



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบการสกัดแบบลำดับขั้นแบบต่อเนื่อง
โดยการไหลสำหรับศึกษาการชะโลหะและธาตุอาหารพืชบางชนิด
จากดินและดินตะกอน

Development of Flow Based On-line Sequential
Extraction Systems for Investigation of Leaching of
Some Metals and Plant Nutrients from Soil and
Sediment

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. จรูญ จักร์มณี

พฤษภาคม 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบการสกัดแบบลำดับขั้นแบบต่อเนื่อง
โดยการไหลสำหรับศึกษาการชะโลหะและธาตุอาหารพืชบาง
ชนิดจากดินและดินตะกอน

Development of Flow Based On-line Sequential
Extraction Systems for Investigation of Leaching of
Some Metals and Plant Nutrients from Soil and
Sediment

รองศาสตราจารย์ ดร. จรุงญ จักรมณี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้สนับสนุนทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษาสำหรับโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณแหล่งทุนสนับสนุนอื่น ๆ ที่มีส่วนเสริมกับโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สกว. ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย และทุนโครงการพัฒนาระบบบัณฑิตศึกษาและการวิจัยทางเคมี (PERCH-CIC) สกอ.

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณนักวิจัยผู้ร่วมงานทุกท่านและนักศึกษาทุกคนที่มีส่วนร่วมในงานวิจัย โดยโครงการนี้ได้มีส่วนสนับสนุนการเรียนและการทำวิจัยของนักศึกษาทุกระดับด้วย

สุดท้ายขอขอบคุณสมาชิกครอบครัวของข้าพเจ้า ที่มีความรักและความเข้าใจในการทำงานวิจัยของข้าพเจ้ามาโดยตลอด

จรูญ จักร์มณี

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5380052

ชื่อโครงการ: การพัฒนาระบบการสกัดแบบลำดับขั้นแบบต่อเนื่องโดยการไหลสำหรับศึกษาการชะ
โลหะและธาตุอาหารพืชบางชนิดจากดินและดินตะกอน

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. จรูญ จักรมณี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: jaroon.jakmunee@cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี (20 กรกฎาคม 2553 ถึง 19 กรกฎาคม 2556)

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบการสกัดแบบลำดับขั้นอย่างต่อเนื่องโดยใช้ระบบการไหลของสารละลาย
ในท่อขนาดเล็ก เพื่อการแยกส่วนโลหะและธาตุอาหารพืชบางชนิดจากดินและดินตะกอน ซึ่งสามารถใช้ใน
การวิเคราะห์ถึงรูปฟอร์มต่างๆ ของโลหะ (เช่น แคดเมียมและตะกั่ว) และธาตุอาหารพืช (เช่น ฟอสฟอรัส)
เพื่อการประเมินความยากง่ายในการเคลื่อนย้าย และการเข้าสู่สิ่งมีชีวิตของสารเหล่านี้ ในการพัฒนาระบบ
วิเคราะห์ดังกล่าว ได้พัฒนาวิธีใหม่ในการหาปริมาณโลหะโดยเทคนิคโวลแทมเมตรีที่สามารถบ่งชี้ถึงโลหะใน
รูปอิสระและรูปที่จับอยู่กับสารหรืออนุภาคอื่นๆ และยังมีการพัฒนาวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้นโดย
พัฒนาชีวไฟฟ้าสัมผัสขึ้นมาใช้แทนชีวไฟฟ้าปรอทที่มีพิษสูง วิธีใหม่นี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์โลหะในสาร
สกัดจากระบบการสกัดแบบลำดับขั้นของดินและดินตะกอนได้ดี มีความสะดวกและมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธี
เดิม รวมทั้งได้พัฒนาระบบโฟลอินเจกชันแอมป์โรเมตรีที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสได้อย่าง
จำเพาะกว่าเดิมและใช้ในระบบการสกัดแบบลำดับขั้นของฟอสฟอรัสจากดินตะกอนได้ทั้งแบบการสกัดแบบ
แบบขั้นและแบบการไหลอย่างต่อเนื่อง สามารถใช้ประเมินผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของฟอสฟอรัสได้
นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชเพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ดินในการ
ทำเกษตรกรรมด้วย เช่น การหาปริมาณฟอสฟอรัส และไนโตรเจน เป็นต้น

คำหลัก: การสกัดลำดับขั้น, การแยกส่วน, การวิเคราะห์โดยการไหล, โลหะ, ธาตุอาหารพืช, ดินและดิน
ตะกอน สิ่งแวดล้อม เกษตรกรรม

Abstract

Project Code: RMU5380052

Project Title: Development of Flow Based On-line Sequential Extraction Systems for Investigation of Leaching of Some Metals and Plant Nutrients from Soil and Sediment

Investigator: Associate Professor Dr. Jaroon Jakmunee
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University

E-mail Address: jaroon.jakmunee@cmu.ac.th

Project Period: 3 years (20 July 2010 - 19 July 2013)

In this research, we developed flow based sequential extraction systems for investigation the leaching of some metals (e.g. cadmium and lead) and phosphorus from soil and sediment. The systems could determine different forms of metals and phosphorus presented in solid samples, which could be applied to assessment of mobility and bioavailability of these chemicals in the environment. On these developments, we explored a new voltammetric method that could indicate free and bound forms of the metals. The method that employing more environmentally friendly bismuth film electrode to replace a highly toxic mercury electrode was also developed. This new method could be applied for determination of metals in the extracted solution from sequential extraction of soil and sediment. It was more convenient and cost less than the conventional method. In addition, flow injection amperometric system was developed for more selective determination of phosphorus and utilized in fractionation of phosphorus in sediment, both by off-line batch extraction and on-line continuous flow extraction. . It could be conveniently used to assess phosphorus in environment. Moreover, we also developed several techniques for determination of plant nutrients, e.g., phosphorus and nitrogen in soil for agriculture activity.

Keywords: Sequential extraction, fractionation, Flow based analysis, metals, plant nutrient, soil and sediment, environment, agriculture

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ.....	ง
1. บทนำ.....	1
1.1. เทคนิคโพลีอินเจกชันอะนาไลซิส.....	5
1.2. เทคนิคโวลแทมเมตรี.....	6
1.3. เทคนิคแอมแปโรเมตรี.....	7
1.4. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	7
1.5. สรุปรงานวิจัยในโครงการนี้.....	8
2. การทดลอง ผลการทดลอง และวิจารณ์	10
2.1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โลหะในรูปไอออนอิสระและที่จับกับสารอื่น โดยเทคนิคการไหลร่วมกับโวลแทมเมตรี.....	10
2.2. การปรับปรุงระบบตรวจวัดแบบโวลแทมเมตรีสำหรับการหาปริมาณโลหะหนักในสารสกัดชนิดต่างๆ ของการสกัดแบบลำดับขั้น.....	12
2.2.1. ศึกษาผลของสารสกัดชนิดต่างๆ ต่อการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก.....	12
2.2.2. การออกแบบเบื้องต้นและทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ในการสกัดแบบลำดับขั้นเพื่อสกัดโลหะหนักจากดิน.....	13
2.3. การพัฒนาวิธีแอดไดกสตริปปิงโวลแทมเมตรีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น.....	15
2.4. การพัฒนาวิธีแอดไดกสตริปปิงโวลแทมเมตรีที่ใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่เคลือบด้วยบิสมัทเป็นขั้วไฟฟ้าขั้วทำงาน	18
2.4.1. การศึกษาถึงผลของสารละลายที่ใช้สกัดต่อการวิเคราะห์โลหะด้วยวิธีแอดไดกสตริปปิงโวลแทมเมตรี	22
2.4.2. การทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารละลายจากการสกัดลำดับขั้นของตัวอย่างดินมาตรฐานและประยุกต์ใช้กับดินตะกอน.....	25
2.5. ระบบโพลีอินเจกชันแอมแปโรเมตรีสำหรับการวิเคราะห์หาฟอสฟอรัส.....	27
2.5.1. ลักษณะเฉพาะทางเคมีวิเคราะห์ของระบบ	29
2.5.2. การศึกษาตัวรบกวน.....	32

2.6 การประยุกต์ใช้ระบบที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่ถูกชะจาก ตัวอย่างดินตะกอนด้วยวิธีการเซแบบออฟไลน์คอลัมน์	35
2.7 ออกแบบและประกอบระบบการสกัดแบบลำดับขั้นแบบต่อเนื่องสำหรับสกัด ฟอสเฟตจากตัวอย่างดิน	40
2.8 การพัฒนาระบบคัลเลอริเมตรีที่ใช้กล้องถ่ายรูปของโทรศัพท์มือถือมาใช้วิเคราะห์ ฟอสเฟต	45
2.9 การพัฒนาระบบโพลีอินเจกชันคอนดักโทเมตรีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช	45
เอกสารอ้างอิง	46
ผลงานจากโครงการ.....	48
ภาคผนวก ก ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ	
ภาคผนวก ข ผลงานที่ตีพิมพ์ใน conference proceeding	
ภาคผนวก ค Manuscript ผลงานที่อยู่ระหว่างการพิจารณา	
ภาคผนวก ง การจัดอบรมวิชาการและการให้บริการชุมชน	

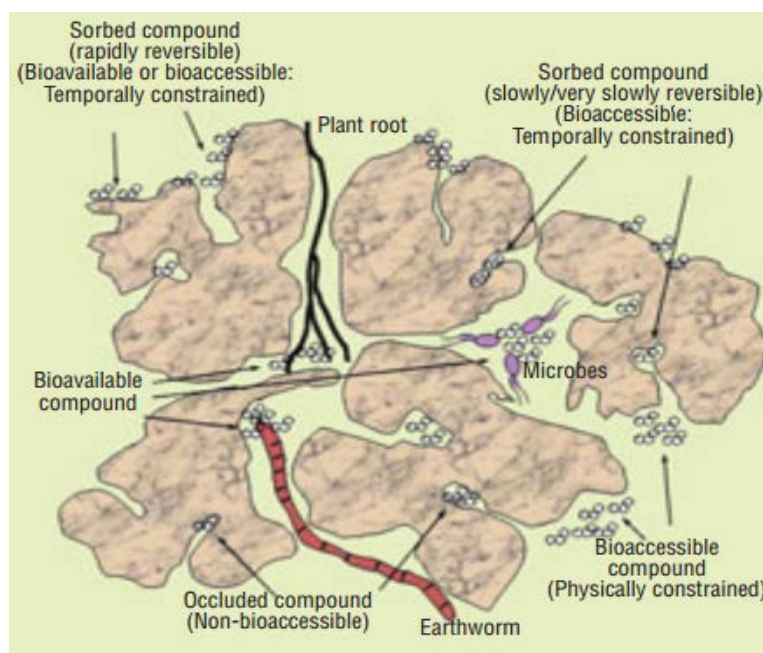
1. บทนำ

การวิเคราะห์ปริมาณรวมของไอออนของโลหะ โดยเฉพาะโลหะที่เป็นพิษ ในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมนั้นในปัจจุบันพบว่าไม่เพียงพอแล้ว เนื่องจากโลหะในสิ่งแวดล้อมอยู่ในหลายรูปแบบ (forms or species) ซึ่งมีพฤติกรรมแตกต่างกัน เช่น ความสามารถในการเคลื่อนย้ายที่ (mobility) และความสามารถในการเข้าสู่สิ่งมีชีวิต (bioavailability) เป็นต้น มีความแตกต่างกัน ข้อมูลจากการวิเคราะห์ปริมาณรวมจึงอาจจะไม่สัมพันธ์กับผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต [1] ดังนั้นการวิเคราะห์ลงไปถึงรูปแบบหรือสปีชีส์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ตัวอย่างเช่น โครเมียมในรูปแบบที่มีเลขออกซิเดชัน +6 (Cr(VI)) จะเป็นสารก่อมะเร็งและมีความเป็นพิษสูงมากกว่าโครเมียมในรูปแบบที่มีเลขออกซิเดชัน +3 (Cr(III)) มาก หรือโลหะที่อยู่ในรูปไอออนอิสระ (free form) จะถูกเคลื่อนย้ายและเข้าสู่สิ่งมีชีวิตได้ง่ายกว่าโลหะที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อน หรือเกาะอยู่กับอนุภาคต่างๆ (bound form) มาก ในทางเคมีวิเคราะห์การพัฒนาวิธีใหม่ที่สามารถตรวจหาปริมาณของโลหะในรูปแบบต่างๆ ที่มีความสำคัญทางสิ่งแวดล้อมแตกต่างกันจึงมีความสำคัญและน่าสนใจมาก เนื่องจากผลกระทบของโลหะต่อระบบนิเวศจะขึ้นอยู่กับรูปแบบของมันและการจับอยู่กับอนุภาคของแข็ง [2]

โลหะหนักต่างๆ มักจะอยู่ในรูปสารประกอบและมีความเสถียรอยู่ในเปลือกโลก อย่างไรก็ตามโดยกระบวนการกัดกร่อนตามธรรมชาติ และโดยเฉพาะกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ เช่น การทำเหมืองแร่ เป็นต้น ทำให้มีการปลดปล่อยโลหะหนักออกมาสู่สิ่งแวดล้อมในปริมาณมาก ซึ่งอาจละลายลงสู่แหล่งน้ำ หรือตกตะกอน หรือดูดซับอยู่กับอนุภาคดิน มีการแพร่กระจาย เคลื่อนย้ายจากแหล่งเดิมออกไป รวมทั้งการเข้าสู่สิ่งมีชีวิตและห่วงโซ่อาหารทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ รวมทั้งมนุษย์ โลหะที่เกี่ยวข้องอยู่กับอนุภาคของแข็ง เช่น ดินและดินตะกอน อาจอยู่ในรูปแบบต่างๆ [3] ดังแสดงในรูป 1.1

ความเป็นอันตรายของโลหะที่ปนเปื้อนสัมพันธ์กับการเข้าถึงทางชีวภาพ (bioaccessibility or bioavailability) ของโลหะเหล่านั้น เช่น โลหะที่ดูดซับอยู่กับอนุภาคดินสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนละลายออกมาในน้ำที่สัมผัสอยู่กับดิน จึงเข้าสู่สิ่งมีชีวิตได้ง่ายกว่าส่วนของโลหะที่เกิดเป็นสารประกอบต่างๆ อยู่กับอนุภาคดิน หรือถูกห่อหุ้มอยู่ภายใน (occluded) อนุภาคดิน ซึ่งเทคนิคการสกัดลำดับขั้น (sequential extraction) เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการหา bioaccessibility/bioavailability ของโลหะที่มีในตัวอย่างของแข็งเพื่อบอกถึงความเป็นอันตรายของโลหะที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ซึ่งวิธีการสกัดสามารถทำได้ทั้งในระบบแบทช์ (batch) และระบบการไหลอย่างต่อเนื่อง ซึ่งแต่เดิมนิยมใช้การสกัดแบบแบทช์แต่การสกัดวิธีนี้มีข้อด้อย เช่น ไม่ให้ข้อมูลจลน์ของการไหลผ่านของ

สารสกัดเนื่องจากการไหละนั้นเป็นการจำลองการชะที่เกิดขึ้นในธรรมชาติของน้ำฝนที่ไหลชะตัวอย่างมากกว่าการแช่สกัดอยู่นิ่ง เกิดการดูดซับกลับคืนของโลหะกับตัวอย่าง (re-adsorption) เป็นต้น ดังนั้นการใช้เทคนิคการไหลร่วมกับการสกัดลำดับขั้นเป็นการกำจัดข้อด้อยที่กล่าวมาข้างต้นได้ซึ่งเป็นแนวคิดใหม่ที่เกิดขึ้นมาใน 10 ปีที่ผ่านมา



รูป 1.1 โลหะที่เกี่ยวข้องอยู่กับอนุภาคดิน [3]

การสกัดลำดับขั้นนี้บางครั้งจะถูกกล่าวถึงในเทอมของการแยกส่วน (fractionation) เพราะเป็นการสกัดแยกส่วนต่างๆ ออกมาตามลำดับ โดยใช้สารสกัดที่มีความแรงสูงขึ้นตามลำดับ หรือมีความสามารถในการสกัดเอาสารที่สนใจในรูปฟอร์มที่จับอยู่กับอนุภาคของแข็งอย่างแข็งแรงจากน้อยไปมากตามลำดับ สารละลายที่ใช้สกัดจะละลายเอาโลหะหรือสารในรูปฟอร์มที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบทางธรณีวิทยาตอนที่อยู่เ็นของแข็งออกมา เช่นสามารถบ่งบอกถึงส่วนที่เป็น ส่วนที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable fraction) ส่วนที่ละลายในกรด (acid soluble fraction) ส่วนที่ถูกรีดิวซ์ได้ (reducible fraction) และส่วนที่ถูกออกซิไดซ์ได้ (oxidizable fraction) เป็นต้น [4] ซึ่งอาจใช้บ่งบอกถึงโอกาสในการเข้าสู่สิ่งมีชีวิตและทำให้เกิดความเป็นพิษขึ้นได้ วิธีสกัดแบบลำดับขั้นนี้จึงมีการใช้ในการศึกษาทางสิ่งแวดล้อมและการหาวิธียับยั้งการแพร่กระจายของโลหะหนัก หรือการพยายามหาวิธีแก้ไขแหล่งที่มีการปนเปื้อนไปแล้ว ซึ่งในการสกัดแยกส่วนโลหะมีผู้พัฒนาวิธีการต่างๆ กันหลายวิธี ดังแสดงตัวอย่างบางวิธีในตาราง 1.1 วิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางคือวิธีของ Tessier *et al.* [6] ซึ่งมี 5 ขั้นตอนที่ใช้สารสกัดต่างๆ กันดังแสดงในตาราง 1.2

ตาราง 1.1 ตัวอย่างบางวิธีการในการศึกษาการแยกส่วนโลหะในดินโดย sequential extraction procedures

Procedures	Analytes	Analytical technique
Community Bureau of reference (BCR)[5]	Cd, Cu, Cr, Ni, Pb and Zn	FAAS, GF-AAS
Tessier <i>et al.</i> [6]	Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg Fe and Mn	FAAS, ET-AAS, ICP-OES HG-ICP-OES
Maiz <i>et al.</i> [7]	Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn	FAAS, ET-AAS
Galán <i>et al.</i> [8]	Pb, Zn, Cu and Cd	ICP-OES
Geological Society of Canada (GCS) [9]	Cd, Cr, Cu, Ni and Zn	ICP-OES

ตาราง 1.2 วิธีการสกัดแยกส่วนโลหะในดินโดยการสกัดลำดับขั้นตามวิธีของ Tessier *et al.* [6]

		Time	Temp	Quantity	Tessier	
					1 g	
F1	Exchangeable	1 hr	continuous agitation	8 mL	1 mol <u>MgCl₂</u> pH 7.0	•Salts
				8 mL	or 1 mol <u>Na OAc</u> pH 8.2	-MgCl ₂
F2	Bound to Carbonates	5 hr	continuous agitation-leached at rm temp.	8 mL	1 mol Na OAc pH 5.0 w/ <u>acetic acid</u>	- NaOAc
F3	Bound to Iron and Manganese Oxides	6 hr		20 mL	0.3 mol Na ₂ S ₂ O ₄ + 0.175 mol <u>Na-citrate</u> + 0.025 mol H-citrate	- NH ₄ OAc
			or 96° ± 3 occasional agitation	20 mL	0.04 mol NH ₂ OH*HCl in 25% (v/v) <u>HOAc</u>	- Na-citrate
		2 hr	85° ± 2 with occasional agitation	3 mL	0.02 mol <u>HNO₃</u>	•Inorganic acids
F4	Bound to Organic Matter	3 hr	85° ± 2 with intermittent agitation	5 mL	30% H ₂ O ₂ pH 2 with <u>HNO₃</u>	-HNO ₃
				3 mL	30% H ₂ O ₂ pH 2 with <u>HNO₃</u>	- HF
		30 min	continuous agitation	5 mL	3.2 mol <u>NH₄OAc</u> in 20% (v/v) <u>HNO₃</u> -dilute to 20 mL	- HClO ₄
F5	Residual			1 mL Unk	<u>HF-HClO₄ 5:1</u> <u>HF-HClO₄ 10:1</u> <u>HClO₄ 12 N HCl</u>	- HCl
						•Organic acid
						- HOAc

ซึ่งการสกัดส่วนใหญ่จะทำในระบบแบทช์ แล้วนำสารสกัดที่ได้จากแต่ละส่วน (F1-F5) มาตรวจหาปริมาณโลหะหนักที่หลุดออกมา โดยมักจะใช้วิธีทางสเปกโทรเมตรี เช่น วิธีอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรเมตรี ทั้งแบบ flame AAS และ Electrothermal AAS วิธีอินดักทีฟพลาสมาออปติคัลอีมิสชันสเปกโทรเมตรี และวิธีอินดักทีฟพลาสมาแมสสเปกโทรเมตรี เป็นต้น ซึ่งเป็นเครื่องมือขนาดใหญ่และมีราคาแพง รวมทั้งมีค่าใช้จ่ายในการใช้งานสูง ในงานวิจัยนี้ เราสนใจพัฒนาวิธีโวลแทมเมตรีมาใช้ในการวิเคราะห์แทนเนื่องจากเป็นเครื่องมือขนาดเล็ก ราคาต่ำกว่ามาก และมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ รวมทั้งจะลดความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ลงได้ เนื่องจากสารละลายที่ใช้ในการสกัดดังตาราง 1.2 จะเป็นพวกกรดและเกลือ ซึ่งสามารถใช้ทำหน้าที่เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในระบบการตรวจวัดด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรีได้

ในปัจจุบันมีการพัฒนาการสกัดลำดับขั้นแบบการไหลอย่างต่อเนื่อง (Flow-through dynamic fractionation) [10-20] มีกระบวนการคือ สารสกัดที่มีความสดใหม่จะไหลผ่านตัวอย่างปริมาณน้อย ที่บรรจุในภาชนะขนาดเล็กอย่างต่อเนื่องจนเข้าสู่สมดุลของการสกัด เพื่อให้เกิดการสกัดที่สมบูรณ์ ในการสกัดด้วยเทคนิคนี้มีข้อดี คือ การสกัดเป็นการจำลองของสภาพแวดล้อมจริงที่เกิดขึ้นเมื่อโลหะถูกชะสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งปริมาณของสารที่ถูกชะออกมาจะขึ้นกับเวลาที่ของเหลวไหลผ่าน และให้ผลการวิเคราะห์ที่ชัดเจนเป็นจริงมากขึ้น เมื่อใช้ในการสกัดโลหะจากตัวอย่างที่มีลักษณะแหล่งที่มาทางธรณีวิทยาที่แตกต่างกัน [10]

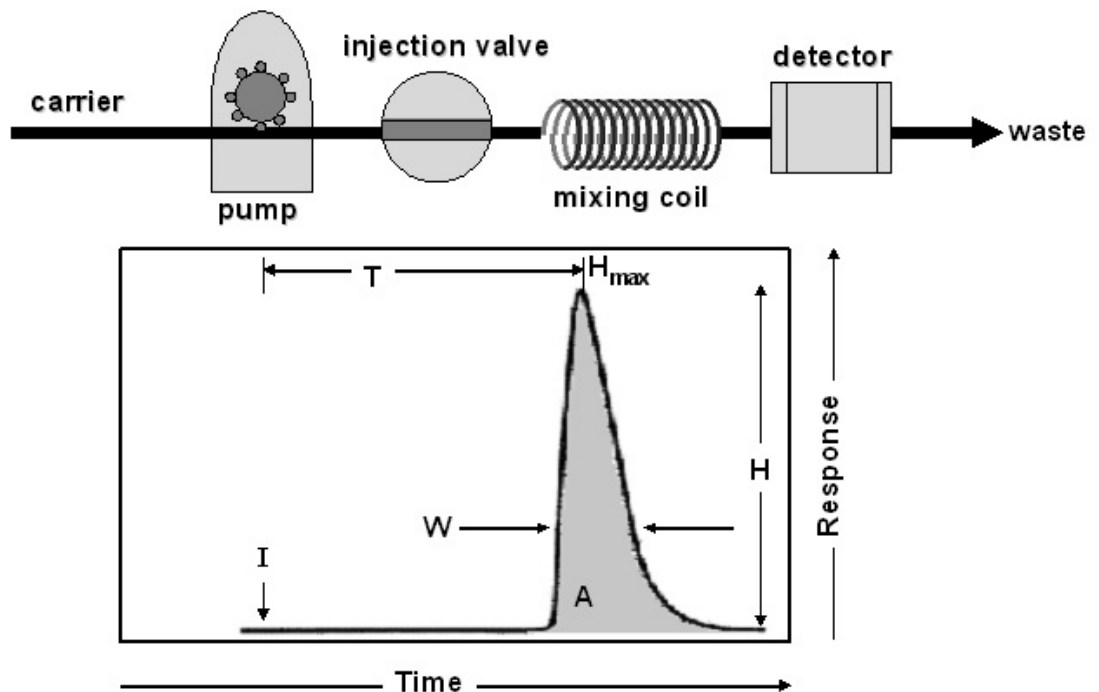
ในกรณีของธาตุอาหารพืช เช่น ฟอสฟอรัสก็มีการวิเคราะห์แยกส่วนโดยการสกัดลำดับขั้นเช่นกัน [11, 21-24] เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสรวมในดินหรือดินตะกอน จะให้ข้อมูลไม่เพียงพอในการประเมินความเสี่ยงต่อสิ่งแวดล้อม [21-23] มีการพัฒนาวิธีสกัดลำดับขั้นสำหรับฟอสฟอรัสมากมายโดยมากมักใช้สารละลายกรดและด่าง ในงานวิจัยนี้สนใจพัฒนาระบบสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้วิธีการสกัดของอีลต์เจส-ลิจลิลมา [24] ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ โดยใช้สารสกัด 3 ชนิดคือสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์สำหรับสกัดฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำได้ซึ่งเป็นรูปฟอร์มที่เป็นประโยชน์ต่อพืช สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สำหรับสกัดรูปฟอร์มฟอสฟอรัสที่จับอยู่กับเหล็กและอลูมิเนียม และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกสำหรับสกัดรูปฟอร์มฟอสฟอรัสที่จับกับแคลเซียม ตามลำดับ

สำหรับในงานวิจัยนี้ จะมีการพัฒนาเครื่องมือ/อุปกรณ์ และวิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์โลหะหนัก คือ แคดเมียมและตะกั่ว โดยอาศัยเทคนิคแอดโนติกสตริบปีงโวลแทมเมตรี เพื่อตรวจวิเคราะห์สปีชีส์ของโลหะ และประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการสกัดแบบลำดับขั้นในการศึกษาส่วนต่างๆ ของโลหะที่อยู่ในตัวอย่างของแข็ง และพัฒนาวิธีโพลีอินเจกชันแอมแปโรเมตรีสำหรับหาปริมาณฟอสฟอรัสที่ถูกสกัดออกมาจากระบบสกัดลำดับขั้น และพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ที่สะดวกและมีค่าใช้จ่ายไม่สูงสำหรับวัดหาปริมาณธาตุอาหารพืชบางชนิด เช่น

ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช และปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในดิน เป็นต้น ซึ่งมีความสำคัญทางด้านเกษตรกรรม และสิ่งแวดล้อม

1.1 เทคนิคโพลินเจกชันอะนาลิซิส

เทคนิคโพลินเจกชันอะนาลิซิส หรือ เอฟไอเอ เป็นเทคนิคที่ได้ถูกพัฒนามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1975 เทคนิคนี้มีหลักการสำคัญคือการฉีดสารเข้าไปในกระแสการไหลของสารละลายที่ไหลอย่างอัตราคงที่ ในระหว่างที่สารละลายที่ถูกฉีดเข้าไปไหลไปยังเครื่องตรวจจับ จะเกิดการแพร่กระจาย (Dispersion) ที่มีรูปแบบแน่นอนและควบคุมได้ ทำให้เกิดการผสมของสารที่ถูกฉีดกับสารที่ไหลอยู่และเกิดปฏิกิริยาขึ้น ระยะเวลาตั้งแต่ฉีดสารจนสารไหลไปถึงจุดตรวจจับจะมีค่าคงที่จึงทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดำเนินไปเท่ากันทุกครั้งที่ฉีด ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องรอให้มีการเกิดปฏิกิริยาจนถึงจุดสมดุลหรือ steady state เหมือนกับในกรณีการวิเคราะห์ในระบบ batch ทั่วไป จึงช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ลงได้มาก นอกจากนี้ ปริมาณสารที่ใช้ก็ลดลงอย่างมาก เนื่องจากการไหลที่ควบคุมได้หรือยังเป็น Laminar flow จะเกิดขึ้นในท่อขนาดเล็กมากเท่านั้น แผนผังและลักษณะของสัญญาณที่จะบันทึกได้จากระบบเอฟไอเอ แสดงดังรูป 1.2



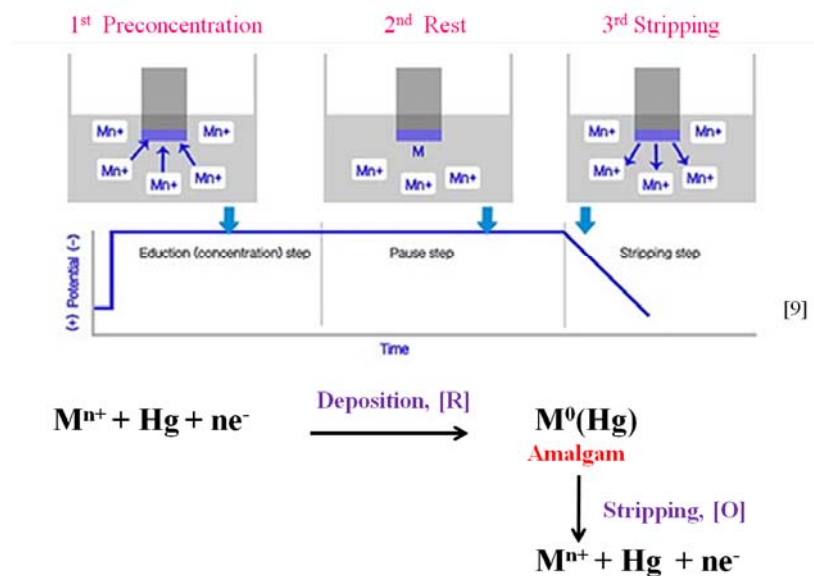
รูป 1.2 แผนผังของระบบโพลินเจกชันอะนาลิซิสอย่างง่ายและสัญญาณที่จะบันทึกได้จากการฉีดสารเข้าไป 1 ครั้ง

ส่วนประกอบพื้นฐานของระบบได้แก่ บั๊มพ์ วาล์วฉีดสาร ส่วนผสมสาร หรือ reactor อุปกรณ์ตรวจวัดในระบบการไหลและเครื่องบันทึกสัญญาณ ซึ่งสามารถเลือกได้หลากหลาย ระบบเครื่องมือที่ผลิตขายในทางการค้ามีราคาในระดับ 500,000 – 1,000,000 บาท

1.2 เทคนิคโวลแทมเมตรี

เทคนิคโวลแทมเมตรีเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมี ที่มีการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปแก่ขั้วไฟฟ้า แล้วทำการตรวจวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีที่ขั้วไฟฟ้า อันเนื่องมาจากสารที่สนใจเข้ามาจับหรือให้อิเล็กตรอนที่ขั้วไฟฟ้าเมื่อขั้วไฟฟ้ามีศักย์ที่เหมาะสมจำเพาะกับการเกิดปฏิกิริยาของสารนั้นๆ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะมักจะใช้เทคนิคแอนโอดิกสทริปปิงโวลแทมเมตรี ซึ่งมีความไววิเคราะห์ (sensitivity) สูง เพราะมีขั้นตอนเพิ่มความเข้มข้นโดยทำการอิเล็กโทรไลซิสเกาะติดโลหะที่สนใจไว้ที่ขั้วไฟฟ้า เช่น ในรูปของอะมัลกัมบนขั้วปรอท จากนั้นจึงทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าเพื่อให้โลหะที่สนใจเกิดออกซิเดชันละลายกลับออกมาในสารละลายที่ศักย์ไฟฟ้าเฉพาะตัวของโลหะชนิดนั้นๆ ดังรูป 1.3 เทคนิคนี้จึงสามารถวิเคราะห์โลหะหลายชนิดได้พร้อมกัน

Anodic stripping voltammetry, ASV



รูป 1.3 หลักการของเทคนิคแอนโอดิกสทริปปิงโวลแทมเมตรี

เทคนิคแอนดิกสทริปปิงโวลแทมเมตรี มักใช้ขั้วไฟฟ้าปรอทเป็นขั้วไฟฟ้าทำงานที่สารที่สนใจจะไปเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากสามารถใช้งานในช่วงศักย์ลบได้ดีโดยไม่มีการเกิดปฏิกิริยาของแก๊สไฮโดรเจน อย่างไรก็ตามปรอทมีความเป็นพิษสูงมาก จึงมีความพยายามพัฒนาขั้วไฟฟ้าใหม่ๆ ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น ซึ่งขั้วบิสมาทสามารถใช้ในช่วงศักย์ไฟฟ้าลบและเกิดเป็นอัลลอยกับโลหะอื่นได้ดี จึงเป็นขั้วที่ใช้งานได้ดีสำหรับเทคนิคแอนดิกสทริปปิงโวลแทมเมตรี

1.3 เทคนิคแอมแปโรเมตรี

เทคนิคแอมแปโรเมตรีเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีอีกเทคนิคหนึ่ง ที่มีการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่แก่ขั้วไฟฟ้าทำงานแล้วทำการตรวจวัดกระแสไฟฟ้า ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่มาเกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีบนขั้วไฟฟ้า โดยเลือกศักย์ไฟฟ้าให้เหมาะสมทำให้เทคนิคนี้มีความจำเพาะสูง ในงานวิจัยนี้ ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบฟอสโฟโมลิบเดต ซึ่งพบว่าให้ความไววิเคราะห์สูงและมีความจำเพาะสูงกว่าวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยทนต่อการรบกวนจากซิลิเกตได้สูงมาก และไม่มีปัญหาการรบกวนจากสีของสารละลายและการหักเหของแสงเนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายสูง เหมือนในกรณีของวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาวิธีโวลแทมเมตรีร่วมกับเทคนิคการไหลที่สามารถวิเคราะห์สปีชีส์ของโลหะได้
2. เพื่อพัฒนาวิธีแอนดิกสทริปปิงโวลแทมเมตรีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทำงานที่เป็นขั้วบิสมาท และประยุกต์ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะในสารสกัดจากการสกัดลำดับชั้นของดินและดินตะกอน
3. เพื่อพัฒนาระบบการสกัดลำดับชั้นของฟอสฟอรัสที่มีการตรวจวัดด้วยโพลีอินเจกชันแอมแปโรเมตรี
4. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบใหม่ ที่มีความสะดวกและค่าใช้จ่ายต่ำสำหรับวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชในดินสำหรับการเกษตรกรรม

1.5 สรุปงานวิจัยในโครงการนี้

ในโครงการนี้ ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางเคมีสำหรับวิเคราะห์โลหะหนักและธาตุอาหารพืชบางชนิด โดยในการวิเคราะห์โลหะหนัก เช่น แคดเมียมและตะกั่ว เป็นต้น จะอาศัยเทคนิคแอนโอดิกสตริปปีงโวลแทมเมตรี ในระบบแรกจะใช้ขั้วไฟฟ้าปรอทเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ร่วมกับระบบการไหลที่มีส่วนของการย่อยสลายตัวอย่างด้วยรังสียูวี เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์สปีชีส์ของโลหะที่อยู่ในรูปฟอร์มอิสระ (free form) และที่อยู่ในฟอร์มที่จับอยู่กับ อนุภาคหรือสารประกอบอื่นๆ (bound form) ในตัวอย่างน้ำ ทั้งนี้อาศัยหลักการที่เทคนิคแอนโอดิกสตริปปีง โวลแทมเมตรีจะตรวจวัดเฉพาะโลหะที่อยู่ในรูปฟอร์มอิสระเท่านั้น และเมื่อทำการย่อยตัวอย่างจะมีการเปลี่ยนโลหะในรูป bound form ไปเป็น free form ทำให้วิเคราะห์หาปริมาณโลหะรวมได้ โลหะในรูป free form จะมี bioavailability สูงกว่า นั่นคือจะเป็นพิษมากกว่า รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีที่พัฒนาขึ้นอยู่ในภาคผนวก ก.1

ในระบบที่สองจะทำการพัฒนาขั้วไฟฟ้าฟิล์มบิสมัทมาใช้แทนขั้วปรอท โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอนโอดิกสตริปปีงโวลแทมเมตรีในระบบการไหล ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างน้ำที่ปนเปื้อนโลหะหนักได้ รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีนี้อยู่ในภาคผนวก ข

เทคนิคแอนโอดิกสตริปปีงโวลแทมเมตรี ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าฟิมพ์สกรีนคาร์บอนที่เคลือบด้วยฟิล์มบิสมัทได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์แคดเมียมและตะกั่ว ในสารสกัดชั้นต่างๆ ของวิธีการสกัดแบบลำดับขั้นของดินและดินตะกอน เพื่อการประเมินผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของโลหะที่ปนเปื้อนในดินและดินตะกอน วิธีดังกล่าวนี้มีความสะดวกและมีค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วโดยมีการเตรียมตัวอย่างน้อย เนื่องจากสารสกัดที่ใช้มีสมบัติเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรีได้ รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีนี้อยู่ในภาคผนวก ค.1-ค.2

ในการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช ได้ทำการพัฒนาเทคนิคโพลีอินเจคชันแอมแปโรเมตรีสำหรับหาปริมาณฟอสฟอรัส ซึ่งพบว่าสารประกอบฟอสโฟโมลิบเดตสามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันบนขั้วไฟฟ้าแกลสซีคาร์บอนได้ง่ายกว่าสารประกอบของซิลิเกตและอาร์ซีเนต ทำให้สามารถนำวิธีดังกล่าวไปใช้วิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่ถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างดินและดินตะกอนได้ โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีข้อได้เปรียบวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี เช่น ไม่มีการรบกวนจากสีและอนุภาคคอลลอยด์ที่อาจมีอยู่ในตัวอย่าง ได้พัฒนาระบบการสกัดแบบลำดับขั้นของฟอสฟอรัสโดยใช้คอลัมน์แบบออฟไลน์ เพื่อทำการแยกส่วนฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปฟอร์มต่างๆ ในดินและดินตะกอน แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น รายละเอียดดังในภาคผนวก ค.3 จากนั้นได้พัฒนาระบบการสกัดแบบลำดับขั้นของฟอสฟอรัสโดยใช้คอลัมน์แบบออนไลน์ ซึ่งสามารถทำการแยกส่วนฟอสฟอรัสได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งทำให้ได้โปรไฟล์ของ

การสกัด ที่ทำให้เห็นลักษณะทางจุลศาสตร์ของการชะฟอสฟอรัสออกมาจากตัวอย่างของแข็ง

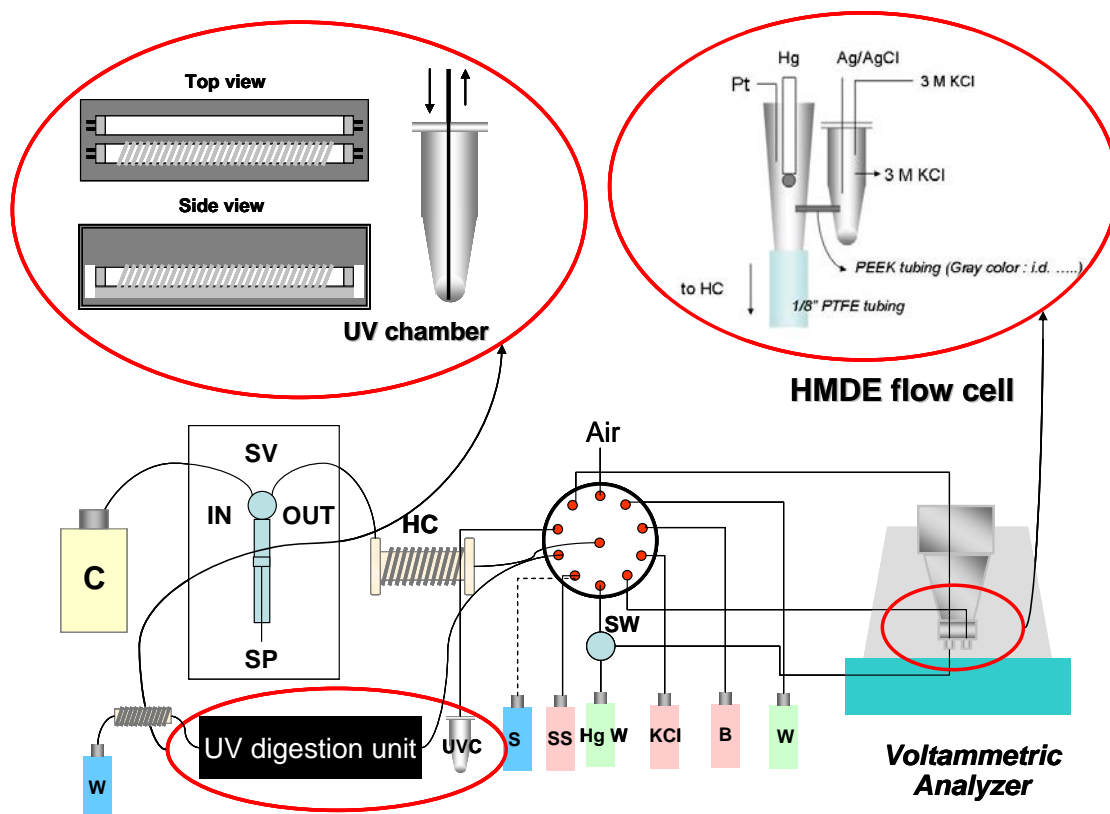
นอกจากนี้ ได้พัฒนาวิธีอัลเลอริเมตรอย่างง่ายที่อาศัยการตรวจวัดความเข้มสีด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องของโทรศัพท์มือถือ และสามารถหาปริมาณฟอสฟอรัสในดินด้วยโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นในระบบแอนดรอยด์ รายละเอียดดังภาคผนวก ก.2 และทำการพัฒนาระบบโพลีอินเจคชันคอนดักโทเมตรีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ที่อยู่ในรูป อนินทรีย์ไนโตรเจนในดิน รายละเอียดดังภาคผนวก ก.3 ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ได้นำไปใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพดินแก่เกษตรกร เพื่อการจัดการดินและปุ๋ยในการทำเกษตรสมัยใหม่

จากงานวิจัยข้างต้นนี้ นอกจากจะทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่ที่สามารถตีพิมพ์ในวารสารชั้นนำระดับนานาชาติแล้ว ความรู้พื้นฐานที่ได้ยังสามารถพัฒนาต่อยอดไปใช้งานได้จริง เครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นได้ใช้ประโยชน์ในการเรียนการสอน และประยุกต์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างดินของเกษตรกร ซึ่งจะเป็นการพึ่งตนเองและทำให้เกิดการพัฒนาอย่างยั่งยืน

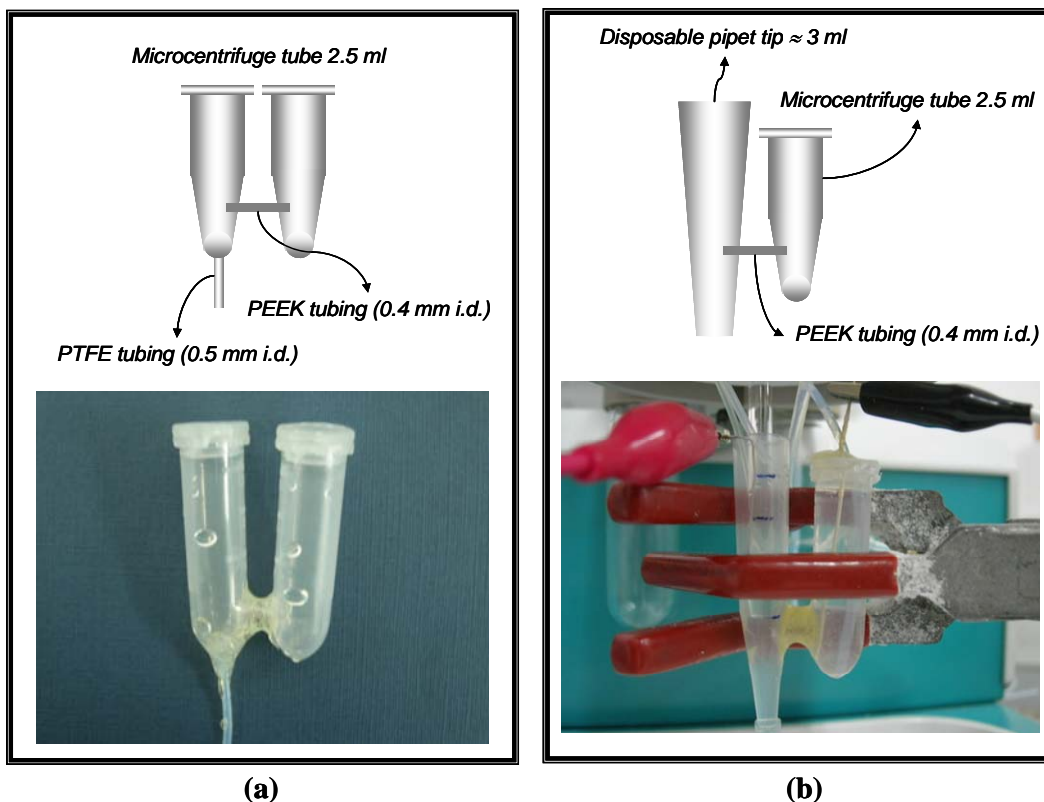
2. การทดลอง ผลการทดลอง และวิจารณ์

2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โลหะในรูปไอออนอิสระและที่จับกับสารอื่น โดยเทคนิคการไหลร่วมกับโวลแทมเมตรี

ได้พัฒนาระบบซีเควนเซียลอินเจกชันโวลแทมเมตรี เพื่อให้การหาปริมาณโลหะหนัก ทำได้สะดวก ประหยัดสารเคมี และมีความเป็นอัตโนมัติสูงขึ้น โดยพัฒนาเพิ่มเติมจากระบบที่เคยศึกษามาก่อนหน้านี้ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าหยดปรอทแขวนเป็นขั้วไฟฟ้าทำงานเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดี เช่น ให้ผิวขั้วไฟฟ้าที่ใหม่อยู่เสมอซึ่งช่วยลดการปนเปื้อนในการวิเคราะห์ และปรอทสามารถเกิดอะมัลกัมกับโลหะที่สนใจหาปริมาณได้ดีจึงช่วยเพิ่มความเข้มข้นโลหะที่มีปริมาณน้อยขึ้นมาได้มาก ระบบที่พัฒนาขึ้นแสดงดังรูป 1 โดยได้ออกแบบโวลแทมเมตริกเซลล์ขนาดเล็ก (small scale voltammetric cell) ขึ้นโดยใช้ปิเปตทิปดังแสดงในรูป 2 ซึ่งช่วยลดปริมาตรสารละลายที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ลงไปได้มาก ระบบดังกล่าวนี้จะถูกควบคุมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อควบคุมการดูด/ผลักสารละลายต่างๆ ตามขั้นตอนที่กำหนด โดยมีหน่วยย่อยสลายสารโดยใช้รังสียูวี (on-line UV digestion unit) ต่อเข้ากับระบบด้วย เพื่อทำหน้าที่เตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ โดยจะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์หรืออนุภาคคอลลอยด์เล็กๆ ที่จับไอออนของโลหะไว้ ทำให้วิธีการนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ สปีชีส์ของโลหะในรูป free ion และ bound ion ได้ โดยอาศัยหลักการที่เทคนิคโวลแทมเมตริกจะตรวจวัดเฉพาะโลหะไอออนที่อยู่ในรูป free ion เท่านั้น ดังนั้น หากทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยตรงโดยไม่ผ่านระบบย่อยสลายจะเป็นการหาปริมาณ free metal ions และถ้านำตัวอย่างผ่านระบบการย่อยสลายจะมีการเปลี่ยน bound metal ions ไปเป็น free metal ions ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณโลหะรวมทั้งสองฟอร์มได้ รายละเอียดเกี่ยวกับเรื่องนี้โปรดดูในภาคผนวก ก.1



รูป 2.1 ระบบซีเควนเชียลอินเจคชันโวลแทมเมตรีที่พัฒนาขึ้น (C = carrier (Milli-Q water); SV = syringe valve; SP = syringe pump; HC = holding coil; SW = 3-way switching valve; UVC = UV chamber; S = sample; SS = single standard; Hg W = mercury waste; NaCl = 3 M sodium chloride; B = 3 M acetate buffer; W = waste)



รูป 2.2 Small scale voltammetric cell; (a) microcentrifuge tube 2.5 mL with cover; (b) disposable pipet tip 3 mL

2.2 การปรับปรุงระบบตรวจวัดแบบโวลแทมเมตรีสำหรับการหาปริมาณโลหะหนักในสารสกัดชนิดต่างๆ ของการสกัดแบบลำดับขั้น

ได้ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโลหะ ด้วยเทคนิคอะนอดิกสทริปปิงโวลแทมเมตรี ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าปรอทเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน โดยศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ทางด้านเคมีและตัวแปรของเครื่องมือ ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ Zn, Pb, Cd และ Cu พร้อมกัน ดังสรุปในตาราง 2.1

2.2.1 ศึกษาผลของสารสกัดชนิดต่างๆ ต่อการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก

ในระบบการสกัดแบบลำดับขั้นจะมีการใช้สารละลายที่มีความแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในการชะละลายโลหะหนักออกมาจากวัสดุที่เป็นของแข็ง โดยในงานวิจัยนี้สนใจใช้สารละลายตามวิธีการมาตรฐานของสหภาพยุโรป ซึ่งใช้ 0.05 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.4 M CH_3COOH , 0.1 M $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ pH 3.6, 0.1 M $(\text{NaPO}_3)_6 + \text{KOH}$ pH 11 และ 0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ ตามลำดับ จึงต้องศึกษาถึงผลขององค์ประกอบ (matrix) ของตัวอย่างที่แตกต่างกันต่อความแม่นยำและความถูกต้องในการหาปริมาณโลหะ พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อการ

หาปริมาณ Zn Cd Pb Cu ด้วยเทคนิค SWASV และมี ช่วงของกราฟมาตรฐาน อยู่ในช่วง 0 – 200 ppb ยกเว้นสารสกัด 0.1 M (NaPO_3)₆+ KOH pH 11 จะต้องเติม 2 mL 1 M acetate buffer pH 4.6 ลงไปช่วยเพื่อไม่ให้เกิดการตกตะกอนหรือแขวนลอย ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่มีปัญหา

ตาราง 2.1 สภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์โลหะ

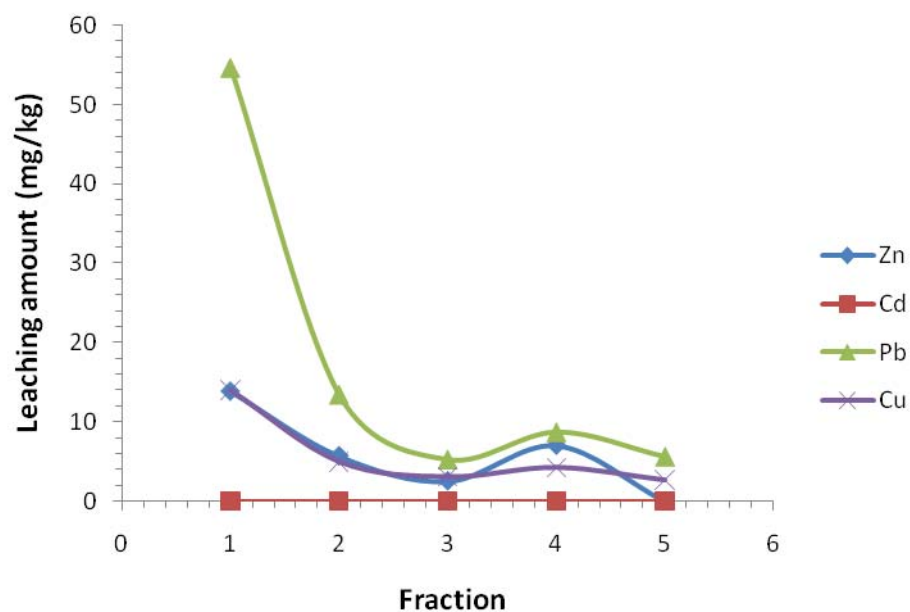
ตัวแปร	ค่าที่เลือก
Voltammetric analysis mode	square wave anodic stripping
Initial purge time	180 s
Condition cycles	
Start potential	-1.20 V
End potential	0.15 V
Pretreatment	-1.20 V
Deposition potential	45 s
Deposition time	5 s
Equilibration time	
Sweep	
Start potential	-1.20 V
End potential	0.15 V
Voltage step	0.01 V
Amplitude	0.04 V
Frequency	50 Hz
Electrolyte	
Acetate buffer pH 4.6 concentration	0.1 M

2.2.2 การออกแบบเบื้องต้นและทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ในการสกัดแบบลำดับขั้นเพื่อสกัดโลหะหนักจากดิน

ได้ออกแบบระบบการสกัดแบบลำดับขั้น โดยใช้คอลัมน์สำหรับศึกษาการสกัดแบบลำดับขั้นอย่างต่อเนื่อง ในการสกัดโลหะบางตัวจากตัวอย่างดิน เช่น Zn Pb Cd Cu เป็นต้น โดยได้ออกแบบคอลัมน์ขนาดเล็กและระบบการสกัดอย่างต่อเนื่องแบบออนไลน์ โดยซึ่ง

ตัวอย่างดิน 0.2000 กรัม บรรจุใส่ใน micro column ทำการ leaching ด้วยสารสกัดชนิดต่างๆ ตามลำดับ ด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/min ทำการเก็บ Fraction สารสกัดครั้งละ 15 ml จำนวน 5 ครั้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะชนิดต่างๆ ที่ถูกชะออกมา พบว่าจะมีการชะสารออกมาเรื่อยๆ โดยค่อยๆ น้อยลงใน Fraction ถัดๆ ไป แต่จะไม่สามารถชะออกมาได้หมดภายใน 5 fractions อย่างไรก็ตามจากลักษณะกราฟที่ได้แสดงว่าโลหะส่วนใหญ่ (มากกว่า 80%) จะถูกชะออกมาภายใน 3 fractions ดังรูป 2.3

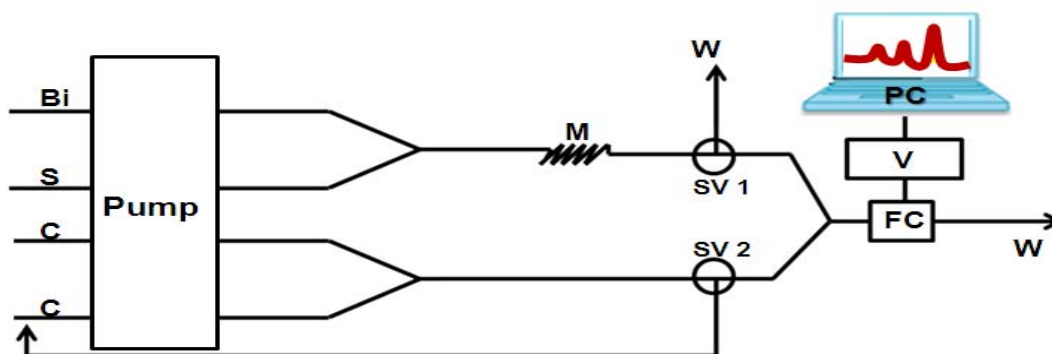
ได้ศึกษาผลของตัวแปรที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัด เช่น dimension ของคอลัมน์ อัตราการไหล ลักษณะการวางคอลัมน์ พบว่าคอลัมน์ที่เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยและการใช้อัตราการไหลต่ำจะให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่า อย่างไรก็ตามพบว่าระบบการสกัดแบบนี้ให้การทำให้ซ้ำได้ไม่ดี (RSD 22.3%, n=5) ซึ่งคาดว่าเกิดจากความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างของแข็งและการสุมตัวอย่างมาเพียง 0.2 กรัมอาจไม่เป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่างทั้งหมด เพื่อลดความยุ่งยากจึงได้มุ่งเน้นการพัฒนานิววิธีวิเคราะห์ที่ก่อนโดยใช้ระบบสกัดตามวิธีมาตรฐานซึ่งใช้สารตัวอย่าง 1.00xx กรัม



รูป 2.3 ปริมาณของโลหะที่ถูกชะออกมาใน fraction ต่างๆ ของสารสกัดแอมโมเนียมออกซาเลต

2.3 การพัฒนาวิธีแอโนดิกสทริปปิงโวลแทมเมตรีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น

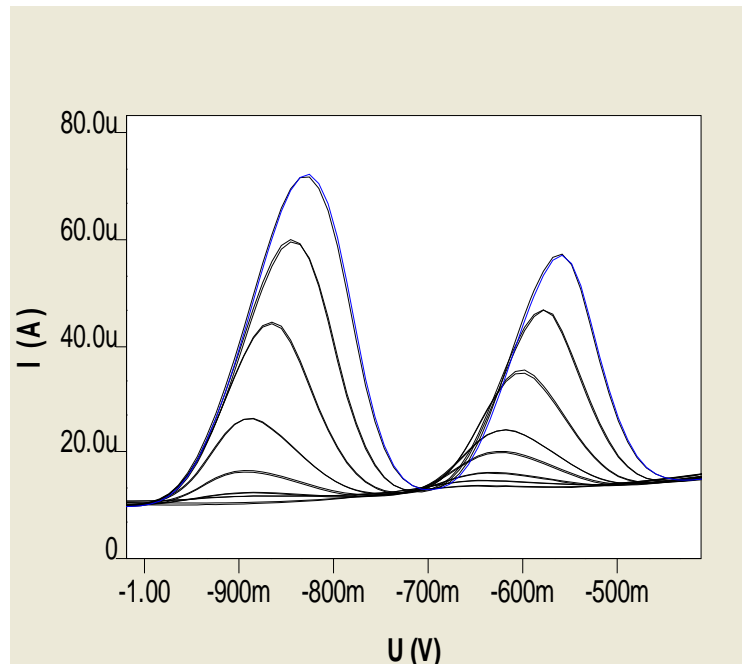
เนื่องจากข้อจำกัดของความเป็นพิษสูง จึงสนใจพัฒนาวิธีวิเคราะห์โลหะด้วยเทคนิคแอโนดิกสทริปปิงโวลแทมเมตรี ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของบิสมีสเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า จึงได้ทดลองใช้ขั้วไฟฟ้าแกสซีคาร์บอนที่เคลือบด้วยฟิล์มบางของบิสมีส เพื่อช่วยให้สามารถใช้งานได้ในช่วงศักย์ไฟฟ้าลบที่โลหะที่สนใจเกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี จากการทดลองเบื้องต้นในระบบแบบสัฟฟรอนให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากมีปัญหาในการทำความสะอาดขั้วไฟฟ้า ซึ่งมีความยุ่งยากและให้ผลที่ไม่คงที่ ซึ่งอาจเกิดจากการตกค้าง (carry over) ของสารบนขั้ว ในงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาระบบการไหลเข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของขั้วไฟฟ้าชนิดนี้ โดยได้ออกแบบเซลล์สำหรับการตรวจวัดในระบบการไหล ซึ่งทำให้การวิเคราะห์และการทำความสะอาดสามารถทำซ้ำได้ดีกว่า และมีความสะดวก รวดเร็วมากขึ้นด้วย ซึ่งสารละลายที่ไหลอย่างต่อเนื่องจะช่วยทำความสะอาดผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ทำให้มีการปนเปื้อนต่ำและให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง โดยได้ออกแบบระบบดังรูป 2.4 และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบได้ดังที่สรุปไว้ในตาราง 2.2 ซึ่งมีขั้นตอนการทำงานของระบบวิเคราะห์ดังนี้ สารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างจะไหลด้วยอัตราการไหลคงที่ ไปผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในระบบการวิเคราะห์โดยโวลแทมเมตรี หลังจากผสมกันใน mixing coil แล้ว สารละลายจะไหลเข้าสู่ flow cell ซึ่งมีการให้ศักย์ไฟฟ้าที่คงที่ เพื่อทำการเกาะติด (deposit) โลหะไว้บนขั้วไฟฟ้าตามเวลาที่กำหนด จากนั้นจึงทำการ scan ศักย์ไฟฟ้าไปทางด้านบวก เพื่อให้โลหะที่เกาะที่ขั้วเกิดออกซิเดชันละลายออกสู่สารละลาย (stripping) พร้อมทั้งทำการวัดกระแสไฟฟ้าซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของโลหะแต่ละชนิดได้ตัวอย่างโวลแทมโมแกรมดังแสดงในรูป 2.5



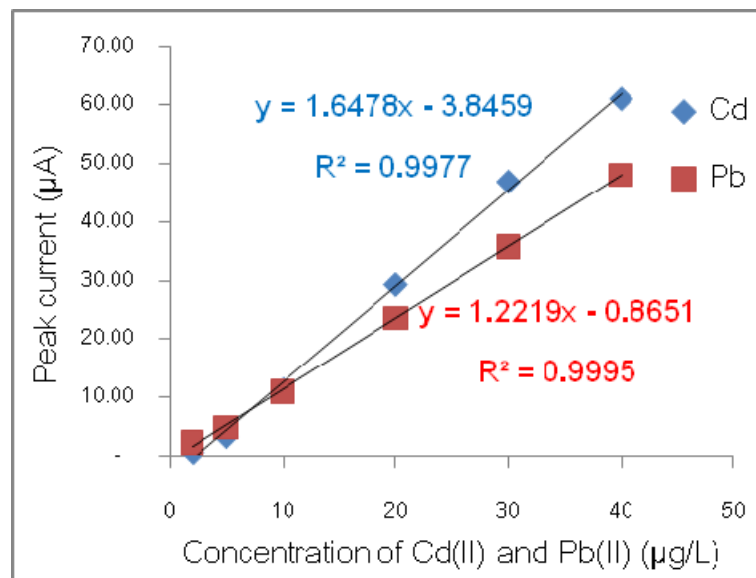
รูป 2.4 ระบบการไหลที่ร่วมกับแอโนดิกสตรipping โวลแทมเมตรีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมและตะกั่ว; S = standard/sample, Bi = Bi(III) plating solution, C= cleaning solution (1 M HNO₃), Pump = peristaltic pump, M = mixing coil, SV 1-2 = solenoid valves, FC= electrochemical flow cell, V= voltammetric analyzer, PC= personal computer, W = waste

ตาราง 2.2 สภาวะที่เหมาะสมของระบบการไหลที่ร่วมกับแอโนดิกสตรipping โวลแทมเมตรีที่ใช้ขั้วฟิล์มบางบิสมัทเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน

Parameter	Optimum condition
Concentration of acetate buffer pH 4.5	0.10 M
Concentration of Bi(III) plating solution	0.60 mgL ⁻¹
Deposition potential	-1.5 V
Deposition time	150 s
Flow rate	0.5 mL/min



(ก)



(ข)

รูป 2.5 แอโนดิกสตรippingโวลแทมโมแกรมที่ได้จากระบบที่พัฒนาขึ้น (ก) solution containing Cd(II) and Pb(II) of increasing concentration, from 2-40 $\mu\text{g/L}$ (ข) calibration graphs of Cd(II) and Pb(II)

ซึ่งจากความสูงพีค (peak current) สามารถนำมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการหาความเข้มข้นของโลหะหนักในสารละลายตัวอย่างได้ ดังรูป 2.5 ข ระบบที่พัฒนาขึ้นนี้ได้นำไปทดลองใช้วิเคราะห์หาปริมาณโลหะแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำทิ้งของเหมืองแร่ได้ผลดังตาราง 2.3 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธีอะตอมมิกอิมิสชันสเปกโทรเมตรีที่มีราคาเครื่องมือและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูงกว่ามาก ได้นำเสนองานวิจัยนี้ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ และตีพิมพ์ใน proceedings ของการประชุมดังรายละเอียดในภาคผนวก ข

ตาราง 2.3 ผลการหาปริมาณแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างน้ำ

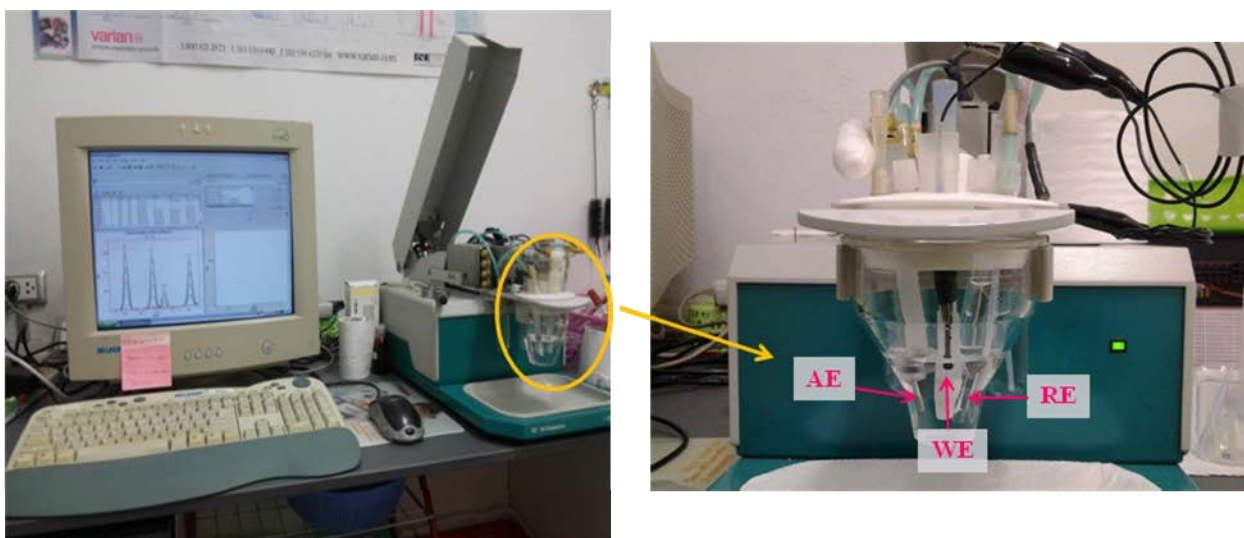
Sample	Concentration of metals (mg/L)			
	Cd		Pb	
	ICP-OES	VA-BiFE	ICP-OES	VA-BiFE
1	0.50 ± 0.03	0.62 ± 0.00	2.06 ± 0.09	1.76 ± 0.01
2	1.08 ± 0.15	1.17 ± 0.01	4.16 ± 0.10	3.70 ± 0.01
3	2.02 ± 0.15	2.10 ± 0.01	12.06 ± 0.26	10.17 ± 0.03
4	0.71 ± 0.06	0.88 ± 0.00	8.26 ± 0.12	6.18 ± 0.00
5	1.52 ± 0.09	1.59 ± 0.01	15.53 ± 0.26	12.70 ± 0.00
6	1.82 ± 0.10	2.03 ± 0.00	5.36 ± 0.10	4.19 ± 0.04
7	1.24 ± 0.09	1.66 ± 0.00	2.35 ± 0.11	1.47 ± 0.01
8	2.51 ± 0.09	2.88 ± 0.01	13.52 ± 0.22	10.86 ± 0.03
9	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.00	21.26 ± 0.12	14.84 ± 0.07

2.4 การพัฒนาวิธีแอดดิติฟสตริบปีงโวลแทมเมตรีที่ใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่เคลือบด้วยบิสมาทเป็นขั้วไฟฟ้าชั่วคราว

เนื่องจากขั้วไฟฟ้าของแข็ง เช่น ขั้วแกรลสซีคาร์บอน มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนขึ้นได้ง่ายในการวิเคราะห์โลหะปริมาณน้อย ซึ่งการใช้ระบบการไหลสามารถช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยเทคนิคโวลแทมเมตรี มักจะต้องทำการหาปริมาณสารด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition) จึงจะให้ผลการหาปริมาณที่ถูกต้องเนื่องจากองค์ประกอบของสารละลายตัวอย่าง (matrix) มักส่งผลต่อสัญญาณการตรวจวัดสารที่สนใจ ซึ่งระบบการไหลที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่เหมาะกับการทำวิธีการเติมสารมาตรฐาน และ

โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการสกัดแบบลำดับขั้นจะมีการใช้สารละลายที่แตกต่างกันหลายชนิด ดังนั้น จึงได้สนใจพัฒนาขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่เคลือบด้วยบิสมัท (bismuth coated screen printed carbon electrode, Bi-SPCE) มาใช้เป็นขั้วไฟฟ้าขั้วทำงาน ซึ่งขั้วไฟฟ้าแบบนี้สามารถสร้างได้ง่ายและราคาถูกกว่าขั้วแกลสซีคาร์บอน หากมีการปนเปื้อนก็สามารถใช้แล้วทิ้งได้

โดยขั้วดังกล่าวจะถูกติดตั้งแทนที่ขั้วไฟฟ้าปรอทในระบบเครื่องมือโวลแทมเมตรีดังรูป 2.6 และใช้ขั้ว Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (RE) และแพลตินัม (Pt) เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (AE) ตามปกติ โดยได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดดังแสดงในตาราง 2.4



รูป 2.6 เครื่องโวลแทมโมกราฟ (757 VA computrace) และขั้วไฟฟ้าที่ใช้

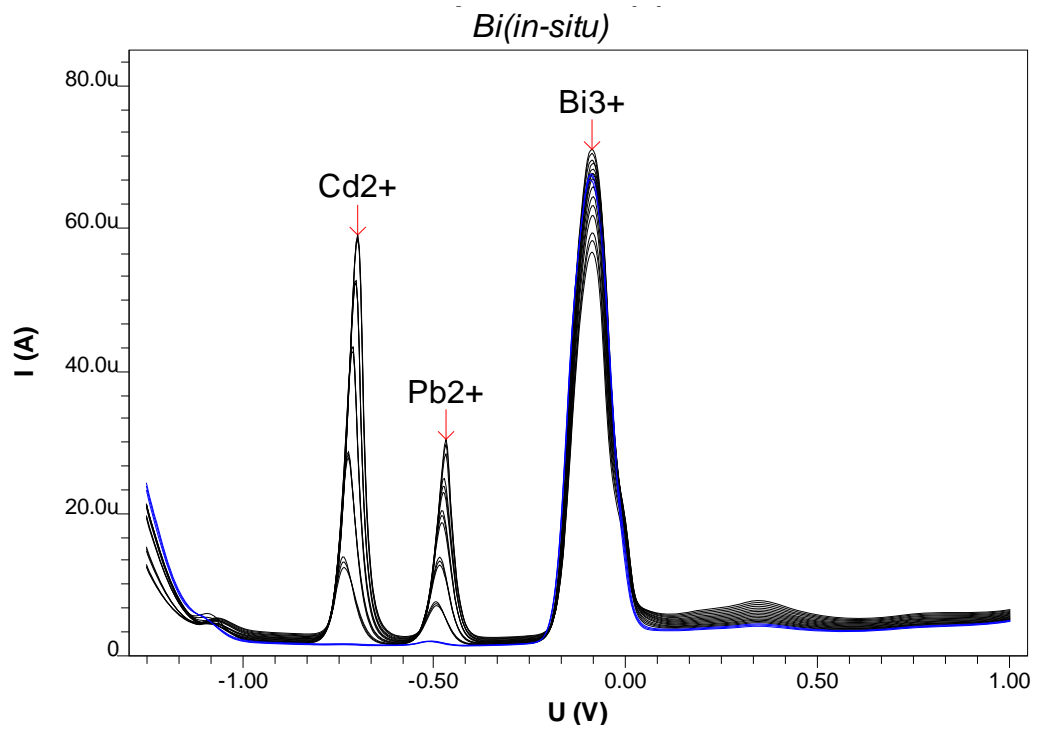
ในการเคลือบบิสมัทบนขั้วไฟฟ้า SPCE ได้ใช้วิธี *in-situ* โดยมีความเข้มข้นของบิสมัท 1 mg/L (Bi^{3+} solution) ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 0.1 M acetate buffer solution pH 4.5 ปริมาตรในการวิเคราะห์ 10.00 mL และใช้สารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ppb Pb^{2+} และ Cd^{2+} ในการตรวจวัดเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานทำให้ทราบช่วงความเป็นเส้นตรงของการหาปริมาณ Pb^{2+} และ Cd^{2+} ได้

ตาราง 2.4 สภาวะการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสแควร์เวฟแอโนดิกสตรipping โวลแทมเมตรีที่ใช้

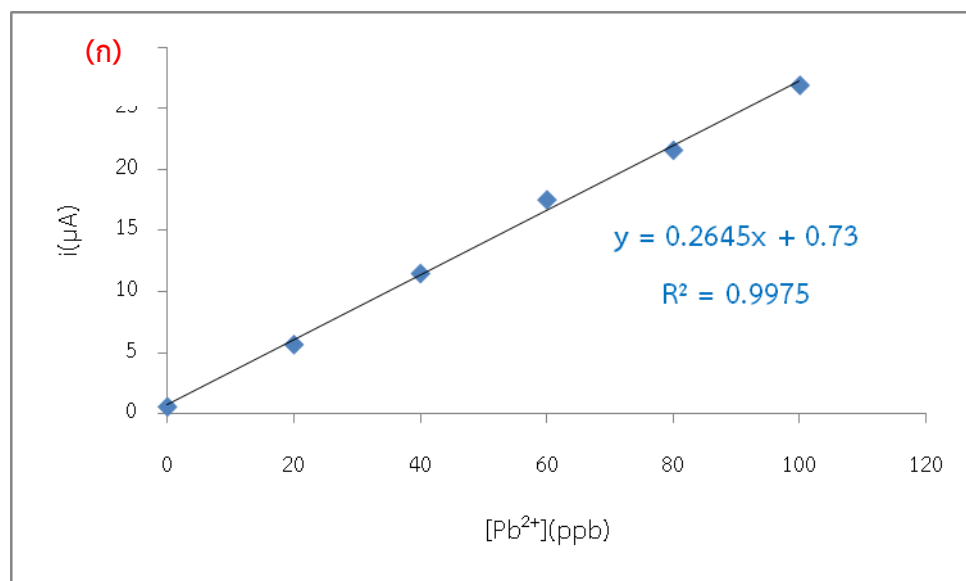
ตัวแปร	สภาวะการทดลอง
Pretreated electrode (ในสารละลาย 0.1M acetate buffer pH 4.5)	1st E = 1.6V, 120s 2nd E = 1.8V, 60s
Deposition potential (Edep)	-1.25V
Deposition time (tdep)	180s
Equilibrium time (teq)	15s
Stripping potential (Estrip)	-1.25 ถึง 1.0V
Cleaning potential (Eclean)	1.0V
Cleaning time (tclean)	30s
Step potential (Estep)	4mV
Amplitude	25mV
Frequency	25Hz
Rotation speed	1400rpm

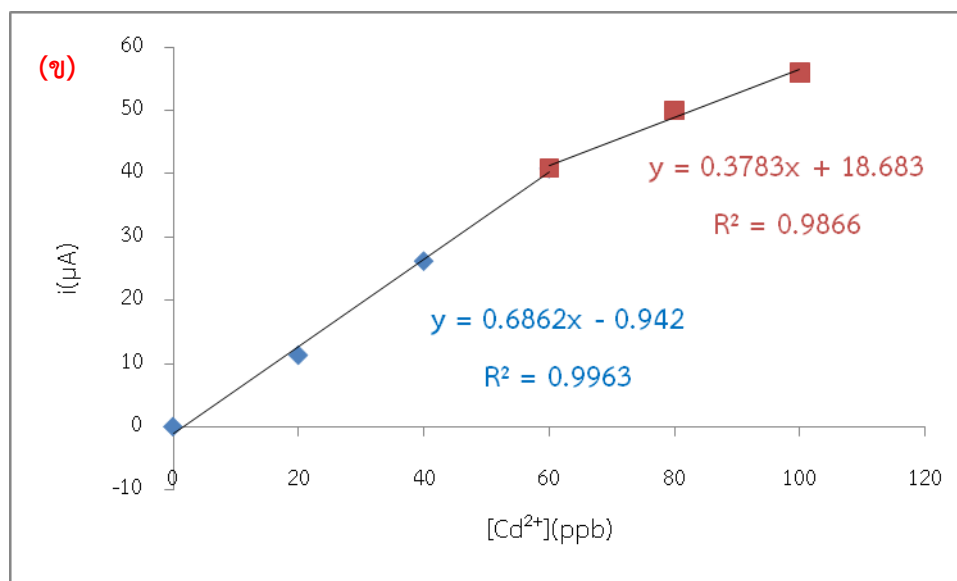
ก่อนทำการวิเคราะห์จะต้องทำให้ขั้วไฟฟ้า SPCE อยู่ในสภาวะสมดุลพร้อมที่จะทำการตรวจวัดโดยจะสแกนในสารละลายแรกสุดที่จะทำการวิเคราะห์ก่อนจำนวน 3 ครั้ง (n=3) ตามสภาวะการวิเคราะห์แล้วจึงจะทำการตรวจวิเคราะห์จริง โดยมีวิธีการทดลอง ดังนี้

1. นำขั้วไฟฟ้า SPCE มาทำ pretreated ขั้ว SPCE ในสารละลาย 0.1M acetate buffer pH 4.5 ดังสภาวะตาราง 4 ล้างด้วย น้ำ milli-Q แล้วซับให้แห้ง
2. ปิเปตน้ำ milli-Q 9.00 mL กับ 1.00 mL 10 ppm Bi^{3+} solution ใน 1M acetate buffer solution pH 4.5 ลงใน vessel แล้วทำการวิเคราะห์ดังตาราง 4 (n=3) จากนั้นทำการเติม 20 μL 10 ppm mixed standard solution จำนวน 5 ครั้งซึ่งในแต่ละครั้งจะทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (n=3) (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppb)
3. นำข้อมูลการทดลองที่ได้สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรงของ Pb^{2+} และ Cd^{2+} ช่วงความเข้มข้น 0-100 ppb โดยค่าศักย์ไฟฟ้าของพีคในการตรวจวัดของ $\text{Cd}^{2+} = -0.75\text{V}$, $\text{Pb}^{2+} = -0.48\text{V}$ และ $\text{Bi}^{3+} = -0.10\text{V}$ ได้ผลการทดลองดังรูป 2.7 และสร้างกราฟมาตรฐานได้ดังรูป 2.8



รูป 2.7 โวลแทมโมแกรมของ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100ppb Pb^{2+} และ Cd^{2+} , 0.1M acetate buffer pH 4.5 เป็น electrolyte ใช้วิธี in-situ ในการเคลือบ Bi-SPCE (1 ppm Bi^{3+}) สภาวะการวิเคราะห์ดังตาราง 2.4





รูป 2.8 กราฟมาตรฐานของ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppb (ก) Pb^{2+} และ (ข) Cd^{2+} , 0.1 M acetate buffer pH 4.5 เป็น electrolyte

รายละเอียดเกี่ยวกับการใช้ระบบที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์โลหะหนักในตัวอย่างน้ำ แสดงดังภาคผนวก ค.1

2.4.1 การศึกษาถึงผลของสารละลายที่ใช้สกัดต่อการวิเคราะห์โลหะด้วยวิธีแอดโนติกสตริปปีงโวลแทมเมตรี

จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของสารสกัดต่างๆ (extractant) ที่ถูกใช้ในการสกัดแบบลำดับขั้น ของตัวอย่างดินตามวิธีของ Tessier ซึ่งสารละลายสำหรับสกัดจะถูกนำมาใช้เป็น ตัวกลาง (medium) ที่ทำหน้าที่เป็น supporting electrolyte ในการวิเคราะห์หาปริมาณ แคดเมียมและตะกั่ว เพื่อลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

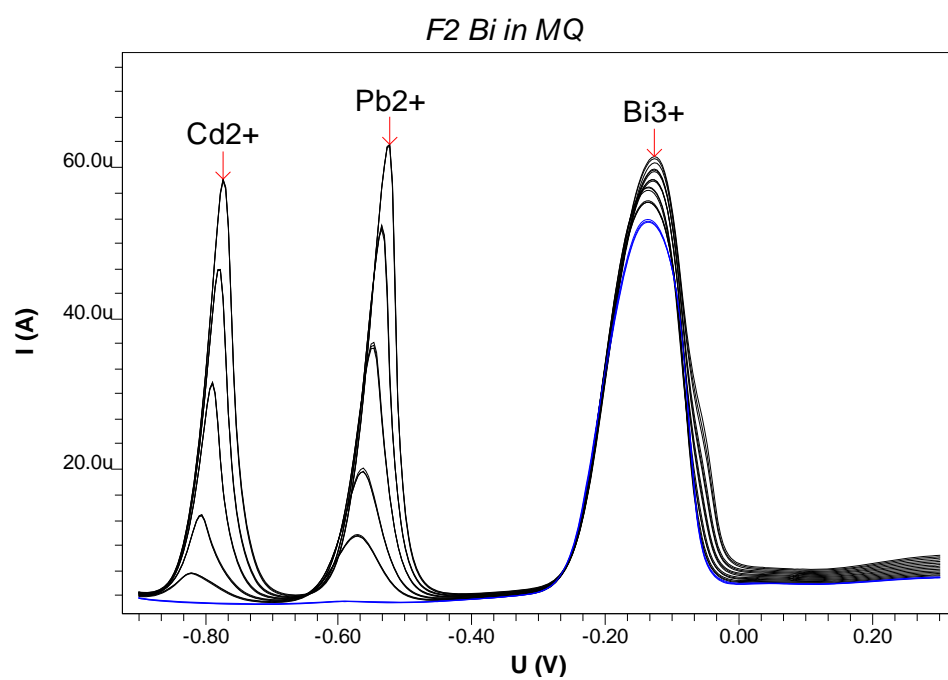
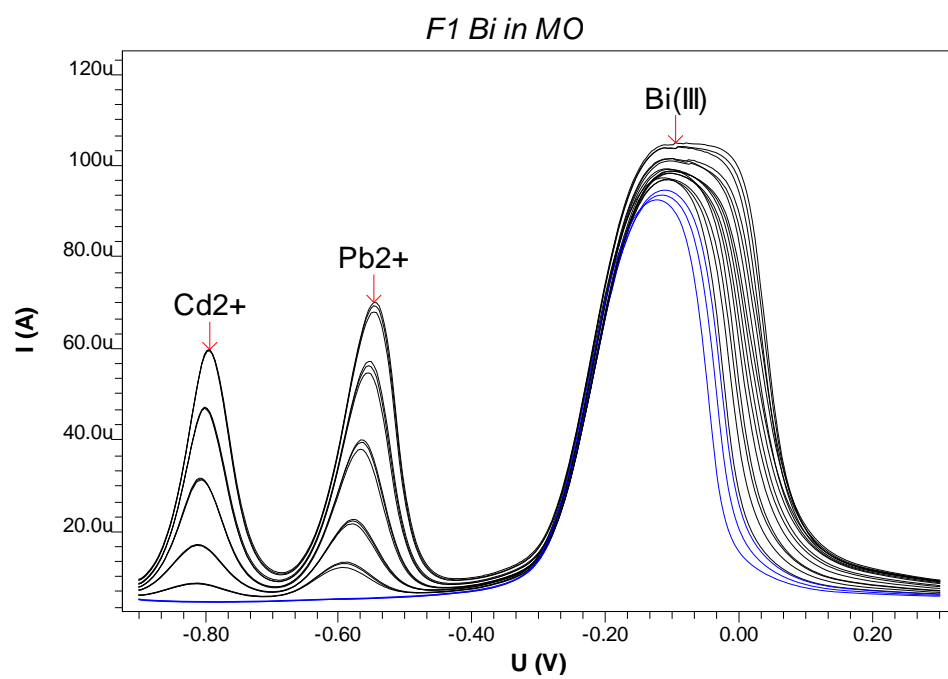
จากการศึกษาผลของสารสกัดที่ใช้ในการสกัดดินแบบลำดับขั้นด้วยวิธีของ Tessier's procedure ทั้ง 5 fractions (F1-F5) ว่าสามารถใช้เป็น medium ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก Pb และ Cd ด้วยเทคนิค SWASV ใช้ขั้วไฟฟ้า Bi-SPCE ทำการเคลือบ บิสมัทด้วยวิธี in-situ ได้หรือไม่ เพื่อลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างของสารก่อนการ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งแต่เดิมจะใช้เทคนิคทาง spectrometry ในการตรวจ วิเคราะห์ซึ่งมีความยุ่งยากของการวิเคราะห์มากกว่าและเครื่องมือมีราคาแพง จากผล การศึกษาที่ได้บอกได้ว่าสามารถใช้สารสกัดทั้ง 5 fractions เป็น medium ในการวิเคราะห์ หาปริมาณโลหะหนัก Pb และ Cd ด้วยเทคนิค SWASV ได้ซึ่งสถานะของสารละลายที่ใช้

วิเคราะห์ในแต่ละ fraction แสดงดังตาราง 2.5 โดยการเลือกใช้สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ นั้นจะเลือกจากที่ให้ความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity) ที่สูงและค่า %RSD ที่ต่ำของการ วิเคราะห์หาปริมาณ Pb^{2+} และ Cd^{2+}

ตาราง 2.5 สภาวะของสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ในแต่ละ fraction ของการสกัดดินแบบ ลำดับขั้นด้วยวิธีของ Tessier และความไวของการวิเคราะห์ Pb^{2+} และ Cd^{2+}

Fraction	สภาวะของ สารละลายที่ใช้ วิเคราะห์	ความไวของการวิเคราะห์, sensitivity ($\mu A/ppb$)	
		Pb^{2+}	Cd^{2+}
F1 = 1M NaOAc pH 8.2	เติม 0.1M acetate buffer solution pH 4.5	1.7975	1.3663
F2 = 1M NaOAc pH 5.0 (ถูกปรับ pH ด้วย HOAc)	ไม่เติม 0.1M acetate buffer solution pH 4.5	1.5081	1.497
F3 = 0.04M $NH_2OH \cdot HCl$ ใน 25%v/v acetic acid solution	เติม 0.1M acetate buffer solution pH 4.5	1.6296	1.1488
F4 = 3.00 mL 0.02M HNO_3 solution, 8.0 mL น้ำ milli-Q และ 5.00 mL 3.2M NH_4OAc ใน 20%v/v HNO_3 solution จากนั้นปรับ ปริมาตรเป็น 20.00 mL ด้วยน้ำ milli-Q	ไม่เติม 0.1M acetate buffer solution pH 4.5	2.6437	2.1003
F5 = aqua regia (ถูกปรับ pH ด้วย 1 M NaOAc solution, pH = 4.69)	เติม 0.1M acetate buffer solution pH 4.5	1.4187	0.5936

ซึ่งตัวอย่างโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการตรวจวัดในตัวกลางของสารละลายที่ใช้สกัด แสดงดังรูป 2.9



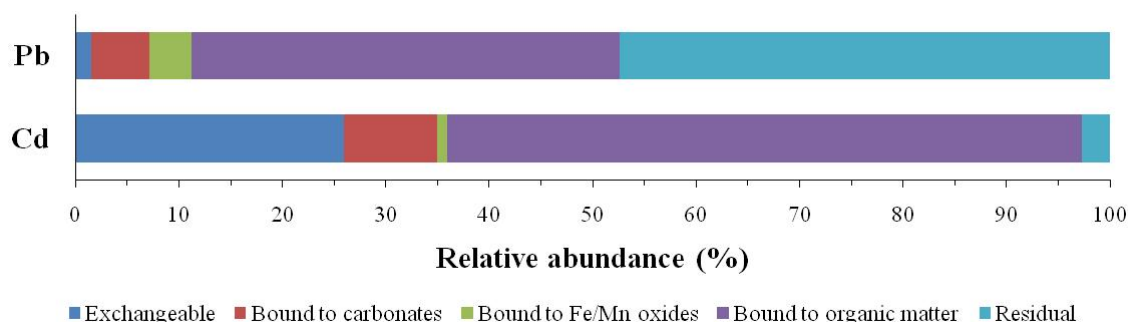
รูป 2.9 Square wave voltammogram ของ 0, 5, 10, 20, 30 และ 40ppb Pb^{2+} และ Cd^{2+} ใน medium ของ F1 และ F2 ใช้วิธี in-situ ในการเคลือบ Bi-SPCE (1 ppm Bi^{3+}) สภาวะการวิเคราะห์ดังตาราง 2.4

2.4.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารละลายจากการสกัดลำดับชั้นของตัวอย่างดินมาตรฐานและประยุกต์ใช้กับดินตะกอน

ได้ประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Pb^{2+} และ Cd^{2+} ในสารละลายจากการสกัดดินแบบลำดับชั้นด้วยวิธี Tessier ของตัวอย่างดินมาตรฐาน (soil certified reference material) CRM033 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์นี้ ผลการทดลองแสดงดังตาราง 2.6 และรูป 2.10

ตาราง 2.6 ปริมาณเฉลี่ยของโลหะหนัก Pb และ Cd ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละ fraction ด้วยเทคนิค SWASV ใช้ขั้วไฟฟ้า Bi-SPCE ในดินตัวอย่างมาตรฐาน CRM033

Fractions	ปริมาณเฉลี่ย (mg/Kg)	
	Cd^{2+}	Pb^{2+}
F1	33.7±0.3	1.7±0.0
F2	11.7±0.0	6.2±0.1
F3	1.3±0.0	4.5±0.1
F4	79.7±0.2	45.9±0.9
F5	3.6±0.1	52.6±0.2
Total	130.0±0.6	110.9±1.3
Certified value	126.7±1.3	107.5±0.3

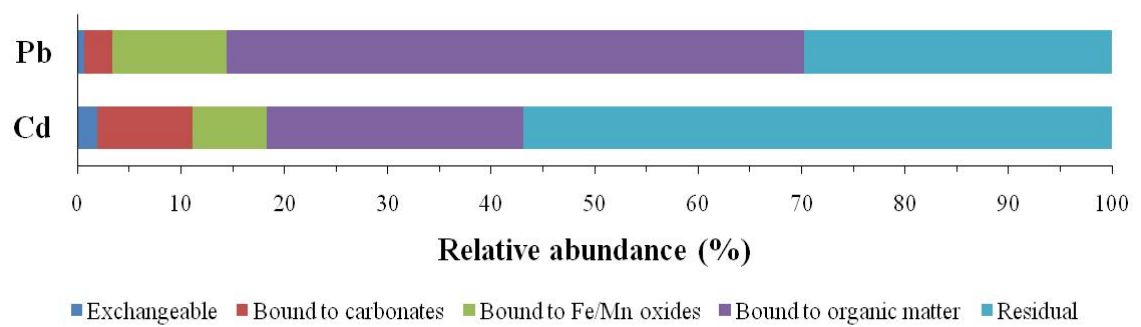


รูป 2.10 The relative distributions of Cd and Pb among the various soil fractions extracted by the Tessier's procedure

ผลปริมาณวิเคราะห์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่ามาตรฐานที่อ้างอิงไว้ ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่าการสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคทางไฟฟ้าเคมี (SWASV) ในการวิเคราะห์ปริมาณ Pb และ Cd ในตัวอย่างดินที่สกัดแบบลำดับขั้นด้วย Tessier's procedure ได้อย่างถูกต้อง ซึ่งแสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโลหะในสารละลายจากการสกัดลำดับขั้นของตัวอย่างดินได้ ซึ่งอาจนำไปใช้ในการประเมินผลกระทบของโลหะที่ปนเปื้อนในดินหรือดินตะกอนได้ ดังตาราง 2.7 และรูป 2.11 ผลการศึกษาโดยสรุปแสดงดังภาคผนวก ค.2

ตาราง 2.7 ปริมาณเฉลี่ยของโลหะหนัก Pb และ Cd ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละ fraction ด้วยเทคนิค SWASV ใช้ขั้วไฟฟ้า Bi-SPCE ในตัวอย่างดินตะกอน

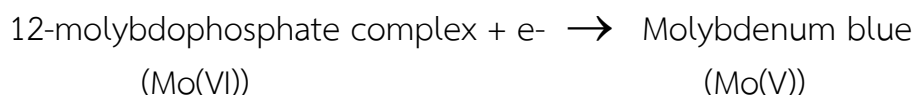
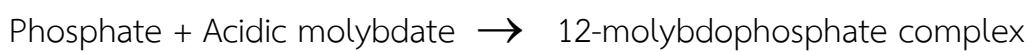
Fractions	ปริมาณเฉลี่ย (mg/Kg)	
	Cd ²⁺	Pb ²⁺
F1	0.3±0.0	3.8±0.0
F2	1.4±0.0	16.9±0.1
F3	1.1±0.0	68.6±0.1
F4	3.8±0.1	344.4±0.4
F5	8.7±0.2	183.6±0.2
Total	15.3±0.3	617.3±0.8



រូប 2.11 The relative distributions of Cd and Pb among the various sediment fractions extracted by the Tessier's procedure

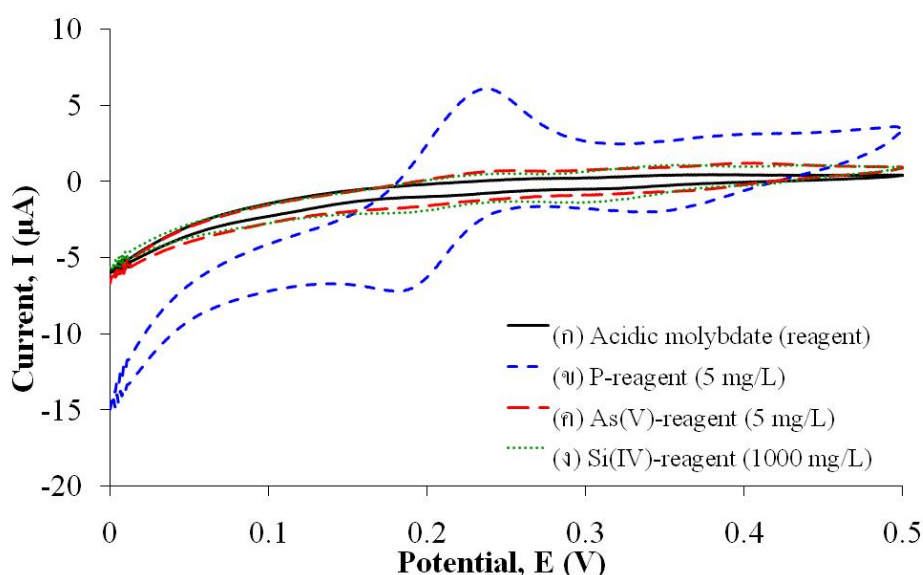
2.5 ระบบโพลีอินเจกชันแอมแปโรเมตรีสำหรับการวิเคราะห์หาฟอสฟอรัส

ระบบโพลีอินเจกชันแอมแปโรเมตรีสำหรับการวิเคราะห์หาฟอสฟอรัส อาศัยปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีในการเกิดรีดักชันสารเชิงซ้อน 12-โมลิบโดฟอสเฟตเป็นสารเชิงซ้อนโมลิบดินัมบลู แสดงดังสมการข้างล่างนี้



สารเชิงซ้อน 12-โมลิบโดฟอสเฟตจะถูกรีดิวซ์ที่ขั้วไฟฟ้าทำงานและให้กระแสไฟฟ้าที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของฟอสเฟต

การเกิดรีดักชันทางไฟฟ้าเคมีของสารเชิงซ้อน 12-โมลิบโดฟอสเฟตได้ศึกษาด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีแสดงดังรูป 2.12 พบว่าฟิสิกออกซิเดชันและฟิกรีดักชันจะเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.19 และ 0.24 โวลต์เทียบกับซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ ตามลำดับ โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 0.20 โวลต์เทียบกับซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์จะให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีและมี baseline คงที่ นอกจากนี้สัญญาณของซิลิเกต (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) และอาซีนเท (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะไม่ปรากฏที่ศักย์ไฟฟ้าดังกล่าว



รูป 2.12 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมเมื่อใช้แก๊สซีคาร์บอนเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน; (ก) สารละลายโมลิบเดทในสภาวะกรด (รีเอเจนต์), (ข) ฟอสเฟต-รีเอเจนต์ (5 มิลลิกรัมต่อลิตร), (ค) อาร์ซีนเท-รีเอเจนต์ (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ (ง) ซิลิเกต-รีเอเจนต์ (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่อัตราการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

จากการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมโมลิบเดตพบว่า เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมโมลิบเดตเพิ่มความไวในการวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของแอมโมเนียมโมลิบเดตมากกว่า 0.5%มวล/ปริมาตร จะทำให้ baseline เลื่อนขึ้น เนื่องจากอาจเกิดการดูดซับสารเชิงซ้อนโมลิบดินัมบลูที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าแกสซีคาร์บอน ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมโมลิบเดตที่ 0.5%มวล/ปริมาตร นอกจากนี้ระบบที่พัฒนาขึ้นใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 2.5%ปริมาตร/ปริมาตร เพราะให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีกว่า และ baseline คงที่ หากความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกมากกว่า 2.5%ปริมาตร/ปริมาตร จะให้ความไวในการวิเคราะห์ที่สูงกว่า แต่ baseline จะมีสัญญาณรบกวน

ในงานวิจัยนี้ ได้มีการปรับอัตราการไหลของระบบที่พัฒนาขึ้นจาก 1.0 เป็น 3.2 มิลลิลิตรต่อนาทีเพื่อเพิ่มความถี่ในการวิเคราะห์ตัวอย่างสำหรับการประยุกต์ใช้ในระบบการสกัดลำดับชั้นฟอสฟอรัสแบบออนไลน์ด้วยระบบโพลินเจกชันแอมแปโรเมตรีสำหรับการแยกส่วนฟอสฟอรัสในตัวอย่างดินต่อไป สภาวะที่เหมาะสมของระบบโพลินเจกชันแอมแปโรเมตรีสำหรับวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสแสดงดังตาราง 2.8

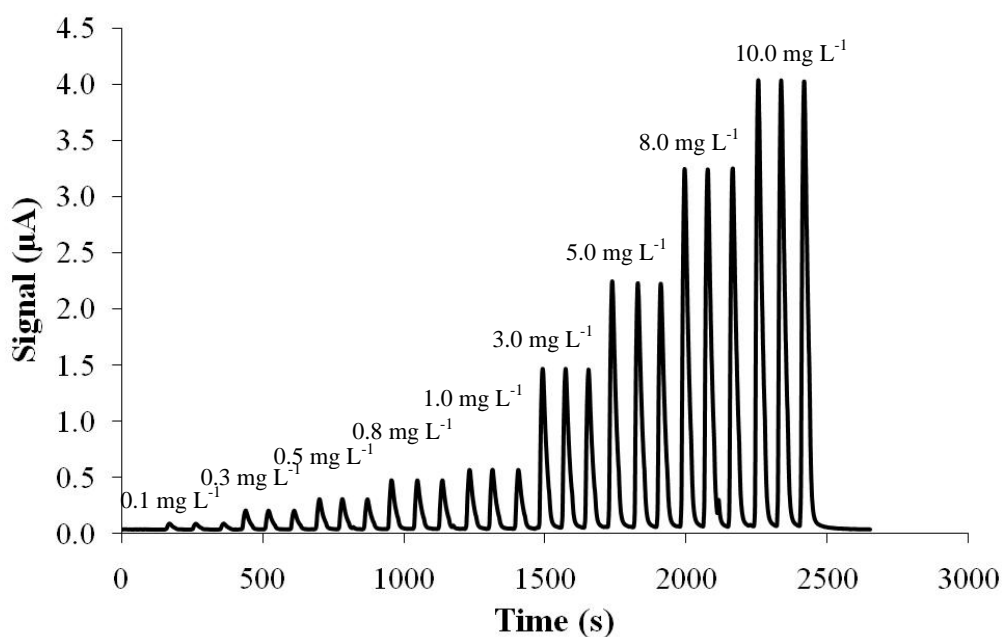
ตาราง 2.8 สภาวะที่เหมาะสมของระบบโพลินเจกชันแอมแปโรเมตรีสำหรับวิเคราะห์หาฟอสฟอรัส

พารามิเตอร์	สภาวะที่ใช้
อัตราการไหล	3.2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสาร	75 ไมโครลิตร
ความเข้มข้นของแอมโมเนียมโมลิบเดต	0.5%มวล/ปริมาตร
ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก	2.5%ปริมาตรปริมาตร
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์	0.1 โมลาร์
ความยาวท่อผสม	50 เซนติเมตร
ขั้วไฟฟ้าทำงาน	แกสซีคาร์บอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง	ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์
ขั้วไฟฟ้าช่วย	สแตนเลสสตีล
ศักย์ไฟฟ้าคงที่	0.20 โวลต์

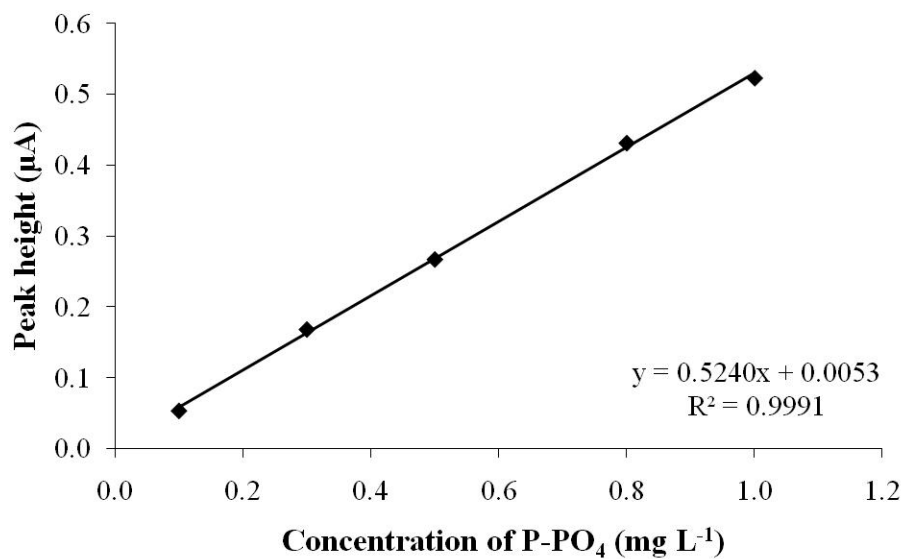
2.5.1 ลักษณะเฉพาะทางเคมีวิเคราะห์ของระบบ

2.5.1.1 กราฟมาตรฐานและขีดจำกัดในการวิเคราะห์

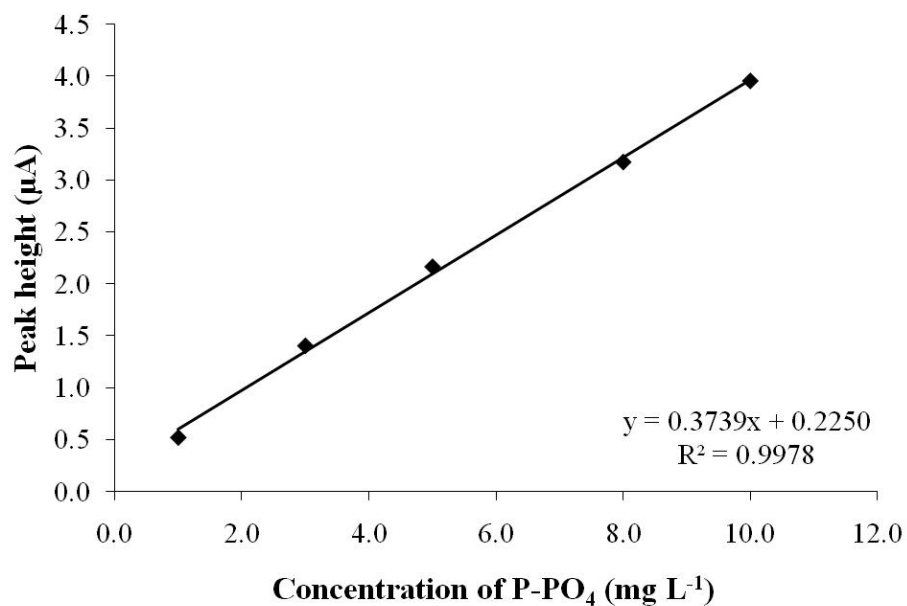
ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของระบบดังตาราง 2.8 จะได้ FIAGram และกราฟมาตรฐาน ดังรูป 2.13 และ 2.14 ตามลำดับ กราฟมาตรฐานมีช่วงความเป็นเส้นตรง 2 ช่วงคือ 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ($y = 0.5240x + 0.0053$, $r^2 = 0.9991$) และ 1.0-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ($y = 0.3739x + 0.2250$, $r^2 = 0.9978$) ขีดจำกัดในการวัด (LOD) เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูป 2.13 FIAGram ของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตด้วยระบบโพลินเจกชันแอมแปโรเมตรี



(ก)



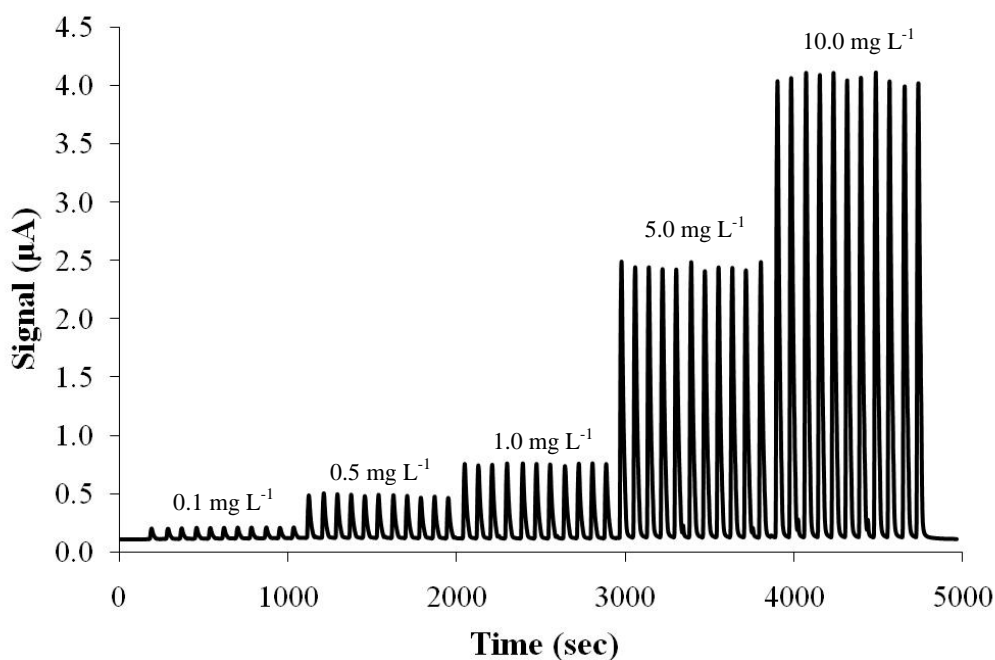
(ข)

รูป 2.14 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาฟอสเฟตช่วงความเป็นเส้นตรง (ก) 0.1-1.0 และ (ข) 1.0-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.5.1.2 ความแม่นยำของระบบ

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของระบบดังตาราง 2.8 เมื่อศึกษาความแม่นยำของระบบ แสดงดังรูป 2.15 พบว่า ร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSDs) ของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (11 ครั้ง)

เท่ากับ 2.1, 2.6, 1.5, 1.2 และ 1.0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระบบมีความแม่นยำดี นอกจากนี้ระบบที่พัฒนาขึ้นใช้สารตัวอย่าง 75 ไมโครลิตร, โพแทสเซียมคลอไรด์ 16 มิลลิกรัม, แอมโมเนียมโมลิบเดต 11 มิลลิกรัม และกรดซัลฟิวริก 0.05 มิลลิลิตรต่อการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ประมาณ 90 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ซึ่งประหยัดสารเคมีและรวดเร็วกว่าวิธีการวิเคราะห์ทางสเปกโทรโฟโตเมตรีแบบกะที่นิยมใช้กันอยู่มาก



รูป 2.15 FIAgram ของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตในการศึกษาความแม่นยำของระบบ

2.5.1.3 ความถูกต้องของระบบ

จากการศึกษาความถูกต้องของระบบแสดงผลดังตาราง 2.9 พบว่า ร้อยละการได้กลับคืนของตัวอย่างดินที่แตกต่างกันในสารสกัดแอมโมเนียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์เท่ากับ 69.2-95.1, ในสารสกัดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์เท่ากับ 72.3-95.3 และในสารสกัดกรดไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์เท่ากับ 92.3-99.0 โดยร้อยละการได้กลับคืนที่มีค่าน้อยอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเหล็ก(III) ซึ่งระบบที่พัฒนาขึ้นควรหลีกเลี่ยงตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเหล็ก(III) สูงๆ นอกจากนี้อาจมีผลมาจากไอออนของคลอไรด์ในสารสกัดแอมโมเนียมคลอไรด์และกรดไฮโดรคลอริกที่อาจเกิดแข่งขันกับฟอสเฟตไอออนในการจับกับไอออนของโมลิบเดต

ตาราง 2.9 ร้อยละการได้กลับคืนของตัวอย่างดิน

ตัวอย่าง	สารสกัด	ปริมาณที่เติม (มก./ล.)	ปริมาณที่พบ (มก./ล.)	ร้อยละการได้ กลับคืน	
1	1.0 M NH ₄ Cl	0.0	0.547 ± 0.005	-	
		0.3	0.805 ± 0.02	95.1	
		2	0.0	0.000 ± 0.000	-
			0.5	0.352 ± 0.007	70.5
		3	0.0	0.000 ± 0.000	-
			0.5	0.346 ± 0.008	69.2
1	0.1 M NaOH	0.0	1.850 ± 0.07	-	
		1.0	2.717 ± 0.02	95.3	
		2	0.0	0.091 ± 0.005	-
			0.5	0.427 ± 0.006	72.3
		3	0.0	0.646 ± 0.02	-
			0.2	0.755 ± 0.01	89.3
1	0.5 M HCl	0.0	4.673 ± 0.07	-	
		1.0	5.617 ± 0.02	99.0	
		2	0.0	0.497 ± 0.004	-
			0.3	0.736 ± 0.01	92.3
		3	0.0	0.902 ± 0.02	-
			0.2	1.083 ± 0.01	98.2

*มก./ล. คือ มิลลิกรัมต่อลิตร

2.5.2 การศึกษาตัวรบกวน

ระบบโพลีอินเจคชันแอมแปโรเมตรีสามารถทนต่อไอออนของซิลิเกต, คาร์บอเนต, ไนเตรท, คลอไรด์, โซเดียม, แคลเซียม, แมกนีเซียม และแอมโมเนียม ส่วนไอออนของอาร์ซีนและไอออนบวกอื่นๆ จะมีผลรบกวนต่อระบบ ดังนั้นตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ด้วยระบบนี้จะต้องมีการกำจัดไอออนตัวรบกวนดังกล่าวด้วยสารเคมี (masking reagent) หรือเรซินแลกเปลี่ยนไอออน แสดงช่วงความทนของสารตัวรบกวนดังตาราง 2.10 ไอออนของโลหะส่วนใหญ่มีการรบกวนทางลบ นั่นคือ ทำให้หาปริมาณฟอสเฟตได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ซึ่ง

น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบที่ตกตะกอนได้ระหว่างฟอสเฟตกับไอออนของโลหะเหล่านี้

ตาราง 2.10 ช่วงความทนต่อสารตัวรบกวน

สาร	ช่วงความทน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
อาร์ซีนีไอออน	0.25, +
ซิลิเกตไอออน	1000, *
คาร์บอเนตไอออน	500, -
ไนเตรทไอออน	1000, *
คลอไรด์ไอออน	40000, *
โซเดียมไอออน	26000, *
แคลเซียมไอออน	1000, *
แมกนีเซียมไอออน	500, -
ทองแดง(II) ไอออน	10, -
สังกะสี(II) ไอออน	10, -
ตะกั่ว(II) ไอออน	10, -
แคดเมียม(II) ไอออน	10, +
แมงกานีส(II) ไอออน	5, -
เหล็ก(II) ไอออน	10, +
เหล็ก(III) ไอออน	0.1, -
อะลูมิเนียมไอออน	0.05, -
แอมโมเนียมไอออน	1000, *

+ = ตัวรบกวนทางบวก, - = ตัวรบกวนทางลบ, * = ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ

นอกจากนี้ไอออนเหล็ก(III) เป็นตัวรบกวนที่มีผลต่อระบบมาก โดยที่ความเข้มข้นของไอออนเหล็ก(III) 0.1-0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ผลทางลบ ส่วนความเข้มข้นที่มากกว่านี้ (≥ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะให้ผลทางบวก แสดงผลดังตาราง 2.11

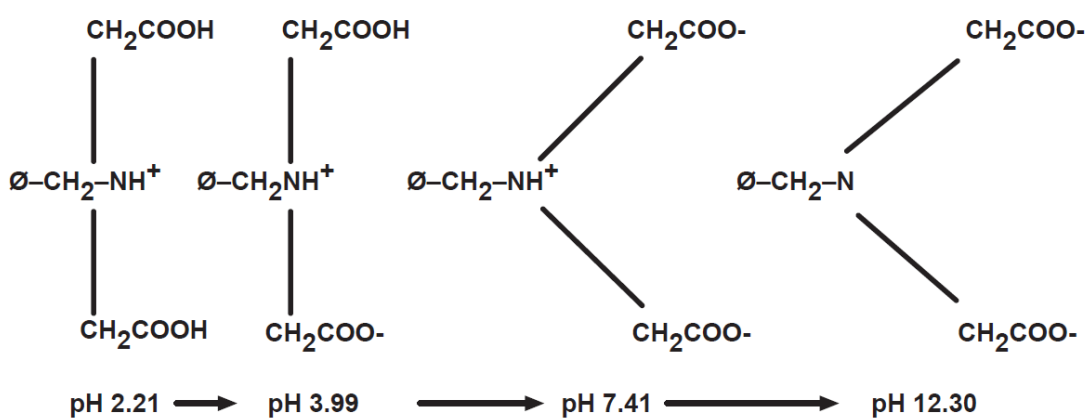
ตาราง 2.11 ผลของไอออนเหล็ก(III) ต่อระบบโพลินเจกซ์แอมแปโรเมตรี

ความเข้มข้นไอออนเหล็ก(III) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความสูงพีก (ไมโครแอมแปร์)	ร้อยละการได้กลับคืน
0.00	0.3956 ± 0.001	-
0.10	0.3948 ± 0.006	99.8
0.20	0.3746 ± 0.004	94.7
0.30	0.3752 ± 0.002	94.8
0.40	0.3703 ± 0.001	93.6
0.50	0.3652 ± 0.002	92.3
1.00	0.1520 ± 0.004	38.4
5.00	0.4711 ± 0.01	119.1
10.00	1.2571 ± 0.02	317.8

(ซ)

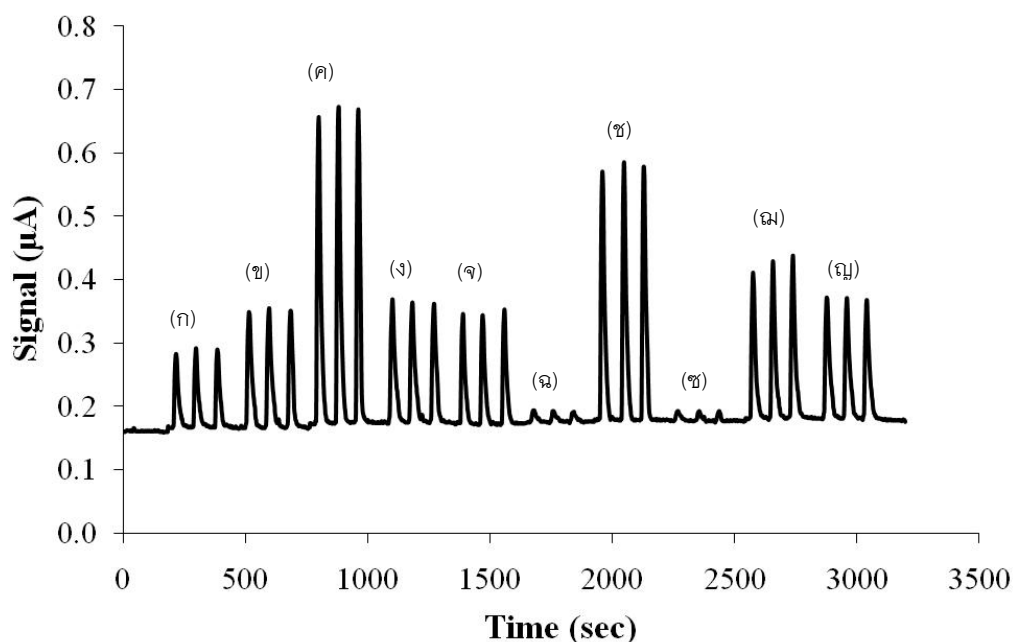
2.5.2.1 การกำจัดไอออนเหล็ก(III) ซึ่งเป็นตัวรบกวนด้วยเรซินซีล็กซ์ 100

จากการศึกษาวิธีการ masking ด้วยกรดทาร์ทาริกพบว่าไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในระบบโพลินเจกซ์แอมแปโรเมตรี ดังนั้นจึงเลือกใช้เรซินแลกเปลี่ยนไอออนในการกำจัดไอออนเหล็ก(III) โดยซีล็กซ์ 100 เป็นเรซินซีล็กซ์ที่นิยมใช้จับไอออนโลหะ ประกอบด้วยโพลีเมอร์สไตรีนไดไวนิลเบนซีนที่มีกลุ่มแลกเปลี่ยนเป็นอิมิโนไดอะซีเตต เรซินนี้จะจับไอออนโลหะได้ดีที่พีเอชสูง และจะเปลี่ยนเป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนลบเมื่อมีค่าพีเอชต่ำ แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดังรูป 2.16



รูป 2.16 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเรซินซีล็กซ์ 100 เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น

จากผลการทดลอง พบว่า ความสูงพีคของสารละลายฟอสเฟตที่มีและไม่มีไอออนของเหล็ก(III) เมื่อผ่านเรซินคีเล็กซ์ 100 จะให้ผลที่ใกล้เคียงกัน แสดงผลดังรูป 2.17 (ก)-(ง), (ณ) และ (ญ) นอกจากนี้สารละลายไอออนเหล็ก(III) เมื่อผ่านเรซินคอลลัมน์จะสามารถกำจัดได้เกือบ 100% แสดงผลดังรูป 3.7 (จ)-(ช) ดังนั้นเรซินคีเล็กซ์ 100 สามารถกำจัดไอออนเหล็ก (III) ได้

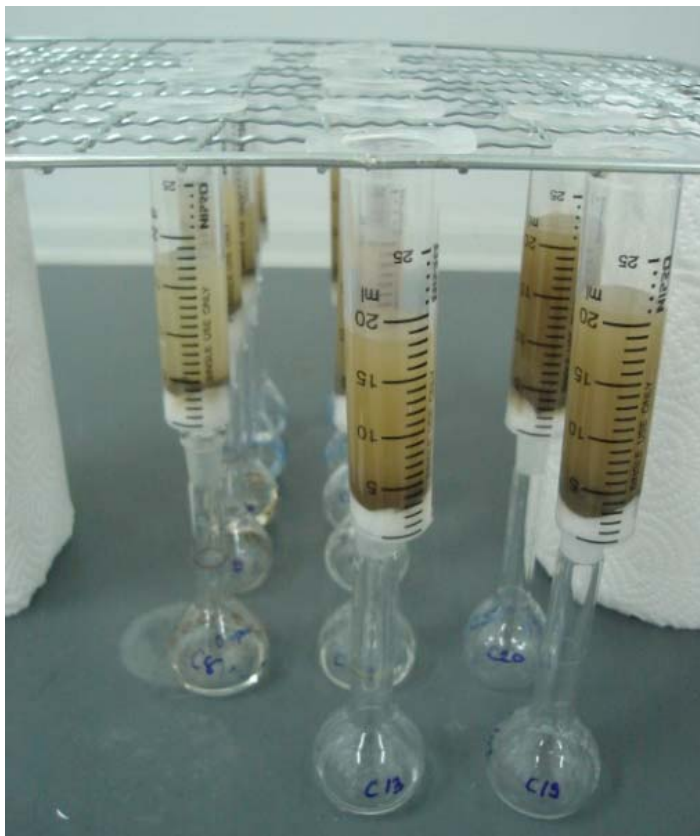


รูป 2.17 FI Agram ของสารละลาย (ก) เหล็ก(III) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + ฟอสเฟต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ข) เหล็ก(III) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + ฟอสเฟต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ผ่านเรซิน), (ค) เหล็ก(III) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + ฟอสเฟต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ง) เหล็ก(III) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + ฟอสเฟต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ผ่านเรซิน), (จ) เหล็ก(III) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ฉ) เหล็ก(III) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ผ่านเรซิน), (ช) เหล็ก(III) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ซ) เหล็ก(III) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ผ่านเรซิน), (ณ) ฟอสเฟต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ญ) ฟอสเฟต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ผ่านเรซิน) ด้วยระบบโพลินิเจนเจกชันแอมแปโรเมตรี

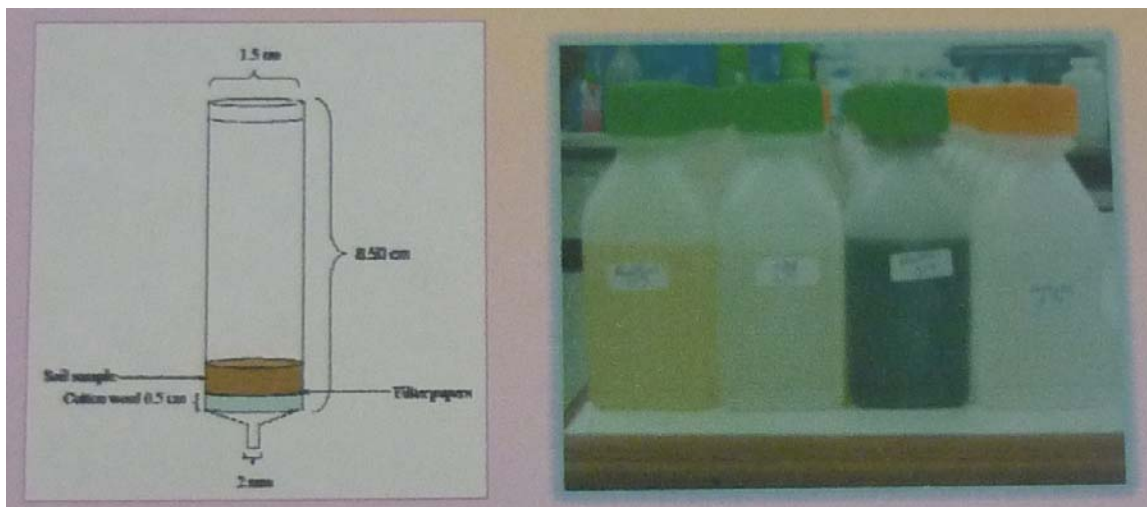
2.6 การประยุกต์ใช้ระบบที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่ถูกชะจากตัวอย่างดินตะกอนด้วยวิธีการชะแบบออฟไลน์คอลลัมน์

วิธีที่พัฒนาขึ้นได้นำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสที่ถูกชะจากตัวอย่างดินตะกอนด้วยวิธีการชะแบบออฟไลน์คอลลัมน์ โดยใช้สารละลายสำหรับการสกัดตามลำดับดังนี้ 1.0 M NH_4Cl (R1), 0.1 M NaOH (R2) และ 0.5 M HCl (R3) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ

ฟอสฟอรัสในรูป exchangeable, organic bound และ carbonate bound ตามลำดับ โดยเติมสารละลายสำหรับการสกัดลงในคอลัมน์และปล่อยให้ไหลลงมาด้วยแรงโน้มถ่วง ดังแสดงในรูป 2.18 ในระบบนี้ถึงแม้ว่าจะใช้เวลานานเช่นกันที่สารสกัดจะไหลผ่านคอลัมน์ลงมาหมดแต่สามารถทำการทดลองที่ละลายคอลัมน์พร้อมๆ กันได้ และใช้อุปกรณ์อย่างง่ายและราคาถูก ทำให้สามารถใช้กับตัวอย่างจำนวนมากได้ สารละลายที่สกัดได้เมื่อใช้สารละลายสำหรับสกัดต่างๆ กัน แสดงดังรูป 2.19 ซึ่งสีของสารละลายจะเข้มมากทำให้เกิดการรบกวนในการวิเคราะห์โดยเทคนิคการตรวจวัดเชิงแสงที่นิยมใช้กัน อย่างไรก็ตามในระบบโพลีอินเจกชันแอมแปโรเมตรีที่พัฒนาขึ้นนี้ จะไม่มีการรบกวนจากสีและสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง ผลการหาปริมาณฟอสเฟตในส่วนของสารสกัดต่างๆ แสดงดังตาราง 2.12



รูป 2.18 ระบบสกัดแบบลำดับขั้นในระบบออฟไลน์ที่ใช้คอลัมน์



รูป 2.19 ขนาดของคอลัมน์และสารละลายที่สกัดได้เมื่อใช้สารละลายสำหรับสกัดต่างๆ กัน (จากขวาไปซ้าย NH_4Cl , NaOH , HCl และ Total digestion of residue)

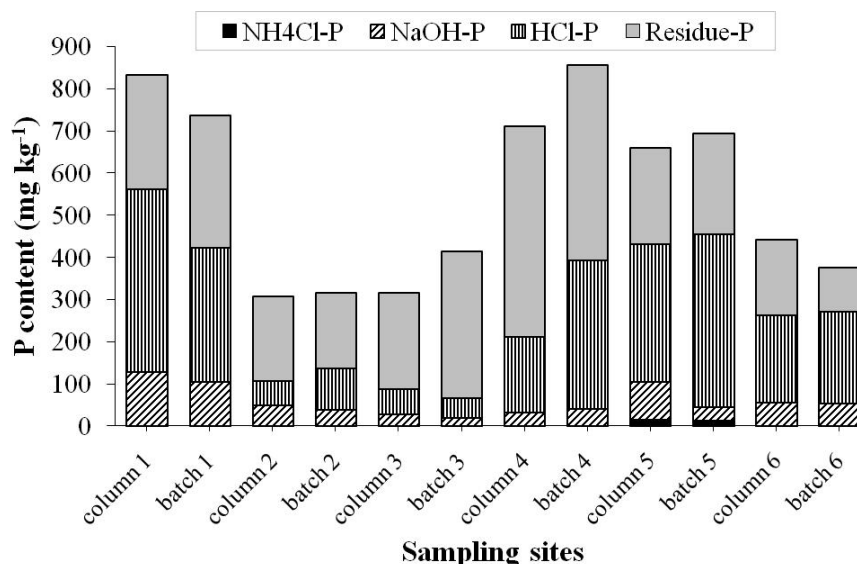
ซึ่งสารละลายตัวอย่างแต่ละส่วนจะถูกฉีดเข้าสู่ระบบโพลินเจกชันแอมแปโรเมตรีและหาปริมาณฟอสฟอรัสที่ได้จากกราฟมาตรฐาน แล้วนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับวิธีแบบกะปริมาณฟอสฟอรัสรวมและฟอสฟอรัสรูปฟอร์มต่างๆ ที่ได้จากทั้งสองวิธีแสดงดังตาราง 2.12 และรูป 2.20 ซึ่งปริมาณฟอสฟอรัสรวมได้จากผลรวมของปริมาณฟอสฟอรัสแต่ละรูปฟอร์ม ปริมาณฟอสฟอรัสรวมจะมีค่าระหว่าง 307-831 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิธีการชะแบบออฟไลน์คอลัมน์) และ 315-856 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิธีแบบกะ) โดยปริมาณฟอสฟอรัสในส่วนของ NH_4Cl -P จะมีค่าน้อยคือ 13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิธีการชะแบบออฟไลน์คอลัมน์) และ 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิธีแบบกะ) ซึ่งจะพบเฉพาะตัวอย่างที่ 5 ปริมาณฟอสฟอรัสในส่วนของ HCl -P, NaOH -P และ Residue-P จะมีค่าอยู่ในช่วง 26-128, 57-434 และ 179-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (วิธีการชะแบบออฟไลน์คอลัมน์) และ 18-103, 47-409 และ 106-465 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (วิธีแบบกะ) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสรวมของตัวอย่างดินตะกอนแต่ละจุดที่ได้จากทั้งสองวิธีพบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ

ตาราง 2.12 ปริมาณฟอสฟอรัสรวมและฟอสฟอรัสรูปฟอร์มต่างๆ ที่ได้จากวิธีการชะแบบออฟไลน์คอลัมน์และวิธีแบบกะ

ตัวอย่าง	วิธี	ปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)				
		NH ₄ Cl-P	NaOH-P	HCl-P	Residue-P	Total-P
1	คอลัมน์	N.D.	128 \pm 20	434 \pm 202	269 \pm 188	831 \pm 199
	แบบกะ	N.D.	103 \pm 8	320 \pm 116	314 \pm 179	736 \pm 144
2	คอลัมน์	N.D.	49 \pm 13	57 \pm 7	201 \pm 65	307 \pm 67
	แบบกะ	N.D.	37 \pm 11	98 \pm 13	180 \pm 26	315 \pm 28
3	คอลัมน์	N.D.	26 \pm 5	60 \pm 11	227 \pm 23	314 \pm 17
	แบบกะ	N.D.	18 \pm 2	47 \pm 6	347 \pm 12	412 \pm 12
4	คอลัมน์	N.D.	32 \pm 4	178 \pm 60	500 \pm 53	709 \pm 97
	แบบกะ	N.D.	39 \pm 12	352 \pm 31	465 \pm 163	856 \pm 185
5	คอลัมน์	13 \pm 3	91 \pm 17	326 \pm 48	228 \pm 91	658 \pm 122
	แบบกะ	11 \pm 2	33 \pm 13	409 \pm 40	239 \pm 40	692 \pm 58
6	คอลัมน์	N.D.	54 \pm 9	208 \pm 25	179 \pm 28	441 \pm 37
	แบบกะ	N.D.	53 \pm 12	216 \pm 38	106 \pm 5	376 \pm 42

*N.D. = Not detected (ไม่สามารถตรวจวัดได้)

ปริมาณฟอสฟอรัสรูปแบบต่างๆ ในตัวอย่างดินแต่ละจุดแสดงดังรูป 2.20 เมื่อเรียงลำดับปริมาณฟอสฟอรัสรวมจะได้ Residue-P > HCl-P > NaOH-P > NH₄C-Pl (จุดที่ 2, 3 และ 4) และ HCl-P > Residue-P > NaOH-P > NH₄Cl (จุดที่ 1, 5 และ 6) เมื่อเรียงลำดับปริมาณอินทรีย์ฟอสฟอรัสของทั้งสองวิธีจะได้ HCl-P > NaOH-P > NH₄Cl-P

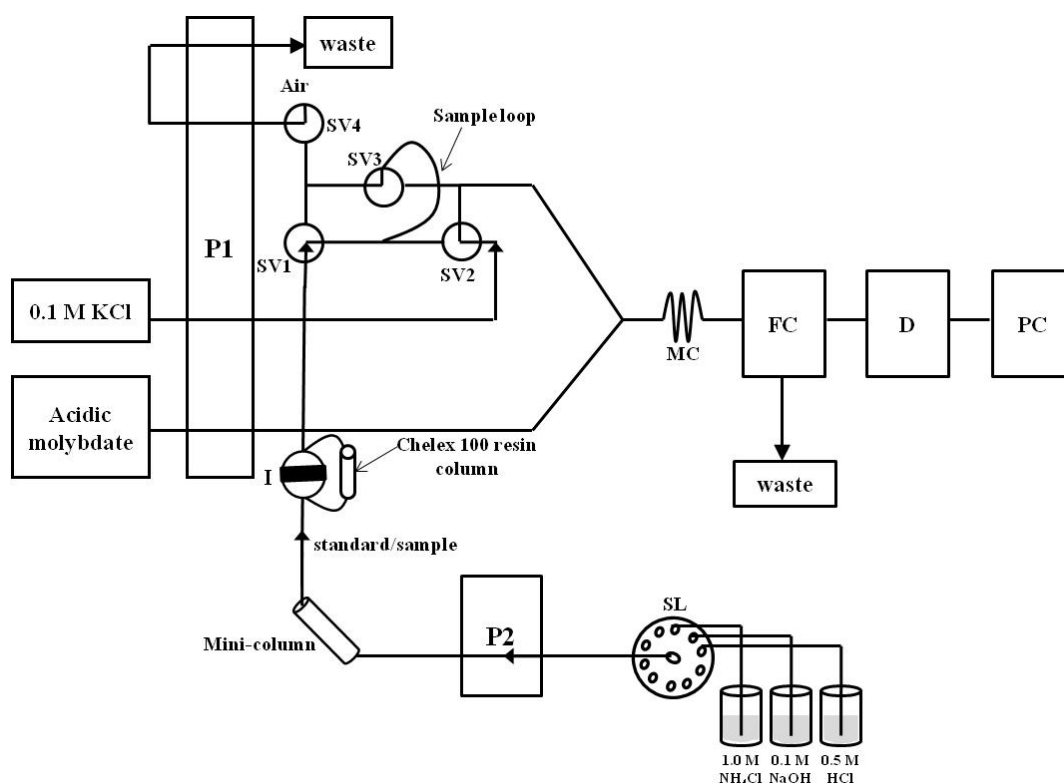


รูป 2.20 ปริมาณฟอสฟอรัสรูปแบบต่างๆ ในตัวอย่างดินตะกอนแต่ละจุดด้วยวิธีการชะแบบออฟไลน์คอลัมน์และวิธีแบบกะ

จากรูป 2.20 พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสรวมและฟอสฟอรัสรูปแบบต่างๆ ที่ได้จากการชะแบบออฟไลน์คอลัมน์และวิธีแบบกะมีความสอดคล้องกันดี (Total P; $y = 0.8962x + 37.394$, $r^2 = 0.8346$, NaOH-P; $y = 1.0604x + 13.085$, $r^2 = 0.6441$, HCl-P; $y = 0.8006x + 18.173$, $r^2 = 0.6130$ และ Residue-P; $y = 0.9213x + 28.831$, $r^2 = 0.7213$) เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองวิธีด้วย paired t -test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($t_{critical} = \pm 2.571$, t_{stat} ของ total-P = -0.562, t_{stat} ของ NaOH-P = 1.678, t_{stat} ของ HCl-P = -0.752 และ t_{stat} ของ residue-P = 0.280) โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาการสกัดน้อยกว่าวิธีแบบกะ อีกทั้งเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า รายละเอียดเรื่องนี้แสดงดังภาคผนวก ค.3

2.7 ออกแบบและประกอบระบบการสกัดแบบลำดับขั้นแบบต่อเนื่องสำหรับสกัดฟอสเฟตจากตัวอย่างดิน

จากการพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต โดยเทคนิคโฟลอินเจกชันแอมแปโรเมตรี พบว่ามีข้อดีคือช่วยลดการรบกวนจากสีและความขุ่นของสารละลาย และซิลิเกตซึ่งมีอยู่ในตัวอย่างดินในปริมาณสูง จึงได้ประยุกต์วิธีดังกล่าวในการศึกษาการสกัดแบบลำดับขั้นแบบต่อเนื่องสำหรับสกัดฟอสเฟตจากตัวอย่างดิน เพื่อศึกษาการชะฟอสเฟตที่อยู่ในรูปฟอร์มต่าง ๆ ในตัวอย่างดิน โดยออกแบบระบบดังแสดงในรูป 2.21 โดยตัวอย่างดินจะถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ และใช้สารละลายสำหรับการสกัดตามลำดับดังนี้ 1.0 M NH_4Cl (R1), 0.1 M NaOH (R2) และ 0.5 M HCl (R3) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับฟอสฟอรัสในรูป exchangeable, organic bound และ carbonate bound ตามลำดับ

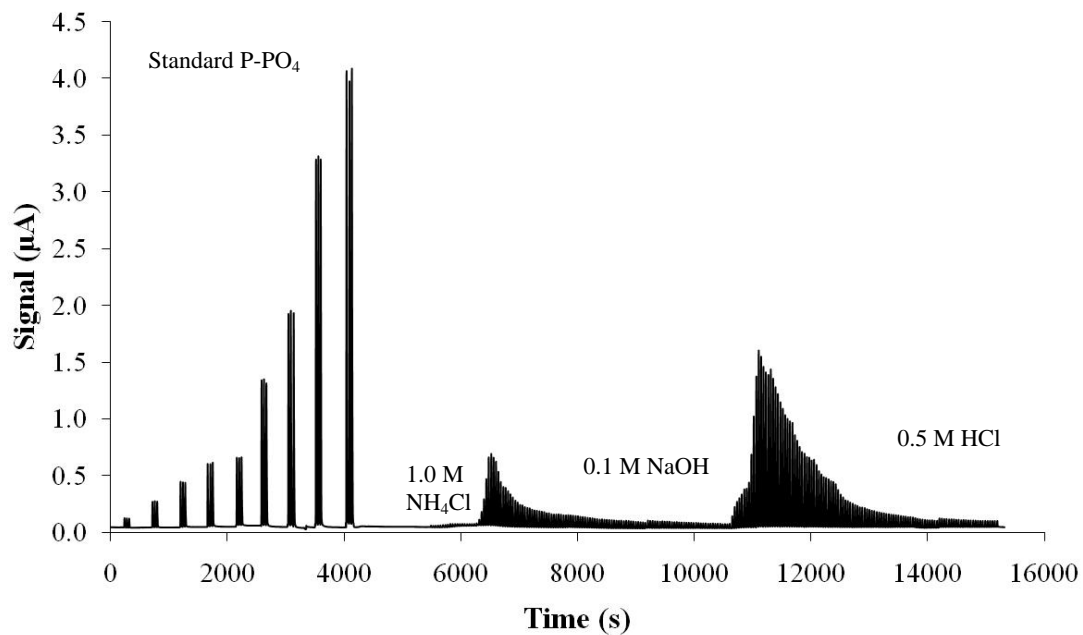


รูป 2.21 ระบบการสกัดลำดับขั้นแบบออนไลน์ร่วมกับระบบโฟลอินเจกชันแอมแปโรเมตรีสำหรับการแยกส่วนฟอสฟอรัสในตัวอย่างดิน: P1-2 = ปั๊มเพอริสตาติค, SV1-4 = โซลินอยด์วาล์ว, MC = ท่อขดผสม, I = วาล์วฉีดยา (six-port valve), SL = 10-port selection valve, FC = โฟลเซลล์ (ขั้วไฟฟ้าทำงาน = แกสซีคาร์บอนเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร, ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง = ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์, ขั้วไฟฟ้าช่วย = สเตนเลสสตีล), D = โฟเทนซิโอสแตท/กัลวานอสแตท (Palmsens), PC = คอมพิวเตอร์

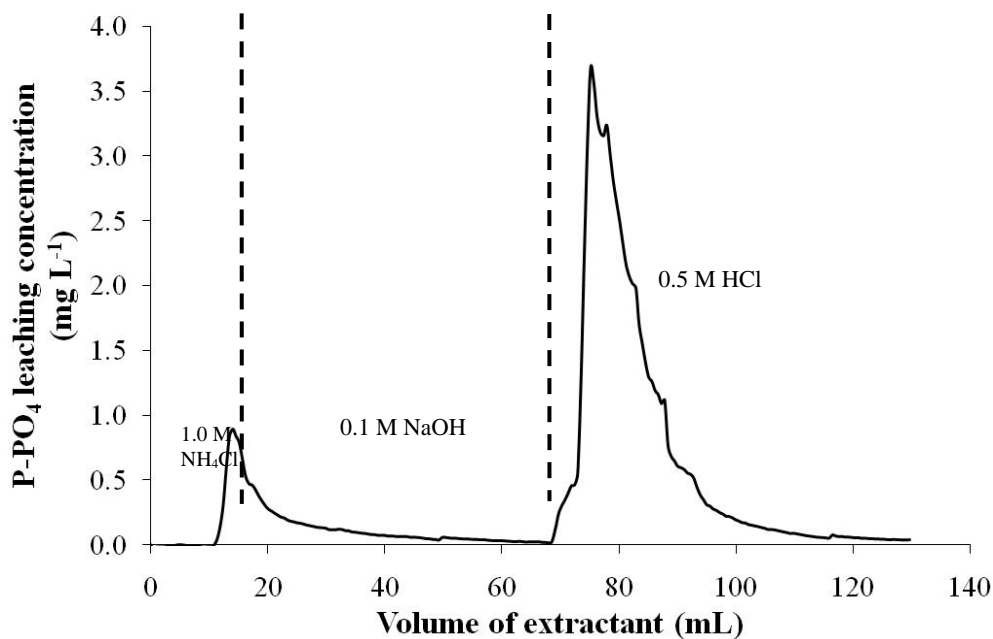
จากรูป 2.21 ข้างต้น สารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างจะไหลผ่านคอลัมน์เรซินซีเล็กซ์ 100 แล้วจะถูกฉีดเข้าในกระแสของสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์และรวมกับกระแสของสารละลายโมลิบเดต 0.5%มวล/ปริมาตร ในสภาวะกรด จากนั้นสารผสมจะไหลผ่านท่อขดผสม (50 เซนติเมตร) ผ่านไปยังโพลีเซลล์ จากนั้นสารเชิงซ้อน 12-โมลิบโดฟอสเฟตที่เกิดขึ้นในระบบจะถูกรีดิวซ์ที่ขั้วไฟฟ้าทำงานแกสซีคาร์บอนที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 0.20 โวลต์เทียบกับซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์เกิดเป็นสารเชิงซ้อนโมลิบดินัมบลู ซึ่งจะให้ค่ากระแสที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของฟอสเฟต แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของพีคและความเข้มข้นของฟอสเฟต จากนั้นต่อระบบการสกัดลำดับขั้นแบบออนไลน์ที่มีตัวอย่างดินบรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาดเล็กเข้ากับระบบโพลีอินเจกชันแอมป์โรเมตรี สารสกัดได้แก่ 1.0 โมลาร์แอมโมเนียมคลอไรด์, 0.1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ 0.5 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกจะไหลผ่านคอลัมน์ตามลำดับด้วยการใช้ซีเล็กชันวาล์ว และมีอัตราการไหลของสารสกัดเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นระบบการตรวจวัดโพลีอินเจกชันแอมป์โรเมตรีจะให้พีคของสารละลายที่ถูกสกัดทุกๆ 40.5 วินาที

ระบบที่พัฒนาขึ้นได้นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการแยกส่วนฟอสฟอรัสในตัวอย่างมาตรฐานดินตะกอน (ปีชีอาร์-684) ซึ่ง FIAGram ที่ได้จะให้ข้อมูลทางด้านจลนศาสตร์ของการสกัดฟอสฟอรัสในตัวอย่าง ปีชีอาร์-684 พบว่า เมื่อใช้สารสกัดชนิดที่ 1 (NH_4Cl) ในการชะจะไม่มีปริมาณฟอสฟอรัส จึงทำการเปลี่ยนเป็นสารสกัดชนิดถัดไป โดยปริมาณฟอสฟอรัสที่ใช้สารสกัด NaOH และ HCl จะมีปริมาณสูงในช่วงแรก แล้วจะค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ จนปริมาณเริ่มคงที่หรือใกล้ศูนย์ แสดงให้เห็นว่า ฟอสฟอรัสที่ถูกจับอย่างแข็งแรงจะค่อยๆ ปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ในสารสกัด ซึ่งจะให้กราฟการชะในลักษณะ broad ส่วนฟอสฟอรัสที่ถูกจับอย่างหลวมๆ จะปล่อยออกมาอย่างรวดเร็วในสารสกัด จะให้กราฟการชะในลักษณะแหลม (sharp) ซึ่งข้อมูลของกราฟการชะในแต่ละสารสกัดแสดงดังรูป 2.22 และ 2.23 พบว่าไม่มีปริมาณฟอสฟอรัสที่ถูกจับอย่างหลวมๆ ในสารสกัดชนิดแรก (NH_4Cl) และฟอสฟอรัสส่วนใหญ่จะถูกจับกับอะลูมิเนียมและเหล็กในสารสกัดชนิดที่ 2 (NaOH) และจับกับแคลเซียมในสารสกัดชนิดที่ 3 (HCl) ซึ่งปริมาณฟอสฟอรัสในแต่ละรูปฟอร์มจะสามารถหาได้จากการอินทิเกรตพื้นที่ใต้กราฟของแฟร็กโทแกรม จากตาราง 2.13 พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสในรูปฟอร์มของ NaOH-P เท่ากับ 181 ± 9 , HCl-P เท่ากับ 912 ± 53 , ฟอสฟอรัสที่จับกับสารอินทรีย์ (residue) เท่ากับ 196 ± 35 และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด เท่ากับ 1289 ± 56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมฟอสเฟต โดยค่าที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้น (1289 ± 56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมฟอสเฟต) กับค่ามาตรฐาน (1373 ± 35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมฟอสเฟต) มีความสอดคล้องกันดี (มีความแตกต่างประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นระบบที่พัฒนาขึ้นมีความสะดวกต่อการนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่ถูกสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยสารสกัดที่แตกต่างกันตามวิธีเอชแอลเอส ซึ่งกราฟการสกัด (แฟร็กโทแกรม) ที่

ได้จากเอฟไอเอแกรมจะให้ข้อมูลทางด้านจลนศาสตร์ของการสกัด นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือ ประหยัดสารเคมี ให้กราฟการสกัดที่มีความละเอียดสูง รวดเร็ว และมีความเป็นอัตโนมัติ



รูป 2.22 FIAGram ของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต (0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ สารสกัดต่างๆ ที่ชะตัวอย่างดินมาตรฐาน บีซีอาร์-684 ด้วยระบบการสกัดลำดับขั้นแบบออนไลน์ร่วมกับระบบโฟลอินเจกชันแอมแปโรเมตรี



รูป 2.23 แฟรกโทแกรม (fractogram) ของการสกัดฟอสฟอรัสในตัวอย่างดินมาตรฐาน บี ซีอาร์-684 ด้วยระบบการสกัดลำดับขั้นแบบออนไลน์ร่วมกับระบบโฟลอินเจกชันแอมแปโรเมตรี

ตาราง 2.13 ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างดินมาตรฐาน ปีซีอาร์-684 ตามวิธีการสกัดของอีลท์เจส-ลิจคลิมาด้วยการใช้ระบบการสกัดลำดับขั้นแบบออนไลน์ร่วมกับระบบโพลอินเจกชันแอมแปโรเมตรี

ครั้งที่	ปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)				
	NH ₄ Cl-P	NaOH-P	HCl-P	Residue-P	Total-P
1	N.D.	172	863	230	1264
2	N.D.	183	906	161	1250
3	N.D.	188	968	197	1353
ค่าเฉลี่ย	-	181	912	196	1289
S.D.	-	9	53	35	56
%RSD	-	5	6	18	4

*BCR-684 Certified value 1373 ± 35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

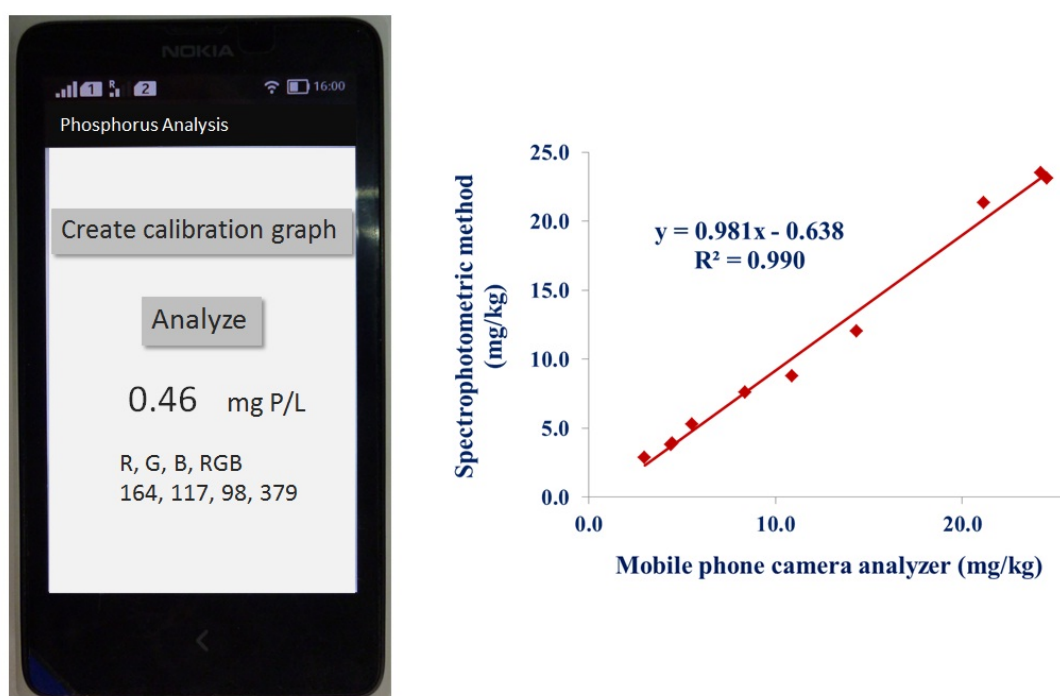
ตาราง 2.14 เป็นการเปรียบเทียบวิธีการสกัดลำดับขั้นฟอสฟอรัสตามวิธีของอีลท์เจส-ลิจคลิมา โดยทุกวิธีการสกัดลำดับขั้นจะทำให้อุณหภูมิห้อง วิธีแบบกะเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ใช้สารเคมีปริมาณมาก อีกทั้งเป็นวิธีการสกัดที่รบกวนเข้าสู่สมดุลระหว่างเฟสของแข็งและของเหลว ซึ่งจะทำให้เกิดการดูดซับกลับ ส่วนวิธีคอลัมน์การชะแบบออฟไลน์เป็นการชะแบบไดนามิก ไม่ต้องรบกวนเข้าสู่สมดุล ซึ่งสารสกัดจะเปลี่ยนใหม่ตลอดเวลาจะช่วยลดการเกิดดูดซับกลับ แต่อย่างไรวิธีนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของดินและขนาดอนุภาคของดิน ซึ่งดินเหนียวหรือดินที่มีขนาดอนุภาคเล็กจะทำให้กระดาษกรองอุดตัน ส่งผลให้อัตราการไหลของสารสกัดช้าลง และใช้เวลานาน ส่วนวิธีการชะแบบออนไลน์เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อจำลองสถานะเช่นเดียวกับธรรมชาติ โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ตัวอย่างดินน้อยกว่าวิธีอื่นๆ แต่เป็นวิธีที่รวดเร็ว อัตโนมัติ ใช้สารเคมีปริมาณน้อย มีความสะดวกในการทำ อีกทั้งให้แฟร็กโทแกรมที่มีความละเอียดสูง ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางด้านจลนศาสตร์ของการชะฟอสฟอรัสในตัวอย่างของแข็ง

ตาราง 2.14 เปรียบเทียบวิธีการสกัดลำดับชั้นฟอสฟอรัสตามวิธีของฮิลท์เจส-ลิจคลีมา

พารามิเตอร์	วิธีแบบกะ	วิธีคอลัมน์การชะแบบออฟไลน์	วิธีการชะแบบออนไลน์
น้ำหนักดิน (กรัม)	1	1	0.05
ปริมาตรสารสกัด (มิลลิลิตร)			
- NH_4Cl	50×2 ครั้ง	50	10-30
fraction	50	50	40-60
- NaOH	50	50	40-70
fraction			
- HCl fraction			
ระยะเวลาการสกัดต่อตัวอย่าง (ชั่วโมง)	45	~ 6-16 (ขึ้นอยู่กับชนิดของดิน)	~ 4-5
อุปกรณ์	อุณหภูมิห้อง เครื่องเขย่าสาร, ขวดรูปชมพู่, กรวยกรอง, กระดาษกรองเบอร์ 1	อุณหภูมิห้อง กระบอกเข็มฉีดยา พลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร, สำลี, กระดาษกรองเบอร์ 1	อุณหภูมิห้อง คอลัมน์ขนาดเล็ก, แผ่นกรองไนลอน, สำลี
ขั้นตอน	เขย่าและกรอง	เทสารสกัดลงในคอลัมน์	สารสกัดไหลผ่านคอลัมน์ขนาดเล็กอย่างต่อเนื่อง

2.8 การพัฒนาระบบคัลเลอริเมตรีที่ใช้กล้องถ่ายรูปของโทรศัพท์มือถือมาวิเคราะห์ฟอสเฟต

ได้พัฒนาระบบคัลเลอริเมตรีที่อาศัยการตรวจวัดความเข้มสีด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องของโทรศัพท์มือถือ มาใช้วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในดินด้วยโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นในระบบแอนดรอยด์ ดังรูป 2.24 รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ก.2

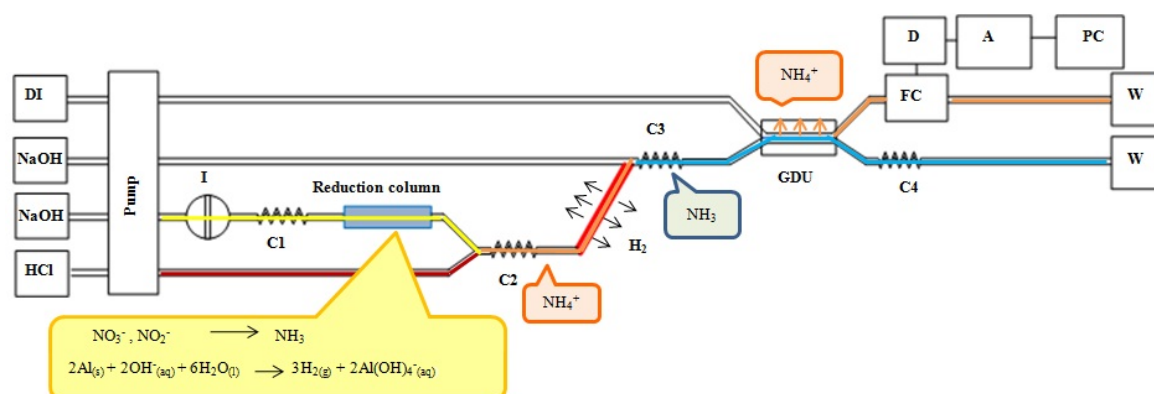


รูป 2.24 ระบบคัลเลอริเมตรีที่ใช้กล้องถ่ายรูปของโทรศัพท์มือถือมาวิเคราะห์ฟอสเฟต

2.9 การพัฒนาระบบฟลูออโรเจนเซนคอนดักโทเมตรีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช

ได้ทำการพัฒนาระบบฟลูออโรเจนเซนคอนดักโทเมตรี ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ที่อยู่ในรูปอนินทรีย์ไนโตรเจนในดิน ซึ่งเป็นรูปฟอร์มของไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ หลักการของระบบแสดงดังรูป 2.25 สารละลายจากการสกัดดินจะถูกฉีดเข้าสู่ระบบ และไหลผ่านคอลัมน์ที่จะเปลี่ยนอนินทรีย์ไนโตรเจนทั้งหมดไปเป็นแอมโมเนียม จากนั้นจึงแยกแอมโมเนียมไนโตรเจนออกมาจากองค์ประกอบอื่นๆ โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแก๊สแอมโมเนีย ซึ่งจะแพร่ผ่านเมมเบรนไปยังสารละลายตัวรับ (acceptor stream) และการละลายของแก๊สแอมโมเนียลงในสารละลายตัวรับทำให้ความนำไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไปอย่างสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบในตอนเริ่มต้น รายละเอียดของวิธีการนี้แสดงดังภาคผนวก ก.3 ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้น

นี้ได้นำไปใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพดินแก่เกษตรกร เพื่อการจัดการดินและปุ๋ยในการทำ
การเกษตรสมัยใหม่



รูป 2.25 ระบบโพลินเจกชันคอนดักโทเมตรีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช

เอกสารอ้างอิง

1. G.E. Batley, *Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems*, CRC Press, Boca Raton, 1989.
2. Ph. Quevauviller (Ed.), *Methodologies for Soil and Sediment Fractionation studies*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002.
3. M. Rosende and M. Miro, *Trends Anal. Chem.*, 45 (2013) 67.
4. C. R. M. Rao, A. Sahuquillo, J. F. L. Sanchez, *Water Air Soil Pollution*, 189 (2008) 291-333.
5. G. Rauret, J. F. López-Sánchez, A. Sahuquillo, R. Rubio, C. Davidson, A. Ure and Ph. Quevauviller, *J. Environ. Monit.*, 1 (1999) 57.
6. A. Tessier, P.G.C. Campbell and M. Bisson, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 844.
7. I. Maiz, I. Arambarri, R. Garcia and E. Millán, *Environ. Pollut.*, 110 (2000) 3.
8. E. Galán, J. L. Gómez Ariza, I. González, J. C. Fernández Caliani, E. Morales and I. Giráldez, in *Libro de Conferencias y Resúmenes de la XV Reunion Científica de la Sociedad Española de Arcillas*, 15 (1999) 68.
9. E. Doelsch, G. Moussard and H. Saint Macary, *Geoderma*, 143 (2008) 168.
10. M. Miro, E.H. Hansen, R. Chomchoei and W. Frenzel, *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 759-771.

11. J. Buanuam, M.Miro, E.H. Hansen, J. Shiowatana, J.M. Estela, V. Cerda, *Talanta*, 71 (2007) 1710-1719.
12. M. Jimoh, W. Frenzel, V. Muller , H. Stephanowitz and E. Hoffmanh, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1197-1203.
13. D. Beauchemin , K. Kyser and D. Chipley, *Anal. Chem.*, 74(2002) 3924-3928.
14. L.M. Dong and X.P. Yan, *Talanta*, 65 (2005) 627-631.
15. P.S. Fedotov, E.Yu. Savonina, R. Wennrich and B.Ya. Spivakov, *Analyst*, 131 (2006) 509-515.
16. P. A. Creed, C. A.Schwegel and J. T. Creed, *J. Environ. Monit.*, 7 (2005) 1079-1084.
17. R. Chomchoei, E.H. Hansen and J. Shiowatana, *Anal. Chim. Acta*, 526 (2004) 177-184.
18. R. Chomchoei, E.H. Hansen and J. Shiowatana, *Anal. Chim. Acta*, 536 (2005) 183-190.
19. R. Chomchoei, E.H. Hansen and J. Shiowatana, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 2720-2726.
20. X.B. Long, M. Miro, E.H. Hansen, *Analyst*, 131 (2006) 132-140.
21. W. Tiyapongattana, P. Pongsakul, J. Shiowatana, D. Nacapricha, *Talanta*, 62 (2004) 765-771.
22. I. Aydin, F. Aydin, A. Saydut, C. Hamamci, *J. Hazard. Mater.*, 168 (2009) 664-669.
23. X. Su-lin, Z. Wen-bin, *Int. J. Sediment Res.*, 26 (2011) 230-238.
24. A.M.H. Hieltjes, L. Lijklema, *J. Environ. Qual.*, 9 (1980) 405-407.

ผลงานจากโครงการ

1. การตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (peer reviewed international journals)
 25. W. Siriangkawut, K. Grudpan and J. Jakmunee, Sequential Injection Anodic Stripping Voltammetry with Monosegmented Flow and In-line UV Digestion for Determination of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in Water Samples, *Talanta*, 84 (2011) 1366– 1373. (IF-2013 3.521)
 26. Nuntaporn Moonrungssee, Somkid Pencharee, Jaroon Jakmunee, Colorimetric analyzer based on mobile phone camera for determination of available phosphorus in soil, *Talanta*, 136 (2015) 204-209. (IF-2013 3.521)
 27. Pattama Yanu, Jaroon Jakmunee, Flow injection with in-line reduction column and conductometric detection for determination of total inorganic nitrogen in soil, *Talanta*, (2015) accepted. (IF-2013 3.521)
 28. Pimporn Insian, and Jaroon Jakmunee, Flow Injection Amperometric Detection and Off-line Sequential Extraction Column for Fractionation of Phosphorus in Sediment, *Chiang Mai J. Sci.*, submitted.
 29. Pimporn Insian, Nuntaporn Moonrungssee , and Jaroon Jakmunee, Simple Automatic Flow Injection Spectrophotometric System for Determination of Phosphate, *Inter. J. Anal. Chem.*, submitted.
 30. Autchara Paukpol, Jaroon Jakmunee, Greener Anodic Stripping Voltammetric Method Employing Bismuth Coated Screen-printed Electrode for Determination of Cadmium and Lead, *Chiang Mai J. Nat. Sci.*, submitted.
 31. Autchara Paukpol, Jaroon Jakmunee, Anodic Stripping Voltammetric Analysis of Cadmium and Lead in Solutions from Sequential Extraction of Soil and Sediment Samples, *Anal. Chim. Acta*, MS in preparation.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - การบริการชุมชน

ต้นแบบเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นและวิธีการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องได้นำไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์คุณภาพดินของเกษตรกร เช่น ระบบเอฟ ไอ เอ สำหรับการหาปริมาณฟอสฟอรัส และ ไนโตรเจนอินทรีย์

- *เชิงวิชาการ*

เครื่องมือ อุปกรณ์และวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ได้ใช้ประโยชน์ในการเรียนปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า ของนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วิธีการที่พัฒนาขึ้นยังได้ใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยทางสิ่งแวดล้อมเกี่ยวกับผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะในดินและดินตะกอน และผลกระทบของฟอสฟอรัสต่อสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะคุณภาพน้ำ

3. อื่น ๆ

3.1 ผลงานจากโครงการที่ตีพิมพ์ใน international conference proceeding

1. W. Powsakul P. Sooksamiti, M. Miro and J. Jakmunee, Greener anodic stripping voltammetric method employing in situ plated bismuth film electrode for determination of cadmium and lead, Proceeding of 14th Asian Chemical Congress (14 ACC) 5-8 September 2011, Bangkok, Thailand, p.135-140.

3.2 ผลงานจากโครงการที่นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

2. Jaroon Jakmunee, Flow Injection Systems for Determination of Some Plant Nutrients in Soil and Fertilizer, PACCON 2011: Pure and Applied Chemistry International Conference (5-7 January 2011), Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand, AC-INV-5.
3. Wanita Powsakul, Manuel Miro, Jaroon Jakmunee, Flow Injection Anodic Stripping Voltammetric Method for Determination of Cadmium and Lead, PACCON 2011: Pure and Applied Chemistry International Conference (5-7 January 2011), Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand, AC_A0019.
4. Jaroon Jakmunee, Jaroon Junsomboon, Manuel Miro, Flow injection amperometric system with on-line and off-line sequential fractionation systems for assessment of orthophosphate in soil, ICAS 2011 – IUPAC International Congress on Analytical Sciences, 22-26 May 2011, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan
5. Wanita Powsakul, Ponlayuth Sooksamiti, Manuel Miro, Jaroon Jakmunee, Greener Anodic stripping voltammetric method employing

in situ plated bismuth film electrode for determination of cadmium and lead, 14th Asian Chemical Congress (14 ACC) 5-8 September 2011, Bangkok, Thailand

6. Jaroon Jakmunee, Preeyaporn Reanpang, Puttaporn Klayprasert, Jantima Upan, Electrochemical Sensors, The 10th Asian Conference on Chemical Sensors, 11-14 November 2013, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand
7. Pattama Yanu, Jaroon Jakmunee, Flow injection conductometric system for determination of total inorganic nitrogen in soil sample, 19th International Conference on Flow Injection Analysis (19th ICFIA)” in Fukuoka, Japan, from 30th November to 5th December
8. Jaroon Jakmunee, Sujitra Funsueb, Small scale method based on flow injection colorimetry for determination of soil organic matter, 19th International Conference on Flow Injection Analysis (19th ICFIA)” in Fukuoka, Japan, from 30th November to 5th December

3.3 ผลงานจากโครงการที่นำเสนอในการประชุมวิชาการในประเทศ

1. Wanita Powsakul, Ponlayuth Sooksamiti, Manuel Miro and Jaroon Jakmunee, Determination of Cadmium and Lead by Flow Injection Anodic Stripping Voltammetric Method Employing Bismuth Film Electrode, P-07, RGJ Seminar Series LXXXIV: “Research and Innovation in Chemistry for Sustainable Development”, September 2nd, 2011, University Academic Service Center (UNISERV), Chiang Mai University.
2. Jaroon Jakmunee, Jaroon Junsomboon, Pimporn In-sian, Flow-based On-line Sequential Extraction for Fractionation of Phosphorus and Some Heavy Metals in Soil, TRF meeting: Young Researcher meet TRF Senior Research Scholar, 10-12 October 2012, Cha-am, Petchaburi.
3. Pimporn In-sain and Jaroon Jakmunee, A CONTINUOUS SEQUENTIAL EXTRACTION WITH ON-LINE DETERMINATION OF PHOSPHORUS LEACHED FROM SOIL BY USING FLOW INJECTION AMPEROMETRIC METHOD, The 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38), October 17-19, 2012.

4. Jakmunee, J., Junsomboon, J., In-sian, P., Flow Injection Amperometric Method for Determination of Phosphate and Fractionation of Phosphorus Species in Solid Materials, TRF meeting: Young Researcher meet TRF Senior Research Scholar, 16-18 October 2013, Cha-am, Petchaburi.
5. Autchara Paukpol, Jaroon Jakmunee, Bismuth Coated Screen-printed Electrode for Determination of Trace Cadmium and Lead by Anodic Stripping Voltammetry, TRF Seminar Series in Basic Research CVIII: "Analytical Science: Past, Present and Future" 13-14 January 2015, SCB2, Faculty of Science, Chiang Mai University.

3.4 ผลงานตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้องกับโครงการอื่น ๆ ที่มีส่วนเสริมซึ่งกันและกันกับโครงการนี้

1. S. Khonyoung, P. Reanpang, P. Kongtawelert, S. Pencharee, J. Jakmunee, K. Grudpan and S. Kradtap Hartwell, Sequential injection system with modified glass capillary for automation in immunoassay of chondroitin sulfate, *Anal. Lett.*, 44 (2011) 327-339.
2. P. Pinyou, N. Youngvises, J. Jakmunee, Flow injection colorimetric method using acidic ceric nitrate as reagent for determination of ethanol, *Talanta*, 84 (2011) 745-751.
3. O. Kritsunankul and J. Jakmunee, Simultaneous determination of some food additives in soft drinks and other liquid foods by flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography, *Talanta*, 84 (2011) 1342-1349
4. J. Junsomboon, J. Jakmunee, Determination of Potassium, Sodium and Total Alkalies in Portland Cement, Fly Ash, Admixtures and Water for Concrete by a Simple Flow Injection Flame Photometric System, *J. Automated Methods and Management in Chemistry*, ID 742656 (2011) 1-9.
5. S. Somnam, P. Novichai, J. Jakmunee, K. Grudpan, An economical ultrasonic-assisted extraction for the spectrophotometric determination of anionic surfactants, *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 5(03) (2011) 426-435.
6. S. Tontrong, S. Konyoung, J. Jakmunee, Flow injection spectrophotometry using natural reagent from *Morinda citrifolia* root for determination of aluminium in tea, *Food Chem.*, 132 (2012) 624-629 .

7. Sarawut Somnam, Jaroon Jakmunee, Kate Grudpan, Cost Effective Dual-Stage Flow Injection/Sequential Injection Hybrid for Continuous Liquid-liquid Extraction, *Chiang Mai J. Sci.*, 39(2) (2012) 255-263.
8. Sam-ang Supharoek, Napaporn Youngvises, Jaroon Jakmunee, A Simple Microfluidic Integrated with an Optical Sensor for Micro Flow Injection Colorimetric Determination of Glutathione, *Anal. Sci.* 28 (2012) 651-656.
9. Nuntaporn Moonrungssee, Tomoko Shimamura, Takehiro Kashiwagi, Jaroon Jakmunee, Keiro Higuchi and Hiroyuki Ukeda, Sequential injection spectrophotometric system for evaluation of mushroom tyrosinase-inhibitory activity, *Talanta*, 101 (2012) 233-239.
10. Callie Croushore, Sam-ang Supharoek, Chang Young Lee, Jaroon Jakmunee and Jonathan V. Sweedler, A Microfluidic Device for the Selective Chemical Stimulation of Neurons and Characterization of Peptide Release with Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9446-9452.
11. N. Youngvises, T. Chaida, S. Khonyoung, N. Kuppithayanant, W. Tiyapongpatana, A. Itharat and J. Jakmunee, Greener liquid chromatography using a guard column with micellar mobile phase for separation of some pharmaceuticals and determination of parabens, *Talanta* 106 (2013) 350-359.
12. Pimporn Insain, Supada Khonyoung, Ponlayuth Sooksamiti, Somchai Lapananathnoppakhun, Jaroon Jakmunee, Kate Grudpan, Katja Zajicek, and Supaporn Kradtap Hartwell, Green Analytical Methodology Using Indian Almond (*Terminalia Catappa* L.) Leaves Extract for Determination of Aluminum Ion in Waste Water from Ceramic Factories, *Anal. Sci.* 29 (2013) 655-659.
13. Y. Yodthongdee, P. Sooksamiti, J. Jakmunee and S. Lapananathnoppakhun, Uptake of Nutrients in Vegetables Grown on FGD-Gypsum-Amended Soils, *Oriental J. Chem.* 29(3) (2013) 1027-1032.
14. Sarawut Somnam, Shoji Motomizu, Kate Grudpan and Jaroon Jakmunee, Hydrodynamic Sequential Injection with Stopped-flow Procedure for Consecutive Determination of Phosphate and Silicate in Wastewater, *Chiang Mai J. Sci.* 41(3) (2014) 606-617.
15. N. Moonrungssee, T. Shimamura, T. Kashiwagi, J. Jakmunee, K. Higuchi, H. Ukeda An automated sequential injection spectrophotometric method for

- evaluation of tyramine oxidase inhibitory activity of some flavonoids, *Talanta*, 122 (2014) 257-263.
16. Napaporn YOUNGWISES, Porapichcha THANURAK, Thanatcha CHAIDA, Jaroon JUKMUNEE and Awadh ALSUHAIMI, Double-Sided Microfluidic Device for Speciation Analysis of Iron in Water Samples: Towards Greener Analytical Chemistry, *Anal. Sci.*, 31(2015)365-370.
17. Jaroon Junsomboon and Jaroon Jakmunee, Determination of Cadmium and Lead in Concrete Roofing Tiles by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetric Method, *Chiang Mai J. Sci.* (2015) accepted.

ภาคผนวก ก

รายการผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (peer reviewed international journals)

1. W. Siriangkhawut, K. Grudpan and J. Jakmunee, Sequential Injection Anodic Stripping Voltammetry with Monosegmented Flow and In-line UV Digestion for Determination of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in Water Samples, *Talanta*, 84 (2011) 1366– 1373. (IF-2013 3.521)
2. Nuntaporn Moonrungsee, Somkid Pencharee, Jaroon Jakmunee, Colorimetric analyzer based on mobile phone camera for determination of available phosphorus in soil, *Talanta*, 136 (2015) 204-209. (IF-2013 3.521)
3. Pattama Yanu, Jaroon Jakmunee, Flow injection with in-line reduction column and conductometric detection for determination of total inorganic nitrogen in soil, *Talanta*, (2015) accepted. (IF-2013 3.521)



Sequential injection anodic stripping voltammetry with monosegmented flow and in-line UV digestion for determination of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in water samples

Watsaka Siriengkawut¹, Kate Grudpan, Jaroorn Jakmunee*

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 5 April 2011

Keywords:

Sequential injection
Monosegmented flow
Voltammetry
UV digestion
Hanging mercury drop electrode

ABSTRACT

A cost-effective sequential injection system incorporating with an in-line UV digestion for breakdown of organic matter prior to voltammetric determination of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) by anodic stripping voltammetry (ASV) on a hanging mercury drop electrode (HMDE) of a small scale voltammetric cell was developed. A low-cost small scale voltammetric cell was fabricated from disposable pipet tip and microcentrifuge tube with volume of about 3 mL for conveniently incorporated with the SI system. A home-made UV digestion unit was fabricated employing a small size and low wattage UV lamps and flow reactor made from PTFE tubing coiled around the UV lamp. An in-line single standard calibration or a standard addition procedure was developed employing a monosegmented flow technique. Performance of the proposed system was tested for in-line digestion of model water samples containing metal ions and some organic ligands such as strong organic ligand (EDTA) or intermediate organic ligand (humic acid). The wet acid digestion method (USEPA 3010a) was used as a standard digestion method for comparison. Under the optimum conditions, with deposition time of 180 s, linear calibration graphs in range of 10–300 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn(II), 5–200 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II), 10–200 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II), 20–400 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu(II) were obtained with detection limit of 3.6, 0.1, 0.7 and 4.3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Relative standard deviation were 4.2, 2.6, 3.1 and 4.7% for seven replicate analyses of 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn(II), 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II), 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II) and 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu(II), respectively. The system was validated by certified reference material of trace metals in natural water (SRM 1640 NIST). The developed system was successfully applied for speciation of Cd(II) Pb(II) and Cu(II) in ground water samples collected from nearby zinc mining area.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Determination of trace metals in environmental samples is important due to their toxicity to the living things. However, there are only some parts of metals that are toxic or bioavailable to the humans and animals. The toxicity of metal ions varies with its physicochemical form. Typically, in water the most toxic forms are the hydrated metal ions and labile complexes (i.e., dissociation can readily occur), and the least toxic forms are strongly bound metal complexes and metal adsorbed on colloidal particles (indeed, in unpolluted natural waters, metals are usually present in one of these latter two forms) [1]. Therefore, the development in speciation analysis for identifying and measuring the species of these metals present in environment is more concern. There are a num-

ber of speciation procedures for identifying and quantifying the individual forms of heavy metals. The selection of the speciation technique depends on which individual form is of interest and what kind of sample is investigated. In this work, speciation of trace elements contaminated in water in the forms of labile dissolved metals and metals bound to various kinds of substances or particles, either organic or inorganic ones are of interested.

It is well known that electroanalytical methods, notably voltammetric techniques, allow the differentiation of free ions or labile metal ion complexes on one hand and species that are stable bound to colloidal species or inert species on the other hand [2]. Labile species are species that can be detected by anodic stripping voltammetry (ASV), such as hydrated metal ions, and metal ions dissociated from weakly bound complexes or weakly adsorbed on colloidal particles. The inert fraction consists of the species that do not dissociate the metal under the conditions used such as metals bound to dissolved organic matter (DOM), so can not be directly detected by ASV. The total metal species can be measured following prolonged sample pretreatment process such as wet digestion, UV digestion [3–5] to convert bound metals to the labile ones and

* Corresponding author. Tel.: +66 5394 1909; fax: +6 5394 1910.

E-mail address: scijjkmn@chiangmai.ac.th (J. Jakmunee).

¹ Permanent address: Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand.

hence the inert species can be calculated by subtracting of the total metal content with the labile metal content [1]. The most popularly used method for destruction of DOM is wet acid digestion [4]. However, the large amounts of reagent added cause high contamination to the sample. UV digestion is a clean method, effective and can easily be incorporated in an automated trace metal analyzer. Thus, it is a more preferable method for destruction of organic matter prior to voltammetric analysis [4].

The combination of flow-based techniques [6–12] such as flow injection analysis (FIA) and sequential injection analysis (SIA) with voltammetric methods [9,11,13] increases the automation degrees and sample throughput of the method. The most often used working electrode in flow-based system is solid electrode or various thin film electrodes because they provides good mechanical stability to withstand the flow of solution. However, these electrodes have major drawback on low reproducibility and accuracy due to carry over of contaminated analyte on the electrode. On the other hand, mercury drop electrode offers renewable surface, high sensitivity and reproducibility. The use of hanging or static mercury electrodes in flow systems requires the suitable design of the flow cell and the adequate flow conditions to keep the drop stable and firmly hold by the capillary tube. Therefore, up to now there are a few papers describing the construction of home-made flow cells for static mercury drop electrode (SMDE) [14–18] or hanging mercury drop electrode (HMDE) [19–23] and applied them for determination of metal ions by stripping voltammetry. In this work, we proposed the use of a small scale voltammetric cell with HMDE in SI system which provides good stability and reproducibility of the electrode and higher degrees of automation comparing to conventional batch-wise voltammetric analysis. The SI with monosegmented flow analysis (MSFA) approach was introduced to promote good mixing of the solution zones sandwiched between two air segments, resulting from a turbulent flow in the monosegment [24–26]. With this approach sample dilution, single stock standard calibration and standard addition could be made in-line [24,26].

In the present work, we developed the SI-ASV system incorporated with UV digestion unit to perform in-line digestion of sample and quantification of some metals. A low-cost small scale voltammetric cell and home-made UV digestion unit were fabricated and tested for their performances. Monosegmented flow was used to gain benefit in convenient handling of sample preparation and determination of the metals. The developed system provided sensitive, reproducible and clean method for speciation of labile and bound metals with semi-automatic operation and low chemical consumption.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals used were of analytical reagent grade. Deionized water (obtained from a system of Milli-Q, Millipore, Sweden) was used throughout. An acetate buffer solution (0.6 M, pH 4.6), which served as a supporting electrolyte was prepared by dissolving sodium acetate 3-hydrate (Ajax Finechem, Australia) (40.82 g) in water before adding of acetic acid (Carlo Erba, Italy) (17.2 mL) and making up to final volume of 500 mL with water. Working standard solutions of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) were daily prepared by appropriate dilution the stock standard solutions (1000 mg L⁻¹ of the metal, atomic absorption standard solutions, Merck, Germany) with 0.1 M HNO₃ solution. The purified humic acid (Sigma–Aldrich, Germany), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Sigma–Aldrich, Germany) and *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol (Sigma–Aldrich, Germany) were used as complexing ligands on the study of performance of an in-

line UV digestion system. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 30%) (BDH, England) and hydrochloric acid (HCl, 37%) (Merck, Germany) were used for digestion of sample.

2.2. Instrumentation and apparatus

A sequential injection-anodic stripping voltammetric (SI-ASV) system was assembled as depicted in Fig. 1, consisted of a syringe pump (Model XL-3000, CAVRO, USA) and a 10-port selection valve (Valco Instrument Co. Inc., Texas, USA), a holding coil (Tygon® tubing, 1.25 mm i.d., 4.5 m), an UV digestion unit and a voltammetric analyzer (757 VA computrace, Metrohm, Switzerland) equipped with a home-made small scale voltammetric cell. The sequential injection system was controlled by an in-house created software based on Visual Basic 6.0 [27]. The 757 PC software version 2.0 was used with the voltammetric analyzer for voltammetric measurement and data evaluation. The small scale voltammetric cell (EC) was connected via a 3-way switching valve (Upchurch Scientific, USA) and a coil tube to the selection valve of the SI system. The used mercury was flushed out from the cell to the mercury waste bottle through this line.

2.3. Small scale voltammetric cell

A simple small scale voltammetric cell as depicted in Fig. 2, consisted of two chambers: measurement chamber and reference chamber. The measurement chamber was constructed from part of disposable pipet tip (5 mL, Appendorf, Germany) which was cut the upper and lower side to obtain a chamber with approximate volume of 3 mL. The hanging mercury drop working electrode (HMDE) and the platinum wire auxiliary electrode were put in the measurement chamber. Silicone and PTFE tubes were used for connecting the cell to the SI system. The oxygen removal was done by bubbling the nitrogen gas into the solution in the measurement chamber. The electrochemical cell was completed with the modified Ag/AgCl reference electrode (RE) which was made from microcentrifuge tube of 2.5 mL as a chamber filling up by 3 M NaCl and Ag/AgCl wire was put in the RE chamber. The PEEK tube (0.4 mm i.d. × 10 mm) was used as salt bridge for connecting between measurement chamber and RE chamber. The liquid junction between these two chambers was renewed for each measurement by dispensing 100 µL of 3 M NaCl solution to the reference chamber.

2.3.1. Homemade UV digestion unit

A homemade UV digestion unit employing a small size and low wattage (6 W) UV lamps (length 226.3 mm, wavelength 253.7 nm, TAS UV Curing Co. Ltd., Pathumthani, Thailand) has been fabricated. The flow reactor was made of PTFE tubing (0.79 mm i.d., 200 cm long) coiled around the UV lamp and wrapped around the coil with an aluminium foil. The reactor was connected to one port of the selection valve of the SI system (Fig. 1).

2.4. Procedure

An in-housed developed software [27] was employed for control the instrument using a script program containing various steps of operational sequences. Before running the operational sequences for sample analysis, the “Start-up” program was firstly executed, in order to fill the tubings connected to all ports of the selection valve with their respective solutions.

Operational sequences for in-line UV digestion procedure are briefly described as follow. First, air (100 µL) was aspirated to separate sample solution from the carrier solution. Then, sample (1500 µL) and air (100 µL) were aspirated to form stacked zones as shown in Fig. 3(a). The monosegmented zone was then propelled to place in the reactor of the UV digestion unit and irradiated to

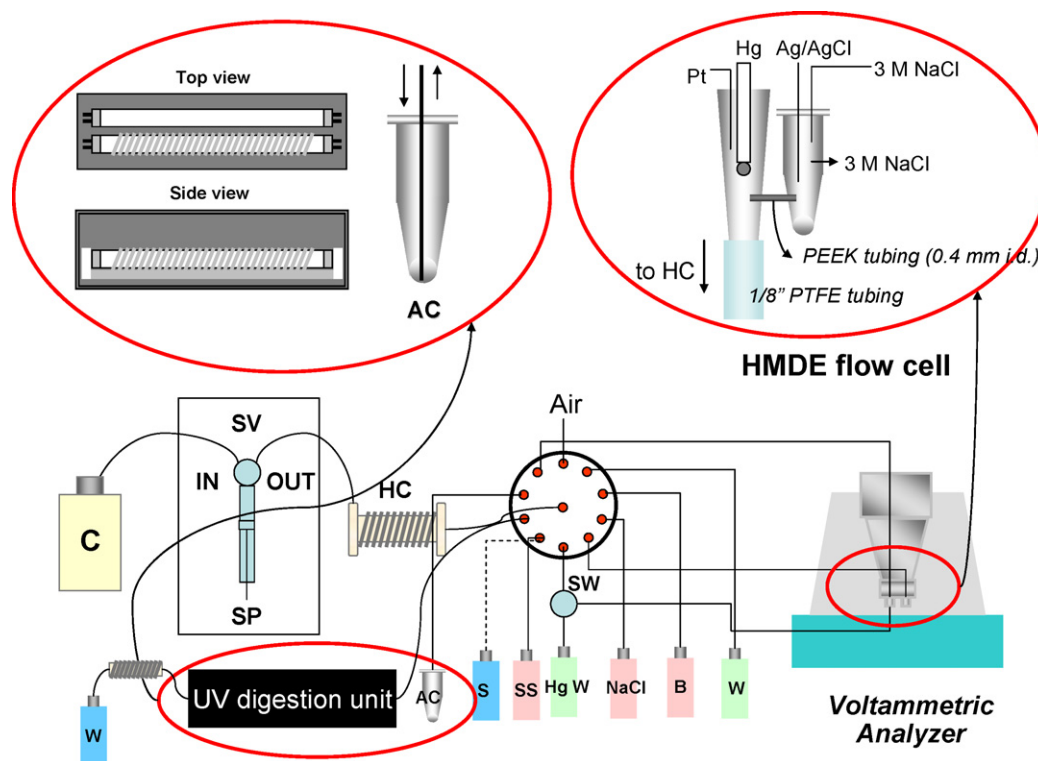


Fig. 1. Sequential injection UV digestion voltammetric system; C = carrier (Milli-Q water); SV = syringe valve; SP = syringe pump; HC = holding coil; SW = 3-way switching valve; AC = auxiliary chamber; S = sample; SS = single standard; Hg W = mercury waste; NaCl = 3 M sodium chloride; B = 3 M acetate buffer; W = waste.

perform UV digestion of sample for 10 min. After that the digested sample was aspirated back to the holding coil (HC) and deliver to store in an auxiliary chamber (AC), waiting for analysis in the next step. Then, the UV reactor was cleaned with water.

The sequences for the determination of metals by an in-line standard calibration or an in-line standard addition are briefly described as below. In case of the external calibration curves, various concentrations of metals standard in buffer solutions were

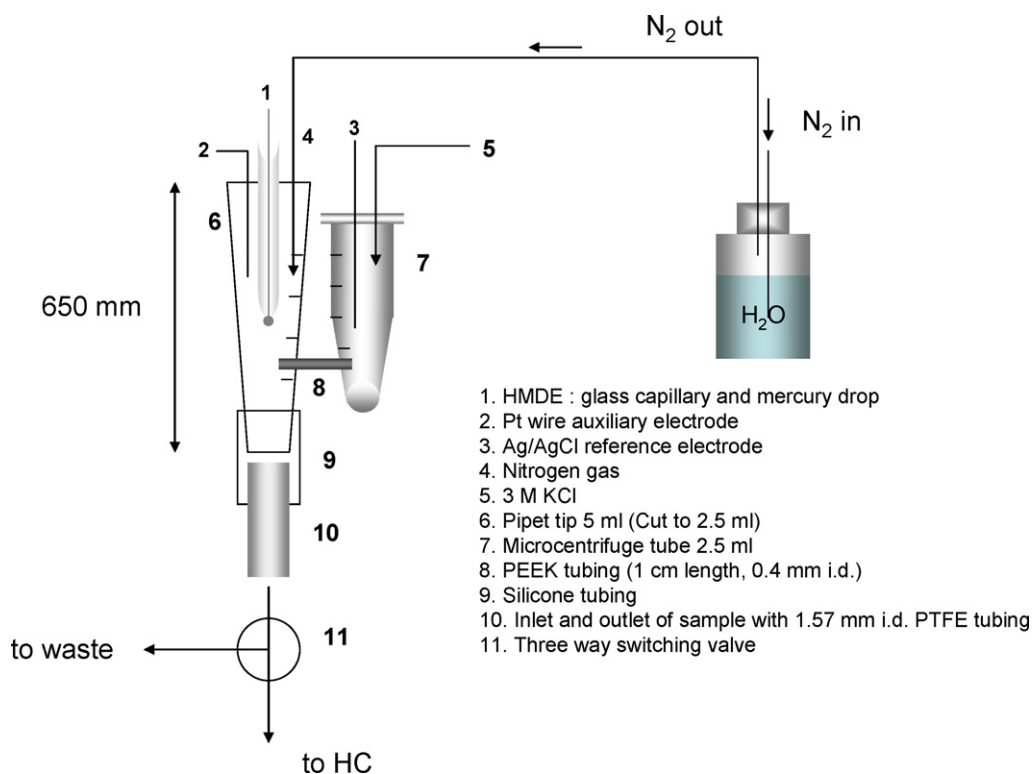


Fig. 2. The developed small scale voltammetric cell.

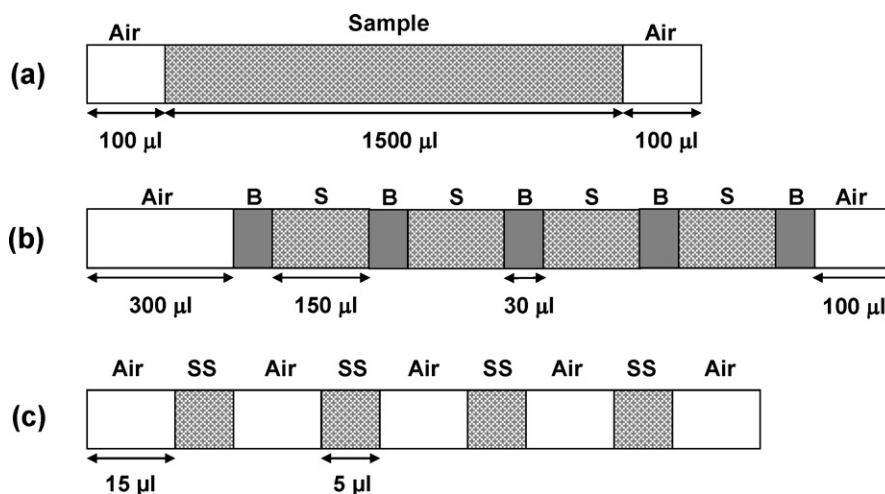


Fig. 3. Sequence of solutions in a holding coil for; (a) in-line UV digestion; (b) in-line buffer dilution; (c) in-line single standard calibration or standard addition; S = sample; SS = single standard; B = 3 M acetate buffer.

aspirated. For the in-line calibration curves or the in-line standard addition, the air monosegmented of buffer (B) and sample (S) or water was sequentially aspirated to form stacked zones as shown in Fig. 3(b). The stacked zone was then propelled to put in a small scale voltammetric cell for electrodeposition of the metals by applying a potential of -1.1 V versus Ag/AgCl to the WE for a specified deposition time. The solution in the cell was moved up and down during the deposition step to promote mass transfer to the electrode. Then, the stripping step was performed under stopped flow condition. A voltammogram was recorded using the following condition: sweep mode, square wave; sweep potential, -1.10 to 0.2 V; sweep rate, 0.25 V/s. To construct the in-line standard addition curves, the 5 μ L of stock standard (SS) each in the monosegment were dispensed to the measurement chamber (see profile in Fig. 3(c)). The solution in the chamber was mixed with SS added before starting the analysis. The concentration of each metal in this system could be varied from the volume of added single standard concentrations. Finally, the used mercury drop was flushed out from the small scale voltammetric cell and dispensed to mercury waste container through a 3-way switching valve. The 3 M NaCl solution was dispensed into a reference chamber to renew the salt bridge between the two chambers and then the measurement chamber and auxiliary chamber were cleaned with water.

3. Results and discussion

3.1. Small scale voltammetric cell design

In this study, a small scale voltammetric cell was designed and fabricated for use with the HMDE without modification of the mercury capillary. The modified voltammetric cell (as shown in Fig. 2) was connected to the tip of mercury capillary tubing. For the deoxygenation step, the commercial nitrogen purging system was modified by connecting the gas tubing from original system to the polypropylene bottle which fills with Milli-Q water. Then, humidified nitrogen gas was connected to the measurement chamber by the PTFE tubing. So, the nitrogen purging time was controlled by the voltammograph software in a similar manner to the batch system.

Preliminary experiments using the small scale voltammetric cell indicated that the upper part of the voltammetric cell should not be too tight to the glass capillary of the HMDE, and the hole at the bottom of voltammetric cell had to be wide enough for efficient removal of mercury waste. The first small scale voltammetric cell developed, the measurement chamber is made from microcen-

trifuge tube of 2.5 mL with cover. The cover was drilled to the same size of the capillary tube diameter. Poor reproducibility of peak current for all metals studied was observed due to the irreproducibility of mercury drop size. In addition, the lower part of the microcentrifuge tube which was drilled and connected to the SI system by 0.51 mm i.d. PTFE tube are not sufficient for mercury waste removal through the bottom hole of the chamber. To solve these problems, 5 mL disposable pipet tip was then used as a measurement chamber. The upper and lower part of the disposable pipet tip was cut to obtain the chamber of approximate volume of 3 mL. A fresh mercury drop was used for each measurement and a suitable position for the glass capillary should be at the center of the chamber. Silicone and $1/8''$ o.d. PTFE tubes were used for connecting of the small scale voltammetric cell to the SI system. The hole at the bottom of the cell was used to allow the inlet and outlet of the solution. And also used for removal of mercury waste after each analysis, avoiding its accumulation inside the voltammetric cell. The used mercury drop and the solution were then flushed out to the mercury waste bottle through the 3-way switching valve (see Fig. 2) before starting the measurement chamber cleaning step.

The inner diameter of PEEK tube that act as the salt bridge between measurement chamber and reference chamber had to be narrow in order to preventing NaCl leakage or contamination of the reference chamber by the sample solution but it should be wide enough for low resistance liquid junction between the two chambers. PEEK tube of internal diameter of 0.4 mm was found to provide reproducible voltammograms of all the metals.

3.2. Optimization of sequential injection and electrochemical parameters

Most of the electrochemical parameters are followed by our previous study [9,11] with mercury thin film electrode. However, some parameters have been re-investigated to fit with the hanging mercury drop electrode used in this work.

3.2.1. Influence of solution movement on peak current

In batch ASV, peak currents increase with the increase of convection rate of the solution due to the decrease of the diffusion layer, thus increasing the mass transport. The similar trend is observed in flow ASV system [24], i.e., an increase in flow rate increased mass transport and sensitivity in the determination. The movement of solution during the deposition step should help increase the sensitivity in the same manner as in the batch ASV. The solution was

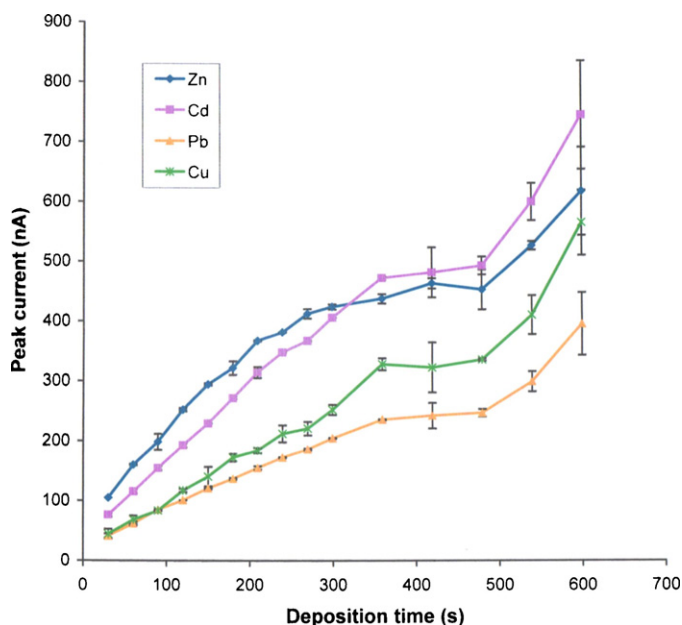


Fig. 4. Effect of deposition time on the peak currents of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II). (conditions: concentration of each metal ion $100 \mu\text{g L}^{-1}$; voltammetric parameters: deposition potential -1.1 V , stripping potential -1.1 to 0.2 V , sweep mode: square wave, voltage step: 0.009918 V , amplitude 0.03998 V , frequency 50 Hz , sweep rate 0.4959 V/s).

moved up and down in the measurement chamber during the deposition step by employing syringe pump. The currents obtained were compared with the quiescent solution at the same deposition times (30 and 180 s deposition time). The results showed that peak current of the metals increased about 65–85% with the movement of the solution.

3.2.2. Influence of deposition time on peak current

The relationship between peak current and deposition time is shown in Fig. 4. Linearities for all metals were observed from deposition time of 0–300 s. Linearities for Cd(II) and Pb(II) were obtained along the concentration of 10 – $100 \mu\text{g L}^{-1}$ and deposition time of 30, 60, 120 and 180 s. That means there is no saturation of the metals on Hg surface. As expected, the sensitivity (peak current) could be increased with an increase in deposition time. However, the comparison of signals obtained in batch and the developed SI system showed that the ratio of the slope of calibration graphs (a plot of peak currents versus concentration of the metals in range of 10 – $100 \mu\text{g L}^{-1}$), of batch to SI systems at deposition time of 30, 60, 120 and 180 s, are 5.5, 6.2, 6.9, 7.1 for Cd(II) and 5.6, 5.9, 6.4, 6.6 for Pb(II), respectively. The lower sensitivity obtained in SI system probably due to mass transport of metal ions toward electrode surface in the developed SI-ASV (by up-down movement of solution) is less efficient than in the batch ASV (by convection). Nevertheless, the developed SI-ASV gave sufficient sensitivity to determine metal ions in range of 10 – $100 \mu\text{g L}^{-1}$ with deposition time of 180 s.

3.2.3. Sequence of solutions for good mixing

Monosegmented flow helped in mixing of the solutions in-line by the effect of turbulent flow in the monosegment while the monosegment zone was moving. Sequence of solutions (mixed standard/sample and buffer) affected on the homogenization of the mixture zone in a monosegment as similar to the previous study [27]. Long zones of each solution would result in incomplete mixing, which lead to lower peak current obtained comparing to an off-line mixing of the solutions. Once the sequence was created, the stacked zones were moved to the measurement chamber and dur-

ing the transportation turbulent flow in the monosegment occurred which caused mixing of the stacked zones. It was found that the sequence as shown in Fig. 3(b) which had a total volume of a final monosegment zone of $750 \mu\text{L}$ provided good mixing. Peak currents of all the metals were comparable to those obtained from off-line mixing.

3.3. In-line UV digestion

In order to release bound metals, an in-line UV digestion was carried out as described in Section 2.4. Some parameters affecting on the digestion were investigated. It was observed that the UV digestion unit caused interference to the voltammetric instrument, so it must be placed far away (at least 60 cm) from the voltammetry unit. Bubbles were evolved during the digestion and caused irreproducibility and low accuracy in the voltammetric analysis. In order to solve this problem, an auxiliary chamber was used for collecting the digested solution from the UV digestion unit. It was fabricated from a 2.5 mL microcentrifuge tube by drilling two holes on the cover lid (one for insert the PTFE tubing to the bottom of the chamber and one for open to the atmosphere). After filling the digested solution into the chamber, the bubbles were released to the atmosphere and then the solution was aspirated into SI system for metal determination. The chamber was cleaned with deionized water after finishing the determination of the metals.

3.3.1. Effect of some parameters on digestion efficiency

The parameters affecting digestion efficiency, i.e., type, concentration and volume of oxidant, and digestion time were investigated. The release of metal ions from the complexes with strong organic ligand (i.e. EDTA) at mole ratio of 1:10 metal:EDTA was used to evaluate digestion efficiency. HCl and/or H_2O_2 was added to 5 mL of the test solution and mixed well before it was aspirated into the system.

Type of oxidant is the most important factor influencing the digestion efficiency in this system. It was found that with the addition of $25 \mu\text{L}$ of 30% (v/v) H_2O_2 and without acid, Pb(II) and Cu(II) could not be detected, while with only $5 \mu\text{L}$ of conc. HCl, low recovery of Cu(II) was observed. However, the mixture of 30% (v/v) H_2O_2 and conc. HCl showed good recoveries (>95%) for all the metals.

Concentration or volume of oxidant used did not significantly affect to the digestion efficiency. The percentage of labile metals after UV digestion are nearly 100% when $10 \mu\text{L}$ 30% (v/v) H_2O_2 and $5 \mu\text{L}$ conc. HCl was used as oxidant. Anyway, volume of H_2O_2 of $25 \mu\text{L}$ was chosen to ensure better digestion efficiency in case of the present of complexing agent or organic matters in sample higher than in this experimental condition.

The digestion time of 4, 6, 8, 10 and 15 min were studied, when using $25 \mu\text{L}$ H_2O_2 and $5 \mu\text{L}$ conc. HCl added to 5 mL of test solution (1:10 metal:EDTA). The good digestion efficiencies of $\geq 85\%$ were observed with digestion time of 4 min. However, the voltammograms showed incomplete digestion of Zn(II) (high background current at potential of Zn(II) peak) until digestion time of ≥ 8 min was used. Therefore, digestion time of 10 min was chosen.

Accuracy and precision of the in-line UV digestion under the optimum condition were investigated. By spiking the metal ions at 25 , $50 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II) and Pb(II) and 50 , $100 \mu\text{g L}^{-1}$ for Zn(II) and Cu(II), the percentage recoveries are in range of 87–106% for Cd(II) and Pb(II) and 82–107% for Zn(II) and Cu(II). Reproducibilities for UV digestion of test solution in five replicates are 3.6%, 2.2%, 4.4% and 5.0% for Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II), respectively.

3.3.2. Digestion performance

Some complexing ligands such as EDTA (strong organic ligand), humic acid or HA (dissolved organic matter), Triton X-100 (surfactant) were added to the metal solutions to be used as model

Table 1

Comparison of percentage recoveries of metal ions in model water samples containing different complexing agents, obtained from using UV-digestion method and wet digestion method.

No.	Organic matter concentration (mg L ⁻¹)			Recovery of metal ions (%)							
	EDTA	HA	TritonX	Zn(II)		Cd(II)		Pb(II)		Cu(II)	
				UV digestion	Wet digestion	UV digestion	Wet digestion	UV digestion	Wet digestion	UV digestion	Wet digestion
1	5	–	–	81.1 ± 2.3	113.8 ± 5.9	104.4 ± 0.9	110.3 ± 2.5	104.7 ± 4.2	97.4 ± 12.7	97.3 ± 5.7	114.7 ± 6.9
2	10	–	–	77.8 ± 2.0	94.0 ± 3.8	104.9 ± 1.1	112.8 ± 2.1	103.1 ± 1.4	101.0 ± 12.7	98.1 ± 9.7	109.9 ± 2.8
3	25	–	–	86.3 ± 1.6	89.2 ± 13.6	100.6 ± 2.5	107.8 ± 6.6	94.0 ± 1.5	108.6 ± 2.0	101.9 ± 1.3	106.6 ± 4.2
4	–	5	–	90.1 ± 4.2	115.0 ± 14.7	102.7 ± 3.6	103.8 ± 14.8	97.7 ± 4.5	91.2 ± 13.6	101.7 ± 6.7	115.6 ± 3.5
5	–	10	–	100.4 ± 2.2	77.5 ± 6.5	100.1 ± 5.6	113.2 ± 0.8	93.7 ± 1.2	108.6 ± 8.2	99.9 ± 12.9	105.6 ± 4.8
6	–	25	–	100.9 ± 2.9	115.4 ± 4.2	102.4 ± 5.5	99.6 ± 6.6	96.3 ± 4.0	98.0 ± 4.1	104.6 ± 4.0	106.5 ± 7.2
7	–	–	5	95.2 ± 2.9	76.3 ± 6.9	103.0 ± 4.0	119.4 ± 1.1	104.2 ± 2.3	99.5 ± 3.2	106.3 ± 15.5	98.5 ± 9.9
8	–	–	10	85.8 ± 1.6	118.8 ± 3.6	115.5 ± 7.9	113.9 ± 3.3	105.5 ± 1.7	101.2 ± 1.2	104.1 ± 4.9	111.9 ± 16.3
9	–	–	25	99.1 ± 4.2	91.2 ± 11.7	100.5 ± 5.5	110.0 ± 3.8	99.7 ± 1.0	94.8 ± 10.7	100.2 ± 9.1	123.9 ± 9.2
10	5	5	5	88.3 ± 3.5	85.0 ± 12.5	102.0 ± 4.7	113.0 ± 11.8	100.6 ± 7.2	107.8 ± 5.4	107.6 ± 5.9	117.9 ± 17.4
11	10	10	10	83.4 ± 6.4	92.9 ± 8.8	108.0 ± 0.3	109.9 ± 3.8	93.6 ± 3.3	112.8 ± 2.0	106.2 ± 4.0	116.5 ± 4.9
12	25	25	25	85.6 ± 0.9	93.2 ± 1.7	104.6 ± 2.0	114.2 ± 2.7	104.8 ± 4.3	93.7 ± 1.2	109.2 ± 6.7	107.9 ± 8.3

water samples. Performance of the proposed system was tested. The wet acid digestion method of aqueous samples [28] for total metal analysis (USEPA 3010a) was used as a standard digestion method for comparison. It was found that the released metal ions from both the digestion procedures were in good correlation as shown in Table 1. According to *t*-test at 99.8% confident limit, the results obtained from both methods were in good agreement ($t_{\text{critical}} = 4.025$, $t_{\text{calculate}} = 1.387$, 3.862, 0.477 and 3.365 for Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II), respectively). Therefore, the SI in-line digestion procedure could be effectively used for digestion of water sample.

3.4. Analytical features of the proposed system

Using the operational sequences for SI-monosegmented flow together with the conditions as described in section 2.4, in-line single standard calibration in range of 10–300 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Zn(II), 5–200 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II), 10–200 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II) and 20–400 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cu(II) were constructed by plotting of peak current versus concentration of metal ions ($\mu\text{g L}^{-1}$). Under the selected conditions, linear calibration graph could be obtained for Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) with the calibration equations, $y = 0.0013x + 0.003$, $R^2 = 0.9992$ for Zn(II); $y = 0.0012x - 0.0006$, $R^2 = 0.9991$ for Cd(II); $y = 0.0008x - 0.0002$, $R^2 = 0.9982$ for Pb(II); $y = 0.0009x + 0.0139$, $R^2 = 0.9983$ for Cu(II); respectively. The detection limits (the concentration corresponding to three times of standard deviation of blank) were obtained at 3.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Zn(II), 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II), 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II) and 4.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cu(II) for deposition time of 180 s. The relative standard deviations for seven replicate determinations of 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Zn(II), 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II), 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II) and 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cu(II) were 4.2%, 2.6%, 3.1% and 4.7%, respectively.

3.5. Validation of the proposed system

The system under the selected conditions was applied for analysis of standard reference material of trace metals in natural water (SRM 1640, NIST) as giving the results in Table 2. It was found that there is no evidence of significant difference between the concentration obtained by SI-ASV and certified value at 95% confidence level ($t_{\text{critical}} = 4.30$, $t_{\text{calculate}} = 0.49$, 2.49, 4.04 and 2.87 for Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II), respectively). Batchwise ASV was also performed. No significant different of the results from Batch-ASV and certified value at 98% confidence level ($t_{\text{critical}} = 6.96$, $t_{\text{calculate}} = 5.13$, 4.00, 1.69 and 3.49 for Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II), respectively). The developed SI-ASV with a small scale voltammetric cell could

detect the metals concentrations at the same level as batch-ASV, although sample volumes of 0.750 mL and 10 mL were used for SI-ASV and batch-ASV, respectively. Comparison to batch ASV, the developed method provided higher degrees of automation and lower waste production.

3.6. Analysis of real samples

The system was applied for analysis of bottled mineral drinking water and tap water samples. Concentration of Cd(II) and Pb(II) in those water samples were below detection limit of the method. By spiking 25, 50 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each metals into a sample, recoveries were found in range of 83–116% for Zn(II), 93–112% for Cd(II), 87–105% for Pb(II) and 80–120% for Cu(II).

The proposed system was employed for determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in ground water samples collected from nearby the zinc mining area. In this study, zinc was not determined and the deposition potential of 800 mV was used in order to avoid interference due to the formation of Zn–Cu intermetallic compounds in the amalgam [29]. The samples were collected in a clean polyethylene bottles (1 L) with adding of HCl to acidify sample to pH 1. No sample pretreatment was made except filtering of the sample just before the analysis. The obtained results are presented in Table 3. Voltammograms of sample without and with subjected to UV digestion is depicted in Fig. 5. It should be noticed that peak potential of copper was close to that of mercury so the baseline of the peak was high, leading to high %RSD of the obtained peak current. It was found that concentration of labile metals obtained from direct-ASV system was less than the concentration of metals obtained from UV-ASV system. This indicated that there were some organic matters or complexing agent in ground water samples that could form complexes or adsorb metal ions. To investigate the performance of the in-line UV digestion system, wet digestion was performed on 6 samples for comparison. The results showed that the released metal ions from both of the digestion procedures were

Table 2

Concentrations of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in SRM 1640, determined by the proposed SI-ASV and batch ASV methods, using standard addition method.

Metal ions	Concentration of metals ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Certified value	SI-ASV	Batch-ASV
Zn(II)	53.5 ± 1.1	51.9 ± 5.7	60.9 ± 2.5
Cd(II)	22.82 ± 0.96	22.1 ± 0.5	24.9 ± 0.9
Pb(II)	27.93 ± 0.14	24.2 ± 1.6	29.3 ± 1.4
Cu(II)	85.3 ± 1.2	92.3 ± 4.2	93.4 ± 4.0

Table 3

Concentrations of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in ground water samples, determined by the proposed SI-ASV, using in-line standard addition method.

Sample No.	Concentration found ($\mu\text{g L}^{-1}$) by method					
	Direct-ASV ^a			UV-ASV ^b		
	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)
1	1.3 \pm 0.1	5.0 \pm 2.3	21.8 \pm 4.9	1.8 \pm 0.4	9.6 \pm 0.9	80.0 \pm 1.8
2	ND	4.2 \pm 0.6	ND	0.5 \pm 0.0	5.3 \pm 1.7	21.3 \pm 9.6
3	1.5 \pm 0.1	4.7 \pm 0.9	37.7 \pm 3.3	2.3 \pm 0.6	9.1 \pm 0.8	55.1 \pm 0.6
				1.5 \pm 0.2	4.5 \pm 0.1	53.5 \pm 17.4
4	1.1 \pm 0.5	3.1 \pm 1.1	14.1 \pm 6.4	1.7 \pm 0.2	14.9 \pm 0.3	52.4 \pm 3.0
5	ND	14.2 \pm 1.4	33.6 \pm 5.2	0.3 \pm 0.1	44.1 \pm 1.3	40.4 \pm 4.7
				0.4 \pm 0.1	36.9 \pm 0.7	24.5 \pm 1.2
6	1.0 \pm 0.7	2.2 \pm 0.0	34.5 \pm 2.6	2.8 \pm 0.1	2.8 \pm 0.5	54.5 \pm 0.5
7	2.7 \pm 0.6	68.8 \pm 0.8	ND	4.3 \pm 0.2	70.6 \pm 2.1	13.5 \pm 2.6
				5.0 \pm 0.6	81.5 \pm 1.2	18.0 \pm 0.1
8	ND	3.1 \pm 0.3	10.8 \pm 2.8	1.3 \pm 0.2	4.7 \pm 1.2	27.6 \pm 8.9
9	1.2 \pm 0.0	6.9 \pm 1.4	16.6 \pm 1.5	2.2 \pm 0.3	12.3 \pm 2.1	49.9 \pm 2.5
10	0.6 \pm 0.2	9.5 \pm 0.9	17.6 \pm 6.0	1.7 \pm 0.1	15.6 \pm 0.8	32.8 \pm 4.0
				2.1 \pm 0.1	13.1 \pm 0.4	27.6 \pm 8.1
11	2.9 \pm 0.1	4.0 \pm 0.6	22.4 \pm 1.3	4.0 \pm 0.2	8.6 \pm 0.2	72.6 \pm 4.5
12	2.4 \pm 0.1	2.4 \pm 0.2	34.8 \pm 6.8	2.0 \pm 0.4	2.4 \pm 0.1	52.3 \pm 3.4
				1.7 \pm 0.1	2.0 \pm 0.9	27.3 \pm 10.5
13	0.8 \pm 0.6	13.7 \pm 0.7	104.2 \pm 21.6	2.6 \pm 0.5	14.5 \pm 2.1	233.7 \pm 46.7
14	0.9 \pm 0.0	14.2 \pm 1.6	107.6 \pm 15.7	1.4 \pm 0.1	15.6 \pm 2.5	130.0 \pm 7.9
15	ND	4.9 \pm 0.5	43.4 \pm 3.3	0.6 \pm 0.2	6.8 \pm 1.4	61.8 \pm 15.6
16	0.3 \pm 0.2	5.1 \pm 0.0	57.7 \pm 9.4	0.7 \pm 0.1	9.7 \pm 2.5	82.4 \pm 6.9
17	0.7 \pm 0.2	4.5 \pm 0.3	25.7 \pm 15.7	0.4 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1	34.1 \pm 1.3
				0.5 \pm 0.1	7.1 \pm 0.6	46.5 \pm 12.2
18	1.0 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1	97.6 \pm 31.4	1.1 \pm 0.0	11.3 \pm 0.4	121.8 \pm 19.6
19	ND	3.3 \pm 0.3	33.4 \pm 1.6	0.9 \pm 0.0	6.7 \pm 0.5	44.2 \pm 12.8
20	0.5 \pm 0.3	3.9 \pm 0.1	24.9 \pm 2.5	1.1 \pm 0.1	7.3 \pm 0.6	62.0 \pm 8.8

Italic values: determined by SI-ASV after batchwise wet digestion [28].^a Direct-ASV: determined by SI-ASV without sample digestion.^b UV-ASV: determined by SI-ASV after in-line UV digestion of sample.

in good correlation. According to *t*-test at 95% confidence limit, the results obtained from both the methods were in good agreement ($t_{\text{critical}} = 2.57$, $t_{\text{calculate}} = 0.015$, 0.664 and 0.548 for Cd(II), Pb(II) and Cu(II), respectively). To perform the recovery study, eight samples were spiked with metals at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II) and Pb (II) and $20 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cu(II). Satisfactory results for the concentration level studied were obtained for Cd(II), Pb(II) and Cu(II) which percentages recoveries of 97–111, 93–115 and 83–118% were obtained,

respectively. The proposed system allowed the speciation of free and bound metals to be carried out quickly and more efficiently.

4. Conclusion

A cost-effective sequential injection system was assembled and applied to perform a monosegmented flow anodic stripping voltammetric analysis with a small scale voltammetric cell using a hanging mercury drop electrode (HMDE) as a working electrode and an in-line UV digestion for determination of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in water samples. The low-cost small scale voltammetric cell was firstly proposed here and it provides several advantages, e.g. convenient to perform analysis with the HMDE, avoiding tedious washing of glass cell and electrodes after each determination, involving small amounts of solution, compatible with automated operation of SI system and providing good precision and accuracy of the results. The system developed further by incorporating a homemade UV digestion unit was successfully applied for speciation of labile and bound forms of some trace metals in ground water samples. Performance of the in-line UV digestion system was tested in the determination of metal ions in model water samples which contained some dissolved organic matters. The results obtained are comparable to those by the standard method based on wet acid digestion (USEPA 3010A) which was used for comparison. The in-line UV digestion system offers high degrees of automation, less contamination, low consumption of reagent and sample, and low waste production when comparing to batchwise wet acid digestion method.

Acknowledgements

The Center for Innovation in Chemistry: Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH-CIC), the Commission

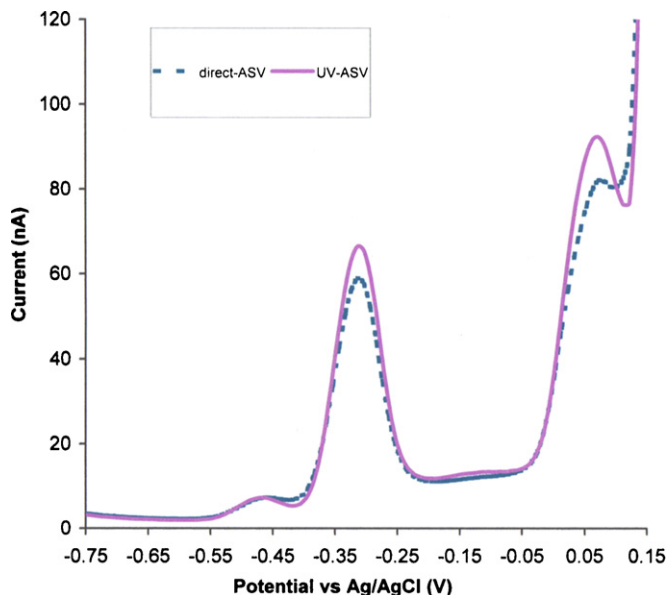


Fig. 5. Voltammograms of ground water sample without and with UV digestion before the voltammetric measurement.

on Higher Education (CHE) and the Thailand Research Fund (TRF) are acknowledged for financial supports. The Royal Golden Jubilee Ph.D. program is gratefully acknowledged for the scholarship to W.S.

References

- [1] A.W. Bott, *Curr. Sep.* 14 (1995) 24–30.
- [2] T.M. Florence, *Analyst* 117 (1992) 551.
- [3] J. Golimowski, K. Golimowska, *Anal. Chim. Acta* 325 (1996) 111.
- [4] E.P. Achterberg, C.M.G. van der Berg, *Anal. Chim. Acta* 291 (1994) 213.
- [5] E.P. Achterberg, C.B. Braungardt, R.C. Sandford, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* 440 (2001) 27.
- [6] A. Economou, A. Voulgaropoulos, *Talanta* 71 (2007) 758.
- [7] G. Kefala, A. Economou, *Anal. Chim. Acta* 576 (2006) 283.
- [8] R. Perez-Olmos, J.C. Soto, N. Zarate, A.N. Araujo, M.C.B.S.M. Montenegro, *Anal. Chim. Acta* 554 (2005) 1.
- [9] S. Suteerapataranon, J. Jakmunee, Y. Vaneesorn, K. Grudpan, *Talanta* 58 (2002) 1235.
- [10] W.W. Kubiak, R.M. Latonen, A. Ivaska, *Talanta* 53 (2001) 1211.
- [11] J. Jakmunee, S. Suteerapataranon, Y. Vaneesorn, K. Grudpan, *Anal. Sci.* 17 (2001) i399.
- [12] A. Ivaska, W.W. Kubiak, *Talanta* 44 (1997) 713.
- [13] C.L. da Silva, J.C. Masini, *Fresenius J. Anal. Chem.* 367 (2000) 284.
- [14] G. Abate, J. Lichtig, J.C. Masini, *Talanta* 58 (2002) 433.
- [15] A.C.V. dos Santos, J.C. Masini, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1538.
- [16] J. Alpizar, A. Cladera, V. Cerda, E. Lasteres, L. Garcia, M. Catusas, *Anal. Chim. Acta* 340 (1997) 149.
- [17] A. Romanus, H. Mueller, D. Kirsch, *Fresenius J. Anal. Chem.* 340 (1997) 371.
- [18] A.M. Bond, H.A. Hudson, P.A. van den Bosch, *Anal. Chim. Acta* 127 (1981) 121.
- [19] C. Fernandez-Bobes, M.T. Fernandez-Abedut, A. Costa-Garcia, *Electroanal.* 10 (1998) 701.
- [20] C. Colombo, C.M.G. van den Berg, A. Daniel, *Anal. Chim. Acta* 346 (1997) 101.
- [21] D. Saur, E. Spahn, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 154.
- [22] A.M. Bond, R.W. Knight, O.M.G. Newman, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2445.
- [23] E.O. Martins, G. Johansson, *Anal. Chim. Acta* 140 (1982) 29.
- [24] L.B.O. dos Santos, M.S.P. Silva, J.C. Masini, *Anal. Chim. Acta* 528 (2005) 21.
- [25] J. Jakmunee, L. Patimapornlert, S. Kradtap, K. Grudpan, *Analyst* 130 (2005) 299.
- [26] M.S. Pinto Silva, J.C. Masini, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 345.
- [27] W. Siriangkhawut, S. Pencharee, K. Grudpan, J. Jakmunee, *Talanta* 79 (2009) 1118.
- [28] U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts for Total Metals for Analysis by FLAA or ICP Spectroscopy (Method 3010a), U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 1992.
- [29] J. Wang, *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications*, VCH Publishers, Florida, 1985.



Colorimetric analyzer based on mobile phone camera for determination of available phosphorus in soil

Nuntaporn Moonrungsee^a, Somkid Pencharee^b, Jaroon Jakmunee^{c,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000, Thailand

^b Department of Physics, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand

^c Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2014

Received in revised form

18 January 2015

Accepted 19 January 2015

Available online 28 January 2015

Keywords:

Colorimetry

Mobile phone camera

RGB values

Available phosphorus

Soil

ABSTRACT

A field deployable colorimetric analyzer based on an “Android mobile phone” was developed for the determination of available phosphorus content in soil. An inexpensive mobile phone embedded with digital camera was used for taking photograph of the chemical solution under test. The method involved a reaction of the phosphorus (orthophosphate form), ammonium molybdate and potassium antimonyl tartrate to form phosphomolybdic acid which was reduced by ascorbic acid to produce the intense colored molybdenum blue. The software program was developed to use with the phone for recording and analyzing RGB color of the picture. A light tight box with LED light to control illumination was fabricated to improve precision and accuracy of the measurement. Under the optimum conditions, the calibration graph was created by measuring blue color intensity of a series of standard phosphorus solution ($0.0\text{--}1.0\text{ mg P L}^{-1}$), then, the calibration equation obtained was retained by the program for the analysis of sample solution. The results obtained from the proposed method agreed well with the spectrophotometric method, with a detection limit of 0.01 mg P L^{-1} and a sample throughput about 40 h^{-1} was achieved. The developed system provided good accuracy ($\text{RE} < 5\%$) and precision ($\text{RSD} < 2\%$, intra- and inter-day), fast and cheap analysis, and especially convenient to use in crop field for soil analysis of phosphorus nutrient.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In agriculture, the determination of major plant nutrients (e.g. nitrogen, phosphorus and potassium) in soil and fertilizers are crucial for management of nutrient suitable for plant growth and avoiding the over dump of fertilizer to soil that will be lead to environmental pollution [1,2]. The phosphorus is the key essential nutrient which is widely distributed in nature. Although total amount of phosphorus in the soil may be high, it is often present in unavailable forms or in the forms that are only available outside of the rhizosphere. In the soil, more than 80% of the phosphorus can become immobile and unavailable for plant uptake because of adsorption, precipitation, or conversion to the organic form. Phosphorus is never found in a free or uncombined state because of its great affinity for oxygen. Orthophosphates are the most abundant form of phosphorus in an environment, and are readily available for assimilation that was used as fertilizers [3–5].

* Corresponding author. Tel.: +66 53 941 908; fax: +66 53 941 908.

E-mail addresses: jaron.jakmunee@cmu.ac.th, jakmunee@gmail.com (J. Jakmunee).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.024>

0039-9140/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

The available phosphorus is an essential plant nutrient, thus knowing the amounts of phosphorus in soils is useful for agricultural management. Many techniques were reported for determination of available phosphorus [6]. In a batchwise chemical analysis, the colorimetric method, such as vanadomolybdophosphoric acid method and molybdenum blue method based on stannous chloride or ascorbic acid as a reductant [7], is widely used for determination of available phosphorus. However, batch method consumes long time, large amount of chemicals and the big instrument is difficult to be employed in the field.

Nowadays, several commercial test kits are available for field test of phosphorus in soil. Five commercially available soil test kit were compared with standard laboratory analysis for phosphorus content as reported by Faber et al. [8]. All commercial test kits showed similar features such as fast analysis, inexpensive and useful for soil management, but the results of those products presented different accuracies. Nevertheless, the analytical laboratory required precise analytical values, but all of products could provide only the approximate value of nutrient content (i.e., low, medium and high), thus, they are suitable for using as initial screening purposes only.

Recently, the colorimetric analysis could be done by determining RGB values of the digital photo image, which provide more precise and accurate results. The RGB color system represented by

Table 1

Summary of various analyses based on smartphone camera since 2011–present.

Year	Operating system	Analyte	Linear range	LOD	Precision	Ref.
2011	Symbian 60 ⁺	Potassium	3.1×10^{-5} –0.1 M	3.1×10^{-5} M	< 2%RSD	[9]
2012	Android ⁺	O ₂	2–100%	0.7%O ₂	N/A	[10]
2013	iOS	Trinitrotoene (TNT)	1–500 mg L ⁻¹	3.67–4.0 mg L ⁻¹	2.09–7.43%RSD	[11]
2013	Android ⁺	Soil color	N/A	N/A	SD < 3	[12]
2013	Android and iOS	Age of blood stains	1 h–42 day	N/A	N/A	[13]
2013	Android ⁺	Citrus yield	N/A	N/A	N/A	[14]
2014	iOS	Methamphetamine	0.1–2.5 mg L ⁻¹	0.01–0.04 mg L ⁻¹	2–6%RSD	[15]
2014	Android ⁺	Cocaine	0–1 mg L ⁻¹	0.25 mg L ⁻¹	N/A	[16]
2014	iOS	Maltose	0–70 μ mol mL ⁻¹ maltose	3.5 μ mol mL ⁻¹	4–6%RSD	[17]
2014	Android and iOS ⁺	pH	5.0–9.0	< 1.66	N/A	[18]
		Protein	0–100 mg L ⁻¹	< 41 mg dL ⁻¹		
		Glucose	0–500 mg L ⁻¹	< 92 mg dL ⁻¹		
2014	Android ⁺	Salivary cortisol	0.01–10 ng mL ⁻¹	0.01 ng mL ⁻¹	N/A	[19]
2015	Android	Salivary cortisol	0.3–60 ng mL ⁻¹	0.3 ng mL ⁻¹	10–16%RSD	[20]
2015	Android ⁺	pH	1–14	N/A	N/A	[21]
In press	Android	CRP	0.3–81 ng mL ⁻¹	0.4 ng mL ⁻¹	1.7–3.7%CV	[22]
		HRP	0.114–7.3 ng mL ⁻¹	0.114 ng mL ⁻¹	2.6–7.1%CV	
		BCA protein	20–2000 μ g mL ⁻¹	N/A	N/A	
Present	Android ⁺	Available phosphorus	0.0–1.0 mg L ⁻¹	0.01 mg L ⁻¹	< 2%RSD	This work

BCA: bicinchoninic acid; CRP: human C-reactive protein; CV: coefficient of variance; HRP: horse radish peroxidase; LOD: limit of detection; N/A: not available; SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation.

* With application software development.

three component intensities (red, green and blue) is an important index for color expression. The digital cameras integrated in mobile phone and similar devices were interested and have been developed as image detectors. These mobile/smart phones are now available at low cost. Table 1 summarized smartphone camera systems that applied to various analyses. Different application softwares on various operating systems have been developed to be used with smartphone for specific purposes. Among different operating systems, the Android is more popular to develop application because of its low cost smartphone, having open code, free license program and a large community of developers.

In this work, we develop a new colorimetric analyzer based on an android mobile phone for application in agricultural field. The aims of the research were: (i) to design and create the more convenient device for the determination of available phosphorus in soil (ii) to develop software program in the android operating system for recording and analyzing RGB color of the picture (iii) to improve the accuracy and precision of the results by controlling the illumination on sample during taking a photograph. The developed method was successfully applied to convenient determination of phosphorus content in soil from fruit orchards for soil management of phosphorus nutrient.

2. Experimental

2.1. Chemicals and solutions preparation

All chemicals are analytical reagent grade and obtained from Ajax Finechem Co. Ltd. (Australia), except HCl was from B.D.H Co., Ltd (England). All solutions were prepared by using deionized water produced by water purification system (Millipore, Sweden). Acidic molybdate reagent was prepared from 25 mL of 3%(w/v) molybdate solution (dissolving 1.5 g of ammonium molybdate in 50 mL water) in 62.5 mL of 4 mol L⁻¹ sulfuric acid (22 mL of 98%(w/v) sulfuric acid in 100.00 mL water) with 12.5 mL of 0.1%(w/v) antimony tartrate (dissolving 0.1 g of antimony tartrate in 100 mL water). Finally, the 100 mL of reagent solution was obtained. A 1%(w/v) of ascorbic acid solution was freshly prepared by dissolving 1 g of ascorbic acid in 100 mL of water. A stock solution of phosphorus (1000 mg P L⁻¹) was prepared by dissolving 0.4394 g potassium dihydrogen phosphate in 100.00 mL of water. Working standard solution of phosphorus was freshly

prepared by diluting the stock solution with water. A Bray II solution for extraction of phosphorus from soil was prepared by mixing 100 mL of 0.5 mol L⁻¹ HCl and 15 mL of 1.0 mol L⁻¹ NH₄F and adjusted to volume of 500 mL with water. The final concentration of NH₄F and HCl are 0.03 and 0.1 mol L⁻¹, respectively.

2.2. Sample collection and extraction procedure

The soil samples were collected from mangosteen, durian and rambutan orchards in Chanthaburi, Thailand. All samples were air-dried and ground to less than 2 mm particles diameter. The extraction procedure [23,24] was carried out by shaking a portion of 1 g of each soil sample with 7 mL of bray II solution for 1 min. The extracted solution was filtered through a filter paper and the final volume of the filtrate was adjusted to 25.00 mL with water. Filtering of sample may take time about 10–15 min, however, several samples could be done at the same time.

2.3. Apparatus and instrument setup

The colorimetric analyzer box (Fig. 1) was made from a polystyrene foam box, covered outside of the box with black plastic board for protecting the environmental light. Dimension of the box (width \times length \times height) is as follow: outside: 8 \times 10 \times 18 cm and inside: 5 \times 6 \times 11.5 cm). A battery operated flashlight with 7 LED was used to control illumination inside the box by attaching it with the lid of the box at a position over the sample test tube. At this position there is no reflected light on side of the test tube being observed when a rough surface back screen was used, as described in Section 3.5. A mobile phone was stuck on the front of the box at about the center position of the box that providing good focus to the tube. A sample holder was fixed far from mobile phone camera about 3–4 cm, that giving the best focus. In this work, the Nokia X Dual SIM RM-980 was used. However, any Android smartphone may be used, with the following setup/characteristics, i.e., LCD touchscreen, back camera at least 3 megapixel (2048 \times 1536 pixel), fixed-focus camera without flash, automatic ISO control, automatic white balance, and single image mode.

Spectrophotometer (T60 visible spectrophotometer, PG instruments Ltd., England) was used to perform a standard method for

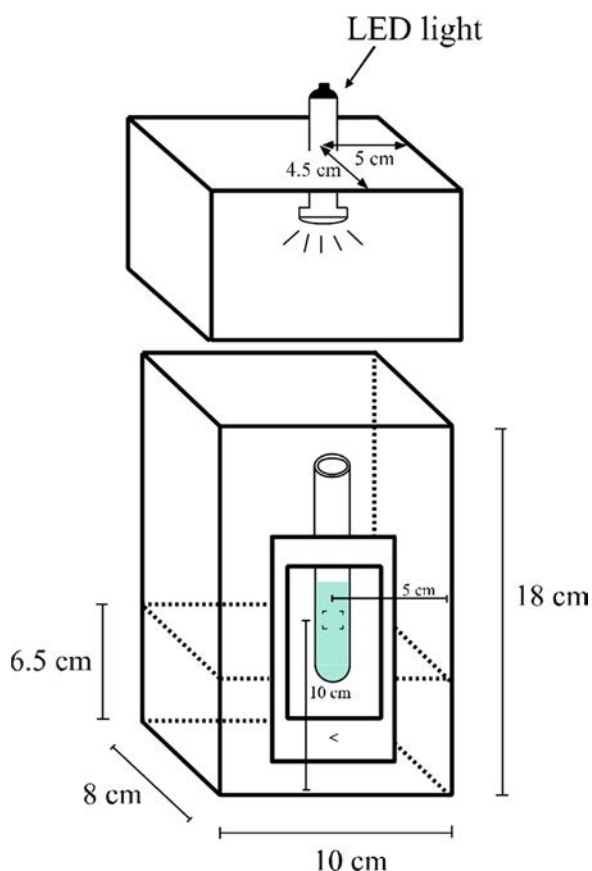


Fig. 1. Light control cabinet and dimension of the setup.

comparison with the proposed method for determination of phosphorus in soil samples.

2.4. Computer program for phosphorus analyzer

A homemade “Phosphorus Analysis” software program (Fig. 2) was developed in Java platform and compiled to run on Android OS. The flow chart of the program is described in supplementary material and the compiled software is available up on requested. As shown in Fig. 2, a simple user interface was designed. A main screen consisted of 2 buttons, “Create calibration graph” and “Analyze” (Fig. 2A). The “Create calibration graph” button (Fig. 2B) was used for creating the calibration graph by taking the photograph of the reaction product of different concentration of standard solutions (up to 5 calibration points). The sample will be focused at the center of the picture. One photograph was taken for each concentration. The program was designed to read color information (red (R), green (G), blue (B)) from the center of the digital images in JPEG format captured by mobile phone camera and to carry out colorimetric analysis. Four adjacent colored pixels at the center of the picture were read and averaged for RGB values. The intensity of R, G, B and summation of RGB (Σ RGB) values were showed 0, 0, 0, and 0 for completely dark or black image, and showed 255, 255, 255 and 765 for a white image. This part of the program was developed from an Eclipse code [25]. After finishing collecting pictures of the standards, then, selected the “Red” or “Green” or “Blue” or RGB option and touch “Done”, a slope and R^2 were calculated and displayed on the screen. If the data was poorly correlated ($R^2 < 0.99$), the “Cancel” option was selected, whereas if it was well correlated ($R^2 \geq 0.99$), “Accept” was chosen to return to the main menu. The calibration equation will be stored for use in the analysis of sample. The sample solution was investigated by selecting the “Analyze” button which was allowed to take a picture. The

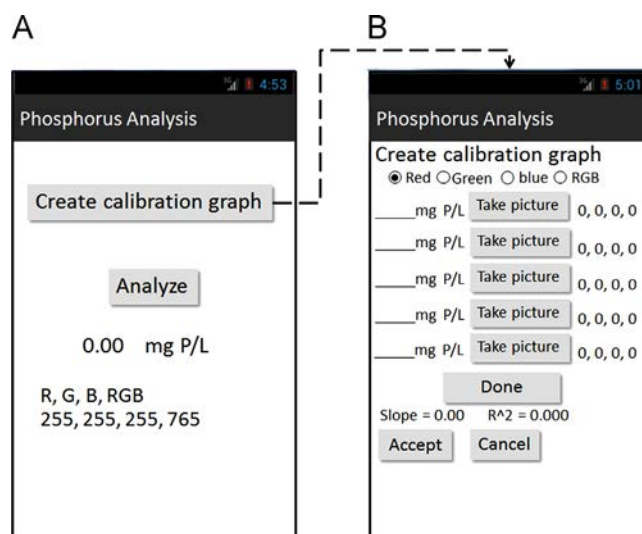


Fig. 2. Designed screen of the analyzer: (A) main menu (B) “Create calibration graph” option menu. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

intensity of color of sample was determined and it was compared with the calibration equation. In real time, the precise concentration (mg P L^{-1}) and the intensity of R, G, B and Σ RGB values were displayed on the screen of the mobile phone.

2.5. Analytical procedure of the colorimetric analyzer

The colorimetric analyzer (Fig. 1) with the ascorbic acid method [7] has been approved to determine of phosphorus in soil samples. The standard phosphorus or sample solution of 5 mL were mixed with 10 drops (about 0.6 mL) of acidic molybdate reagent and 10 drops (about 0.6 mL) of 1%(w/v) ascorbic acid solution in test tubes. The mixed solutions were shaken and left to stand for at least 15 min but no more than 30 min, the blue color product was appeared. The calibration graph was created by analyzing a series of standard phosphorus solution by the developed program (Phosphorus Analysis, Fig. 2) with “Blue” option, as described in Section 2.4.

2.6. Batch spectrophotometric procedure [7]

The ascorbic acid method has been adapted to be a standard method for determination of phosphorus. The procedure was done in a batch system, it is based on the reaction of 3%(w/v) ammonium molybdate and orthophosphate in acidic medium ($4 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$), in the presence of 0.1%(w/v) potassium antimonyl tartrate to form a phosphomolybdic acid that is further reduced to intensely colored molybdenum blue by 1%(w/v) ascorbic acid. After at least 20 min but no more than 30 min, the measurement of absorbance of each solution at 880 nm by a spectrophotometer should be carried out. A calibration graph is then plotted between absorbance and concentration of a series of standard phosphorus solution.

3. Results and discussion

The ascorbic acid method [7] is widely used for the determination of available phosphorus in soil. Spectrophotometer is usually employed as a detector. In this proposed method, the intensity of colored molybdenum blue was measured by using a colorimetric analyzer based on mobile phone camera with the developed software program as described in Section 2. The RGB color system of a picture was then examined for colorimetric determination of phosphorus.

Table 2
Effect of the ambient light on precision (5 measurements in each case).

Controlled illumination	The ambient light	Intensities of color at 0.5 mg P L ⁻¹ of phosphorus concentration			
		R	G	B	ΣRGB
Without cover	Dim room	62 ± 2	55 ± 3	44 ± 2	161 ± 4
	Bright room	121 ± 3	117 ± 3	109 ± 2	347 ± 4
	Outdoor	151 ± 4	114 ± 1	100 ± 3	366 ± 8
	Mean ± SD	111 ± 41	95 ± 35	85 ± 35	291 ± 114
	%RSD	41	37	42	39
With cover	Dim room	164 ± 2	118 ± 1	98 ± 1	379 ± 1
	Bright room	164 ± 2	117 ± 2	98 ± 1	380 ± 4
	Outdoor	164 ± 4	116 ± 1	98 ± 1	379 ± 2
	Mean ± SD	164 ± 1	117 ± 1	98 ± 1	379 ± 1
	%RSD	< 1	1	< 1	< 1

Various conditions, e.g., reaction time, ambient light condition, light intensity, back screen and focal length were optimized.

3.1. Effect of the reaction time

In this method, timing should be controlled precisely in order to obtain accurate result. The blue colored product was observed if the sample solutions and reagents were mixed more than 1 min. The blue product increased with time. The reaction time was studied in the range of 0–40 min at phosphorus concentration of 0.5 and 1.0 mg P L⁻¹. Intensity of the blue product was measured by the developed colorimetric analyzer. It indicated that the intensity values were not significantly different for reaction time in the range of 15–30 min. Therefore, the reaction time of 15–30 min was selected for further measurement.

3.2. Effect of the ambient light on precision

Different ambient light conditions, i.e., dim room (turn off the light), bright room (turn on the light), and outdoor were studied by analyzing the phosphorus concentration of 0.5 mg P L⁻¹. The solution was placed in the colorimetric analyzer box with and without cover lid (Fig. 1) in place while a picture was taken. The intensities of red (I_R), green (I_G), blue (I_B) and sum of red green blue (I_{RGB}) values at different ambient light conditions were summarized in Table 2. The results indicated the extent of effect of ambient light on the measurement without cover lid. When the cover with LED light was used to control constant illumination in the box, the results indicated high precision (RSD < 1%). Therefore, the analyzer box is necessary for improving the precision and accuracy of the measurement.

3.3. Effect of the light intensity on RGB values

Two levels of constant light intensity inside the box were controlled by turning on different numbers of LED (7 and 9 LEDs). The blue colored product from the phosphorus concentration of 0.5 mg P L⁻¹ was measured for the I_R , I_G , I_B and I_{RGB} values under these two light intensities. The obtained results in Fig. 3 indicated that the I_R and I_G showed significantly different values when the power of light increased, while the I_B values is not significantly different. The light intensity affected to the I_R , I_G and I_{RGB} values, therefore, only the I_B was selected to measure the blue colored product in this developed method, with 7 LEDs illumination.

3.4. Effect of the focal length of the mobile phone camera

Distance between the mobile phone camera and sample holder was studied in the range of 1–5 cm by measuring the solutions of 0.0, 1.0 and 5.0 mg P L⁻¹. The length of 1–2 cm gave blurred image while

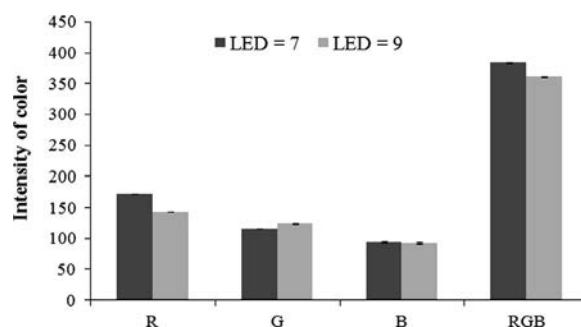


Fig. 3. Effect of the illuminated light intensity on RGB values. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the distance of 3–5 cm presented the clear pictures and higher sensitivity. Nevertheless, the longer distance required a large size of toolbox. Hence, the distance between 3 and 4 cm was chosen.

3.5. Effect of the back screen

The white foam board was applied inside the toolbox, which help to decrease reflection of light when illuminated the LED light inside the box. A white paper with glossy surface and rough surface were selected to study in the effect of the back screen. Those papers were attached behind the sample tube, the results were compared with the white foam board (without sticking the paper). The I_B values of phosphorus concentration in the range of 0.0 to 5.0 mg P L⁻¹ were measured. The I_B and sensitivity were not significantly different for all kinds of back screen. However, the white paper with glossy surface presented the higher reflection than the rough surface and white foam board. Thus, the white paper with rough surface and white foam board are more suitable to be used as the back screen.

3.6. Analytical characteristics

Using optimum conditions as summarized in Table 3, a series of standard phosphorus (0.0–10.0 mg P L⁻¹) were measured for three replicates. A calibration graph was created by plotting I_B values versus concentration of phosphorus as shown in Fig. 4A. It was found to be linear in the range of 0.0–1.0 mg P L⁻¹ (Fig. 4B), with detection limit of 0.01 mg P L⁻¹. Thus, the phosphorus concentration in this range was selected to create the calibration graph for sample analysis. The calibration equation obtained was retained by the developed program (slope = -88 ± 2 , $R^2 = 0.993$). Meanwhile, the spectrophotometric method presented the same linear range as the proposed method (slope = 0.435 ± 0.008 , $R^2 = 0.994$).

For precision study, 0.5 and 1.0 mg P L⁻¹ was evaluated for five replicates, the percent of relative standard deviation (%RSD) values were 0.95 and 2.1%, respectively. The inter-day precision was also obtained, %RSD values were 1.0 and 1.5%, respectively. The method had a sample throughput about 40 samples h⁻¹. The percent of relative error (%RE) was evaluated by analyzing known concentration of standard phosphorus of 0.3 and 0.8 mg P L⁻¹ for three replicates using the calibration graph stored in the mobile phone. The %RE of 3.8% (for 0.3 mg P L⁻¹) and 4.7% (for 0.8 mg P L⁻¹) were obtained.

3.7. Application to soil samples

Soil samples were taken from fruit orchards and prepared as described in Section 2.2. The extracted solutions were measured for phosphorus contents by using the proposed colorimetric analyzer and compared with the batch spectrophotometric method. The results are presented in Table 4. Results from both the methods were correlated well as indicated by a linear equation: $y = 0.981x - 0.638$; $r^2 = 0.990$

Table 3

The optimum conditions.

Parameters	Studied range	Selected condition
Ammonium molybdate concentration, %(w/v)	–	3
Ascorbic acid concentration, %(w/v)	–	1
Sulfuric acid concentration (mol L ⁻¹)	–	4
Potassium antimonyl tartrate concentration, %(w/v)	–	0.1
Reaction time (min)	0–40	15–30
Intensity of color	Red, green, blue	Blue
Length between mobile phone camera and sample	1–5	3–4
Back screen	Foam board, white paper with glossy and rough surface	Foam board and white paper with rough surface
Linear range (mg P L ⁻¹)	0.0–10.0	0.0–1.0

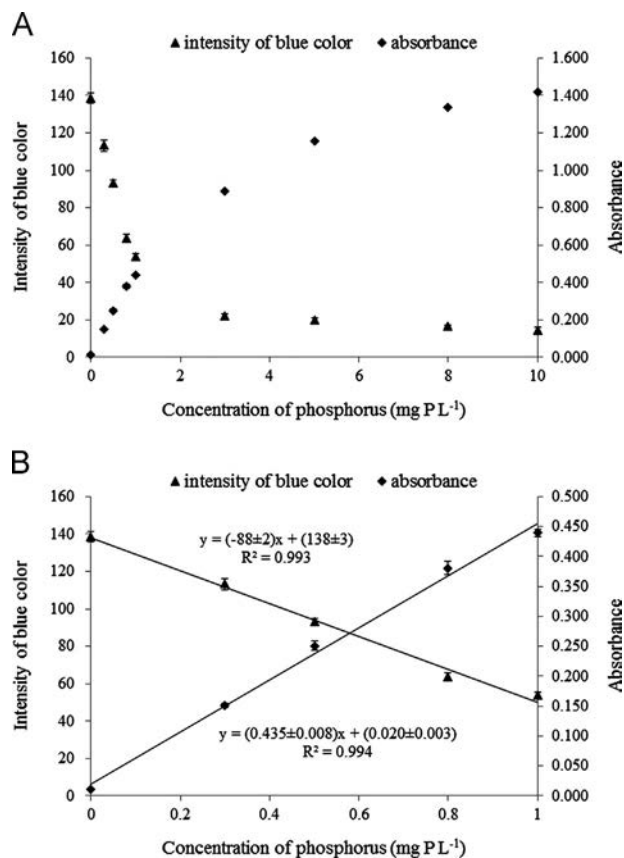


Fig. 4. Calibration graphs using blue color intensity (I_B) and absorbance for phosphorus concentration in the range of (A) 0.0–10.0 mg PL⁻¹ and (B) 0.0–1.0 mg PL⁻¹. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Fig. 5A). The experimental t -value between both the methods is 0.15, which was less than the critical t -values of 2.31 for degree of freedom of 8, at the 95% confidence level, that mean the results obtained from both the methods were not significant difference. Moreover, under the same conditions, the old calibration graph that has been already saved was used for analyzing the phosphorus content. The results obtained from the mobile phone camera correlated well with the spectrophotometric method ($y = 1.005x - 0.382$; $r^2 = 0.996$, Fig. 5B). The results obtained from both the methods were not significant difference, according to examination the t -test at 95% confidence level, the experimental t -value (0.05) was less than the critical t -value (2.31). The developed method provides various advantages, including more convenient, simpler, faster and cheaper analysis. In addition, the precise concentration could be immediately displayed on the screen when analyzed the sample. Whereas, the commercial test kit usually provides approximated values. Therefore, the colorimetric analyzer

Table 4

Comparison of the obtained results from the spectrophotometric method and the mobile phone camera analyzer.

Sample no.	Phosphorus content (mg kg ⁻¹), ($n = 3$)		
	Spectrophotometric method	Mobile phone camera analyzer	
		Intra-day	Inter-day
1	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.4	2.6 ± 0.3
2	4.5 ± 0.1	3.9 ± 0.3	4.3 ± 0.2
3	5.5 ± 0.0	5.3 ± 0.1	5.2 ± 0.2
4	24.2 ± 0.4	23.5 ± 0.4	24.8 ± 0.3
5	24.5 ± 0.2	23.1 ± 0.4	23.9 ± 0.2
6	4.4 ± 0.1	3.8 ± 0.2	4.5 ± 0.3
7	8.4 ± 0.1	7.6 ± 0.3	8.4 ± 0.4
8	14.3 ± 0.0	12.0 ± 0.2	13.4 ± 0.2
9	21.2 ± 0.4	21.3 ± 0.3	20.9 ± 0.2
10	10.9 ± 0.8	8.8 ± 0.2	9.8 ± 0.3

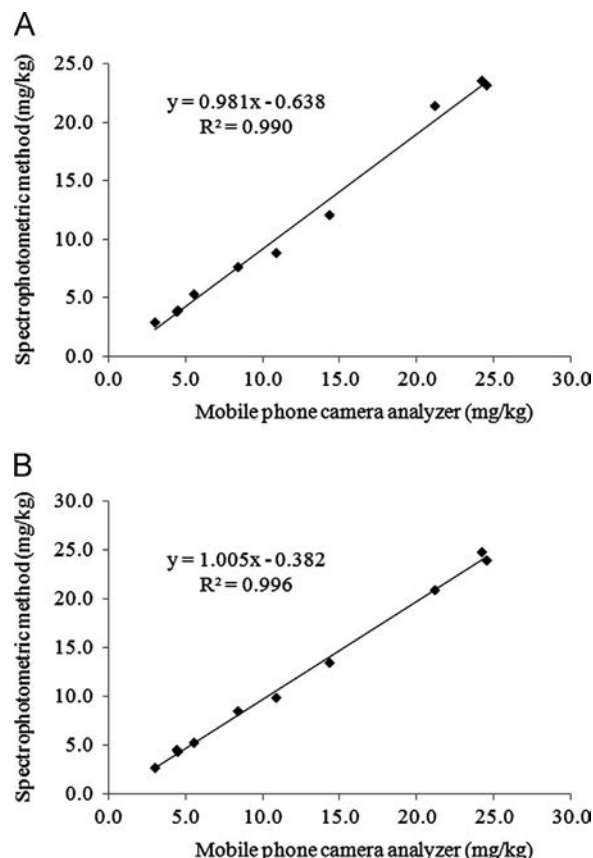


Fig. 5. Correlation graph of phosphorus contents obtained from the spectrophotometric method and the mobile camera analyzer: (A) intra-day, (B) inter-day.

based on mobile phone camera could be usefully applied to examine the available phosphorus for soil management.

4. Conclusions

The experimental results indicate that the developed colorimetric analyzer based on a smartphone could be applied for determination of the available phosphorus content in soil. Ambient light intensity seriously affected on color of the picture obtained from mobile phone camera. Therefore, the light tight box with a simple LED flash light was designed to control constant illumination on sample during taking photograph. This helps to improve precision and accuracy of the measurement. This proposed method could provide the precise value of phosphorus content as same as the laboratory analytical instrument. The developed method shows obvious advantages, e.g., more convenient, field deployable, inexpensive instrument, fast and cheap analysis, which should be suitable for the determination of phosphorus for plant nutrients management in agriculture. The colorimetric analyzer can be developed further for determining of other parameters.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University and Faculty of Science, Chiang Mai University, the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for financial support (grant number RMU5380052). We thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry for partial support.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.024>.

References

- [1] P.B. Martelli, J.A.G. Neto, E.A. Zagatto, S.B. Brienza, M.B. Montenegro, J.F. Lima, *Anal. Chim. Acta* 317 (1995) 239–245.
- [2] J. Wang, B. Fu, Y. Qiu, L. Chen, *Catena* 54 (2003) 17–29.
- [3] X. Su-lin, Z. Wen-bin, *Int. J. Sediment Res.* 26 (2011) 230–238.
- [4] S. Somnam, K. Grudpan, J. Jakmunee, *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 2 (2008) 172–181.
- [5] D.P. Schachtman, R.J. Reid, S.M. Ayling, *Plant Physiol.* 116 (1998) 447–453.
- [6] J.M. Estela, V. Cerda, *Talanta* 66 (2005) 307–331.
- [7] American Public Health Association, *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 18th ed., American Public Health Association, USA, 1992.
- [8] B.A. Faber, A.J. Downer, D. Holstege, M.J. Mochizuki, *Hortic. Technol.* 17 (2007) 358–362.
- [9] A. García, M.M. Erenas, E.D. Marinetto, C.A. Abad, I. de Orbe-Paya, A.J. Palma, L.F. Capitán-Vallvey, *Sens. Actuators, B* 156 (2011) 350–359.
- [10] N. López-Ruiz, A. Martínez-Olmos, I.M. Pérez de Vargas-Sansalvador, M.D. Fernández-Ramos, M.A. Carvajal, L.F. Capitán-Vallvey, A.J. Palma, *Sens. Actuators, B* 171–172 (2012) 938–945.
- [11] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, N. NicDaeid, *Talanta* 115 (2013) 143–149.
- [12] L. Gómez-Robledo, N. López-Ruiz, M. Melgosa, A.J. Palma, L.F. Capitán-Vallvey, M. Sánchez-Marañón, *Comput. Electron. Agric.* 99 (2013) 200–208.
- [13] P. Thanakiatkrai, A. Yaodam, T. Kitpipit, *Forensic Sci. Int.* 233 (2013) 288–297.
- [14] A. Gong, J. Yu, Y. He, Z. Qiu, *Biosyst. Eng.* 115 (2013) 162–170.
- [15] A. Choodum, K. Parabun, N. Klawach, N. Nic Daeid, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, *Forensic Sci. Int.* 235 (2014) 8–13.
- [16] J.E. Smith, D.K. Griffin, J.K. Leny, J.A. Hagen, J.L. Chávez, N. Kelley-Loughnane, *Talanta* 121 (2014) 247–255.
- [17] K. Thongprajukaew, A. Choodum, B. Sa-E, U. Hayee, *Food Chem.* 163 (2014) 87–91.
- [18] A.K. Yetisen, J.L. Martinez-Hurtado, A. Garcia-Melendrez, F. da, C. Vasconcellos, C.R. Lowe, *Sens. Actuators, B* 196 (2014) 156–160.
- [19] S. Choi, S. Kim, J. Yang, J. Lee, C. Joo, H. Jung, *Sens. Biosens. Res.* 2 (2014) 8–11.
- [20] M. Zangheri, L. Cevenini, L. Anfossi, C. Baggiani, P. Simoni, F. Dinardo, A. Roda, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 63–68.
- [21] J.P. Devadhasan, S. Kim, *Anal. Chim. Acta* 858 (2015) 55–59.
- [22] S.K. Vashist, T. van Oordt, E.M. Schneider, R. Zengerle, F. von Stetten, J.H.T. Luong, *Biosens. Bioelectron.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.027i>.
- [23] D.J. Palmer, D.J. Lowe, T.W. Payn, B.K. Hock, C.D.A. McLay, M.O. Kimberley, *Forest Ecol. Manage.* 220 (2005) 140–154.
- [24] R.H. Bray, L.T. Kurtz, *Soil Sci.* 59 (1945) 39–45.
- [25] (<https://developer.android.com>) (accessed 1.11.2014).

**Flow injection with in-line reduction column and conductometric detection for
determination of total inorganic nitrogen in soil**

Pattama Yanu^a, Jaroon Jakmunee^{a,b*}

^aDepartment of Chemistry and ^bCenter of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of
Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author Tel.: +66 53 941908, Fax. +66 53 941908

E-mail: jaroon.jakmunee@cmu.ac.th

ABSTRACT

A cost effective flow injection (FI) conductometric system has been developed for
determination of total inorganic nitrogen (TIN). The system is aimed for evaluation of
nitrogen nutrient in soil for agricultural application. Inorganic nitrogen compounds were
extracted from soil according to the standard method by using potassium chloride solution as
an extractant, and the extracted solution was then injected into the FI system. Nitrate and
nitrite are converted to ammonium ion by an in-line reduction column packed with a
Devarda's alloy. A gas diffusion unit was incorporated into the FI system to separate
ammonium ion from other ions in a donor stream by forming ammonia gas that can diffuse
through a PTFE membrane to re-dissolve in an acceptor stream. Conductance of the acceptor
stream was directly proportional to ammonium ion concentration. Various parameters
affecting reduction efficiency of the column, e.g., column diameter, column packing
procedure, and column length was investigated and optimized. A linear calibration graph in
the range of 2.00-60.00 mgL⁻¹ N-NH₄⁺ ($y=0.123x+0.039$, $R^2=0.997$) was obtained with a

limit of detection of 1.47 mgL^{-1} . Sample throughput of 20 samples h^{-1} was achieved. The result of developed method was correlated with total Kjeldahl nitrogen (TKN) obtained from Kjeldahl digestion method. The proposed method could be used as an alternative method to the Kjeldahl method for determination TIN in soil.

Keywords: Total inorganic nitrogen, Devarda's alloy reduction column, gas diffusion, conductometry, Flow injection, soil

1. Introduction

Nitrogen is the most important nutrient in crop productions for example it is significant for improving the production of rice [1]. Land Development Department of Thailand offers nitrogen determination for Thai farmer. Kjeldahl method is widely used to analyze total nitrogen in soil [2]. However, sample preparation for this method is complicated and time consuming. It needs digestion of soil sample in concentrated acid at high temperature. Then, all species of N are converted into ammonium form which is separated as ammonia gas (NH_3) by distillation and determined by titration. The Kjeldahl method consumes large amount of chemical and energy. However, nitrogen that crops can uptake is inorganic form such as ammonium and nitrate [3] that is directly influent on crop yield. This inorganic nitrogen is simply extracted from soil by shaking with an appropriate extracting solution. The extract is filtered and analyzed by various techniques such as spectrophotometry and potentiometry. Nitrite is normally determined spectrophotometrically employing Griess reaction [4]. Nitrate is usually converted to nitrite by cadmium reduction and determined by the same reaction as nitrite. Ammonium is determined by another reaction, e.g., Nessler reaction [5] and Berthelot reaction [6]. Although sample preparation is simple, there are several analytical methods involved and toxic chemical such as cadmium is

used. Therefore, the development of a greener method that can determine all three nitrogen species together as total inorganic nitrogen (TIN) is attractive. Flow injection conductometry is of interest because it consumes cheap and non toxic chemical. The determination involves the transformation of ammonium ion into ammonia gas and separation by a gas diffusion membrane prior to detection by conductometric detector [7]. It has been proposed earlier for determination of Kjeldahl nitrogen [8]. This method is attractive in term of its high sensitivity, wide linear response to the analyte concentration and relatively simple instrumentation. Previously, this method was proposed for evaluation of ammonium nitrogen in soil [9]. In order to determine TIN, the high efficiency reduction method is required for conversion of nitrite and nitrate to ammonium.

There are various reduction techniques such as by employing metal, alloy, or electrochemical reduction. Cadmium and copper-plated cadmium [10] provide high reducing efficiency to convert nitrate (NO_3^-) to nitrite (NO_2^-). However cadmium is highly toxic. Other metals and alloys were proposed for nitrate reduction such as palladium and platinum [11]. An electrochemical reduction of nitrate on the weakly alkaline electrode such as Pd/Sn-modified activated carbon fiber [12], Cu-Zn cathode [13, 14] was proposed for nitrate reduction. The electrochemical reduction is environmentally benign but it provides low reducing efficiency and takes long time. The most powerful reduction method for converting nitrate to ammonium is by using Devarda's alloy in an alkaline solution [15]. Devarda's alloy is the alloy of aluminium, copper and zinc. It has been used in batch method, as a reductant to convert nitrate and nitrite to ammonia. for determination of TIN in soil and water [16]

In this work, we develop flow injection system that incorporated an in-line reduction column packed with Devarda's alloy and gas diffusion unit for convenient determination of TIN. The column converts nitrite and nitrate to ammonium, which is further being separated as ammonia gas through the gas diffusion membrane, and determined conductometrically.

The method has features of high selectivity, promising sensitivity, excellent precision, rapidity and useful for determining TIN in soil.

2. Experimental

2.1 Chemical and Reagent

Deionized water Type 2 was obtained from a water purification system (Milli-Q, Millipore, Sweden), and was used for preparation of all standard and reagent solutions. The concentration of standard inorganic nitrogen was calculated in term of nitrogen such as nitrogen in ammonium form (N-NH_4^+), nitrogen in nitrite form (N-NO_2^-) and nitrogen in nitrate form (N-NO_3^-). Standard solution of each species was prepared from its salt, i.e., ammonium chloride (Carlo Erba), sodium nitrate (Merck), and sodium nitrite (Merck). Reagent solutions for flow injection conductometric procedure such as sodium hydroxide (Merck) and hydrochloric acid (RCL Labscan) were prepared by dissolving in water. Devarda's alloy of 100 mesh particle size (Sigma-aldrich) was used to construct a reduction column. The silica sand that used for construction was sieved through a 40 and 20 mesh screen, then the particles that retained on the 40 mesh screen were washed with water and stirred in conc. HCl:HNO_3 (1:5 v/v) for 15 minutes. After that it was washed with water until up to pH 6.0, and then oven dried over night (105°C). It was used to prepare the reduction column by mixing with the alloy, in order to reduce back pressure of the column. Potassium chloride (Ajax Finechem) was used to prepare the extractant solution for extraction of total inorganic nitrogen from soil. Sulfuric acid (Merck) was used to digest sample in Kjeldahl method, with a mixed catalyst of potassium sulphate (Carlo Erba), copper sulphate (Carlo Erba) and selenium (Fluka). Stock of each interference ion was prepared from its salt such as calcium chloride (Ajax), magnesium chloride (Fluka), sodium sulphate (Ajex), sodium

chloride (Carlo Erba), sodium carbonate (Carlo Erba), copper chloride (Ajex), ferric acetate (BDH) and magnesium chloride (Fluka). All chemicals are of analytical reagent grade.

2.2 Instrument and apparatus

Manifold of the flow injection conductometric system for determination of total inorganic nitrogen is shown in **Fig. 1**. Reduction column was constructed by packing Devarda's alloy mixed with sand in a glass tube of diameter 2.0-6.0 mm. Degassing tube was made of porous PTFE tube of 0.5 mm i.d., 50 cm long. A home-made gas diffusion unit (GDU) and a home-made flow through conductometric cell (FC) were previously described [8]. A low cost PTFE plumbing tape was used as a gas diffusion membrane. It was placed in between the two Perspex plastic plates which had a groove on each surface. When the GDU was assembled, these grooves formed a donor channel on one side of the membrane and an acceptor channel on the opposite side. PTFE tubing of 0.75 mm i.d. was used to assemble the FI system including mixing coils C1, C2, C4 and C4, each of 50 cm in length. A conductometer (Model 712, Metrohm, Switzerland) was used as a detector (D), connected to a lab-built amplifier (A) with data acquisition unit, and a personal computer (PC). The DK6 Digestion Units (VELP Scientifica) was used for digesting soil sample in the modified Kjeldahl method.

_____Fig.1_____

2.3 Flow injection conductometric procedure

Standard or sample was injected via an injection valve (I) into the NaOH stream and mixing together in a mixing coil C1, then flowed through a reduction column, where the inorganic nitrogen was converted to ammonia gas in an alkaline medium. Devarda's alloy in

alkaline solution also produced hydrogen gas (H_2) which caused problem to the detection system. Therefore, the NaOH solution was mixed with hydrochloric acid in a mixing coil C2, in order to acidify the solution before entering degassing zone. In the low pH solution, ammonia gas was dissolved as ammonium ion, therefore, only H_2 gas was removed from the system at the degassing tube. After that ammonium ion was converted to ammonia gas again, when the solution was mixed with sodium hydroxide at a mixing coil C3. Ammonia gas can pass through a PTFE membrane to re-dissolve as ammonium ion in an acceptor stream (water). Both NaOH and water streams had the same flow rate of 1.0 mLmin^{-1} each. The mixing coil C4 was used for increasing the pressure on the donor side that improves mass transfer of ammonia gas through the membrane to the acceptor stream. Conductance of the acceptor stream was directly proportional to ammonium ion concentration. The increasing of conductance was recorded as a peak when the zone passed through the flow cell of detector. Calibration graph plotting between peak height and nitrogen concentration was used for determination of nitrogen content in sample.

Ammonium was used as standard solution for constructing a calibration graph, by plotting average peak height obtained from triplicate injections of each solution *versus* mgL^{-1} nitrogen (N-NH_4^+). Sensitivity of the method was considered from the slope of the calibration graph. Reduction efficiency of the Devarda's alloy column was evaluated by injecting nitrate or nitrite into the proposed FI system, and it was calculated by comparison the nitrogen concentration obtained from the calibration graph (as N-NH_4^+) to the nitrogen concentration calculated from concentration of each standard solution (N-NO_3^- or N-NO_2^-), i.e., Reduction efficiency = $(\text{N-NH}_4^+ / \text{N-NO}_3^-) \times 100$.

2.4 Sample preparation

Inorganic nitrogen compounds were extracted from soil sample by using 2 M potassium chloride solution as an extractant. Column extraction was carried out batchwise employing a 50.0 mL plastic syringe fitted at the bottom with cotton wool and a piece of filter paper to support the sample [9]. A portion of soil was accurately weighed 10.00 g and put in the column. An aliquot of 40.00 mL of extracting solution (2.00 M KCl) was carefully poured into the column, it was flowed through a soil sample bed under gravity, and the leachate was collected in a polyethylene bottle. Extraction was carried out at room temperature of about 25 ± 2 °C. Kjeldahl digestion was employed for TKN determination. The mixed catalyst of $\text{K}_2\text{SO}_4\text{:CuSO}_4\text{:Se}$ (100:10:1 by weight) and conc. H_2SO_4 were used for Kjeldahl digestion of soil sample at 380°C for 30 minutes. The digested solution was then determined for ammonium content by triplicate injections into the flow injection conductometric system as previously reported [8].

3. Results and discussion

3.1 Optimization of reduction column and FIC system

Reduction efficiency of the Devarda's alloy depended on concentration of hydroxide concentration. Therefore, the effect of concentration of sodium hydroxide on sensitivity (the slope of calibration graph using N-NH_4^+ as standard) and reduction efficiencies on conversion of 50 and 100 mgL^{-1} N-NO_3^- to N-NH_4^+ was studied. The reduction efficiency is calculated based on mgL^{-1} of nitrogen in each standard nitrogen species (N-NH_4^+ or N-NO_3^-) as described in section 2.3.

Reduction column was made by packing 3.0 g Devarda's alloy in glass column of 6.0 mm diameter. It was found that 0.07 M NaOH provided the highest sensitivity and reduction efficiencies for both 50 and 100 mgL^{-1} NO_3^- . Reduction efficiencies in the media of 0.05-0.08 M NaOH were not significantly different as shown in **Fig. 2**. It was observed that the metal

oxide was formed on the surface of alloy particles and caused aggregation of the particles, which led to the built up of back pressure or irreproducible of the flow pattern through the column. Therefore, the new reduction column was used for each condition of NaOH concentration in this experiment.

_____Fig.2_____

Column diameter was studied in the range of 2.0-6.0 mm i.d.. The sensitivity and reduction efficiency of each column was studied by injecting 4-60 mgL⁻¹ of N-NH₄⁺ standard solution for calibration. It was found that smaller column diameter provided higher sensitivity as shown in **Fig. 3**, while the reduction efficiency was quite the same for 2.0-4.0 mm diameters. So that the column of 2.0 mm diameter was selected to use further.

_____Fig.3_____

Sand was selected to mix with the alloy and pack in the column in order to reduce back pressure of the column. Sand of bigger particle size than the alloy could avoid tight packing of the particle, and also help to disperse alloy particles so preventing aggregation of the alloy. It was prepared as described in section 2.1. The proportion of the mixture (w/w) was studied by mixing Devarda's alloy (A) and sand (S) at various ratios: 3A:1S, 2A:1S, 1A:1S, 1A:2S and 1A:3S. A column of diameter 2.0 mm and length of 5.00 cm (constant column volume) was used to study proportion of alloy and sand. Then sensitivity and reduction efficiency of each column was studied by injecting 2-60 mgL⁻¹ of N-NH₄⁺ standard solutions for making calibration graph and 30.00 mgL⁻¹ of N-NO₃⁻ standard solution to investigate reduction efficiency. Despite the reduction column that contained a mixture

1A:3S provided the highest sensitivity, the lowest reduction efficiency was obtained, as shown in **Fig. 4**. This may be because of low amount of alloy in the column. The other proportion of the mixture was not significantly different in sensitivity and reduction efficiency. It was concerned about reduction efficiency and column stability if reduction column contained low amount of alloy, so the mixture of 3A:1S was selected.

_____Fig.4_____

Effect of column length on sensitivity and reduction efficiency was studied. The glass column of 2.0 mm i.d. was cut about 3.00-7.00 cm long, then packed with mixture of 3A:1S. Then 2-60 mgL⁻¹ of standard N-NH₄⁺ was injected to the system for calibration and 30 mgL⁻¹ of standard N-NO₃⁻ was injected to investigate reduction efficiency. It was found that column lengths of 3.00-7.00 cm provided no significant different in reduction efficiency as shown in **Fig. 5**. But the 3.00 cm reduction column provided the lowest sensitivity while the other lengths gave similar sensitivity. The column length of 4.00 cm was selected to investigate column stability.

_____Fig.5_____

Reduction reproducibility or column stability was studied by injecting 2.00-60.00 mgL⁻¹ N-NH₄⁺ standard solution, and then injecting 50.00 mgL⁻¹ of N-NO₃⁻ standard solution consecutively. The standard solution of N-NO₃⁻ was detected about 40 mgL⁻¹ as N-NH₄⁺. The reduction efficiency was almost 70-80% as shown in **Fig. 6**. The reduction efficiency may be improved further by using smaller particle size of Devarda's alloy with appropriate support for reduction of back pressure. The increase of temperature may also improve the reduction

1 efficiency. Anyway, the percent reduction of 70-80% can be used for estimation of TIN for
2 agricultural application. As can be seen from the Fig. 6, the column was stable for at least 2.5
3 hours.
4
5
6
7
8
9

10 _____Fig.6_____

11
12
13
14 Reduction efficiency of the reduction column was investigated by injecting 15- 60
15 mgL^{-1} N-NO_3^- standard solution and mixed standard solution of nitrate, nitrite and
16 ammonium, and determined as N-NH_4^+ by the proposed system. As shown in **Table 1**, the
17 reduction efficiency was more than 80% for all concentration of N-NO_3^- and mixed standard
18 solutions.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 _____Table 1_____

30 31 32 33 34 *3.2 Interference study and analytical characteristics*

35
36
37 The influence of interfering ions was examined by testing a series of solutions
38 containing 20.00 mgL^{-1} of N-NO_3^- and various concentrations of potential interfering ions
39 ($100\text{-}1000 \text{ mgL}^{-1}$). It was found that carbonate, chloride, copper, ferric and zinc up to 1000
40 mgL^{-1} , and magnesium and sulfate up to 500 mgL^{-1} did not interfere the system (95-105%
41 recovery). Calcium ion higher than 200 mgL^{-1} caused positive interference. The analytical
42 characteristics of developed method are summarized in **Table 2**. A linear calibration graph in
43 the range of $2.00\text{-}60.00 \text{ mgL}^{-1}$ N-NH_4^+ ($y=0.123x+0.039$, $R^2=0.997$) was obtained. A limit of
44 detection (calculated based on 3SD of the intercept/slope of a calibration graph) was 1.47
45 mgL^{-1} . A sample throughput of $20 \text{ samples h}^{-1}$ was achieved, with low consumption of non-
46 toxic chemical, i.e. $0.20 \text{ g NaOH.sample}^{-1}$.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

____Table 2____

3.3 Application to soil analysis

A calibration graph was constructed by injecting 2.00-60.00 mgL⁻¹ N-NH₄⁺ standard solutions and used for examining of TIN reported as N-NH₄⁺ concentration in the extract of soil sample. FIgram of the standard N-NH₄⁺ and some samples are shown in **Fig. 7**. A linear calibration equation, $y = 0.123x + 0.039$, $R^2 = 0.997$ was obtained. The same samples were also determined for total nitrogen content by modified Kjeldahl method. The results are presented in **Table 3**. Total Kjeldahl nitrogen (TKN) contents are higher than TIN obtained by the proposed method for almost all samples, because the Kjeldahl method also can release organic nitrogen during sample preparation. However, TIN was correlated with TKN as indicated by the correlation graph equation: $TIN = 0.200TKN + 5.0302$ and $R^2 = 0.523$. The FIC method should be more suitable for determination nitrogen in soil sample than Kjeldahl method since the fraction of nitrogen that available to plant is the inorganic nitrogen.

____Fig.7____

____Table 3____

4. Conclusion

The flow injection conductometric system combining with an in-line Devarda's alloy reduction column and gas diffusion unit was developed for determination of total inorganic nitrogen in soil. The method is more environmental friendly and convenient for determining plant available nitrogen content in soil for agricultural purpose. Moreover, it provides several

advantages such as high sensitivity, selectivity and reproducibility, rapid and low chemical consumption.

Acknowledgements

Human Resource Development in Science Project (Science Achievement Scholarship of Thailand, SAST) is acknowledged for providing a scholarship to PY. We thank Land Development Department, Chiang Mai for providing soil samples. The Thailand Research Fund, the commission on higher Education, Faculty of Science, and Chiang Mai University are acknowledged for funding support (grant number RMU5380052). We thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry and the Graduate School, Chiang Mai University for partial support.

References

- [1] D. Ying-Hua, Y. Xiao-Ming, Z. Ya-Li and S. Qi-Rong *Pedosphere* 17 (2007) 697.
- [2] M.L. Jackson, *Soil chemical analysis*, Pretice-hall, USA, 1974, Chapter 8, pp.183.
- [3] J. Murray, *A textbook of soil chemical analysis*, P.R. Hesse, London, 1971, Chapter 10, pp.149.
- [4] M.J. Moorcroft, J. Davis, R.G. Compton, *Talanta* 54 (2001) 785–803
- [5] F. Cañete, A. Rios, M.D. Luque de Castro and M.Valcarcel, *Analyst* 113 (1998) 739.
- [6] J. Kanda, *Wat. Res.* 29 (1995) 2746-2750
- [7] V. Kuban, *Collection of Czechoslovak Chem. Commun.* 62 (1997) 609-619.
- [8] J. Junsomboon and J. Jakmunee, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 232.
- [9] P. Yanu, J. Junsomboon, T. Norsuwan, and J. Jakmunee¹, *Pure and Applied Chemistry International Conference*, 6th ed, Thailand 2012.
- [10] A.P. Doherty, M.A. Stanley, D. Leech, J.G. Vos, *Anal. Chim. Acta* 319 (1996) 111-120.

- [11] F. Gauthard, F. Epron, J. Barbier, J. Catal. 220 (2003) 182–191.
- [12] Y. Wang, J. Qua, R. Wua, P. Leia, Wat. Res. 40 (2006) 1224–1232.
- [13] M. Li, C. Feng, Z. Zhang, Z. Shen, N. Sugiura, Electrochim. Commun. 11(2009) 1853–1856.
- [14] M. Li, C. Feng, Z. Zhang, X. Lei, R. Chen, Y. Yang, N. Sugiura, J. Hazard. Mater. 171 (2009) 724–730.
- [15] D. S. Hubble and D. M. Harper, Wat. Res. 34 (2000) 2598-2600.
- [16] R. L. Mulvaney, S.A. Khan, W. B. Stevens, C. S. Mulvaney, Biol. Fertil. Soils 24 (1997) 413–420.

Captions for Figures

Fig. 1. Manifold of flow injection conductometric system for determination of total inorganic nitrogen (Pump= peristaltic pump I = injection valve, GDU= gas diffusion unit, FC = flow through cell, W = waste, D = conductometer, A = amplifier, C1 ,C2, C3, C4 = mixing coil, PC = personal computer).

Fig. 2. Sensitivity and reduction efficiencies of 50 and 100 mgL⁻¹ of NO₃⁻ detected as NH₄⁺ after reduction by Devarda's alloy column in various NaOH concentrations.

Fig. 3. Effect of column diameter on sensitivity and reduction efficiency.

Fig. 4. The effect of proportion of the mixture of alloy and sand on sensitivity and reduction efficiency.

Fig. 5. The effect of column length on sensitivity and reduction efficiency.

Fig. 6. Reduction efficiency of the column on the injection of standard 50 mgL^{-1} of N-NO_3^-

(— mean, ----- SD)

Fig. 7. FIgram of $2.00\text{-}60.00 \text{ mgL}^{-1}$ N-NH_4^+ standard solution and extracted solutions of soil samples.

Table 1. Reduction efficiency of mixed standard of nitrate, nitrite and ammonium being detected as ammonium nitrogen (N-NH_4^+) by FIC method.

Mixed solution (mgL^{-1} N)			Detected (mgL^{-1})*	Reduction (%)
NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-		
-	-	15.00	16.34 ± 0.60	109
-	-	30.00	30.48 ± 0.07	102
-	-	45.00	38.60 ± 0.01	86
-	-	60.00	49.16 ± 0.72	82
10.00	-	20.00	29.01 ± 1.23	97
10.00	20.00	-	29.11 ± 0.37	97
10.00	10.00	10.00	27.61 ± 0.45	92

*mean of triplicate injections

Table 2. Analytical characteristics of flow injection conductometric system for determination total inorganic nitrogen in soil.

Category	Value
Precision(RSD)	1.06 (30 mgL ⁻¹ n=11)
LOD	0.06 mgL ⁻¹
LOQ	0.19 mgL ⁻¹
Linear range	2.00-60.00 mgL ⁻¹
NaOH consumption	0.20 g.sample ⁻¹
Sample throughput	20 samples.h ⁻¹
Tolerance limit (mgL ⁻¹)	› 200 mgL ⁻¹ positive peak (Ca ²⁺) › 500 mgL ⁻¹ negative peak (Mg ²⁺) and positive peak (SO ₄ ²⁻) › 1000 mgL ⁻¹ (Cl ⁻ , CO ₃ ²⁻ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺)

Table 3. Content of TIN (determined by FIC method) and TKN (determined by modified Kjeldahl method) in the soil samples.

Sample	TIN* (mgL ⁻¹)	TKN* (mgL ⁻¹)
1	9.33 ± 0.26	24.81 ± 1.39
2	10.18 ± 0.20	13.07 ± 0.39
3	11.45 ± 0.61	14.92 ± 0.64
4	16.37 ± 0.46	36.30 ± 0.51
5	10.87 ± 0.15	38.38 ± 0.47
6	15.09 ± 0.14	32.13 ± 0.41
7	6.69 ± 0.05	23.83 ± 0.20
8	3.84 ± 1.02	3.10 ± 0.52
9	7.44 ± 0.12	27.67 ± 0.73
10	15.93 ± 0.33	56.33 ± 0.19

* mean of triplicate measurements

Figure 1

[Click here to download high resolution image](#)

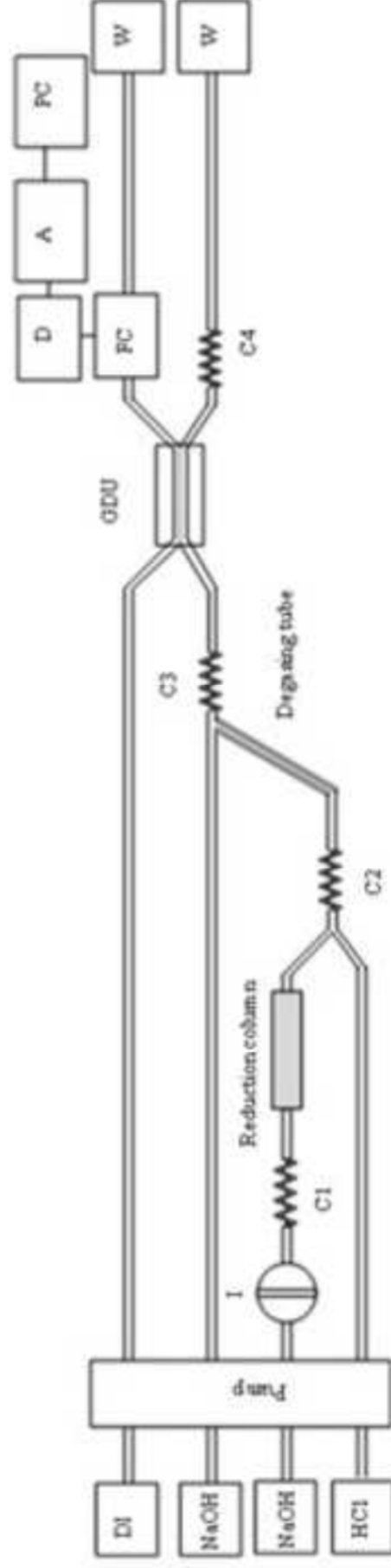


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

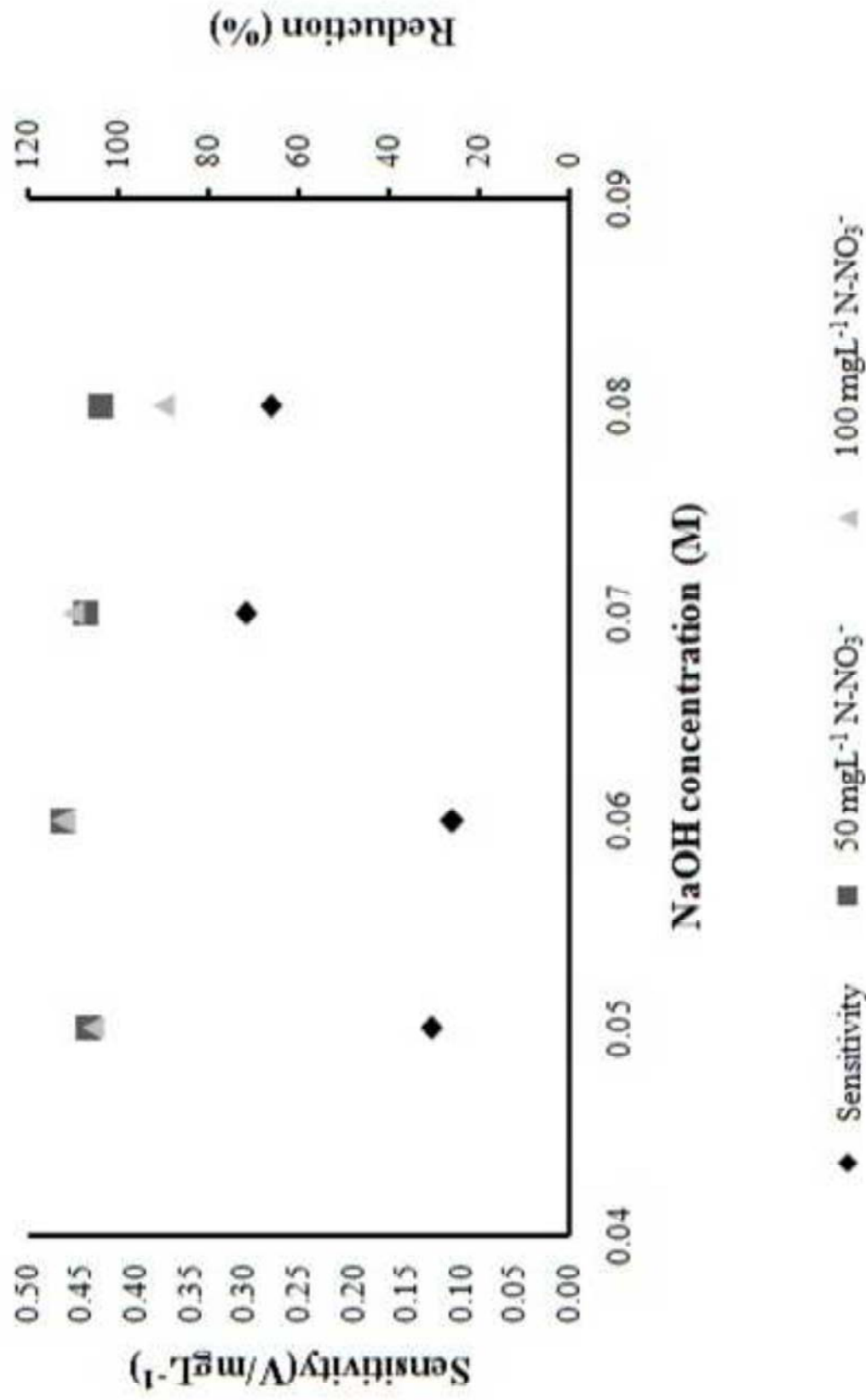


Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)

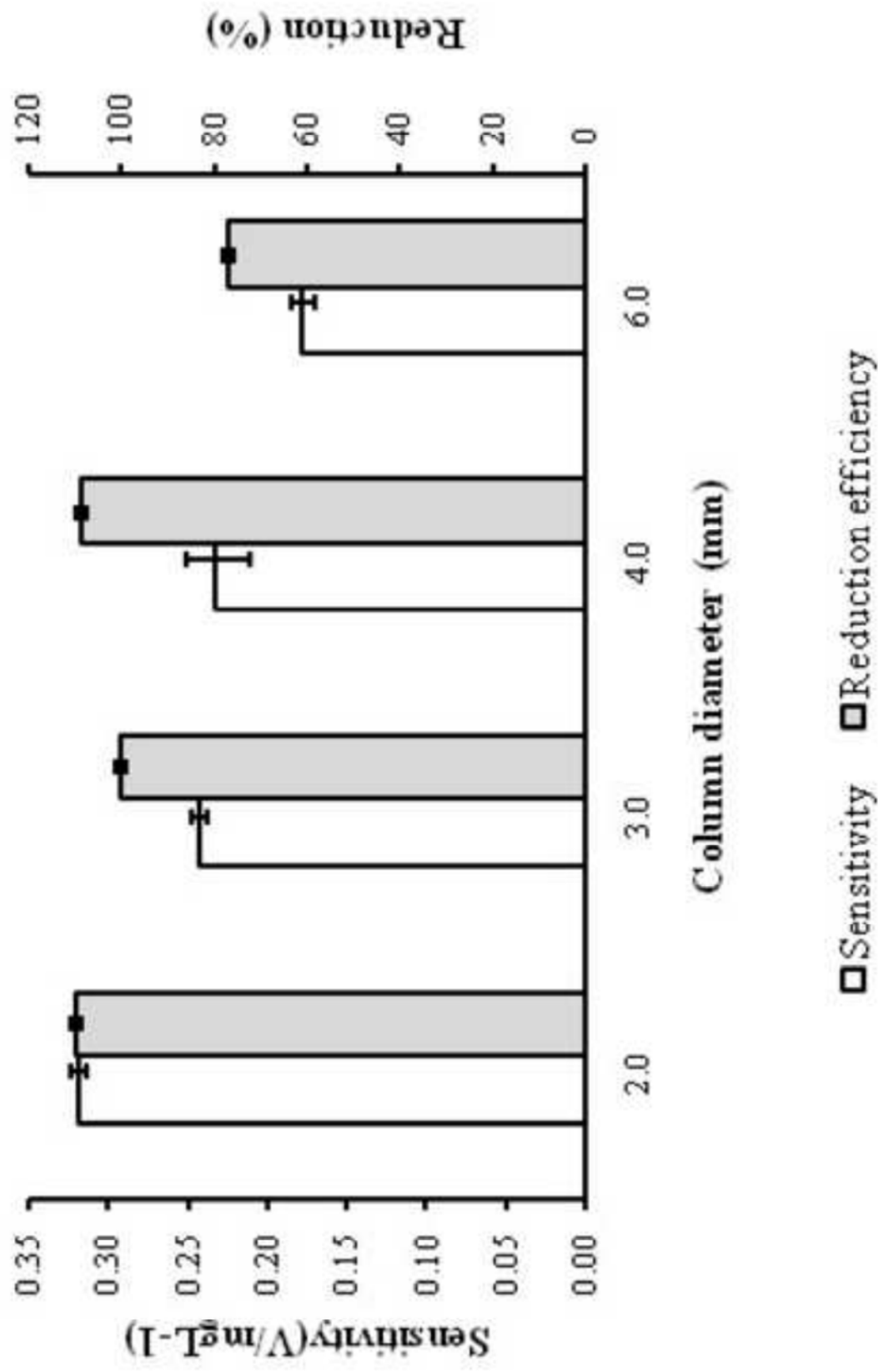


Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)

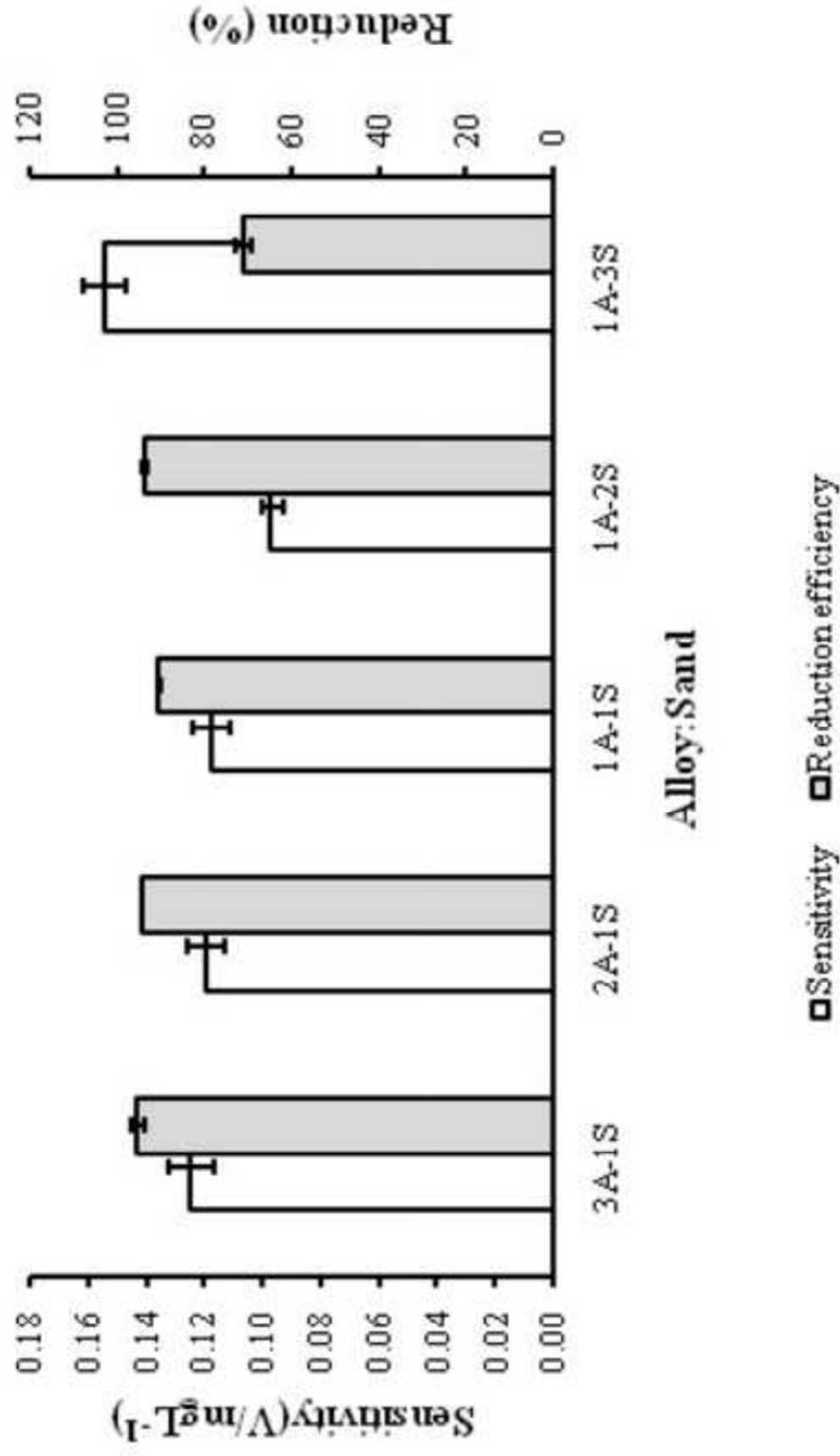


Figure 5

[Click here to download high resolution image](#)

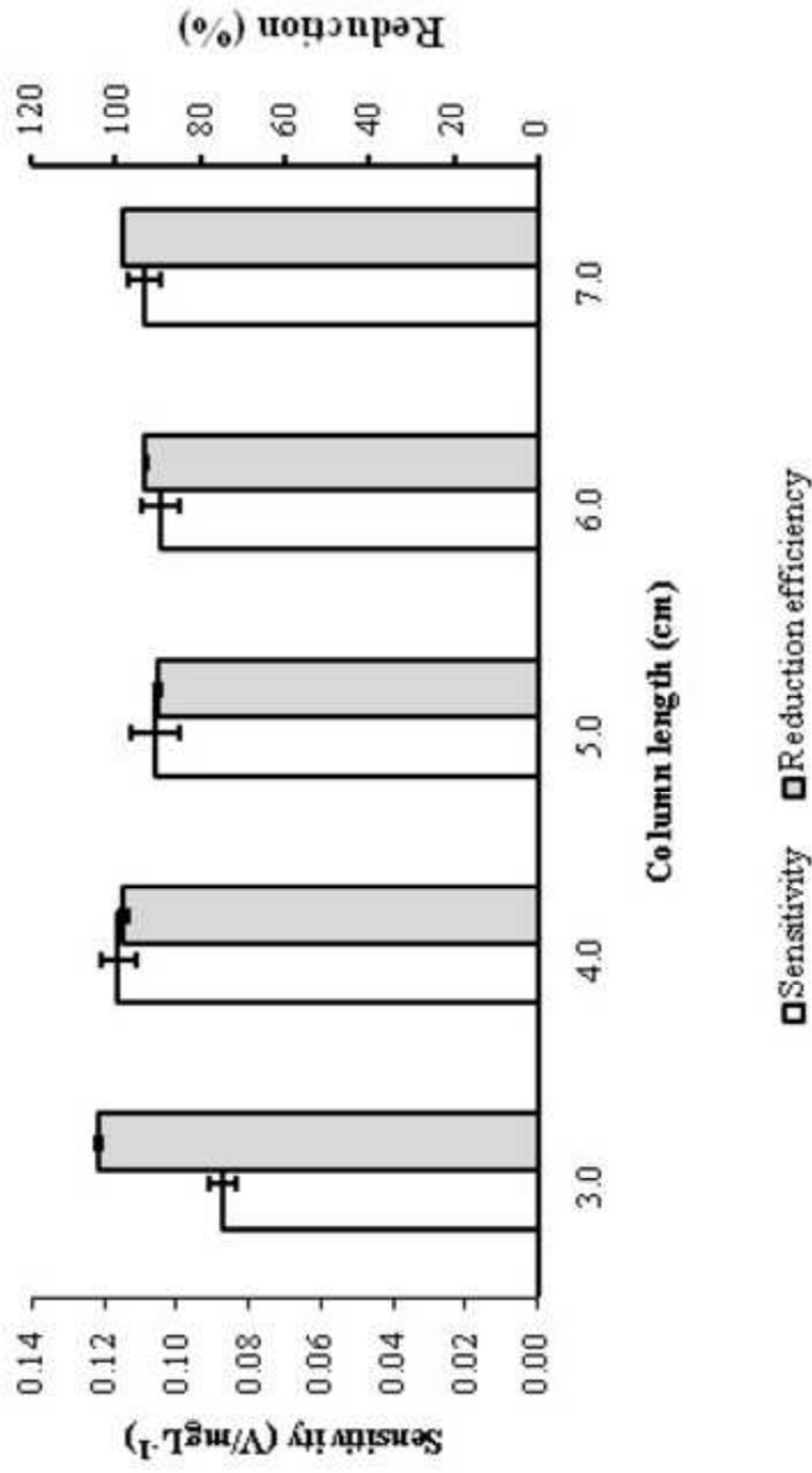


Figure 6

[Click here to download high resolution image](#)

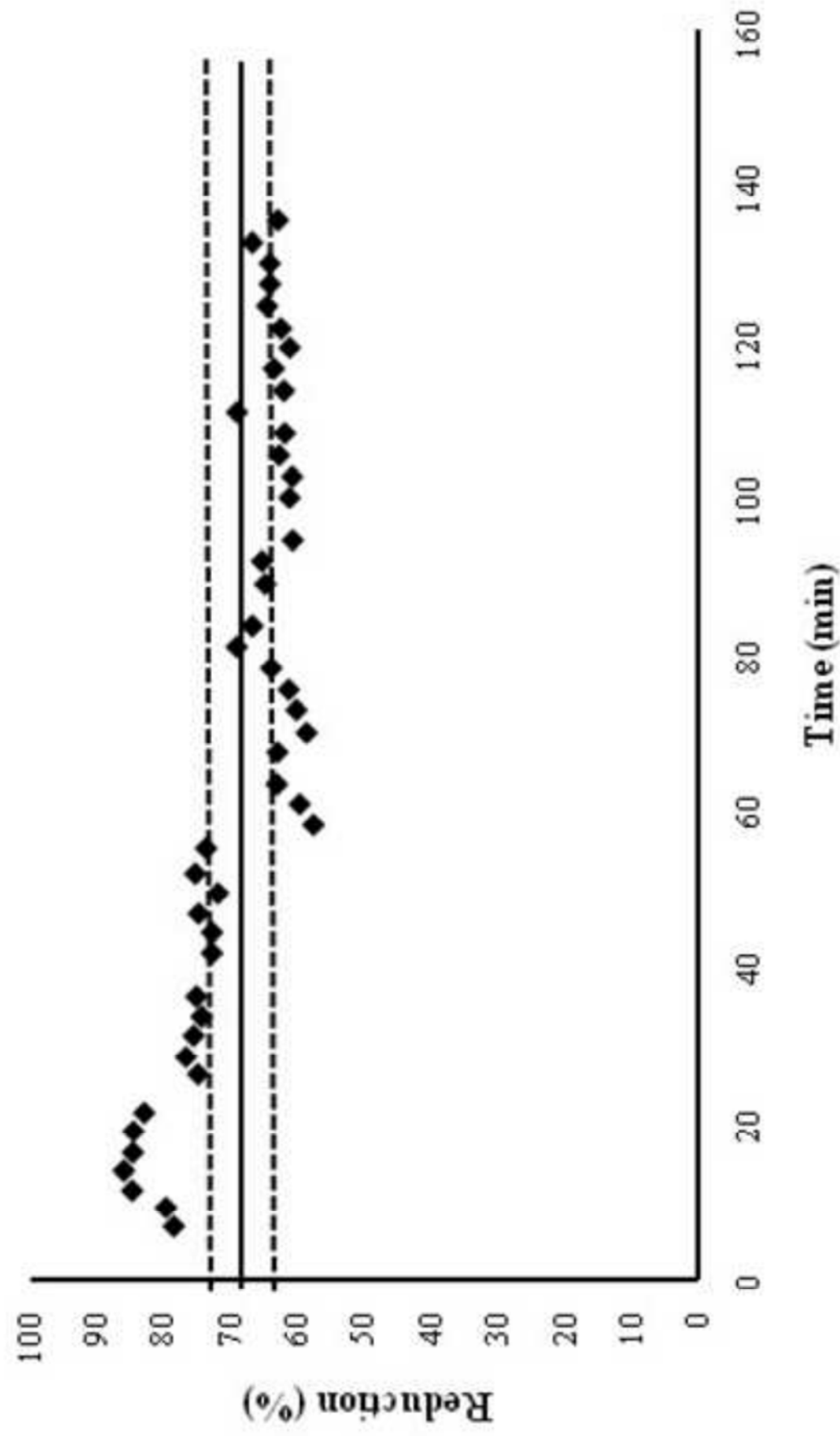
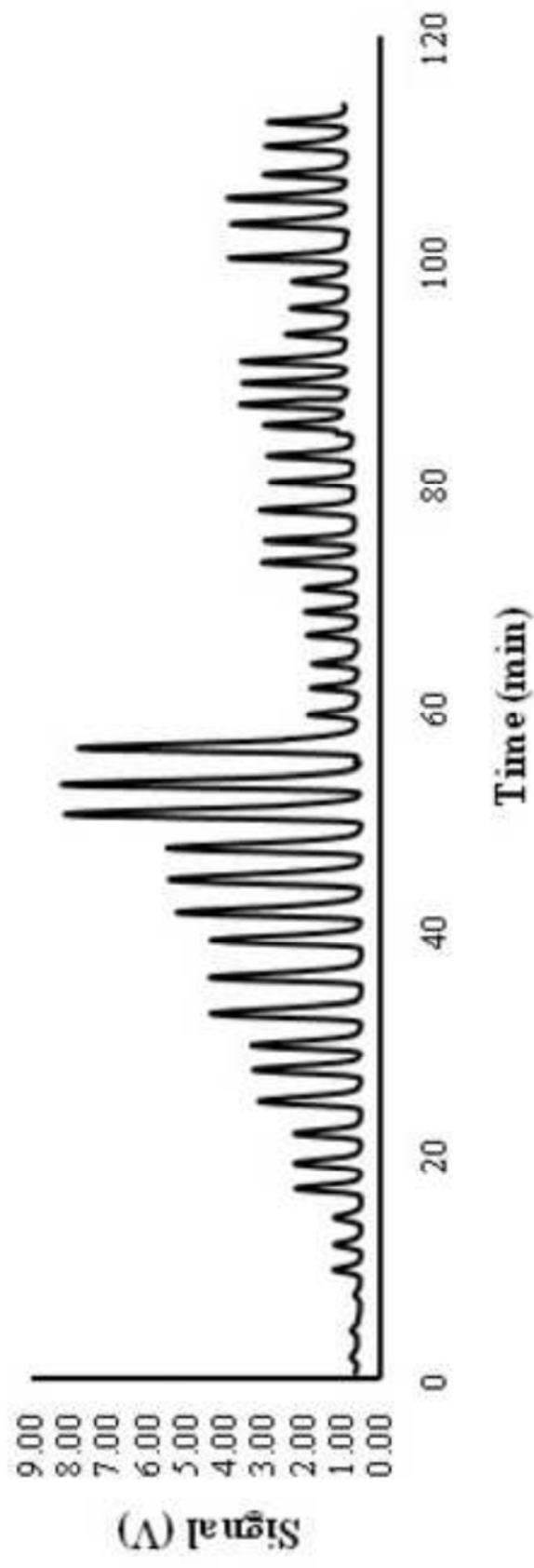
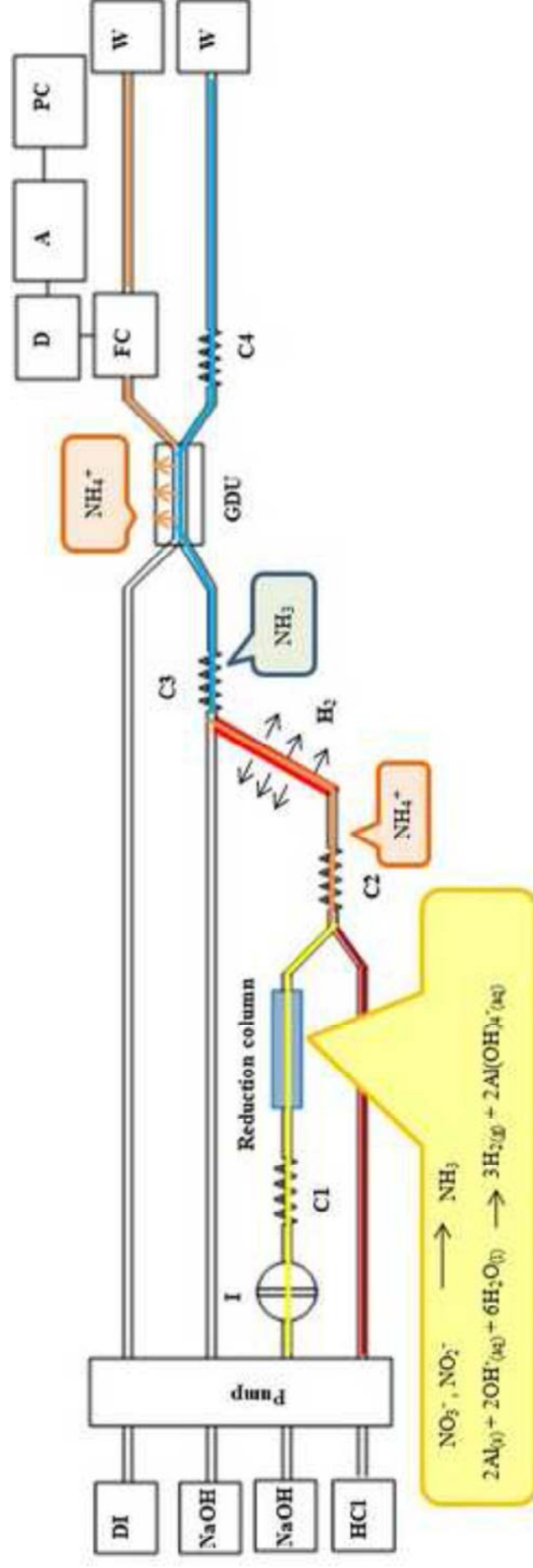


Figure 7

[Click here to download high resolution image](#)



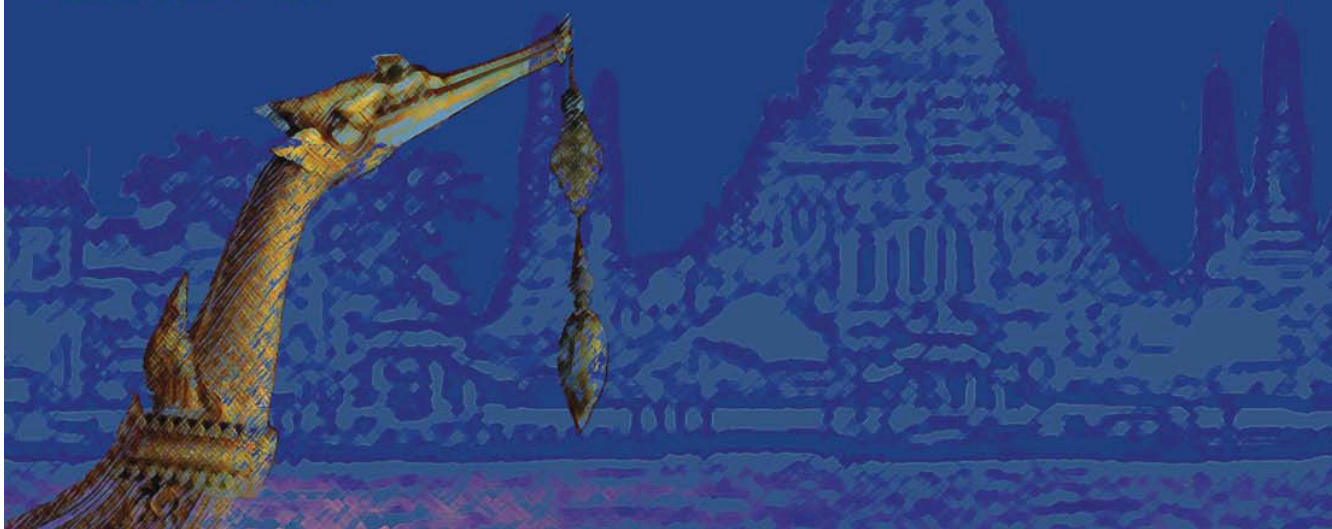


14th ASIAN CHEMICAL CONGRESS 2011

CONTEMPORARY CHEMISTRY FOR SUSTAINABILITY AND ECONOMIC SUFFICIENCY

5-8 SEPTEMBER 2011
BANGKOK, THAILAND

www.14acc.org



HOSTED BY CO-HOSTED BY



THE AUSPICES OF



SUPPORTED BY



Greener Anodic Stripping Voltammetric Method Employing *In Situ* Plated Bismuth Film Electrode for Determination of Cadmium and Lead

Wanita Powsakul¹, Ponlayuth Sooksamiti², Manuel Miro³, Jaroorn Jakmunee^{1*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50202, Thailand

²The Office of Primary Industry and Mine Region 3, Chiang Mai 50200, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of the Balearic Islands, Carretera de Valldemossa Km. 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain

*Corresponding author: scijikmn@chiangmai.ac.th

Abstract

In this research, an in-line preparation of in situ plated bismuth film on glassy carbon electrode was employed for anodic stripping voltammetric determination of cadmium and lead. This electrode is more environmentally friendly than the commonly used mercury working electrode. Bismuth film electrode could be prepared by three procedures, namely, in situ plating, ex situ plating and modifying the substrate with bismuth compounds. Although the first procedure is the simplest and cheapest, in batch wise analysis it usually gives irreproducible results. In the flow system, standard or sample solution was mixed on-line with Bi(III) plating solution before entering a voltammetric cell. Then, the deposition of the metals was carried out by applying a constant potential of -1.50 V versus Ag/AgCl to the working electrode. Next, a square wave waveform was scanned from -1.50 to 0.60 V and a voltammogram was recorded. The linear ranges were 2 – 40 µg/L for both cadmium and lead. Relative standard deviations were 0.76-1.57% for 11-replicate injections of 5, 20 and 40 µg/L of both Cd(II) and Pb(II). Detection limits of 1.4 and 0.9 µg/L for Cd and Pb respectively. The method has percentage recoveries for the determination of those metals in range of 92.8 – 102.8. A sample throughput was 13 h⁻¹. The proposed method provided high sensitivity and convenient operation for the determination of cadmium and lead at trace level. Application for analysis of real water samples was performed.

Keywords: Flow injection, Anodic stripping voltammetry, Bismuth film, Trace metals

1. Introduction

Heavy metals such as cadmium and lead are used mainly in metal processing industries. They are found naturally in small quantities in air, water and soil. Their toxicity are well known such as cadmium seriously affects on health, causing “Itai-Itai” disease and lead interrupts physical development and nervous system. Many techniques are employed for trace metals determination such as atomic absorption spectrometry (AAS), inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES), inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), atomic fluorescence spectrometry (AFS) and electroanalytical techniques such as anodic stripping voltammetry (ASV). ASV can be considered as the most powerful technique for in-field analysis, due to its excellent detection limit, high sensitivity, capacity to multi element

determination, high speed, simplicity and relatively low cost. Mercury electrode provides a wide cathodic potential limit for reduction of several metals and allows the formation of amalgams for accumulative preconcentration of the metals leading to very high sensitivity and reproducibility for ASV determination. However, due to toxicity of the mercury [1-2], mercury electrode is recently limited use for voltammetric analysis and other alternative electrodes are being developed.

Many studies have demonstrated the applicability of bismuth film electrode (BiFE) as a possible alternative for electrochemical stripping analysis of trace heavy metals, with electroanalytical behavior similar to that of mercury-based electrodes [3-5]. However, using of BiFE in batch voltammetry is tedious and not effective. Low reproducibility and carry over are usually concerned. The method that combined stripping voltammetry with flow system has been proposed. It provides significant advantages over batch analysis, such as offering high level of automation, fast analysis, less risk of contamination and better reproducibility [6-9].

Aims: In this work, the flow based anodic stripping voltammetric system has been developed for determination of cadmium and lead with using of BiFE as a working electrode. The flow system improves the analytical performance of ASV for determination of cadmium and lead (such as high reproducibility and sensitivity and more convenient, rapid, inexpensive and environmental friendly operation). The real application of the proposed method to the analysis of water samples is demonstrated.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

All chemical used are analytical reagent grade and all standard and reagent solution were prepared with ultrapure water (Milli Q water, resistivity of 18.2 MΩ cm⁻¹) obtained from a Millipore water purification system (Millipore, Sweden).

A stock solution of Bi(III) (1000 mg l⁻¹) was prepared by dissolving 0.2356 g of Bi(NO₃)₃·5H₂O in 0.5 M HNO₃ solution and adjusting to the volume of 100 ml. A stock solution of Cd(II) (1000 mg l⁻¹) was prepared by dissolving 0.2032 g of CdCl₂·2H₂O in 0.1 M HCl solution and adjusting to the volume of 100 ml. A stock solution of Pb(II) (1000 mg l⁻¹) was prepared by dissolving 0.3128 g of Pb(NO₃)₂ in 0.1 M HNO₃ solution and adjusting to the volume of 100 ml. Working standard solutions of Cd(II) and Pb(II) were daily prepared by appropriate dilution of the stock standard solution with a 0.01 M nitric acid solution pH 2. A 0.10 M acetate buffer pH 4.5 was prepared by dissolving 1.20 g of CH₃COONa·3H₂O in water and adding 1 ml of CH₃COOH, then adjusting to the volume of 250 ml with water.

2.2 Instrument Set Up

The proposed flow based voltammetric analysis system with bismuth film electrode (VA-BiFE) is shown in Fig. 1. It consisted of peristaltic pump (Ismatec, Switzerland) with pump tubing, two 3-way solenoid valves (Biochemvalve, USA) for injection in line, a mixing coil (PTFE, i.d. 0.05 mm), and a voltammograph (VA 757, Metrohm, Switzerland) with an electrochemical flow-cell. The electrochemical flow-cell (cross-flow cell, Model MF- 1093, BAS, USA) composes of a 6 mm diameter glassy carbon working electrode (GCE), a Ag/AgCl reference electrode (RE) and a stainless

steel auxiliary electrode (AE). The system was controlled by a personal computer using a software program written in-house.

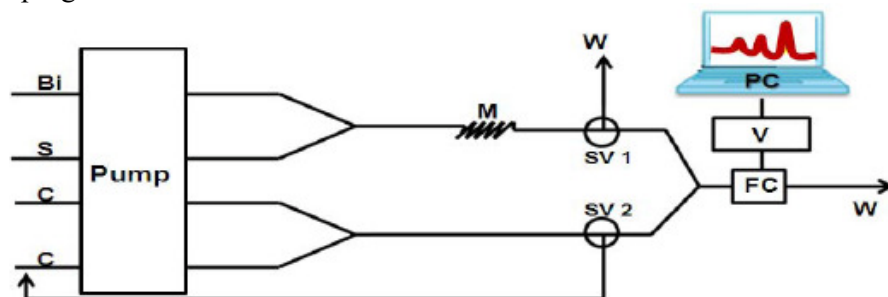


Figure 1. Manifold of flow based anodic stripping voltammetric system for determination of cadmium and lead; S = standard/sample, Bi = Bi(III) plating solution, C= cleaning solution (1 M HNO₃), Pump = peristaltic pump, M = mixing coil, SV 1-2 = solenoid valves, FC= electrochemical flow cell, V= voltammetric analyzer, PC= personal computer, W = waste

2.3 Analytical Procedure:

In the flow system, standard or sample solution was mixed on-line with Bi(III) plating solution before entering a voltammetric cell. When the analyte metals reached the flow cell was applying potential of -1.50 V versus Ag/AgCl to the glassy carbon electrode and the flow was briefly stop to the stripping. Next, the square wave anodic stripping voltammograms were recorded between -1.50 and 0.60 V. The electrode was cleaning by applying a potential of 0.6 V to the working electrode while nitric acid 1M was flowed through the flow cell before to the next analysis cycle. A voltammogram was obtained, which peak potential and peak current of each metal were determined. A linear calibration graph of each metal was obtained by plotting between concentration of metal and peak current.

3. Results and Discussion

3.1 Optimization of the Parameters

The parameters which affected analytical performance and the optimum condition are presented in Table 1. Under the optimal condition, the stripping peak currents at peak potential of about -850 and -550 mV versus Ag/AgCl were proportional to concentrations of Pb(II) and Cd(II), respectively. The voltammograms are depicted in Fig. 2(A). The calibration graphs of Cd(II) and Pb(II) in range of 2 to 40 µg/L of each metal were constructed by plotting peak current (µA) versus concentration of metal ions (µg l⁻¹). The calibration curves exhibit excellent linearity with a correlation of 0.9977 for Cd(II) and 0.9995 for Pb(II). The peak current increased linearity with metal ion concentration, with slopes of 1.6478 µA/µg for Cd(II) and 1.2219 µA/µg for Pb(II), respectively, as shown in Fig. 2(B). This system had very good reproducibility, the relative standard deviations were 0.76-1.57% for 11 replicate injections of 5, 20 and 40 µg/L of both Cd(II) and Pb(II).

Table 1. Optimization of Flow-ASV system using bismuth film electrode as a working electrode

Parameter	Optimum condition
Concentration of acetate buffer pH 4.5	0.10 M
Concentration of Bi(III) plating solution	0.60 mgL ⁻¹
Deposition potential	-1.5 V
Deposition time	150 s
Flow rate	0.5 ml/L

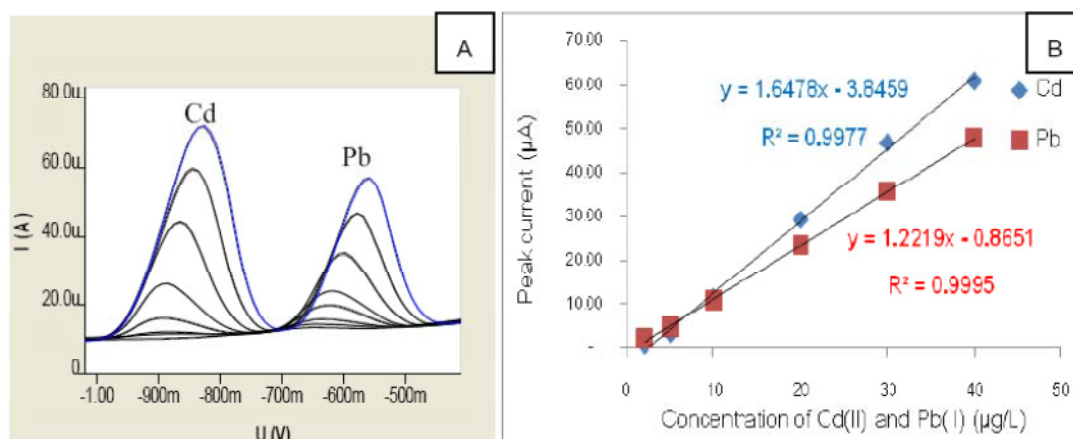


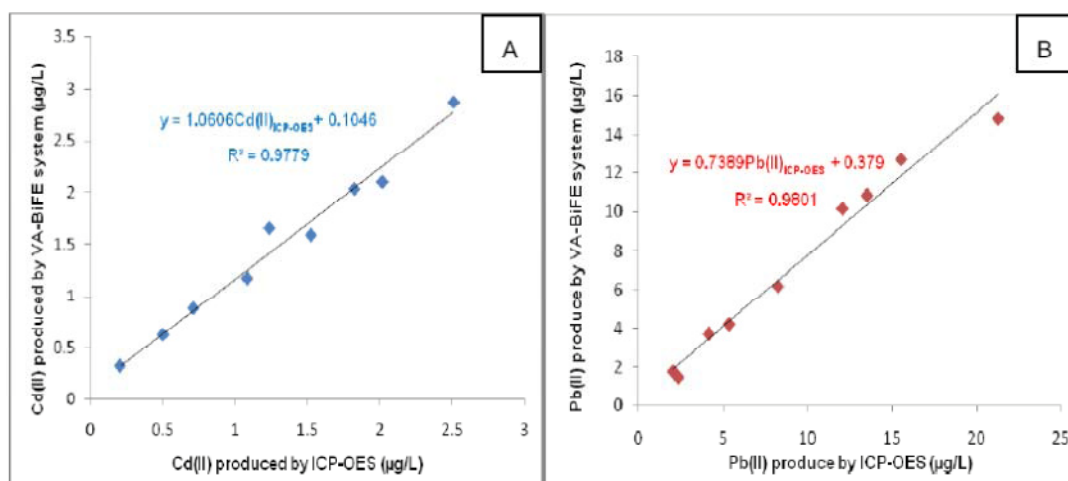
Figure 2. Square wave anodic stripping voltammograms obtained from VA-BiFE system of solution containing Cd(II) and Pb(II) of increasing concentration, from 2-40 μ g/L (A) and calibration graphs of Cd(II) and Pb(II) (B).

3.2 Application to real samples

The developed method was applied to real water samples. The calibration graph was used for quantification of each metal. The results obtained for 9 water samples are summarized in Table 2. The correlation plot of the proposed method and ICP-OES method is shown in Fig. 3. It was found that the results from the proposed VA-BiFE method were in good correlation with those of ICP-OES method ($\text{Cd(II)}_{\text{VA-BiFE}} = 1.0606\text{Cd(II)}_{\text{ICP-OES}} + 0.1046$, $r^2 = 0.9779$) for Cd(II) and poor correlation with those of ICP-OES method ($\text{Pb(II)}_{\text{VA-BiFE}} = 0.7389\text{Pb(II)}_{\text{ICP-OES}} + 0.379$, $r^2 = 0.9801$) for Pb(II). Detection limits of 1.4 and 0.9 μ g/L were achieved for Cd and Pb, respectively. The method has percentage recoveries for the determination of those metals in range of 92.8 – 102.8. A sample throughput was 13 h⁻¹. The method provided high sensitivity, low consumption and convenient operation for the determination of cadmium and lead at trace level. The method is simple, fast and can simultaneously determine two metals with high sensitivity. The developed method is suitable to be applied in the routine determination of cadmium and lead in water sample.

Table 2. Determination of cadmium and lead in real samples

Sample	Concentration of metals (mg/L)			
	Cd		Pb	
	ICP-OES	VA-BiFE	ICP-OES	VA-BiFE
1	0.50 ± 0.03	0.62 ± 0.00	2.06 ± 0.09	1.76 ± 0.01
2	1.08 ± 0.15	1.17 ± 0.01	4.16 ± 0.10	3.70 ± 0.01
3	2.02 ± 0.15	2.10 ± 0.01	12.06 ± 0.26	10.17 ± 0.03
4	0.71 ± 0.06	0.88 ± 0.00	8.26 ± 0.12	6.18 ± 0.00
5	1.52 ± 0.09	1.59 ± 0.01	15.53 ± 0.26	12.70 ± 0.00
6	1.82 ± 0.10	2.03 ± 0.00	5.36 ± 0.10	4.19 ± 0.04
7	1.24 ± 0.09	1.66 ± 0.00	2.35 ± 0.11	1.47 ± 0.01
8	2.51 ± 0.09	2.88 ± 0.01	13.52 ± 0.22	10.86 ± 0.03
9	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.00	21.26 ± 0.12	14.84 ± 0.07

**Figure 3.** Correlation graphs of (A): Cd(II) and (B): Pb(II) contents determined by the proposed VABiFE method and ICP –OES method.

4. Conclusions

In this work, an in-line preparation of in situ plated bismuth film on glassy carbon electrode was employed for anodic stripping voltammetric determination of cadmium and lead. The proposed method provided high sensitivity and convenient operation for the determination of cadmium and lead at trace level. By employing flow system, the environmentally friendly BiFE can be used with a good reproducibility and no carry over. Application for analysis of real water was demonstrated.

5. Acknowledgements

The Thailand Research Fund (TRF) and the Commission on Higher Education (CHE), Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Department of Chemistry, Faculty of Science and Center of Excellence for Innovation in Analytical Science and Technology, Chiang Mai University are acknowledged for the support.

6. References

- [1] Anastasios Economou and Peter R. Fielden. (2003), *Analyst*. **128**: 205–212.
- [2] Jaroon Jakmunee and Jaroon Junsomboon. (2008), *Talanta*. **77**: 172-175.
- [3] Joseph Wang, Jianmin Lu, Samo B. Hocevar, and Percio A. M. Farias. (2000), *Analytical Chemistry*. **72**:3218–3222.
- [4] Joseph Wang, Jianmin Lu, Ülkü Anik Kirgöz, Samo B. Hocevar and Bozidar Ogorevc. (2001), *Analytica Chimica Acta*. **434**: 29-34.
- [5] Emily A. Hutton, Johannes T. van Elteren, Bo idar Ogorevc and Malcolm R. Smyth. (2004, July). *Talanta*. **63**: 849–855.
- [6] Suchada Chuanuwatanakul, wijitar Dungchai, orawon Chailapakul, and Shoji Motomizu. (2008), *Analytical Sciences*. **24**:589–594.
- [7] Watsaka Siriangkhawut, Somkid Pencharee, Kate Grudpan and Jaroon Jakmunee. (2009), *Talanta*. **79**: 1118–1124.
- [8] Yang Wang, Zaiqing Liu, Guojun Yao, Peihua Zhu, Xiaoya Hu, Qin Xu, Chun Yang (2010), *Talanta*. **80**: 1959–1963.
- [9] Uthaitip Injang, Peeyanun Noyrod, Weena Siangproh, Wijitar Dungchai, Shoji Motomizu and Orawon Chailapakul. (2010), *Analytica Chimica Acta*. **668**:54–60.

ภาคผนวก ค

รายการผลงานที่อยู่ในระหว่างการพิจารณาเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (peer reviewed international journals)

1. Autchara Paukpol, Jaroon Jakmunee, Greener Anodic Stripping Voltammetric Method Employing Bismuth Coated Screen-printed Electrode for Determination of Cadmium and Lead, *Chiang Mai J. Nat. Sci.*, submitted.
2. Autchara Paukpol, Jaroon Jakmunee, Anodic Stripping Voltammetric Analysis of Cadmium and Lead in Solutions from Sequential Extraction of Soil and Sediment Samples, *Anal. Chim. Acta*, MS in preparation.
3. Pimporn Insian, and Jaroon Jakmunee, Flow Injection Amperometric Detection and Off-line Sequential Extraction Column for Fractionation of Phosphorus in Sediment, *Chiang Mai J. Sci.*, submitted.

Greener Anodic Stripping Voltammetric Method Employing Bismuth Coated Screen-printed Electrode for Determination of Cadmium and Lead

Autchara Paukpol and Jaroon Jakmunee*

Department of Chemistry, and Center of Excellence for Innovation in Chemistry,
Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50202, Thailand

*Corresponding author. E-mail: jaroon.jakmunee@cmu.ac.th

ABSTRACT

A greener electrochemical platform was developed for determination of trace amounts of cadmium and lead. It is based on a disposable screen-printed carbon ink electrode modified with an in situ plated bismuth film employing as a more environmentally friendly working electrode alternative to the widely used mercury electrode. The bismuth coated screen-printed electrode (Bi-SPE) was used for the simultaneous determination of trace Cd(II) and Pb(II) by square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV). Operational parameters such as Bi(III) concentration, deposition potential, deposition time and rotation speed during preconcentration of the metals were optimized. It was found that the Bi-SPE presented well-defined, reproducible and sharp stripping voltammogram. Peak current increased linearly with the metal concentration in a range of 5-40 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II) and 2-40 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II). Limit of detections were 1.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II) and 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II), which are better than those of flame atomic absorption method. Accuracy of the developed method was studied by examining the percent recovery of Cd(II) and Pb(II) that spiking into water samples. The proposed method could be applied for monitoring of trace cadmium and lead in river water sample.

Keywords: Bismuth coated screen-printed electrode, Square-wave anodic stripping voltammetry, Cd(II), Pb(II), Water samples

INTRODUCTION

The growing concerns about Cd(II) and Pb(II) poisoning have led to increasing demands for highly sensitive, reliable, reproducible, and low cost methods for quantitating them in water. Electrochemical stripping analysis historically has been recognized as a powerful technique for Cd(II) and Pb(II) detection. In stripping voltammetry, mercury film or hanging mercury drop electrode (MFE/HMDE) have been widely applied as a working electrode owing to its remarkable sensitivity. However the toxicity of mercury has stimulated the search for environmentally friendly material to produce greener mercury-free electrode. Bismuth film electrode (BFE) is considered as the best alternative material to MFE due to its ability to form fusing alloys with other metals (Arduini et al., 2010; Locatelli and Torsi, 2001 and Wang et al., 2000). Different materials have been used as substrates for BFEs, including glassy carbon (Wang et al., 2001a and Kefala et al., 2003), carbon paste (Krolicka et al., 2002 and Svancara et al., 2003), wax-impregnated graphite (Kefala et al., 2003), pencil-lead (Demetriadis et

al., 2004) and screen-printed carbon ink (Wang et al., 2001b). The screen-printing technology is well established for the production of low cost, reproducible and sensitive electrochemical sensors. Screen-printed sensors have been widely used for environmental, biomedical and industrial monitoring (Goldberg et al., 1994 and Laschi et al., 2006).

In this work, bismuth film in situ coated on screen-printed carbon working electrodes have been used in square wave anodic stripping voltammetry (SWASV) for the determination of Cd(II) and Pb(II) in water samples. The optimization, characterization and attractive analytical performance of bismuth coated screen-printed electrode will be reported. The developed method provides high sensitivity and low detection limits which is better than the standard flame atomic absorption spectrometric (FAAS) method. Accuracy of the developed method was examined from percent recovery of Cd(II) and Pb(II) and found in the range of 86.4 to 110.6%. Moreover, the SWASV method involves inexpensive instrument and has lower operating cost.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All the chemicals were of analytical reagent grade. Ultrapure water (Milli-Q water, resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtained from a Millipore water purification system (Millipore, Sweden) was used throughout. The solution of Bi(III) (Carlo Erba, Italy), Cd(II) (Fluka, Switzerland) and Pb(II) (Merck, Germany) were prepared from 1000 mg L^{-1} standard solutions by appropriate diluting with Milli-Q water. An acetate buffer solution (0.1 M, pH 4.5), was prepared by mixing the acetic acid (Lab scan, Thailand) and sodium acetate (Carlo Erba, Italy) and served as a supporting electrolyte.

Apparatus

Voltammetric measurements were performed with a Metrohm model 757 VA computer, GPES software for control of the voltammograph linked with a personal computer. A bismuth coated screen-printed carbon electrode was served as the working electrode, with the Ag/AgCl (3 M KCl) and platinum wire as the reference and counter electrodes, respectively.

Bismuth coated screen-printed carbon electrode (Bi-SPCE) preparation

SPCEs were produced with a homemade manually screen-printing apparatus. Carbon ink (Henkel, Germany) was used to print the working electrode. The substrate was a flexible polyester film. The diameter of the working electrode was 3 mm. SPCEs was modified with bismuth by in situ plating approach. Firstly, SPCEs were cleaned with air plasma and pretreated in 0.1 M acetate buffer solution, at pH 4.5 by applying a positive potential of +1.6 V vs Ag/AgCl for 120 s, followed by +1.8 V vs Ag/AgCl for 60 s and then were thoroughly rinsed with water.

Measurement procedure

The electrochemical deposition on SPCEs coated by bismuth was carried out according to the in situ procedure in the presence of dissolved oxygen. The SPCE was immersed in an electrochemical cell, containing the required concentration of

Bi(III) in an acetate buffer (0.1 M, pH 4.5) medium and simultaneously deposited Bi and the metals on the surface of the electrode under stirring. The analytical measurement was carried out in square wave anodic stripping voltammetric mode (SWASV). ASV experiments consisted of three conventional steps: time controlled electrochemical deposition with solution stirring, rest period and a positive going voltammetric stripping scan under the selected conditions. The individual conditions and parameters were optimized as described in the discussion section.

Analysis of real samples

Water samples were collected from the Ping River, Chiang Mai, Thailand as the sampling sites shown in Figure 1. Water samples were filtered through a 0.45 μm membrane. In the analysis, in situ plated Bi-SPCEs were prepared by spiking the sample with 1 mg L⁻¹ Bi(III) in 0.1 M acetate buffer at pH 4.5. Calibration graph method was used for quantification of Cd(II) and Pb(II) in samples.

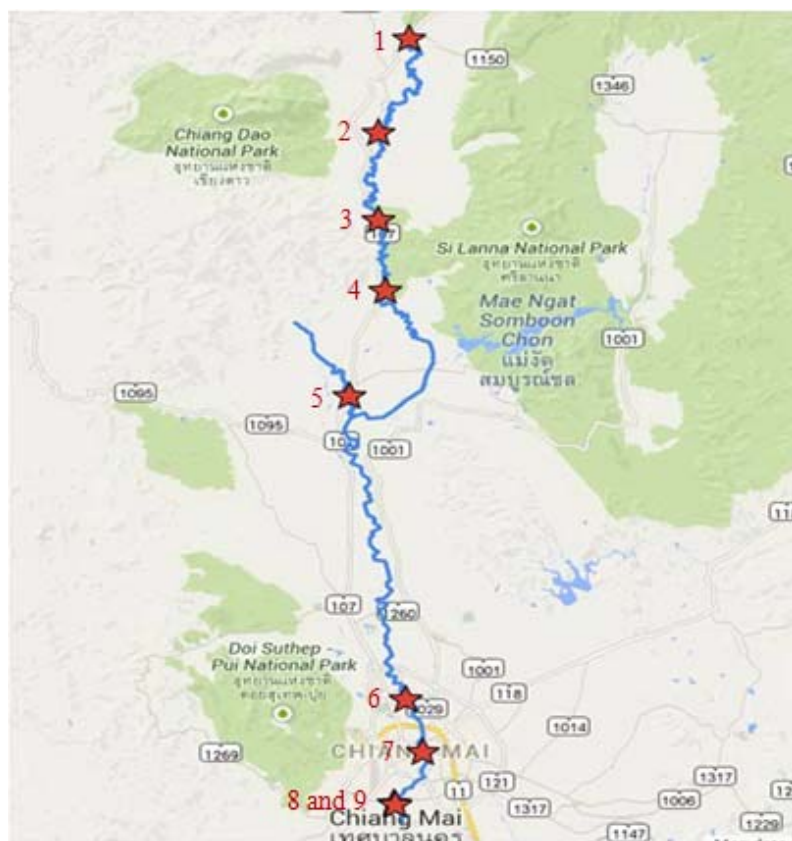


Figure 1. The sampling sites where water samples being collected from the Ping River, Chiang Mai, Thailand

RESULTS

Effect of experimental variables

1. Bi(III) concentration

Representative Cd(II) and Pb(II) peak currents for a solution containing 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ each of Cd(II) and Pb(II) in 0.1 M acetate buffer (pH 4.5) on in situ plated

Bi-SPCEs with different Bi(III) concentrations in the range 100-1400 $\mu\text{g L}^{-1}$ are shown in Figure 2(a).

2. Deposition potential

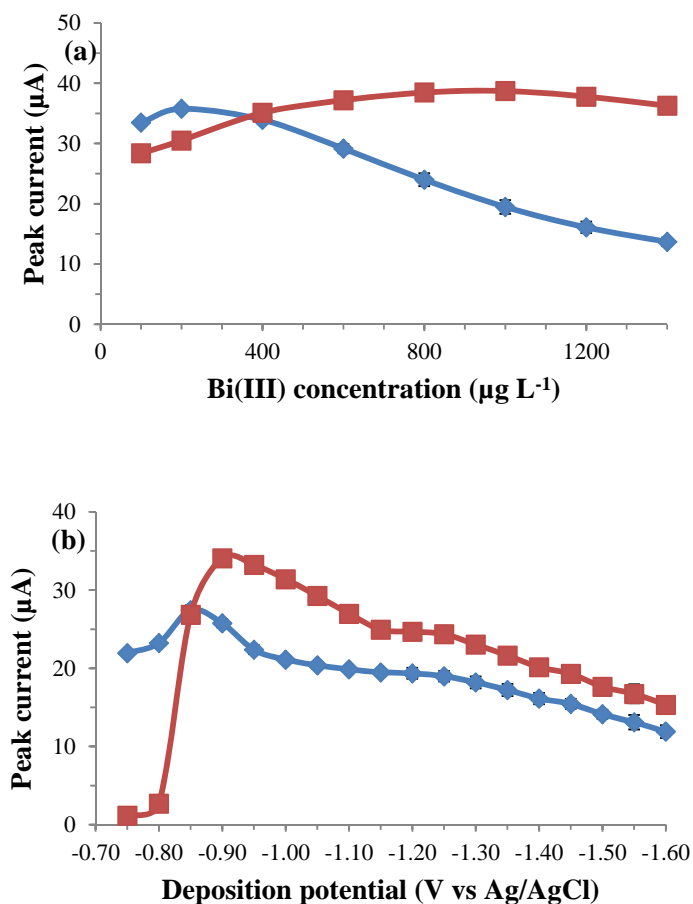
Effect of deposition potentials in the range of -0.75 to -1.60 V on the stripping currents of Cd(II) and Pb(II) were studied. As shown in Figure 2(b), Peak potential of Cd(II) and Pb(II) were -0.75 and -0.50 V, respectively.

3. Deposition time

The metals deposition time was studied in the range of 60-420 s for the solution containing 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ each of Cd(II) and Pb(II) in 0.1 M acetate buffer (pH 4.5) as shown in Figure 2(c).

4. Rotation speed during preconcentration step

The rotation speed of the stirrer was investigated in the range of 0-3000 rpm as shown in Figure 2(d).



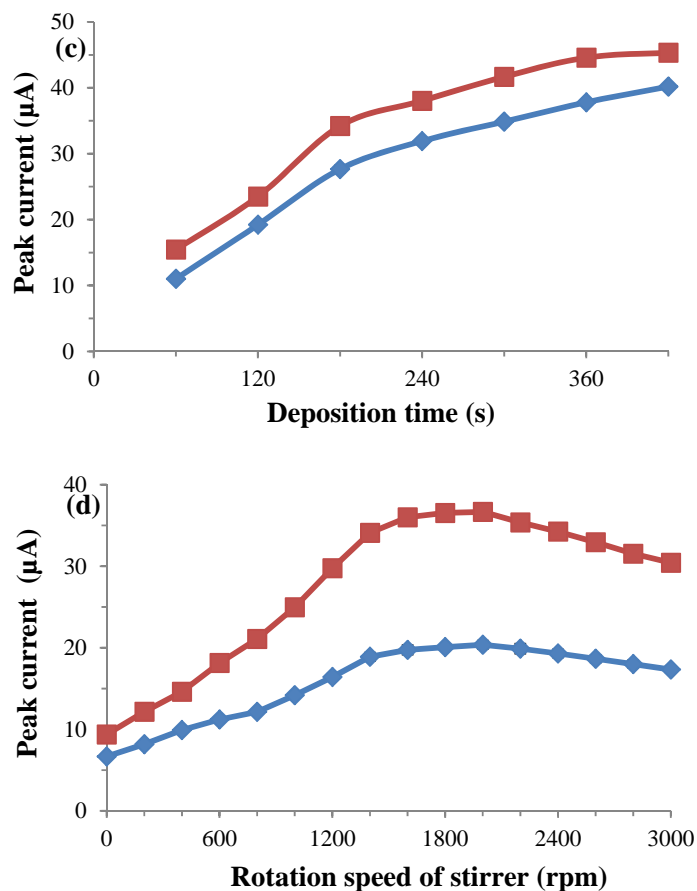


Figure 2. Effect of the Bi(III) concentration (a), deposition potential (b), deposition time (c) and rotation speed during preconcentration (d) on the stripping peak currents of Cd(II) (—■—) and Pb(II) (—◆—) in $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) and Pb(II) with 0.1 M acetate buffer pH 4.5 using in-situ prepared Bi-SPCE, $n = 3$. SWASV parameter; step increment 4 mV , frequency 35 Hz , pulse height 40 mV , cleaning potential 0.3 V and cleaning time 30 s .

Calibration data

Calibration was performed on Bi-SPCEs for the simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) by SWASV as shown in Figure 3. A small background current over a wide potential range was noticed. Calibration graphs had two different slopes in the range of $5\text{--}40$ and $40\text{--}100 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II) and $2\text{--}40$ and $40\text{--}100 \mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II). The analytical sensitivities were Cd(II): $1.21, 0.17 \mu\text{A per } \mu\text{g L}^{-1}$ ($R^2 = 0.9995, 0.9911$) and Pb(II): $1.21, 0.15 \mu\text{A per } \mu\text{g L}^{-1}$ ($R^2 = 0.9961, 0.9959$). On the same electrode, the relative standard deviations were 7.0% for Cd(II) and 5.8% for Pb(II) at $20 \mu\text{g L}^{-1}$ level ($n=15$). The same SPCE electrode could be used for at least 15-20 stripping cycles without loss of sensitivity. The limit of detections were calculated at a deposition time of 180 s , as $1.7 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II) and $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II).

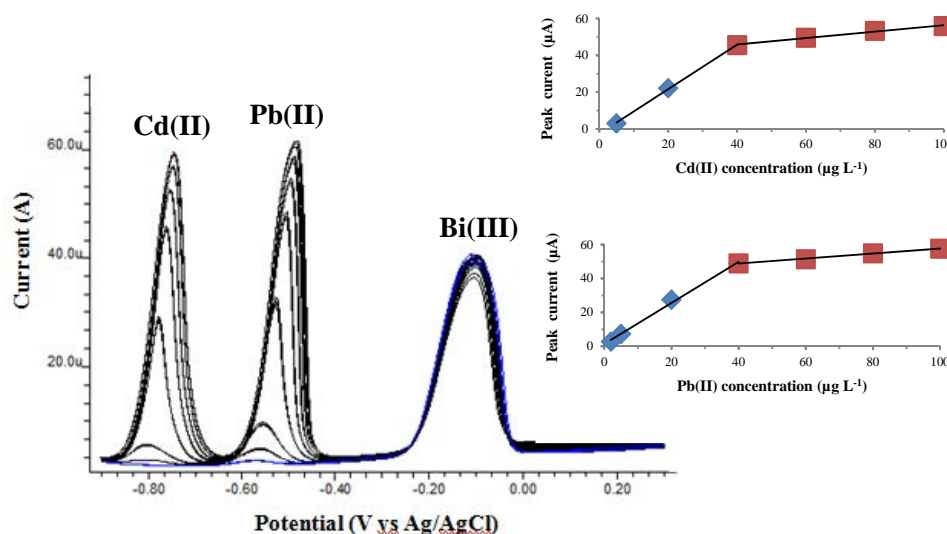


Figure 3. A series of voltammograms and calibration graphs for increasing concentrations of Cd(II) and Pb(II) in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 using in-situ prepared Bi-SPCE (1 mg L^{-1} Bi(III)), $n = 3$. SWASV parameter; deposition potential -0.9 V vs Ag/AgCl, deposition time 180 s, stirrer speed 2000 rpm, step increment 4 mV, frequency 35 Hz, pulse height 40 mV, cleaning potential 0.3 V and cleaning time 30 s.

Accuracy of the method

An accuracy of the system was studied by examining the percent recoveries of Cd(II) and Pb(II) at spiked concentration of Cd(II) and Pb(II) standard solution of $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ in water samples. The obtained results are given in the Table 1. Percent recoveries of Cd(II) and Pb(II) are close to 100%, in the range of 86.4 to 110.6%, under the optimal condition.

Application to river water

For the purpose of practical applicability, Bi-SPCEs were employed for the determination of Cd(II) and Pb(II) in river water samples. After that, the anodic stripping peak current was recorded for the determination of Cd(II) and Pb(II) with the calibration graph method under the optimized condition. The results obtained for nine water samples are summarized in Table 1.

Table 1. Determination of Cd(II) and Pb(II) in water samples by the proposed SWASV with Bi-SPCE

Water samples	Concentration of metals ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recovery (%)	
	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)
1	n.d.	n.d.	96.9	98.1
2	n.d.	n.d.	95.7	99.4
3	n.d.	n.d.	86.4	103.0
4	n.d.	n.d.	95.7	106.2
5	n.d.	n.d.	98.7	110.4
6	n.d.	n.d.	92.4	110.6
7	n.d.	2.10 \pm 0.01	91.4	106.7
8	n.d.	n.d.	103.1	104.3
9	n.d.	n.d.	103.7	105.6

* n.d. = not detected

DISCUSSION

The operational parameters are necessary due to indicating performance of analysis. The concentration of Bi(III) is a crucial parameter to be investigated. It controls the thickness of the Bi film. The thickness of the film does not affect the peak potential of any metals but rather affects the peak height. The results showed a decrease of peak current of the Cd(II) and Pb(II) with increasing thickness of the Bi film, especially the Pb(II) peak as shown in Figure 2(a). As Pb(II) has more positive reduction potential than Cd(II), Pb(II) can be determined at lower Bi(III) concentration. At high Bi(III) concentration, the peaks became wider and led to a substantial decrease in sensitivity over the Bi(III) concentration of 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, which was explained as a saturation effect of Bi film on the screen-printed carbon surface. This behavior was attributed to the increased number of nucleation sites and increased alloy formation. However, at Bi(III) concentrations greater than 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, a reduction in the peak intensity was observed, ascribed to the formation of a thick layer of Bi on the electrode surface that partially blocks the conductive surface of the electrode, reducing the number of electroactive site (Kachosangi et al., 2007). Thus, Bi(III) concentration of 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ was selected for further experiment.

The deposition potential affects the quality of bismuth film to form fusing alloys with metal ions. As shown in Figure 2(b), the stripping responses of Cd(II) and Pb(II) were found to occur at potential more negative than -0.75 V. As the deposition potential became more negative, the peak currents increased up to -0.90 V for Cd(II) and -0.85 V for Pb(II). The Pb(II) peak current did not increase significantly from -0.75 to -0.85 V due to its more positive reduction than Cd(II). The evolution of hydrogen gas from the SPCE surface started to occur at -1.50V that could damage the bismuth film and came about the reduction of interference when more negative potential was applied. A potential of -0.9 V was thus chosen as optimum deposition potential.

Deposition time is the time during which the Cd(II) and Pb(II) is reduced at the Bi-SPCE to form the Cd(Bi) and Pb(Bi) alloys. It is generally accepted that lower limits of detection (LODs) can be obtained with longer deposition time (Castaneda et al., 2005). In Figure 2(c), Cd(II) and Pb(II) peak currents increased

rapidly with the deposition time from 60-180 s. For the deposition time longer than 180 s, the current responses exhibited negligibly increase which were considered the longest practical time for a satisfactory compromise between high sensitivity and short analysis time. Metal ions were preconcentrated for 180 s in further experiments.

The mass transport behavior during preconcentration step was under the control of the rotation speed of the stirrer as shown in Figure 2(d). The stripping peak currents for Cd(II) and Pb(II) continuously increased with increment of rotation speed until 2000 rpm. The decrease of peak currents were observed at the rotation speed higher than 2000 rpm because of the bismuth film being mechanically damaged therefore, preconcentration was performed at 2000 rpm.

The SWASV with bismuth film working electrode can be applied to the simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) in real water samples by using calibration graph. This system was investigated for trace metals determination and it provides high sensitivity, low consumption and convenient operation. Concentrations of both the metals found in water samples are lower than the detection limit of FAAS method, therefore, this standard method could not be used for comparison with the developed method. The recovery study indicated that the proposed method can be used for analysis of real water sample with recoveries found in the range of 86.4 to 110.6%. The results obtained for nine water samples are summarized in Table 1. The concentration of both the metal ions in Ping river water is very low and should have no environmental impact. The permission levels of Cd(II) and Pb(II) in drinking water according to WHO guidelines are below $3 \mu\text{g L}^{-1}$ and $10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The developed method can be used for monitoring of these trace metals in water.

CONCLUSIONS

The developed anodic stripping voltammetric method with in situ coated Bi film on screen-printed carbon working electrode should be useful to be applied as a cost effective and a sensitive alternative analytical method for the simultaneous determination of trace Cd(II) and Pb(II) in water samples. SPCE, an inexpensive, widely available and disposable material requiring minimal pretreatment, has been shown to offer comparable performance to the more expensive glassy carbon electrodes for the simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II). In addition with the low toxicity of bismuth, low background current and their small size, Bi-SPCEs offer great scope for applications in which compact instrumentation and low sample volumes are critical such as field measurement and on-site monitoring of heavy metals.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF), the Commission on Higher Education (CHE) and Chiang Mai University (Grant # RMU5380052). We thank the Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) for providing scholarship to AP. The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) is acknowledged for partial support.

REFERENCES

- Arduini, F., J.Q. Calvo, A. Amine, G. Palleschi, and D. Moscone. 2010. Bismuth-modified electrodes for lead detection. *Trends Anal. Chem.* 29: 1295-1304.
- Locatelli, C., and G. Torsi. 2001. Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference. *J. Electroanal. Chem.* 509: 80-89.
- Wang, J., J.M. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, and B. Ogorevc. 2000. Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.* 72: 3218-3222.
- Wang, J., J. Lu, U.A. Kirgeoz, S.B. Hocevar, and B. Ogorevc. 2001. Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes. *Anal. Chim. Acta* 434: 29-34.
- Kefala, G., A. Economou, A. Voulgaropoulos, and M. Sofoniou. 2003. A study of bismuth-film electrodes for the detection of trace metals by anodic stripping voltammetry and their application to the determination of Pb and Zn in tapwater and human hair. *Talanta* 61: 603-610.
- Krolicka, A., R. Pauliukaite, I. Svancara, R. Metelka, A. Bobrowski, E. Norkus, K. Kalcher, and K. Vytras. 2002. Bismuth-film-plated carbon paste electrodes. *Electrochem. Commun.* 4: 193-196.
- Svancara, T., M. Fairouz, Kh. Ismail, R. Metelka, and K. Vytras. 2003. A contribution to the characterization of mercury and bismuth film carbon paste electrodes in stripping voltammetry. *Sci. Pap. Univ. Pardubice A*, 9 (2003) 31-48.
- Demetriadis, D., A. Economou, and A. Voulgaropoulos. 2004. A study of pencil-lead bismuth-film electrodes for the determination of trace metals by anodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta* 519: 167-172.
- Wang, J., J.M. Lu, S.B. Hocevar, and B. Ogorevc. 2001. Bismuth-coated screen-printed electrodes of stripping voltammetric measurements of trace lead. *Electroanal.* 13: 13-16.
- Goldberg, H.D., R.B. Brown, D.P. Liu, and M.E. Meyerhoft. 1994. Screen printing: a technology for the batch fabrication of integrated chemical-sensor arrays. *Sens. Actuator B: Chem.* 21: 171-183.
- Laschi, S., I. Palchetti, and M. Mascini. 2006. Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead. *Sens. Actuator B: Chem.* 114: 460-465.
- Kachoosangi, R.T., C.E. Banks, X. Ji, and R.G. Compton. 2007. Electroanalytical determination of cadmium(II) and lead(II) using an in-situ bismuth film modified edge plane pyrolytic graphite electrode. *Anal. Sci.* 23: 283-289.
- Castaneda, M.T., B. Perez, M. Numera, M. Del Valle, A. Merkoci, and A. Alegret. 2005. Sensitive stripping voltammetry of heavy metals by using a composite sensor based on a built-in bismuth precursor. *Analyst (Cambridge, UK)* 130: 971-976.

Anodic Stripping Voltammetric Analysis of Cadmium and Lead in Solutions from Sequential Extraction of Soil and Sediment Samples

Autchara Paukpol¹, Jaroon Jakmunee^{1,*}

¹*Department of Chemistry, and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

*E-mail: jaroon.jakmunee@cmu.ac.th, Tel. +66 53941908, Fax. +66 53941908

Abstract

Sequential extraction is an important tool for the determination of different chemical forms of trace metals in soil and sediment. In this work, an environmental friendly anodic stripping voltammetric method (ASV) has been developed for determination of cadmium and lead in the extracted solutions of sequential extraction of soil and sediment samples. A bismuth coated screen printed carbon electrode (Bi-SPCE) was developed to be used instead of mercury based electrodes. The method was optimized for the determination in various extracting solutions of Tessier's extraction scheme. The developed method provided good sensitivity and precision. Linear ranges for cadmium and lead were 2-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ with detection limit of 1.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. It was validated by using certified reference material of soil (CRM033), and applied to sequential extraction analysis of sediment sample. The method involves small instrument which is relatively low cost, portable and could be used as an alternative to the sophisticated instrument for study of sequential extraction of solid sample.

Keywords: Anodic stripping voltammetry; Bismuth coated screen-printed carbon electrode; Sequential extraction; Cadmium; Lead; Sediment; Soil

1. Introduction

The accumulation of heavy metals in sediment and soil samples causes a potential risk to human health due to the transfer of these elements to aquatic media, their uptake by plants, and their subsequent introduction into the food chain (Konradi et al., 2005). Metals present in solid sample such as soil can be related to several reactive components. Total metal analyses in solid sample provide limited information, they do not indicate the chemical nature or potential mobility and bioavailability of the metals (Silveira et al., 2006). Therefore, sequential extraction procedure is an important tool in environmental study to determine different chemical forms of trace metals in soil material (Tessier et al., 1979; Reinirkens, 1996). Sophisticated analytical techniques, e.g., electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS) (Gulmini et al., 1994), flame atomic absorption spectrometry (FAAS), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (Korn et al., 2006) are the standard techniques used for determination of cadmium (Cd) and lead (Pb) in the extracts of sequential extraction procedure. However, these instruments are expensive, complicated and inappropriate for field applications. In addition, the analysis must be performed in a specialized laboratory by skilled personnel.

Anodic stripping voltammetry (ASV) historically has been widely recognized as a powerful technique for Cd and Pb detection, due to its remarkable sensitivity. This is resulted from unique ability to cathodically preconcentrate target metals during the accumulation step onto the working electrode, and then stripped out from the electrode by applying an anodic potential scan (Wang, 2000; Locatelli et al., 2001). It can also be readily coupled with inexpensive and easy to use instrumentation (Arduini et al., 2010). Stripping voltammetry using screen-printed electrode (SPE) with mercury film has been widely used to determine Cd and Pb. However, the toxicity of mercury has stimulated the search for environmentally friendly material to introduce mercury-free electrode. Bismuth film electrode (BiFE) is considered as the best alternative to mercury film electrode (MFE), because it can form fused alloys with heavy metals, which is analogous to the amalgams that mercury forms (Economou, 2005). Moreover, it does not require the removal of dissolved oxygen during stripping analysis, and has wide negative potential window, which is a good analytical advantage (Locatelli et al., 2001).

The modification with carbon materials on the screen-printed carbon electrode (SPCE) is popular, which increases surface area of the working electrode, and improve sensitivity. Graphene and multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) are two carbon materials, which have attracted attention. The graphene is mostly obtained from graphene oxide (GO) by electrochemically reduced method but the reduced graphene oxide (RGO) tends to aggregate due to π - π stacking interactions, thus modifications of RGO are necessary (Liu et al., 2010). The MWCNTs are rolled graphene sheets. They existed aggregation phenomenon during the period of use because of Van der Waals interactions (Zhang et al., 2010). Therefore, the combination of two dimensional (2D) graphene and 1D MWCNTs are attractive means to create 3D modified carbon materials to get rid of aggregation phenomenon and increase an electrode surface.

In this work, sequential extraction procedure and anodic stripping voltammetric method with employing bismuth film in situ coated on modified screen-printed carbon working electrode will be developed for the determination of the different chemical forms or ways of binding between metals (Cd and Pb) and soil components which are the novel concept for environmental studies. Some carbon materials, i.e., MWCNTs, RGO and RGO-MWCNTs were modified on SPCEs and investigated for simultaneous measurement of Cd and Pb by square wave anodic stripping voltammetry (SWASV). The sequential extraction procedure adapted by Tessier *et al.* was used for extracted soil and sediment samples (Tessier et al., 1979; Reinirckens, 1996). The conditions for operation of the system will be optimized and validated by using CRM033 certified reference material of soil. Addition, the development was applied to sediment sample.

2. Material and methods

2.1 Chemicals and Reagents

Multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) were obtained from Nanomaterials Research Unit (Chiang Mai, Thailand). The graphene oxide (GO) was synthesized based on the modified Hummers method (Hummers et al., 1958). All chemicals were of analytical reagent grade. Ultrapure water (Milli-Q water, resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtained from a Millipore water purification system (Millipore, Sweden) was used throughout. The solution of bismuth (Bi^{3+}) (Carlo Erba, Italy), cadmium (Cd^{2+}) (Fluka,

Switzerland) and lead (Pb^{2+}) (Merck, Germany) were prepared from 1000 mgL^{-1} standard stock solutions. An acetate buffer solution (0.1 M, pH 4.5), was prepared by mixing the acetic acid (HOAc) (Lab scan, Thailand) and sodium acetate (NaOAc) (Carlo Erba, Italy) and served as a supporting electrolyte. Nitric acid (HNO_3) (Lab scan, Thailand), hydrogen peroxide (H_2O_2) (Carlo Erba, Italy), hydroxylamine hydrochloride ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) (Fluka, Switzerland), ammonium acetate (NH_4OAc) (Loba Chemie, India) and hydrochloric acid (HCl) (Lab scan, Thailand) were used for preparation of extractants that used in sequential extraction. Certified reference material of soil (CRM033) (Fluka, Switzerland) was used to validate the developed method. All plastic and glassware were cleaned up by soaking in 10%(v/v) HNO_3 and rinsed with Milli-Q water prior to use.

2.2 Apparatus

Voltammetric measurements were performed with a Metrohm model 757 VA computrace, with GPES software for control of the voltammograph linked with a personal computer. A bismuth coated screen-printed carbon electrode was served as the working electrode, with a Ag/AgCl (3 M KCl) and a platinum wire as reference and counter electrodes, respectively. Hotplate with magnetic stirrer (C-MAG HS7, IKA, Germany) was used for sample digestion. Centrifuge (Clay Adams Dynac, Becton Dickinson, US) operated at $12000 \times g$ was used for complete separation of the extracts.

2.3 Preparation of carbon materials

The MWCNTs were treated with 3 M HNO_3 solution for 24 h followed by filtering, rinsing with Milli-Q water until the filtrate pH became nearly neutral and drying in an oven at 80°C for 24 h. This process is known as the carboxylation of MWCNTs to introduce $-\text{COOH}$ groups at the ends or the sidewalls of the structure for dispersing in polar solvent and performed to ensure complete removal of transition metal ion catalyst as used in the production of MWCNTs (Mandil et al., 2012). 0.5 mg mL^{-1} MWCNTs dispersion was prepared by adding 1.0 mg of functionalized MWCNTs to 2.0 mL ethanol (EtOH) (Merck, Germany) and ultrasonication for 30 min. Even so, the obtained dispersion was not stable since most MWCNTs were hydrophobic.

The GO dispersion in Milli-Q water with concentration 0.5 mg mL^{-1} was obtained by 30 min ultrasonication. The homogeneous GO hydrosol was brown color. The preparation of reduced graphene oxide (RGO) was performed by electrochemically process as the cyclic scan between 0.0 V and -1.5 V for 10 cycles in 0.1M acetate buffer pH 4.5 to reduce the GO from the composite film modified on the working electrode (Lia et al., 2014).

To prepare the graphene oxide-multiwall carbonnanotubes (GO-MWCNTs) hybrid material, 1.0 mg functionalized MWCNTs and 2.0 mL 1.0 mg mL^{-1} GO hydrosol were mixed together with ultrasonication for 1 h. The GO-MWCNTs were electrochemically reduced as above by performing only 3 scan cycles because the incorporating of MWCNT significantly promotes the reduction of GO and acts as a conducting wire between the graphene sheets (Mani et al., 2013).

2.3 Modified of the screen-printed carbon electrodes (SPCEs)

SPCEs were produced with a homemade manual screen-printing. Carbon ink (Henkel, Germany) was used to print the working electrode, on a flexible polyvinyl chloride (PVC) substrate. The diameter of the working electrode was 3 mm. Firstly, SPCEs were cleaned with air plasma (PDC-32G, Harrick Plasma, USA) and modified with carbon materials (MWCNTs, RGO and RGO-MWCNTs hybrid) by dropping 5 μ L of the solutions on SPCEs and drying at room temperature. After that, the electrodes were pretreated in 0.1 M acetate buffer solution, at pH 4.5 by applying a positive potential of +1.6 V for 120 s, followed by +1.8 V for 60 s and then were thoroughly rinsed with Mili-Q water. The electrochemical deposition of metals on Bi-SPCEs was carried out by in situ procedure in the presence of dissolved oxygen. The SPCE was immersed in an electrochemical cell, containing 1 mgL^{-1} Bi^{3+} in an acetate buffer (0.1 M, pH 4.5) medium and simultaneously deposited Bi and the metals on the surface of the electrode under stirring at 2000 rpm.

2.4 Sample preparation

Sediment sample was collected from the heavy metals contaminated area in Mae Sot district, Tak province, Thailand, by the Freshwater Biomonitor Research Laboratory (Chiang Mai, Thailand). Sediment sample was dried indoor at room temperature, crushed manually in a porcelain mortar and sieved through a 2 mm screen. Subsample of air-dried sediment was ground and sieved to obtain aggregates less than 0.1 mm to ensure uniformity of the material. The selected sediment sample was homogenized and stored in polyethylene vessel at room temperature in desiccators.

2.5 Digestion Procedures

2.5.1 Total metal digestion

Total metal content was determined by using EPA's acid digestion procedure 3050B as the conventional acid extraction method (USEPA, 1996). 1 g of sample was placed in 250 mL conical flask for digestion. The first step was to heat the sample to 95 ± 5 °C with 10 mL of 50 % (v/v) HNO_3 without boiling. After cooling the sample, it was refluxed with repeated additions of 65 % (v/v) HNO_3 until no brown fumes observed. Then the solution was allowed to evaporate until the volume was reduced to 5 mL. After cooling, 5 mL of 18 % (v/v) H_2O_2 was added and warmed for peroxide reaction. Heat until effervescence subsides as complete reaction and cool the flask. Continue to add 1 mL 30 % (v/v) H_2O_2 with warming until the complete peroxide reaction. Continue heating the acid-peroxide digestion until the volume has been reduced to approximately 5 mL. After cooling, centrifuge for 30 min, dilute to 100 mL with Mill-Q water and store at 4°C for analyses.

2.5.2 Sequential extraction

The metals distribution in sediment and soil was evaluated by using the sequential extraction developed by Tessier *et al.* (Tessier *et al.*, 1979). The steps in the sequence were operationally defined in terms of the targeted forms to be extracted as follows (Frentiu *et al.*, 2007; Zimmerman *et al.*, 2010):

Exchangeable (fraction I, F1): 1 g of sample extracted with 8 mL of 1 M NaOAc pH 8.2 for 1 h at room temperature with continuous agitation.

Bound to carbonates (F2): Residual from F1 extracted with 8 mL of 1 M NaOAc pH 5 for 1 h at room temperature with continuous agitation.

Bound to iron and manganese oxides (F3): Residual from F2 extracted with 20 mL of 0.04 M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in 25%(v/v) HOAc for 6 h at 96 ± 3 °C with occasional agitation.

Bound to organic matter (F4): Residual from F3 extracted with 3 mL of 0.02 M HNO_3 and 5 mL 30 %(v/v) H_2O_2 pH 2. The mixture was heated to 85 ± 2 °C for 5 h with occasional agitation, the second 3 mL 30 %(v/v) H_2O_2 pH 2 was then added and sample reheated to 85 ± 2 °C for 6 h with intermittent agitation. After cooling, extracted with 5 mL of 3.2 M NH_4OAc in 20 %(v/v) HNO_3 was added and dilute to 20 mL with Milli-Q water for 1.5 h at 85 ± 2 °C.

Residual (F5): Residual from F4 extracted with 10 mL aqua regia for 6 h at 96 ± 3 °C. Finally, the sample was evaporated to near dryness and diluted to 25 mL volume.

Following each extraction or wash, mixtures were centrifuged for 30 min. Prior to the start of the next extraction step, residues were washed with water, centrifuged, the wash solutions were collected and store at 4°C for analyses.

2.6 Measurement procedure

The analytical measurement were carried out in square wave anodic stripping voltammetric mode (SWASV). ASV experiments consisted of three conventional steps: time controlled electrochemical deposition with solution stirring, rest period and a positive going voltammetric stripping scan under the selected conditions. For SWASV the frequency (f) was 35 Hz, step potential (E_{step}) 4 mV, and amplitude 40 mV; the deposition potential (E_{dep}) -0.9 V for 180 s and the potential was swept from -0.9 to -0.3 V after an equilibrium time (t_{eq}) of 15 s; the cleaning potential (E_{clean}) 0.3V for 30 s. The electrodeposition and precondition steps were stirred at 2000 rpm. In the analysis, in situ plated Bi-SPCEs were prepared by spiking the extracted sample solution as appropriate dilution with 1 mgL^{-1} Bi^{3+} in 0.1 M acetate buffer solution at pH 4.5. Standard addition method was used for quantification of Cd^{2+} and Pb^{2+} in samples.

3. Results and Discussion

3.1 Electrochemical characterization of modified SPCEs

Stripping voltammograms of different carbon electrodes (bare SPCE and, MWCNTs, RGO, and RGO-MWCNTs modified SPCEs) on which Bi was in situ plated are shown in Fig. 1. Stripping voltammograms were obtained with 1 mgL^{-1} Bi^{3+} in 0.1 M acetate buffer solution at pH 4.5 containing $100\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ each of Cd^{2+} and Pb^{2+} . For comparison of the resulting voltammograms of different electrodes, the baselines current increased in the order of bare, RGO, MWCNTs and RGO-MWCNTs modified SPCEs, respectively. This indicated the increase of electrode area after modification. However, the surface areas as increasing were not active sites for Cd^{2+} and Pb^{2+} detection. The data obtained from the voltammograms are summarized in Table 1. The Bi-SPCE exhibited the sharpest and the highest peak current. And the sensitivity of the electrode decreased in the order of bare, RGO, RGO-MWCNTs and MWCNTs modified SPCEs as shown in Table 2. The sensitivity of Bi-SPCE was 11 times higher than RGO-Bi-SPCE for Cd^{2+} and 4 times for Pb^{2+} . Therefore, it was clear that the Bi-SPCE was more appropriate for determination of Cd^{2+} and Pb^{2+} using SWASV.

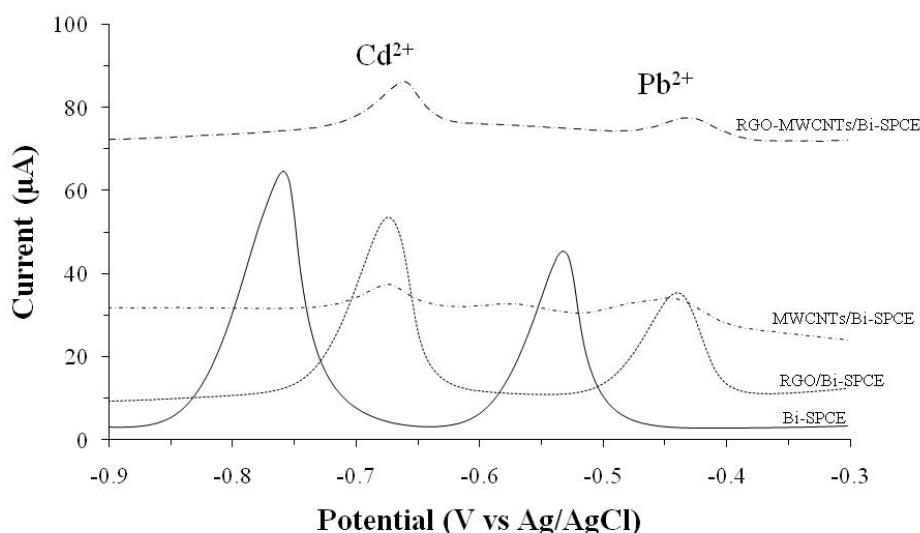


Fig. 1 Anodic stripping voltammograms of $100 \mu\text{gL}^{-1}$ Cd^{2+} and Pb^{2+} at in situ plated Bi film ($1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Bi}^{3+}$) on different carbon materials modified SPCEs. Supporting electrolyte; 0.1 M acetate buffer solution ($\text{pH } 4.5$); $E_{\text{dep}} -0.9 \text{ V}$; $t_{\text{dep}} 180 \text{ s}$; $t_{\text{eq}} 15 \text{ s}$; $f 35 \text{ Hz}$; $E_{\text{step}} 4 \text{ mV}$; amplitude 40 mV .

Table 1 Effect of the different carbon materials modified Bi-SPCEs on the SWASV peak current (i_p), peak potential (E_p) and peak widths ($W_{1/2}$) for a solution containing $100 \mu\text{gL}^{-1}$ each of Cd^{2+} and Pb^{2+} in 0.1 M acetate buffer solution ($\text{pH } 4.5$), the conditions as in Fig. 1

	Cd^{2+}			Pb^{2+}		
	$i_p (\mu\text{A})$	$E_p (\text{V})$	$W_{1/2} (\text{V})$	$i_p (\mu\text{A})$	$E_p (\text{V})$	$W_{1/2} (\text{V})$
Bi-SPCE	61.9	-0.76	0.59	34.2	-0.53	0.51
MWCNTs/Bi-SPCE	5.3	-0.68	0.44	1.3	-0.47	0.82
RGO/Bi-SPCE	42.9	-0.68	0.59	23.8	-0.44	0.59
RGO-MWCNTs/Bi-SPCE	13.4	-0.66	0.53	4.6	-0.43	0.57

Table 2 The sensitivity of different carbon materials modified Bi-SPCEs in range $0-40 \mu\text{gL}^{-1}$ Cd^{2+} and Pb^{2+} with 0.1 M acetate buffer solution ($\text{pH } 4.5$) using in-situ prepared Bi-SPCE, $n = 3$, other conditions as Fig. 1.

	Sensitivity ($\mu\text{A}/\mu\text{gL}^{-1}$)			
	Bi-SPCE	MWCNTs/Bi-SPCE	RGO/Bi-SPCE	RGO-MWCNTs/Bi-SPCE
Cd^{2+}	0.8491	0.0200	0.0758	0.0580
Pb^{2+}	0.4401	0.0028	0.0980	0.0468

3.2 Analytical performances

Fig. 2 exhibits the evolution of square wave anodic stripping voltammograms were performed on Bi-SPCE for the simultaneous determination of Cd^{2+} and Pb^{2+} in range $0-100 \mu\text{gL}^{-1}$. A small background current over a wide potential range was noticed. The resulting calibration plots, which considers as peak height, are linear over the entire range studied. They had two different slopes in the range of $2-40$ and $40-100 \mu\text{gL}^{-1}$ for both Cd^{2+} and Pb^{2+} . The corresponding equations of calibration curves are $y = 0.8491x - 1.4767$, $y =$

$0.4975x+13.0450$ (x: concentration/ μgL^{-1} ; y: current/ μA) with the correlation coefficient of $R^2 = 0.9982$, 0.9930 for for Cd^{2+} and $y = 0.4401x-0.2460$, $y = 0.2731x+7.064$ (x: concentration/ μgL^{-1} ; y: current/ μA) with the correlation coefficient of $R^2 = 0.9975$, 0.9990 for for Pb^{2+} . The limit of detections (LODs) were calculated based on three times the standard deviation of blank at a deposition time of 180 s, were $1.7 \mu\text{gL}^{-1}$ for Cd^{2+} and $0.7 \mu\text{gL}^{-1}$ for Pb^{2+} .

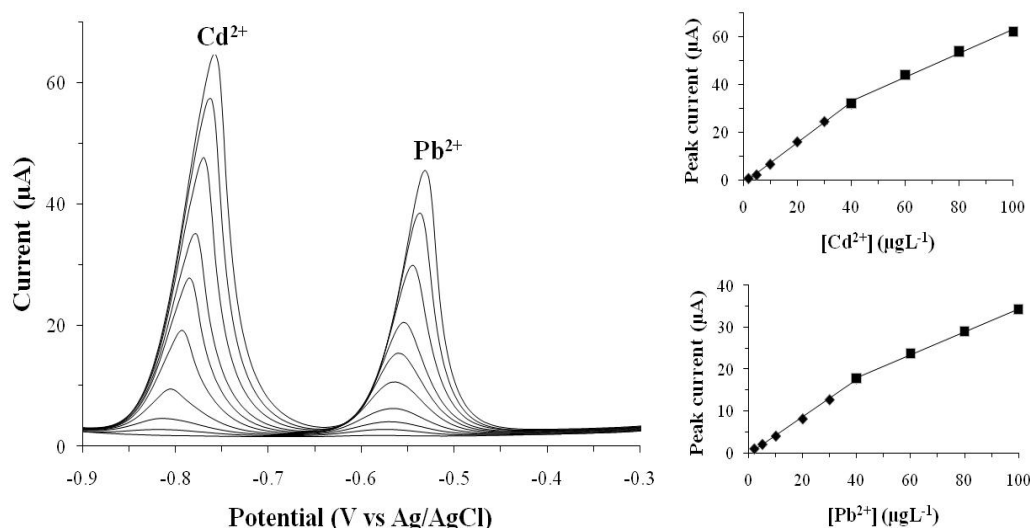


Fig. 2 A series of voltammograms and calibration graphs for increasing concentrations of Cd^{2+} and Pb^{2+} in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 using in-situ prepared Bi-SPCE ($1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Bi}^{3+}$), $n = 3$, SWASV parameter as Fig. 1.

The performances of Bi film deposition on SPCE have been tested and evaluated for Cd^{2+} and Pb^{2+} concentrations lower than $40 \mu\text{gL}^{-1}$ which are sufficient to analyze in the real samples. On the same electrode, the relative standard deviations (RSDs) were 7.6 % for Cd^{2+} and 9.4 % for Pb^{2+} at $20 \mu\text{g L}^{-1}$ level ($n=30$). The same SPCE could be used for at least 30 stripping cycles with slightly loss of sensitivity ($\text{RSD} < 10 \%$) as shown in Fig.3. This electrode also permits to attain a repeatability of RSDs; 6.7 % for Cd^{2+} and 5.6 % for Pb^{2+} ($n=3$) considering seven successive measurements of the same solution.

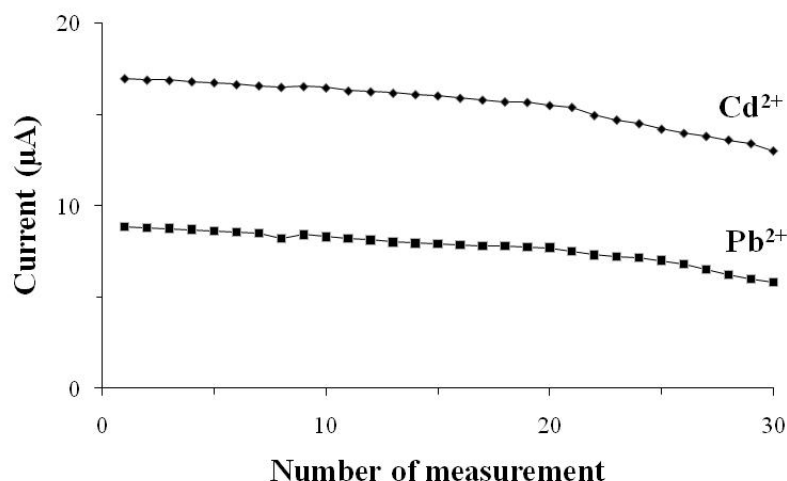


Fig. 3 Stability of 30 reproductive measurements for $20 \mu\text{gL}^{-1}$ Cd^{2+} and Pb^{2+} in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 using in-situ prepared Bi-SPCE (1 mgL^{-1} Bi^{3+}), Other conditions as Fig. 1.

3.3 Effect of sequential extractants in Tessier's procedure

The extractants for sequential extraction by Tessier's procedure are the solution of salt and acid so the extractants of each fraction were used as supporting mediums for the voltammetric analysis without sample preparation. The bound to organic matter (F4) and residual (F5) fractions were adjusted the conditions to be appropriate for electrochemical stripping analysis. Since the extractant for fraction 4 contained HNO_3 , H_2O_2 and NH_4OAc , the excess H_2O_2 can be reduced to oxygen gas (O_2) on working electrode at negative potential in preconcentration step. Therefore, the solution was added with zinc (Zn) powder to reduce remaining H_2O_2 before the measurement. In addition, the residual fraction was strong acid solution, i.e., aqua regia. The reduction of remaining hydrogen ion (H^+) to hydrogen gas (H_2) in preconcentration step was occurred so the solution was adjusted pH (~ 4.5) with NaOAc before measurement. A small background current over a wide potential range was observed in each sequential extractant of five fractions. In each case, the calibration graphs of Cd^{2+} and Pb^{2+} in concentration range of $0\text{--}40 \mu\text{gL}^{-1}$ were constructed. The calibration data as sensitivity and R^2 of Cd^{2+} and Pb^{2+} are summarized in Table 3. The different extractants as supporting mediums provided different sensitivities, suggesting that a standard addition method should be used for quantification of the analytes. The linearity of the calibration graphs of both Cd^{2+} and Pb^{2+} are good as indicated by R^2 values closing to 1. Therefore, the SWASV was applicable to determine Cd^{2+} and Pb^{2+} that were extracted from soil and sediment by Tessier's procedure. All of the extractants can be used as supporting electrolyte, without any trouble, so it did not require sample preparation step before measurement. The ASV provides more convenient operation and cheaper than the commonly used spectrometry techniques.

Table 3 The calibration data of Cd^{2+} and Pb^{2+} at concentration range 0-40 $\mu\text{g L}^{-1}$ in each Tessier's procedure sequential extractants by the proposed SWASV with Bi-SPCE

Fractions	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calibration data			
		Cd^{2+}		Pb^{2+}	
		Sensitivity ($\mu\text{A}/\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	Sensitivity ($\mu\text{A}/\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2
Exchangeable	0-40	1.3663	0.9975	1.7975	0.9933
Bound to carbonates		1.4970	0.9951	1.5081	0.9945
Bound to Fe/Mn oxides		1.1488	0.9990	1.6296	0.9960
Bound to organic matter		2.1003	0.9960	2.6437	0.9993
Residual		0.5936	0.9891	1.4187	0.9944

3.4 Application to real samples

The validation of the developed method was studied by determining of Cd^{2+} and Pb^{2+} in the CRM033 certified reference material using standard addition method for quantification of the analytes in concentration range of 0-40 $\mu\text{g L}^{-1}$. The total concentrations as certified values were found to be very high, i.e., $126.7 \pm 1.3 \text{ mg Kg}^{-1}$ for Cd and $107.5 \pm 0.3 \text{ mg Kg}^{-1}$ for Pb. The relative distributions in each elemental fractions of Cd and Pb in soil by the Tessier's procedure were exchangeable (25.9; 1.5 %), bound to carbonates (9.0; 5.6 %), bound to iron and manganese oxides (1.0; 4.1 %), bound to organic matter (61.3; 41.4 %) and residual (2.8; 47.4 %), respectively. All the obtained results are given in the Table 4 and Fig. 4. The summation of Cd and Pb concentrations analyzed by sequential extraction were in good agreement with the results found in the total concentration using EPA's acid digestion procedure 3050B. Therefore, the SWASV with bismuth film working electrode can be applied to the simultaneous determination of Cd and Pb in real soil and sediment samples by using Tessier's sequential extraction procedure.

Table 4 The concentration of Cd and Pb in CRM033 analyzed using the proposed SWASV with Bi-SPCE by different extraction method^a.

Extraction method	Fractions	Concentration (mg Kg^{-1})	
		Cd	Pb
Sequential extraction	Exchangeable	33.7 ± 0.3	1.7 ± 0.0
	Bound to carbonates	11.7 ± 0.0	6.2 ± 0.1
	Bound to Fe/Mn oxides	1.3 ± 0.0	4.5 ± 0.1
	Bound to organic matter	79.7 ± 0.2	45.9 ± 0.9
	Residual	3.6 ± 0.1	52.6 ± 0.2
	Sum	130.0 ± 0.6	110.9 ± 1.3
Total concentration by digestion certified value		126.7 ± 1.3	107.5 ± 0.3

^a Values represent the mean of three duplicates \pm standard deviation.

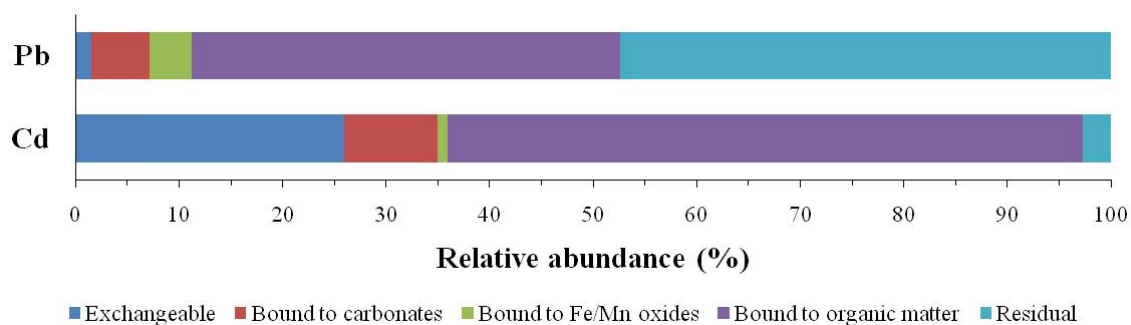


Fig. 4 The relative distributions of Cd and Pb among the various soil fractions extracted by the Tessier's procedure

For the purpose of practical applicability, the Tessier's procedure and SWASV method with employing bismuth film in situ coated on screen-printed carbon working electrode were used for the determination of the different chemical forms of Cd and Pb contaminants in sediment sample, which was collected from the Mae Sot district, Tak province, Thailand. The element contents determined in five fractions following the Tessier's procedure and the total concentrations of Cd and Pb are shown in Table 5, while the distribution among the fractions are presented in Fig. 5, consisting of exchangeable (2.0; 0.6 %), bound to carbonates (9.2; 2.7 %), bound to iron and manganese oxides (7.2; 11.1 %), bound to organic matter (24.8; 55.8 %) and residual (56.9; 29.7 %), respectively. The Tessier's partitioning shows the predominance of metals associated with the organic matter, residual fractions and smaller concentrations extracted from exchangeable, carbonates and oxides fractions. The exchangeable and bond to carbonates species, corresponding to the first and second fractions, are generally called "bio-available", as they exhibit a mobility relative to the environment and are potentially available for plants which introduce into the food chain. The results show that the amounts of Cd and Pb in bio-available form are very low in sediment so they do not risk to human health. For Cd and Pb increasing of the oxides, organic matter and residual fractions, excepting Cd bound to oxides, are non-bioavailable forms to general environment.

Table 5 The concentration of Cd and Pb in sediment sample analyzed using the proposed SWASV with Bi-SPCE by different extraction method^a.

Extraction methods	Fractions	Concentration (mg Kg ⁻¹)	
		Cd	Pb
Sequential extraction	Exchangeable	0.3±0.0	3.8±0.0
	Bound to carbonates	1.4±0.0	16.9±0.1
	Bound to Fe/Mn oxides	1.1±0.0	68.6±0.1
	Bound to organic matter	3.8±0.1	344.4±0.4
	Residual	8.7±0.2	183.6±0.2
	Sum	15.3±0.3	617.3±0.8
Total concentration		15.3±0.1	614.2±4.2

^a Values represent the mean of triplicates ± standard deviation.

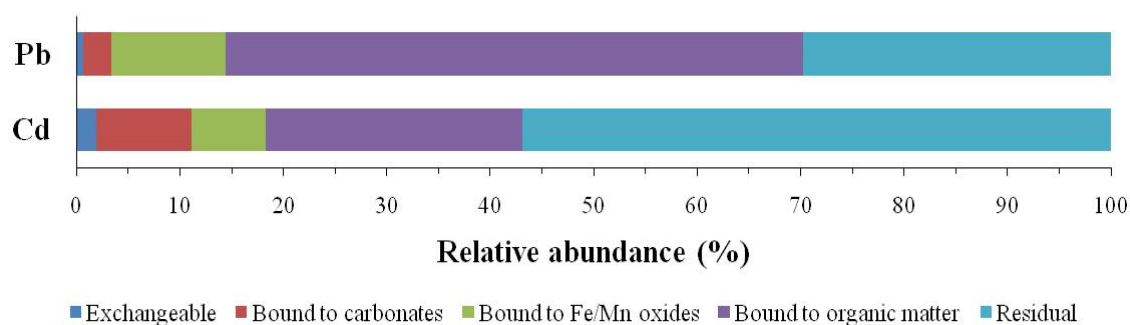


Fig. 5 The relative distributions of Cd and Pb among the various sediment fractions extracted by the Tessier's procedure

4. Conclusions

The experimental results indicate that the developed analytical method by using electrochemical stripping analysis for the determining different chemical forms of Cd^{2+} and Pb^{2+} which extract from soil and sediment by Tessier's sequential extraction procedure is successful. The method is applicable for direct simultaneous determination of Cd^{2+} and Pb^{2+} which are extracted from soil and sediment by sequential extraction using standard addition method for quantification of the analytes. Therefore, it is not require sample preparation before measurement. In addition Bi-SPCEs are sensitive alternative electrode for Cd^{2+} and Pb^{2+} with the high active surface area, low background current, low toxicity of Bi, disposable material requiring minimal pretreatment and their small size. Sequential extraction as Tessier's procedure coupled SWASV using Bi-SPCE offers great scope for applications in which it is simpler, less expensive, and low sample volume than the spectrometric methods for studying in environmental field.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) for supporting scholarship to AP. The Thailand Research Fund (TRF), the Office of the Higher Education Commission (OHEC), and Faculty of Science, Chiang Mai University are gratefully acknowledged for financial support (grant number RMU5380052). The Center for Innovation in Chemistry: Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH-CIC) is acknowledged for partial support.

References

- E.A. Konradi, T. Frentiu, M. Ponta and E. Cordos, *Acta Univ. Cib.; Seria F*, **8** (2005-2) 5.
- M.L. Silveira, L.R.F. Alleoni, G.A. O'Connor and A.C. Chang, *Chemosphere*, **64** (2006) 1929.
- A. Tessier, P.G.C. Campbell and M. Bisson, *Anal. Chem.*, **51** (1979) 844.
- P. Reinirkens, *Sci. Total Environ.*, **189**(1996) 361.
- W. S. Hummers and R. E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.*, **80** (1958) 1339.
- M. Gulmini, G. Ostacoli and V. Lano, *Analyst*, **11** (1994) 2075.
- M.A. Korn, J.B. de Nadrade, D.S. de Jesus, V.A. Lemos, M.L.S.F. Bandeira, W.N.L. dos Santos, M.A. Bezerra, F.A.C. Amorin, A.S. Souza and S.L.C. Ferreira, *Talanta*, **69** (2006) 16.
- J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, second ed., Wiley-VCH, New York, 2000.

- C. Locatelli and G. Torsi, *J. Electroanal. Chem.* **509** (2001) 80.
- F. Arduini, J.Q. Calvo, A. Amine, G. Palleschi and D. Moscone, *Trends Anal. Chem.*, **29** (2010) 1295.
- A. Economou, *Trends Anal. Chem.*, **24** (2005) 334.
- C. Locatelli and G. Torsi, *J. Electroanal. Chem.* **509** (2001) 80.
- Y. Lia, L. Zoua, Y. Lia, K. Lia and B. Yea, *Sens. Actuator B.*, **201** (2014) 511.
- V. Mani, B. Devadas and S. MingChen, *Biosens Bioelectron.*, **41** (2013) 309.
- J.B. Liu, S.H. Fu, B. Yuan, Y.L. Li and Z.X. Deng, *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (2010) 72.
- C. Zhang, L. Ren, X. Wang and T. Liu, *J. Phys. Chem. C*, **114** (2010) 35.
- X.Q. Shan and B. Chen, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 802.
- Q. Tu, X.Q. Shan, J. Qian, and Z.M. Ni, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 3562.
- P.C. Ryan, S. Hillier, and A.J. Wall, *Sci.Total Environ.*, **407** (2008) 603.
- USEPA, *Environmental Protection Agency*, Revision 2, Washington, USA, 1996.
- T. Frentiu, M. Ponta, E. Levei, E. Gheorghiu, I Kasler and E. A. Cordos, *Chemical Papers*, **62(1)** (2008) 114.
- A.J. Zimmerman and D.C. Weindorf, *Int. of J. Anal Chem.*, **1**(2010) 1.
- A. Mandil, R. Pauliukaite, A. Amine and C.M.A. Brett, *Anal. Lett.*, **45** (2012) 395.

Flow Injection Amperometric Detection and Off-line Sequential Extraction Column for Fractionation of Phosphorus in Sediment

Pimporn Insain[a] and Jaroon Jakmunee*[b]

[a] Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[b] Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Author for correspondence; e-mail address: jaroon.jakmunee@cmu.ac.th; jakmunee@gmail.com

ABSTRACT

Flow injection amperometric system has been developed for determination of phosphorus. It is based on in-line formation of 12-molybdophosphate complex, which is further electrochemically reduced on a glassy carbon working electrode at a constant applied potential of 0.20 V vs. Ag/AgCl. An electrical current is directly proportional to phosphate concentration. Calibration graphs plotting between peak height and phosphate concentration were obtained in range of 0.1-1.0 and 1.0-10.0 mg L⁻¹ P-PO₄, with a detection limit of 0.03 mg L⁻¹ P-PO₄. The precision of 2.1, 2.6, 1.5, 1.2 and 1.0% (n=11, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ P-PO₄, respectively) and sample throughput of 89 h⁻¹ were achieved. The method has lower interference (i.e., from silicate, colored and colloidal substances, and the Schlieren's effect) than the commonly used spectrophotometric method. Although it may be interfered by cations, e.g., Fe³⁺ and Al³⁺, these ions could be eliminated by using Chelex 100 resin column. The proposed system was successfully applied to determine phosphorus that sequentially leached from sediments. An off-line leaching column was proposed for fractionation of phosphorus according to Hietjes-Lijklema scheme (HLS). The results obtained from extraction by using the proposed column method and the batch shaking method were in good agreement (no significant difference at 95% confident level).

KEYWORDS: Flow injection amperometry, Phosphorus, Fractionation, Sequential extraction, Sediment

1. INTRODUCTION

Phosphorus (P) is an important element for the growth of plants and animals. It also plays a major role in eutrophication of aquatic system [1-3]. Determination of phosphorus in natural water and environmental solids is significant for assessing the sources, cycle and fate of phosphorus [4], whereas, the information on total phosphorus content is not enough to estimate the environmental risk [3,5,6]. In solid phases, various chemical forms of phosphorus have different behaviors, mobilities and bioavailabilities [3,7]. Consequently, it is necessary to study and determine phosphorus species in environmental solids using fractionation schemes [3,6,8].

Sequential extraction or fractionation procedures have been widely used to characterize the different forms of inorganic phosphorus exploiting acid and alkaline reagents [9,10]. Most modification or improvement of extraction schemes are originally suggested by Chang and Jackson [9]. The Hietjes-Lijklema scheme [11] is one of the modified fractionation procedures that it is simple to operate and has been used by many researchers [9,12-19]. This method employs NH_4Cl to extract loosely bound P and partially remove carbonates, NaOH to dissolve Fe- and Al-bound P, and HCl to solubilize Ca-bound P.

Sequential extraction procedures have been performed in a batchwise manner, i.e., normally by shaking solid sample with extracting solution, which is much time consuming, large consumption of reagents and inconvenient. Flow based on-line fractionation methods were also proposed [9,18,19]. The detection of extracted phosphate could be done on-line or off-line, commonly by a spectrophotometric method based on a molybdenum blue reaction. However, the spectrophotometric detection using this reaction suffers from interferences such as silicate, colored and colloidal substances and the Schlieren's (refractive index) effect. Amperometric detection is one of electrochemical techniques that can be applied for phosphate determination and it does not suffer from the mentioned interferences [4,20].

In this work, the flow injection amperometric detection system was developed for determination of phosphate in different mediums of various extracting solutions according to the Hietjes-Lijklema scheme. An on-line cation exchange column was incorporated into the proposed system to eliminate interference from metal ions. A batchwise off-line extraction column was also proposed for sequential extraction of sediment using the Hietjes-Lijklema scheme. The method provides the results comparable to the standard shaking extraction method, but it is faster, lower cost, and more convenient operation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

All chemicals used are analytical reagent grade. All standard and reagent solutions were prepared with deionized (DI) water, which obtained from Millipore water purification system (Millipore, Sweden). Potassium dihydrogenphosphate (Fisher Scientific, USA) 0.4394 g was dissolved with water and the solution was made up to 100.00 mL to obtain 1000 mg L⁻¹ of phosphate stock standard solution. Working standard solution was prepared by appropriately diluting the stock solution with water. Solution of 0.1 M potassium chloride was prepared by dissolving 3.73 g potassium chloride (Carlo Erba, Italy) with water and the solution was made up to 500 mL. Ammonium molybdate (Carlo Erba, Italy) 2.50 g was dissolved with water. Then, sulfuric acid (QR c, New Zealand) 12.5 mL was added into the solution. The solution was made up to 500 mL and the resulting solution contains 0.5%w/v molybdate and 2.5%v/v sulfuric acid solution.

Chelex 100 resin column was prepared by suspending 5.0 g of the Chelex 100 resin (50-100 mesh (sodium form), total capacity 0.4 meq mL⁻¹, density 0.65 g mL⁻¹ (BIO-RAD, USA)) in water and pouring into 10 mL of plastic syringe (length 8.5 cm, I.D. 1.5 cm). After that, the resin column was washed with the large excess of 1 M HCl, H₂O, 1 M NaOH and H₂O, respectively, until pH of the effluent was less than 10.

Extracting solutions for sequential extraction of phosphorus were prepared as follow: Ammonium chloride (Scharlau, Spain) 26.75 g was dissolved with water. Then, the pH of solution was adjusted to 7.0 by adding ammonium hydroxide (Fluka, Switzerland). The solution was made up to 500 mL to obtain 1.0 M of ammonium chloride solution. Sodium hydroxide (Solvay, Belgium) 2.00 g was dissolved with water and the solution was made up to 500 mL to obtain 0.1 M of sodium hydroxide solution. Hydrochloric acid (Lab Scan, Poland) 20.8 mL was added into water and the solution was made up to 500 mL to obtain 0.5 M of hydrochloric acid solution.

2.2 Flow Injection Amperometric System

Flow injection amperometric system for phosphorus determination is shown in Figure 1. The system consisted of a peristaltic pump (Ismatec, Switzerland) with Tygon pump tubing, an injection device assembled from a set of three-way solenoid valves (Biochemvalve, USA), a flow through electrochemical cell (Cross-flow cell, Model MF – 1093, BAS, USA) composed of a 3 mm diameter glassy carbon working electrode (GCE), a Ag/AgCl reference electrode (RE) and a stainless steel auxiliary electrode (AE), a PalmSens handheld potentiostat/galvanostat (PalmSens, Netherland) and a personal computer. PTFE tube with inner diameter of 0.5 mm was used for assembling the flow system. The glassy carbon electrode was polished with water slurry of 0.3 and 0.05 µm alumina polish (Al₂O₃), respectively, on a polishing pad and polished about 100-300 times to obtain a fresh surface. Then, it was rinsed three times into water and into ethanol alternatively to eliminate the remaining Al₂O₃ particles from its surface.

The operation of FI system is as follow: A solution was flowed through the system at 3.2 mL min⁻¹. A standard/sample solution (75 µL) was injected into the stream of 0.1 M KCl and merged with the stream of 0.5%w/v acidic molybdate solution. Then, the mixture was flowed through a mixing coil (50 cm) to a flow through electrochemical cell. The 12-molybdophosphate complex produced from the reaction was then electrochemically reduced at a GCE working electrode, at a constant applied potential of 0.20 V *vs.* Ag/AgCl, producing an electrical current which is directly proportional to phosphate concentration. The calibration graph was plotted between peak height and phosphate concentration and used for quantification of phosphate in sample.

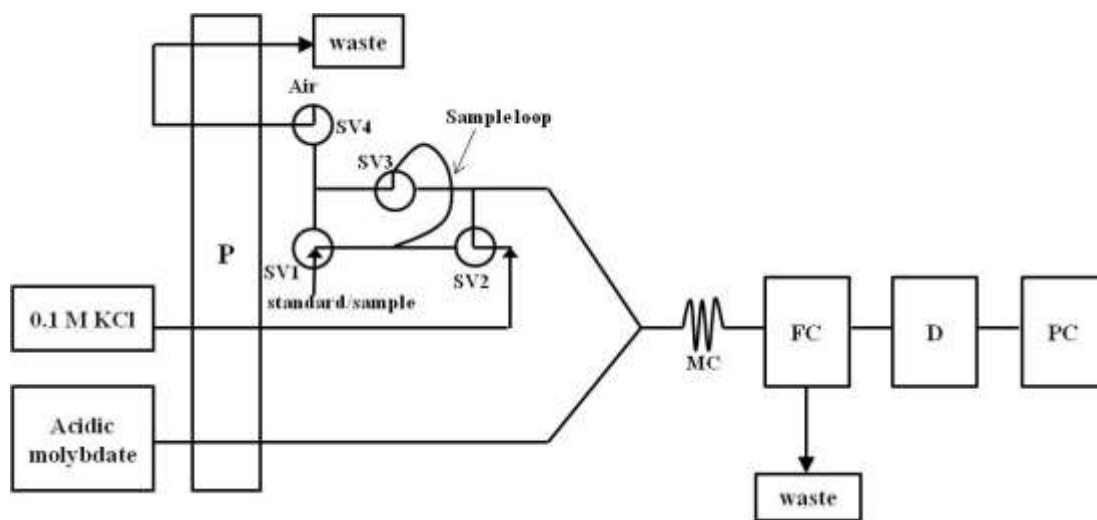


Figure 1. Flow injection amperometric system for phosphorus determination: P = peristaltic pump, SV1-4 = solenoid valves, MC = mixing coil, FC = flow through electrochemical cell (WE = glassy carbon I.D. 3 mm, RE = Ag/AgCl, AE = stainless steel), D = potentiostat/amperometric detector, and PC = computer.

2.3 Sample Collection and Preparation

Sediment samples were collected from 6 sites in Chiang Mai University, as illustrated in Figure 2. Sediment samples (depth 0-3 cm) were randomly collected in each sampling site and combined together. The samples were sieved through a 70 mesh sieve and kept at -20 °C before analysis. 1.0000 g of wet sediment sample was oven dried at 105 °C for 16-24 hours. After that, the dried sediment sample was put into desiccator, weighted and calculated percentages of solid and moisture.



Figure 2. Map of sampling sites showing the location of 6 sampling points in Chiang Mai University.

2.4 Sequential Extraction Procedures

2.4.1 Sequential extraction of phosphorus from sediment by the off-line leaching column

The column leaching was carried out at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) by the batch method employing a plastic syringe fitted at the bottom with cotton wool and a piece of filter paper to support the sample as shown in Figure 3. A portion (1.0000 g) of sediment was accurately weighed and put in the column. The first extractant (1.0 M NH_4Cl) 50.00 mL was carefully poured into the column and the leached solution was collected in a polyethylene bottle. Then, the next extractant (0.1 M NaOH) 50.00 mL was carefully poured into the column and the leached solution was collected in a polyethylene bottle. The last extractant (0.5 M HCl) 50.00 mL was carefully poured into the column and the leached solution was collected in a polyethylene bottle. Finally, the residue was digested with 2.00 mL of hydrochloric acid for an hour, then filtered through Whatman No.1 filter paper and made up to 50.00 mL with water.

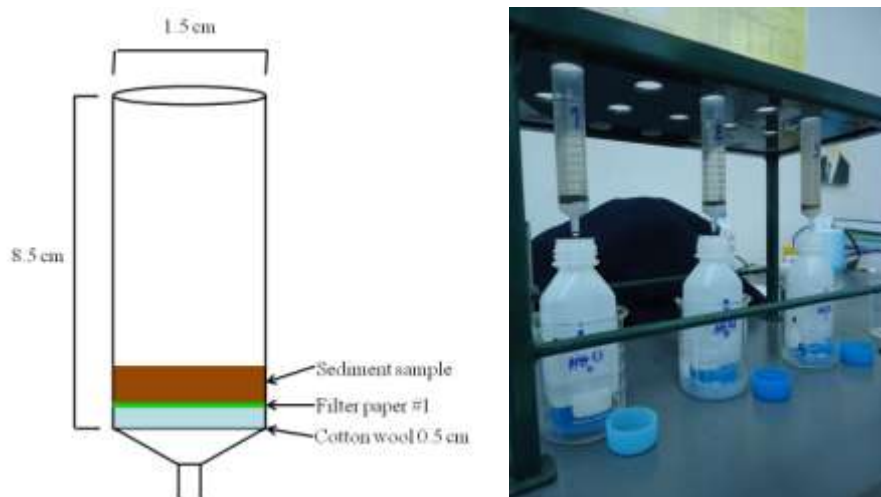


Figure 3. A leaching column for off-line sequential extraction of phosphorus from sediment samples.

2.4.2 Sequential extraction of phosphorus from sediment shaking method

A portion (1.0000 g) of sediment was extracted with 50.00 mL of 1.0 M NH_4Cl for 2 hours, then filtered through Whatman No.1 filter paper and collected in a polyethylene bottle. The residue was extracted with 1.0 M NH_4Cl again. After that, the residue was extracted with 0.1 M NaOH for 17 hours, then filtered through Whatman No.1 filter paper and collected in a polyethylene bottle. Next, the residue was extracted with 0.5 M HCl for 24 hours, then filtered through Whatman No.1 filter paper and collected in a polyethylene bottle. Finally, the residue was digested with 2.00 mL of hydrochloric acid for an hour, then filtered through Whatman No.1 filter paper and made up to 50.00 mL with water. Extraction was carried out at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Before changing to the next extractant, cleaning the sediment with water was done. The Schematic diagram of sequential extraction of phosphorus is summarized in Figure 4.

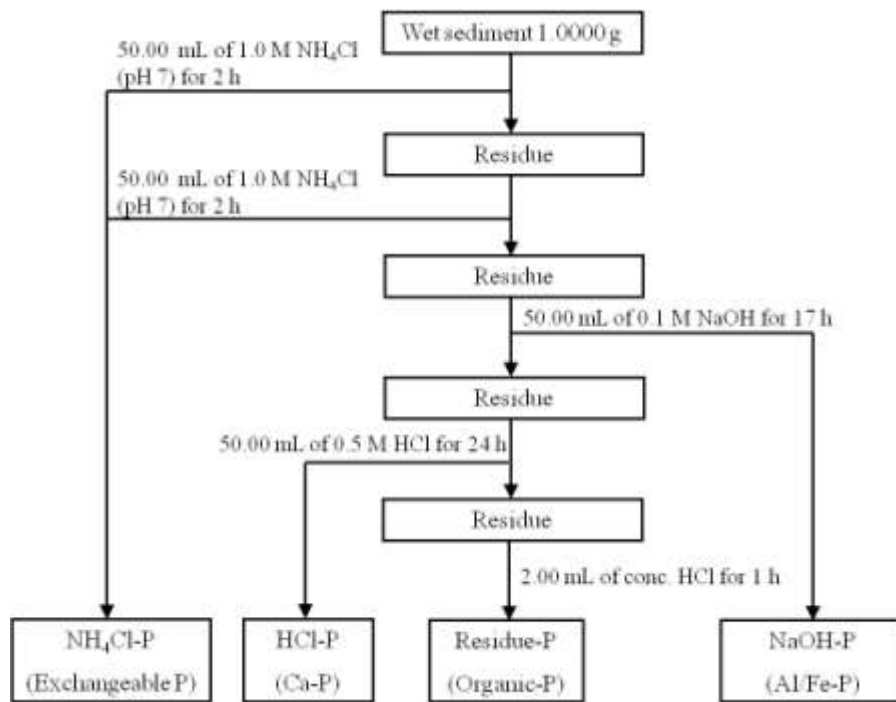
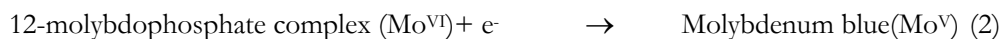
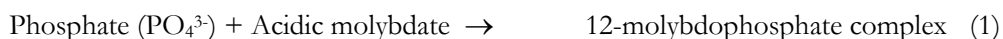


Figure 4. Schematic diagram of sequential extraction of phosphorus from sediment soil by the batch method.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Flow Injection Amperometric Method for Phosphate Determination

FI-amperometric method for phosphorus determination is based on the electrochemical reduction of the 12-molybdophosphate complex as shown in the equations below:



The 12-molybdophosphate complex was reduced at a working electrode and produced an electrical current which is directly proportional to phosphate concentration.

The FI system as depicted in Figure 1 was employed and the previously reported conditions of the system [20] were preliminary used. It was found that applied potential of 0.20 V vs. Ag/AgCl gave a good sensitivity and stable baseline. Moreover, signal of silicate (1000 mg L⁻¹) and arsenate (5 mg L⁻¹) did not appear at this potential. The sensitivity increased when increasing ammonium molybdate concentration, however, at ammonium molybdate concentration higher than 0.5%w/v, the baseline drift was occurred due to the adsorption of the molybdenum blue at surface of GCE was occurred. Therefore, 0.5%w/v of ammonium molybdate was chosen. Sulfuric acid concentration of 2.5 %v/v was selected for the developed system since it furnished better

sensitivity and stable baseline. At sulfuric acid concentration higher than 2.5%v/v, the sensitivity was higher but a dramatically noisy baseline was observed. The optimum conditions of the FI-amperometric system are summarized in Table 1.

Table 1. The optimum conditions of the FI-amperometric system for phosphate determination

Parameters	Optimum value
Flow rate	3.2 mL min ⁻¹
Sample volume	75 μ L
Ammonium molybdate concentration	0.5%w/v
Sulfuric acid concentration	2.5%v/v
Potassium chloride concentration	0.1 M
Mixing coil length	50 cm
Working electrode	Glassy carbon I.D. 3 mm
Reference electrode	Ag/AgCl
Auxiliary electrode	stainless steel
Applied potential	0.20 V

3.2 Analytical Characteristics of the Method

Under the optimum conditions in Table 1, the FI-gram of various concentrations of phosphate standard solution was obtained as shown in Figure 5. The calibration graphs were linear in the range of 0.1-1.0 mg L⁻¹ P-PO₄ ($y = -0.5240x - 0.0053$, $r^2 = 0.9991$) and 1.0-10.0 mg L⁻¹ P-PO₄ ($y = -0.3739x - 0.2250$, $r^2 = 0.9978$). The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 0.03 and 0.11 mg L⁻¹ P-PO₄, respectively.

Precision of the system was evaluated by eleven injections of standard phosphate solution concentrations of 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ P-PO₄. The proposed method provided a good precision as indicated by percentages of relative standard deviation (%RSDs) of 2.1, 2.6, 1.5, 1.2, and 1.0 for 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ P-PO₄, respectively. The proposed method consumed 75 μ L of sample and 2.1 mL each of electrolyte and reagent solutions (corresponding to 16 mg of KCl, 11 mg of ammonium molybdate and 0.05 mL of sulfuric acid per analysis), which is much lower than the batch spectrophotometric method. Sample throughput of 89 h⁻¹ was achieved.

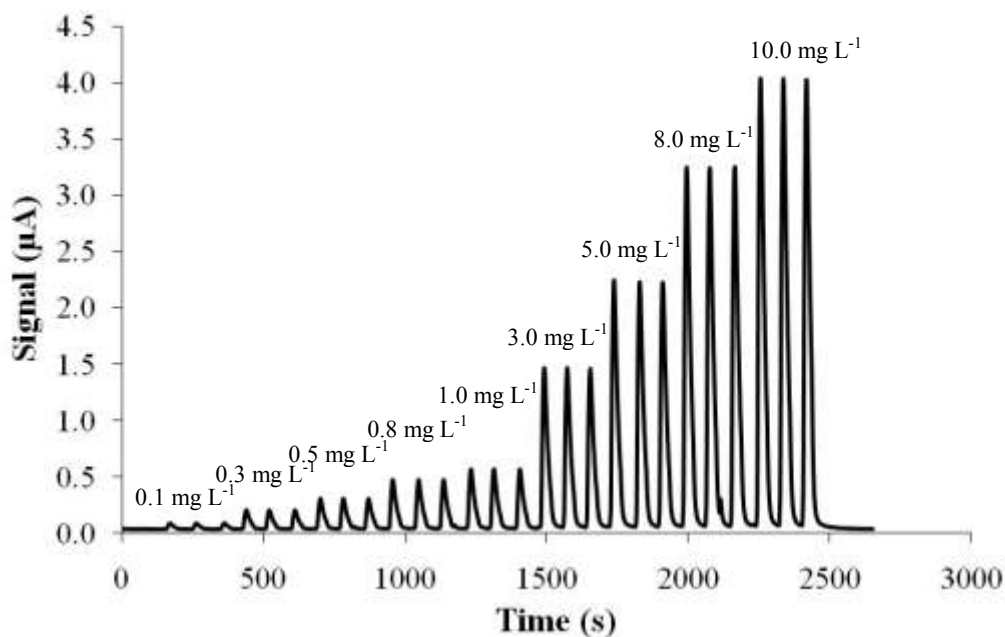


Figure 5. FIAGram of standard phosphate solutions by using the FI-amperometry.

3.3 Interference study

Effects of some potential interfering species have been investigated by adding different concentrations of the potential interfering substances into 0.5 mg L⁻¹ standard phosphate solution. Then, the solutions were injected to the FI-amperometric system and the peak height obtained was compared to that of 0.5 mg L⁻¹ standard phosphate solution without interfering species. The tolerance limit of interfering substances was considered as the concentration that did not give %different in peak height more than $\pm 5\%$. Effects of some anions were investigated, such as arsenate and silicate which can react with the acidic molybdate and interfere in spectrophotometric molybdenum blue method. It was found that the FI amperometric method can tolerate to arsenate and silicate up to 0.25 mg L⁻¹ and 1000 mg L⁻¹, respectively, which is higher than the spectrophotometric method. Tolerance limits for carbonate, nitrate and chloride were 500 mg L⁻¹, 1000 mg L⁻¹, and 40 g L⁻¹, respectively. Unlike spectrophotometric method, amperometric detection did not suffer from high concentration of salt (Schlieren's effect) and colored substances in sample solution.

The FI-amperometric system can tolerate to some cations, such as Na⁺ up to 26 g L⁻¹, Ca²⁺ and NH₄⁺ up to 1000 mg L⁻¹, and Mg²⁺ up to 500 mg L⁻¹. In case of metal ions which can bind with phosphate and precipitate in the insoluble form (e.g., Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ and Al³⁺), the system can tolerate up to 10 mg L⁻¹ of Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ and Fe²⁺, and 5 mg L⁻¹ of Mn²⁺. Fe³⁺ and Al³⁺ had low tolerance limit at 0.1 and 0.05 mg L⁻¹, respectively. For Fe³⁺, it

provides the negative interference at 0.1-1.0 mg L⁻¹, but it gives the positive interference at the higher concentration, i.e., ≥ 5 mg L⁻¹.

In order to reduce interference from cations, an ion exchange resin was used to remove cations from the solution before being injected into the system. Chelex 100 is a chelate resin which is widely used to bind metal ions. It is styrene divinylbenzene copolymers with iminodiacetate exchange groups. The resin can strongly bind metal ions at high pH and poorly bind to metal ions at low pH [21]. The resin column was prepared as described in section 2.1 and tested for removal of Fe³⁺. It was found that after passing through the Chelex 100 resin column the peak heights of phosphate solutions with and without Fe³⁺ were identical, indicating that Chelex 100 resin could eliminate Fe³⁺.

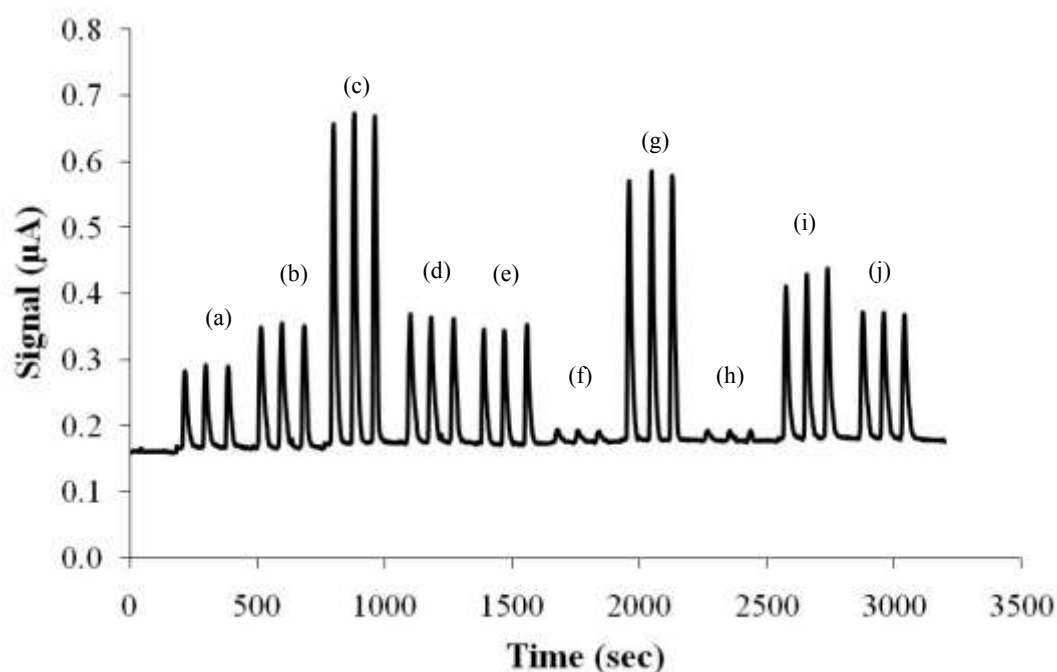


Figure 6. FI-Agram from the FI-amperometric system for the injection of various solutions: (a) 5 mg L⁻¹ Fe³⁺ + 0.5 mg L⁻¹ P-PO₄, (b) 5 mg L⁻¹ Fe³⁺ + 0.5 mg L⁻¹ P-PO₄ (passed resin column), (c) 10 mg L⁻¹ Fe³⁺ + 0.5 mg L⁻¹ P-PO₄, (d) 10 mg L⁻¹ Fe³⁺ + 0.5 mg L⁻¹ P-PO₄ (passed resin column), (e) 5 mg L⁻¹ Fe³⁺, (f) 5 mg L⁻¹ Fe³⁺ (passed resin column), (g) 10 mg L⁻¹ Fe³⁺, (h) 10 mg L⁻¹ Fe³⁺ (passed resin column), (i) 0.5 mg L⁻¹ P-PO₄ and (j) 0.5 mg L⁻¹ P-PO₄ (passed resin column).

3.4 Application of FI amperometric Method to Study Fractionation of Phosphorus in Sediment

3.4.1 Effect of extractants to the FI-amperometric method

Characterization of various phosphorus species in soil is normally performed by sequential extraction employing three different extractant solutions such as 1.0 M NH_4Cl , 0.1 M NaOH and 0.5 M HCl (Hietjes-Lijklema Scheme). The determinations of leached phosphorus in different extractants are usually done by using different conditions/systems [4,18,19]. In this work, the developed FI amperometric system was proposed to analyze all 3 extracted solutions. Effect of the extractants was examined before applying the proposed system to such analysis. Under the optimum conditions in Table 1, standard phosphate solutions ($0.1\text{--}10.0\text{ mg L}^{-1}$) in each medium (DI water, 1.0 M NH_4Cl , 0.1 M NaOH and 0.5 M HCl) were injected into the system. The FI Agrams obtained are shown in Figure 7. Comparison to standard solution prepared in DI water, 0.1 M NaOH did not affect on the phosphate determination, while 1.0 M NH_4Cl caused slightly reduction of sensitivity, and 0.5 M HCl caused dramatically reduction of sensitivity of the analysis. It might cause by the high molar ratio of $[\text{H}^+]$ to $[\text{MoO}_4^{2-}]$ (more than 80) resulted in slow and incomplete reaction to form phosphomolybdate complex [22]. Furthermore, it might be resulted from chloride ion which competed to phosphate ion to bind molybdate ion. Therefore, the standard solution of phosphate must be prepared in each extractant for use in analysis of each fraction.

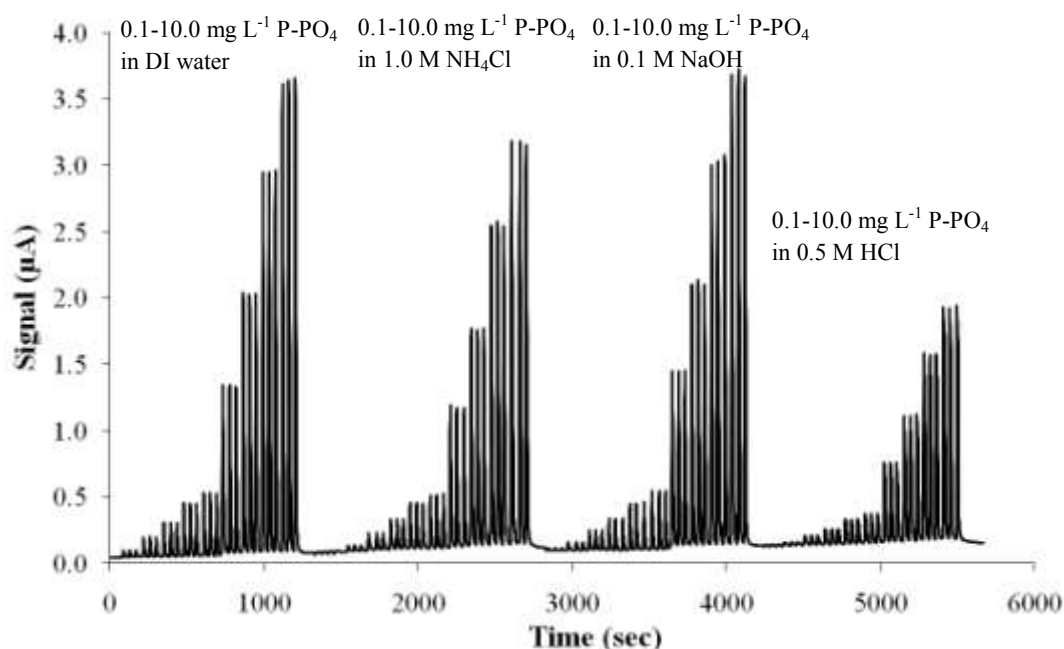


Figure 7. FI Agrams of standard phosphate solutions in the different mediums (DI water, 1.0 M NH_4Cl , 0.1 M NaOH and 0.5 M HCl).

3.4.2 Determination of phosphorus leached from sediment in various fractions

Firstly, percentage of solid and moisture in sediment samples were analyzed. It was found that the percentages of solid were between 45-73 and moistures were in the range of 28-55%. Content of phosphorus leached in each fraction was reported as mg kg⁻¹ dry weight.

The sediment samples were sequentially extracted by using off-line column leaching, and standard shaking-filtering methods as described in section 2.4. Several samples can be carried out in parallel. Sample solutions in each fraction were injected into the FI-amperometric system and phosphorus contents were calculated by using corresponded calibration graphs. Phosphorus contents in various fractions obtained from the off-line leaching column and the batch shaking method are presented in Table 2. The total phosphorus (Total-P) content is the summation of phosphorus contents in the fractions of NH₄Cl, NaOH, HCl and the residue. The values of total phosphorus ranged from 307 to 831 mg kg⁻¹ for the off-line leaching column and 315 to 856 mg kg⁻¹ for the shaking method. The first fraction (NH₄Cl-P) is exchangeable phosphorus which is the most mobile one, being extracted by NH₄Cl. It was found at negligible levels in only sample No. 5 (13 mg kg⁻¹ by off-line leaching column, and 11 mg kg⁻¹ by shaking method). Phosphorus contents in NaOH-P, HCl-P and Residue-P ranged from 26 to 128, 57 to 434 and 179 to 500 mg kg⁻¹, respectively, for the off-line leaching column, and 18 to 103, 47 to 409 and 106 to 465 mg kg⁻¹, respectively, for the shaking method. Results from both the extraction methods were in good agreement. Both the results were compared with paired *t*-test at 95% confidence level, indicated that there was no significant difference between both methods ($t_{\text{critical}} = \pm 2.571$, t_{stat} of total-P = -0.562, t_{stat} of NaOH-P = 1.678, t_{stat} of HCl-P = -0.752 and t_{stat} of residue-P = 0.280). In addition, the off-line column leaching method is faster, simpler and more convenient operation as summarized in Table 3.

Figure 8 illustrated fractions of phosphorus being extracted from sediment samples by both methods. It was found that the trends of phosphorus contents were Residue-P > HCl-P > NaOH-P > NH₄Cl for sites 2, 3 and 4, and HCl-P > Residue-P > NaOH-P > NH₄Cl-P for sites 1, 5 and 6. For all the sediment samples from both extraction methods, the rank order of inorganic phosphorus fractions was HCl-P > NaOH-P > NH₄Cl-P, indicating that phosphorus in the sediment is in stable forms which do not easily leach into water under natural condition.

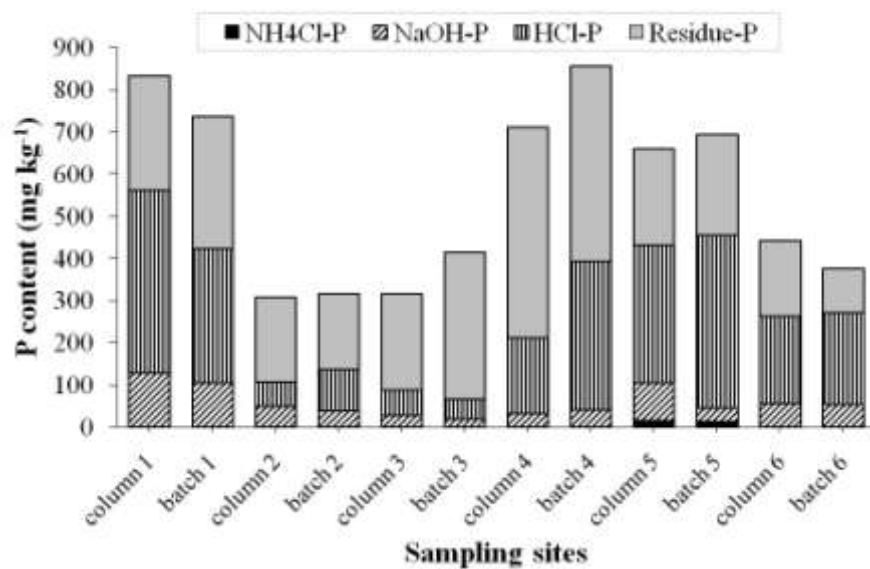
Table 2. Contents of phosphorus in sediment in different fractions leaching by off-line leaching column and the batch shaking method

Sample	Method	Phosphorus (mg kg ⁻¹) contents (mean \pm S.D.)				
		NH ₄ Cl-P	NaOH-P	HCl-P	Residue-P	Total-P
1	column	N.D.	128 \pm 20	434 \pm 202	269 \pm 188	831 \pm 199
	batch	N.D.	103 \pm 8	320 \pm 116	314 \pm 179	736 \pm 144
2	column	N.D.	49 \pm 13	57 \pm 7	201 \pm 65	307 \pm 67
	batch	N.D.	37 \pm 11	98 \pm 13	180 \pm 26	315 \pm 28
3	column	N.D.	26 \pm 5	60 \pm 11	227 \pm 23	314 \pm 17
	batch	N.D.	18 \pm 2	47 \pm 6	347 \pm 12	412 \pm 12
4	column	N.D.	32 \pm 4	178 \pm 60	500 \pm 53	709 \pm 97
	batch	N.D.	39 \pm 12	352 \pm 31	465 \pm 163	856 \pm 185
5	column	13 \pm 3	91 \pm 17	326 \pm 48	228 \pm 91	658 \pm 122
	batch	11 \pm 2	33 \pm 13	409 \pm 40	239 \pm 40	692 \pm 58
6	column	N.D.	54 \pm 9	208 \pm 25	179 \pm 28	441 \pm 37
	batch	N.D.	53 \pm 12	216 \pm 38	106 \pm 5	376 \pm 42

*N.D. = Not detected

Table 3. Comparison of the batch shaking/filtering and the off-line leaching column methods

Parameters	Shaking and filtering	Off-line leaching column
Weight of soil (g)	1	1
Volume of extractant (mL):		
- NH ₄ Cl fraction	50×2 times	50
- NaOH fraction	50	50
- HCl fraction	50	50
Operation time per sample (h)	45	6-14
Temperature	Room temperature	Room temperature
Instrument	Shaker, erlenmeyer flask, glass funnel, Whatman filter paper No. 1	Plastic syringe 10 mL, cotton wool, Whatman filter paper No. 1
Procedure	Shaking and filtering	Pouring the extractant solution into the column

**Figure 8.** Contents of phosphorus in different sediment samples, being extracted into various fractions by using the off-line leaching column and the batch shaking methods. (sediment samples were taken from different sampling sites as shown in Figure 2).

4. CONCLUSIONS

Flow injection amperometric method was developed for determination of phosphate. The method has high sensitivity and selectivity but yet simple and more convenient operation. It has many advantages over the commonly used spectrophotometric method, such as did not affect by high concentration of salts and colored substances, and can tolerate to high concentration of silicate. The developed method was successfully applied for analysis of various extracting solutions obtained from sequential extraction of sediment. The off-line column extraction was also proposed for sequential leaching of phosphorus from solid material, which gave the results in good agreement with those obtained by the standard shaking extraction procedure.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) for supporting scholarship to PI. The Thailand Research Fund (TRF), the Office of the Higher Education Commission (OHEC), and Faculty of Science, Chiang Mai University are gratefully acknowledged for financial support (grant number RMU5380052). The Center for Innovation in Chemistry: Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH-CIC) is acknowledged for partial support.

REFERENCES

- [1] Estela J.M., and Cerdà V., Flow Analysis Techniques for Phosphorus: An Overview, *Talanta*, 2005; **66**: 307-331.
- [2] Zhang J., Li M., Liu S., Liu Y., Zhang L., Cao Q., and Sun D., Seasonal Variations and Bioavailability of Inorganic Phosphorus in Soils of Yeyahu Wetland in Beijing, China, *Int. J. Sediment Res.*, 2011; **26**: 181-192.
- [3] Xiang S., and Zhou W., Phosphorus Forms and Distribution in the Sediments of Poyang Lake, China, *Int. J. Sediment Res.*, 2011; **26**: 230-238.
- [4] Udman Y., McKelvie I.D., Grace M.R., Jakmunee J., and Grudpan K., Evaluation of On-line Preconcentration and Flow-injection Amperometry for Phosphate Determination in Fresh and Marine Waters, *Talanta*, 2005; **66**: 461-466.
- [5] Kaiserli A., Voutsas D., and Samara C., Phosphorus Fractionation in Lake Sediments - Lakes Volvi and Koronia, N. Greece, *Chemosphere*, 2002; **46**: 1147-1155.
- [6] Aydin I., Aydin F., Saydut A., and Hamamci C., A Sequential Extraction to Determine the Distribution of Phosphorus in the Seawater and Marine Surface Sediment, *J. Hazard. Mater.*, 2009; **168**: 664-669.
- [7] Jalali M., and Matin N.H., Soil Phosphorus Forms and Their Variations in Selected Paddy Soils of Iran, *Environ. Monit. Assess.*, 2013; **185**: 8557-8565.
- [8] Ruban V., López-Sánchez J. F., Pardo P., Rauret G., Muntauc H., and Quevauviller Ph., Selection and Evaluation of Sequential Extraction Procedures for the Determination of Phosphorus Forms in Lake Sediment, *J. Environ. Monit.*, 1999; **1**: 51-56.

- [9] Tiyapongpatana W., Pongsakul P., Shiowatana J., and Nacapricha D., Sequential extraction of phosphorus in soil and sediment using a continuous-flow system, *Talanta*, 2004; **62**: 765-771.
- [10] Wang C., Zhang Y., Li H., and Morrison R.J., Sequential Extraction Procedures for the Determination of Phosphorus Forms in Sediment, *Limnology*, 2013; **14**: 147-157.
- [11] Hieltjes A.M.H., and Lijklema L., Fractionation of Inorganic Phosphates in Calcareous Sediments, *J. Environ. Qual.*, 1980; **9**: 405-407
- [12] Ding-Sie T., and Appan A., General Characteristics and Fractions of Phosphorus in Aquatic Sediments of Two Tropical Reservoirs, *Water Sci. Tech.*, 1996; **34**: 53-59.
- [13] V. Istvánovics, Fractional Composition, Adsorption and Release of Sediment Phosphorus in the Kis-Balaton Reservoir, *Water Res.*, 1994; **28**: 717-726.
- [14] Søndergaard M., Windolf J., and Jeppesen E., Phosphorus Fractions and Profiles in the Sediment of Shallow Danish Lakes as Related to Phosphorus Load, Sediment Composition and Lake Chemistry, *Water Res.*, 1996; **30**: 992-1002.
- [15] Rydin E., Experimental Studies Simulating Potential Phosphorus Release from Municipal Sewage Sludge Deposits, *Water Res.*, 1996; **30**: 1695-1701.
- [16] Perkins R.G., and Underwood G.J.C., The Potential for Phosphorus Release Across the Sediment-Water Interface in an Eutrophic Reservoir Dosed with Ferric Sulphate, *Water Res.*, 2001; **35**: 1399-1406.
- [17] Carlyle G.C., and Hill A.R., Groundwater Phosphate Dynamics in a River Riparian Zone: Effects of Hydrologic Flowpaths, Lithology and Redox Chemistry, *J. Hydrol.*, 2001; **247**: 151-168.
- [18] Buanuam J., Miró M., Hansen E.H., and Shiowatana J., On-line Dynamic Fractionation and Automatic Determination of Inorganic Phosphorus in Environmental Solid Substrates Exploiting Sequential Injection Microcolumn Extraction and Flow Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, 2006; **570**: 224-231.
- [19] Buanuam J., Miró M., Hansen E.H., Shiowatana J., Estela J.M., and Cerdà V., A Multisyringe Flow-through Sequential Extraction System for On-line Monitoring of Orthophosphate in Soils and Sediments, *Talanta*, 2007; **71**: 1710-1719.
- [20] Jakmunee J., and Junsomboon J., Determination of Available Phosphorus in Soils by Using a New Extraction Procedure and a Flow Injection Amperometric System, *Talanta*, 2009; **79**: 1076-1080.
- [21] *Chelex 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual*, BIO-RAD, 2000.
- [22] Worsfold P.J., Gimbert L.J., Mankasingh U., Omaka O.N., Hanrahan G., Gardolinski P.C.F.C., Haygarth P.M., Turner B.L., Keith-Roach M.J., and McKelvie I.D., Sampling, Sample Treatment and Quality Assurance Issues for the Determination of Phosphorus Species in Natural Waters and Soils, *Talanta*, 2005; **66**: 273-293.

ภาคผนวก ง

ตัวอย่างเอกสารการฝึกอบรมและประยุกต์งานวิจัยในการวิเคราะห์ดินสำหรับเกษตรกร

เอกสารประกอบการฝึกอบรม
โครงการการถ่ายทอดเทคโนโลยี
เรื่อง เทคโนโลยีใหม่ในการหาปริมาณธาตุอาหารพืช
เพื่อการจัดการดินและปุ๋ยอย่างเหมาะสม

วันศุกร์ที่ 20 พฤษภาคม 2554

ณ ศูนย์ความเป็นเลิศนวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการวิเคราะห์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาคารคณะวิทยาศาสตร์ 40 ปี ห้องประชุมสัมมนา ชั้น 2
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



โดย คณะวิทยาศาสตร์ (ศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์พหุวิทยาการ) ร่วมกับ
ศูนย์ความเป็นเลิศนวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการวิเคราะห์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



โครงการการถ่ายทอดเทคโนโลยี
เรื่อง เทคโนโลยีใหม่ในการหาปริมาณธาตุอาหารพืชเพื่อการจัดการดินและปุ๋ยอย่างเหมาะสม

วันศุกร์ที่ 20 พฤษภาคม 2554 เวลา 8.30 – 16.30 น.

ณ ศูนย์ความเป็นเลิศนวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการวิเคราะห์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อาคารคณะวิทยาศาสตร์ 40 ปี ห้องประชุมสัมมนา ชั้น 2 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาคเช้า

เวลา	กิจกรรม
8.30 – 9.00 น.	ลงทะเบียนผู้เข้าร่วมประชุมเชิงปฏิบัติการ
9.00 – 9.15 น.	พิธีเปิดการอบรมเชิงปฏิบัติการ โดย ศ.ดร. เกตุ กรุดพันธ์ หัวหน้าศูนย์ความเป็นเลิศนวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการวิเคราะห์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และหัวหน้าศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์พหุวิทยาการ คณะวิทยาศาสตร์
9.15 – 9.45 น.	การบรรยาย: เรื่อง เทคโนโลยีใหม่ในการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารพืช โดย: รศ.ดร. จรูญ จักรมณี
9.45 – 10.15 น.	พักรับประทานอาหารว่างและเครื่องดื่ม
10.15 – 10.45 น.	การบรรยาย: เรื่อง ปุ๋ยอินทรีย์น้ำ/น้ำหมักชีวภาพ กระบวนการผลิตแบบง่ายและการเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช โดย: นาย ชินกฤต สุวรรณศิริ
10.45 – 11.15 น.	การบรรยาย: เรื่อง การเก็บตัวอย่างดินและพืชเพื่อการวิเคราะห์ธาตุอาหาร โดย: ดร. สิทธิชัย ลอดแก้ว
11.15 – 11.45 น.	การบรรยาย: เรื่อง ระบบโฟลอินเจกชันสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสและไนโตรเจน โดย: รศ.ดร. จรูญ จักรมณี
11.45 – 12.00 น.	ตอบข้อซักถาม
12.00 – 13.30 น.	พักรับประทานอาหารกลางวัน

ภาคบ่าย

เวลา	กิจกรรม
13.30 – 15.30 น.	ทำปฏิบัติการและชมการสาธิต (4 ปฏิบัติการ) โดย อ.ดร. กฤษณะ จิตมณี, ดร. จรูญ จันทรมบูรณ์, นางสาวพิมพ์พร อินเสน และนางสาวปัทมา ยานู
15.30 – 15.45 น.	พักรับประทานอาหารว่างและเครื่องดื่ม
15.45 – 16.15 น.	-การสรุปผลการปฏิบัติการ -ตอบข้อซักถามและแนวทางในการนำความรู้/เทคโนโลยีที่ฝึกอบรมไปใช้ โดย: รศ.ดร. จรูญ จักรมณี
16.15 – 16.30 น.	แจกประกาศนียบัตรแก่ผู้เข้าประชุมและกล่าวปิดการประชุม

หมายเลขอ้างอิง AIE-08-05

วันที่รายงาน 28 สิงหาคม 2556

รายงานผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง
(Sample Analysis Report)

1. ข้อมูลตัวอย่าง

ชื่อผู้ส่งตัวอย่าง นายวินัย สายไฮคำ
นามผู้ขอใช้บริการ -
สถานที่ติดต่อ 154 หมู่ที่ 6 ต.ป่าป้อง อ.ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ 50220
โทรศัพท์ 081-9503417
E-mail -

2. ข้อมูลตัวอย่าง

รายละเอียดตัวอย่างดิน
จำนวนตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์

เลขที่ (Lab NO)	ตัวอย่าง (Sample Designation)	พีเอช (pH)	อินทรีย์วัตถุ (OM) g/100 g	ไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) g/100 g	ฟอสฟอรัส (P) mg/kg	โพแทสเซียม (K) mg/kg
S-12	แปลงที่ 1	6.23	2.3	10.0	24.4	14.7
S-13	แปลงที่ 2	4.73	2.3	20.0	20.9	22.4
S-14	แปลงที่ 3	4.76	2.5	30.0	38.2	32.0

รับรองผลการวิเคราะห์ถูกต้อง

(รองศาสตราจารย์ ดร. จริญญา จักร์มณี)

หัวหน้าห้องปฏิบัติการฯ