

การหาปริมาณฟอสฟอรัสที่พืชใช้ประโยชน์ได้ในดิน โดยใช้ระบบไฮโดรไดนามิกซีควเอนเชียลอินเจคชันแบบประหยัด

The Determination of Available Phosphorus in Soils Using an Economic Hydrodynamic Sequential Injection System

ชนิสรา ปัญญายิ่ง, มิกิ กันณะ และสรวุตติ สมนาม*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

ถนนช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50300

Chanisara Panyaying, Miki Kanna and Sarawut Somnam*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University,

Changpuek Road, Muang, Chiang Mai 50300

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาชุดไฮโดรไดนามิกซีควเอนเชียลอินเจคชัน (HSI) แบบประหยัดซึ่งสามารถพกพาได้ ใช้
งานง่าย ขนาดกะทัดรัด และสามารถประยุกต์ได้กับหลากหลายปฏิกิริยาด้วยหลักการฉีดแบบไฮโดรไดนามิก
สารละลายต่าง ๆ จะถูกนำเข้าสู่ท่อที่มีความยาวแน่นอนด้วยแรงดันแบบไฮโดรไดนามิกในขณะที่กระแสน้ำของตัวพา
หยุดไหล ท่อที่มีปริมาตรคงที่ สำหรับการฉีดแบบไฮโดรไดนามิกถูกทำขึ้นโดยการเจาะแผ่นอะคริลิกให้ได้ความยาว
และเส้นผ่านศูนย์กลางที่ต้องการ และวาล์วทั้งหมดถูกยึดติดกับแผ่นอะคริลิกเพื่อเป็นชุดที่สามารถพกพาได้สำหรับ
ต่อเข้ากับโพลาไรเซชันของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ระบบไฮโดรไดนามิกซีควเอนเชียลอินเจคชันที่
นำเสนอนี้ถูกใช้ในการหาปริมาณฟอสฟอรัสที่พืชใช้ประโยชน์ได้ในดินโดยใช้ปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู ซึ่งตรวจวัด
ทางสเปคโตรโฟโตเมตริกที่ 630 นาโนเมตร สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ได้ถูกศึกษา ได้กราฟมาตรฐานที่
เป็นเส้นตรงในช่วง 0.050-20 มก./ลิตร โดยมีขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.025 มก./ลิตร จากการฉีด
สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 2.0 มก./ลิตร ซ้ำ 11 ครั้ง พบว่าได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 3.4 % จาก
การวิเคราะห์ดินโดยเปรียบเทียบผลกับวิธีมาตรฐาน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้การทดสอบ
ความแตกต่างของค่ากลางของสองประชากรที่ไม่อิสระต่อกัน (paired t-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ค่าร้อยละ
การกลับคืนถูกพบในช่วง 83.5-102.5 %

คำสำคัญ : ไฮโดรไดนามิกซีควเอนเชียลอินเจคชัน; ฟอสฟอรัสที่พืชใช้ประโยชน์ได้; ดิน

Abstract

In this research, a cost-effective hydrodynamic sequential injection (HSI) setup which is
portable, easy to use, compact and applicable to the various reactions was developed. Based on

hydrodynamic injection principle, various solutions could be inserted into the well-defined length of conduit with hydrodynamic pressure while the stream of carrier was halted. A fixed-volume conduit (FVC) for hydrodynamic injection was built by drilling an acrylic block for the desired length and diameter. FVC and all valves were embedded onto the acrylic plate to obtain a portable setup which was easily connected to a flow through cell of a UV-VIS spectrophotometer. The proposed HSI system was applied to the determination of available phosphorus in soils based on molybdenum blue which spectrophotometrically detected at 630 nm. The optimum conditions for the analysis were studied. A linear calibration graph in the range of 0.050-20 mg L⁻¹ was obtained, with LOD of 0.025 mg L⁻¹. From the 11 repeated injection of phosphate standard solution of 2.0 mg L⁻¹, % RSD was found to be 3.4 %. From the analysis of soils, comparing the results to the standard method, there were not significantly difference by the paired t-test at 95 % confidence level. Percent recovery was found in the range of 83.5-102.5 %

Keywords: hydrodynamic sequential injection; available phosphorus; soil

1. บทนำ

ฟอสฟอรัสจัดเป็นธาตุอาหารหลักของพืชที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตโดยช่วยให้การสังเคราะห์แสง การหายใจ และการแบ่งเซลล์เป็นไปอย่างปกติ ช่วยเร่งการออกดอก ติดผล และยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์ของพืช [1,2] ฟอสฟอรัสในดินมักอยู่ในรูปออร์โทฟอสเฟต (orthophosphate; HPO_4^{2-} และ H_2PO_4^-) ซึ่งอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (available phosphorus) [3] แม้ว่าจะพบสารประกอบของฟอสฟอรัสในดินจำนวนมาก แต่พืชอาจแสดงอาการจากการขาดฟอสฟอรัสได้ เช่น ลำต้นแคระแกร็น เกิดสีม่วงตามข้อใบ ไม่ติดดอกออกผล [2] ซึ่งอาจมีสาเหตุจากสารประกอบของฟอสฟอรัสเหล่านี้เกิดจากการตกตะกอนฟอสฟอรัสกับแคทไอออนต่าง ๆ ในดิน ได้สารประกอบใหม่ที่ละลายน้ำได้ยาก อย่างไรก็ตาม หากมีปริมาณฟอสฟอรัสในดินมากเกินไปก็อาจส่งผลกระทบต่อการดูดซับธาตุอาหารสำรองของพืช เช่น ทองแดง สังกะสี และเหล็ก [4,5] นอกจากนี้หากเกิด

การชะล้างของหน้าดินฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำได้ (water-soluble phosphorus) ซึมจากดินลงสู่แหล่งน้ำ ฟอสฟอรัสจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชน้ำ และแพลงก์ตอนพืชอย่างรวดเร็ว และทำให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน (eutrophication) ซึ่งเป็นปัญหามลพิษทางน้ำ [6,7] ดังนั้นการตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัสในดิน จึงมีความสำคัญต่อการประเมินการเจริญเติบโตของพืชและคุณภาพสิ่งแวดล้อมได้

การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่จัดเป็นวิธีมาตรฐาน (standard method) คือ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟตกับโมลิบเดต (molybdate) ในสารละลายกรด เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองของโมลิบโดฟอสเฟต (molybdophosphate, Mo(VI)) จากนั้นรีดิวซ์สารประกอบดังกล่าวด้วยตัวรีดิวซ์ เช่น กรดแอสคอร์บิก หรือ ทิน(II)คลอไรด์ จะได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงิน (Mo(V)) ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่าวิธีโมลิบดีนัมบลู (molybdenum blue method) [8,9]

เนื่องจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดได้ค่อนข้างช้า

ดังนั้นการวัดด้วยวิธีทางสเปกโทรโฟโตเมทรีแบบแบทช์ จึงต้องรอให้ปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลเสียก่อน อย่างไรก็ตาม ได้มีรายงานวิจัยหลายเรื่องที่กล่าวถึงการพัฒนาระบบการวิเคราะห์แบบฉีดไหล (flow injection analysis, FIA) สำหรับการหาปริมาณฟอสฟอรัส รวมถึงเทคนิคที่เกี่ยวข้อง เช่น ซีควนเชียลอินเจกชันอนาลิซิส (sequential injection analysis, SIA) [9-14] แต่ถึงกระนั้นแม้ว่าเทคนิค FIA จะสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องรอปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลและใช้อุปกรณ์แบบง่าย แต่พบว่ายังคงมีการไหลทิ้งของสารเคมีในขั้นตอนการฉีดสารตัวอย่าง และต้องใช้อุปกรณ์สำหรับฉีดสาร ตัวอย่าง เช่น วาล์วฉีดสาร (injection valve) ส่วนเทคนิค SIA ซึ่งใช้สารเคมีน้อยกว่า แต่เครื่องมือที่ใช้กลับมีราคาสูงกว่ามาก นอกจากนี้ แม้ว่าจะมีการนำเทคนิคการฉีดแบบหยุดไหล (stopped-flow injection technique) มาใช้ร่วมกับระบบ FIA ในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส เพื่อเพิ่มสภาพไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ [1,15] แต่ก็เป็นการเพิ่มเวลาในการวิเคราะห์ด้วยเช่นกัน

งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคการวิเคราะห์แบบไฮโดรไดนามิกซีควนเชียลอินเจกชัน (hydrodynamic sequential injection, HSI) มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างดินซึ่งเทคนิคดังกล่าวถูกพัฒนาจากการนำหลักการฉีดแบบไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic injection) ซึ่งสารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าสู่ท่อที่ทราบความยาวและปริมาตรภายในที่แน่นอนของระบบด้วยแรงดันไฮโดรไดนามิกโดยปราศจากอุปกรณ์ฉีดสารก่อนถูกชะด้วยกระแสตัวพา (carrier) ดังรูปที่ 1ก และ 1ข มาประยุกต์เข้ากับเทคนิค SIA โดยเป็นการฉีดสารตัวอย่างและรีเอเจนต์แบบเป็นลำดับด้วยแรงดันไฮโดรไดนามิกดังรูปที่ 1ค ด้วยเทคนิคดังกล่าวจะสามารถลดการใช้สารเคมีได้มากกว่าระบบ FIA เนื่องจากขณะฉีดสารตัวอย่างและ

รีเอเจนต์ กระแสตัวพาจะหยุดไหลหรืออาจถูกควบคุมให้ไหลวนกลับไปยังขวดเก็บสารตัวพา และใช้อุปกรณ์ที่ราคาประหยัดกว่าระบบ SIA ได้อีกด้วย เนื่องจากไม่ต้องใช้อุปกรณ์ฉีดสารที่ยุ่งยากและราคาแพง [16,17] อย่างไรก็ตาม ระบบ HSI ที่ได้พัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้ [16-19] มักเกิดปัญหาการรั่วซึมหรือหลุดออกของข้อต่อบริเวณจุดที่สารไหลมาบรรจบกัน (confluent point) เนื่องจากการฉีดสารด้วยแรงดัน ในงานนี้จึงได้ออกแบบระบบโดยการเจาะแผ่นอะคริลิกแทนการใช้ท่อเพื่อเพิ่มความทนทานมากขึ้น สามารถพกพาได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อยและยังสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลากหลายโดยไม่ต้องปรับเปลี่ยนระบบอีกด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี

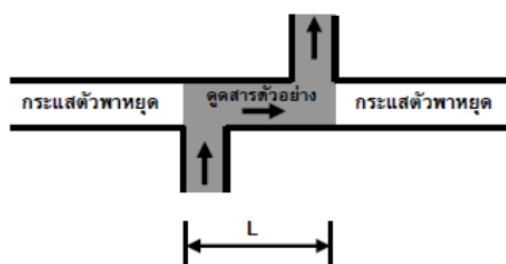
ใช้น้ำปราศจากไอออน (Millipore, Milli Q&Elix 10) ในการเตรียมสารละลายตลอดการทดลอง สารเคมีที่ใช้เป็นสารเคมีเกรดงานวิเคราะห์ (AR grade)

ใช้สารละลาย 0.0015 M แอมโมเนียม-โมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99 %, LOBA Chemie, India) เป็นรีเอเจนต์ โดยชั่งมา 0.187 g ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยกรดไนตริก (HNO_3 , RCI Labscan, Australia) เข้มข้น 0.05 M ใช้กรดแอสคอร์บิก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, 99.0 %, Ajax Finechem, Australia) เข้มข้น 0.5 % w/v เป็นตัวรีดิวซ์ โดยการชั่งมา 0.505 g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตร 100 mL สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ เตรียมจากการชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4 , 99.5 %, Rankem, India) หนัก 0.1434 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 100 mL

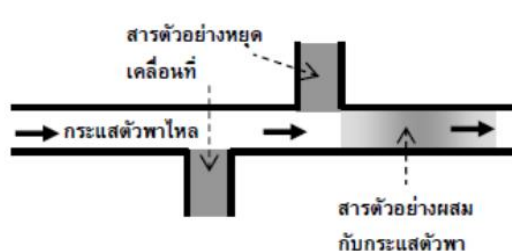
เนื่องจาก Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} และ SiO_3^{2-} สามารถรบกวนการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสได้ ในการ

ทดลองนี้จึงได้ใช้สารกำบัง (masking agent) คือ สารละลาย EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, 99.0 %, Ajax Finechem, Australia) เข้มข้น 0.040 M ในการป้องกันไอออน Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} และสารละลาย

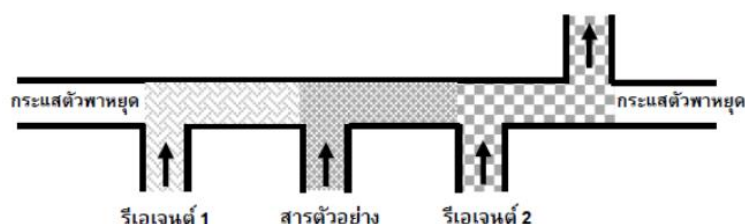
โซเดียมฟลูออไรด์ (NaF, 98.0 %, Ajax Finechem, Australia) เข้มข้น 0.085 M ในการป้องกันไอออน SiO_3^{2-} ตามลำดับ



(ก) จุดสารตัวอย่างเข้าสู่ท่อของระบบ



(ข) ผลักสารตัวอย่างด้วยกระแสตัวพา



(ค) การฉีดแบบไฮโดรไดนามิกซีควเอนเชียลอินเจกชัน

รูปที่ 1 หลักการฉีดสารแบบไฮโดรไดนามิก (ก) สารตัวอย่างถูกฉีดผ่านเข้าสู่ท่อที่ทราบความยาว (L) และปริมาตรภายในที่แน่นอนขณะที่กระแสตัวพาหยุดไหล (ข) สารตัวอย่างถูกผลักด้วยกระแสของตัวพาในขณะที่สารตัวอย่างที่ตำแหน่ง A จะหยุดนิ่ง และ (ค) ไฮโดรไดนามิกซีควเอนเชียลอินเจกชัน (HSI) โดยเป็นการนำสารตัวอย่างและรีเอเจนต์เข้าสู่ระบบเป็นลำดับส่วนด้วยแรงดันไฮโดรไดนามิก [17]

2.2 วัสดุและเครื่องมือ

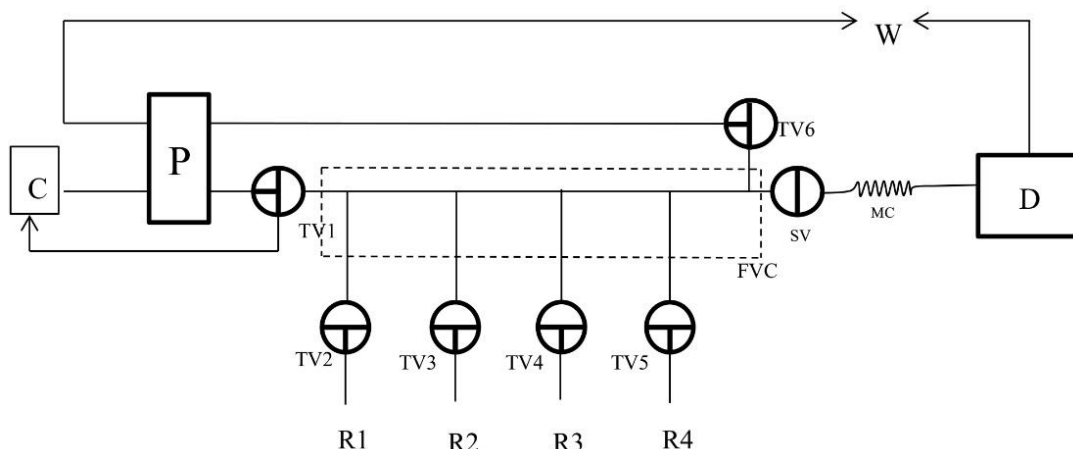
2.2.1 อุปกรณ์และระบบ HSI

ระบบ HSI ที่ถูกพัฒนาขึ้นแสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยปั๊มเพอร์ริสตาลติก (peristaltic pump, Ismatec, USA) ทำหน้าที่ดูดผลักสารละลายเข้าสู่ระบบด้วยอัตราการไหลคงที่ที่ $mL \min^{-1}$ โดยใช้ท่อ PTFE (i.d.0.03") สำหรับให้สารละลายไหลภายในระบบยกเว้นท่อที่ใช้กับปั๊มเพอร์ริสตาลติกเป็นท่อไทกอน (Tygon® tube) และใช้วาล์วสามทาง (low pressure-3-port switching valve, Upchurch

scientific, USA) สำหรับควบคุมทิศทางการไหลของสารละลาย

2.2.2 วิธีการปฏิบัติงานของระบบ HSI

ระบบที่พัฒนาขึ้นดังรูปที่ 2 ขั้นตอนการปฏิบัติงานได้ถูกสรุปไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งอธิบายได้ดังนี้ ปั๊มเพอร์ริสตาลติกจะผลักสารตัวพา (สารละลายผสมของแอมโมเนียมโมลิบเดตกับกรดไนตริก) เข้าสู่ระบบโดยผ่านวาล์ว TV1 และ SV ในขณะที่วาล์ว TV2-TV6 จะถูกปิดไว้ เมื่อต้องการดูดสารละลายรีเอเจนต์และตัวอย่างเข้าสู่ระบบจะปิดวาล์ว TV1 (ซึ่งทำให้ตัวพา



รูปที่ 2 ระบบไฮโดรไดนามิกซีควเอนเชียลอินเจกชัน : TV1-TV6 = วาล์วสามทาง, SV = วาล์วเปิด-ปิด, R1-R4 = ช่องฉีดสาร, P = ปั๊มเพอร์ริสตาลติก, MC = ขดท่อ, FVC = fixed-volume conduit, D = เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์, C = สารตัวพา, W = สารละลายเหลือทิ้ง

ตารางที่ 1 ขั้นตอนการปฏิบัติงานของระบบ HSI

ขั้นที่	การทำงานของอุปกรณ์							คำอธิบาย
	TV1	TV2	TV3	TV4	TV5	TV6	SV	
1	+	-	-	-	-	-	+	กระแสตัวพาไหลเข้าสู่ระบบ HSI
2	-	-	-	+	-	+	-	สารตัวอย่างฟอสฟอรัสถูกดูดเข้าสู่ระบบด้วยปั๊มเพอร์ริสตาลติก
3	-	-	-	-	+	+	-	กรดแอสคอร์บิกถูกดูดเข้าสู่ระบบด้วยปั๊มเพอร์ริสตาลติก
4	+	-	-	-	-	-	+	กระแสตัวพาไหลชะสารตัวอย่างและกรดแอสคอร์บิกให้เกิดการผสมและเกิดปฏิกิริยา

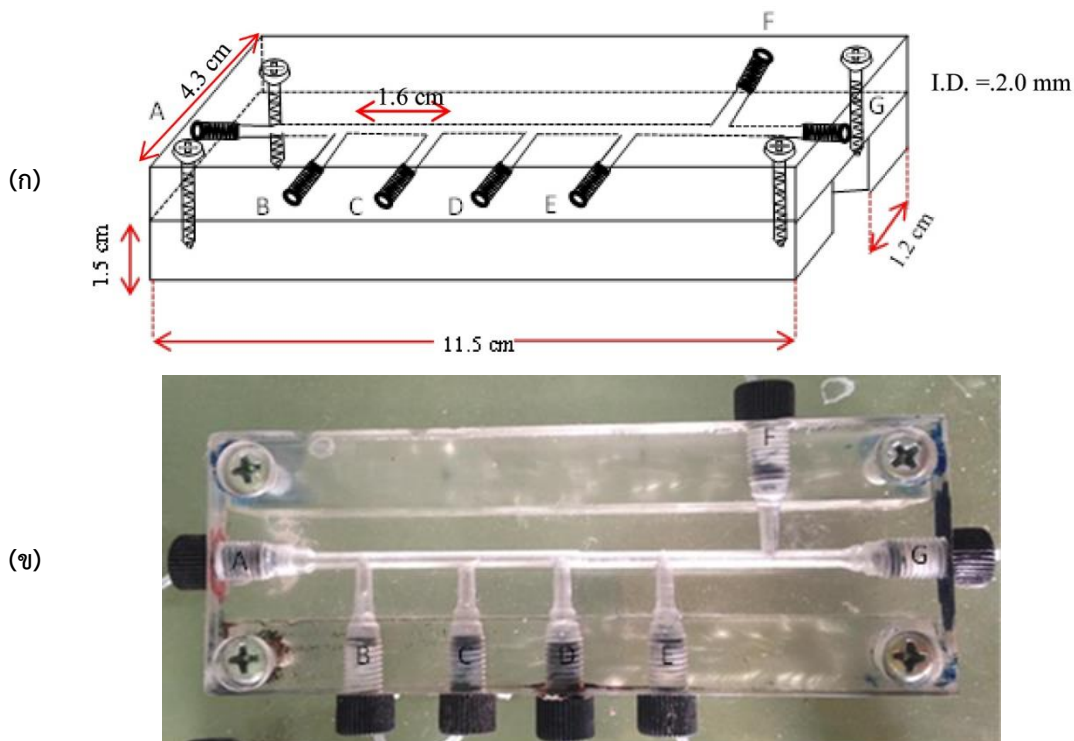
ไหลวน เป็นการประหยัลดสารเคมี) และ SV จากนั้นจึงเปิดวาล์ว TV6 และ TV4 ตามลำดับเพื่อดูดสารตัวอย่างฟอสฟอรัสเข้าสู่ระบบ โดยสังเกตจนสารไหลไปถึงวาล์ว TV6 จึงปิดวาล์ว TV4 และเปิด TV5 เพื่อดูดกรดแอสคอร์บิกเข้าสู่ระบบ โดยดูดจนกระทั่งสารไหลไปถึงวาล์ว TV6 เช่นกัน จึงปิดวาล์ว TV5, TV6 และเปิดวาล์ว SV, TV1 ตามลำดับ สารตัวพาซึ่งเป็นรีเอ-เจนต์จะไหลชะกรดแอสคอร์บิกและตัวอย่างเข้าสู่ระบบโดยผสมกันในขดท่อเพื่อเกิดปฏิกิริยาและตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ต่อไป (ใน

งานวิจัยนี้ไม่ได้ใช้ TV2 และ TV3 แต่ถูกเจาะสำรองไว้กรณีใช้กับปฏิกิริยาที่มีรีเอเจนต์หลายชนิด)

สำหรับส่วนที่เกิดการฉีดแบบไฮโดรไดนามิกตามรูปที่ 3ก และ 3ข คือ fixed-volume conduit (FVC) ซึ่งทำจากแผ่นอะคริลิกแบบใสซึ่งทนต่อสารเคมี โดยออกแบบให้เจาะท่อกลางภายในแผ่นให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ดังรูปที่ 3ก และ 3ข ซึ่งลักษณะการเจาะจะได้ท่อหลักที่มีความยาว 11.5 cm (ระยะจากตำแหน่ง A ถึง G) และท่อรอง (ตำแหน่ง B, C, D, E และ F ตามลำดับ) โดยท่อรองที่ตำแหน่ง B ถึง

E จะใช้สำหรับนำรีเอเจนต์ และสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ และไหลออกที่ตำแหน่ง F นั่นคือ สารรีเอเจนต์และสารตัวอย่างจะถูกซิงอยู่ในท่อหลักแบบเป็นลำดับส่วน โดยระยะของตำแหน่ง B, C, D, E ในท่อหลักจะห่างกัน

1.60 cm ซึ่งแต่ละช่วงจะมีปริมาตรภายใน 50 μL จากระบบ HSI นี้จะเห็นได้ว่าสามารถรองรับปฏิกิริยาที่ต้องใช้รีเอเจนต์ได้สูงสุด 4 ชนิด



รูปที่ 3 ชุด fixed-volume conduit (FVC) (ก) ภาพด้านข้าง และ (ข) ภาพอุปกรณ์จริง

วาล์วสามทางทุกตัวและชุด FVC จะถูกยึดติดอยู่กับฐาน (ใช้แผ่นอะคริลิก ซึ่งมีขนาด $20.5 \times 33.0 \times 1.2$ cm) เพื่อให้เป็นชุดที่มีขนาดกะทัดรัดและสะดวกต่อการใช้งานโดยสามารถนำไปต่อเข้ากับเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้ง่าย และสามารถเก็บได้สะดวกเมื่อใช้งานเสร็จ โดยสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาหลังจากการผสมกันในขดท่อ (mixing coil, MC) จะถูกตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer, UV-Carry 60, Agilent, UK) โดยใช้โฟลทรูเซลล์ (flow-through cell, Agilent, UK) ซึ่งมี

ปริมาตรภายใน 715 μL

2.2.3 วิธีการทดลอง

ระบบ HSI ที่ได้พัฒนาขึ้นในเบื้องต้นได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบเพื่อทำให้ระบบดังกล่าวมีสมรรถนะสูงเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส โดยได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเคมีที่มีต่อปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู ได้แก่ แอมโมเนียมโมลิบเดต กรดไนตริก และกรดแอสคอบิก จากนั้นจึงศึกษาความยาวของท่อ (mixing coil) โดยศึกษาผลของแต่ละสภาวะที่ละชนิด และกำหนดสภาวะอื่น ๆ ให้คงที่ (univariate variable) สำหรับ

วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม จะเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตในช่วงความเข้มข้น $1.0-20.0 \text{ mg L}^{-1}$ เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยระบบ HSI โดยนำสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากแต่ละค่าของสภาวะที่ศึกษามาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อสังเกตกราฟมาตรฐานที่มีความชันสูงสุด เนื่องจากความชันของกราฟมาตรฐานสามารถแสดงถึงสภาพไว (sensitivity) หลังการตอบสนองของสัญญาณของระบบที่สภาวะนั้น ๆ นอกจากนี้ยังได้พิจารณาค่าจุดตัดแกน Y ประกอบการตัดสินใจเลือกสภาวะต่าง ๆ อีกด้วย

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว นำไปศึกษาผลของไอออนที่มีต่อการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส รวมถึงสารกำบังที่เหมาะสมในการป้องกันการรบกวนของไอออนบางชนิดด้วย นอกจากนี้ยังได้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบ HSI ที่ได้พัฒนาขึ้น ซึ่งประกอบด้วย ช่วงความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) ความเที่ยงและความถี่ในการวิเคราะห์ รวมถึงปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไปก่อนหน้านี้ และได้นำระบบ HIS ไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างดินโดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับวิธีแบบแบบซ์ต่อไป

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ

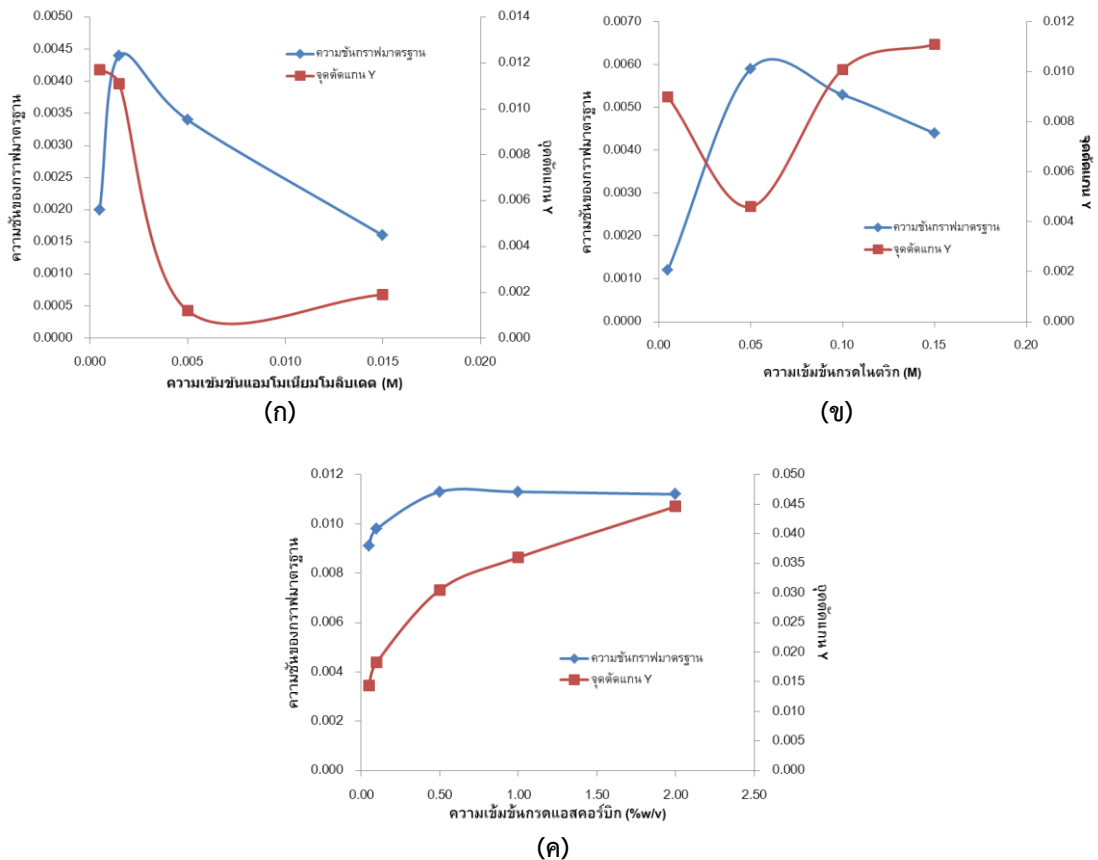
3.1.1 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่มีต่อปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู

เบื้องต้นได้เริ่มศึกษาผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมโมลิบเดต โดยกำหนดความเข้มข้นที่จะศึกษา คือ 0.5, 1.5, 5.0 และ 15 mM ตามลำดับ และกำหนดสภาวะอื่น ๆ ไว้คงที่ที่แต่ละค่าของความเข้มข้นที่ศึกษา ใช้สารมาตรฐานฟอสฟอรัสในช่วงความเข้มข้น $1.0-20.0 \text{ mg L}^{-1}$ เพื่อสร้างกราฟ

มาตรฐานซึ่งพล็อตระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) แต่ละค่าของความเข้มข้นของแอมโมเนียมโมลิบเดตดังที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อสังเกตว่าที่ความเข้มข้นใดให้ค่าความชันของกราฟมาตรฐานสูงสุด (พิจารณาจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน, $Y = mX + c$) โดยในการทดลองนี้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 1.5 mM เนื่องจากให้ค่าความชันของกราฟมาตรฐานสูงสุดดังรูปที่ 4ก แม้ว่าจุดตัดแกน Y จะมีค่าค่อนข้างสูง แต่ไม่แตกต่างจากความเข้มข้นอื่นมากนัก อีกทั้งยังมีความเข้มข้นต่ำกว่า 5.0 และ 15 mM จึงเป็นการประหยัดสารเคมี และล้างออกจากโพลทูเซลล์ได้ง่ายอีกด้วย

จากนั้นได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดไนตริก เนื่องจากปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลูต้องเกิดในสภาวะที่เป็นกรด โดยเตรียมกรดไนตริกเข้มข้น 0.0050, 0.050, 0.10 และ 0.15 M และศึกษาทำนองเดียวกับกรณีความเข้มข้นแอมโมเนียมโมลิบเดต โดยผลการศึกษาดังรูปที่ 4ข พบว่าความเข้มข้น 0.050 M ให้ค่าความชันของกราฟมาตรฐานสูงสุด และค่าจุดตัดแกน Y ต่ำที่สุด จึงเลือกที่ความเข้มข้นดังกล่าวใช้ในการทดลองต่อไป

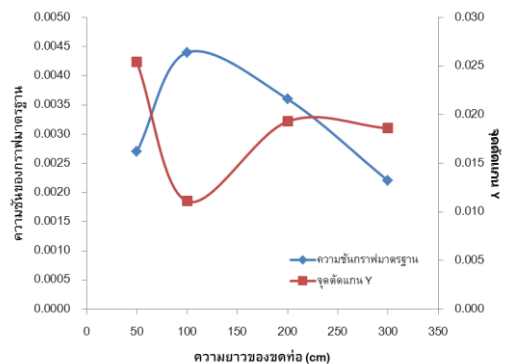
การทดลองนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นตัวรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งมีสีเหลืองของแอมโมเนียมโมลิบโดฟอสเฟต (ammonium molybdophosphate) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินของโมลิบดีนัมบลู โดยเตรียมกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 % w/v จากผลการทดลองดังรูปที่ 4ค พบว่าค่าความชันของกราฟมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ที่ความเข้มข้น 0.5 % w/v ให้ค่าจุดตัดแกน Y น้อยกว่า จึงเลือกที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม



รูปที่ 4 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมี (ก) แอมโมเนียมโมลิบเดต (ข) กรดไนตริก และ (ค) กรดแอสคอร์บิกที่มีต่อปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู

3.1.2 ผลของความยาวขดท่อ

ความยาวของขดท่อส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์และสารตัวอย่างอีกทั้งปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลูยังเกิดได้ค่อนข้างช้า ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีความสำคัญ โดยได้ศึกษาความยาวของขดท่อที่ 50, 100, 200 และ 300 cm ตามลำดับ นำความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีมาใช้ในการศึกษานี้ จากผลการทดลองพบว่าความยาวขดท่อที่เหมาะสม คือ 100 cm ดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งให้ค่าความชันของกราฟมาตรฐานสูงที่สุดและจุดตัดแกน Y ต่ำสุด



รูปที่ 5 การศึกษาความยาวขดท่อที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา

3.2 การศึกษาผลของไอออนรบกวน

วิธีการศึกษาผลของไอออนรบกวนทำได้โดยผสมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1 mg L^{-1} กับสารละลายไอออนต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1.0, 10, 20 และ 50 mg L^{-1} ตามลำดับ โดยศึกษาที่ละไอออน ซึ่งประกอบด้วย Na^+ , K^+ , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , F^- , NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} และ SiO_3^{2-} (เลือกศึกษาจากไอออนที่มักพบในตัวอย่างดินรวมถึงไอออนที่อาจส่งผลต่อปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู)

ผลการรบกวนของไอออนจะพิจารณาจากความเข้มข้นของไอออนที่มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ไม่มีไอออนรบกวนเกินกว่า $\pm 5\%$ โดยผลการแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการรบกวนของไอออนที่มีต่อการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

ระดับความเข้มข้นที่ไอออนแสดงการรบกวน (mg L^{-1})	ไอออนที่แสดงการรบกวน
>50	Na^+ , Al^{3+} , NO_3^-
50	K^+ , Zn^{2+} , F^- , Cl^- , SO_4^{2-}
20	Mn^{2+} , Ni^{2+} , CO_3^{2-}
10	Fe^{2+}
1	Cu^{2+} , Fe^{3+} , SiO_3^{2-}

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าไอออนที่แสดงการรบกวนอย่างชัดเจนต่อการวิเคราะห์ คือ Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} และ SiO_3^{2-} ในขณะที่ไอออนอื่น ๆ จะเริ่มแสดงการรบกวนเมื่อความเข้มข้นมากกว่า 20 mg L^{-1} ขึ้นไป ดังนั้นจึงได้ศึกษาวิธีการป้องกันการรบกวนของไอออน Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} และ SiO_3^{2-} โดยใช้สารกำบัง

3.2.1 การป้องกันการรบกวนของไอออน

Fe^{2+} , Fe^{3+} และ Cu^{2+} โดยใช้ EDTA

การศึกษากการใช้ EDTA ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยา (masking) ระหว่าง ไอออนรบกวน ได้แก่ Fe^{3+} , Fe^{2+} และ Cu^{2+} กับสารรีเอเจนต์ โดยเตรียมสารละลายผสมของฟอสฟอรัส 1 mg L^{-1} กับแต่ละไอออน คือ Fe^{3+} , Fe^{2+} และ Cu^{2+} ที่แต่ละความเข้มข้นดังที่กล่าวไปข้างต้น จากนั้นผสม EDTA ให้มีความเข้มข้นในสารละลายผสมเท่ากับ 0.04 M แล้วสังเกตค่าการดูดกลืนแสงเมื่อนำสารละลายผสมนี้ไปเกิดปฏิกิริยา ซึ่งพบว่าสามารถป้องกันการรบกวนของ Fe^{3+} , Fe^{2+} และ Cu^{2+} ได้ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 20, 10 และ 10 mg L^{-1} ตามลำดับ ซึ่งโดยปกติไอออนเหล่านี้มีปริมาณในดินไม่สูงมากนัก ที่ EDTA ความเข้มข้นดังกล่าวจึงสามารถป้องกันการรบกวนของไอออนเหล่านี้ เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างดินได้

3.2.2 การป้องกันการรบกวนของไอออน

SiO_3^{2-} โดยใช้ NaF

ซิลิเกตไอออน (SiO_3^{2-}) สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับแอมโมเนียมโมลิบดีตแต่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ช้ากว่าฟอสเฟต ดังนั้นจึงรบกวนการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการใช้ 0.085 M NaF ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไอออน SiO_3^{2-} กับสารรีเอเจนต์ [16] โดยทดลองทำนองเดียวกับการใช้ EDTA ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ 0.085 M NaF สามารถป้องกันการรบกวนของ SiO_3^{2-} ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 50 mg L^{-1}

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของระบบ HSI

การศึกษาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ของระบบ HSI โดยจากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างการพล็อตค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลาย

มาตรฐานฟอสฟอรัส (แกน X) พบว่าได้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง $0.050\text{--}20\text{ mg L}^{-1}$ โดยมีสมการเส้นตรงของกราฟ คือ $Y = 0.0025X + 0.0074$; $R^2 = 0.998$ และได้ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) จากการคำนวณสัญญาณที่มีค่าเป็น 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของสัญญาณ แบลงค์พบว่ามีความเท่ากับ 0.025 mg L^{-1}

การศึกษาความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 2 mg L^{-1} ซ้ำ 11 ครั้ง พบว่าได้ % RSD เท่ากับ 3.40 นอกจากนี้มีความถี่ในการวิเคราะห์ 12 ตัวอย่างต่อชั่วโมง โดยใช้ปริมาณสารเคมีซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมโมลิบเดต กรดแอสคอร์บิก กรดไนตริก และสารตัวอย่าง รวม 10.5 mL ต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

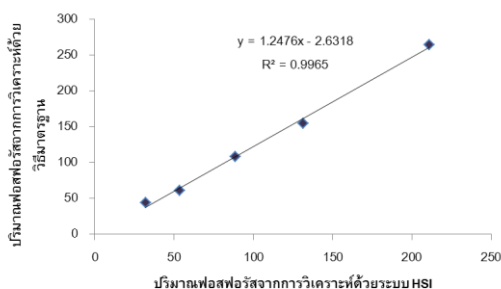
ระบบ HSI ที่พัฒนาขึ้นถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณฟอสฟอรัสที่พืชใช้ประโยชน์ได้ในตัวอย่างดิน โดยได้เก็บตัวอย่างดินสำหรับปลูกต้นไม้แบบบรรจุถุงจากร้านจำหน่ายอุปกรณ์การเกษตรในเขตจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 5 ยี่ห้อ นำตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110°C และบดให้ละเอียด นำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 18 mesh แบ่งตัวอย่างมา 20 g สกัดด้วย 0.8 M แอซิเตดบัฟเฟอร์ pH 4.8 ปริมาตร 50 mL โดยการเขย่า 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน [1] จากนั้นนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยระบบ HSI โดยเปรียบเทียบผลกับการวิเคราะห์แบบแบทช์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3

จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อนำมาเปรียบเทียบผลตามหลักสถิติด้วยค่า t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น

95 % พบว่าผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำข้อมูลจากวิธีทั้งสองมาพลอตในรูปกราฟสหสัมพันธ์ (correlation graph) พบว่าได้ผลดังรูปที่ 6

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่พืชใช้ประโยชน์ได้ในตัวอย่างดิน

ตัวอย่าง	ปริมาณฟอสฟอรัสที่พืชใช้ประโยชน์ได้ในสารสกัดในตัวอย่างดิน (mg L^{-1})	
	วิธี HSI	วิธีแบบแบทช์
ดิน 1	43.60 ± 1.36	33.40 ± 1.02
ดิน 2	60.80 ± 2.90	54.82 ± 1.11
ดิน 3	264.80 ± 6.14	213.75 ± 5.67
ดิน 4	108.00 ± 4.05	90.54 ± 3.09
ดิน 5	154.40 ± 4.85	133.39 ± 4.13



รูปที่ 6 กราฟสหสัมพันธ์ของผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสจากระบบ HSI และวิธีแบบแบทช์

จะเห็นได้ว่าผลการทดลองทั้งสองวิธีได้ค่าสอดคล้องกันทั้งค่าความชันและค่า R^2 ของกราฟที่มีค่าเข้าใกล้ 1 นอกจากนี้ เมื่อศึกษาค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) โดยเติมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 2 mg L^{-1} จากนั้นนำไปวิเคราะห์และหาค่าร้อยละการกลับคืนพบว่าได้ค่า

ในช่วง 83.5-102.5 %

อื่นในดินด้วยปฏิกิริยาอื่นได้ง่ายอีกด้วย

4. สรุป

ชุดการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการของ HSI ถูกพัฒนาขึ้นโดยออกแบบให้ใช้งานง่าย ใช้พื้นที่น้อย และราคาประหยัด เมื่อใช้งานชุดดังกล่าวจะถูกประกอบเข้ากับโพลาไรเซอร์ของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตร-โฟโตมิเตอร์ เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยสามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ได้กับหลากหลายปฏิกิริยา ซึ่งชุดวิเคราะห์ถูกออกแบบให้รองรับปฏิกิริยาที่ต้องใช้รีเอเจนต์ได้สูงสุดถึง 4 ชนิด โดยไม่จำเป็นต้องปรับแก้ระบบเพิ่มเติม แต่ใช้อุปกรณ์ที่ทำขึ้นเองซึ่งมีราคาถูกกว่าและใช้งานง่ายกว่าระบบการวิเคราะห์แบบไหลอื่น ๆ เช่น FIA และ SIA

งานวิจัยนี้ได้นำระบบที่พัฒนาขึ้นใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่พืชใช้ประโยชน์ได้ด้วยปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าได้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมโมลิบเดต กรดแอสคอร์บิก และกรดไนตริก เท่ากับ 1.5 mM 0.5 % w/v และ 0.05 M ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ค่าสภาพไวเหมาะสมต่อการตอบสนองสัญญาณในการวิเคราะห์และใช้ปริมาณสารเคมีอย่างเหมาะสมและประหยัด นอกจากนี้ได้ใช้ความยาวของขดท่อ คือ 100 cm ซึ่งเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยานี้อีกด้วย ไอออนรบกวนที่สำคัญได้แก่ Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} และ SiO_3^{2-} ได้ถูกป้องกันด้วยสารละลาย EDTA และ NaF จากสภาวะที่เหมาะสมนี้เมื่อประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างดินโดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีแบบแบทช์พบว่าให้ผลสอดคล้องกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และได้ค่าร้อยละการกลับคืนในช่วง 87.5-102.5 % ดังนั้นระบบ HSI ที่ได้นำเสนอนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในดินได้อย่างดีโดยยังสามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ธาตุอาหารอย่าง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2558 และได้รับการสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

6. รายการอ้างอิง

- [1] Somnam, S., Grudpan, K. and Jakmunee, J., 2008, Stopped-flow injection method for determination of phosphate in soils and fertilisers, *Mj. Int. J. Sci. Tech.* 2: 172-181.
- [2] สัมฤทธิ์ เพื่องจันทร์, 2538, แร่ธาตุอาหารพืชสวน, พิมพ์ครั้งที่ 1, โรงพิมพ์ศิริกัญท์ ออฟเซ็ท, ขอนแก่น, 3 น.
- [3] ไพบูลย์ วิวัฒนวงศ์วนา, 2546, เคมีดิน, พิมพ์ครั้งที่ 1, ห้างหุ้นส่วนจำกัดเชียงใหม่พิมพ์สวย, เชียงใหม่, 160 น.
- [4] Li, B.Y., Zhou, D.M., Cang, L., Fan, S.H. and Qin, S.W., 2007, Soil micronutrient availability to crops as effected by long-term inorganic and organic fertilizer application, *Soil Till. Res.* 96: 166-173.
- [5] Watson, C.A., Oborn, I., Edwards, A.C., Dahlin, A.S., Eriksson, J., Lindstrom, B.E.M., Linse, L., Topp, C.F.E. and Walker, R.L., 2012, Using soil and plant properties and farm management practices to improve the micronutrient composition of food and feed, *J. Geochem. Explor.* 121: 15-24.

- [6] Xiao, G., Li, T., Zhang, X., Yu, H., Huang, H. and Gupta, D.K., 2009, Uptake and accumulation of phosphorus by dominant plant species growing in a phosphorus mining area, *J. Hazard. Mater.* 171: 542-550.
- [7] Sharma, N.C., Starnes, D.L. and Sahi, S.V., 2007, Photoextraction of excess soil phosphorus, *Environ. Pollut.* 146: 120-127
- [8] Pettersson, A.K. and Karlberg, B., 1999, Simultaneous determination of orthophosphate and silicate in brackish water, *Anal. Chim. Acta.* 378: 183-189.
- [9] Karthikeyan, S., Hashigaya, S., Kajiya, T. and Hirata, S., 2004, Determination of trace amounts of phosphate by flow-injection photometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 1842-1846.
- [10] Li, Y., Muo, Y. and Xie, H., 2002, Simultaneous determination of silicate and phosphate in boiler water at power plants based on series flow cells by using flow injection spectrophotometry, *Anal. Chim. Acta.* 455: 315-325.
- [11] Moskvina, L.N., Bulatov, A.V., Nikolaeva, D.N. and Grigor'ev, G.L., 2002, Flow-injection extraction-photometric trace determination of phosphate and silicate ions, *J. Anal. Chem.* 57: 590-594.
- [12] Galhardo, C.X. and Masini, J.C., 2000, Spectrophotometric determination of phosphate and silicate by sequential injection using molybdenum blue chemistry, *Anal. Chim. Acta.* 417: 191-200.
- [13] Mas-Torres, F., Estela, J.M., Miro, M., Cladeva, A. and Cerda, V., 2004, Sequential injection spectrophotometric determination of orthophosphate in beverages, wastewater, and urine sample by electro-generation of molybdenum blue using tubular flow-through electrodes, *Anal. Chim. Acta.* 510: 61-68.
- [14] Frank, C., Schroeder, F., Ebinghaus, R. and Ruck, W., 2006, Using sequential injection analysis for fast determination of phosphate in coastal waters, *Talanta* 70: 513-517.
- [15] Grudpan, K., Ampan, P., Udnan, Y., Jayasvati, S., Lapanantnoppakhun, S., Jakmunee, J., Christian, G.D. and Ruzicka, J., 2002, Stopped-flow injection simultaneous determination of phosphate and silicate using molybdenum blue, *Talanta* 58: 1319-1326.
- [16] Somnam, S., Motomizu, S., Grudpan, K. and Jakmunee, J., 2014, Hydrodynamic sequential injection with stopped-flow procedure for consecutive determination of phosphate and silicate in wastewater, *Chiang Mai J. Sci.* 41: 606-617.
- [17] อรุณรัตน์ ขางเลง, วัฒนจิระ คำไชย และสรารุณิสมนาม, 2557, การพัฒนาระบบไฮโดรไดนามิก-โพลีอินเจคชันสำหรับการหาปริมาณเหล็กในดินและไนโตรเจนในน้ำเสีย, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22(1): 34-45.
- [18] Somnam, S., Grudpan, K. and Jakmunee, J.,

- 2008, Hydrodynamic sequential injection spectrophotometric system for determination of manganese in soil. Spectrosc. Lett. 41: 221-227.
- [19] Somnam, S., Jakmunee, J., Grudpan, K., Lenghor, N. and Motomizu, S., 2008, Determination of nitrite and nitrate in water samples by an automated hydrodynamic sequential injection method, Anal. Sci. 24: 1599-1603.