

# วิธีการทางสเปกโทรเมตรีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์โดยใช้เกลือไนโตรโซอาร์เป็นรีเอเจนต์

## Spectrometric method for the determination of cobalt(II) concentration using nitroso-R salt as reagent

นงคราญ ดวงสิน,<sup>1</sup> อุทัย สาชี,<sup>2</sup> เสนีย์ เครือเนตร<sup>3\*</sup>

Nongkran Duangsin,<sup>1</sup> Uthai Sakee,<sup>2</sup> Senee Kruanetr<sup>3\*</sup>

### บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้นำเสนอเทคนิคสเปกโทรเมตรี สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์โดยใช้เกลือไนโตรโซอาร์ (disodium-1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulphonate) เป็นรีเอเจนต์ โดยวิธีการจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโคบอลต์(II)กับเกลือไนโตรโซอาร์ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 6.5 เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ในย่านวิสิเบิล โดยได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น ความยาวคลื่นสูงสุด สารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ ช่วงความเป็นเส้นตรงในการใช้งาน ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจสอบวัดและปริมาณต่ำสุดในการตรวจวัด และร้อยละการได้กลับคืน พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของโคบอลต์ (II) -เกลือไนโตรโซอาร์ ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 408 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.005-7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการถดถอยเชิงเส้นเท่ากับ  $y = 0.0544x - 0.0023$  ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.995 วิธีนี้มีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (3SD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้ (10SD) เท่ากับ  $1.33 \times 10^{-3}$  และ  $4.45 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความสามารถในการทอนซ้ำและทำซ้ำซึ่งทำการทดลอง 11 ครั้ง ที่ความเข้มข้นของโคบอลต์ 3 ความเข้มข้น (0.005, 3.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้ค่าความสามารถในการทอนซ้ำเท่ากับร้อยละ 2.64, 0.25 และ 0.078 ตามลำดับ และความสามารถในการทำซ้ำเท่ากับร้อยละ 4.23, 0.29 และ 0.131 ตามลำดับ วิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ในตัวอย่างน้ำ ซึ่งให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 92.40 ถึง 97.80

**คำสำคัญ:** โคบอลต์ เกลือไนโตรโซอาร์ สเปกโทรโฟโตเมตรี

### Abstract

In this study, a spectrometric method for determination of cobalt(II) concentration using nitroso-R salt (disodium-1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulphonate) as reagent is proposed. The procedure is to form the red complex by the reaction between cobalt(II) and nitroso-R salt in buffer pH 6.5. This complex absorbs the light at the visible region.

<sup>1</sup> นิสิตปริญญาโท, <sup>2</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์, <sup>3</sup> อาจารย์ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

<sup>1</sup> Master student, <sup>2</sup> Assistant Professor, <sup>3</sup> Lecture, Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science, Mahasarakham University, Khantharawichai Distract, Maha Sarakham 44150, Thailand

\* Corresponding author: Senee Kruanetr, Lecture, Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science, Mahasarakham University, Khantharawichai Distract, Maha Sarakham 44150, Thailand, E-mail seiney@yahoo.com

The optimum parameters to form the stable complex such as the maximum absorption wave length, buffer solution, the concentration of nitroso-R salt, the linear range, the detection limit (3SD), the quantitation limit (10SD) and the percentage recovery were investigated. The results showed the maximum absorption wavelength of cobalt(II)- nitroso-R salt complex at 408 nm. The calibration graph of cobalt(II) was linear in the range of 0.005-7.0 mg L<sup>-1</sup> with a regression equation of  $y = 0.0544x - 0.0023$  and a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.9995. The detection limit (3SD) and the quantitation limit (10SD) were  $1.33 \times 10^{-3}$  and  $4.45 \times 10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup> respectively. The repeatability and reproducibility are reported as a percentage of the relative standard deviation calculated from 11 identical measurements of three concentrations (0.005, 3.0 and 7.0 mg L<sup>-1</sup>) were 2.64%, 0.25% and 0.078% respectively for repeatability and 4.23%, 0.29% and 0.131% respectively for reproducibility. The method was satisfactorily applied for determine of cobalt(II) concentration in water samples to obtain the percentage recovery in range of 92.40 to 97.80.

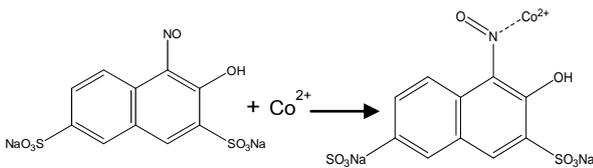
**Keyword:** cobalt(II), Nitroso-R salt, Spectrometric method

## บทนำ

โคบอลต์ เป็นธาตุที่จัดอยู่ในกลุ่มของโลหะทรานซิชัน (transition metal) ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ เช่น น้ำ ดิน หิน อากาศ เป็นต้น โคบอลต์เป็นธาตุที่จำเป็นในกระบวนการเผาผลาญของมนุษย์ สัตว์และพืช<sup>1</sup> โดยในร่างกายมนุษย์มักพบว่าโคบอลต์จะถูกเก็บไว้ในเซลล์เม็ดเลือดแดง และพบในปริมาณเพียงเล็กน้อยในตับ ไต และม้าม โดยโคบอลต์จะช่วยในการขนส่งกลูโคสจากเลือดเข้าสู่เซลล์ในร่างกาย และมีส่วนในการสร้างเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้โคบอลต์ยังเป็นส่วนประกอบหลักของวิตามินบีสิบสอง (Vitamin B<sub>12</sub>) ซึ่งเป็นวิตามินที่มีความจำเป็นและสำคัญสำหรับร่างกายมนุษย์<sup>2</sup> หากร่างกายขาดวิตามินบี-สิบสอง อาจส่งผลให้เกิดโรคโลหิตจางขั้นรุนแรง และอาจทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาท<sup>3,4</sup> และหากร่างกายได้รับหรือมีการสะสมในปริมาณที่มากเกินไป ก็อาจส่งผลให้เกิดภาวะเป็นพิษของโลหะหนัก ทำให้เกิดความผิดปกติของปอด ผิวหนังอักเสบ และอาจส่งผลให้ต่อมไทรอยด์ทำงานผิดปกติ<sup>5</sup> ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยและเป็นผลดีต่อสุขภาพ ร่างกายควรได้รับในปริมาณที่เหมาะสม ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ ขึ้นมาอย่างมากมายเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของโคบอลต์ เช่น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี (spectrofluorometry)<sup>6</sup>, การวิเคราะห์ด้วย

เทคนิคเคมีลูมิเนสเซนส์ (chemiluminescence)<sup>7</sup>, การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรเมทรี (atomic absorption spectrometry)<sup>8,9</sup>, การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography<sup>10</sup>, การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค inductively coupled plasma-optical emission spectrometry<sup>11</sup> และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโวลแทมเมทรี (Voltametry)<sup>12</sup> เป็นต้น ในการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์นั้นจะต้องอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับสารละลายรีเอเจนต์ที่เหมาะสม ซึ่งได้มีงานวิจัยรายงานเกี่ยวกับสารละลายรีเอเจนต์ต่างๆ ที่ใช้วิเคราะห์โคบอลต์ได้อยู่หลายชนิด เช่น ซินคอน (Zincon)<sup>13</sup>, 2-(2-benzothiazolylazo)-2-p-cresol<sup>14</sup> เป็นต้น โดยในงานวิจัยนี้ได้สนใจที่จะใช้เกลือไนโตรโซอาร์มาเป็นสารละลายรีเอเจนต์ เพราะเป็นสารที่มีความว่องไวและจำเพาะกับโลหะโคบอลต์ อีกทั้งยังเป็นสารที่หาได้ง่าย ขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก เหมาะกับการใช้เป็นสารละลายรีเอเจนต์ เกลือไนโตรโซอาร์ (Nitroso-R salt or disodium-1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulphonate) (C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>NNa<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองละลายน้ำได้ และเป็นสารรีเอเจนต์ที่มีความจำเพาะกับโลหะบางชนิด<sup>15</sup> ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะ เช่น Cu(II)<sup>16</sup>, Co(II) และ Ni(II)<sup>17</sup> ได้

การวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ โดยใช้เกลือไนโตร-โซอาร์นั้น จะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโคบอลต์และเกลือไนโตรโซอาร์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน โดยโลหะโคบอลต์จะถูกจับที่ตำแหน่งของไนโตรเจน เนื่องจาก ไนโตรเจนมีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว และมีค่า อิเล็กโตรเนกาทีวิตี (Electronegativity, EN) น้อยกว่าออกซิเจน จึงทำให้ไนโตรเจนสามารถให้อิเล็กตรอนได้ง่ายกว่าออกซิเจน ดังแสดงใน Figure 1



**Figure 1** The complexation reaction between cobalt(II) and nitroso-R salt.

### วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย และมีความจำเพาะเจาะจง โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างโคบอลต์ (II) กับเกลือไนโตรโซอาร์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Co(II)-nitroso-R salt ซึ่งดูตลกที่ความยาวคลื่นในช่วงยูวี-วิสิเบิล

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### การเตรียมสารละลาย

#### 1. สารละลายมาตรฐานโคบอลต์ (II) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายเพื่อใช้ (Stock solution) ของโคบอลต์ (II) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยการเปิดสารละลายโคบอลต์ 1.0 มิลลิกรัมจากสารละลายมาตรฐานโคบอลต์ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (AR Grade, Carlo Erba) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

#### 2. สารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ 1.0 %w/v

เตรียมสารละลายเพื่อใช้ ของเกลือไนโตรโซอาร์เข้มข้น 1.0 %w/v (AR Grade, Alpha Chemica) เตรียมโดยชั่งเกลือไนโตรโซอาร์ 1.0 กรัม นำมาละลายในน้ำปราศจากไอออน เติสารละลายที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน สำหรับความเข้มข้นในช่วงใช้งานจะเตรียมโดยการเปิดสารละลายในปริมาตรที่เหมาะสมจากสารละลายเพื่อใช้ที่เตรียมไว้ และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

#### 3. สารละลายบัฟเฟอร์

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตต (acetate buffer) พีเอช 3-5 เตรียมโดยผสมสารละลาย กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (AR Grade, UNIVAR) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ กับสารละลายโซเดียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (AR Grade, UNIVAR) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยพีเอช 3, 4 และ 5 เปิดสารละลาย  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ปริมาตร 98.23, 83.4, 32.2 มิลลิลิตรและสารละลาย  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ปริมาตร 1.77, 16.6, 67.8 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับพีเอชตามที่ต้องการด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffer) พีเอช 6-9 เตรียมโดยผสมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (AR Grade, KARLO ERBA) ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์ กับสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟตแอนไฮดรัส ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (AR Grade, UNIVAR) 0.07 โมลาร์ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมแต่ละพีเอช โดยพีเอช 6, 7, 8 และ 9 เปิดสารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ปริมาตร 88.9, 41.3, 3.7 และ 1.43 มิลลิลิตร และสารละลาย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ปริมาตร

11.1, 58.7, 96.3 และ 88.60 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้น ปรับพีเอชตามต้องการด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และ กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

## ขั้นตอนการวิจัย

### การหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม ( $\lambda_{max}$ )

การศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยากันระหว่าง โคบอลต์ (II)ไอออน และเกลือไนโตรโซอาร์ (Co(II)-nitroso-R salt) เพื่อให้ทราบถึงความยาวคลื่นที่จะให้สัญญาณได้ดีที่สุด ซึ่งหมายถึงมีความไว (sensitivity) ที่ดี ทั้งนี้จะดูได้จากค่าการดูดกลืนแสง หากมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงก็จะทำให้ผลการตรวจวัดมีความชัดเจน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมของปฏิกิริยา ซึ่งทำได้โดยการศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจากโคบอลต์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ ความเข้มข้น 0.2 %w/v ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.5 โดยเตรียมจากการปิเปตสารละลายมาตรฐานโคบอลต์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากสารละลายเพื่อใช้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร จากสารละลายเพื่อใช้ของเกลือไนโตรโซอาร์เข้มข้น 1.0 %w/v ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 200-800 nm ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Lamda 25 บริษัท Perkin-Elmer ได้ค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 408 nm ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่นำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

### การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือไนโตรโซอาร์

ความเข้มข้นของเกลือไนโตรโซอาร์ มีผลต่ออัตราส่วนโดยโมลของการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร ถ้าความเข้มข้นของสารละลายรีเอเจนต์ไม่เหมาะสม เช่น มีความเข้มข้นน้อยหรือมากเกินไป จะ

ส่งผลต่อปริมาณของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น คือ ถ้าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเกลือไนโตรโซอาร์และโคบอลต์(II) ไม่เหมาะสม สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไม่เสถียร ส่งผลให้ปริมาณของสารประกอบมีน้อย ทำให้สัญญาณที่ตรวจวัดได้มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์มีสถานะเหมาะสม อัตราส่วนโดยโมลของการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนก็จะเหมาะสมและมีความเสถียร ซึ่งปริมาณของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นก็จะมากตามไปด้วย ส่งผลให้สัญญาณที่ตรวจวัดได้ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง และมีความไว นอกจากนี้ หากสารละลายมีความเข้มข้นมากเกินไป สีของสารละลายที่เข้มข้นนั้น อาจไปส่งผลหรือบดบังสัญญาณที่เกิดขึ้น ดังนั้นเพื่อให้ได้สัญญาณที่ถูกต้องและชัดเจน จึงต้องมีการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ซึ่งทำได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานโคบอลต์มาทำปฏิกิริยากับเกลือไนโตรโซอาร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 %w/v) โดยจะปิเปตสารละลายมาตรฐานโคบอลต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานโคบอลต์เพื่อใช้ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เหมือนกันทุกขวดของ แต่ละความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา และปิเปตสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์จากสารละลายเพื่อใช้ของสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ในปริมาตรที่เหมาะสมกับความเข้มข้นต่างๆ ลงไปผสมกับสารละลายมาตรฐานโคบอลต์แต่ละขวด และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนโคบอลต์กับเกลือไนโตรโซอาร์ที่ความยาวคลื่น 408 nm แล้วทำการเลือกความเข้มข้นของเกลือไนโตรโซอาร์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

### การศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์

สารละลายบัฟเฟอร์มีคุณสมบัติในการช่วยรักษาสภาพกรด-เบสของสารละลายเอาไว้ ดังนั้นเพื่อให้สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีความเสถียร ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช จึงต้องมีการศึกษาพีเอชที่

เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา ซึ่งการศึกษาผลของสารละลายบีฟเฟออร์นั้น จะศึกษาในช่วงพีเอช 3.0-10.0 โดยใช้สารละลายเกลือ ไนโตรโซอาร์ความเข้มข้น 0.2%w/v และโคบอลต์ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (เตรียมเหมือนกันกับการศึกษาความเข้มข้นของเกลือไนโตรโซอาร์) และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบีฟเฟออร์ที่พีเอชต่างๆ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนที่ความยาวคลื่น 408 nm ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และทำการเลือกช่วงพีเอชที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

### การตรวจสอบความน่าเชื่อถือ

#### การหาช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์

เตรียมสารละลายมาตรฐานของโคบอลต์ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.001-9.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายเกลือไนโตรโซอาร์เข้มข้น 0.2 %w/v ในฟอสเฟตบีฟเฟออร์พีเอช 6.5 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 408 nm จากนั้นนำช่วงที่ได้มาทำการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) จะได้เป็นสมการเส้นตรงสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ในตัวอย่าง

#### ขีดจำกัดในการตรวจวัด ( Limit of Detection, LOD) และปริมาณต่ำสุด (Limit of Quantitation, LOQ) ที่สามารถตรวจวัดได้

ค่านี้จะได้จากการคำนวณจากสัญญาณของสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์เข้มข้น 0.2 %w/v เตรียมโดยการเปิดสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร จากสารละลายเพื่อใช้ของเกลือไนโตรโซอาร์ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 408 nm จำนวน 11 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อการ

คำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจวัด และปริมาณต่ำสุดสามารถตรวจวัดได้

#### ความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

คำนวณจากสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนของโคบอลต์และเกลือไนโตรโซอาร์ ที่ 3 ความเข้มข้น (0.05, 3.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ของโคบอลต์ ซึ่งแต่ละความเข้มข้นจะเตรียมทั้งหมด 11 ขวด เตรียมโดยการเปิดสารละลายมาตรฐานโคบอลต์ปริมาตรที่เหมาะสมของทั้ง 3 ความเข้มข้น จากสารละลายเพื่อใช้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร จากสารละลายเพื่อใช้ของเกลือไนโตรโซอาร์เข้มข้น 1.0 %w/v ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ให้ครบทุกขวด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 25 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 408 nm โดยทำการวัดทุกขวด ขวดละ 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

#### ความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability)

ค่าความสามารถในการทวนซ้ำ คำนวณจากสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อน ของโคบอลต์และเกลือไนโตรโซอาร์ ที่ 3 ความเข้มข้น (0.05, 3.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ของโคบอลต์ เตรียมจากการเปิดสารละลายมาตรฐานโคบอลต์ปริมาตรที่เหมาะสมของทั้ง 3 ความเข้มข้น จากสารละลายเพื่อใช้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร จากสารละลายเพื่อใช้ของเกลือไนโตรโซอาร์เข้มข้น 1.0 %w/v ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 25 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 408 nm โดยทำการวัดซ้ำความเข้มข้นละ 11 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

## การวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ในน้ำตัวอย่าง

น้ำตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้ทำการเก็บจากสระน้ำตามจุดต่างๆ ในบริเวณของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม 5 จุด ได้แก่ น้ำจากสระบริเวณอาคารราชนครินทร์ (RN building), สระน้ำบริเวณคอนโดอาจารย์ (Ajarn's condo), แม่น้ำชี, น้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสียของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม (Wastewater treatment pond) และ สระน้ำบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ (Science building) ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่างโดย นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 40 มิลลิลิตร มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อกรองตะกอนและสิ่งสกปรกที่มากับน้ำ จากนั้นเติมกรดไนตริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ลงไปในน้ำตัวอย่างที่กรองแล้ว และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำสารละลายผสมที่ได้ไปย่อยโดยการให้ความร้อนบนฮอทเพลท (hot plate) ย่อยทิ้งไว้จนสารละลายตัวอย่างเหลือประมาณ 2 มิลลิลิตร ทั้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายตัวอย่างไปปรับสภาพให้มีค่าพีเอชเป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 โมลาร์ เมื่อสารละลายตัวอย่างมีพีเอชเป็นกลาง (ประมาณพีเอช 6-7) แล้วนำมาปรับปริมาตรด้วยสารละลายพีเอชที่เหมาะสมจนครบ 25 มิลลิลิตร<sup>18</sup> และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เปรียบเทียบกับแอบซอร์บชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

## ผลการทดลองและอภิปรายผล

### การหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม ( $\lambda_{max}$ )

การหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณของโคบอลต์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนโคบอลต์กับเกลือไนโตรโซอาร์โดยใช้ความเข้มข้นของโคบอลต์ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือไนโตรโซอาร์ความเข้มข้น 0.2%w/v สารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นสีส้ม จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 200-800 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโต-

มิเตอร์ ได้ผลแสดงใน Figure 2 จะเห็นว่ากราฟของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโคบอลต์กับเกลือไนโตรโซอาร์ ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 408 nm ในขณะที่สารละลายโคบอลต์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นนี้ ส่วนสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ พบว่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 390 nm จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าทั้งสารละลายโคบอลต์ (II) และสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ไม่รบกวนช่วงการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโคบอลต์ (II) กับสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์

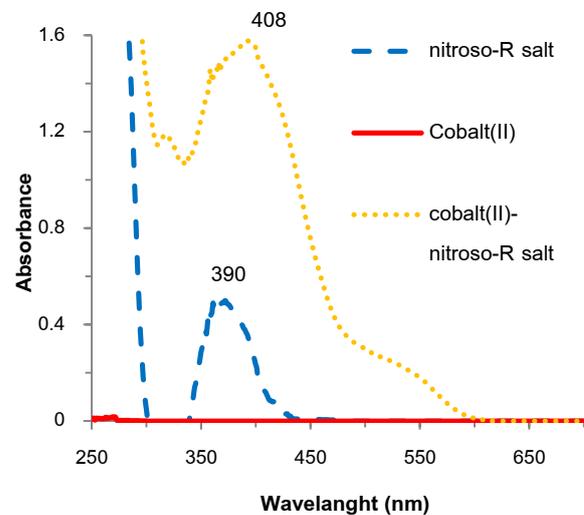
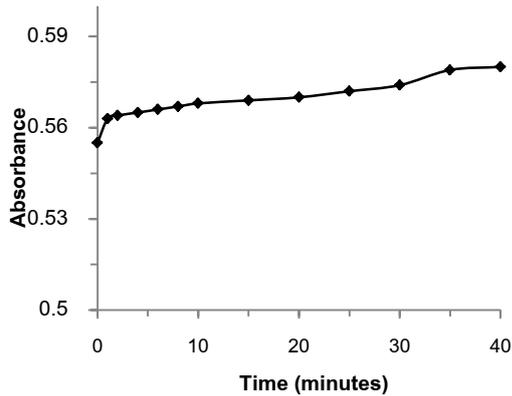


Figure 2 Absorbance spectra of nitroso-R salt (0.2%w/v), Co(II) and Co(II)-nitroso-R salt complex.

### ความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน

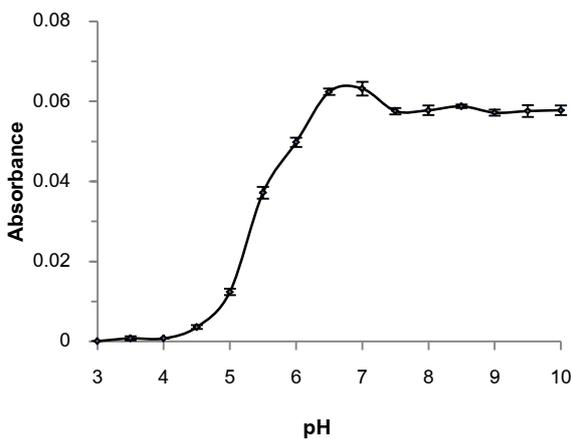
จาก Figure 3 แสดงผลของความเสถียรของการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโคบอลต์ (II) กับเกลือไนโตรโซอาร์ พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนเกิดขึ้นทันทีที่สารละลายทำปฏิกิริยากัน และเมื่อเวลาผ่านไปปฏิกิริยาของสารละลายเกิดสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้น และเมื่อผ่านไป 2 นาที ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มคงที่ไปจนถึงนาทีที่ 40 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น มีความเสถียรสูง



**Figure 3** Effect of stability of Co(II)-nitroso-R salt complex.

**ผลของ pH**

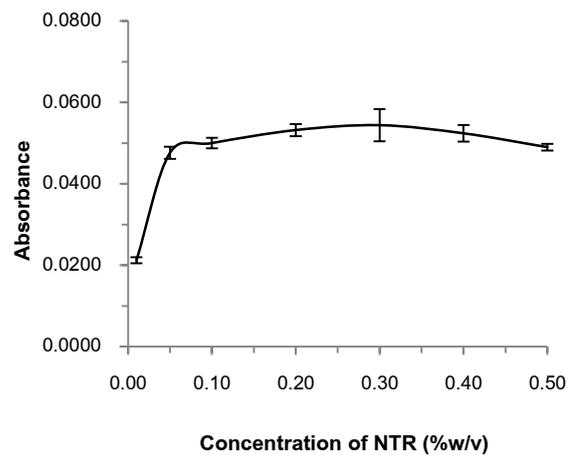
ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโคบอลต์กับเกลือไนโตรโซอาร์นั้น ค่า pH มีผลต่อความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น และมีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน การหาช่วงพีเอชที่เหมาะสม โดยทำการศึกษา pH ช่วง 3.0-10.0 พบว่า ที่ pH 6.5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด แสดงว่าสารประกอบเชิงซ้อนมีความเสถียรมาก ดังนั้นจึงเลือก pH 6.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ดังแสดงใน Figure 4



**Figure 4** The effect of pH (3.0-10.0) on the absorbance at wavelength 408 nm of Co(II)-nitroso-R salt complex.

**ผลของความเข้มข้นของเกลือไนโตรโซอาร์**

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์โดยใช้เกลือไนโตรโซอาร์เป็นสารละลายรีเอเจนต์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมถือเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยา เพราะถ้าอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้ปฏิกิริยากันเหมาะสมกัน จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้สัญญาณที่ตรวจวัดได้มีความชัดเจนและถูกต้อง โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเกลือไนโตรโซอาร์ในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.5%w/v ผลการทดลองแสดงดัง Figure 5 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนโคบอลต์กับเกลือไนโตรโซอาร์เพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้น 0.3 %w/v จากนั้นค่าการดูดกลืนแสงก็เริ่มคงที่ จากกราฟแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 0.2 %w/v ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเกลือไนโตรโซอาร์ 0.2 %w/v เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์



**Figure 5** Effect of concentration of nitroso-R salt on the absorbance of Co(II)-nitroso-R salt complex.

**Table 1** The studied parameters and their optimum conditions of UV-Vis spectrophotometric method for determination of cobalt(II).

Parameters	Studied range	Optimum value
Wavelength (nm)	200-800	408
pH	3-10	6.5
Concentration of nitroso-R salt (%w/v)	0.001-0.5	0.2

### ช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์

ทำการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นของโคบอลต์ตั้งแต่ 0.01-9.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 408 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ดังแสดงใน Table 1 พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงจะอยู่ระหว่างความเข้มข้น 0.005-7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงใน Figure 6 สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง ได้สมการสมการเส้นตรงคือ  $y = 0.0544x - 0.0023$  ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9995

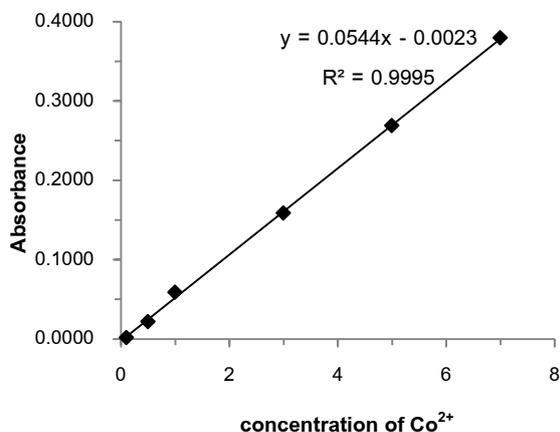


Figure 6 The linear range for cobalt(II) determination.

### ผลของตัวรบกวน

ตัวรบกวนไอออนของโลหะชนิดอื่นที่มีปนอยู่ในตัวอย่างน้ำ อาจรบกวนการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ในตัวอย่าง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงตัวรบกวน หากพบว่ารบกวนการวิเคราะห์จะต้องกำจัดตัวรบกวนก่อนทำการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ ซึ่งในการศึกษาผลของตัวรบกวนในงานวิจัยนี้ จะศึกษาไอออนของโลหะดังนี้ ซีลีเนียม ( $Se^{2+}$ ), อลูมิเนียม ( $Al^{2+}$ ),  $Zn^{2+}$ , ทองแดง ( $Cu^{2+}$ ), เหล็ก ( $Fe^{3+}$ ), แมงกานีส ( $Mn^{2+}$ ), แมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ), แคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) และ นิกเกิล ( $Ni^{2+}$ ) ผลที่ได้จากการทดลองคือ โลหะส่วนใหญ่ไม่ส่งผลรบกวนต่อการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์(II)ในตัวอย่างน้ำ ไอออนของโลหะ  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  และ  $Ni^{2+}$  จะรบกวนการวิเคราะห์เมื่อมีความเข้มข้นมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

และโลหะที่เหลือจะรบกวนการวิเคราะห์เมื่อมีความเข้มข้นมากกว่า 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในตัวอย่างน้ำที่นำมาวิเคราะห์ มีปริมาณโลหะเหล่านี้ปนอยู่น้อยกว่าความเข้มข้นที่จะส่งผลรบกวน ดังนั้นในการทดลองตัวรบกวนจึงไม่ส่งผลต่อการตรวจวัด

### ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ในน้ำตัวอย่าง

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ในตัวอย่างน้ำทั้ง 5 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคสเปกโทรเมตรี เปรียบเทียบกับเทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรเมตรี โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองแสดงใน Table 2 จากตารางพบว่าน้ำตัวอย่างจากทั้ง 5 จุด ไม่มีไอออนของโคบอลต์อยู่ และเมื่อเติมสารละลายมาตรฐานโคบอลต์ (II) ลงในตัวอย่างน้ำแต่ละจุดที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และตรวจวัดด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าร้อยละการได้กลับคืน (%Recovery) สำหรับเทคนิคสเปกโทรเมตรี เท่ากับ 92.40, 95.20, 97.80, 93 และ 93.40 ตามลำดับ และเทคนิคแอบซอร์บชันสเปกโทรเมตรีเท่ากับ 97.60, 95.80, 98.40, 97.80 และ 94.60 ซึ่งจากผลดังกล่าวจะเห็นว่าค่าการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 92.40 ถึง 97.80 แสดงว่าวิธีที่นำเสนอนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ (Accuracy) และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานพบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่ต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สำหรับสารละลายตัวอย่างที่ตรวจไม่พบโลหะโคบอลต์ (II) ปนอยู่นั้น สาเหตุเพราะสภาพของน้ำจากแหล่งน้ำไม่มีการปนเปื้อนของโลหะโคบอลต์มากนัก อีกทั้งยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่ไกลจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ ปริมาณโคบอลต์จึงมีอยู่ค่อนข้างน้อย

**Table 2** The concentration of cobalt(II) found in water samples analysed by the proposed spectrometry compared to the standard method.

Samples	Concentration of Co(II) (mg/L), (n = 3)			
	Spectrometry		AAS	
	Detected (mg/L)	Found (Add Co <sup>2+</sup> 5 mg/L)	Detected (mg/L)	Found (Add Co <sup>2+</sup> 5 mg/L)
Pond (RN building)	ND	4.62	ND	4.88
Pond (Ajahn's condos)	ND	4.76	ND	4.79
Chee river	ND	4.89	ND	4.92
Wastewater treatment pond	ND	4.65	ND	4.89
Pond (Science building)	ND	4.67	ND	4.73

\*ND = Not detected

### สรุปผลการศึกษา

เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างโคบอลต์กับเกลือไนโตรโซอาร์คความเข้มข้น 0.2 % w/v เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 408 นาโนเมตร เมื่อใช้สภาวะในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เหมาะสม พบว่าได้ช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับวิเคราะห์หาโคบอลต์อยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005-7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีนี้มีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (3SD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (10SD) เท่ากับ  $1.33 \times 10^{-3}$  และ  $4.45 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความแม่นยำและความเที่ยง (Precision) ที่ทำการทดลอง 11 ครั้ง สำหรับความเข้มข้นของโคบอลต์ 3 ความเข้มข้น ( 0.005, 3.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ของการทำซ้ำภายในวัดเดียวเท่ากับ 2.64%, 0.25% และ 0.078% ตามลำดับ และทำซ้ำระหว่างวันเท่ากับ 4.23%, 0.29% และ 0.131% ตามลำดับ และมีค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 92.40 ถึง 97.80 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโคบอลต์ด้วยเทคนิคสเปกโทรเมตรีสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโคบอลต์ในตัวอย่างน้ำ พบว่า ตัวอย่างน้ำที่นำมาวิเคราะห์ไม่พบโลหะโคบอลต์ ซึ่งแสดงถึงสภาพแหล่งน้ำว่ายังไม่มีการปนเปื้อนของโคบอลต์

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) ที่กรุณาสับสนุนทุนการศึกษา และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกด้านห้องปฏิบัติการเครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัยมา ณ ที่นี้

## เอกสารอ้างอิง

1. Shabani AM, Dadfarnia S, Dehghan K. On-line preconcentration and determination of cobalt by chelating microcolumns and flow injection atomic spectrometry. *Talanta* 2003;59:719-25.
2. Song Z, Yue O, Wang C. Flow injection chemiluminescence determination of femtogram-level cobalamin egg yolk, fish tissue and human serum. *Food Chem* 2006;94: 457-63.
3. Li H, Chen F, Jiang Y. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatograph A* 2000;891:243-47.
4. Sato K, Kudo Y, Muramatsu K. Incorporation of a high level of vitamin B<sub>12</sub> into a vegetable, kaiware daikon (Japanese radish sprout), by the absorption from its seeds. *Biochim Biophys Acta* 2004;1672:135-37.
5. Ahmed MJ, Uddin MN. A simple spectrophotometric method for the determination of cobalt in Industrial, environmental, biological and soil samples using bis(salicylaldehyde)orthophenylenediamine. *Chemosphere* 2007;67:2020-27.
6. Mori I, Takasaki K, Fujita Y, Matsuo T. Selective and sensitive fluorometric determinations of cobalt (II) and hydrogen peroxide with fluorescein-hydrazide. *Talanta* 1998;47:631-37.
7. Johnson EH, Al-Habsi K, Al-Busaidy R, Khalaf SK. The effect of low levels of dietary cobalt on the chemiluminescence response of polymorphonuclear leukocytes of goats. *Res Vet Sci* 2010;88:61-3.
8. Lemos VA, Santos LN, Bezerra MA. Determination of cobalt and manganese in food seasonings by flame atomic absorption spectrometry after preconcentration with 2-hydroxyacetophenone-functionalized polyurethane foam. *J Food Compos Anal* 2010;23:277-81.
9. Ribeiroa AS, Vieiraa MA, Silvaa AF, Borgesa DL, Welza B, Heitmannb U et al. Determination of cobalt in biological samples by line-source and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using solid sampling or alkaline treatment. *Spectrochim Acta B* 2005;60:693-98.
10. Niwa H, Yasui T, Ishizuki T, Yuchi A, Yamada H, Wada H. Separation and simultaneous determination of cobalt, nickel and copper with 2-(4-methyl-2-quinolyazo)-5-diethylaminophenol by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Talanta* 1997;45:349-55.
11. Khorrami AR, Hashempur T, Mahmoudi A, Karimi AR. Determination of ultra trace amounts of cobalt and nickel in water samples by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry after preconcentration on modified C18-silica extraction disks. *Microchem J* 2006;84: 75-9.
12. Giroussia S, Voulgaropoulos A, Ayiannidisb AK, Golimowski J, Janicki M. Determination of cobalt in vegetable animal foodstuffs by differential pulse adsorptive voltammetry using a-benzil dioxime. *Sci Total Environ* 1995;176:135-39.

- 13 Crystal ES, Joseph MN, Strfan S. A Spectrophotometric method for the determination of zinc, copper and cobalt ions in metalloproteins using zincon. *Anal Biochem* 2010; 397: 218-26.
- 14 Marcelo S, Izabel CSF, Katia CMN, Euclides QSF. Selective determination of cobalt using polyurethane foam and 2-(2-benzothiazolylazo)-2-p-cresol as a spectrophotometric. *Talanta* 1996;43:1675-80.
- 15 Marczenko Z, Balcerzak M. Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic. Amsterdam: Elsevier; 1998.
- 16 Kruanetr S, Tengjaroenkul U, Liawruangrath B, Liawruangrath S. A cleaner and simple spectrophotometric micro-fluidic procedure for copper determination using nitroso-R salt as chromogenic agent. *Spectrochim Acta A* 2007; 70:1134-40.
- 17 Ghasemi J, Shahabadi N, Seraji HR. Spectrophotometric simultaneous determination of cobalt, copper and nickel using nitroso-R-salt in alloys by partial least squares. *Anal Chim Acta* 2004;510:121-6.
- 18 Miller JC, Miller JN. *Statistics for analytical chemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Ellis Horwood;1993.