



## บทที่ 4

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์และศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เยื่อเปลือกไข่สำหรับกระบวนการดูดซับและการเพิ่มความเข้มข้นโลหะหนักนิกเกิล แคดเมียม และตะกั่ว ที่ตกค้างในแม่น้ำน่าน โดยเริ่มจากการศึกษาวัสดุธรรมชาติที่ใช้สำหรับการดูดซับโลหะหนักนิกเกิล แคดเมียม และตะกั่ว ที่ปนเปื้อนในน้ำตัวอย่างร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตเมตรี (FAAS) สภาวะที่เหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่นำเสนอ และผลการทดลอง สามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

จากข้อมูลของเยื่อเปลือกไข่โดยใช้เทคนิค FT-IR พบว่า เยื่อเปลือกไข่ทั้งสองชนิดมีหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญเหมือนกัน แต่ผลที่ได้จากเทคนิค SEM พบว่าเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการต้มแล้วทั้งเยื่อเปลือกไข่เปิดและเยื่อเปลือกไข่โก้ เส้นใยของเยื่อ (membrane fiber) ถูกทำลายด้วยความร้อนจากการต้ม ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของโลหะหนัก ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวจึงเลือกเยื่อเปลือกไข่เปิดที่ไม่ผ่านการต้ม (Dn-ESMs) เป็นวัสดุในการเพิ่มความเข้มข้น ซึ่งเยื่อเปลือกไข่เปิดเป็นขยะที่สามารถเก็บได้จากแหล่งเดียวกัน (ร้านทำขนมไทยชื่อ ร้านละมัย อำเภอเมืองพิษณุโลก) เพื่อลดการปนเปื้อนของวัสดุที่ใช้ในการเตรียมตัวดูดซับ

ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณเยื่อเปลือกไข่ (ขนาด 25 เมช) ที่มีผลต่อการดูดซับของแคดเมียม และนำไปประยุกต์ใช้ในการดูดซับโลหะหนักตัวอื่นๆ จากผลการศึกษาพบว่า ปริมาณของเยื่อเปลือกไข่ในช่วง 500-1000 มิลลิกรัม สามารถดูดซับแคดเมียมได้ถึง 100% จึงเลือกเยื่อเปลือกไข่ปริมาณ 500 มิลลิกรัม เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับโลหะหนักนิกเกิล แคดเมียม และตะกั่ว

ได้ทำการศึกษาผลของค่า pH ต่อการดูดซับของนิกเกิล แคดเมียม และตะกั่ว ซึ่งศึกษาค่า pH ของสารละลายในช่วง 4-14 ที่มีผลต่อการดูดซับบนเยื่อเปลือกไข่เปิด จากการทดลองพบว่า ที่ pH 10 เหมาะสำหรับการดูดซับแคดเมียม และตะกั่ว และ pH 9 เหมาะสำหรับการดูดซับนิกเกิล

ได้ทำการศึกษาร้อยละการกลับคืนของตะกั่ว โดยพบว่าสามารถใช้กรดไนตริกเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในการชะตะกั่วออกจากเยื่อเปลือกไข่เปิดได้ร้อยละการกลับคืน

มากกว่า 80 % แต่ร้อยละการกลับคืนของนิกเกิล และแคดเมียม ต้องใช้เทคนิค UAD โดยใช้กรดไนตริก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และช่วยย่อยด้วยเครื่องอัลตราโซนิคที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งวิธีนี้ให้ค่าร้อยละการกลับคืนมากกว่า 80%

จากการศึกษาผลของไอออนที่รบกวนค่าร้อยละการกลับคืนของนิกเกิล แคดเมียม และตะกั่ว ที่ดูดซับบนเยื่อเปลือกไข่เป็ด โดยศึกษาปริมาณของไอออนสูงสุดที่มีผลทำให้ร้อยละการกลับคืนของแคดเมียม นิกเกิล และ ตะกั่ว มีค่าน้อยกว่า 80 ซึ่งพบว่าทั้งไอออนบวก และไอออนลบส่วนใหญ่ไม่มีผลรบกวนต่อการเพิ่มความเข้มข้นและการวิเคราะห์นิกเกิล แคดเมียม และตะกั่ว

ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำตัวอย่างจริงจากแม่น้ำน่านที่ทำการตรวจวัด พบว่าค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6-9 และมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 26-29 องศาเซลเซียส โดยตรวจพบนิกเกิล ปริมาณ 0.0132 มิลลิกรัมต่อลิตร ในบริเวณอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก แต่มีปริมาณที่ไม่มากเกินค่ามาตรฐาน (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนตะกั่ว ตรวจพบที่ อำเภอเมือง และอำเภอบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก รวมทั้งอำเภอตะพานหิน จังหวัดพิจิตร ในช่วง 0.0553-0.0780 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเกินมาตรฐานเล็กน้อย (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตามตรวจไม่พบแคดเมียมในจุดเก็บตัวอย่างทุกจุด ทั้งนี้ปริมาณโลหะที่ตรวจพบอาจมีการเปลี่ยนแปลง ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตามฤดูกาล และปริมาณน้ำในแต่ละช่วงเวลาที่มีการเก็บสุ่มตัวอย่างด้วย

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า เยื่อเปลือกไข่ (ESMs) เป็นวัสดุดูดซับธรรมชาติ (biosorbent) ที่สามารถใช้สำหรับเป็นวัสดุในการเพิ่มความเข้มข้นโลหะหนัก เช่น นิกเกิล แคดเมียม และตะกั่วได้ โดยสามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคฟลอมอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตเมตรี

## Output ที่ได้จากโครงการ

1. ได้นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ (Poster Presentation) ในการประชุมวิชาการนานาชาติ Pure and Applied Chemistry International Conference 2011 ซึ่งมีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract เมื่อ 5-7 มกราคม 2554 ในหัวข้อเรื่อง “Development of eggshell membranes as solid phase adsorbent for preconcentration of Cd(II), Pb(II) and Ni(II) coupled with flame atomic absorption spectrometry”
2. ได้นำเสนอในรูปแบบบรรยาย (Oral Presentation) ในการประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 3 ซึ่งมีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract เมื่อ 14-15 มีนาคม 2554 ในหัวข้อเรื่อง “Development of eggshell membranes as solid phase adsorbent for preconcentration of Cd(II), Pb(II) and Ni(II) coupled with flame atomic absorption spectrometry”
3. ได้นำเสนอในรูปแบบบรรยาย (Oral Presentation) ในการประชุมทางวิชาการนเรศวรวิจัยครั้งที่ 7 ซึ่งมีการตีพิมพ์บทความบน Proceedings เมื่อ 29-30 กรกฎาคม 2554 ในหัวข้อเรื่อง “การพัฒนาเยื่อเปลือกไข่เป็นของแข็งดูดซับ สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักแคดเมียมที่ปนเปื้อนในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี”
4. ได้นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ (Poster Presentation) ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37 (วทท 37) ซึ่งมีการตีพิมพ์บทความบน Proceedings เมื่อ 10-12 ตุลาคม 2554 ในหัวข้อเรื่อง “Eggshell membranes-based preconcentration coupled with flame atomic absorption spectrometry for trace Ni(II) and Cd(II) residues in Nan River of Phitsanulok province”
5. ส่งผลงานเพื่อตีพิมพ์ในวารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร ในหัวข้อเรื่อง “Development of eggshell membranes as solid phase adsorbent for Cd(II), Pb(II) and Ni(II) coupled with flame atomic absorption spectrometry”

# **Output 1**

**PACCON 2011**



### **AC\_A0002: Electrocatalytic determination of ascorbic acid by gold-cysteamine-lysine-Cu<sup>2+</sup> Self assembled monolayer modified electrode**

Rostam Shabani\*, Abdolreza Rahpima

*Chemistry Department, Islamic Azad University of Firouzabad, Firouzabad 74715-117, Iran*

Electrocatalytic activity of Cu<sup>2+</sup> immobilized on the topside of Gold-cysteamine-glutar aldehyde-Lysine (Au-CA-GA-Lys) self assembled monolayer (SAM) electrode investigated by differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV) method. A new gold SAM electrode constructed. This electrode illustrated a selective and reproducible adsorption for Cu<sup>2+</sup>. Preparation steps of the modified electrode were studied by CV. In the absence of Cu<sup>2+</sup>, DPV redox peak for ascorbic acid is observed at about 400 mv with anodic current equal to 0.5 μA vs. Ag/AgCl for 1.0×10<sup>-4</sup> M of ascorbic acid. At presence of Cu<sup>2+</sup> on the modified electrode, anodic peak observed at 300 mv vs. Ag/AgCl with 4.5 μA for 1×10<sup>-6</sup> M of ascorbic acid. This electrocatalytic activity of copper ion could be apply for determination of trace concentration of ascorbic acid. The differential pulse voltammetric response of the SAM modified electrode was linear against the concentration of the ascorbic acid in the ranges of 1×10<sup>-10</sup> - 1×10<sup>-8</sup> and 5×10<sup>-8</sup> - 1×10<sup>-6</sup> with R<sup>2</sup>= 0.9978 and R<sup>2</sup>= 0.9981 respectively at pH=6.0. RSD were determined as 3.6% by DPV.

### **AC\_A0005: Development of eggshell membranes as solid phase adsorbent for preconcentration of Cd(II), Pb (II) and Ni(II) coupled with flame atomic absorption spectrometry**

Tanawat Duangkum\*, Prinya Masawat, Yuthapong Udnan and Wipharat Chaiyasit

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand*

\*E-mail: [z-non\\_kem@hotmail.com](mailto:z-non_kem@hotmail.com)

The eggshell membranes (ESMs) of hen and duck are biosorbent and potentially used as preconcentration material for some heavy metals. In this research, the ESMs of hen and duck were studied in two types; natural and boiled ESMs. Characterization of ESMs by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscope (SEM) demonstrated that the FT-IR spectra showed broad -OH stretching absorption band at 3419 cm<sup>-1</sup> and C-H stretching at 2930 cm<sup>-1</sup>. The peaks observed at 1652 and 1534 cm<sup>-1</sup> represented the amide I and II absorption bands, respectively. These functional groups could therefore capture metal ions. The SEM images of boiled hen and duck ESMs showed that the membrane fibers were mostly destroyed. Therefore, the natural duck eggshell membranes (Dn-ESMs) were selected as preconcentration sorbent in which waste Dn-ESMs were collected from the same place (The biggest Thai dessert factory in Phitsanulok town) to reduce the contamination from raw materials. Dn-ESMs were studied for preconcentration of Cd(II), Pb(II) and Ni(II) in batch method. Effects of ESM amount, sample volume, pH, time of agitation and concentration of eluent were investigated.

### **AC\_A0006: Semi-automation iodometric method using on-line hollow fiber membrane extraction for the determination of selenium**

Suprawee Wongsuchoto and Pakorn Varanusupakul\*

*Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand*

\*Corresponding author. Tel.: +66-2-218-7612; Fax: +66-2-254-1309.

E-mail: [pakorn.v@chula.ac.th](mailto:pakorn.v@chula.ac.th)

A simple, inexpensive and less laborious method has been developed for the determination of Selenium. The method was based on iodometry, where Se(IV) was reduced with iodide yielding iodine. The iodine was then on-line extracted into the organic solvent that has been impregnated and filled in the hollow fiber membrane served as a phase separator. The purple colored extract was then carried to the spectrophotometric detector at wavelength 521 nm. Several parameters affecting the extraction efficiency were investigated and optimized. All processes except loading and washing were controlled with microcontroller on a computer. The working range of 60 - 280 mg L<sup>-1</sup> Se was obtained

# Output 2

การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 3

# Abstract

การประชุมวิชาการ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 3  
The 3<sup>rd</sup> Science Research Conference



กลุ่มที่ 1 สาขาฟิสิกส์ ฟิสิกส์ประยุกต์ ฟิสิกส์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และพลังงาน  
วัสดุศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ศึกษา

กลุ่มที่ 2 สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ศึกษา

กลุ่มที่ 3 สาขาเคมี เคมีสิ่งแวดล้อม และวิทยาศาสตร์ศึกษา

กลุ่มที่ 4 สาขาคณิตศาสตร์ สถิติ และวิทยาศาสตร์ศึกษา

กลุ่มที่ 5 สาขาวิทยาการคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีสารสนเทศ และคอมพิวเตอร์ศึกษา

วันที่ 14-15 มีนาคม 2554

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

O-C12

การพัฒนาเยื่อเปลือกไข่เป็นของแข็งดูดซับ สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนัก แคลเซียม ตะกั่ว และนิกเกิล ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคเฟลอมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี ธนวัฒน์ ดวงคำ, ปริญญามาสวัสดิ์, ยูทธพงษ์ อุณน และวิภารัตน์ เชื้อชวด

Development of eggshell membranes as solid phase adsorbent for preconcentration of Cd(II), Pb (II) and Ni(II) coupled with flame atomic absorption spectrometry

Tanawat Duangkum\*, Prinya Masawat, Yuthapong Udnan and Wipharat Chuachud

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ พิชญ์ โลก 65000

\*Corresponding author. E-mail: z-non\_kem@hotmail.com

บทคัดย่อ

เยื่อเปลือกไข่ของไข่ไก่และไข่เป็ด เป็นตัวดูดซับแบบไบโอซอร์เบนต์ ที่สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุในการเพิ่มความเข้มข้นสำหรับ โลหะหนักบางตัว ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเยื่อเปลือกไข่ของไข่ไก่ และไข่เป็ด 2 ชนิด คือ เยื่อเปลือกไข่สดตามธรรมชาติและเยื่อเปลือกไข่ที่ได้หลังจากการต้ม ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเยื่อเปลือกไข่ ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี พบแถบของ -OH ที่ 3,419 cm<sup>-1</sup>, C-H ที่ 2930 cm<sup>-1</sup> และที่ 1652 และ 1534 cm<sup>-1</sup> เป็นแถบการดูดกลืนของ amide I และ II ตามลำดับ ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้สามารถจับกับไอออนโลหะได้ ส่วนผลจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนพบว่าเส้นใยของเยื่อเปลือกไข่ไก่ และไข่เป็ด ที่ได้หลังจากการต้มถูกทำลายเสียสภาพ เพราะฉะนั้นจึงเลือกเยื่อเปลือกไข่เป็ดสดตามธรรมชาติ เป็นวัสดุในการเพิ่มความเข้มข้น เนื่องจากสามารถเก็บเปลือกไข่เป็ดได้จากแหล่งเดียวกัน (ร้านขนมไทยในจังหวัด พิชญ์ โลก) เยื่อเปลือกไข่เป็ดได้นำไปใช้ในการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียม ตะกั่ว และนิกเกิล ด้วยวิธีแบทช์ และตรวจวัดร่วมกับเทคนิคเฟลอมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี

คำสำคัญ : แคลเซียม, ตะกั่ว, นิกเกิล, เยื่อเปลือกไข่, การเพิ่มความเข้มข้น

Abstract

The eggshell membranes (ESMs) of hen and duck are biosorbent and potentially used as preconcentration material for some heavy metals. In this research, the ESMs of hen and duck were studied in two types; natural and boiled ESMs. Characterization of ESMs by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscope (SEM) demonstrated that the FT-IR spectra showed broad -OH stretching absorption band at 3419 cm<sup>-1</sup> and C-H stretching at 2930 cm<sup>-1</sup>. The peaks observed at 1652 and 1534 cm<sup>-1</sup> represented the amide I and II absorption bands, respectively. These functional groups could therefore capture metal ions. The SEM images of boiled hen and duck ESMs showed that the membrane fibers were mostly destroyed. Therefore, the natural duck eggshell membranes (Dn-ESMs) were selected as a preconcentration sorbent in which waste Dn-ESMs were collected from the same place (The biggest Thai dessert factory in Phitsanulok province). Dn-ESMs were studied for preconcentration of Cd(II), Pb(II) and Ni(II) in batch method coupled with flame atomic absorption spectrometric detection.

Keywords: Cadmium, Lead, Nickel, Eggshell membranes, Preconcentration

# Output 3

การประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 7

เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ

# นเรศวรวิจัย 7

Proceedings of the 7<sup>th</sup> Naresuan Research Conference Volume 2



ก้าวสู่ทศวรรษที่ 3  
มุ่งมั่นงานวิจัยพัฒนาชาติไทยให้ยั่งยืน  
29-30 กรกฎาคม 2554  
มหาวิทยาลัยนเรศวร



การพัฒนาเยื่อเปลือกไข่เป็นของแข็งดูดซับ สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักแคดเมียมที่ปนเปื้อนใน  
แม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคเปลวอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี  
ธันวรัตน์ ดวงคำ ปริญญา มาสวัสดิ์ ยุทธพงษ์ อุดแน่น และ วิภารัตน์ เชื้อชาติ ชัยสิทธิ์

**Development of eggshell membranes as solid phase adsorbent for preconcentration of Cd(II) contaminated in  
Nan river of Phitsanulok province and coupled with flame atomic absorption spectrometry**  
Tanawat Duangkum, Prinya Masawat, Yuthapong Udnan and Wipharat Chuachud Chaiyasith

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok Province.

\*Corresponding author. E-mail: prinyam@nu.ac.th (P. Masawat)

#### บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเยื่อเปลือกไข่ของไข่ไก่และไข่เป็ด 2 รูปแบบ คือ เยื่อเปลือกไข่ที่ยังไม่ได้ผ่านการต้มและเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการต้ม โดยศึกษาลักษณะทางกายภาพของเยื่อเปลือกไข่ ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี พบแถบของ -OH ที่  $3419\text{ cm}^{-1}$ , C-H ที่  $2930\text{ cm}^{-1}$  และที่  $1652$  และ  $1534\text{ cm}^{-1}$  เป็นแถบการดูดกลืนของ amide I และ II ตามลำดับ ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้สามารถจับกับไอออนโลหะได้ ส่วนผลจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน พบว่าเส้นใยของเยื่อเปลือกไข่ไก่ และไข่เป็ด ที่ได้หลังจากการต้มถูกทำลายเสียสภาพ เพราะฉะนั้นจึงเลือกเยื่อไข่เป็ดที่ไม่ได้ต้ม เป็นวัสดุในการเพิ่มความเข้มข้น เนื่องจากสามารถเก็บเปลือกไข่เป็ดได้จากแหล่งเดียวกัน (ร้านขนมไทยในจังหวัดพิษณุโลก) นำไปใช้ในการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียม ด้วยวิธีแอมัลกัมและตรวจวัดร่วมกับเทคนิคเปลวอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี ที่เอชของน้ำตัวอย่างที่ปรับให้เป็น 10 ให้ค่าการดูดซับเท่ากับร้อยละ 100 โดยร้อยละการกลับคืนของโลหะหนักเมื่อใช้การย่อยด้วยกรดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นตัวช่วยอยู่ในช่วงร้อยละ 84 ถึง 108 ได้ประยุกต์วิธีการดังกล่าวกับน้ำตัวอย่างจริง หลังจากที่ผ่านมาการกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำตัวอย่างด้วยเทคนิคการกลั่นแบบต่อเนื่องภายใต้ความร้อน พบว่าแม่น้ำน่านในเขตจังหวัดพิษณุโลกตรวจไม่พบปริมาณแคดเมียมปนเปื้อนโดยใช้เทคนิคดังกล่าว

**คำสำคัญ :** แคดเมียม เยื่อเปลือกไข่ การเพิ่มความเข้มข้น

#### Abstract

In this research, the ESMs of hen and duck were studied in two types; natural and boiled ESMs. Characterization of ESMs by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscope (SEM) demonstrated that the FT-IR spectra showed broad -OH stretching absorption band at  $3419\text{ cm}^{-1}$  and C-H stretching at  $2930\text{ cm}^{-1}$ . The peaks observed at  $1652$  and  $1534\text{ cm}^{-1}$  represented the amide I and II absorption bands, respectively. These functional groups could therefore capture metal ions. The SEM images of boiled hen and duck ESMs showed that the membrane fibers were mostly destroyed. Therefore, the natural duck eggshell membranes (Dn-ESMs) were selected as a preconcentration sorbent in which waste Dn-ESMs were collected from the same place (the biggest Thai dessert factory in Phitsanulok province). Dn-ESMs were studied for preconcentration of Cd(II) in batch method coupled with flame atomic absorption spectrometric detection. A pH value of sample solution adjusted to pH 10 for Cd(II) was adopted as the optimum pH value for the next study. The maximum adsorption of Cd(II) on Dn-ESMs were 100%. Recoveries of heavy metals ranging from 84% to 108% were obtained from the ultrasonic assisted acid digestion, which suggests the ESM can be used as an adsorbent for heavy metals preconcentration from real water samples after heating under reflux. The result found that the concentration of Cd(II) in Nan River in Phitsanulok province was not found by the proposed method.

**Keywords:** Cadmium, Eggshell membranes, Preconcentration



## บทนำ

แคดเมียม (U.S. Department of Health and Human Services) เป็นโลหะที่พบในสินแร่สังกะสี ตะกั่วและทองแดง โดยแคดเมียมเป็นผลพลอยได้จากการถลุงแร่ดังกล่าว แคดเมียมเป็นโลหะสีขาวเทา มีลักษณะอ่อนดัดได้ ภาวะพิษจากแคดเมียมเป็นภาวะพิษที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขชนิดหนึ่ง เพราะโลหะชนิดนี้อาจมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน หิน น้ำ และปุ๋ยจากดินแร่ (mineral fertilizers) เป็นต้น และส่งผลกระทบต่อประชากรเป็นวงกว้าง แคดเมียมร้อยละ 50 ใช้ในอุตสาหกรรม และสินค้าอุปโภค เช่น ใช้ในพลาสติก ใช้ในการเคลือบเงาด้วยไฟฟ้าที่เรียกว่า Electroplated coating จะได้ว่าโลหะที่เคลือบด้วยแคดเมียมเป็นเงางามและทนต่อการกัดกร่อน ไม่เป็นสนิม นอกเสียจากจะมีการหลุดลอกของแคดเมียมที่เคลือบอยู่ แคดเมียมสามารถเข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้จากการทำเหมืองแร่ การอุตสาหกรรม การเผาถ่านหิน และการเผาขยะตามบ้านเรือน ซึ่งเป็นอันตรายที่อยู่ใกล้ตัวอย่างยิ่ง อนุภาคของแคดเมียมสามารถปนเปื้อนในน้ำและดินจากการทิ้งขยะ และการรั่วไหลของสารพิษจากสถานที่เก็บ ซึ่งบางรูปของแคดเมียมสามารถละลายน้ำได้ แต่ไม่ละลายตัวในสิ่งแวดล้อม ปลา พืช และสัตว์ รวมถึงสิ่งมีชีวิตอย่างมนุษย์ที่อยู่ในระบบห่วงโซ่อาหาร เมื่อได้รับแคดเมียมจากสิ่งแวดล้อมจะสะสมอยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานาน และสะสมเพิ่มขึ้นทุก ๆ ปีจากการรับเข้ามาที่ละน้อย ๆ

แม่น้ำน่าน เป็นแม่น้ำซึ่งไหลผ่านในหลายจังหวัดและมีความสำคัญอย่างมากในด้านการอุปโภค บริโภค เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำและปริมาณโลหะหนักในแหล่งน้ำ เพื่อคุณภาพชีวิตที่ดีของประชากร และเพื่อเป็นการป้องกันผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นในหลายภาคส่วนจากการใช้ทรัพยากรน้ำ ในปัจจุบันการขยายตัวของชุมชนเมืองและจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น (สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2551) ทำให้มีน้ำทิ้งจากกิจกรรมต่าง ๆ ปนเปื้อนในแหล่งน้ำมากขึ้นรวมสิ่งโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมซึ่งมีผลกระทบต่อห่วงโซ่อาหาร ส่วนใหญ่เป็นธาตุที่อยู่ในกลุ่มโลหะทรานซิชัน มีความว่องไวเพาะมากกว่า 4 ขึ้นไปสามารถสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานานซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม งานวิจัยนี้จะทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำและปริมาณโลหะหนักแคดเมียมที่ปนเปื้อนในลำน้ำน่านในเขต จังหวัดพิษณุโลก เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังและติดตามคุณภาพน้ำ และเพื่อเป็นแนวทางในการจัดการคุณภาพน้ำของแม่น้ำน่านต่อไป ซึ่งเกณฑ์มาตรฐานของโลหะแคดเมียมที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำผิวดิน และยอมรับได้จะต้องมีค่าไม่เกินกว่า 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับน้ำที่มีความกระด้างในรูปของ  $\text{CaCO}_3$  ไม่เกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับน้ำที่มีความกระด้างในรูปของ  $\text{CaCO}_3$  เกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะต้องมิใช่แคดเมียม ไม่เกินกว่า 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8, 2537) ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากในธรรมชาติ และน้อยเกินกว่าจุดที่เครื่องมือจะสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ทำให้ไม่สามารถบอกถึงปริมาณของโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างได้ จึงต้องมีการเตรียมตัวอย่างน้ำในแม่น้ำสำหรับการหาปริมาณโลหะน้อย ๆ ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะแคดเมียมในแม่น้ำน่าน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการเพิ่มความเข้มข้นให้กับสารตัวอย่าง โดยการเพิ่มความเข้มข้น (Preconcentration) เป็นเทคนิคในการเตรียมหรือแยกสารตัวอย่างที่ให้การวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นมากขึ้น มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในตรวจวิเคราะห์ ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ UV-Visible Spectrophotometry, Flame Atomic Absorption Spectrophotometry, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

วัสดุดูดซับสำหรับเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักที่มีปริมาณน้อย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) ตัวดูดซับที่สังเคราะห์ (Synthetic sorbent) ขึ้นมาเพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงกับไอออนโลหะ แต่มีราคาแพง มีขั้นตอนในการเตรียมที่ยุ่งยาก เช่น ในงานวิจัยของ Serap seyhan et al. (2007) ได้สังเคราะห์ *p-tert-butylcalix[4]arene-1,2-crown-4-anchored chloromethylated polymeric resin beads* สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียม โคบอลต์ นิกเกิล และสังกะสี ซึ่งมีกระบวนการสังเคราะห์หลายขั้นตอน Duhui chen et al. (2009) ได้ทำการสังเคราะห์ และปรับปรุงสภาพของ Chitosan สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์โลหะ ทองแดง ตะกั่ว แคดเมียม ปปรอท และวานาเดียม ปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำธรรมชาติ Anupreet & L'sha (2008) ได้ทำการ



เพิ่มความเข้มข้นของโลหะแคดเมียมในตัวอย่างน้ำ โดยใช้ silica nanoparticle ที่ถูกปรับสภาพด้วย 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol ก่อนใช้เป็นวัสดุดูดซับ ส่วนงานวิจัยของ M. Ghaedi et al. (2009) ได้ปรับสภาพของ activated carbon สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของโลหะ โครเมียม เหล็ก ทองแดง นิกเกิล โคบอลต์ และสังกะสี ในตัวอย่างน้ำและอาหารบางชนิด โดยใช้ bis(2-hydroxy acetophenone)ethylenediimine การใช้วัสดุสังเคราะห์ในกระบวนการเพิ่มความเข้มข้นมีความจำเพาะ และมีประสิทธิภาพในการจับกับโลหะได้ดี แต่วัสดุดูดซับอีกกลุ่มหนึ่งที่มีประสิทธิภาพที่ดีไม่น้อยกว่ากันคือ (2) วัสดุดูดซับที่ไม่ได้สังเคราะห์ (Non-synthetic sorbent) หรือวัสดุธรรมชาติ (Natural sorbent) เป็นวัสดุที่สามารถหาได้ง่าย ไม่มีขั้นตอนในการเตรียมที่ยุ่งยาก และเพียงไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีผลงานวิจัยมากมายที่ศึกษาการตรวจวัด และการกำจัดโลหะหนักบางตัวที่เป็นอันตรายในสิ่งแวดล้อมโดยใช้วัสดุจากธรรมชาติในการดูดซับหรือกำจัดโลหะหนัก เช่น ใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับซึ่งทำจากดินขาว kaolin (Pattarich, n.d.) ศึกษาการดูดซับของโลหะหนักโครเมียม แคดเมียม และตะกั่ว ด้วยวิธีแบทช์ และคอลัมน์ พบว่าความสามารถในการดูดซับ (adsorption capacity) ของโลหะหนักตะกั่วบน Silica gel ด้วยทั้งสองวิธีได้ผลดีกว่าการดูดซับของโลหะหนักแคดเมียม และโครเมียม ตามลำดับ หินปูน (Limestone chips) (Pomputtha & Taraka, 2010) ที่สามารถนำมาใช้ในการกำจัดโลหะหนัก (ตะกั่ว, นิกเกิล, แคดเมียม, โครเมียม และทองแดง) ได้มากกว่าร้อยละ 95 และสามารถปรับสภาพความเป็นกรดของน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี (AAS laboratory) จากพีเอช 2.5 เป็น 7 การกำจัดโลหะหนักจากน้ำเสียในห้องปฏิบัติการยังได้มีการนำเปลือกกล้วย (Chaibu & Chawanchai, n.d.) มาใช้เป็นวัสดุดูดซับโลหะหนัก (แคดเมียม และตะกั่ว) ซึ่งก็สามารถกำจัดได้ถึงร้อยละ 97 ในบางงานวิจัยได้มีการศึกษากำจัดโลหะหนักโดยใช้เปลือกไข่ (Duangdeun, n.d.; Polamesanaporn, 2001; Jai H.P. et al., 2007) ซึ่งพบว่าการกำจัดแคดเมียมด้วยเปลือกไข่ให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า (ร้อยละ 99.8) เปลือกไข่เป็ด (ร้อยละ 86.4) (Duangdeun, n.d.) และเปลือกไข่ไก่ธรรมชาติ (natural eggshell) มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเปลือกไข่ไก่ที่กำจัดโปรตีนออก (protein-removed eggshell) ในการดูดซับไอออนของแคดเมียม (Polamesanaporn, 2001) เนื่องจากเยื่อโปรตีน (protein tissue) ในเปลือกไข่ประกอบไปด้วยหมู่ คาร์บอกซิล เอมีน และ ซัลเฟต ซึ่งมีส่วนช่วยในการจับกับไอออนของแคดเมียม สำหรับอาร์เซนิก (As(V)) ได้ใช้เยื่อเปลือกไข่ (eggshell membrane; ESM) (Zhang et al., 2010) เป็นตัวดูดซับในเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase extraction, SPE) ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค hydride generation atomic fluorescence spectrometry ซึ่งให้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยมีการเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียม และตะกั่ว โดยใช้เส้นผมของคน (Sweilch, 2003) ก่อนการตรวจวัดด้วยเทคนิคเฟลอมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี (FAAS) ซึ่งเส้นผมก็เป็นกลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่า keratin และมีหมู่ฟังก์ชันของ sulfhydryl amino และ carboxylate ที่สามารถจับกับโลหะหนักได้

จากงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า วัสดุธรรมชาติสามารถใช้ในกระบวนการดูดซับเพื่อกำจัดโลหะหนัก และใช้เพื่อการเพิ่มความเข้มข้นของโลหะได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกที่จะศึกษาเยื่อเปลือกไข่สำหรับใช้เป็นวัสดุดูดซับโลหะหนักแคดเมียม เนื่องจากเปลือกไข่เป็นวัสดุธรรมชาติที่หาได้ง่ายและมีคุณสมบัติที่น่าสนใจสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นวัสดุดูดซับ (Biomaterial adsorbent) ซึ่งยังไม่พบในรายงานวิจัยที่ใช้เยื่อของเปลือกไข่เป็นวัสดุดูดซับในกระบวนการเพิ่มความเข้มข้นของโลหะแคดเมียม ก่อนการตรวจวัดด้วยเทคนิคเฟลอมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายรวดเร็ว ราคาถูก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับการวิเคราะห์โลหะหนักที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำน่านได้จริง

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมเยื่อเปลือกไข่ : Eggshell membranes (ESMs)

เก็บเปลือกไข่ไก่ และเปลือกไข่เป็ดจากร้านอาหารและร้านอาหารไทย ซึ่งแบ่งเป็นเปลือกไข่ที่ยังไม่ได้ผ่านการต้ม และเปลือกไข่ที่ผ่านการต้ม แล้วนำมาลอกเอาเฉพาะส่วนเยื่อข้างในให้สะอาดแช่ในกรดไนตริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร นาน 12 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนหลาย ๆ ครั้ง (Zhang et al., 2010) ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ



80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง บดเยื่อเปลือกไซท์แห้งด้วยเครื่องบด (Pulverisette 6, FRITSCH, Germany) จากนั้นนำมากรองผ่านตะแกรงขนาด 25 เมช และศึกษาลักษณะทางกายภาพของเยื่อเปลือกไซท์ ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (FT-IR, Spectrum GX, Perkin Elmer, US) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (SEM, 1455 VP, LEO, England) เพื่อใช้ดูรูปร่างพื้นผิว และความแตกต่างของเยื่อเปลือกไซท์ และใช้เปิดก่อนทำการทดลองขั้นต่อไป

## 2. ศึกษาผลของพีเอช ของตัวอย่างต่อการดูดซับของแคดเมียม (II) บนเยื่อเปลือกไซท์

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานแคดเมียม (II) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐาน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cd(II) 1000 mg/L, AVS Titrimorm, UK) ศึกษาพีเอชในช่วง 4-14 โดยปรับพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

2.2 ซึ่งเยื่อเปลือกไซท์ 500 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นมาตรฐานแคดเมียม (II) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ที่มีพีเอชต่างๆ กัน) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Max-Shake, Heto lab equipment, Denmark) ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกรองแยกน้ำตัวอย่างหลังการดูดซับไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแฟลอมอะตอมมิคแบบซอร์พชันสเปกโทรมิเตอร์ (Flame Atomic Absorption Spectrometer, FAAS, SpectrAA 220, VARIAN, US) เพื่อคำนวณหาร้อยละการดูดซับ (% Adsorption) และนำเยื่อเปลือกไซท์หลังจากการดูดซับศึกษาร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ต่อไป

## 3. ศึกษาชนิด และผลของตัวชะที่มีต่อร้อยละการกลับคืน

เตรียมสารละลายมาตรฐานแคดเมียม (II) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปรับพีเอชให้ได้อัตราการดูดซับสูงสุด (จากการศึกษาในข้อ 2) นำไปเติมในขวดพลาสติกที่บรรจุเยื่อเปลือกไซท์ 500 มิลลิกรัม นำไปเขย่าแล้วนำเยื่อเปลือกไซท์ที่ได้หลังจากการดูดซับนำมาเติมตัวชะแต่ละชนิดปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยตัวชะที่ศึกษาได้แก่ (1) Ethylenediaminetetra acetic acid, EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ), Fisher Scientific, UK (2) Thiourea ( $NH_2CSNH_2$ ), Carlo ERBA, Italy (3) Hydrochloric acid (HCl), RCI Labscan Limited, Thailand (4) Nitric acid ( $HNO_3$ ), RCI Labscan Limited, Thailand เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแยกน้ำสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก ด้วยเทคนิค FAAS เพื่อคำนวณหาอัตราการกลับคืน

## 4. ศึกษาการใช้เทคนิคอัลตราโซนิคเอซิดไอเดเจชัน เป็นตัวช่วยในการสกัด

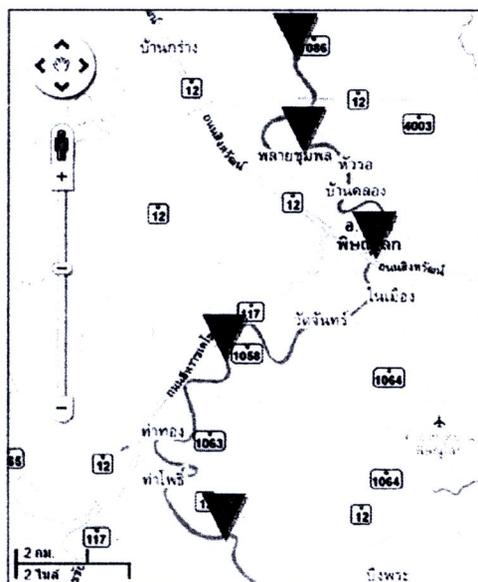
นำเยื่อเปลือกไซท์ที่ได้หลังจากการดูดซับ มาทำการเติมกรดไนตริกกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), Merck Schuchardt OHG, Germany) ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 (Kazi et al., 2009) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ก่อนใช้เครื่องอัลตราโซนิค (Elma S30H Elmasonic, Germany) ในการช่วยสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FAAS และคำนวณหาอัตราการกลับคืน

## 5. การเก็บ และวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง

การเก็บน้ำตัวอย่างจะทำการเก็บแบบแยก ตัวอย่างที่เก็บ ณ เวลาและสถานที่หนึ่งแล้วนำมาวิเคราะห์เป็นตัวอย่างๆ ไป (กรณีการ, 2525) ซึ่งจะเป็นตัวแทนของแหล่งน้ำนั้น เฉพาะเวลาและจุดที่เก็บเท่านั้นตัวอย่างแยกเพียงตัวอย่างเดียวอาจใช้เป็นตัวแทนของแหล่งน้ำบางแห่งได้เสีย เช่น น้ำประปา น้ำผิวดิน และน้ำบ่อลึก โดยจุดทดลองเก็บน้ำตัวอย่าง แสดงในรูปที่ 1 ตั้งแต่จุด A คือ ทำน้ำวัดคู่งวาริต.ท่าโพธิ์ จนถึงจุด E วัดห้วยเคียน ต.จอมทอง อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก ชนิดที่ใช้ในการเก็บน้ำตัวอย่างเป็นขวดพลาสติก (polyethylene) ก่อนทำการเก็บตัวอย่างล้างขวดด้วยน้ำตัวอย่างที่จะเก็บ 2-3 ครั้ง เขียนระบุสถานที่ เวลา วันที่เก็บ วัดอุณหภูมิและพีเอช ให้เรียบร้อยก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน และทำการกำจัดสารอินทรีย์ด้วยเทคนิคการรีฟลักซ์แบบต่อเนื่องภายใต้ความร้อน (Heating under Reflux) (วรรณพร และพงศกร, 2552) การเตรียมน้ำตัวอย่างทำได้โดยนำน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง มา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกรดไนตริก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (อัตราส่วน 1 ต่อ 9) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้สารเข้ากัน นำขวดก้นกลมไป



ต่อเข้ากับชุดอุปกรณ์ Reflux ตั้งอุณหภูมิที่ 130 ถึง 160 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิถึงค่าที่กำหนด (ดูจากเทอร์โมมิเตอร์) จับเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อได้เวลาที่กำหนดนำขวดก้นกลมออกจากชุดอุปกรณ์ Reflux ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำที่บริเวณขวดก้นกลม นำสารละลายในขวดก้นกลมไปปรับพีเอชที่ให้ค่าการดูดซับสูงสุดไปเขย่าตามวิธีในข้อ 2.2 เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การดูดซับ และใช้เทคนิคออสตราโซนิคเอซิดไดเจสชัน เพื่อหาร้อยละการกลับคืน



รูปที่ 1 จุดเก็บน้ำตัวอย่าง

- จุด A: ทำน้ำวัดคู้งวารี ต.ท่าโพธิ์ อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก  
 จุด B: ทำน้ำวัดสว่างอารมณ์ ต.ท่าทอง อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก  
 จุด C: ทำน้ำวัดพระศรีรัตนมหาธาตุ ต.ในเมือง อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก  
 จุด D: ทำน้ำวัดหลายชุมพล ต.หลายชุมพล อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก  
 จุด E: ทำน้ำวัดท่าตะเคียน ต.จอมทอง อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก

#### 6. การคำนวณหาร้อยละการดูดซับ และร้อยละการกลับคืน

$$\text{ร้อยละการดูดซับ} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

$C_i$  = ปริมาณโลหะหนักที่ตรวจพบก่อนการดูดซับ

$C_f$  = ปริมาณโลหะหนักที่ตรวจพบหลังการดูดซับ

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{(C_s + C_{std}) - C_s}{C_{std}} \times 100$$

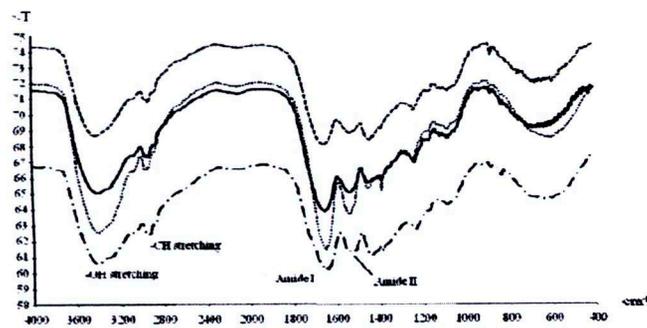
$C_i$  = ปริมาณโลหะหนักในน้ำตัวอย่าง

$C_{std}$  = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

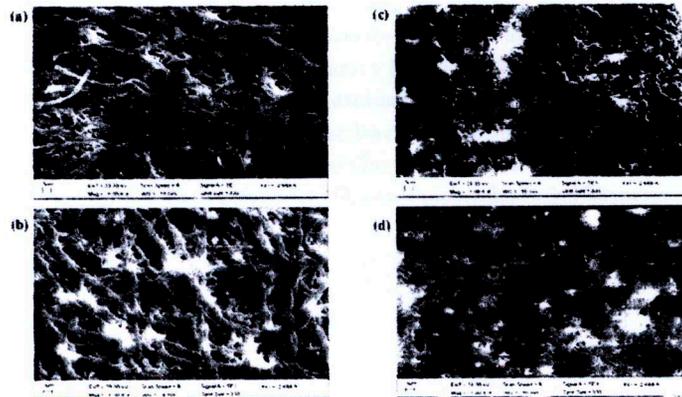


## ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

## ลักษณะทางกายภาพของเยื่อเปลือกไข่



รูปที่ 2 FT-IR สเปกตรัมของเยื่อเปลือกไข่ไก่ และไข่เป็ด โดยแบ่งเป็นเยื่อเปลือกไข่ที่ไม่ได้ผ่านการต้ม และเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการต้ม; Hn-ESMs: เยื่อเปลือกไข่ไก่ที่ไม่ได้ผ่านการต้ม, Dn-ESMs: เยื่อเปลือกไข่เป็ดที่ไม่ได้ผ่านการต้ม, Hb-ESMs: เยื่อเปลือกไข่ไก่ที่ผ่านการต้ม และ Db-ESMs: เยื่อเปลือกไข่เป็ดที่ผ่านการต้ม

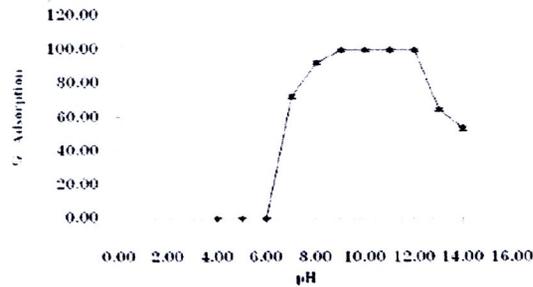


รูปที่ 3 (a-d) ภาพถ่าย SEM ของเยื่อเปลือกไข่ไก่ และไข่เป็ด โดยแบ่งเป็นเยื่อเปลือกไข่ที่ไม่ได้ผ่านการต้ม และเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการต้ม; (a) Hn-ESMs: เยื่อเปลือกไข่ไก่ที่ไม่ได้ผ่านการต้ม, (b) Dn-ESMs: เยื่อเปลือกไข่เป็ดที่ไม่ได้ผ่านการต้ม, (c) Hb-ESMs: เยื่อเปลือกไข่ไก่ที่ผ่านการต้ม และ (d) Db-ESMs: เยื่อเปลือกไข่เป็ดที่ผ่านการต้ม

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเยื่อเปลือกไข่ทั้งสองชนิดด้วยเทคนิค FT-IR พบแถบของ -OH ในช่วง  $3413-3421\text{ cm}^{-1}$ , C-H ช่วง  $2965-2930\text{ cm}^{-1}$  และที่  $1652-1655$  และ  $1529-1541\text{ cm}^{-1}$  เป็นแถบการดูดกลืนของ 1° และ 2° amide ตามลำดับ ซึ่งพบทั้งในเยื่อเปลือกไข่ไก่และเยื่อเปลือกไข่เป็ด ทั้งที่ไม่ได้ผ่านการต้ม และที่ผ่านการต้ม พบหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ที่เหมือนกัน ซึ่งสามารถจับกับไอออนโลหะได้ (Zhang et al., 2010) ส่วนผลจากภาพถ่าย SEM จะสังเกตเห็นว่าเส้นใยของเยื่อเปลือกไข่ไก่ และไข่เป็ด ที่ได้หลังจากการต้ม (รูปที่ 3c-d) ถูกทำลายเสียสภาพเหมือนกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกเปลือกไข่ที่ไม่ได้ผ่านการต้ม โดยเลือกเยื่อเปลือกไข่เป็ด เป็นวัสดุในการเพิ่มความเข้มข้น เนื่องจากสามารถเก็บเปลือกไข่เป็ดได้จากแหล่งเดียวกัน (ร้านขนมไทยในจังหวัดพิษณุโลก) ซึ่งสามารถช่วยลดการปนเปื้อนของเปลือกไข่ที่มาจากหลายๆ แหล่ง



#### ผลของพีเอชของตัวอย่าง ต่อการดูดซับของแคดเมียม (II) บนเชื้อเปลือกไข่

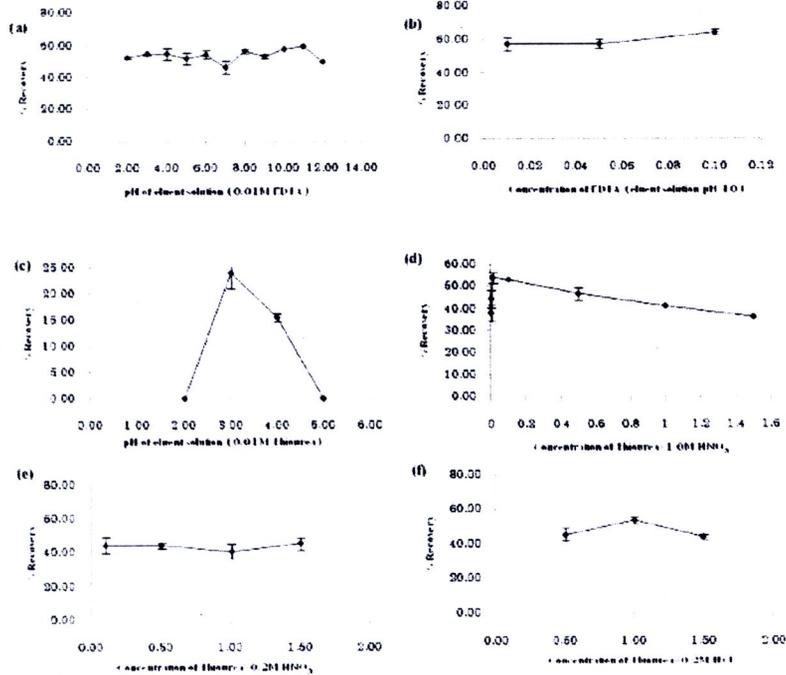


รูปที่ 4 พีเอชของตัวอย่าง ที่มีผลต่อการดูดซับของ แคดเมียม (สารละลายมาตรฐานแคดเมียม (II) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิตร)

การศึกษาพีเอชของตัวอย่าง ที่มีผลต่อการดูดซับของ แคดเมียม โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ ในช่วงพีเอช 4 ถึง 14 จากนั้นนำไปเขย่าร่วมกับเชื้อเปลือกไข่ 500 มิลลิกรัม ที่เตรียมไว้ เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกรองแยกสารละลายหลังการดูดซับไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FAAS และคำนวณหาร้อยละการดูดซับ พบว่า แคดเมียมสามารถดูดซับได้สูงสุดคือร้อยละ 100 ในพีเอชช่วง 9 ถึง 12 ส่วน ซึ่งสังเกตเห็นว่า แคดเมียมมีช่วงของพีเอชในการดูดซับที่กว้าง และหากพีเอชที่เป็นเบสมากเกินไปจะส่งผลให้ค่าการดูดซับลดลง อาจเป็นผลเนื่องมาจากเกิดการตกตะกอนของโลหะที่กั้นขาด ทำให้ในขณะที่ทำการเขย่าไอออนของโลหะหนักไม่สามารถจับกับเชื้อของเปลือกไข่ได้ ดังนั้นในการเลือกพีเอชที่เหมาะสมเพื่อการดูดซับเกิดขึ้นอย่างสูงสุดจึงไม่ควรเลือกพีเอชที่สูงเกินไป จึงเลือกปรับพีเอชของน้ำตัวอย่างให้เท่ากับ 10 เพื่อจะลดโอกาสในการตกตะกอนของโลหะหนักที่พีเอชสูง และเพื่อความสะดวกในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์



ผลของตัวชะ ต่อร้อยละการกลับคืน



รูปที่ 5 (a-f) ผลของพีเอช และความเข้มข้นของตัวชะแต่ละชนิด ต่อร้อยละการกลับคืนของ แคดเมียม (II)

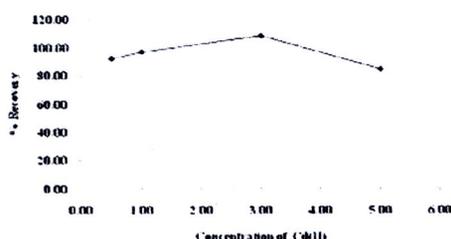
ผลของตัวชะในรูปที่ 5(a-f) ซึ่งได้จากการนำเยื่อเปลือกไข่หลังจากกระบวนการดูดซับมาทำการเติมตัวชะแต่ละชนิด จะเห็นว่าตัวชะแต่ละตัวไม่สามารถให้ค่าร้อยละการกลับคืนที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือร้อยละ 80 ถึง 120 ในรูป 5(a-b) แสดงค่าร้อยละการกลับคืนของแคดเมียมโดยใช้ EDTA (J. A. Sweileh, 2003) ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (พีเอช 10) สามารถชะแคดเมียมได้เพียงร้อยละ 64 (รูป 5b) และเข้มข้นของ EDTA ที่มากกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถเตรียมได้เนื่องจาก EDTA ไม่สามารถละลายได้หมด เมื่อทดลองชะโลหะแคดเมียมโดยใช้ Thiourea (TU) (Li et al., 2009) ค่าร้อยละการกลับคืนแสดงในรูป 5(c-f) ซึ่งเมื่อเตรียม TU ที่ความเข้มข้น 0-1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในกรดไนตริกเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตร (รูป 5d) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TU เพิ่มจนถึงที่ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร TU สามารถชะแคดเมียมออกมาได้สูงสุดเพียงร้อยละ 54 และลดลงเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TU แต่เมื่อเปลี่ยนการเตรียม TU ในกรดไนตริกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร แสดงในรูป 5e ค่าร้อยละการกลับคืนที่ได้ประมาณร้อยละ 41 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นของ TU ส่วนรูป 5f แสดงการใช้ TU ซึ่งเตรียมในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร พบว่าสามารถชะแคดเมียมได้เพียงร้อยละ 54 ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ TU

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจะเห็นว่า เทคนิคการเขย่าอาจไม่เหมาะสมที่จะทำให้แคดเมียม (II) ที่มีกรดดูดซับถึงร้อยละ 100 หลุดออกจากเยื่อเปลือกไข่ได้ ดังนั้นจึงได้ทดลองใช้เทคนิคอัลตราโซนิคเอซิดโดเจสชัน (UAD) ในการศึกษาค่าร้อยละการกลับคืนของแคดเมียมต่อไป



### ผลของการใช้อัลตราโซนิคเอซิดเจสชัน (UAD)

ได้ทำการทดลองหาร้อยละการกลับคืนด้วยการย่อยเยื่อเปลือกไข่ที่ได้หลังจากการทดลองการดูดซับของแคดเมียม (II) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (25 มิลลิลิตร) ด้วยกรดไนตริกกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 (10 มิลลิลิตร) ก่อนนำสารละลายที่ได้หลังจากการย่อยไปปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 25 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค FAAS และคำนวณร้อยละการกลับคืน ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนของแคดเมียม อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือมากกว่าร้อยละ 80



รูปที่ 6 ร้อยละการกลับคืนของแคดเมียม (3 มิลลิกรัมต่อลิตร, 25 มิลลิลิตร) โดยเทคนิค UAD

### ผลการทดลองกับน้ำตัวอย่างจริง

นำน้ำตัวอย่างหลังจากที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และผ่านการกำจัดสารอินทรีย์ (Heating under Reflux) เรียบร้อยแล้วมาทำการปรับพีเอชของตัวอย่างให้เป็น 10 และแบ่งสารตัวอย่างออกเป็น 2 ชุด คือ (1) sample (2) sample + standard (1ppm) และ blank ที่เป็นน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำไปเขย่ากับเยื่อเปลือกไข่เพื่อหาค่าการดูดซับ และกรองแยกเยื่อเปลือกไข่ไปย่อยด้วยเทคนิคอัลตราโซนิคเอซิดเจสชัน และหาค่าร้อยละการกลับคืน ซึ่งได้ผลดังตาราง 1

ตาราง 1 ค่าการดูดซับและร้อยละการกลับคืน

จุดเก็บน้ำตัวอย่าง	ความเข้มข้นเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของแคดเมียมในน้ำตัวอย่างที่กรองแยกออกมา หลังการดูดซับ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดซับ (%) <sup>a</sup>	ความเข้มข้นของแคดเมียม	
				ที่ตรวจพบหลังผ่าน การย่อยด้วยเทคนิค UAD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการกลับคืน (%) <sup>a</sup>
น้ำวัดคูรงวารี	0	ND	-	ND	-
	1	0.0860	93.4±0.003	0.9159	91.8±0.051
น้ำวัดสว่างอารมณ์	0	ND	-	ND	-
	1	0.0437	93.4±0.007	0.9264	92.8±0.030
น้ำวัดพระศรีรัตนมหาธาตุ	0	ND	-	ND	-
	1	0.0829	91.7±0.004	0.8997	90.0±0.004
น้ำวัดพลายชุมพล	0	ND	-	ND	-
	1	0.0716	92.8±0.006	0.9197	92.0±0.014
น้ำวัดท่ามะเคียน	0	ND	-	ND	-
	1	0.0313	96.9±0.006	0.9522	95.2±0.034

<sup>a</sup> Mean value ± standard deviation (n=3). LOD (n=25): limit of detection = 0.002 mgL<sup>-1</sup>

ND: not detected (below the limit of detection)



### สรุปผลการทดลอง

เยื่อเปลือกไข่เปิดที่ไม่ได้ผ่านการต้ม (Dn-ESMs) ได้ถูกเลือกนำมาใช้ศึกษาเพื่อเป็นวัสดุในกระบวนการเพิ่มความเข้มข้น ในการศึกษาเพื่อของตัวอย่างที่ส่งผลต่อการดูดซับ พบว่า พีเอช 10 เหมาะสำหรับดูดซับแคดเมียม (II) ซึ่งให้ค่าการดูดซับเท่ากับร้อยละ 100 จากการศึกษาค่าร้อยละการกลับคืนด้วยวิธีการเขย่าแบบเบบซ์ พบว่าไม่สามารถให้ค่าร้อยละการกลับคืนที่น่าพอใจ คือต่ำกว่าร้อยละ 80 จึงทดลองเปลี่ยนวิธีในการค่าร้อยละการกลับคืนของแคดเมียม โดยใช้เทคนิคอัลตราโซนิคเอซิดไดเจสชัน (ultrasonic acid digestion, UAD) พบว่าได้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 84 ถึง 108 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ และเมื่อนำไปทดลองประยุกต์ใช้กับน้ำตัวอย่างจริงในแม่น้ำน่าน ซึ่งต้องผ่านกระบวนการกำจัดสารอินทรีย์ด้วยเทคนิคการรีฟลักซ์แบบต่อเนื่องภายใต้ความร้อน (Heating under reflux) ก่อนเข้าสู่กระบวนการต่าง ๆ ก็พบว่าเยื่อเปลือกไข่เปิดสามารถนำไปใช้ได้กับตัวอย่างจริง ได้ค่าร้อยละการดูดซับอยู่ในช่วงร้อยละ 91 ถึง 96 และร้อยละการกลับคืนร้อยละ 90 ถึง 95 แต่ตรวจไม่พบปริมาณของแคดเมียมที่ปนเปื้อนในแม่น้ำน่าน

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และการสนับสนุนจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และน้อง ๆ ผู้ร่วมทำวิจัย นางสาวรุ่งรัตน์ อูระเพ็ญ และนางสาวกรรณา บุรีรักษ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลงได้ด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

- กรณีการณ์ ลิ่วสิงห์. (2552). *เคมีของน้ำ น้ำโสโครก และการวิเคราะห์*. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: บริษัท ประยูร วงศ์ จำกัด.
- ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8. (2537). *ออกตามความในพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ.2535. เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน*. สืบค้นเมื่อวันที่ 11 มีนาคม 2554. จาก [http://infofile.pcd.go.th/law/3\\_14\\_water.pdf?CFID=3596712&CFTOKEN=20552557](http://infofile.pcd.go.th/law/3_14_water.pdf?CFID=3596712&CFTOKEN=20552557)
- วรรณพร สิงห์บุญ และพงศกร ชันมณี. (2552). *การหาปริมาณโลหะหนักที่ตกค้างในลำน้ำน่าน อ่างทองเมือง จังหวัดพิษณุโลก*. วท.บ.เคมี., คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
- สำนักจัดการคุณภาพน้ำ. (2551). *รายงานประจำปี สำนักจัดการคุณภาพน้ำ พ.ศ. 2551* กรุงเทพฯ: สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- Chaibu, P & Chawanchai, B. (n.d.). *The use of longan peel as an adsorbent for metal ion (cadmium and lead) adsorption in aqueous solution*. Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University.
- Chen, D., Hu, B & Huang, C. (2009). Chitosan modified order mesoporous silica as micro-column packing materials for on-line flow injection-inductively-coupled plasma optical emission spectrometry determination of trace heavy metal in environmental water sample. *Talanta*, 78, 491-497.
- Duangdeun, U. (n.d.). *Removal of cadmium by waste egg shell*. Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Kasatsart University, Bangkok.
- Im-crbrath, S. (2005). *Reduction of some heavy metals contaminated in water using seaweed*. M.Sc. Thesis in Science (Chemistry).. Chiang Mai University, Chiang Mai.



- Jai, H. P., Wook, J. S., Kyu, Y. J., Gil K. B. & Mok, L. S. (2007). Removal of heavy metals using waste eggshell. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 1436-1441.
- Kaur, A & Gupta U. (2008). A preconcentration procedure using 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol anchored to silica nanoparticle for the analysis of cadmium in different samples. *E-Journal of Chemistry*, 5(4), 930-939.
- Kazi, T. G., Jamali, M. K., Arain, M. B., Afridi, H. I., Jalhani, N., & Sarfraz R. A. et.al. (2009). Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 1391-1398.
- Li, Z., Chang, X., Zou, X., Zhu, X., Nie, R., & Hu, Z. et.al. (2009). Chemically-modified activated carbon with ethylenediamine for selective solid-phase extraction and preconcentration of metal ions. *Analytica Chemica Acta*, 632, 272-277.
- Pattarith, K. (n.d.). *Production of heavy metal adsorbent from natural material*. Department of Chemistry. Faculty of Science, Rajabhat Institute Phranakhon Sri Ayutthaya.
- Polamesanaporn, Y. (2001). *Development of an adsorbing material from egg shell for the removal of cadmium*. M.Sc. Thesis in Natural Resources Management., King Mongkut's University of Technology Thonburi.
- Pornputtha, M & Taraka, S. (2010). Elimination of heavy metals and acidity of liquid waste from laboratory using limestone chips. *Science Journal*, 64(1), 81-88.
- Sekhan, S., Colak, M., Merdivan, M & Demirel, N. (2007). Solid phase extractive preconcentration of metals using *p*-tert-butylcalix[4]arene-1,2-crown-4-anchored chloromethylated polymeric resin beads. *Analytica Chemica Acta*, 584, 462-468.
- Sweilth, J. A., (2003). Sorption of trace metals on human hair and application for cadmium and lead preconcentration with flame atomic absorption determination. *Anal Bioanal Chem*, 375, 450-455.
- U.S. Department of Health and Human Services. (1999). *Top 20 Hazardous Substances*. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Retrieved May 11, 2011, from [http://library.uru.ac.th/webdb/images/charpa\\_cadmium.html](http://library.uru.ac.th/webdb/images/charpa_cadmium.html)
- Zhang, Y., Wang, W., Li, L., Huang, Y. & Cao, J. (2010). Eggshell membrane-based solid-phase extraction combined with hydride generation atomic fluorescence spectrometry for trace arsenic (V) in environmental water samples. *Talanta*, 80, 1907-1912.

# Output 4

ภาพ 37



คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยมหิดล

37<sup>TH</sup> CONGRESS ON SCIENCE  
AND TECHNOLOGY  
OF THAILAND

*Creative Sciences  
for Creating the Future*

วิทยาศาสตร์สร้างสรรค์  
เพื่อสรรค์สร้างอนาคต

วทท 37

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์  
และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37

10 - 12 ตุลาคม 2554  
ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ

[www.sc.mahidol.ac.th/stt37](http://www.sc.mahidol.ac.th/stt37)  
[www.stt37.scisoc.or.th](http://www.stt37.scisoc.or.th)

Organized by :  
The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King  
in association with the Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok Thailand

**EGGSHELL MEMBRANES-BASED PRECONCENTRATION COUPLED WITH FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY FOR TRACE Ni(II) AND Cd(II) RESIDUES IN NAN RIVER OF PHITSANULOK PROVINCE**

Tanawat Duangkum, Prinya Masawat,\* Yuthapong Udnan, Wipharat Chuachud Chaiyasith

Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

\*e-mail: tana\_dk@hotmail.com

**Abstract:** In this research, the eggshell membranes (ESMs) of hen and duck were studied in two types: natural and boiled ESMs. Characterization of ESMs by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscope (SEM) demonstrated that the FT-IR spectra showed broad -OH stretching absorption band at  $3419\text{ cm}^{-1}$  and C-H stretching at  $2930\text{ cm}^{-1}$ . The peaks observed at  $1652$  and  $1534\text{ cm}^{-1}$  represented the amide I and II absorption bands, respectively. These functional groups could therefore capture metal ions. The SEM images of boiled hen and duck ESMs showed that the membrane fibers were mostly destroyed. Therefore, the natural duck eggshell membranes (Dn-ESMs) were selected as a preconcentration sorbent in which waste Dn-ESMs were collected from the same place (the biggest Thai dessert factory in Phitsanulok province). Dn-ESMs were studied for preconcentration of Ni(II) and Cd(II) in batch method coupled with flame atomic absorption spectrometric detection. Under the optimum analytical condition, the maximum adsorption of both of  $3.0\text{ mg L}^{-1}$  Ni(II) and Cd(II) on Dn-ESMs were 100%. Recoveries of heavy metals were obtained from the ultrasonic assisted acid digestion. Detection limits were found as low as  $0.015\text{ mg L}^{-1}$  for Ni(II) and  $0.002\text{ mg L}^{-1}$  for Cd(II) with enrichment factors of 2.61 for Ni(II) and 2.96 for Cd(II), and relative standard deviations (RSD) were 6.6% and 5.1%, respectively. The results showed that the concentrations of Ni(II) and Cd(II) in Nan River in Phitsanulok province were not detected by the proposed method.

**Introduction:** Toxic heavy metals (THMs) contamination is the most important parameters indicated quality of surface water. There is an increasing demand for accurate and sensitive quantitative THMs analysis. By using simplicity and low initial and running cost technique such as flame atomic absorption spectroscopy (FAAS), sample preconcentration is a crucial treatment step because FAAS provides low sensitivity for the ultra-trace THMs concentration usually encountered in river water samples. In recent years, many solid-phase adsorbents have been developed to preconcentrate heavy metals prior to FAAS. The sorbent material consists of two types, i.e. synthetic and biosorbent. Many researchers used synthetic sorbents as preconcentration material such as Diaion HP-2MG/dithizone,<sup>1</sup> Chromosorb108/bathocuproinedisul-fonic,<sup>2</sup> Octadecyl bonded Silica membrane disk Modified with Cyanex302<sup>3</sup> and Multiwalled carbon nanotube/*o*-cresolphthalein complexone<sup>4</sup>. These materials were used for determination of some heavy metals. Although the methods was claimed that they are simple, accurate and can be applied for the determination of heavy metals in environmental sample but using synthetic adsorbent leads to cost effective in a large-scale production and time consuming. Therefore, it is interesting to study the preconcentration of heavy metals by using natural adsorbent or biosorbent. The term 'natural adsorbent' is assigned to any material that is not synthetically produced and has adsorptive properties in terms of chemical species of inorganic and organic origins.<sup>5</sup> Human hair<sup>6</sup>, Soybean hull<sup>7</sup>, *Bacillus sphaericus* immobilized on Diaion SP-850<sup>8</sup> and *Agrobacterium*

*amefaciens* immobilized on Amberlite XAD-4<sup>9</sup> were used as adsorbents for determination of heavy metals in food and environment samples.

Eggshell membrane (ESM)-based material is a novel, robust, microporous, cost effective, easily available organic support material. It contains several surface functional groups such as amines, amides and carboxylic groups with potential as SPE adsorbent for metal species.<sup>10</sup> ESM has been used for enrichment as solid phase extraction (SPE) for As(V) preconcentration followed by hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HGA-AFS),<sup>10</sup> Cr(VI),<sup>11</sup> and Se(IV) and Se(VI)<sup>12</sup> followed by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). However, to the best of our knowledge, there is no report on natural biomaterial ESM-based adsorbent for heavy metals as solid phase extraction (SPE) prior to FAAS. Consequently, the main objective of this work is to develop an analytical method for the determination of Cd(II) and Ni(II) residues in Nan River by using natural ESM and detection with FAAS.

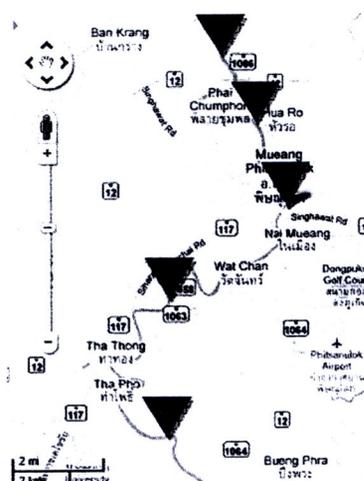
#### Methodology:

**Preparing of Eggshell membranes (ESMs):** Eggshell membranes (ESMs) of hen and duck were studied in two types; natural and boiled ESMs. ESMs of hen were collected from waste of vendor shops while ESMs of duck were collected from the biggest Thai dessert factory in Phitsanulok province. After thoroughly washed with deionized water (DI), the ESMs were carefully peeled, soaked in 1 mol L<sup>-1</sup> nitric acid for 12 h and rinsed with DI water. The ESMs were dried at 80 °C for 4 h and milled to get the particle size of 25 meshes. Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscope (SEM) were used for characterization of natural and boiled ESMs. The ESMs were studied for preconcentration of Ni(II) and Cd(II) in batch method.

**Effect of pH on adsorption:** The 25.0 mL of 3 mg L<sup>-1</sup> of Ni(II) and Cd(II) were adjusted to different pH. Then, the solutions were shaken with 500.0 mg (dry weight) of Dn-ESMs at 200 rpm for 1 h at room temperature followed by filtration the solutions for adsorption study by FAAS. The Dn-ESMs were finally digested with acid mixtures of HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2:1, v/v) by using ultrasonic water bath at 70 °C for 30 min. The final volume was made up to 10 mL with deionized water for determination by FAAS.

**Effect of interfering ions:** The effect of ions commonly presented in water samples on the recovery of Ni(II) and Cd(II) was studied at appropriate level of diverse ions. In these experiments, solutions of 0.5 mg L<sup>-1</sup> of Ni(II) and Cd(II) that contains the added interfering ions were analyzed according to the proposed procedure. The tolerance level of coexisting ions defined as the largest amount making the recoveries of Ni(II) and Cd(II) less than 80%.

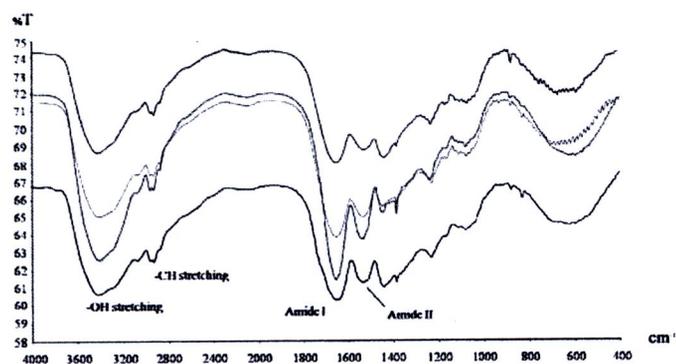
**Analysis of real sample:** The river water samples were collected in polyethylene bottles from Nan River of Phitsanulok province which flow through in several regions and important in many agricultural areas. The regions of sampling (Figure 1) cover a surface water type without treatment with concentrated nitric acid, and analyzed immediately after collected. The water samples were filtered through 0.45 µm cellulose acetate membrane then adjusted the pH to 9 for Ni(II) and 10 for Cd(II), subsequently, analyzed by the proposed method and FAAS.



**Figure 1.** Map of the sampling site locations of Muang Phitsanulok

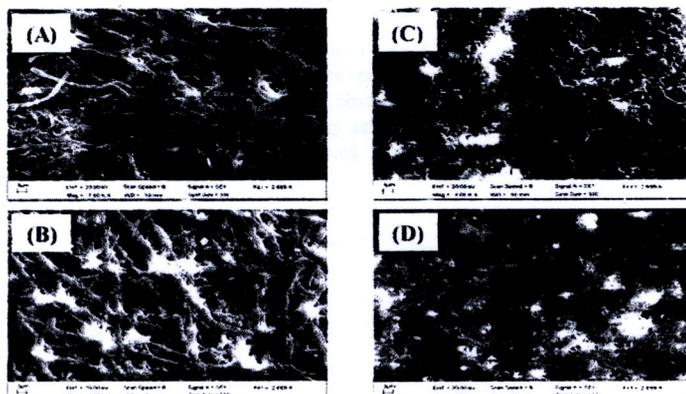
- A: Wat Khung Waree, Tha Pho
- B: Wat Sawang Arom, Tha Thong
- C: Wat Phra Si Rattana Mahathat, Nai Muang
- D: Wat Phai Chumphon, Phai Chumphon
- E: Wat Tha Takhian, Jhom Thong

### Results, Discussion and Conclusion: Characterization of ESMs:



**Figure 2.** FT-IR spectra of natural and boiled eggshell membranes of hen and duck:

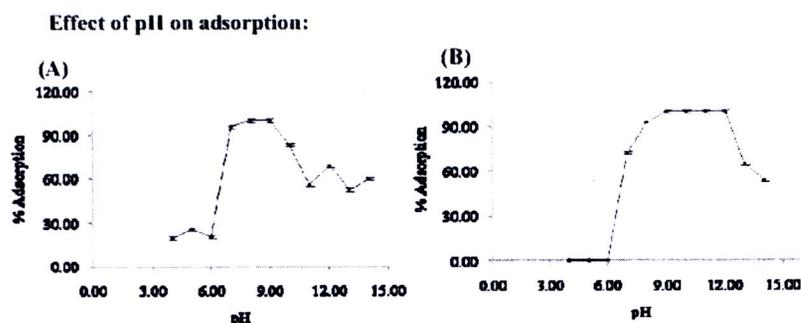
- IIn-ESMs: natural hen eggshell membranes
- Dn-ESMs: natural duck eggshell membranes
- IIb-ESMs: boiled hen eggshell membranes
- Db-ESMs: boiled duck eggshell membranes



**Figure 3.** SEM images of natural and boiled eggshell membranes of hen and duck; (A) Hn-ESMs: natural hen eggshell membranes  
(B) Dn-ESMs: natural duck eggshell membranes  
(C) Hb-ESMs: boiled hen eggshell membranes  
(D) Db-ESMs: boiled duck eggshell membranes

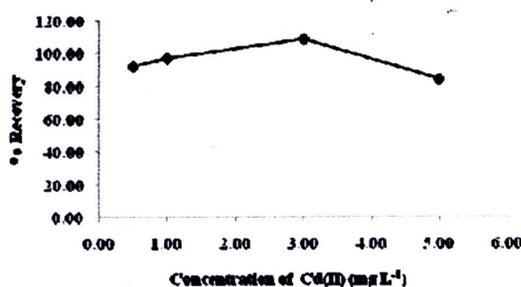
Characterization of ESMs by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscope (SEM) demonstrated that the FT-IR spectra (Figure 2) showed broad -OH stretching absorption band at  $3419\text{ cm}^{-1}$  and C-II stretching at  $2930\text{ cm}^{-1}$ . The peaks observed at  $1652$  and  $1534\text{ cm}^{-1}$  represented the amide I and II absorption bands, respectively. These functional groups could therefore capture metal ions. The SEM images (Figure 3) of boiled hen and duck ESMs showed that the membrane fibers were mostly destroyed than natural ESMs. This may have an effect on adsorption of heavy metals.

Therefore, the natural duck eggshell membranes (Dn-ESMs) were selected as preconcentration sorbent, which waste Dn-ESMs were collected from the same place (the biggest Thai dessert factory in Phitsanulok town) to reduce the contamination from raw materials.



**Figure 4.** Effect of pH on adsorptions of (A) Ni(II) and (B) Cd(II)

The maximum adsorption of Ni(II) and Cd(II) on Dn-ESMs were obtained between pH 8 to 9 (Figure. 4A) and pH 9 to 12 (Figure. 4B), respectively. A pH 9 and 10 were selected as the optimum pH value for Ni(II) and Cd(II), respectively. Ultrasonic acid digestion (UAD) techniques required for recoveries study. The result presented in Figure 5 showed that the recoveries of Cd(II) were observed in the range of 84 to 108%. Which demonstrated that the proposed method was satisfactory for Cd(II) analysis. It should be indicated that good recoveries can be obtained for Ni(II) as well as Cd(II) by using UAD technique.



**Figure 5.** Recovery study using UAD technique for Cd(II)

**Effect of interfering ions:** Recoveries of Ni(II) and Cd(II) adsorbed onto the Dn-ESMs in the presence of different ions are shown in Table 1. The tolerance limit was set as the amount of interfering ions causing recoveries of analyze less than 80%. Most of metal ions interfered more than 10-fold except Ni(II) and Cu(II) interfered more than 100-fold for Cd(II) determination. Besides, some anions and cations did not interfere in preconcentration and determination of Ni(II) and Cd(II) with the concentration greater than 10000-fold.

**Table 1.** Effect of interfering ions on recovery of 0.5 mg L<sup>-1</sup> Ni(II) and Cd(II) adsorbed on Dn-ESMs

Co-existing ions	Ni(II)		Cd(II)	
	Tolerance limit ratio	%Recovery $\pm$ SD	Tolerance limit ratio	%Recovery $\pm$ SD
Ni <sup>2+</sup>	-	-	<100	88.7 $\pm$ 0.31
Cd <sup>2+</sup>	<10	85.9 $\pm$ 1.03	-	-
Pb <sup>2+</sup>	<10	82.7 $\pm$ 0.31	<10	85.6 $\pm$ 0.65
Zn <sup>2+</sup>	<10	85.0 $\pm$ 0.25	<10	87.7 $\pm$ 0.25
Mn <sup>2+</sup>	<10	85.6 $\pm$ 0.53	<10	84.3 $\pm$ 0.30
Cu <sup>2+</sup>	<10	84.1 $\pm$ 0.12	<100	85.1 $\pm$ 0.31
Fe <sup>2+</sup>	<10	82.2 $\pm$ 1.51	<10	82.4 $\pm$ 0.36
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	>10000	83.3 $\pm$ 0.50	>10000	84.7 $\pm$ 0.81
Cl <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	>10000	82.0 $\pm$ 0.40-83.3 $\pm$ 0.61	>10000	81.7 $\pm$ 0.21-89.2 $\pm$ 0.53
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	>10000	85.6 $\pm$ 0.23-87.3 $\pm$ 0.46	>10000	88.7 $\pm$ 0.35-89.6 $\pm$ 0.51

**Analysis of real sample:** The results from the analysis of real samples are given in Table 2. Recoveries of Ni(II) and Cd(II) in the spiked river water samples ranged from 84 to 90% for Ni(II) and 90 to 93% for Cd(II), which suggested that the ESMS can be used as an adsorbent for Ni(II) and Cd(II) preconcentration from real water samples. Fortunately, Ni(II) and Cd(II) were not found in Nan River in Phitsanulok province by the proposed method.

**Table 2.** Determination of Ni(II) and Cd(II) in real samples

Sampling sites	Trace heavy metals				
	Added (mg L <sup>-1</sup> )	Ni(II)		Cd(II)	
		%Adsorption <sup>a</sup>	%Recovery <sup>a</sup>	%Adsorption <sup>a</sup>	%Recovery <sup>a</sup>
A: Wat Khung Waree	0	ND	ND	ND	ND
	1	97.86±0.003	88.51±0.020	93.4±0.003	91.6±0.051
B: Wat Sawang Arom	0	ND	ND	ND	ND
	1	88.65±0.001	88.76±0.008	95.4±0.007	92.8±0.030
C: Wat Phra Si Rattana Mahathat	0	ND	ND	ND	ND
	1	94.71±0.017	90.32±0.072	91.7±0.004	90.0±0.004
D: Wat Phai Chumphon	0	ND	ND	ND	ND
	1	95.63±0.001	87.70±0.003	92.8±0.008	92.0±0.014
E: Wat Tha Takhian	0	ND	ND	ND	ND
	1	93.50±0.011	84.13±0.011	96.9±0.006	95.2±0.054

<sup>a</sup> Mean value ± standard deviation (n =3).

LOD (n=25): limit of detection = 0.015 mg L<sup>-1</sup> for Ni(II) and 0.002 mg L<sup>-1</sup> for Cd(II)

ND: not detected (below the limit of detection)

Eggshell membranes (ESMs) could be used as biosorbent for preconcentration especially for Ni(II) and Cd(II) coupled with flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The propose method is a very simple and reliable technique for detecting metals and metalloids in environmental samples.

#### References:

1. Tuzen, M.; Soylak, M. *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *504*, 325-334.
2. Tuzen, M.; Soylak, M.; Elci, L. *Anal. Chim. Acta.* **2005**, *548*, 101-108.
3. Karve, M.; Rajgor, R.V. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *141*, 607-613.
4. Duran, A.; Tuzed, M.; Soylak, M. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *169*, 466-471.
5. Alves, V.N.; Mosquetta, R.; Coelho, N.M.M.; Bianchin, J.N.; Roux, K.C.D.P.; Martendal, E.; Carasek, E. *Talanta.* **2010**, *80*, 1133-1138.
6. Sweileh, J.A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 450-455.
7. Xiang, G.; Zhang, Y.; Jiang, X.; He, L.; Fan, L.; Zhao, W. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *179*, 521-525.
8. Tuzen, M.; Uluozlu, O.D.; Usta, C.; Soylak, M. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *581*, 241- 246.
9. Baytak, S.; Turker, A.R. *Talanta.* **2005**, *65*, 938-945.
10. Zhang, Y.; Wang, W.; Li, L.; Huang, Y.; Cao, J. *Talanta.* **2010**, *80*, 1970-1912.
11. Zou, A.M.; Chen, X.W.; Chen, M.L.; Wang, J.H. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 412-415.
12. Yang, T.; Chen, M.L.; Hu, X.W.; Wang, Z.W.; Wang, J.H.; Dasgupta, P.K. *Analyst.* **2011**, *136(1)*, 83-89.



**Keywords:** Nickel, Cadmium, Eggshell membranes (ESMs), Preconcentration

# Output 5

ส่งตีพิมพ์ในวารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร



22 Ni(II) and Pb(II) were observed in the sample sites of Phitsanulok province and Phichit province. Fortunately, Cd(II) was not  
23 detected in Nan River in the Lower Northern of Thailand by the proposed method.

24 **Keywords:** Cadmium, Lead, Nickel, Eggshell membranes, Preconcentration

25

26

## Introduction

27 Toxic heavy metals (THMs) contamination is the most important parameter indicated quality of surface  
28 water. There is an increasing demand for accurate and sensitive quantitative THMs analysis. By using  
29 simplicity and low initial and running cost technique such as flame atomic absorption spectroscopy (FAAS),  
30 sample preconcentration is a crucial treatment step because FAAS provides low sensitivity for the ultra-trace  
31 THMs concentration usually encountered in river water samples. In recent years, many solid-phase adsorbents  
32 have been developed to preconcentrate heavy metals prior to FAAS as shown in Table 1. Although the  
33 methods in Table 1 claim that they are simple, accurate and can be applied for the determination of heavy  
34 metals in environmental samples but using synthetic adsorbent leads to cost effective in a large-scale  
35 production. Therefore, it is interesting to study the preconcentration of heavy metals by using natural adsorbent  
36 or biosorbent. The term 'natural adsorbent' is defined to any material that is not synthetically produced and has  
37 adsorptive properties in terms of chemical species of inorganic and organic origins (Alves et al., 2010). Table  
38 2 lists the use of natural adsorbents for solid phase extraction prior to FAAS.

39

40

41

42 **Table 1.** Comparative data from some recent studies on preconcentration of heavy metals using synthetic adsorbent prior to  
 43 FAAS.  
 44

Analytes	System	Eluent	Preconcentration factor	Detection limit ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	%RSD	Reference
Cd, Cu, Co, Fe, Pb, Ni, Zn	Diaion HP-2MG/dithizone	2 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> in cetone	375	0.08-0.25	<9	Tuzen & Soylak, 2004
Cu, Cd, Pb, Zn, Mn, Fe, Cr, Ni, Co	Chromosorb 108/bathocuproinedisu l-fonic	2 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	80	0.16-0.60	1-17	Tuzen et al., 2005
Cd, Cu	Amberlite XAD-2/ 2-aminothiophenol	0.5 mol L <sup>-1</sup> HCl	14-28	0.14-0.54	<5	Lemos & Baliza, 2005
Pb	Octadecyl bonded Silica membrane disk Modified with Cyanex302	1 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	400	1.0	0.4	Karve & Rajgor, 2007
Pb, Ni, Cu, Mn	Amberlite XAD7/sodium bispiperdine-1,1'- carbottetrathioate (Na-BPCTT)	1 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	50	2800-3600	<3	Rekha et al., 2007
Co, Cu, Ni, Zn, Cd	Activated carbon/2- ([1-(2- hydroxynaphthyl methylidene]amino) benzoic acid (HNMABA)	1 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> in acetone	100-310	0.75-3.82	<5	Kiran et al., 2007
Mn	Naphthalene/1-(2- pyridylazo)-2- naphthol (PAN)	Dimethyl- formamide	20	5	3.8	Anjos et al., 2007
Cu, Cd, Pb, Zn, Ni, Co	Multiwalled carbon nanotubes/APDC	1 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> in acetone	80	0.30-0.60	<5	Tuzen et al., 2008
Cu, Co, Ni, Pb	Multiwalled carbon nanotube/o- cresolphthalein complexone	1 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	40	1.64-5.68	<5	Duran et al., 2009

46 Table 2. Use of bioadsorbents in preconcentration of heavy metals prior to FAAS.

47

Analytes	Bioadsorbent	Eluent	Preconcentration factor	Detection limit ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	%RSD	Reference
Cd, Pb	Human hair	0.5 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> or 0.1 mol L <sup>-1</sup> EDTA	40	3.4–4.6	3.2–10.3	Sweileh, 2003
Fe, Co, Mn, Cr	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> immobilized on Amberlite XAD-4	1 mol L <sup>-1</sup> HCl	25	2.8–3.6	2–3	Baytak & Turker, 2005
Cu, Pb, Fe, Co	<i>Bacillus sphaericus</i> immobilized on Diaion SP-850	1 mol L <sup>-1</sup> HCl	-	0.20–0.75	1–3	Tuzen et al., 2007
Cu, Cd	<i>Bacillus subtilis</i> immobilized on Amberlite XAD-4	1 mol L <sup>-1</sup> HCl	50	0.002–0.004	0.06–0.72	Dogru et al., 2007
Cu, Cd, Pb, Mn, Fe, Ni, Co	<i>Penicillium italicum</i> immobilized on Sepabeads SP 70	1 mol L <sup>-1</sup> HCl	-	0.41–1.6	2–4	Mendil et al., 2008
Ag	<i>Moringa oleifera</i> seeds	0.5 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	35	0.22	3.8	Araujo et al., 2010
Cd	<i>Moringa oleifera</i> seeds	0.5 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	-	5.5	<2.3	Alves et al., 2010
Cu	Soybean hull	1 mol L <sup>-1</sup> HCl	-	0.80	1.7	Xiang et al., 2010

48

49 Eggshell membrane (ESM) is a novel, robust, microporous, cost effective, easily available organic support

50 material. It contains several surface functional groups such as amines, amides and carboxylic groups with

51 potential as SPE adsorbent for metal species (Zhang et al., 2010). ESM has been used for enrichment as solid

52 phase extraction (SPE) format of As(V) followed by hydride generation atomic fluorescence spectrometry

53 (HG-AFS) (Zhang et al., 2010), Cr(VI)(Zou et al., 2008), and Se(IV) and Se(VI)(Yang et al., 2011)  
54 followed by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS). Although other detection method such  
55 as ETAAS provides higher sensitivity than FAAS, FAAS was selected in this research as it is simpler and  
56 cheaper. Moreover, to the best of our knowledge, there is no report on natural biomaterial ESM-base  
57 adsorbent for heavy metals as solid phase extraction (SPE) format prior to FAAS. Therefore, the main  
58 objective of this work is to develop an analytical method for the determination of Cd(II), Pb(II) and Ni(II)  
59 residues in Nan River by using natural ESM and monitoring with FAAS.

## 60 **Materials and Methods**

### 61 **Preparation of Eggshell membrane (ESM)**

62 ESM of hen and duck were studied in two types; natural and boiled ESM. Boiled ESM was  
63 prepared by boiling at 100 °C for 10 min of natural hen and duck eggs followed by carefully peeling off the  
64 eggshell by hand. ESM of hen was collected from waste of vendor shops while ESM of duck were collected  
65 from the biggest Thai dessert factory in Phitsanulok province. After thoroughly washed with deionized (DI)  
66 water, the ESM was carefully peeled, soaked in 1 M nitric acid for 12 h and rinsed with DI water (Alves et  
67 al., 2010). The ESM was dried at 80 °C for 4 h and milled to get the particle size of 25 meshes.

### 68 **Eggshell membrane characterization**

69 Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscope (SEM) were  
70 used for characterization of natural and boiled ESM.

71 FT-IR, which was useful for studying functional groups of eggshell membrane was performed on a  
72 Perkin-Elmer Model 1600 Series FT-IR Spectrophotometer in the wavenumber range of 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

73 Solid samples were made by the pressed disc method after mixing dried solid samples with KBr (Theamdee,  
74 2010).

75 SEM, which was used for measuring surfaces of eggshell membranes was observed under a LEO  
76 Model 1455 VP SEM operated at 120 kV and magnifications at 1,000X. The samples were put on a stub  
77 and coated with thin layer of gold (Au) in order to generate conductivity on the measurement surfaces.

#### 78 **Effect of ESM amount**

79 The dried ESM and 25.0 mL of metal standard solution ( $3 \text{ mgL}^{-1}$  of Cd (II)) were added to  
80 polyethylene bottle. Then the suspended solution was shaken for 1 h at 200 rpm at room temperature. The  
81 solution was filtered and analyzed for the residual concentration of heavy metal by FAAS. The experimental  
82 was repeated by variation of ESM amount from 100.0 mg to 1000.0 mg.

#### 83 **Eggshell membrane adsorption**

84 **Adsorption of heavy metals on ESM was studied by batch method.** 25.0 mL of metal standard  
85 solutions ( $3 \text{ mgL}^{-1}$  of Ni(II), Cd (II) and Pb(II)) **were shook with** 500.0 mg (dry weight) of Dn-ESM at  
86 200 rpm for 1 h at room temperature then filtered followed by analyzed the filtrates for the residual  
87 concentration of heavy metal by FAAS. **Percentage adsorption was calculated by the following equation**  
88 **(Sweileh, 2003);**

$$89 \quad \% \text{ Adsorption} = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100$$

90 When,  $C_i$  = initial concentration (the target element before agitation with the sorbent)

91  $C_e$  = equilibrium metal concentration

92

93 **Effect of pH on adsorption**

94 The pH of 25.0 mL of metal standard solutions ( $3 \text{ mgL}^{-1}$  of Ni(II), Cd (II) and Pb(II)) were  
 95 adjusted to various pH. Then the solutions were mixed with 500.0 mg (dry weight) of Dn-ESM followed by  
 96 shaken at 200 rpm for 1 h at room temperature and filtered. Finally the solutions were determined by FAAS.  
 97 The Dn-ESM was kept for desorption process.

98 **Eggshell membrane desorption**

99 **Effect of eluent types on recovery** was studied in the desorption process. Eluent types were as  
 100 follow: 0.01 M EDTA, 0.01 M Thiourea, Thiourea in 0.2 M HCl, Thiourea in 0.2 M  $\text{HNO}_3$  and Thiourea in  
 101 1.0 M  $\text{HNO}_3$ . After adsorption process, the Dn-ESM was mixed with 5.0 mL of various eluent and shaken at  
 102 200 rpm for 1 h at room temperature. Then the solutions were filtered and made up to 10 mL in volumetric  
 103 flasks with DI water before determination by FAAS. **Percentage recovery was calculated by the following**  
 104 **equation (Thongsuk et al., 2009);**

$$105 \quad \% \text{Recovery} = \frac{(C_s + C_{\text{std}}) - C_s}{C_{\text{std}}} \times 100$$

106 When,  $C_s$  = sample concentration

107  $C_{\text{std}}$  = standard concentration (or added concentration)

108 **Ultrasound assisted acid digestion (UAD)**

109 Acid (acid mixtures) digestion technique required for recoveries of trace heavy metals and assisted  
 110 by ultrasonic water bath (Kazi et al., 2009). After adsorption process, the Dn-ESM was digested with acid  
 111 mixtures of  $\text{HNO}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2:1, v/v). Erlenmeyer flask containing Dn-ESM and acid mixtures was  
 112 covered by parafilm and stood for 10 min. Then the flask was immersed into the ultrasonic water bath and

113 sonicated at 70 °C for 30 min. After cooling, the final volume was made up to 10.0 mL in volumetric flask  
114 with DI water then determined by FAAS.

### 115 **Effect of interfering ions**

116 The effect of ions commonly presented in water samples on the recovery of Ni(II), Cd(II) and  
117 Pb(II) was studied at appropriate level of diverse ions. In these experiments, solutions of 0.5 mgL<sup>-1</sup> of Ni(II),  
118 Cd(II) and Pb(II) containing interfering ions were added to 500.0 mg of ESM in polyethylene bottle. Then,  
119 the solution was shaken for 1 h at 200 rpm. The solution was filtered and measured by FAAS. The tolerance  
120 level of coexisting ions is defined as the largest amount making the recoveries of Ni(II), Cd(II) and Pb(II)  
121 less than 80% .

### 122 **Enrichment factor (EF)**

123 Enrichment factor is meant to be the ratio between the analyte concentration in the concentrate, C<sub>e</sub>  
124 and in the original sample, C<sub>s</sub> (Fang, 1993).

$$125 \quad EF = \frac{C_e}{C_s}$$

126 An approximation of EF is the ratio of the slope of the linear section of the calibration curves before  
127 and after the preconcentration.

### 128 **Application to the real water samples**

129 The water samples were kept in polyethylene (PE) bottles (Duran et al., 2009). The PE bottles  
130 were immersed into hydrochloric acid (10%) overnight and nitric acid (10%) overnight. Then, the PE bottles  
131 were thoroughly and consecutively washed with DI water prior to use.

132

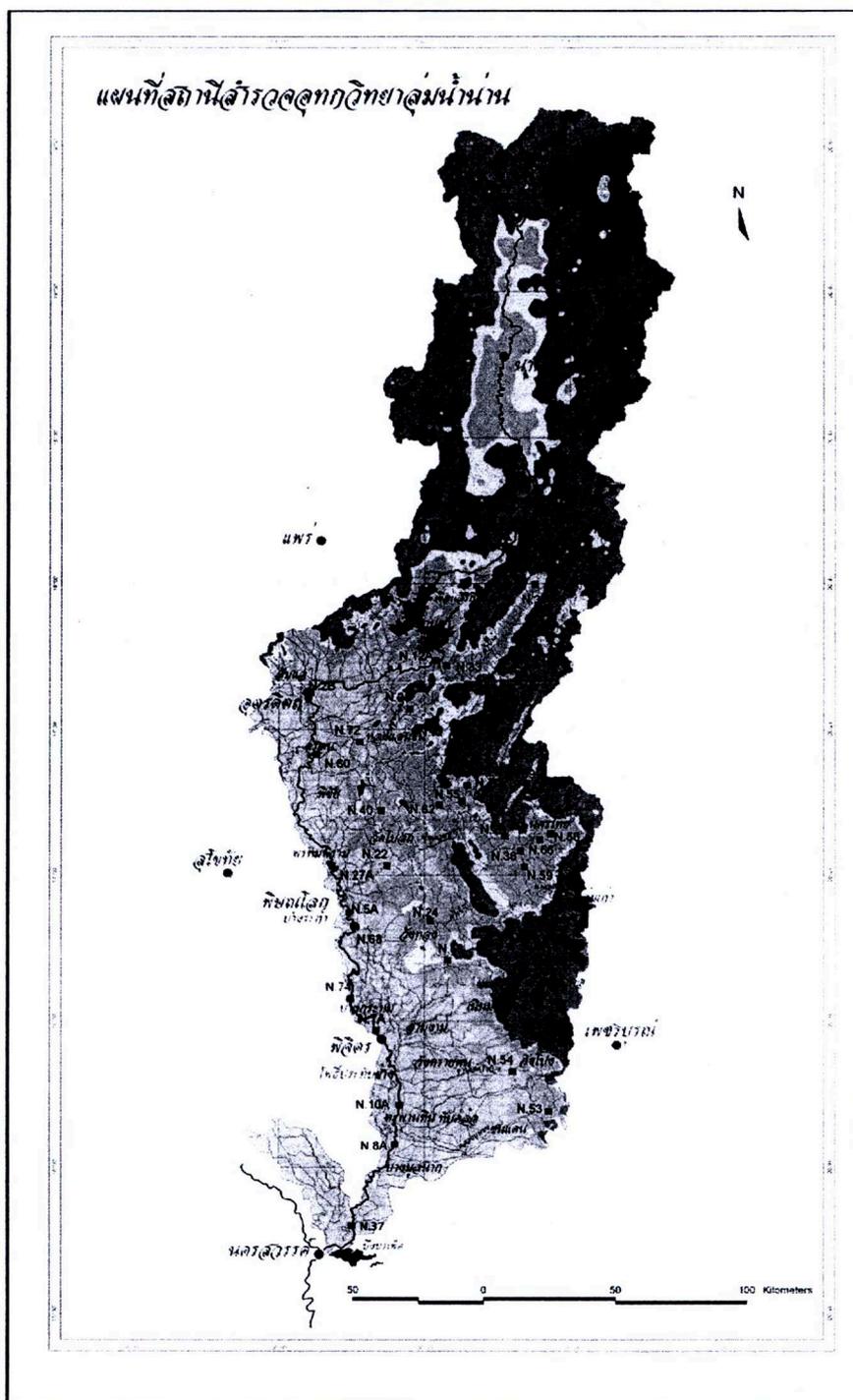


Figure 1 Map of the sampling site locations of Nan River located in the Lower Northern of Thailand

The river water samples were collected from Nan River, which flows through several regions and important in many agricultural areas (Figure 1). The samples were immediately analyzed after collection without treatment with concentrated nitric acid. The water samples were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose

153 acetate membrane to remove the suspended solids then the pH was adjusted to optimum pH value for each  
154 metal ion by 0.025 M sodium tetraborate decahydrate (prepared in water sample) and 50% sodium hydroxide  
155 to pH 10 for Cd(II) and Pb(II) and 37% hydrochloric acid to pH 9 for Ni(II) before the adsorption process.

156 The recoveries of Cd(II) and Ni(II) were obtained by ultrasound assisted acid digestion. The ESM  
157 was digested with 5.0 mL acid mixtures of HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2:1, v/v) in Erlenmeyer flask. The flask was  
158 covered by parafilm and stood for 10 min. Then the flask was immersed into ultrasonic water bath and was  
159 sonicated at 70 °C for 30 min. After cooling, the final volume was made up to 10.0 mL in volumetric flask  
160 with DI water then determined by FAAS.

161 The Pb(II) adsorbed on the ESMs was desorbed by adding 25.0 mL of 0.5 M HNO<sub>3</sub> and soaking  
162 in ultrasonic water bath for 1 h at 70 °C. Then the solution was filtered and analyzed by FAAS.

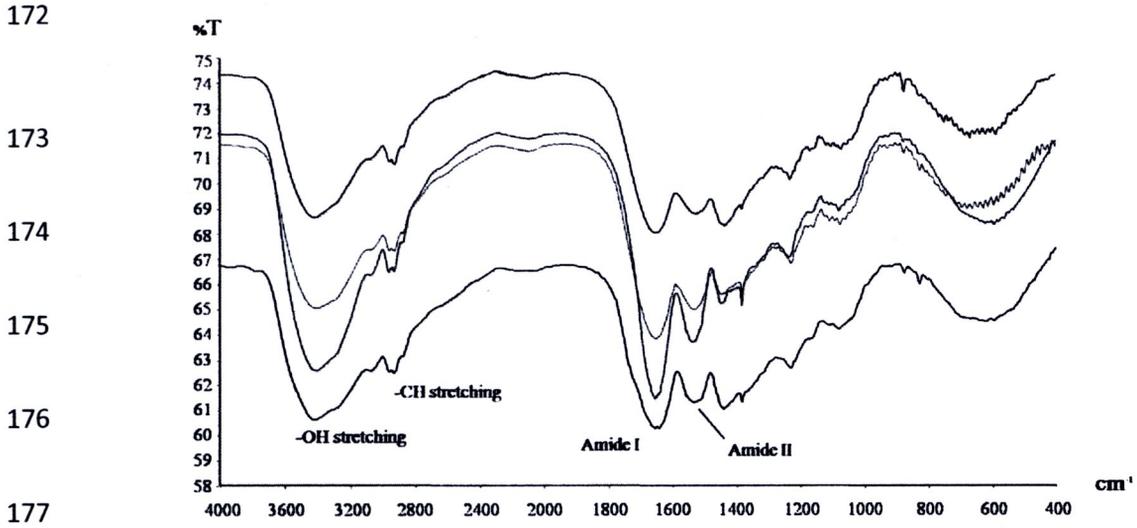
## 163 **Results and Discussion**

164 Characterization of ESMs by FT-IR and SEM demonstrated that the FT-IR spectra (Figure 2)  
165 showed broad -OH stretching absorption band at 3419 cm<sup>-1</sup> and C-H stretching at 2930 cm<sup>-1</sup>. The peaks  
166 observed at 1652 and 1534 cm<sup>-1</sup> represented the amide I and II absorption bands, respectively. These  
167 functional groups could therefore capture metal ions. The SEM images (Figure 3) of boiled hen and duck  
168 ESMs showed that the membrane fibers were mostly destroyed. This may affect adsorption of heavy metals.

169 Therefore, the natural duck eggshell membrane (Dn-ESM) was selected as preconcentration sorbent.

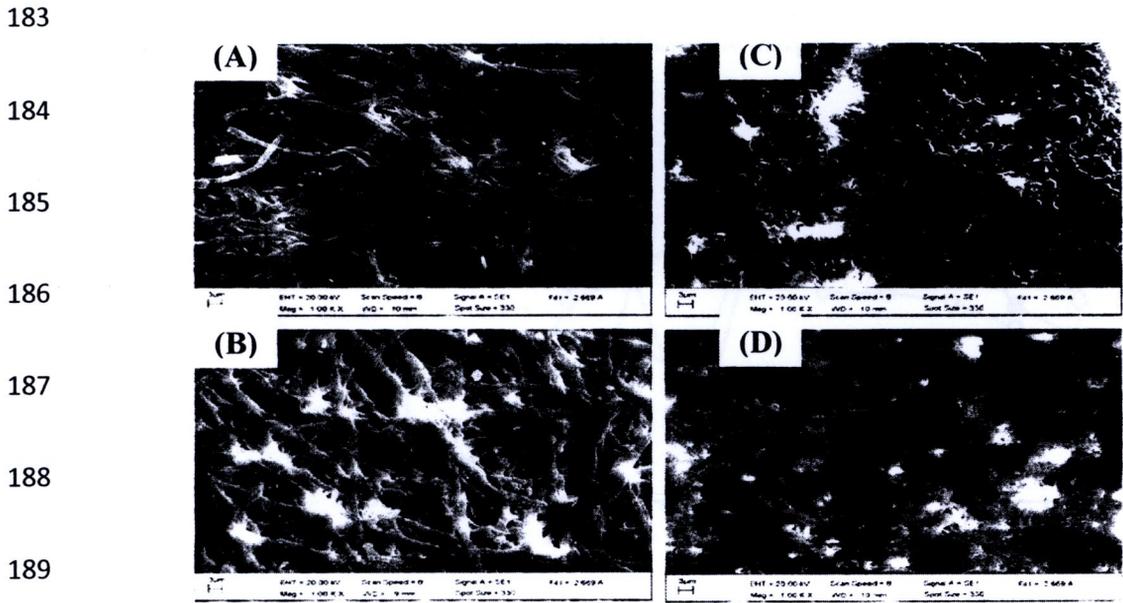
170

171



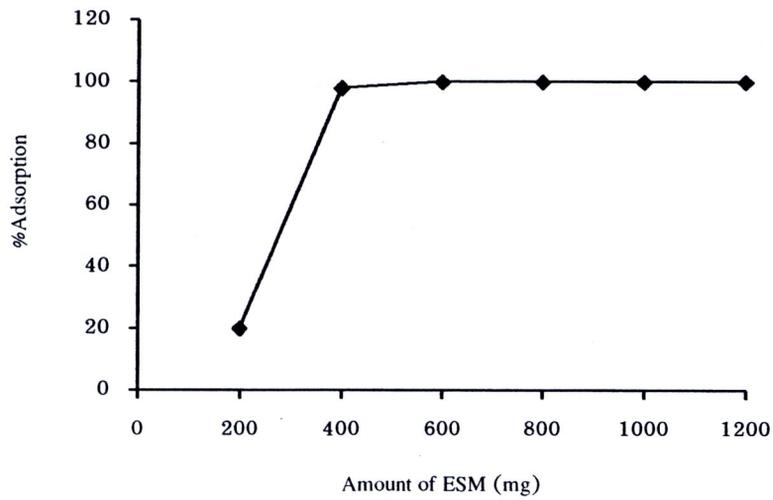
178 **Figure 2** FT-IR spectra of natural and boiled eggshell membrane of hen and duck;

- 179 — Hn-ESM: natural hen eggshell membrane
- 180 — Dn-ESM: natural duck eggshell membrane
- 181 — Hb-ESM: boiled hen eggshell membrane
- 182 — Db-ESM: boiled duck eggshell membrane

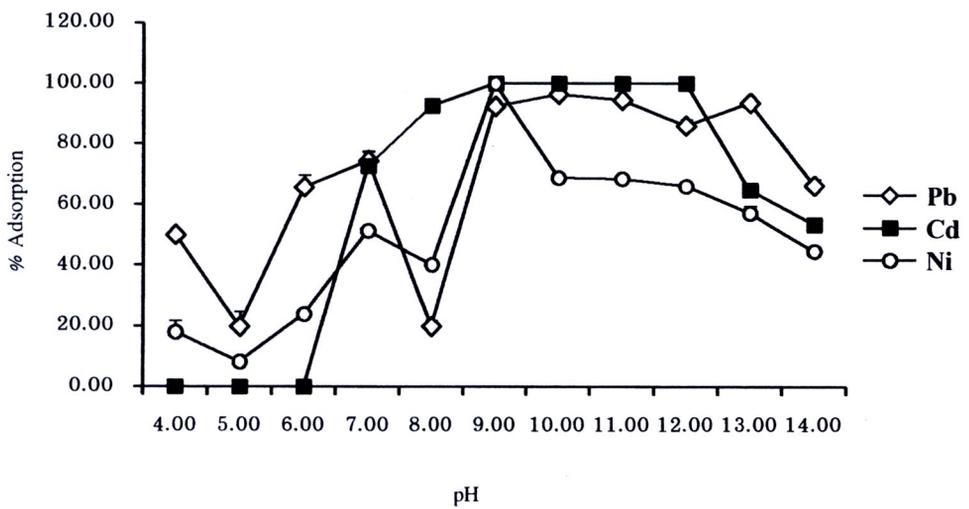


190 **Figure 3** SEM images of natural and boiled eggshell membrane of hen and duck; (A) Hn-ESM: natural hen eggshell  
 191 membrane(B) Dn-ESM: natural duck eggshell membrane (C) Hb-ESM: boiled hen eggshell membrane (D) Db-ESM: boiled  
 192 duck eggshell membrane

193 Effect of ESM amount (particle size is 25 mesh) on the adsorption of Cd(II) in aqueous solution  
 194 was studied in order to select the appropriate ESM amount and use for other metal ions. As shown in Figure 4,  
 195 it was found that the maximum adsorption of Cd(II) (100 %) was obtained from the amount of 500.0 to  
 196 1000.0 mg. Hence, the ESM amount of 500.0 mg was selected as appropriate amount for Ni(II), Cd(II) and  
 197 Pb(II) for the next experiment.



198  
 199 **Figure 4** Effect of ESM amount on adsorption of Cd(II)



205  
 206 **Figure 5** Effect of sample pH on adsorptions of Cd(II), Pb(II) and Ni(II)

207

208

209

Effect of pH on adsorption of Cd(II), Pb(II) and Ni(II) was studied by varying the pH of sample

210

solution between 4.0 to 14.0 The results were shown in Figure 5 that the maximum adsorption of Cd(II),

211

Pb(II) and Ni(II) on Dn-ESMs were obtained between pH 7 to 12. Therefore the pH value of solution

212

adjusted to pH 10 for Cd(II), Pb(II) and pH 9 for Ni(II) was selected as the optimum pH value for the next

213

study.

214

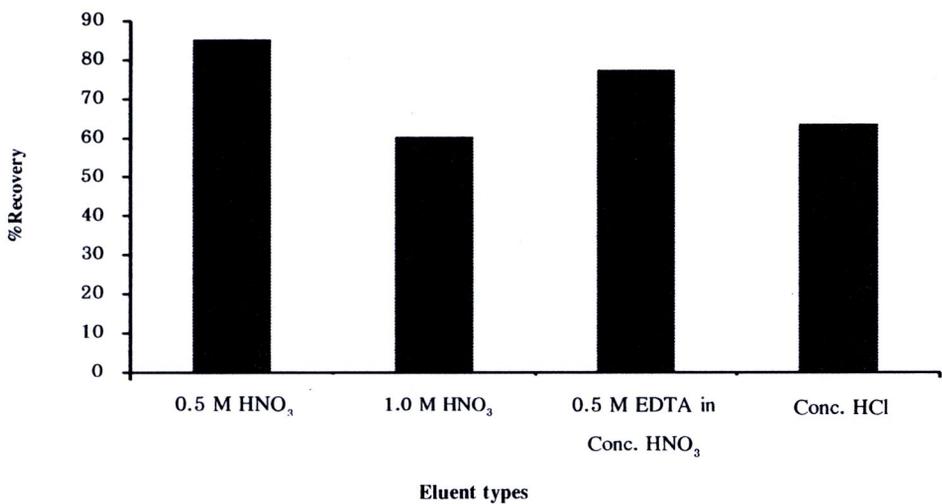
215

216

217

218

219



220

**Figure 6 Effect of eluent types (25.0 mL) on desorption of Pb(II)**

221

As shown in Figure 6, the highest recoveries of Pb(II) was obtained by desorption using 25.0 mL of

222

0.5 M HNO<sub>3</sub>. Unfortunately, the desorption process is not suitable for Cd(II). Figure 7 indicated that the

223

recoveries of Cd(II) were less than 80% which were unacceptable. The highest recovery of Cd(II) was 64.2%

224

by using 0.1 M EDTA. EDTA at the concentration more than 0.1 M appears insoluble in DI water which

225

described in case of saturation. Thus, the acid (acid mixture) digestion techniques required for recoveries of

226

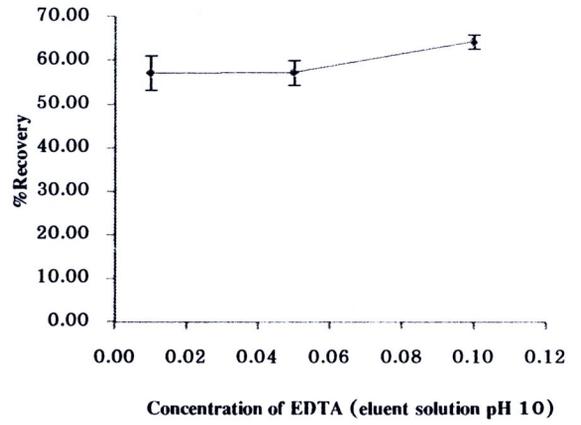
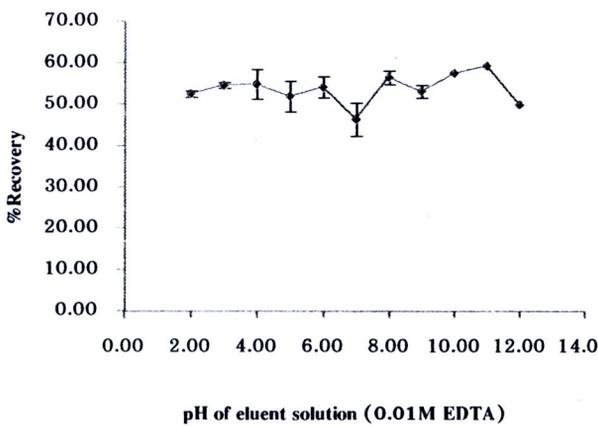
Cd(II) and assisted by ultrasonic water bath. A 5.0 mL acid mixture of HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2:1, v/v) was

227

sonicated at 70 °C for 30 min. The result presented in Figure 8 shown that the recoveries of Cd(II) were

228 observed in the range of 84 to 108%, which demonstrated that the proposed method was satisfactory for  
 229 Cd(II) and also suitable for Ni(II) analysis (not shown).

230



231

232

233

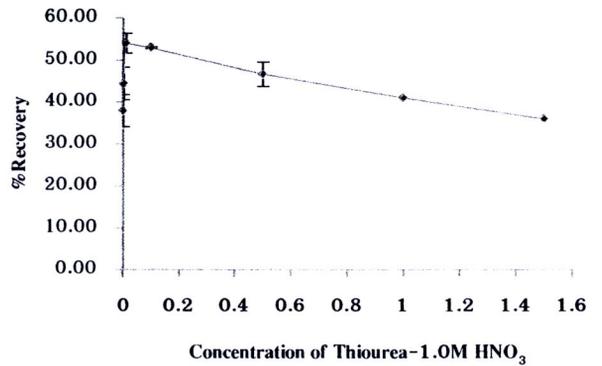
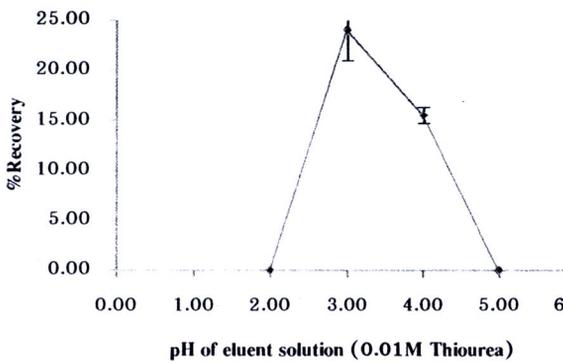
234

235

236

237

238



239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

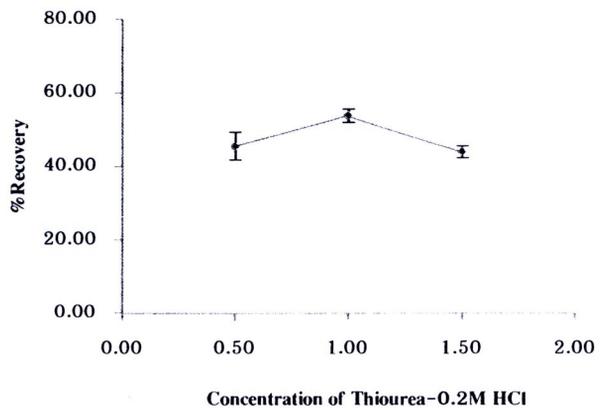
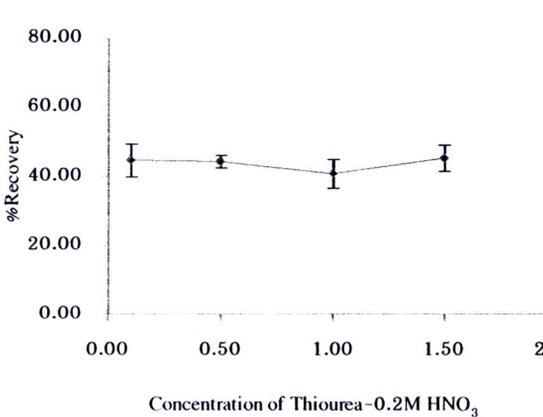


Figure 7 Effect of pH and concentration of eluent on desorption of Cd(II)

254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274

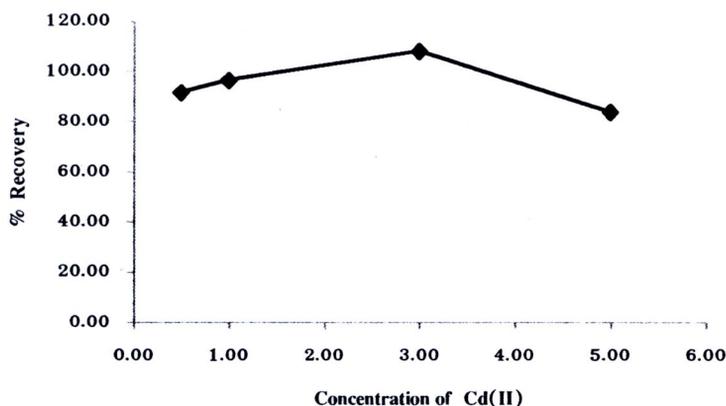


Figure 8 Ultrasound assisted acid digestion on recovery of Cd(II)

Effect of interfering ions on recoveries of Ni(II), Cd(II) and Pb(II) adsorbed onto the Dn-ESM in the presence of different ions was also studied. The tolerance limit was set as the amount of interfering ions causing recoveries of analyze less than 80%. Most of metal ions, some anions and cations did not interfere in the preconcentration and determination of Ni(II), Cd(II) and Pb(II) as shown in Table 3.

Application to the real water sample, pH value and temperature of water samples were observed in the range of 6 to 9 and 26 to 29 °C, respectively. Table 4 shows that the concentration of Ni(II) observed in Nai Mueang Phitsanulok province was 0.0132 mgL<sup>-1</sup>, which did not violate the allowable limit of surface water (0.1 mgL<sup>-1</sup>). The concentrations of Pb(II) detected in Phitsanulok province at Nai Mueang and Bang Krathum including Phichit province at Taphan Hin, were in the range of 0.0553 to 0.0780 mgL<sup>-1</sup> which were over the allowable limit (0.05 mgL<sup>-1</sup>). Cd(II) was not detected in all samples.

Table 3 Effect of interfering ions on recovery of 0.5 mg/L Ni(II), Cd(II) and Pb(II) adsorbed on Dh-ESM

Co-existing ions	Ni(II)		Cd(II)		Pb(II)	
	Tolerance limit ratio	%Recovery <sup>a</sup>	Tolerance limit ratio	%Recovery <sup>a</sup>	Tolerance limit ratio	%Recovery <sup>a</sup>
Ni <sup>2+</sup>	-	-	<100	88.7±0.31	<10	81.7±0.89
Cd <sup>2+</sup>	<10	85.9±1.03	-	-	<10	82.4±0.40
Pb <sup>2+</sup>	<10	82.7±0.31	<10	85.6±0.65	-	-
Zn <sup>2+</sup>	<10	85.0±0.25	<10	87.7±0.25	<10	85.3±0.61
Mn <sup>2+</sup>	<10	85.6±0.53	<10	84.3±0.30	<10	83.6±0.40
Cu <sup>2+</sup>	<10	84.1±0.12	<100	85.1±0.31	<10	83.7±0.31
Fe <sup>2+</sup>	<10	82.2±1.51	<10	82.4±0.36	<10	80.5±0.50
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	>10000	83.3±0.50	>10000	84.7±0.81	>10000	94.7±0.61
Cl <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	>10000	82.0±0.40-83.3±0.61	>10000	81.7±0.21-89.2±0.53	>10000	89.1±0.76-95.1±0.83
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	>10000	85.6±0.23-87.3±0.46	>10000	88.7±0.35-89.6±0.51	>10000	94.6±0.73-96.3±0.35

<sup>a</sup> Mean value ± standard deviation (n = 3)

Table 4 Determination of Pb(II), Ni(II) and Cd(II) in real water samples

Sampling sites	Trace heavy metals					
	Ni(II)		Cd(II)		Pb(II)	
	Added (mg L <sup>-1</sup> )	%Adsorption <sup>a</sup>	%Recovery <sup>a</sup>	%Adsorption <sup>a</sup>	%Recovery <sup>a</sup>	%Adsorption <sup>a</sup>
<b>Uttaradit Province</b>						
<b>N12A: Ban Hat Phai, Tha Pla</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	96.8±0.031	91.9±0.020	99.7±0.023	97.9±0.042	95.0±0.087	85.9±0.066
<b>N2B: Nai Mueang</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	95.0±0.081	91.7±0.092	100.0±0.001	98.9±0.095	94.1±0.030	89.0±0.079
<b>N60: Ban Den Samrong, Tron</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	97.0±0.059	87.5±0.068	100.0±0.001	90.4±0.070	96.0±0.076	90.7±0.080
<b>Phitsanulok Province</b>						
<b>N27A: Narasundam, Phrom Phiram</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	96.8±0.085	84.0±0.059	100.0±0.002	90.9±0.046	96.0±0.064	90.1±0.012
<b>N5A: Nai Mueang</b>						
0	ND	0.013(mg L <sup>-1</sup> )	ND	ND	ND	0.078(mg L <sup>-1</sup> )
1	93.6±0.035	94.0±0.005	100.0±0.001	100.4±0.624	98.3±0.012	88.5±0.004
<b>N74: Bang Krathum</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	0.055(mg L <sup>-1</sup> )
1	99.2±0.080	92.0±0.050	100.0±0.001	95.0±0.078	98.8±0.046	82.9±0.003

Sampling sites	Trace heavy metals							
	Ni(II)		Cd(II)		Pb(II)			
	Added (mg L <sup>-1</sup> )	%Adsorption <sup>a</sup>	%Recovery <sup>a</sup>	%Adsorption <sup>a</sup>	%Recovery <sup>a</sup>	%Adsorption <sup>a</sup>	%Recovery <sup>a</sup>	%Recovery <sup>a</sup>
<b>Pichit Province</b>								
<b>N7A: Ban Rach Chang</b>								
Kwan, Mueang	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1	93.5±0.059	88.1±0.045	100.0±0.002	96.4±0.067	92.7±0.085	87.0±0.050	
<b>N10A: Taphan Hin</b>								
	0	ND	ND	ND	ND	ND	0.060(mg L <sup>-1</sup> )	
	1	96.9±0.064	87.2±0.071	100.0±0.001	93.9±0.081	98.7±0.076	90.0±0.014	
<b>N8A: Bang Mun Nak</b>								
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1	96.4±0.079	92.1±0.083	100.0±0.001	97.6±0.046	94.8±0.017	86.7±0.060	
<b>Nakhon Sawan Province</b>								
<b>N37: Chum Saeng</b>								
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1	99.7±0.081	88.0±0.089	100.0±0.001	98.1±0.062	95.5±0.057	87.0±0.046	

<sup>a</sup> Mean value ± standard deviation (n =3).

LOD (n=25): limit of detection = 0.015 mg L<sup>-1</sup> for Ni(II), 0.002 mg L<sup>-1</sup> for Cd(II) and 0.132.mg L<sup>-1</sup> for Pb(II)

ND: not detected (below the limit of detection)

### Conclusions

Development of an analytical method and study on a potential use of the ESM for adsorption and preconcentration for the determination of Ni(II), Cd(II) and Pb(II) residues in Nan River were studied in this research. The originality of this work is the use of natural material for adsorption of Ni(II), Cd(II) and Pb(II) contaminated in water sample coupled with FAAS. It can be concluded that ESM could be used as biosorbent for preconcentration especially for Ni(II), Cd(II) and Pb(II) coupled with FAAS. The propose method is a very simple and reliable technique for detecting metals and metalloids in environmental samples.

### Acknowledgements

This project was financially supported by National Research Council of Thailand to Naresuan University in the year 2011. The authors also thank the Faculty of Science, Naresuan University for providing laboratory facilities and a consumable materials grant.

Financial support from the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education is gratefully acknowledged.

### References

- Tuzen, M. & Soylak, M. (2004). A column system using Diaion HP-2MG for determination of some metal ions by flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 504, 325-334.
- Tuzen, M., Soylak, M. & Elci, L. (2005). Multi-element preconcentration of heavy metal ions by solid phase extraction on Chromosorb 108. *Anal. Chim. Acta*, 548, 101-108.

Lemos, V.A. & Baliza, P.X. (2005). Amberlite XAD-2 functionalized with 2-aminothiophenol as a new sorbent for on-line preconcentration of cadmium and copper. *Talanta*, 67, 564-570.

Karve, M. & Rajgor, R.V. (2007). Solid phase extraction of lead on octadecyl bonded silica membrane disk modified with Cyanex302 and determination by flame atomic absorption spectrometry. *J. Hazard. Mater.*, 141, 607-613.

Rekha, D., Suvadhan, K., Kumar, J.D., Subramanyam, P., Prasad, P.R., Lingappa, Y. & Chiranjeevi, P. (2007). Solid phase extraction method for the determination of lead, nickel, copper and manganese by flame atomic absorption spectrometry using sodium bispiperdine-1,1'-carbotetrathioate (Na-BPCTT) in water. *J. Hazard. Mater.*, 146, 131-136.

Kiran, K., Kumar, K.S., Suvadhan, K., Janardhanam, K. & Chiranjeevi, P. (2007). Preconcentration and solid phase extraction method for the determination of Co, Cu, Ni, Zn and Cd in environmental and biological samples using activated carbon by FAAS. *J. Hazard. Mater.*, 147, 15-20.

Anjos, A.P.D., Cornejo-Ponce, L., Cadore, S. & Baccan, N. (2007). Determination of manganese by flame atomic absorption spectrometry after its adsorption onto naphthalene modified with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN). *Talanta*, 71, 1252-1256.

- Tuzen, M., Saygi, K.O. & Soylak, M. (2008). Solid phase extraction of heavy metal ions in environmental samples on multiwalled carbon nanotubes. *J. Hazard. Mater.*, 152, 632–639.
- Duran, A., Tuzed, M. & Soylak, M. (2009). Preconcentration of some trace elements via using multiwalled carbon nanotubes as solid phase extraction adsorbent. *J. Hazard. Mater.*, 169, 466–471.
- Alves, V.N., Mosquetta, R., Coelho, N.M.M., Bianchin, J.N., Roux, K.C.D.P., Martendal, E. & Carasek, E. (2010). Determination of cadmium in alcohol fuel using *Moringa oleifera* seeds as a biosorbent in an on-line system coupled to FAAS. *Talanta*, 80, 1133–1138.
- Sweileh, J.A. (2003). Sorption of trace metals on human hair and application for cadmium and lead pre-concentration with flame atomic absorption determination. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, 450–455.
- Baytak, S. & Turker, A.R. (2005). The use of *Agrobacterium tumefaciens* immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent for the column preconcentration of iron(III), cobalt(II), manganese(II) and chromium(III). *Talanta*, 65, 938–945.
- Tuzen, M., Uluozlu, O.D., Usta, C. & Soylak, M. (2007). Biosorption of copper(II), lead(II), iron(III) and cobalt(II) on *Bacillus sphaericus*-loaded Diaion SP-850 resin. *Anal. Chim. Acta*, 581, 241–246.

Dogru, M., Gul-Guven, R. & Erdogan, S. (2007). The use of *Bacillus subtilis* immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent in trace metal determination. *J. Hazard. Mater.*, 149, 166-173.

Mendil, D., Tuzen, M. & Soylak, M. (2008). A biosorption system for metal ions on *Penicillium italicum*-loaded on Sepabeads SP 70 prior to flame atomic absorption spectrometric determinations. *J. Hazard. Mater.*, 152, 1171-1178.

Araujo, C.S.T., Alves, V.N., Rezende, H.C. & Coelho, N.M.M. (2010). Development of a flow system for the determination of low concentrations of silver using *Moringa oleifera* seeds as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.*, 96, 82-85.

Xiang, G., Zhang, Y., Jiang, X., He, L., Fan, L. & Zhao, W. (2010). Determination of trace copper in food samples by flame atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on modified soybean hull. *J. Hazard. Mater.*, 179, 521-525.

Thongsuk, N. & Khonprasop, S. (2009). Determination of Cadmium, Lead and Zinc in Soil from Mae Sod, Tak province by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry. Phitsanulok: Naresuan University.

Fang, Z.L. (1993). Flow Injection Separation and Preconcentration. Germany: Wiley-VCH.

Zhang, Y., Wang, W., Li, L., Huang, Y. & Cao, J. (2010). Eggshell membrane-based solid-phase extraction combined with hydride generation atomic fluorescence spectrometry for trace arsenic(V) in environmental water samples. *Talanta*, 80, 1970–1912.

Zou, A.M., Chen, X.W., Chen, M.L. & Wang, J.H. (2008). Sequential injection reductive bio-sorption of Cr(VI) on the surface of egg-shell membrane and chromium speciation with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 23, 412–415.

Yang, T., Chen, M.L., Hu, X.W., Wang, Z.W., Wang, J.H. & Dasgupta, P.K. (2011). Thiolated eggshell membranes sorb and speciate inorganic selenium. *Analyst*, 136(1), 83–89.

Theamdee, P. (2010). Surface-initiated atom transfer radical polymerization of magnetite nanoparticle containing azobenzene moiety: synthesis and photocontrolled release. Thesis, Naresuan University.

Kazi, T.G., Jamali, M.K., Arain, M.B., Afridi, H.I., Jalbani, N., Sarfraz, R.A. & Ansari, R. (2009).

Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. *J. Hazard. Mater.*, 161, 1391–1398.

Duran, C., Senturk, H.B., Elci, L., Soylak, M. & Tufekci, M. (2009). Simultaneous preconcentration of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Cd(II) from environmental sample on Amberlite XAD-2000 column and determination by FAAS. *J. Hazard. Mater.*, 162, 292-299.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการ 2554A.10702045

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาโลหะหนักปริมาณน้อยที่ตกค้างในลำน้ำน่าน

ด้วยวิธีการเพิ่มความเข้มข้นร่วมกับวิธีอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตเมตรี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.ปริญญญา มาสวัสดิ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม 2554 ถึงวันที่ 30 มีนาคม 2555

ระยะเวลาดำเนินการ 11 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม 2554 ถึงวันที่ 30 มีนาคม 2555

หมวด	รายจ่าย		รวมรายจ่าย	งบประมาณ	คงเหลือ
	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน			
			รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	รวมทั้งโครงการ	(หรือเกิน)
1.ค่าตอบแทน	20,960.00	13,800.00	34,760.00	55,240.00	20,480.00
2.ค่าจ้าง					
3.ค่าวัสดุ	44,564.00	30,262.50	74,826.50	112,160.00	37,333.50
4.ค่าใช้สอย	33,624.00	30,000.00	63,624.00	25,000.00	-38,624.00
5.ค่าใช้จ่ายอื่นๆ					
<b>รวม</b>	<b>99,148.00</b>	<b>74,062.50</b>	<b>173,210.50</b>	<b>192,400.00</b>	<b>19,189.50</b>

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	96,200.00 บาท	เมื่อวันที่ 13 กรกฎาคม 2554
งวดที่ 2	76,960.00 บาท	เมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2555
<b>รวม</b>	<b>173,160.00 บาท</b>	

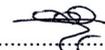
ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1	99,148.00 บาท
งวดที่ 2	74,062.50 บาท
<b>รวม</b>	<b>173,210.50 บาท</b>

จำนวนเงินคงเหลือ -50.50 บาท



ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน



ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ