



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคทางการวิเคราะห์ที่ใช้การไหล  
โดยเกี่ยวข้องกับอนุภาค

**Sample Pretreatment Using Flow-Based Analytical  
Techniques Involving Particles**

โดย ดร. รัตติกาล จันทิวาสณ์

มิถุนายน 2548

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร. รัตติกาล จันทร์ทิวาสน์

สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รศ. ดร. เกตุ กรุดพันธ์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยการสนับสนุนหลักจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และหน่วยงานที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการดำเนินการวิจัยคือ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยการนำเสนอผลงานวิจัยบางส่วนยังได้รับการสนับสนุนให้ไปเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ จากโครงการส่งเสริมการเพิ่มสมรรถนะ และขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ “ในโครงการการพัฒนาเครื่องมือและวิธีสำหรับวิทยาศาสตร์การสังเคราะห์ในระดับไมโครและนาโนเพื่อใช้ในงานทางสุขภาพและสิ่งแวดล้อม” ของสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.)

ขอขอบคุณการสนับสนุนจากห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อการพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นื่องๆ นักศึกษาบัณฑิต และนักวิจัยพี่เลี้ยง/หัวหน้าหน่วยวิจัยฯ คือ รองศาสตราจารย์ ดร. เกตุ กรุดพันธ์ ที่ได้ให้โอกาสการเรียนรู้ และข้อคิดต่างๆ ในการทำการวิจัย อีกทั้งประสบการณ์ที่สำคัญในการทำงาน และขอขอบคุณ Dr. Ronald Beckett แห่ง Water Studies Centre, Monash University, Melbourne, Australia ที่ได้ให้การสนับสนุนการเขียนบทความเพื่อตีพิมพ์ ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชญญา คงทวีเลิศ จาก ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และหน่วยการเงินและการบัญชีจากสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จากการวิจัยในโครงการนี้หวังว่าจะเกิดประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจและบางส่วนอาจสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดและให้เกิดคุณประโยชน์ต่อไปในอนาคต

ดร. รัตติกาล จันทิวาสันต์  
หัวหน้าโครงการ

## บทคัดย่อ

---

รหัสโครงการ: TRG4680025

ชื่อโครงการ: การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคทางการวิเคราะห์ที่ใช้การไหล โดยเกี่ยวข้องกับ  
อนุภาค

**Investigator:** ดร. รัตติกาล จันทิวาสน์ สังกัดสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ รองศาสตราจารย์ ดร. เกตุ กรุดพันธ์ สังกัดสถาบันวิจัยและพัฒนา  
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**e-mail** [rattikan@chiangmai.ac.th](mailto:rattikan@chiangmai.ac.th), [rchantiwas@hotmail.com](mailto:rchantiwas@hotmail.com)

**ระยะเวลาโครงการ:** 2 ปี (1 มิถุนายน 2546-30 มิถุนายน 2548)

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการไหลสำหรับการเตรียมตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม  
และทางชีวภาพ โดยพัฒนาเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการไหล 2 เทคนิคคือเทคนิคฟิลด์โฟลแฟรคชันเน  
ชันและเทคนิคซีควนเซียนอินเจกชันอะนาลิซิส โดยระบบแรกเป็นการรวมเทคนิคฟิลด์โฟลแฟ  
รคชันเนชันแบบแรงโน้มถ่วงกับการตรวจวัดของอิเล็กโตรเทอร์มอลอะตอมมิกแอปซอพชันส  
เปคโตรเมตรีสำหรับการหาปริมาณเหล็กในตัวอย่างดินเคลย์ที่มีขนาดอนุภาคช่วง 5-20  
ไมโครมิเตอร์ โดยจากการศึกษาพบว่าได้รับข้อมูลในการกระจายของเหล็กในอนุภาคตัวอย่าง  
ระบบที่สองเป็นการพัฒนาระบบซีควนเซียนอินเจกชันอะนาลิซิส-แลปแอทวาล์วบีคิมมูโน  
แอสเส โดยระบบนี้เป็นการใช้บีคิมและใช้สารตัวอย่างและสารละลายในระดับไมโครลิตร ซึ่งได้  
นำระบบนี้มาทดสอบสมรรถนะกับสารสำคัญตัวหนึ่งที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคตัวคือคอนครอยติน 6-  
ซัลเฟตและชาร์คเอ-1 ในตัวอย่างซีรัมคนปกติ

**Keywords:** gravitational field-flow fractionation, size-based speciation, sequential injection  
analysis, lab-at-valve, bead immunoassay

## Abstract

---

**Project code:** TRG4680025

**Project Title:** Sample Pretreatment Using Flow-Based Analytical Techniques Involving Particles

**Project:** Title: Sample Pretreatment Using Flow-Based Analytical Techniques Involving Particles

**Investigator:** **Dr. Rattikan Chantiwas** (Institute for Science and Technology Research and Development, Chiang Mai University) and **Assoc. Prof. Dr. Kate Grudpan** (Institute for Science and Technology Research and Development and Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University)

**e-mail** [rattikan@chiangmai.ac.th](mailto:rattikan@chiangmai.ac.th) , [rchantiwas@hotmail.com](mailto:rchantiwas@hotmail.com)

**Project period:** 2 Years (1 July 2003 - 30 June 2005)

This work introduces a development of flow-based analysis techniques for sample pretreatment of environmental and biological samples. Two main flow-based techniques, i.e. field-flow fractionation and sequential injection analysis, were developed. The first system, gravitational field-flow fractionation (GrFFF) coupled to UV and ETAAS detector was used for the investigation of micronsize Fe-rich clay samples in the range of 5-20  $\mu\text{m}$ . The size-distribution information of particulate samples was provided by using the size-based speciation, GrFFF technique. The second system was the sequential injection-lab-at-valve (SI-LAV) bead immunoassay system. The SI-LAV system provides microfluidic handling ability to manipulate the bead, sample and reagents required to perform an immunoassay. The performance of the system was demonstrated using a potential biomarker, chondroitin 6-sulfate (C6S) and Shark A1 (Sh-A1) in a normal serum.

**Keywords:** gravitational field-flow fractionation, size-based speciation, sequential injection analysis, lab-at-valve, bead immunoassay

## โครงการ: การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคทางการวิเคราะห์ที่ใช้การไหล โดยเกี่ยวข้องกับอนุภาค

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ทางเคมีเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ เช่น วิธีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration) หรือลดความเข้มข้น (predilution) และอาจรวมถึงการแยก (preseparation) สารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) ออกจากสารอื่นที่ประกอบอยู่ในสารตัวอย่าง (matrix) เพื่อให้เหมาะสมกับสถานะในขั้นตอนการหาปริมาณ ในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะพัฒนาระบบการวิเคราะห์เพื่อใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับการไหล (Flow-based analysis) ที่เกี่ยวข้องกับอนุภาค (micro particle/bead) โดยเทคนิคที่ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่นำมาพัฒนา 2 เทคนิคในงานวิจัยโครงการนี้ได้แก่ เทคนิค Gravitational field-flow fractionation (GrFFF) และ Sequential injection (SI)-bead injection (BI) analysis เพื่อใช้กับตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างทางชีวภาพ ตามลำดับ

เทคนิค GrFFF เป็นเทคนิคที่สามารถให้ข้อมูลในการแยกและบ่งบอกถึงลักษณะของสาร (separation and characterization) การแยกของกลุ่มอนุภาค โดยใช้ external field ที่เป็น gravitational field ร่วมกับการไหลที่เป็นลามินา (laminar flow) ใน thin channel cell โดยแยกอนุภาค (micro particle) ที่มีขนาดในช่วงไมโครเมตร โดยได้มีการพัฒนาเพื่อแยกอนุภาคก่อนการทำการวิเคราะห์ปริมาณหลักของกลุ่มอนุภาคเพื่อศึกษา size-based speciation โดยรวมเทคนิค GrFFF เพื่อแยกกลุ่มขนาดอนุภาค กับเทคนิค Electrothermal Atomic Absorption Spectrophotometry (ETAAS) เพื่อการหาปริมาณหลัก โดยการรวม GrFFF- ETAAS สามารถทำการทดลองได้ทั้งแบบ Online และ แบบ Offline โดยการทดลองแบบ Online ต้องใช้ร่วมกับ laboratory designed flow cell โดยข้อมูลที่ได้รับจากการทำ size-based speciation ของหลักในตัวอย่างดินเคลย์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานทางสิ่งแวดล้อมได้ (ดังรายละเอียดจาก reprint ภาคผนวก ก1)

Sequential injection (SI)-bead injection (BI) analysis เป็นเทคนิคของระบบการไหลที่มีการใช้กับสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ analyte ที่สนใจร่วมกับการไหลของอนุภาคที่เป็น micro bead ได้ โดยทั่วไปงานวิจัยที่มีการใช้หลักการ BI จะต้องมีอุปกรณ์หรือเครื่องมือของ SI ที่เป็น Lab-on-valve หรือ Jet ring cell แต่ในงานวิจัยนี้ได้พยายามพัฒนาให้ได้ระบบ BI โดยใช้อุปกรณ์ของ SI ซึ่งมีในห้องปฏิบัติการและออกแบบ flow cell เพื่อนำมาพัฒนาให้ได้ระบบ sequential injection-lab-at-valve (SI-LAV) และสามารถนำไปใช้ได้ โดยนำมาทดสอบสมรรถนะของระบบ

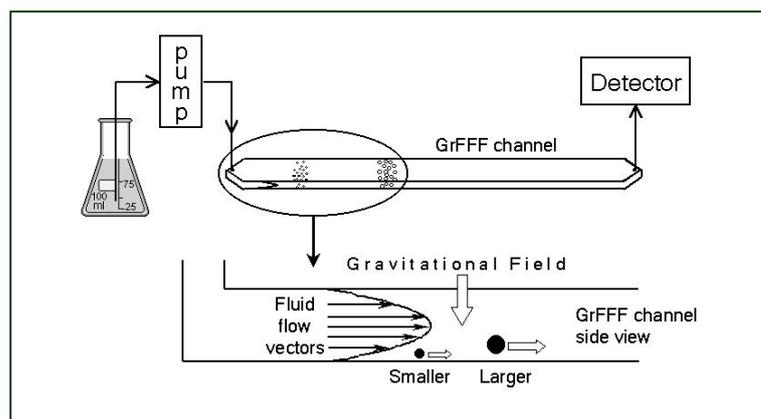
กับสารที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคตัวคือ Chondroitin sulfate และ Shark A1 โดยได้ทดลองในตัวอย่างซีรัมคนปกติ (ตั้งรายละเอียดจาก manuscript drafted ภาคผนวก ก2)

## 2. วัตถุประสงค์

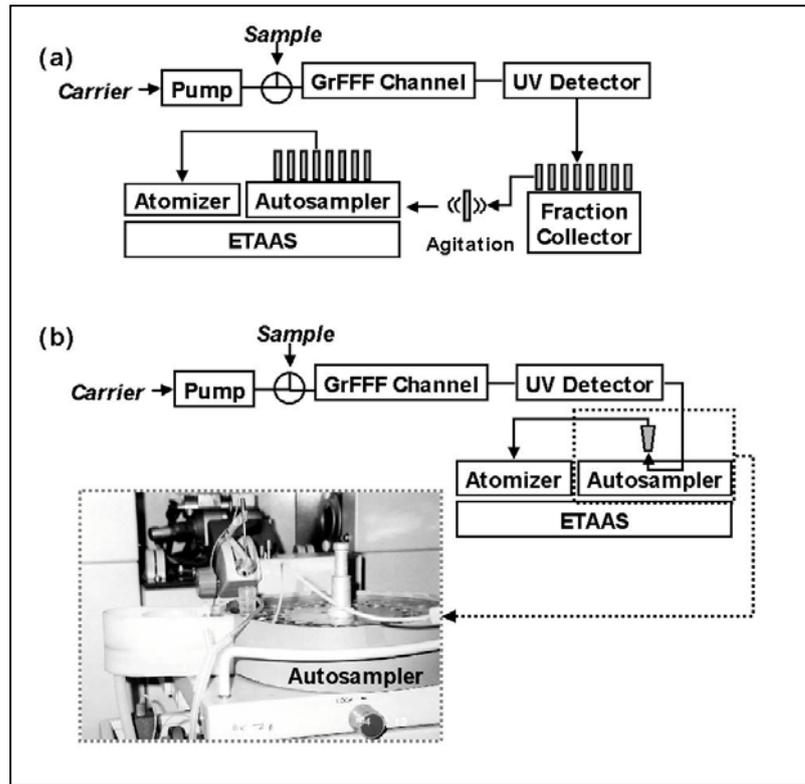
เพื่อพัฒนาระบบและวิธีสำหรับการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Sequential injection-bead injection analysis และ Gravitational field-flow fractionation เพื่อการประยุกต์ทางตัวอย่างทางชีวภาพ และตัวอย่างสิ่งแวดล้อมตามลำดับ

## 3. วิธีทดลอง

ระบบที่ 1 Gravitational-field flow fractionation-electrothermal atomic absorption spectrometer (GrFFF-ETAAS)

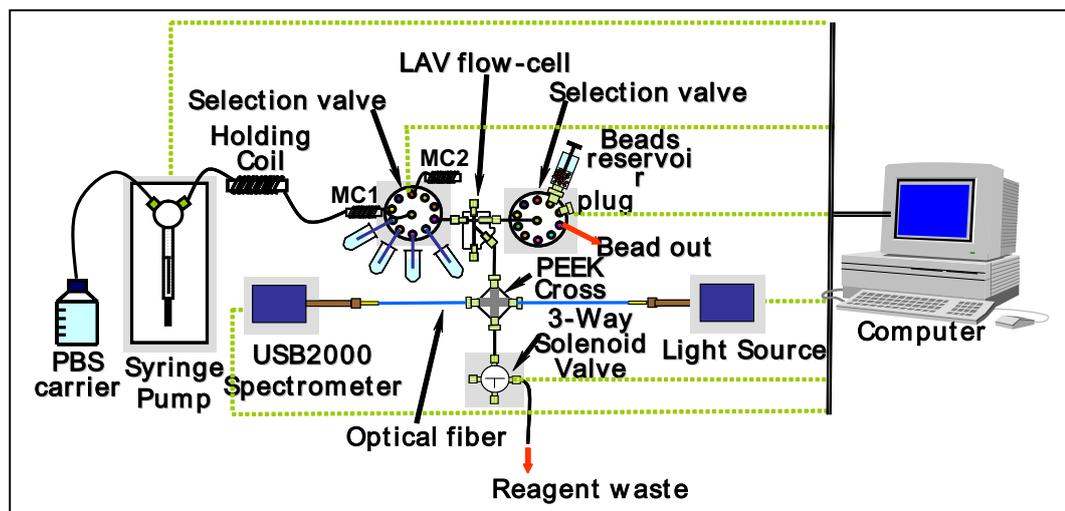


**Figure 1** GrFFF instrument and steric/hyperlayer separation mechanism for micron-size of particles



**Figure 2** Instrumental set up for GrFFF coupled with ETAAS: (a) off-line GrFFF-ETAAS, (b) on-line GrFFF-ETAAS showing the flow through sampler vial

ระบบที่ 2 SI-LAV for bead immunoassay system



**Figure 3** Schematic diagram of the SI-LAV system

#### 4. ผลการทดลอง

ระบบที่ 1 ดังเอกสาร จาก reprint ในภาคผนวก ก1

ระบบที่ 2 ดังเอกสาร จาก manuscript drafted ในภาคผนวก ก2

#### 5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองโดยสังเขป

##### ระบบที่ 1

พัฒนาระบบ GrFFF-ETAAS สำหรับตัวอย่างดินเคลย์ที่มีขนาดอนุภาคช่วง 5-20 ไมโครมิเตอร์ โดยการตรวจวัดด้วย ETAAS สามารถทำได้ทั้งแบบ offline และแบบ online โดยการทำแบบ online จะใช้ร่วมกับ Flow cell ที่ออกแบบขึ้นเองในห้องปฏิบัติการและวางในตำแหน่งหนึ่งของ autosampler tray ของ ETAAS โดยได้เปรียบเทียบผลการทดลองการหาปริมาณเหล็กของการทำ slurry injection ของ particles suspension ของวิธีการทดลองแบบ offline, online และได้ทำการทดลองหาปริมาณเหล็กรวมในตัวอย่างดินเคลย์โดยการย่อยด้วยกรดพบว่ามีความประมาณ 20-40 mg/kg เมื่อนำผลการหาปริมาณเหล็กมาเปรียบเทียบผลของการทดลองแบบ offline, online พบว่าโดยภาพรวมได้เปอร์เซ็นต์ recovery มากกว่า 90 โดยจากข้อมูลการรวมเทคนิค GrFFF-ETAAS สามารถทราบปริมาณเหล็กในแต่ละช่วงของขนาดอนุภาค (size-based speciation) โดยพบว่าความเข้มข้นของเหล็กลดลงเมื่อขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น ดังเช่นที่สามารถพบได้โดยทั่วไป

##### ระบบที่ 2

การพัฒนาระบบ Bead immunoassay โดยใช้เทคนิค Sequential injection-lab-at-valve (SI-LAV) ซึ่งเป็นระบบที่สามารถวิเคราะห์วิเคราะห์ได้รวดเร็วและเป็นระบบอัตโนมัติและวิเคราะห์ได้แบบ real time โดยได้ประยุกต์เพื่อใช้กับการวิเคราะห์ chondroitin 6-sulfate และ shark-A1 ซึ่งเป็น biomarker ที่สำคัญสำหรับโรคข้อเสื่อม

#### 6. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ในส่วนของการทดลองในระบบที่ 2 มีความน่าสนใจที่จะนำระบบไปใช้กับตัวอย่างที่หลากหลาย เช่นทำการทดลองซีรัมในผู้ป่วยที่เป็นโรค หรืออาจประยุกต์กับตัวอย่างชนิดอื่นๆ เช่นตัวอย่าง ปัสสาวะ หรือน้ำลาย และอาจนำไปทดลองกับการวิเคราะห์ biomarker ตัวอื่นๆ เป็นต้น

#### 7. หนังสืออ้างอิง

- [1] P. Ampan, S. Lapanantnoppakhun, P. Sooksamiti, J. Jakmune, S. Kradtap Hartwell, S. Jayasvati, G.D. Christian, K. Grudpan, *Talanta*, 58 (2002) 1327.
- [2] P. Ampan, J. Ruzicka, R. Atallah, G.D. Christian, J. Jakmune, K. Grudpan, *Analytica Chimica Acta*, 499 (2003) 167.

- [3] R.M. Barnes, A. Siripinyanond, *Advances in Atomic Spectroscopy*, 7 (2002) 179.
- [4] H.G. Barth, B.E. Boyes, C. Jackson, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 251R.
- [5] H.G. Barth, R. Flippen, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 257R.
- [6] R. Beckett, Y. Jiang, G. Liu, M.H. Moon, J.C. Giddings, *Particulate Science and Technology*, 12 (1994) 89.
- [7] G. Blo, C. Contado, F. Fagioli, M.H. Bollain Rodriguez, F. Dondi, *Chromatographia*, 41 (1995) 715.
- [8] M.J. Cal-Prieto, M. Felipe-Sotelo, A. Carlosena, J.M. Andrade, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui, D. Prada, *Talanta*, 56 (2002) 1.
- [9] A.D. Carroll, *Development of bead injection methodology for immunoassays*, 2003, p. 115 pp.
- [10] A.D. Carroll, L. Scampavia, D. Luo, A. Lernmark, J. Ruzicka, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 128 (2003) 1157.
- [11] A.D. Carroll, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 127 (2002) 1228.
- [12] R. Chantiwas, R. Beckett, J. Jakmune, I.D. McKelvie, K. Grudpan, *Talanta*, 58 (2002) 1375.
- [13] R. Chantiwas, J. Jakmune, R. Beckett, K. Grudpan, *Analytical Sciences*, 17 (2001) i1419.
- [14] B. Chen, R. Beckett, *Analyst*, 126 (2001) 1588.
- [15] Y. Chen, J. Ruzicka, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 129 (2004) 597.
- [16] D.J. Chittleborough, D.M. Hotchin, R. Beckett, *Soil Science*, 153 (1992) 341.
- [17] G.D. Christian, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 119 (1994) 2309.
- [18] C. Contado, G. Blo, F. Fagioli, F. Dondi, R. Beckett, *Colloids and Surfaces A*, 120 (1997) 47.
- [19] B. Dockendorff, D.A. Holman, G.D. Christian, J. Ruzicka, *Analytical Communications*, 35 (1998) 357.
- [20] H. Erxleben, J. Ruzicka, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 130 (2005) 469.
- [21] H.A. Erxleben, M.K. Manion, D.M. Hockenbery, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 129 (2004) 205.
- [22] H. Geckeis, T. Rabung, T.N. Manh, J.I. Kim, H.P. Beck, *Environmental Science and Technology*, 36 (2002) 2946.

- [23] J.C. Giddings, M.H. Moon, P.S. Williams, M. Myers, *Analytical Chemistry*, 63 (1991) 1366.
- [24] K. Grudpan, *Talanta*, 64 (2004) 1084.
- [25] E.H. Hansen, J. Wang, *Analytica Chimica Acta*, 467 (2002) 3.
- [26] S.K. Hartwell, K. Grudpan, G.D. Christian, *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2004) 619.
- [27] M. Hasselov, B. Lyven, C. Haraldsson, W. Sirinawin, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 3497.28
- [28] P.S. Hodder, C. Beeson, J. Ruzicka, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 3109.
- [29] R.J. Hunter, *Introduction to Modern Colloid Science*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [30] J. Jakmune, L. Pathimapornlert, S.K. Hartwell, K. Grudpan, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 130 (2005) 299.
- [31] J. Jakmune, L. Patimapornlert, S. Suteerapataranon, N. Lenghor, K. Grudpan, *Talanta*, 65 (2005) 789.
- [32] K. Jitmanee, S.K. Hartwell, J. Jakmune, S. Jayasvasti, J. Ruzicka, K. Grudpan, *Talanta*, 57 (2002) 187.
- [33] I. Laehdesmaeki, L.D. Scampavia, C. Beeson, J. Ruzicka, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 5248.
- [34] I. Lahdesmaki, C. Beeson, G.D. Christian, J. Ruzicka, *Talanta*, 51 (2000) 497.
- [35] I. Lahdesmaki, A. Ivaska, J. Ruzicka, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 125 (2000) 1889.
- [36] J.R. Lead, K.J. Wilkinson, E. Balnois, B.J. Cutak, C.K. Larive, S. Assemi, R. Beckett, *Environmental Science and Technology*, 34 (2000) 3508.
- [37] W.L. Lindsay, *Chemical equilibria in soils*, A Wiley-Interscience publication, New York, 1979, p. 449.
- [38] S.E. Manahan, *Environmental chemistry*, Lewis Publishers, Boca Raton, 1994, p. 48.
- [39] T. McCreedy, *Chemistry & Industry (London, United Kingdom)*, (2003) 27.
- [40] D.M. Murphy, J.R. Garbarino, H.E. Taylor, B.T. Hart, R. Beckett, *Journal of Chromatography*, 642 (1993) 459.
- [41] M. Nguyen, R. Beckett, *Separation Science and Technology*, 31 (1996) 453.

- [42] C.C. Oliveira, E.A.G. Zagatto, J. Ruzicka, G.D. Christian, *Analytical Letters*, 33 (2000) 929.
- [43] J.F. Ranville, D.J. Chittleborough, F. Shanks, R.J.S. Morrison, T. Harris, F. Doss, R. Beckett, *Analytica Chimica Acta*, 381 (1999) 315.
- [44] P. Reschiglian, D. Melucci, G. Torsi, *Chromatographia*, 44 (1997) 172.
- [45] P. Reschiglian, D. Melucci, G. Torsi, A. Zattoni, *Chromatographia*, 51 (2000) 87.
- [46] M.J. Ruedas Rama, A. Ruiz Medina, A. Molina Diaz, *Analytica Chimica Acta*, 482 (2003) 209.
- [47] J. Ruzicka, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), 123 (1998) 1617.
- [48] J. Ruzicka, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), 125 (2000) 1053.
- [49] J. Ruzicka, C.H. Pollema, K.M. Scudder, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 3566.
- [50] J. Ruzicka, L. Scampavia, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 257A.
- [51] L.D. Scampavia, P.S. Hodder, I. Lahdesmaki, J. Ruzicka, *Trends in Biotechnology*, 17 (1999) 443.
- [52] M.E. Schimpf, J.C. Giddings, K. Caldwell, *Field-Flow Fractionation Handbook*, Wiley, New York, 2000, p. xviii.
- [53] C.M. Schulz, J. Ruzicka, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), 127 (2002) 1293.
- [54] C.M. Schulz, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), 127 (2002) 1583.
- [55] A. Siripinyanond, R.M. Barnes, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 (1999) 1527.
- [56] A. Siripinyanond, R.M. Barnes, *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 57B (2002) 1885.
- [57] A. Siripinyanond, R. M. Barnes, D. Amarasiriwardena, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (2002) 1055.
- [58] P. Solich, M. Polasek, J. Klimundova, J. Ruzicka, *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2004) 116.
- [59] N.M. Thang, R. Knopp, H. Geckeis, J.I. Kim, H.P. Beck, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 1.
- [60] A.M. Ure, C.M. Davidson, *Chemical speciation in the environment*, Blackie Academic&Professional, London, 1995, p. 408.
- [61] J. Van Berkel, R. Beckett, *Journal of Chromatography*, 733 (1996) 105.

- [62] E.C. Vidotti, V.C. Almeida, C.C. Oliveira, *Talanta*, 64 (2004) 993.
- [63] C.-H. Wu, J. Ruzicka, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), 126 (2001) 1947.
- [64] C.-H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), 127 (2002) 898.
- [65] C.-H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), 128 (2003) 1123.
- [66] C.-H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, B. Zamost, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), 126 (2001) 291.

Output จากโครงการที่ได้รับทุนจาก สกว.

ก. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1 R. Chantiwas, R. Beckett and K. Grudpan. *Size-based Speciation of Iron in Clay Mineral Particles by Gravitational Field-Flow Fractionation and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B* 60 (2005) 109-116. (impact factor 2.361) (ภาคผนวก ก1)

2 R. Chantiwas, P. Kongtawelert, S. Kradtap, K. Grudpan, *Development of Sequential Injection Lab-at-Valve-Bead Immunoassay System for Chondroitin Sulfate and Chondroitin Sulfate Epitopes*, (manuscript in preparation) (ภาคผนวก ก2)

ข. ผลงานที่เสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. R. Chantiwas, P. Kongtawelert, S. Kradtap, J. Jakmune, K. Grudpan, *The Flow-Microparticles Based Immunoassay System*, Poster Presentation. 15<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2004), 2-6 May 2004, Florence, ITALY. (ภาคผนวก ข1)

\* สนับสนุนโดย ทุนวิจัยโครงการส่งเสริมสมรรถนะและขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ (สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา)

2. R. Chantiwas, P. Kongtawelert, S. Kradtap, K. Grudpan. *Development of Sequential Injection Lab-at-Valve-Bead Immunoassay System for Chondroitin 6-Sulfate*. Poster Presentation (by KG). 13<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (Including Related Techniques) (13<sup>th</sup> ICFIA). 24-29 April 2005, Las Vegas, USA. (ภาคผนวก ข2)

3. **R. Chantiwas**, S. Suteerapataranon, H. Geckeis, R. Beckett, K. Grudpan. Gravitational Field-Flow Fractionation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: *Exploiting Size-Based Elemental Speciation by Gravitational Field-Flow Fractionation-Coupled with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Poster Presentation (by RC). 2005 Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (WC 2005). 25-30 April **2005**, Chiang Mai, THAILAND. (ภาคผนวก ข3)
4. **R. Chantiwas**, P. Kongtawelert, S. Kradtap, K. Grudpan, A Novel Bead Immunoassay-Sequential Injection for a Important Proteoglycan. Poster Presentation (by RC), IUPAC 2005 Innovation in Chemistry, 14-19 August 2005, Beijing, CHINA. (ภาคผนวก ข4)

#### ค. ผลงานที่เสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

1. **R. Chantiwas**, P.Kongtawelert, S. Kradtap, J. Jakmune and Kate Grudpan. *Development of Bead Injection System for Chondroitin 6-Sulfate Assay*. Poster Presentation. 30<sup>th</sup> Congress on Science and Technology, 19-21 October **2004**, Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani, BKK, THAILAND. (ภาคผนวก ค1)

#### 2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยที่คาดว่าจะจะเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ทางสิ่งแวดล้อมเช่นส่วนของระบบ GrFFF-ETAAS สำหรับ size-based metal speciation โดยอาจเกิดประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับ fate metal transport ในงานทางสิ่งแวดล้อม และระบบ SI-LAV คาดว่าน่าจะเป็นประโยชน์หากนำไปใช้ได้จริงในการตรวจโรคหรืออย่างน้อยอาจเป็นประโยชน์ในการคัดกรองโรคสำหรับผู้ป่วย

### 3.อื่นๆ

จากการดำเนินโครงการวิจัยดังกล่าวได้รับการสนับสนุนเพิ่มเติมบางส่วนจากทุนเมธี-  
วิจัยอาวุโส โดยมี รองศาสตราจารย์ ดร. เกตุ กรุดพันธ์ เป็นหัวหน้าโครงการ นอกจากนี้ยังได้รับ  
การสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการเพิ่มสมรรถนะและขีดความสามารถในการแข่งขันของ  
ประเทศ “ในโครงการการพัฒนาเครื่องมือและวิธีสำหรับวิทยาศาสตร์การสังเคราะห์ในระดับไม  
โครและนาโนเพื่อใช้ในงานทางสุขภาพและสิ่งแวดล้อม” ของสำนักงานคณะกรรมการอุดม  
ศึกษา (สกอ.) เพื่อเสนอผลงานวิจัยที่ประเทศอิตาลี (ภาคผนวก ข1) รวมทั้งได้รับการสนับสนุน  
ให้ไปปฏิบัติงานวิจัยระยะสั้น; Visiting Scholar ที่ University of Washington, USA และได้รับรางวัล  
Young Scientist Award จาก The Chinese Chemical Society สนับสนุนการเดินทางให้ไปประชุมวิชา  
การการประชุมนานาชาติ “IUPAC2005 Innovation in Chemistry” ระหว่างวันที่ 14-19 สิงหาคม  
2005 ณ กรุงปักกิ่ง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (ภาคผนวก ข4)

# Size-based speciation of iron in clay mineral particles by gravitational field-flow fractionation with electrothermal atomic absorption spectrometry

Rattikan Chantiwas<sup>a,b,\*</sup>, Ronald Beckett<sup>c</sup>, Kate Grudpan<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>*Institute for Science and Technology Research and Development, Chiang Mai University, Thailand*

<sup>b</sup>*Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

<sup>c</sup>*Water Studies Centre, Department of Chemistry, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia*

Received 22 January 2004; accepted 8 November 2004

## Abstract

Gravitational field-flow fractionation (FFF) coupled to UV and ETAAS detectors has been tested for micron-size particles in the range of 5–20  $\mu\text{m}$  using three Fe-rich clay samples. The iron content estimated after aqua regia extraction was about 20–40  $\text{mg kg}^{-1}$ . The ETAAS analysis was performed both off-line from collected fractions and in an online continuous sampling mode using a specially designed flow through vial placed in the autosampler of the ETAAS. Comparison of the direct injection method with total analysis after aqua regia digestion shows that slurry injection of the dilute samples in the gravitational field-flow fractionation (GrFFF) effluent is quite efficient in these samples. In the majority of cases, more than 90% recovery was obtained for the slurry injection method. Fe mass-based particle size distributions and Fe concentration versus particle diameter plots can be generated using certain assumptions. This provides detailed information on size-based speciation of particulate samples. Generally, the Fe concentrations in the particles decreased slightly with an increase in particle size as is often found for soil and sediment samples.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Clay mineral particles; Size-based iron speciation; Micron-size particles; Gravitational field-flow fractionation; Electrothermal atomic absorption spectrometry

## 1. Introduction

The size of particles influences many properties of solid materials. An important example is the transport and fate of particles in aquatic environments [1] through soil profiles [2] and as atmospheric aerosols [3]. Since many elements and compounds are associated with such particulate material, the study of size-based speciation is very relevant in environmental science. One approach for such work is to use conventional separation methods, such as filtration and settling (gravitational or centrifugal), to prepare subsamples with specified size ranges and to analyze these for the

components of interest [4–6]. However, filtration suffers from many artefacts, and settling methods are usually quite time consuming [5,6].

For several decades, various groups have been developing methods involving field-flow fractionation (FFF) for separation purposes [7]. FFF has the advantage of generating a continuous distribution of polydisperse samples which can be either collected as discrete subsamples for analysis [8–10], or in certain cases, the FFF eluent can be fed directly into an analytical device [11]. The data generated by such experiments are often in the form of an analyte-based size distribution [8–11].

Most studies on size-based speciation of environmental samples to date have involved the use of sedimentation FFF (SdFFF) [8,12–15] or flow FFF (FIFFF) [16–22] to characterize submicron colloids. These have been coupled

\* Corresponding author. Tel.: +66 53 941910; fax: +66 53 222268.

E-mail address: rattikan@chiangmai.ac.th (R. Chantiwas).

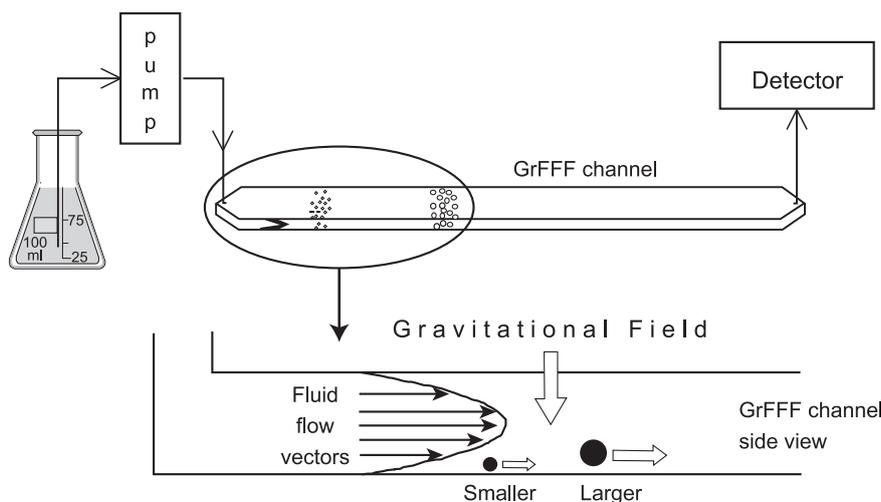


Fig. 1. GrFFF instrument and steric/hyperlayer separation mechanism for micron-size of particles.

both off-line and online with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [12–22], and electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) is employed as tool [8–11] for element speciation. FFF-ICP-MS has been currently reviewed for some selected applications by Barnes and Siripinyanond [23]. One of the limitations for elemental analysis of particulate slurries is that the efficiency decreases for particles greater than about 5–10  $\mu\text{m}$ . This could be due to trapping of particles in the nebulizer or incomplete atomization/ionization for these larger particles. Recently, we have demonstrated that gravitational FFF (GrFFF) can be combined with ETAAS to achieve size-based speciation data for micron-size silica particles up to 10  $\mu\text{m}$  in diameter [9]. This was done off-line by collecting subfractions for Fe analysis by ETAAS. The digestion efficiency of ETAAS with slurry samples proved to be good at least up to 10- $\mu\text{m}$  diameter particles.

GrFFF is carried out by applying a gravitational field perpendicular to the laminar flow direction in a thin GrFFF separation channel (see Fig. 1). One significant advantage of GrFFF is that the channel can be constructed quite easily and cheaply, and the system can be assembled using widely available components for HPLC or flow injection systems. However, the weak gravitational field restricts the size range that can be fractionated to about 2–50  $\mu\text{m}$  in diameter. Nonetheless, this silt-size range is of importance for sediment transport in rivers and atmospheric aerosols.

As an extension of our work to develop analytical methods for size-based element speciation, we present for the first time data for online GrFFF-ETAAS of micron-size clay particles. This was achieved by continuously feeding the eluent from the GrFFF into a special flow through sampler set in one position of the autosampler. The stream was sampled at regular time intervals, and the Fe content was obtained by slurry introduction into the ETAAS. A major advantage of this method is that samples are withdrawn from a flowing suspension, thus avoiding the

problem of settling of sample particles in a vial. This same approach may be useful in other applications where slurry injection is used.

The reason for our focus on Fe, in this and previous publications, is that hydrous Fe oxide coatings are thought to exist on aquatic and soil particles and are generally believed to be involved in the uptake of contaminants such as toxic metals [3] and phosphate [2]. In this paper, we continue with this emphasis, but instead of using pure silica with a coating of synthetic goethite [9], we study the Fe speciation of a series of natural iron-rich silt-size clay minerals.

## 2. Experimental section

### 2.1. Instrumentation

#### 2.1.1. GrFFF

The components of the GrFFF instrument have been described in previous work [9,24]. The channel dimensions were  $0.095 \times 300 \times 20$  mm for the channel thickness, tip-to-tip length and breadth, respectively. The geometric void volume was 0.57 mL. Although the GrFFF channel was only 95  $\mu\text{m}$  thick, no clogging problems were experienced with the dilute ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) <45- $\mu\text{m}$  diameter sieved samples used in this work. A Milton Roy Constametric III pump (Pennsylvania, USA) was used to deliver the carrier,  $10^{-4}$  M sodium hydroxide solution. Particle suspensions were injected into the carrier stream with a hypodermic syringe (40  $\mu\text{L}$ ) through a homemade injection port [24]. The concentration of particles in the FFF eluent was monitored by a UV detector (Model UV8, BAS, USA) at an operating wavelength of 254 nm. The Pocket Sampler (Dick Smith, Australia) with the software supplied was used as the interfacing device for digitizing the GrFFF-UV detection signal.

### 2.1.2. ETAAS

The ETAAS instrument was a Perkin–Elmer Model 5100 (Norwalk, CT, USA) equipped with Zeeman correction, an HGA-600 graphite furnace and AS-60 autosampler. A pyrolytically coated graphite tube with L'vov platform was used. The fast-heating program for the graphite furnace is summarized in Table 1. The peak area across the 3-s heating segment (step 2) of the program was recorded. This program enables more analysis data to be collected across the GrFFF fractogram. The total analysis time for each replicate was 86 s (including autosampler operating time and cooling step). By using this temperature program, there was no difference for the Fe atomic peak profiles from the slurry, and solution analysis was observed.

### 2.1.3. GrFFF–ETAAS

Off-line and online determination of iron by GrFFF with ETAAS detection can be carried out by employing the instrument set-ups, as shown in Fig. 2. Off-line GrFFF with ETAAS analysis was done by collecting fractions (ISCO, Model RETRIEVER 500 fraction collector, Lincoln, USA) of the eluent after passing through the GrFFF separation device, as shown in Fig. 2(a). Analysis of the iron content in each fraction was obtained through slurry introduction into an electrothermal atomic absorption spectrometer (ETAAS). For online GrFFF–ETAAS analysis, the eluent from FFF unit was continuously fed into the bottom of a specially designed flow through sampler vial (see Fig. 2(b)) which was placed in the autosampler of the ETAAS. Sample suspensions (10–20  $\mu\text{L}$  of 2.01–2.07  $\text{mg mL}^{-1}$  depending on the sample) were introduced into the GrFFF, and the eluted particle suspension was continuously introduced through the bottom of the sampler vial. The overflow was directed to waste (Fig. 2(b)). The autosampler arm was set always to sample from this same position so that it introduced discrete samples of the eluent into the ETAAS. A photograph of the online GrFFF–ETAAS instrumentation is shown in Fig. 2(c).

## 2.2. Chemicals and samples

### 2.2.1. Chromatographic silica particles (5 and 10 $\mu\text{m}$ )

Chromatographic silica was obtained from used HPLC columns (CN packing from PARTISPHERE RTF Columns, Whatman, UK). Particle suspensions of about 2  $\text{mg mL}^{-1}$  in water were prepared. The 5- $\mu\text{m}$  particles were spherical, and

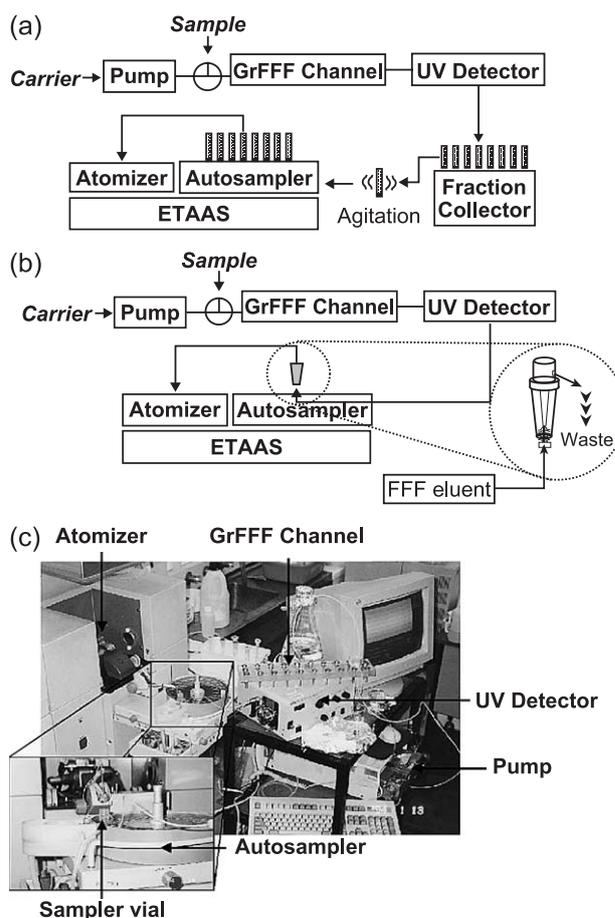


Fig. 2. Instrumental set-up for GrFFF coupled with ETAAS. (a) Off-line GrFFF–ETAAS, (b) online GrFFF–ETAAS showing the flow through sampler vial and (c) photo of the online GrFFF–ETAAS instrumentation.

the 10- $\mu\text{m}$  particles had more irregular shapes. These were used as particle size standards.

### 2.2.2. Clay samples

All clay samples were of natural origin and were obtained from different provinces in Thailand. The clays are referred to as red clay (Kanchanaburi province), ball clay 1 and ball clay 2 (sampled from different sites in Payao province). They were dry sieved through a 45- $\mu\text{m}$  sieve, then dried further at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 12 h in an oven and stored in a desiccator until required. Each sample was suspended in water (2  $\text{mg mL}^{-1}$ ).

### 2.2.3. Reagents

All reagents were prepared using water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Milford, MA, USA). Carrier of sodium hydroxide ( $10^{-4}$  M) was prepared using a reagent from Aka Chemicals (Sweden). A standard iron solution (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ) was SpectrosoL<sup>®</sup> grade from BDH. The desired standard concentrations (10, 20, 40, 60 and 80  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) were diluted appropriately from the stock standard and used to obtain the calibration line:  $Y=0.0049x$ ,  $r^2=0.9947$ .

Table 1  
Fast heating graphite furnace temperature program

Step	Furnace temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Ramp time (s)	Hold time (s)	Internal Ar gas flow ( $\text{mL min}^{-1}$ )
1	140	1	15	300
2 <sup>a</sup>	2400	3	10	0
3	2600	1	5	300

<sup>a</sup> Peak area measurement.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Mass- and Fe-based fractograms obtained by GrFFF with ETAAS

Fractograms of the three clays generated with off-line and online GrFFF–ETAAS analysis for iron are given in Fig. 3. It was found that the UV and Fe profiles obtained by off-line and online operations from all samples agreed

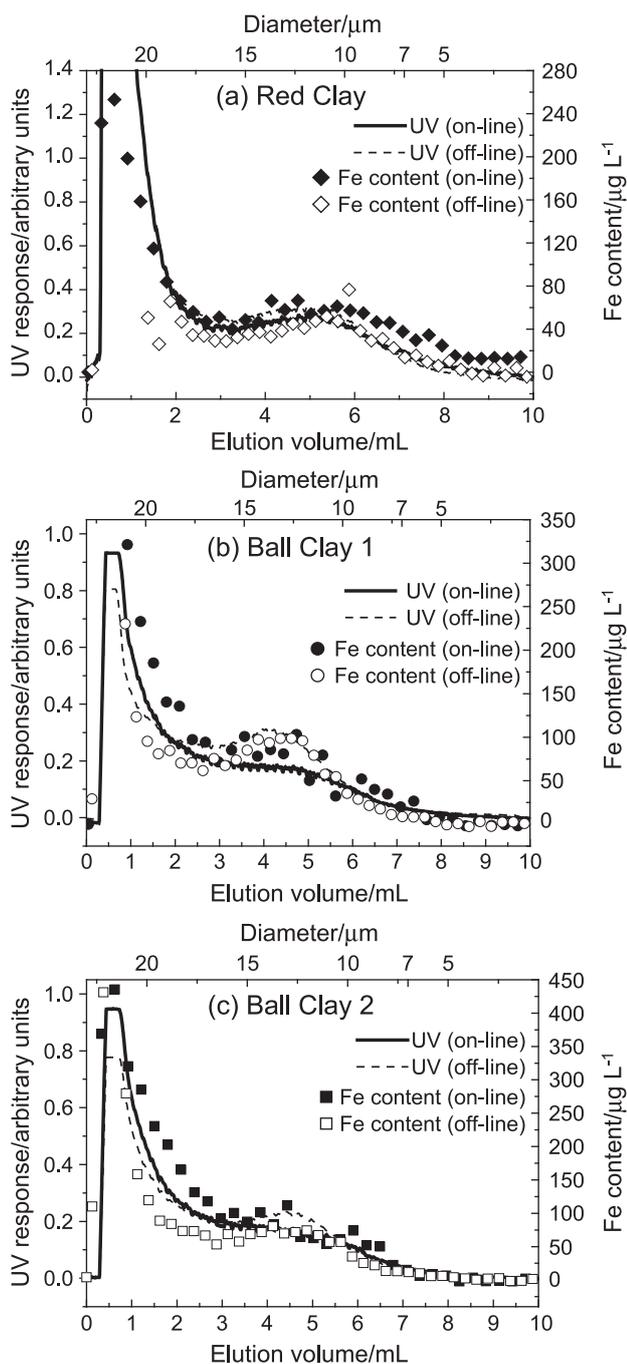


Fig. 3. UV and Fe-based fractograms of clay samples obtained by off-line/online GrFFF–ETAAS (a) red clay, (b) ball clay 1 and (c) ball clay 2.

reasonably well with each other. The largest discrepancy was between the off-line and online UV fractograms for ball clay 1, which might have been caused by specific errors of the runs. In all subsequent plots, the online fractogram data were used for the calculations. The fact that the sample peak was not resolved from the void peak indicated the presence of large particles of about 20 µm or more.

#### 3.2. Conversion from elution time to diameter

Due to the complications in the steric/hyperlayer model, the conversion of the elution time or volume to diameter must be done empirically via calibration with suitable standard particles. By assuming that the standard particles have the same density as the clay particles, the conversion of the diameter scale can be made employing the empirical formula [25],

$$\log t_r = -S_d \log d + \log t_{r1} \quad (1)$$

where  $t_r$  is measured retention time,  $d$  is the diameter of the particles,  $S_d$  the size selectivity, and  $t_{r1}$  is a constant equal to the extrapolated value of  $t_r$  corresponding to particles of unit diameter.

For the purposes of illustrating the general approach, a calibration line was obtained using only two chromatographic silica samples (5 and 10 µm) as particle size standards. Although it is not adequate for accurate size determination, the errors are not likely to be excessive as many previous studies have found that the calibration graph is linear [7,26]. Fig. 4 shows fractograms of the 5- and 10-µm silica particles and the plot of  $\log t_r$  versus  $\log d$ . This plot was used to generate the equation for converting the x-axis to a diameter scale as described above. In this case, the calculated selectivity using the data for the 5- and 10-µm silica was found to be 0.92, and  $t_{r1}$  was 98.

It should be noted that there may be a systematic error in the calibration performed because the 5-µm silica standard particles are spherical, but the 10-µm silica standard and clay particles are more platy in shape. It is known that platy particles experience higher lift forces than spheres of the same volume and hence elute at shorter times [27].

A rough estimate of the magnitude of the error introduced by shape can be deduced as follows. A survey of the literature shows that the selectivity for sedimentation FFF (including the gravitational version) usually falls between 0.7 and 0.8. The gradient for our data in Fig. 4(b) is higher (0.92) because  $t_r$  for the 10-µm nonspherical particles is smaller than would be expected for a spherical particle of the same volume. If we use a gradient of 0.75 and the single 5-µm spherical particle calibration point, we can estimate that, for a 10-µm spherical sample particle, we would obtain a diameter of

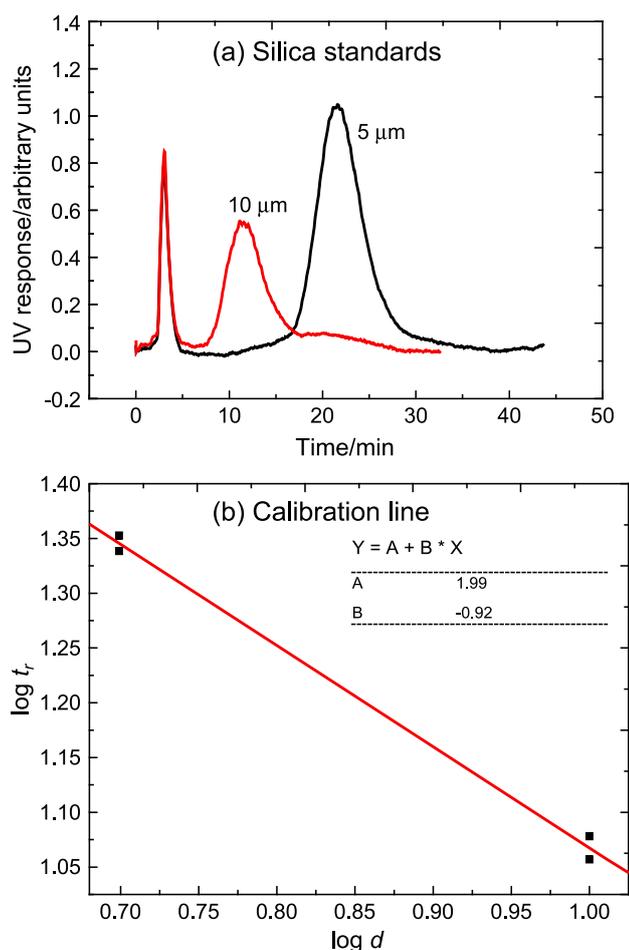


Fig. 4. (a) GrFFF Fractograms of 5- and 10- $\mu\text{m}$  silica particles and (b) plot of  $\log t_r$  versus  $\log d$ .

8.8  $\mu\text{m}$  or thus incurring an error of 12%. This simple calculation illustrates the magnitude of the shape error to be expected but should not be taken as the error in our results. Indeed, the situation here is even more complicated as the 5  $\mu\text{m}$  standard was spherical, the 10  $\mu\text{m}$  standard appeared to be somewhat irregular in shape, and the ball clay samples were very platy.

The density of the silica particles may also differ from the clays although this is likely to be less than 20%. Ideally, the calibration standards and samples should have the same shape and density. The calibration error encountered here are of no importance in this paper which is intended just to outline the concept of GrFFF–ETAAS approach for size-based speciation.

### 3.3. Conversion from UV detector signal to eluted mass

For submicron particles, the UV detector response is usually assumed to be directly proportional to the mass concentration of particles ( $dm_{pi}^c/dV_i$ ). However, according to the approach of Reschiglian et al. [28,29] for micron-size particles, the general relationship for the suspension concentration for large particles (10-fold bigger than the

incident wavelength), which comes from Mie theory, can be expressed as

$$\frac{dm_{pi}^c}{dV_i} \propto UV_i d_i \quad (2)$$

where  $UV_i$  is the UV detector response at point  $i$  along the FFF elution profile;  $m_{pi}^c$  is the mass of sample eluted up to elution volume  $V_i$ , and  $d_i$  is the particle diameter eluting at  $V_i$ . It should be noted that the superscript  $c$  in these quantities signifies that it is the cumulative amount eluted up to point  $i$  on the fractogram.

### 3.4. Mass- and Fe-based particle size distributions of clay samples

The appropriate  $y$ -axis for a particle size distribution ( $dm_{pi}^c/dd_i$ ) is given by [7]

$$\frac{dm_{pi}^c}{dd_i} = \frac{dm_p^c}{dV_i} \left| \frac{\delta V_i}{\delta d_i} \right| \propto UV_i d_i \left| \frac{\delta V_i}{\delta d_i} \right| \quad (3)$$

where  $\delta d_i$  is the increment in  $d_i$  corresponding to increment  $\delta V_i$  in  $V$  at point  $i$  along the fractogram. The mass-based size distribution is thus a plot of  $dm_{pi}^c/dd_i$  versus  $d_i$ .

When the GrFFF was connected to the ETAAS system, the Fe content can be evaluated. The mass concentration of the Fe present in the eluent ( $dm_{Fei}^c/dV_i$ ) is used to plot the Fe fractogram. This is then converted to an Fe-based particle size distribution using the equation,

$$\frac{dm_{Fei}^c}{dd_i} = \frac{dm_{Fei}^c}{dV_i} \left| \frac{\delta V_i}{\delta d_i} \right| \quad (4)$$

where  $m_{Fei}^c$  represents the cumulative mass of Fe eluted up to digitized point  $i$  on the fractogram. The Fe-based particle size distribution is obtained by plotting  $d_{Fei}^c/dd_i$  against particle diameter  $d_i$ .

Fig. 5 shows the particle mass and Fe distributions of the three clay samples. It was found that the samples contained particles in a broad size range starting from about 2  $\mu\text{m}$  and extending beyond 20  $\mu\text{m}$ . However, in these GrFFF runs, the larger particles ( $>20 \mu\text{m}$ ) are eluted with the void peak where there is no resolution of particle size. Again, we caution that extrapolation beyond the 10- $\mu\text{m}$  upper limit of the calibration standards is not recommended, but in this illustration of the method, it is tolerated because of the expected linear calibration graph.

In all samples, the size distributions decrease rapidly in the range from 4 to 2  $\mu\text{m}$ . This truncation of the distributions is expected in these runs since no stop flow relaxation step was used. Stop flow relaxation is sometimes required in order that the particles travel across the channel to the accumulation wall under the influence gravity. Thus, some of the particles  $<2 \mu\text{m}$  would be eluted in the void peak as their relaxation time is  $>35 \text{ s}$  compared to the mean residence time of the carrier in the channel of 171 s [7]. The

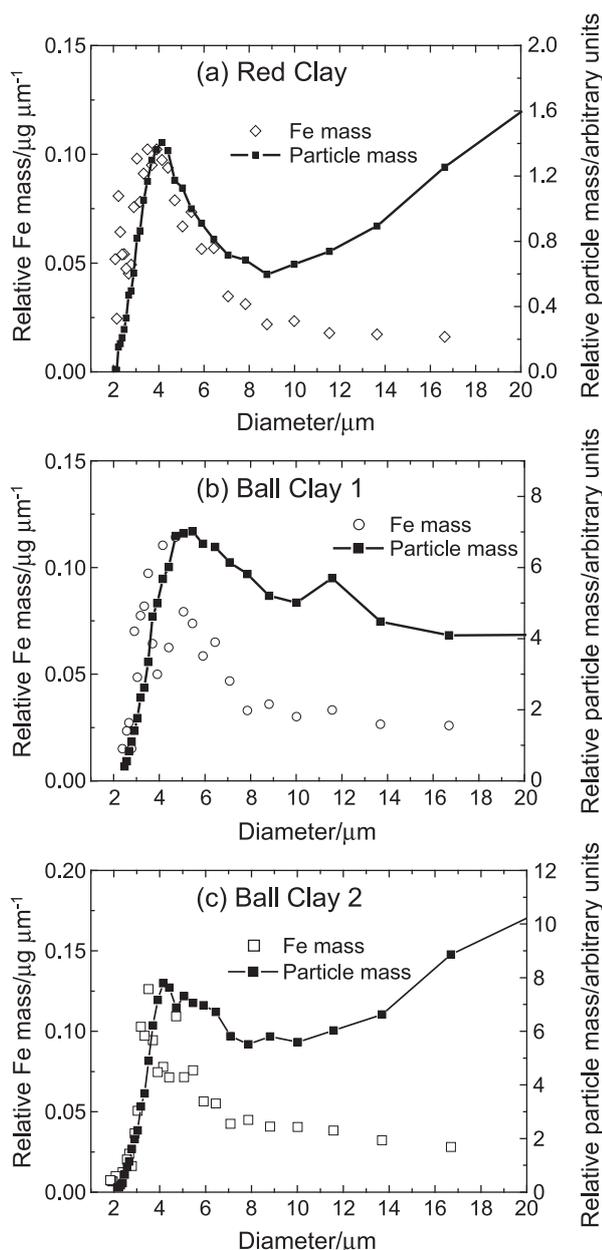


Fig. 5. Mass- and Fe-based particle size distributions (a) red clay, (b) ball clay 1 and (c) ball clay 2.

relaxation time is estimated as the time for the smallest particle of interest to settle across the channel width,  $w$ . The relaxation time ( $t_{\text{relax}}$ ) is calculated by transposing the Stokes settling velocity equation to give  $t_{\text{relax}} = 18\eta w / g\Delta\rho d^2$ , where  $\eta$  is the carrier liquid viscosity,  $w$  is the channel thickness,  $d$  is the particle diameter,  $g$  is the gravitational acceleration and  $\Delta\rho$  is the density difference between the particle and the carrier liquid. However, optical microscope observation of these samples revealed that only small amounts of material were present with diameter  $< 2$  μm. The lack of sample relaxation will cause some spreading of the smaller particles but should be insignificant for particles greater than about 4 μm which have relaxation times  $< 9$  s.

### 3.5. Fe content distributions

The Fe concentration in the particles is given by

$$\frac{dm_{\text{Fe}_i}^c}{dm_{\text{p}_i}^c} = \frac{dm_{\text{Fe}_i}^c/dV_i}{dm_{\text{p}_i}^c/dV_i} \propto \frac{dm_{\text{Fe}_i}^c}{dV_i} \frac{1}{UV_i d_i} \quad (5)$$

The Fe concentration distributions were obtained by plotting  $\frac{dm_{\text{Fe}_i}^c/dV_i}{UV_i d_i}$  i.e.  $\frac{[\text{Fe}_i]}{UVd}$  against particle diameter.

The distribution of the Fe concentration in the particles is plotted in Fig. 6. The data are only plotted between 5 and

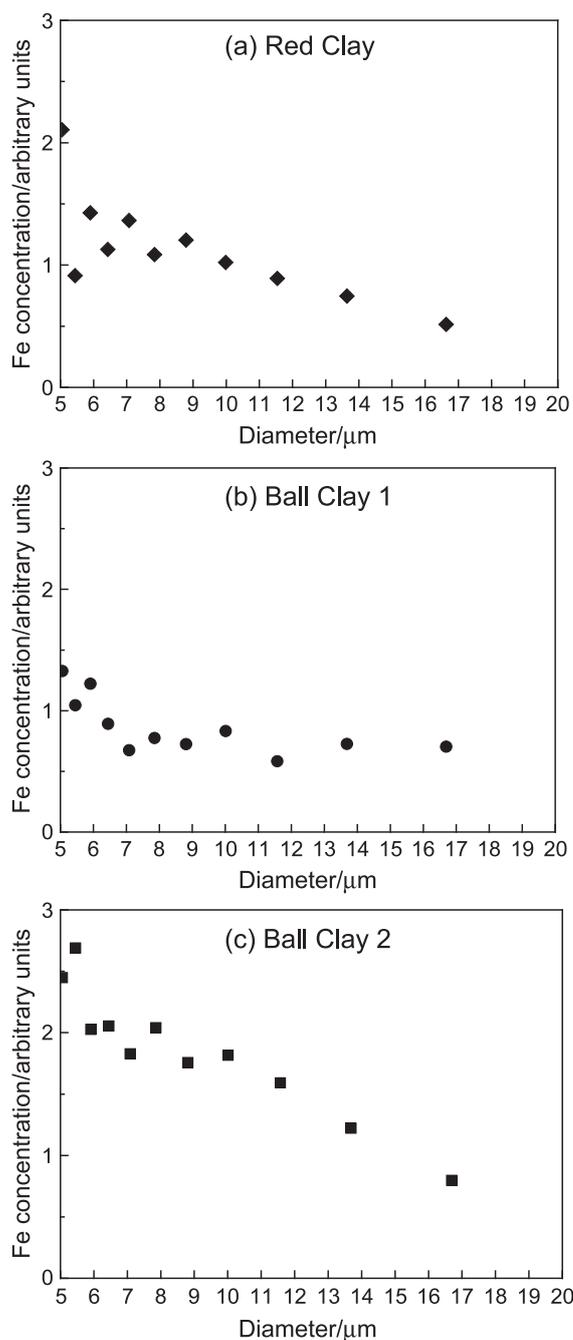


Fig. 6. Distribution of Fe concentrations in the particles as a function of diameter (a) red clay, (b) ball clay 1 and (c) ball clay 2.

Table 2  
Total Fe concentrations in the three clay samples

Samples	Fe content (mg g <sup>-1</sup> )		
	Digested	Online	Off-line
Red clay	41.7	32.6	38.6
Ball clay 1	19.9	18.2	18.3
Ball clay 2	21.7	23.9	21.7

20 μm. For >20-μm particles, no resolution from the void peak is obtained at the run conditions employed. The data below 5 μm are not shown as both the UV and Fe concentration values are small, which can result in a large swing in the graph due to errors in setting the correct baselines in the fractograms.

The Fe content increases in the smaller particles, particularly for ball clay 2. This is commonly found for soil and sediment samples [1,11,14]. This may indicate that a significant proportion of the Fe is present as a surface coating on the particles, or that there is an increase in the proportion of Fe containing particles in the smaller size range.

### 3.6. Efficiency of Fe analysis by GrFFF–ETAAS

An evaluation was carried out on the effectiveness of the slurry ETAAS method for Fe analysis after GrFFF separation. Summation of the iron amounts in each fraction across the entire Fe-based fractogram (including the void peak) provides an estimate of the total mass of Fe injected into the GrFFF with the samples. This was done by integration of the area under the Fe-based fractograms obtained by both off-line and online operations (Fig. 3).

The results were compared with the total iron contents of the original samples analyzed by flame atomic absorption spectrometry after being digested with aqua regia. This comparison is presented in Table 2. It can be seen that the total Fe contents obtained by the GrFFF–ETAAS methods (both off-line and online slurry injections) agreed reasonably well with the digestion analysis. Thus, it would appear that the slurry ETAAS analysis for Fe does not suffer from the same loss of efficiency. This agrees with some previous studies [30].

Using the mean value of all three methods for a given sample, the percentage deviations of each method from this

mean can be calculated, as shown in Table 3. It was found that the percent deviations from the mean for the digestion, online and off-line methods were 3–11%, 3–13% and 3%, respectively.

Assuming that the digestion method gave the most accurate estimate of the total Fe content of the sample, the percentage deviations from this value for the slurry methods were found to be 8–22% for the online method and 0–8% for the off-line method. The mean deviation (discounting the sign) was 9%, and only one value was greater than 10%. By far, the most significant outlier was the online red clay result (22% deviation). One contributing factor may be the fact that only 10 μL of sample was injected compared to 20 μL for the ball clays.

It was found that for ball clay 2, the slurry results were higher than those obtained from the digestion analysis. This suggested that there could be other errors in the analysis in addition to inefficient slurry atomization. Thus, it is reasonable to conclude from the results in Tables 2 and 3 that the slurry efficiency is quite good. However, optimization of the slurry method is required to improve the overall accuracy of the Fe analysis.

## 4. Conclusion

GrFFF–ETAAS was demonstrated to be an effective method for investigating the Fe size-based speciation of micron-size particles. Direct injection of the dilute suspensions of GrFFF eluent into the graphite furnace was shown to be quite efficient. The average deviation of the Fe contents from the values determined after aqua regia digestion was 9%.

The method was illustrated using some Fe-rich clay samples. The Fe concentration in the particles increased slightly with decreased particle size, perhaps indicating that significant amounts of the Fe exists as surface hydroxy oxide coatings. An alternative explanation is an increase in the proportion of Fe-rich minerals in the smaller particles.

GrFFF is the most cost effective of the FFF suite of separation techniques and could be constructed in the simplest workshops. However, it is only applicable over a size range of about 2–50 μm. The ETAAS can be operated

Table 3  
Percentage deviations of the total mass of Fe in the three clay samples obtained by various ETAAS methods from either the mean Fe content value or the Fe content of the total digested sample

Sample	%Deviation of Fe content from the mean value <sup>a</sup>			%Deviation of Fe content from the digested value <sup>b</sup>	
	Digested	Online	Off-line	Online	Off-line
Red clay	11	13	3	22	7
Ball clay 1	6	3	3	8	8
Ball clay 2	3	6	3	10	0

The mean value was for the three methods.

“method” refers to either the digest, online or off-line method for ETAAS analysis.

<sup>a</sup> %Deviation of Fe content the from mean value=(Total Fe<sub>(method)</sub>–Total Fe<sub>(mean)</sub>×100/Total Fe<sub>(mean)</sub>).

<sup>b</sup> %Deviation of Fe content from digest value=(Total Fe<sub>(method)</sub>–Total Fe<sub>(digest)</sub>×100/Total Fe<sub>(digest)</sub>).

online using a specially designed sampler vial which was used in the autosampler. GrFFF–ETAAS has been demonstrated for Fe speciation here but should also be useful for a range of other elements.

### Acknowledgments

Thanks are due to the Thailand Research Fund for the grants including the Royal Golden Jubilee (RGJ) PhD scholarship for RC and the Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH) for support. The Institute for Science and Technology Research and Development, Chiang Mai University, for the support in a visit by RB to Chiang Mai University. Thanks are due to Dr. Ponlayuth Sooksamiti for the provision of the clay samples.

### References

- [1] S.E. Manahan, Environmental Chemistry, 6th ed., Lewis Publishers, Boca Raton, 1994.
- [2] W.L. Lindsay, Chemical Equilibria in Soils, A Wiley-Interscience Publication, New York, 1979.
- [3] M. Ure, C.M. Davidson, Chemical Speciation in the Environment, Blackie Academic & Professional, London, 1995.
- [4] R.J. Hunter, Introduction to Modern Colloid Science, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [5] H.G. Barth, R. Flippen, Particle size analysis, *Anal. Chem.* 67 (1995) 257R–272R.
- [6] H.G. Barth, B.E. Boyes, C. Jackson, Size exclusion chromatography and related separation techniques, *Anal. Chem.* 70 (1998) 251R–278R.
- [7] M.E. Schimpf, J.C. Giddings, K. Caldwell, Field-Flow Fractionation Handbook, Wiley, New York, 2000.
- [8] C. Contado, G. Blo, F. Fagioli, F. Dondi, R. Beckett, Characterisation of river PO particles by sedimentation field-flow fractionation coupled to GrFFF and ICP-MS, *Colloids Surf., A* 120 (1997) 47–59.
- [9] R. Chantiwas, R. Beckett, J. Jakmunee, I.D. McKelvie, K. Grudpan, Gravitational field-flow fractionation in combination with flow injection analysis or electrothermal AAS for size based iron speciation of particles, *Talanta* 58 (2002) 1375–1383.
- [10] G. Blo, C. Contado, F. Fagioli, M.H. Bolland Rodriguez, F. Dondi, Analysis of kaolin by sedimentation field-flow fractionation and electrothermal atomic absorption spectrometry detection, *Chromatographia* 41 (1995) 715–721.
- [11] B. Chen, R. Beckett, Development of SdFFF–ETAAS for characterizing soil and sediment colloids, *Analyst* 126 (2001) 1588–1593.
- [12] J. Van Berkel, R. Beckett, Determination of adsorption characteristics of the nutrient orthophosphate to natural colloids by sedimentation field-flow fractionation, *J. Chromatogr.* 733 (1996) 105–117.
- [13] D.J. Chittleborough, D.M. Hotchin, R. Beckett, Sedimentation field-flow fractionation: a new technique for the fractionation of soil colloids, *Soil Sci.* 153 (1992) 341–348.
- [14] J.F. Ranville, D.J. Chittleborough, F. Shanks, R.J.S. Morrison, T. Harris, F. Doss, R. Beckett, Development of sedimentation field-flow fractionation-inductively coupled plasma mass-spectrometry for the characterization of environmental colloids, *Anal. Chim. Acta* 381 (1999) 315–329.
- [15] D.M. Murphy, J.R. Garbarino, H.E. Taylor, B.T. Hart, R. Beckett, Determination of size and element composition distributions of complex colloids by sedimentation field-flow fractionation inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 642 (1993) 459–467.
- [16] A. Siripinyanond, R.M. Barnes, Flow field-flow fractionation-inductively coupled plasma mass spectrometry of chemical mechanical polishing slurries, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1885–1896.
- [17] A. Siripinyanond, R.M. Barnes, D. Amarasiriwardena, FIFFF–ICPMS for sediment bound trace metal characterization, *JAAS* 17 (2002) 1055–1064.
- [18] A. Siripinyanond, R.M. Barnes, Flow field-flow fractionation-inductively coupled plasma mass spectrometry and metal speciation in proteins: a feasibility study, *JAAS* 14 (1999) 1527–1531.
- [19] M. Hasselov, B. Lyven, C. Haraldsson, W. Sirinawin, Determination of continuous size and trace element distribution of colloidal material in natural water by on-line coupling of flow field-flow fractionation with ICPMS, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3497–3502.
- [20] J.R. Lead, K.J. Wilkinson, E. Balnois, B.J. Cutak, C.K. Larive, S. Assemi, R. Beckett, Diffusion coefficients and polydispersities of the Suwannee river fulvic acid: comparison of fluorescence correlation spectroscopy, pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance, and flow field-flow fractionation, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3508–3513.
- [21] H. Geckeis, T. Rabung, T.N. Manh, J.I. Kim, H.P. Beck, Humic colloid-borne natural polyvalent metal ions: dissociation experiment, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2946–2952.
- [22] N.M. Thang, R. Knopp, H. Geckeis, J.I. Kim, H.P. Beck, Detection of nanocolloids with flow-field flow fractionation and laser-induced breakdown detection, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1–5.
- [23] R.M. Barnes, A. Siripinyanond, Field-flow fractionation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Adv. At. Spectrosc.* 7 (2002) 179–235.
- [24] R. Chantiwas, J. Jakmunee, R. Beckett, K. Grudpan, A cost-effective gravitational field-flow fractionation system, *Anal. Sci.* 17 (2001) i1419–i1421.
- [25] J.C. Giddings, M.H. Moon, P.S. Williams, M. Myers, Particle size distribution by sedimentation/steric field-flow fractionation: development of a calibration procedure based on density compensation, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1366–1372.
- [26] M. Nguyen, R. Beckett, Calibration methods for field-flow fractionation using broad standards: II. Flow field-flow fractionation, *Sep. Sci. Technol.* 31 (1996) 453–470.
- [27] R. Beckett, Y. Jiang, G. Liu, M.H. Moon, J.C. Giddings, Separation and behavior of nonspherical particles in sedimentation/steric field-flow fractionation, *Part. Sci. Technol.* 12 (1994) 89–113.
- [28] P. Reschiglian, D. Melucci, G. Torsi, A quantitative approach to the analysis of supermicron dispersions by field-flow fractionation with UV-Vis detectors. The application of an absolute method, *Chromatographia* 44 (1997) 172–178.
- [29] P. Reschiglian, D. Melucci, G. Torsi, A. Zattoni, Standardless method for quantitative particle-size distribution studies by gravitational field-flow fractionation. Application to silica particles, *Chromatographia* 51 (2000) 87–94.
- [30] M.J. Cal-Prieto, M. Felipe-Sotelo, A. Carlosena, J.M. Andrade, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui, D. Prada, Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000, *Talanta* 56 (2002) 1–51.

## **Development of Sequential Injection Lab-at-Valve-Bead Immunoassay System for Chondroitin 6-Sulfate and Chondroitin Sulfate Epitopes†**

Rattikan Chantiwas<sup>a\*</sup>, Prachya Kongtawelert<sup>b</sup>, Supaporn Kradtap<sup>c</sup>, Kate Grudpan<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Institute for Science and Technology Research and Development, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, THAILAND.

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, THAILAND.

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, THAILAND 50200

\*Corresponding author (Email; [rattikan@chiangmai.ac.th](mailto:rattikan@chiangmai.ac.th), [rchantiwas@hotmail.com](mailto:rchantiwas@hotmail.com))

† Paper presented at the 13<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2005), Las Vegas, Nevada USA, 24–29 April 2005

### **ABSTRACT**

This work introduces a development of a sequential injection-lab-at-valve (SI-LAV) immunoassay system. The SI-LAV system provides microfluidic handling ability to manipulate the bead, sample and reagents required to perform an immunoassay.

Chondroitin 6-sulfate (C6S) and Shark A1(Sh-A1) fraction assay are important for diagnosis of cartilage disease. The C6S/Sh-A1 analyte is mixed with a fixed amount of WF6 specific antibody. The analyte in a sample competes with the C6S coating on beads for the binding with the WF6 antibody. The C6S coating beads and the reagents are aspirated and trapped in a specially designed device attached to a selection valve.

Flow manipulation is made using a syringe pump. The investigation on assay conditions and its advantages compared with the conventional method are discussed.