

การเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์และการตรวจวัดออกซาเลตและซีเทรตโดยใช้คะพิลลารี
อิเล็กทรอนิกส์



นางสาวนิษฐา คนหาญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ON-LINE PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF OXALATE AND CITRATE
USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Miss Kanittha Konhan



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์และการตรวจวัดออกซาเลตและซีเทรตโดยใช้คะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส
โดย	นางสาวชนิษฐา คนหาญ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. มนพิชา ศรีสะอาด

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ทารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ดร. มนพิชา ศรีสะอาด)

.....กรรมการ
(ดร. ณัฐธิดา โชติช่วง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ)

ชนิดวิชา คนหาญ : การเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์และการตรวจวัดออกซาเลตและซิเตรตโดยใช้
 คัพพิลลารีอิเล็กโทรฟอรีซิส (ON-LINE PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF
 OXALATE AND CITRATE USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
 ดร. มนพิชา ศรีสะอาด, 76 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคคัพพิลลารีอิเล็กโทรฟอรีซิส (Capillary electrophoresis, CE) สำหรับการเพิ่มปริมาณแบบออนไลน์และการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรต เทคนิคการเพิ่มสารตัวอย่างแบบออนไลน์จะใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากพร้อมกับการกำจัดเมทริกซ์ออกโดยอาศัย electro-osmotic flow (EOF) เพื่อช่วยเพิ่มสภาพไวของเทคนิค CE ในการทดลองนี้ใช้คัพพิลลารีซิลิกาที่ปราศจากการเคลือบภายในขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 ไมโครเมตร ความยาว 40.2 เซนติเมตร (30 เซนติเมตร ถึงเครื่องตรวจวัด) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกเท่ากับ -15 กิโลโวลต์ โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8.0 และระยะเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างในช่วง 10-90 วินาที ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 90 วินาที ขีดจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ (Limit of detection, LOD) ของออกซาเลตและซิเตรต เท่ากับ 0.003 ppm และ 0.013 ppm ตามลำดับ และขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (Limit of quantitation, LOQ) สำหรับออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 0.013 ppm และ 0.033 ppm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการบรรจุสารตัวอย่างตามระยะเวลาปกติ (10 วินาที) พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดออกซาเลตและซิเตรตได้ถึง 200 เท่าทั้งออกซาเลตและซิเตรต การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยการทดสอบความแม่นยำพบว่ามีความแม่นยำของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-108% สำหรับออกซาเลตและซิเตรตและมี %RSD<5 สำหรับทั้งโมเมนต์อินเทอร์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคแก้ไข (A_{corr}) เมื่อเปรียบเทียบความเที่ยงระหว่างวันและภายในวันเดียวกันพบว่า %RSD<5 สำหรับทั้ง t_m และ A_{corr} วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจวัดออกซาเลตและซิเตรตที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานโดยใช้เทคนิคทางเอนไซม์ (enzymatic method) โดยการทดสอบแบบ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้นว่ามีความถูกต้อง โดยนำผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีมาสร้างกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสองวิธี พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและมีค่า intraclass correlation coefficient อยู่ในเกณฑ์ที่ดีมากสำหรับออกซาเลตและซิเตรต คือเท่ากับ 0.977 และ 0.970 ตามลำดับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไว้ได้ เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยการรักษา และการป้องกันการเกิดโรคนี้ไว้ในอนาคต

5571925023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: CAPILLARY ELECTROPHORESIS / ON-LINE PRECONCENTRATION / OXALATE AND CITRATE

KANITTHA KONHAN: ON-LINE PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF OXALATE AND CITRATE USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS. ADVISOR: MONPHICHAR SRISA-ART, Ph.D., 76 pp.

In this work, online preconcentration and determination of oxalate and citrate using capillary electrophoresis (CE) was presented. A preconcentration technique exploiting large volume sample injection together with matrix removal using an electro-osmotic flow (EOF) pump was employed to improve the sensitivity of the CE method. The migration of analytes was achieved using an uncoated fused silica capillary column of 40.2 cm (30 cm to detector) × 50 μm i.d. and an applied voltage of -15 kV. A background electrolyte (BGE) was 200 mM phosphate buffer (pH 8.0) with injection times of 10-90 seconds. Results showed that when using an injection time of 90 s, limit of detections (Limit of detection, LODs) were 0.003 ppm and 0.013 ppm and limit of quantifications (Limit of quantitation, LOQs) were 0.013 ppm and 0.033 ppm for oxalate and citrate, respectively. When compared with a normal injection time of 10 s, 90 s injection time could improve the sensitivity of the CE method for approximately 200 times. Recoveries of the method were in the range of 98-108% for oxalate and citrate with the relative standard deviation (%RSD) values <5% for corrected peak area (A_{corr}) and %RSD <5 for migration time (t_m). Inter-day and intra-day precisions evaluated using %RSD were found to be less than 5% for both corrected peak area and migration time. The CE method was further applied to quantitatively determine the amounts of oxalate and citrate in urine samples. Results obtained from the CE method were compared with those from the standard method (enzymatic assays) using the student *t*-test. It was found that no significant difference between the results obtained from both methods. In addition, results obtained from the CE method and enzymatic assays were plotted to determine a relationship between the two methods. It was found that linear relationships were obtained from both oxalate and citrate results with intraclass correlation coefficient (R^2) values equal to 0.977 and 0.970 for oxalate and citrate, respectively. This also confirms the accuracy and reliability of the proposed CE method. Therefore, the proposed CE method could be applied for determination of oxalate and citrate in urine of patients with kidney stones for diagnostics medical treatment and prevention of the disease in the future.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่สำเร็จหากไม่มีความกรุณาจากอาจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด ขอกราบขอบพระคุณในการให้คำแนะนำการแก้ไขปัญหาระหว่างทำวิทยานิพนธ์ การให้ความรู้ และสำหรับความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งความรู้ คำแนะนำ ให้การปรึกษาในงานวิจัย การรวบรวมข้อมูล ตลอดจนการทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. พชรินทร์ ชัยสุวรรณ อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และอาจารย์ ดร. ณัฐธิดา โชติช่วง อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นเกียรติและกรุณาสละเวลาเพื่อเป็นกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ตลอดจนขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีวิเคราะห์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเมตตา ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และอบรมสั่งสอนคุณธรรม จริยธรรม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณกำลังใจและความช่วยเหลือรวมถึงแรงบันดาลใจในชีวิตสำหรับ บิดา มารดา และครอบครัวที่เป็นผู้อุปการะทุกๆด้านของชีวิต ขอขอบคุณ พี่ น้อง เพื่อนๆ ปริญญาโททุกท่านที่คอยช่วยเหลือและกำลังใจเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives).....	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย (Scope of research)	4
1.4 คำจำกัดความสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	5
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย (anticipated outcomes).....	7
1.6 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
บทที่ 2	9
2.1 คัพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis, CE)	9
2.1.1 อุปกรณ์ของเครื่องคัพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	9
2.1.2 ประเภทของ CE	11
2.1.3 คัพิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary zone electrophoresis, CZE)	12
2.1.3.1 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ) ...	12
2.1.3.2 อิเล็กโทรออสโมซิส (Electroosmosis).....	14
2.1.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อ EOF	15
2.1.3.4 ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ EOF	16

2.1.3.5 ไมเกรชันไทม์ (migration time, t_m)	18
2.1.3.6 การบรรจุสารตัวอย่าง (sample injection).....	19
2.1.3.7 การเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ (On-line preconcentration). 20	
2.1.3.8 การบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัด เมทริกซ์ออก (Large volume sample stacking using EOF pump)	21
2.1.3.9 ค่าการแยกของสาร (Resolution, R_s).....	24
2.1.3.10 ปริมาณวิเคราะห์ในเทคนิค CE (Quantitative analysis in CE).....	25
2.2 วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรต (Standard method for determination of oxalate and citrate)	26
2.3 วิธีการทดสอบแบบที (The student t test).....	28
บทที่ 3	30
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	30
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
3.3 ตัวอย่างปัสสาวะ	32
3.4 สถานที่ทำการวิจัย	32
3.5 การเตรียมสารละลาย.....	32
3.6 การหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเตรตด้วยเทคนิค CE.....	33
3.6.1 ภาวะทั่วไปของเครื่อง CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์	33
3.6.2 ผลของ pH ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรต	34
3.6.3 การศึกษาผลความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการแยกของออกซาเลต และซิเตรต	34
3.6.4 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกออกซาเลตและซิเตรต	35
3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้น (On-line preconcentration) ของออก ซาเลตและซิเตรตโดยใช้เทคนิค CE.....	36

3.7.1 เวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง	36
3.7.2 ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง	36
3.8 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น (Method validation)	36
3.8.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (Limit of detection, LOD and limit of quantitation, LOQ)	36
3.8.2 กราฟมาตรฐาน (calibration curve)	37
3.8.3 ความแม่นยำ (Accuracy)	38
3.8.4 ความเที่ยง (Precision)	39
3.9 ประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตใน ตัวอย่างปัสสาวะ	40
3.9.1 วิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะโดยวิธี CE ที่พัฒนาขึ้น	40
3.9.2 วัดปริมาณออกซาเลตโดยใช้ชุดตรวจวัดออกซาเลต (oxalate kit)	40
3.9.3 วัดปริมาณซิเตรตโดยใช้ชุดตรวจวัดซิเตรต (citrate kit)	42
บทที่ 4	44
4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเตรตด้วยเทคนิค CE	45
4.1.1 ผลของพีเอชต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรต	45
4.1.2 ผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อความสามารถในการแยกของออกซา เลตและซิเตรต	48
4.1.3 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรต	50
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ (on-line preconcentration) ของออกซาเลตและซิเตรตโดยเทคนิค CE	52
4.2.1 ระยะเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง	53
4.2.2 ความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่าง	54
4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น	56

4.3.1	ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (Limit of detection, LOD and limit of quantitation, LOQ).....	57
4.3.2	กราฟมาตรฐาน (calibration curve).....	58
4.3.4	ความแม่นยำ (Accuracy).....	59
4.3.5	ความเที่ยง (Precision)	60
4.3.6	การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการหาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตใน ปัสสาวะและการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic method).....	61
บทที่ 5	69
รายการอ้างอิง	72
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	76



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่า t ที่ลิมิตความเชื่อมั่นค่าต่าง ๆ	29
ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	31
ตารางที่ 3 ภาวะทั่วไปของเครื่อง CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเทรต	33
ตารางที่ 4 การเตรียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้นต่าง ๆ	35
ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรตเพื่อใช้สำหรับการสร้างกราฟ มาตรฐาน	37
ตารางที่ 6 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิ เทรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	38
ตารางที่ 7 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิ เทรตสำหรับหาค่าความเที่ยง.....	39
ตารางที่ 8 การเตรียมสารละลายเพื่อหาปริมาณออกซาเลตโดยใช้ชุดตรวจวัดออกซาเลตโดย.....	41
ตารางที่ 9 การเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานเพื่อวัดปริมาณซิเทรตโดยใช้ เอนไซม์	42
ตารางที่ 10 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ.....	57
ตารางที่ 11 สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของออกซาเลตและซิเทรตสำหรับการวิเคราะห์ ออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะโดยเทคนิค CE	59
ตารางที่ 12 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะ เมื่อใช้การบรรจุสาร ตัวอย่างแบบปกติ (10 วินาที) (จำนวนการวิเคราะห์ $n=10$)	60
ตารางที่ 13 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะเมื่อใช้การบรรจุสาร ตัวอย่างปริมาณมาก (30 วินาที) (จำนวนการวิเคราะห์ $n=10$)	60
ตารางที่ 14 ความเที่ยงภายในวันเดียวกันของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะด้วย เทคนิค CE ที่ได้พัฒนาขึ้นโดยทำการบรรจุสารตัวอย่าง 10 และ 30 วินาที (จำนวน การวิเคราะห์ $n=10$).....	61

ตารางที่ 15 ความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะด้วยเทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเท่ากับ 10 วินาที (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)..... 61

ตารางที่ 16 ความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตที่วิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิค CE ตามสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้การบรรจุสารตัวอย่างที่ 10 วินาทีกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic method) ^๓ (จำนวนวิเคราะห์ n=41) 65

ตารางที่ 17 ปริมาณของออกซาเลตและซีเทรตที่วิเคราะห์ได้โดยเทคนิค CE ตามสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการบรรจุสารตัวอย่างที่ 30 วินาทีกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic assay) ^๓ (จำนวนวิเคราะห์ n=10) 68



สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 อุปกรณ์ของเครื่องคะพิลลารีอเล็กโทรฟอริซิส (ดัดแปลงจาก [12]).....	9
รูปที่ 2 การเกิด double layer ที่ผนังคะพิลลารีและการเคลื่อนที่ของ electroosmotic flow (EOF) (ดัดแปลงจาก [15])	14
รูปที่ 3 การเคลื่อนที่ของสารภายใต้อิทธิพลของ EOF แบบปกติและใช้ขั้วไฟฟ้าแบบปกติ (ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทด) (ดัดแปลงจาก [16])	16
รูปที่ 4 การเคลื่อนที่ของสารภายใต้อิทธิพล EOF และใช้การกลับขั้วไฟฟ้าหรือ reversedpolarity (ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแอโนด) (ดัดแปลงจาก [15]).....	17
รูปที่ 5 ตัวอย่างอเล็กโทรโฟโรรแกรมที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE	18
รูปที่ 6 การเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในคะพิลลารีโดยใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดันร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ด้วย EOF (ก) เริ่มต้นบรรจุสารตัวอย่างเข้าไปในคะพิลลารีในปริมาณมากด้วยความดัน (ข) เริ่มต้นให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเข้าไปในระบบโดยใช้ reversed polarity (ค) สารที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกส่วน EOF เคลื่อนที่ไปทางขั้วลบและพาเมทริกซ์ออกไปจากระบบ (ง) สารที่มีประจุลบเกิดการรวมตัวเป็นไอออนสารตัวอย่างที่แคบลงและมีความเข้มข้นสูงขึ้นและเคลื่อนที่ออกมายังเครื่องตรวจวัดตามทิศทางการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารอย่างต่อเนื่อง [11].....	23
รูปที่ 7 อเล็กโทรโฟโรรแกรมของสารออร์แกนิกที่เป็นไอออนลบ (organic anions)ความเข้มข้น 0.05 ppm (ก) บรรจุสารตัวอย่างด้วยวิธีปกติ (ข) บรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก โดยพีค (1) maleic (2) Fumaric [11]	24
รูปที่ 8 อเล็กโทรเฟอโรรแกรมของการแยกสารสาร 2 ชนิด.....	25
รูปที่ 9 โครงสร้างของสารเมื่อแตกตัวเป็นประจุลบ (ก) ออกซาเลต และ (ข) ซิเทรต.....	44
รูปที่ 10 อเล็กโทรเฟอโรรแกรมแสดงของผลของ pH ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะ ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัพเฟอร์เท่ากับ 200 mM และปรับ pH เป็น (ก) 6.0 (ข) 6.5 (ค) 7.0 (ง) 7.5 และ (จ) 8.0 พีค 1 คือ ออกซาเลต และ พีค 2 คือ ซิเทรต สภาวะของ CE ที่ใช้คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ศักย์ไฟฟ้า -15 kV	

- บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 195 nm 47
- รูปที่ 11 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า R_s ที่ค่า pH ต่าง ๆ 48
- รูปที่ 12 อิเล็กโทรโพรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัพเฟอร์ต่อการแยกของ ออกซาเลตและซีเทรตในตัวอย่างปัสสาวะ ความเข้มข้นของบัพเฟอร์คือ (ก) 40 mM (ข) 60 mM (ค) 80 mM (ง) 100 mM (จ) 120 mM (ฉ) 140 mM (ช) 160 mM (ซ) 180 mM และ (ณ) 200 mM โดยพีค 1 คือ ออกซาเลต และ พีค 2 คือซีเทรต สำหรับสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10..... 49
- รูปที่ 13 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า R_s ของฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 50
- รูปที่ 14 อิเล็กโทรโพรแกรมแสดงผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ โดยปรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น (ก) -10 kV (ข) -15 kV (ค) 20 kV (ง) -25 kV และ (จ) -30 kV พีค 1 คือ ออกซาเลต และ พีค 2 คือซีเทรต สำหรับสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10 51
- รูปที่ 15 อิเล็กโทรโพรแกรมแสดงการแยกของพีคออกซาเลต (พีค 1) และซีเทรต (พีค 2) เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกเท่ากับ -15 kV สำหรับสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10 52
- รูปที่ 16 อิเล็กโทรโพรแกรมแสดงผลของเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้น ของออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ โดยปรับเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง เป็น (ก) 10 และ (ข) 30 วินาที พีค 1 คือออกซาเลตและ พีค 2 คือซีเทรต สำหรับสภาวะของ CE คือฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ความเข้มข้น 200 mM pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก -15 kV และสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 4.2..... 54
- รูปที่ 17 อิเล็กโทรโพรแกรมแสดงผลของความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ โดยปรับความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น (ก) 0.5 (ข) 1.0 (ค) 1.5 (ง) 2.0 (จ) 2.5 (ฉ) 3.0 (ช) 3.5 และ (ซ) 4.0 psi พีค 1 คือออกซาเลตและพีค 2 คือซีเทรต โดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาที และสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10 55
- รูปที่ 18 อิเล็กโทรโพรแกรมแสดงผลของผลของความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ โดยปรับความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น (ก) 0.5 psi (ข) 1.5 psi (ค) 3.0 psi และ (ง) 4.0 psi พีค 1 คือ

ออกซาเลตและ พิค 2 คือซีเทรต โดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาที และสถานะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10	56
รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานของออกซาเลต (ก) และซีเทรต (ข) สำหรับการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะโดยเทคนิค CE สภาวะของ CE คือความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ 200 mM pH 8.0 คัพฟิลลารีคอลัมน์เป็น uncoated fused silica ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μ m ยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ศักย์ไฟฟ้า -15 kV บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 195 nm	58
รูปที่ 20 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นต่ำ (11.81 และ 44.97 ppm ตามลำดับ) สภาวะของ CE ที่ใช้คือบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา10 วินาทีและสถานะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 19	62
รูปที่ 21 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นระดับกลาง (30.58 และ 240 ppm ตามลำดับ) สภาวะของ CE ที่ใช้คือบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา10 วินาทีและสถานะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 19.....	63
รูปที่ 22 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นสูง (108.19 และ 315.57 ppm ตามลำดับ) สภาวะของ CE ที่ใช้คือบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา10 วินาทีและสถานะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 19.....	63
รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซาเลต (ก) และซีเทรต (ข) ที่ตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิค CE ที่ได้พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic method).....	67

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

โรคนิ่วไต (kidney stone) เกิดจากการตกผลึกหรือตะกอนของเสียที่ขับออกทางปัสสาวะ หากตะกอนมีก้อนขนาดเล็กจะถูกขับออกจากไตทางปัสสาวะ แต่หากไม่ถูกขับออกตะกอนจะรวมตัวเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจนอุดทางเดินของปัสสาวะกลายเป็นก้อนนิ่วในไต โรคนิ่วไตเป็นปัญหาสุขภาพที่พบได้ในทุกอายุตั้งแต่เด็กจนถึงผู้ใหญ่ และจำนวนผู้ป่วยมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วในไตได้แก่ กรรมพันธุ์ สิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ปริมาณน้ำที่ดื่มในแต่ละวัน รวมถึงอาหารที่รับประทานในแต่ละวัน จะเห็นได้ว่าโรคนิ่วไตเป็นโรคที่เกิดจากสิ่งที่อยู่ใกล้ตัวเรามาก และผลข้างเคียงการมีนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะจะส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ ได้ เช่น โรคไตอักเสบติดเชื้อแบคทีเรียเรื้อรัง ซึ่งอาจรุนแรงจนติดเชื้อในกระแสโลหิตหรือเป็นสาเหตุให้ไตเสียการทำงานเกิดเป็นโรคไตเรื้อรังและอาจร้ายแรงจนถึงภาวะไตวายจนเสียชีวิตได้ ดังนั้นโรคนิ่วไตจึงจัดเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรไทยเป็นอย่างยิ่ง สำหรับการรักษาโรคนิ่วไตในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงทำให้ก้อนนิ่วแตกเป็นก้อนเล็กๆ (extracorporeal shock wave lithotripsy, ESWL) การสวนส่องกล้องเข้าไปในท่อไต (ureteroscopy) เพื่อคล้องเอานิ่วไตออกมา หรือการใช้ยาละลาย [1] ทั้งนี้การรักษาขึ้นอยู่กับขนาดของก้อนนิ่วด้วย นอกจากนี้ผู้ป่วยโรคนิ่วไตยังมีโอกาสเป็นนิ่วซ้ำสูง พบว่าโอกาสที่จะเกิดเป็นซ้ำมีประมาณครึ่งหนึ่งในเวลา 10 ปี ทำให้ภาครัฐรวมทั้งผู้ป่วยเองต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมาก [2]

ปัจจุบันพบว่าปัจจัยที่สำคัญในการเกิดโรคนิ่วไตได้แก่ การที่มีปัสสาวะน้อย และมีการขับสารหรือเกลือแร่ออกมามากในปัสสาวะ เกลือแร่ที่สำคัญได้แก่ แคลเซียม (Ca^{2+}) ออกซาเลต ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) เป็นต้น [3] ในภาวะที่มีปริมาณสารเหล่านี้ผิดปกติและสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวย สารเหล่านี้สามารถรวมตัวกันจนกลายเป็นก้อนผลึกแข็ง เช่น แคลเซียมออกซาเลต (CaC_2O_4) และมีขนาดใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นนิ่วอุดตันที่บริเวณต่าง ๆ ของทางเดินปัสสาวะ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดท้องรุนแรง ปัสสาวะเป็นเลือด สำหรับสารที่สามารถยับยั้งการเกิดผลึกนิ่ว ได้แก่ ซิเทรต โดยซิเทรตจะไปแย่งจับกับสารก่อนิ่ว เช่น ซิเทรตจับกับแคลเซียมเกิดเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีและขับออกไปพร้อมกับน้ำปัสสาวะ [2] ดังนั้นเมื่อมีปริมาณซิเทรตมากในปัสสาวะจะทำให้ไอออนอิสระของแคลเซียม

ลดลง จึงลดความเสี่ยงของการเกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะได้ เนื่องจากปริมาณสารก่อนิ่วในปัสสาวะลดลงและไม่สามารถรวมตัวกันเป็นผลึกนิ่วได้ ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตจึงมีความสำคัญสำหรับการรักษาและการป้องกันการเกิดโรคนิ่วไต สำหรับเทคนิคการวิเคราะห์สารเหล่านี้ได้แก่ การใช้เอนไซม์ (enzymatic method) [4] ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high-performance liquid chromatography, HPLC) [5] และแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) [6, 7] เป็นต้น แต่เนื่องจากการใช้เอนไซม์มีราคาแพง อีกทั้งเมื่อเปิดใช้งานแล้วอายุการใช้งานของชุดตรวจสอบเอนไซม์มีระยะเวลาเพียง 30 วันเท่านั้น ส่วน HPLC เป็นเทคนิคที่ต้องมีวิธีการเตรียมสารตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างยุ่งยาก รวมถึงการใช้สารในปริมาณมาก ดังนั้น CE จึงเป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจในการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรต เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้สารละลายน้อย การเตรียมสารตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก

CE เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ซึ่งเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของไอออน ข้อดีของเทคนิค CE ที่เหนือกว่า HPLC คือไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ยกเว้นการกรองและการเจือจาง ใช้ปริมาณสารน้อย ดังนั้นเทคนิค CE จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการหาปริมาณออกซาเลตและซีเทรต จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ามีการใช้เทคนิค CE ร่วมกับเครื่องตรวจวัดที่เป็นยูวี-วิสิเบิล (CE-UV) ในการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรต เช่น ในปี ค.ศ. 2001 Garcia และคณะ [8] ได้รายงานการตรวจวัดออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ โดยใช้บัฟเฟอร์คือ กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 0.2 M พบว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดของออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.67 mg L^{-1} และ 25.9 mg L^{-1} ตามลำดับ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2010 Muñoz และคณะ [7] ได้พัฒนาและหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดออกซาเลต ซีเทรต กรดยูริก และครีเอทีนีน ในปัสสาวะ โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM พบว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดสารดังกล่าวเท่ากับ 0.46 mg L^{-1} , 2.6 mg L^{-1} , 3.8 mg L^{-1} และ 1.3 mg L^{-1} ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตด้วยเทคนิค CE-UV นั้น พบว่ามีปัญหาเกิดขึ้นเนื่องจากออกซาเลตและซีเทรตมีความสามารถในการดูดกลืนยูวีได้ต่ำ จึงส่งผลให้ไม่สามารถตรวจวัดที่ความเข้มข้นต่ำได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรต จึงมีความสำคัญที่จะช่วยให้เทคนิค CE สามารถตรวจวัดออกซาเลตและซีเทรตในปริมาณต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการศึกษารายงานก่อนหน้านี้พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นโดยใช้เทคนิค CE โดยวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในคอลัมน์แบบออนไลน์ (on-column sample preconcentration) สามารถวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปริมาณที่ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดที่กล่าวมาข้างต้น

สำหรับวิธีการที่ใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตแบบออนไลน์ได้มีรายงานดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 2004 Hirokawa และคณะ [9] ได้รายงานการเพิ่มความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ (inorganic anions) ได้แก่ ไอโอไดด์ โบรไมด์ ออกซาเลต และไนเตรต ในซีรัมและในปัสสาวะ โดยใช้เทคนิค transient isotachopheresis (TITP) วิธีนี้เป็นการแยกสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าโดยสารในระบบเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเท่ากัน แต่บริเวณโชนสารมีสนามไฟฟ้าที่แตกต่างกันเนื่องจากความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่ต่างกัน จึงทำให้สารแยกออกเป็นโซนติดกันและอยู่ระหว่างสารละลายอิเล็กโทรไลต์ส่วนหน้า (leading electrolyte) และสารละลายอิเล็กโทรไลต์ส่วนหลัง (terminating electrolyte) วิธีนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ และให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดของออกซาเลตในซีรัมและปัสสาวะเท่ากับ 0.04 mg L^{-1} และ 0.12 mg L^{-1} ตามลำดับ แต่ในขณะเดียวกันก็พบข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ ไม่สามารถวิเคราะห์สารที่เป็นแคปโธออนและแอนไอออนในคราวเดียวกันได้ และวิธีนี้ใช้ระบบสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ซับซ้อน

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2005 Suzuki และคณะ [10] ได้รายงานการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25 mM ร่วมกับ 0.5 mM tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) โดยวิธีนี้จะละลายสารตัวอย่างในน้ำ และทำการบรรจุสารเข้าไปในคอลัมน์ในปริมาณมากด้วยศักย์ไฟฟ้า (electrokinetic injection) โดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างนาน 90 วินาที จากนั้นเริ่มให้ศักย์ไฟฟ้าสำหรับการแยก เนื่องจากมีความแตกต่างของสภาพการนำไฟฟ้าบริเวณสารตัวอย่างซึ่งมากกว่าบริเวณบัฟเฟอร์ในแคพิลลารี ไอออนของสารจะเกิดการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว เมื่อไอออนสารมาเจอกับบัฟเฟอร์จะเกิดการชะลอความเร็วลง ทำให้ไอออนของสารมาชิดกัน ซึ่งส่งผลให้ในโชนของสารตัวอย่างแคบลงและมีความเข้มข้นมากขึ้น วิธีนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ 225 เท่า จึงทำให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดของออกซาเลตเท่ากับ 0.10 ppb แต่เนื่องจากวิธีนี้ใช้การบรรจุสารตัวอย่างด้วยศักย์ไฟฟ้า สารตัวอย่างที่มีไอออนบวกหรือลบอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้นที่สามารถเข้าไปในแคพิลลารี และสลับขั้วไฟฟ้าในขั้นตอนการแยกสารตัวอย่าง เทคนิคนี้จึงไม่สามารถวิเคราะห์สารที่มีประจุต่างกันในเวลาเดียวกันได้ และปริมาณสารตัวอย่างที่บรรจุเข้าไปในแคพิลลารีจะแปรผันตามค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารแต่ละชนิดกับเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารด้วย

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่าเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตสำหรับการวิเคราะห์ด้วย CE ยังมีความซับซ้อนและมีข้อจำกัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำเอาเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นที่สามารถทำได้โดยง่าย โดยประยุกต์เทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีการบรรจุสารในปริมาณมากโดยใช้ความดันและ (large-volume sample injection) และอาศัย electro-osmotic flow (EOF) ในการกำจัดเมทริกซ์ (matrix) ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า “large-

volume sample stacking using EOF pump” [11] โดยก่อนหน้านี้ He และ Lee ได้นำเทคนิคนี้มาใช้วิเคราะห์สารในกลุ่มสารอินทรีย์ที่เป็นไอออนลบ (organic anion) คือ กรดฟูมาริก (fumaric acid) และกรดมาเลอิก (maleic acid) โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 mM ที่ pH 3.27 พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารในคอลัมน์ และให้ผลการตรวจวัดดีกว่าเดิมถึง 300 เท่า ซึ่งเทคนิคนี้เหมาะกับสารที่มีทิศทางการเคลื่อนที่ตรงข้ามกับ EOF หลักการของเทคนิคนี้คือ ใช้สภาวะในการวิเคราะห์ที่ pH ต่ำ เพื่อลดความแรงของ EOF และใช้การบรรจุสารเข้าไปในคอลัมน์ในปริมาณมากด้วยความดัน ซึ่งเมทริกซ์จะถูกกำจัดออกภายหลังด้วยอิทธิพลของ EOF เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าในการแยก สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF พร้อมกับเมทริกซ์ถูกกำจัดออกโดยเคลื่อนที่ออกมาพร้อมกับ EOF จึงทำให้ไซนสารตัวอย่างเกิดการรวมเป็นโซนที่แคบลงและมีความเข้มข้นสูงขึ้น ข้อดีของการเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีนี้คือ ทำได้ง่ายไม่ต้องมีการสลับขั้วไฟฟ้าในระหว่างการวิเคราะห์ และไม่มี ความแตกต่างของปริมาณสารที่บรรจุเพราะใช้ความดันในการบรรจุสาร เนื่องจากออกซาเลตและซิเทรตจัดอยู่ในกลุ่ม สารอินทรีย์ที่เป็นไอออนลบ (organic anion) ซึ่งสามารถแตกตัวให้ประจุลบ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคาดว่าจะสามารถนำวิธีนี้มาประยุกต์ในการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลต และซิเทรตก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิค CE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives)

1. หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกออกซาเลตและซิเทรตในตัวอย่างปัสสาวะด้วยเทคนิค CE
2. ประยุกต์วิธีการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ สำหรับการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเทรตโดยใช้เทคนิค CE
3. ประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการหาปริมาณออกซาเลตและซิเทรตในตัวอย่างปัสสาวะ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย (Scope of research)

1. หาภาวะที่เหมาะสมของการแยก การเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์สำหรับการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเทรตโดยใช้เทคนิค CE
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ได้แก่
 - ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (Limit of detection, LOD and limit of quantitation, LOQ)
 - กราฟมาตรฐาน (calibration curve)

- ความแม่นยำ (Accuracy)
- ความเที่ยง (Precision)
- ประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในตัวอย่างปัสสาวะ
- เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานที่ใช้เอนไซม์ (enzymatic method) ในการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในตัวอย่างปัสสาวะ

1.4 คำจำกัดความสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

e	ประจุของอิเล็กตรอน (1.6×10^{-19} คูลอมป์)
i.d.	เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน (internal diameter) ของคะพิลลารี
l_{inj}	ความยาวของโชนสารตัวอย่างที่บรรจุ (sample plug)
r_c	รัศมีด้านในของคะพิลลารี
r_h	รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบ (hydrodynamic radius of the ion)
t_{eo}	ไมเกรชันไทม์ของสารที่ไม่มีประจุ
t_{inj}	เวลาของการบรรจุสาร
t_m	ไมเกรชันไทม์ (migration time)
v_{eo}	ความเร็วของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic velocity)
v_{ep}	ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่สังเกตได้ (electrophoretic velocity)
v_{hf}	hydrodynamic flow velocity
v_{net}	ผลรวมของความเร็วของสารเนื่องจากอิเล็กโทรฟอรีซิสและอิเล็กโทรออสโมซิส
w	ความกว้างของฐานพีค (peak width)
A	พื้นที่ใต้พีค (peak area)
A_{corr}	พื้นที่ใต้พีคแก้ไข (corrected peak area)
BGE	สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte)
C	ความเข้มข้นของสาร
$C_{diluted}$	ความเข้มข้นของสารละลายเจือจางที่ได้จากกราฟมาตรฐาน
CE	คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอรีซิส (capillary electrophoresis)

CEC	คะพิลลารีอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (capillary electrochromatography)
CGE	คะพิลลารีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary gel electrophoresis)
CIEF	คะพิลลารีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (capillary isoelectric focusing)
CITP	คะพิลลารีไอโซแทโคโฟรีซิส (capillary isotachoporesis)
CL	เอนไซม์ซิเทรตไลเอส (citrate lyase)
CZE	คะพิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis)
D_i	ความแตกต่างของการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี
\bar{D}	ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี
DMAB	3-(dimethylamino) benzoic acid
D-LDH	D-lactate dehydrogenase
E	ความเข้มข้นของสนามไฟฟ้า (electric field strength)
EOF	การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow)
l	ความยาวของคะพิลลารีจากด้านที่บรรจุสารตัวอย่างจนถึงด้านเครื่องตรวจวัด
L	ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี
L-MDH	L-malate dehydrogenase
LOD	ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ (limit of detection)
LOQ	ค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (limit of quantification)
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone
MEKC	คะพิลลารีอิเล็กโทรไคเนติกโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography)
PVP	polyvinylpyrrolidone
Q_{inj}	ปริมาณสารที่บรรจุเข้าไปในคะพิลลารี
R_s	ค่าการแยกของสาร (Resolution)
RSD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
S/N	อัตราส่วนของสัญญาณความสูงของพีคต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio)
V	ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสาร (applied voltage)
\bar{X}	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคและไมเกรชันโทม์ของสารทั้งหมด
z	ค่าประจุบนไอออนของสาร (electronic charge)
α	ดีกรีการแตกตัวของสาร (degree of ionisation)
ΔP	ความแตกต่างของความดันที่ใช้สารบรรจุสาร
Δt_m	ความแตกต่างของไมเกรชันโทม์ของสารที่อยู่ติดกัน
ϵ	permittivity
η	ความหนืดของสารละลาย (viscosity)
μ	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility)
μ_{eo}	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility)
μ_o	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารที่แตกตัว 100%
ζ	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (anticipated outcomes)

ภาวะที่เหมาะสมของการแยกออกซาเลตและซีเทรต และวิธีการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์สำหรับการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตโดยใช้เทคนิค CE เพื่อที่จะสามารถตรวจหาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยโรคนี้ไว้ต่อไป

1.6 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ดำเนินการทดลอง รวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์

2. จัดทำโปสเตอร์ เพื่อนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทยครั้งที่ 40 (วทท. 40) (The 40th congress on science & technology of Thailand (STT 40)) วันที่ 2-4 ธันวาคม 2557



บทที่ 2

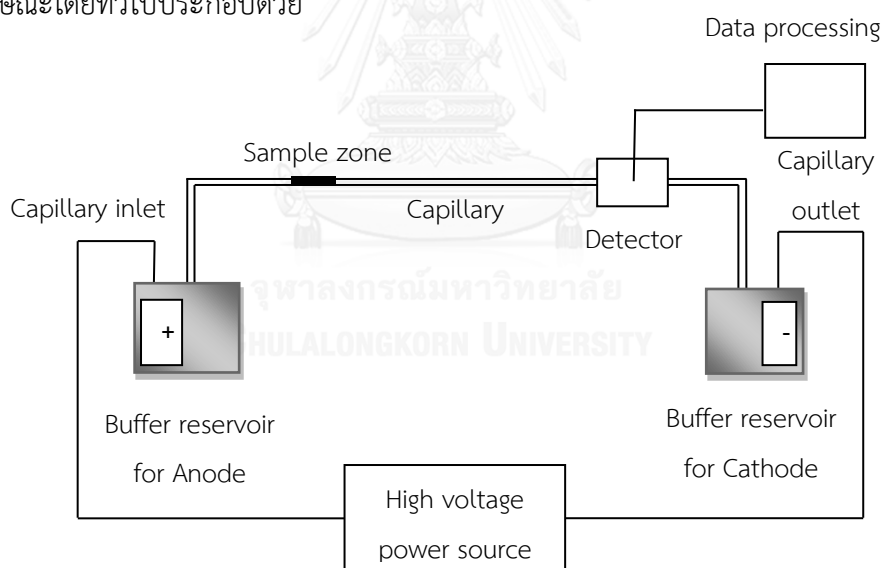
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 คะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis, CE)

กะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคการแยกสารภายในหลอดกะพิลลารีที่บรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ภายใต้สนามไฟฟ้า กลไกการแยกจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งจะแปรผันตามอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของสาร

2.1.1 อุปกรณ์ของเครื่องกะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เครื่องกะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสมีรูปร่างต่างกันไปตามการออกแบบของแต่ละบริษัท แต่ลักษณะโดยทั่วไปประกอบด้วย



รูปที่ 1 อุปกรณ์ของเครื่องกะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (ดัดแปลงจาก [12])

1) คะพิลลารี (Capillary)

กะพิลลารีมีลักษณะคล้ายหลอดเส้นเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในตั้งแต่ 10-200 μm [13] เนื่องจากกะพิลลารีเป็น fused silica จึงเคลือบภายนอกด้วยพอลิเอไมด์ (polyamide) เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นและป้องกันการแตกหัก แต่เนื่องจากพอลิเอไมด์มีลักษณะทึบแสง

ดังนั้นเมื่อต้องการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดประเภทแสงเช่น ยูวี-วิสิเบิล (UV-visible) จะลอกพอลิเอไมด์ออกโดยการเผาเฉพาะบริเวณที่จะตรวจวัด (detection window)

2) เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (High voltage power source)

เครื่องกำเนิดไฟฟ้าส่วนใหญ่นิยมใช้แบบศักย์ไฟฟ้าคงที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -30 ถึง +30 kV และเป็นเครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงให้กระแสสูงสุด 300 μ A การใช้ศักย์ไฟฟ้ามี 2 แบบคือการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบขั้วปกติ (normal polarity) และการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reversed polarity) กล่าวคือการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบขั้วปกติด้านบรรจุสารตัวอย่างเข้า (inlet) เป็นขั้วบวก (anode) ด้านปลายออกหรือด้านเครื่องตรวจวัด (outlet) เป็นขั้วลบ (cathode) สำหรับการ ใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้วด้านบรรจุสารตัวอย่างเข้าเป็นขั้วลบและด้านปลายออกหรือด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก

3) ขั้วไฟฟ้า (Electrode)

ขั้วไฟฟ้าที่ใช้สำหรับเครื่อง CE ส่วนใหญ่เป็นลวดแพลทินัม (platinum wire)

4) เครื่องตรวจวัด (Detector)

ส่วนใหญ่นิยมใช้เครื่องตรวจวัดที่สามารถตรวจวัดไอออนของสารบนคะฟิลลารีได้โดยตรง ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล (UV-visible) และฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) นอกจากนี้ยังมีการตรวจวัดภายนอกคะฟิลลารีโดยมีส่วนเชื่อมต่อจากปลายคะฟิลลารี (interface) เข้าสู่เครื่องตรวจวัดอื่นได้แก่ เครื่องตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical detector) และแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS)

5) สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE)

สารละลายอิเล็กโทรไลต์ส่วนใหญ่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมพีเอชให้คงที่และอาจมีการเติมสารเติมแต่งเช่น สารลดแรงตึงผิว ตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อปรับปรุงการแยกให้เหมาะสมสำหรับการใช้งานในการแยกสารแต่ละชนิด

6) ภาชนะบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์และสารตัวอย่าง (Buffer reservoir)

ภาชนะบรรจุที่ใช้โดยส่วนใหญ่เป็นขวดแก้ว (vial) ขนาด 1-5 mL ตามความต้องการในการใช้งาน

7) ส่วนควบคุมความดัน (pressure controller)

เป็นส่วนที่ใช้สำหรับการบรรจุสารตัวอย่างเข้าไปในคะพิลลารี โดยการใส่แก๊สไนโตรเจน หรืออัดอากาศโดยใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่ในเครื่องโดยตรง

8) ส่วนควบคุมอุณหภูมิของคะพิลลารี (temperature controller)

ใช้สำหรับปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ต้องการสำหรับการแยกสาร และยังเป็นตัวช่วยควบคุมอุณหภูมิในเครื่องที่เกิดจากความร้อนในการให้ศักย์ไฟฟ้า (joule heating) อีกด้วย

9) ระบบการฉีดสารตัวอย่าง (sample introduction)

ระบบการฉีดสารตัวอย่างมี 2 ชนิดได้แก่ การฉีดสารตัวอย่างโดยใช้ความดัน (pressure หรือ hydrodynamic injection) และการฉีดสารตัวอย่างโดยใช้ศักย์ไฟฟ้า (electrokinetic injection)

2.1.2 ประเภทของ CE

1) Capillary zone electrophoresis (CZE)

การแยกเกิดขึ้นภายในคะพิลลารีที่บรรจุด้วย BGE โดยกลไกการแยกขึ้นอยู่กับความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งขึ้นอยู่กับประจุและขนาดของสาร CZE สามารถแยกสารที่มีประจุทั่วไป ส่วนสารที่ไม่มีประจุจะสามารถวิเคราะห์ได้โดยการเติม complexing agent ที่มีประจุ

2) Micellar electrokinetic chromatography (MEKC)

สามารถแยกได้ทั้งสารที่มีหรือไม่มีประจุ โดยมีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ลงใน BGE เพื่อให้เกิดเป็นไมเซลล์ (micelle) กลไกการแยกขึ้นอยู่กับค่า μ ของสารและความแตกต่างของค่าคงที่การกระจายตัวของสารระหว่างเอควีเอสเฟส (aqueous phase) และไมเซลล์าร์เฟส (micellar phase)

3) Capillary gel electrophoresis (CGE)

เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารตามขนาดของโมเลกุลของสารแต่ละชนิด โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลที่บรรจุอยู่ในคะพิลลารี มักใช้ในการแยกสารชีวโมเลกุล (biomolecules) เช่น DNA และโปรตีน

4) Capillary isoelectric focusing (CIEF)

เป็นการทำให้เกิด pH gradient ขึ้นภายในคะพิลลารี โดยใช้สารแอมโฟไฟลด์ (ampholyte) ที่มีทั้งประจุบวกและลบภายในโมเลกุล กลไกการแยกขึ้นอยู่กับค่า isoelectric point (pI) ของสาร มักใช้วิเคราะห์สารจำพวกโปรตีนและกรดอะมิโน

5) Capillary isotachoporesis (CITP)

กลไกการแยกขึ้นอยู่กับความแตกต่างของค่า μ ของสารแต่ละชนิด โดยที่ภายในคะพิลลารีนั้นจะประกอบด้วยสารอิเล็กโทรไลต์ 2 ชนิด โดยสารอิเล็กโทรไลต์ส่วนหน้า (leading electrolyte) จะมีค่า μ สูงและสารอิเล็กโทรไลต์ส่วนหลัง (terminating electrolyte) จะมีค่า μ ต่ำ เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า สารในคะพิลลารีจะแยกออกเป็นโซน และจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่เท่ากัน แต่บริเวณโซนสารมีสนามไฟฟ้าที่ต่างกันจึงทำให้สารแยกออกจากกันได้

สำหรับเทคนิค CE นั้น CZE เป็นโหมด (mode) ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากใช้งานง่าย ไม่ต้องมีการเตรียมคอลัมน์ที่ยุ่งยาก และสารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็นบัฟเฟอร์ทั่วไป เช่น ฟอสเฟต และบอเรต และอาจมีสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยก ในงานวิจัยนี้ได้เลือกเทคนิค CZE ในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ ดังจะกล่าวถึงรายละเอียดของ CZE ดังต่อไปนี้

2.1.3 คะพิลลารีโซนอิเล็กโทรฟอรีซิส (Capillary zone electrophoresis, CZE)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารอย่างแพร่หลาย โดยการแยกขึ้นอยู่กับความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ) ของสาร ซึ่งแปรผันตามอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของสาร

2.1.3.1 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ)

ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารเป็นความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity, v_{ep}) ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า (E) ดังแสดงในสมการ 1 และ 2

$$v_{ep} = \mu E \quad \text{สมการ 1}$$

$$\mu = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} \quad \text{สมการ 2}$$

z = ค่าประจุของไอออนของสาร

e = ค่าคูลอมบ์ของอิเล็กตรอน (1.6×10^{-19} คูลอมบ์)

η = ความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (N/m^2)

r_h = รัศมีไฮโดรไดนามิกของสาร (hydrorynamic radius of ion)

μ = ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility)

จากสมการที่ 2 จะเห็นได้ว่าค่า μ ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างประจุ (z) ต่อขนาด (r_h) กล่าวคือสารที่มีประจุมากและ r_h น้อยจะมีค่า μ มาก นั่นคือจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีประจุน้อยและขนาดใหญ่แน่นอน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อค่า μ ได้แก่

1) พีเอชของ BGE

พีเอชมีผลต่อดีกรีการแตกตัวของสาร เมื่อเพิ่มพีเอชของบัฟเฟอร์ส่งผลให้สารที่เป็นกรดอ่อนแตกตัวกลายเป็นไอออนลบได้มากขึ้น เช่นเดียวกันเมื่อพีเอชของบัฟเฟอร์ลดลงสารที่เป็นเบสจะสามารถรับโปรตอนทำให้มีไอออนบวกเพิ่มขึ้น ดังนั้นถ้าสารกลายเป็นไอออนได้มากขึ้นจะส่งผลให้ค่า μ เพิ่มขึ้น

2) ความเข้มข้นของ BGE หรือความแรงของไอออนิก (ionic strength)

การเพิ่มความเข้มข้นของ BGE จะทำให้ไอออนในระบบมากขึ้น และสารจะถูกล้อมรอบด้วยแคตไอออนหรือแอนไอออนที่มีประจุตรงข้ามทำให้ r_h เพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ค่า μ ของสารลดลง นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของ BGE จะสามารถทำให้เกิด joule heating ซึ่งมีผลทำให้ความหนืดของสารลดลงจึงอาจส่งผลให้ค่า μ เพิ่มขึ้นได้

3) ความหนืดและอุณหภูมิ

จากสมการ 2 แสดงให้เห็นว่า μ แปรผกผันกับความหนืด กล่าวคือเมื่อความหนืดของสารตัวกลางมีค่ามากจะส่งผลให้ μ ของสารลดลง แต่หากความหนืดของสารตัวกลางลดลงจะส่งผลให้ μ เพิ่มขึ้น และอุณหภูมิมิมีผลต่อความหนืดของสารอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นทำให้ความหนืดของสารลดลง ดังนั้นเมื่อความหนืดลดลงจะส่งผลให้ μ ที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง

4) ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก

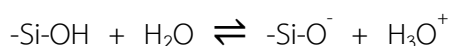
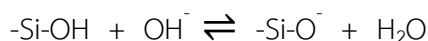
ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นทำให้ μ ของสารเพิ่มขึ้นและอาจทำให้ค่า μ เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเกิด joule heating ได้อีกด้วย

5) ตัวทำละลายอินทรีย์

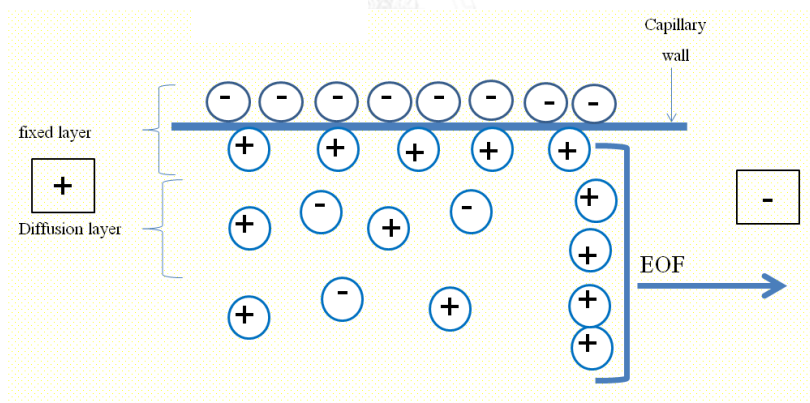
การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ใน BGE มีผลทำให้ μ ลดลงเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ไปล้อมรอบไอออนของสารทำให้สารมี r_h เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงใน BGE ปริมาณหนึ่งจะทำให้ความหนืดลดลงและมีผลให้ μ เพิ่มขึ้นได้

2.1.3.2 อิเล็กโทรออสโมซิส (Electroosmosis)

เนื่องจากคะพิลลารีทำจาก fused silica ผิวด้านในประกอบด้วยหมู่ซิลานอล (-Si-OH) เมื่อหมู่ซิลานอลที่ผิวด้านในของคะพิลลารีสัมผัสกับ BGE ที่มีพีเอชมากกว่า 2 จะเกิดการแตกตัวของหมู่ซิลานอลขึ้นดังสมการต่อไปนี้



อธิบายในรูป 2 เมื่อหมู่ซิลินอลแตกตัวจะทำให้มีไอออนบวก (H^+ หรือ H_3O^+) อยู่ในสารละลายเป็นจำนวนมากหรือรวมกับ OH^- เกิดเป็นโมเลกุลของน้ำ และไอออนบวกเหล่านี้บางส่วนจะเกาะที่ผิวของคะพิลลารีที่มีประจุตรงข้ามกัน โดยจะเรียงตัวเกิดเป็นชั้นในลักษณะ 2 ชั้น (double layer) ชั้นแรกเรียกว่า stern layer หรือ fixed layer เป็นชั้นที่ไอออนบวกเกาะอยู่ติดกับผิวของคะพิลลารีด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ ทำให้ไอออนในชั้นนี้ไม่เคลื่อนที่ และชั้นถัดมาเรียกว่า diffusion layer หรือ mobile layer ส่วนไอออนอื่น ๆ ที่เหลือจะอยู่ใน bulk solution [14]



รูปที่ 2 การเกิด double layer ที่ผนังคะพิลลารีและการเคลื่อนที่ของ electroosmotic flow (EOF) (ดัดแปลงจาก [15])

จากรูป 2 เมื่อเริ่มให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารี ไอออนบวกจำนวนมากที่ถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของน้ำจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ ทำให้ไอออนบวกเหล่านี้พาโมเลกุลของน้ำเคลื่อนที่ไปด้วย ซึ่งเรียกรวมการเคลื่อนที่หรือการไหลของสารในลักษณะนี้ว่า electroosmotic flow (EOF) ซึ่งสารที่มีประจุบวก ลบ และไม่มีประจุจะเคลื่อนที่เนื่องจากแรง EOF

ที่เท่ากันแต่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าหรือค่า μ ที่ต่างกัน จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้

ความเร็วของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic velocity, v_{eo}) ในความเข้มข้นของสนามไฟฟ้า 1 V m^{-1} เรียกว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility, μ_{eo}) ดังแสดงในสมการที่ 3

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{-\epsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad \text{สมการ 3}$$

ϵ = ค่า permittivity ของตัวกลาง

ζ = ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential)

2.1.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อ EOF

1) ความต่างศักย์ไฟฟ้าและขนาดของคะพิลลารี

การให้ศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ μ_{eo} เพิ่มขึ้นเนื่องจากความร้อนในการให้ศักย์ไฟฟ้าเช่นเดียวกับขนาดของคะพิลลารีที่มีขนาดใหญ่จะมีผลต่อการระบายความร้อนได้ช้าลง ดังนั้นจึงทำให้ความหนืดของสารละลายในคะพิลลารีลดลง จึงส่งผลให้ μ_{eo} เพิ่มขึ้น

2) พีเอชของบัฟเฟอร์

ค่า μ_{eo} เพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่เพิ่มขึ้นกล่าวคือพีเอชมีผลต่อการแตกตัวของหมู่ซิลานอลที่ผนังของคะพิลลารี เมื่อบัฟเฟอร์มีพีเอชต่ำหมู่ซิลานอลจะแตกตัวได้น้อย จึงทำให้ค่า μ_{eo} น้อยลง ถ้าพีเอชเพิ่มขึ้นหมู่ซิลานอลจะแตกตัวได้มากขึ้นจึงทำให้ค่า μ_{eo} เพิ่มขึ้น

3) ตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เติมลงไปใน BGE เพื่อปรับปรุงการแยกให้ดีขึ้นนั้นมีผลทำให้ EOF ลดลง กล่าวคือตัวทำละลายอินทรีย์จะเกิดอันตรกิริยากับผนังของคะพิลลารีส่งผลให้ความหนืดบริเวณ double layer เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ทำให้ μ_{eo} ลดลง

4) ความเข้มข้นหรือความแรงไอออนิกของ BGE

จากสมการ 3 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นหรือความแรงของสารละลาย BGE ทำให้ ζ ลดลงเนื่องจากความหนาของ diffusion layer ลดลงซึ่งจะส่งผลให้ μ_{eo} ลดลง แต่การเพิ่มความแรงของไอออนก็อาจส่งผลให้ μ_{eo} เพิ่มขึ้นได้เนื่องจากการเกิดความร้อนที่เพิ่มขึ้นทำให้ความหนืดของสารละลายลดลง

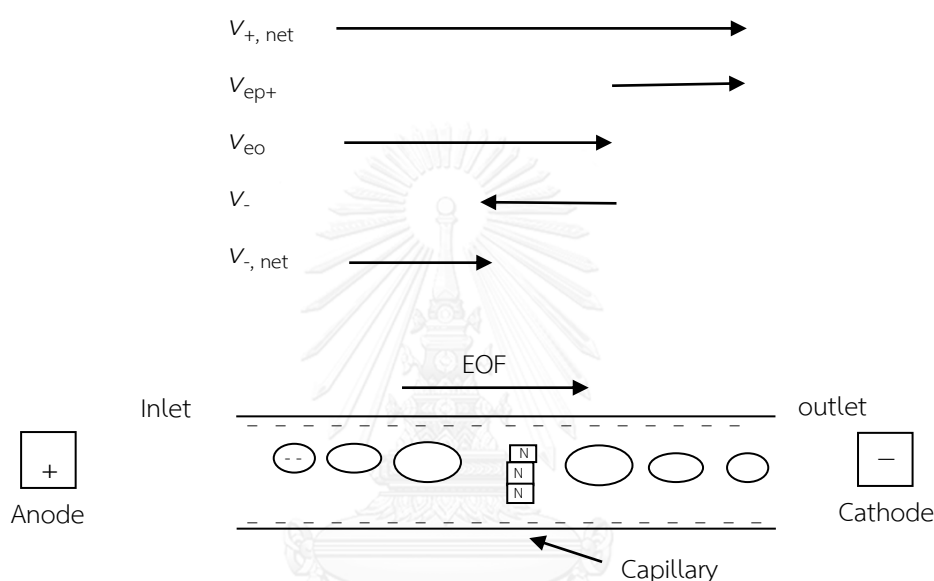
5) ความหนืดและอุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ μ_{eo} เพิ่มขึ้นเนื่องจากความหนืดลดลง อธิบายได้ในสมการที่ 3 จะเห็นว่าค่า μ_{eo} แปรผกผันกับความหนืด

2.1.3.4 ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ EOF

เกิดขึ้นได้ 2 แบบดังต่อไปนี้

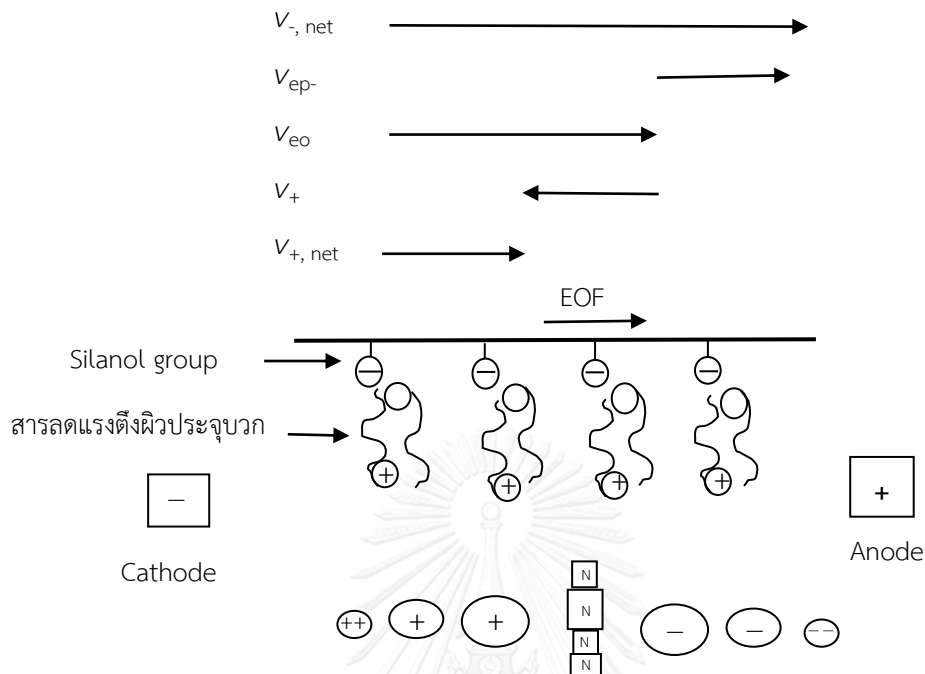
1) การเคลื่อนที่ของสารภายใต้ EOF แบบปกติ (Normal EOF)



รูปที่ 3 การเคลื่อนที่ของสารภายใต้อิทธิพลของ EOF แบบปกติและใช้ขั้วไฟฟ้าแบบปกติ (ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทด) (ดัดแปลงจาก [16])

โดยปกติแล้วการเคลื่อนที่ของ EOF จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบและสารตัวอย่างได้รับอิทธิพลของแรง EOF ที่เท่ากัน ดังนั้นสารที่เป็นประจุบวกจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน ตามด้วยสารที่ไม่มีประจุซึ่งจะเคลื่อนที่ออกมาพร้อมกันและพร้อมกับ EOF ส่วนสารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ออกมาช้าที่สุด สารที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วของตัวเอง (v_{ep+}) ร่วมกับการเคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของ EOF (v_{eo}) ดังนั้นสารที่มีค่าประจุบวกมากและมีขนาดเล็กจะมีค่า μ มากจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน สำหรับกรณีสารที่เป็นประจุลบ ซึ่งทิศทางการเคลื่อนที่จะตรงข้ามกับ EOF ดังนั้นสารที่มีค่าประจุลบมากขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าที่สุด เพราะมีแรงต้าน EOF ได้มากที่สุดนั่นเอง

2) การกลับทิศการเคลื่อนที่ของ EOF (Reversed EOF)



รูปที่ 4 การเคลื่อนที่ของสารภายใต้อิทธิพล EOF และใช้การกลับขั้วไฟฟ้าหรือ reversed polarity (ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแอโนด) (ดัดแปลงจาก [15])

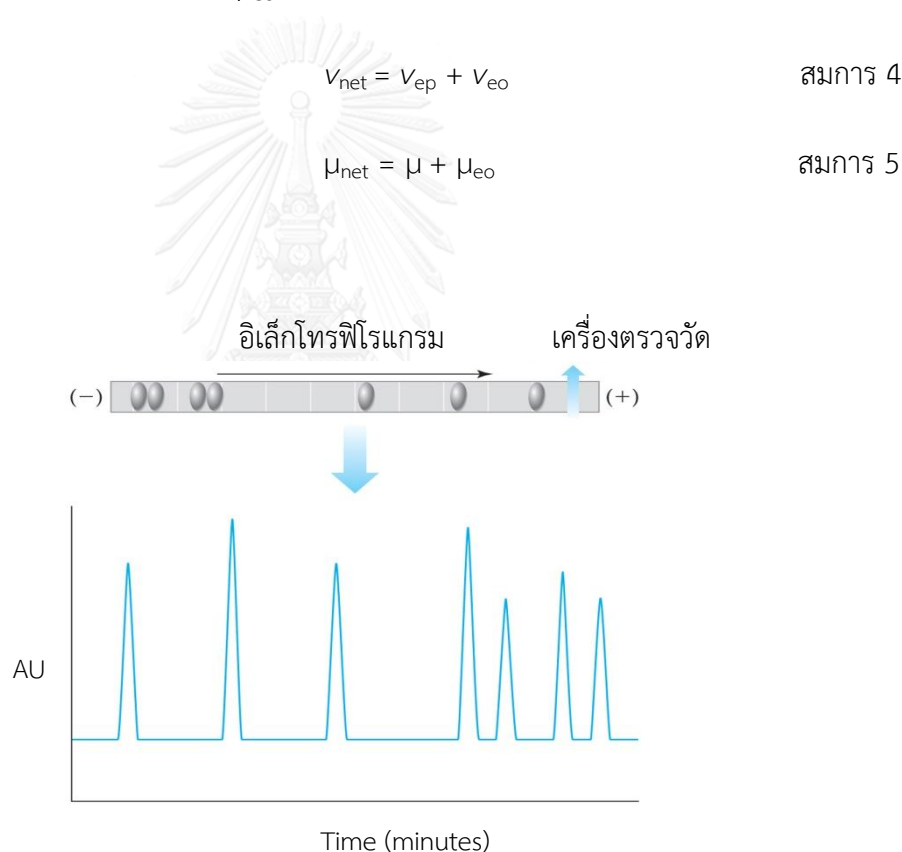
การกลับทิศทางของ EOF มักใช้ควบคู่กับการกลับทิศของขั้วไฟฟ้า สามารถทำได้ โดยการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่มีประจุบวกลงไป ใน BGE ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการเรียงตัวเป็น 2 ชั้นบนผิวคะพิลลารีดังแสดงในรูปที่ 4 กล่าวคือชั้นแรกนั้นประจุบวกที่เป็นส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวจะจับกับประจุลบที่ผิวของคะพิลลารีโดยหันส่วนหางออกมา ชั้นที่สองเกิดจากส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวเข้าไปแทรกกับส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวชั้นแรกและหันส่วนหัวที่เป็นประจุบวกออกมา ทำให้ที่ผนังของคะพิลลารีเป็นประจุบวกแทนที่จะเป็นประจุลบ และภายในคะพิลลารีมีประจุลบอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าประจุลบเหล่านี้จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกและพาโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบเคลื่อนที่ไปด้วย เกิดเป็น EOF ที่เคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก หากต้องการให้ EOF เคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจวัดต้องทำการกลับขั้วไฟฟ้าให้เครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก ซึ่งเรียกว่าการกลับขั้วไฟฟ้า (reversed polarity) ดังนั้นสารที่มีประจุลบมากและมีขนาดเล็ก จะมีค่า μ มากและเคลื่อนที่ออกมาก่อนส่วนสารที่มีประจุบวกมากและมีขนาดเล็ก จะเคลื่อนที่ออกมาหลังสุดเพราะมีแรงต้าน EOF ได้มากที่สุดนั่นเอง

2.1.3.5 ไมเกรชันไทม์ (migration time, t_m)

สารตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE เมื่อสารเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดจะแสดงผลออกมาเป็นพีคพร้อมกับระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่ออกมาดังรูปที่ 5 เรียกผลที่แสดงออกมานี้ว่าอิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) และเรียกระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่ออกมาถึงเครื่องตรวจวัดว่าไมเกรชันไทม์ (migration time, t_m) ในสมการที่ 4 และ 5 ในสถานะ EOF ปกติ ความเร็วของสารที่เคลื่อนที่ออกมาถึงเครื่องตรวจวัด (v_{net}) คือผลรวมของความเร็วของสาร (v_{ep}) กับความเร็วของ EOF (v_{eo}) หรือกล่าวได้ว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารสุทธิ (μ_{net}) จะเป็นผลรวมระหว่างค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (μ) และค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของ EOF (μ_{eo}) ดังสมการ

$$v_{net} = v_{ep} + v_{eo} \quad \text{สมการ 4}$$

$$\mu_{net} = \mu + \mu_{eo} \quad \text{สมการ 5}$$



รูปที่ 5 ตัวอย่างอิเล็กโทรฟีโรแกรมที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE

จากอิเล็กโทรฟีโรแกรมเมื่อทราบค่าไมเกรชันไทม์ของสารจะสามารถคำนวณเพื่อหาค่า μ_{eo} และค่า μ โดยอาศัยสมการ 6 และ 7

$$\mu_{eo} = \frac{IL}{vt_{eo}} \quad \text{สมการ 6}$$

$$\mu = \mu_{net} - \mu_{eo} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \frac{IL}{V} \quad \text{สมการ 7}$$

l = ความยาวจากปลายของคะพิลลารีด้านเข้า (inlet) จนถึงด้านเครื่องตรวจวัด (outlet) (m)

L = ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี (m)

V = ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก (V)

t_m = ไมเกรชันไทม์ของสาร (s)

2.1.3.6 การบรรจุสารตัวอย่าง (sample injection)

การบรรจุสารตัวอย่างในเทคนิค CE มี 2 วิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายกล่าวคือ

1) วิธีการบรรจุสารตัวอย่างด้วยศักย์ไฟฟ้า (Electrokinetic injection)

วิธีการบรรจุสารตัวอย่างเข้าไปในคะพิลลารีด้วยศักย์ไฟฟ้าอาศัยหลักการอิเล็กโทรไมเกรชัน (electromigration) การบรรจุสารตัวอย่างด้วยวิธีนี้ทำให้เกิดความยาวของ sample plug (l_{inj}) ดังสมการที่ 8 และปริมาณสารที่บรรจุเข้าไปในคะพิลลารี (Q_{inj}) สามารถควบคุมได้ด้วยการเปลี่ยนระยะเวลาของการบรรจุ (t_{inj}) หรือความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง (E) ดังสมการที่ 9

$$l_{inj} = (\mu + \mu_{eo}) Et_{inj} \quad \text{สมการ 8}$$

$$Q_{inj} = (\mu + \mu_{eo}) C \pi r_c^2 l_{inj} E t_{inj} \quad \text{สมการ 9}$$

C = ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

อย่างไรก็ตามการบรรจุสารตัวอย่างด้วยศักย์ไฟฟ้ามีความคลาดเคลื่อนที่เด่นชัดอยู่ 2 ประการคือ

- เกิดจากความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารแต่ละชนิด เช่นในกรณีของสารในระบบที่มี EOF มาก สารที่มีประจุบวกจะมีปริมาณการเคลื่อนที่เข้าไปในคะพิลลารีได้มากกว่าสารที่มีประจุลบ เนื่องจากสารที่มีประจุลบจะมีทิศทางการเคลื่อนที่ของ

μ และ μ_{e0} ตรงข้ามกัน ถ้าสารมีประจุเหมือนกัน สารที่มีค่า μ มาก จะเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์ได้มากกว่าสารที่มี μ น้อย

- หากสารที่บรรจุเข้าไปในคัพพิลลารีนั้นอยู่ในเมทริกซ์ที่ต่างกันก็จะส่งผลให้ปริมาณการบรรจุสารเข้าไปในคัพพิลลารีต่างกันด้วยเนื่องจากมี E , μ และ μ_{e0} ที่ต่างกันจึงทำให้มีผลต่อความถูกต้องในการวิเคราะห์สาร

2) การบรรจุสารตัวอย่างด้วยความดัน (Hydrodynamic injection)

การบรรจุสารตัวอย่างด้วยความดันจะช่วยลดความแตกต่างของปริมาณสารที่บรรจุเนื่องมาจากความแตกต่างของค่าการนำไฟฟ้าที่ต่างกันของสารและเมทริกซ์ที่ต่างกัน เทคนิคการบรรจุสารด้วยวิธีนี้จึงเป็นที่นิยม การบรรจุสารตัวอย่างด้วยความดันสามารถทำได้หลายวิธีคือการบรรจุสารโดยอาศัยการไหลตามแรงโน้มถ่วงของโลก (gravity flow injection) การบรรจุตัวอย่างโดยการอัดอากาศ (pressurized injection) และการบรรจุตัวอย่างโดยการดูดอากาศ (vacuum injection) แต่ที่นิยมใช้คือการบรรจุตัวอย่างโดยการอัดอากาศ ซึ่งใช้หลักการคือทำให้เกิดความแตกต่างของความดันระหว่างภาชนะที่บรรจุสารตัวอย่างและภาชนะที่บรรจุ BGE ด้านเครื่องตรวจวัด โดยที่การบรรจุสารตัวอย่างโดยการอัดอากาศนั้นเป็นการอัดอากาศลงไปในภาชนะที่บรรจุสารละลาย ตัวอย่างส่วนการดูดอากาศเป็นการดูดอากาศจากภาชนะด้านเครื่องตรวจวัด สารตัวอย่างสามารถเข้าไปยังคัพพิลลารีได้เนื่องจาก hydrodynamic flow velocity (v_{hf}) ปริมาณของสารที่บรรจุไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างและเมทริกซ์แต่จะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของความดัน (ΔP) และเวลาที่ใช้ในการให้ความดัน (t_{inj}) ดังสมการที่ 10

$$v_{inj} = \frac{\Delta P r_c^2}{8\pi L} t_{inj} \quad \text{สมการ 10}$$

r_c = รัศมีด้านในของคัพพิลลารี

โดยทั่วไปจะใช้ความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีในการบรรจุสารตัวอย่างถ้าสารที่มีความเข้มข้นน้อยและมีสมบัติในการดูดกลืนยูวีต่ำ จะใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างนานขึ้น เพื่อช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในคัพพิลลารี

2.1.3.7 การเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ (On-line preconcentration)

สารที่มีสมบัติในการดูดกลืนยูวีต่ำ อาจทำให้การตรวจวัดสารในปริมาณความเข้มข้นน้อยไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์

โดยใช้เทคนิค CE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้ไอออนของสารแคบลง โดยอาศัยการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากแล้วทำให้สารเคลื่อนที่เข้ามาชิดกันเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนสารตัวอย่าง วิธีนี้เป็น การเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดสารในปริมาณน้อย ๆ ได้อย่างถูกต้อง ซึ่งเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ใน CE มีด้วยกันหลายวิธี เช่น

- Sample stacking เป็นเทคนิคที่ทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าชิดกันทำให้ความยาวของไอออนสารตัวอย่างแคบลง [17] เกิดขึ้นเมื่อสารตัวอย่างมีสภาพการนำไฟฟ้า (conductivity) น้อยกว่า BGE สารตัวอย่างในแคพิลลารีจะมี E สูง เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่มาเจอกับไอออนของ BGE จะเกิดการชะลอความเร็วลงทำให้ไอออนของสารมาชิดกันเกิดการ stacking หรือการอัดกันของไอออนสาร ทำให้ไอออนสารแคบลงและความเข้มข้นสูงขึ้น

- การบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากแล้วสลับขั้วไฟฟ้าเพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก (Large volume sample stacking using polarity switching) เป็นเทคนิคการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้การสลับขั้วไฟฟ้าเพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก ทำให้ไอออนสารแคบลงและสารมีความเข้มข้นมากขึ้นหรือเกิดการ stacking [18]

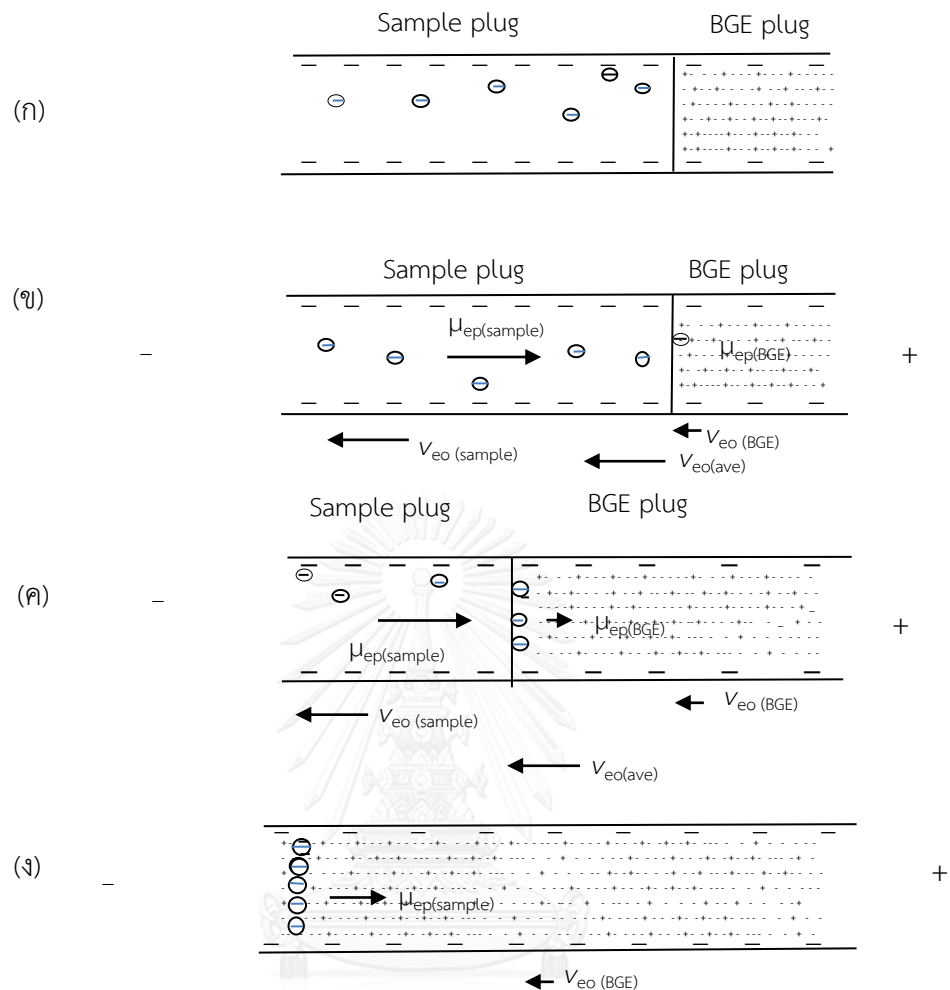
- การบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก (Large volume sample stacking using EOF pump) [11] วิธีนี้สารจะต้องเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF ดังนั้นจะเหมาะกับสารที่เป็นไอออนลบ และจะต้องทำที่ pH ต่ำ เพื่อให้มีความแรง EOF น้อย เพื่อที่สารที่เป็นไอออนลบจะสามารถต้านการเคลื่อนที่ของ EOF ได้ วิธีนี้ทำได้โดยการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดัน จากนั้นเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า สารที่เป็นประจุลบจะเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF และใช้ EOF ในการกำจัดเมทริกซ์ออกในขณะที่สารเกิดการ stacking เป็นไอออนที่แคบลงและมีความเข้มข้นมากขึ้น

เนื่องจากออกซาเลตและซิเทรตมีประจุลบจึงทำให้มีทิศทางการเคลื่อนที่ตรงข้ามกับ EOF เทคนิคที่น่าสนใจในการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของในแคพิลลารีของออกซาเลตและซิเทรตคือการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก (Large volume sample stacking using EOF pump)

2.1.3.8 การบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก (Large volume sample stacking using EOF pump)

เป็นวิธีการเพิ่มความเข้มข้นโดยอาศัยหลักการบรรจุสารตัวอย่างเข้าไปในแคพิลลารีในปริมาณมากด้วยความดันและกำจัดเมทริกซ์ออกภายใต้อิทธิพลของ EOF ที่ไม่สูงมากนัก (low EOF) ดังนั้นจะต้องทำในภาวะที่ pH ต่ำ โดยสารที่ต้องการเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิคนี้จะต้อง

เป็นสารที่แตกตัวให้ประจุลบ ซึ่งสารจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางที่ตรงข้ามกับ EOF แต่เนื่องจาก EOF ต่ำ สารที่เป็นไอออนลบจะสามารถต้านการเคลื่อนที่ของ EOF ได้ ขั้นตอนการทำงานของวิธีนี้อธิบายได้ในรูปที่ 6 โดยเริ่มต้นจากรูปที่ 6 (ก) เป็นการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดัน เมื่อเพิ่มระยะเวลาการบรรจุสารมากขึ้น สารจะสามารถเคลื่อนที่เข้าไปในคะพิลลารีได้มากขึ้นนั่นเอง ขั้นตอนต่อมาในรูปที่ 6 (ข) เมื่อเริ่มต้นให้ศักย์ไฟฟ้าโดยใช้ reversed polarity สารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับด้านขั้วไฟฟ้าแอโนด (anode) ส่วน EOF จะพาเมทริกซ์ซึ่งมีประจุเป็นบวกหรือเป็นกลางหรือไอออนลบที่ไม่สามารถต้าน EOF ได้เคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าด้านลบหรือขั้วไฟฟ้าแคโทด (cathode) ต่อมาในรูป 6 (ค) สารที่มีประจุไฟฟ้าลบที่เคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับอย่างต่อเนื่องนั้นจะเกิดแรงต้านกับแรงของ EOF จึงเกิดการเคลื่อนที่ถอยย้อนมายังด้านขั้วไฟฟ้าแอโนด เนื่องจากสถานะของ EOF ที่ไม่สูงมาก จึงทำให้สารมีแรงพอที่จะเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องไปยังเครื่องตรวจจับจึงทำให้เกิดการรวมตัวของสารเป็นโซนแคบ ๆ ในขณะที่ EOF ก็เคลื่อนที่พาเอาเมทริกซ์ออกจากโซนสารตัวอย่าง ขั้นตอนสุดท้ายในรูปที่ 6 (ง) EOF พาเมทริกซ์ออกไปจากคอลัมน์และสารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ออกมายังเครื่องตรวจจับตามทิศทางการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารอย่างต่อเนื่องโดยสารจะเกิดการแยกตามค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า



$\mu_{ep(\text{sample})}$ = electrophoretic mobility ของไอออนลบใน sample plug

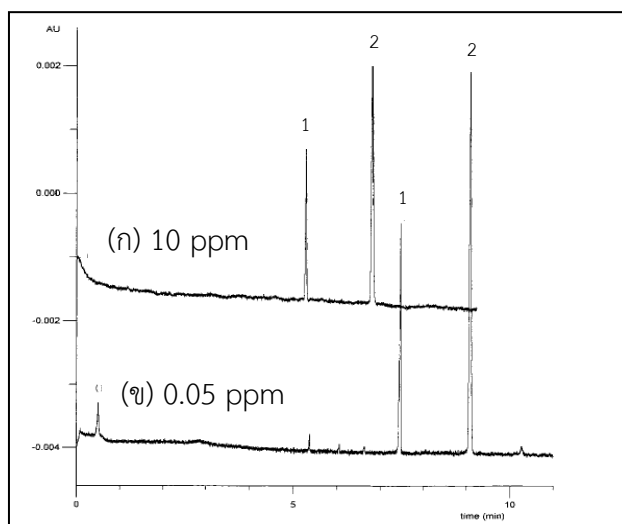
$\mu_{ep(\text{BGE})}$ = electrophoretic mobility ของไอออนลบใน BGE plug

$V_{eo(\text{sample})}$ = EOF ใน sample plug

$V_{eo(\text{ave})}$ = average EOF ในแคพิลลารี

รูปที่ 6 การเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในแคพิลลารีโดยใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดันร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ด้วย EOF (ก) เริ่มต้นบรรจุสารตัวอย่างเข้าไปในแคพิลลารีในปริมาณมากด้วยความดัน (ข) เริ่มต้นให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเข้าไปในระบบโดยใช้ reversed polarity (ค) สารที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกส่วน EOF เคลื่อนที่ไปทางขั้วลบและพาเมทริกซ์ออกไปจากระบบ (ง) สารที่มีประจุลบเกิดการรวมตัวเป็นโซนสารตัวอย่างที่แคบลงและมีความเข้มข้นสูงขึ้นและเคลื่อนที่ออกมายังเครื่องตรวจวัดตามทิศทางการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารอย่างต่อเนื่อง [11]

ข้อดีของเทคนิคนี้คือเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารและแยกสาร (preconcentration and separation) แบบต่อเนื่องไม่ต้องสลับขั้วไฟฟ้า และเทคนิคดังกล่าวนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารในคอลัมน์ และให้ผลการตรวจวัดดีกว่าเดิมถึง 300 เท่าเมื่อเทียบกับการบรรจุสารตัวอย่างด้วยความดันแบบปกติ [11] ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของสารออร์แกนิกที่เป็นไอออนลบ (organic anions) (ก) บรรจุสารตัวอย่างด้วยวิธีปกติ (ข) บรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก โดยพีค (1) maleic (2) Fumaric [11]

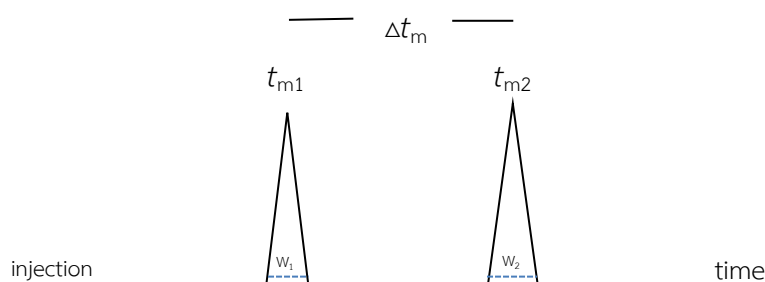
2.1.3.9 ค่าการแยกของสาร (Resolution, R_s)

โดยสามารถหาค่าการแยกได้จากการคำนวณความแตกต่างของไมเกรชันไทม์ระหว่าง 2 พีคที่อยู่ติดกันต่อค่าเฉลี่ยความกว้างของฐานพีคทั้งสองในหน่วยเวลาดังแสดงในรูปที่ 8 และสมการ 11

$$R_s = \frac{\Delta t_m}{0.5 (w_1 + w_2)} \quad \text{สมการ 11}$$

Δt_m = ความแตกต่างของไมเกรชันไทม์ของสารที่อยู่ติดกัน ($t_{m2} - t_{m1}$) โดย t_{m2} มากกว่า t_{m1}

w_1, w_2 = ความกว้างของฐานพีคของสารตัวที่ 1 และ 2



รูปที่ 8 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการแยกสาร 2 ชนิด

ค่าการแยกของ 2 พีกที่อยู่ติดกันนั้นเมื่อแยกกันจนถึง baseline ค่าการแยกของสารจะเท่ากับ 1.5 ($R_s=1.5$) ในการทำปริมาณวิเคราะห์นั้นต้องมีค่า $R_s \geq 1.5$ ถึงจะมีค่าการแยกที่ดีและพีกสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์

2.1.3.10 ปริมาณวิเคราะห์ในเทคนิค CE (Quantitative analysis in CE)

เนื่องจากเทคนิค CE นั้นสารแต่ละชนิดจะมีความเร็วในการเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจวัดที่ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับค่า μ ของสารแต่ละชนิด สารที่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าจะใช้เวลาน้อยกว่าในการเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ทำให้พีกที่ได้แคบกว่าสารที่เคลื่อนที่ได้ช้า สารที่มีปริมาณที่เท่ากันและมี analyte response ที่เท่ากันสารที่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าจะมีพื้นที่ใต้พีกที่มากกว่าสารที่เคลื่อนที่ได้เร็ว ดังนั้นการหาปริมาณใน CE จึงไม่สามารถใช้พื้นที่ใต้พีก (peak area, A) ในการหาปริมาณได้โดยตรง ดังนั้นในเทคนิค CE จึงแก้ปัญหาการเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากันของสารแต่ละชนิดด้วยวิธีการใช้ค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับไมเกรชันโทมของสาร (ดังสมการ 12) ซึ่งนิยามว่าพื้นที่ใต้พีกแก้ไข (corrected peak, A_{corr})

$$A_{corr} = \frac{A}{t_m} \quad \text{สมการ 12}$$

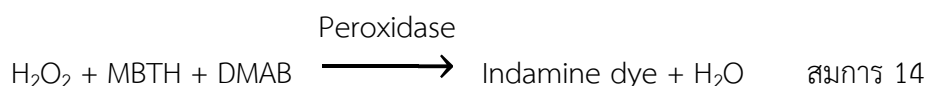
ในการหาปริมาณวิเคราะห์ของสารสามารถทำได้โดยการหา A_{corr} ของพีกสารตัวอย่างที่วิเคราะห์มาคำนวณกับสมการเส้นตรง ($y = mx+c$) ที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่าง A_{corr} (แกน y) กับความเข้มข้นต่าง ๆ (แกน x) ของสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับ

2.2 วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรต (Standard method for determination of oxalate and citrate)

วิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (accepted method) สำหรับการหาปริมาณออกซาเลตและซิเตรต คือ วิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method) โดยทำขึ้นเป็นชุดทดสอบสำหรับวิเคราะห์ออกซาเลต (oxalate kit) และซิเตรต (citrate kit)

1) การวิเคราะห์ออกซาเลตโดยใช้ชุดทดสอบออกซาเลต (oxalate kit)

เป็นการวิเคราะห์ออกซาเลตโดยใช้เอนไซม์ออกซาเลตออกซิเดส (oxalate oxidase) หลักการคือเมื่อออกซาเลตทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ออกซาเลตออกซิเดส เกิดเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) แสดงในสมการ 13 จากนั้นเติม 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) และ 3-(dimethylamino) benzoic acid (DMAB) เพื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เพื่อให้เกิดสีของ indamine dye แสดงในสมการ 14 ซึ่ง indamine dye มีสมบัติในการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 570 นาโนเมตรจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ indamines dye ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของออกซาเลตในตัวอย่าง [19] ข้อดีของวิธีนี้คือวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตได้ง่ายขั้นตอนไม่ยุ่งยาก มีความเร็ว ข้อเสียคือราคาของชุดตรวจสอบออกซาเลตโดยใช้เอนไซม์ออกซาเลตออกซิเดสมีราคาแพง และเมื่อเปิดใช้งานแล้วมีอายุการใช้งานเพียง 30 วันเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิ 5°C หรือเพียงแค่ 1 วันเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง [20]

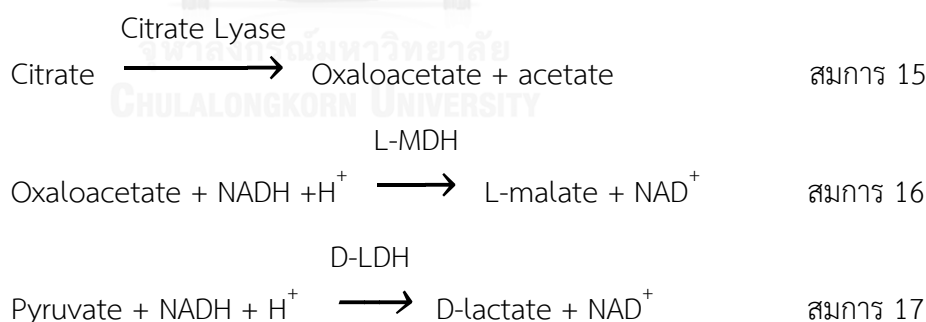


2) การวิเคราะห์ซิเตรตโดยใช้ชุดทดสอบซิเตรต (Citrate kit)

การวิเคราะห์ซิเตรตโดยใช้เอนไซม์ซิเตรตไลเอส (citrate lyase) หลักการคือเมื่อเอนไซม์ซิเตรตไลเอสย่อยสลายซิเตรตได้เป็น oxaloacetate และ acetate (สมการ 15) จากนั้นในสภาวะที่มี NADH เอนไซม์ L-malate dehydrogenase (L-MDH) จะเปลี่ยน oxaloacetate เป็น L-malate และ NADH จะกลายเป็น NAD^+ (สมการ 16) แต่ถ้าในสารละลายมีเอนไซม์ oxaloacetate decarboxylase จะทำให้ oxaloacetate ที่เกิดขึ้นถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate ได้

ดังนั้นเพื่อให้การหาปริมาณซิเทรตมีความถูกต้อง จะต้องใช้เอนไซม์ D-lactate dehydrogenase (D-LDH) เพื่อให้ pyruvate ที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับ NADH เกิดเป็น D-Lactate และ NAD^+ (สมการ 17) ปริมาณ NAD^+ ที่เกิดขึ้น หรือปริมาณ NADH ที่ลดลง จะสัมพันธ์กับปริมาณซิเทรตที่มีอยู่ เนื่องจาก NADH สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้สูงสุดที่ 340 nm ดังนั้นในการหาปริมาณซิเทรตจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ NADH ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของซิเทรต [21]

ในการวิเคราะห์หาปริมาณซิเทรตโดยใช้ชุดทดสอบซิเทรตสามารถทำได้โดยการเติมสารต่าง ๆ ลงในคิวเวตซึ่งประกอบด้วย น้ำ บัฟเฟอร์ NADH สารตัวอย่างที่มีซิเทรต L-MDH และ D-LDH ผสมให้เข้ากันและจับเวลาทันที 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 1 (A1) ที่ 340 nm ซึ่งจะเป็นค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ NADH จากนั้นเติมเอนไซม์ซิเทรตไลเอสลงไปในสารละลายผสมที่อยู่ในคิวเวต จับเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เอนไซม์ซิเทรตไลเอสจะย่อยสลายซิเทรตได้เป็นเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ตามที่อธิบายข้างต้น (สมการ 15-17) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ 340 nm (วัดค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 2 (A2)) ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเนื่องจาก NADH ถูกใช้ในการเกิดปฏิกิริยา นำค่าการดูดกลืนครั้งที่ 1 และ 2 มาหักลบกัน (A1-A2) ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของซิเทรตในปัสสาวะ ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถวิเคราะห์ปริมาณซิเทรตได้ง่ายขั้นตอนไม่ยุ่งยาก มีความเร็ว ข้อเสียคือราคาของชุดตรวจสอบซิเทรตโดยใช้เอนไซม์ไลเอสมีราคาแพง และเมื่อเปิดใช้งานแล้วมีอายุการใช้งานเพียง 30 วันเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิ 5°C หรือเพียงแค่วัน 1 วันเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง



ในการหาปริมาณวิเคราะห์ของออกซาเลตและซิเทรตโดยใช้ชุดทดสอบ จะใช้การทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยใช้หลักการและวิธีเดียวกันทั้งของออกซาเลตและซิเทรต กราฟมาตรฐานสร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน (แกน y) กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) จะได้กราฟเส้นตรง ($y = mx+c$) การหาปริมาณของสารตัวอย่างทำได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวณหาความเข้มข้นกับสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น

2.3 วิธีการทดสอบแบบที (The student t test)

การทดสอบเชิงสถิติมีความจำเป็นสำหรับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ใหม่ ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่ (test method) โดยนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นั้นมาวิเคราะห์ควบคู่กับวิธีมาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับกัน (accepted method) จากนั้นใช้วิธีการทดสอบแบบ t [22] เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่จัดทำขึ้นสองชุด ชุดที่หนึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยใช้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่ และอีกชุดหนึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน ในการทดสอบทั้งสองชุดนั้นจะต้องใช้สารละลายมาตรฐานและตัวอย่างชุดเดียวกันและทำในวันเดียวกัน เพื่อให้ผลการทดลองมีความถูกต้องไม่เกิดความคลาดเคลื่อนด้วยปัจจัยอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ อุปกรณ์เครื่องมือ ความคลาดเคลื่อนจากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน เป็นต้น เมื่อทำการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีแล้วจึงนำผลการวิเคราะห์ของทั้งสองชุดไปคำนวณหาค่า t ทำได้โดยหาความแตกต่างระหว่างผลการทดลองทั้งสองวิธีของแต่ละตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของผลต่างของสารตัวอย่างทั้งหมด (\bar{D}) จากนั้นหาค่าเบี่ยงเบนผลต่างที่เกิดขึ้นของวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีที่มีต่อสารตัวอย่างแต่ละสารกับค่า \bar{D} ทั้งหมดนี้สามารถนำมาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s_d) ดังสมการที่ 18 และหาค่า t ดังสมการที่ 19 ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่า t จากตารางที่ 1 ตามระดับชั้นความเสรี ($N-1$) ที่จำกัดความเชื่อมั่น 95% แสดงว่าทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หากค่า t ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่า t จากตารางที่ 1 สามารถทำนายได้ว่าผลการทดลองทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่สามารถบอกรายละเอียดได้ว่าผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีนั้นมีความเหมือนกัน [22]

$$S_d = \sum \frac{\sqrt{(D_i + \bar{D})^2}}{N-1} \quad \text{สมการ 18}$$

$$t = \frac{\bar{D}}{S_d} \sqrt{N} \quad \text{สมการ 19}$$

D_i = ความแตกต่างของการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี (ต้องคิดเครื่องหมายบวกลบด้วย)

\bar{D} = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี (ต้องคิดเครื่องหมายบวกลบด้วย)

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์

ตารางที่ 1 ค่า t ที่ลิมิตความเชื่อมั่นค่าต่าง ๆ

ระดับชั้นความเสรี ($N-1$)	ค่า t สำหรับลิมิตความเชื่อมั่น (%)					
	50	80	90	95	99	99.8
1	1.00	3.08	6.31	12.70	63.70	31.80
2	0.82	1.89	2.92	4.30	9.92	22.30
3	0.76	1.64	2.35	3.18	5.84	10.20
4	0.74	1.53	2.13	2.78	4.60	7.17
5	0.73	1.48	2.02	2.57	4.03	5.89
6	0.72	1.44	1.94	2.45	3.71	5.21
7	0.71	1.42	1.90	2.36	3.50	4.78
8	0.71	1.40	1.86	2.31	3.36	4.50
9	0.70	1.38	1.83	2.26	3.25	4.30
10	0.70	1.37	1.81	2.23	3.17	4.14
12	0.70	1.36	1.78	2.18	3.06	3.93
15	0.69	1.34	1.75	2.13	2.95	3.73
20	0.69	1.32	1.72	2.09	2.84	3.55
30	0.68	1.31	1.70	2.04	2.75	3.38
40	0.68	1.30	1.68	2.02	2.70	3.55
60	0.68	1.30	1.67	2.00	2.66	3.23
α	0.67	1.29	1.64	1.96	2.58	3.09

(อ้างอิงจาก [22])

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องคะพิลลารีอิลีกโทรฟอริซิส (CE) ของบริษัท Beckman coulter รุ่น MDQ
2. เครื่อง UV visible spectrophotometer ของบริษัท Agilent รุ่น 8453
3. เครื่อง sonication ของบริษัท ultrasonic steri-cleaner
4. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) ของบริษัท Mettler Toledo รุ่น SevenCompact™
5. เครื่องชั่งสารสี่ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler Toledo รุ่น PB 403-S
6. ไมโครปิเปตขนาด 100-1000 μL , ขนาด 10-100 μL และขนาด 1-10 μL ของบริษัท Eppendorf
7. ขวดใส่สาร (vial) ขนาด 2 mL พร้อมฝาปิด
8. ขวดกำหนดปริมาตรขนาด 5, 10, 25 และ 50 mL
9. ปีกเกอร์ขนาด 50 และ 100 mL
10. คิวเวต (cuvettes) ขนาด 1 mL และ 3 mL
11. Syringe filter ขนาด 0.2 μm ของบริษัท Vertical chromatography Co., Ltd

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

แสดงดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 , MW 136.09 g/mol)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 , MW 141.96 g/mol)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
Phosphoric acid (H_3PO_4 , MW 97.995 g/mol)	Merck (Darmstadt, Germany)
Methanol (CH_3OH , MW 32.04 g/mol)	Merck (Darmstadt, Germany)
Sodium hydroxide (NaOH , MW 201.14 g/mol)	Lab scan Asia (Thailand) Co, LTD
Sodium oxalate ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, MW 134.00 g/mol)	Bake analyzed (USA)
Citric acid monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MW 201.14 g/mol)	Riedel deHaen (USA)
น้ำ Milli Q	สิทธิพรแอสโซซิเอต จำกัด
ชุดทดสอบออกซาเลตโดยใช้เอนไซม์ (oxalate kit) ซึ่งประกอบด้วย Reagent A ประกอบด้วย - 3.2 mmol/L ของ 3-(dimethylamino) benzoic acid (DMAB) - 0.22 mmol/L ของ 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) - buffer pH 3.1 ± 0.1	Trinity biotech (Ireland)

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

สารเคมี	บริษัท
Reagent B ประกอบด้วย <ul style="list-style-type: none"> - 3000 μ/L ของ oxalate oxidase (Barlay) - 100 μ/L ของ peroxidase (Horseradish) 	Trinity biotech (Ireland)
ชุดทดสอบซีเทรตในปัสสาวะโดยใช้เอนไซม์ (citrate kit) ซึ่งประกอบด้วย <ul style="list-style-type: none"> - ขวดที่ 1 buffer (40 mL, pH 7.5) และ sodium azide (0.02%) - ขวดที่ 2 NADH และ polyvinylpyrrolidone (PVP) - ขวดที่ 3 L-malate dehydrogenase (L-MDH) และ D-lactate dehydrogenase (D-LDH) - ขวดที่ 4 Citrate lyase (CL) 	Megazyme international (Ireland)

3.3 ตัวอย่างปัสสาวะ

ได้มาจากส่วนหนึ่งของการวิจัย “โครงการวิจัยเรื่องภาวะเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วกลุ่มอาการเมแทบอลิกกับโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคนี้่วไตและบุคคลในครอบครัว” จากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

การวิเคราะห์สารตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ บันทึก วิเคราะห์และแปลผล ดำเนินการที่ภาคเคมีวิเคราะห์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การเตรียมสารละลาย

3.5.1 สารละลายมาตรฐานออกซาเลตความเข้มข้น 1,000 ppm

ชั่งสาร Sodium oxalate ปริมาณ 0.0250 g จากนั้นนำมาละลายด้วยน้ำ Milli-Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

3.5.2 สารละลายมาตรฐานซีเทรตความเข้มข้น 1,000 ppm โดยซังสาร Citric acid monohydrate ปริมาณ 0.0250 g จากนั้นนำมาละลายด้วยน้ำ Milli-Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

3.5.3 สารละลาย KH_2PO_4 ความเข้มข้น 500 mM (stock solution) โดยซังสาร KH_2PO_4 ปริมาณ 3.4022 g จากนั้นนำมาละลายด้วยน้ำ Milli-Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL

3.5.4 สารละลาย Na_2HPO_4 ความเข้มข้น 500 mM (stock solution) โดยซังสาร Na_2HPO_4 ปริมาณ 3.5490 g จากนั้นนำมาละลายด้วยน้ำ Milli-Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL

3.6 การหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซีเทรตด้วยเทคนิค CE

3.6.1 ภาวะทั่วไปของเครื่อง CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 3 ภาวะทั่วไปของเครื่อง CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรต

รูปแบบ/ภาวะที่ใช้	รายละเอียด
เครื่อง CE	บริษัท Beckman coulter รุ่น MDQ
คะพิลลารี	Uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด)
การบรรจุสาร	ใช้ความดันในการบรรจุสารตัวอย่างเท่ากับ 0.5 psi
การตรวจวัด	UV-Vis ช่วง 200-400 nm เลือกตรวจวัดที่ 195 nm
การ rinse คะพิลลารีคอลัมน์	ก่อนการทดลองแต่ละวัน rinse ด้วย - 0.1 M H_3PO_4 15 นาที - บัฟเฟอร์ 15 นาที ระหว่างการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งก่อนการบรรจุสารตัวอย่างในคะพิลลารี Rinse ด้วย - 0.1 M H_3PO_4 1 นาที - บัฟเฟอร์ 2 นาที หลังจากการทดลองในแต่ละวัน rinse ด้วย - 0.1 M H_3PO_4 20 นาที - น้ำ 20 นาที

3.6.2 ผลของ pH ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรต

โดยศึกษาในช่วง pH 6.0-8.0 ทำโดยเลือกใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 200 mM ในการแยกออกซาเลตและซิเตรต จากนั้นปรับ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้อยู่ในช่วง pH ที่ต้องการศึกษาคือ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 โดยใช้สารละลาย 0.1 M NaOH จากนั้นนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดยใช้เทคนิค CE เพื่อหา pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งจะเป็น pH ที่ออกซาเลตและซิเตรตแตกตัวได้เกือบ 100% เพื่อจะสามารถแยกออกซาเลตและซิเตรตออกจากสารอื่น ๆ ในปัสสาวะได้ และนอกจากนี้ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดันแล้วกำจัดเมทริกซ์ออกภายใต้อิทธิพลของ EOF ที่ไม่สูงมากนัก ดังนั้นหากต้องการ EOF ที่ไม่สูงมากจะต้องใช้ pH ต่ำ (pH น้อยกว่า 4) แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้ pH ที่ต่ำได้ เนื่องจากออกซาเลตและซิเตรตมีค่า pK_a อยู่ในช่วง 1-7 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเตรตและ pH ที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์โดยใช้ CE

3.6.3 การศึกษาผลความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการแยกของออกซาเลตและซิเตรต

นำ stock solution ในข้อ 3.5.3 และ 3.5.4 มาเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40-200 mM ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

ตารางที่ 4 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (mM)	KH ₂ PO ₄ ความเข้มข้น 500 mM ที่ต้องปิเปต (μL)	Na ₂ HPO ₄ ความเข้มข้น 500 mM ที่ต้องปิเปต (μL)
40	2	2
60	3	3
80	4	4
100	5	5
120	6	6
140	7	7
160	8	8
180	9	9
200	10	10

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่มีต่อการแยกออกซาเลตและซิเตรต จะใช้สารตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตที่เจือจางสองเท่าและนำมากรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.2 μm เนื่องจากตัวอย่างปัสสาวะในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณไม่มาก ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ตัวอย่างเดียวกันในการหาสถานะที่เหมาะสมได้ในทุกการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมทริกซ์ที่อยู่ในแต่ละตัวอย่างไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นปัสสาวะที่ใช้ในแต่ละการทดลองจึงสามารถเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมด จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ในช่วงความเข้มข้น 40-200 mM เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สามารถแยกออกซาเลตและซิเตรตออกจากสารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในปัสสาวะได้

3.6.4 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกออกซาเลตและซิเตรต

โดยศึกษาในช่วงความต่างศักย์ -10 ถึง -30 kV เพื่อหาความต่างศักย์ที่เหมาะสมที่สุดในการแยกออกซาเลตและซิเตรตออกจากสารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในปัสสาวะและใช้ระยะเวลาในการแยกไม่นาน

3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้น (On-line preconcentration) ของออกซาเลตและซีเทรตโดยใช้เทคนิค CE

3.7.1 เวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง

ทำได้โดยวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดยใช้เทคนิค CE โดยการเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 วินาที ตามลำดับ แต่ใช้ความดันในการบรรจุสารเท่ากับ 0.5 psi เพื่อหาเวลาการบรรจุสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นได้มากที่สุดโดยที่ไม่สูญเสียการแยก และเพื่อเพิ่มความสามารถของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตปริมาณน้อย ๆ ในปัสสาวะได้ถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

3.7.2 ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง

โดยศึกษาความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างโดยเริ่มจาก 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 psi ตามลำดับ โดยใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาที เพื่อหาความดันในการบรรจุสารตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตปริมาณน้อย ๆ ในปัสสาวะได้ถูกต้องและคงไว้ซึ่งประสิทธิภาพการแยก

3.8 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น (Method validation)

3.8.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (Limit of detection, LOD and limit of quantitation, LOQ)

ทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตความเข้มข้น 10 ppm จากนั้นทำการเจือจาง และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น วัดอัตราส่วนของสัญญาณความสูงของพีคต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) จนกระทั่งได้ค่าอัตราส่วน S/N ใกล้เคียง 3 สำหรับ LOD และ 10 สำหรับ LOQ จากนั้นนำมาคำนวณ LOD และ LOQ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{LOD} = \frac{3}{S/N} \times C_{\text{diluted}} \quad \text{สมการ 20}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10}{S/N} \times C_{\text{diluted}} \quad \text{สมการ 21}$$

S = ค่าสัญญาณของสารที่วิเคราะห์ได้

N = สัญญาณรบกวน

C_{diluted} = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ทำการเจือจาง

3.8.2 กราฟมาตรฐาน (calibration curve)

การสร้างกราฟมาตรฐานสามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตความเข้มข้น 1,000 ppm จากนั้นนำมาเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL ด้วยน้ำ Milli-Q ดังแสดงในตารางที่ 5 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น จากนั้นนำค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคแก้ไข (corrected area, A_{corr}) ซึ่งหาจากพื้นที่ใต้พีค (peak area, A) หารด้วยค่าไมเกรชันไทม์ (migration time, t_m) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ppm) มาสร้างกราฟมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจะได้สมการเส้นตรง

$$y = mx + c$$

สมการ 22

y = พื้นที่ใต้พีคแก้ไข (corrected peak, A_{corr})

m = ความชันของกราฟ

x = ความเข้มข้นของสาร (ppm)

c = จุดตัดแกน y ของกราฟ

ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตเพื่อใช้สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน

สารขวดที่	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ppm)		ปริมาตรสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ppm ที่ต้องปิเปต (μL)	
	ออกซาเลต	ซีเทรต	ออกซาเลต	ซีเทรต
	1	5	10	50
2	20	50	200	500
3	50	100	500	800
4	80	300	800	3,000
5	100	500	1,000	5,000

3.8.3 ความแม่นยำ (Accuracy)

จะใช้การเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค CE เพื่อคำนวณหาค่าร้อยละการคืนของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป ขั้นตอนการเตรียมสารละลายและการหาค่าความแม่นยำทำได้ดังนี้

3.8.3.1 เตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่า ทำได้โดยการกรองปัสสาวะด้วย Syringe filter ขนาด 0.2 μm จากนั้นเปิดมา 500 μL และเปิดน้ำ Milli-Q 500 μL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 mL จะได้ปัสสาวะที่เจือจางแล้ว 2 เท่า

3.8.3.2 เตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรต ทำได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ขวดที่	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ppm)	ปริมาตรสารละลาย 1000 ppm ที่ต้องเปิด (μL)	ปัสสาวะ (μL)	Milli-Q (μL)	
1	ออกซาเลต	5	5	500	485
	ซีเทรต	10	10		
2	ออกซาเลต	50	50	500	350
	ซีเทรต	100	100		
3	ออกซาเลต	80	80	500	120
	ซีเทรต	300	300		

3.8.3.3 หาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตทั้งหมด โดยวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตที่เตรียมในตารางที่ 6 ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมโดยทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 10 ครั้ง นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบค่าความแม่นยำสำหรับการบรรจุสารแบบปกติกับการบรรจุสารในปริมาณมากอีกด้วย

3.8.3.4 คำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่เติมลงไป โดยนำค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคแก้ไขที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นในหัวข้อ 3.6.2 จะได้ปริมาณความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างปัสสาวะที่ไม่เติมสารละลาย

มาตรฐานออกซาเลตและซีเทรต (จากสารละลายในหัวข้อ 3.6.3.1) และความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตทั้งหมดซึ่งได้จากออกซาเลตและซีเทรตที่มีอยู่แล้วในตัวอย่างปัสสาวะร่วมกับสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่เติมลงไป (จากสารละลายในหัวข้อ 3.6.3.2) จากนั้นนำมาคำนวณหาร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่เติมลงไป ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป}} \times 100 \quad \text{สมการ 23}$$

3.8.4 ความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยงซึ่งประกอบด้วย ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และความเที่ยงระหว่างวัน (inter-day precision) ทำได้ดังนี้

3.8.4.1 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตสำหรับหาค่าความเที่ยง

ชนิดที่	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน (ppm)	ปริมาตร		
		สารละลาย 1,000 ppm ที่ต้องปิเปต (μL)	ปัสสาวะ (μL)	Milli-Q (μL)
1	ซีเทรต	50	50	500
	ออกซาเลต	100	100	

3.8.4.2 นำตัวอย่างที่เตรียมในตาราง 7 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบการบรรจุสารแบบปกติกับการบรรจุสารในปริมาณมาก ทำการวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวันเดียวกันจำนวนการวิเคราะห์ 10 ครั้ง สำหรับความเที่ยงระหว่างวันจะทำการวิเคราะห์เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน โดยจำนวนการวิเคราะห์ 10 ครั้งเพื่อหาความเที่ยงของเครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์

3.8.4.3 วิเคราะห์ผลจาก 3.6.4.2 โดยหาพื้นที่ใต้พีคแก้ไข และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในข้อ 3.6.2 จะได้ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตที่วิเคราะห์ได้ จากนั้นคำนวณค่า %RSD ของค่าพื้นที่ใต้พีคแก้ไข ไมเกรซินไทม์ และปริมาณออกซาเลตและซิเตรตที่วิเคราะห์ได้ เพื่อหาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน และความเที่ยงระหว่างวัน จากสมการดังต่อไปนี้

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{สมการ 24}$$

RSD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคแก้ไขหรือค่าเฉลี่ยไมเกรซินไทม์

3.9 ประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในตัวอย่างปัสสาวะ

3.9.1 วิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะโดยวิธี CE ที่พัฒนาขึ้น

ตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาวิเคราะห์นั้นแบ่งเป็น 3 ช่วงความเข้มข้นของออกซาเลต คือ ช่วง 0-20 ppm ซึ่งเป็นการตรวจเพื่อยืนยันว่าอุปกรณ์และเครื่องมือรวมถึงสภาวะที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลตในปริมาณน้อย ๆ ได้อย่างถูกต้อง ช่วง 20-40 ppm ซึ่งเป็นช่วงปริมาณออกซาเลตที่พบในปัสสาวะของคนปกติ และช่วงความเข้มข้นของออกซาเลตที่มากกว่า 40 ppm ซึ่งเป็นช่วงปริมาณออกซาเลตที่พบในปัสสาวะของคนป่วยโรคนิ่วไต

นำปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ผ่านการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 μm แล้วมาเจือจาง 2 เท่า จากนั้นนำมาตรวจวัดด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้พัฒนาขึ้นดังกล่าวมาแล้ว จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคแก้ไข (corrected peak, A_{corr}) มาคำนวณหาความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตจากกราฟมาตรฐานที่ได้ทำขึ้นในข้อ 3.8.2

3.9.2 วัดปริมาณออกซาเลตโดยใช้ชุดตรวจวัดออกซาเลต (oxalate kit)

- เตรียมสารละลายในคิวเวตขนาด 1 mL ดังตารางที่ 8 จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาบ่มที่อุณหภูมิห้องทันทีเป็นเวลา 5 นาที [19]

ตารางที่ 8 การเตรียมสารละลายเพื่อหาปริมาณออกซาเลตโดยใช้ชุดตรวจวัดออกซาเลตโดย

สารละลายที่ต้องเติม	ปริมาณที่เติม (μL)				
	Blank	ตัวอย่าง ปัสสาวะ	std * 1	std * 2	std * 3
Reagent A	500	500	500	500	500
Milli-Q	25	-	-	-	-
ตัวอย่างปัสสาวะ	-	25	-	-	-
ออกซาเลต 10 ppm	-	-	25	-	-
ออกซาเลต 50 ppm	-	-	-	25	-
ออกซาเลต 100 ppm	-	-	-	-	25
Reagent B	50	50	50	50	50

std * สารละลายมาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้ oxalate kit

- นำ blank ตัวอย่างปัสสาวะ และสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ความเข้มข้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวี (absorbance) ที่ 590 นาโนเมตร

- สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและ Blank กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซาเลต (ppm) จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจะได้สมการเส้นตรงดังนี้

$$y = mx + c$$

สมการ 25

y = ผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและ Blank

m = ความชันของกราฟ

x = ความเข้มข้นของออกซาเลต (ppm)

c = จุดตัดแกน y ของกราฟ

- หาความเข้มข้นของออกซาเลตในตัวอย่างปัสสาวะโดยนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างปัสสาวะมาลบกับ blank จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของออกซาเลตโดยใช้สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

3.9.3 วัดปริมาณซิเตรตโดยใช้ชุดตรวจวัดซิเตรต (citrate kit)

- เตรียมสารละลายในคิวเวตปริมาตรขนาด 3 mL ดังตารางที่ 9 ผสมสารละลายให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องทันทีเป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 9 การเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานเพื่อวัดปริมาณซิเตรตโดยใช้ เอนไซม์

สารละลายที่ต้องเติม	ปริมาณที่เติม (μL)				
	Blank	ตัวอย่าง ปัสสาวะ	std * 1	std * 2	std * 3
Milli-Q water	2,000	1,800	1,800	1,800	1,800
ตัวอย่างปัสสาวะ	-	200	-	-	-
ซิเตรต 50 ppm	-	-	200	-	-
ซิเตรต 100 ppm	-	-	-	200	-
ซิเตรต 200 ppm	-	-	-	-	200
ขวดที่ 1 (buffer)	500	500	500	500	500
ขวดที่ 2 (NADH/PVP)	200	200	200	200	200
ขวดที่ 3 (L-MDH/D-LDH)	20	20	20	20	20

std * สารละลายมาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้ citrate kit

- จากนั้นนำสารละลาย blank สารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานที่อยู่ในคิวเวต ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวี (absorbance) ที่ 340 นาโนเมตรของ บันทึกผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 1 (A_1)

- จากนั้นเติมสารละลายขวดที่ 4 (CL) ทุกคิวเวต ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องทันทีเป็นเวลา 5 นาที

- จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดในคิวเวตมาวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีอีกครั้งที่ 340 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 2 (A_2)

- หาค่าผลต่างหรือค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ΔA ($A_1 - A_2$) ของ blank สารตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน

- สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าผลต่างของ ΔA ($A_1 - A_2$) ของ Blank และ ΔA ($A_1 - A_2$) ของสารละลายมาตรฐานซีเทรต กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซีเทรต (ppm) จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจะได้สมการเส้นตรงดังสมการ

$$y = mx + c$$

สมการ 26

y = ค่า ΔA ของ blank ลบด้วย ΔA ของสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง

m = ความชันของกราฟ

x = ความเข้มข้นของซีเทรต (ppm)

c = จุดตัดแกน y ของกราฟ

- หาความเข้มข้นของซีเทรตในตัวอย่างปัสสาวะโดยนำค่า ผลต่างของ ΔA blank กับ ΔA ของตัวอย่างปัสสาวะมาหาความเข้มข้นของซีเทรตจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

เมื่อได้ผลการตรวจวัดปริมาณของออกซาเลตและซีเทรตโดยใช้เทคนิค CE และผลการตรวจวัดปริมาณของออกซาเลตและซีเทรตโดยใช้ไอออนไซม์ ซึ่งการทดลองทั้งสองวิธีใช้ตัวอย่างปัสสาวะตัวเดียวกันทำในวันเดียวกัน ใช้สารมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่เตรียมในชุดเดียวกัน จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ปริมาณดังกล่าวมาเปรียบเทียบความแตกต่างของวิธีทั้งสอง กล่าวคือเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตโดยเทคนิค CE ใช้สภาวะที่พัฒนาขึ้นและอีกเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตโดยใช้ชุดตรวจวัดซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน จากนั้นเปรียบเทียบผลทั้งสองวิธีว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยการทดสอบแบบที (the student test, t) [22] ซึ่งได้อธิบายแล้วในหัวข้อที่ 2.3 โดยในการเปรียบเทียบครั้งนี้ใช้สารตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 41 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 3 ระดับตามความเข้มข้นของออกซาเลต โดยสารตัวอย่างที่มีออกซาเลตในช่วงความเข้มข้น 0-20 ppm มี 13 ตัวอย่าง ความเข้มข้นออกซาเลตในช่วง 20-40 ppm มีจำนวน 11 ตัวอย่าง และความเข้มข้นของออกซาเลต >40 ppm มีจำนวน 17 ตัวอย่าง

นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงหรือไม่ โดยการสร้างกราฟที่ได้จากผลการวิเคราะห์จากเทคนิค CE และผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีมาตรฐาน เพื่อเป็นการยืนยันความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นอีกด้วย

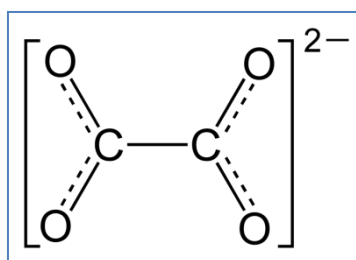
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

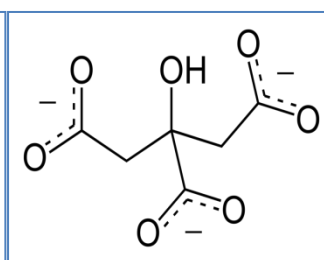
CE เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยหลักความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารภายใต้สนามไฟฟ้า การใช้ศักย์ไฟฟ้ามี 2 แบบคือการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบขั้วปกติ (normal polarity) โดยด้านบรรจุสารตัวอย่างเข้า (inlet) เป็นขั้วบวก (anode) ส่วนด้านปลายออกหรือด้านเครื่องตรวจวัด (outlet) เป็นขั้วลบ (cathode) และ การใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reversed polarity) ด้านบรรจุสารตัวอย่างเข้าเป็นขั้วลบและด้านปลายออกหรือด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก ในกรณีการแยกออกซาเลตและซิเตรตซึ่งมีประจุเป็นลบจึงเลือกใช้การให้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว เพื่อให้ ออกซาเลตและซิเตรตเคลื่อนที่ไปยังด้านเครื่องตรวจวัดที่เป็นขั้วบวก ดังนั้น electroosmotic flow (EOF) จะมีทิศทางการเคลื่อนที่ตรงข้ามกับออกซาเลตและซิเตรต โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ที่ pH ต่ำเพื่อลดความแรงของ EOF และทำให้สารจึงมีค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่จะสามารถต้านความแรงของ EOF และเคลื่อนที่มายังเครื่องตรวจวัดที่อยู่ทางด้านออกซึ่งเป็นขั้วบวกได้

กรดออกซาลิก (oxalic acid, $C_2H_2O_4$) สามารถแตกตัวให้ประจุลบ มีค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) 2 ค่า คือ 1.23 และ 4.28 นั่นคือกรดออกซาลิกสามารถแตกตัวได้ 2 ครั้งและให้ประจุ 2 ลบ ดังแสดงในรูปที่ 9 (ก) ส่วนกรดซิทรिक (citric acid, $C_6H_8O_7$) ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก 3 หมู่ แต่ละหมู่มีการแตกตัวที่ไม่เท่ากัน กรดซิทรिकมีค่าคงที่การแตกตัว (pK_a) 3 ค่า คือ 3.13, 4.76 และ 6.40 นั่นคือกรดซิทรिकสามารถแตกตัวได้ 3 ครั้งและให้ประจุ 3 ลบ ดังแสดงในรูปที่ 9 (ข) สำหรับปฏิกิริยาการแตกตัวของกรดอ่อน (HA) แสดงในสมการที่ 27

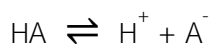
(ก)



(ข)



รูปที่ 9 โครงสร้างของสารเมื่อแตกตัวเป็นประจุลบ (ก) ออกซาเลต และ (ข) ซิเตรต



สมการ 27

ระดับขั้นการแตกตัว (degree of ionization, α) สามารถหาได้จากสมการที่ 28 จะเห็นว่าระดับขั้นการแตกตัวของสารมีความสัมพันธ์กับค่า pH และ pK_a ของสารดังแสดงในสมการที่ 29 กล่าวคือที่ pH เท่ากับ pK_a ดิกรีการแตกตัวจะเท่ากับ 0.5 หรือสารสามารถแตกตัวได้ 50% เท่านั้น แต่หากต้องการให้สารแตกตัวได้เกือบ 100% จะต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH มากกว่า pK_a ของสารอย่างน้อย 2 หน่วย จึงจะทำให้สารเกิดการแตกตัวได้เกือบ 100% และในงานวิจัยนี้ได้เลือกฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการแยกออกซาเลตและซิเตรต เนื่องจากเป็นบัฟเฟอร์ที่มีค่า pK_a 3 ค่าคือ 2.12 7.21 และ 12.32 สามารถใช้เป็นบัฟเฟอร์ทั้งในช่วงที่เป็นกรด กลาง และเบส โดยเฉพาะที่ pK_a เท่ากับ 7.21 ซึ่งเหมาะสำหรับการแยกสารที่มีช่วง pH 6.2-8.2 ซึ่งครอบคลุมค่า pK_a ของออกซาเลตและซิเตรตที่ต้องการวิเคราะห์ สำหรับการศึกษากาวยะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเตรต ด้วยเทคนิค CE ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]}$$

สมการ 28

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}}$$

สมการ 29

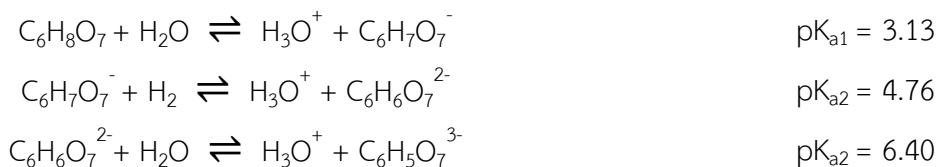
4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเตรตด้วยเทคนิค CE

4.1.1 ผลของพีเอชต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรต

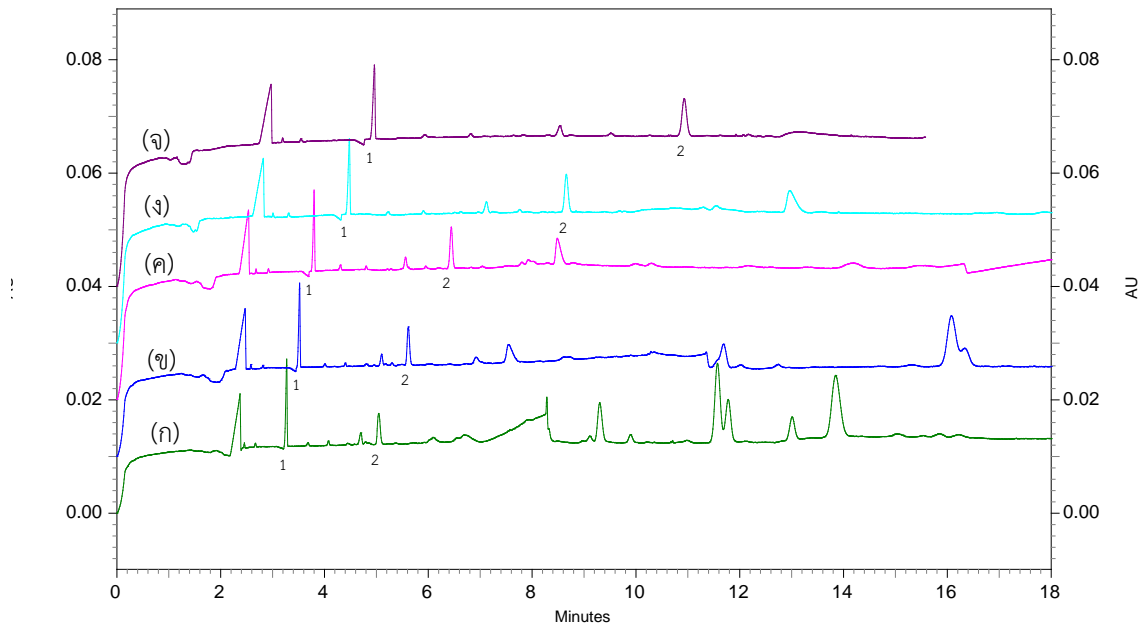
เนื่องจากในงานวิจัยนี้จะศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดันแล้วกำจัดเมทริกซ์ออกภายใต้อิทธิพลของ EOF ที่ไม่สูงมากนัก (low EOF) ซึ่งวิธีนี้จะเหมาะกับการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เป็นประจุลบ เช่น ออกซาเลตและซิเตรต เนื่องจากเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้วในการแยก สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF พร้อมกับเมทริกซ์ถูกกำจัดออกไปด้วยอิทธิพลของ EOF ดังนั้นหากต้องการ EOF ที่ไม่สูงมากจะต้องใช้ pH ต่ำในการทดลอง โดยปกติในการเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีนี้มักจะใช้ pH น้อยกว่า 4 [11] แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้ pH ที่ต่ำได้ เนื่องจากออกซาเลตซึ่งแตกตัวมาจากกรดออกซาลิก ที่มีค่า pK_a 2 ค่าคือ 1.23 และ 4.28 สมการการแตกตัวของกรดออกซาลิกแสดงดังต่อไปนี้



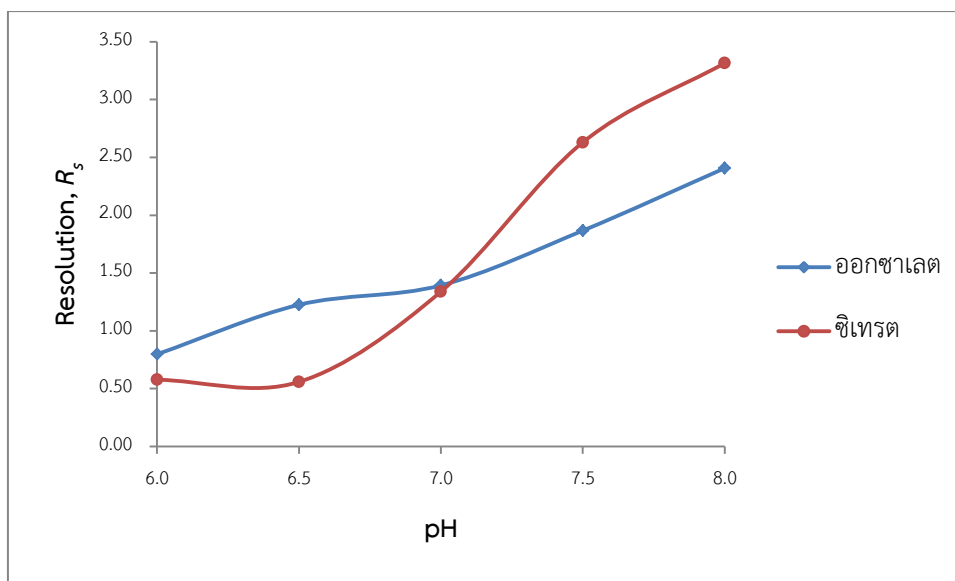
และซีเทรตซึ่งแตกตัวมาจากกรดซีทริก มีค่า pK_a 3 ค่า คือ 3.13 4.76 และ 6.40 การแตกตัวของกรดซีทริกแสดงดังต่อไปนี้



ดังนั้นหากต้องการให้กรดออกซาลิกและซีทริกแตกตัวได้หมดต้องใช้ pH มากกว่า 7.0 ขึ้นไป และจากการทดลองพบว่าถ้าใช้ $pH < 7.0$ ทั้งออกซาลेटและซีเทรตจะใช้เวลานานมากกว่า 30 นาที ในการเคลื่อนที่มาถึงเครื่องตรวจวัด เนื่องจากที่ pH ต่ำทั้งออกซาลิกและซีทริกแตกตัวได้น้อย ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้ามีค่าต่ำ จึงเคลื่อนที่ได้ช้า ดังนั้นการเพิ่มปริมาณแบบออนไลน์ของออกซาลेटและซีเทรตจึงไม่สามารถใช้ pH ที่ต่ำมาก ด้วยเหตุนี้จึงต้องทำการศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการแยกออกซาลेटและซีเทรตและการเพิ่มปริมาณแบบออนไลน์ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.21 และจะศึกษาช่วงค่า pH ของบัฟเฟอร์ดังนี้คือ pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ซึ่งเป็นช่วงที่ออกซาลेटและซีเทรตแตกตัวได้เกือบ 100% ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 10 จากรูปจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มค่า pH ของบัฟเฟอร์จาก 6.0-8.0 มีผลทำให้สารออกมาช้าลงตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นจะทำให้ EOF มากขึ้นตามไปด้วย จึงเกิดแรงต้านระหว่างไอออนลบของออกซาลेटและซีเทรตกับ EOF ที่มีทิศทางการเคลื่อนที่ที่ตรงกันข้ามกัน ดังนั้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้สารเคลื่อนที่ออกมาช้าลง และนอกจากนี้จากรูปจะสังเกตได้ว่าเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นพีคของออกซาลेटและซีเทรตแยกจากพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ มากขึ้น เมื่อพิจารณาค่าการแยกดังแสดงในรูปที่ 11 พบว่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ค่าการแยก (R_s) ก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งค่า $pH=8.0$ เป็นค่า pH ให้ค่าการแยกของพีคออกซาลेटและซีเทรตมากที่สุด ($R_s=2.4$ และ 3.3 ตามลำดับ) ถึงแม้ว่าที่ pH 7.5 จะสามารถแยกออกซาลेटและซีเทรตได้อย่างสมบูรณ์ ($R_s \geq 1.5$) แต่พีคของออกซาลेटและซีเทรตอยู่ใกล้กับพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ ในปัสสาวะมากกว่าที่ pH 8.0 ซึ่งพีคอื่น ๆ อาจบดบังพีคของออกซาลेटและซีเทรตได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือก pH 8.0 สำหรับการแยกออกซาลेटและซีเทรตในปัสสาวะ



รูปที่ 10 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงของผลของ pH ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 200 mM และปรับ pH เป็น (ก) 6.0 (ข) 6.5 (ค) 7.0 (ง) 7.5 และ (จ) 8.0 พีค 1 คือ ออกซาเลต และ พีค 2 คือซิเตรต สภาวะของ CE ที่ใช้คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ศักย์ไฟฟ้า -15 kV บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่มีความยาวคลื่น 195 nm

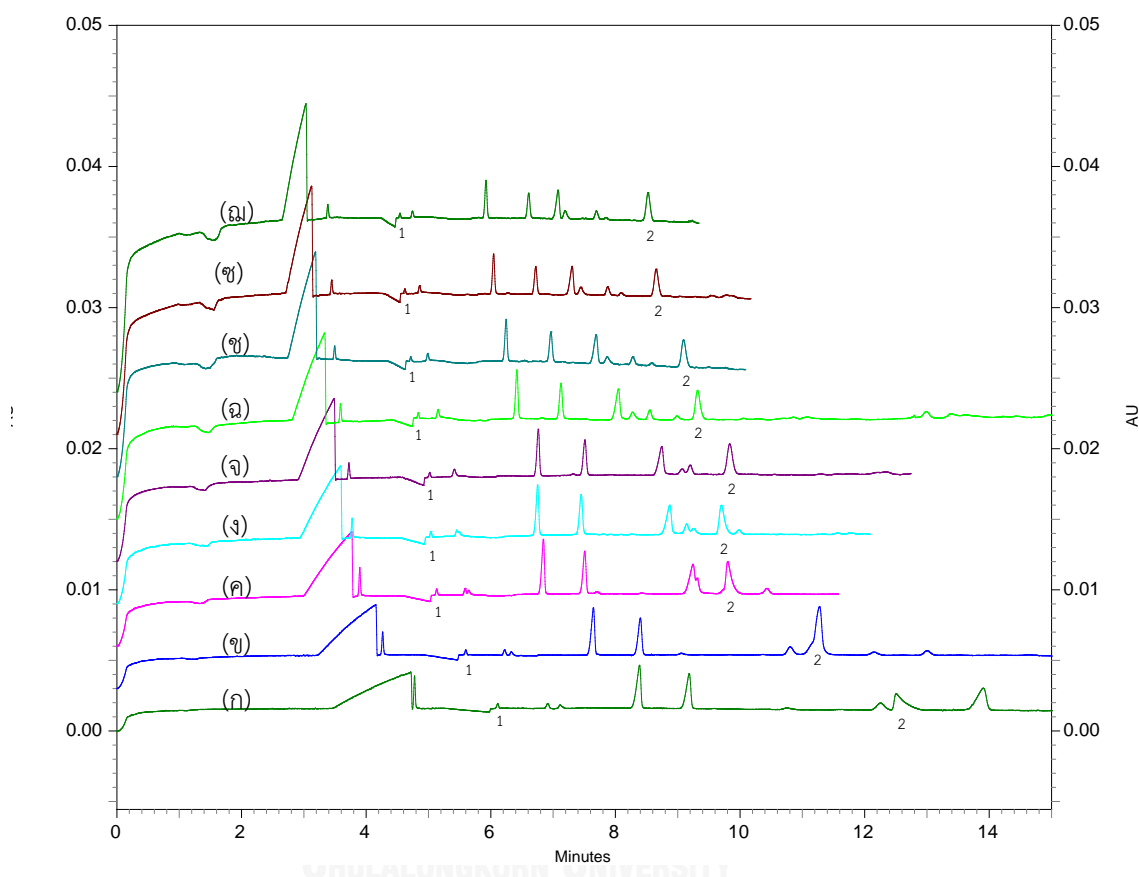


รูปที่ 11 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า R_s ที่ค่า pH ต่าง ๆ

4.1.2 ผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อความสามารถในการแยกของออกซาเลตและซีเทรต

บัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้คือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pK_a 7.21) ที่ pH 8.0 ซึ่งจะทำการดออกซาลิกและซิเทริกแตกตัวเป็นระจุได้เกือบ 100% และในสภาวะนี้จะมี EOF ที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของออกซาเลตและซีเทรตมีค่าสูงพอที่จะสามารถต้านการเคลื่อนที่ของ EOF เข้าไปสู่เครื่องตรวจจับได้ ในการทดลองนี้จึงศึกษาความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซีเทรต โดยศึกษาที่ช่วงความเข้มข้น 40-200 mM ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาถึงเครื่องตรวจจับเร็วขึ้น โดยปกติการเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าลดลง เนื่องจากค่าความแรงไอออนิกในสารละลายที่มีค่ามากขึ้น ทำให้สารตัวอย่างมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากไอออนที่ล้อมรอบมีจำนวนมากขึ้น ทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง แต่ในการทดลองนี้เมื่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นสารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จะทำให้ในสารละลายมีปริมาณไอออนมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้เกิดความร้อนภายในคัพลลารีหรือเกิด joule heating ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นจะส่งผลทำให้ความหนืดของสารละลายลดลง มีผลทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาเร็วขึ้น จากรูปสังเกตได้ว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง 40-120 mM (รูปที่ 12 (ก-จ)) ยังไม่สามารถแยกพีคของซีเทรตออกจากเมทริกซ์ได้ ทั้งนี้พีคของออกซาเลตและซีเทรตจะสามารถแยกออกจากพีค

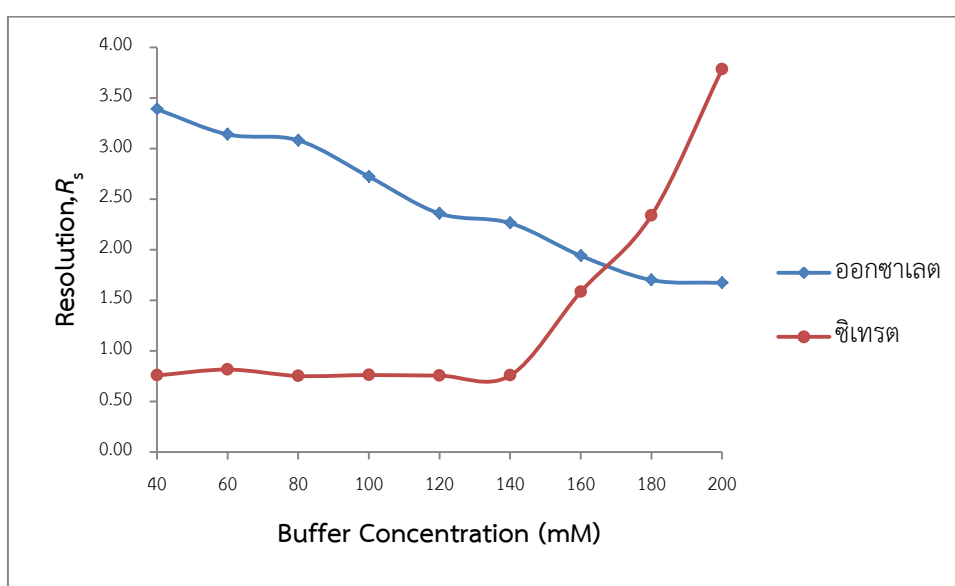
อื่น ๆ ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าตั้งแต่ 140 mM ขึ้นไป (รูปที่ 12 (ฉ-ณ)) ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 140 mM สามารถแยกพีคออกซาเลตได้แต่พบว่าพีคของซิเทรตยังรวมอยู่กับสารอื่น



รูปที่ 12 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อการแยกของออกซาเลตและซิเทรตในตัวอย่างปัสสาวะ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์คือ (ก) 40 mM (ข) 60 mM (ค) 80 mM (ง) 100 mM (จ) 120 mM (ฉ) 140 mM (ช) 160 mM (ซ) 180 mM และ (ณ) 200 mM โดยพีค 1 คือ ออกซาเลต และ พีค 2 คือซิเทรต สำหรับสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10

เมื่อเปรียบเทียบค่า R_s ของออกซาเลตและซิเทรตและความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่ม ค่าการแยกของออกซาเลตลดลงในขณะที่ค่าการแยกของซิเทรตเพิ่มขึ้น พีคของซิเทรตจะแยกได้อย่างสมบูรณ์ ($R_s \geq 1.5$) เมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าตั้งแต่ 160 mM เช่นกัน จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟต

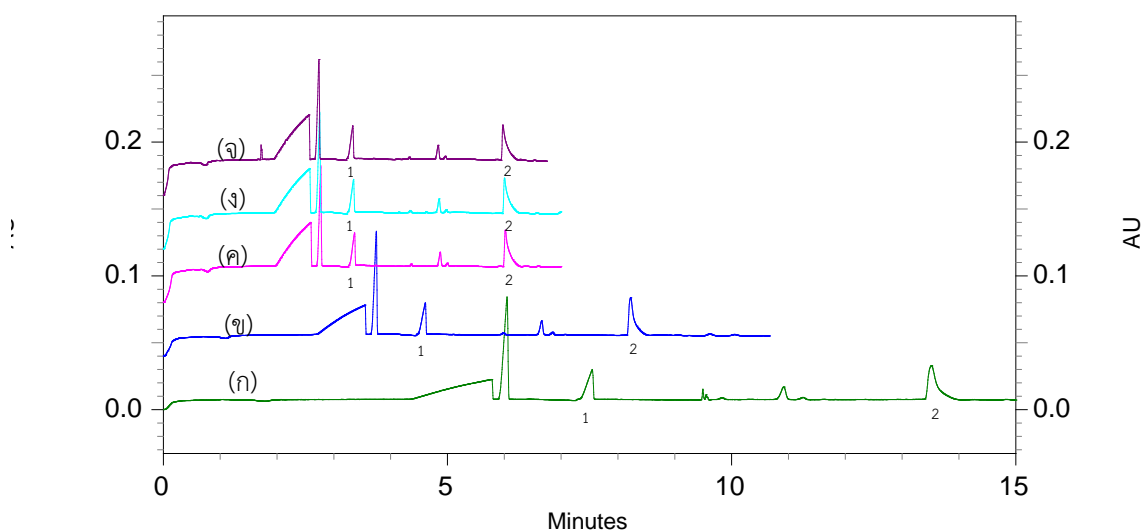
บัฟเฟอร์ 160 mM ก็เพียงพอที่จะแยกพีคของออกซาเลตและซีเทรตได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีค่า R_s เท่ากับ 1.94 และ 1.58 สำหรับพีคของออกซาเลตและซีเทรตตามลำดับ อย่างไรก็ตามถ้าใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์มากกว่า 160 mM พีคของซีเทรตจะยิ่งแยกออกจากพีคอื่น ๆ ได้มากขึ้น และที่ความเข้มข้นสูง ๆ เวลาที่ใช้ในการแยกยังลดลงอีกด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 200 mM เพราะสามารถแยกทั้งออกซาเลตและซีเทรตได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยให้ค่าการแยก 1.67 และ 3.78 ตามลำดับ ค่าไมเกรชันโทมของออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 4.45 และ 8.16 ตามลำดับ



รูปที่ 13 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า R_s ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

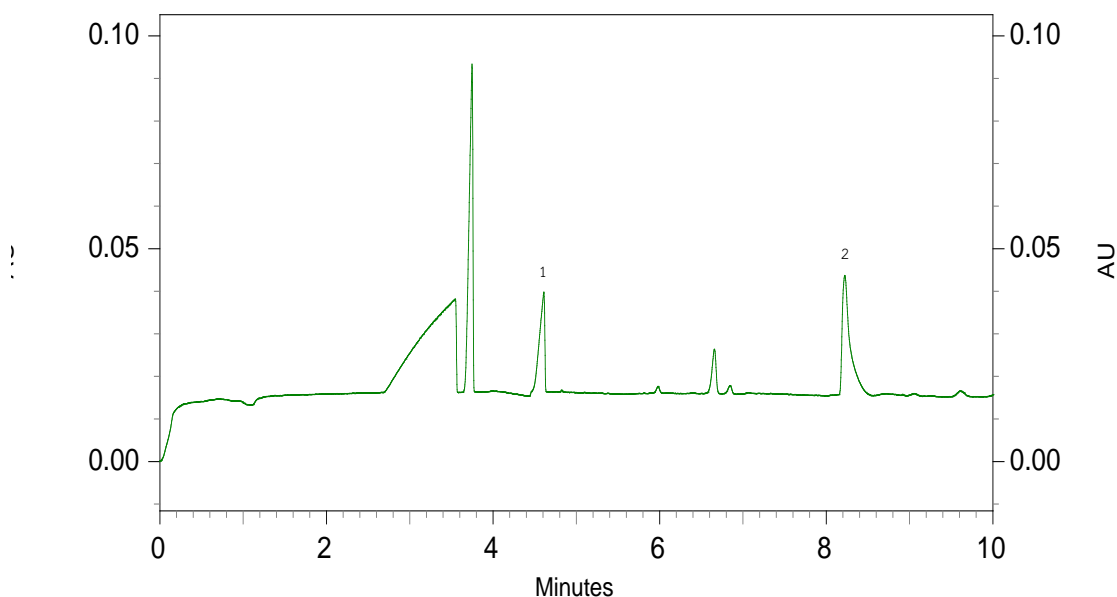
4.1.3 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซีเทรต

หลังจากได้ความเข้มข้นและค่า pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกออกซาเลตและซีเทรตแล้วต่อมาได้ศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกเพื่อให้ค่าการแยกที่ดีที่สุดของสารทั้งสองชนิด โดยปรับค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เป็น -10, -15, -20, -25 และ -30 kV ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14 จะเห็นได้ว่าเมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น เนื่องจากการเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้านั้นทำให้เกิดความเข้มของสนามไฟฟ้า (E) ที่มากขึ้นและส่งผลให้อีออนของสารเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับได้เร็วขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก μ ของสารขึ้นอยู่กับความเข้มของสนามไฟฟ้า ดังสมการที่ 1



รูปที่ 14 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ โดยปรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น (ก) -10 kV (ข) -15 kV (ค) 20 kV (ง) -25 kV และ (จ) -30 kV พีก 1 คือ ออกซาเลต และ พีก 2 คือซีเทรต สำหรับสถานะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10

ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ทุกศักย์ไฟฟ้าออกซาเลตและซีเทรตแยกออกจากพีกของเมทริกซ์อื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน แต่จากการทดลองพบว่าเมื่อลดค่าศักย์ไฟฟ้าลงเป็น -10 kV ทำให้การเคลื่อนที่ของสารมายังเครื่องตรวจวัดช้าลง ส่งผลให้เสียเวลาในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แต่หากเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น -20 ถึง -30 kV สารจะเคลื่อนที่ออกมาเร็วขึ้นตามค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นทำให้เวลาที่ใช้ในการแยกลดลงและพีกของออกซาเลตและซีเทรตเข้ามาชิดกันมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้พีกของเมทริกซ์อื่น ๆ บดบังและรบกวนการแยกของออกซาเลตและซีเทรตได้ อีกทั้งยังพบว่าการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกตั้งแต่ -20 kV ขึ้นไปมีผลทำให้กระแสไฟฟ้าในระบบมากขึ้นอาจเสี่ยงต่อการหยุดทำงานของเครื่องโดยอัตโนมัติ เนื่องจากกระแสไฟฟ้าที่สูงมากเกินไป ($>200 \mu\text{A}$) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า -15 kV สำหรับการแยกออกซาเลตและซีเทรต ซึ่งให้ R_s ของพีกออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 2.80 และ 5.46 ตามลำดับ อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการแยกที่ใช้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -15 kV แสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการแยกของพีคออกซาเลต (พีค 1) และซีเทรต (พีค 2) เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกเท่ากับ -15 kV สำหรับสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10

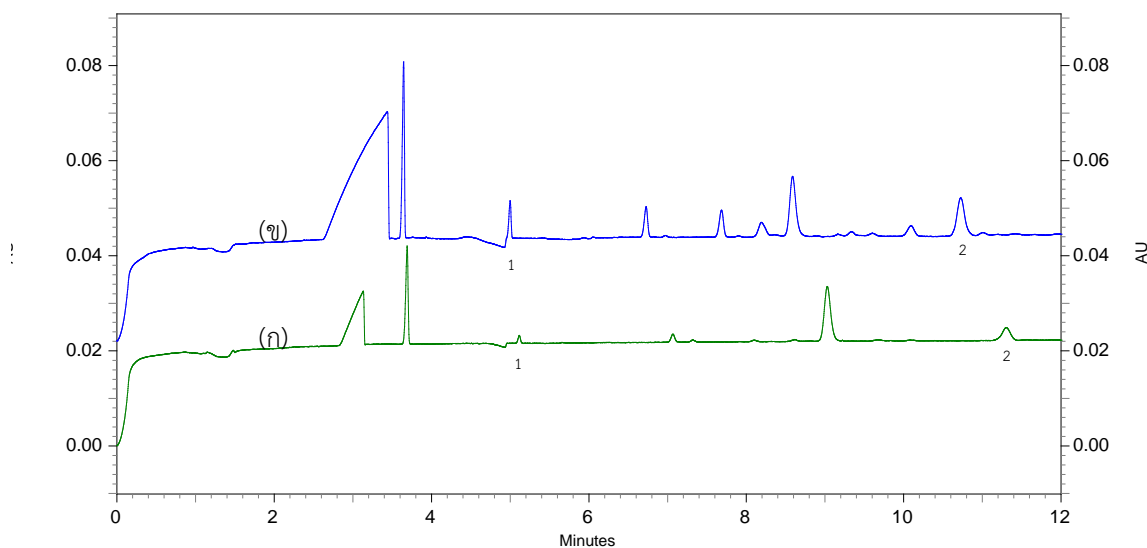
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ (on-line preconcentration) ของออกซาเลตและซีเทรตโดยเทคนิค CE

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตด้วยเทคนิค CE และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลนั้น พบว่ามีปัญหาเกิดขึ้นเนื่องจากออกซาเลตและซีเทรตมีความสามารถในการดูดกลืนยูวีได้ต่ำ จึงส่งผลให้ไม่สามารถตรวจวัดที่ความเข้มข้นต่ำได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตจึงมีความสำคัญที่จะช่วยให้เทคนิค CE สามารถตรวจวัดออกซาเลตและซีเทรตในปริมาณต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการเพิ่มสารตัวอย่างในคอลัมน์แบบออนไลน์โดยใช้การบรรจุสารเข้าไปในคะพิลลารีในปริมาณมากด้วยความดัน เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าในการแยก สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF พร้อมกับเมทริกซ์ถูกกำจัดออกโดย EOF จึงทำให้โซนสารตัวอย่างแคบลงและมีความเข้มข้นสูงขึ้น จากสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 200 mM pH 8.0 และความต่างศักย์ไฟฟ้า -15 kV ดังกล่าวแล้วในหัวข้อ 4.1 ขึ้นตอนต่อมาทำการศึกษาการหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ของออกซาเลตและซีเทรต เพื่อสามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปริมาณน้อย ๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.2.1 ระยะเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง

ในการทดลองได้เลือกใช้วิธีการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในคะฟิลลารีโดยใช้การบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ออกจากระบบโดยใช้ EOF [11] ซึ่งได้อธิบายวิธีการและขั้นตอนของวิธีดังกล่าวแล้วในหัวข้อ 2.8 ดังนั้นระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างจึงมีความสำคัญสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีนี้

ในรูปที่ 16 เป็นการใช่วิธีการเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตในคะฟิลลารี พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างนานขึ้นจะทำให้พีคของออกซาเลตและซิเทรตสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างนานขึ้นทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้นอีกด้วย เนื่องมาจากการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างทำให้โซนสารตัวอย่างมีความยาวมากและเคลื่อนที่เข้าไปในคะฟิลลารีได้มากขึ้นตามระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เหลือระยะทางในคะฟิลลารีที่สารจะต้องเคลื่อนที่ถึงเครื่องตรวจวัดสั้นลง จึงมีผลทำให้สารใช้เวลาน้อยในการเคลื่อนที่ออกมาถึงเครื่องตรวจวัดหรือสารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้นนั่นเอง กล่าวคือการบรรจุสารในปริมาณมากทำให้โซนของสารที่มีประจุลบไม่เคลื่อนที่ย้อนไปยังด้านบรรจุสารมากนักเนื่องจาก sample plug มีปริมาณมาก จึงทำให้อยู่ใกล้เครื่องตรวจวัดมากกว่า ดังนั้นระยะทางในการเคลื่อนที่ถึงเครื่องตรวจวัดจึงสั้นกว่า (ดังแสดงในรูปที่ 6) ดังนั้นการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างจึงส่งผลให้สารเคลื่อนที่ออกมาจากคะฟิลลารีได้เร็วขึ้นนั่นเอง จากการทดลองพบว่าออกซาเลตและซิเทรตให้ค่าการแยกอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10-70 วินาที หากบรรจุสารตัวอย่างมากกว่า 70 วินาทีจะทำให้พีคของสารตัวอย่างสูงขึ้นแต่พบว่าให้ค่าการแยกที่ไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการบรรจุสารตัวอย่างที่ 30 วินาทีก็เพียงพอแล้วสำหรับการตรวจวัดสารออกซาเลตและซิเทรตในปริมาณน้อย ๆ โดยสามารถเพิ่มความสูงของพีคออกซาเลตและซิเทรตได้ประมาณ 2 เท่า และให้ค่าการแยกสำหรับออกซาเลตและซิเทรตเท่ากับ 2.49 และ 1.65 ตามลำดับ ถึงแม้ว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างที่มากกว่า 30 วินาทีจะสามารถเพิ่มความสูงของพีคออกซาเลตและซิเทรตได้ดียิ่งขึ้น แต่จากการทดลองพบว่าอาจทำให้พีคของเมทริกซ์อื่น ๆ เข้ามาอยู่ใกล้ชิดกับพีคของออกซาเลตและซิเทรตมากเกินไป ซึ่งมีโอกาสทำให้สูญเสียการแยกได้

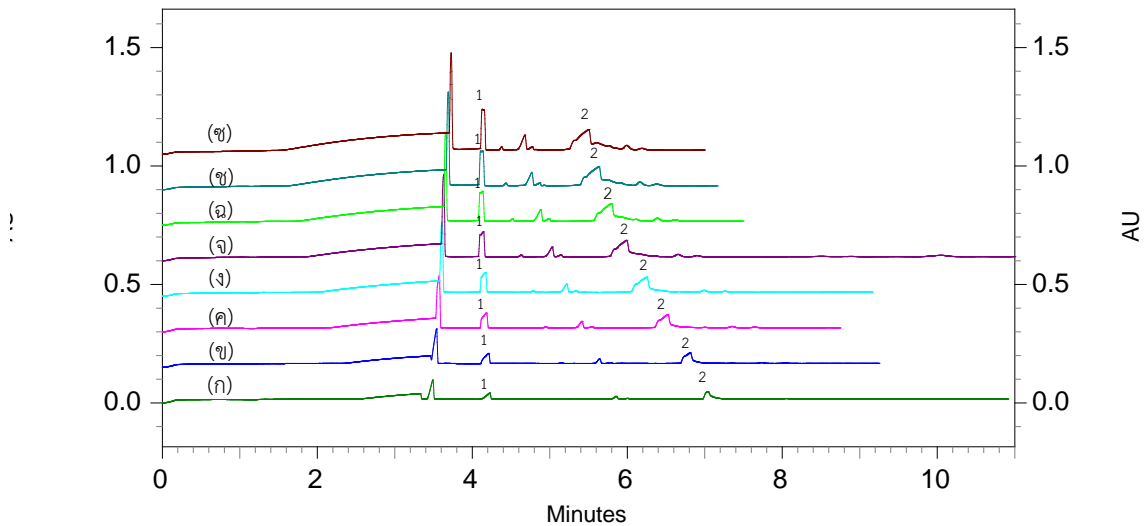


รูปที่ 16 อิเล็กโทรโกราแกรมแสดงผลของเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้น ของออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ โดยปรับเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น (ก) 10 และ (ข) 30 วินาที พีก 1 คือออกซาเลตและ พีก 2 คือซิเตรต สำหรับสถานะของ CE คือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 200 mM pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก -15 kV และสถานะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10

4.2.2 ความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่าง

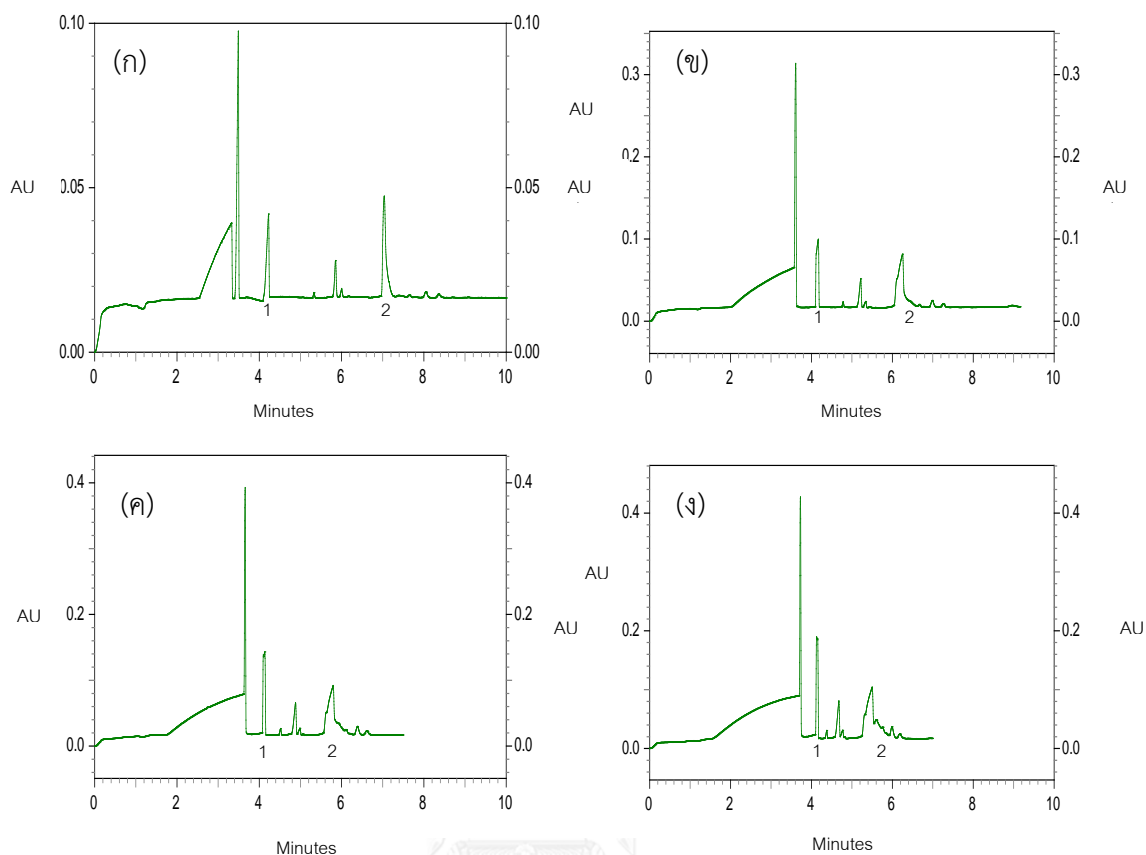
นอกจากระยะเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างจะส่งผลถึงปริมาณสารตัวอย่างที่บรรจุแล้ว ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างก็มีผลต่อปริมาณของสารตัวอย่างเช่นกัน ตามสมการที่ 11 ดังนั้นจึงทำการศึกษาความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่างสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 17 พบว่าเมื่อเพิ่มความดันในการบรรจุสารตัวอย่างโดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างคงที่ (10 วินาที) พีกของสารตัวอย่างจะกว้างขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ความดันที่สูงขึ้นทำให้ด้านหน้าของโซนสารมีลักษณะเป็นแบบพาราโบลาและเกิดการกระจายของโซนสาร ซึ่งจะคล้ายกับการเคลื่อนที่ของสารเนื่องมาจากการใช้ปั๊มใน HPLC จึงส่งผลให้พีกสารกว้างมากขึ้น จะเห็นได้ว่าการใช้ความดันที่ 0.5 psi เป็นความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่าง และหากเพิ่มความดันมากกว่า 0.5 psi พีกของออกซาเลตและซิเตรตจะมีลักษณะกว้าง เป็นผลเนื่องมาจากความดันที่มากขึ้นและในการบรรจุสารตัวอย่างทำให้เกิดการกระจายของพีกสารตัวอย่าง จึงทำให้พีกมีลักษณะไม่สมมาตร ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ความดันสูงในการบรรจุสารตัวอย่างเพื่อเพิ่มปริมาณสารในคะพิลลารี แต่ควรเพิ่มปริมาณโดยการเพิ่มเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างแทน และทำ

การบรรจุสารที่ความดัน 0.5 psi นอกจากนี้การใช้ความดันสูงขึ้นจะทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้นจนอาจสูญเสียการแยกได้ ทั้งนี้เพราะเมื่อใช้ความดันสูงขึ้น โชนสารตัวอย่างจะยาวขึ้น ทำให้เหลือระยะทางในการเคลื่อนที่ไปสู่เครื่องตรวจวัดสั้นลง ซึ่งคล้ายกับกรณีการบรรจุสารตัวอย่างให้นานขึ้นนั่นเอง



รูปที่ 17 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะ โดยปรับความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น (ก) 0.5 (ข) 1.0 (ค) 1.5 (ง) 2.0 (จ) 2.5 (ฉ) 3.0 (ช) 3.5 และ (ข) 4.0 psi พีค 1 คือออกซาเลตและพีค 2 คือซิเทรต โดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาที และสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10

รูปที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบการบรรจุสารตัวอย่างที่ 0.5, 1.5, 3.0 และ 4.0 psi จะเห็นว่าการใช้ความดันในการบรรจุสารตัวอย่างที่ 0.5 psi (รูปที่ 18 (ก)) พีคของออกซาเลตและซิเทรตมีลักษณะแคบและสูง ซึ่งแสดงถึงความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่างในคัพฟิลลารี เมื่อเพิ่มความดันมากขึ้นในการบรรจุสารตัวอย่าง (รูปที่ 18 (ข-ง)) พีคจะมีลักษณะกว้างเกิดการกระจายของพีคอันเนื่องมาจากลักษณะโชนสารที่เป็นแบบพาราโบลา และหากเพิ่มความดันมากเกินไปกว่า 2.0 psi พีคของเมทริกซ์อื่น ๆ จะเคลื่อนที่เข้ามาชิดและบดบังพีคของซิเทรตทำให้ไม่สามารถแยกสารดังกล่าวได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกการบรรจุสารตัวอย่างในคัพฟิลลารีด้วยความดัน 0.5 psi สำหรับการแยกออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะ



รูปที่ 18 อิเล็กโทรโฟโรรแกรมแสดงผลของผลของความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ โดยปรับความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น (ก) 0.5 psi (ข) 1.5 psi (ค) 3.0 psi และ (ง) 4.0 psi พิก 1 คือออกซาเลตและ พิก 2 คือซิเตรต โดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาที และสถานะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10

4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น

จากการทดลองในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 ทำได้สถานะที่เหมาะสมในการแยกและสถานะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยเทคนิค CE ซึ่งได้แก่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 mM pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก -15 kV ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 30 วินาทีสำหรับการตรวจวัดตัวอย่างออกซาเลตและซิเตรตในปริมาณน้อย ๆ แต่จะใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาทีสำหรับการตรวจวัดออกซาเลตและซิเตรตในปริมาณปกติที่เครื่องมือสามารถวิเคราะห์ได้พิกที่สูงเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และใช้ความดันในการบรรจุสารตัวอย่าง 0.5 psi ขั้นตอนต่อมาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยวิธีการดังต่อไปนี้

4.3.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ

(Limit of detection, LOD and limit of quantitation, LOQ)

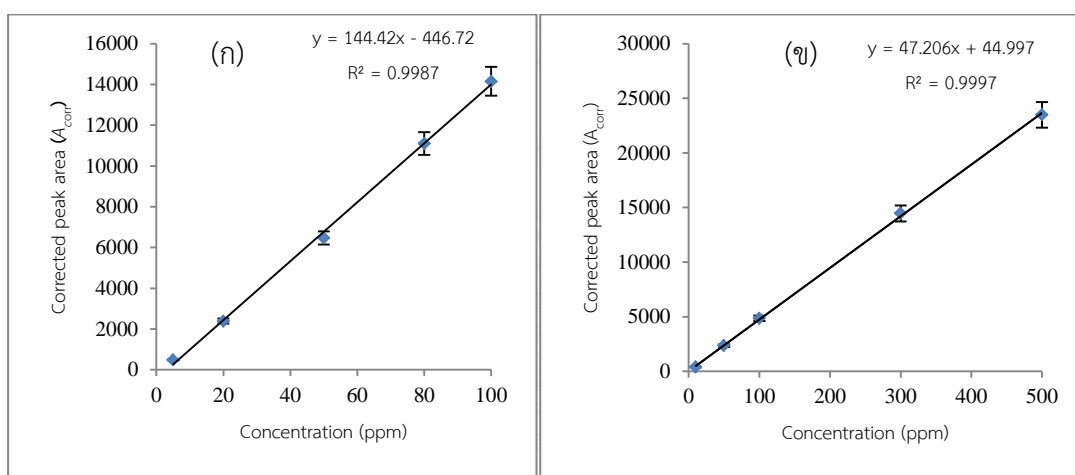
ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเตรต จากนั้นทำการเจือจางสารละลายมาตรฐาน และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นอย่างน้อย 3 ขั้ว และวัดอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) จนกระทั่งได้ค่าสัญญาณใกล้เคียง 3 สำหรับ LOD และ 10 สำหรับ LOQ ตามหัวข้อในหัวข้อ 3.6.1 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเป็นเวลา 90 วินาทีได้ค่า LOD สำหรับออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 0.003 และ 0.013 ppm ตามลำดับ และค่า LOQ สำหรับออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 0.013 และ 0.033 ppm ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่ม LOD และ LOQ เมื่อเปรียบเทียบกับบรรจุสารตัวอย่างตามระยะเวลาปกติ (10 วินาที) ได้ถึงปริมาณ 200 เท่าทั้งออกซาเลตและซิเตรต เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้เช่น ในปี ค.ศ. 2010 Muñoz และคณะได้พัฒนาและหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดออกซาเลต ซิเตรต กรดยูริก และครีเอทีนีน ในปัสสาวะโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM pH 6.5 และใช้เทคนิค CZE ในการวิเคราะห์สาร พบว่า LOD ของการตรวจวัดสารดังกล่าวเท่ากับ 0.46, 2.6, 3.8 และ 1.3 ppm ตามลำดับ [7] จะเห็นได้ว่าถึงแม้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่า LOD สำหรับออกซาเลตและซิเตรตน้อยกว่างานวิจัยดังกล่าว แต่วิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถทำได้ง่ายและสามารถเพิ่มความเข้มข้นสารแบบออนไลน์สำหรับการหาปริมาณออกซาเลตที่มีอยู่ในปัสสาวะในปริมาณต่ำ ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 10 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ

ระยะเวลาในการบรรจุสาร ตัวอย่าง (วินาที)	ออกซาเลต		ซิเตรต	
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
10	0.657	3.285	2.628	6.571
20	0.526	1.314	1.971	5.257
30	0.329	0.657	1.314	3.943
40	0.197	0.329	0.657	2.628
50	0.131	0.197	0.329	1.314
60	0.066	0.131	0.197	0.657
70	0.033	0.066	0.053	0.329
80	0.007	0.033	0.033	0.066
90	0.003	0.013	0.013	0.033

4.3.2 กราฟมาตรฐาน (calibration curve)

ในการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในแต่ละวันจะทำการสร้างกราฟมาตรฐานตามตารางที่ 5 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้พัฒนาขึ้นโดยทำการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของ A_{corr} เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 19 และได้สมการเส้นตรงดังแสดงในตารางที่ 11 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง A_{corr} และความเข้มข้นของสารมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตมีความสัมพันธ์ในลักษณะเชิงเส้นตรงสูง จะเห็นได้จากค่า R^2 ของออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.9987 และ 0.9997 ตามลำดับ



รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานของออกซาเลต (ก) และซีเทรต (ข) สำหรับการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะโดยเทคนิค CE สภาวะของ CE คือความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 200 mM pH 8.0 คะพิลลารีคอลัมน์เป็น uncoated fused silica ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ศักย์ไฟฟ้า -15 kV บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่มีความยาวคลื่น 195 nm

ตารางที่ 11 สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของออกซาเลตและซีเทรตสำหรับการวิเคราะห์
ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะโดยเทคนิค CE

กราฟ มาตรฐาน	ช่วงความเข้มข้น (ppm)	สมการเชิงเส้นตรง		
		ความชัน	จุดตัดแกน y	R^2
ออกซาเลต	5-100	114.42	446.72	0.9987
ซีเทรต	10-500	47.206	44.997	0.9997

4.3.4 ความแม่นยำ (Accuracy)

การหาความแม่นยำสามารถทำได้ตามหัวข้อ 3.6.3 โดยเตรียมความเข้มข้นดังตารางที่ 6 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้พัฒนาขึ้นความเข้มข้นละ 10 ครั้ง เพื่อหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น และนำค่า A_{corr} จากผลการทดลองที่ได้มาหาปริมาณของออกซาเลตและซีเทรตเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปที่ 19 จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) โดยใช้สมการ 23 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 12 จากผลการทดลองหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นและใช้การบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ (10 วินาที) พบว่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-108% สำหรับออกซาเลตและ 103-106% สำหรับซีเทรต ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ในช่วงร้อยละของการคืนกลับ 80-110% สำหรับความเข้มข้นในช่วง 0.1-10 ppm และ 90-107% สำหรับความเข้มข้นในช่วง 10-100 ppm [23] นอกจากนี้ได้ทำการหาร้อยละของการคืนกลับเพื่อทดลองความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ สำหรับการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมาก (30 วินาที) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13 พบว่าร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 98.95% สำหรับออกซาเลตและ 102.66% สำหรับซีเทรต ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกับการทดสอบความแม่นยำสำหรับการบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องและแม่นยำของเครื่องมือและวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นและการแยกออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ

ตารางที่ 12 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ เมื่อใช้การบรรจุสาร ตัวอย่างแบบปกติ (10 วินาที) (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (±SD)	Recoveries (%) (±SD)
ออกซาเลต	5	5.42±0.13	108.37±2.53
	50	49.43±1.27	98.86±2.53
	80	78.81±0.73	98.51±0.91
ซีเทรต	10	10.36±0.65	103.57±6.52
	100	104.95±4.13	104.95±4.13
	300	318.87±1.86	106.29±3.95

ตารางที่ 13 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะเมื่อใช้การบรรจุสาร ตัวอย่างปริมาณมาก (30 วินาที) (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (±SD)	Recoveries (%) (±SD)
ออกซาเลต	50	49.48±0.42	98.95±0.83
ซีเทรต	100	102.66±4.61	102.66±4.61

4.3.5 ความเที่ยง (Precision)

ทำได้โดยการวิเคราะห์ผลจากการทดลองในหัวข้อ 4.3.4 โดยคำนวณ A_{corr} ของสาร และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูป 19 จะได้ปริมาณออกซาเลต และซีเทรตที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่เติมลงไป จากนั้นสามารถคำนวณ %RSD ได้จากสมการ 24 เพื่อหาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน โดยเทียบการบรรจุสารแบบปกติ (10 วินาที) กับการบรรจุสารในปริมาณมาก (30 วินาที) ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่ามีค่าความเที่ยงสูงทั้งการบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติและการบรรจุสาร ตัวอย่างในปริมาณมาก (30 วินาที) กล่าวคือในการทดลองได้ค่า %RSD<4% สำหรับทั้งไมเกรซินไทม์ (t_m) และ A_{corr} และ %RSD<5 สำหรับปริมาณที่ตรวจวัดได้ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงและ อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ [23] และวิธีการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากให้ความเที่ยงที่สูงเช่นเดียวกับการบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ เมื่อเปรียบเทียบความเที่ยงระหว่างวันโดยทำติดต่อกัน 3 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่า %RSD<5 สำหรับทั้งไมเกรซินไทม์ (t_m) และ A_{corr} ซึ่งส่งผลให้

%RSD<5 สำหรับความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้เช่นเดียวกับการทดสอบความภายในวันเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าเครื่องมือและวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ที่ติดต่อกันหลายวัน

ตารางที่ 14 ความเที่ยงภายในวันเดียวกันของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะด้วยเทคนิค CE ที่ได้พัฒนาขึ้นโดยทำการบรรจุสารตัวอย่าง 10 และ 30 วินาที (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	%RSD (ค่าเฉลี่ยของ t_m)		%RSD (ค่าเฉลี่ยของ A_{corr})		%RSD (ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น)	
		10 วินาที	30 วินาที	10 วินาที	30 วินาที	10 วินาที	30 วินาที
		ออกซาเลต	50	2.27 (5.45)	0.39 (5.23)	3.75 (5514.84)	0.77 (17431.50)
ซีเทรต	100	3.27 (13.77)	2.06 (11.68)	2.88 (5746.83)	1.09 (17396.45)	3.93 (104.95)	4.48 (102.66)

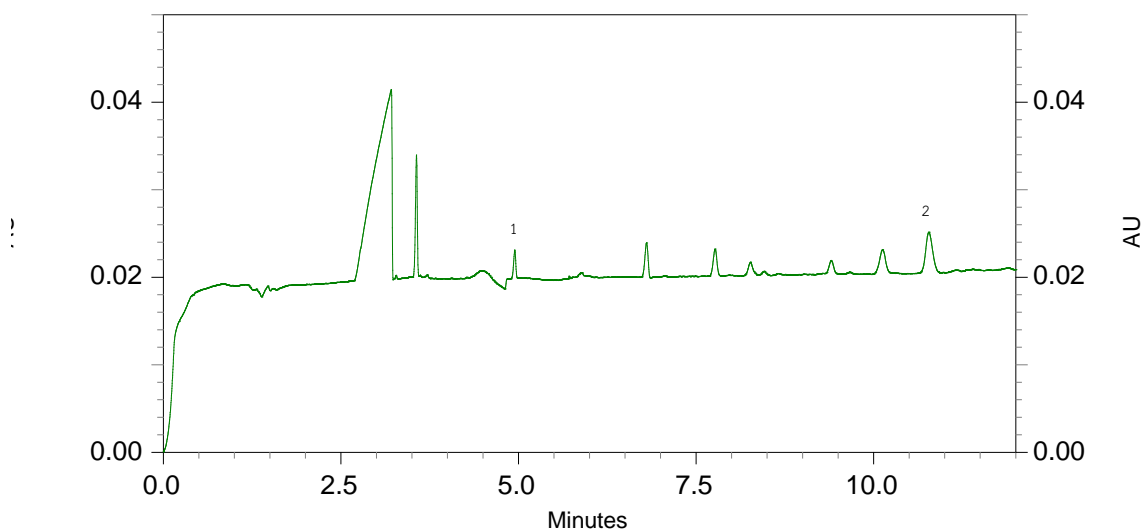
ตารางที่ 15 ความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะด้วยเทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเท่ากับ 10 วินาที (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	วันที่	ค่า			%RSD	%RSD (ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น)
			1	2	3		
			ออกซาเลต	50	t_m		
		A_{corr}	6060.25	5770.20	5734.80	4.86	(49.88)
ซีเทรต	100	t_m	12.53	12.67	12.43	4.54	4.35
		A_{corr}	5929.30	5949.72	6037.64	4.35	(102.98)

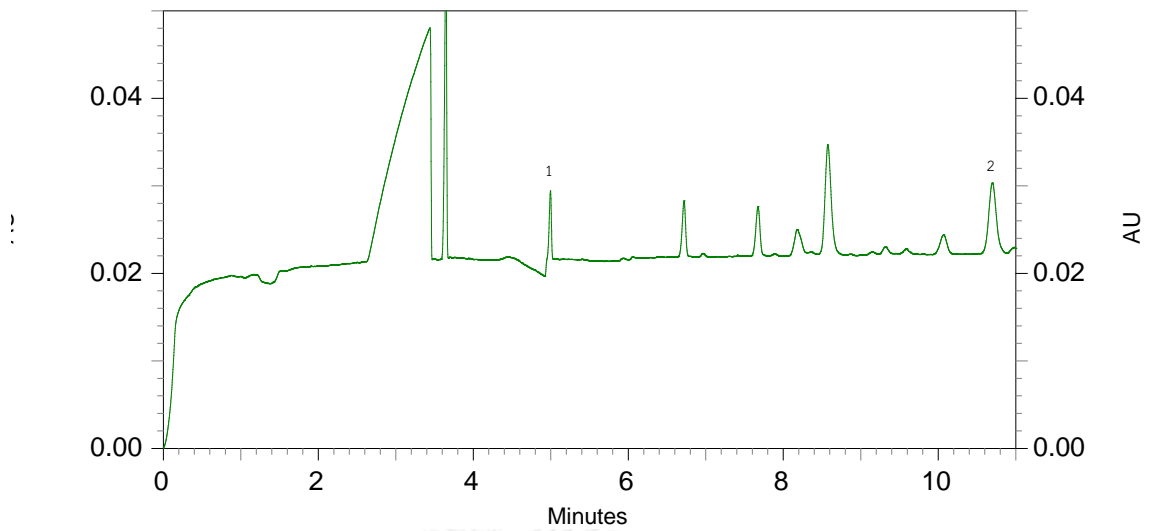
4.3.6 การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการหาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะและการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic method)

เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความน่าเชื่อถือเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับ จึงทำการเปรียบเทียบการ

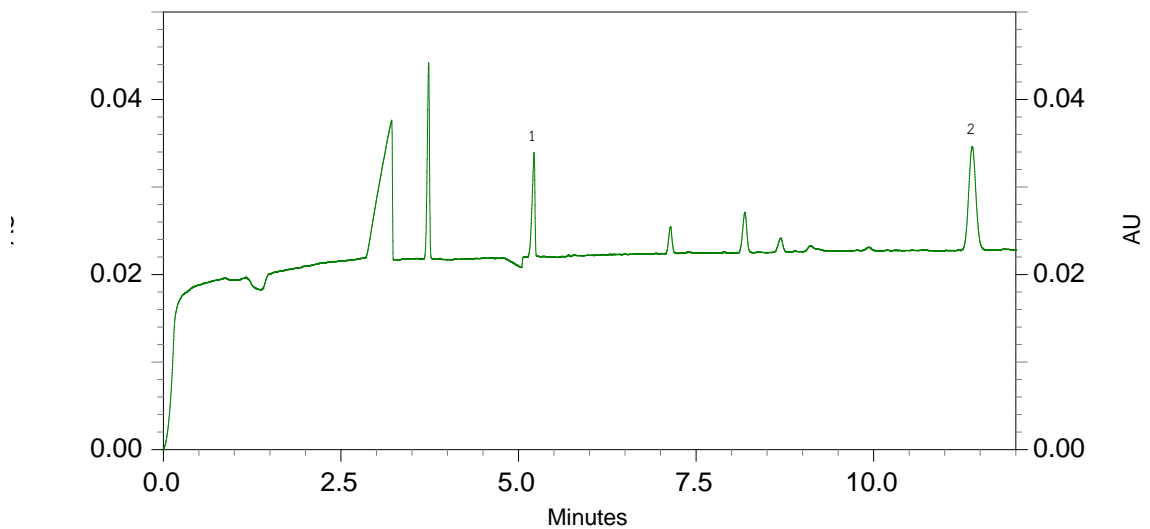
วิเคราะห์โดยการหาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตด้วยวิธีทั้งสอง กล่าวคือเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยเทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้นและอีกเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยใช้วิธีมาตรฐานโดยใช้ชุดทดสอบ การทดสอบทั้งสองวิธีจะใช้ตัวอย่างปัสสาวะตัวอย่างเดียวกัน สารละลายมาตรฐานที่เตรียมในชุดเดียวกัน ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน เพื่อเป็นการลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการวิเคราะห์ ปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีความเข้มข้นแบ่งเป็น 3 ระดับ กล่าวคือช่วงความเข้มข้นของออกซาเลตในปัสสาวะของคนปกติคือ 1-20 ppm ซึ่งเป็นการตรวจเพื่อยืนยันว่าอุปกรณ์และเครื่องมือรวมถึงสถานะที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดปริมาณสารในปริมาณน้อย ๆ ได้อย่างถูกต้อง ช่วงถัดมาคือ 20-40 ppm และช่วงความเข้มข้นของออกซาเลตที่มากกว่า 40 ppm ซึ่งเป็นช่วงปริมาณออกซาเลตที่พบในปัสสาวะของคนป่วยโรคนี้ไต [24] สำหรับปริมาณของซิเตรตในคนปกติส่วนใหญ่ความเข้มข้นของซิเตรตในปัสสาวะจะมากกว่า 200 ppm และในผู้ป่วยปริมาณของซิเตรตโดยเฉลี่ยจะมากกว่า 100 ppm [3] จึงไม่มีปัญหาในการตรวจวัดซิเตรต ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงแบ่งสารตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มตามความเข้มข้นของออกซาเลต จากนั้นนำสารตัวอย่างทั้งหมดไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สถานะที่เหมาะสมควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบออกซาเลตและซิเตรตตามวิธีทดลองในหัวข้อ 3.6.6



รูปที่ 20 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นต่ำ (11.81 และ 44.97 ppm ตามลำดับ) สถานะของ CE ที่ใช้คือบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีและสถานะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 21 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นระดับกลาง (30.58 และ 240 ppm ตามลำดับ) สภาพของ CE ที่ใช้คือบรรจุนสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีและสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 22 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นสูง (108.19 และ 315.57 ppm ตามลำดับ) สภาพของ CE ที่ใช้คือบรรจุนสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีและสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 19

เมื่อได้ผลการทดลองโดยใช้เอ็นไซม์แล้ว จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจวัดออกซาลेटโดยใช้เทคนิค CE จากวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น นำผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกัน กล่าวคือเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาลेटและซีเทรตโดยเทคนิค CE ใช้สภาวะ CE ที่พัฒนาขึ้นและอีกเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาลेटและซีเทรตโดยใช้วิธีมาตรฐาน จากนั้นเปรียบเทียบผลของทั้งสองวิธีโดยการทดสอบแบบที (the student test, t) ซึ่งได้อธิบายแล้วหัวข้อที่ 2.3 ผลการเปรียบเทียบแสดงในตาราง 16 พบว่าเมื่อคำนวณค่า t ของออกซาลेटและซีเทรตได้เท่ากับ 0.32 และ 1.43 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีทั้งสองที่ระดับชั้นความเสรีเท่ากับ 40 (จำนวนวิเคราะห์ $n = 41$) ค่า t ที่ลิมิตความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 1) เท่ากับ 2.00 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า t ที่คำนวณได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี [22]

นอกจากนี้ในรูปที่ 23 ยังสามารถยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้นว่ามีความถูกต้อง กล่าวคือการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาลेटและซีเทรตโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ดีมากกับวิธีมาตรฐาน โดยมี intraclass correlation coefficient สำหรับออกซาลेटและซีเทรตเท่ากับ 0.977 และ 0.970 ตามลำดับ (ตามเกณฑ์ค่า intraclass correlation coefficient อยู่ในช่วง 0.81-0.98 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95) [25]

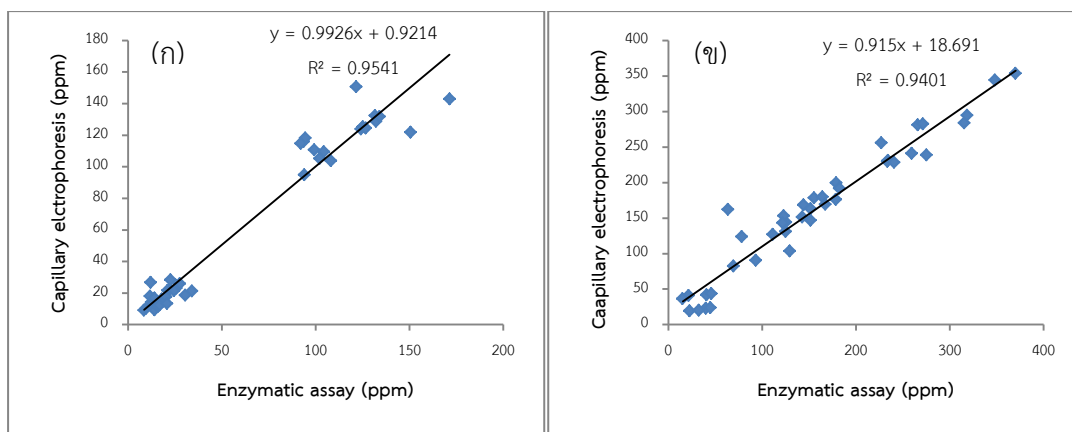
ตารางที่ 16 ความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตที่วิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิค CE ตามสถานะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้การบรรจุสารตัวอย่างที่ 10 วินาทีกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic method)ⁿ (จำนวนวิเคราะห์ n=41)

ตัวอย่าง	ออกซาเลต (ppm)		ซีเทรต (ppm)	
	CE (\pm SD)	enzymatic assay	CE (\pm SD)	enzymatic assay
1	14.17 \pm 0.10	9.27	15.35 \pm 0.50	36.25
2	9.65 \pm 0.29	10.27	40.25 \pm 3.44	22.84
3	15.87 \pm 0.54	11.27	21.92 \pm 0.67	41.20
4	16.80 \pm 0.11	12.27	40.91 \pm 0.96	41.73
5	14.64 \pm 0.09	11.73	22.71 \pm 1.08	19.26
6	18.10 \pm 0.63	16.21	32.56 \pm 0.23	20.04
7	11.81 \pm 1.02	18.01	44.97 \pm 1.34	23.84
8	12.12 \pm 0.90	26.76	129.76 \pm 3.87	103.39
9	12.52 \pm 0.51	14.27	78.58 \pm 2.05	124.08
10	8.53 \pm 0.05	9.07	63.61 \pm 0.41	162.16
11	13.42 \pm 0.04	13.63	155.43 \pm 2.82	178.48
12	13.96 \pm 0.12	11.07	259.42 \pm 1.62	240.82
13	14.11 \pm 0.09	16.81	370.27 \pm 1.59	353.86
14	20.77 \pm 0.27	13.27	227.18 \pm 2.46	255.78
15	22.53 \pm 0.05	22.58	234.45 \pm 1.82	231.02
16	24.09 \pm 0.10	21.35	318.64 \pm 1.26	294.44
17	22.62 \pm 0.33	28.48	275.14 \pm 1.63	238.64
18	21.17 \pm 0.54	21.66	233.52 \pm 2.61	229.98
20	30.58 \pm 1.13	18.60	240.98 \pm 0.45	228.38
21	20.28 \pm 0.24	0.24	266.12 \pm 1.76	281.02

ตารางที่ 16 ผลของความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตโดยเทคนิค CE ตามสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการบรรจุสารตัวอย่างที่ 10 วินาทีกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic assay)ⁿ (จำนวนวิเคราะห์ n=41) (ต่อ)

ตัวอย่าง	ออกซาเลต (ppm)		ซีเทรต (ppm)	
	CE (±SD)	enzymatic assay	CE (±SD)	enzymatic assay
22	25.80±0.42	23.09	15.35±0.50	36.25
23	24.55±0.56	21.44	69.46±1.65	82.48
24	108.19±0.37	103.85	315.57±1.38	283.64
25	104.40±0.22	109.42	178.96±3.10	199.42
26	102.19±0.44	105.31	125.59±1.63	144.00
27	99.24±0.35	110.68	182.56±0.73	192.09
28	93.98±0.26	94.80	144.15±0.33	168.52
29	131.59±0.65	132.43	178.58±0.96	176.10
30	124.21±0.12	123.93	142.98±2.15	151.59
31	93.64±0.58	116.03	151.81±6.39	163.07
32	125.23±0.40	125.38	164.34±0.94	179.67
33	94.50±0.12	118.20	111.50±0.99	127.05
34	171.06±0.39	142.87	167.32±1.20	169.33
35	121.65±0.09	150.59	123.30±1.16	153.16
36	132.11±0.77	128.82	151.70±1.46	147.07
37	92.08±0.50	114.85	122.17±1.56	143.13
38	150.61±0.45	121.94	46.13±0.92	43.89
39	126.79±1.12	124.51	93.49±0.68	90.57
40	133.97±0.08	131.84	125.05±1.46	131.01
41	21.45±1.25	25.97	131.01±1.29	134.14

ⁿ Paired *t*-test: ออกซาเลต, $t_{cal} = 0.60$, $t_{table} (95\%) = 2.00$ และซีเทรต $t_{cal} = 1.89$, $t_{table} (95\%) = 2.00$



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซาเลต (ก) และซีเทรต (ข) ที่ตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิค CE ที่ได้พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic method) โดยมี intraclass correlation coefficient สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.977 และ 0.970

นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบการหาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตโดยเทคนิค CE ที่ใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาทีเปรียบเทียบกับ 30 วินาที ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณ (ในหัวข้อ 2.3) ของออกซาเลตและซีเทรตได้เท่ากับ 0.42 และ 2.13 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีทั้งสองที่ระดับชั้นความเสรีเท่ากับ 9 (จำนวนวิเคราะห์ $n = 10$) ค่า t ค่า t ที่จำกัดความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 1) เท่ากับ 2.26 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า t ที่คำนวณ [22] ซึ่งแสดงว่าผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือ สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 17 ปริมาณของออกซาเลตและซีเทรตที่วิเคราะห์ได้โดยเทคนิค CE ตามสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการบรรจุสารตัวอย่างที่ 30 วินาทีกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic assay)ⁿ (จำนวนวิเคราะห์ n=10)

ตัวอย่าง	ออกซาเลต (ppm)		ซีเทรต (ppm)	
	CE (±SD)	enzymatic assay	CE (±SD)	enzymatic assay
1	10.23±0.09	9.50	44.94±0.61	40.97
2	3.68±0.04	4.18	7.13±0.11	4.20
3	3.64±0.09	5.84	14.92±0.64	13.42
4	5.04±0.18	6.14	7.92±0.01	8.98
5	5.34±0.19	6.16	65.79±2.12	42.89
6	4.43±0.12	6.93	54.25±0.82	45.39
7	5.61±0.04	7.28	43.32±0.64	35.76
8	0.62±0.02	0.56	48.80±1.48	46.39
9	7.57±0.06	8.13	43.40±1.06	30.09
10	5.83±0.03	7.58	124.89±2.94	131.65

ⁿ Paired *t*-test: ออกซาเลต, $t_{cal} = 0.42$, $t_{table} (95\%) = 2.26$ และซีเทรต $t_{cal} = 2.13$, $t_{table} (95\%) = 2.26$

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการแยกออกซาเลตและซีเทรตด้วยเทคนิค CE โดยเริ่มต้นจากการหาพีเอชและความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซีเทรตพบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 200 mM pH 8.0 และใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกเท่ากับ -15 kV ร่วมกับสภาวะอื่นๆของ CE คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 μm ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่มีความยาวคลื่น 195 nm ผลการทดลองจากการใช้สภาวะดังกล่าวในการแยกออกซาเลตและซีเทรตพบว่าอิเล็กโทรโฟโแกรมของออกซาเลตและซีเทรตแยกจากพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ ได้อย่างสมบูรณ์ กล่าวคือมีค่าการแยก (R_s) สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 2.80 และ 5.46 ตามลำดับ

ขั้นตอนต่อมาทำการศึกษาการหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ของออกซาเลตและซีเทรต เพื่อสามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปริมาณต่ำ ๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ด้วยวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในคัพลลารีโดยใช้การบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดัน ร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ออกจากระบบโดยใช้ EOF โดยศึกษาระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างและความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่างพบว่า ที่ความดัน 0.5 psi เป็นความดันที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุสารตัวอย่าง เพราะหากเพิ่มความดันมากกว่า 0.5 พีคของออกซาเลตและซีเทรตจะมีลักษณะกว้างเป็นผลเนื่องมาจากความดันที่มากเกินไปในการบรรจุสารตัวอย่างทำให้เกิดการกระจายของพีคสารตัวอย่างจึงทำให้พีคมีความกว้างและสูญเสียการแยก และเมื่อใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นทำให้พีคของออกซาเลตและซีเทรตสูงขึ้น อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการบรรจุสารตัวอย่างที่ 30 วินาทีก็เพียงพอสำหรับการตรวจวัดออกซาเลตและซีเทรตปริมาณต่ำ ๆ ถ้าใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่างมากกว่า 30 วินาทีจะสามารถเพิ่มความสูงของพีคออกซาเลตและซีเทรตได้ดียิ่งขึ้น แต่พบว่าพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ อาจเข้ามาอยู่ใกล้กับพีคของออกซาเลตและซีเทรตมากเกินไปและอาจบดบังพีคของสารทั้งสองได้ ด้วยเหตุนี้การบรรจุสารตัวอย่างเวลา 30 วินาทีก็เพียงพอที่จะวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในระดับต่ำได้อย่างถูกต้อง และให้ค่าการแยกสำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 2.49 และ 1.65 ตามลำดับ แต่ถ้ามีปริมาณออกซาเลตและซีเทรตไม่ต่ำจนเกินไป ($\geq 20\text{ppm}$) การบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติที่เวลา 10 วินาทีก็เพียงพอที่จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างถูกต้อง

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมทั้งการแยกออกซาเลตและซีเทรตและการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ด้วยวิธีการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดันร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ออกจากระบบโดยใช้ EOF กล่าวคือ สภาวะที่เหมาะสมของ CE คือความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 200 mM pH 8.0 โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกเท่ากับ -15 kV ร่วมกับสภาวะอื่นๆของ CE คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 μm ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีสำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตปานกลางถึงสูง ($\geq 20\text{ppm}$) และใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 30 วินาทีสำหรับตัวอย่างปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตต่ำ ๆ ($\leq 20\text{ppm}$) และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่มีความยาวคลื่น 195 nm จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นพบว่า การเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเป็นเวลา 90 วินาทีได้ค่า LOD สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.003 และ 0.013 ตามลำดับ และค่า LOQ สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.013 และ 0.033 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การบรรจุสารตัวอย่างตามระยะเวลาปกติ (10 วินาที) พบว่าสามารถเพิ่มความสูงของพีคออกซาเลตและซีเทรตได้ถึงประมาณ 200 เท่า นอกจากนี้ผลการทดลองทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีที่พัฒนาขึ้นภายในวันเดียวกัน (ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ) และระหว่างวันเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน (ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ) ผลการทดสอบพบว่า

ความแม่นยำภายในวันเดียวกันของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ สำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้นเมื่อใช้การบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ (10 วินาที) พบว่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-108% สำหรับออกซาเลตและ 103-106% สำหรับซีเทรต และการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมาก (30 วินาที) พบว่าร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 98.95% สำหรับออกซาเลตและ 102.66% สำหรับซีเทรต ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

การทดสอบความเที่ยงพบว่ามีค่าความเที่ยงสูงทั้งการบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติและการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมาก ค่า %RSD < 4 สำหรับทั้งโมเกรซินโทม (t_m) และ A_{corr} และ %RSD < 5 สำหรับปริมาณที่ตรวจวัดได้ เมื่อเปรียบเทียบความเที่ยงระหว่างวันโดยทำติดต่อกัน 3 วัน ผลการทดลองพบว่า %RSD < 5 สำหรับทั้งโมเกรซินโทม (t_m) และ A_{corr} ซึ่งส่งผลให้ %RSD < 5 สำหรับความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้เช่นเดียวกับการทดสอบความภายในวันเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าเครื่องมือและวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ที่ติดต่อกันหลายวัน

การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการหาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะและการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานที่ใช้กันในปัจจุบัน (enzymatic method) พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลตที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0-20 ppm 20-40 และ

มากกว่า 40 ppm ในตัวอย่างปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ และให้ผลการตรวจวัดปริมาณเป็นที่น่าพอใจ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับค่าการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตที่ได้จากวิธีมาตรฐานโดยใช้เอนไซม์ พบว่าผลการทดลองที่ได้จากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้เมื่อนำผลการทดลองจากทั้งสองวิธีมาสร้างเป็นกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ พบว่าค่า intraclass correlation coefficient สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.977 และ 0.970 ตามลำดับ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์ตามเกณฑ์ที่ดีมากเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน

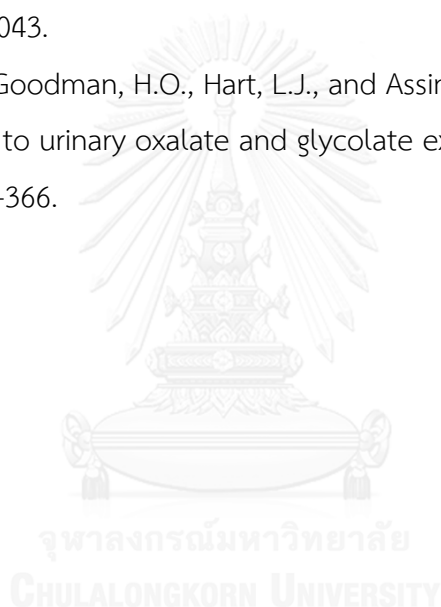
กล่าวโดยสรุปการศึกษาวิธีการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ (on-line preconcentration) และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลนั้น พบว่าวิธีเพิ่มความเข้มข้นโดยการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากและกำจัดเมทริกซ์ออกโดยใช้ EOF สามารถช่วยทำให้วิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตมีความถูกต้องน่าเชื่อถือมากขึ้น และการวิเคราะห์ด้วย CE นั้นสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เหมาะที่จะใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตเพื่อประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต และสามารถหาทางป้องกันการเกิดโรคนิ่วไตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

รายการอ้างอิง

- [1] Basavaraj, D.R., Biyani, C.S., Browning, A.J., and Cartledge, J.J. The Role of Urinary Kidney Stone Inhibitors and Promoters in the Pathogenesis of Calcium Containing Renal Stones. EAU-EBU Update Series 5(3) (2007): 126-136.
- [2] Robertson, W.G., Peacock, M., Marshall, R.W., Marshall, D.H., and Nordin, B.C. Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. New England Journal of Medicine 294(5) (1976): 249-252.
- [3] Boonla C, T.P., Tungsanga K. Kidney Stone- From Molecular Lithogenesis to Stone Prevention. Chula Med J. (2007).
- [4] Santamaria, J.R., Coll, R., and Fuentespina, E. Comparative study of two commercial enzymatic kits for determining oxalate concentrations in urine. Clinical Biochemistry 26(2) (1993): 93-96.
- [5] Hassan Khaskhali, M., Iqbal Bhangar, M., and Khand, F.D. Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 675(1) (1996): 147-151.
- [6] Holmes, R.P. Measurement of urinary oxalate and citrate by capillary electrophoresis and indirect ultraviolet absorbance. Clinical chemistry 41(9) (1995): 1297-1301.
- [7] Muñoz, J.A., López-Mesas, M., and Valiente, M. Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis. Talanta 81(1) (2010): 392-397.
- [8] García, A., Muros, M., and Barbas, C. Measurement of nephrolithiasis urinary markers by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 755(1) (2001): 287-295.
- [9] Hirokawa, T., Yoshioka, M., Okamoto, H., Timerbaev, A.R., and Blaschke, G. High-sensitivity capillary electrophoresis determination of inorganic anions in

- serum and urine using on-line preconcentration by transient isotachopheresis. Journal of Chromatography B 811(2) (2004): 165-170.
- [10] Suzuki, H., Nagata, M., Ohzono, S., and Fujimoto, C. Determination of oxalate in human serum in the nM range by on-column sample preconcentration-capillary zone electrophoresis with direct absorbance detection. Chromatographia 61(7-8) (2005): 333-337.
- [11] He, Y. and Lee, H.K. Large-volume sample stacking in acidic buffer for analysis of small organic and inorganic anions by capillary electrophoresis. Analytical chemistry 71(5) (1999): 995-1001.
- [12] Thompson, L., Veening, H., and Strein, T.G. Capillary Electrophoresis in the Undergraduate Instrumental Analysis Laboratory: Determination of Common Analgesic Formulations. Journal of chemical education 74(9) (1997): 1117.
- [13] Horáková, J., et al. Combination of large volume sample stacking and dynamic pH junction for on-line preconcentration of weak electrolytes by capillary electrophoresis in comparison with isotachopheretic techniques. Journal of Chromatography A 1155(2) (2007): 193-198.
- [14] Wu, H.-K. and Sheu, S.-J. Capillary electrophoretic determination of the constituents of *Paeoniae Radix*. Journal of Chromatography A 753(1) (1996): 139-146.
- [15] WEINBERGER, R. Practical capillary Electrophoresis. Academic press (2000).
- [16] Grossman, P.D. and Colburn, J.C. Capillary electrophoresis: Theory and practice. Academic Press, 1992.
- [17] Quirino, J.P. and Terabe, S. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A 902(1) (2000): 119-135.
- [18] Albert, M., Debusschere, L., Demesmay, C., and Rocca, J. Large-volume stacking for quantitative analysis of anions in capillary electrophoresis I. Large-volume stacking with polarity switching. Journal of Chromatography A 757(1) (1997): 281-289.
- [19] Kohlbecker, G. and Butz, M. Direct spectrophotometric determination of serum and urinary oxalate with oxalate oxidase. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 19(11) (1981): 1103-1106.

- [20] Sriboonlue, P., Prasongwatana, V., Chata, K., and Tungsanga, K. Prevalence of Upper Urinary Tract Stone Disease in a Rural Community of North-eastern Thailand. British journal of urology 69(3) (1992): 240-244.
- [21] ใช้เทียมวงศ์, ศ. เคมีวิเคราะห์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพมหานคร, 2546.
- [22] Taverniers, I., De Loose, M., and Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. TrAC Trends in Analytical Chemistry 23(8) (2004): 535-552.
- [23] Siener, R., Ebert, D., Nicolay, C., and Hesse, A. Dietary risk factors for hyperoxaluria in calcium oxalate stone formers. Kidney international 63(3) (2003): 1037-1043.
- [24] Holmes, R.P., Goodman, H.O., Hart, L.J., and Assimos, D.G. Relationship of protein intake to urinary oxalate and glycolate excretion. Kidney international 44 (1993): 366-366.



ภาคผนวก

1. เตรียมคัพพิลลารีให้พร้อมใช้งาน (capillary condition) ก่อนการทดลอง

ก่อนนำคอลัมน์ใหม่หรือคอลัมน์ที่ไม่ได้ใช้งานเป็นเวลานานมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis (CE) ต้อง rinse ด้วยสารละลายดังต่อไปนี้

- rinse ด้วย Methanol เป็นเวลา 30 นาที
- rinse ด้วย 1 M NaOH เป็นเวลา 30 นาที
- rinse ด้วย 0.1 M NaOH เป็นเวลา 30 นาที
- rinse ด้วย Milli-Q เป็นเวลา 30 นาที
- rinse ด้วย 0.1 M H_3PO_4 เป็นเวลา 30 นาที
- rinse ด้วย Milli-Q เป็นเวลา 30 นาที

2. การเตรียมสารละลายเพื่อวัดปริมาณออกซาเลตโดยใช้ชุดตรวจวัดออกซาเลต (oxalate kit)

- Reagent A 1 ขวดละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10 mL (ใช้ทดสอบได้จำนวน 20 ตัวอย่าง)

- Reagent B 1 ขวดละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 2 mL (ใช้ทดสอบได้จำนวน 40 ตัวอย่าง)

3. การเตรียมสารละลายเพื่อวัดปริมาณซิเตรตโดยใช้ชุดตรวจวัดซิเตรต (citrate kit)

- NADH/PVP 1 ขวดละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 16 mL (ใช้ทดสอบได้จำนวน 30 ตัวอย่าง)

- Citrate lyase 1 ขวดละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 0.55 mL (ใช้ทดสอบได้จำนวน 2 ตัวอย่าง)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวชนิษฐา คนหาญ
(ภาษาอังกฤษ) Miss Kanittha Konhan

วัน เดือน ปีเกิด 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2526

โทรศัพท์ 083-1357546

E-mail Tudtoo_2015@hotmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 87/152 ซ.อ่อนนุช 21/1 แขวงสวนหลวง
เขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร 10250

ประวัติการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยรามคำแหง