

การพัฒนาระบบการไหลอัตโนมัติร่วมกับอุปกรณ์วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสารละลาย เพื่อวิเคราะห์ยูเรียในปัสสาวะ*

Development of an automatic flow based system with contactless conductivity detector for determination of urea in urine

เกณิกา คชสารทอง (Kenika Khotchasanthong)**

สุภัทรา ปลาอ่อน (Supatha Pla-On)**

รัศมี ชัยสุขสันต์ (Rasamee Chaisuksant)**

ดวงใจ นาคะปรีชา (Duangjai Nacapricha)***

สมุนมาลย์ จันทร์เอี่ยม (Sumonmarn Chaneam)****

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เสนอวิธีใหม่เพื่อตรวจวัดยูเรียโดยใช้ระบบวิเคราะห์การไหลอัตโนมัติชนิดโพลาไรซ์ โดยสารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าสู่กระแสตัวให้ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ระหว่างไกลซีนกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ พีเอช 8.8 และถูกส่งผ่านยูรีเอสคอลลัมน์เกิดเป็นแก๊สแอมโมเนียแล้วไหลเข้าสู่อุปกรณ์แก๊สดีฟิวชันไปละลายเป็นแอมโมเนียมไอออนอยู่ในกระแสตัวรับซึ่งเป็นน้ำปราศจากไอออน ทำให้ค่าการนำไฟฟ้าของกระแสตัวรับเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของยูเรียในตัวอย่าง ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยอุปกรณ์วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสารละลายที่ประดิษฐ์ขึ้นในห้องปฏิบัติการ เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมพบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับวิเคราะห์ยูเรียอยู่ในช่วง 1.0-5.0 มิลลิโมลาร์ (สัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง 0.9903) และวิเคราะห์ได้เร็ว 19 ตัวอย่างต่อชั่วโมง อีกทั้งมีความเที่ยงในการวิเคราะห์สูง โดยมีค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.12

* เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย

** ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Mueang, Nakhon Pathom, 73000, Thailand

*** ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST labs.), Thailand

ภาควิชาเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Phayathai, Ratchathewi, Bangkok 10400

**** ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST labs.), Thailand

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Mueang, Nakhon Pathom, 73000,

ThailandCorresponding author: Sumonmarn Chaneam, email: schaneam@gmail.com

(วิเคราะห์จากสารละลายยูเรียเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ จำนวน 10 ครั้ง) วิธีที่พัฒนาขึ้นในงานนี้นำไปใช้จริงเพื่อวิเคราะห์ยูเรียในปัสสาวะ พบว่ามีค่าการวิเคราะห์ที่ได้กลับคืนอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้ทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก และเนื่องจากข้อผิดพลาดของอุปกรณ์ตรวจวัดไม่ได้สัมผัสสารละลาย จึงช่วยแก้ปัญหาการปนเปื้อนที่ผิวหน้าขั้ว และลดการสึกกร่อนของขั้วได้

Abstract

This work presents a new method for determination of urea by using an effective flow injection analysis (FIA) system. Sample solution was injected and propelled through a urease column by means of a donor stream of glycine-NaOH buffer pH 8.80. Urea was hydrolyzed by urease in the column to produce $\text{NH}_3(\text{g})$. Using a gas diffusion unit (GD), the generated $\text{NH}_3(\text{g})$ in a donor stream was separated and trapped into an acceptor stream of deionized water as $\text{NH}_4^+(\text{aq})$ form. Changing of conductivity related to the concentration of urea in sample was monitored using an in-house contactless conductivity detector. At the optimum condition, the GD-FIA system shows linear range of 1.0-5.0 mM ($R^2=0.9903$) with throughput of 19 sample/h. High precision of 2.12 %RSD (2.0 mM, n=10) was achieved. This method was successfully applied to analysis of human urine samples and good recovery was obtained. Advantages of our developed method are rapid, simple and low cost. Using the contactless conductivity detector, the problem of electrode corrosion and electrode fouling are resolved.

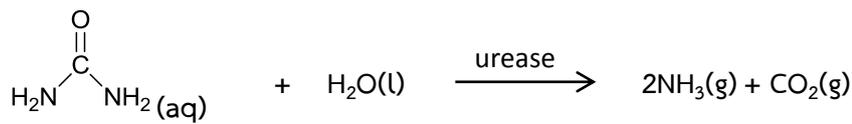
1. บทนำ

ไตเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญไม่ต่างจากส่วนอื่นๆ หากเกิดความผิดปกติขึ้นก็จะส่งผลต่อการทำงานของระบบอื่นตามไปด้วย หน้าที่ของไตคือปรับสมดุลน้ำในร่างกาย ปรับสมดุลเกลือแร่และกรดต่าง สร้างฮอร์โมนหลายชนิด และที่สำคัญคือกำจัดของเสียออกจากร่างกายในรูปปัสสาวะ ยูเรีย (urea) เป็นสารชนิดหนึ่งที่ถูกขับออกมาทางปัสสาวะด้วยเช่นกัน โดยในปัสสาวะ 1 เดซิลิตรจะมียูเรียประมาณ 1500 มิลลิกรัม ปัจจุบันมีรายงานว่าในทุกๆ 1000 คน จะพบผู้ป่วยโรคไต 1 คน และเราต้องเสียงบประมาณถึง 2% ไปกับการรักษาโรคนี้ (Mallick and Gokal, 1999: 737-742) ในผู้ป่วยโรคไต (Uremic patient) พบว่าจะมียูเรียคั่งในร่างกายมาก มีการสะสมและไม่สามารถถูกขับออกจากร่างกายได้เนื่องจากไตไม่ทำงาน ดังนั้นปริมาณยูเรียจึงเป็นพารามิเตอร์เบื้องต้นที่สำคัญในการบอกความรุนแรงของการดำเนินโรคไตวาย (Chronic renal failure, CRF) ปัจจุบันพบว่าวิธีที่ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง แม่นยำ และทำได้ง่าย ยังคงเป็นที่ต้องการในทางการแพทย์อย่างมาก (Koncki, 2008: 304-314)

การวิเคราะห์ยูเรียทำได้โดยวิธีตรงโดยอาศัยปฏิกิริยา condensation กับ diacetyl monoxime ในสภาวะกรดเข้มข้นและร้อนเกิดเป็นสารประกอบ diazine มีสีชมพู ติดตามได้ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี วิธีนี้มีความเที่ยงและความถูกต้องอยู่ในระดับดี แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ ช่วงความเป็นเส้นตรงแคบ หากยูเรียใน

ตัวอย่างมีปริมาณมากจะต้องเพิ่มขึ้นขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างด้วย นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นที่มีรายงานไว้เพื่อหาปริมาณยูเรีย เช่น FTIR (Eddy and Arnold, 2001: 1279-1286; Eddy, Flannigan, and Arnold, 2003: 1230-1235; Olsenberg, Arnold, and Flannigan, 2004: 175-181) การวัดแสงแบบ chemiluminescence โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของยูเรีย (Lewis *et al.*, 2002: 131-139) และเพื่อเพิ่มความจำเพาะให้กับการวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย มีรายงานการนำเอนไซม์ยูรีเอส (urease) มาใช้ร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเรียกยูรีเอสไบโอเซนเซอร์แล้วตรวจวัดด้วยหลักการต่างๆ เช่น หลักการวัดนำไฟฟ้า (conductivity) (Calzavara *et al.*, 1998: 147-150; Chiari *et al.*, 1998: 526-534; Ciana and Caputo, 1996: 1079-1085) หลักการโพเทนชิโอเมตรี (potentiometry) (Canaud *et al.*, 1998: 184-190; Chauveau *et al.*, 1996: 1568-1573) และการใช้ไอเล็กโตรดแบบจำเพาะ ไม่ว่าจะเป็น ion selective electrode, ISE (Koncki, Radomska, and Glab, 2000: 13-17) หรือ พีเอซีไอเล็กโตรด (pH electrode) (Koncki, Chudzik, and Walcerz, 1999: 51-57) อย่างไรก็ตาม มีรายงานข้อจำกัดของการใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่กล่าวมานี้ เช่น ถูกรบกวนจากโมเลกุลหรือไอออนอื่น ซึ่งอาจต้องทำการกำจัดความผิดพลาดเนื่องจากตัวรบกวนนี้ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (mathematic correction) หรือใช้ pseudo-reference electrode หรือต้องตรึงเอนไซม์ที่จำเพาะหลายขั้นตอน ซึ่งเพิ่มความยุ่งยากให้กับการวิเคราะห์ นอกจากนี้ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในทุกเทคนิคที่กล่าวมาเป็นลักษณะ contact electrode นั่นคือผิวหน้าขั้วมีการสัมผัสกับสารละลายที่ต้องการวัดอยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดการปนเปื้อนที่ผิวหน้าขั้ว ต้องมีขั้นตอนการทำความสะอาดขั้วอย่างสม่ำเสมอ ส่งผลต่อความเที่ยงของการวิเคราะห์ (precision) และสุดท้ายทำให้อายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้านี้สั้นลงนั่นเอง นอกจากนี้เพื่อให้วิธีการวิเคราะห์มีความเป็นอัตโนมัติและรวดเร็วมากขึ้น จึงมีการพัฒนาระบบการไหลเพื่อวิเคราะห์ยูเรีย เช่น การใช้ระบบการไหลชนิดโฟลอินเจกชัน (flow injection analysis, FIA) เพื่อวิเคราะห์ยูเรียในซีรัม (Warakorn Limbut *et al.*, 2004: 813-821) หรือการใช้ระบบการไหลชนิดเอ็มซีเอฟเอ (multicommutation flow analysis, MCFA) วิเคราะห์ยูเรียในตัวอย่างที่ได้รับการฟอกโลหิตด้วยเครื่องล้างไตเทียม (Michalec *et al.*, 2016: 563-569) อย่างไรก็ตาม ส่วนตรวจวัดของระบบการไหลที่กล่าวมายังคงเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือวัดด้วยขั้วไฟฟ้าแบบสัมผัสสารละลาย ซึ่งมีข้อจำกัดดังที่กล่าวมาก่อนหน้านี้แล้ว

งานวิจัยนี้จึงพัฒนาระบบอัตโนมัติเพื่อวิเคราะห์ยูเรียในปัสสาวะ อาศัยเทคนิคการไหลแบบอัตโนมัติชนิดโฟลอินเจกชัน โดยยูเรียในตัวอย่างจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสกับเอนไซม์ยูรีเอสเกิดเป็นแก๊สแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ดังปฏิกิริยาในรูปที่ 1 ส่งผลให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่เป็นเบส (ค่าพีเอชประมาณ 9.3) (Glab, Koncki, and Hulanicki, 1992: 1675-1678) ทำให้แก๊สแอมโมเนียแพร่ผ่านเมมเบรนแบบไม่มีขั้วภายใน gas diffusion unit (GD) และตรวจวัดสัญญาณโดยใช้อุปกรณ์วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสกับสารละลาย (contactless conductivity detector) ซึ่งประดิษฐ์ขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกลง และมีความเที่ยงสูงเนื่องจากขั้วไฟฟ้าปราศจากการปนเปื้อนจากสารเคมี และลดการสึกกร่อนของขั้วไฟฟ้าได้อีกด้วย



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของยูเรียด้วยเอนไซม์ยูรีเอส

2. การทดลอง

2.1 สารเคมีและสารละลาย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical grade) และสารละลายทุกชนิดเตรียมในน้ำปราศจากไอออน สารมาตรฐานยูเรียเข้มข้น 50.0 mM เตรียมโดยชั่งยูเรีย (Merck, Germany) 0.0750 กรัม ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 และ 5.00 mM เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน สารละลายตัวพา (carrier solution) คือ บัฟเฟอร์ของ 0.05 M glycine-NaOH เตรียมโดยชั่ง glycine (UNIVAR, USA) 3.23 กรัม ผสมกับ NaOH (Carlo Erba, France) 0.27 g ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 mL จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 8.8 (pH meter, Mettler Toledo, USA)

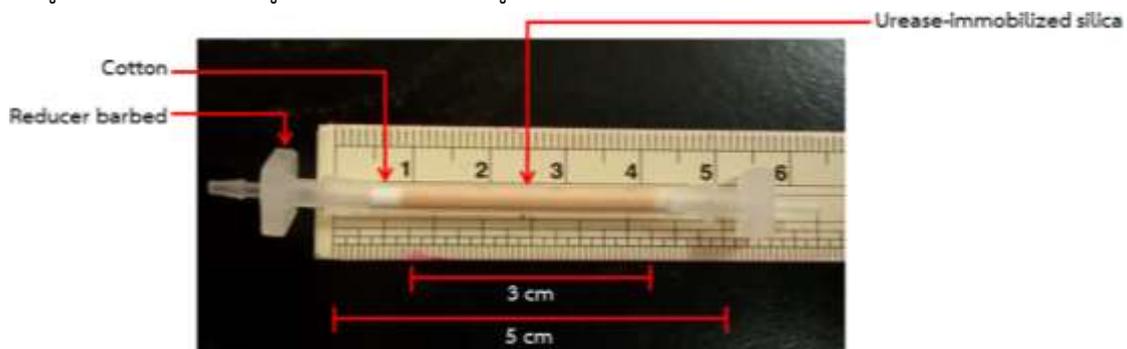
2.2 การสุ่มตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะแบบสุ่มจากอาสาสมัครซึ่งมีสุขภาพปกติ โดยขั้นแรกทำความสะอาดอวัยวะขับถ่ายปัสสาวะด้วยน้ำสะอาด ต่อมาถ่ายปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อนและเก็บปัสสาวะเฉพาะช่วงกลาง จากนั้นเปิดปัสสาวะตัวอย่าง 100.00 μL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดปริมาตร 10.00 mL แล้วนำไปวิเคราะห์ทันที

2.3 ยูรีเอสคอลัมน์ (urease column)

เนื่องจากเอนไซม์ยูรีเอสมีราคาแพงและเสื่อมสภาพได้ง่าย งานวิจัยนี้จึงนำเอนไซม์ดังกล่าวมาตรึงไว้บนวัสดุซับพอร์ตคือซิลิกาเจล แล้วบรรจุลงในท่อพลาสติกขนาดเล็กเรียกว่า “ยูรีเอสคอลัมน์” โดยวิธีการสร้างคอลัมน์มีการปรับเปลี่ยนบางส่วนจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Warakorn Limbut *et al.*, 2004: 813-821) ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก อธิบายอย่างคร่าวๆ คือ ขั้นที่ 1 ทำความสะอาดซิลิกาเจล โดยนำซิลิกาเจล (grade 90 %, particle size 40-63 μm , pore size 60 \AA , SiliCycle Inc., Canada) ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อกำจัดความชื้นและสารอินทรีย์ต่างๆ จากนั้นนำมาต้มในกรดไนตริกเข้มข้น 5% (w/v) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที เพื่อกำจัดสิ่งตกค้างอื่นๆ กรองและล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสตลอดคืน ขั้นตอนที่ 2 เป็นการสร้างอนุพันธ์ alkylamine บนผิวของซิลิกาเจล ด้วย 10%(v/v) 3-aminopropyl-triethoxysilane (reagent grade, Sigma-Aldrich, USA) ขั้นตอนที่ 3 คือตรึงเอนไซม์ยูรีเอส โดยนำ alkylaminesilica gel แขนในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M sodium phosphate pH 7.0 ที่มี 5% (v/v) glutaraldehyde (Grade 1, Sigma-Aldrich, USA) ประมาณ 90 นาที แล้วเติม urease 620 units (EC 3.5.1.5: from *Canavalia ensiformis*, 399.8 U/mg, Merck, Germany) แขน

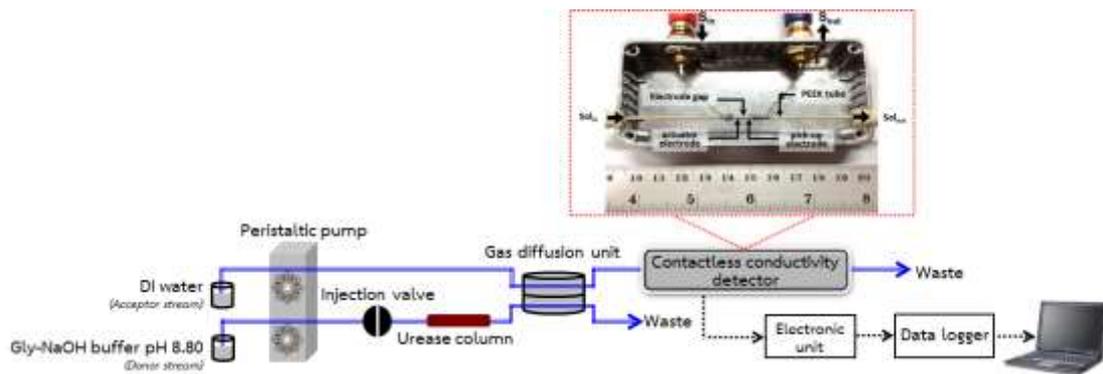
ทิ้งไว้ประมาณ 5 ชั่วโมง ล้างให้สะอาด กรอง และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และขั้นตอนสุดท้าย นำซิลิกาที่ตรึงเอนไซม์ยูรีเอสเรียบร้อยแล้วประมาณ 0.14 กรัม บรรจุลงในท่อ tygon ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.54 mm ความยาว 50 mm ปิดด้านหัวท้ายด้วยสำลีและใส่ reducer barbed เพื่อใช้เชื่อมต่อกับระบบการไหล FIA เมื่อไม่ได้ใช้งานให้เก็บคอลัมน์นี้ไว้ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่มี 0.02% sodium azide ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยูรีเอสคอลัมน์แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2. ยูรีเอสคอลัมน์ที่สร้างในงานวิจัยนี้

2.4 ระบบวิเคราะห์อัตโนมัติแบบไหลต่อเนื่องร่วมกับอุปกรณ์คัดเลือกแก๊ส (GD-FIA)

เพื่อให้การวิเคราะห์ยูเรียทำได้อัตโนมัติและรวดเร็ว ในการทดลองนี้จึงใช้ระบบการไหลแบบต่อเนื่องหรือ FIA ร่วมกับส่วนคัดเลือกแก๊ส gas diffusion unit (GD) และเรียกระบบนี้ว่า “GD-FIA” แสดงระบบอย่างง่ายในรูปที่ 3 ระบบ GD-FIA นี้ประกอบด้วยปั๊มลูกกริด (peristaltic pump, Ismatec REGLO Analog 4-Ch Var-Speed pump, Switzerland) ทำหน้าที่ขับเคลื่อนสารละลาย เมื่อฉีดสารละลายตัวอย่างผ่านวาล์ว (injection valve, V-540, Upchurch Scientific®, USA) เข้าสู่กระแสตัวให้ (donor stream) ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ 0.05 M glycine-NaOH pH 8.80 ยูเรียในตัวอย่างจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสกับเอนไซม์ยูรีเอสภายในยูรีเอสคอลัมน์ (urease column) เมื่อไหลเข้าสู่อุปกรณ์ GD แก๊สแอมโมเนียจะแพร่ผ่านเมมเบรน PTFE (47 mm i.d. with pore size 0.45 μm , Sartorius, Germany) แล้วละลายในกระแสตัวรับ (acceptor stream) ซึ่งเป็นน้ำปราศจากไอออนได้เป็นแอมโมเนียมไอออน ทำให้ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยอุปกรณ์วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสารละลาย (contactless conductivity detector) บันทึกสัญญาณตลอดเวลาด้วย data logger (ADC-10, Pico Technology, UK) และแสดงผลผ่านหน้าจอคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม PicoLog Recorder ทั้งนี้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของยูเรียสามารถทำปฏิกิริยาสะเทินกับแอมโมเนียได้ (รูปที่ 1) ไม่ส่งผลกระทบต่อค่าการนำไฟฟ้าอันเนื่องมาจากแก๊สแอมโมเนีย



รูปที่ 3 แผนภาพจำลองระบบการไหล GD-FIA สำหรับวิเคราะห์ยูเรียในปัสสาวะ

2.5 อุปกรณ์วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสารละลาย (contactless conductivity detector)

ในงานวิจัยนี้ติดตามสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยอุปกรณ์วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสารละลายที่สร้างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ขั้วไฟฟ้าทำได้โดยวิธีเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้า (Kamonthip Sereenonchai *et al.*, 2010: 1040–1044; Saowapak Teerasong *et al.*, 2010: 47–53) โดยเคลือบโลหะเงิน (silver varnish, Chemtronics®, USA) ยาว 2.0 cm บนท่อฉนวนพอลิเมอร์ที่สารละลายไหลผ่าน (Polyether ether ketone, PEEK, 1 mm ID, 1/16" OD) แล้วใช้ตัดเตอร์ควั่นตรงกลาง จะได้ขั้วไฟฟ้ายาว 1.0 cm จำนวน 2 ขั้ว ที่แยกออกจากกัน และขั้วไฟฟ้าทั้งสองไม่สัมผัสกับสารละลายภายในท่อนั้น ขั้วไฟฟ้างัดกล่าวทำหน้าที่เป็นขั้วกระตุ้น (actuator electrode) ซึ่งต่อกับแหล่งจ่ายไฟฟ้ากระแสสลับ (100 kHz, 20 Vpp) และขั้วรับสัญญาณ (pick-up electrode) ซึ่งต่อกับกล่องควบคุมไฟฟ้า (Bangkok HighLab Co., Ltd., Thailand) ประกอบด้วยวงจรขยายสัญญาณ (amplifier) วงจรแปลงสัญญาณ (rectifier) และเปลี่ยนสัญญาณออกมาเป็นค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (volt, V) ซึ่งในส่วนของวงจรอิเล็กทรอนิกส์นี้ได้ปรับปรุงให้เล็กลง และสามารถพกพาได้โดยมีแบตเตอรี่ขนาด 12V จ่ายไฟเพื่อเลี้ยงวงจรทั้งหมด จากนั้นต่อปลายทั้งสองข้างของ PEEK tube กับระบบ FIA ด้วยท่อซิลิโคน แล้ววางลงในกล่องโลหะ (5 cm x 10 cm x 2.5 cm) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น grounding box เพื่อลดสัญญาณรบกวนจากภายนอก อุปกรณ์นี้แสดงในรูปที่ 3 (รูปแทรก)

2.6 วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.6.1 ศึกษาชนิดของ gas diffusion unit (GD)

เนื่องจากภายใน GD เป็นบริเวณที่เกิดการแพร่ของแก๊สแอมโมเนียจากกระแสตัวให้ขึ้นมายังกระแสตัวรับการทดลองนี้จึงเปรียบเทียบผลจากการใช้ GD ต่างชนิดกันคือ ชนิดร่องตรง (straight groove, ขนาดร่อง กว้าง x ยาว x ลึก : 2.0 มม. x 10.1 มม. x 0.5 มม.) และชนิดร่องขด (spiral groove, ขนาดร่อง กว้าง x ยาว x ลึก : 2.0 มม. x 25.0 มม. x 0.5 มม.) ทำการศึกษาโดยจัดระบบ GD-FIA ดังรูปที่ 3 กำหนดอัตราเร็วในการลำเลียงสารเป็น 1.0 mL/min และปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 100 μ L ฉีดสารละลายยูเรียความเข้มข้น 1-3 mM เข้าระบบ พล็อตกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยูเรียกับสัญญาณที่ได้ แล้วเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity)

2.6.2 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการลำเลียงสาร (Flow rate)

เพื่อให้ระบบมีความไวในการวิเคราะห์สูงและวิเคราะห์ตัวอย่างได้รวดเร็ว ผู้วิจัยจึงศึกษาอัตราเร็วในการลำเลียงสารที่ดีที่สุดโดยจัดระบบการไหล GD-FIA ใช้ปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 100 μL แล้วกำหนดค่าความเร็วด้วยปั๊มลูกรีดให้ได้อัตราการไหลทั้งกระแสตัวให้และกระแสตัวรับ เท่ากับ 0.5 mL/min ฉีดสารละลายมาตรฐานยูเรียความเข้มข้น 1-3 mM วัดความสูงของสัญญาณที่ได้แล้วนำไปพล็อตกราฟมาตรฐาน จากนั้นทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนอัตราเร็วในการลำเลียงสารเป็น 1.0 และ 2.0 mL/min ตามลำดับ เปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) และจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ต่อชั่วโมง (throughput)

2.6.3 ศึกษาผลของปริมาตรสารตัวอย่าง (Injection volume)

เนื่องจากปริมาตรตัวอย่างส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์และเวลาที่ใช้วิเคราะห์ด้วยเช่นกัน ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพื่อหาปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสมในระบบการไหล GD-FIA โดยกำหนดอัตราเร็วในการไหลของสารละลายเท่ากับ 1.0 mL/min และฉีดสารละลายมาตรฐานยูเรียความเข้มข้น 1-3 mM ปริมาตร 50 μL บันทึกสัญญาณที่ได้ แล้วทำการทดลองเช่นเดิมแต่เปลี่ยนปริมาตรตัวอย่างเป็น 100, 300 และ 500 μL แล้วพล็อตกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์และจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ต่อชั่วโมง

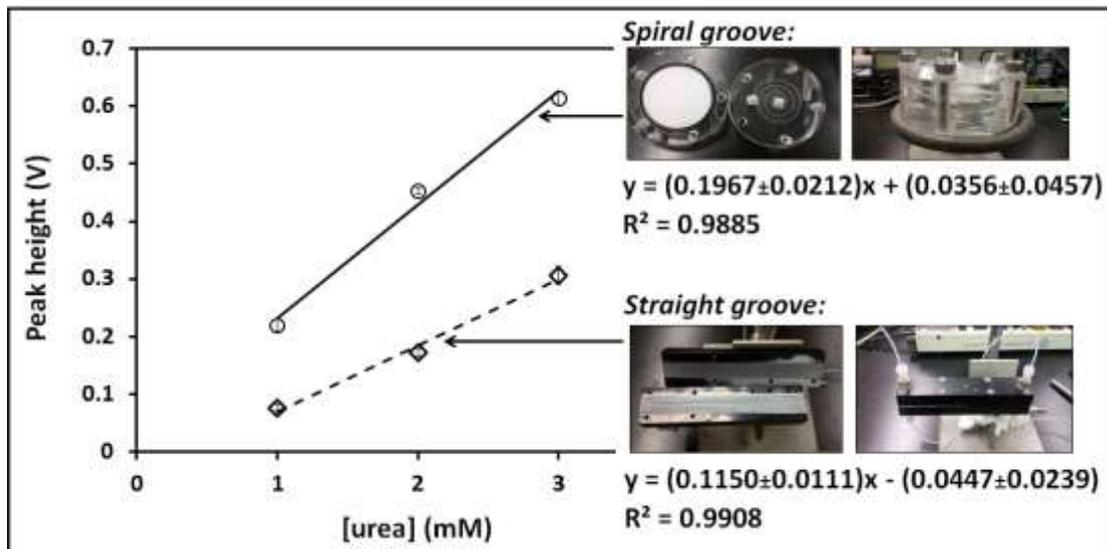
2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณยูเรียในปัสสาวะโดยใช้ระบบที่พัฒนาขึ้น

นำระบบการไหล GD-FIA ที่พัฒนาขึ้นในงานนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูเรียในปัสสาวะ โดยฉีดตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้วเข้าระบบ GD-FIA ด้วยสภาวะการทดลองที่เหมาะสม วัดค่าความสูงของสัญญาณ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของยูเรีย คำนวณความเข้มข้นแล้วรายงานในหน่วย mg/dL พร้อมรายงานค่าการวิเคราะห์กลับได้ (recovery) ของทุกตัวอย่างด้วย

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 ประสิทธิภาพของระบบการไหลเมื่อใช้อุปกรณ์ GD ต่างชนิดกัน

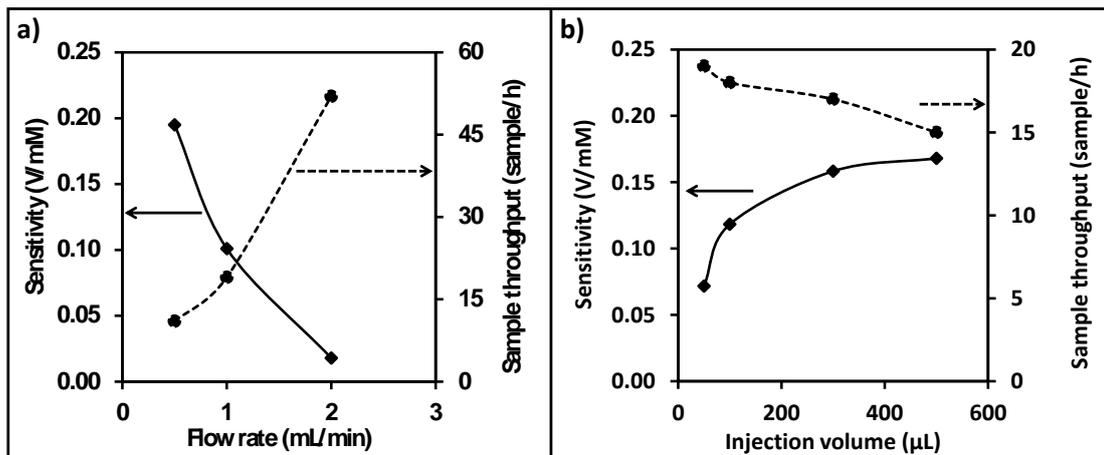
ผลการทดลองในรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ GD ชนิดร่องขด ให้ความไวในการวิเคราะห์สูงกว่าชนิดร่องตรง เนื่องจากมีพื้นที่ผิวให้แก๊สแพร่จากกระแสตัวให้ผ่านเมมเบรนไปยังกระแสตัวรับได้มากขึ้น และลักษณะของร่องที่ขดเป็นวงกลมจะช่วยให้เกิดการผสมกันดียิ่งขึ้นด้วยเช่นกัน ส่งผลให้ความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ GD ชนิดร่องขดในการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 4 ผลการศึกษา GD แบบร่องตรง (straight groove) และแบบร่องขด (spiral groove)

3.2 ผลของอัตราเร็วในการลำเลียงสาร (Flow rate)

การศึกษาผลของอัตราเร็วในการลำเลียงสารในระบบการไหล GD-FIA ให้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5 a) พบว่าเมื่อใช้อัตราเร็วเพิ่มขึ้นจาก 0.5 mL/min เป็น 1 mL/min และ 2 mL/min ความไวในการวิเคราะห์จะลดลงตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มอัตราเร็วในการลำเลียงสารจะทำให้ระยะเวลาที่สารละลายอยู่ในระบบสั้นลงจากการทดลองพบว่าอัตราการลำเลียงสารที่ดีที่สุดคือ 0.5 mL/min แต่การทดลองนี้เลือกใช้ที่ 1.0 mL/min เนื่องจากให้ความไวในการวิเคราะห์เพียงพอและใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานเกินไป



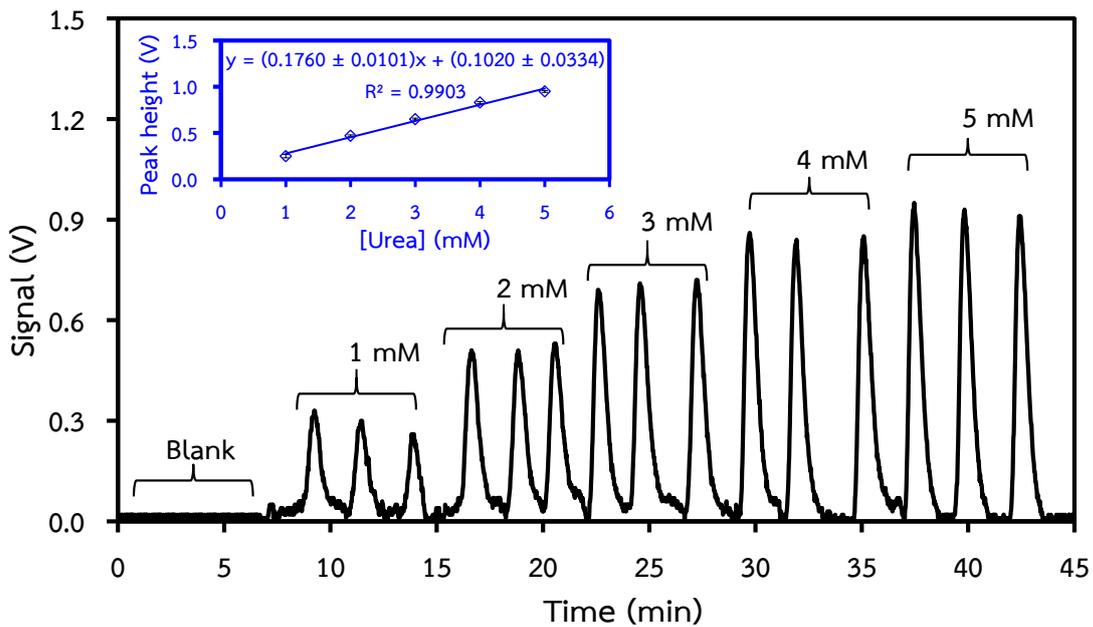
รูปที่ 5 กราฟแสดงผลของอัตราเร็วในการลำเลียงสาร (a) และ ผลของปริมาตรตัวอย่าง (b)

3.3 ผลของปริมาตรตัวอย่าง (Injection volume)

การศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานยูเรียความเข้มข้น 1-3 mM แล้วเปรียบเทียบกับ พบว่าความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้นมากเมื่อเพิ่มปริมาตรจาก 50 µL เป็น 100 µL และความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเมื่อเพิ่มปริมาตรเป็น 300 µL และ 500 µL ดังนั้นปริมาตรตัวอย่างขนาด 100 µL จึงมีความเหมาะสม เนื่องจากให้ความไวในการวิเคราะห์เพียงพอ และเวลาที่ใช้วิเคราะห์ยอมรับได้ (19 ตัวอย่างต่อชั่วโมง) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5 b)

3.4 คุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (Analytical feature)

เมื่อจัดระบบ GD-FIA โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมคือ GD ชนิดร่องขด อัตราเร็วในการลำเลียงสาร 1.0 mL/min และปริมาตรการฉีด 100 µL ศึกษาคุณลักษณะการวิเคราะห์โดยฉีดสารละลายมาตรฐานยูเรียความเข้มข้น 1-5 mM สัญญาณที่บันทึกได้แสดงในรูปที่ 6 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานยูเรียเพิ่มมากขึ้น จะเกิดแก๊สแอมโมเนียแพร่ผ่านเมมเบรนมากขึ้น ส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้าของกระแสตัวรับมากขึ้น กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยูเรียกับสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงในรูปที่ 6 (รูปแทรก) และจะได้คุณลักษณะของระบบวิเคราะห์เพื่อตรวจวัดยูเรียได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1



รูปที่ 6 สัญญาณที่ได้จากการวัดสารมาตรฐานยูเรียความเข้มข้นต่างๆ ด้วยระบบการไหล GD-FIA ร่วมกับอุปกรณ์วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสารละลายที่พัฒนาขึ้น (สภาวะที่ใช้: อัตราเร็วในการลำเลียงสาร = 1.0 mL/min, ปริมาตรสารตัวอย่าง = 100 μ L) และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดยูเรียกับความสูงของสัญญาณ (รูปแทรก)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติการวิเคราะห์ของสารละลายมาตรฐานยูเรียด้วยระบบ GD-FIA ที่พัฒนาขึ้น

คุณลักษณะ	ค่าที่ได้
สมการเส้นตรง	Peak height = $(0.1760 \pm 0.0101)[\text{NH}_4^+, \text{mM}] + (0.1020 \pm 0.0334)$ $R^2 = 0.9903$
ช่วงความเป็นเส้นตรง (mM)	1.0 - 5.0
ความเที่ยง (%RSD, 2.0 mM, n=10)	2.12
ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (3S/N, mM)	0.95
ความเร็วในการวิเคราะห์ (ตัวอย่างต่อชั่วโมง)	19

3.5 การวิเคราะห์ยูเรียในปัสสาวะ

ปริมาณยูเรียที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างปัสสาวะแสดงดังตารางที่ 2 และค่าการวิเคราะห์ได้กลับคืน (%Recovery) อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 93.8-118.2 แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถใช้วิเคราะห์ยูเรียในตัวอย่างปัสสาวะได้จริง และไม่มีมารบกวนจากสารอื่นๆ ในตัวอย่าง (sample matrix)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ยูเรียในปัสสาวะตัวอย่างโดยใช้ระบบ GD-FIA ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสารละลาย

ตัวอย่าง	Urea (mg/dl)*	%Recovery
1	2,027 ± 6.92	93.8
2	2,512 ± 4.40	118.2
3	2,043 ± 5.20	91.3
4	2,496 ± 22.82	99.3

*mean±sd จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

4.สรุปผลการทดลอง

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณยูเรียโดยระบบการไหล GD-FIA และตรวจวัดสัญญาณด้วยอุปกรณ์วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสารละลาย ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ ชนิด GD แบบร่องขด อัตราการลำเลียงสารเท่ากับ 1.0 mL/min และปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 100 µL โดยพิจารณาจากความไวในการวิเคราะห์ และจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ต่อชั่วโมง เมื่อใช้สารละลายมาตรฐานยูเรียจะได้กราฟมาตรฐาน $y = (0.1760 \pm 0.0101)x + (0.1020 \pm 0.0334)$ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9903 และช่วงความเป็นเส้นตรง 1.0-5.0 mM มีความเที่ยง

ดี และวิเคราะห์ตัวอย่างเร็วถึง 19 ตัวอย่างต่อชั่วโมง เมื่อนำระบบที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์ปัสสาวะตัวอย่าง พบว่าแต่ละตัวอย่างมีปริมาณยูเรียแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณยูเรียในปัสสาวะจะเปลี่ยนไปตามปริมาณการบริโภคอาหารในแต่ละวัน ข้อดีของงานวิจัยนี้คือการวิเคราะห์เป็นระบบปิดและเป็นอัตโนมัติ ซึ่งเหมาะต่อการวิเคราะห์แก๊สหรือสารที่ระเหยได้ ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกลงเนื่องจากใช้วิธีการตรึงเอนไซม์ยูรีเอสลงบนซิลิกาแล้วทำเป็นคอลัมน์เพื่อให้สารตัวอย่างไหลผ่าน ซึ่งยูรีเอสคอลัมน์นี้สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ต่อเนื่อง และมีอายุใช้งานได้นานถึง 1 เดือน นอกจากนี้ยังใช้อุปกรณ์ตรวจวัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเอง และเนื่องจากขั้วไฟฟ้าของอุปกรณ์นี้ไม่ได้สัมผัสสารละลาย จึงลดปัญหาการปนเปื้อน และการสึกกร่อนของขั้ว ส่งผลให้การวิเคราะห์มีความเที่ยงมากขึ้นด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับบัณฑิต พสวท. แรกบรรจุ ปีงบประมาณ 2556 (017/2557) และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อให้อุปกรณ์และสารเคมี รวมถึงสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- Calzavara, P. *et al.* (1998). "A new biosensor for continuous monitoring of the spent dialysate urea level in standard hemodialysis." **The international journal of Artificial Organs** 21, 3 (March): 147-150.
- Canaud, B. *et al.* (1998). "On-line dialysis quantification in acutely ill patients: preliminary clinical experience with a multipurpose urea sensor monitoring device." **American Society for Artificial Internal Organs** 44, 3 (May-June): 184-190.
- Chauveau, P. *et al.* (1996). "Adequacy of haemodialysis and nutrition in maintenance haemodialysis patients: clinical evaluation of a new on-line urea monitor." **Nephrology Dialysis Transplantation** 11, 8 (August): 1568-1573.
- Chiari, L. *et al.* (1998). "Model-based dialysis adequacy prediction by continuous dialysate urea monitoring." **The international journal of Artificial Organs** 21, 9 (September): 526-534.
- Ciana, Leopoldo D., and Giuseppe Caputo. (1996). "Robust, reliable biosensor for continuous monitoring of urea during dialysis." **Clinical Chemistry** 42, 7 (July): 1079-1085.
- Eddy, Christopher V., and Mark A. Arnold. (2001). "Near-infrared spectroscopy for measuring urea in hemodialysis fluids." **Clinical Chemistry** 47, 7 (July): 1279-1286.

- Eddy, Christopher V., M. Flannigan, and M.A. Arnold. (2003). "Near-infrared spectroscopic measurement of urea in dialysate samples collected during hemodialysis treatments." **Applied Spectroscopy** 57, 10 (October): 1230-1235.
- Głab, Stanislaw, Robert Koncki and Adam Hulanicki. (1992). "Kinetic model of pH-based potentiometric enzymic sensors. Part 3. Experimental verifications" *Analyst*, 117, 11 1675–1678.
- Koncki, Robert. (2008). "Analytical aspects of hemodialysis." **Trends in Analytical Chemistry** 27, 4 (April): 304-314.
- Koncki, Robert, Agnieszka Chudzik, and Izabela Walcerz. (1999). "Urea determination using pH-enzyme electrode." **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 21, 1 (October): 51–57.
- Koncki, Robert, Anna Radomska, and Stanislaw Glab. (2000). "Potentiometric determination of dialysate urea nitrogen." **Talanta** 52, 1 (May): 13-17.
- Lewis, Simon W. *et al.* (2002). "Monitoring urea levels during haemodialysis with a pulsed-flow chemiluminescence analyser." **Analytica Chimica Acta** 461, 1 (June): 131-139.
- Limbut, Warakorn *et al.* (2004). "Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver[®] for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor syste." **Biosensor and Bioelectronics** 19, 8 (April): 813-821.
- Mallick, N.M., and R. Gokal. (1999). "Haemodialysis." **Lancet** 353, 9154 (February): 737-742.
- Michalec, Michał *et al.* (2016). "Optoelectronic detectors and flow analysis systems for determination of dialysate urea nitrogen" *Sensors and Actuators B* 226 (April): 563–569.
- Olsenberg, Jonathon T., Mark A. Arnold, and Michael J. Flannigan. (2004). "Online measurement of urea concentration in spent dialysate during hemodialysis." **Clinical Chemistry** 50, 1 (January): 175-181.
- Sereenonchai, Kamonthip *et al.* (2010). "A low-cost method for determination of calcium carbonate in cement by membraneless vaporization with capacitively coupled contactless conductivity detection." **Talanta** 81, 3 (May): 1040–1044.
- Teerasong, Saowapak *et al.* (2010). "A reagent-free SIA module for monitoring of sugar, color and dissolved CO₂ content in soft drinks." **Analytica Chimica Acta** 668, 1 (May): 47–53.