

การวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้เทคนิคที่อาศัยการไหลของ
ของเหลวและตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสีย้อม
Quantitative Analysis of Urinary Albumin by Flow-Based Techniques and
Detection with Protein-Dye Binding Reaction

ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

Nathawut Choengchan

สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ มีความสำคัญต่อการวินิจฉัยอาการของผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy) เนื่องจากสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การเสื่อมของไตในระยะเริ่มแรกหรือเรียกว่า ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (Microalbuminuria) ได้ มีงานวิจัยจำนวนมากที่กล่าวถึงการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหาความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะโดยอาศัยวิธีวิเคราะห์ทั้งแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch analysis) และแบบต่อเนื่อง (Continuous analysis) โดยใช้เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลว (Flow-based techniques) ในบทความวิชาการนี้ ได้รวบรวมเฉพาะวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีวิเคราะห์ที่อาศัยเทคนิคการไหลของของเหลวที่น่าสนใจ เช่น โฟลว์อินเจกชันอะนาลิซิส (Flow injection analysis) และ ซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส (Sequential injection analysis) เป็นต้น โดยจะได้บรรยายเกี่ยวกับขั้นตอนการวิเคราะห์ เริ่มตั้งแต่การเก็บ การรักษาสภาพและการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ ก่อนนำมาวิเคราะห์โดยใช้หลักการตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสีย้อม (Protein-dye binding reaction) ในบทความนี้ได้เปรียบเทียบคุณลักษณะของวิธีที่อาศัยการไหลของของเหลวแบบต่างๆด้วย ซึ่งพบว่า คุณลักษณะที่โดดเด่นของวิธีเหล่านี้ คือ วิเคราะห์ได้รวดเร็ว และมีความเที่ยงสูง

คำสำคัญ: อัลบูมิน, ปัสสาวะ, สีย้อม, เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวภายในท่อขนาดเล็ก

E-mail: kcnathaw@kmitl.ac.th โทรศัพท์ 02-326-8400-11 ต่อ 653 โทรสาร 02-326-8428

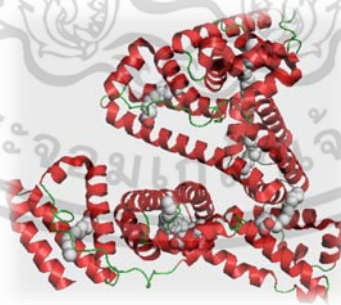
Abstract

Quantitative analysis of urinary albumin plays an important role on clinical diagnosis of renal dysfunction due to diabetic nephropathy. The albumin concentration is used as a marker for microalbuminuria. There are larger numbers of publications reported on development of the analytical methods for determination of albumin in human urine by batch analysis and continuous analysis based on flow-based techniques. In this review article, some interested analytical methods based on flow-based techniques have been presented such as flow injection analysis (FIA) and sequential injection analysis (SIA). Analytical methodology involved in urine sample collection, preparation and detection with protein-dye binding reaction is described. Comparative study on analytical characteristics of the flow-based methods is also summarized. It is found that the most remarkable characteristics of flow-based technique are high sample throughput and high precision.

Keywords: Albumin, Urine, Dye, Flow-based technique

1. อัลบูมินคืออะไร [1]

'อัลบูมิน' (Albumin) คือ โปรตีนชนิดหนึ่ง ผลิตขึ้นที่ตับ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนชนิดที่พบมากที่สุดในกระแสเลือด ซึ่งจะเรียกว่า "ซีรัมอัลบูมิน" (Serum albumin) โครงสร้างของซีรัมอัลบูมินแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. โครงสร้างของซีรัมอัลบูมิน [1]

หน้าที่ของอัลบูมิน คือ ลำเลียงฮอร์โมน กรดไขมัน และสารอาหารต่างๆ ไปกับกระแสเลือดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ อัลบูมินยังทำหน้าที่ควบคุมแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ในกระแสเลือดให้อยู่ในภาวะสมดุล ทำให้ของเหลวและของแข็งในกระแสเลือดรวมตัวอยู่ในเส้นเลือดได้ตามปกติ

2. ความสำคัญของการวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ

โดยทั่วไป จะไม่พบอัลบูมินในปัสสาวะ ยกเว้นในกรณีที่ไตทำงานผิดปกติ เช่น ในผู้ป่วยโรคไตที่มีสาเหตุจากการป่วยเป็นเบาหวานเรื้อรัง หรือที่เรียกว่า "โรคไตจากเบาหวาน" (Diabetic nephropathy) ซึ่งอัลบูมินจะหลุดผ่านช่องว่างบนผนังชั้นเบสเมมเบรน (Basement membrane) ของโกลเมอรูลัส (Glomerulus) ซึ่งเป็นหลอดเลือดฝอยภายในหน่วยไต (Nephron) ปนออกมากับปัสสาวะได้ [2] ดังนั้น ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ (Urinary albumin) จึงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การทำงานของไตได้ โดยถ้าพบปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่เก็บภายใน 24 ชั่วโมง น้อยกว่า 30 มิลลิกรัม จะถือว่าไตทำงานเป็นปกติ แต่ถ้าพบปริมาณอัลบูมินอยู่ในช่วงตั้งแต่ 30 ถึง 300 มิลลิกรัม จะจัดว่าไตทำงานผิดปกติในระยะแรก เรียกว่า "ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย" (Microalbuminuria) [3] จากข้อมูลของสำนักพัฒนาวิชาการแพथกรรมกรรมแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข [2] ระบุว่า ผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะ Microalbuminuria มีจำนวนร้อยละ 18.7 - 43.5 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด [3] ซึ่งหากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาตั้งแต่ระยะนี้ จะลดโอกาสเสี่ยงต่อภาวะไตวายเรื้อรังได้อย่างมาก แต่ถ้าไม่ได้รับการรักษา จนปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะมากกว่า 300 มิลลิกรัม ซึ่งเรียกระยะนี้ว่า "ภาวะแมโครอัลบูมินูเรีย" (Macroalbuminuria) หรือ "คลินิคัลอัลบูมินูเรีย" (Clinical albuminuria) [3] ผู้ป่วยจะเข้าสู่ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (End stage renal disease) และเสียชีวิตในที่สุด

3. ขั้นตอนการวิเคราะห์อัลบูมินในปัสสาวะด้วยเทคนิคที่อาศัยหลักการไหลของของเหลว

3.1 การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อนำไปวิเคราะห์อัลบูมิน สามารถทำได้ 3 วิธี [2] ดังต่อไปนี้

1. การเก็บแบบ 24 ชั่วโมง (24-hour urine collection) เป็นการนำปัสสาวะที่ถ่ายแต่ละครั้งในหนึ่งวัน มารวมกัน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ การเก็บตัวอย่างในลักษณะนี้ ให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) [2, 4-6] ปริมาณอัลบูมินที่วิเคราะห์ได้ จะเรียกว่า ค่าอัลบูมินในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (24-hour urinary albumin excretion, UAE) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ ไม่สะดวกต่อผู้ป่วย อีกทั้งการเก็บปัสสาวะไว้เป็นเวลานาน อาจทำให้แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ยูรีเอส (Urease)

ย่อยยูเรียในปัสสาวะกลายเป็นแอมโมเนีย ทำให้ปัสสาวะเป็นด่างมากขึ้น และทำให้สารบางอย่างตกตะกอน ซึ่งอาจรบกวนการวิเคราะห์ได้

2. การเก็บเพียงครั้งเดียว ณ เวลาใดเวลาหนึ่ง (Spot urine collection) เป็นการเก็บปัสสาวะที่ถ่ายในเวลาใดก็ได้ แล้วนำมาตรวจวัด วิธีนี้ทำได้สะดวกเพราะจะเก็บตัวอย่างเพียงครั้งเดียวเท่านั้น จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล อย่างไรก็ตาม มีข้อเสีย คืออาจให้ผลวิเคราะห์คลาดเคลื่อนเนื่องจากในแต่ละเวลา ผู้ป่วยอาจถ่ายปัสสาวะในปริมาณที่แตกต่างกัน อัลบูมินจึงถูกเจือจางไม่เท่ากัน ทั้งนี้ หากต้องการเก็บตัวอย่างปัสสาวะแบบนี้ ต้องหาปริมาณ “ครีเอตินิน” (Creatinine) ควบคู่กับการหาปริมาณอัลบูมินด้วย แล้วจึงประเมินในรูปอัตราส่วนความเข้มข้นอัลบูมินต่อครีเอตินิน (Albumin-to-creatinine ratio, ACR) ครีเอตินิน เป็นโปรตีนที่เปลี่ยนมาจาก “ครีเอติน” (Creatine) และถูกขับออกทางปัสสาวะในปริมาณที่คงที่ [7] ดังนั้น การหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่มเพียงครั้งเดียว แล้วเทียบกับปริมาณครีเอตินิน จะช่วยแก้ไขความคลาดเคลื่อนจากอิทธิพลของการเจือจางของปัสสาวะที่ไม่เท่ากันได้ จากการศึกษาของ วีระศักดิ์ และคณะ [8] ซึ่งได้เปรียบเทียบค่า ACR และ ค่า UAE ของตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 42 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีทางสถิติ คือ การวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) [9] พบว่า ค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์สอดคล้องกันเป็นอย่างดีโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) เท่ากับ 0.952

3. การเก็บปัสสาวะในช่วงเวลาเฉพาะ (Timed-urine collection) เป็นการเก็บปัสสาวะในช่วงเวลาหนึ่งๆ แต่ไม่ครบ 24 ชั่วโมง เช่น เก็บ 12 ชั่วโมง เพื่อคำนวณหาอัตราการขับอัลบูมินต่อ 1 หน่วยเวลา (Albumin excretion rate) สำหรับการเก็บปัสสาวะในช่วงเวลาเฉพาะนี้ จะมีเกณฑ์ในการประเมินความผิดปกติของไต แตกต่างไปจากการเก็บปัสสาวะในสองแบบแรก แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. เกณฑ์การวินิจฉัยความผิดปกติของไต เมื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีที่ต่างกัน [2]

เกณฑ์การวินิจฉัย	ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะ		
	เก็บแบบ 24 ชั่วโมง (มิลลิกรัม ต่อ วัน)	เก็บแบบสุ่มเพียงครั้งเดียว (ไมโครกรัม ต่อ มิลลิกรัม ครีเอตินิน)	เก็บในช่วงเวลาเฉพาะ (ไมโครกรัม ต่อ นาที)
ภาวะปกติ	< 30	< 30	< 20
ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย	30 - 299	30 - 299	20 - 199
ภาวะแมโครอัลบูมินูเรีย	> 300	> 300	> 200

3.2 การเก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะ

การเก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะมีผลต่อความเสถียรของอัลบูมิน จากการศึกษาของ Cohen และคณะ [10] พบว่า หากเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน จะไม่พบการสูญเสียของอัลบูมิน แต่หากต้องการเก็บไว้นานกว่านั้น จำเป็นต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ มีนักวิจัยจำนวนหนึ่ง [10-15] ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่เก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะ ซึ่งพบว่าหากเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จะเก็บได้นานถึง 30 สัปดาห์ [13] แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่อุณหภูมิต่ำแล้วก็ตาม อาจพบการสูญเสียของอัลบูมินได้ ถ้าความเข้มข้นของอัลบูมินน้อยกว่า 30 มิลลิกรัมต่อลิตร [12] หรือ เก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลานานกว่า 30 สัปดาห์ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของอัลบูมินจะลดลงร้อยละ 0.27 ต่อวัน [13] โดย Sorensen [16] สันนิษฐานว่า สาเหตุการสูญเสียของอัลบูมินนี้เป็นเพราะอัลบูมินถูกดูดซับบนพื้นผิวของขวดเก็บตัวอย่าง

3.3 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ

การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินด้วยเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลของของเหลว นั้นนิยมเจือจางด้วยน้ำกลั่น [17-23] อาจมีการปั่นกวน (Centrifugation) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที [17, 22] หรือ การกรอง [21, 23] ก่อน แล้วจึงนำไปเจือจางภายหลัง การเจือจางด้วยน้ำกลั่น มีข้อดีคือ ไม่ยุ่งยาก และสามารถลดการรบกวนการวิเคราะห์ เนื่องจากอิทธิพลขององค์ประกอบในตัวอย่าง (Sample matrix effect) ได้ เช่น Watta-lad และคณะ [21] พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนการเจือจางจาก 10 เท่า เป็น 100 เท่า ค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery) เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 89 เป็น ร้อยละ 101 นอกจากนี้ การเจือจางตัวอย่างปัสสาวะยังช่วยลดสัญญาณของตัวอย่างได้ ในกรณีที่ตัวอย่าง (Sample blank) ตอบสนองต่อเครื่องตรวจวัด เช่น Laiwattanapaisal และคณะ [22] พบว่า ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเบาหวานรายหนึ่ง เรืองแสงได้ จึงต้องเจือจาง เพื่อลดค่าการเรืองแสงของตัวอย่างนั้น

อย่างไรก็ตาม มีหลายงานวิจัย [24-26] ไม่ได้เจือจางตัวอย่างปัสสาวะ โดยจะฉีดตัวอย่างปริมาตร 8 ถึง 10 ไมโครลิตร ลงไปในระบบที่อาศัยการไหลของของเหลวโดยตรง ผู้วิจัยกล่าวว่า ปริมาตรที่ฉีดน้อยมาก และเกิดการเจือจางตัวอย่างในระบบการไหล ทำให้ไม่พบการรบกวนจากองค์ประกอบในตัวอย่าง โดยพบว่าค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (> ร้อยละ 83) นอกจากนี้ งานวิจัยของ Huang และคณะ [27] ไม่ได้เจือจางตัวอย่าง แต่ใช้วิธีเติมสารละลายมาตรฐาน (Standard addition calibration) ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ซึ่งวิธีนี้ทำให้อัลบูมินในตัวอย่างและในสารละลายมาตรฐานมีองค์ประกอบเหมือนกัน จึงได้รับอิทธิพลการรบกวนจากองค์ประกอบในตัวอย่างเท่าๆกัน สามารถหักล้างกันได้

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะด้วยเทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลว

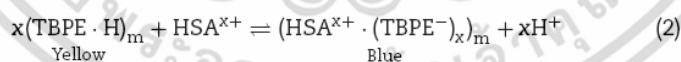
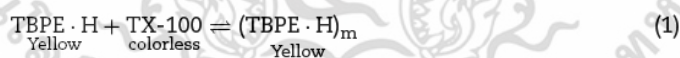
3.4.1 หลักการตรวจวัด

3.4.1.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

จากการรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่า หลักการตรวจวัดอัลบูมินด้วยเทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวที่ได้รับความนิยม คือ การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorption spectrometry) เพราะมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และเครื่องมือที่ใช้ คือ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ มีใช้มากในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากราคาไม่แพง เมื่อเทียบกับเครื่องมือตรวจวัดชนิดอื่น

โดยส่วนใหญ่ ปฏิริยาเคมีที่นักวิจัยนำมาใช้หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง คือ ปฏิริยาระหว่างอัลบูมินกับสีย้อมอินทรีย์ (Protein-dye binding reaction) ซึ่งจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงได้ในช่วงวิชิเบิล ค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของอัลบูมิน และเนื่องจากสีย้อมเหล่านี้ไม่ละลายน้ำ จึงต้องเตรียมโดยละลายด้วยแอลกอฮอล์เล็กน้อย แล้วจึงละลายด้วยน้ำ ในบางงานวิจัย ใช้สารลดแรงตึงผิว เช่น ไทรทอนเอ็กซ์-100 (Triton X-100) [17-18, 28] หรือ ไทรทอนเอ็กซ์-405 (Triton X-405) [26] หรือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) [29] ซึ่งจะช่วยให้เกิดสารละลายไมเซลล์ (Micelle solution) ส่งผลให้สีย้อมกระจายตัวและละลายได้ดีขึ้น

ตัวอย่างสีย้อมที่ใช้หาปริมาณอัลบูมิน ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง เช่น เทตระโบรโมฟีนอล์ฟทาไลน์ เอธิลเอสเทอร์ (Tetrabromophenolphthalein ethyl ester, TBPE) [17, 21, 30] ซึ่ง Sakai และคณะ [17] พบว่า อัตราส่วนจำนวน โมลของอัลบูมิน (HSA^{x+}) ที่เข้าทำปฏิริยากับ TBPE เป็น 1 ต่อ 21 และได้เสนอขั้นตอนการเกิดปฏิริยาดังสมการที่ (1) และ (2) [21]

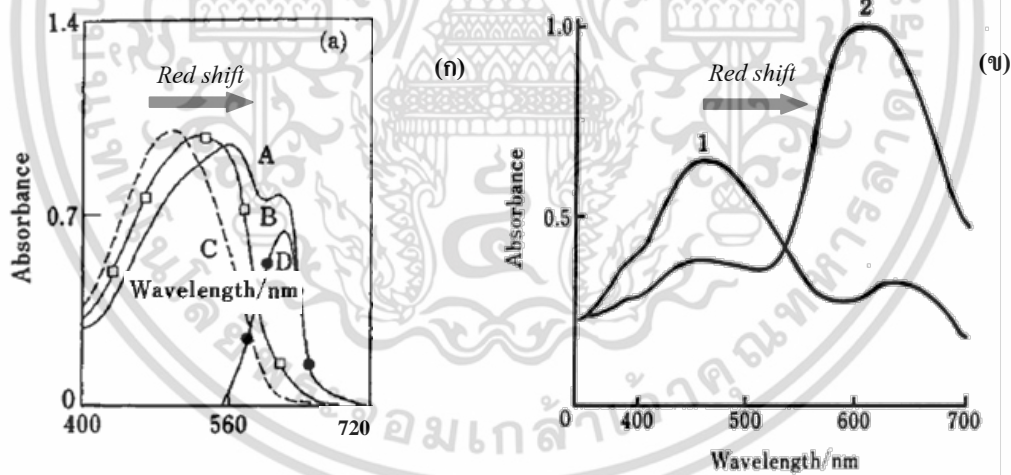


โดยที่ ()_m แสดงถึง อยู่ในสารละลายไมเซลล์ (Micelle solution)

นอกจาก TBPE แล้ว พบว่ามีการใช้สีย้อมชนิดอื่นๆ อีก เช่น เทตระโบรโมฟลูออเรสซีน (Tetrabromofluorescence) หรือ อีโอซิน วาย (Eosin Y) [23] โบรโมคลีซอลกรีน (Bromocresol green, BCG) [24] คูแมสซี บริลเลียน บลู (Coomassie brilliant blue, CBB) [31] คองโก เรด (Congo red) [32] และ เทตระโบรโมฟีนอล์ฟทาไลน์ (Tetrabromophenol blue, TBPB) [28] ซึ่งสีย้อมเหล่านี้ จะทำปฏิริยา

กับอัลบูมิน โดยตรงเช่นเดียวกับ TBPE แต่มีบางงานวิจัย ที่รายงานว่า นำโลหะไอออนไปทำปฏิกิริยากับสี
 ย้อมเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนก่อน แล้วจึงทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน หรือที่เรียกว่า “Protein-dye-
 metal ion-binding reaction” เช่น Yoshikazu และคณะ [26] ใช้ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน
 ระหว่าง แบลิลีียมไอออน (II) กับ โครเมียมซุรอล บี (Chromazural B, CAB) แล้วให้อัลบูมินเข้าทำ
 ปฏิกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนนี้ ทั้งนี้พบว่าต้องเติมเอธิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (Ethylene
 diamine tetraacetic acid, EDTA) ลงไป เพื่อป้องกันไม่ให้ไอออนของโลหะตัวอื่นๆ เกิดสารประกอบ
 เชิงซ้อนกับ CAB อย่างไรก็ตาม การเติม EDTA มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย

มีข้อสังเกตบางประการเกี่ยวกับสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสีย้อมในสภาวะที่มีและไม่มีอัลบู
 มิน กล่าวคือ สเปกตรัมของสีย้อมบางชนิด จะเกิดปรากฏการณ์บาโรโครมิกชิฟท์ (Bathochromic shift)
 หรือ เรดชิฟท์ (Red shift) หลังจากทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน เช่น CAB [26] และ CBB G-250 [31] โดยรูปที่
 2. (ก) และ (ข) แสดงการเกิดเรดชิฟท์ ของ CAB และ CBB G-250 ตามลำดับ พบว่าผู้วิจัยนิยมเลือกความ
 ยาวคลื่นที่สูงที่สุดหลังเกิดเรดชิฟท์ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เพราะเป็นช่วงที่ค่าการดูดกลืนแสง
 ของสารละลายรีเอเจนต์เบสลงก็มีค่าต่ำ



รูปที่ 2. สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ: (ก) CAB [26] โดย C; CAB ที่ไม่มีอัลบูมิน B; Be(II)-CAB A; Albumin-Be(II)-
 CAB และ D; A-B และ (ข) CBB G-250 [29] โดย 1; CBB G-250 และ 2) Albumin-CBB G-250

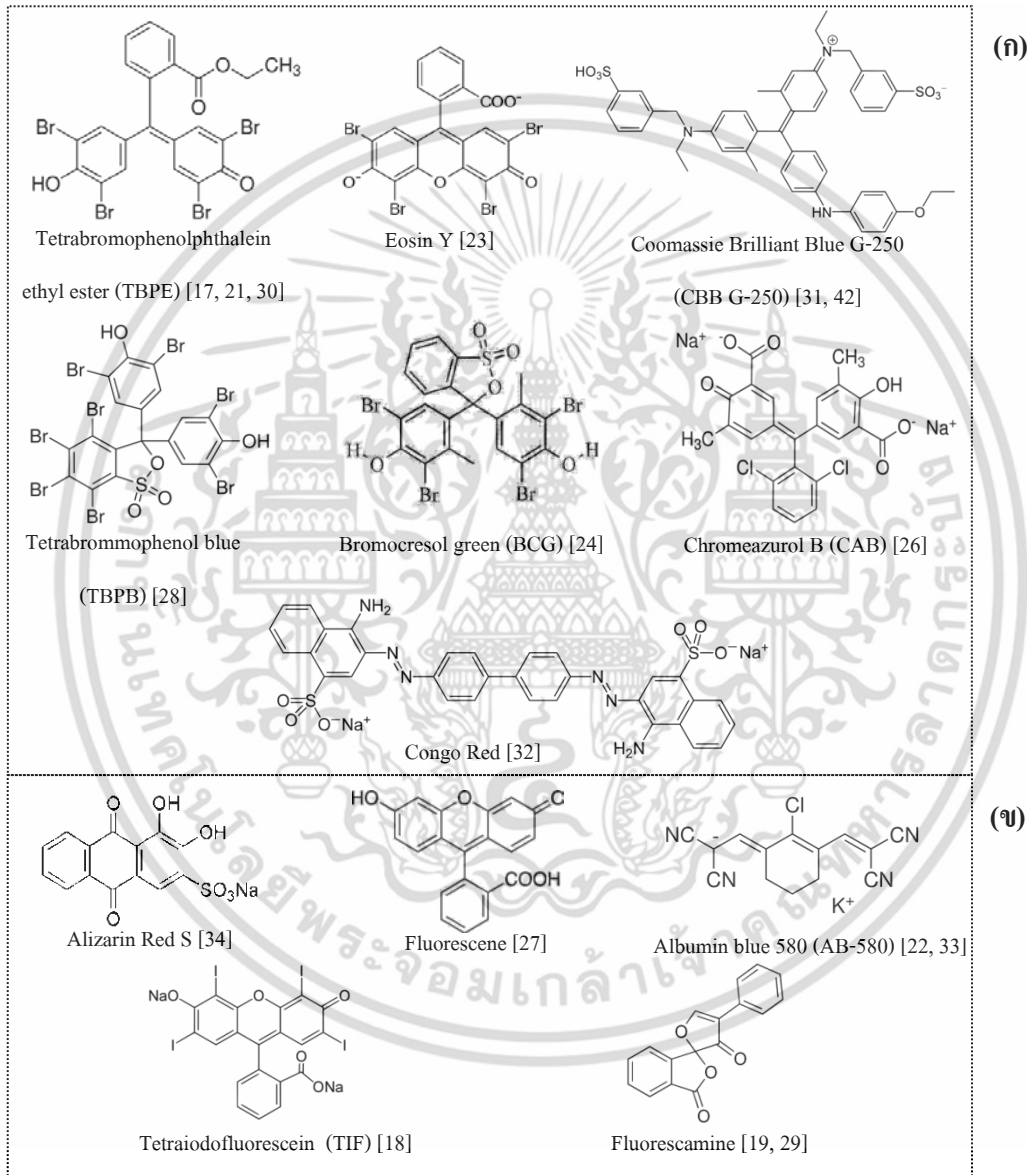
3.4.1.2 การวัดการคายแสง

หลักการตรวจวัดอัลบูมิน ที่นิยมรองลงมาจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง คือ การวัดการคายแสง (Emission spectrometry) ซึ่งมี 2 แบบ คือ วัดการเรืองแสง (Fluorescence) [18-19, 22, 33] และวัดการเปล่งแสงทางเคมี (Chemiluminescence) [27, 29, 34] ทั้งสองแบบ อาศัยปฏิกิริยาระหว่างอัลบูมินกับสีย้อมอินทรีย์ โดยความเข้มของแสงที่คายออกมา จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอัลบูมิน สำหรับงานวิจัยที่วัดการเรืองแสง พบว่า มีการวัดค่าการเรืองแสงของสีย้อมทั้งแบบที่เพิ่มขึ้น [19, 22, 33] และแบบที่ลดลง [18] เมื่อทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน ตัวอย่างของสีย้อมที่ค่าการเรืองแสงเพิ่มขึ้น เช่น ฟลูออเรสซามีน (Fluorescamine) [19] และ อัลบูมิน บลู-580 (Albumin Blue-580, AB-580) [22] ส่วนสีย้อมที่ค่าการเรืองแสงลดลง เช่น เททราไอโดฟลูออเรสซีน (Tetraiodofluorescence, TIF) [18] โดยสาเหตุที่ค่าการเรืองแสงลดลงเป็นเพราะเกิด "ปฏิกิริยาควENCHING แบบสถิต" (Static quenching reaction) [35] กล่าวคือ อัลบูมินจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสีย้อม ได้เป็นอนุพันธ์ชนิดใหม่ซึ่งไม่เรืองแสง จึงทำให้ค่าการเรืองแสงของสีย้อมลดลง

ตัวอย่างงานวิจัยที่นำสีย้อมไปทำปฏิกิริยากับอัลบูมินแล้ววัดการเปล่งแสงทางเคมี เช่น Huang และคณะ [27] ใช้ฟลูออเรสซีนทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน แล้วออกซิไดซ์ด้วยไฮโปคลอไรท์ Gamiz-Gracia และคณะ [29] ใช้ *bis* (2, 4, 6-trichlorophenyl) oxalate ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเปอร์ออกไซด์ออกซาลेट เพื่อออกซิไดซ์สารประกอบระหว่างอัลบูมินและฟลูออเรสซามีน โดยมีอิมิดาโซล (Imidazole) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในบางงานวิจัยพบว่า สารประกอบระหว่างอัลบูมินกับสีย้อม มีพฤติกรรมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เอง ดังเช่นที่ Yu และ Mou [34] พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอัลบูมิน-คอปเปอร์(II)-อะลิซารินเรด เอส (Alizarin Red S) สามารถเร่งปฏิกิริยาระหว่างลูมิโนลและไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ (Luminol-H₂O₂) ทำให้เกิดการเปล่งแสงมากขึ้น

สาเหตุที่นิยมนำสีย้อมมาใช้สำหรับหาปริมาณอัลบูมินเป็นเพราะสีย้อมเหล่านี้ดูดกลืนแสงและเรืองแสงได้ดี เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลมีวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) เป็นองค์ประกอบ และมีพันธะคู่ที่คอนจูเกตกัน (Conjugated double-bond) จำนวนมาก (ดังรูปที่ 3) ทำให้ระยะห่างของระดับ

พลังงาน (Energy gap) ของการเกิดทรานสิชันชนิดโฟโตโฟสตาบิลแคบ เมื่อโมเลกุลของสีเชื่อมถูกกระตุ้น จึงดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิซิเบิลได้ดี จึงเกิดการเรืองแสงได้ดีด้วยเช่นกัน [35]

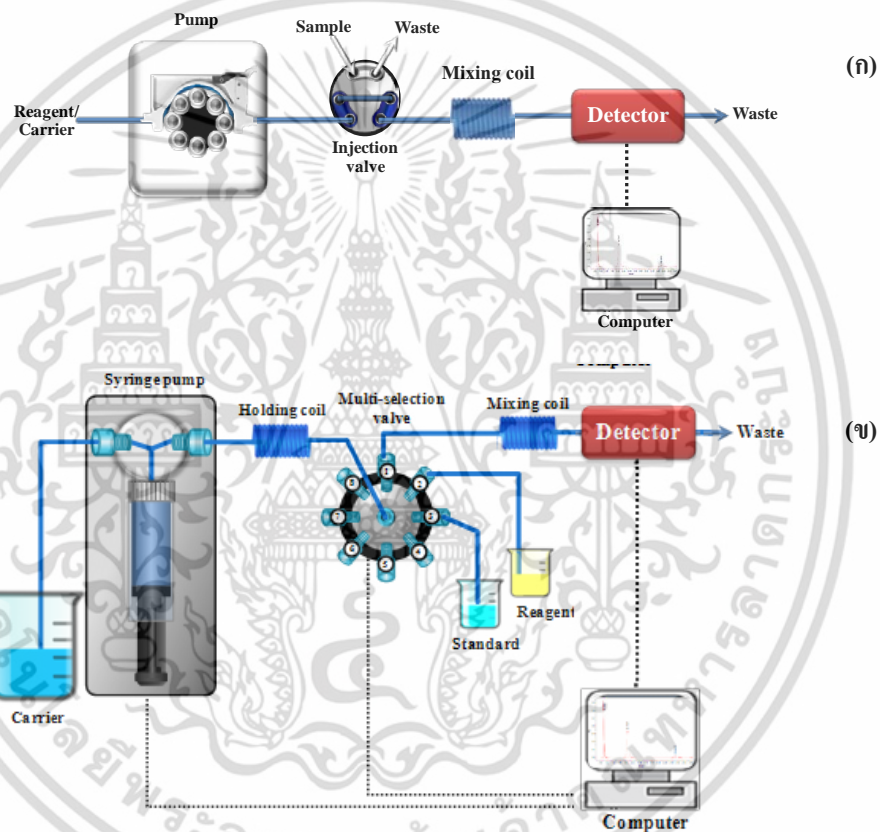


รูปที่ 3. โครงสร้างของสีอินทรีย์ที่นำมาใช้ทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน:

(ก) สี้อมที่นำไปใช้กับหลักการวัดการดูดกลืนแสง และ (ข) สี้อมที่นำไปใช้กับหลักการวัดการเรืองแสง

3.4.2 เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวที่นิยมใช้ตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะ

เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวที่ได้รับความนิยมนำมาพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ ได้แก่ เทคนิคโพลินเจกชันอะนาไลซิส (Flow injection analysis, FIA) และ เทคนิคซีควเอนเชียลโพลินเจกชันอะนาไลซิส (Sequential injection analysis, SIA) ระบบ FIA และ SIA อย่างง่าย แสดงดังรูปที่ 4 (ก) และ (ข) ตามลำดับ



รูปที่ 4. ตัวอย่างระบบอย่างง่ายของเทคนิค: (ก) FIA และ (ข) SIA

3.4.2.1 การวิเคราะห์อัลบูมินในปัสสาวะด้วยเทคนิค FIA

เทคนิค FIA จัดเป็นเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลของของเหลวรุ่นแรก ได้รับการเสนอเมื่อปี ค.ศ. 1974 โดย Ruzicka และ Hansen [36] หลักการของเทคนิคนี้ คือ มีการฉีดสารตัวอย่างปริมาตรระดับไมโครลิตรผ่านทางอินเจกชันวาล์ว (Injection valve) ลงสู่กระแสตัวพาหรือรีเอเจนต์ (Carrier/Reagent)

ก่อนตัวอย่างจะเกิดการกระจายตัวในกระแสตัวพาที่ไหลอย่างต่อเนื่องภายในท่อขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน < 1.0 มิลลิเมตร) ด้วยอัตราการไหลคงที่ ซึ่งควบคุมด้วยเพอริสตัลติกปั๊ม (Peristaltic pump) สารตัวอย่างจะผสมกับกระแสตัวพาบริเวณท่อผสม (Mixing coil) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะถูกรวบรวมด้วยเวลาคงที่เท่ากันทุกครั้ง ข้อดีของเทคนิค FIA คือ มีความเที่ยงสูง และพัฒนาให้เป็นระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติได้

จากการสืบค้นเอกสารอ้างอิง พบว่า การต่อระบบ FIA (Manifold) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ มี 3 แบบ ได้แก่ “แบบที่ 1” ระบบเส้นเดี่ยว (Single line manifold) ซึ่งทำโดยเตรียมรีเอเจนต์ทุกตัวผสมกันก่อน แล้วใช้เพอริสตัลติกปั๊มดูดสารละลายผสมผ่านปั๊มทิวบ์ (Pump tube) เพียงหนึ่งเส้น แล้วจึงฉีดสารละลายตัวอย่างลงในกระแสของรีเอเจนต์ผสม [26] “แบบที่ 2” ระบบเส้นคู่ (Double line manifold) ซึ่งจะฉีดสารตัวอย่างลงในกระแสตัวพาหรือน้ำ หรืออาจเป็นรีเอเจนต์ แล้วจึงไหลไปบรรจบกับรีเอเจนต์อีกชนิดหนึ่ง พบว่า งานวิจัยส่วนใหญ่ต่อระบบในลักษณะนี้ [17-20, 24, 31] “แบบที่ 3” ระบบสามเส้น (Tripple line manifold) ซึ่งมักพบกับระบบ FIA ที่อาศัยหลักการตรวจวัดโดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทางเคมี [27, 29] ซึ่งมีรีเอเจนต์ที่เกี่ยวข้องในการเกิดปฏิกิริยามากกว่า 2 ชนิด และไม่สามารถผสมกันก่อนดูดเข้าระบบได้เพราะจะทำให้รีเอเจนต์ไม่เสถียร

การต่อระบบ FIA ดังกล่าวข้างต้น โดยส่วนใหญ่ต่อแบบ Normal FIA (n-FIA) [36] กล่าวคือ มีการฉีดตัวอย่างลงในกระแสตัวพา/รีเอเจนต์ แต่พบว่า งานวิจัยของ Huang และคณะ [27] ต่อระบบแบบ Reversed FIA (r-FIA) [36] ซึ่งจะฉีดรีเอเจนต์ลงในกระแสของตัวอย่างปัสสาวะแทน โดยนักวิจัยกล่าวว่าเลือกวิเคราะห์ด้วยระบบ r-FIA เพราะให้ความไวในการวิเคราะห์ (Sensitivity) มากกว่าแบบ n-FIA

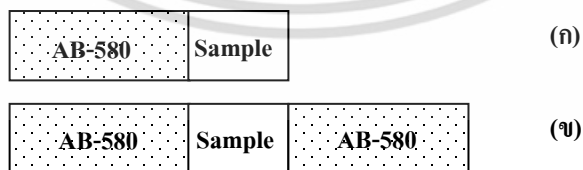
3.4.2.2 การวิเคราะห์อัลบูมินในปัสสาวะด้วยเทคนิค SIA

เทคนิค SIA จัดเป็นเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลของของเหลวรุ่นที่สอง ที่พัฒนาต่อจากเทคนิค FIA โดย Ruzicka และ Marshall ในปี ค.ศ. 1990 [37] หลักการของ SIA ยังคงเหมือนกับ FIA แต่อุปกรณ์ที่ใช้และลักษณะการลำเลียงสารละลายจะแตกต่างกัน กล่าวคือ ใช้ไซริงจ์ปั๊ม (Syringe pump) ดูดสารละลายตัวอย่างและรีเอเจนต์ ผ่านมัลติซีเล็กชันวาล์ว (Multi-selection valve) โดยจะดูดเข้ามาเป็นลำดับ มาพักไว้ที่ท่อพัก (Holding coil) แล้วผลักไปผสมกันที่ท่อผสม (Mixing coil) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์

เพื่อตรวจวัดต่อไป อุปกรณ์ที่ใช้ ถูกควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ ทำให้เทคนิค SIA เป็นวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติโดยสมบูรณ์แบบ (Fully automation)

พบว่านิยมใช้เทคนิค SIA เพื่อหาปริมาณอัลบูมินร่วมกับสารตัวอื่นๆภายในคราวเดียวกัน (Simultaneous analysis) เช่น Wata-iad และคณะ [21] เสนอระบบ SIA เพื่อใช้ตรวจวัดอัลบูมินและกลูโคสในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวาน ทั้งสองตัวแปรนี้สามารถใช้เป็นดัชนีระบุอาการและความรุนแรงของโรคไตจากเบาหวานได้ [2] ในกลุ่มวิจัยเดียวกันนี้ [23] ยังได้เสนอระบบ SIA เพื่อใช้ตรวจวัดอัลบูมินและครีอะตินินในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บเพียงครั้งเดียว ซึ่งการใช้ค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของอัลบูมินต่อครีอะตินิน จะถูกต้องมากกว่าใช้ค่าความเข้มข้นของอัลบูมินเพียงตัวเดียวสำหรับการเก็บปัสสาวะเพียงครั้งเดียว

อนึ่ง เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลของของเหลว อาจทำให้ท่อนของสารตัวอย่างผสมกับรีเอเจนต์ไม่ดี ทำให้มีความเที่ยงและความไวในการวิเคราะห์ต่ำ จึงมีความพยายามที่จะแก้ไขปัญหานี้เนื่องจากเทคนิค SIA สามารถทำ “Flow reversal” [37] ได้ โดยให้โซลินจ์ปั๊ม ผลักท่อนสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ ให้ไหลกลับไป-มา (ซ้าย-ขวา) โดยไม่ไหลเข้าเครื่องตรวจวัด เปรียบได้กับการเขย่า ซึ่งจะช่วยให้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ผสมกันได้ดีขึ้น มีนักวิจัยกลุ่มหนึ่ง [21, 23] ทำ Flow reversal แล้วพบว่า ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD (%)) น้อยลง [21] และพบอีกว่า ความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น [23] ทั้งนี้การเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ในระบบ SIA ยังสามารถทำได้อีกแนวทาง คือ ติดท่อนรีเอเจนต์ให้มาประกบกับท่อนสารตัวอย่าง หรือที่เรียกว่า “Sandwich zone” [37] ซึ่ง Laiwattanapaisal และคณะ [22] พบว่า เมื่อทำ Sandwich zone (ดังรูป 5(ข)) ความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 43 เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ทำ (รูป 5(ก)) เพราะการทำ Sandwich เป็นการเพิ่มปริมาตรรีเอเจนต์และทำให้ท่อนตัวอย่างสัมผัสกับท่อนรีเอเจนต์ได้มากขึ้นนั่นเอง



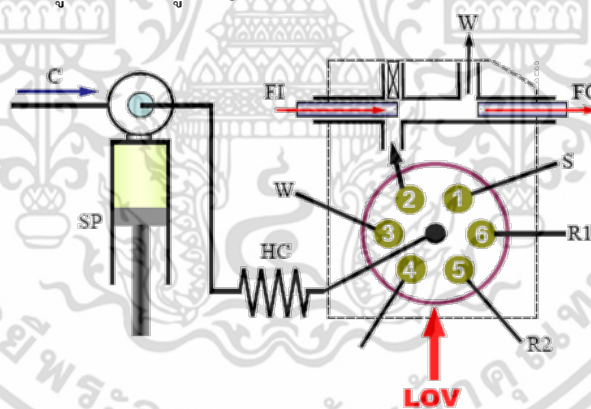
รูปที่ 5. ท่อนโซลินจ์ตัวอย่าง (Sample) และ รีเอเจนต์ (AB-580)

เมื่อ: (ก) ไม่ทำ Sandwich zone และ (ข) ทำ Sandwich zone [22]

3.4.2.3 การวิเคราะห์อัลลูมิเนียมในปัสสาวะด้วยเทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวแบบอื่นๆ

เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวแบบอื่นๆที่ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ตรวจวัดอัลลูมิเนียมในปัสสาวะ เช่น เทคนิคแลบ-ออน-วาล์ว (Lab-on-valve, LOV) [38] เทคนิคไมล์ที่เนี่ยสอินเจกชันเอฟเฟกทีฟ (Simultaneous injection effective mixing analysis, SIEMA) [39] เทคนิคครอสอินเจกชัน (Cross injection, CIA) [40] และ เทคนิคแลบ-ออน-อะ-ชิพ (Lab-on-a-chip, LOC) [41]

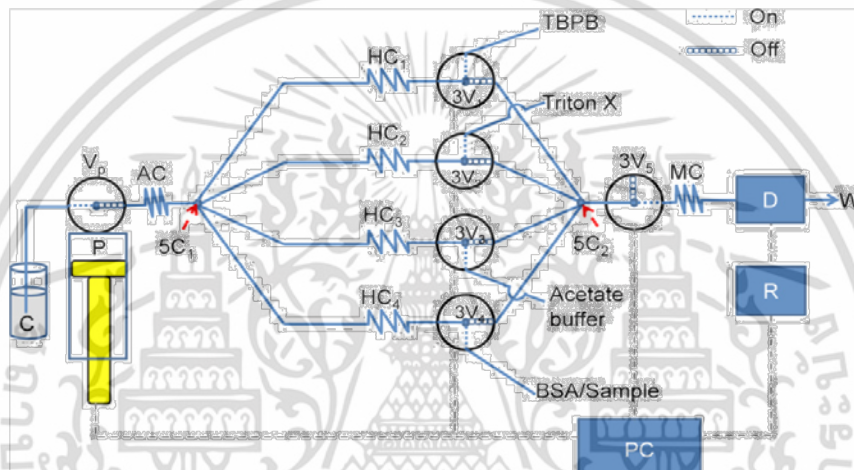
เทคนิค LOV จัดเป็นเทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวรุ่นที่ 3 ต่อจาก FIA และ SIA เทคนิค LOV มีหลักการ อุปกรณ์ที่ใช้ และการติดตั้งระบบคล้ายกับเทคนิค SIA แตกต่างกันที่เทคนิค LOV จะใช้ปริมาตรสารน้อยกว่า บางครั้งจึงอาจเรียกว่า “ไมโครเอสไอเอ” (μ -SIA) และมีหน่วยตรวจวัดติดตั้งอยู่บนไมล์ที่เนี่ยสวาล์วเลข ซึ่งหน่วยตรวจวัดที่นิยมใช้คือ ใยแก้วนำแสง (Fiber optic) งานวิจัยที่ใช้เทคนิค LOV เพื่อวิเคราะห์อัลลูมิเนียมในปัสสาวะได้แก่ งานวิจัยของ Wei และคณะ [32] โดยให้อัลลูมิเนียมทำปฏิกิริยากับคองโกเรด (Congo red) แล้วตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 496 นาโนเมตร ระบบ LOV ที่พัฒนาขึ้นเพื่อหาปริมาณอัลลูมิเนียม เป็นดังรูปที่ 6



รูปที่ 6. ระบบ LOV เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณอัลลูมิเนียมในปัสสาวะ SP: syringe pump; C: carrier; HC: holding coil (60 cm \times 0.75 mm i.d); FI: fiber inlet; FO: fiber outlet; R1: 0.9 g l⁻¹ Congo red solution; R2: 50% alcohol; S: sample solution; W: waste [32]

เทคนิค SIEMA มีนักวิจัยเสนอเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 2010 [39] โดยเทคนิคนี้ จะฉีดทั้งสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ผ่านโซลินอยด์วาล์ว (Solenoid valve) เข้าสู่ระบบพร้อมๆกัน ไม่ต้องควบคุมลำดับเข้า

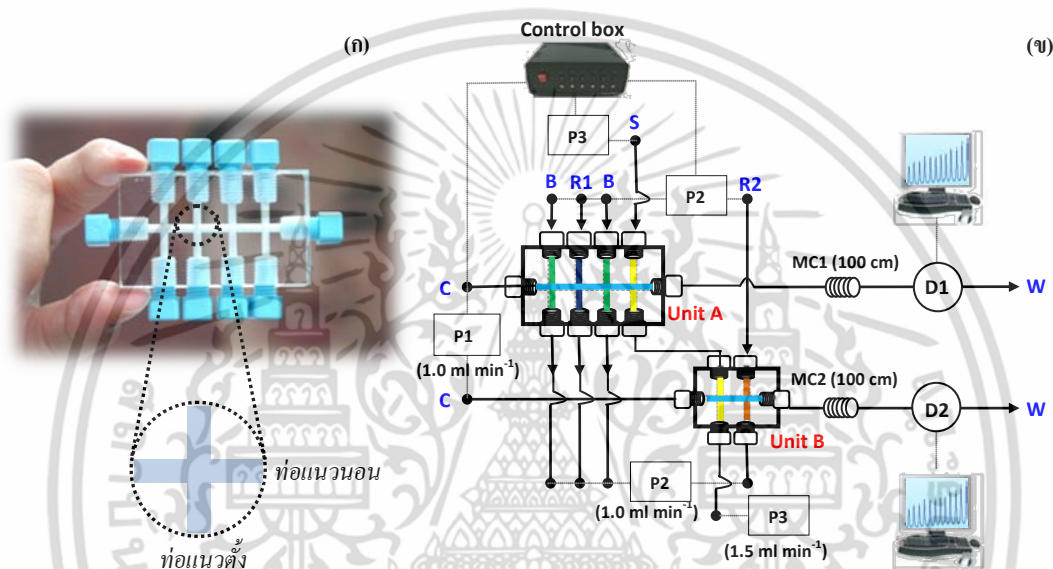
มาเป็นลำดับ เหมือนกับเทคนิค SIA ทำให้มีข้อดี คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า เทคนิคนี้ ยังช่วยให้แต่ละท่อนของสาร สามารถผสมกันได้โดยมีประสิทธิภาพอีกด้วย ในปี ค.ศ. 2012 Ratanawimarnwong และคณะ [28] ได้พัฒนาระบบ SIEMA (ดังรูปที่ 7) เพื่อตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเบาหวาน และใช้สีย้อมคือเทตระ โบรโมฟีนอล บลู (TBPB) มีผลการทดลองที่น่าสนใจ คือ จะต้องฉีดไททรอนเอ็กซ์-100 เข้าสู่ระบบด้วย เพื่อกำจัดปัญหาเส้นฐานไม่เรียบและมีการยกตัว (Baseline shift)



รูปที่ 7. ระบบ SIEMA ที่ใช้หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ C: Carrier, P: Syringe pump, V: Solenoid valve, HC: Holding coil, AC: Auxiliary coil, MC: Mixing coil, C₁C₂: Merging unit, D: Detector, R: Recorder, PC: personal computer และ W: Waste [28]

เทคนิค CIA เสนอเป็นครั้งแรกโดย Nacapricha และคณะ [40] เทคนิคนี้จะฉีดสารตัวอย่างและรีเอเจนต์เข้าสู่ระบบพร้อมๆกันเหมือนกับเทคนิค SIEMA แต่จะไม่ใช้โซลินอยด์วาล์วและไซรินจ์ปั๊ม ใช้เพียงเพอร์ริสแทททิคปั๊ม ฉีดสารละลายทั้งหมดเข้าสู่ระบบผ่านแท่งอะคิลริก ซึ่งเรียกว่า “ครอสอินเจกชันยูนิต” (Cross injection unit หรือ CIA unit) (ดังรูปที่ 8(ก)) ภายใน CIA unit จะมีท่อเล็กๆที่ถูกเจาะในแนวตั้งและแนวนอนตัดกันเป็นเครื่องหมายบวก (Cross) สารตัวอย่างและรีเอเจนต์จะถูกฉีดผ่านท่อในแนวตั้ง สารละลายตัวพาจะถูกดูดเข้ามายังท่อในแนวนอนแล้วพาสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ไหลเข้าเครื่องตรวจวัด ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ไม่ใช้วาล์ว ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์น้อยกว่า ในปี ค.ศ. 2011 Impota และ คณะ [30] ได้เสนอระบบ CIA (ดังรูปที่ 8(ข)) เพื่อหาปริมาณอัลบูมินและครีอะตินินใน

ปัสสาวะ ภายในคราวเดียวกัน ในงานวิจัยนี้ต้องใช้ CIA unit จำนวน 2 ตัว แต่ละตัวจะเชื่อมกันด้วยท่อ นำสารละลายตัวอย่าง ปฏิกริยาที่ใช้คือปฏิกริยาระหว่างอัลบูมินและเทตระโบรโมฟีนอล์ฟทาลิน เอซิด เอสเซอ์ และคณะนักวิจัยได้พัฒนากล่องควบคุม (Control box) เพื่อควบคุมการทำงานของเพอร์ริสทอลทิกปั๊มให้เป็นอัตโนมัติ



รูปที่ 8. (ก) รูปถ่าย CIA unit [40] และ (ข) แสดง ระบบ CIA เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ Unit A และ B: CIA unit ตัวที่หนึ่งและสองสำหรับตรวจวัดอัลบูมินและครีเอตินิน ตามลำดับ, P: Peristaltic pump, D: Detector, MC: Reaction coil, C: Carrier, S: Sample, B: Buffer, R1: TBPE, R2: Picric acid และ W: Waste [30]

เทคนิค Lab-on-a-chip (LOC) เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลที่ใช้ปริมาตรน้อยมากๆ (ในระดับนาโนลิตรถึงไมโครลิตร) อุปกรณ์ที่สำคัญคือ ไมโคร (หรือนาโน) ฟลูอิดิกชิพ (Micro- หรือ Nano-fluidic chip) ซึ่งต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูงในการสร้าง (Fabrication) ภายในชิพ จะมีท่อขนาดเล็กเพื่อให้สารละลายตัวอย่างและรีเอเจนต์ไหลเข้ามาผสมกัน แล้วตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนชิพนั่นเอง สำหรับการประยุกต์เทคนิค LOC เพื่อวิเคราะห์อัลบูมินในปัสสาวะ พบว่า Hofmann และคณะ [33] ได้สร้างชิพที่ทำจากพลาสติกประเภทโพลีไดเมทิลไซลอกเซน (Poly(dimethylsiloxane) หรือ PDMS) แล้วนำไปตรวจวัดอัลบูมิน อาศัยปฏิกริยากับสีย้อมคืออัลบูมิน บลู-580 (AB-580) แล้ววัดค่าการเรืองแสง ซึ่ง

คณะนักวิจัยได้เตรียมแหล่งกำเนิดแสงขึ้นเองโดยเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มบางทำจากสารอินทรีย์ (Thin-film organic light emitting diode หรือ OLED) นอกจากนี้ Nishihama และคณะ [42] ได้นำชิปไปใช้หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่ออัลบูมินทำปฏิกิริยากับ คูแมสซี บริลเลียนบลู (CBB) และเนื่องจากชิปมีขนาดเล็ก (กว้าง x ยาว: 50 x 60 มิลลิเมตร) คณะนักวิจัยจึงพิจารณาว่าสามารถพกพาไปตรวจวัดที่เตียงของผู้ป่วยในลักษณะ ที่เรียกว่า "การทดสอบแบบพอยท์-ออฟ-แคร์" (Point-of-care testing หรือ POCT) [42] ได้

4. การเปรียบเทียบคุณลักษณะของวิธีที่อาศัยการไหลของของเหลวในการวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ

คุณลักษณะของวิธีที่อาศัยการไหลของของเหลวที่ใช้วิเคราะห์อัลบูมินในปัสสาวะ ที่จะเปรียบเทียบได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Working range, WR) ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) และจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ในหนึ่งชั่วโมง (Sample throughput) ข้อมูลที่เปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 2 จากผลการเปรียบเทียบ พบว่า ระบบเหล่านี้ มีข้อดีที่เห็นได้ชัดเจนคือ คือ วิเคราะห์ได้รวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างในหนึ่งชั่วโมง และ มีความเที่ยงสูง งานวิจัยส่วนใหญ่ มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดต่ำ เพียงพอที่จะประเมินภาวะไมโครอัลบูมินูเรียซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นที่ไตเสื่อมได้

อนึ่ง มีบางงานวิจัย มีจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ในหนึ่งชั่วโมงค่อนข้างต่ำ [21, 24] ทั้งนี้เป็นเพราะ ในงานวิจัยของ Watta-iad และคณะ [21] ต้องวิเคราะห์อัลบูมินและกลูโคส ซึ่งปฏิกิริยาที่ใช้ตรวจวัดกลูโคสใช้เวลาาน ส่วนในงานวิจัยของ Korenaga และคณะ [24] ใช้อัตราการไหลต่ำ คือ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที เพราะต้องการเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างอัลบูมินกับสีย้อม

ตารางที่ 2. คุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์อัลลูมิเนียมในปัสสาวะแบบต่างๆ ที่ใช้เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวร่วมกับการตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและสีอ้อมอินทรีย์

Techniques	Organic dye ^a	Detection	WR	LOD	RSD (%)	Throughput (samples/h)	Ref.
FIA	TBPE	Absorption	0.15-12 mg/dl	0.05 mg/dl	1.2	30	[17]
FIA	TIF	Fluorescence	upto 10 mg/dl	0.6 mg/dl	0.134	60	[18]
FIA	Fluorescamine	Fluorescence	0-500 mg/l	N.R.	N.R.	30	[19]
FIA	BCG	Absorption	upto 8 µg ^b	0.3 µg ^b	0.2	7-8	[24]
FIA	CAB	Absorption	0.1-1 µg ^b	N.R.	1.38	90	[26]
FIA	Fluorescene	Chemiluminescence	0.05-21 µg/ml	0.03 µg/ml	0.8	N.R.	[27]
FIA	Fluorescamine	Chemiluminescence	N.R.	0.1 fmol ^b	N.R.	N.R.	[29]
FIA	CBB G-250	Absorption	40 ng-10 µg ^b	N.R.	0.2	60	[31]
FIA	Alizarin Red S	Chemiluminescence	0.05-1x10 ⁻⁹ mol/l	0.02 mol/l	N.R.	N.R.	[34]
SIA	TBPE	Absorption	upto 10 mg/dl	0.03 mg/dl	2.5-2.7	6 (for 2 analytes)	[21]
SIA	AB-580	Fluorescence	1-100 mg/l	0.3 mg/l	2.3-3.8	37	[22]
SIA	Eosin Y	Absorption	upto 20 mg/l	0.6 mg/l	2.49	18 (for 2 analytes)	[23]
LOV	Congo red	Absorption	12.5-200 µg/ml	5.6 µg/ml	1.9	60	[32]
SIEMA	TBPB	Absorption	10-50 µg/ml	0.53 µg/ml	1.35	37	[28]
CIA	TBPE	Absorption	1-40 mg/dl	0.92 mg/dl	2.3	12 (for 2 analytes)	[30]
LOC	AB-580	Fluorescence	10-100 mg/l	N.R.	N.R.	N.R.	[33]
LOC	CBB G-250	Absorption	0-1000 µg/ml	15.8 µg/ml	0.023	60	[42]

หมายเหตุ: ^a ชื่อของสีอ้อมบางชนิดแสดงเป็นชื่อย่อ (ดูชื่อเต็มได้จากรูปที่ 3)

^b ผู้เขียนไม่ได้ระบุหน่วยปริมาตร

N.R. ผู้เขียนไม่ได้รายงานค่า

บทสรุป

ในบทความวิชาการนี้ได้รวบรวมและนำเสนอวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลของของเหลวร่วมกับหลักการตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสีย้อมอินทรีย์ แล้วติดตามสมบัติทางแสงของสารประกอบที่เกิดขึ้น เช่น การดูดกลืนแสง การเรืองแสง และการเปล่งแสงทางเคมี

เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวที่มีผู้รายงานได้แก่ โพลินเจกชันอะนาไลซิส (FIA) ซึ่ง เควนเซชันเจกชันอะนาไลซิส (SIA) แล็บ-ออน-วาล์ว (LOV) ไชมันท์เนี่ยสอินเจกชันเอฟเฟกทีฟมิกรีซิง (SIEMA) ครอสอินเจกชัน (CIA) และ แล็บ-ออน-ชิพ (LOC) โดยเทคนิคที่ได้รับความนิยมนำมาใช้มากที่สุด คือ FIA อาจเป็นเพราะติดตั้งระบบได้ง่าย และสามารถเลือกได้ว่าจะควบคุมการทำงานของอุปกรณ์ด้วยคอมพิวเตอร์ หรือ กำหนดให้อุปกรณ์ทำงานเอง ทำให้นักวิจัยที่ไม่มีโปรแกรม ก็สามารถใช้งานได้

ข้อดีที่สำคัญของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่อาศัยหลักการไหลของของเหลวคือ ใช้เวลาวิเคราะห์ไม่นาน วิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างต่อชั่วโมง (สูงได้ถึง 90 ตัวอย่างต่อชั่วโมง) และมีความเที่ยงสูง (RSD < ร้อยละ 4) อีกทั้งยังสามารถพัฒนาเป็นระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติได้ จึงเหมาะแก่การนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะในกรณีที่มีตัวอย่างเป็นจำนวนมากซึ่งอาจพบได้ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ของรัฐ

เอกสารอ้างอิง

- [1] Serum albumin, online available at: <http://en.wikipedia.org/wiki/Serum_albumin> [Accessed 21 August 2013].
- [2] เกียรติ ตั้งสง่า, 2548. แนวทางการวินิจฉัย การป้องกันและการรักษาโรคไตจากโรคเบาหวาน. พิมพ์ครั้งที่ 1, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ [Kriang Tangsa-nga, 2005. Criteria for Diagnosis, Prevention and Treatment of Diabetic Nephropathy. 1st ed. Thai Agricultural Cooperative Publisher. Bangkok (in Thai)]
- [3] สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย และ กนกวรรณ เหมมาประสิทธิ์, 2546. การตรวจหาระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะผู้ป่วยโรคเบาหวาน. *สารศิริราช*, 55(5), 236-242. [S. Tangvarasittichai and K. Mhaoprasit, 2003. Microalbumin detection in diabetes mellitus Patients. *Siriraj Hospital Gazette*, 55(5), 236-242. (in Thai)]

- [4] American Diabetes Association, Clinical practice recommendations, 2007. *Diabetes Care*. 30(1), s4-41.
- [5] The task force for the management of arterial hypertension of the European society of hypertension (ESH) and of the European society of cardiology (ESC), Guidelines for the management of arterial hypertension, 2007. *Eur. Heart J.*, 28(1), 462-536.
- [6] ทวี ศิริวงศ์, แนวทางปฏิบัติเพื่อชะลอการเสื่อมของไตสำหรับแพทย์และบุคลากรทางการแพทย์, สมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย, on line available at: <<http://www.nephrothai.org/knowledge>> [Accessed 20 July 2013].
- [7] Wheeler II, T. L., Blackhurst, D. W., Dellinger, E. H. and Ramsey, P. S., 2007. Usage of spot urine protein to creatinine ratios in the evaluation of preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196(5), 465 e.1-465 e.4.
- [8] วีระศักดิ์ ไทยชนในศวรรษย์, วุฒิชัย วงศ์สรรคกร, วัฒนา เลี้ยววัฒนา, ความสัมพันธ์ของอัตราส่วน โปรตีนและครีอะตินินในปัสสาวะครั้งเดียวกับปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง. *สารศิริราช*, 44(7), 503-508. [W. Thaidhanaiswanya, W. Wongsankakorn and W. Leowattana, 1992. Correlation of protein-creatinine ratio in single voided specimen and quantitation of 24-hour proteinuria. *Siriraj Hospital Gazette*, 44(7), 503-508. (in Thai)]
- [9] Miller, J. N. and Miller, J. C., 1993. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed. Pearson Education, Essex.
- [10] Cohen, D. L., Close, C. F. and Viberti, G. C., 1987. The variability of overnight urinary albumin excretion in insulin-dependent diabetic and normal subjects. *Diabetic Med.*, 4, 437-440.
- [11] Gatling, W., Knight, C., Mulee, M. A. and Hill, R. D., 1988. Microalbuminuria in diabetes: a population study of the prevalence and assessment of three screening tests. *Diabetic Med.*, 5, 343-347.
- [12] Osberg, I., Chase, H. P., Garg, S. K., De Andrea, A., Harris S., Hamilton, R. and Marshall, G., 1990. Effects of storage time and temperature on measurements of small concentrations of albumin in urine. *Clin. Chem.*, 36, 1428-1430.
- [13] Mueller, P. W., McNeil. M. L., Smith, J. and Miller, D. T., 1991. Interlaboratory comparison of the measurement of albumin in urine. *Clin. Chem.*, 37, 191-195.

- [14] Gianpietro, O., Clerico, A., Cruschelli, L., Penno, G. and Navalesi, R., 1991. More on effect of storage time and temperature on measurement of small concentrations of albumin in urine. *Clin. Chem.*, 37, 591-592.
- [15] Gianpietro, O., Penno, G., Clerico, A., Cruschelli, L. and Cecere, M., 1993. How and how long to store urine samples before albumin radioimmunoassay: a practical response. *Clin. Chem.*, 39, 533-536.
- [16] Sorensen, K., 1991. Possible explanation for decrease in albumin content during storage of urine samples. *Clin. Chem.*, 37, 2013.
- [17] Sakai, T., Kito, Y., Teshima, N., Katoh, S., Watla-Iad, K. and Grudpan, K., 2007. Spectrophotometric flow injection analysis of protein in urine using tetrabromophenolphthalein ethyl ester and triton X-100. *J. Flow Injection Anal.*, 24(1), 23–26.
- [18] Sakai, T., Teshima, N., Kato, T., Katoh, S. and Siangproh, W., 2011. Flow injection determination of urinary protein using fluorescence quenching of tetraiodofluorescein. *J. Flow Injection Anal.*, 28 (2), 120–123.
- [19] Pokrzywnicka, M., Tymecki, L. and Koncki, R., 2012. Low-cost optical detectors and flow systems for protein determination. *Talanta*, 96, 121–126.
- [20] Strzelak, K. and Koncki, R., 2013. Nephelometry and turbidimetry with paired emitter detector diodes and their application for determination of total urinary protein. *Anal. Chim. Acta*, 788, 68–73.
- [21] Watla-iad, K., Sakai, T. and Teshima, N., 2007. Successive determination of urinary protein and glucose using spectrophotometric sequential injection method. *Anal. Chim. Acta*, 604, 139–146.
- [22] Laiwattanapaisal, W., Kunanuvat, U., Intharachuti, W., Chinvongamorn, C., Hannongbua, S. and Chailapakul, O., 2009. Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria. *Talanta*, 79, 1104–1110.
- [23] Siangproh, W., Teshima, N., Sakai, T., Katoh, S. and Chailapakul, O., 2009. Alternative method for measurement of albumin/creatinine ratio using spectrophotometric sequential injection analysis. *Talanta*, 79, 1111–1117.

- [24] Korenaga, T., Izawa, M., Takahashi, T. and Stewart, K. K., 1991. Development of capillary stream sensor based on FIA for the determination of proteins in biological samples with high precision and sensitivity. *Bunseki Kagaku*, 40, 481-487.
- [25] Korenaga, T., Zhou, X. J., Izawa, M., Takahashi, T. and Moriwake, T., 1992. High-sensitivity flow method for the determination of proteins with micro-plunger pumps. *Anal. Chim. Acta*, 261(1), 67-74.
- [26] Yoshikazu, F., Mori, I. and Toyoda, M., 1992. Spectrophotometric determination of protein with Chromeazural B-Beryllium(II) complex by manual and flow-injection methods. *Anal. Sci.*, 8, 323-316.
- [27] Huang, C. B., Zhang, K., Liu, X. L. and Wang, S. F., 2007. A flow-injection chemiluminescence method for the determination of human serum albumin, using the reaction of fluorescein-human serum albumin-sodium hypochlorite by the enhancement effect of the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide. *Luminescence*, 22, 393-400.
- [28] Ratanawimarnwong, N., Ponghong, K., Teshima, N., Nacapricha, D., Grudpan, K., Sakai, T. and Motomizu, S., 2012. Simultaneous injection effective mixing flow analysis of urinary albumin using dye-binding reaction. *Talanta*, 96, 50-54.
- [29] Gamiz-Gracia, L., Garcia-Campana, A. M., Ales Barrero, F. and Cuadros Rodriguez L., 2003. Determination of albumin in biological fluids by flow injection analysis using the peroxyoxalate chemiluminescent system in micellar medium. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 281-286.
- [30] Inpota, P., Teerasong, S., Kongsakphaisal, A., Maneerat, N., Nacapricha, D. and Choengchan, N., 2011. Parallel cross injection system for determination of albumin to creatinine ratio in urine. The 5th Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON) Proceedings, 79-82.
- [31] Shuto, T., Koga, M., Tanaka, I., Akiyama, T. and Igusu, H., 1992. Rapid and sensitive determination of proteins in biological samples by FIA. *Bunseki Kagaku*, 36, 256-260.
- [32] Wei, C. X., Jiao, J. and Hua, W. J., 2008. Determination of proteins in a mesofluidic Lab-on-Valve system. *Chin. J. Anal. Chem.*, 36(12), 1601-1605.
- [33] Hofmann, O., Wang, X. H., deMello, J. C., Bradley, D. D. C. and deMello, A. J., 2005. Towards microalbuminuria determination on a disposable diagnostic microchip with integrated fluorescence detection based on thin-film organic light emitting diodes. *Lab Chip*, 5, 863-868.

- [34] Yu, X. and Mou, C., 2011. A flow injection chemiluminescence method for the determination of protein using Copper(II)-Alizarin Red S complex as an efficient chemiluminescent probe. *Anal. Lett.*, 44, 137-145.
- [35] ลาวัลย์ ศรีพงษ์, 2544. การวิเคราะห์เชิงฟลูออโรเมตรี. พิมพ์ครั้งที่ 1, ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. จังหวัดนครปฐม [Lawan Sripong, 2001. Fluorometric analysis. 1st ed. Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University Publisher. Nakornpathom Province (in Thai)]
- [36] Ruzicka, J. and Hansen, E. H., 1998. Flow Injection Analysis, 2nd ed. Wiley, New York.
- [37] Ruzicka, J. and Marshall, G. D., 1990. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal. Chim. Acta*, 237, 329-343.
- [38] Ruzicka, J., 2000. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *Analyst*, 125, 1053-1060.
- [39] Teshima, N., Noguchi, D., Joichi, Y., Lenghor, N., Ohno, N., Sakai, T. and Motomizu, S., 2010. Simultaneous injection-effective mixing analysis of Palladium. *Anal. Sci.*, 26, 143-144.
- [40] Nacapricha, D., Sastranurak, P., Mantim, T., Amornthammarong, N., Uraisin, K., Boonpanaid, C., Chuyprasartwattana C. and Wilairat, P., 2013. Cross injection analysis: Concept and operation for simultaneous injection of sample and reagents in flow analysis. *Talanta*, 110, 89-95.
- [41] Lab-on-a-chip, online available at: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Lab-on-a-chip>> [Accessed 21 August 2013].
- [42] Nishihama, S., Imabayashi, H., Matoba, T., Toya, C., Watanabe, K. and Yoshizuka, K., 2008. Micro-flow injection system for the urinary protein assay. *Talanta*, 74, 1350-1354.