

ชุดทดสอบสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินร่วมกับแอสปาลิเคชัน  
บนมือถือ : ชุดต้นแบบ รุ่นสอง

Albumin Smart Test : Prototype II



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาเคมีอุตสาหกรรม  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2557

ชุดทดสอบสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินร่วมกับแอปพลิเคชัน  
บนมือถือ : ชุดต้นแบบ รุ่นสอง

Albumin Smart Test : Prototype II



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีอุตสาหกรรม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Albumin Smart Test : Prototype II



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
IN INDUSTRIAL CHEMISTRY  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### หัวข้อโครงการพิเศษ

ชุดทดสอบสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินร่วมกับแอสปาร์ทามีน  
บนมือถือ : ชุดต้นแบบ รุ่นสอง  
Albumin Smart Test : Prototype II

### ชื่อนักศึกษา

นางสาวจุฑาทพร ยาจิตร รหัสนักศึกษา 54050149  
นางสาวธนาภรณ์ คำเอี่ยม รหัสนักศึกษา 54050178  
นางสาวธัญพร หลิวสุวรรณ รหัสนักศึกษา 54050182

### ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)

### ภาควิชา

เคมี




### ปีการศึกษา

2557

### อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
อุตสาหกรรมประจำปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ ประธานกรรมการ	
ดร.เสาวภาคย์ ธีราทรง กรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

### ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ ชุดทดสอบสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินร่วมกับแอฟฟลิเคชันบนมือถือ : ชุดต้นแบบ รุ่นสอง

นักศึกษา	นางสาวจุฑาพร ยาจิตร	รหัสนักศึกษา 54050149
	นางสาวธนาภรณ์ คำเอี่ยม	รหัสนักศึกษา 54050178
	นางสาวธัญพร หลิวสุวรรณ	รหัสนักศึกษา 54050182
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	เคมี	
ปีการศึกษา	2557	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ณัฐวดี เขิงชั้น	

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ นำเสนอวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้ชุดทดสอบภาคสนาม ร่วมกับการตรวจวัดด้วยแอฟฟลิเคชันบนโทรศัพท์มือถือหรือแท็บเล็ต หลักการตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาการระหว่างอัลบูมินกับเทตราโบโรโมฟีนอลล์ฟทาไลน์ เอทิล เอสเทอร์ ภายใต้สภาวะที่มีบัฟเฟอร์อะซีเทต (pH 3.0) และไททรอนเอ็กซ์-100 โดยชุดทดสอบภาคสนามนี้ จะประกอบด้วย: (1) ขวดพลาสติกสำหรับเก็บและเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ (2) ไซริงค์พลาสติก (3) หลอดบรรจุสารละลายรีเอเจนต์ (4) ตลับผสมตัวอย่างและสารละลายรีเอเจนต์ (5) คู่มือการใช้งาน ขั้นตอนการตรวจวัดเริ่มจากเก็บตัวอย่างปัสสาวะ แล้วเจือจางด้วยน้ำ จากนั้นจึงใช้ไซริงค์ดูดตัวอย่างที่เจือจาง ใส่ในตลับ ตัดหลอดพลาสติกเทสารละลายรีเอเจนต์ลงไป เขย่าเล็กน้อย จะเกิดผลิตภัณฑ์สีเขียวแกมน้ำเงิน จากนั้นถ่ายรูปด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือหรือแท็บเล็ตผ่านแอฟฟลิเคชันเพื่อทำการตรวจวัด โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะถูกประมวลผลเปลี่ยนเป็นความเข้มชั้นของอัลบูมินซึ่งจะแสดงผลที่ได้บนหน้าจอในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงสูง (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ที่ความเข้มชั้นของสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับร้อยละ 4.94) ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ อยู่ระหว่างร้อยละ 96.95-101.60 จึงกล่าวได้ว่าสามารถพัฒนาวิธีตรวจวัดอัลบูมินด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือหรือแท็บเล็ตได้เป็นผลสำเร็จและสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างปัสสาวะได้

คำสำคัญ : อัลบูมินในปัสสาวะ, การวิเคราะห์เชิงปริมาณ, ชุดทดสอบภาคสนาม, โทรศัพท์มือถือ, แท็บเล็ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา แยก ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Albumin Smart Test : Prototype II		
Students	Juthaporn	Yajit	Student ID 54050149
	Tanaporn	Kamiam	Student ID 54050178
	Thunyaporn	Lewsuwan	Student ID 54050182
Degree	Bachelor of Science (Industrial Chemistry)		
Department	Chemistry		
Academic Year	2014		
Advisor	Dr. Nathawut Choengchan		

### Abstract

This work presents a test kit, namely “Albumin Smart Test” for quantitative determination of urinary albumin. Detection principle is based on the reaction between albumin with tetrabromophenolphthalein ethyl ester (TBPE) in the presence of acetate buffer (pH 3.0) and Triton X-100. The packaging of test kit was composed of: (i) plastic bottles for urine sample collection and dilution, (ii) plastic syringes, (iii) reagent ampoules (iv) cassette for solution mixing and (v) user's manual. Detection procedure was started by transferring diluted sample and reagent solutions in to the cassette. The cassette was tightened and was shaken. Blue-colored product was developed. The color was taken a photo through the embedded application in smart mobile phone (or tablet). The color intensity was evaluated and then converted to the albumin concentration as mg/L. The developed method provided high precision (RSD at concentration of albumin 30 mg/L = 4.94 %). Analytical recovery was observed at 96.95-101.60 %. This method was successfully developed and applicable for measurement of albumin in urine samples.

**Keywords:** Urinary albumin, Quantitative analysis, Test kit, Smart phone, Tablet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และขออภัยถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องจากได้รับคำแนะนำและให้คำปรึกษาจาก ดร. ณัฐวุฒิ เขิงชั้น อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ จึงขอขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ และ ดร.เสาวภาคย์ อีราทรง ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบและตรวจทาน แก้ไข ให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณ คุณอาจณรงค์ เมธาวิสรรเสริญ และ คุณอรฉัตร เลิศอิทธิพร ที่กรุณาติดตามตรวจสอบดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี จนโครงการพิเศษสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้วิชาความรู้จนสามารถทำให้พวกเราทำงานจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และให้ความสะดวกในทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ ที่สนับสนุนให้ใช้พื้นที่และสาธารณูปโภค รวมถึงเครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนญาติพี่น้องทุกท่าน รวมทั้งรุ่นพี่รุ่นน้องทุกๆ คนที่ให้ความสนใจและช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนโครงการพิเศษนี้สำเร็จในที่สุด

นางสาวจุฑาพร

นางสาวธนาภรณ์

นางสาวธัญพร

ยาจิตร

คำเอี่ยม

หลิวสุวรรณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ณ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 การเกิดปัสสาวะ.....	3
2.2 ส่วนประกอบของปัสสาวะ.....	3
2.3 วิธีการตรวจปัสสาวะในห้องปฏิบัติการ.....	4
2.4 การเก็บปัสสาวะ.....	4
2.5 การเก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะ.....	5
2.6 อัลบูมิน.....	6
2.7 วิธีการตรวจอัลบูมินในปัสสาวะ.....	6
2.8 โรคไต.....	6
2.8.1 สาเหตุการเกิดของโรคไต.....	6
2.8.2 อาการ.....	7
2.9 ชุดทดสอบภาคสนาม.....	7
2.10 มาตรฐานสี.....	8
2.10.1 ระบบสีแบบ RGB.....	8
2.10.2 ระบบสีแบบ CMYK.....	8
2.10.3 ระบบสีแบบ HSB.....	9
2.11 ความละเอียดของการแสดงผลสีบนหน้าจอโทรศัพท์.....	9
2.12 ความแตกต่างของระดับสีในการแสดงผลบนหน้าจอโทรศัพท์.....	10
2.13 หลักการการตรวจวัดปริมาณอัลบูมิน.....	10
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3</b> วิธีการดำเนินงานวิจัย .....	15
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ .....	15
3.1.1 สารเคมี .....	15
3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ .....	15
3.2 การเตรียมสารละลาย .....	16
3.2.1 สารละลายมาตรฐานอัลบูมินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร .....	16
3.2.2 สารละลาย TBPE ความเข้มข้น $2.0 \times 10^{-4}$ โมลต่อลิตร .....	16
3.2.3 สารละลายบัฟเฟอร์ (กรดอะซิติก 0.1 โมลต่อลิตร และ โซเดียมอะซิเตต 0.1 โมลต่อลิตร) .....	16
3.3 วิธีการทดลอง .....	16
3.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานการตรวจวัดอัลบูมิน .....	16
3.3.2 ศึกษาความเสถียรของน้ำยาเคมี .....	16
3.3.3 ศึกษาอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ .....	17
3.3.4 การศึกษาคูณลักษณะเด่นและความเหมาะสมของชนิดบรรจุภัณฑ์ .....	17
3.3.4.1 การศึกษาคูณลักษณะของบรรจุภัณฑ์ชนิดของพลาสติก .....	17
3.3.4.2 การศึกษาคูณลักษณะของบรรจุภัณฑ์ชนิดหลอดพลาสติก .....	18
3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ .....	18
3.4.1 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะที่มีการเจือจาง 50 เท่า .....	18
3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้เครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ .....	18
3.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้แอปพลิเคชันในโทรศัพท์มือถือหรือแท็บเล็ต .....	18
<b>บทที่ 4</b> ผลการวิจัยและการอภิปรายผล .....	19
4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน .....	19
4.2 การศึกษาความเสถียรของน้ำยาเคมี .....	20
4.3 การศึกษาอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ .....	21
4.3.1 การศึกษาอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำกลั่น .....	21
4.3.2 การศึกษาอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำประปา .....	22
4.4 ศึกษาคูณลักษณะเด่นและความเหมาะสมของชนิดบรรจุภัณฑ์ .....	22
4.4.1 บรรจุภัณฑ์ชนิดของพลาสติก .....	22
4.4.1.1 การทวนซ้ำ .....	22
4.4.1.2 การทำซ้ำ .....	23
4.4.2 บรรจุภัณฑ์ชนิดหลอดพลาสติก .....	24
4.4.2.1 การทวนซ้ำ .....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ใด ๆ การค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2.2 การทำซ้ำ .....	24
4.4.2.3 ค่าร้อยละการคืนกลับ .....	25
4.4.2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี .....	25
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....</b>	<b>27</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	27
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	28
เอกสารอ้างอิง .....	29
ภาคผนวก .....	31
ภาคผนวก ก .....	32
ภาคผนวก ข .....	34
ภาคผนวก ค .....	39
ภาคผนวก ง .....	43
ภาคผนวก จ .....	44



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงส่วนประกอบในน้ำปัสสาวะ 100 ซีซี (ลูกบาศก์เซนติเมตร).....	3
2.2 แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยความผิดปกติของไตเมื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีที่ต่างกัน.....	5
4.1 แสดงผลการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ.....	21
4.2 แสดงผลการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำประปา .....	22
4.3 แสดงค่า %RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้บรรจุภัณฑ์แบบใหม่ (ซอง) โดยใช้บุคคลเดียวในการตรวจวัด .....	23
4.4 แสดงค่า %RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้บรรจุภัณฑ์แบบใหม่ (ซอง) โดยใช้หลายบุคคลในการตรวจวัด .....	23
4.5 แสดงค่า %RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้บรรจุภัณฑ์แบบใหม่ (หลอด) โดยใช้บุคคลเดียวในการตรวจวัด .....	24
4.6 แสดงค่า %RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้บรรจุภัณฑ์แบบใหม่ (หลอด) โดยใช้หลายบุคคลในการตรวจวัด .....	24
4.7 แสดงค่าร้อยละการคืนกลับของอัลบูมินที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer .....	25
4.8 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่วิเคราะห์ด้วยวิธีที่ตรวจวัดด้วย UV-VIS spectrophotometer ชุดทดสอบเดิม และชุดทดสอบใหม่ .....	26
ก.1 แสดงอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่าง Spiked Sample ในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมิน .....	32
ก.2 แสดงอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่าง Sample ในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมิน .....	33
ง.1 แสดงค่าการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินด้วยการใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer, Ampule, และ syringe .....	43
ง.2 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ ANOVA .....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงระบบสี RGB .....	8
2.2 แสดงระบบสี CMYK .....	9
2.3 แสดงระบบสี HSB .....	9
2.4 แสดงความแตกต่างของระดับสีในการแสดงผล .....	10
4.1 แสดงสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ระหว่างสารละลาย TBPE กับสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 1, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร .....	19
4.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายอัลบูมินในช่วงความเข้มข้น 1-40 มิลลิกรัมต่อลิตร .....	20
4.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำยาเคมีที่ผสมเตรียมเก็บไว้ และน้ำยา เคมีที่เตรียมใหม่เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานอัลบูมินที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร .....	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ/สัญลักษณ์

TBPE	=	สารละลายเทตระโบรโมฟีนอลฟทาลีน เอทิล เอสเทอร์
Triton x-100	=	สารละลายไตรทรอน X-100
conc.	=	concentration
M	=	molar
%RSD	=	relative standard deviation
$R^2$	=	coefficient of determination
HSA	=	สารละลายมาตรฐานอัลบูมิน
pH	=	ระดับความเป็นกรดต่าง
%	=	เปอร์เซ็นต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันปัญหาสุขภาพถูกจัดเป็นสิ่งสำคัญในอันดับแรกที่สุดที่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ จึงทำให้ประชากรทั่วโลกเริ่มตระหนักถึงและให้ความสำคัญโดยการหันมาดูแลสุขภาพมากยิ่งขึ้น ปัญหาทางสุขภาพที่สามารถพบได้มากในชีวิตประจำวันคือ ภาวะโรคไต

ไตเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ขบถ่ายของเสีย และเกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของน้ำในร่างกาย หากไตมีสภาวะการทำงานผิดปกติ ร่างกายจะไม่สามารถทำการปรับสมดุลน้ำก่อให้เกิดภาวะน้ำเกิน หรือภาวะขาดน้ำ ซึ่งมีผลกระทบต่อสมองทำให้เกิดอาการสับสน อ่อนเพลียและชักได้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจร่างกายเพื่อตรวจสอบระบบการทำงานของไตให้อยู่ในสภาวะปกติ โดยสามารถทำการตรวจสอบได้จากทางปัสสาวะและเลือด

ในการตรวจโรคไตสามารถทำได้โดยการตรวจหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ ซึ่งอัลบูมิน คือ โปรตีนชนิดหนึ่ง ผลิตขึ้นที่ตับ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67 กิโลดาลตัน หากมีการตรวจพบปริมาณ อัลบูมินในปัสสาวะที่เก็บภายใน 24 ชั่วโมงน้อยกว่า 30 มิลลิกรัม จะถือว่าไตทำงานเป็นปกติ แต่ถ้าพบปริมาณอัลบูมินอยู่ในช่วงตั้งแต่ 30 ถึง 300 มิลลิกรัม จะจัดว่าไตทำงานผิดปกติในระยะแรก เรียกว่า "ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย" (Microalbuminuria) จะแสดงถึงความเสี่ยงต่อการเป็นโรคไต

วิธีการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะที่นิยมใช้ในโรงพยาบาล เป็นวิธีที่อาศัยหลักการอิมมูโนวิทยา กล่าวคือ จะใช้แอนติบอดี เป็นตัวทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน ซึ่งจะทำให้เป็นแอนติเจน หลังจากทำปฏิกิริยาแล้ว จะเกิดผลิตภัณฑ์ และนำไปวัดความขุ่นต่อไป โดยค่าความขุ่นจะแปรผันตรงกับปริมาณอัลบูมิน จึงใช้ปฏิกิริยาดังกล่าว ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ วิธีดังกล่าวมีข้อดี คือ มีความจำเพาะเจาะจงสูง แต่มีข้อจำกัดคือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน จึงไม่เหมาะสม ในกรณีที่มีตัวอย่างที่ต้องตรวจวัดเป็นจำนวนมาก

เมื่อไม่นานมานี้ มีคณะนักวิจัย ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินแบบรู้ผลเร็ว [1] วิธีดังกล่าว เป็นชุดทดสอบภาคสนามและใช้ร่วมกับแอปพลิเคชันในโทรศัพท์มือถือ ใช้เวลาในการตรวจวัดน้อยกว่า 2 นาที แต่อย่างไรก็ดี วิธีนี้ข้ออุปสรรคในการตรวจ/ถ่ายเทสารเคมี คือ ไซริงค์ ซึ่งอาจไม่สะดวกต่อผู้ใช้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถ้าผู้ใช้เป็นผู้สูงวัย สายตาไม่ดี อ่านสเกลของไซริงค์ไม่สะดวก

ดังนั้น ในโครงการวิจัยนี้ จึงมีความสนใจจะพัฒนาต่อยอดจากโครงการวิจัยเดิม [1] โดยเปลี่ยนจากการใช้ไซริงค์ในการถ่ายเทสารเคมี มาเป็นการบรรจุสารเคมีในหลอดพลาสติก เมื่อต้องการใช้งานก็ทำเพียงตัดจุกหลอดพลาสติกแล้วเทออกมา ซึ่งจะสะดวกแก่การใช้งานมากขึ้น นอกจากนี้ ในโครงการวิจัยนี้ จะได้ศึกษาความเสถียรของสารเคมีด้วย เพื่อใช้เป็นข้อมูลว่าสารเคมีมีอายุการใช้งานได้นานเท่าใด

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาแบบชุดทดสอบภาคสนาม สำหรับวิเคราะห์อัลบูมินในปัสสาวะ โดยทำการตรวจวัดด้วยแอปพลิเคชันมือถือ ให้ดีขึ้น โดยเปลี่ยนเป็นบรรจุสารเคมีในหลอดพลาสติก

1.2.2 เพื่อศึกษาความเสถียรของน้ำยาทางเคมีของการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะในระยะเวลา 1 ปี

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เริ่มจากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ศึกษาหลักการที่ใช้ตรวจวัดโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นจึงมีการออกแบบและพัฒนาชุดทดสอบเพื่อนำมาใช้ภาคสนามร่วมกับการตรวจวัดด้วยแอปพลิเคชันมือถือ เมื่อได้ชุดทดสอบแล้วก็จะศึกษาความเสถียรของน้ำยาเคมี โดยศึกษาทั้งทางด้านเคมีและกายภาพ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงมีการประเมินความถูกต้องของแอปพลิเคชันบนมือถือที่สร้างขึ้นเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากการใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นจึงนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้กับตัวอย่างปัสสาวะต่อไป

สามารถสรุปเป็นขั้นตอนการดำเนินงานได้ดังนี้

1.3.1 ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.2 เพื่อศึกษาหลักการตรวจวัดอัลบูมิน โดยการติดตามสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1.3.3 ออกแบบและพัฒนาชุดทดสอบภาคสนามที่ใช้ในการตรวจหาอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะโดยทำการตรวจวัดด้วยแอปพลิเคชันบนมือถือ

1.3.4 ศึกษาสภาวะความเสถียรของน้ำยาเคมี

1.3.5 ประเมินความถูกต้องแม่นยำของแอปพลิเคชันบนมือถือที่สร้างขึ้นโดยเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากการใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1.3.6 นำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างปัสสาวะ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ชุดทดสอบภาคสนามที่สร้างขึ้นสามารถช่วยตรวจหาปริมาณอัลบูมินที่จะบอกถึงความเสื่อมสภาพของไตได้ โดยใช้ระยะเวลาวิเคราะห์ไม่นาน สะดวกต่อการใช้งาน

1.4.2 สามารถประเมินอายุการใช้งานของน้ำยาเคมีได้ โดยไม่ทำให้การตรวจวิเคราะห์เกิดข้อผิดพลาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 การเกิดปัสสาวะ [2]

1. กระบวนการกรอง เกิดขึ้นที่โกลเมอรูลัส ทำให้สารที่มีโมเลกุลเล็กซึมผ่านมาพร้อมกับน้ำ เช่น แร่ธาตุ กลูโคส ยูเรีย กรดยูริก โดยปกติไตจะกรองเลือดได้ประมาณ 180 ลิตรต่อวัน และถูกดูดกลับเหลือเป็นปัสสาวะประมาณ 1,440 ซีซีต่อวัน

2. กระบวนการดูดกลับ เกิดขึ้นที่ท่อไตส่วนต้นและมากที่สุดที่ Loop of Henle สารที่ดูดกลับหมดได้แก่ กลูโคส วิตามิน C แร่ธาตุบางชนิด น้ำ เกลือ สารที่ไม่ดูดกลับเลยคือ โปรตีนอินนูลิน (Innulin) สารที่มีการดูดกลับเป็นส่วนน้อย ได้แก่ ยูเรีย ฟอสเฟต ซัลเฟต ศูนย์ควบคุมการดูดกลับมาจากฮอร์โมน จากต่อมใต้สมองส่วนท้ายมากับกระแสเลือดชื่อแอนติไดยูเรติกฮอร์โมน (Antidiuretic Hormone; ADH) โดย ADH จะกระตุ้นให้ระหว่างเซลล์ของท่อไตขยายขึ้นให้สารที่มีโมเลกุลเล็กกลับนำไปใช้ในร่างกายใหม่ ถ้าขาด ADH จะไม่เกิดการดูดกลับปัสสาวะบ่อยจะเกิดโรคเบาจัด

3. กระบวนการหลังสาร เพื่อให้เกิดการดูดกลับสมบูรณ์ หน่วยไตจะสร้างสารต่างๆเติมเข้าไปในพลาสมาที่กรองได้เพื่อปรับ pH และความเข้มข้นของปัสสาวะ สารเหล่านี้ได้แก่  $K^+$  (โปแตสเซียม-ไอออน),  $H^+$  (ไฮโดรเจนไอออน), กรดยูริก ทำหน้าที่ปรับความสมดุลในน้ำปัสสาวะ

#### 2.2 ส่วนประกอบของปัสสาวะ [3]

ส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญในปัสสาวะพบว่า 95% เป็นน้ำ 2.5% เป็นยูเรียอีก 2.5%

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบในน้ำปัสสาวะ 100 ซีซี (ลูกบาศก์เซนติเมตร)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัม)	ส่วนประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัม)
1. Urea Nitrogen	682	9. Sodium	212
2. Urea	1,459	10. Potassium	137
3. Creatinine Nitrogen	36	11. Calcium	19.5
4. Creatinine	97	12. Magnesium	11.3
5. Uric acid nitrogen	12.3	13. Chloride	314
6. Uric acid	36.9	14. Total sulphate	91
7. Amino nitrogen	9.7	15. Inorganic sulphate	83
8. Ammonia nitrogen	57	16. Inorganic phosphate	127

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ได้แก่ เอนไซม์ ฮอร์โมน ฮอร์โมนเพศ ฮอร์โมนเมลาโทนิน และ อินซูลิน

### 2.3 วิธีการตรวจปัสสาวะในห้องปฏิบัติการ [3]

การตรวจปัสสาวะเพื่อวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ แบ่งออกเป็น

1. การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพ (Physical examination) ได้แก่ ตรวจหาปริมาณ สี กลิ่น ความขุ่น และความถ่วงจำเพาะ
2. การตรวจคุณสมบัติทางเคมี (Chemical examination) เป็นการตรวจความเป็นกรด-ด่าง และสารเคมีต่างๆ เช่น โปรตีน กลูโคส คีโตน และยูโรบิรินเจน เป็นต้น
3. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) เป็นอีกวิธีที่สำคัญมากในการวินิจฉัยโรค โดยการนำตะกอนปัสสาวะ มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาจุลเซลล์ต่างๆ เช่น เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เซลล์เยื่อหู และ ตรวจหาคริสท ซึ่งมีความสำคัญในการวินิจฉัยโรคไต การตรวจหาผลึกต่างๆ เช่น แคลเซียมออกซาเลต ยูริกแอซิด เป็นต้น การตรวจปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้นสามารถช่วยในการวินิจฉัยโรค เช่น การพบเม็ดเลือดแดงและคริสทออกมาพร้อมชี้บ่งว่า น่าจะเป็นโรคไตเฉียบพลัน และยังมีประโยชน์ในการติดตามการรักษาโรคคว่ำตื้นหรือเสลง

### 2.4 การเก็บปัสสาวะ [4]

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อนำไปวิเคราะห์อัลบูมินสามารถทำได้ 3 วิธีดังต่อไปนี้

1. การเก็บแบบ 24 ชั่วโมง (24-hour urine collection) เป็นการนำปัสสาวะที่ถ่ายแต่ละครั้งในหนึ่งวันมารวมกันแล้วจึงนำไปวิเคราะห์การเก็บตัวอย่างในลักษณะนี้ให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ปริมาณอัลบูมินที่วิเคราะห์ได้จะเรียกว่าค่าอัลบูมินในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (24-hour urinary albumin excretion, UAE) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สะดวกต่อผู้ป่วยอีกทั้งการเก็บปัสสาวะไว้เป็นเวลานานอาจทำให้แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ ยูรีเอส (Urease) ย่อยยูเรียในปัสสาวะกลายเป็นแอมโมเนียทำให้ปัสสาวะเป็นด่างมากขึ้นและทำให้สารบางอย่างตกตะกอนซึ่งอาจรบกวนการวิเคราะห์ได้

2. การเก็บเพียงครั้งเดียว ณ เวลาใดเวลาหนึ่ง (Spot urine collection) เป็นการเก็บปัสสาวะที่ถ่ายในเวลาใดก็ได้แล้วนำมาตรวจวัดวิธีนี้ทำได้สะดวกเพราะจะเก็บตัวอย่างเพียงครั้งเดียวเท่านั้นจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลอย่างไรก็ตามมีข้อเสียคืออาจให้ผลวิเคราะห์คลาดเคลื่อนเนื่องจากในแต่ละเวลาผู้ป่วยอาจถ่ายปัสสาวะในปริมาณที่แตกต่างกัน อัลบูมินจึงถูกเจือจางไม่เท่ากันทั้งนี้หากต้องการเก็บตัวอย่างปัสสาวะแบบนี้ต้องหาปริมาณ “ครีเอตินิน” (Creatinine) ควบคู่กับการหาปริมาณอัลบูมินด้วย แล้วจึงประเมินในรูปอัตราส่วน ความเข้มข้นอัลบูมินต่อครีเอตินิน (Albumin-to-creatinine ratio, ACR)

ครีเอตินินเป็นโปรตีนที่เปลี่ยนมาจาก “ครีเอติน” (Creatine) และถูกขับออกทางปัสสาวะในปริมาณที่คงที่ดังนั้นการหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่มเพียงครั้งเดียวแล้วเทียบกับปริมาณครีเอตินินจะช่วยแก้ไขความคลาดเคลื่อนจากอิทธิพลของการเจือจางของปัสสาวะที่ไม่เท่ากัน

ได้จากการศึกษาของวิระศักดิ์ไทยธนะและคณะ ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบค่า ACR และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการเรียนการสอน เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ประการใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า UAE ของตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 42 ตัวอย่างโดยใช้วิธีทางสถิติคือการวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) พบว่าค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์สอดคล้องกันเป็นอย่างดีโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) เท่ากับ 0.952

3. การเก็บปัสสาวะในช่วงเวลาเฉพาะ (Timed-urine collection) เป็นการเก็บปัสสาวะในช่วงเวลาหนึ่งๆแต่ไม่ครบ 24 ชั่วโมงเช่นเก็บ 12 ชั่วโมงเพื่อคำนวณหาอัตราการขับอัลบูมินต่อ 1 หน่วยเวลาสำหรับการเก็บปัสสาวะในช่วงเวลาเฉพาะนี้จะมีเกณฑ์ในการประเมินความผิดปกติของไตแตกต่างไปจากการเก็บปัสสาวะในสองแบบแรกแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยความผิดปกติของไตเมื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีที่ต่างกัน

เกณฑ์การวิจัย	ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะ		
	เก็บแบบ 24 ชั่วโมง (มิลลิกรัมต่อวัน)	เก็บแบบสุ่มเพียงครั้งเดียว (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ครีอะตินิน)	เก็บในช่วงเวลา เฉพาะ (ไมโครกรัมต่อนาที)
ภาวะปกติ	< 30	< 30	< 20
ภาวะไมโคร อัลบูมินูเรีย	30-299	30-299	20-199
ภาวะแมโคร อัลบูมินูเรีย	> 300	> 300	> 200

## 2.5 การเก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะ [4]

การเก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะมีผลต่อความเสถียรของอัลบูมินจากการศึกษาของ D. L. Cohen และคณะพบว่าหากเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วันจะไม่พบการสูญเสียของอัลบูมินแต่หากต้องการเก็บไว้นานกว่านั้นจำเป็นต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ มีนักวิจัยจำนวนหนึ่งศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่เก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะซึ่งพบว่าหากเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จะเก็บได้นานถึง 30 สัปดาห์แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้จะเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่อุณหภูมิต่ำแล้วก็ตามอาจพบการสูญเสียของอัลบูมินได้ถ้าความเข้มข้นของอัลบูมินน้อยกว่า 30 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลานานกว่า 30 สัปดาห์ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของอัลบูมินจะลดลงร้อยละ 0.27 ต่อวันโดย K. Sorensen สันนิษฐานว่าสาเหตุการสูญเสียของอัลบูมินนี้เป็นเพราะอัลบูมินถูกดูดซับบนพื้นผิวของขวดเก็บตัวอย่าง

## 2.6 อัลบูมิน [5]

อัลบูมินคือโปรตีนที่ถูกสร้างจากตับ โดยระดับอัลบูมินเป็นการบ่งบอกความสมดุลของการสร้างที่ตับและการขับอัลบูมินออกทางไตทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความดันออสโมติก (osmotic pressure) ช่วยป้องกันสารอาหารไม่ให้รั่วซึมออกมาภายนอกหลอดเลือด นอกจากนี้ อัลบูมินยังมีบทบาทที่สำคัญ ได้แก่ การทำหน้าที่เป็นพาหะขนส่งฮอร์โมน เอนไซม์ แร่ธาตุ หรือแม้แต่ยารักษาโรค

## 2.7 วิธีการตรวจอัลบูมินในปัสสาวะ [6]

1. โดยการใช้แถบตรวจปัสสาวะจุ่มในปัสสาวะแล้วเทียบสี จะตรวจพบไข่ขาวเมื่อมีปริมาณโปรตีน 300-500 มิลลิกรัม ข้อเสียคือไม่สามารถทราบค่าที่แน่นอนของโปรตีนได้
2. วัดปริมาณ Protein ที่ขับออกมาตลอด 24 ชั่วโมงโดยการเก็บปัสสาวะตลอดทั้งวันและส่งตรวจหาโปรตีน และค่า Creatinine
3. การตรวจปัสสาวะหาค่า Protein Creatinine  
ค่าอัตราส่วน Protein/Creatinine ค่าปกติจะน้อยกว่า 0.2  
ค่าอัตราส่วน Albumin/Creatinine ค่าปกติจะน้อยกว่า 30 mg/g creatinine หากค่าดังกล่าวอยู่ระหว่าง 30-300 แสดงว่ามีไข่ขาวออกมาในปริมาณไม่มาก หากมากกว่า 300 mg/g แสดงว่าอัลบูมินออกมามาก

## 2.8 โรคไต [7]

ไตเป็นอวัยวะที่ผลิตปัสสาวะจากการกรองเอาของเสียและเกลือแร่ส่วนเกินจากเลือดที่ไหลผ่านไตหน้าที่สำคัญของไตคือการสร้างปัสสาวะซึ่งจะช่วยขับของเสียที่เกิดจากการเผาผลาญสารอาหารต่างๆ และช่วยในการรักษาความปกติของน้ำและเกลือแร่ของร่างกายนอกจากนั้นไตยังมีหน้าที่ในการสร้างสารที่ควบคุมความดันโลหิตและสารที่ช่วยกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงดังนั้นเมื่อไตทำงานน้อยลงมักเกิดปัญหาความดันโลหิตสูงและโลหิตจางร่วมด้วย

### 2.8.1 สาเหตุการเกิดของโรคไต

- เป็นมาแต่กำเนิด (Congenital) เช่น มีไตข้างเดียวหรือไตมีขนาดไม่เท่ากันโรคไตเป็นถุงน้ำ (Polycystic kidney disease) ซึ่งเป็นกรรมพันธุ์
- เกิดจากการอักเสบ (Inflammation) เช่น โรคของกล้ามเนื้อฝอยของไตอักเสบ
- เกิดจากการติดเชื้อ (Infection) เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่เช่นกรวยไตอักเสบไตเป็นหนอง กระเพาะปัสสาวะอักเสบจากเชื้อโรค
- เกิดจากการอุดตัน (Obstruction) เช่น จากนิ่ว ต่อมลูกหมากโต มะเร็งมดลูกไปกดท่อไต
- เนื่องอกในไตซึ่งมีได้หลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8.2 อาการ

1. ปัสสาวะเป็นเลือด เป็นอาการส่วนใหญ่ของการเป็นโรคไต โดยจะปัสสาวะเป็นเลือด อาจเป็นเลือดสดๆ เลือดเป็นลิ่มๆ
2. ปัสสาวะเป็นสีแดง สีน้ำตาลเนือ สีชาแก่ๆ หรือปัสสาวะเป็นสีเหลืองเข้ม
3. ปัสสาวะเป็นฟองมาก เพราะมีอัลบูมินหรือโปรตีนออกมามาก จะทำให้ปัสสาวะมีฟองขาวๆ
4. การมีปัสสาวะเป็นเลือดพร้อมกับมีไขขาว-โปรตีนออกมาในปัสสาวะพร้อมๆ กันเป็นข้อสันนิษฐาน ที่มีน้ำหนักมากกว่าจะเป็นโรคไต
5. ปัสสาวะขุ่น อาจเกิดจากมี เม็ดเลือดแดง (ปัสสาวะเป็นเลือด) เม็ดเลือดขาว (มีการอักเสบ) มีเชื้อแบคทีเรีย (แสดงว่ามีการติดเชื้อ) หรืออาจเกิดจากสิ่งที่ร่างกายขับออกจากไต
6. การผิดปกติของการถ่ายปัสสาวะ เช่นการถ่ายปัสสาวะบ่อย ปัสสาวะแสบ ปัสสาวะราด ล้วนเป็นอาการผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะ
7. การปวดท้องอย่างรุนแรง (colicky pain) ร่วมกับการมีปัสสาวะเป็นเลือด ปัสสาวะขุ่น หรือมีกรวดทราย แสดงว่าเป็นนิ่วในไต และทางเดินปัสสาวะ
8. ความดันโลหิตสูง เนื่องจากไตสร้างสารควบคุมความดันโลหิต ประกอบกับไตมีหน้าที่รักษาสมดุลของน้ำและเกลือแร่ในร่างกาย เพราะฉะนั้นความดันโลหิตสูงอาจเป็นจากโรคไตโดยตรง

## 2.9 ชุดทดสอบภาคสนาม [8]

หลักการของชุดทดสอบอย่างง่ายส่วนใหญ่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเป้าหมายที่สนใจกับสารทดสอบที่มีความไวและจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารเป้าหมาย โดยทั้งนี้สารทดสอบมักถูกเคลือบหรือตรึงอยู่บนแผ่นทดสอบที่เป็นวัสดุรองรับ หรืออาจอยู่ในรูปสารละลายก็ได้ เมื่อสารทดสอบทำปฏิกิริยากับสารเป้าหมายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นด้วยตาเปล่า เช่น สีเปลี่ยนไปจากเดิม หรือการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางแสง เช่น เกิดการเรืองแสง หรือเกิดสารประกอบตัวใหม่หลังเกิดปฏิกิริยาเคมี หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าทางไฟฟ้า นอกจากนี้อาจมีการประกอบวงจรอย่างง่ายเข้าไปด้วยสำหรับแปรผลให้เป็นตัวเลขที่อ่านค่าได้โดยสะดวก

ปฏิกิริยาเคมีที่นำมาใช้กับชุดทดสอบอย่างง่ายมีหลายปฏิกิริยา ได้แก่

### 1. ปฏิกิริยาระหว่างกรดกับด่าง

พีเอชอินดิเคเตอร์ที่ใช้หาค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นตัวอย่างของชุดทดสอบอย่างง่ายที่อาศัยปฏิกิริยาระหว่างกรดกับด่างที่เด่นชัดที่สุด โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงสีจะเกิดขึ้นบนวัสดุรองรับที่อาจเป็นกระดาษหรือแผ่นพลาสติกที่เคลือบสารอินดิเคเตอร์ที่ไวต่อปฏิกิริยาระหว่างกรด-ด่าง

### 2. ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน

เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดมีการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้าเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารเป้าหมายกับสารทดสอบที่ถูกตรึงไว้กับวัสดุรองรับ

### 3. ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

ชุดทดสอบที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนนิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไอออนของโลหะหนัก แต่มีบ้างที่ใช้หาปริมาณสารอินทรีย์ สารทดสอบที่ใช้คือ ไดไทโซน (dithizone) เนื่องจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะได้หลายชนิดและเกิดสีที่แตกต่างกันการเลือกใช้ไดโตนในการทดสอบหาไอออนของโลหะชนิดต่างๆ สามารถเพิ่มความจำเพาะโดยการปรับเปลี่ยนค่าพีเอชระหว่างการทดสอบ เช่น การทดสอบหาไอออนของปรอท (Hg) สารประกอบเชิงซ้อนของไดโตนและปรอทจะเกิดได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 2

#### 4. ปฏิกิริยาของเอนไซม์

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในร่างกายแตกต่างจากปฏิกิริยาของสารเคมีทั่วไป เพราะมีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก สารเป้าหมายในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจพบได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาในลักษณะดังกล่าว เช่น แผ่นทดสอบการตั้งครรภ์ ชุดทดสอบการตกไข่ ชุดทดสอบเชื้ออินฟลูเอนซา (influenza) และชุดตรวจสอบน้ำตาลในปัสสาวะ

### 2.10 มาตรฐานสี [9]

โดยทั่วไปสีในธรรมชาติและสีที่สร้างขึ้นจะมีรูปแบบการมองเห็นของสีที่แตกต่างกัน

#### 2.10.1. ระบบสีแบบ RGB

เป็นระบบสีที่ประกอบด้วยแม่สี 3 สีคือ แดง เขียวและน้ำเงิน ในสัดส่วนความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาผสมกันทำให้เกิดสีต่างๆ ได้มากถึง 16.7 ล้านสี ซึ่งใกล้เคียงกับสีที่ตาเรามองเห็นได้โดยปกติ และจุดที่สีทั้งสามสีรวมกันจะกลายเป็นสีขาว นิยมเรียกการผสมสีแบบนี้ว่าแบบ “Additive” หรือการผสมสีแบบบวก ซึ่งเป็นการผสมสีขั้นที่ 1 หรือถ้าเอา สีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน มาผสมครั้งละ 2 สี ก็จะทำให้เกิดสีใหม่

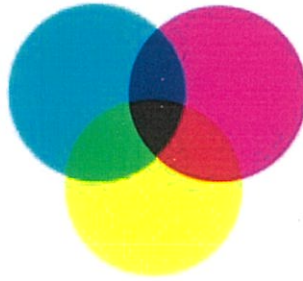


รูปที่ 2.1 แสดงระบบสี RGB

#### 2.10.2. ระบบสีแบบ CMYK

ประกอบด้วยสีพื้นฐาน คือ สีฟ้า สีม่วงแดง สีเหลือง และเมื่อนำสีทั้ง 3 สีมาผสมกันจะเกิดสีเป็นสีดำแต่จะไม่ดำสนิท โดยเรียกการผสมสีทั้ง 3 สีข้างต้นว่า “Subtractive Color” หรือการผสมสีแบบลบ หลักการเกิดสีของระบบนี้คือ สีหนึ่งจะดูดกลืนสีจากสีหนึ่งแล้วสะท้อนกลับออกมาเป็นสีต่างๆ เช่น สีฟ้าดูดกลืนสีม่วงแล้วสะท้อนออกมาเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งจะสังเกตได้ว่าสีที่สะท้อนออกมาจะเป็นสีหลักของระบบ RGB การเกิดสีนี้ในระบบนี้จึงตรงข้ามกับการเกิดสีในระบบ RGB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงระบบสี CMYK

### 2.10.3. ระบบสีแบบ HSB

เป็นระบบสีพื้นฐานในการมองเห็นสีด้วยสายตาของมนุษย์ ประกอบด้วยลักษณะของสี 3 ลักษณะ คือ

1. Hue คือ สีต่างๆ ที่สะท้อนออกมาจากวัตถุเข้ามายังตามนุษย์ ทำให้สามารถมองเห็นวัตถุเป็นสีต่างๆ ได้ ซึ่งแต่ละสีจะแตกต่างกันตามความยาวของคลื่นแสงที่มากกระทบวัตถุและสะท้อนกลับที่ตา Hue ถูกวัดโดยตำแหน่งการแสดงสีบน Standard Color Wheel ซึ่งถูกแทนด้วยองศา 0 ถึง 360 องศา แต่โดยทั่วๆ ไปแล้วมักจะเรียกการแสดงสีนั้นๆ เป็นชื่อของสีเลย เช่น สีแดง สีม่วง สีเหลือง

2. Saturation คือ ความสดของสีโดยค่าความสดของสีจะเริ่มที่ 0-100 ถ้ากำหนด Saturation ที่ 0 สีจะมีความสดน้อย แต่ถ้ากำหนดที่ 100 สีจะมีความสดมาก ถ้าถูกวัดโดยตำแหน่งบน Standard Color Wheel ค่า Saturation จะเพิ่มขึ้นจากจุดกึ่งกลางจนถึงเส้นขอบ โดยค่าที่เส้นขอบจะมีสีที่ชัดเจนและอิ่มตัวที่สุด

3. Brightness คือ ระดับความสว่างและความมืดของสี โดยค่าความสว่างของสีจะเริ่มที่ 0 ถึง 100 ถ้ากำหนดที่ 0 ความสว่างจะน้อยซึ่งจะเป็นสีดำ แต่ถ้ากำหนดที่ 100 สีจะมีความสว่างมากที่สุด ยิ่งมีค่า Brightness มากจะทำให้สีนั้นสว่างมากขึ้น



รูปที่ 2.3 แสดงระบบสี HSB

## 2.11 ความละเอียดของการแสดงผลสีบนหน้าจอโทรศัพท์ [10]

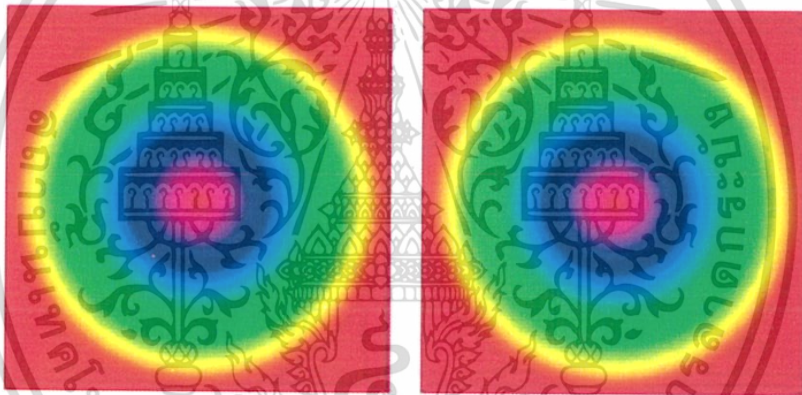
ความละเอียดของหน้าจอ (Resolution) หน้าจอมีเนื้อที่ที่เห็นกันอยู่ และภาพที่เราเห็นผ่านหน้าจอมีเนื้อที่นั้นเกิดจากจุดแสดงสีเล็กๆ (Pixel) ที่เรียงต่อกันเป็นจำนวนมากทั้งแนวตั้งและแนวนอน ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกันกับหน้าจอโทรทัศน์หรือคอมพิวเตอร์ ดังนั้นหากหน้าจอมีเนื้อที่รุ่นใดมีจุดเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่า ก็จะทำให้ภาพที่มีความละเอียดคมชัดสูงกว่าไปด้วย ทำให้การแสดงผลสวยงามน่ามองยิ่งขึ้น เช่นหน้าจอที่มีความละเอียด 320 x 240 Pixels ก็จะทำให้ภาพที่ละเอียดคมชัดกว่าหน้าจอที่มีความละเอียด 176 x 220 Pixels

## 2.12 ความแตกต่างของระดับสีในการแสดงผลบนหน้าจอโทรศัพท์ [10]

โทรศัพท์มือถือแต่ละรุ่นก็จะมีหน้าจอที่สามารถแสดงสีได้มากน้อยแตกต่างกันไป ถ้ายิ่งแสดงสีได้มากเท่าไร ภาพที่แสดงบนหน้าจอก็จะมีสีสันสดใสสมจริงขึ้นเท่านั้น แต่ความแตกต่างก็อาจจะมองไม่ออก หากภาพที่เห็นเป็นภาพที่ประกอบด้วยสีไม่กี่สี โดยเฉพาะภาพที่มีลักษณะเป็นการ์ตูนทั้งหลาย ซึ่งหากมองไปแล้วอาจจะไม่เห็นความแตกต่างกันเลยระหว่างหน้าจอที่แสดงสีได้แตกต่างกัน เช่นระหว่างหน้าจอ 256 สี กับ 65,536 สี แต่ถ้าหากเป็นภาพที่ประกอบไปด้วยโทนสี และแสงเงาที่แตกต่างกันอย่างมาก เช่นภาพถ่ายจริง ภาพวิวทิวทัศน์ ก็ จะเห็นความแตกต่างกันอย่างชัดเจน เช่นสมมติในรูปตัวอย่างจะแทนภาพด้านซ้ายเป็นภาพจากหน้าจอที่สามารถแสดงสีได้น้อยกว่า ในขณะที่ภาพด้านขวาเป็นภาพจากหน้าจอที่สามารถแสดงผลสีได้มากกว่าแสดงดังรูปภาพที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงความแตกต่างของระดับสีในการแสดงผล

จะสังเกตเห็นว่าภาพด้านซ้ายจะมีการไล่สีที่ไม่นุ่มนวล ดูไปแล้วภาพค่อนข้างไม่ละเอียด ในขณะที่ภาพด้านขวาจะมีการไล่สีที่ดูนุ่มนวลสวยงามกว่ามากซึ่งในปัจจุบันหน้าจอที่แสดงผลได้แค่ 4,096 สีหาได้น้อยลงมากแล้ว เนื่องจากมาตรฐานของมือถือรุ่นใหม่ ๆ ก็จะมีหน้าจอที่แสดงผลได้ 65,536 สีขึ้นไปเป็นอย่างน้อย เพื่อให้รองรับกับการใช้งานที่หลากหลายมากขึ้นในปัจจุบันและอนาคต

## 2.13 หลักการตรวจวัดปริมาณอัลบูมิน [11]

การตรวจสอบปฏิกิริยาเคมีของโปรตีน โดย Sakai et al พบว่าการสกัดไมเซลล์ของ TBPE-protein เข้าไปใน Triton X-100 ที่ pH 3.0 การพัฒนาสีที่เกิดขึ้นเป็นดังสมการนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



จากสมการข้างต้น TBPE ซึ่งอยู่ในสภาวะกรด ได้ทำการเติม Triton x-100 ลงไปเพื่อให้ TBPE จัดอยู่ในรูปของไมเซลล์ โดยสารละลายที่ได้จะเป็นสีเขียวยอ่อน จากนั้น TBPE ในรูปของไมเซลล์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายอัลบูมิน จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีเขียวยแกมมน้ำเงิน โดยสีของผลิตภัณฑ์จะแปรผันตรงกับความเข้มข้น ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ตรวจพบของ TBPE-protein เท่ากับ 607 นาโนเมตร

## 2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

A.F. Coskun และคณะ [12] ได้เสนอการตรวจวัดหาอัลบูมินในปัสสาวะด้วยการใช้งานผ่านกล้องโทรศัพท์มือถือ โดยการถ่ายภาพและวิเคราะห์แบบอัตโนมัติด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัลบูมินที่มีความจำเพาะความแม่นยำ และความไวในการวิเคราะห์สูงและวิเคราะห์ได้รวดเร็ว การทดลองทำได้โดยใช้หลอดทดสอบแบบใช้ครั้งเดียวทั้งในการตรวจสอบโดยติดหลอดทดสอบไว้ที่ด้านข้างของเครื่องโทรศัพท์ ( Samsung Galaxy S II ) ที่มีน้ำหนักโดยประมาณ 148 กรัมและใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์มือถือในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาซึ่งแสงแฟลชจะต้องทำมุมในแนวตั้งฉากกับหลอดทดสอบ เกิดการคายแสงของสารตัวอย่างอาศัยหลักการฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปี (fluorescence spectroscopy) จึงทำการบันทึกภาพถ่าย เพื่อทำการประมวลผล และขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด  $5-10\mu\text{g mL}^{-1}$  ในสภาวะ pH 3.0

A.S. Claeys และคณะ [13] ได้ทำการเปรียบเทียบข้อมูลการวิเคราะห์ของแถบวัดมาตรฐานอัลบูมินที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเชิงเคมีและการแพทย์จากบริษัท Combur-Test<sup>®</sup> โดยใช้เครื่อง nephelometer รุ่น BNII ในการอ่านค่าแถบวัดมาตรฐานอัลบูมิน CobasU411 โดยทำการศึกษาจากตัวอย่างผู้ป่วยทั้งหมด 389 ตัวอย่าง และจากคนปกติ 328 ตัวอย่าง จากผลการศึกษาได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 11.5 – 121.5 mg/L และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เป็น 0.921

จุฑามาศ จำปี และคณะ [14] ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้ชุดทดสอบอัลบูมินเบื้องต้น ซึ่งชุดทดสอบถูกพัฒนาขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างอัลบูมินกับสารละลายเทตระโบรโมฟีนอลฟทาลีน เอทิล เอสเทอร์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีสีเขียวยแกมมน้ำเงิน ตามความเข้มข้นของปริมาณอัลบูมิน อีกทั้งชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะได้โดยเปรียบเทียบกับแถบสีมาตรฐาน เปรียบเทียบความใช้ได้ของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ พบว่าสามารถตรวจวัดได้ในช่วง 0.1-50 mg/L

อรฉัตร เลิศอิทธิพร และคณะ [15] ได้เสนอการหาปริมาณอัลบูมินและครีอาตินินในปัสสาวะด้วยชุดทดสอบภาคสนามสำหรับวินิจฉัยโรคไตโดยได้ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินและครีอาตินินในปัสสาวะ โดยใช้เครื่อง ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานอัลบูมินและพัฒนาการทำชุดทดสอบภาคสนาม ให้สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณของอัลบูมินและครีอาตินินในปัสสาวะที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยผลที่ได้จากการตรวจวัดสามารถนำไปวินิจฉัยประเมินความเสี่ยงของภาวะไตเสื่อมระยะแรก หลักการตรวจวัดอัลบูมินอาศัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับผูกขาดหากไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาระหว่างอัลบูมินกับสารละลายเทระโบรโมฟีนอล์ฟทาลีนเอทิลเอสเทอร์ ในสภาวะกรด เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีเขียวแกมน้ำเงิน ส่วนการตรวจวัดครีอาตินินอาศัยปฏิกิริยาระหว่างครีอาตินินกับ สารละลายฟิเครทในสภาวะต่าง เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีแดงส้ม โดยสีของผลิตภัณฑ์จะเข้มมากขึ้นหาก ปริมาณอัลบูมินหรือครีอาตินินมีมากขึ้น ซึ่งปริมาณอัลบูมินและครีอาตินินนี้จะหาได้จากการเทียบกับ แถบสี จากผลการศึกษาได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง  $5-30 \text{ mg L}^{-1}$  มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เป็น 0.992 สำหรับการหาปริมาณอัลบูมินและ  $2.5-25 \text{ mg L}^{-1}$  มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เป็น 0.9954 สำหรับการหาปริมาณครีอาตินินและผลของการเจือจางปัสสาวะ 100 เท่า จะให้ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับเท่ากับ 99.6 และ 100.9% สำหรับอัลบูมินและ ครีอาตินิน ตามลำดับ

S.G. Jeong และคณะ [16] ได้เสนอการตรวจหาโปรตีนและกลูโคสในปัสสาวะโดยอาศัย หลักการของระบบของไหลจุลภาคในการแยก โดยทำการประดิษฐ์แผ่นกระดาษที่มีความยาว 20 mm เคลือบด้วยตัวดูดซับสารละลายเทระโบรโมฟีนอล์ฟทาลีน เอทิล เอสเทอร์ และ โฟแทสเซียม-ไอโอไดด์ ทำการวิเคราะห์ในสภาวะ pH 1.8 โดยทำการหยดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร  $0.5 \mu\text{L}$  .ใช้เวลาในการตรวจวัด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และทำการจัดเก็บกระดาษทดสอบไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือทำการอบด้วยความร้อนเพื่อไล่ความชื้นก่อนใช้งาน เนื่องจากความชื้นส่งผล รบกวนต่อการวิเคราะห์ โดยทำให้เกิดการแยกทำให้ใช้เวลานานขึ้นในการวิเคราะห์ จากผลการศึกษา วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง  $0-75 \mu\text{M}$  และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เป็น 0.9875 การหาปริมาณกลูโคสได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง  $0.5-10 \text{ mM}$  และมีค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เป็น 0.9642และขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด  $2.5 \mu\text{M}$  และ  $1.4 \text{ mM}$  ตามลำดับ

ยุวดี บุญศิริ และคณะ [17] ได้เสนอการตรวจหาอัลบูมินในปัสสาวะ โดยอาศัยหลักการของ ระบบของไหลจุลภาคบนแผ่นกระดาษสำหรับทดสอบ ซึ่งทำการพัฒนามาจากการวิเคราะห์หาน้ำตาล ในเลือดจากผู้ป่วยเบาหวาน ในการวิเคราะห์หาอัลบูมินใช้เวลาในการทดสอบเพียง 10 นาที และ ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด  $0.50 \text{ g dL}^{-1}$  และ  $0.58 \text{ mM}$  ตามลำดับ (S/N=3) และมีความสามารถ ในการทำซ้ำที่ดี โดยมีค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ เท่ากับ 95.1– 106.2%

ผลการทบทวนวรรณกรรมสามารถสรุปได้ดังตารางต่อไปนี้

Reference	Sample	Technique	Condition	Analytical performances
[11]	Urine	-Fluorescence Spectrometry	-pH of buffer was 3.0	-LOD = 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$
[12]	Human serum albumin (HSA)	-Spectrophotometric Flow Injection Analysis	- Used nephelometer (BNII) for detector	-Linear ranges was 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - $r^2 = 0.921$
[13]	Urine	-UV-Vis Spectrophotometry	-Absorbance was measured at 600 nm -pH of buffer was 3.2	-Linear ranges was 0.1-50 $\text{mg L}^{-1}$ - $r^2 = 0.9956$
[14]	Urine	-UV-Vis Spectrophotometry	-Absorbance was measured at 600 nm for albumin determination and at 487 nm for creatinine analysis. -pH of buffer was 3.2	-Linear ranges was 5-30 $\text{mg L}^{-1}$ for albumin and was 2.5-25 $\text{mg L}^{-1}$ for creatinine. - $r^2 = 0.992$ for albumin determination and 0.9954 for creatinine analysis. -% Recovery for albumin = 99.6% And 100.9% for creatinine.

Reference	Sample	Technique	Condition	Analytical performances
[15]	Human serum albumin (HSA)	-Spectrophotometric Flow Injection Analysis	-pH of buffer was 1.8 (acetic acid) - TBPE for adsorbent - At room temperature for detection - Length of paper device is 20 mm	- $r^2 = 0.9875$ for protein determination and 0.9642 for glucose analysis. -Linear ranges was 0–75 $\mu\text{M}$ for protein and was 0.5–10 mM for glucose analysis. -Detection limit was 2.5 $\mu\text{M}$ for protein and 1.4 mM for glucose determination
[16]	Bovine serum albumin (BSA)	-UV-Vis Spectrophotometry	-pH of buffer was 3.0	-%Recovery = 95.1 – 106.2% -LOD = 0.50 $\text{g dL}^{-1}$ and 0.58mM(S/N=3)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

##### 3.1.1 สารเคมี

1. อัลบูมิน (Human serum albumin) ความบริสุทธิ์  $\geq 95.0\%$  – Aldrich, USA
2. เททระโบรมโอฟีนอลฟทาไลน์เอทิล เอสเทอร์  
(Tetrabromophenolphthalineethyl ester (TBPE) ) ความบริสุทธิ์ 99.0%  
– Aldrich, USA
3. เอทานอล (Ethanol) ความบริสุทธิ์ 99.9% – Mallinckrodt
4. ไทรทรอน X-100 (Triton X-100) ความบริสุทธิ์ 99.0% – Aldrich, USA
5. โซเดียมอะซิเตต (Sodium Acetate) ความบริสุทธิ์ 90.0-100.5% – Rankem
6. กรดอะซิติก (Acetic acid) ความบริสุทธิ์ 99.5-100.5% – Mallinckrodt

##### 3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ขวดวัดปริมาตร
2. บีกเกอร์
3. ปีเปต
4. หลอดทดลอง
5. กระจกตวง
6. หลอดหยดสาร
7. ซ้อนตักสาร
8. แท่งคนสาร
9. นาฬิกาจับเวลา
10. เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ – JascoV630 , USA
11. เครื่องเขย่าสาร Vortex- Genie Z, USA
12. เครื่องวัด pH-Metrohm® 827 pH Lab meter, USA
13. โทรศัพท์ รุ่น Samsung galaxy Grand 2
14. เครื่องซีลสุญญากาศ ยี่ห้อ TiiVA รุ่น MODEL NZ280/2SD
15. ชุดทดสอบภาคสนาม ซึ่งประกอบด้วย
  - 15.1 ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุปัสสาวะ จำนวน 1 ขวด
  - 15.2 ขวดพลาสติกสำหรับเจือจางปัสสาวะ จำนวน 1 ขวด
  - 15.3 หลอดบรรจุน้ำยาทดสอบ จำนวน 2 หลอด
  - 15.4 ไซริงค์สำหรับดูดของเหลว จำนวน 2 กระบอก
  - 15.5 ตลับสำหรับผสมสารละลาย จำนวน 1 ตลับ
  - 15.6 แแถบสีมาตรฐานสำหรับใช้เทียบสีและคู่มือการใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 การเตรียมสารละลาย

### 3.2.1 สารละลายมาตรฐานอัลบูมินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายอัลบูมิน 0.0125 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้เป็น 50.00 มิลลิลิตร

### 3.2.2 สารละลาย TBPE ความเข้มข้น $2.0 \times 10^{-4}$ โมลต่อลิตร

ละลาย TBPE 0.0070 กรัมในเอทานอล ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Triton X-100 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ถึงขีดบอกริมาตร

### 3.2.3 สารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 (กรดอะซิติก 0.1 โมลต่อลิตรและ โซเดียมอะซิเตต 0.1 โมลต่อลิตร

- เตรียมสารละลาย 0.1 โมลต่อลิตรโซเดียมอะซิเตต โดยชั่งสารมา 0.4101 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 50.00 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลาย 0.1 โมลต่อลิตรกรดอะซิติก โดยปิเปตจากสารละลายอะซิติกเข้มข้น 99.5 % มา 1.43 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 250.00 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกันโดยใช้ 0.1 โมลต่อลิตรกรดอะซิติก 200.00 มิลลิลิตร กับ 0.1 โมลต่อลิตรโซเดียมอะซิเตต 4.00 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 3.0 และปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร

## 3.3 วิธีการทดลอง

### 3.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานการตรวจวัดอัลบูมิน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานอัลบูมินเข้มข้น 1, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานอัลบูมินเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.20, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายมาตรฐานอัลบูมินเข้มข้น 5, 50, 100, 150, 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานอัลบูมินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตร ลงไป 0.50 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 1.50 มิลลิลิตร เขย่านาน 50 วินาที เติสารละลายใส่ควเวต ทำการสแกนสเปกตรัมที่เวลา 2 นาที

### 3.3.2 ศึกษาความเสถียรของน้ำยาเคมี

1. เตรียมสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตร เก็บไว้ในขวดบรรจุสารขนาด 500 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 เก็บไว้ในขวดบรรจุสารขนาด 250 มิลลิลิตร เก็บสารทั้ง 2 ขวดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตรและสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 ใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษา

3. ปิเปตสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตรที่เตรียมเก็บไว้ มา 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายอัลบูมินเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรอยู่ 0.50 มิลลิลิตร เขย่า 30 วินาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 ที่เตรียมเก็บไว้ จำนวน 1.50 มิลลิลิตร เขย่า 30 วินาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 2 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง โดยทำการตรวจวัดในช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ 1, 7, 14, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 165, 180, 195, 210, 225, 240, 255, 270, 285, 300, 315, 330, 345 และ 365 วัน

5. ทำการทดลองเช่นเดียวกันโดยเปลี่ยนจากสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตร และ สารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 ที่เตรียมเก็บไว้เป็นสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตรและ สารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 ที่เตรียมใหม่

### 3.3.3 ศึกษาอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ

1. เตรียมสารตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน โดยปิเปตปัสสาวะมา 0.25, 0.50, 2.50 และ 5.00 ใส่ขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย อัลบูมินที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 15 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดวัดปริมาตรทุกขวด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้การเจือจางปัสสาวะที่ 5, 10, 50 และ 100 เท่า ตามลำดับ

2. เตรียมสารตัวอย่าง โดยปิเปตปัสสาวะมา 0.25, 0.50, 2.50 และ 5.00 ใส่ขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้การเจือจางปัสสาวะที่ 5, 10, 50 และ 100 เท่า ตามลำดับ

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่มีการเจือจาง 5 เท่า มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม สารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตรลงไป 0.50 มิลลิลิตรเขย่าเป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นเติม สารละลายบัฟเฟอร์ 1.50 มิลลิลิตรเขย่านาน 50 วินาที เทสารละลายใส่คิวเวททำการสแกนสเปกตรัม ที่เวลา 2 นาที

4. ทำซ้ำข้อ 3 กับทุกการเจือจางทั้งตัวอย่างที่มีการเติมและไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน อัลบูมิน

5. คำนวณความเข้มข้น และร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ

### 3.3.4 การศึกษาคุณลักษณะเด่นและความเหมาะสมของชนิดบรรจุภัณฑ์

#### 3.3.4.1 การศึกษาคุณลักษณะของบรรจุภัณฑ์ชนิดของพลาสติก

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานอัลบูมินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังข้อ 3.2.1

2. เตรียมสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตร ดังข้อ 3.2.2

3. เตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์ pH 3.0 ดังข้อ 3.2.3

4. บรรจุสารละลาย TBPE ลงในบรรจุภัณฑ์ชนิดของพลาสติก โดยปิเปต TBPE มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในซองสีน้ำเงิน และทำการปิดปากซองด้วยเครื่องซีลสุญญากาศ สำหรับบัฟเฟอร์ ปิเปตมา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในซองสีขาว และทำการปิดปากซองด้วยเครื่องซีลสุญญากาศเช่นเดียวกัน

5. ทำการตรวจวัด โดยฉีกซองสีน้ำเงินใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายอัลบูมินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เขย่า 40 วินาที จากนั้นฉีกซองสีขาวเทใส่หลอดทดลอง เขย่าอีก 50 วินาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 2 นาที

6. ศึกษาการทวนซ้ำ และการทำซ้ำ ตามลำดับ

### 3.3.4.2 การศึกษาคุณลักษณะของบรรจุภัณฑ์ชนิดหลอดพลาสติก

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานอัลบูมินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังข้อ 3.2.1
2. เตรียมสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตร ตามข้อ 3.2.2
3. เตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์ pH 3.0 ตามข้อ 3.2.3
4. บรรจุสารละลาย TBPE ลงในบรรจุภัณฑ์ชนิดของพลาสติก โดยปิเปต TBPE มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดพลาสติก และทำการปิดปากของด้วยเครื่องซีลสุญญากาศ สำหรับ บัฟเฟอร์ ปิเปตมา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดพลาสติก และทำการปิดปากของด้วยเครื่องซีลสุญญากาศเช่นเดียวกัน
5. ทำการตรวจวัด โดยตัดหลอดพลาสติกสีน้ำเงินใส่หลอดทดลองที่มีสารละลาย อัลบูมินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร อยู่ 0.5 มิลลิลิตร เขย่า 40 วินาที จากนั้นตัดหลอดสีขาว เทใส่หลอดทดลอง เขย่าอีก 50 วินาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 2 นาที
6. ศึกษาการทวนซ้ำ และการทำซ้ำ ตามลำดับ

## 3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ

### 3.4.1 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะที่มีการเจือจาง 50 เท่า

ใช้ไซริงค์พลาสติกดูดตัวอย่างปัสสาวะ 0.50 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารตัวอย่างที่มีการเจือจาง 50 เท่า

### 3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตร-โฟโตมิเตอร์

ใช้ไซริงค์พลาสติกดูดสารตัวอย่างที่มีการเจือจาง 50 เท่า 0.50 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตร ลงไป 0.50 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 40 วินาที จากนั้น เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1.50 มิลลิลิตร เขย่านาน 50 วินาที เทสารละลายใส่คิวเวตทำการสแกน สเปกตรัมที่เวลา 2 นาทีนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ

### 3.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้แอปพลิเคชันในโทรศัพท์มือถือ หรือแท็บเล็ต

ใช้ไซริงค์พลาสติกดูดสารตัวอย่างที่มีการเจือจาง 50 เท่า 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในตลับสำหรับ ผสมสารละลาย เติมสารละลาย TBPE  $2.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตร ลงไป 0.50 มิลลิลิตร แล้วจึงเขย่าเป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1.50 มิลลิลิตร เขย่านาน 50 วินาที ใช้แอปพลิเคชัน ในโทรศัพท์มือถือหรือแท็บเล็ตถ่ายรูปสีของสารผลิตภัณฑ์ที่เวลา 2 นาที แอปพลิเคชันจะประมวลผล ออกมาเป็นความเข้มข้นในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

## บทที่ 4

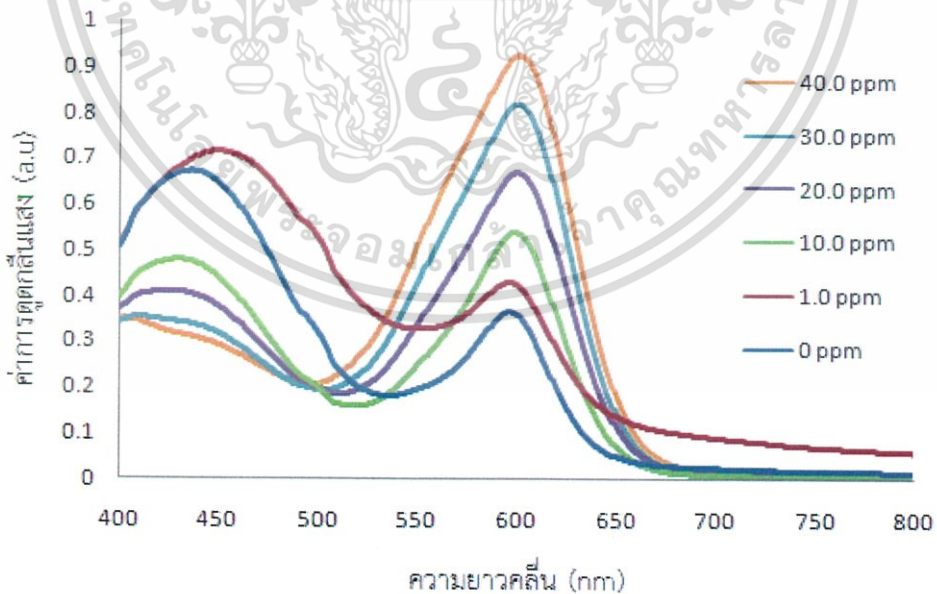
### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

วัตถุประสงค์ของการศึกษาหัวข้อนี้ คือ เพื่อศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ตรวจวัด โดยปฏิกิริยาที่ใช้ตรวจวัดอัลบูมินเป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเทรโซโบโมฟีนอลฟทาซีน เอทิล เอสเตอ์ (TBPE) ในสารลดแรงตึงผิว (Triton X-100) กับสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน



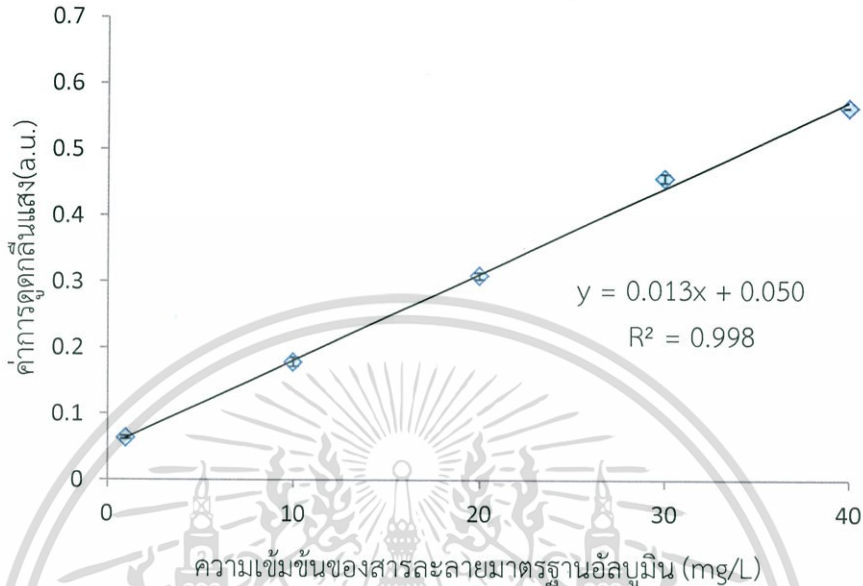
จากสมการข้างต้น TBPE ซึ่งอยู่ในสภาวะกรด ได้ทำการเติม Triton x-100 ลงไปเพื่อให้ TBPE จัดอยู่ในรูปของไมเซลล์ โดยสารละลายที่ได้จะเป็นสีเขียวย่อน จากนั้น TBPE ในรูปของไมเซลล์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายอัลบูมิน จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยสีของผลิตภัณฑ์จะแปรผันตรงกับความเข้มข้น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั้นได้ทำการศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากสมการดังกล่าวในช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร พบว่าได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ระหว่างสารละลาย TBPE กับสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 1, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงดังกล่าวได้นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด ไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานอัลบูมินในช่วงความเข้มข้น 1- 40 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2

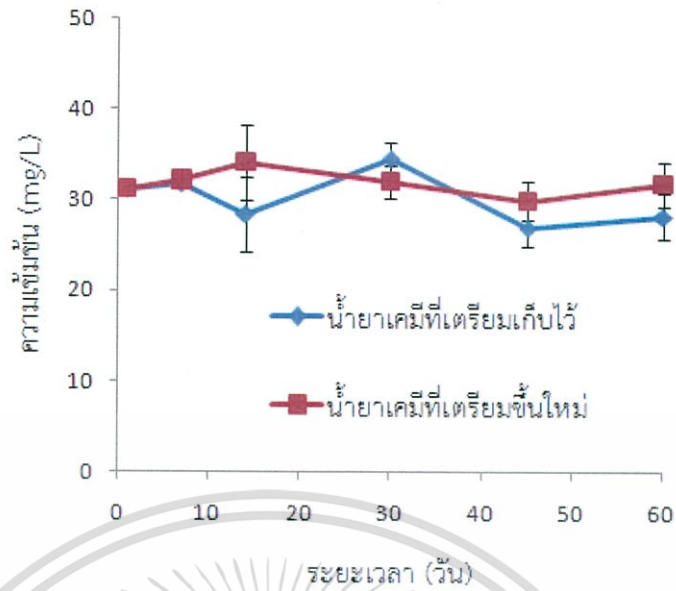


รูปที่ 4.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายอัลบูมินในช่วงความเข้มข้น 1-40 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับตามความเข้มข้นของอัลบูมิน และเมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination) มีค่าเท่ากับ 0.998 จึงกล่าวได้ว่ากราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ดี

#### 4.2 การศึกษาความเสถียรของน้ำยาเคมี

ได้ศึกษาความเสถียรของน้ำยาเคมีตามการทดลองในหัวข้อ 3.3.2.1 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3



**รูปที่ 4.3** แสดงค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำยาเคมีที่ผสมเตรียมเก็บไว้และน้ำยาเคมีที่เตรียมใหม่เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานอัลบูมินที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลอง พบว่าน้ำยาเคมีมีความเสถียรไม่ว่าจะเตรียมเมื่อใช้งานหรือเตรียมเก็บไว้เห็นได้จากกราฟรูป 4.3 เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการนำน้ำยาเคมีที่เตรียมเก็บไว้และเตรียมใหม่มาทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จะได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน

อย่างไรก็ตามน้ำยาทดสอบในครั้งนี้ได้เตรียมขึ้นมาเพื่อศึกษาความเสถียรของน้ำยาทดสอบไปถึงระยะเวลา 1 ปี ซึ่งจะต้องดำเนินการศึกษาต่อไปโดยกลุ่มวิจัยอื่นๆในการศึกษาหน้า (ปีการศึกษา 2558)

#### 4.3 การศึกษาอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ

##### 4.3.1. การศึกษาอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำกลั่น

ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการเจือจางของตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำกลั่นพบว่าได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** แสดงผลการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ

จำนวนเท่าของการเจือจาง	ความเข้มข้นของอัลบูมิน ( mgL <sup>-1</sup> )			ร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ
	แรกเริ่ม	ที่เติมลงไป (30 mgL <sup>-1</sup> )	ที่ตรวจพบ (30 mgL <sup>-1</sup> )	
Pure urine	18.18	31.67	50.61±10.49	102.40
5	7.02	31.67	41.47±8.13	108.78
10	N.D.*	31.67	35.95±4.91	113.51
50	N.D.*	31.67	31.13±2.12	98.29
100	N.D.*	31.67	29.91±2.85	94.44

หมายเหตุ : N.D.\* คือ ไม่สามารถตรวจวัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าปัสสาวะที่ไม่มีการเจือจางเลย หรือที่เจือจาง 5 เท่า ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับมีค่าที่สูง ซึ่งอาจเป็นเพราะองค์ประกอบอื่นๆของตัวอย่าง ( matrix ) รบกวนการวิเคราะห์ แต่เมื่อมีการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนการเจือจางที่มากขึ้น จาก 10 , 50 และ 100 เท่า พบว่าค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับมีแนวโน้มใกล้เคียง 100 มากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจือจางที่ 50 เท่า มีค่าร้อยละการคืนกลับได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนการเจือจางที่ 50 เท่า เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ

#### 4.3.2 การศึกษาอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำประปา

เนื่องจากต้องการพัฒนาชุดทดสอบให้รองรับการใช้งานจริง ซึ่งผู้ใช้งานจะต้องเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำประปา เพราะทำได้สะดวกกว่าการเจือจางด้วยน้ำกลั่น ดังนั้นจึงได้ศึกษาชนิดของตัวเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำประปา ว่าจะส่งผลต่อการวิเคราะห์หรือไม่ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำประปา

จำนวนเท่าของการเจือจาง	ความเข้มข้นของอัลบูมิน ( $\text{mgL}^{-1}$ )			ร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ
	แรกเริ่ม	ที่เติมลงไป ( $30 \text{ mgL}^{-1}$ )	ที่ตรวจพบ ( $30 \text{ mgL}^{-1}$ )	
Pure urine	13.64	31.89	41.68±5.43	87.93
5	5.55	31.89	34.15±3.64	89.68
10	1.29	31.89	31.97±4.08	96.21
50	N.D.*	31.89	32.78±3.32	102.79
100	N.D.*	31.89	32.07±2.48	100.56

หมายเหตุ : N.D.\* คือ ไม่สามารถตรวจวัดได้

จากตารางข้างต้น พบว่าค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับของการใช้น้ำประปาและใช้น้ำกลั่นดังผลการทดลองในหัวข้อ 4.3 เป็นตัวเจือจางนั้นมีค่าไม่แตกต่างกัน จึงถือได้ว่าสามารถใช้น้ำประปาเป็นตัวเจือจางปัสสาวะแทนน้ำกลั่นได้ โดยปราศจากการรบกวนจากสิ่งอื่นที่มีอยู่ในน้ำประปา

#### 4.4 ศึกษาคุณลักษณะเด่นและความเหมาะสมของชนิดบรรจุภัณฑ์

##### 4.4.1 บรรจุภัณฑ์ชนิดของพลาสติก

4.4.1.1 การทวนซ้ำ (Repeatability) การวัดที่ได้จากการวัดหลาย ๆ ครั้งในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน โดยการวัดทั้งหมดต้องอยู่ภายใต้วิธีการวัด ผู้ทำการวัด และสภาวะแวดล้อมเดียวกัน หรือการแสดงถึงความเที่ยงตรง (precision) ของวิธีที่ดี ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า %RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้บรรจุภัณฑ์แบบใหม่ (ซอง) โดยใช้บุคคลเดียวในการตรวจวัด

ครั้งที่	ความเข้มข้นที่แท้จริง (mg/L)	ความเข้มข้นที่ตรวจพบ (mg/L)
1	30	24.36
2		23.20
3		22.69
4		22.21
5		23.93
6		23.05
7		19.77
8		25.24
Mean	30.00	23.04
SD	-	1.65
%RSD	-	7.17

4.4.1.2) การทำซ้ำ (Reproducibility) ความสามารถในการแสดงค่าซ้ำ โดยการวัดครั้งหนึ่งๆ สามารถเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขดังต่อไปนี้ได้ เช่น วิธีการวัด ผู้วัด รวมถึงสภาวะแวดล้อม ซึ่งค่า reproducibility เกี่ยวข้องกับค่าความเที่ยงตรง (precision) ของวิธี แสดงผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า %RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้บรรจุภัณฑ์แบบใหม่ (ซอง) โดยใช้ 3 บุคคลในการตรวจวัด

ครั้งที่	ความเข้มข้นที่แท้จริง (mg/L)	ความเข้มข้นที่ตรวจพบ (mg/L)
1	30	19.99
2		21.66
3		27.14
4		16.85
5		26.99
6		26.19
7		28.45
8		27.94
Mean	30.00	24.40
SD	-	4.31
%RSD	-	17.68

จากการศึกษาการทวนซ้ำและการทำซ้ำพบว่า ความเข้มข้นของอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ในแต่ละครั้งมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นที่แท้จริงของอัลบูมิน และพิจารณาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์พบว่า มีค่าสูงเกินกว่าเกณฑ์ยอมรับได้ จึงสรุปได้ว่าชนิดของผลิตภัณฑ์นี้ไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2 บรรจุภัณฑ์ชนิดหลอดพลาสติก

##### 4.4.2.1) การทวนซ้ำ

ตารางที่ 4.5 แสดงค่า %RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้บรรจุภัณฑ์แบบใหม่ (หลอดพลาสติก) โดยใช้บุคคลเดียวในการตรวจวัด

ครั้งที่	ความเข้มข้นที่แท้จริง (mg/L)	ความเข้มข้นที่ตรวจพบ (mg/L)
1	30	28.67
2		30.93
3		31.37
4		30.28
5		29.04
6		28.67
7		28.09
8		31.01
Mean	30.00	29.76
SD	-	1.28
%RSD	-	4.30

##### 4.4.2.2) การทำซ้ำ

ตารางที่ 4.6 แสดงค่า %RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้บรรจุภัณฑ์แบบใหม่ (หลอดพลาสติก) โดยใช้หลายบุคคลในการตรวจวัด

ครั้งที่	ความเข้มข้นที่แท้จริง (mg/L)	ความเข้มข้นที่ตรวจพบ (mg/L)
1	30	31.23
2		28.45
3		29.04
4		28.45
5		28.82
6		27.36
7		28.6
8		30.93
Mean	30.00	29.11
SD	-	1.31
%RSD	-	4.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการทวนซ้ำและการทำซ้ำพบว่า ความเข้มข้นของอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ในแต่ละครั้งมีค่าความเข้มข้นใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่แท้จริงของอัลบูมิน และพิจารณาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์พบว่ามีค่าที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จึงสรุปได้ว่าชนิดของผลิตภัณฑ์นี้เหมาะสมกับการนำมาใช้งานได้จริงต่อไป

#### 4.4.2.3) ค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ

ได้ศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับได้ พบว่าได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าร้อยละการคืนกลับของอัลบูมินที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของอัลบูมิน ( $\text{mgL}^{-1}$ )			Recovery (%)
	แรกเริ่ม	ที่เติมลงไป (30 mg/L)	ที่ตรวจพบ (30 $\text{mgL}^{-1}$ )	
1	N.D.*	31.66	31.16±1.46	101.60
2	N.D.*	30.33	31.16±1.46	97.33
3	N.D.*	30.22	31.16±1.46	96.95

จากตารางพบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับเมื่อตรวจวัดปริมาณอัลบูมินด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer มีค่าใกล้เคียง 100% จึงสามารถประยุกต์ใช้วิธีตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นนี้ในการหาปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ

#### 4.4.2.4) การทดสอบความถูกต้องของวิธี

ได้เปรียบเทียบผลการทดสอบจากวิธีดั้งเดิม (UV-VIS spectrophotometer) ชุดทดสอบแบบเดิม (การใช้ไซริงค์ในการดูดสารละลาย) และชุดทดสอบแบบใหม่ที่พัฒนาจากโครงการนี้ (การบรรจุสารภายในหลอดพลาสติก) พบว่าได้ปริมาณวิเคราะห์อัลบูมินดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่วิเคราะห์ด้วยวิธีที่ตรวจวัดด้วย UV-VIS spectrophotometer ชุดทดสอบเดิม และชุดทดสอบใหม่

ตัวอย่าง	ปริมาณอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ (mg L <sup>-1</sup> )		
	UV-VIS	ชุดทดสอบเดิม	ชุดทดสอบใหม่
1	36.3	41.16	34.71
2	37.28	31.28	33.90
3	37.18	28.51	32.80
4	37.42	29.90	32.51
5	38.80	26.47	36.69
Mean ( $\bar{X}$ )	37.39	31.46	34.12
SD	0.90	5.70	1.68
%RSD	2.40	18.13	4.94

หมายเหตุ :

ชุดทดสอบเดิม : การใช้ไซริงค์ในการดูดสารละลาย

ชุดทดสอบใหม่ : การบรรจุสารละลายลงหลอดพลาสติก

จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า การวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $F_{\text{stat}} = 3.66 < F_{\text{critical}} = 3.89$ ) จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำสูงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงการพิเศษนี้เป็นการพัฒนาชุดทดสอบสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ จากต้นแบบเดิมที่มีอยู่ให้เกิดความสะดวกในการใช้งานและสร้างมาตรฐานในการยอมรับการตรวจวิเคราะห์ของชุดทดสอบมากขึ้น ซึ่งการหาปริมาณอัลบูมินทำโดยการสร้างกราฟมาตรฐานในช่วงความเป็นเส้นตรง 1-40 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สมการเชิงเส้นเป็น  $Abs. = 0.0131[Albumin] + 0.05080$  มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.998 และทำการศึกษาความเสถียรของน้ำยาเคมีโดยเตรียมสารละลาย TBPE และสารละลายบัฟเฟอร์เก็บไว้แยกขวดกัน จากนั้นศึกษาความเสถียรของน้ำยาเคมีที่เตรียมเก็บไว้เปรียบเทียบกับน้ำยาเคมีที่เตรียมขึ้นมาใหม่โดยเมื่อนำน้ำยาเคมีทั้งสองสถานะมาทำปฏิกิริยากับอัลบูมินพบว่าน้ำยาเคมีมีความเสถียรไม่ว่าจะเตรียมเมื่อใช้งานหรือเตรียมเก็บไว้ใน การศึกษาอิทธิพลของการเจือจางปัสสาวะที่มีผลต่อการตรวจวัด ได้เลือกวิธีการ Spike Sample มาใช้ในการศึกษา โดยทำการเจือจางปัสสาวะด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 5, 10, 50, 100 เท่า และที่ไม่ทำการเจือจางปัสสาวะพบว่าปัสสาวะที่ไม่มีการเจือจาง มีค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับสูง ซึ่งอาจเป็นเพราะองค์ประกอบอื่นๆในตัวอย่าง (matrix) รบกวนการวิเคราะห์ แต่เมื่อมีการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับในแนวโน้มที่ใกล้เคียง 100 มากขึ้น จากการทดลองได้ข้อสรุปว่าการเจือจางปัสสาวะที่ 50 เท่าที่ให้ค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับ 98.29 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม ให้ผลการตรวจวัดที่ดี และสะดวกต่อการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นใหม่

การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะได้ทำการศึกษาอิทธิพลของชนิดของตัวเจือจางตัวอย่างปัสสาวะโดยทำการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำประปาจากนั้นทำการทดสอบด้วยการตรวจวัดเปรียบเทียบกับปัสสาวะที่ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนพบว่าความชันของกราฟมาตรฐานเมื่อนำน้ำประปาและใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นตัวเจือจางนั้นมีค่าไม่แตกต่างกัน จึงถือได้ว่าสามารถใช้น้ำประปาเป็นตัวเจือจางปัสสาวะแทนน้ำกลั่นปราศจากไอออนได้ โดยปราศจากการรบกวนจากสิ่งอื่นที่มีอยู่ในน้ำประปา

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความเที่ยงและความแม่นยำของชุดทดสอบ โดยการศึกษาเรื่องความเที่ยง จะใช้วิธีการทวนซ้ำ (Repeatability) เป็นการวัดที่ได้จากการวัดหลายๆครั้งในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน ซึ่งการวัดทั้งหมดต้องอยู่ภายใต้วิธีการวัด ผู้ทำการวัด รวมถึงสภาวะแวดล้อมเดียวกัน และการทำซ้ำ (Reproducibility) เป็นความสามารถในการแสดงค่าซ้ำ โดยการวัดครั้งหนึ่งๆ สามารถเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขดังต่อไปนี้ได้ เช่น วิธีการวัด ผู้วัด รวมถึงสภาวะแวดล้อมพบว่าการทดสอบในแต่ละครั้งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกันและมีค่า%RSD ของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยใช้เครื่อง UV-VIS spectrophotometer อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ส่วนในการศึกษาความแม่นยำของชุดทดสอบศึกษาโดยใช้การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินด้วยวิธีดั้งเดิม (UV-VIS spectrophotometer) ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าให้ค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับในช่วง 96.95-101.60%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ท้ายสุดนี้เป็นการทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผลวิเคราะห์ที่ได้จากชุดทดสอบที่มีการพัฒนาขึ้น (การบรรจุสารละลาย TBPE และ บัฟเฟอร์ ภายในหลอดพลาสติก) กับชุดทดสอบแบบเดิม (การใช้ไซริงค์ในการดูดสารละลาย) ซึ่งทั้งสองวิธีนี้จะใช้การวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณอัลลูมิเนียมด้วยแอฟฟลิคชันโนโทรคัพที่มีถือ แต่วิธีดั้งเดิมจะใช้ UV-VIS spectrophotometer ในการวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณอัลลูมิเนียม พบว่าการทดสอบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก 3 วิธี มีค่า  $F_{stat} = 3.66 < F_{critical} = 3.89$  ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จึงกล่าวได้ว่าทั้ง 3 วิธี ให้ผลวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสรุปได้ว่าชุดทดสอบแบบใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้นในโครงการนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำสูง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. Cuvette ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วควรทำการล้างให้สะอาดก่อนการใช้งานครั้งต่อไปเพราะจะทำให้ค่าที่วัดได้มีการคลาดเคลื่อน
2. ในการเตรียมสารเคมีต่างๆควรสวมถุงมือเพื่อป้องกันไม่ให้สารเคมีสัมผัสผิวหนังซึ่งอาจเป็นอันตรายได้
3. สารละลาย TBPE เป็นสารละลายประเภทระเหยง่าย ดังนั้นควรมีการป้องกันด้วยการปิดฝีกออุปกรณ์ที่ใช้ในระหว่างทำการผสม
4. ในการถ่ายรูปควรถ่ายในสถานที่ที่มีแสงสว่างเพียงพอ

## เอกสารอ้างอิง

- [1] รัตนาวดี กลั่นเรืองแสง และคณะ, โครงการงานพิเศษ ปีการศึกษา2556. การหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้ชุดทดสอบภาคสนามและตรวจวัดด้วยแอปพลิเคชันบนโทรศัพท์มือถือ
- [2] การเกิดปัสสาวะ.  
[online].Available: <http://sgpt.thai-aip.net/subjects/microscopy/urinalysis.html>;  
Search: 11 May 2015.
- [3] ส่วนประกอบของปัสสาวะ, วิธีการตรวจปัสสาวะ. [online].Available:  
[http://www.siamhealth.net/public\\_html/Health/Lab\\_interprete/ua.htm](http://www.siamhealth.net/public_html/Health/Lab_interprete/ua.htm);  
Search: 11 May 2015.
- [4] ณัฐวุฒิเชิงชั้น, 2556. การวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลวและตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสีย้อม,วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบังปีที่ 22 ฉบับที่ 2, หน้า 115-136
- [5] โปรตีนอัลบูมิน.[online]. Available:  
<http://www.livewellnutritions.com/index.php/>;  
Search: 10 May 2015.
- [6] วิธีการตรวจอัลบูมินในปัสสาวะ.  
[online].Available:<http://www.thailabonline.com/urine.htm>;  
Search: 11 May 2015.
- [7] โรคไต. [online].Available:  
[http://www.siamhealth.net/public\\_html/index0/k\\_index.htm](http://www.siamhealth.net/public_html/index0/k_index.htm);  
Search:10 May 2015.
- [8] ชุดทดสอบภาคสนาม.[online]. Available:  
<http://www.nstda.or.th/nstda-knowledge/18895-test-kit>;  
Search: 11 May 2015.
- [9] ระบบสี. [online]. Available:  
[http://lpruofteng.blogspot.com/2012/04/blog-post\\_04.html](http://lpruofteng.blogspot.com/2012/04/blog-post_04.html);  
Search: 12 May 2015.
- [10] ความละเอียดของการแสดงผลสีบนหน้าจอโทรศัพท์,ความแตกต่างของระดับสีในการแสดงผลบนหน้าจอโทรศัพท์สี. [online]. Available:  
<http://www.thaimobilecenter.com/>; Search: 12 May 2015.
- [11] Kanchana W., Tadao S., Norio T., Shuji K., and Kate G.,  
Successive determination of urinary protein and glucose using spectrophotometric sequential injection method, J. Flow Injection Anal., 24(2007), No.1, pp. 23–26.

- [12] Coskun A.F., Nagi R., Sadeghi K., Phillips S., and Ozcan A.,  
Albumin testing in urine using a smart-phone, Lab on a chip,21(2013),pp.  
4231-4238.
- [13] An-Sofie C.D., Tom F., Joris P., and Joris R. D.,  
A sensitive quantitative test strip based point-of-care albuminuria screening  
assay, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 50(2012),pp. 673-678.
- [14] นางสาวจุฑามาศ จำปี และคณะ, โคร่งงานพิเศษ ปีการศึกษา2553.  
**ชุดทดสอบอัลบูมินเบื้องต้น**
- [15] นางสาวอรฉัตร เลิศอิทธิพร และคณะ, โคร่งงานพิเศษ ปีการศึกษา 2552.  
**ชุดทดสอบภาคสนามสำหรับวินิจฉัยโรคไต**
- [16] Christopher L., Cassano Z. and Hugh F.,  
Laminated paper-based analytical devices (LPAD):fabrication, characterization  
and assays.Analyticachimicaacta, 15(2013), pp. 173-181.
- [17] Yuwadee B. and Wanida L.,  
A microfluidic paper-based analytical device for the assay of albumin-  
corrected fructose amine values from whole blood  
samples,Bioanalysis,8(2013), pp.79-90.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### 1. การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การหาค่า SD คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

เมื่อ  $\bar{x}$  คือ ความเข้มข้นเฉลี่ย  
 $x_i$  คือ ความเข้มข้นที่หาได้  
 $n$  คือ จำนวนครั้งในการทำซ้ำ

### 2. การคำนวณค่าการคืนกลับ (%Recovery) อัลบูมิน

2.1

ตารางที่ ก.1 แสดงอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่าง Spiked Sample ในการวิเคราะห์หาปริมาณ อัลบูมิน

อัตราส่วนการเจือจาง สารตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง		ค่าการดูดกลืนแสง - blank	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
5	0.9454	0.9380	0.5872	0.5772
10	0.8898	0.8856	0.5316	0.5248
50	0.8189	0.8135	0.4607	0.4527
100	0.7829	0.7780	0.4247	0.4172
ไม่เจือจาง	1.0003	0.9968	0.6421	0.6360

จากสมการเส้นตรง  $y = 0.013x + 0.050$  และค่าดูดกลืนแสงที่ได้ นำมาสู่การคำนวณหาความเข้มข้นของ Spiked Sample ได้ดังนี้

ที่อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างเป็น 5 เท่า ครั้งที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสง - blank ของ Spiked Sample = 0.5872

จากสมการเส้นตรง  $y = 0.013x + 0.050$

จะได้  $0.5872 = 0.013x + 0.050$

$x = 41.32 \text{mgL}^{-1}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 แสดงอิทธิพลของการเจือจางตัวอย่าง Sample ในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมิน

อัตราส่วนการเจือจาง สารตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง		ค่าการดูดกลืนแสง - blank	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
5	0.4357	0.4245	0.0775	0.0637
10	0.3873	0.3974	0.0291	0.0366
50	0.3776	0.3664	0.0194	0.0056
100	0.3614	0.3561	0.0032	-0.0047
ไม่เจือจาง	0.4981	0.4899	0.1399	0.1291

ที่อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างเป็น 5 เท่า ครั้งที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสง- blank ของ Sample = 0.0755

จากสมการเส้นตรง  $y = 0.013x + 0.050$

จะได้  $0.0755 = 0.013x + 0.050$

$x = 2.11 \text{ mgL}^{-1}$

สารละลายมาตรฐานอัลบูมินที่ความเข้มข้น  $30 \text{ mgL}^{-1}$  วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.4577

จากสมการเส้นตรง  $y = 0.013x + 0.050$

จะได้  $0.4577 = 0.013x + 0.050$

$x = 31.36 \text{ mgL}^{-1}$

$$\% \text{Recovery} = \frac{(\text{Spiked sample} - \text{Control sample})}{\text{Std.}} \times 100$$

$$= \frac{41.32 - 2.11}{31.36} \times 100$$

$$= 125.0 \%$$

**หมายเหตุ :** สำหรับการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ 10, 50, 100 เท่า และที่ไม่ทำการเจือจาง  
ใช้การคำนวณเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### ชุดทดสอบอัลบูมินต้นแบบที่ 2

ชุดทดสอบอัลบูมินเบื้องต้น (Albumin Smart Test) สามารถช่วยคัดกรองความเสี่ยงของไตในระยะเบื้องต้นได้โดยการหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่อาศัยปฏิกิริยาระหว่างอัลบูมินและรีเอเจนต์ทำให้เกิดเป็นสารละลายที่มีสี ซึ่งจะทำการตรวจวัดและประมวลผลโดยใช้แอปพลิเคชันในโทรศัพท์มือถือแล้วรายงานออกมาในรูปปริมาณอัลบูมินหน่วย (mg/L) ซึ่งจะสามารถบ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของไตได้ในคนปกติ จะพบปริมาณอัลบูมินไม่เกิน 30 mg/L แต่ในผู้ป่วยโรคไตระยะเริ่มแรกจะมีการตรวจพบอัลบูมินในปัสสาวะตั้งแต่ 30 mg/L ขึ้นไปหรือที่เรียกว่าภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (Microalbuminuria)

### อุปกรณ์

ใน 1 ชุดทดสอบประกอบด้วย

1. ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุปัสสาวะจำนวน 1 ขวด
2. ขวดพลาสติกสำหรับเจือจางปัสสาวะจำนวน 1 ขวด
3. น้ำยาทดสอบจำนวน 5 ชุด
4. ไชริงค์สำหรับดูดปัสสาวะจำนวน 1 กระบอก
5. ไชริงค์สำหรับดูดตัวอย่างปัสสาวะที่เจือจางแล้ว 1 กระบอก
6. ภาพขณะผสมสาร
7. คู่มือการใช้งาน

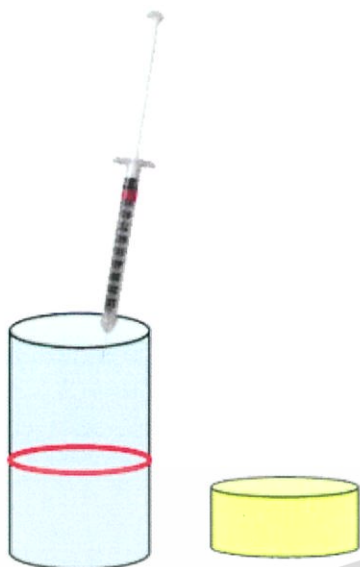
วิธีการใช้ชุดทดสอบ (How to use Test kit)

การเตรียมตัวอย่าง (Sample Preparation)



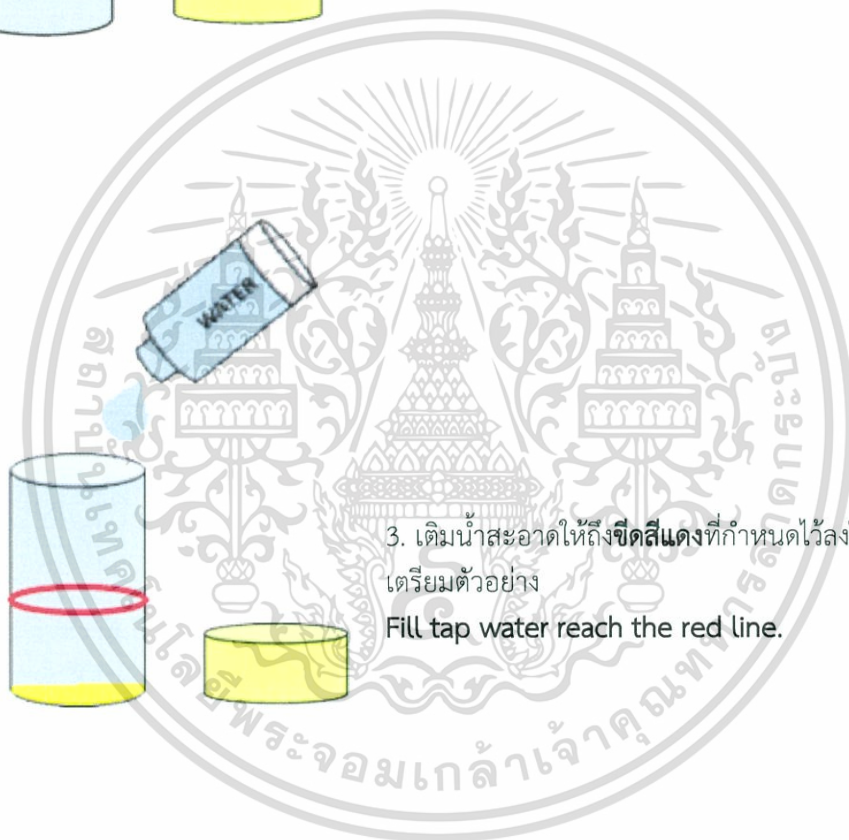
1. เก็บตัวอย่างปัสสาวะที่ต้องการตรวจสอบใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง  
Collect urine sample in container.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



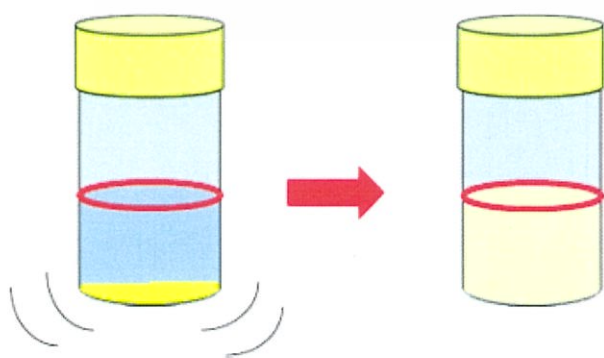
2. ใช้ไซริงจ์ดูดปัสสาวะให้ถึงขีดสีแดงที่กำหนดไว้ (0.5 ml) ฉีดลงในขวดเตรียมตัวอย่าง

Pull a syringe reach the red line (0.5 ml) to fill the urine into the sample prepared bottle.



3. เติมน้ำสะอาดให้ถึงขีดสีแดงที่กำหนดไว้ลงในขวดเตรียมตัวอย่าง

Fill tap water reach the red line.

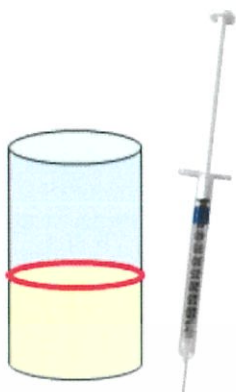


4. ปิดฝา และเขย่า

Tighten cap and shaking the bottle.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การทดสอบ (Test procedure)



1. ใช้ไซริงค์ดูดปัสสาวะที่เจือจางแล้วให้ถึงขีดสีน้ำเงิน (0.5 ml) ใส่ในภาชนะผสมสารหลุมที่ 1

Pull a syringe reach the blue line (0.5 ml) to fill the diluted urine sample into the first side of container.

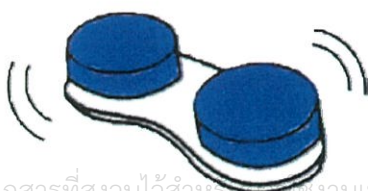
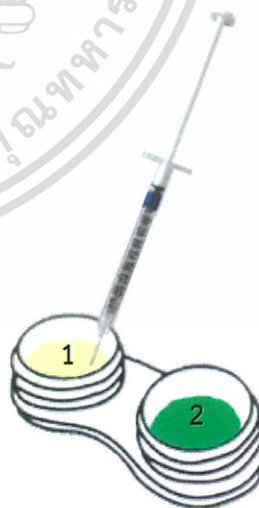


2. ตัดหลอดพลาสติกที่บรรจุสารละลาย TBPE และบัฟเฟอร์ เทใส่ในภาชนะผสมสารหลุมที่ 2

Cut off the tips of ampule (TBPE, Buffer) then pour them into the number 2 on side of container.

3. เทปัสสาวะที่เจือจางแล้วใส่ในภาชนะผสมสารหลุมที่ 1 เล็กน้อย

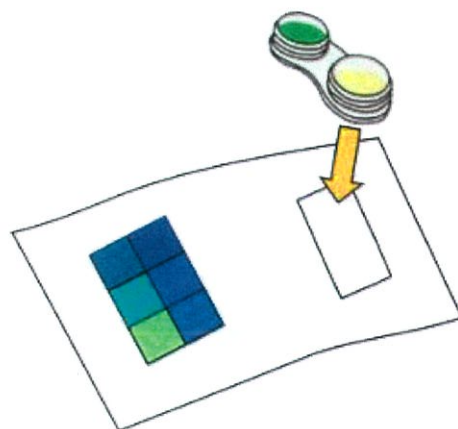
Fill a few of diluted urine sample into the number 1 side of container.



4. ปิดฝา เขย่าเล็กน้อย  
Tighten cap and shaking.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. วางภาชนะผสมสารลงบนกระดาษรอง  
สำหรับถ่ายรูป ให้ตรงกับตำแหน่งที่กำหนดไว้  
Place the container on the location on paper.



### วิธีการใช้แอปพลิเคชัน (How to use application)

1. เปิด แอปพลิเคชัน “Albumin smart test”  
Open “Albumin smart test” application.

2. กดปุ่ม  เพื่อเริ่มทดสอบ

- Press  for testing.

3. วางหน้าจอของโทรศัพท์หรือแท็บเล็ต ให้ตรงกับตำแหน่งที่กำหนดไว้บนกระดาษ  
Put the mobile or tablet into the marker area on paper.

4. กด  เพื่อถ่ายรูป

- Press  for take a photo.

5. กด  เพื่ออ่านค่าการทดสอบ

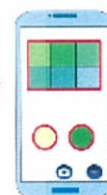
- Press  for get the result.

6. กด  เพื่อบันทึกผลการทดสอบ

- Press  for save the result.

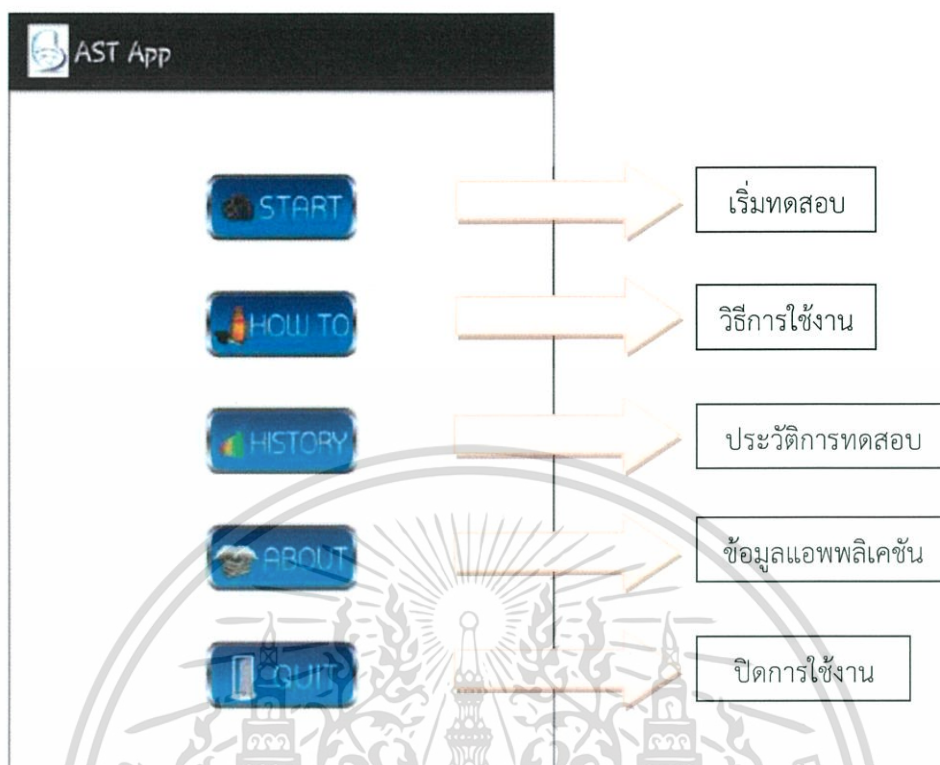
7. กด  เพื่อกลับสู่หน้าจอเริ่มต้น

- Press  for back to home page.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เมนูต่างๆในแอปพลิเคชัน



### การประเมินผล

ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะ (mg/L)	ระยะ	ผลการประเมิน
< 30	Normal	ปกติ
>30	Microalbuminuria	ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย*

\*ควรได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์อีกครั้ง

### ข้อบ่งชี้

- ผลการประเมินอาจมีการคลาดเคลื่อนทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพฤติกรรมกรบริโภคของแต่ละบุคคลหากพบว่าผลการประเมินของท่านอยู่ในภาวะไมโครอัลบูมินูเรียควรไปพบแพทย์เพื่อได้รับการรักษาต่อไป
- แม้ว่าชุดทดสอบนี้จะมีคามเที่ยงตรงแต่ในบางครั้งอาจเกิดความผิดพลาดจากเทคนิคและวิธีการทดสอบหรือถูกรบกวนจากสารต่างๆในปัสสาวะทำให้ผลที่ได้ผิดไป

### การเก็บรักษา

- ควรเก็บชุดทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องให้พ้นจากแสงแดด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### 1. การประมาณฟังก์ชันเลขชี้กำลังหรือฟังก์ชันเอ็กซ์โพเนนเชียล

ฟังก์ชันเลขชี้กำลังถูกใช้เพื่อจำลองความสัมพันธ์เมื่อการเปลี่ยนแปลงคงตัวในตัวแปรอิสระทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตามสัดส่วนเดียวกันในตัวแปรตาม



รูปกระจายแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมการทั่วไป  $y = ab^x$  หรือ  $\log y = \log a + x \log b$

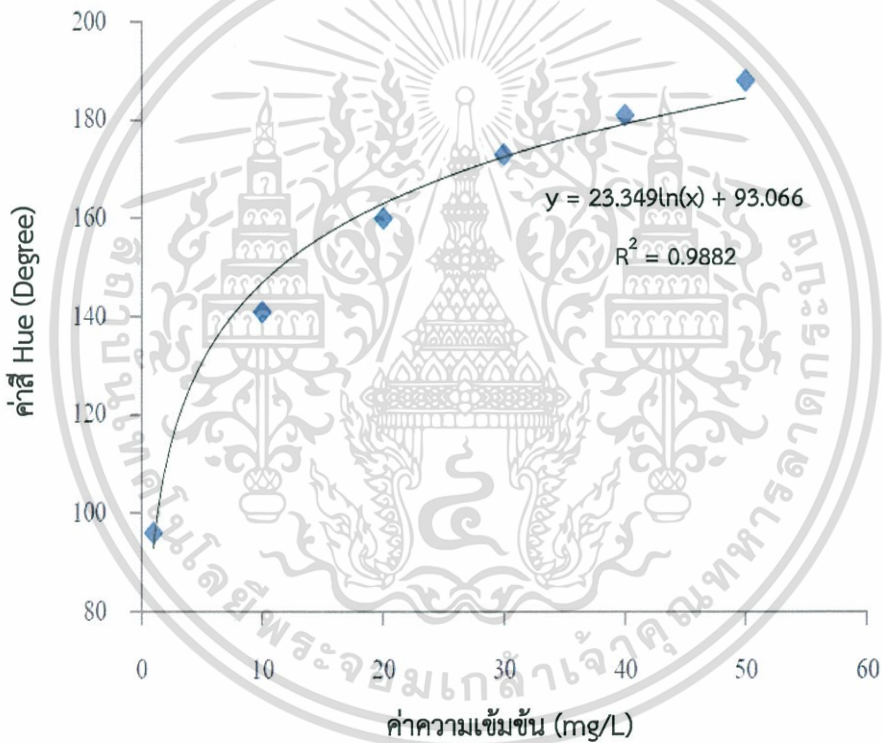
สมการปกติคือ

$$\sum_{i=1}^n \log y_i = n \log a + (\log b) \sum_{i=1}^n x_i \dots\dots\dots(1)$$

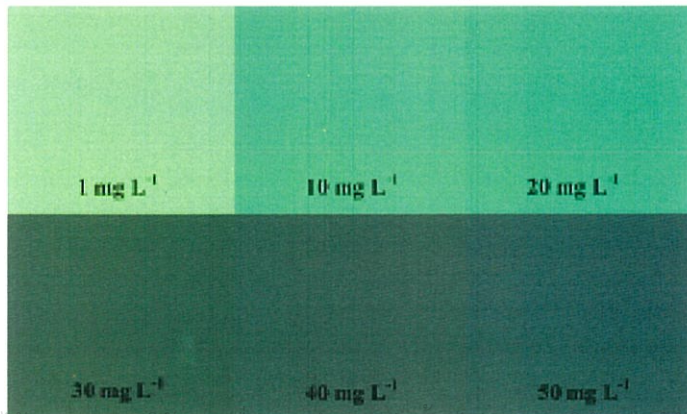
$$\sum_{i=1}^n x_i \log y_i = (\log a) \sum_{i=1}^n x_i + (\log b) \sum_{i=1}^n x_i^2 \dots\dots\dots(2)$$

โดยที่ c และ b เป็นค่าคงที่ และ e เป็นฐานของลอการิทึมธรรมชาติ มีค่าประมาณ 2.718281828

2. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้แอปพลิเคชันในโทรศัพท์มือถือ



นำค่าสีที่เลือกแล้วมาทำเป็นแถบสีมาตรฐานดังนี้

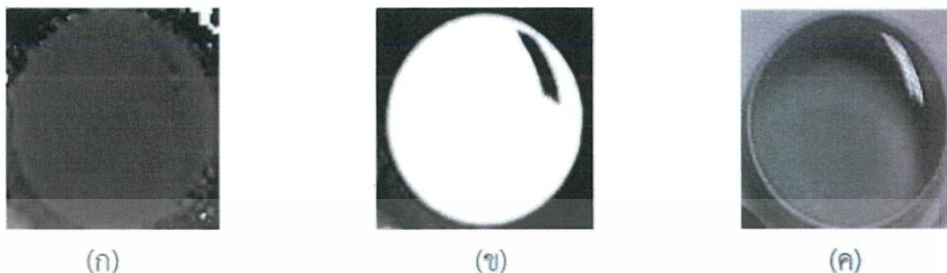


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. หลักการตัดเงาในภาพ

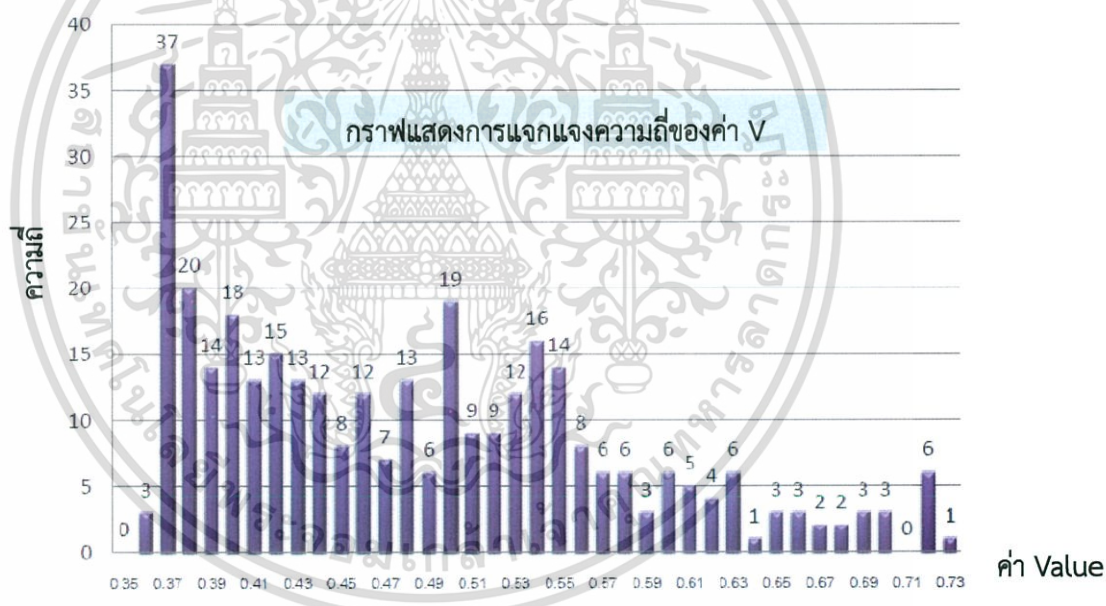
3.1 แปลงรูปภาพจากระบบสี RGB เป็นระบบสี HSB

3.2 แยกรูปภาพออกเป็นภาพค่าสี (hue) , ความสว่าง (lightness) และความบริสุทธิ์ของสี (saturation) ดังรูป



รูปแสดงรูปภาพในระบบสี HSB โดยแบ่งภาพออกเป็น  
(ก) ค่าสี (ข) ความสว่าง (ค) ความบริสุทธิ์ของสี

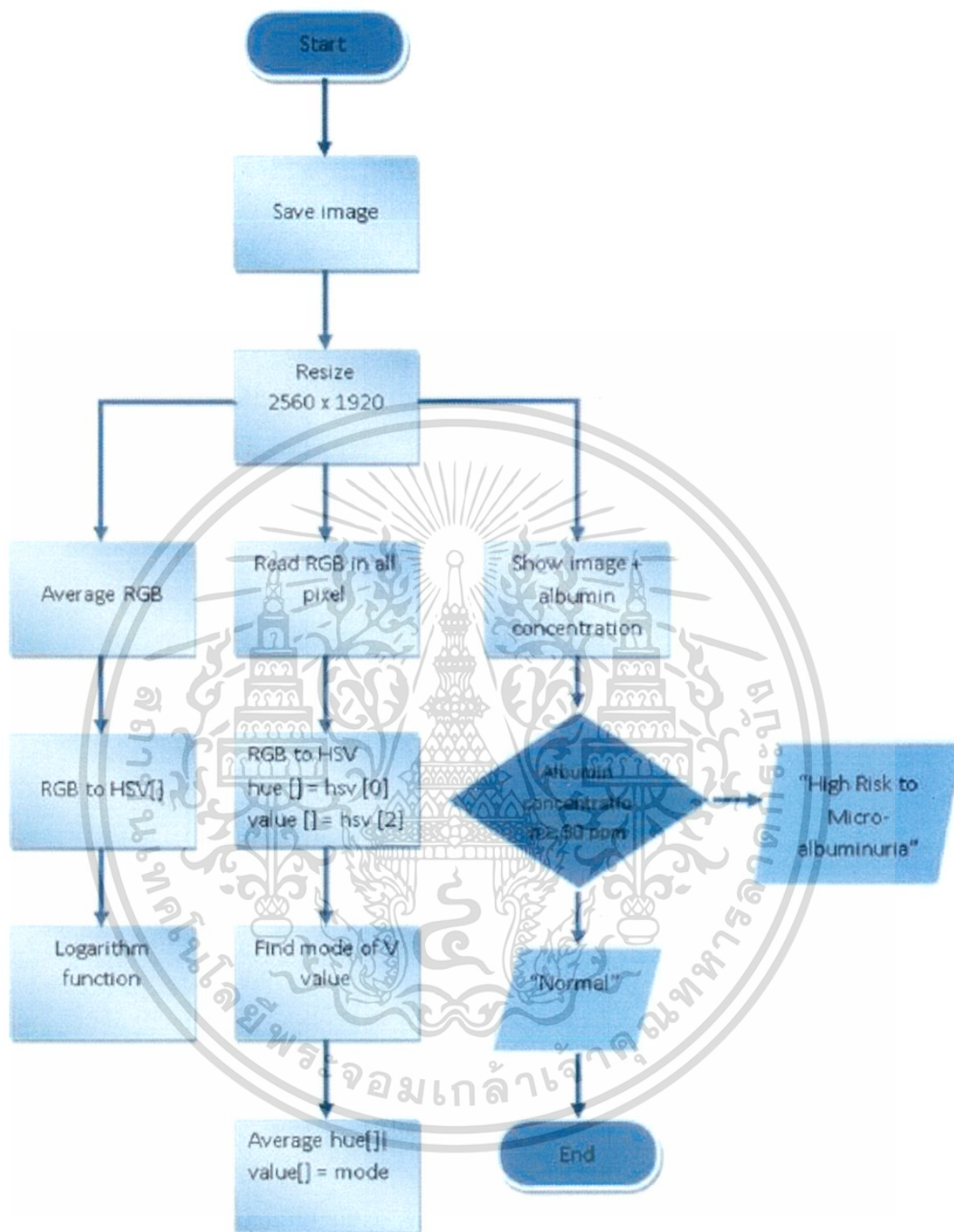
3.3 เลือกใช้ภาพที่แสดงค่าความสว่างของสี (Value) มาอ่านค่าความสว่างของสีในทุกๆ พิกเซล



3.4 เลือกเฉพาะพิกเซลที่มีค่าความสว่างของสีใกล้เคียงกันนำมาอ่านค่าค่าสี (Hue) แล้วนำค่าสีไปเฉลี่ยเพื่อหาค่าสีที่ไม่มีเงามารบกวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การคำนวณความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะโดยแอปพลิเคชันในโทรศัพท์มือถือ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง.1 แสดงค่าการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินด้วยการใช้เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer, Ampule และ Syringe

	UV-Vis	Ampule	Syringe
	36.3	34.71	41.16
	37.28	33.90	31.28
	37.18	32.80	28.51
	37.42	32.51	29.90
	38.80	36.69	26.47
$\bar{X}$	37.39	34.12	31.46
SD	0.90	1.68	5.70
%RSD	2.40	4.94	18.13

ตารางที่ ง.2 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ ANOVA

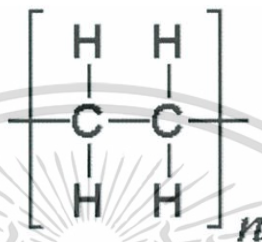
Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
UV-VIS	5	186.965	37.393	0.805258		
Ampule	5	170.602	34.1204	2.838427		
Syringe	5	157.3195	31.4639	32.54237		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	88.20188	2	44.10094	3.656183	0.057554	3.885294
Within Groups	144.7442	12	12.06202			
Total	232.9461	14				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

### 1. บรรจุภัณฑ์พลาสติก [11]

High Density Polyethylene เรียกว่า HDPE เป็นพลาสติกประเภทพอลิเอทิลีน (polyethylene, PE) ที่มีค่าความหนาแน่นสูง การเรียงตัวของโมเลกุลจะมีกึ่งกันมาก มีความหนาแน่นมาก HDPE มีความหนาแน่นประมาณ  $0.941-0.965 \text{ g/cm}^3$  นิยมใช้กันมากในการผลิตบรรจุภัณฑ์พลาสติก เช่น ขวด ถัง ถาด ถังที่ต้องการความแข็งแรงแต่ไม่ต้องการความใสมากนัก



สูตรโครงสร้างทางเคมีของ HDPE

พอลิเอทิลีนผลิตจากแก๊สเอทิลีนที่ผ่านกระบวนการเติมสารที่ทำให้สามารถจับตัวกันเป็นพอลิเมอร์ได้ ภายใต้แรงดันขนาดต่างๆ ทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีขนาดตั้งแต่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (ลักษณะเป็นน้ำมันหรือไขข้น) ไปจนถึงขนาดโมเลกุลสูง (ลักษณะเป็นของแข็งที่ยืดหยุ่นได้)

#### 1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

HDPE มีโครงสร้างทางเคมีที่เป็นกิ่งสาขา (branching) น้อย มีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ค่อนข้างสูง มีความแข็งแรง เมื่อความหนาแน่นสูงขึ้นจะทำให้ความแข็งแรงและความเหนียวเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความหนาแน่นลดลง จะทำให้ผิวแตกกร้าวได้ง่าย ทนความร้อนได้ไม่มากนัก แต่ทนสารเคมีได้ดี ซึ่งจะทนความร้อน (ทนอุณหภูมิสูงถึง  $110^{\circ}\text{C}$  ถึง  $120^{\circ}\text{C}$  ได้ในช่วงสั้นๆ) แต่ไม่สามารถทนอุณหภูมิสูงในหม้ออัดไอน้ำ (Autoclave) เท่าพลาสติกชนิด PP (Polypropylene, สัญลักษณ์เลข 5) และทนต่อสารเคมีมากกว่า LDPE (Low-density polyethylene, สัญลักษณ์เลข 4) ทนต่อสภาพอากาศได้ดีพอสมควร แต่อากาศสามารถซึมผ่านได้

HDPE มีสีขาวขุ่น โปร่งแสง มีความลื่นมันในตัว มีความเหนียวและยืดหยุ่น ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส มีความหนาแน่นต่ำกว่าน้ำจึงลอยน้ำได้ สามารถผสมให้มีสีต่างๆ ได้

#### 1.2 ความเป็นมา

พอลิเอทิลีน (Polyethylene หรือ Polythene) ถูกค้นพบในปี 1933 โดย Reginald Gibson and Eric Fawcett บริษัท Imperial Chemical Industries (ICI) ในประเทศอังกฤษ วัสดุประเภทนี้มี 2 รูปแบบคือ LDPE และ HDPE โดย LDPE ใช้ผลิตแผ่นฟิล์มและวัสดุสำหรับบรรจุหีบห่อ ส่วน HDPE มีความแข็งแรงกว่า ใช้ผลิตบรรจุภัณฑ์ ท่อน้ำ และอุปกรณ์ยานยนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HDPE เป็นวัสดุประเภท Polyethylene Thermoplastic (Thermoplastic คือพลาสติกที่สามารถนำกลับมาหลอมใช้ใหม่ได้) ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม จัดเป็นพลาสติกที่ได้รับสัญลักษณ์เลข 2 ซึ่งหมายถึง Resin Identification Code 2 เพื่อความสะดวกสำหรับการจำแนกชนิดของพลาสติกในการนำกลับไปเวียนทำใหม่ (recycled)

ในปี 1945 Earl Tupper แห่งบริษัท DuPont<sup>®</sup> สังเกตว่าพอลิเอทิลีนเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีความเหนียว ทนทาน สามารถนำมาหล่อในแบบพิมพ์ให้มีขนาด รูปร่าง และผสมสีให้มีสีต่าง ๆ ได้ จึงเริ่มด้วยการผลิตแก้วน้ำพลาสติก และชามอ่าง ซึ่งได้รับความนิยมเนื่องจากมีน้ำหนักเบา สีสน่าใช้ และต่อมาได้ผลิตภาชนะที่มีฝาปิดได้ด้วย ซึ่งเป็นที่มาของภาชนะบรรจุอาหารที่ได้รับความนิยมจากแม่บ้านในสมัยนั้น ในชื่อของทัปเปอร์แวร์ (Tupperware<sup>®</sup>)

### 1.3 การใช้งาน

HDPE ทนทานต่อสารเคมีและตัวทำละลายหลายชนิด มีความยืดหยุ่นต่อแรงกระแทกแตก ไม่แตกง่าย สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานต่าง ๆ โดยเฉพาะการผลิตภาชนะบรรจุที่เตรียมจากการเป่าจากแม่พิมพ์ (blow molding) เนื่องจากหดตัวในแม่พิมพ์ได้ดีมาก ไม่ติดแม่พิมพ์ ทำให้ถอดออกจากแม่พิมพ์ได้ง่าย ภาชนะที่ผลิตจาก HDPE เช่น ขวดบรรจุนมสด ขวดบรรจุน้ำยาซักผ้า ถังบรรจุน้ำมันในยานยนต์ ท่อประปา โตะ-เก้าอี้พับได้ ถังพลาสติก ฯลฯ นอกจากนี้ HDPE ยังใช้ในการบุพื้นบ่อฝังกลบขยะเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารเคมีลงสู่พื้นดินและแหล่งน้ำธรรมชาติ

### 1.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ทำจาก HDPE

- ขวดน้ำดื่ม ขวดบรรจุนม ถาดทำน้ำแข็ง
- ภาชนะ กล่อง กระจุกบรรจุอาหาร กระจุกยาและวิตามิน
- ขวดใส่สารเคมี ขวดสบู่เหลว (ขวดปั๊ม) ขวดน้ำยาซักผ้า กระจุกป้องกัน
- ถังและกล่องบรรจุสินค้า ถังใส่ของ
- ฉนวนไฟฟ้า



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

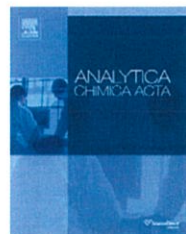


ELSEVIER

available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



# Successive determination of urinary protein and glucose using spectrophotometric sequential injection method

Kanchana Watla-iad<sup>a,b</sup>, Tadao Sakai<sup>a,\*</sup>, Norio Teshima<sup>a</sup>,  
Shuji Katoh<sup>c</sup>, Kate Grudpan<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology, 1247 Yachigusa, Yakusa-cho, Toyota 470-0392, Japan

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

<sup>c</sup> Murakami Memorial Hospital, Asahi University, Hashimoto-cho, Gifu 500-8523, Japan

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 15 August 2007

Received in revised form

5 October 2007

Accepted 8 October 2007

Published on line 13 October 2007

### Keywords:

Sequential injection

Spectrophotometry

Successive determination

Urinary protein and glucose

Ion association with tetrabromophenolphthalein ethyl ester

Catalytic reaction

Screening for diabetic

## ABSTRACT

A new sequential injection (SI) system with spectrophotometric detections has been developed for successive determination of protein and glucose. The protein assay is based on ion-association of protein with tetrabromophenolphthalein ethyl ester (TBPE) in the presence of Triton X-100 at pH 3.2. The blue product is monitored for absorbance at 607 nm. For glucose, hydrogen peroxide, generated by the oxidation of glucose in the presence of glucose oxidase immobilized on glass beads packed in a minicolumn, is monitored using iron-catalyzed oxidation reaction of *p*-anisidine to form a red colored product (520 nm). The SI procedure takes advantage in performing the protein assay during the incubation period for glucose oxidation. Linear ranges were up to 10 mg dL<sup>-1</sup> human serum albumin (HSA) with a limit of detection (LOD) ( $3\sigma$ ) of 0.3 mg dL<sup>-1</sup>, and up to 12.5 mg dL<sup>-1</sup> glucose with LOD of 0.08 mg dL<sup>-1</sup>. R.S.D.s ( $n=11$ ) were 2.7% and 2.5% (for 1 mg dL<sup>-1</sup> and 5 mg dL<sup>-1</sup> HSA) and 1.4% (9 mg dL<sup>-1</sup> glucose). Sample throughput for the whole assay of both protein and glucose is 6 h<sup>-1</sup>. The automated system has been demonstrated for the successive assay of protein and glucose in urine samples taken from diabetic disease patients, with good agreement with the other methods. This developed SI system is an alternative automation for screening for diabetic diagnosis.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Proteins synthesized in the liver are building blocks for all body parts. Usually, most proteins are too big to pass through kidneys' filters into urine unless the kidneys are damaged. Therefore, appearance of proteins in urine is an important indicator to proteinuria. Over 30% of patients who started undergoing artificial dialysis in Japan in 2000 were the result

diabetic nephropathy [1], and diabetes is closely related to kidney failure. Hence, urinary glucose, which also is an important indicator to diabetes, should be monitored for diagnosis of renal disease.

For semi-quantitative assay of protein and glucose in the clinical laboratory [2], a strip of specially treated paper with dyestuff is commonly used for convenient and rapid examination. The color appearance on the urine test paper relates to

\* Corresponding author. Tel.: +81 565 48 8121; fax: +81 565 48 0076.

E-mail address: tadsakai@aitech.ac.jp (T. Sakai).

0003-2670/\$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2007.10.010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the amount of abnormal values in urine. However, it does not offer accurate analytical values and the determinable range is rough. Therefore, simultaneous and automated protein and glucose quantification in clinical diagnosis requires a method that is more accurate for screening.

Protein dye-binding assays are simple, rapid and becoming increasingly popular for the clinical determination of the total protein. Bromophenol blue was proposed for a simple spectrophotometric determination of urinary albumin [3,4]. Fujita et al. reported highly sensitive spectrophotometric methods for urinary protein with dye-metal complexes and micelle media [5–9]. Simple and rapid analytical methods with bromochlorophenol blue were proposed for protein detection [10,11]. However, the methods mentioned above are manual and consume large amounts of reagents.

Flow injection analysis proposed by Ruzicka and Hansen is a versatile and convenient technology for clinical and pharmaceutical analysis [12]. A highly sensitive flow injection method was proposed for the determination of proteins using Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) [13]. Zaia et al. found that total protein obtained by using the Bradford method was not statistically different ( $p > 0.05$ ) from the results obtained by the Biuret standard method [14]. However, a short linear range for the calibration graph was offered by this method.

Sakai et al. have reported that tetrabromophenolphthalein ethyl ester (TBPE) anion has a larger molar absorptivity ( $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), comparing with bromophenol blue and bromocresol green [15]. Fortunately, it was found that TBPEH dissolved in the micelle formed by adding Triton X-100. Consequently, it is possible to use TBPEH as a chromogenic reagent for the protein–TBPE associate formation. In a previous paper [16], TBPEH in the micelle was applied to the FIA procedure for the protein determination at less than  $1 \text{ mg dL}^{-1}$  level.

Glucose can be determined using *o*-toluidine by batchwise [17] and/or on-line procedure [18], but it requires heating. Glucose oxidase is widely used for quantitative analysis of glucose in body fluids [19,20] due to selectivity, but it is a tedious method.

Flow injection determination of glucose using glucose oxidase (GOD) immobilized on controlled porosity glass (CPG) was reported [21–23]. Hydrogen peroxide generated by the oxidation of glucose in the presence of GOD was monitored using an iron-catalyzed oxidative coupling of 4-aminoantipyrine with *N,N*-dimethylaniline [23]. While FIA shows some advantages for practical analyses, because of the continuous flow of the reagents it still consumes relatively high amounts of reagents, resulting in higher amount of laboratory waste in comparison to the second generation, sequential injection analysis (SIA).

We recently found that vanadium acted as a catalyst for the oxidation of *p*-anisidine by bromate [24]. Furthermore, preliminary experiments in this paper reveal that iron has a catalytic effect on the oxidation of *p*-anisidine by hydrogen peroxide and that this catalytic reaction is useful for an alternative indicator reaction of glucose. As a result, we propose here a new automated sequential injection method for successive determination of protein with TBPE and glucose based on the new catalytic reaction by iron in urinary samples. This should be useful to diagnostic screening for diabetic disease.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

All chemicals used were of analytical-reagent grade and were used without further purification. The DI water used throughout the experiments was purified by an Advantec GSH-210 apparatus.

Stock standard solutions were of human serum albumin (HSA) ( $100 \text{ mg dL}^{-1}$ ) using MW: 66,000, Seikagaku Kogyo and glucose ( $180 \text{ mg dL}^{-1}$ ) prepared by dissolving D-(+)-glucose (Nakarai Chemicals Co., Osaka) in water with standing for at least 12 h before use, to ensure mutarotation equilibrium. Working standard solutions were obtained by mixing the HSA and glucose stock solutions for appropriate concentrations.

Stock solutions of TBPE ( $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) and Triton X-100 (0.5%, w/v) were prepared by dissolving tetrabromophenolphthalein ethyl ester potassium salt (MW: 700, Tokyo Kasei, Tokyo) in ethanol and *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol (Sigma Chemical) in water, respectively.

A *p*-anisidine solution (0.1 M) was prepared by dissolving *p*-anisidine (Wako Pure Chemical Co., Japan) in water.

An iron(II) stock solution (0.1 M) was obtained by dissolving iron(II) sulphate (MW: 278.01, Wako Pure Chemical Co.) in 0.005 M sulfuric acid.

Buffer solutions were prepared by adding acetic acid in 0.5 M sodium acetate solution to adjust pH values to be 3.2 and 4.5 for protein and glucose assay, respectively.

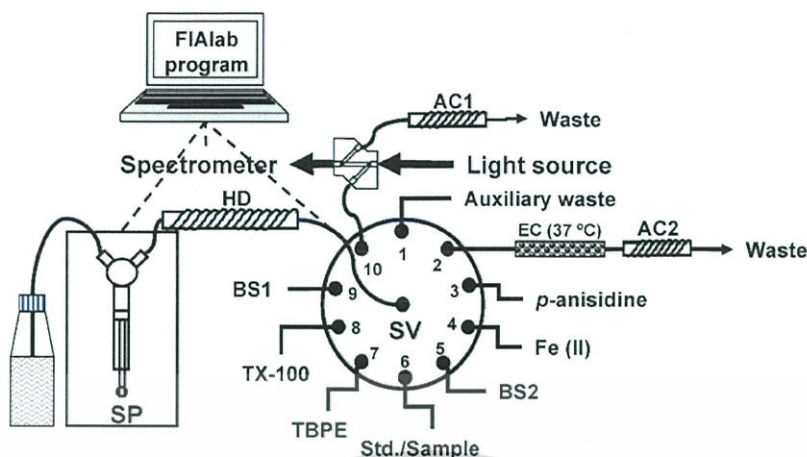
Controlled porosity glass beads (200–400 mesh size, 182 Å mean pore size) were obtained from Sigma Chemical Company. Glucose oxidase (E.C.1.1.3.4) from *Aspergillus sp.* ( $200 \text{ U mg}^{-1}$ ) was obtained from Roche Diagnostics, USA. A working solution of glucose oxidase was obtained by dissolving the enzyme in phosphate buffer (4 C, pH 7.0) and with suitable dilution. Aqueous aminoalkylating agent (10%) was prepared by adding 5.2 mL of 3-aminopropyltriethoxysilane (99%, Acros organics) to 50 mL of water and the pH was carefully adjusted to 3.45 with hydrochloric acid. The cross-linking agent (2.5%) was prepared by adding 2.5 mL of glutaraldehyde (50%, Kanto Kagaku Co., Japan) to 50 mL of water.

### 2.2. Apparatus

A schematic diagram of the SI system for successive analysis of protein and glucose in urine samples is shown in Fig. 1. The flow lines were of Teflon tubings (0.5 mm inner diameter). Flows of the carrier and reagent were controlled by a syringe pump (FIALab instruments, USA) and a 10-port selection valve (C25-3180EMH, Valco instruments Co. Inc.). The enzymatic column was immersed in circulating thermostated water bath at 37 °C (Thermo minder SM-05, Taitec, Japan). Absorbance was monitored at 607 nm for protein determination and at 520 nm for glucose analysis. The detection unit consisted of a tungsten halogen light source (LS-1, FIALab Instruments, USA) and a spectrometer (USB2000, Ocean Optics, USA) and fiber optic cables (P200-2-UV/Vis, FIALab instruments, USA) and Z-cell (home made, path length 10 mm). The FIALab software was used to control the system and some signal processing. Peak evaluation was made by using the Origin software with man-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**Fig. 1 – Manifold of the SI system for successive determination of protein and glucose in urine samples.** HD: holding coil, EC: enzyme column (4.5 cm × 2 mm), AC: auxiliary coil, SV: 10-port selection valve, SP: syringe pump, BS1: 0.5 M acetate buffer pH 3.2, BS2: 0.5 M acetate buffer pH 4.5, TX-100: 0.1% Triton X-100, TBPE:  $1 \times 10^{-4}$  M tetrabromophenolphthalein ethyl ester, Fe(II):  $5 \times 10^{-3}$  M iron(II), *p*-anisidine: 0.1 M *p*-anisidine.

ual operation for each peak: peak area for protein while peak height for glucose.

### 2.3. Procedure

#### 2.3.1. Immobilization of enzyme on glass beads

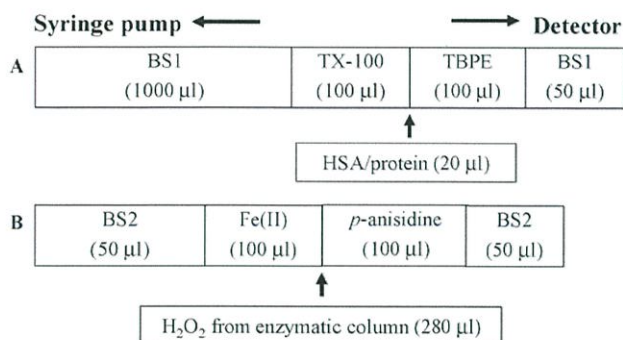
The immobilization of enzyme was performed by following procedures described in previous reports [21–23]. A 5 g amount of CPG was boiled in 300 mL of 5% nitric acid for 30 min. The CPG was washed with water and dried in an oven at 95 °C for 12 h. After that, 10% of 3-aminopropyltriethoxysilane solution (pH 3.45) was added to the dried glass beads with a ratio of

20 mL to 1.0 g of the glass. The mixture was left at 75 °C in a water bath for 2.5 h. The chemically modified alkylamino glass was washed and dried in an oven at 115 °C for 8 h. After that, the alkylamino glass (1 g) was added to 5 mL of an aqueous glutaraldehyde solution (2.5%) and was kept under reduced pressure for 30 min and then kept under atmospheric pressure for 2 h. The activated glass beads were washed with water. Glucose oxidase (100 mg) was dissolved in a cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0, 4 °C) and added to the activated glass beads. The mixture was kept at 4 °C for 2.5 h. The immobilized enzyme derivative was washed with cold phosphate buffer and cold water to remove unlinked enzymes that remained

**Table 1 – Operation sequence of SI system for successive determination of protein and glucose (see full protocol in ESI)**

No.	Operation sequence of the SI method	Remark
1	Aspiration of buffer and glucose solution	Incubation of glucose
2	Aspiration of 0.5 M acetate buffer pH 4.5	
3	Aspiration of stand/sample solution	Determination of protein
4	Aspiration of 0.5 M acetate buffer pH 4.5	
5	Dispensation of all reagents to the enzymatic column	
6	Aspiration of 0.5 M acetate buffer pH 3.2	
7	Aspiration of 0.1% Triton X-100	
8	Aspiration of $1 \times 10^{-4}$ M TBPE	
9	Aspiration of 0.5 M acetate buffer pH 3.2	
10	Flow several process for mixing	
11	Aspiration of protein standard/sample	
12	Flow reversal process for mixing	
13	Monitoring of product	Cleaning the system
14	Cleaning the holding coil and flow cell	
15	Aspiration of 0.5 M acetate buffer pH 4.5	Determination of glucose
16	Aspiration of $5 \times 10^{-3}$ M iron(II)	
17	Aspiration of 0.1 M <i>p</i> -anisidine	Cleaning the system
18	Aspiration of 0.5 M acetate buffer pH 4.5	
19	Flow reversal for mixing	
20	Aspiration of peroxide solution from the enzymatic column	
21	Flow reversal for mixing of reagents	
22	Monitoring of product	
23	Washing the holding coil, flow cell and enzymatic column	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญญาติเห็นาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**Fig. 2 – The sequence of reagents for protein and glucose determination. The concentrations of all reagents are defined in Fig. 1. (A) for protein determination, (B) for glucose determination.**

on the glass beads. The immobilized glass beads were packed into a Teflon tube (4.5 cm × 2 mm). The two ends of the column were plugged with cotton filters and stored at 4 °C in water. The activity of enzyme can be kept for at least 1 month.

### 2.3.2. Procedure for the successive determination of protein and glucose

Using the manifold shown in Fig. 1, the system was filled with water as a carrier. The enzymatic column was controlled at 37 °C (temperature in human body). The home made Z-cell (10 mm path length) was connected to port#10 of a selection valve with 5 cm tubing to minimize dispersion of product zone. The auxiliary coils 1 and 2 were set to protect from waste and air flow to the flow cell and the enzymatic column, respectively. Sequences for SI operation are summarized and illustrated in Table 1 and Fig. 2.

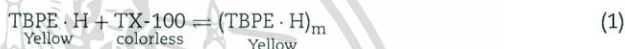
To start the glucose determination process, 20 µL of 0.5 M acetate buffer solution of pH 4.5 (BS2), 280 µL of glucose standard solution or sample and 50 µL of 0.5 M acetate buffer solution (pH 4.5) were dispensed to the enzymatic column through port#2 for incubation during the protein analysis process. The protein determination started with aspirating the following into the holding coil (Fig. 2A): 1000 µL of 0.5 M acetate buffer solution of pH 3.2, 100 µL of 0.1% Triton X-100, 100 µL of  $1 \times 10^{-4}$  M TBPE and 50 µL of 0.5 M acetate buffer solution of pH 3.2. Flow reversal was made to promote mixing of the reagents via the flow cell port of the selection valve. Then,

the standard human serum albumin (HSA) or sample solution was inserted into the micelle mixture solution. The blue color product zone that occurred after the second-flow reversal process was transferred to detection unit for absorbance monitoring at 607 nm. At the end of this process, the system was washed with water. Then, the glucose determination step restarted again by aspirating 0.5 M acetate buffer (pH 4.5),  $5 \times 10^{-3}$  M iron(II) and 0.1 M *p*-anisidine solutions as the sequence in Fig. 2B. Flow reversal was made before inserting the peroxide produced from the enzymatic column into the center of mixture. The red product formed was then transported to the detector.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Detection reactions

For protein, as proposed by Sakai et al. for the micelle extraction of TBPE-protein into Triton X-100 at pH 3.0 [16], the color development occurs according to the following Eqs. (1) and (2).

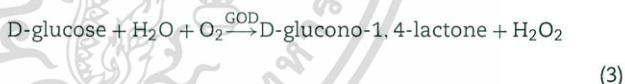


The protein in acid solution ( $\text{HSA}^{x+}$ ) would be associated into the micelle:

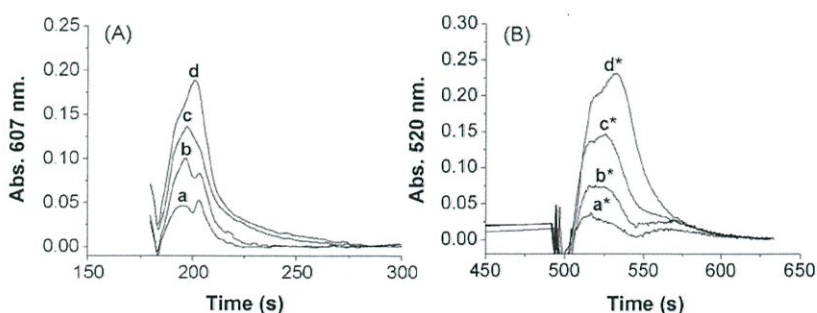


The maximum absorption wavelength of the TBPE-protein associate was found to be at 607 nm.

The detection reactions for glucose determination by the enzymatic method are as follows:

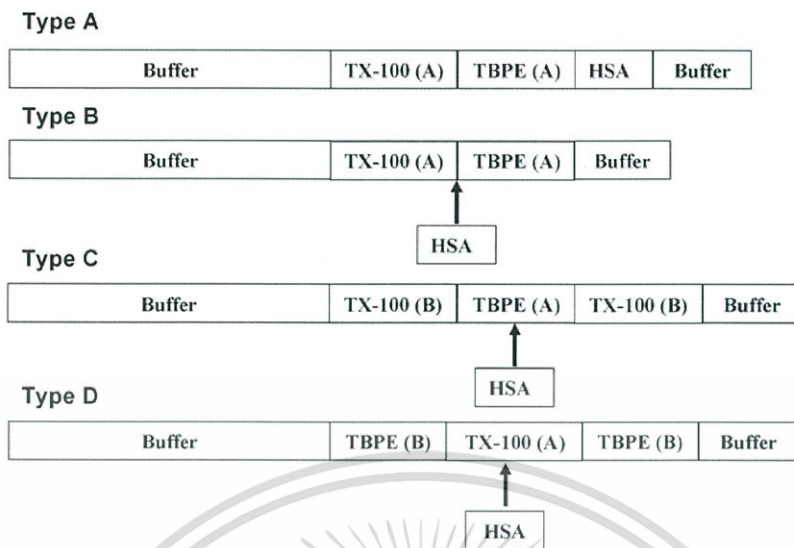


GOD promotes the oxidation of D-glucose by molecular oxygen to D-glucono-1,4-lactone [25]. Hydrogen peroxide is produced simultaneously. The hydrogen peroxide obtained from the oxidation of glucose oxidizes *p*-anisidine to a red color compound in the presence of iron(II) used as a catalyst.



**Fig. 3 – Peak profiles due to (A) protein, HSA: (a) blank, (b) 0.5 mg dL<sup>-1</sup>, (c) 1.0 mg dL<sup>-1</sup>, (d) 2.0 mg dL<sup>-1</sup>; (B) glucose: (a\*) blank, (b\*) 1.8 mg dL<sup>-1</sup>, (c\*) 5.4 mg dL<sup>-1</sup>, (d\*) 12.6 mg dL<sup>-1</sup>.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**Fig. 4** – The sequences of the reagents for protein assay by the SI system. Buffer: 500  $\mu\text{L}$  of 0.5 M acetate buffer at pH 3.2, TX-100(A) and TX-100(B): 50 and 25  $\mu\text{L}$  of 0.1% TX-100, respectively, TBPE(A) and TBPE(B): 50 and 25  $\mu\text{L}$  of  $1 \times 10^{-4}$  M TBPE, respectively, HSA: 20  $\mu\text{L}$  of human serum albumin standard solution.

The maximum absorption wavelength of the red color product was at 520 nm.

### 3.2. Peak profiles

According to the two detecting steps in the successive determination of protein and glucose, first, the protein–TBPE associate was formed and monitored at 607 nm (Fig. 3A). Then in the steps for glucose determination, the oxidized form of *p*-anisidine was monitored at 520 nm (Fig. 3B). The detection steps for protein and glucose can be performed independently with the ability of the spectrometer to measure absorbances of the monitored products simultaneously, even in two different wavelengths.

### 3.3. Variables in the determination of protein

#### 3.3.1. Aspiration sequence

The aspiration sequence of reagents into the SI system is important for mixing and consequent reaction steps. Four different aspiration sequences of reagents (types A, B, C and D) were tried, as illustrated in Fig. 4. Experiments using HSA ( $0\text{--}8 \text{ mg dL}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{L}$ ;  $1 \times 10^{-4}$  M TBPE, 50  $\mu\text{L}$ ; 0.1% TX-100, 50  $\mu\text{L}$  and the buffer solution (pH 3.2) were performed. Type B sequence was selected as it yielded small standard deviation, reproducibility and a good linear calibration graph.

#### 3.3.2. Effect of TBPE concentration

The effect of TBPE concentration was examined in a range of  $8 \times 10^{-5}$  M to  $1.5 \times 10^{-4}$  M. It was found that the slope of the calibration graph was practically constant for TBPE concentrations in a range of  $1 \times 10^{-4}$  to  $1.5 \times 10^{-4}$  M. The slope was found to be less when TBPE concentration was less than  $1 \times 10^{-4}$  M. TBPE of  $1 \times 10^{-4}$  M was selected for further study.

#### 3.3.3. Effect of Triton X-100 concentration

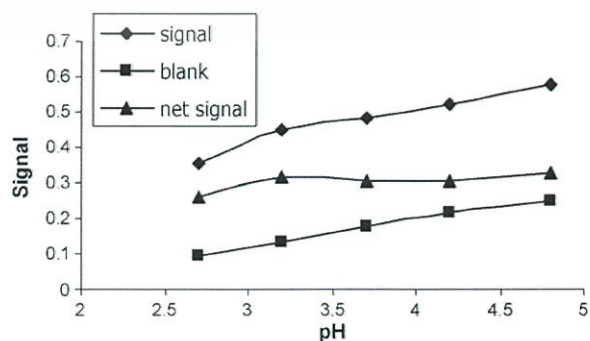
The effect of TX-100 concentration (0.05–0.13%, w/v) on the sensitivity of the system for the protein determination was studied. A concentration of 0.09% (w/v) was suitable for the detection.

#### 3.3.4. Effect of pH of buffer

In this study, pH of the 0.5 M of acetate buffer was optimized for protein detection. The effect of pH in the range of 2.7–4.8 on the  $5 \text{ mg dL}^{-1}$  HSA is presented in Fig. 5. Signals increased slightly when pH of the buffer increased. However, the blank signals also increased when pH increased. The net signals (subtraction for blank) were considered. It can be seen that the net signals become constant starting from pH 3.2. Therefore, the suitable pH for protein-detected reaction should be 3.2.

#### 3.3.5. Flow reversal

For the protein determination, there are two steps employing flow reversal, one before and one after protein solution was



**Fig. 5** – Effect of pH of 0.5 M acetate buffer on protein determination,  $5 \text{ mg dL}^{-1}$  HSA 20  $\mu\text{L}$ , (■) blank signal, (♦)  $5 \text{ mg dL}^{-1}$  HSA, (▲) net signal, other conditions as in Fig. 1.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญญาตให้เข้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

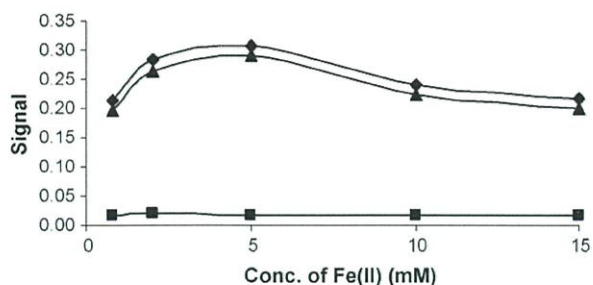


Fig. 6 – Effect of iron(II) concentration on glucose assay.  $80 \mu\text{L}$  of  $8 \times 10^{-4} \text{ M H}_2\text{O}_2$  and  $100 \mu\text{L}$  of iron(II) at various concentration. (■) Blank signal, (◆)  $8 \times 10^{-4} \text{ M H}_2\text{O}_2$ , (▲) net signal. Other condition as in Fig. 1.

aspirated into the system. It was found that flow reversal for both the steps did not enhance signals. So, only one direction of flow should be implemented.

### 3.4. Variables on the determination of glucose

#### 3.4.1. Effect of iron(II) concentration

Iron(II) solution was used as a catalytic reagent for the oxidative reaction of *p*-anisidine and hydrogen peroxide. The effect of concentration of iron(II) ( $8 \times 10^{-4} \text{ M}$  to  $1.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) was studied. The results in Fig. 6 indicate that  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$  iron(II) should be chosen.

#### 3.4.2. Effect of *p*-anisidine concentration

The effect of concentration of *p*-anisidine (0.02–0.15 M) was studied. The absorbance increased with increasing concentration of *p*-anisidine until 0.1 M and became constant over 0.1 M. Therefore, a 0.1 M of *p*-anisidine was selected.

#### 3.4.3. Effect of pH of buffer solution

The effect of pH on the formation of colored product was investigated in the range pH 4.0–5.7 using 0.5 M acetate buffer. It was found that the slope of calibration obtained by using buffer of pH 4.5 was the highest. Hence, pH 4.5 was chosen.

Table 2 – The recoveries of successive determination of  $3 \text{ mg dL}^{-1}$  HSA and  $5.4 \text{ mg dL}^{-1}$  glucose in a real sample urine using various dilution factors.

Dilution factor	%Recovery	
	Protein	Glucose
10	89	52
20	100	55
30	97	74
50	98	90
60	101	100

#### 3.4.4. Standard/sample volume

Sample volume loaded into the enzymatic column was studied over the range of  $40\text{--}320 \mu\text{L}$ . The peak height for glucose increased with increasing sample volume up to  $280 \mu\text{L}$ . The peak height became constant for a volume of  $280 \mu\text{L}$  or over. Therefore, a sample volume of  $280 \mu\text{L}$  was selected.

### 3.5. Analytical characteristics

Calibration graphs for protein and glucose were established under the proposed conditions:  $[\text{peak area}] = 0.747 [\text{mg dL}^{-1} \text{HAS}] + 0.673$ ,  $r^2 = 0.999$  for  $0\text{--}10 \text{ mg dL}^{-1}$  HSA with LOD ( $3\sigma$ ) of  $0.3 \text{ mg dL}^{-1}$  and R.S.D.s ( $n = 11$ ) were 2.7% and 2.5% for 1 and  $5 \text{ mg dL}^{-1}$  HSA, respectively; and  $[\text{peak height}] = 0.0106 [\text{mg dL}^{-1} \text{glucose}] + 0.0275$ ,  $r^2 = 0.998$  for  $0\text{--}12.5 \text{ mg dL}^{-1}$  glucose with LOD ( $3\sigma$ ) of  $0.08 \text{ mg dL}^{-1}$  and R.S.D. of 1.4% ( $9 \text{ mg dL}^{-1}$  glucose;  $n = 11$ ). The sample throughput was six samples  $\text{h}^{-1}$  for successive analyses.

### 3.6. Interference study

For the determination of protein and glucose, various amounts of foreign compounds were added and their interference was examined. Sodium chloride, creatinine and urea were considered as they are commonly coexisting in urine. The average concentration levels of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , creatinine and urea in an ordinary person's urine were reported to be  $294 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $128 \text{ mEq L}^{-1}$ ),  $478 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $134 \text{ mEq L}^{-1}$ ),  $196 \text{ mg dL}^{-1}$  and  $1820 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectively, although the values may be differ-

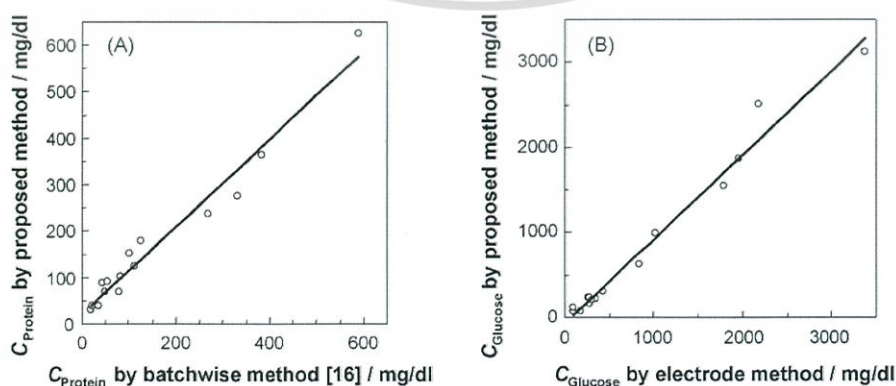


Fig. 7 – Correlations between the results obtained by the proposed method and other methods (see the text) for the determinations of (A) urinary protein and (B) glucose. (A)  $y = 0.942x + 20.6$ ,  $r^2 = 0.967$  ( $n = 15$ ); (B)  $y = 0.991x - 74.3$ ,  $r^2 = 0.980$  ( $n = 15$ ).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ent from person to person and/or condition to condition [26]. Sodium chloride and creatinine did not interfere in the protein determination up to  $75 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $29 \text{ mg dL}^{-1}$  for  $\text{Na}^+$  and  $46 \text{ mg dL}^{-1}$  for  $\text{Cl}^-$ ) and  $100 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectively, when defining as a maximum concentration of foreign species that causes a deviation of less than  $\pm 5\%$ . Urea up to  $1820 \text{ mg dL}^{-1}$  did not interfere. For enzymatic glucose determination, uric acid and ascorbic acid were reported to compete with a reduced chromogen as hydrogen donors [27,28]. Uric acid and ascorbic acid are usually found to be about  $42 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) and  $3.7 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $2.1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) in normal urine. It was found that uric acid up to  $2 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) and ascorbic acid up to  $0.25 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) did not interfere for the determination of  $9 \text{ mg dL}^{-1}$  glucose. In order to overcome the possible interferences discussed above, dilution of urine sample should be made so that the concentration of interfering species would become lower than their limits that would interfere.

A urine sample containing  $3 \text{ mg dL}^{-1}$  HSA and  $5.4 \text{ mg dL}^{-1}$  glucose with various dilution factors was studied for recovery to verify the approach. The results (Table 2) indicate that dilution of at least 60 folds would overcome the possible interference from the species. The R.S.D.s of this manipulation were higher than that of the standard solutions of the same concentrations without dilution.

### 3.7. Applications to real samples

The proposed SI method was applied to determine successively protein and glucose in 15 urine samples taken from diabetic disease patients in a group of different ages. The samples were filtered by filter paper (Whatman#1) and were diluted at least 60-fold with water before aspirating directly into the proposed SI system. Concentrations of protein and glucose were evaluated from the calibration equations. The results are shown in Fig. 7. The protein contents obtained by the proposed SI method agree with those by the batch-wise method [16] with correlation of  $y = 0.942x + 20.6$ ,  $r^2 = 0.967$ . The correlation of glucose concentration obtained by the proposed SI method and that of a routine assay using a commercial Glucoroder GXR with an oxygen electrode (A&T Co., Yokohama) was:  $y = 0.991x - 74.3$ ,  $r^2 = 0.980$ . The experimental *t*-values between the two couples of methods were 0.291 for protein and 1.77 for glucose. These *t*-values were less than the *t*-value (2.145) for 14 degrees of freedom at the 95% confidence level.

For medical checkup, protein is generally assayed in the range from 15 to  $1000 \text{ mg dL}^{-1}$  while the range for glucose is from 50 to  $2000 \text{ mg dL}^{-1}$ . Healthy subjects give concentration levels of protein and glucose less than 15 and  $50 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectively. The proposed method would be employed for the assays of protein and glucose with suitable dilution.

## 4. Conclusions

A new automatic sequential injection system with spectrophotometric detection for successive determination of protein ( $0\text{--}10 \text{ mg dL}^{-1}$ ) and glucose ( $0\text{--}12.5 \text{ mg dL}^{-1}$ ) was devel-

oped. The protein assay is based on ion-associate formation with TBPEH, while the glucose assay is based on the detection of hydrogen hydroxide produced from glucose oxidase, using *p*-anisidine with iron-catalyst. With automation using SI, protein assay can be performed during the glucose oxidation incubation period. The developed system has been demonstrated for the assay of protein and glucose in diabetic patient urine samples with good agreement with the other methods. This new automated SI system should be an alternative for clinical routine assay for diabetic disease screening.

## Acknowledgements

This work was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research No. 17550087 (to T.S.) from Japan Society of the Promotion of Science. K.W. and K.G. acknowledge The Thailand Research Fund (TRF) for the Royal Golden Jubilee Ph.D. program and The Commission on Higher Education for the Research Group Grant and The Postgraduate Education and Research Program in Chemistry: Center of Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for financial support. We thank Professor Gary D. Christian for editing the English.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aca.2007.10.010.

## REFERENCES

- [1] Y. Tomino, *Nippon Jinzo Gakkaishi* 44 (2002) 373.
- [2] W.L. Gyure, *Clin. Chem.* 23 (1977) 876.
- [3] K. Jung, E. Nickel, M. Pergande, *Clin. Chim. Acta* 187 (1990) 163.
- [4] K.H. Schosinsky, M. Vargas, A.L. Esquivel, M.A. Chavarria, *Clin. Chem.* 33 (1987) 223.
- [5] Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano, *Bunseki Kagaku* 32 (1983) E379.
- [6] Y. Fujita, I. Mori, K. Ikuta, Y. Nakahashi, K. Kato, T. Kakanishi, *Chem. Pharm. Bull.* 37 (1989) 2452.
- [7] Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda, *Anal. Sci.* 7 (1991) 771.
- [8] Y. Fujita, *ICMR Annals* 20 (2000) 237.
- [9] T. Yamaguchi, E. Amano, S. Kamino, S. Uehara, C. Yanaiharu, Y. Fujita, *Anal. Sci.* 21 (2005) 1237.
- [10] K. Yoshimoto, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi, *Chem. Lett.* 29 (2000) 6.
- [11] K. Yoshimoto, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi, *Bunseki Kagaku* 49 (2000) 363.
- [12] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145.
- [13] T. Korenaga, X. Zhou, M. Izawa, T. Takahashi, T. Moriwake, *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 67.
- [14] D.A.M. Zaia, F.R. Marques, C.T.B.V. Zaia, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48 (2005) 385.
- [15] T. Sakai, M. Kato, N. Teshima, *Anal. Sci.* 21 (2005) 1557.
- [16] T. Sakai, Y. Kito, N. Teshima, S. Katoh, K. Watla-Iad, K. Grudpan, *J. Flow Injection Anal.* 24 (2007) 26.
- [17] K.M. Dubowski, *Clin. Chem.* 8 (1962) 215.
- [18] C.S. Frings, C.R. Ratliff, R.T. Dunn, *Clin. Chem.* 16 (1970) 282.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [19] E.F. Beach, J.J. Turner, *Clin. Chem.* 4 (1958) 462.  
[20] G.R. Kingsley, G. Getchell, *Clin. Chem.* 6 (1960) 466.  
[21] M. Masoom, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta* 166 (1984) 111.  
[22] H. Katsumata, T. Sekine, N. Teshima, M. Kurihara, T. Kawashima, *Talanta* 51 (2000) 1197.  
[23] N. Maeuchihara, S. Nakano, T. Kawashima, *Anal. Sci.* 17 (2001) 255.  
[24] N. Teshima, S. Ohno, T. Sakai, *Anal. Sci.* 23 (2007) 1.  
[25] R.B. Passey, R.L. Gillum, J.B. Fuller, F.M. Urry, M.L. Giles, *Clin. Chem.* 23 (1977) 131.  
[26] <http://www.science.edu.sg/ssc/detailed.jsp?artid=3042&type=6&root=4&parent=4&cat=48>, last accessed August 10, 2007.  
[27] M.H. Zweig, A. Jackson, *Clin. Chem.* 34 (1986) 674.  
[28] J.E. Logan, D.E. Haight, *Clin. Chem.* 11 (1965) 367.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้