

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการ “การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ แบบง่ายและรวดเร็ว ด้วยระบบซีเควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิส”

### คณะผู้วิจัย

### สังกัด

|                             |                |                                                                              |
|-----------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1. ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล   | หัวหน้าโครงการ | ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์<br>จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                    |
| 2. นางสาวอุษากร คุณานุวัฒน์ | ผู้ร่วมวิจัย   | ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์<br>จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                    |
| 3. นางสาววิชาภรณ์ อินทรชุตี | ผู้ร่วมวิจัย   | ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์<br>จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                    |
| 4. ดร. ชاکกร ชินวงศ์อมร     | ผู้ร่วมวิจัย   | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี<br>มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี |
| 5. รศ.ดร. อรพรรณ ชัยลภากุล  | ผู้ร่วมวิจัย   | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์<br>จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                          |
| 6. ศ.ดร. สุพจน์ หารหนองบัว  | ผู้ร่วมวิจัย   | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์<br>จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                          |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## สารบัญ

|                                        | หน้า |
|----------------------------------------|------|
| สารบัญ.....                            | i    |
| สารบัญรูปภาพ.....                      | ii   |
| สารบัญตาราง.....                       | iii  |
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                   | 1    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                | 2    |
| บทสรุปสำหรับผู้บริหาร.....             | 3    |
| บทนำ.....                              | 6    |
| ทบทวนวรรณกรรม.....                     | 9    |
| วิธีการดำเนินการวิจัย.....             | 19   |
| ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง..... | 25   |
| สรุปผลการทดลอง.....                    | 36   |
| เอกสารอ้างอิง.....                     | 38   |
| Output ที่ได้จากโครงการ.....           | 45   |
| ภาคผนวก.....                           | 46   |

## สารบัญรูปภาพ

|           |                                                                                                                                                                           | หน้า |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| รูปที่ 1  | ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและการปลดปล่อย การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสาร AB 580.....                                                                                        | 8    |
| รูปที่ 2  | เครื่อง Sequential injection analysis.....                                                                                                                                | 20   |
| รูปที่ 3  | แสดงส่วนประกอบของระบบ SIA.....                                                                                                                                            | 21   |
| รูปที่ 4  | แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างการใช้อัตราส่วนระหว่าง Reagent A ต่อ Reagent B ที่ความเข้มข้น 1:25 และ 1: 50 .....                                                                  | 26   |
| รูปที่ 5  | แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวของการตรวจวัดกับปริมาตรสิ่งตัวอย่างที่ใช้ในระบบ SIA.....                                                                                     | 27   |
| รูปที่ 6  | แสดงลำดับการดูดสารในระบบ SIA.....                                                                                                                                         | 29   |
| รูปที่ 7  | แสดงผลการศึกษาเมื่อใช้ลำดับการดูดสารแบบ A (เส้นทึบ) และ แบบ B (เส้นประ) โดยใช้อัลบูมินความเข้มข้น 25 mg/L.....                                                            | 29   |
| รูปที่ 8  | แสดงผลการศึกษาเมื่อใช้ลำดับการดูดสารแบบ A (เส้นทึบ) และ แบบ B (เส้นประ) โดยใช้อัลบูมินความเข้มข้น 100 mg/L.....                                                           | 30   |
| รูปที่ 9  | แสดงรูปร่างและลักษณะฟีดจากการใช้ Carrier buffer ปริมาตรต่างๆ.....                                                                                                         | 31   |
| รูปที่ 10 | แสดงจำนวนสิ่งตัวอย่างที่ตรวจได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยระบบ SIA.....                                                                                                           | 31   |
| รูปที่ 11 | แสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัดระดับอัลบูมินความเข้มข้นในช่วง 1 - 200 mg/L.....                                                                                        | 32   |
| รูปที่ 12 | เปรียบเทียบผลการตรวจวัดระดับอัลบูมินในปัสสาวะในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานด้วยระบบ SIA ในงานวิจัยนี้ กับผลการทดลองที่ได้จากการตรวจวัดโดยใช้หลักการ immunoturbidimetric ..... | 35   |

## สารบัญตาราง

|                                                                                                     | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 1 การศึกษาความถูกต้องของการใช้แถบตรวจ Micral-Test.....                                     | 13   |
| ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีต่างๆ สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ.....                    | 16   |
| ตารางที่ 3 แสดงสารเคมีและสารชีวภาพต่างๆ ที่นำมาตรวจวัดด้วยระบบ SIA.....                             | 18   |
| ตารางที่ 4 แสดงลำดับการตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบ SIA.....                                               | 22   |
| ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยา AB 580 working solution.....                                 | 26   |
| ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบสารรบกวน (Interferences) การตรวจวัดระดับอัลบูมินในปัสสาวะด้วยระบบ SIA..... | 34   |

**รหัสโครงการ : MRG4980090**

**ชื่อโครงการ :** การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแบบง่าย และรวดเร็ว ด้วยระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส

**ชื่อนักวิจัย :** ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล และคณะ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**E-mail address:** [wanida.k@chula.ac.th](mailto:wanida.k@chula.ac.th)

**ระยะเวลาโครงการ :** 2 ปี

### **บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส (sequential injection analysis) (SIA) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ซึ่งอาศัยหลักการที่ไม่ใช้ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยอัลบูมินในปัสสาวะจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับน้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) แล้วเกิดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้น ซึ่งสามารถตรวจวัดได้เมื่อใช้ Excitation wavelength และ Emission wavelength ที่ 590 นาโนเมตร และ 610 นาโนเมตร ตามลำดับ กราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวัด มีช่วงความเข้มข้นของอัลบูมินตั้งแต่ 1 ถึง 200 mg/L ค่าปริมาณอัลบูมินต่ำสุดที่ระบบสามารถตรวจได้คือ 0.3 mg/L การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีนี้มีความแม่นยำสูงโดยจากการสร้างกราฟมาตรฐาน 4 ครั้งให้ค่า within-run และ between-run CVs เท่ากับ 2.3-3.3% และ 3.8% ตามลำดับ เมื่อทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของอัลบูมิน 15 mg/L และ 100 mg/L ทำซ้ำจำนวน 15 ครั้ง ให้ค่า R.S.D.s 0.9% และ 1.4% ตามลำดับ พบว่า Ibuprofen, 2-ketobutyric acid, Hemoglobin, Ascorbic acid, Bilirubin และ NaCl ไม่รบกวนการตรวจวัด โดยมีค่า recovery 92-97% จำนวนตัวอย่างที่สามารถตรวจได้ด้วยระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส ภายใน 1 ชั่วโมง คือ 37 ตัวอย่าง ระบบดังกล่าวได้ถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 72 ราย ( $n = 72$ ) พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีที่ได้จากวิธี immunoturbidimetric ( $r^2 = 0.965$ ) ดังนั้นระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวาน

**คำสำคัญ :** ซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส, อัลบูมินในปัสสาวะ, ผู้ป่วยเบาหวาน, อัลบูมินบลู 580

**Project Code : MRG4980090**

**Project Title :** Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria

**Investigators :** Dr. Wanida Laiwattanapaisa et al Department of Clinical Chemistry, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University

**E-mail address:** [wanida.k@chula.ac.th](mailto:wanida.k@chula.ac.th)

**Project Period :** 2 years

### **Abstract**

A simple, specific and sensitive sequential injection analysis (SIA) system based on non-immunoassay fluorescent detection has been developed for the determination of urinary albumin. The specific binding of the dye Albumin Blue 580 (AB 580) to albumin in urine generated high emission fluorescent signals. The excitation and emission wavelengths were set at 590 and 610 nm, respectively. The calibration range was obtained from 1-200 mg L<sup>-1</sup>, with a limit of detection of 0.3 mg L<sup>-1</sup> (S/N = 3). The SIA system gave high precision with relative standard deviations (RSDs) of 0.9% and 1.4% when evaluated with 15 mg L<sup>-1</sup> and 100 mg L<sup>-1</sup> albumin (*n* = 15), respectively. The method exhibited good reproducibility, as assessed by performing four calibration curves on different days, and intra-run CVs (2.3-3.3%) and inter-run CVs (3.8%) were obtained. Rapid operation was achieved with a sample throughput of 37 h<sup>-1</sup>. This method was successfully applied to the determination of urinary albumin, and the method was highly correlated with the immunoturbidimetric method ( $r^2 = 0.965$ ; *n*=72).

**Keywords:** Sequential injection analysis, urinary albumin, diabetic patients, Albumin blue 580,

# บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

## Executive Summary

### ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแบบง่ายและรวดเร็ว ด้วยระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส

(ภาษาอังกฤษ) Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทํารว้จย

ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ คือภาวะที่มีโปรตีนชนิดอัลบูมินเพิ่มขึ้นในปัสสาวะปริมาณ 30 - 300 มิลลิกรัม/วัน (20 - 200 ไมโครกรัม/นาที) หรือปริมาณ 30 - 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของครีเอตินิน ซึ่งมีความสำคัญทางคลินิก ใช้ในการบ่งชี้ถึงการเสื่อมหน้าที่ของไตในระยะเริ่มแรก และเป็นระยะที่สามารถรักษาให้หายขาดได้ การตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมีความสำคัญสอดคล้องกับคำแนะนำของสมาคมแพทย์โรคเบาหวานในสหรัฐอเมริกา ที่บ่งชี้ให้มีการตรวจกรองระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะอย่างน้อยปีละหนึ่งครั้ง ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ที่มีการดำเนินโรคเข้าสู่ปีที่ห้าเป็นต้นไป และในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ทุกคน ตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน (1) นอกจากนี้ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (2),(3) ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่ไม่เป็นเบาหวาน การเพิ่มระดับไขมันโคเลสเตอรอล การลดลงของไขมันชนิด HDL และยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะโฮโมซิสทีนในเลือดสูง (hyperhomocysteinemia) ด้วย ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) (4, 5) การตรวจกรองเพื่อหาภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ จึงมีประโยชน์ในการช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว

ในสภาวะปกติความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะมีค่าต่ำ ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยการใช้แถบตรวจปัสสาวะทั่วไป ดังนั้นวิธีการตรวจวัดระดับอัลบูมินในปัสสาวะ จำเป็นต้องเป็นวิธีที่มีความไวสูง ซึ่งวิธีการตรวจวัดที่นิยมใช้กันทั่วไปทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีหลายวิธี ส่วนใหญ่เป็นวิธีที่ใช้หลักปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoassay) ได้แก่ radioimmunoassay (RIA) (6), immunonephelometry (7), immunoturbidimetry (IT) (8) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (9) แต่เนื่องจากวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินเหล่านี้ ส่วนใหญ่ทำโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่มีราคาแพง รวมถึงมีการใช้น้ำยาปริมาณค่อนข้างมาก ซึ่งน้ำยาดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพง เนื่องจากแอนติบอดีจำเพาะต่ออัลบูมินผลิตได้ยาก ต้องใช้สัตว์ทดลอง ทำให้ต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมีราคาสูง การตรวจวัดไมโครอัลบูมินเชิงปริมาณ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ยีนย่นนั้น ราคาค่าบริการตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของกรมบัญชีกลาง 270 บาทต่อตัวอย่าง ดังนั้นการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในอดีต จึงไม่นิยมทำกันอย่างแพร่หลาย มี

บริการตรวจวัดเฉพาะในโรงพยาบาลบางแห่ง เช่น โรงพยาบาลของคณะแพทยศาสตร์ และ โรงพยาบาลศูนย์ของกระทรวงสาธารณสุขจำนวน 12 แห่งทั่วประเทศไทยเท่านั้น แต่ปัจจุบันพบว่า เริ่มมีบริการตรวจจำนวนมากขึ้นกว่าในอดีต เนื่องจากทุกฝ่ายเล็งเห็นถึงความสำคัญของการส่งตรวจ ไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมากขึ้น อย่างไรก็ตามการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีที่ไม่ใช่หลักการอิมมูโนแอสเซย์ ที่มีราคาต้นทุนต่ำ แต่มีความไวและความจำเพาะสูงนั้นเป็นวิธีการที่น่าสนใจใ้ศึกษาวิจัยและพัฒนาขึ้น เพื่อรองรับการตรวจในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงซึ่งจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยเบาหวาน

วิธีการตรวจวัดด้วยหลักการจับกับสี (Dye Binding) โดยใช้สารเรืองแสง Albumin blue 580 (AB 580) ที่พัฒนาโดย Kessler และคณะ (10) ซึ่งอัลบูมินในคน (human albumin) ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับน้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนให้สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ความเข้มสูง สามารถตรวจวัดได้เมื่อใช้ Excitation wavelength และ Emission wavelength ที่ 590 นาโนเมตร และ 610 นาโนเมตรตามลำดับ (10) หลักการดังกล่าว มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเนื่องจากมีความไวสูง และมีรายงานว่าให้ผลการตรวจวัดสอดคล้องกับวิธี immunonephelometry (11) หรือ radioimmunoassay (12) นอกจากนั้นยังพบว่าโกลบูลิน (globulin) และสารอื่นๆ ไม่รบกวนการตรวจวัด อย่างไรก็ตาม วิธีที่รายงานก่อนหน้านี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ยังไม่จัดเป็นวิธี high-throughput และปริมาณน้ำยาที่ใช้ค่อนข้างมาก จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดแบบงานประจำ

ระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส (Sequential injection analysis, SIA) เป็นอีกระบบหนึ่งที่ถูกพัฒนามาจากระบบโฟลว์อินเจกชันอะนาลิซิส (flow injection analysis, FIA) เพื่อใช้สำหรับงานตรวจวัดและวิเคราะห์สารเคมีต่างๆ จัดเป็นระบบที่วิเคราะห์สารแบบอัตโนมัติโดยใช้ระบบคอมพิวเตอร์เป็นตัวควบคุมสำหรับการดูดและปล่อยน้ำยา (13) ระบบ SIA นี้มีข้อดีหลายประการ โดยระบบจะสามารถตรวจสิ่งตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก และให้ผลการตรวจวัดที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย เพราะระบบ SIA ใช้ปริมาณน้ำยาน้อย อีกทั้งของเสียที่ออกจากระบบก็มีปริมาณน้อยด้วย (14) ทำให้ระบบ SIA มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็นอย่างมาก มีรายงานวิจัยที่ได้มีการนำระบบ SIA มาประยุกต์ใช้ตรวจสอบสารทางชีวภาพ เช่น การตรวจหาโปรตีนรวมและกลูโคสในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งพบว่าให้ผลดีและสามารถใช้เป็นวิธีการตรวจกรอง (screening test) สำหรับการวินิจฉัยเบาหวานได้ (15) หรือ การตรวจหาไนโตรต์ และ ไนเตรท ในซีรัมคนเพื่อทำนายปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค (16)

สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ยังไม่เคยมีการนำระบบ SIA มาประยุกต์ใช้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบ SIA สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแบบง่าย และรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการ Albumin Blue 580 Florescence assay ซึ่งเป็นหลักการที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธี radioimmunoassay ที่เป็น gold standard (17) และเป็นหลักการที่ไม่ใช่ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยา (non – immunoassay) จึงไม่จำเป็นต้องใช้แอนติบอดีซึ่งมีราคาแพงในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจ ซึ่งในส่วน

การพัฒนาระบบ SIA นี้จะมีการเปรียบเทียบกับการวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธี immunoturbidimetry ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่วไป และได้มีการพิสูจน์แล้วว่ามีความไวและแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้ (18) การพัฒนาระบบ SIA ในครั้งนี้ได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ และพบว่าระบบ SIA นี้สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่มาจากคนปกติ และผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. พัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่มีต้นทุนต่ำ ด้วยวิธีที่ไม่ใช่หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา
2. พัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว

### ผลการวิจัย

วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีความไวและความจำเพาะสูง จากการที่ได้นำเทคนิคซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิสมาใช้ร่วมกับหลักการจับกันของอัลบูมินกับสาร AB 580 และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น ทำให้ตรวจวัดได้รวดเร็ว 37 ตัวอย่างต่อชั่วโมง มีความแม่นยำสูง (intra-run CVs, 2.3-3.3%; inter-run CVs 3.8%) และเนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ใช้แอนติบอดีจำเพาะต่ออัลบูมิน และมีการใช้น้ำยาและสารเคมีปริมาณน้อย ทำให้เป็นวิธีที่ต้นทุนต่ำ ซึ่งจำเป็นสำหรับการตรวจวิเคราะห์ไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในผู้ป่วยเบาหวานจำนวนมาก ช่วงการตรวจวัดของระบบดังกล่าวคือวัดอัลบูมินได้ตั้งแต่ 1-200 mg/L ซึ่งครอบคลุมทั้งในช่วงภาวะปกติและภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 0.3 mg/L และผลการนำไปทดลองตรวจวัดกับปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 72 คน ได้ผลที่สอดคล้องกับวิธีการที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่วไป ( $r^2 = 0.965$ ) ดังนั้นระบบดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำไปใช้แทนวิธีการทางอิมมูโนแอสเซย์

## บทนำ

ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะหรือภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (microalbuminuria) คือ ภาวะที่มีโปรตีนชนิดอัลบูมินเพิ่มขึ้นในปัสสาวะปริมาณ 30 - 300 มิลลิกรัม/วัน (20 - 200 ไมโครกรัม/นาที) หรือปริมาณ 30 - 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของครีเอตินิน ซึ่งภาวะนี้สามารถบ่งชี้ถึงการเสื่อมหน้าที่ของไตในระยะเริ่มแรกได้ในผู้ป่วยเบาหวาน (19) การตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมีความสำคัญ สอดคล้องกับคำแนะนำของสมาคมแพทย์โรคเบาหวานในสหรัฐอเมริกา ที่บ่งชี้ให้มีการตรวจกรองระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะอย่างน้อยปีละหนึ่งครั้ง ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ในรายที่การดำเนินโรคเข้าสู่ปีที่ห้าเป็นต้นไป และในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ทุกคน ควรได้รับการตรวจตั้งแต่เริ่มต้นที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน (1) เนื่องจากส่วนมากของผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่สามารถระบุระยะเวลาของการดำเนินโรคที่แท้จริงได้ การตรวจกรองดังกล่าวนี้จึงมีความสำคัญอย่างมาก ที่จะช่วยให้สามารถติดตามการเสื่อมหน้าที่ของไตตั้งแต่ระยะแรกเริ่มของผู้ป่วยเบาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะจะมีระดับ Von Willebrand factor (vWF) ในเลือดสูง ซึ่งอาจเพิ่มโอกาสในการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (2),(3) ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่ไม่เป็นเบาหวาน พบว่าภาวะไมโครอัลบูมินูเรียมีความสัมพันธ์กับการมีความดันโลหิตสูง การเพิ่มระดับไขมันโคเลสเตอรอล การลดลงของไขมัน HDL และยังพบว่ามีสัมพันธ์กับภาวะโฮโมซิสทีนในเลือดสูง (hyperhomocysteinemia) ด้วย ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) (4, 5) การตรวจกรองเพื่อหาภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ จึงมีประโยชน์ในการช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว

โดยปกติความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะมีค่าต่ำ ดังนั้นวิธีการตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะจึงต้องมีความไวสูงเพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้อง ซึ่งวิธีการตรวจวัดที่นิยมใช้กันทั่วไปทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีหลายวิธี ส่วนใหญ่เป็นวิธีที่ใช้หลักการปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoassay) ในการตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ ได้แก่ radioimmunoassay (RIA) (6), immunonephelometry (7), immunoturbidimetry (IT) (8) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (9) แต่เนื่องจากวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินเหล่านี้ส่วนใหญ่ทำโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่มีราคาแพง รวมถึงมีการใช้น้ำยาในปริมาณที่มาก ซึ่งน้ำยาดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพงเนื่องจากแอนติบอดีจำเพาะต่ออัลบูมินผลิตได้ยาก ทำให้ต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมีราคาสูง การตรวจวัดเชิงปริมาณ ราคากรรมบัญญัติกลางสำหรับการตรวจไมโครอัลบูมิน 270 บาทต่อตัวอย่าง ดังนั้นการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในอดีต จึงไม่นิยมทำกันอย่างแพร่หลาย มีบริการตรวจวัดเฉพาะในโรงพยาบาลบางแห่ง เช่น โรงพยาบาลของคณะแพทยศาสตร์ และโรงพยาบาลศูนย์ของกระทรวงสาธารณสุขจำนวน 12 แห่งทั่วประเทศไทยเท่านั้น แต่ปัจจุบันพบว่าเริ่มมีบริการตรวจจำนวนมากขึ้นกว่าในอดีต เนื่องจากการเล็งเห็นความสำคัญการส่งตรวจมากขึ้น อย่างไรก็ตามการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีที่ไม่ใช่หลักการอิมมูโนแอสเซย์ ซึ่งมีราคาต้นทุนต่ำ แต่มีความไวและ

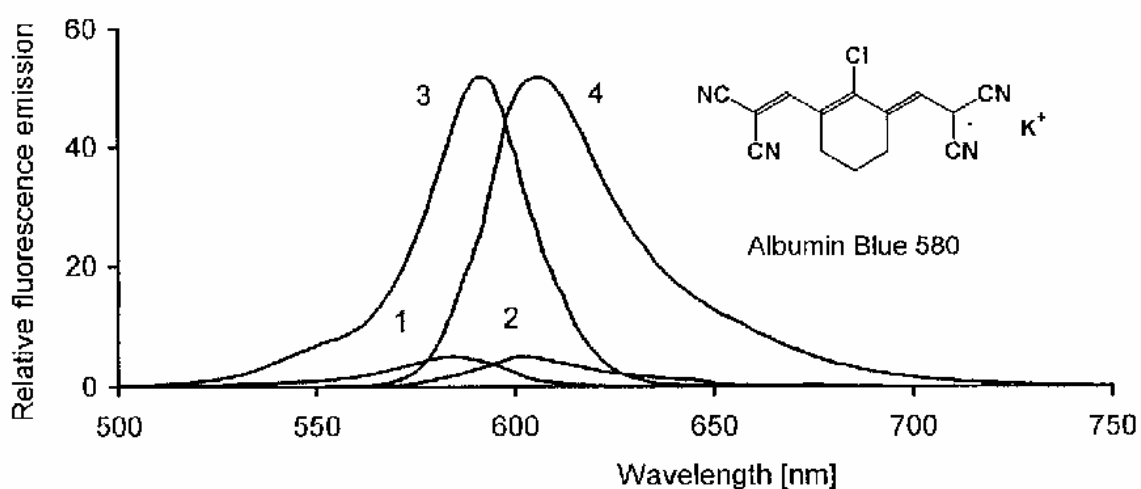
ความจำเพาะสูง นำเป็นวิธีการที่น่าสนใจศึกษาวิจัยที่จะพัฒนาขึ้น เพื่อรองรับการตรวจในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงจำนวนมาก

Kessler และคณะ (10) ได้เสนอวิธีการตรวจวัดด้วยวิธีจับกับสี (Dye Binding) โดยใช้สารเรืองแสง Albumin blue 580 (AB 580) อัลบูมินจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับน้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่ ให้สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ความเข้มสูง สามารถตรวจวัดได้เมื่อใช้ Excitation wavelength และ Emission wavelength ที่ 590 นาโนเมตร และ 610 นาโนเมตรตามลำดับ (10) (รูปที่ 1) จากการศึกษาพบว่าหลักการดังกล่าวสามารถใช้ตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะได้ในระดับต่ำๆ คลอบคลุมช่วงไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ และเมื่อนำผลการตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) มาเปรียบเทียบกับวิธี immunonephelometry (11) หรือ radioimmunoassay (12) พบว่าให้ผลสอดคล้องกันเป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบว่าโกลบูลิน (globulin) และสารอื่นๆ ไม่รบกวนการตรวจวัดด้วยวิธีนี้อีกด้วย ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) น่าจะเป็นวิธีที่ดีและสามารถใช้แทนวิธีที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoassay) ได้ในอนาคต (11) แม้ว่าการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะด้วย Albumin blue 580 (AB 580) ที่พัฒนาโดย Kessler และคณะ ครั้งแรกเป็นการนำเสนอการตรวจวัดโดยใช้เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) แบบวิธีดั้งเดิม ต่อมาได้มีการนำน้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่เป็นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automate) (11) หรือในงานวิจัยโดยใช้เครื่องมืออื่นๆ เช่น capillary electrophoresis (20) Lab-on-a-chip ( LOC ) (21) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าว ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธี capillary electrophoresis ใช้เวลาในการตรวจอย่างน้อย 4 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง (20) สำหรับวิธี Lab-on-a-chip (LOC) ต้องใช้เวลาถึง 10 นาทีในการล้างอัลบูมินที่ติดอยู่ในท่อขนาดเล็ก (microchannel) ออกให้หมด ซึ่งถือว่าใช้เวลานานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ (21) และไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดแบบงานประจำ

ระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาลิซิส (Sequential injection analysis, SIA) เป็นอีกระบบหนึ่งที่ถูกพัฒนามาจากระบบโฟลอินเจกชันอะนาลิซิส (flow injection analysis, FIA) เพื่อใช้สำหรับงานตรวจวัดและวิเคราะห์สารเคมีต่างๆ จัดเป็นระบบที่วิเคราะห์สารแบบอัตโนมัติโดยใช้ระบบคอมพิวเตอร์เป็นตัวควบคุมสำหรับการดูดและปล่อยน้ำยา (13) ระบบ SIA นี้มีข้อดีหลายประการ โดยระบบจะสามารถตรวจสิ่งตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก และให้ผลการตรวจวัดที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย เพราะระบบ SIA นี้จะใช้ปริมาณน้ำยาน้อยมาก อีกทั้งของเสียที่ออกจากระบบก็มีปริมาณน้อยด้วย (14) นอกจากนั้นการวิเคราะห์สารด้วยการใช้ระบบ SIA นี้ยังสามารถเชื่อมต่อการเกิดปฏิกิริยา gas diffusion, extraction (liquid/liquid, gas/liquid and solid-phase), เอนไซม์และอิมมูโนแอสเซย์ ได้ง่ายทำให้เกิดความสะดวกในการวิเคราะห์ (22) จากข้อดีของระบบ SIA ที่กล่าวมานี้ทำให้ระบบ SIA นี้ มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็นอย่างมาก โดยได้มีการใช้ระบบ SIA มาประยุกต์ใช้ตรวจสารทางชีวภาพ ได้แก่ การตรวจหาโปรตีน

รวมและกลูโคสในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานซึ่งพบว่าให้ผลดีและสามารถใช้เป็นวิธีการตรวจกรอง (screening test) สำหรับการวินิจฉัยเบาหวานได้ (15) หรือ การตรวจหาไนไตรท์ และไนเตรทในซีรัมคนเพื่อทำนายปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค (16)

สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ยังไม่เคยมีการนำระบบ SIA มาประยุกต์ใช้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบ SIA สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแบบง่าย และรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการ Albumin Blue 580 Florescence assay ซึ่งเป็นหลักการที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธี radioimmunoassay (RIA) ที่เป็น gold standard (17) และเป็นหลักการที่ไม่ใช้ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยา (non-immunoassay) จึงไม่จำเป็นต้องใช้แอนติบอดีซึ่งมีราคาแพงในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจ ซึ่งในส่วนของการพัฒนาระบบ SIA นี้จะมีการเปรียบเทียบกับการวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธี immunoturbidimetry ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่วไป และได้มีการพิสูจน์แล้วว่ามีความไวและแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้ (18) การพัฒนาระบบ SIA ในครั้งนี้ได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ และพบว่าระบบ SIA นี้สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่มาจากคนปกติ และผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 1. ความยาวคลื่นของการกระตุ้น (1, 3) และการปลดปล่อย (2, 4) การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสาร AB 580 ในบัฟเฟอร์ pH 7.4 ก่อน (1, 2) และหลัง (3, 4) การเติม 11.1 mg/L human serum albumin (Modified from Kessler et al, 1997)

## บททวนวรรณกรรม

### 1. อัลบูมิน

อัลบูมินเป็นโปรตีนซึ่งพบมากในพลาสมาเมื่อเทียบกับโปรตีนโกลบูลิน (globulin) และไฟบริโนเจน (fibrinogen) คือมีปริมาณ 50-60% ของโปรตีนรวมทั้งหมดในพลาสมา อัลบูมินประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เพียงสายเดียว มีกรดอะมิโน 575 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 65,000 ดาลตัน ละลายน้ำได้ และถูกสร้างขึ้นที่ตับ โดยมีอัตราการสร้างประมาณ 10 กรัมต่อวัน อัลบูมินจะไม่ถูกเก็บที่ตับ แต่จะถูกปล่อยออกมาไหลเวียนในกระแสเลือด มีค่าครึ่งชีวิต (half life) 15-19 วัน มีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.7 และมีประจุสุทธิเป็นลบที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างของร่างกาย (pH = 7.4) เนื่องจากอัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีประจุลบมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ จึงสามารถจับกับ ligand ได้หลายชนิด อัลบูมินมีหน้าที่รักษาสมดุลของน้ำในร่างกาย ช่วยรักษา oncotic pressure และช่วยในการขนส่งสารโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น แคลเซียม (Calcium) (23), บิลิรูบินชนิดที่ไม่มีการควบจับ (unconjugated bilirubin) (24-26), กรดไขมันอิสระ (free fatty acids) (27), คอร์ติซอล (cortisol) (28) และไทรอกซีน (thyroxine) (29, 30) นอกจากนี้ยังสามารถจับกับยาในซีรัมได้ เช่น วาร์ฟาริน (warfarin) (31), ฟีนิลบูทาโซน (phenylbutazone) (32) และคลอไฟเบรท (clofibrate) (33)

อัลบูมินในเลือดมีความสำคัญทางคลินิก สามารถบอกถึงสภาวะของร่างกายและการทำงานของตับ และไตได้ การที่ปริมาณอัลบูมินในซีรัมต่ำกว่าปกติ อาจเกิดจากสาเหตุต่างๆ เช่น

1. ตับสร้างได้น้อย เนื่องจากเป็นโรคตับ (liver disease) หรือร่างกายได้รับโปรตีนไม่เพียงพอ
2. ระบบคาตาบอลิซึม (catabolism) ของร่างกายเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากเนื้อเยื่อถูกทำลาย หรือมีการอักเสบ
3. การดูดซึมกรดอะมิโนลดลง เนื่องจากสาเหตุการดูดซึมไม่ดี หรือภาวะทุพโภชนาการ
4. สูญเสียโปรตีนทางปัสสาวะเนื่องจากโรคไต (kidney disease) กรวยไตอักเสบเรื้อรัง หรือเป็นโรคเบาหวาน
5. อัลบูมินเปลี่ยนไปอยู่นอกเส้นเลือด เช่น ในผู้ป่วยโรคท้องมาร (ascites) ความดันของเส้นเลือดในตับจะสูง จนโปรตีนถูกขับออกมาอยู่ในน้ำในช่องท้อง การสูญเสียโปรตีนทางปัสสาวะและอุจจาระ เป็นผลให้เกิดภาวะอัลบูมินในเลือดต่ำอย่างรุนแรง ถ้าระดับอัลบูมินในเลือดต่ำกว่า 2 g/dL จะเกิดอาการบวมได้

ส่วนปริมาณอัลบูมินในเลือดสูงไม่มีความสำคัญทางคลินิก พบได้ไม่บ่อยนัก อาจพบได้ในภาวะขาดน้ำ (dehydration), โรคลมแดด (sunstroke), ออกกำลังกายอย่างหนัก, โรคกล้ามเนื้อสเคลอโรซิส (multiple sclerosis), ภาวะขาดฮอร์โมนไทรอยด์ (hypothyroidism) เป็นต้น

### 2. ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (microalbuminuria)

ในภาวะที่ไตทำงานได้ปกติ จะตรวจไม่พบอัลบูมินในปัสสาวะ หรือพบได้ในปริมาณน้อยกว่า 1% ของปริมาณอัลบูมินในร่างกาย ค่าปกติของปริมาณอัลบูมินจากปัสสาวะซึ่งเก็บครบ 24

ชั่วโมง มีค่าน้อยกว่า 30 มิลลิกรัม/วัน แต่เมื่อเกิดความผิดปกติขึ้นที่ไต ก็จะมีอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ หมายถึงภาวะที่มีการขับอัลบูมินออกทางปัสสาวะในปริมาณน้อยๆ ตรวจพบอัลบูมินประมาณ 30 -300 มิลลิกรัมภายในเวลา 24 ชั่วโมง หรือประมาณ 30 – 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของครีเอตินิน และจะต้องพบ 2 ใน 3 ครั้งของปัสสาวะที่เก็บต่างเวลากัน ซึ่งภาวะนี้สามารถบ่งชี้ถึงการเสื่อมหน้าที่ของไตในระยะเริ่มแรกได้ (34)

นอกจากนี้พบว่าภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ อาจเกิดจากสาเหตุอื่นได้ เช่น ภาวะไข้สูง ปัสสาวะมีเม็ดเลือดแดงปน การติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ การตั้งครรภ์ ภาวะหัวใจวาย การออกกำลังกายอย่างหนัก และมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่า การให้ยาในกลุ่มต้านการทำงานของ Angiotensin Converting Enzyme (ACE Inhibitor) เช่น ยาอีนาลาพริล (Enalapril) ซึ่งเป็นกลุ่มยาลดความดันโลหิตสูง จะมีผลช่วยลดระดับอัลบูมินในปัสสาวะ และสามารถชะลอการเสื่อมของไตได้

จากการศึกษาพบว่าภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (2, 3) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูง ดังนั้นการตรวจกรองเพื่อหาภาวะนี้จึงมีประโยชน์ในการช่วยป้องกันการเกิดโรคนี้ได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีข้อบ่งชี้ตามคำแนะนำของสมาคมแพทย์โรคเบาหวานในสหรัฐอเมริกา (1) ให้การตรวจวินิจฉัยภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ เป็นการตรวจกรองในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ในรายที่การดำเนินโรคเข้าสู่ปีที่ห้าเป็นต้นไป และในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ควรได้รับการตรวจตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน และหากตรวจไม่พบภาวะนี้ ก็ควรตรวจเช็คระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะต่อเนื่องทุกๆ ปี รวมทั้งในผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงที่ไม่ทราบสาเหตุ ก็ควรตรวจเช็คเช่นเดียวกัน ซึ่งจะช่วยให้สามารถติดตามการเสื่อมหน้าที่ของไตในระยะแรกเริ่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งโรคเบาหวานเป็นโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของร่างกายในการผลิตฮอร์โมนอินซูลินไม่เพียงพอ ทำให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูง และจะมีผลทำลายหลอดเลือดได้ในระยะยาวหากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม อาจนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้ โดยภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญ ภาวะแทรกซ้อนทางไต (Diabetic nephropathy) เกิดจากพยาธิสภาพของหลอดเลือดเล็กๆ ที่กลุ่มเส้นโลหิตฝอยโกลเมอรูลัส จะทำให้หน่วยไต (Nephron) ยอมให้อัลบูมินรั่วออกไปได้ ทำให้ Proximal tubule ดูดสารกลับมากขึ้น ซึ่งในระยะยาวจะทำให้เกิดภาวะไตเสื่อมได้

### 3. การตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ

ในภาวะปกติ พบอัลบูมินในปัสสาวะปริมาณต่ำ หรือในระยะที่มีความสำคัญทางคลินิกแล้ว เช่น ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (microalbuminuria) ถ้าใช้การตรวจโปรตีนในปัสสาวะด้วยการใช้แถบทดสอบธรรมดา (urine strip) นั้นมีความไวไม่เพียงพอ เนื่องจากการใช้แถบทดสอบธรรมดาจะให้ผลบวกต่อโปรตีน ก็ต่อเมื่อมีปริมาณโปรตีนรวมมีความเข้มข้นมากกว่า 300 mg/L ขึ้นไป และจะเป็นระยะที่ปริมาณอัลบูมินรั่วออกมามากแล้ว ซึ่งเป็นระยะที่แม้จะตรวจพบ ก็ไม่สามารถรักษาโรค

ให้หายขาดได้ เป็นเพียงการรักษาเพื่อให้การพัฒนาเป็นไตวายระยะสุดท้ายช้าที่สุดเท่านั้น ในปัจจุบัน การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน ใช้หลักการอิมมูโนแอสเซย์ ซึ่งมีความไวเพียงพอสำหรับอัลบูมินปริมาณน้อยๆ ในปัสสาวะ วิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วไปมีวิธีหลักๆ คือ การตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative) การตรวจแบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) และแบบเชิงปริมาณ (quantitative)

เมื่อทำการตรวจตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีการใช้แถบตรวจชนิดกึ่งปริมาณ แล้วให้ผลว่าอยู่ในภาวะไมโครอัลบูมินนรีเรีย ควรตรวจยืนยันด้วยการตรวจที่มีความจำเพาะมากกว่าเสมอ เช่น การตรวจวัดเชิงปริมาณ (quantitative) ซึ่งสามารถทำได้ 3 วิธี คือ

- 1) ตรวจจากปัสสาวะที่เก็บในช่วงเวลาเฉพาะ (timed collection) แต่ไม่ครบ 24 ชั่วโมง เช่น เก็บในระยะเวลา 4 ชั่วโมงหรือเก็บข้ามคืน เพื่อคำนวณหาอัตราการขับอัลบูมินที่ออกไปทางปัสสาวะต่อ 1 หน่วยเวลา (albumin excretion rate)
- 2) ตรวจจากปัสสาวะที่สุ่มตรวจครั้งเดียว (spot urine) เพื่อหาสัดส่วนปริมาณอัลบูมินต่อปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะ (urine albumin/creatinine concentration ratio) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด
- 3) การตรวจจากปัสสาวะ 24 ชั่วโมงเพื่อหาปริมาณอัลบูมินทั้งหมดที่ถูกขับออกไปทางปัสสาวะในช่วง 1 วัน

### 3.1 การตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative)

#### การใช้แถบจุ่ม (Albumin dipsticks)

การตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยการใช้แถบจุ่มเป็นวิธีดั้งเดิม ซึ่งตัวอย่างของแถบจุ่มที่อาศัยหลักการปฏิกิริยาทางเคมีของสารเคมีที่ตรึงอยู่กับแผ่นตรวจ ได้แก่ Clinitek Microalbumin dipsticks (Bayer Corporation) โดยอัลบูมินในปัสสาวะจะจับกับ sulfonephthalein dye และทำให้เกิดสีและอ่านด้วยหลักการการสะท้อนกลับ (reflectometry) ด้วยเครื่อง Clinitek 50 portable urine chemistry analyzer (Bayer Corporation) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงของห้องปฏิบัติการ วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะค่อนข้างต่ำ ตามรายงานพบว่ามีค่าความไว (sensitivity) หรือการตรวจพบได้ค่าบวกที่แท้จริงในช่วง 79%-95.4% และมีค่าความจำเพาะ (specificity) หรือค่าผลลบที่แท้จริงเพียง 73%-81% (35)

### 3.2 การตรวจแบบกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative method)

การตรวจแบบกึ่งปริมาณใช้หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟี (immunochromatography) คือ การแถบจุ่มสำหรับไมโครอัลบูมิน ซึ่งสามารถบอกปริมาณอัลบูมินที่พบในปัสสาวะได้เป็นช่วงๆ และอ่านด้วยตาเปล่าโดยเปรียบเทียบกับแถบสีมาตรฐานที่กำหนดมาให้ แถบตรวจไมโครอัลบูมินดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งแถบจุ่มที่เป็นที่นิยมใช้ทั่วไปคือ Micral-Test test strip (Boehringer Mannheim, Germany) อาศัยหลักการที่วอัลบูมินจะไหลผ่าน wick fleece ไปยังบริเวณ conjugate

fleece ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการจับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีที่ติดกับทอง (gold-labelled antibodies) จากนั้นโมเลกุลเชิงซ้อนจะไหลไปยังบริเวณตรวจวัด (detection pad) ซึ่งมีการเกิดสีสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และเปรียบเทียบความเข้มสีกับแถบสีอ้างอิงที่มีในชุดทดสอบ วิธีนี้บอกปริมาณของไมโครอัลบูมินเป็นช่วงๆ เช่น 0, 10, 20, 50, 100 mg/L มีรายงานวิจัยผลการเปรียบเทียบการวัดด้วยวิธีนี้กับวิธี immunonephelometry พบว่าวิธีแถบตรวจดังกล่าวมีความจำเพาะสูง (High specificity, 98%) แต่ความไวค่อนข้างต่ำ (low sensitivity 89%) ดังนั้นการตรวจวัดด้วยแถบจุ่มดังกล่าว จึงมีประโยชน์สำหรับการตรวจกรองเบื้องต้นเท่านั้น ไม่นิยมใช้ในการติดตามผล (follow-up) เนื่องจากมีความน่าเชื่อถือน้อย (36)

ความถูกต้องของการนำ Micral-Test ไปใช้ ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ตามรายงานในตารางที่ 1 ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกันที่ว่า วิธีนี้มีความจำเพาะค่อนข้างสูง แต่ความไวต่ำ ยกเว้นบางรายงานเท่านั้น เช่น ของ Cheung Tie et al (37) รายงานว่าตรวจวัดได้ค่าผลบวกจริงค่อนข้างต่ำ (12 จาก 75 ตัวอย่าง) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากผู้วิจัยใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่แช่แข็งไว้มาทำการตรวจวัดระดับอัลบูมิน มีรายงานวิจัยว่าระดับอัลบูมินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อมีการเก็บตัวอย่างแช่แข็ง (frozen) และจากงานวิจัยของ Jensen et al ที่พบว่า Micral-Test มีความจำเพาะต่ำ อาจเนื่องจากงานวิจัยดังกล่าว มีการใช้ตัวอย่างปัสสาวะจากคนปกติ ไม่ใช่จากผู้ป่วยเบาหวานเหมือนในงานวิจัยอื่นๆ (38)

งานวิจัยของ Le Floch et al ได้มีการศึกษาถึงประสิทธิผลต่อค่าใช้จ่าย (cost-effectiveness) ของการตรวจกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ โดยใช้ Micral-Test หรือการใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ และได้ข้อสรุปว่าวิธีการทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ควรใช้เป็นการตรวจยืนยัน ในผู้ป่วยที่มีผลบวกจากการใช้ Micral-Test นับเป็นวิธีที่มีประสิทธิผลต่อค่าใช้จ่ายมากกว่าการตรวจด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการทั้งหมด (39)

ตารางที่ 1 การศึกษาความถูกต้องของการใช้แถบตรวจ Micral-Test

| วิธีอ้างอิง | จำนวนสิ่ง<br>ตัวอย่างทั้งหมด | จำนวนสิ่งตัวอย่าง<br>ให้ผลบวก | Sensitivity | specificity | R <sup>2</sup> | ผู้แต่ง          | Ref  |
|-------------|------------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|----------------|------------------|------|
| IT          | 186                          | 52                            | 92          | 82          | 0.82           | Bengstad et al   | (40) |
| RIA         | 195                          | 35                            | 86          | 97          | 0.79           | Poulsen et al    | (41) |
| IT          | 396                          | 133                           | 91          | 95          | 0.73           | Spooren et al    | (42) |
| RIA         | 298                          | 108                           | 92          | 92          | -              | Gilbert et al    | (43) |
| IT          | 184                          | 71                            | 84          | 98          | -              | Jury et al       | (44) |
| RIA         | 112                          | 34                            | 100         | 91          | -              | Marshall et al   | (45) |
| RIA         | 75                           | 12                            | 759         | 879         | -              | Cheung Tiu et al | (37) |
| IT          | 167                          | 32                            | 63          | 100         | -              | Bashyam et al    |      |
| ELISA       | 1359                         | 76                            | 92          | 58          | -              | Jensen et al     | (38) |
| Neph        | 159                          | -                             | -           | -           | -              | Koury et al      | (46) |
| IT          | 506                          | 109                           | 91          | 80          | -              | Le Floch et al   | (39) |
| Neph        | 308                          | 185                           | 89          | 98          | 0.79           | Minetti et al    | (36) |

การตรวจวัดด้วยแถบทดสอบอีกชนิดคือ ของบริษัท Bayer® microalbumin/creatinie dipstick ซึ่งสามารถนาระดับไมโครอัลบูมินเปรียบเทียบกับค่าครีเอตินิน ซึ่งมีหลักการตรวจวัดระหว่างอัลบูมินกับสารสี (albumin dye-binding) และการใช้คอปเปอร์จับเป็นสารเชิงซ้อนกับครีเอตินินและทำปฏิกิริยาระหว่าง diisopropyl-benzene dihydroperoxide และ 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine และเกิดสี ซึ่งแถบทดสอบดังกล่าว สามารถใช้กับเครื่อง Bayer® Clinitek50® urine analyzer (47) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบการใช้แถบทดสอบดังกล่าวเปรียบเทียบกับวิธี immunoturbidity (ไมโครอัลบูมิน) และ Jaffe-kinetic method (ครีเอตินิน) พบว่ามีความไวค่อนข้างต่ำ 53.7% และความจำเพาะ 97.6% ดังนั้นการใช้แถบทดสอบนี้จึงมีข้อจำกัดใช้ในการตรวจกรองเบื้องต้นเท่านั้น

### 3.3 การตรวจเชิงปริมาณ (Quantitative method)

#### 3.3.1 การตรวจด้วยหลักการอิมมูโนแอสเซย์ (Immunologically-based assays)

การตรวจเชิงปริมาณนิยมใช้หลักการอิมมูโนแอสเซย์ เช่น radioimmunoassay (6), immunoturbidimetry (8), immunonephelometry (7), enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) (9), particle-enhance turbidimetry วิธีการทางอิมมูโนแอสเซย์ เป็นวิธีที่ใช้ตรวจยืนยันและหาปริมาณอัลบูมิน ในภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะหลังจากการตรวจกรองได้ผลบวก

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ จำเป็นต้องใช้เครื่อง manual spectrophotometer หรือเครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติ (automated spectrophotometric method) ที่ใช้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลทั่วไปและพบว่าเป็นการสิ้นเปลืองน้ำยาที่ใช้วิเคราะห์ และเนื่องจากแอนติบอดีจำเพาะต่ออัลบูมินมีราคาแพง จึงทำให้การตรวจวัดไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ อิมมูโนแอสเซย์ยังคงมีราคาแพง จึงเป็นข้อจำกัดที่ทำให้การตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ มีบริการเฉพาะบางโรงพยาบาล หรือคลินิกเอกชนบางแห่งเท่านั้น ทั้งๆ ที่การตรวจวัดดังกล่าวมีความสำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยเบาหวาน

### 3.3.2 การตรวจเชิงปริมาณ ชนิดไม่ใช้แอนติบอดี

#### 3.3.2.1 Fluorescent dye binding

เร็วๆ นี้มีงานวิจัยที่รายงานถึงวิธีที่ไม่ใช้หลักการทางอิมมูโนแอสเซย์ ที่มีความไวเพียงพอต่อการวัดอัลบูมินในปัสสาวะได้ และได้มีการเสนอว่าอาจมาใช้ทดแทนหลักการอิมมูโนแอสเซย์ได้ วิธีดังกล่าวใช้หลักการวัดการวาวแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent dye-binding assays) ที่เกิดจากการจับอย่างจำเพาะระหว่างอัลบูมินและสารสีชนิดหนึ่ง ซึ่งคือ albumin blue 580 (48, 49) สารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สูงมาก (50) วิธีดังกล่าวจึงมีความไวสูงเพียงพอ สามารถใช้ตรวจระดับอัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะได้, สารเชิงซ้อนมีค่า fluorescence quantum efficiency เพิ่มขึ้นอย่างน้อยสองเท่า มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าวิธี AB 580 dye-binding ให้ผลที่สอดคล้องกับวิธี immunonephelometry methods [16] หรือวิธี radioimmunoassays [13] และไม่มีสารรบกวนจากโกลบูลินหรือโปรตีนอื่นๆ ที่พบในปัสสาวะ ผู้วิจัยยังได้กล่าวว่าวิธี AB 580 dye-binding อาจนำมาใช้ทดแทนวิธีการทางอิมมูโนแอสเซย์ สำหรับใช้ตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณ [16]

นอกเหนือจากการใช้การวัดด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ ต่อมาได้มีงานวิจัยที่มีการใช้เครื่องมือในรูปอื่นๆ เช่น automated fluorescence assays [16], capillary electrophoresis [17] และในห้องปฏิบัติการบนชิป (lab-on-a-chip, LOC) [15] อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่นรูปแบบ LOC จำเป็นต้องมีการล้าง microchannel ด้วยน้ำเป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาทีเพื่อทำการ de-adsorption อัลบูมินที่เกาะติดตามผนังของท่อขนาดเล็ก

#### 3.2.2.2 HPLC method

การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ ปัจจุบันใช้วิธีตรวจวัดแบบกึ่งปริมาณที่มีการใช้แถบจุ่ม หรือตรวจเชิงปริมาณโดยวิธีอิมมูโนแอสเซย์ทั่วไป ดังได้กล่าวในข้างต้น ซึ่งเป็นการตรวจอัลบูมินที่อยู่ในรูปที่สมบูรณ์ ที่ไม่ได้ถูกดูดซึมกลับที่บริเวณ proximal tubular cells และขับออกมาในปัสสาวะ อัลบูมินรูปสมบูรณ์ดังกล่าว จึงถูกตรวจวัดได้ด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่ออัลบูมินด้วยวิธีทางอิมมูโนแอสเซย์ที่จำเพาะ อย่างไรก็ตาม ได้มีงานวิจัยที่กล่าวว่า ความเชื่อดังกล่าวไม่ถูกต้อง เนื่องจากได้มีการทดลองในหนูและคน แสดงให้เห็นว่าอัลบูมินที่พบในปัสสาวะอยู่ในรูปที่ไม่

สมบูรณ์ ถูกย่อย (degraded) ให้อยู่ในรูปสายเปปไทด์ (peptide fragments) เป็นจำนวนมาก (>95%) เมื่อมีการใช้เทคนิคการแยกสารด้วยขนาด (size-exclusion chromatography) และ differential filtration โดยใช้เมมเบรนที่เลือกขนาด (size selective membrane) แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์สายย่อยของอัลบูมินดังกล่าว มีขนาดตั้งแต่ 200-10,000 ดาลตัน

อัลบูมินที่ถูกกรองผ่านที่ไต อาจมาจากการถูกปรับเปลี่ยนโดยเอนไซม์ lysosomal proteases ใน tubular cells ก่อนจะมีการขับออกมาทางปัสสาวะ ซึ่งอัลบูมินที่สมบูรณ์มีปริมาณน้อยกว่า 1% และมากกว่า 99% เป็นชนิดที่ถูกทำลายแล้ว (albumin-derived fragments) (51-53) ซึ่ง fragments เหล่านั้น อาจเป็นชนิดที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีอิมมูโนแอสเซย์ทั่วไป หรือด้วยวิธีการใช้แถบจุ่มสำหรับไมโครอัลบูมิน (urinary dipstick methods) (52, 53) สมมติฐานดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Greive et al. ที่รายงานว่าอัลบูมินชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (immunounreactive albumin) ตรวจพบได้มากขึ้นในหนูที่เป็นเบาหวาน จึงอาจบ่งชี้ได้ว่า วิธีอิมมูโนแอสเซย์ทั่วไปแบบดั้งเดิมนั้น สามารถตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะได้ต่ำกว่าความเป็นจริง (54)

รายงานวิจัยของ Comper et al. ได้ตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่เก็บครบ 24-hr ในผู้ป่วยเบาหวานโดยเปรียบเทียบหลายวิธี ระหว่าง วิธี size exclusion HPLC, radioimmunoassay (RIA), reducing dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), และ native polyacrylamide gel electrophoresis (Native AGE) ผลการทดลองพบว่าวิธีที่มีความสอดคล้องกันสูงคือระหว่างวิธี HPLC และ Native PAGE, และระหว่างวิธี RIA และ SDS-PAGE และเขาได้ศึกษาโดยทำให้อัลบูมินชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่อยู่ในรูปที่สมบูรณ์ (immunounreactive intact albumin) และเมื่อถูกทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีส่วน fragments ที่มีขนาดเล็กกว่าอัลบูมินที่สมบูรณ์ (intact albumin) งานวิจัยดังกล่าวสรุปว่าวิธี HPLC ตรวจพบอัลบูมินได้สองชนิด คือ ชนิด immunoreactive และ immunounreactive (55)

อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยของ Sviridov et al ขัดแย้งกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่กล่าวว่าวิธี HPLC สามารถตรวจอัลบูมินได้มากกว่าวิธีอิมมูโนแอสเซย์ทั่วไป เนื่องจากวิธี HPLC สามารถตรวจวัดอัลบูมินชนิด immunounreactive ได้ด้วยนั้นเป็นความเข้าใจผิด เนื่องจากงานวิจัยของ Sviridov และคณะ ที่ได้ทำการแยกโปรตีนจากปัสสาวะ โดยใช้เทคนิค size-exclusion HPLC และใช้คอลัมน์ Zorbax Bio Series GF-250 พบว่าพีคของอัลบูมินที่แยกได้ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass spectrometry ผลการทดลองพบว่า มีโปรตีนหลายชนิด เช่น transferrin,  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein และ  $\alpha_2$ -HS glycoprotein ได้ถูกชะออกจากคอลัมน์พร้อมกับอัลบูมิน จึงทำให้เข้าใจผิดว่าตรวจวัดอัลบูมินได้ปริมาณมากกว่าวิธีอิมมูโนแอสเซย์

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีต่างๆ สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ

| Method                                                                                                                    | Detection range<br>(mg/L)                | LOD<br>(mg/L)        | Refs |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------|------|
| <b>Immunoassay</b>                                                                                                        |                                          |                      |      |
| Resonance scattering                                                                                                      | 0.03–0.96                                | 0.02                 | (56) |
| immunonanogold resonance scattering-quenching probe                                                                       | $4 \times 10^{-3} - 1.28 \times 10^{-1}$ | $3.2 \times 10^{-3}$ | (57) |
| Particle-enhanced immunoturbidity                                                                                         | $10^3 - 3 \times 10^4$                   | $1.9 \times 10^2$    | (58) |
| ELISA                                                                                                                     | 0.01 - 1                                 | 0.01                 | (59) |
| radioimmunoassay                                                                                                          | $4 - 6 \times 10^3$                      | $1.6 \times 10^{-5}$ | (60) |
| immunonephelometry                                                                                                        | nd                                       | nd                   | (61) |
| quartz crystal microbalance                                                                                               | 0.01–60                                  | 0.008                | (62) |
| <b>Non-immunoassay</b>                                                                                                    |                                          |                      |      |
| HPLC                                                                                                                      | 3.4                                      | 4-240                | (63) |
| Size-Exclusion Chromatography and LC-MS                                                                                   | 9-300                                    | 10                   | (64) |
| FIA resonance light scattering detection                                                                                  | 0.005-18                                 | nd                   | (65) |
| Rayleigh light scattering on dibromomethylchlorophosphonazo                                                               | $6.5 \times 10^{-2} - 4.005 \times 10^1$ | 0.03                 | (66) |
| resonance light scattering decrease (dibromo-o-nitrophenylfluorone (DBONPF)-sodium lauroyl glutamate (SLG) with proteins) | $7.5 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-1}$  | $1.7 \times 10^{-3}$ | (67) |
| Spectrophotometric method o-sulfophenylfluorone-metal complex                                                             | 1-15                                     | nd                   | (68) |
| Bromocresolgreen dye binding                                                                                              | $2.5 \times 10^2 - 2 \times 10^4$        | nd                   | (69) |
| Bromphenol blue                                                                                                           | $6 \times 10^2 - 12 \times 10^3$         | nd                   | (70) |
| AB580 automate fluorescent                                                                                                | 2–200                                    | 1.4                  | (71) |
|                                                                                                                           | 1–50                                     | 0.4                  |      |
| AB 580 spectrofluorometer                                                                                                 | nd                                       | 0.4                  | (50) |
| Capillary electrophoresis                                                                                                 | nd                                       | 11 nM                | (20) |
| OLED microchip                                                                                                            | 10 - 100                                 | nd                   | (72) |
| Laser-Induced Fluorescence                                                                                                | 1 - 100                                  | nd                   | (73) |

#### 4. ระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส (Sequential injection analysis system)

Sequential injection analysis (SIA) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากหลักการพื้นฐานของระบบโฟลว์อินเจกชันอะนาไลซิส (Flow Injection Analysis, FIA) ซึ่งระบบ FIA จะวิเคราะห์สารโดยฉีดสารละลาย (standard/sample หรือ reagent สำหรับ normal FIA หรือ reverse FIA ตามลำดับ) เข้าไปในกระแสตัวพา (carrier stream) ที่ไหลด้วยอัตราคงที่ในท่อขนาดเล็ก การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นขณะที่ผ่านท่อขด (mixing coil) และถูกตรวจวัดอย่างต่อเนื่องที่เครื่องตรวจวัด (detector) ที่ต่อเข้ากับเครื่องบันทึกสัญญาณ (recorder) สัญญาณที่ได้จะสัมพันธ์กับปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte)

สำหรับระบบ SIA สารละลายไม่ได้ไหลอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาเร็วและช้าอย่าง จะถูกดูดผ่าน multiport valve เข้ามาใน holding coil ตามลำดับ จากนั้น pump จะขับเคลื่อนในทิศทางตรงข้ามผลักดันให้สารละลายที่อยู่ใน holding coil ไหลผ่านไปยังเครื่องตรวจวัด (detector) ซึ่งระหว่างนั้นอาจมีการเกิดปฏิกิริยาหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น สามารถบันทึกได้เช่นเดียวกับในระบบ FIA แต่ในระบบ SIA สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ (เช่น ปริมาตรสาร อัตราการไหล ทิศทางการไหล และลำดับในการฉีดสาร) สามารถควบคุมและเปลี่ยนแปลงผ่านคอมพิวเตอร์โดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนแปลงระบบทางกายภาพ

ประโยชน์ของการตรวจวัดสารเคมีด้วยระบบ SIA มีหลายประการ คือระบบ SIA ให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ ทำงานได้สะดวก รวดเร็ว การเตรียมตัวอย่างง่าย ตัวระบบสามารถเชื่อมต่อการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์หรือปฏิกิริยาทางอิมมูโนแอสเซย์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำการตรวจสิ่งตัวอย่างได้ครั้งละมากๆ และใช้ปริมาณน้ำยาน้อย ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและช่วยลดต้นทุนในการตรวจวัด รวมทั้งของเสียที่ออกจากระบบก็มีปริมาณน้อยด้วย

การนำระบบ SIA มาประยุกต์ใช้ตรวจวัดสารเคมีและสารชีวภาพในงานด้านต่างๆ สามารถสรุปได้ดัง ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสารเคมีและสารชีวภาพต่างๆ ที่นำมาตรวจวัดด้วยระบบ SIA

| สารที่ตรวจวัด                    | หลักการและวิธีการตรวจวัด                                                                                                                                                                                                                                                   | Ref. |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>งานทางด้านการแพทย์</b>        |                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |
| โปรตีนและกลูโคสในปัสสาวะ         | โดยใช้หลักการ spectrophotometric วัดโปรตีนที่ความยาวคลื่น 607 nm และวัดกลูโคสที่ความยาวคลื่น 520 nm                                                                                                                                                                        | (15) |
| ครีเอตินิน และ ครีเอตินินในซีรัม | ใช้ multi- enzyme ของ creatininase (CA), และ/หรือ creatinase (CI) และ sarcosine oxidase (SO) แล้ววัด $H_2O_2$ ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า                                                                                                                                         | (74) |
| ไนไตรท์และไนเตรทในซีรัม          | ไนเตรทจะถูกเปลี่ยนเป็น ไนไตรท์หลังจากถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ nitrate reductase และตรวจวัดด้วยวิธี spectrophotometric                                                                                                                                                         | (16) |
| <b>งานทางด้าน Bioprocessing</b>  |                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |
| กลูโคส                           | ตรวจวัด $H_2O_2$ ที่เกิดขึ้น ด้วยปฏิกิริยา chemiluminescence                                                                                                                                                                                                               | (75) |
| แอมโมเนีย และ แอมโมเนียมไนโตรเจน | แอมโมเนีย ที่แพร่ผ่าน hydrophobic membrane ผสมกับ bromothymol blue indicator และตรวจวัดด้วยวิธี spectrophotometric ที่ความยาวคลื่น 580 nm                                                                                                                                  | (76) |
| Biomass                          | ตรวจวัดด้วยหลักการการวัดความขุ่น (Turbidimetry)                                                                                                                                                                                                                            | (77) |
| <b>งานทางด้านสิ่งแวดล้อม</b>     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |
| แคลเซียม                         | ตรวจวัด $Ca^{2+}$ o-cresolphthaleine complex จากสมการ<br>$Ca^{2+} + o-cresolphthalein \text{ complexone} \longrightarrow Ca^{2+} \text{ o-cresolphthaleine complex.}$<br>ด้วยวิธี spectrophotometric ที่ความยาวคลื่น 620 nm.                                               | (78) |
| ไนไตรท์, ไนเตรท                  | ไนเตรท ถูก รีดิวซ์ โดย hydrazine ในสภาวะต่างเป็น ไนไตรท์ ไนไตรท์ ที่ได้ทำปฏิกิริยากับ sulphanilamide และ naphthylethylenediamine ได้ coloured complex ตรวจวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยวิธี spectrophotometric ที่ความยาวคลื่น 540 nm                                               | (79) |
| ฟอสเฟต                           | ตรวจวัด Mo(V) ที่ได้จากสมการด้วยวิธี spectrophotometric<br>$H_3PO_4 + 12 H_2MoO_4 \longrightarrow H_3P(Mo_{12}O_{40}) + 12 H_2O.$<br>$Mo(VI) \longrightarrow Mo(V)$                                                                                                        | (80) |
| <b>งานทางด้านอุตสาหกรรม</b>      |                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |
| Lead, nickel, vanadium           | ตรวจวัดด้วยหลักการ ICP-MS.                                                                                                                                                                                                                                                 | (81) |
| $^{90}Sr$                        | $^{90}Sr$ แยกได้จาก other radionuclides ด้วยการ extraction ภายในคอลัมน์ และตรวจวัดด้วย flow-through liquid scintillation counter.                                                                                                                                          | (82) |
| <b>งานทางด้านเภสัชวิทยา</b>      |                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |
| มอร์ฟิน                          | ตรวจวัด Acidic potassium permanganate โดยใช้หลักการ chemiluminescence                                                                                                                                                                                                      | (83) |
| พาราเซตามอล                      | อาศัยหลักการของปฏิกิริยาไนโตรเซชัน โดยพาราเซตามอลทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ในสภาวะกรด ได้สารประกอบที่ไม่เสถียร เมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะได้สารประกอบที่มีความเสถียรเพิ่มขึ้น ซึ่งสารประกอบที่ได้มีสีเหลืองในสภาวะเบสและสามารถตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 430 nm | (84) |

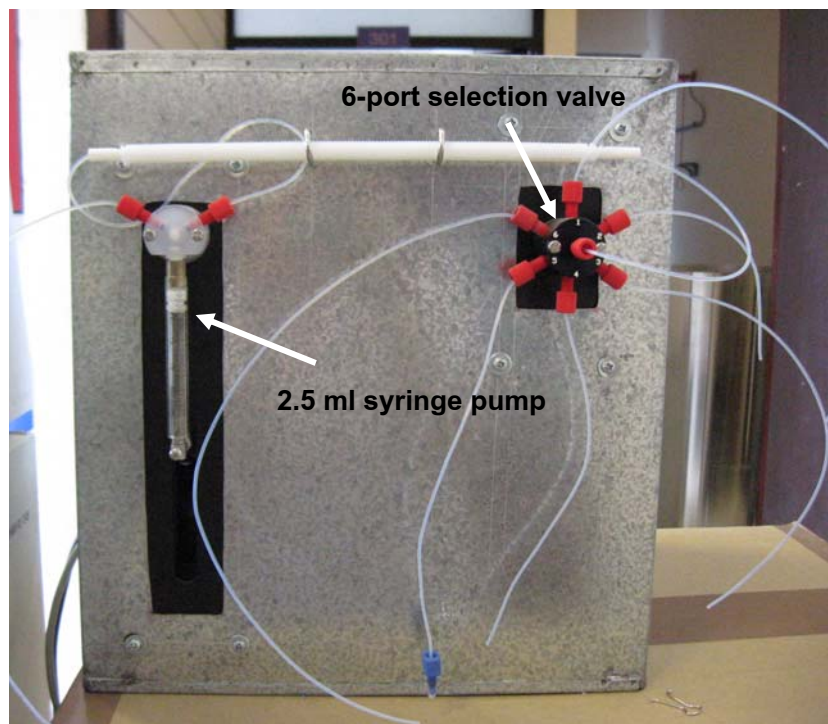
## วิธีการดำเนินการวิจัย

### สารเคมีและน้ำยา

1. Reagent A (Albumin blue 580 potassium salt solution (AB 580) เป็นสินค้าจากบริษัท Fluka Chemica AG (Buchs, Switzerland) Product No. 05497
2. Reagent B ในงานวิจัยนี้ใช้เป็น Carrier buffer ประกอบด้วย MOPS free acid 11.1g , NaCl 12.0 g , EDTA disodium salt 1.0 g , และ 100 ml of 2-propanol ปรับ pH ให้ได้  $7.4 \pm 0.2$  ด้วย NaOH และปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 ml ด้วยน้ำ MilliQ จากนั้นกรองด้วย 0.45  $\mu\text{m}$  โดยใช้กระดาษกรองชนิด Cellulose acetate เก็บที่ 4 °C จนกว่านำมาใช้งาน
3. Calibrator diluent ใช้สำหรับเตรียมสารละลายอัลบูมินมาตรฐาน Calibrator diluent ปริมาตร 500 ml ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.7 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.18 g, NaCl 4.5 g, EDTA disodium salt 0.5 และ human IgG 50 mg สารละลายที่เตรียมได้ pH ควรอยู่ในช่วง  $6.0 \pm 0.5$
4. Microalbumin assay kit สำหรับวิเคราะห์อัลบูมินในปัสสาวะเปรียบเทียบกับวิธีที่พัฒนาได้ เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Randox Laboratories (United Kingdom)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Sequential injection analysis (SIA) ประกอบด้วยไซริงค์ปั๊ม (syringe pump) (Cavro XL 3000, Cavro Scientific Instruments Inc., USA) โดยใช้ไซริงค์ปริมาตร 2.5 mL และมี port ทั้งหมด 6 port (Cavro Smart Valve, Cavro Scientific Instruments Inc., USA) ดังแสดงในรูปที่ 2
2. เครื่อง Fluorescence detector (RF-10AX Shimadzu, Japan)
3. เครื่องมืออื่นๆ เช่น เครื่องชั่งสาร, pH meter, magnetic stirrer, centrifuge, vortex mixture และเครื่อง ultrasonic cleaner



รูปที่ 2 เครื่อง Sequential injection analysis

### สิ่งตัวอย่างและการเตรียม

ใช้ปัสสาวะ (fresh urine) ซึ่งเก็บจากผู้ป่วยเบาหวาน จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลราชวิถี จำนวน 72 คน ( $n = 72$ ) กรณีไม่ทำการตรวจวัดทันที นำปัสสาวะมาเติมด้วย Sodium azide ในอัตราส่วน 1 mL : 2  $\mu$ L เพื่อรักษาภาพปัสสาวะ

ก่อนทำการตรวจวัด นำปัสสาวะมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกส่วนใสมาตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมิน

## ขั้นตอนการดำเนินงาน

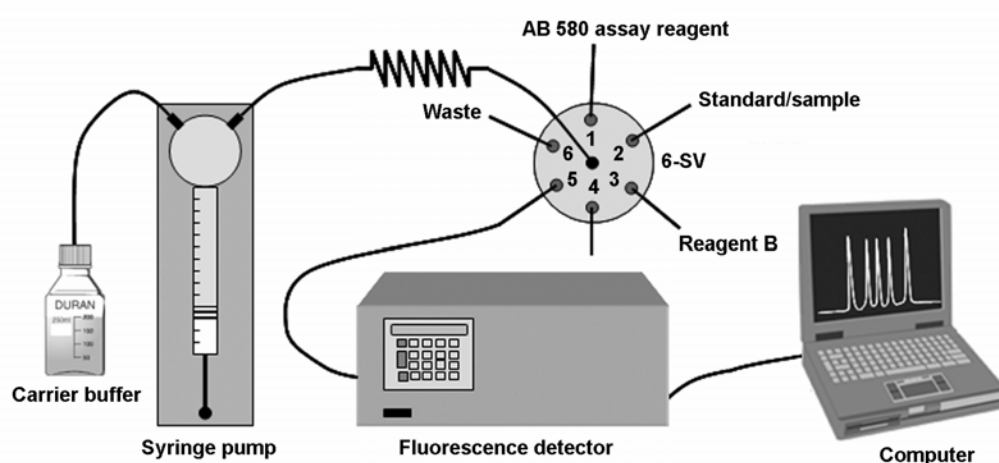
### 1. การติดตั้งระบบ SIA สำหรับตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมิน

ส่วนประกอบของระบบ SIA แสดงในรูปที่ 3 ประกอบด้วย 2.5 ml syringe pump สำหรับนำ carrier buffer เข้าสู่ระบบ สำหรับ 6-port selection valve นั้น port ที่ 1 ส่งให้มีการดูดน้ำยา AB 580 working solution สำหรับ port ที่ 2 สำหรับดูดสิ่งตัวอย่างหรืออัลบูมินมาตรฐาน สำหรับ port ที่ 3 ดูด reagent B ใช้ในกรณีตรวจวัด sample blank (ตัวอย่างปัสสาวะผสมกับ reagent B และวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์) port ที่ 5 เชื่อมต่อกับฟลูออเรสเซนซ์ดีเทคเตอร์ และ port ที่ 6 สำหรับปล่อยของเสียทิ้ง

ก่อนทำการทดลองนำน้ำยา A (Reagent A) และ น้ำยา B (Reagent B) ออกจากตู้เย็น รอให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง และกำจัดฟองอากาศ Reagent B โดยเครื่อง Ultrasonic จากนั้นเตรียม AB 580 working solution ถ้าไม่ได้กล่าวเป็นอย่างอื่น ใช้สัดส่วน Reagent A ต่อ Reagent B ที่ 1:25 เสมอ

สารละลายอัลบูมินมาตรฐาน เตรียมโดยละลาย Human serum albumin Calibrator diluent ให้มีความเข้มข้นช่วง 0-200 mg/L โดยเตรียมจาก stock albumin standard ความเข้มข้น 2000 mg/L และอัลบูมินมาตรฐาน จะเตรียมใหม่ทุกวัน

ถ้าไม่ได้กล่าวเป็นอย่างอื่นลำดับการดูดสารเข้าระบบ ปริมาตรการดูด และอัตราการไหลที่ใช้ ดังแสดงใน ตารางที่ 4



รูปที่ 3 แสดงส่วนประกอบของระบบ SIA ซึ่งประกอบด้วย 2.5 ml syringe pump สำหรับนำ carrier buffer เข้าสู่ระบบ, 6-port selection valve โดย port ที่ 1 ดูดน้ำยา AB 580 working solution, port ที่ 2 ดูดสิ่งตัวอย่างหรืออัลบูมินมาตรฐาน, port ที่ 3 ดูด reagent B, port ที่ 5 เชื่อมต่อกับฟลูออเรสเซนซ์ดีเทคเตอร์ และ port ที่ 6 สำหรับปล่อยของเสียทิ้ง

ตารางที่ 4 แสดงลำดับการตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบ SIA

| Step | Operation                                | Valve of pump | Port of selection valve | Volume (μL/s) | Flow rate (μL/s) |
|------|------------------------------------------|---------------|-------------------------|---------------|------------------|
| 1    | Aspirate carrier buffer to syringe pump  | In            | -                       | 1200          | 200              |
| 2    | Aspirate AB 580 working solution         | Out           | 1                       | 100           | 100              |
| 3    | Aspirate standard/sample to holding coil | Out           | 2                       | 100           | 100              |
| 4    | Aspirate AB 580 working solution         | Out           | 1                       | 50            | 50               |
| 5    | Dispense mixture to fluorescent detector | Out           | 5                       | 950           | 25               |

## 2. Optimization

### 2.1 ทดสอบอัตราส่วนการเตรียมน้ำยา AB 580 working solution ที่เหมาะสม

จากงานวิจัยของ Kessler อัตราส่วนระหว่าง Reagent A กับ Reagent B คือ 1:50 แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ พบว่าธรรมชาติของระบบ SIA มีความแตกต่างจากการตรวจวัดในระบบ Batch ที่มีการใช้คิวเวตต์ เนื่องจากระบบของไหลมีการแพร่ของสารภายในท่อขณะมีการตรวจวัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ตรวจสอบ อัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมน้ำยา AB 580 working solution โดยทดลองน้ำยา AB 580 (Reagent A) ต่อ carrier buffer (Reagent B) ในอัตราส่วน 1:10, 1:25 และ 1:50 และในการทดลองให้มีลำดับการดูด AB 580 working solution : Sample (μL) เป็น 75 : 25 μL และความเข้มข้นอัลบูมินที่ใช้ในการทดลองคือ 50 mg/L

### 2.2 ทดสอบปริมาตรในการดูดน้ำยา AB 580 working solution ที่เหมาะสม

การทดลองนี้สัดส่วนของ AB 580 working solution ที่เหมาะสมและใช้ในการทดลองคือ 1 : 25 โดยให้ปริมาตรของ sample คงที่ที่ 100 μL และความเข้มข้นอัลบูมินที่ใช้ในการทดลองคือ 25 mg/L ปริมาตรของน้ำยาที่ใช้ต่อปริมาตรของสิ่งตัวอย่าง ดังนี้ 25 : 100, 50 : 100, 75 : 100, 100 : 100, 125 : 100, 150 : 100 μL

### 2.3 ทดสอบปริมาณในการดูดสิ่งตัวอย่าง (sample) ที่เหมาะสม

โดยทดลองดูดสิ่งตัวอย่าง ในปริมาตรที่ต่างกัน ดังนี้ 25, 50, 75, 100, 125 และ 150  $\mu\text{L}$  โดยใช้ปริมาตรของน้ำยา AB 580 working solution คงที่ที่ 50  $\mu\text{L}$  และความเข้มข้นอัลบูมินที่ใช้ในการทดลองคือ 25 mg/L

### 2.4 ทดสอบลำดับของการฉีดสารเข้าไปในระบบ

ในการวิจัยครั้งนี้ได้มีการตรวจสอบว่าลำดับการฉีดสารรูปแบบใด ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็ว โดยให้ความไวของการตรวจวัดสูงสุด รูปแบบของลำดับการฉีดสารที่ได้ทดสอบดังนี้

- ดูด AB 580 working solution ก่อน แล้วจึงดูด sample
- ดูด AB 580 working solution ก่อน แล้วจึงดูด sample และ AB 580 working solution ตามลำดับ

โดยในการทดลองกำหนดให้ดูปริมาตรของสิ่งตัวอย่างคงที่ที่ 100  $\mu\text{L}$

### 2.5 ทดสอบหาปริมาตรของ carrier buffer ที่เหมาะสม

ปริมาตรของ carrier buffer ที่ใช้ในการทดลองมีผลต่อ baseline ของ fluorescent peaks ซึ่งถ้าปริมาตรน้ำยาไม่เพียงพอ จะทำให้ฐานของพีคไม่เรียบ ในงานวิจัยจึงทดลองใช้ carrier buffer ปริมาตรต่างๆ ดังนี้ 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300 และ 1400  $\mu\text{L}$

### 2.6 ทดสอบอัตราการไหล (Flow rate) ที่เหมาะสม

เพื่อดูอัตราการไหลที่เหมาะสมของน้ำยาที่ใช้ในปฏิกิริยา โดยทดลองใช้อัตราการไหลของน้ำยา ที่ความเร็วต่างๆ ดังนี้ 10, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{L/s}$

## 3. Characterization

3.1 ศึกษาช่วงที่วิธีที่พัฒนาได้สามารถตรวจวัดได้ (Assay range) และหาค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection)

3.2 ความแม่นยำ (precision) และ reproducibility

3.3 ทดสอบหาสารรบกวน (Interferences) ต่างๆ ได้แก่ โปรตีน (transferrin, IgG, pepsin), drugs (acetylsalicylic acid, indomethacin, aminocetaphen, ibuprofen), 2-ketobutyric acid, แอสคอร์บิก แอซิด (ascorbic acid), โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), กลูโคส (glucose), ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และ บิลิรูบิน (billirubin)

3.4 Method validation

เพื่อศึกษาว่าวิธีที่พัฒนาได้สามารถตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะได้สอดคล้องกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปหรือไม่ ในการวิจัยครั้งนี้ได้เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับวิธีอ้างอิง (วิธี immunoturbidimetry) โดยใช้ microalbumin kit จาก บริษัท Randox Laboratories และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer (Evolution 600, Thermo Scientific, USA)

วิธีการทดลอง ปิเปตต์ reagent buffer ปริมาตร 0.5 ml และ sample/standard ปริมาตร 0.05 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm (A1) จากนั้นเติม antibody solution ปริมาตร 0.05 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง (A2) ทำการสร้างกราฟมาตรฐานชนิด semi-log ระหว่างความเข้มข้นของอัลบูมินกับผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง (A2-A1) เพื่อนำไปหาค่าความเข้มข้นของอัลบูมินจากสิ่งตัวอย่าง ในการทดลองมีการควบคุมคุณภาพโดยทำการตรวจวัด control ทั้งสองระดับที่มาพร้อมกับชุดทดสอบ

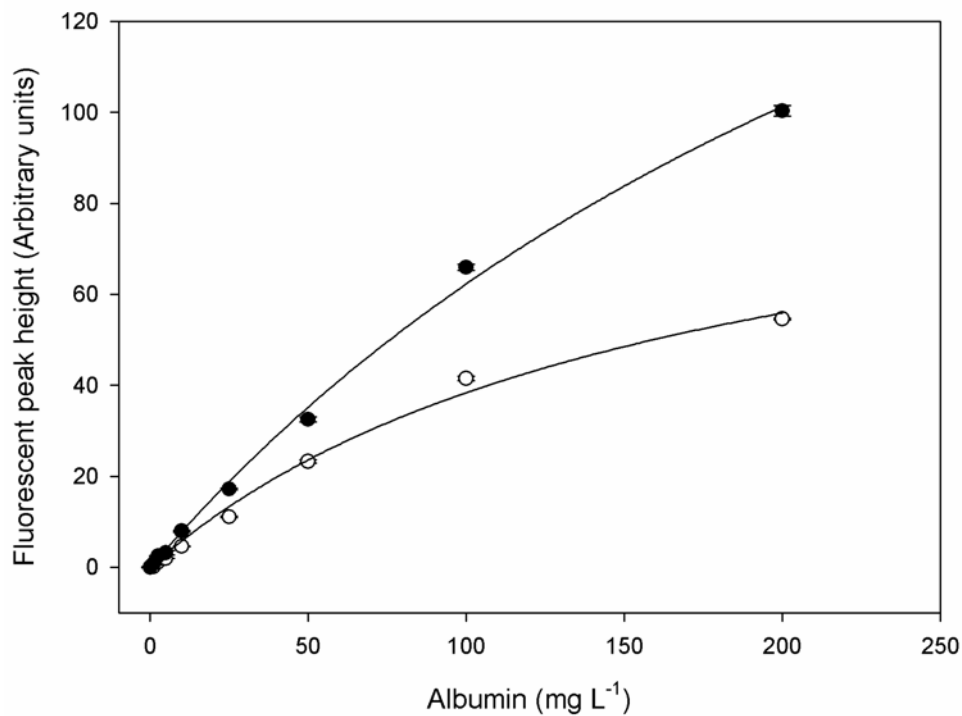
## ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

### 1. อัตราส่วนน้ำยา AB 580 working solution ที่เหมาะสม ในระบบ SIA

น้ำยา AB 580 working solution ที่ใช้ในการทดลองประกอบไปด้วย AB 580 dye potassium salt solution (Reagent A) และ Carrier Buffer (Reagent B) โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง Reagent A ต่อ Reagent B ต้องเป็นอัตราส่วนที่เมื่อทำปฏิกิริยากับสิ่งตัวอย่างแล้วให้ความไวของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด ในขณะที่เดียวกันควรใช้ปริมาณ น้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) น้อยๆ เพื่อเป็นการประหยัด ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโดยใช้อัตราส่วน Reagent A ต่อ Reagent B คือ 1 : 10 , 1 : 25 และ 1 : 50 สำหรับเตรียมน้ำยา AB 580 working solution ความเข้มข้นของอัลบูมิน (Sample) ที่ใช้ทดสอบคือ 25 mg/L ปริมาตรของ Sample และปริมาตรของน้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) คือ 25  $\mu$ l และ 75  $\mu$ l ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าที่อัตราส่วน 1 : 10 ให้ความไวของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด ในขณะที่ถ้าใช้อัตราส่วน 1 : 25 และ 1 : 50 สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงประมาณ 10% ถึงแม้ว่าที่อัตราส่วน 1 : 10 จะให้ความไวของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด ผู้วิจัยไม่ได้เลือกใช้อัตราส่วนนี้เนื่องจากที่อัตราส่วนนี้จะใช้ปริมาณ น้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) ค่อนข้างมากซึ่งจะเป็นการสิ้นเปลือง ในการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยา Albumin blue 580 (AB 580) โดยใช้วิธีคิวเวตต์ (Cuvette-based method) ใช้อัตราส่วน 1 : 50 ในการเตรียมน้ำยา AB 580 working solution (10) แต่เนื่องจากธรรมชาติของระบบของไหล (flow based method) จะมีการแพร่ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ไปถึงเครื่องตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์แตกต่างจากการตรวจวัดโดยใช้วิธีคิวเวตต์ (Cuvette-based method) ทำให้ต้องมีการหาอัตราส่วน Reagent A ต่อ Reagent B ที่เหมาะสมใหม่ ในการที่จะเลือกว่าจะใช้อัตราส่วน 1 : 25 และ 1 : 50 นั้น ผู้วิจัยได้ทดสอบโดยเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานอัลบูมินความเข้มข้น 0-200 mg/L จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วน 1 : 50 ซึ่งมีความเจือจางมากกว่า กราฟมาตรฐานที่ได้มีช่วงแคบกว่าการใช้อัตราส่วน 1:25 นอกจากนั้นอัตราส่วน Reagent A ต่อ Reagent B ยังมีผลต่อความไวของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยเฉพาะเมื่อใช้ตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้นสูง ดังรูปที่ 4 ตัวอย่าง เช่นระหว่างอัตราส่วน 1 : 25 และ 1 : 50 เมื่อใช้อัตราส่วน 1 : 50 ในการวัดความเข้มข้นของอัลบูมิน 200 mg/L ความไวของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงประมาณ 50% เมื่อเทียบกับการใช้อัตราส่วน 1:25 ในขณะที่ใช้อัตราส่วน 1:50 ในการวัดความเข้มข้นของอัลบูมินต่ำกว่า 10 mg/L พบว่าความไวของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ไม่แตกต่างจากอัตราส่วนที่ 1:25 จากเหตุผลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงเลือกอัตราส่วน Reagent A ต่อ Reagent B ที่ 1 : 25 ในการเตรียมน้ำยา AB 580 working solution สำหรับทำการทดลองทุกการทดลอง

ในการใช้อัตราส่วน Reagent A ต่อ Reagent B ที่ 1 : 25 นั้นพบว่ามีความคงตัวของน้ำยานานอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของอัลบูมิน 100 mg/L ทำการตรวจวัดทุกๆ

2 ชั่วโมงเป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์หลังผ่านไป 8 ชั่วโมง คิดเป็น 92.36% และ 86.32% เมื่อใช้อัตราส่วน 1 : 25 และ 1 : 50 ตามลำดับ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5



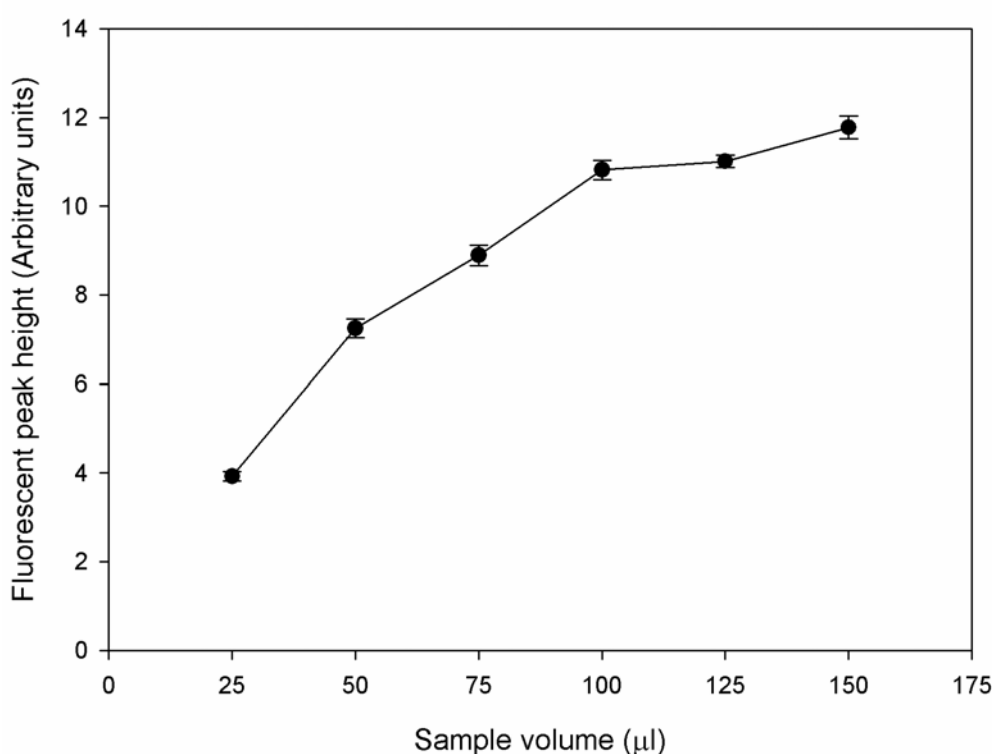
รูปที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างการใช้อัตราส่วนระหว่าง Reagent A ต่อ Reagent B ที่ความเข้มข้น 1:25 (●) และ 1: 50 (○)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยา AB 580 working solution

| Time after preparation (h) | Remained signals |         |
|----------------------------|------------------|---------|
|                            | 1:25             | 1:50    |
| 0                          | 100 %            | 100 %   |
| 2                          | 111.87 %         | 93.19 % |
| 4                          | 98.20 %          | 90.74 % |
| 6                          | 102.49 %         | 90.30%  |
| 8                          | 92.36%           | 86.32%  |
| 10                         | 83.74 %          | 74.75%  |

## 2. ปริมาตรสิ่งตัวอย่าง (Sample) ที่เหมาะสมในระบบ SIA

การศึกษาหาปริมาตรสิ่งตัวอย่าง (Sample) ที่เหมาะสมในงานวิจัยครั้งนี้ กำหนดให้ระบบดูดน้ำยา AB 580 working solution ปริมาตรคงที่ที่ 50  $\mu\text{L}$  และดูดสิ่งส่งตัวอย่างปริมาตรต่างๆ ในช่วง 25 – 150  $\mu\text{L}$  โดยเว้นช่วงละ 25  $\mu\text{L}$  ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคกับปริมาตรสิ่งตัวอย่างความเข้มข้นอัลบูมิน 10 mg/L สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรสิ่งส่งตรวจที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาตรสิ่งส่งตรวจเกิน 100  $\mu\text{L}$  พบว่าไม่มีผลต่อสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ และการเพิ่มปริมาตรสิ่งส่งตรวจเกิน 100  $\mu\text{L}$  อาจทำให้มากเกินไปสำหรับการทำปฏิกิริยากับน้ำยา AB 580 working solution ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรสิ่งส่งตรวจ 100  $\mu\text{L}$



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวของการตรวจวัดกับปริมาตรสิ่งตัวอย่างที่ใช้ในระบบ SIA

## 3. ปริมาตรของน้ำยา AB 580 working solution ที่เหมาะสมในระบบ SIA

จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า ปริมาตรของน้ำยา AB 580 working solution และปริมาตรสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมคือ 50  $\mu\text{L}$  และ 100  $\mu\text{L}$  ตามลำดับ และเพื่อเป็นการศึกษาว่าสัดส่วนของน้ำยา AB 580 working solution ที่ใช้นั้นเพียงพอที่จะทำให้สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองให้มีการดูดน้ำยา AB 580 working solution ปริมาตรต่างๆ ในช่วง 25 –

350  $\mu\text{L}$  ความเข้มข้นของอัลบูมินที่ใช้ทดสอบ คือ 25 mg/L การทดลองในช่วงแรกใช้ลำดับสารในการทำปฏิกิริยา ดังรูปที่ 6 (แบบ A) คือดูดน้ำยา AB 580 working solution ก่อนแล้วดูดสิ่งส่งตรวจตามมาที่ตามลำดับ ผลการทดลอง แสดงในรูปที่ 7 (เมื่อใช้ลำดับ A) (เส้นทึบ) พบว่าการเพิ่มปริมาตรของน้ำยา AB 580 working solution ทำให้ความไวของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มมากขึ้น สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์จะเริ่มคงที่เมื่อปริมาตรของน้ำยา AB 580 working solution ต่อปริมาตรสิ่งตัวอย่าง เป็น 100 : 100  $\mu\text{L}$  ซึ่งที่อัตราส่วนนี้สามารถเพิ่มสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นประมาณ 20% เมื่อเทียบกับการใช้อัตราส่วน 50 : 100  $\mu\text{L}$

นอกจากนั้นผู้วิจัยยังทำการศึกษาต่อว่าถ้าหากเพิ่มปริมาตรน้ำยา AB 580 working solution หลังจากการดูดสิ่งส่งตรวจ (รูปที่ 6 แบบ B) จะมีผลทำให้ความไวของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มมากขึ้นหรือไม่ ผลการทดลอง แสดงในรูปที่ 7 (เมื่อใช้ลำดับ B) (เส้นประ) พบว่าการเพิ่มปริมาตรน้ำยา AB 580 working solution อีก 50  $\mu\text{L}$  ซึ่งทำให้ปริมาตรรวมของน้ำยา AB 580 working solution ในระบบเป็น 150  $\mu\text{L}$  จะมีผลทำให้ความไวของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มมากขึ้นจากเดิมประมาณ 50% เมื่อเทียบกับลำดับสารแบบ A การเพิ่มปริมาตรน้ำยา AB 580 working solution ในครั้งหลังนี้พบว่าหากเพิ่มเกินกว่า 50  $\mu\text{L}$  จะ ไม่มีผลต่อความไวของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้นลำดับสารแบบดูดน้ำยา AB 580 working solution (100  $\mu\text{L}$ ) ตามด้วยดูดสิ่งส่งตรวจ (100  $\mu\text{L}$ ) และ ดูดน้ำยา AB 580 working solution (50  $\mu\text{L}$ ) อีกครั้ง ตามลำดับ จึงเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดในระบบ SIA โดยให้สัญญาณการตรวจวัดสูงสุด

อย่างไรก็ตามเนื่องจากผลการทดลองที่ได้ทำการทดสอบกับอัลบูมินความเข้มข้น 25 mg/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำ ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการทดลองโดยใช้อัลบูมินความเข้มข้นในช่วงสูงด้วย โดยเลือกความเข้มข้น 100 mg/L และผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งแตกต่างจากการใช้อัลบูมินความเข้มข้น 25 mg/L เล็กน้อย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มน้ำยา AB 580 working solution ทำให้ความไวการตรวจวัดเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อเพิ่มปริมาตรน้ำยาถึง 200  $\mu\text{L}$  แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าเมื่อให้ระบบดูดน้ำยาปริมาตรรวมทั้งหมด 200  $\mu\text{L}$  ความไวของการตรวจวัดเพิ่มขึ้นเพียง 20% เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ปริมาตรน้ำยาทั้งหมด 150  $\mu\text{L}$  ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ ลำดับการดูดสารที่เลือกใช้ตลอดการทดลองคือ AB 580 working solution (100  $\mu\text{L}$ ), สิ่งตัวอย่าง (100  $\mu\text{L}$ ), และ AB 580 working solution (50  $\mu\text{L}$ ) ตามลำดับ โดยพิจารณาจากความเหมาะสมระหว่างความสิ้นเปลืองของน้ำยา AB 580 working solution และความไวของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์

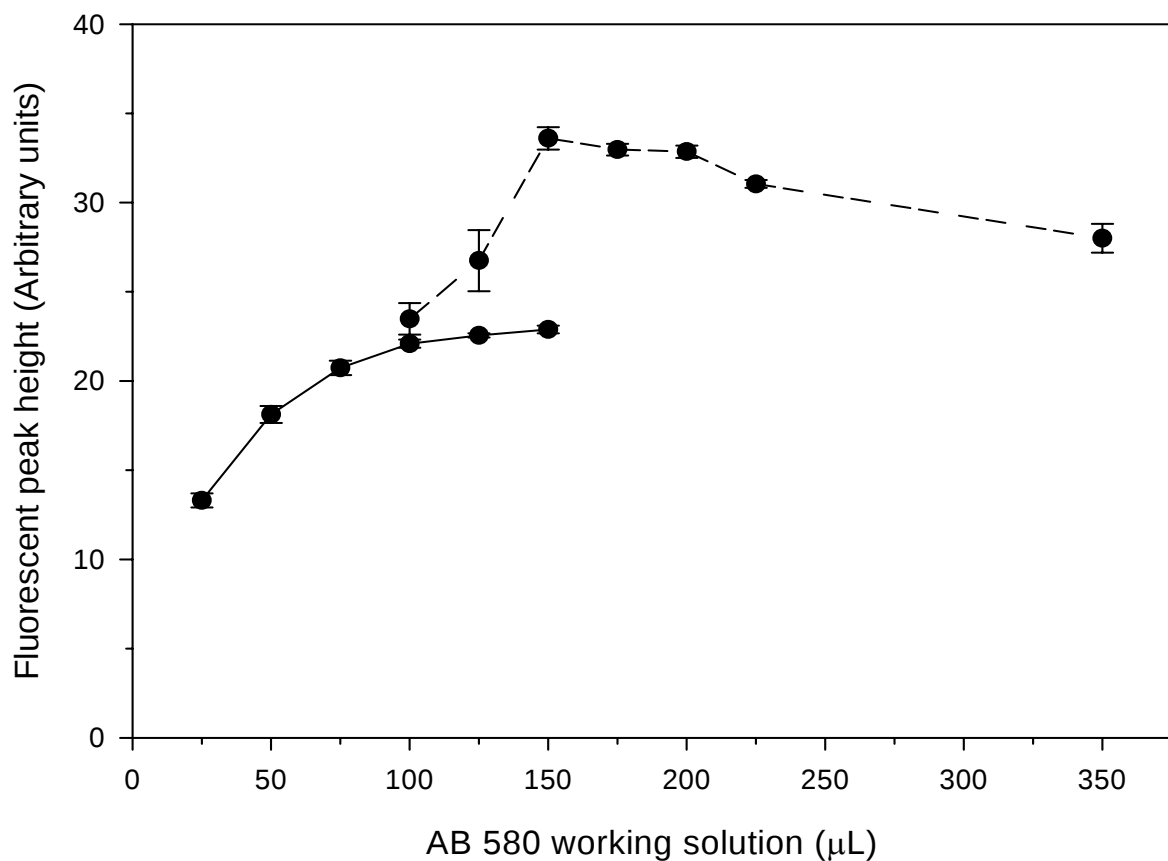
แบบ A

|                                              |                             |
|----------------------------------------------|-----------------------------|
| AB 580 working solution<br>100 $\mu\text{L}$ | Sample<br>100 $\mu\text{L}$ |
|----------------------------------------------|-----------------------------|

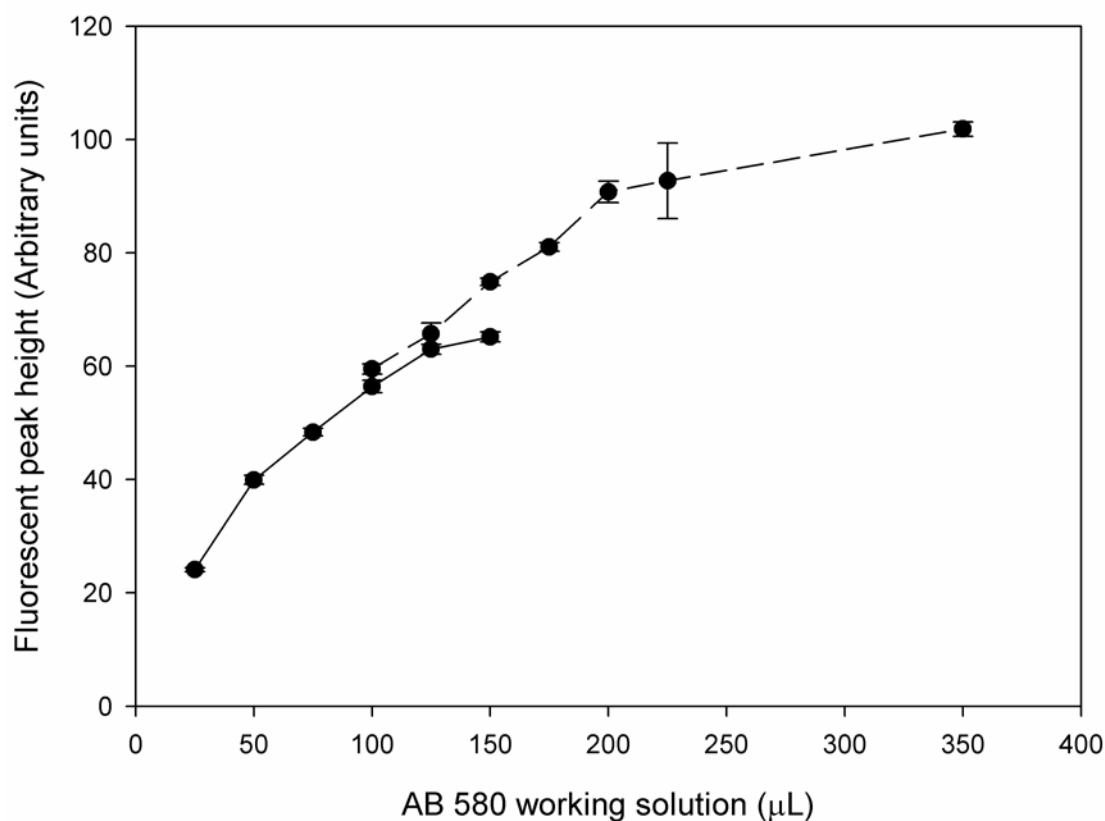
แบบ B

|                                              |                             |                                                |
|----------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| AB 580 working solution<br>100 $\mu\text{L}$ | Sample<br>100 $\mu\text{L}$ | AB 580 working<br>solution (50 $\mu\text{L}$ ) |
|----------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|

**รูปที่ 6** แสดงลำดับการดูดสารในระบบ SIA แบบ A คือลำดับการดูดสารแบบดูดน้ำยา AB 580 working solution ก่อนแล้วดูดสิ่งส่งตรวจตามมา แล้วส่งไปยังเครื่องวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ แบบ B คือ ลำดับการดูดสารแบบดูดน้ำยา AB 580 working solution ก่อนแล้วดูดสิ่งส่งตรวจตามมาแล้วน้ำยา AB 580 working solution อีกครั้ง แล้วจึงส่งไปยังเครื่องวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์



**รูปที่ 7** แสดงผลการศึกษาเมื่อใช้ลำดับการดูดสารแบบ A (เส้นทึบ) และ แบบ B (เส้นประ) โดยใช้อัลบูมินความเข้มข้น 25 mg/L

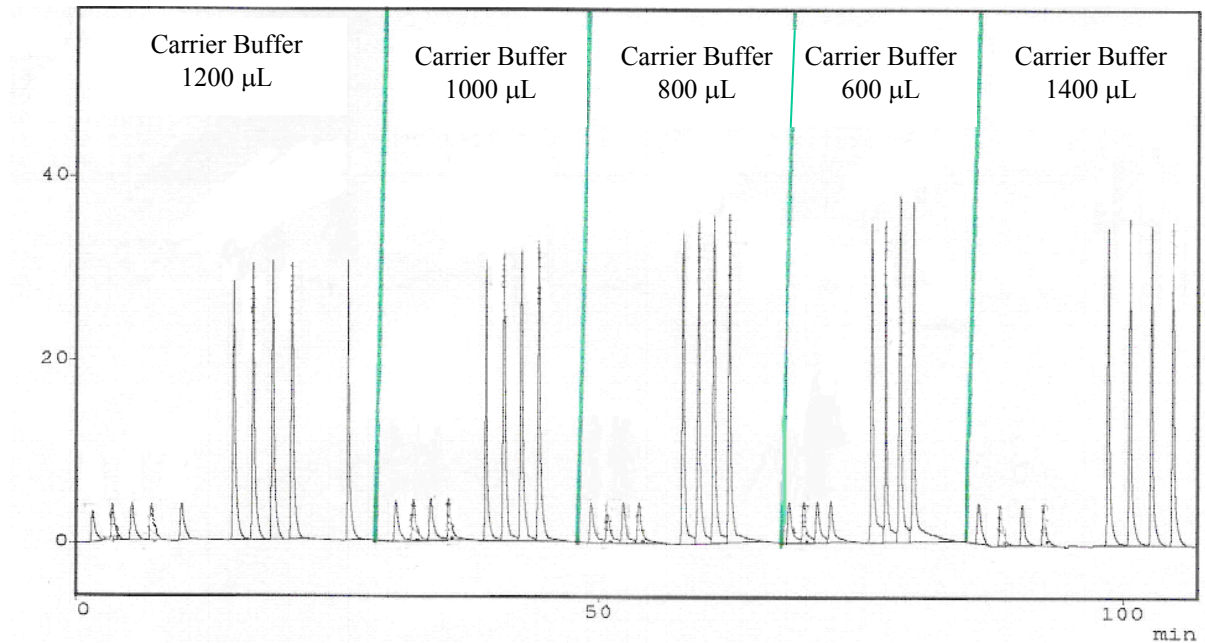


**รูปที่ 8** แสดงผลการศึกษาเมื่อใช้ลำดับการดูดสารแบบ A (เส้นทึบ) และ แบบ B (เส้นประ) โดยใช้อัลบูมินความเข้มข้น 100 mg/L

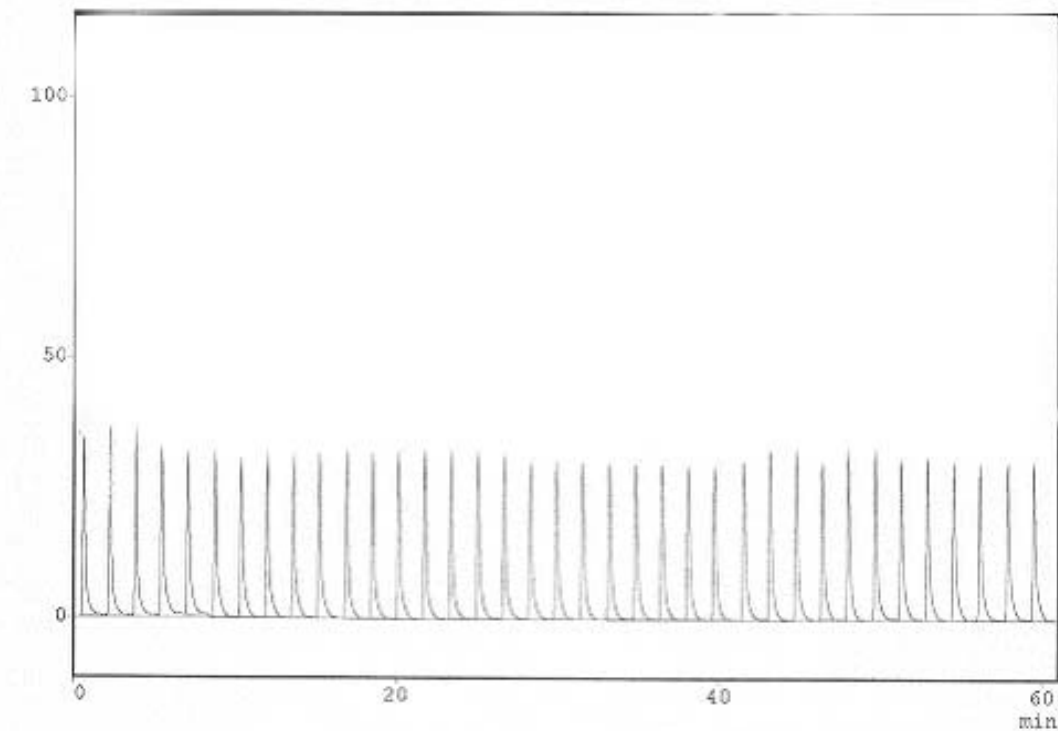
#### 4. ปริมาตร Carrier buffer และ อัตราเร็วที่เหมาะสม

ในงานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษ ปริมาตร Carrier buffer ในช่วง 600-1400  $\mu\text{L}$  ผู้วิจัยพบว่า ปริมาตร Carrier buffer น้อยกว่า 1200  $\mu\text{L}$  ไม่เพียงพอสำหรับการผลักสารผสมไปที่เครื่องวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ และทำให้ baseline ไม่นิ่ง อีกทั้งยังได้รูปร่างของพีคที่ไม่สมมาตร ดังแสดงในรูปที่ 9 อีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อรูปร่างของพีค คือ อัตราเร็วที่ฉีดสารเข้าสู่เครื่องวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในการศึกษาผู้วิจัยใช้อัตราเร็วที่ฉีดสารเข้าสู่เครื่องวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วง 10 – 25  $\mu\text{L/s}$  แล้วสังเกตรูปร่าง และความกว้างของพีค พบว่าอัตราเร็วที่ฉีดสารเข้าสู่เครื่องวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่เหมาะสม คือ 25  $\mu\text{L/s}$  เนื่องจากได้พีคที่แหลมและใช้เวลาต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่างสั้น อัตราเร็วที่มากกว่านี้อาจทำให้ fluorescent flow-cell รับแรงดันไม่ได้ จึงไม่ได้ทำการทดลอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ปริมาตร Carrier buffer 1200  $\mu\text{L}$  และอัตราเร็วที่ฉีดสารเข้าสู่เครื่องวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ 25  $\mu\text{L/s}$  ตลอดการทดลองและพบว่าที่สภาวะนี้ ระบบ SIA สามารถตรวจวัดสิ่งตัวอย่างได้ 37 ตัวอย่างภายใน 1 ชั่วโมง ดังรูปที่ 10 ซึ่งนับว่าวิธีการที่

พัฒนาขึ้นเป็นวิธีการที่ high-throughput สามารถตรวจวัดสิ่งตัวอย่างได้เร็วและจำนวนมาก เมื่อเทียบกับงานวิจัยของกาญจนาและคณะ ระบบ (15) ที่ได้พัฒนาระบบ SIA สำหรับตรวจวัดโปรตีนในปัสสาวะ แต่ระบบสามารถตรวจวัดได้เพียง 6 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามระบบของคณะผู้วิจัยดังกล่าวมีข้อดีและแตกต่างจากงานวิจัยครั้งนี้ คือสามารถตรวจปริมาณโปรตีนและกลูโคสในปัสสาวะพร้อมกัน จึงเป็นสาเหตุให้การวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างใช้เวลานาน



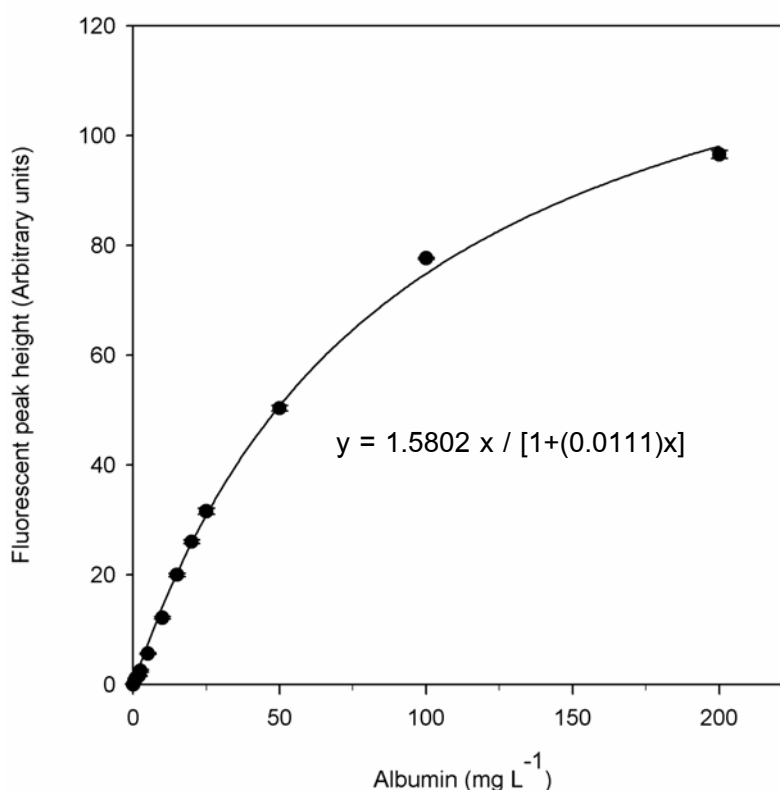
รูปที่ 9 แสดงรูปร่างและลักษณะพีคจากการใช้ Carrier buffer ปริมาตรต่างๆ



รูปที่ 10 แสดงจำนวนสิ่งตัวอย่างที่ตรวจได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยระบบ SIA

## 5. กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) และปริมาณสารตัวอย่างน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection)

การสร้างกราฟมาตรฐานทำโดยใช้ความเข้มข้นของอัลบูมิน (Standard) ในช่วง 1 - 200 mg/L พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์อัลบูมินในช่วงระดับความเข้มข้นต่ำๆ คือ 1-25 mg/L ( $r^2 = 0.998$ ) ในงานวิจัยนี้ช่วงของการวิเคราะห์คือ 1 - 200 mg/L รูปที่ 11 สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน คือ  $y = y_0 + ax / (1+bx)$  โดย  $y$  คือ สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ และ  $X$  คือ ปริมาณความเข้มข้นของอัลบูมิน (mg/L) ส่วน  $y_0$ ,  $a$  และ  $b$  เป็นค่าคงที่ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ลักษณะของ non-linear calibration curve ที่ได้เป็นลักษณะเฉพาะของหลักการการใช้ fluorescent dye-binding และเป็นลักษณะเดียวกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ (10, 11) ความเข้มข้นต่ำสุดของอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ (limit of detection) คำนวณมาจากการทำการทดลองโดยวัด blank ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ calibrator diluent ทั้งหมด 10 ครั้ง คำนวณหาค่า mean, SD อ้างอิงจาก  $S/N = 3$  ความเข้มข้นต่ำสุดของอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ คือ 0.3 mg/L ซึ่งเป็นปริมาณน้อยมาก และมีความไวใกล้เคียงกับวิธีของ Kessler และคณะ (11) ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำสุดของอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ คือ 0.4 mg/L สำหรับการตรวจวิเคราะห์ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ กล่าวว่าเบื้องต้นนั้นควรตรวจได้ถึง 1 mg/L ดังนั้นระบบ SIA ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงมีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ โดยเฉพาะการตรวจในระยะแรกๆ ของความผิดปกติทางไต



รูปที่ 11 แสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัดระดับอัลบูมินความเข้มข้นในช่วง 1 - 200 mg/L

## 6. Precision และ Reproducibility

การคำนวณ Reproducibility ทำได้โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน 4 ครั้งที่ทำต่างวันกัน เป็นจำนวน 4 วันติดต่อกัน ผลการทดลองพบว่า การตรวจวัดด้วยระบบ SIA ได้ค่าที่มี reproducibility ที่ดี โดยมีค่า within-run CVs เท่ากับ 2.3-3.3% และ between-run CVs เท่ากับ 3.8% และเมื่อทดลองทำการวัดความเข้มข้นของอัลบูมินที่ 15 mg/L และ 100 mg/L โดยทำซ้ำ 15 ครั้ง (n =15) พบว่ามีความแม่นยำสูงโดยมีค่า R.S.D.s เท่ากับ 0.9 % และ 1.1 % ตามลำดับ

## 7. ผลการทดสอบสารรบกวน (Interferences) สำหรับการตรวจวัดด้วยระบบ SIA

จากการศึกษาของ Kessler และคณะ ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของสารรบกวน (Interferences) เช่น ยา, วิตามิน, โปรตีนและ metabolites ต่างๆ ในปัสสาวะ พบว่า สารดังกล่าวไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ (11) ดังนั้นสำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยระบบ SIA สารดังกล่าวจึงไม่น่าจะมีผลรบกวนการตรวจวัดด้วยวิธีนี้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยได้มีการทดสอบสารรบกวนบางชนิดด้วย เพื่อยืนยันผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6 ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะ ได้แก่ โปรตีนต่างๆ เช่น transferrin, IgG, pepsin, ยาบางชนิด เช่น acetylsalicylic acid, indomethacin, aminocetaphen เป็นต้น รวมถึงทดสอบว่ากลูโคสมีผลต่อการตรวจวัดหรือไม่ ผลการทดลองพบว่า การทดสอบสารรบกวนมี % recovery ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 97.3-102.7% สำหรับฮีโมโกลบิน (ความเข้มข้น 200 mg/L) รบกวนการตรวจวัดเล็กน้อย มีค่า recovery 91.8% ส่วนบิลิรูบินได้นำมาทดสอบเพิ่มเติมด้วยเนื่องจากบิลิรูบินชนิดมีการควบจับ (conjugated bilirubin) อาจพบในปัสสาวะของผู้ป่วยได้ จากการศึกษาบิลิรูบินความเข้มข้น 80 mg/L พบว่ารบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดอย่างเห็นได้ชัด โดยมี % recovery เท่ากับ 84.9% เหตุผลที่บิลิรูบินสามารถยับยั้งสัญญาณการตรวจวัดได้ เนื่องจากบิลิรูบินสามารถแย่งอัลบูมินในการจับกับสี แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในสภาวะปกติ ไม่พบบิลิรูบินในปัสสาวะ หรือพบปริมาณต่ำๆ ดังนั้นการรบกวนด้วยบิลิรูบินจึงไม่นำมาประเด็นพิจารณา

**ตารางที่ 6** แสดงผลการทดสอบสารรบกวน (Interferences) การตรวจวัดระดับอัลบูมินในปัสสาวะ ด้วยระบบ SIA

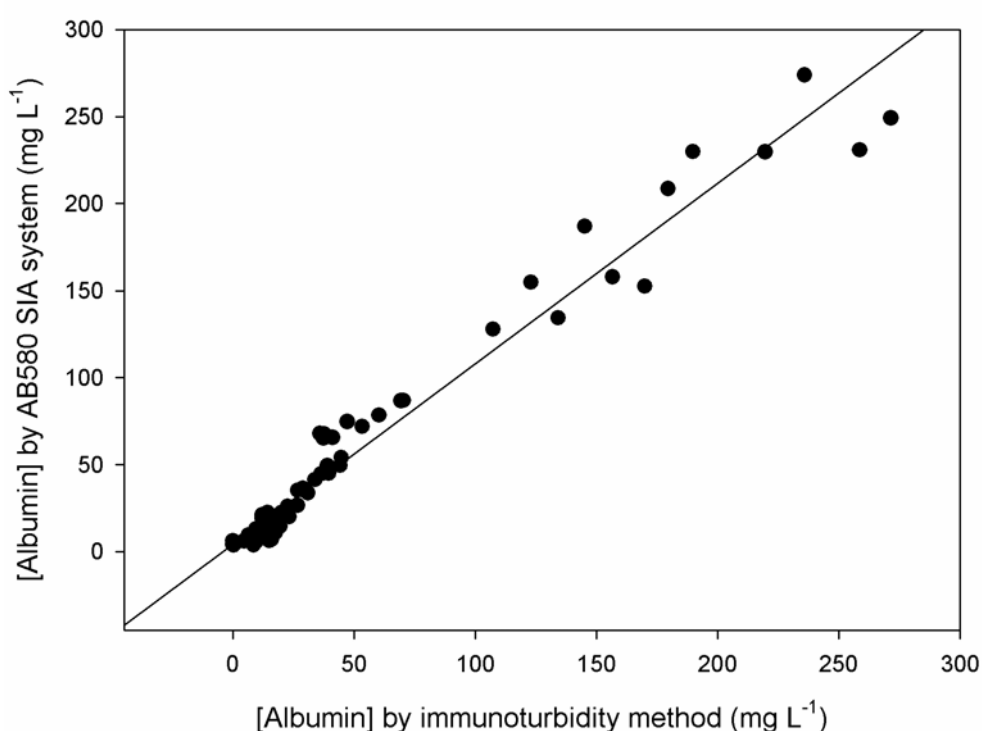
| Added interferences  | Added concentration (mg/L) | % Recovery |
|----------------------|----------------------------|------------|
| None                 | -                          | 100.0      |
| Transferrin          | 100                        | 97.3       |
| 2-ketobutyric acid   | 1                          | 97.0       |
| IgG                  | 1000                       | 102.7      |
| Acetylsalicylic acid | 100                        | 100.0      |
| Ibuprofen            | 1000                       | 94.7       |
| Indomethacin         | 10                         | 102.7      |
| Aminocetaphen        | 0.59                       | 97.3       |
| Pepsin               | 590                        | 97.3       |
| Glucose              | 20000                      | 100.0      |
| Hemoglobin           | 200                        | 91.8       |
|                      | 10                         | 96.4       |
| Bilirubin            | 80                         | 84.9       |
|                      | 10                         | 92.4       |
| Ascorbic acid        | 100                        | 95.8       |
| NaCl                 | 10000                      | 96.6       |

## 8. การเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง (immunoturbidimetric method)

ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากระบบ SIA กับ ผลการทดลองที่ได้จากการตรวจวัดโดยใช้หลักการ immunoturbidimetric เพื่อเป็นการประเมินว่าระบบ SIA มีความเหมาะสมหรือไม่ในการนำมาใช้ตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวาน งานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ระบบ SIA ในการตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 72 ราย โดยค่าความเข้มข้นของอัลบูมินที่ได้ คำนวณมาจากสมการที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน แล้วนำผลมาเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงคือวิธี immunoturbidimetric method ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ผลการเปรียบเทียบพบว่า ค่าที่ได้จากระบบ SIA ให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีที่ได้จากวิธี immunoturbidimetric ( $r^2 = 0.965$ ) สมการความถดถอย คือ  $y = 1.037 (\pm 0.039) X + 4.34 (\pm 0.324)$  หากทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันแบบสมบุรณ์ จุดตัดแกน y และ ความชันของกราฟ ควรจะมีค่าเท่ากับ 0 และ 1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในการทดลองของทั้งสองวิธีนี้ ใช้ Standard และ

Calibrator แตกต่างกัน โดยวิธี immunoturbidimetric จะใช้ Calibrator ที่มากับชุดน้ำยา แต่วิธีที่ใช้ระบบ SIA การตรวจวัดจะใช้ Standard ที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ โดยเตรียมจาก human serum albumin ที่บริสุทธิ์ ดังนั้นจุดตัดแกน y และความชัน จึงเป็น 4.34 และ 1.037 ตามลำดับ

เมื่อใช้สถิติคำนวณที่ค่า degree of freedom 70 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $\alpha = .05$ ) ค่าวิกฤต (Critical t-value ( $t_{0.025,70}$ )) คือ  $\pm 1.994$  ค่า t-value ของทั้งสองวิธีเท่ากับ 43.705 ซึ่งตกอยู่ในช่วงวิกฤต ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมติฐาน ( $H_0$ ) จึงสรุปได้ว่าวิธีที่ใช้ระบบ SIA ในการตรวจวัดระดับอัลบูมินในปัสสาวะและวิธี immunoturbidimetric มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p\text{-value} < 0.05$ ) กราฟแสดงดังรูปที่ 12



**รูปที่ 12** เปรียบเทียบผลการตรวจวัดระดับอัลบูมินในปัสสาวะในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานด้วยระบบ SIA ในงานวิจัยนี้ กับผลการทดลองที่ได้จากการตรวจวัดโดยใช้หลักการ immunoturbidimetric

## สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ด้วยระบบ Sequential Injection Analysis (SIA) โดยใช้สารเรืองแสง Albumin Blue 580 ซึ่งจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับอัลบูมินในปัสสาวะแล้ววัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ Excitation wavelength และ Emission wavelength ที่ 590 นาโนเมตร และ 610 นาโนเมตร ตามลำดับ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. อัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมน้ำยา AB 580 working solution คือ Reagent A (AB 580) : Reagent B (Carrier buffer) คือ 1 : 25 และพบว่า AB 580 working solution ดังกล่าวมีความคงตัวของน้ำยานานอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ สำหรับงานประจำ ซึ่งมีช่วงการทำงานอย่างน้อย 8 ชั่วโมง
2. ลำดับและปริมาตรในการดูดน้ำยาที่เหมาะสมในระบบ SIA คือ AB 580 working solution : Sample : AB 580 working solution ที่ 100  $\mu$ L: 100  $\mu$ L: 50  $\mu$ L ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ให้ความไวสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ดี และประหยัดการใช้น้ำยา
3. ปริมาตรในการดูดสิ่งตัวอย่าง ที่เหมาะสม คือ 100  $\mu$ L
4. ปริมาตรของ Carrier buffer ที่เหมาะสม คือ 1200  $\mu$ L
5. อัตราการไหล (Flow rate) ผ่านเครื่องตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์คือที่ 25  $\mu$ L/s

การตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยระบบ Sequential injection analysis (SIA) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ง่าย รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง มีความแม่นยำ และความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) ที่ดีเนื่องจากเป็นระบบการทำงานอัตโนมัติ หลักการที่ใช้ไม่จำเป็นต้องใช้แอนติบอดีในปฏิกิริยาการตรวจวัด และใช้น้ำยาปริมาณน้อย จึงทำให้ต้นทุนในการตรวจวัดลดลงอย่างมาก ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งมีจำนวนมาก จากการตรวจวัดด้วยระบบนี้พบว่า ค่าปริมาณอัลบูมินต่ำสุดที่ระบบสามารถตรวจได้คือ 0.3 mg/L และจำนวนตัวอย่างที่สามารถตรวจได้ด้วยระบบ SIA ภายใน 1 ชั่วโมง คือ 37 ตัวอย่าง ด้วยระบบดังกล่าว ช่วงการตรวจวัดที่ได้คือ 1-200 mg/L ซึ่งเป็นช่วงที่ครอบคลุมทั้งค่าปกติของอัลบูมินและภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ระบบดังกล่าวได้ถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 72 ราย ( $n = 72$ ) พบว่าให้ผลการตรวจวัดที่สอดคล้องกับวิธี immunoturbidimetric ( $r^2=0.965$ ) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และจากการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัด เช่น โปรตีนต่างๆ ยา หรือสารอื่นๆ ที่อาจพบได้ในปัสสาวะนั้น ไม่รบกวนการตรวจวัดด้วยวิธีนี้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า %recovery ในช่วง 92-97% ในอนาคตระบบ SIA Albumin blue 580 จึงมีความเป็นไปได้ที่จะถูก

นำมาใช้ทดแทนการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีอิมมูโนแอสเซย์ สำหรับการ  
ตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ สำหรับใช้ตรวจภาวะแทรกซ้อนทางไตในผู้ป่วยเบาหวาน  
(Diabetic nephropathy) ได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้น

## เอกสารอ้างอิง

1. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem 2002 Mar;48(3):436-72.
2. MDa RS, MDb WSA, MDa PK, MDa LG, MDa RS, MDa AS, et al. Relation of Microalbuminuria and Coronary Artery Disease in Patients With and Without Diabetes Mellitus. Am J Cardiol 2006;98(3): 279-81.
3. Pedrinelli R, Giampietro O, Carmassi F, Melillo E, Dell'Omo G, Catapano G, et al. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. Lancet 1994 Jul 2;344(8914):14-8.
4. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Microalbuminuria in essential hypertension: significance, pathophysiology, and therapeutic implications. Am J Kidney Dis 1999 Dec;34(6):973-95.
5. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jager A, Heine RJ, Jakobs C, Bouter LM et al. Serum homocysteine level and protein intake are related to risk of microalbuminuria: The Hoorn Study. Kidney Int 1998 Feb;54(1):203-9.
6. Brodows R, Nichols D, Shaker G, NP Kubasik ea. Evaluation of a new radioimmunoassay for urinary albumin. Diabetes Care 1986;9(2):189-93.
7. Dezier JF, Jouanolle AM, Le Reun M, Poirier JY. Comparison of 2 methods of measuring microalbuminuria. Immunonephelometry and radioimmunology. Ann Biol Clin 1987;45(1):78-84.
8. Rifai N, Gubar K, Silverman LM. Immunoturbidimetry: an attractive technique for the determination of urinary albumin and transferrin. Clin Biochem 1987 Jun;20(3):179-81.
9. Wu TL, Chang PY, Li CC, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Microplate ELISA for urine microalbumin: reference values and results in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease. Ann Clin Lab Sci 2005 Spring;35(2):149-54.
10. Kessler MA, Meinitzerb A, O. S. Wolfbeisc ea. Albumin Blue 580 Fluorescence Assay for Albumin. Anal Biochem 1997;248(1):180-2.
11. Kessler MA, Meinitzer A, Petek W, Wolfbeis OS. Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the Albumin Blue 580 fluorescence assay. Clin Chem 1997 Jun;43(6 Pt 1):996-1002.

12. Pegoraro AA, Peracha W, Hasnain M, Ranginwala N, Shaykh M, Singh AK, Arruda JA, Dunea G. Evaluation of a new fluorescent dye method to measure urinary albumin in lieu of urinary total protein. *Am J Kidney Dis*. 2000;35:739-44.
13. Wang J, Elo Harald Hansen ea. Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis *Trends Anal Chem* 2003;22(4):225-31.
14. Hansen EH, Manuel Miró<sup>b</sup>. How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. *Trends Anal Chem* 2007;26(1):18-26 .
15. Kanchana W-i, Sakaia T, Teshima N, Katoh<sup>c</sup> S, al. KGe. Successive determination of urinary protein and glucose using spectrophotometric sequential injection method. *Anal Chim Acta* 2007;604(2):139-46.
16. Pinto PCAG, Lima JLFC, Maria Lúcia Marques Ferreira de Sousa Saraiva ea. Sequential injection analysis of nitrites and nitrates in human serum using nitrate reductase *Clin Chim Acta* 2003; 337(1-2):69-76.
17. Pegoraro AA, Peracha W, Hasnain M, Ranginwala N, Shaykh M, Singh AK, et al. Evaluation of a new fluorescent dye method to measure urinary albumin in lieu of urinary total protein. *Am J Kidney Dis* 2000 Apr;35(4):739-44.
18. Soonthornpun S, Thammakumpee N, Thamprasit A. Immunoturbidimetric measurement of microalbuminuria. *Songkla Med J* 1999;17(3):179-83.
19. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 2005 Jan;28(1):164-76.
20. Wei-Lung T, Tai-Chia C, Jang-Mao W, CHANG Huan-Tsung. Analysis of albumins, using albumin blue 580, by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence. *J Liq Chromatogr RT* 2001;24:2971-82.
21. Hofmann O, Wang X, deMello JC, Bradley DDC, Andrew J. deMello ea. Towards microalbuminuria determination on a disposable diagnostic microchip with integrated fluorescence detection based on thin-film organic light emitting diodes. *Lab Chip* 2005;5:863 - 8.
22. Economou A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *Trends Anal Chem* 2005;24(5):416-25.
23. Kragh-Hansen U, Henrik Vorum. Quantitative Analyses of the Interaction between Calcium Ions and Human Serum Albumin. *Clin Chem* 1993;39:202-8.

24. Pascolo L, Vecchio SD, Koehler RK, Bayon JE, Webster CC, Mukerjee P, et al. Albumin binding of unconjugated [3H]bilirubin and its uptake by rat liver basolateral plasma membrane vesicles. *Biochem J* 1996;316:999-1004.
25. Nikolaev AV, Rozhilo YA, Starozhilova TK, Sarnatskaya VV, Yushko LA, Mikhailovskii SV, et al. Mathematical Model of Binding of Albumin—Bilirubin Complex to the Surface of Carbon Pyropolymer. *Bulletin Exp Biol Med* 2005;140:352-6.
26. Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Stephen Curry ea. Crystallographic Analysis of Human Serum Albumin Complexed with 4Z,15E-Bilirubin-Ix $\alpha$ . *J Mol Biol* 2008;381(2):394-406.
27. Belgacem O, Stübiger G, Allmaier G, Buchacher A, Katharina Pock ea. Isolation of esterified fatty acids bound to serum albumin purified from human plasma and characterised by MALDI mass spectrometry. *Biologicals* 2007;35(1):43-9.
28. Westphal U, Firschein HE, Pearce EM. Transport of cortisol-4-C14 and progesterone-4-C14 by serum proteins as demonstrated by paper electrophoresis and paper chromatography. *Am J Physiol* 1956 Apr;185(1):54-60.
29. Schussler GC. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 2000 Feb;10(2):141-9.
30. Petitpas I, Petersen CE, Ha CE, Bhattacharya AA, Zunszain PA, Ghuman J, et al. Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 May 27;100(11):6440-5.
31. Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S, East M, Curry S. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J Biol Chem* 2001 Jun 22;276(25):22804-9.
32. Sułkowska A, Maciążek-Jurczyk M, B. Bojko JR, Zubik-Skupie I, Temba E, Pentak D, et al. Competitive binding of phenylbutazone and colchicine to serum albumin in multidrug therapy: A spectroscopic study. *J Mol Struct* 2008;881(1-3):97-106.
33. Nazareth RI, Sokoloski TD, Witiak DT, Allen T. Hopper ea. Biological significance of serum albumin binding parameters determined in vitro for clofibrate-related hypolipemic drugs: Use of 2-(4-hydroxybenzeneazo)benzoic acid to mirror L-thyroxine binding to and displacement from serum albumins. *J Pharm Sci* 1973;63(2):203 - 11.
34. Pijls LT, de Vries H, van Eijk JT, Donker AJ. Protein restriction, glomerular filtration rate and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized trial. *Eur J Clin Nutr* 2002 Dec;56(12):1200-7.
35. Comper WD, Osicka TM. Detection of urinary albumin. *Adv Chron Kidney Dis* 2005;12(2):170-6.

36. Minetti EE, Cozzi MG, Granata S, Guidi E. Accuracy of the urinary albumin titrator stick 'Micral-Test' in kidney-disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997 Jan;12(1):78-80.
37. Tiu SC, Lee SS, Cheng MW. Comparison of six commercial techniques in the measurement of microalbuminuria in diabetic patients. *Diabetes Care* 1993 Apr;16(4):616-20.
38. Jensen JS, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen BF, Jensen G. Screening of microalbuminuria with the Micral-Test. A semi-quantitative urinary dipstick. *Ugeskr Laeger* 1993 Dec 20;155(51):4155-7.
39. Le Floch JP, Charles MA, Philippon C, Perlemuter L. Cost-effectiveness of screening for microalbuminuria using immunochemical dipstick tests or laboratory assays in diabetic patients. *Diabet Med* 1994 May;11(4):349-56.
40. Bangstad HJ, Try K, Dahl-Jorgensen K, Hanssen KF. New semiquantitative dipstick test for microalbuminuria. *Diabetes Care* 1991 Nov;14(11):1094-7.
41. Poulsen PL, Hansen B, Amby T, Terkelsen T, Mogensen CE. Evaluation of a dipstick test for microalbuminuria in three different clinical settings, including the correlation with urinary albumin excretion rate. *Diabete Metab* 1992 Sep-Oct;18(5):395-400.
42. Spooren PF, Lekkerkerker JF, Vermes I. Micral-Test: a qualitative dipstick test for micro-albuminuria. *Diabetes Res Clin Pract* 1992 Nov;18(2):83-7.
43. Gilbert RE, Akdeniz A, Jerums G. Semi-quantitative determination of microalbuminuria by urinary dipstick. *Aust N Z J Med* 1992 Aug;22(4):334-7.
44. Jury DR, Mikkelsen DJ, Glen D, Dunn PJ. Assessment of Micral-Test microalbuminuria test strip in the laboratory and in diabetic outpatients. *Ann Clin Biochem* 1992 Jan;29:96-100.
45. Marshall SM, Shearing PA, Alberti KG. Micral-test strips evaluated for screening for albuminuria. *Clin Chem* 1992 Apr;38(4):588-91.
46. Kouri T, Solakivi T, Harmoinen A. Performance of NycoCard:::U-Albumin and Micral-Test rapid methods for detecting microalbuminuria. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994 May;32(5):419-23.
47. Wilde HM, Banks D, Larsen CL, Connors G, Wallace D, Lyon ME. Evaluation of the Bayer microalbumin/creatinine urinalysis dipstick. *Clin Chim Acta* 2008 Jul 17;393(2):110-3.
48. Harvey MD, Bablekis V, Banks PR, Skinner CD. Utilization of the non-covalent fluorescent dye, NanoOrange, as a potential clinical diagnostic tool. *Nanomolar human*

- serum albumin quantitation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001 Apr 25;754(2):345-56.
49. Jones LJ, Haugland RP, Singer VL. Development and characterization of the NanoOrange protein quantitation assay: a fluorescence-based assay of proteins in solution. *Biotechniques* 2003 Apr;34(4):850-4.
  50. Kessler MA, Meinitzer A, Wolfbeis OS. Albumin blue 580 fluorescence assay for albumin. *Anal Biochem* 1997;248(1):180-2.
  51. Burne MJ, Panagiotopoulos S, Jerums G, Comper WD. Alterations in renal degradation of albumin in early experimental diabetes in the rat: A new factor in the mechanism of albuminuria. *Clin Sci* 1998;95(1):67-72.
  52. Greive KA, Balazs NDH, Comper WD. Protein fragments in urine have been considerably underestimated by various protein assays. *Clin Chem* 2001;47(9):1717-9.
  53. Comper WD, Jerums G, Osicka TM. Deficiency in the detection of microalbuminuria by urinary dipstick in diabetic patients. *Diabetes Care* 2003 Nov;26(11):3195-6.
  54. Greive KA, Eppel GA, Reeve S, Smith AI, Jerums G, Comper WD. Immuno-unreactive albumin excretion increases in streptozotocin diabetic rats. *Am J Kidney Dis* 2001;38(1):144-52.
  55. Comper WD, Osicka TM, Jerums G. High prevalence of immuno-unreactive intact albumin in urine of diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 2003 Feb;41(2):336-42.
  56. Liang AH, Huang YJ, Jiang ZL. A rapid and sensitive immunoresonance scattering spectral assay for microalbumin. *Clin Chim Acta* 2007 Aug;383(1-2):73-7.
  57. Jiang ZL, Huang YJ, Liang AH. An immunonanogold resonance scattering-quenching probe for rapid and sensitive assay of microalbumin. *J Fluoresc* 2008 Mar;18(2):563-71.
  58. Medcalf EA, Newman DJ, Gorman EG, Price CP. Rapid, robust method for measuring low concentrations of albumin in urine. *Clin Chem* 1990;36(3):446-9.
  59. AYBAY C, Resul KARAKUŞ ea. Measurement of Urine Albumin Levels With A Monoclonal Antibody Based in-House Elisa. *Turk J Medical Sci* 2003;33(1):1-5.
  60. Woo J, Floyd M, Cannon DC, Kahan B. Radioimmunoassay for urinary albumin. *Clin Chem* 1978 Sep;24(9):1464-7.
  61. Stamp RJ. Measurement of albumin in urine by end-point immunonephelometry. *Ann Clin Biochem* 1988 Jul;25 ( Pt 4):442-3.
  62. Luo Y, Chen M, Wen Q, Zhao M, Zhang B, Li X, et al. Rapid and simultaneous quantification of 4 urinary proteins by piezoelectric quartz crystal microbalance immunosensor array. *Clin Chem* 2006;52(12):2273-80.

63. Owen WE, William L. Roberts ea. Performance Characteristics of an HPLC Assay for Urinary Albumin. *Am J Clin Pathol* 2005;124:219-25.
64. Shaikh A, Seegmiller J, Borland T, Burns B, Ladwig P, Singh R, et al. Comparison between Immunoturbidimetry, Size-Exclusion Chromatography, and LC-MS to Quantify Urinary Albumin. *Clin Chem* 2008;54.
65. Tan K, Li Y, Huang C. Flow-injection resonance light scattering detection of proteins at the nanogram level. *Luminescence* 2005;20(3):176-80.
66. Li Q, Zhang H, Xue C, Chen X, Hu Z. Determination of proteins at nanogram levels based on their enhancement effects of Rayleigh light scattering on dibromomethylchlorophosphonazo. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2000 Nov 1;56A(12):2465-70.
67. Chen Z, Zhang T, Ren F, Weifeng Ding ea. Determination of Proteins at Nanogram Levels Based on Their Resonance Light Scattering Decrease Effect on the Dibromo-o-Nitrophenylfluorone–Sodium Lauroyl Glutamate system. *Microchim Acta* 2006;153:65–71.
68. Yamaguchi T, Kadono K. [Clinical evaluation of the albumin/creatinine ratio in outpatients with diabetes]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1991 Mar;33(3):283-93.
69. Rasanayagam LJ, Lim KL, Beng CG, Lau KS. Measurement of urine albumin using bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1973 Feb 28;44(1):53-7.
70. Schosinsky KH, Vargas M, Esquivel AL, Chavarria MA. Simple spectrophotometric determination of urinary albumin by dye-binding with use of bromphenol blue. *Clin Chem* 1987;33(2):223-6.
71. Kessler MA, Meinitzer A, Peter W, Wolfbeis OS. Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the Albumin Blue 580 fluorescence assay. *Clin Chem* 1997;43(6):996-1002.
72. Hofmann O, Wang X, Demello JC, Bradley DDC, Andrew J Demello et al. Towards microalbuminuria determination on a disposable diagnostic microchip with integrated fluorescence detection based on thin-film organic light emitting diodes. *Lab Chip* 2005 5(8):863-8
73. Kessler MA, Hubmann MR, Dremel BA, Wolfbeis OS. Nonimmunological assay of urinary albumin based on laser-induced fluorescence. *Clin Chem* 1992 Oct;38(10):2089-92.

74. Staden R-IS-v, Bokretsiön RG, Staden JFv, Y. H, Aboul-Enein. Simultaneous Detection of Creatine and Creatinine using a Sequential Injection Analysis/Biosensor System. *Prep Biochem Biotech* 2006;36(4):287 – 96.
75. Min RW, Nielsen J, John Villadsen ea. On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 1996;320(2-3):199-205.
76. Lukkari I, Ruzicka J, CHRISTIAN GD. Determination of total ammonium-nitrogen and free ammonia in a fermentation medium by sequential injection analysis. *J Anal Chem* 1993;346(6-9):813-8.
77. Baxter PJ, Christian GD, J. Rika ea. Rapid determination of total biomass from a yeast fermentation using sequential injection. *Analyst* 1994;119:1807 - 12.
78. Nyman J, Ari Ivaska. Spectrophotometric determination of calcium in paper machine white water by sequential injection analysis *Anal Chim Acta* 1995;308(1-3):286-92.
79. Cerdà\* V, Cerdà A, Cladera A, Oms MT, Mas F, Gómez E, et al. Monitoring of environmental parameters by sequential injection analysis *Trends Anal Chem* 2001;20(8):407-18.
80. F. VSJ, E. TR. On-line monitoring of phosphate in natural water and effluent streams using sequential injection analysis. *Mikrochim acta* 1998;128(3-4):223-8.
81. Al-Swaidan HM. The determination of lead, nickel and vanadium in Saudi Arabian crude oil by sequential injection analysis/inductively-coupled plasma mass spectrometry *Talanta* 1996;43(8):1313-9.
82. Grate JW, Strebin R, Janata J. Automated analysis of radionuclides in nuclear waste : rapid determination of <sup>90</sup>Sr by sequential injection analysis. *Anal Chem* 1996;68: 333-40.
83. Barnett NW, Lewis SW, Daryl J. Tucker ea. Determination of morphine in process streams by sequential injection analysis with chemiluminescence detection. *Fresenius' J Anal Chem* 1996;355:591-5.
84. Burakham R, Duangthong S, Patimapornlert L, Lenghor N, Kasiwad S, Srivichai L, et al. Flow-Injection and Sequential-Injection Determinations of Paracetamol in Pharmaceutical Preparations Using Nitrosation Reaction. *Anal Sci* 2004; 20 (5):837.

## Output ที่ได้จากโครงการ

### 1. รางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยดีเยี่ยมแบบโปสเตอร์

ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ระหว่างวันที่ 11-13 ตุลาคม 2550

### 2. การสร้างเครือข่ายงานวิจัยด้านไบโอเซนเซอร์

ได้ทุนสนับสนุนจาก British High Commission ประเทศสิงคโปร์ เพื่อเดินทางไปสร้างเครือข่ายความร่วมมืองานวิจัยด้านไบโอเซนเซอร์ ณ Newcastle University upon Tyne ประเทศอังกฤษ และ National University of Singapore ประเทศสิงคโปร์  
ระหว่างวันที่ 18 ก.พ.2551 – 2 มีนาคม 2551

### 3. การนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

The 15th International Conference on Flow Injection Analysis including related techniques (ICFIA 2008) & The 25th Anniversary Meeting of Japanese Association for Flow Injection Analysis ณ เมืองนาโกยา ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 28 กันยายน 2551- 3 ตุลาคม 2551  
หัวข้อการบรรยาย “Towards flow-based system for less reagent and low-cost method for determination of urinary albumin”

ภาคผนวก

## Manuscript

### **Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria**

Wanida Laiwattanapaisa<sup>a,\*</sup>, Usakorn Kunanuvat<sup>a</sup>, Wichabhorn Intharachuti<sup>a</sup>, Chakorn Chinvongamorn<sup>b</sup>, Supot Hannongbua<sup>c</sup>, Orawon Chailapakul<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Chemistry, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>d</sup> Sensor Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

\*Corresponding author

Tel. +66 02 218 1081 ext 307

Fax +66 02 218 1082

*E-mail address:* wanida.k@chula.ac.th

## Abstract

A simple, specific and sensitive sequential injection analysis (SIA) system based on non-immunoassay fluorescent detection has been developed for the determination of urinary albumin. The specific binding of the dye Albumin Blue 580 (AB 580) to albumin in urine generated high emission fluorescent signals. The excitation and emission wavelengths were set at 590 and 610 nm, respectively. The calibration range was obtained from 1-200 mg L<sup>-1</sup>, with a limit of detection of 0.3 mg L<sup>-1</sup> (S/N = 3). The SIA system gave high precision with relative standard deviations (RSDs) of 0.9% and 1.4% when evaluated with 15 mg L<sup>-1</sup> and 100 mg L<sup>-1</sup> albumin ( $n = 15$ ), respectively. The method exhibited good reproducibility, as assessed by performing four calibration curves on different days, and intra-run CVs (2.3-3.3%) and inter-run CVs (3.8%) were obtained. Rapid operation was achieved with a sample throughput of 37 h<sup>-1</sup>. This method was successfully applied to the determination of urinary albumin, and the method was highly correlated with the immunoturbidimetric method ( $r^2 = 0.965$ ;  $n=72$ ).

**Keywords:** Sequential injection analysis, urinary albumin, Albumin blue 580, fluorescent detection

## 1. Introduction

Microalbuminuria is defined as the detection of an albumin concentration of 30-300 mg from a 24 h urine collection. Early detection of microalbuminuria is a sensitive forecast of the outcome of nephropathy complications in diabetic patients [1]. Early detection and instant treatment can prevent the progression of persistent albuminuria. The importance of microalbumin detection has been realized by the American Diabetes Association, who issues guidance for the annual detection of microalbuminuria in every diabetes patient [2]. Additionally, it is a powerful predictor of non-diabetic coronary artery disease patients [3-5].

Unlike in blood plasma, albumin concentrations in urine are usually low, and therefore require a sensitive and selective method for an accurate assay. Numerous methods have been described in the literature for the determination of urinary albumin. Among those methods, the most routinely used methods are based on immunoassays, including radioimmunoassay [6], immunoturbidimetry [7], immunonephelometry [8, 9], enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) [10], fluorescence immunoassay [11], and immunoresonance scattering spectral assay [12]. However, most of the existing methods

have significant drawbacks. The radioimmunoassay is notorious for its health hazards, and thus is not widely used, although it is claimed to be a gold standard method [13]. ELISA is known as the most sophisticated immunoassay because of its numerous time-consuming and tedious washing steps. However, immunological methods are accepted for use in most laboratories on the basis of high sensitivity and selectivity. On the other hand, it is commonly known that most of the immunoassay-based methods consume large amounts of expensive reagents, especially the antibody specific for albumin, which relies on the immunization of animals for production. This leads to increased cost to patients for the clinical diagnostics and assessment of the diabetic nephropathy. Therefore, non-immunoassay methods that offer satisfactory sensitivity and selectivity are of great interest for low cost determination of microalbuminuria.

Recently, Kessler and co-workers [14] proposed a simpler dye binding assay that utilizes the fluorescent dye Albumin Blue 580 (AB 580). The dye can specifically bind to human albumin, and the protein-dye complex can generate dramatic emission fluorescent signals at 610 nm [14]. Upon binding to albumin, the fluorescence quantum efficiency of the dye AB 580 increases by two orders of magnitude [15]. Several papers have demonstrated that the AB 580 fluorescent dye is able to quantify low levels of urinary albumin with appreciable characteristics. The results based on AB 580 dye-binding were in good agreement with the results acquired by immunonephelometry methods [16] or radioimmunoassays [13]. In addition, no interferences from globulin and other contaminating substances were found. Therefore, methods based on the AB 580 dye-binding can be considered good substitute methods for immunoassays for the quantitation of urinary albumin [16]. Although the AB 580 was first evaluated by Kessler et al. for the determination of urinary albumin in a conventional spectrofluorometer, several different assay formats based on AB 580 were later established, such as automated fluorescence assays [16], capillary electrophoresis [17] and lab-on-a-chip (LOC) [15]. However, none of these methods could perform rapid analysis. In the capillary electrophoresis platform, the assay time required is at least 4 min for one sample [17]. In the LOC format, the microchannel must be flushed with water for 10 min for de-adsorption of the albumin [15].

The sequential injection analysis (SIA) technique has the potential to be a fully automatic operation, with computer control for the aspiration or dispensation of samples and reagents [18]. The SIA system is the second generation of the flow injection (FI)-based systems, and the SIA method provides several advantages over the first generation system, which utilizes continuous pumping of carrier and reagent solutions. The SIA can

substantially reduce reagent consumption and waste generation [19]. The well-known advantageous characteristics of the SIA system have been widely reviewed, e.g., the simplicity of fundamental principles, inexpensive instrumentation, automated sampling and analytical procedures, limited sample consumption, short analysis time, and on-line performance of difficult operations [20].

Recently, there has been growing interest in the development of a fast and automatic analytical method. The purpose of this work is to establish a SIA system by exploiting the AB 580 dye for the sensitive and selective determination of microalbuminuria. Combining the SIA system and utilization of AB 580 for the chemical reaction, we obtained a low cost, simple and rapid operation method for the microalbumin assay. In this work, we successfully configured the AB 580 SIA system for the determination of urinary albumin, covering both the normal and clinical levels of microalbuminuria. The effects of various parameters affecting the fluorescence signals were studied and optimized. The applicability of the system for real sample analysis was also evaluated.

## **2. Experimental**

### **2.1 Chemicals and Reagents**

All chemicals used were of analytical reagent grade. Albumin Blue 580 potassium salt solution (AB 580) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS free acid), EDTA disodium salt, human IgG, human serum albumin, and 2-propanol were obtained from Sigma (St. Louis, USA). The microalbumin assay kit used for method validation was supplied by Randox Laboratories (United Kingdom).

All solutions were prepared in Milli-Q water, except the albumin standards, which were prepared daily in the calibrator diluent. As previously described, the calibrator diluent (500 mL, pH 6.0) was composed of 2.7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.18 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 4.5 g NaCl, 0.5 g EDTA disodium salt, and 50 mg human IgG [14].

The carrier buffer (pH  $7.4 \pm 0.20$ ) used in the SIA system was prepared from the previous method with a slight modification [14]. Briefly, 1-L of the buffer solution was prepared by dissolving 11.1 g MOPS free acid, 12.0 g NaCl, 1.0 g EDTA disodium salt, and 100 mL of 2-propanol in Milli-Q water, and the pH was adjusted to  $7.4 \pm 0.20$  with 1 M NaOH. The buffer solution was filtered with a 0.45 micron cellulose acetate membrane

(Sartorius, Germany) and kept at 4°C with tight sealing to prevent 2-propanol evaporation. The carrier buffer was degassed for 5 min to remove air bubbles before use.

Unless otherwise stated, the AB 580 working solution for the SIA system was prepared by mixing the purchased AB 580 solution with the carrier buffer in a 1:25 ratio. The AB 580 working solution was stored in an amber bottle for light protection throughout the experiments.

## **2.2 Apparatus**

The SIA system consisted of a syringe pump (Cavro XL 3000, Cavro Scientific Instruments Inc., USA) equipped with a 2.5 mL syringe, a six port selection valve (Cavro Smart Valve, Cavro Scientific Instruments Inc., USA), and a fluorescence detector (RF-10AX Shimadzu, Japan). The system components were arranged as shown schematically in Figure 1. Fluorescent peak heights were recorded and quantified using Class-LC 10 software from Shimadzu. All tubing used to connect the different components of the flow system was PTFE with 0.8 mm i.d. (Cole-Parmer Instrument Company, USA).

A UV-VIS spectrophotometer (Evolution 600, Thermo Scientific, USA) was used for the immunoturbidimetric method.

## **2.3 Sequential injection procedure**

The operating sequence of the SIA system for the analysis of albumin is listed in Table 1. The analytical cycle started with the aspiration of carrier buffer into the syringe. Next, the AB 580 working solution and the standard/sample solution were aspirated into the holding coil in which the fluorescent product was generated. The flow was then reversed, and the mixture was propelled through the fluorescent detector. Each point of the analytical plot represents the average peak height for four successive injections.

## **2.4 Sample preparation and analysis**

Unidentified urine samples were collected from diabetes patients at the King Chulalongkorn Memorial Hospital. The samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min, and the supernatant was then analyzed with the SIA system. The supernatant urine samples were aspirated to the SIA system for analysis of the albumin content. Four consecutive runs were carried out on each sample, and the results are expressed in  $\text{mg L}^{-1} \pm \text{SD}$ . The analytical results were compared with those obtained by the immunoturbidimetric method.

Since urine samples can generate fluorescent signals by themselves, the sample blank peak height was also quantified. The fluorescent signals of the urine sample was measured and subtracted from those of the urine-dye mixture.

## **2.5 Immunoturbidimetric method**

The proposed method was validated for accuracy by comparison to the immunoturbidimetric method using the commercial microalbumin kit from Randox Laboratories. A UV-VIS spectrophotometer set at 340 nm was used according to the manufacturer's instructions with slight modification. First, 0.5 mL of reagent buffer was mixed well with 0.05 mL of the sample/standard, and the initial absorbance (A1) was measured against water. Subsequently, 0.05 mL of the antibody solution was added. After mixing well, the solution was incubated at room temperature for 30 minutes. The solution was mixed again, and then the final absorbance (A2) of each solution was measured. The unknown concentrations of the samples were interpreted from the semi-log standard curve, which was plotted between the albumin concentrations and the change in absorbance (A2-A1) using the microalbumin calibration series supplied with the kit. The quality control of the assay was performed using the two levels of control samples provided with the kit. Agreement between the results obtained by the SIA and immunoturbidimetric method was evaluated by Pearson analysis using the SPSS 11.5 program, in which the  $p$  values  $< 0.05$  were considered significant.

## **3. Results and discussion**

### **3.1 Optimum ratio for preparation of AB 580 working solution**

The optimum ratio between the purchased AB 580 solution (here, reagent A) and the carrier buffer (here, reagent B) for preparation of the AB 580 working solution was investigated at the ratios of 1:10, 1:25, and 1:50. The aspiration volumes were 25  $\mu\text{L}$  and 75  $\mu\text{L}$  for the 25  $\text{mg L}^{-1}$  albumin and AB 580 working solution, respectively, in the SIA system. It was observed that the ratio of 1:10 gave the highest sensitivity, whereas the signals were decreased about 10% for the ratios of 1:25 and 1:50 (data not shown). This result is different from that obtained by the previous cuvette-based method, in which the ratio of 1:50 was used for the preparation of the working solution [14]. The cause of this differing result can be explained by the diffusion of analytes and reagents that occurs during flow to the detector, due to the nature of the flow-based method, which is different

from the batch-based system. Although the ratio of 1:10 gave the highest signal, it was disregarded because of the relatively large amount of AB 580 dye that was consumed at this ratio. To clarify the optimum ratio between 1:25 and 1:50, the calibration curves obtained from both ratios were compared as shown in Figure 2. These calibration curves indicated that using a more diluted dye reagent yielded a narrower calibration range. In addition, the dilution of the AB 580 working solution affected the sensitivity of the assay, especially in cases of a high albumin concentration. For example, the sensitivity at both ratios were similar for albumin concentrations less than 10 mg L<sup>-1</sup>, but the sensitivity for the 1:50 ratio was lower than that of the 1:25 ratio for 200 mg L<sup>-1</sup> albumin. Therefore, the ratio of 1:25 was selected as a compromise between sensitivity and the cost of AB 580 for preparation of the working dye solution for all subsequent experiments.

For the AB 580 working solution at a 1:25 ratio, excellent signal stability for at least 8 h was obtained. The remaining fluorescent signal for 100 mg L<sup>-1</sup> albumin was obtained at 102.5% and 92.4% after 6 h and 8 h, respectively (data not shown).

### **3.2 Influence of sample volume**

The influence of sample volume for the 25 mg L<sup>-1</sup> albumin in the SIA operating sequence was studied over the range 25–150 µL. The volume for the AB 580 working solution was set at 50 µL. The relationship between the fluorescent peak height and the sample volume is shown in Figure 3. It was observed that the fluorescent signals increased with increasing sample volume. However, increasing the sample volume above 100 µL did not significantly affect the emission intensity. This result indicated that the albumin content was in excess to the AB dye at the sample volumes higher than 100 µL. Therefore, the sample volume of 100 µL was chosen for further experiments.

### **3.3 Influence of AB 580 working solution volume**

To investigate whether the volume of the AB 580 working solution at 50 µL was sufficient to react with a fixed sample volume of 100 µL, the influence of the working dye solution volume on the fluorescent signals was studied over the range 25–350 µL. In the preliminary experiment, the simple operation sequence (Figure 4A, top) was performed by aspirating the working dye solution and the sample sequentially, before dispensing the mixture through the fluorescent detector. Two levels of albumin standards were investigated, 25 and 100 mg L<sup>-1</sup>.

The results shown in Figure 4B (solid line) demonstrated that increasing the volume of the dye reagent could improve the sensitivity of the assay. Clearly, a plateau signal was observed when the dye and 25 mg L<sup>-1</sup> albumin were injected in a proportion volume of 100:100  $\mu$ L. This ratio enhanced the fluorescent signal approximately 22% when compared to those obtained from a ratio of 50:100  $\mu$ L. A similar curve pattern was observed for the injection of 100 mg L<sup>-1</sup> albumin (Figure 4C, solid line).

Furthermore, we also investigated whether the additional volume of the AB 580 working solution could improve the sensitivity of the current procedure. Using the operation sequence shown in Figure 4A (bottom), we found that an additional step of aspirating an extra 50  $\mu$ L volume of the AB 580 working solution, in which the total volume of the AB 580 working solution was 150  $\mu$ L, could raise the sensitivity considerably (Figure 4B, dashed line). The sensitivity was increased approximately 43% when compared to the original sequence. An additional volume of the AB 580 working solution higher than 50  $\mu$ L was unable to improve the sensitivity of the assay.

However, the results were different from that obtained by aspirating 100 mg L<sup>-1</sup> albumin. As shown in Figure 4C (dash line), the results implied that the injection of a higher dye reagent volume lead to better sensitivity of the assay, and the plateau curve was found at 200  $\mu$ L of the working dye reagent. However, we noticed that using the working dye reagent for total volume of 200  $\mu$ L, the sensitivity was increased only 20% when compare to that of 150  $\mu$ L.

Therefore, the operation sequence of aspirating the AB 580 working solution (100  $\mu$ L), sample (100  $\mu$ L), and AB 580 working solution (50  $\mu$ L) was selected as a compromise between sensitivity and consumption of the AB 580 working solution. This formula was used for all subsequent experiments.

### **3.4 Carrier buffer and flow rate optimization**

Several volumes of carrier buffer were studied over the range 600-1400  $\mu$ L at intervals of 200  $\mu$ L. The carrier buffer volumes less than 1200  $\mu$ L were not sufficient to propel all of the chemical reaction mixture to the detector, and the baseline shift was clearly observed. Another factor affecting the peak shape was the dispensing flow rate to the detector. When a slower flow rate was used, broader peaks were obtained. In this study, the optimum carrier buffer volume was found to be 1200  $\mu$ L with a dispensing flow rate at 25  $\mu$ L/s. Under these conditions, the sampling frequency was 37 h<sup>-1</sup> (data not

shown). Recently, Kanchana et al. [21] proposed a spectrophotometric SIA system for the determination of urinary protein. Similar to our method, the main purpose of their system was for screening in diabetic patients. However, because their system was designed for the detection of both glucose and urinary protein, this led to a sample frequency of the spectrophotometric SIA system that was only 6 h<sup>-1</sup>, which was significantly less than our SIA system.

### 3.5 Calibration curve and limit of detection

The fluorescent peak height of the albumin standards and a typical calibration curve are shown in Figure 5. The calibration curve obeyed the mass action law, in which the linear range was obtained only at the low concentration from 1-25 mg L<sup>-1</sup> ( $r^2=0.998$ ). It should be noted that this linear range was sufficiently below the range for the cut-off limit of microalbuminuria at 15–40 mg L<sup>-1</sup> albumin [22]. In this study, the assay range was well displayed in the range of 1 to 200 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 6). The equation derived from the calibration curve was  $y = ax/(1+bx)$ , where  $y$  represented the relative fluorescence signals and  $x$  represented the concentration of albumin (mg L<sup>-1</sup>), while  $a$  and  $b$  were obtained from fit parameters of the standard curve. The detection limit (LOD) was calculated from ten replicate assays of the blank sample. In this work, we used the calibrator diluent as the blank sample. Based on the  $S/N = 3$ , the detection limit obtained for albumin was 0.3 mg L<sup>-1</sup>. For the early detection of microalbuminuria, a detection limit of 1 mg L<sup>-1</sup> is desirable. Therefore, our SIA system is very promising for microalbumin assays, especially in the early stages. Our SIA system was slightly more sensitive than the method described previously that was based on a centrifugal automatic analyzer using a AB 580 fluorescence assay, in which the detection limit was 0.4 mg L<sup>-1</sup> [16].

### 3.6 Precision and reproducibility

The statistical analysis of the reproducibility study was calculated from the calibration curves performed on four different days. The method exhibited a good reproducibility, as assessed by intra-run CVs (2.3-3.3%) and inter-run CVs (3.8%). For the measurement of albumin with low (15 mg L<sup>-1</sup>) and high concentrations (100 mg L<sup>-1</sup>), excellent precision was observed with relative standard deviations of 0.9% and 1.1%, respectively ( $n=15$ ).

### 3.7 Interferences

In the paper of Kessler, various substances that normally coexist in urine samples were investigated for their interferences, including common drugs, vitamins, proteins and urine metabolites. The results revealed that none of the tested substances significantly interfered [16]. Therefore, we believe that the AB 580 SIA systems, based on the same dye-binding principle as in the previous report, have a high selectivity to albumin. However, a few substances were tested to assure the specificity. As shown in Table 2, the results demonstrated that the interferences from proteins (transferrin, IgG, pepsin), drugs (acetylsalicylic acid, indomethacin, aminocetaphen), and glucose were acceptable with recoveries between 97.3-102.7%. Hemoglobin concentrations of 200 mg L<sup>-1</sup> slightly decreased the fluorescent signals with a recovery of 91.8%. However, the hemoglobin concentration at 10 mg L<sup>-1</sup> did not interact substantially with AB 580, which is in good agreement with the previous report [16]. Bilirubin was also tested because the bilirubin conjugated form may be found in pathogenic urine samples. Clearly, bilirubin concentrations at 80 mg L<sup>-1</sup> or 10 mg L<sup>-1</sup> were found to inhibit the assay signal, for which the recovery signals were 84.9% and 92.4%, respectively. This could be explained by the possible competitive binding between the bilirubin and albumin to the dye [23]. However, since bilirubin is usually absent in normal urine, this interference could be disregarded [24].

### 3.8 Method comparison

To evaluate the applicability of the proposed method for real sample analysis, 72 urine samples from diabetic patients were subjected to the SIA system along with albumin standards. The albumin concentrations were calculated from the calibration equations. The analytical results were compared with those obtained from different techniques, such as the immunological method. We compared the SIA system results to the immunoturbidimetric method, which is widely used in most laboratories. The results demonstrated that our proposed AB 580 SIA system is highly correlated with the immunoturbidimetric method ( $r^2 = 0.965$ ,  $n = 72$ ). The equation for the regression analysis was  $y = 1.037 (\pm 0.039)x + 4.34 (\pm 0.324)$ . For two methods with the ideal high correlation, the y-intercept and the slope should be close to 0 and 1.0, respectively. However, in this work, different standards/calibrators were used in the two methods, i.e., the immunoturbidimetric method used the calibrators from the kit supplied. However, our SIA system used the standards prepared in our laboratory from the commercial human serum albumin. Therefore, the y-intercept was significantly different from 0 at 4.34, and the slope

obtained was 1.037, which was slightly different from 1.0. For 70 degrees of freedom at the 95% confidence interval ( $\alpha = 0.05$ ), the critical t-value ( $t_{0.025, 70}$ ) was  $\pm 1.994$ . The statistical analysis revealed that the t-value of both methods was 43.705, which was significantly higher than the 95% confidence interval. Therefore, it could be summarized that the AB 580 SIA system and the immunoturbidimetric method were well correlated ( $p$ -value  $< 0.05$ ). The scatter-plot of the results obtained by both methods is shown in Figure 7.

#### **4. Conclusion**

The proposed SIA system was very efficient for the simple and rapid analysis of microalbuminuria. Utilizing the SIA system combination with the AB 580 fluorescent dye-binding technique, the method displayed good reproducibility and high sensitivity and specificity. Since no antibodies were required and less reagent was consumed, the cost of the assay was much lower, which is in high demand for the routine analysis of microalbuminuria in diabetic patients. The calibration range obtained from this work, 1-200 mg L<sup>-1</sup> albumin, covered the entire range of both normal urine and microalbuminuria. This system has been applied for the determination of microalbuminuria in real samples with satisfactory results. The AB 580 SIA is very promising for use instead of an immunoassay, or it can be an alternative method for the assessment of early diabetic nephropathy. Furthermore, the SIA system has the potential to be equipped with a small detector based on the fiber optic fluorometer, which would be fully portable and very beneficial for in-field analysis.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and the Commission on Higher Education (grant No. MRG4980090). Partial support from the National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials was also acknowledged.

#### **References**

- [1] J.L. Gross, M.J. de Azevedo, S.P. Silveiro, L.H. Canani, M.L. Caramori, T. Zelmanovitz, *Diabetes Care*, 28 (2005) 164.

- [2] D.B. Sacks, D.E. Bruns, D.E. Goldstein, N.K. Maclaren, J.M. McDonald, M. Parrott, *Diabetes Care*, 25 (2002) 750.
- [3] M.R. Weir, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2 (2007) 581.
- [4] S.S. Soedamah-Muthu, F.L. Visseren, A. Algra, Y. van der Graaf, *Diabetic Med.*, 25 (2008) 51.
- [5] D. de Zeeuw, H.H. Parving, R.H. Henning, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17 (2006) 2100.
- [6] J. Woo, M. Floyd, D.C. Cannon, B. Kahan, *Clin. Chem.*, 24 (1978) 1464.
- [7] H. Thakkar, D.J. Newman, P. Holownia, C.L. Davey, C.C. Wang, J. Lloyd, A.R. Craig, C.P. Price, *Clin. Chem.*, 43 (1997) 109.
- [8] M. Marre, J.P. Claudel, P. Ciret, N. Luis, L. Suarez, P. Passa, *Clin. Chem.*, 33 (1987) 209.
- [9] R.J. Stamp, *Ann. Clin. Biochem.*, 25 ( Pt 4) (1988) 442.
- [10] T.L. Wu, P.Y. Chang, C.C. Li, K.C. Tsao, C.F. Sun, J.T. Wu, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 35 (2005) 149.
- [11] S. Choi, E.Y. Choi, H.S. Kim, S.W. Oh, *Clin. Chem.*, 50 (2004) 1052.
- [12] A.H. Liang, Y.J. Huang, Z.L. Jiang, *Clin. Chim. Acta*, 383 (2007) 73.
- [13] A.A. Pegoraro, W. Peracha, M. Hasnain, N. Ranginwala, M. Shaykh, A.K. Singh, J.A.L. Arruda, G. Dunea, *Am. J. Kidney Dis.*, 35 (2000) 739.
- [14] M.A. Kessler, A. Meinitzer, O.S. Wolfbeis, *Anal. Biochem.*, 248 (1997) 180.
- [15] O. Hofmann, X. Wang, J.C. DeMello, D.D.C. Bradley, A.J. DeMello, *Lab. Chip.*, 5 (2005) 863.
- [16] M.A. Kessler, A. Meinitzer, W. Peter, O.S. Wolfbeis, *Clin. Chem.*, 43 (1997) 996.
- [17] W.L. Tseng, T.C. Chiu, J.M. Weng, H.T. Chang, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 24 (2001) 2971.
- [18] J. Wang, E.H. Hansen, *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 225.
- [19] E.H. Hansen, M. Miro, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 18.
- [20] D. Satinsky, I. Neto, P. Solich, H. Sklenakova, M. Conceicao, B.S. Montenegro, A.N. Araujo, *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 529.
- [21] W.I. Kanchana, T. Sakai, N. Teshima, S. Katoh, K. Grudpan, *Anal. Chim. Acta*, 604 (2007) 139.
- [22] D.J. Rowe, A. Dawney, G.F. Watts, *Ann. Clin. Biochem.*, 27 ( Pt 4) (1990) 297.
- [23] R. Brodersen, *J. Clin. Invest.*, 54 (1974) 1353.
- [24] K.L. Nuttall, G.G. Klee, in: C.A. Burtis, E.R. Ashwood (Eds.), *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 2001, p. 584.

## Table legends

**Table 1.** Operation sequence of the SIA system for the determination of urinary albumin.

**Table 2.** Effects of the tested interferences on the urinary albumin assay using the AB 580 SIA system.

## Figure legends

**Figure 1.** Configuration of the AB 580 SIA system. The syringe pump was used for delivering the carrier buffer; 6-SV (six-port selection valve); position 1 on the 6-SV was connected to the AB 580 working solution, position 2 was connected to samples/standards, position 3 to reagent B, 5 to the fluorescent detector, and 6 to the waste.

**Figure 2.** The effect of the ratio of reagent A and reagent B for the preparation of the AB 580 working solution on the sensitivity and calibration range. Reagent A and reagent B ratios of 1:25 (●) and 1:50 (○).

**Figure 3.** The relationship between the average fluorescent peak height and the sample volume aspirated to the SIA system.

**Figure 4.** (A) Aspiration sequences of the AB 580 working solution and sample. The influence of the AB 580 working solution volume aspirated to the system and reacted with 25 mg L<sup>-1</sup> albumin (B) or 100 mg L<sup>-1</sup> albumin (C). The aspiration sequence for figure 4A top (solid line) and figure 4A bottom (dashed line).

**Figure 5.** Typical fluorescent signals for the microalbumin assay using the AB 580 SIA system. The fluorescent peak height is shown for four injections for each concentration.

**Figure 6.** Non-linear calibration curve for the determination of microalbuminuria measured by the AB 580 SIA system. The equation derived from the calibration curve was  $y = 1.5802(x) / [1 + (0.0111)x]$ .

**Figure 7.** The AB 580 SIA system and the immunoturbidimetric method were compared for the determination of albumin in urine. The regression analysis gives  $y = 1.037 (\pm 0.039)x + 4.34 (\pm 0.324)$ ;  $n = 72$ ,  $r^2 = 0.965$ .

**Table 1.**

| Step | Operation                                        | Valve of pump | Port of selection valve | Volume ( $\mu\text{L}$ ) | Flow rate ( $\mu\text{L/s}$ ) |
|------|--------------------------------------------------|---------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 1    | Aspirate carrier buffer to syringe pump          | in            | -                       | 1200                     | 200                           |
| 2    | Aspirate AB 580 working solution to holding coil | out           | 1                       | 100                      | 100                           |
| 3    | Aspirate standard/sample to holding coil         | out           | 2                       | 100                      | 100                           |
| 4    | Aspirate AB 580 working solution to holding coil | out           | 1                       | 50                       | 50                            |
| 5    | Dispense mixture to fluorescent detector         | out           | 5                       | 1450                     | 25                            |

**Table 2.**

| Added interferences  | Added concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | % Recovery |
|----------------------|--------------------------------------------|------------|
| None                 | -                                          | 100        |
| Transferrin          | 100                                        | 97.3       |
| 2-ketobutyric acid   | 1                                          | 97         |
| IgG                  | 1000                                       | 102.7      |
| Acetylsalicylic acid | 100                                        | 100.0      |
| Ibuprofen            | 1000                                       | 94.7       |
| Indomethacin         | 100                                        | 102.7      |
| Acetaminophen        | 0.59                                       | 97.3       |
| Pepsin               | 590                                        | 97.3       |
| Glucose              | 20000                                      | 100.0      |
| Hemoglobin           | 200                                        | 91.8       |
|                      | 10                                         | 96.4       |
| Bilirubin            | 80                                         | 84.9       |
|                      | 10                                         | 92.4       |
| Ascorbic acid        | 100                                        | 95.8       |
| NaCl                 | 10000                                      | 96.6       |

Figure 1.

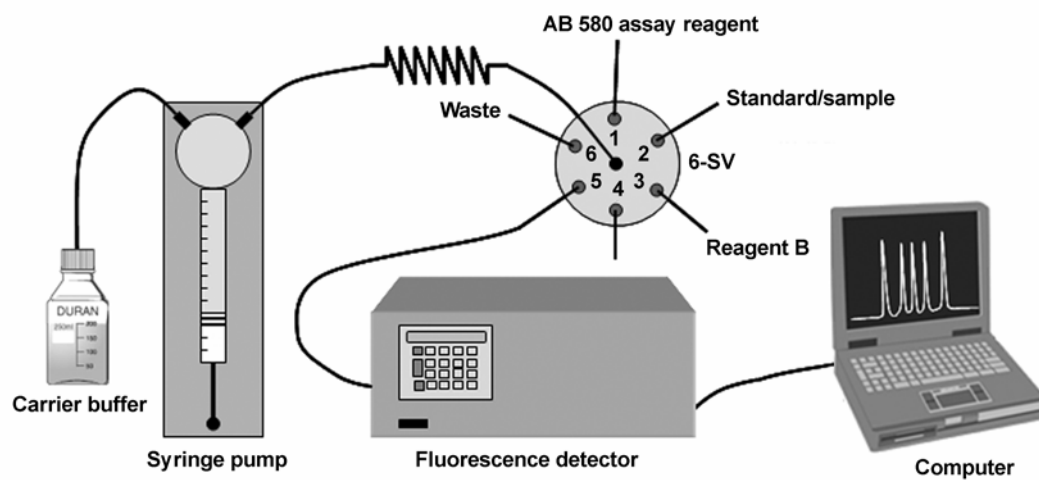
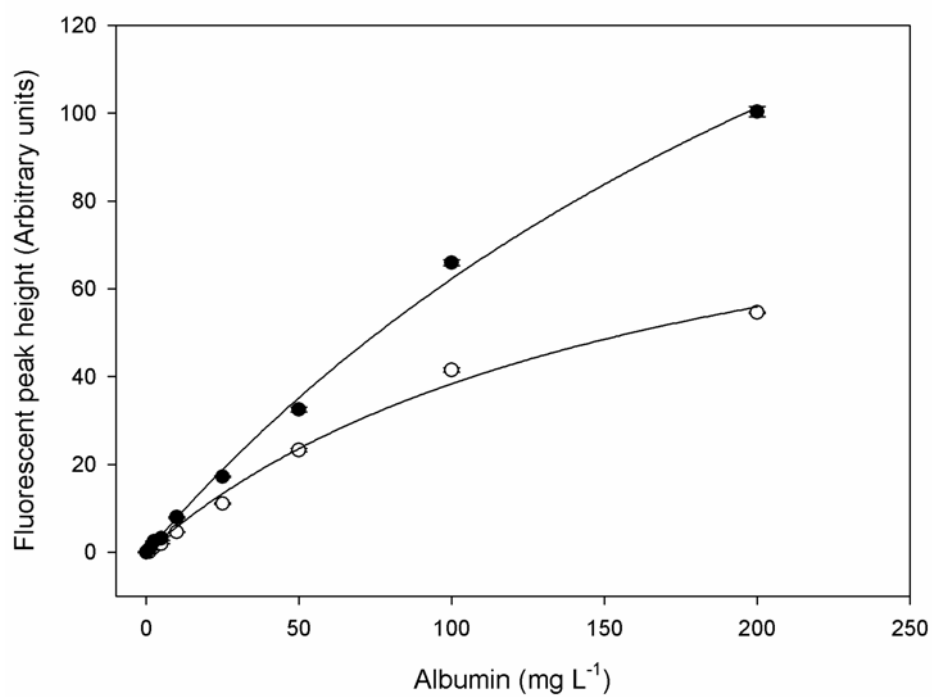
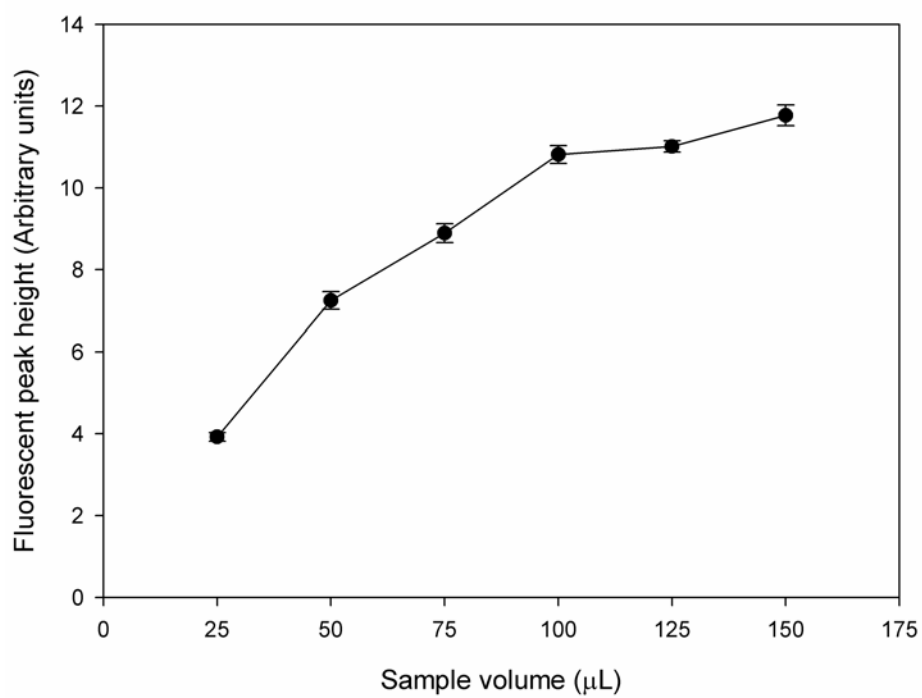


Figure 2.



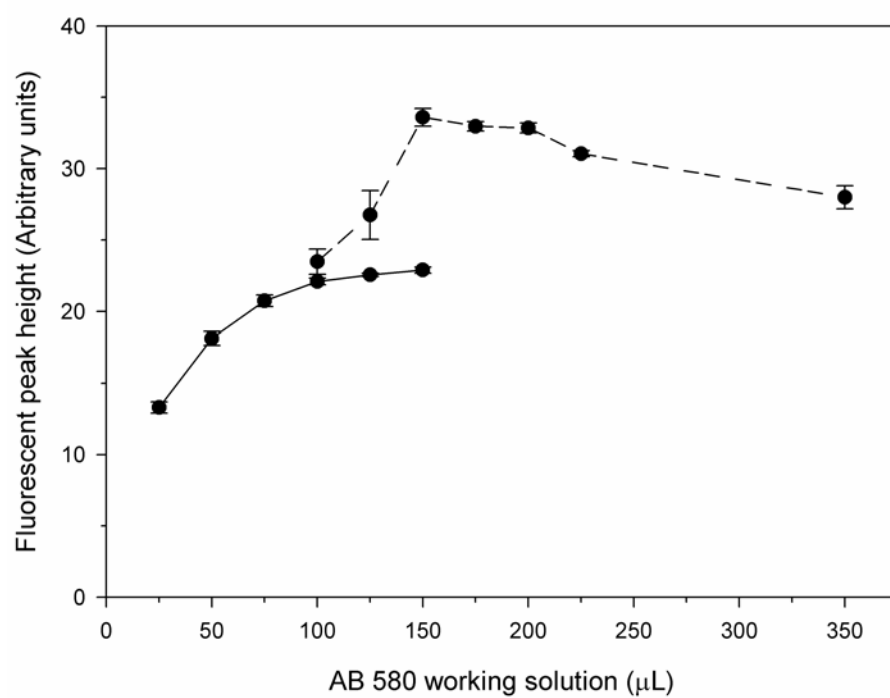
**Figure 3.**



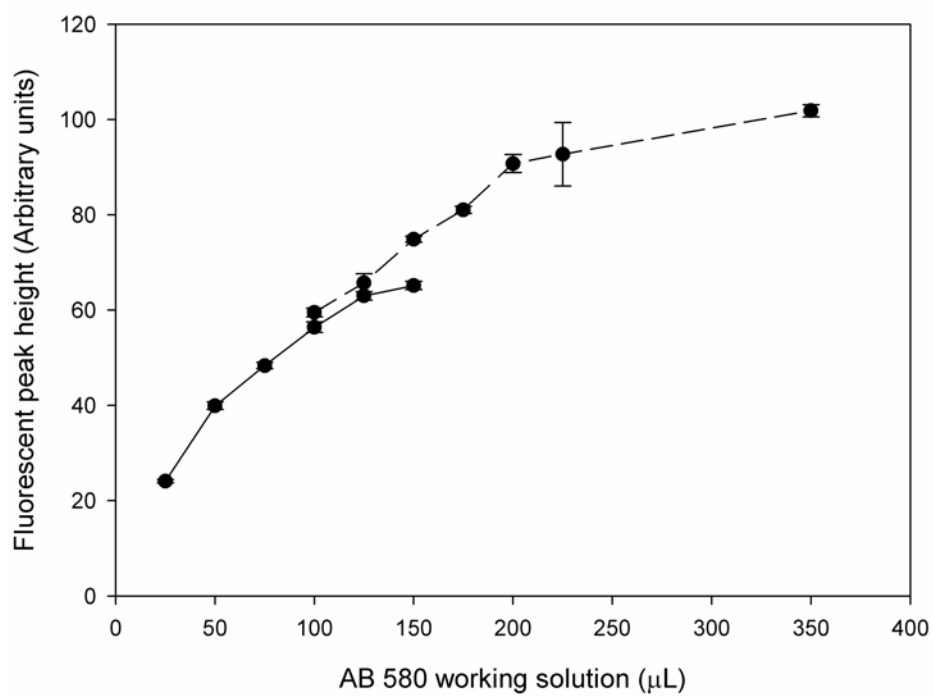
**Figure 4A.**



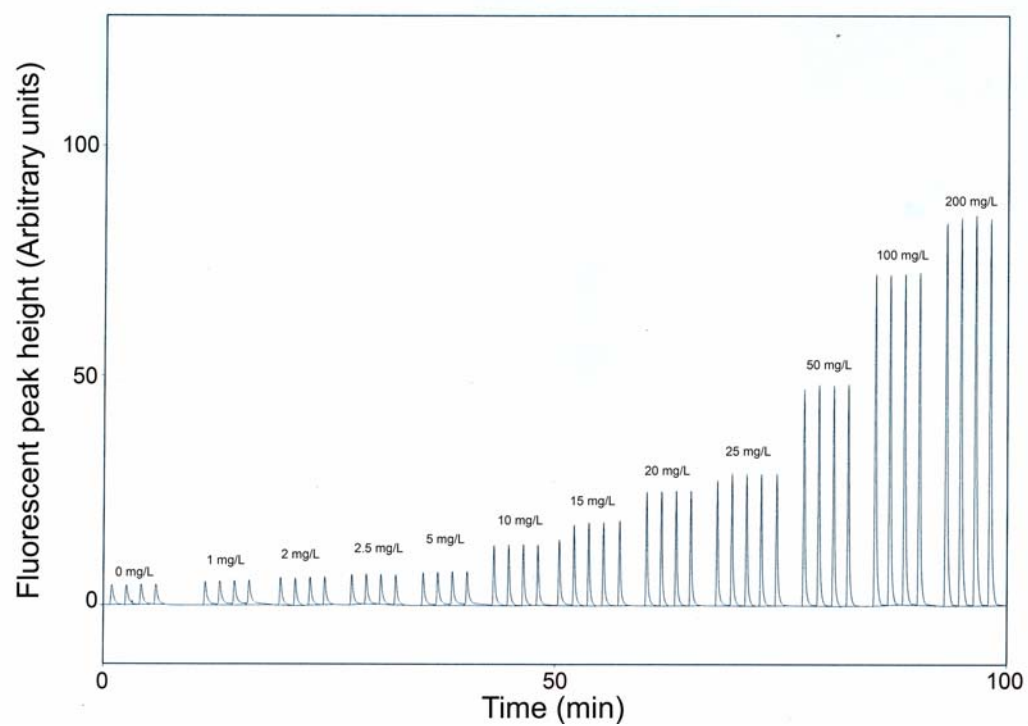
**Figure 4B.**



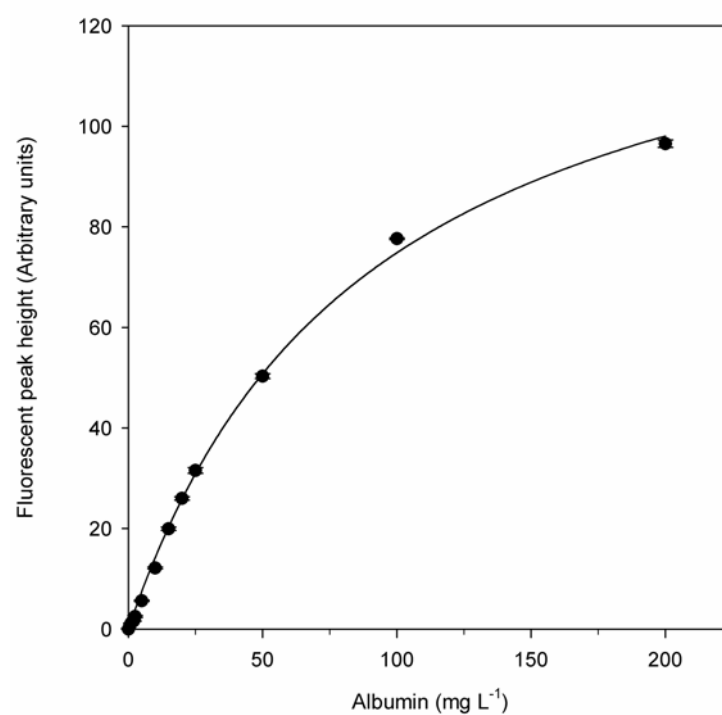
**Figure 4C.**



**Figure 5.**



**Figure 6.**



**Figure 7.**

