



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ: การเพิ่มความเข้มข้นและการตรวจวัดสารที่เป็นตัวบ่งชี้การเกิดนิวโดยใช้เทคนิคอะฟัลลาริโอ
เล็กโทรฟอริซิส

โดย ดร.มนพิชา ศรีสะอาด และคณะ

มิถุนายน/2560 (วันสิ้นสุดโครงการ)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ: การเพิ่มความเข้มข้นและการตรวจวัดสารที่เป็นตัวบ่งชี้การเกิดนิวโดยใช้เทคนิคอะฟิลาเรีย
เล็กโทรฟอริซิส

คณะผู้วิจัย

- ดร.มนพิชา ศรีสะอาด
- นางสาวชนิษฐา คนหาญ
- รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมบุญ หนูจักร

สังกัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Project Code: TRG5780174

Project Title: Simple On-line Preconcentration and Determination of Nephrolithiasis Markers Using Capillary Electrophoresis

Investigator: Dr. Mionpichar Srisa-Art

E-mail Address: monpichar.s@chula.ac.th

Project Period: 2nd June 2014–1st June 2017

Abstract:

Online preconcentration and determination of oxalate and citrate using capillary electrophoresis (CE) were presented. A preconcentration technique exploiting large volume sample injection together with matrix removal using an electro-osmotic flow (EOF) pump was employed to improve the sensitivity of the CE method. The migration of analytes was achieved using an uncoated fused silica capillary column of 40.2 cm (30 cm to detector) × 50 µm i.d. and an applied voltage of -15 kV. A background electrolyte (BGE) was 200 mM phosphate buffer (pH 8.0) with injection times of 10-90 s. Results showed that when using an injection time of 90 s, limits of detection (LODs) were 0.003 ppm and 0.013 ppm and limits of quantification (LOQs) were 0.013 ppm and 0.033 ppm for oxalate and citrate, respectively. When compared with a normal injection time of 10 s, 90 s injection time could improve the sensitivity of the CE method for approximately 200 times. Recoveries of the method were in the range of 98-108% for oxalate and citrate with the relative standard deviation (%RSD) values <5% for corrected peak area and %RSD <5 for migration time. Inter-day and intra-day precisions evaluated using %RSD were found to be less than 5% for both corrected peak area and migration time. The CE method was further applied to quantitatively determine the amounts of oxalate and citrate in urine samples. Results obtained from the CE method were compared with those from the standard method (enzymatic assays) using the student *t*-test. It was found that no significant difference between the results obtained from both methods. This confirmed the accuracy and reliability of the proposed CE method for determination of oxalate and citrate in urine of patients with kidney stones.

Keywords: capillary electrophoresis, on-line preconcentration, oxalate, citrate

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5780174

ชื่อโครงการ: การเพิ่มความเข้มข้นและการตรวจวัดสารที่เป็นตัวบ่งชี้การเกิดนิวโดยใช้เทคนิคอะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ชื่อนักวิจัย: ดร.มนพิชา ศรีสะอาด

อีเมล: monpichar.s@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 มิถุนายน 2557 – 1 มิถุนายน 2560 (ขอพักโครงการวิจัย 1 ปี)

บทคัดย่อ:

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคอะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis, CE) สำหรับการเพิ่มปริมาณแบบออนไลน์และการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรต เทคนิคการเพิ่มสารตัวอย่างแบบออนไลน์จะใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากพร้อมกับการกำจัดเมทริกซ์ออกโดยอาศัย electro-osmotic flow (EOF) เพื่อช่วยเพิ่มสภาพไวของเทคนิค CE ในการทดลองนี้ใช้อะพิลลารีซิลิกาที่ปราศจากการเคลือบภายใน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 ไมโครเมตร ยาว 40.2 เซนติเมตร (30 เซนติเมตร ถึงเครื่องตรวจวัด) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกเท่ากับ -15 กิโลโวลต์ โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8.0 และระยะเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างในช่วง 10-90 วินาที ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 90 วินาที ซิตจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ ของออกซาเลตและซีเทรต เท่ากับ 0.003 และ 0.013 ppm ตามลำดับ และซิตจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.013 และ 0.033 ppm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการบรรจุสารตัวอย่างตามระยะเวลาปกติ (10 วินาที) พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดออกซาเลตและซีเทรตได้ถึง 200 เท่า การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยการทดสอบความแม่นยำพบว่ามีความแม่นยำของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-108% สำหรับออกซาเลตและซีเทรต และมี %RSD<5% สำหรับทั้งไมเกรชันโคมและพื้นที่ใต้พีค เมื่อเปรียบเทียบความเที่ยงระหว่างวันและภายในวันเดียวกันพบว่ามี %RSD<5% สำหรับทั้งไมเกรชันโคมและพื้นที่ใต้พีค วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะและเมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจวัดออกซาเลตและซีเทรตที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานโดยใช้เทคนิคทางเอนไซม์โดยการทดสอบแบบ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไต เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการวินิจฉัย การรักษา และการป้องกันการเกิดโรคนี้ไตในอนาคต

คำหลัก: อะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส, การเพิ่มปริมาณแบบออนไลน์, ออกซาเลต, ซีเทรต

สารบัญ

	หน้า
Abstract	i
บทคัดย่อ	ii
1. Executive summary	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
3. วิธีดำเนินงานวิจัย	2
4. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	12
5. สรุปผลการทดลอง	32
6. เอกสารอ้างอิง	34
7. Output	34
8. ภาคผนวก	35
9. รายงานการเงิน	43

1. Executive Summary

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคอะคูสติกโฟลว์อิเล็กโทรออสโมติก (CE) สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นและการตรวจวัดออกซาเลตและซิเตรตซึ่งเป็นสารบ่งชี้การเกิดนิ่ว โดยการเพิ่มปริมาณสารจะใช้เทคนิคการเพิ่มสารแบบออนไลน์ โดยทำการบรรจุสารในปริมาณมากด้วยความดันพร้อมกับกำจัดเมทริกซ์ออกภายหลังโดยอาศัย electroosmotic flow (EOF) เพื่อช่วยเพิ่มสภาพไวของเทคนิค CE โดยทำการศึกษาภาวะต่าง ๆ ของเทคนิค CE เพื่อใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นและแยกออกซาเลตและซิเตรต เช่น ความเข้มข้นและค่า pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ เวลาและความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสาร เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นและการแยกสาร ได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ (LOD) ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์ และสุดท้ายประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการหาปริมาณสารที่เป็นตัวบ่งชี้การเกิดนิ่วในตัวอย่างปัสสาวะ

จากผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยเทคนิค CE คือ ใช้อะคูสติกโฟลว์ที่ปราศจากการเคลือบภายใน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 ไมโครเมตร ความยาว 40.2 เซนติเมตร (30 เซนติเมตร ถึงเครื่องตรวจวัด) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกเท่ากับ -15 กิโลโวลต์ โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8.0 และระยะเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างในช่วง 10-90 วินาที ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 90 วินาที ค่า LOD ของออกซาเลตและซิเตรต เท่ากับ 0.003 และ 0.013 ppm ตามลำดับ และมี LOQ สำหรับการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 0.013 และ 0.033 ppm ตามลำดับ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยการทดสอบความแม่นยำพบว่ามีความแม่นยำของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-108% สำหรับออกซาเลตและซิเตรตและมี %RSD<5% สำหรับทั้งไมเกรชั่นไทม์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคแก้ไข (A_{corr}) เมื่อเปรียบเทียบความเที่ยงระหว่างวันและภายในวันเดียวกันพบว่ามีความแม่นยำ %RSD<5% สำหรับทั้ง t_m และ A_{corr} วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจวัดออกซาเลตและซิเตรตที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานโดยใช้เทคนิคทางเอนไซม์ (enzymatic method) โดยการทดสอบแบบ t -test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้นว่ามีความถูกต้อง โดยนำผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีมาสร้างกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสองวิธี พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและมีค่า intraclass correlation coefficient อยู่ในเกณฑ์ที่ดีมากสำหรับออกซาเลตและซิเตรต คือเท่ากับ 0.977 และ 0.970 ตามลำดับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการวินิจฉัย การรักษา และการป้องกันการเกิดโรคนี้ได้อีกในอนาคต

ผลจากงานวิจัยนี้ได้นำไปเผยแพร่ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 40 และจะทำการเผยแพร่ผลงานวิจัยเพื่อจะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

พัฒนาเทคนิคอะตอมิเล็ทโรฟลูออโรสโคปีในการหาปริมาณสารที่เป็นบ่งชี้การเกิดนิ่ว (เช่น ออกซาเลตและซิเตรต) และประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นในการหาปริมาณสารที่เป็นบ่งชี้การเกิดนิ่วในตัวอย่างปัสสาวะ

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

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

3.2 สารเคมี

1. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
2. di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
3. Phosphoric acid (H_3PO_4)
4. Methanol
5. Sodium hydroxide (NaOH)
6. Sodium oxalate ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$)
7. Citric acid monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
8. Milli Q water
9. ชุดทดสอบออกซาเลตโดยใช้เอนไซม์ (oxalate kit)
10. ชุดทดสอบซิเตรตโดยใช้เอนไซม์ (citrate kit)

3.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเตรตด้วยเทคนิค CE

3.3.1 ภาวะทั่วไปของเครื่อง CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 1 ภาวะทั่วไปของเครื่อง CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรต

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

3.3.2 ผลของ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการแยกของออกซาเลตและซิเตรต

ศึกษาในช่วง pH 6.0-8.0 ทำโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 200 mM จากนั้นปรับ pH ให้อยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษาคือ pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 โดยใช้สารละลาย 0.1 M NaOH จากนั้นนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไต โดยใช้เทคนิค CE เพื่อหา pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุด เพื่อจะสามารถแยกออกซาเลตและซิเตรตออกจากสารอื่น ๆ ในปัสสาวะได้ และนอกจากนี้ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดันแล้วกำจัดเมทริกซ์ออกภายใต้อิทธิพลของ EOF ที่ไม่สูงมากนัก ดังนั้นหากต้องการ EOF ที่ไม่สูงมากจะต้องใช้ pH ต่ำ (pH น้อยกว่า 4) แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้ pH ที่ต่ำได้ เนื่องจากออกซา

เลตและซิเทรตมีค่า pK_a อยู่ในช่วง 1-7 ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเทรตและ pH ที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์โดยใช้ CE

3.3.3 ผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการแยกของออกซาเลตและซิเทรต

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่มีต่อการแยกออกซาเลตและซิเทรต จะใช้สารตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตที่เจือจางสองเท่าและนำมากรองด้วย Syringe filter ขนาด $0.2\ \mu\text{m}$ เนื่องจากตัวอย่างปัสสาวะในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณไม่มาก ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ตัวอย่างเดียวกันในการหาสภาวะที่เหมาะสมได้ในทุกการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมทริกซ์ที่อยู่ในแต่ละตัวอย่างไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นปัสสาวะที่ใช้ในแต่ละการทดลองจึงสามารถเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมด จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ในช่วงความเข้มข้น 40-200 mM เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สามารถแยกออกซาเลตและซิเทรตออกจากสารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในปัสสาวะได้

3.3.4 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกออกซาเลตและซิเทรต

โดยศึกษาในช่วงความต่างศักย์ -10 ถึง -30 kV เพื่อหาความต่างศักย์ที่เหมาะสมที่สุดในการแยกออกซาเลตและซิเทรตออกจากสารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในปัสสาวะและใช้ระยะเวลาในการแยกไม่นาน

3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้น (On-line preconcentration) ของออกซาเลตและซิเทรตด้วยเทคนิค CE

3.4.1 เวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง

ทำได้โดยวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไต โดยใช้เทคนิค CE โดยการเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 วินาที ตามลำดับ แต่ใช้ความดันในการบรรจุสารเท่ากับ 0.5 psi เพื่อหาเวลาการบรรจุสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นได้มากที่สุดโดยไม่สูญเสียการแยก และเพื่อเพิ่มความสามารถของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเทรตปริมาณน้อย ๆ ในปัสสาวะได้ถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

3.4.2 ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง

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

3.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น (Method validation)

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

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

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

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

S = ค่าสัญญาณของสารที่วิเคราะห์ได้

N = สัญญาณรบกวน

C_{diluted} = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ทำการเจือจาง

3.5.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

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

$$y = mx + c$$

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

m = ความชันของกราฟ

x = ความเข้มข้นของสาร (ppm)

c = จุดตัดแกน y ของกราฟ

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตเพื่อใช้สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน

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

3.5.3 ความแม่นยำ (Accuracy)

จะใช้การเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค CE เพื่อคำนวณหาค่าร้อยละการคืนของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป ขั้นตอนการเตรียมสารละลายและการหาค่าความแม่นยำทำได้ดังนี้

3.5.3.1 เตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่า ทำได้โดยการกรองปัสสาวะด้วย Syringe filter ขนาด 0.2 μm จากนั้นปิเปตมา 500 μL และปิเปตน้ำ Milli-Q 500 μL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 mL จะได้ปัสสาวะที่เจือจางแล้ว 2 เท่า

3.5.3.2 เตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรต ทำได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

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

3.5.3.3 หาปริมาณออกซาเลตและซิเทรตทั้งหมด โดยวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเทรตที่เตรียมในตารางที่ 6 ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมโดยทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 10 ครั้ง นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบค่าความแม่นยำสำหรับการบรรจุสารแบบปกติกับการบรรจุสารในปริมาณมากอีกด้วย

3.5.3.4 คำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรตที่เติมลงไป โดยนำค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคแก้ไขที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตจากกราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นในหัวข้อ 3.5.2 จะได้ปริมาณความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างปัสสาวะที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรต (จากสารละลายในหัวข้อ 3.5.3.1) และความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตทั้งหมดซึ่งได้จากออกซาเลตและซิเทรตที่มีอยู่แล้วในตัวอย่างปัสสาวะรวมกับสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรตที่เติมลงไป (จากสารละลายในหัวข้อ 3.5.3.2) จากนั้นนำมาคำนวณหาร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรตที่เติมลงไป ดังสมการต่อไปนี้

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

3.5.4 ความเที่ยง (Precision)

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

3.5.4.1 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรตความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรตสำหรับหาค่าความเที่ยง

ชุดที่	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน (ppm)		ปริมาตรสารละลาย		
			1,000 ppm ที่ต้องปิเปต(μL)	ปัสสาวะ (μL)	Milli-Q (μL)
1	ซิเทรต	50	50	500	350
	ออกซาเลต	100	100		

3.5.4.2 นำตัวอย่างที่เตรียมในตาราง 4 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบการบรรจุสารแบบปกติกับการบรรจุสารในปริมาณมาก ทำการวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวันเดียวกันจำนวนการวิเคราะห์ 10 ครั้ง สำหรับความเที่ยงระหว่างวันจะทำการวิเคราะห์เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน โดยจำนวนการวิเคราะห์ 10 ครั้งเพื่อหาความเที่ยงของเครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์

3.5.4.3 วิเคราะห์ผลจาก 3.5.4.2 โดยหาพื้นที่ใต้พีคแก้ไข และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในข้อ 3.5.2 จะได้ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตที่วิเคราะห์ได้ จากนั้นคำนวณค่า %RSD ของค่าพื้นที่ใต้พีคแก้ไข ไมเกรซินโทม และปริมาณออกซาเลตและซิเตรตที่วิเคราะห์ได้ เพื่อหาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน และความเที่ยงระหว่างวันจากสมการดังต่อไปนี้

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

RSD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคแก้ไขหรือค่าเฉลี่ยไมเกรซินโทม

3.6 ประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในตัวอย่างปัสสาวะ

3.6.1 วิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะโดยวิธี CE ที่พัฒนาขึ้น

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

นำปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ผ่านการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 μm แล้วมาเจือจาง 2 เท่า จากนั้นนำมาตรวจวัดด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้พัฒนาขึ้นดังกล่าวมาแล้ว จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคแก้ไข (corrected peak, A_{corr}) มาคำนวณหาความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตจากกราฟมาตรฐานที่ได้ทำขึ้นในข้อ 3.5.2

3.6.2 วัดปริมาณออกซาเลตโดยใช้ชุดตรวจวัดออกซาเลต (oxalate kit)

1. เตรียมสารละลายในคิวเวตขนาด 1 mL ดังตารางที่ 5 จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาบ่มที่อุณหภูมิห้องทันทีเป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลายเพื่อหาปริมาณออกซาเลตโดยใช้ชุดตรวจวัดออกซาเลตโดย

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

std* สารละลายมาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้ oxalate kit

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

3. สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและ Blank กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซาเลต (ppm) จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจะได้สมการเส้นตรงดังนี้

$$y = mx + c$$

y = ผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและ Blank

m = ความชันของกราฟ

x = ความเข้มข้นของออกซาเลต (ppm)

c = จุดตัดแกน y ของกราฟ

4. หาความเข้มข้นของออกซาลेटในตัวอย่างปัสสาวะโดยนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างปัสสาวะมาลบกับ blank จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของออกซาลेटโดยใช้สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

3.6.3 วัดปริมาณซีเทรตโดยใช้ชุดตรวจวัดซีเทรต (citrate kit)

1. เตรียมสารละลายในคิวเวตปริมาตรขนาด 3 mL ดังตารางที่ 6 ผสมสารละลายให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องทันทีเป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 6 การเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานเพื่อวัดปริมาณซีเทรตโดยใช้เอนไซม์

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

std* สารละลายมาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้ citrate kit

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

3. จากนั้นเติมสารละลายขวดที่ 4 (CL) ทุกคิวเวต ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันและนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องทันทีเป็นเวลา 5 นาที

4. จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดในคิวเวตมาวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีอีกครั้งที่ 340 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 2 (A_2)

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

6. สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าผลต่างของ $\Delta A (A_1 - A_2)$ ของ Blank และ $\Delta A (A_1 - A_2)$ ของสารละลายมาตรฐานซีเทรต กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซีเทรต (ppm) จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจะได้สมการเส้นตรงดังสมการ

$$y = mx + c$$

y = ค่า ΔA ของ blank ลบด้วย ΔA ของสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง

m = ความชันของกราฟ

x = ความเข้มข้นของซีเทรต (ppm)

c = จุดตัดแกน y ของกราฟ

7. หาความเข้มข้นของซีเทรตในตัวอย่างปัสสาวะโดยนำค่า ผลต่างของ ΔA blank กับ ΔA ของตัวอย่างปัสสาวะมาหาความเข้มข้นของซีเทรตจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

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

นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงหรือไม่ โดยการสร้างกราฟที่ได้จากผลการวิเคราะห์จากเทคนิค CE และผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีมาตรฐาน เพื่อเป็นการยืนยันความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นอีกด้วย

4. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเตรตด้วยเทคนิค CE

4.1.1 ผลของ pH ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรต

เนื่องจากในงานวิจัยนี้จะศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดันแล้วกำจัดเมทริกซ์ออกภายใต้อิทธิพลของ EOF ที่ไม่สูงมากนัก (low EOF) ซึ่งวิธีนี้จะเหมาะกับการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เป็นประจุลบเช่น ออกซาเลตและซิเตรต เนื่องจากเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้วในการแยกสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF พร้อมกับเมทริกซ์ถูกกำจัดออกไปด้วยอิทธิพลของ EOF ดังนั้นหากต้องการ EOF ที่ไม่สูงมากจะต้องใช้ pH ต่ำในการทดลอง โดยปกติในการเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีนี้มักจะใช้ pH น้อยกว่า 4 [1] แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้ pH ที่ต่ำได้ เนื่องจากออกซาเลตซึ่งแตกตัวมาจากกรดออกซาลิก ที่มีค่า pK_a 2 ค่าคือ 1.23 และ 4.28 สมการการแตกตัวของกรดออกซาลิกแสดงดังต่อไปนี้

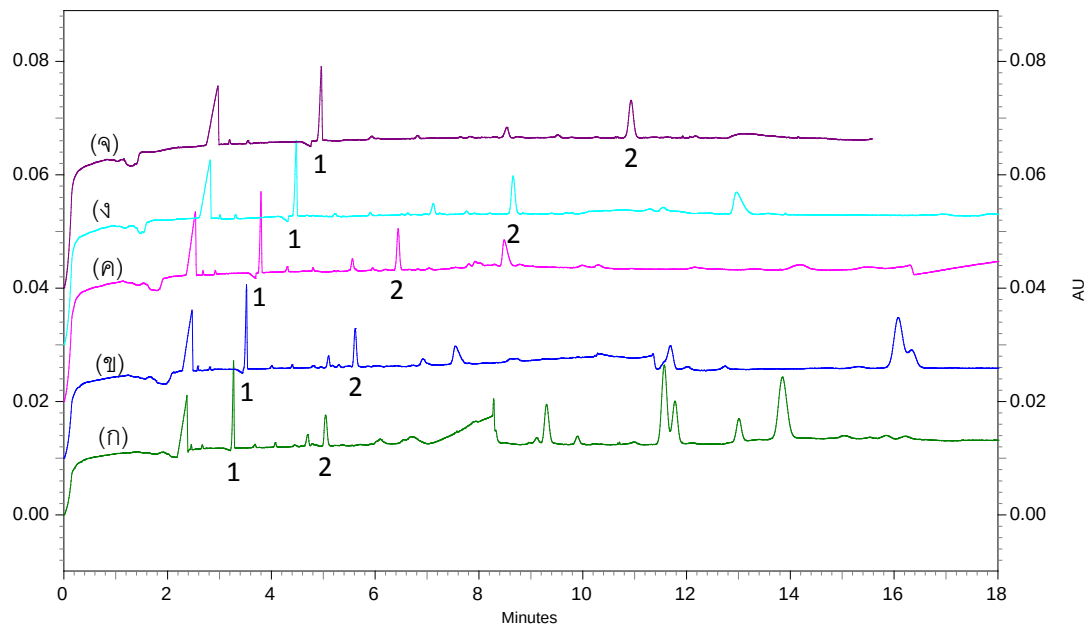


และซิเตรตซึ่งแตกตัวมาจากกรดซิทริก มีค่า pK_a 3 ค่า คือ 3.13 4.76 และ 6.40 การแตกตัวของกรดซิทริกแสดงดังต่อไปนี้

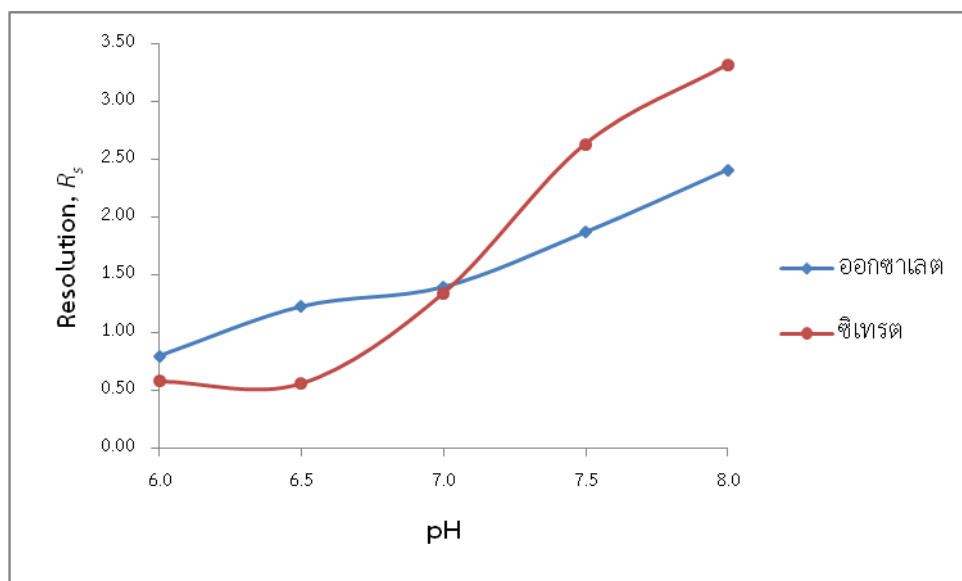


ดังนั้นหากต้องการให้กรดออกซาลิกและซิเตรตแตกตัวได้หมดต้องใช้ pH มากกว่า 7.0 ขึ้นไป และจากการทดลองพบว่าถ้าใช้ $pH < 7.0$ ทั้งออกซาเลตและซิเตรตจะใช้เวลาในการเคลื่อนที่มาถึงเครื่องตรวจวัด เนื่องจากที่ pH ต่ำทั้งออกซาลิกและซิเตรตแตกตัวได้น้อย ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้ามีค่าต่ำ จึงเคลื่อนที่ได้ช้า ดังนั้นการเพิ่มปริมาณแบบออนไลน์ของออกซาเลตและซิเตรตจึงไม่สามารถใช้ pH ที่ต่ำมาก ด้วยเหตุนี้จึงต้องทำการศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการแยกออกซาเลตและซิเตรตและการเพิ่มปริมาณแบบออนไลน์ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.21 และจะศึกษาช่วงค่า pH ของบัฟเฟอร์ดังนี้คือ pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ซึ่งเป็นช่วงที่ออกซาเลตและซิเตรตแตกตัวได้เกือบ 100% ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 1 จากรูปจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มค่า pH ของบัฟเฟอร์จาก 6.0-8.0 มีผลทำให้สารออกมาช้าลงตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นจะทำให้ EOF มากขึ้นตามไปด้วย จึงเกิดแรงต้านระหว่างไอออนลบของออกซาเลตและซิเตรตกับ EOF ที่มีทิศทางการเคลื่อนที่ที่ตรงกันข้ามกัน ดังนั้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้สารเคลื่อนที่ออกมาช้าลง และนอกจากนี้จากรูปจะสังเกตได้ว่าเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นพีคของออกซาเลตและซิเตรตแยกจากพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ มากขึ้น เมื่อพิจารณาค่าการแยกดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ค่าการแยก (R_s) ก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งค่า $pH=8.0$ เป็นค่า pH ให้ค่าการแยกของพีคออกซาเลตและซิเตรตมากที่สุด ($R_s=2.4$ และ 3.3 ตามลำดับ) ถึงแม้ว่าที่ pH 7.5 จะสามารถแยกออกซาเลตและซิเตรตได้อย่างสมบูรณ์ ($R_s \geq 1.5$) แต่พีคของออกซาเลตและซิ

เทอร์ตอยูไกลักกับพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ ในสารตัวอย่างปัสสาวะมากกว่าที่ pH 8.0 ซึ่งพีคอื่น ๆ อาจบดบังพีคของออกซาเลตและซีเทรตได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือก pH 8.0 สำหรับการแยกออกซาเลตและซีเทรตในสารตัวอย่างปัสสาวะ



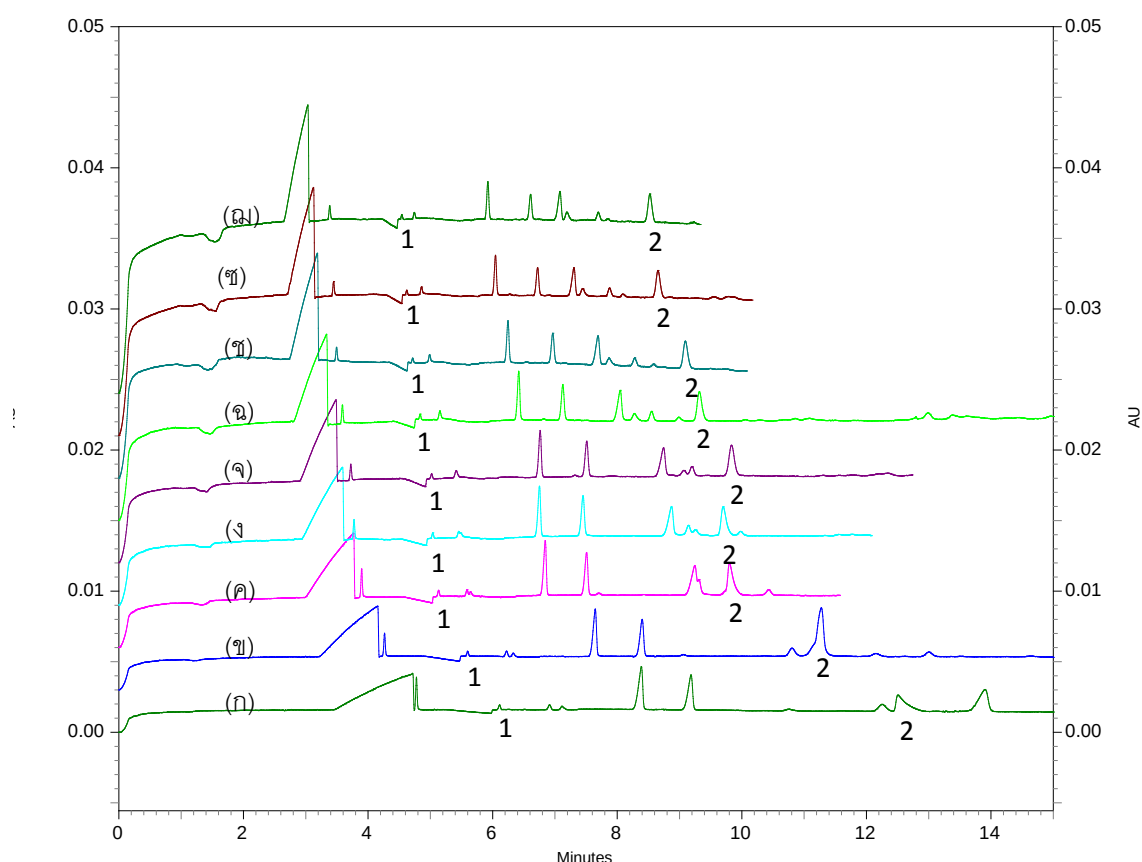
รูปที่ 1 อิเล็กโทรโฟโแกรมแสดงของผลของ pH ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 200 mM และปรับ pH เป็น (ก) 6.0 (ข) 6.5 (ค) 7.0 (ง) 7.5 และ (จ) 8.0 พีค 1 คือ ออกซาเลต และ พีค 2 คือซีเทรต สภาวะของ CE ที่ใช้คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน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



รูปที่ 2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า R_s ที่ค่า pH ต่าง ๆ

4.1.2 ผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรต

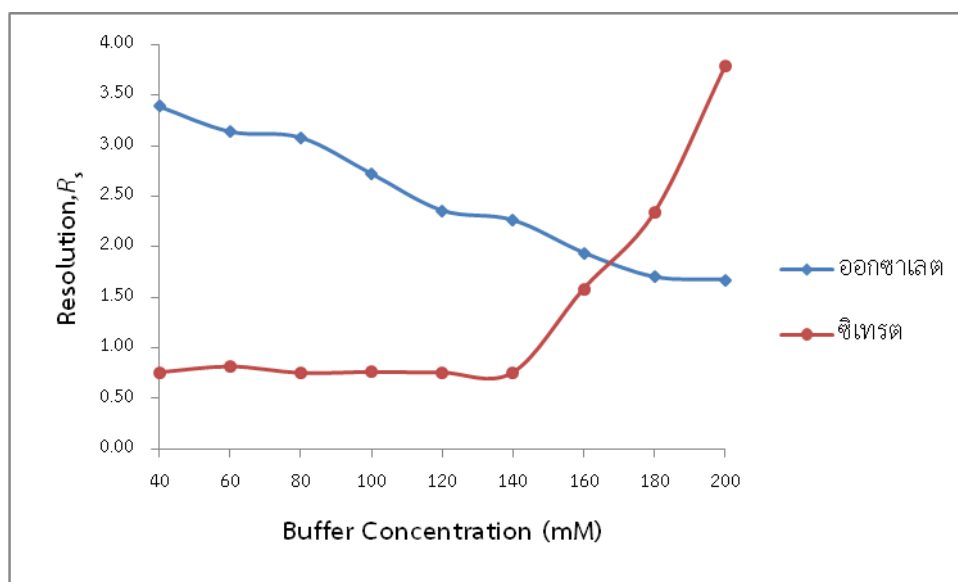
บัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้คือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pK_a 7.21) ที่ pH 8.0 ซึ่งจะทำให้กรดออกซาลิกและซิทรिकแตกตัวเป็นระจุได้เกือบ 100% และในสภาวะนี้จะมี EOF ที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของออกซาเลตและซิเตรตมีค่าสูงพอที่จะสามารถต้านการเคลื่อนที่ของ EOF เข้าไปสู่เครื่องตรวจจับได้ ในการทดลองนี้จึงศึกษาความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซิเตรต โดยศึกษาในช่วงความเข้มข้น 40-200 mM ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทำให้สารเคลื่อนที่ออกมายังเครื่องตรวจจับเร็วขึ้น โดยปกติการเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าลดลงเนื่องจากค่าความแรงไอออนิกในสารละลายที่มีค่ามากขึ้น ทำให้สารตัวอย่างมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากไอออนที่มาล้อมรอบมีจำนวนมากขึ้น ทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง แต่ในการทดลองนี้เมื่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นสารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จะทำให้ในสารละลายมีปริมาณไอออนมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้เกิดความร้อนภายในกะปิลารีหรือเกิด joule heating ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นจะส่งผลทำให้ความหนืดของสารละลายลดลง มีผลทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาเร็วขึ้น จากรูปสังเกตได้ว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง 40-120 mM (รูปที่ 3 (ก-จ)) ยังไม่สามารถแยกพีคของซิเตรตออกจากเมทริกซ์ได้ ทั้งนี้พีคของออกซาเลตและซิเตรตจะสามารถแยกออกจากพีคอื่น ๆ ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าตั้งแต่ 140 mM ขึ้นไป (รูปที่ 3 (ฉ-ณ)) ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 140 mM สามารถแยกพีคออกซาเลตได้แต่พบว่าพีคของซิเตรตยังรวมอยู่กับสารอื่น



รูปที่ 3 อิเล็กโทรโครมาโตแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อการแยกของออกซาเลตและซิเตรตในตัวอย่างปัสสาวะ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์คือ (ก) 40 mM (ข) 60 mM (ค) 80 mM (ง) 100 mM (จ) 120 mM (ฉ) 140 mM (ช) 160 mM (ณ) 180 mM

160 mM (ข) 180 mM และ (ง) 200 mM โดยพีค 1 คือ ออกซาเลต และ พีค 2 คือซิเตรต สำหรับสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 1

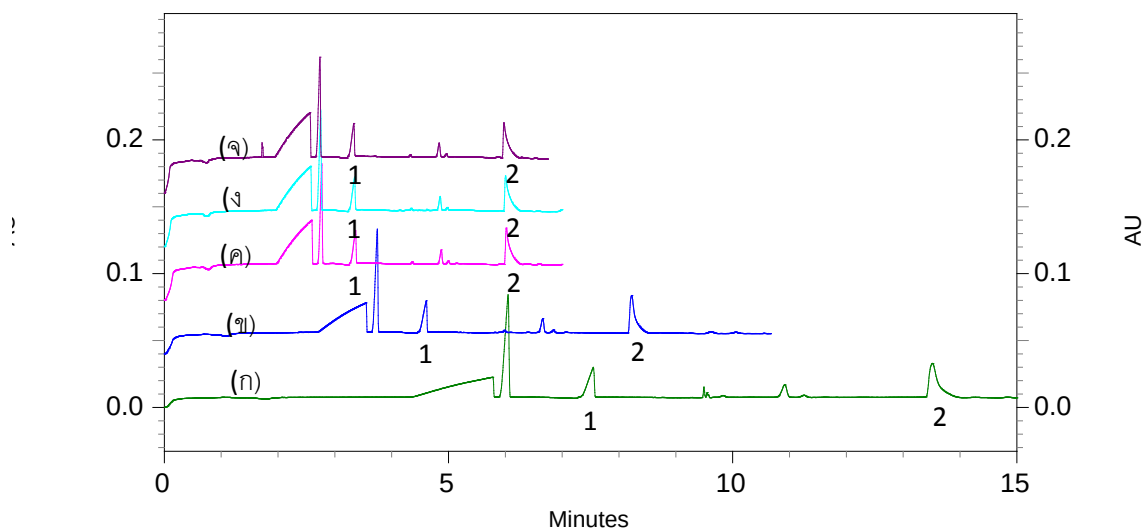
เมื่อเปรียบเทียบค่า R_s ของออกซาเลตและซิเตรตและความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่ม ค่าการแยกของออกซาเลตลดลงในขณะที่ค่าการแยกของซิเตรตเพิ่มขึ้น พีคของซิเตรตจะแยกได้อย่างสมบูรณ์ ($R_s \geq 1.5$) เมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าตั้งแต่ 160 mM เป็นต้นไป จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 160 mM ก็เพียงพอที่จะแยกพีคของออกซาเลตและซิเตรตได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีค่า R_s เท่ากับ 1.94 และ 1.58 สำหรับพีคของออกซาเลตและซิเตรตตามลำดับ อย่างไรก็ตามถ้าใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์มากกว่า 160 mM พีคของซิเตรตจะยิ่งแยกออกจากพีคอื่น ๆ ได้มากขึ้น และที่ความเข้มข้นสูง ๆ เวลาที่ใช้ในการแยกยังลดลงอีกด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 200 mM เพราะสามารถแยกทั้งออกซาเลตและซิเตรตได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยให้ค่าการแยก 1.67 และ 3.78 ตามลำดับ ค่าไมเกรชันไทม์ของออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 4.45 และ 8.16 ตามลำดับ



รูปที่ 4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า R_s ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

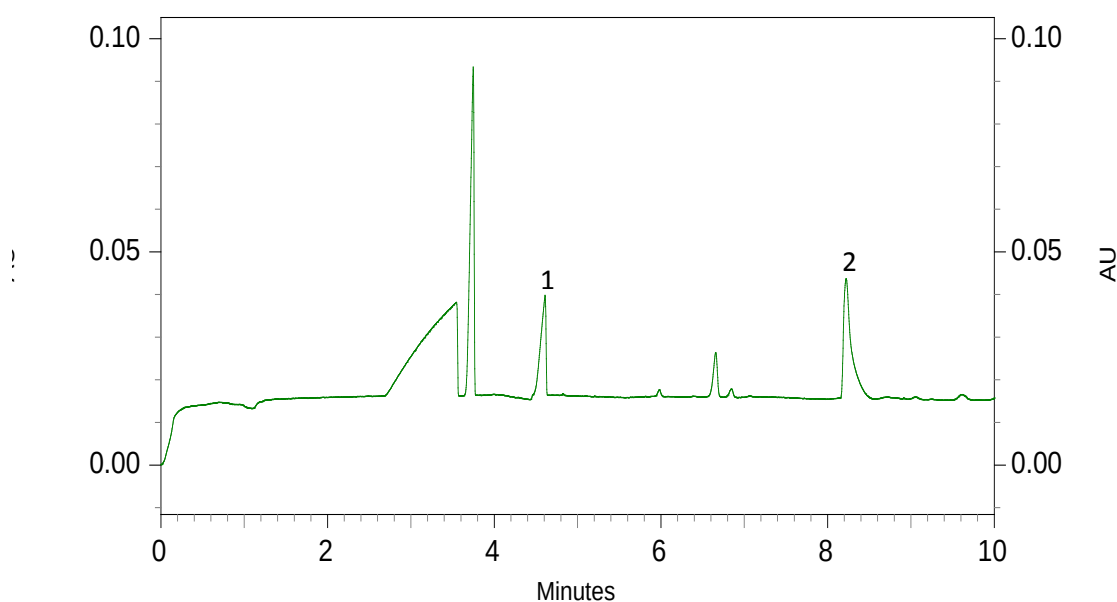
4.1.3 ผลของความต่างศักย์ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเตรต

หลังจากได้ความเข้มข้นและค่า pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกออกซาเลตและซิเตรตแล้ว ต่อมาได้ศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกเพื่อให้ค่าการแยกที่ดีที่สุดของสารทั้งสองชนิด โดยปรับค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เป็น -10, -15, -20, -25 และ -30 kV ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่าเมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้น ทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น เนื่องจากการเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้านั้นทำให้เกิดความเข้มของสนามไฟฟ้า (E) ที่มากขึ้น และส่งผลให้อิออนของสารเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับได้เร็วขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก μ ของสารขึ้นอยู่กับความเข้มของสนามไฟฟ้า



รูปที่ 5 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อความสามารถในการแยกออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะ โดยปรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น (ก) -10 kV (ข) -15 kV (ค) 20 kV (ง) -25 kV และ (จ) -30 kV พีก 1 คือ ออกซาเลต และ พีก 2 คือซิเทรต สำหรับสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 1

ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ทุกศักย์ไฟฟ้าออกซาเลตและซิเทรตแยกออกจากพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน แต่จากการทดลองพบว่าเมื่อลดค่าศักย์ไฟฟ้าลงเป็น -10 kV ทำให้การเคลื่อนที่ของสารมายังเครื่องตรวจจับช้าลง ส่งผลให้เสียเวลาในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แต่หากเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น -20 ถึง -30 kV สารจะเคลื่อนที่ออกมาเร็วขึ้นตามค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นทำให้เวลาที่ใช้ในการแยกลดลงและพีคของออกซาเลตและซิเทรตเข้ามาชิดกันมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้พีคของเมทริกซ์อื่น ๆ บดบังและรบกวนการแยกของออกซาเลตและซิเทรตได้ อีกทั้งยังพบว่าการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกตั้งแต่ -20 kV ขึ้นไปมีผลทำให้กระแสไฟฟ้าในระบบมากขึ้นอาจเสี่ยงต่อการหยุดทำงานของเครื่องโดยอัตโนมัติ เนื่องจากกระแสไฟฟ้าที่สูงมากเกินไป ($>200 \mu\text{A}$) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า -15 kV สำหรับการแยกออกซาเลตและซิเทรต ซึ่งให้ R_s ของพีคออกซาเลตและซิเทรตเท่ากับ 2.80 และ 5.46 ตามลำดับ อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการแยกที่ใช้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -15 kV แสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการแยกของพืคออกซาเลต (พืค 1) และซีเทรต (พืค 2) เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกเท่ากับ -15 kV สำหรับสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 1

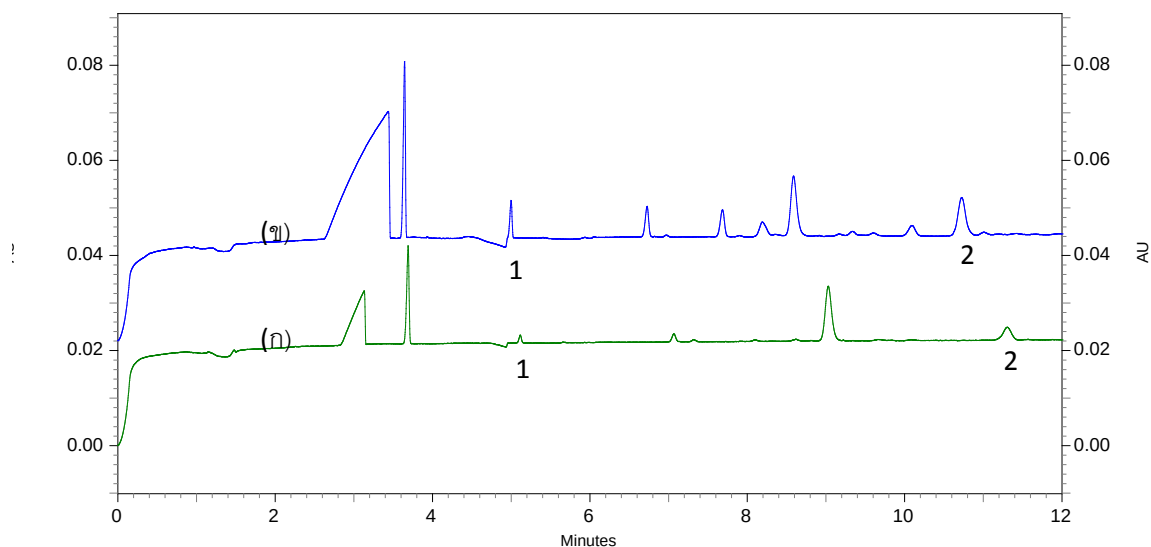
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ (on-line preconcentration) ของออกซาเลตและซีเทรตโดยเทคนิค CE

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

4.2.1 ระยะเวลาที่บรรจุสารตัวอย่าง

ในการทดลองได้เลือกใช้วิธีการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในแคพิลลารีโดยใช้การบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ออกจากระบบโดยใช้ EOF [1] ดังนั้นระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างจึงมีความสำคัญสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีนี้

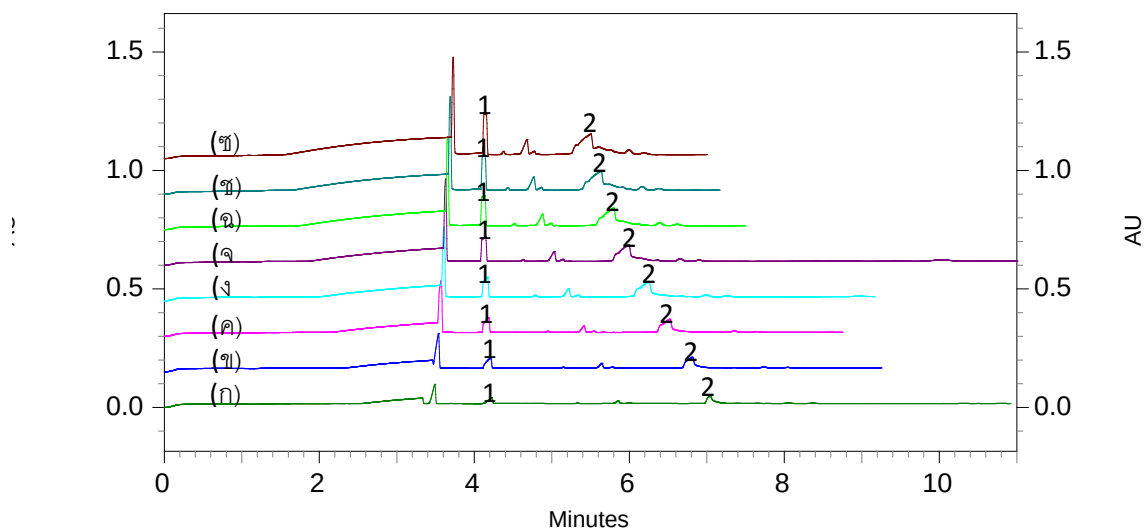
ในรูปที่ 7 เป็นการใช้วิธีการเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตในคะฟิลลารี พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างนานขึ้นจะทำให้พีคของออกซาเลตและซิเทรตสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างนานขึ้นทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้นอีกด้วย เนื่องมาจากการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างทำให้โซนสารตัวอย่างมีความยาวมากและเคลื่อนที่เข้าไปในคะฟิลลารีได้มากขึ้นตามระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เหลือระยะทางในคะฟิลลารีที่สารจะต้องเคลื่อนที่ถึงเครื่องตรวจวัดสั้นลง จึงมีผลทำให้สารใช้เวลาน้อยในการเคลื่อนที่ออกมาถึงเครื่องตรวจวัดหรือสารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้นนั่นเอง กล่าวคือการบรรจุสารในปริมาณมากทำให้โซนของสารที่มีประจุลบไม่เคลื่อนที่ย้อนไปยังด้านบรรจุสารมากนักเนื่องจาก sample plug มีปริมาณมาก จึงทำให้อยู่ใกล้เครื่องตรวจวัดมากกว่า ดังนั้นระยะทางในการเคลื่อนที่ถึงเครื่องตรวจวัดจึงสั้นกว่า ดังนั้นการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างจึงส่งผลให้สารเคลื่อนที่ออกมาจากคะฟิลลารีได้เร็วขึ้นนั่นเอง จากการทดลองพบว่าออกซาเลตและซิเทรตให้ค่าการแยกอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10-70 วินาที หากบรรจุสารตัวอย่างมากกว่า 70 วินาทีจะทำให้พีคของสารตัวอย่างสูงขึ้นแต่พบว่าให้ค่าการแยกที่ไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการบรรจุสารตัวอย่างที่ 30 วินาทีก็เพียงพอแล้วสำหรับการตรวจวัดสารออกซาเลตและซิเทรตในปริมาณน้อย ๆ โดยสามารถเพิ่มความสูงของพีคออกซาเลตและซิเทรตได้ประมาณ 2 เท่า และให้ค่าการแยกสำหรับออกซาเลตและซิเทรตเท่ากับ 2.49 และ 1.65 ตามลำดับ ถึงแม้ว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างที่มากกว่า 30 วินาทีจะสามารถเพิ่มความสูงของพีคออกซาเลตและซิเทรตได้ดียิ่งขึ้น แต่จากการทดลองพบว่าอาจทำให้พีคของเมทริกซ์อื่น ๆ เข้ามาอยู่ใกล้ซิดกับพีคของออกซาเลตและซิเทรตมากเกินไป ซึ่งมีโอกาสทำให้สูญเสียการแยกได้



รูปที่ 7 อิเล็กโทรโฟโกราฟีแสดงผลของเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้น ของออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ โดยปรับเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น (ก) 10 และ (ข) 30 วินาที พีค 1 คือออกซาเลตและ พีค 2 คือซีเทรต สำหรับสภาวะของ CE คือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 200 mM pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก -15 kV และสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 1

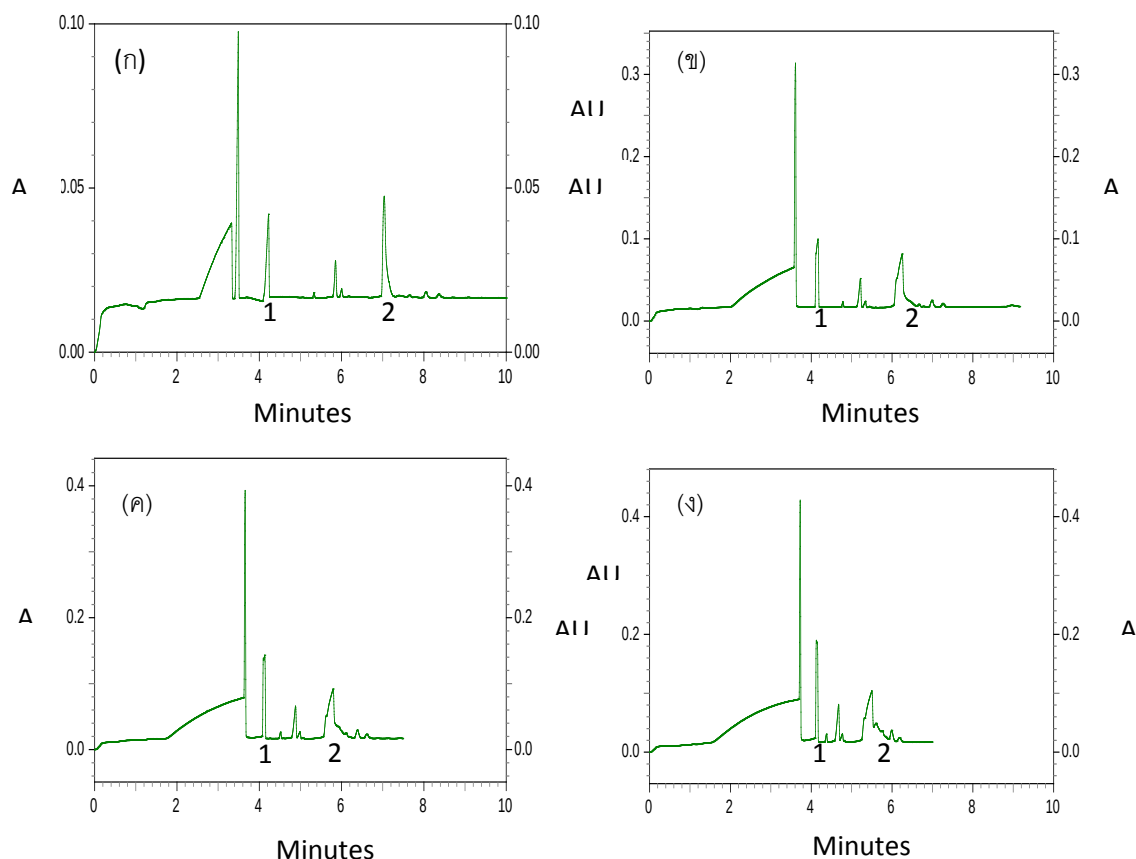
4.2.2 ความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่าง

นอกจากระยะเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างจะส่งผลถึงปริมาณสารตัวอย่างที่บรรจุแล้ว ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างก็มีผลต่อปริมาณของสารตัวอย่างเช่นกัน ดังนั้นจึงทำการศึกษาความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่าง สำหรับการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 พบว่าเมื่อเพิ่มความดันในการบรรจุสารตัวอย่างโดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างคงที่ (10 วินาที) พีคของสารตัวอย่างจะกว้างขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ความดันที่สูงขึ้น ทำให้ด้านหน้าของโซนสารมีลักษณะเป็นแบบพาราโบลาและเกิดการกระจายของโซนสาร ซึ่งจะคล้ายกับการเคลื่อนที่ของสาร เนื่องมาจากการใช้ปั๊มใน HPLC จึงส่งผลให้พีคสารกว้างมากขึ้น จะเห็นได้ว่าการใช้ความดันที่ 0.5 psi เป็นความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่าง และหากเพิ่มความดันมากกว่า 0.5 psi พีคของออกซาเลตและซีเทรตจะมีลักษณะกว้าง เป็นผลเนื่องมาจากความดันที่มากขึ้นและในการบรรจุสารตัวอย่างทำให้เกิดการกระจายของพีคสารตัวอย่าง จึงทำให้พีคมีลักษณะไม่สมมาตร ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ความดันสูงในการบรรจุสารตัวอย่างเพื่อเพิ่มปริมาณสารในแคปิลลารี แต่ควรเพิ่มปริมาณโดยการเพิ่มเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างแทน และทำการบรรจุสารที่ความดัน 0.5 psi นอกจากนี้การใช้ความดันสูงขึ้นจะทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้นจนอาจสูญเสียการแยกได้ ทั้งนี้เพราะเมื่อใช้ความดันสูงขึ้น โซนสารตัวอย่างจะยาวขึ้น ทำให้เหลือระยะทางในการเคลื่อนที่ไปสู่เครื่องตรวจวัดสั้นลง ซึ่งคล้ายกับกรณีการบรรจุสารตัวอย่างให้นานขึ้นนั่นเอง



รูปที่ 8 อิเล็กโทรโฟโแกรมแสดงผลของความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะ โดยปรับความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น (ก) 0.5 (ข) 1.0 (ค) 1.5 (ง) 2.0 (จ) 2.5 (ฉ) 3.0 (ช) 3.5 และ (ซ) 4.0 psi พีก 1 คือออกซาเลตและพีก 2 คือซิเทรต โดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาที และสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบการบรรจุสารตัวอย่างที่ 0.5, 1.5, 3.0 และ 4.0 psi จะเห็นว่าการใช้ความดันในการบรรจุสารตัวอย่างที่ 0.5 psi (รูปที่ 9 (ก)) พีกของออกซาเลตและซิเทรตมีลักษณะแคบและสูง ซึ่งแสดงถึงความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่างในคัพฟิลลารี เมื่อเพิ่มความดันมากขึ้นในการบรรจุสารตัวอย่าง (รูปที่ 9 (ข-ง)) พีกจะมีลักษณะกว้าง เกิดการกระจายของพีกอันเนื่องมาจากลักษณะไฮดรอสแตติกที่เป็นแบบพาราโบลา และหากเพิ่มความดันมากเกินไปกว่า 2.0 psi พีกของเมทริกซ์อื่น ๆ จะเคลื่อนที่เข้ามาชิดและบดบังพีกของซิเทรตทำให้ไม่สามารถแยกสารดังกล่าวได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกการบรรจุสารตัวอย่างในคัพฟิลลารีด้วยความดัน 0.5 psi สำหรับการแยกออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะ



รูปที่ 9 อิเล็กโทรโฟโแกรมแสดงผลของผลของความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างกับการเพิ่มความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตในบัฟเฟอร์ โดยปรับความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างเป็น (ก) 0.5 psi (ข) 1.5 psi (ค) 3.0 psi และ (ง) 4.0 psi พีก 1 คือ ออกซาเลตและ พีก 2 คือซิเตรต โดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาทีและสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 1

4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น (Method validation)

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

4.3.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ))

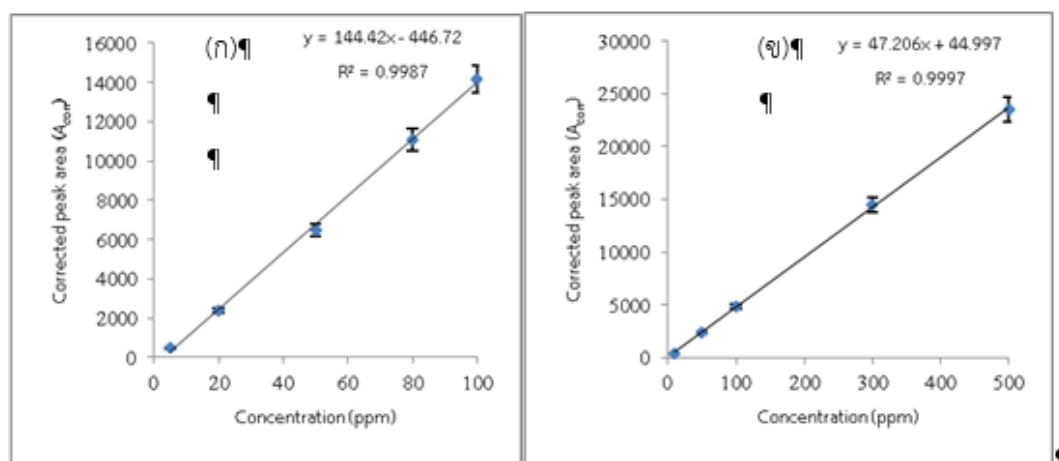
ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรต จากนั้นทำการเจือจางสารละลายมาตรฐาน และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นอย่างน้อย 3 ซ้ำ และวัดอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) จนกระทั่งได้ค่าสัญญาณใกล้เคียง 3 สำหรับ LOD และ 10 สำหรับ LOQ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเป็นเวลา 90 วินาทีได้ค่า LOD สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.003 และ 0.013 ppm ตามลำดับ และค่า LOQ สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 0.013 และ 0.033 ppm ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่ม LOD และ LOQ เมื่อเปรียบเทียบกับกรบรรจุสารตัวอย่างตามระยะเวลาปกติ (10 วินาที) ได้ถึงปริมาณ 200 เท่าทั้งออกซาเลตและซีเทรต เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้เช่น ในปี ค.ศ. 2010 Muñoz และคณะได้พัฒนาและหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดออกซาเลต ซีเทรต กรดยูริก และครีเอทีนีน ในปัสสาวะ โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM pH 6.5 และใช้เทคนิค CZE ในการวิเคราะห์สาร พบว่า LOD ของการตรวจวัดสารดังกล่าวเท่ากับ 0.46, 2.6, 3.8 และ 1.3 ppm ตามลำดับ [2] จะเห็นได้ว่าถึงแม้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่า LOD สำหรับออกซาเลตและซีเทรตน้อยกว่างานวิจัยดังกล่าว แต่วิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถทำได้ง่ายและสามารถเพิ่มความเข้มข้นสารแบบออนไลน์สำหรับการหาปริมาณออกซาเลตที่มีอยู่ในปัสสาวะในปริมาณต่ำ ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 7 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ

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

4.3.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

ในการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในแต่ละวันจะทำการสร้างกราฟมาตรฐานตามตารางที่ 2 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้พัฒนาขึ้นโดยทำการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของ A_{corr} เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 10 และได้สมการเส้นตรงดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง A_{corr} และความเข้มข้นของสารมาตรฐานออกซาเลตและซิเตรตมีความสัมพันธ์ในลักษณะเชิงเส้นตรงสูง จะเห็นได้จากค่า R^2 ของออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 0.9987 และ 0.9997 ตามลำดับ



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของออกซาเลต (ก) และซิเตรต (ข) สำหรับการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะโดยเทคนิค CE สภาวะของ CE คือความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 200 mM pH 8.0 คะปิลลารีคอลัมน์เป็น uncoated fused silica ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μ m ยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ศักย์ไฟฟ้า -15 kV บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่มีความยาวคลื่น 195 nm

ตารางที่ 8 สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของออกซาเลตและซิเตรตสำหรับการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะโดยเทคนิค CE

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

4.3.3 ความแม่นยำ (Accuracy)

การหาความแม่นยำสามารถทำได้ตามหัวข้อ 3.5.3 โดยเตรียมความเข้มข้นดังตารางที่ 3 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้พัฒนาขึ้นความเข้มข้นละ 10 ครั้งเพื่อหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น และนำค่า A_{corr} จากผลการทดลองที่ได้มาหาปริมาณของออกซาเลตและซิเตรตเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปที่ 10 จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 จากผลการทดลองหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นและใช้การบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ (10 วินาที) พบว่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-108% สำหรับออกซาเลตและ 103-106% สำหรับซิเตรต ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ในช่วงร้อยละของการคืนกลับ 80-110% สำหรับความเข้มข้นในช่วง 0.1-10 ppm และ 90-107% สำหรับความเข้มข้นในช่วง 10-100 ppm [3] นอกจากนี้ได้ทำการหาร้อยละของการคืนกลับเพื่อทดลองความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ สำหรับการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมาก (30 วินาที) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 พบว่าร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 98.95% สำหรับออกซาเลตและ 102.66% สำหรับซิเตรต ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เช่นเดียวกับการทดสอบความแม่นยำสำหรับการบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องและแม่นยำของเครื่องมือและวิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นและการแยกออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ

ตารางที่ 9 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะ เมื่อใช้การบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ (10 วินาที) (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)

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

ตารางที่ 10 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะเมื่อใช้การบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมาก (30 วินาที) (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นที่วัดได้ ($\pm$ SD)	Recoveries (%) ($\pm$ SD)
ออกซาเลต	50	49.48 $\pm$ 0.42	98.95 $\pm$ 0.83
ซิเตรต	100	102.66 $\pm$ 4.61	102.66 $\pm$ 4.61

4.3.4 ความเที่ยง (Precision)

ทำได้โดยการวิเคราะห์ผลจากการทดลองในหัวข้อ 4.3.3 โดยคำนวณ A_{corr} ของสารและวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูป 10 จะได้ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเตรตที่เติมลงไป จากนั้นสามารถคำนวณ %RSD เพื่อหาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน โดยเทียบการบรรจุสารแบบปกติ (10 วินาที) กับการบรรจุสารในปริมาณมาก (30 วินาที) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่ามีค่าความเที่ยงสูงทั้งการบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติและการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมาก (30 วินาที) กล่าวคือ ในการทดลองได้ค่า %RSD<4% สำหรับทั้งไมเกรซินโทม (t_m) และ A_{corr} และ %RSD<5 สำหรับปริมาณที่ตรวจวัดได้ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงและอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ [3] และวิธีการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากให้ความเที่ยงที่สูงเช่นเดียวกับการบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ เมื่อเปรียบเทียบความเที่ยงระหว่างวันโดยทำติดต่อกัน 3 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่า %RSD<5 สำหรับทั้งไมเกรซินโทม (t_m) และ A_{corr} ซึ่งส่งผลให้ %RSD<5 สำหรับความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้เช่นเดียวกับการทดสอบความภายในวันเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าเครื่องมือและวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ที่ติดต่อกันหลายวัน

ตารางที่ 11 ความเที่ยงภายในวันเดียวกันของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะด้วยเทคนิค CE ที่ได้พัฒนาขึ้นโดยทำการบรรจุสารตัวอย่าง 10 และ 30 วินาที (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)

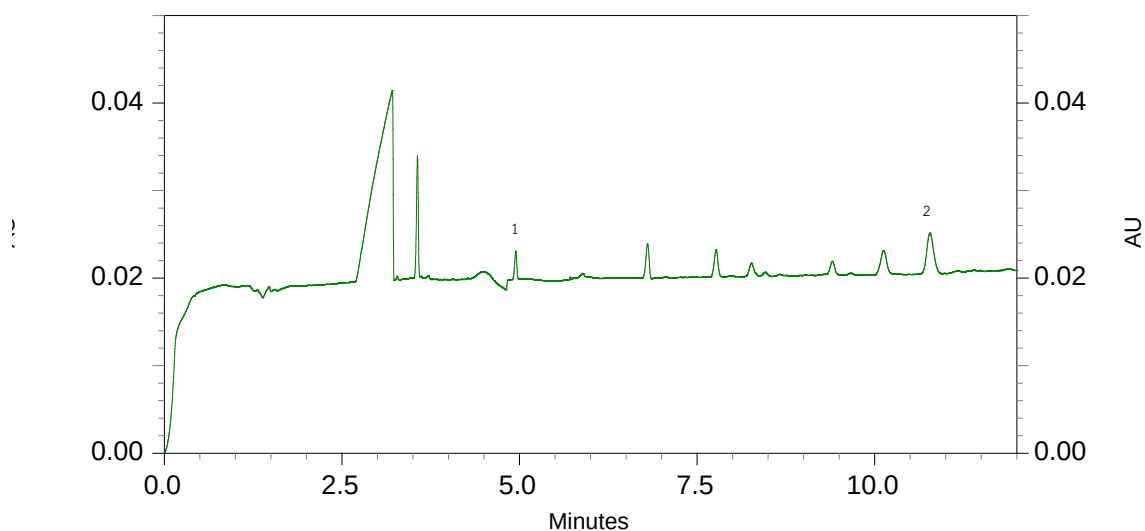
สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	%RSD (ค่าเฉลี่ยของ t_m)		%RSD (ค่าเฉลี่ยของ A_{corr})		%RSD (ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น)	
		10 วินาที	30 วินาที	10 วินาที	30 วินาที	10 วินาที	30 วินาที
ออกซาเลต	50	2.27	0.39	3.75	0.77	2.56	0.84
		(5.45)	(5.23)	(5514.84)	(17431.50)	(49.43)	(49.48)
ซิเตรต	100	3.27	2.06	2.88	1.09	3.93	4.48
		(13.77)	(11.68)	(5746.83)	(17396.45)	(104.95)	(102.66)

ตารางที่ 12 ความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะด้วยเทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเท่ากับ 10 วินาที (จำนวนการวิเคราะห์ n=10)

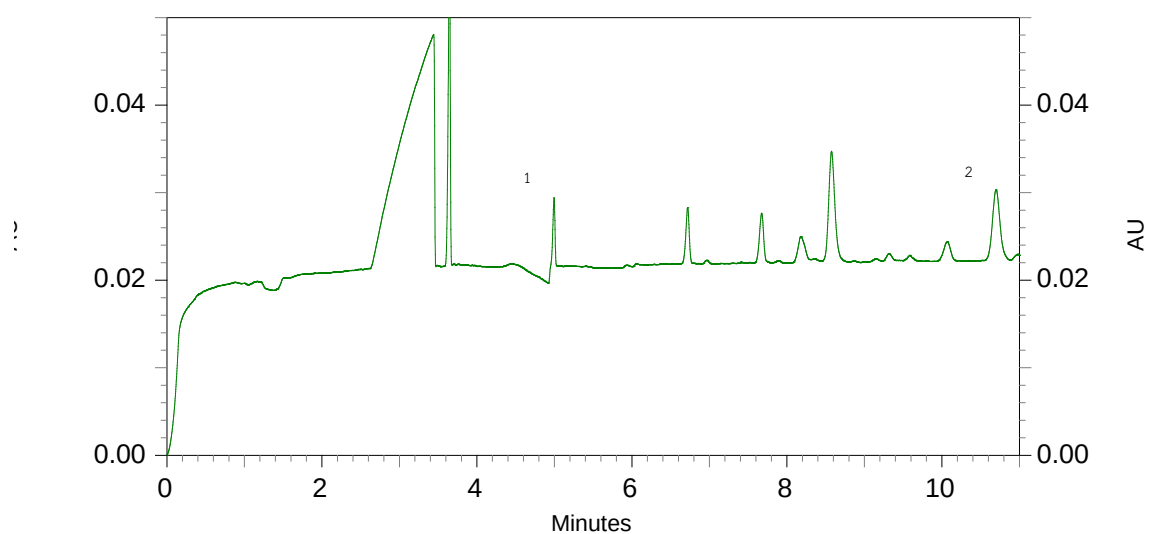
สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่ เติม (ppm)	ค่า	วันที่			%RSD	%RSD (ค่าเฉลี่ยของ ความเข้มข้น)
			1	2	3		
ออกซาเลต	50	t_m	5.48	5.56	5.43	1.45	4.86
		A_{corr}	6060.25	5770.20	5734.80	4.86	(49.88)
ซิเตรต	100	t_m	12.53	12.67	12.43	4.54	4.35
		A_{corr}	5929.30	5949.72	6037.64	4.35	(102.98)

4.3.5 การประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นในการหาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะและการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Enzymatic method)

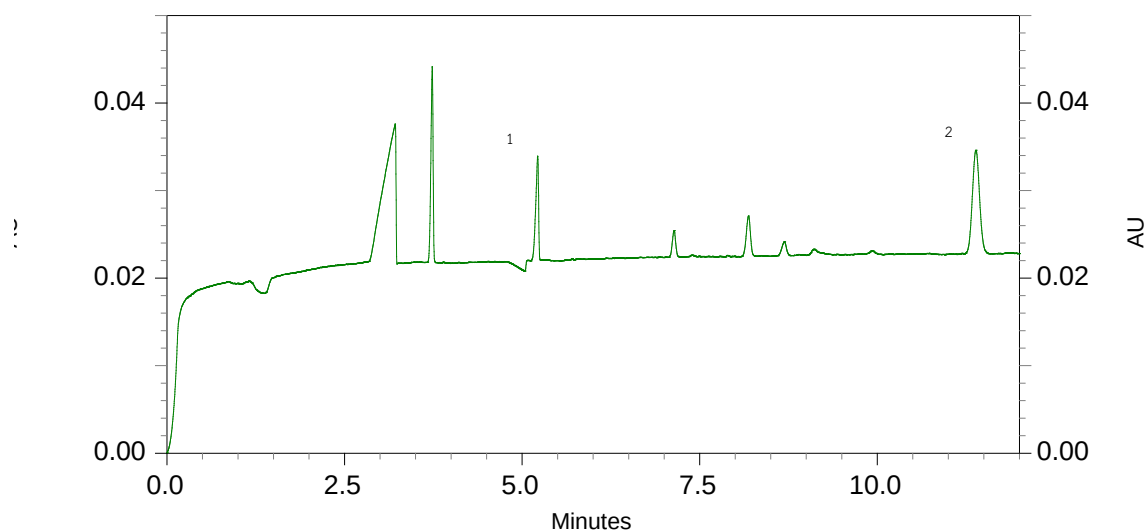
เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความน่าเชื่อถือเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับ จึงทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์โดยการหาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตด้วยวิธีทั้งสอง กล่าวคือเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยเทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้นและอีกเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยใช้วิธีมาตรฐานโดยใช้ชุดทดสอบ การทดสอบทั้งสองวิธีจะใช้ตัวอย่างปัสสาวะตัวอย่างเดียวกัน สารละลายมาตรฐานที่เตรียมในชุดเดียวกัน ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน เพื่อเป็นการลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการวิเคราะห์ ปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีความเข้มข้นแบ่งเป็น 3 ระดับ กล่าวคือ ช่วงความเข้มข้นของออกซาเลตในปัสสาวะของคนปกติคือ 1-20 ppm ซึ่งเป็นการตรวจเพื่อยืนยันว่าอุปกรณ์และเครื่องมือรวมถึงสภาวะที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดปริมาณสารในปริมาณน้อย ๆ ได้อย่างถูกต้อง ช่วงถัดมาคือ 20-40 ppm และช่วงความเข้มข้นของออกซาเลตที่มากกว่า 40 ppm ซึ่งเป็นช่วงปริมาณออกซาเลตที่พบในปัสสาวะของคนป่วยโรคนี้ไต [4] สำหรับปริมาณของซิเตรตในคนปกติส่วนใหญ่ความเข้มข้นของซิเตรตในปัสสาวะจะมากกว่า 200 ppm และในผู้ป่วยปริมาณของซิเตรตโดยเฉลี่ยจะมากกว่า 100 ppm [5] จึงไม่มีปัญหาในการตรวจวัดซิเตรต ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงแบ่งสารตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มตามความเข้มข้นของออกซาเลต จากนั้นนำสารตัวอย่างทั้งหมดไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบออกซาเลตและซิเตรตตามวิธีทดลองในหัวข้อ 3.6.2 และ 3.6.3



รูปที่ 111 อิเล็กโทรโฟโแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นต่ำ (11.81 และ 44.97 ppm ตามลำดับ) สภาวะของ CE ที่ใช้คือบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีและสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 12 อิเล็กโทรโฟโแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นระดับกลาง (30.58 และ 240 ppm ตามลำดับ) สภาวะของ CE ที่ใช้คือบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีและสภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 13 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในปัสสาวะที่ความเข้มข้นสูง (108.19 และ 315.57 ppm ตามลำดับ) สภาวะของ CE ที่ใช้คือบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีและสภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 10

เมื่อได้ผลการทดลองโดยใช้เอนไซม์แล้ว จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจวัด ออกซาเลตโดยใช้เทคนิค CE จากวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น นำผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกัน กล่าวคือเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยเทคนิค CE ใช้สภาวะ CE ที่พัฒนาขึ้นและอีกเซตหนึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยใช้วิธีมาตรฐาน จากนั้นเปรียบเทียบผลของทั้งสองวิธีโดยการทดสอบแบบที (the student test, t) ผลการเปรียบเทียบแสดงในตาราง 13 พบว่าเมื่อคำนวณค่า t ของออกซาเลตและซิเตรตได้เท่ากับ 0.32 และ 1.43 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีทั้งสองที่ระดับชั้นความเสรีเท่ากับ 40 (จำนวนวิเคราะห์ $n = 41$) ค่า t ที่ขีดความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 2.00 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า t ที่คำนวณได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี [6]

นอกจากนี้ในรูปที่ 14 ยังสามารถยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้นว่ามีความถูกต้อง กล่าวคือการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ดีมากกับวิธีมาตรฐาน โดยมี intraclass correlation coefficient สำหรับออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 0.977 และ 0.970 ตามลำดับ (ตามเกณฑ์ค่า intraclass correlation coefficient อยู่ในช่วง 0.81-0.98 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

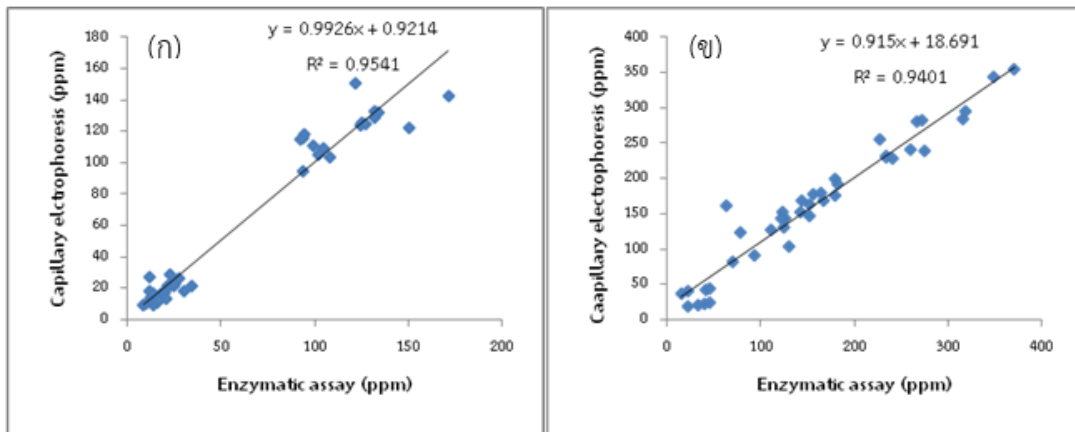
ตารางที่ 13 ความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตที่วิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิค CE ตามสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการใช้การบรรจุสารตัวอย่างที่ 10 วินาทีกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic method)ⁿ (จำนวนวิเคราะห์ n=41)

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

ตารางที่ 13 ผลของความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรตโดยเทคนิค CE ตามสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการบรรจุสารตัวอย่างที่ 10 วินาทีกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic assay)ⁿ (จำนวนวิเคราะห์ n=41) (ต่อ)

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

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



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซาเลต (ก) และซิเตรต (ข) ที่ตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิค CE ที่ได้พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic method) โดยมี intraclass correlation coefficient สำหรับออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 0.977 และ 0.970

นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบการหาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตโดยเทคนิค CE ที่ใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 10 วินาทีเปรียบเทียบกับ 30 วินาที ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณ ของออกซาเลตและซิเตรตได้เท่ากับ 0.42 และ 2.13 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีทั้งสองที่ระดับชั้นความเสรีเท่ากับ 9 (จำนวนวิเคราะห์ $n = 10$) ค่า t ค่า t ที่จำกัดความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 2.26 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า t ที่คำนวณ [6] ซึ่งแสดงว่าผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือ สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 14 ปริมาณของออกซาเลตและซีเทรตที่วิเคราะห์ได้โดยเทคนิค CE ตามสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการบรรจุสารตัวอย่างที่ 30 วินาทีกับวิธีมาตรฐาน (enzymatic assay)ⁿ (จำนวนวิเคราะห์ n=10)

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

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

5. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการแยกออกซาเลตและซีเทรตด้วยเทคนิค CE โดยเริ่มต้นจากการหาพีเอชและความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลตและซีเทรต พบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 200 mM pH 8.0 และใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกเท่ากับ -15 kV ร่วมกับสภาวะอื่น ๆ ของ CE คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 μ m ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่มีความยาวคลื่น 195 nm ผลการทดลองจากการใช้สภาวะดังกล่าวในการแยกออกซาเลตและซีเทรตพบว่าอิเล็กโตรโฟโแกรมของออกซาเลตและซีเทรตแยกจากพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ ได้อย่างสมบูรณ์ กล่าวคือมีค่าการแยก (R_s) สำหรับออกซาเลตและซีเทรตเท่ากับ 2.80 และ 5.46 ตามลำดับ

ขั้นตอนต่อมาทำการศึกษาการหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ของออกซาเลตและซีเทรตเพื่อสามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในปริมาณต่ำ ๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ด้วยวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในคิลลารีโดยใช้การบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดัน ร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ออกจากกระบอกโดยใช้ EOF โดยศึกษาระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างและความดันที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่างพบว่า ที่ความดัน 0.5 psi เป็นความดันที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุสารตัวอย่าง เพราะหากเพิ่มความดันมากกว่า 0.5 พีคของออกซาเลตและซีเทรตจะมีลักษณะกว้างเป็นผลเนื่องมาจากความดันที่มากเกินไปในการบรรจุสารตัวอย่างทำให้เกิดการกระจายของพีคสาร

ตัวอย่างจึงทำให้พีคมีความกว้างและสูญเสียการแยก และเมื่อใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นทำให้พีคของออกซาเลตและซิเทรตสูงขึ้น อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการบรรจุสารตัวอย่างที่ 30 วินาทีก็เพียงพอสำหรับการตรวจวัดออกซาเลตและซิเทรตปริมาณต่ำ ๆ ถ้าใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่างมากกว่า 30 วินาทีจะสามารถเพิ่มความสูงของพีคออกซาเลตและซิเทรตได้ดียิ่งขึ้น แต่พบว่าพีคของเมทริกซ์อื่น ๆ อาจเข้ามาอยู่ใกล้กับพีคของออกซาเลตและซิเทรตมากเกินไปและอาจบดบังพีคของสารทั้งสองได้ ด้วยเหตุนี้การบรรจุสารตัวอย่างเวลา 30 วินาทีก็เพียงพอที่จะวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเทรตในระดับต่ำได้อย่างถูกต้อง และให้ค่าการแยกสำหรับออกซาเลตและซิเทรตเท่ากับ 2.49 และ 1.65 ตามลำดับ แต่ถ้ามีปริมาณออกซาเลตและซิเทรตไม่ต่ำจนเกินไป (≥ 20 ppm) การบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติที่เวลา 10 วินาทีก็เพียงพอที่จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างถูกต้อง

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมทั้งการแยกออกซาเลตและซิเทรตและการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ด้วยวิธีการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดันร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ออกจากระบบโดยใช้ EOF กล่าวคือ สภาวะที่เหมาะสมของ CE คือความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 200 mM pH 8.0 โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกเท่ากับ -15 kV ร่วมกับสภาวะอื่น ๆ ของ CE คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 μ m ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีสำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตปานกลางถึงสูง (≥ 20 ppm) และใช้ระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่าง 30 วินาทีสำหรับตัวอย่างปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเทรตต่ำ ๆ (≤ 20 ppm) และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 195 nm จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นพบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเป็นเวลา 90 วินาทีได้ค่า LOD สำหรับออกซาเลตและซิเทรตเท่ากับ 0.003 และ 0.013 ตามลำดับ และค่า LOQ สำหรับออกซาเลตและซิเทรตเท่ากับ 0.013 และ 0.033 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการบรรจุสารตัวอย่างตามระยะเวลาปกติ (10 วินาที) พบว่าสามารถเพิ่มความสูงของพีคออกซาเลตและซิเทรตได้ถึงประมาณ 200 เท่า นอกจากนี้ผลการทดลองทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีที่พัฒนาขึ้นภายในวันเดียวกัน (ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ) และระหว่างวันเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน (ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ) ผลการทดสอบพบว่าความแม่นยำภายในวันเดียวกันของการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะเมื่อใช้การบรรจุสารตัวอย่างแบบปกติ (10 วินาที) พบว่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-108% สำหรับออกซาเลตและ 103-106% สำหรับซิเทรต และการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมาก (30 วินาที) พบว่าร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 98.95% สำหรับออกซาเลตและ 102.66% สำหรับซิเทรต ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

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

การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการหาปริมาณออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะและการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานที่ใช้กันในปัจจุบัน (enzymatic method) พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลตที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0-20 ppm 20-40 และมากกว่า 40 ppm ในตัวอย่างปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ และให้ผลการตรวจวัดปริมาณเป็นที่น่าพอใจ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับค่าการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตและซิเทรตที่ได้จากวิธีมาตรฐานโดยใช้เอนไซม์ พบว่าผลการทดลองที่ได้จากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้เมื่อนำผลการทดลองจากทั้งสองวิธีมาสร้างเป็นกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ พบว่าค่า intraclass correlation coefficient สำหรับออกซาเลตและซิเตรตเท่ากับ 0.977 และ 0.970 ตามลำดับ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์ตามเกณฑ์ที่ดีมากเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน

กล่าวโดยสรุปการศึกษาวិธีการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์ (on-line preconcentration) และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลนั้น พบว่าวิธีเพิ่มความเข้มข้นโดยการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากและกำจัดเมทริกซ์ออกโดยใช้ EOF สามารถช่วยให้วิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตมีความถูกต้องน่าเชื่อถือมากขึ้น และการวิเคราะห์ด้วย CE นั้นสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เหมาะที่จะใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตเพื่อประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยโรคนี้ไว้ได้ และสามารถหาทางป้องกันการเกิดโรคนี้อย่างมีประสิทธิภาพ

6. เอกสารอ้างอิง

- 6.1 He, Y. and Lee, H.K. Large-volume sample stacking in acidic buffer for analysis of small organic and inorganic anions by capillary electrophoresis. Analytical chemistry 71(5) (1999): 995-1001.
- 6.2 Robertson, W.G., Peacock, M., Marshall, R.W., Marshall, D.H., and Nordin, B.C. Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. New England Journal of Medicine 294(5) (1976): 249-252.
- 6.3 Siener, R., Ebert, D., Nicolay, C., and Hesse, A. Dietary risk factors for hyperoxaluria in calcium oxalate stone formers. Kidney international 63(3) (2003): 1037-1043.
- 6.4 Holmes, R.P., Goodman, H.O., Hart, L.J., and Assimos, D.G. Relationship of protein intake to urinary oxalate and glycolate excretion. Kidney international 44 (1993): 366-366.
- 6.5 Hassan Khaskhali, M., Iqbal Bhangar, M., and Khand, F.D. Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 675(1) (1996): 147-151.
- 6.6 Taverniers, I., De Loose, M., and Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. TrAC Trends in Analytical Chemistry 23(8) (2004): 535-552.

7. Output

- 7.1 Proceeding ในหัวข้อ “On-Line Preconcentration and Determination of Oxalate and Citrate Using Capillary Electrophoresis” ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 40 (The 40th Congress on Science and Technology of Thailand, STT 40), December 2–4, 2014 at Hotel Pullman Khon Kane Raja Orchid, Khon Kane, Thailand.
- 7.2 Manuscript จะดำเนินการเผยแพร่ผลงานวิจัยเพื่อจะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติต่อไป

8. ภาคผนวก

Proceeding ในหัวข้อ On-Line Preconcentration and Determination of Oxalate and Citrate Using Capillary Electrophoresis ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 40

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

Kanittha Konhan¹, Thumnoon Nhujak², Monpichar Srisa-Art^{2,*}

¹Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

*e-mail: monpichar.s@chula.ac.th

(Leave a blank line between e-mail and abstract.)

Abstract: In this work, online preconcentration and determination of oxalate and citrate using capillary electrophoresis (CE) was presented. A preconcentration technique exploiting large volume sample stacking using an electro-osmotic flow (EOF) pump was employed to improve the sensitivity of the CE method. The migration of analytes was achieved using an uncoated fused silica capillary column of 40.2 cm (30 cm to detector) × 50 μm i.d. and an applied voltage of -15 kV. A background electrolyte (BGE) was 200 mM phosphate buffer (pH 8.0) with injection times of 10-90 seconds. Results showed that when using an injection time of 90 s, limit of detections (LODs) were 0.003 ppm and 0.013 ppm and limit of quantifications (LOQs) were 0.013 ppm and 0.033 ppm for oxalate and citrate, respectively. Recoveries of the method were in the range of 98.51-108.37% with the relative standard deviation (%RSD) values < 3.94% for peak area and <4.29% for migration time (t_m). Interday precisions evaluated using %RSD were found to be less than 3.33% for both peak area and migration time. This CE approach has been successfully applied for quantitative analysis of oxalate and citrate in human urine samples with high accuracy and precision.

(Leave a blank line between sections.)

Introduction: Kidney stone is a disease which is found in all age-groups and the number of patients increases steadily. This disease is a longstanding medical illness and affects a common public health problem of the general population worldwide.¹ Super saturation of urinary promoters (such as calcium, oxalate, phosphate and uric acid) is considered as the risk factor of renal stone formation. On the other hand, decreasing in urinal stone inhibitors (such as citrate, potassium and magnesium) is also a critical risk. People with low levels of urinary citrate are more risky to encounter the renal stone disease because calcium oxalate can form easily in the absence of citrate. Therefore, measurement of urinary oxalate and citrate are crucial for diagnosis, protection and inhibition of the kidney stone disease. Analytical methods for determining urinary oxalate and citrate are normally enzymatic method, high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). Since the enzymatic method is comparatively expensive and the HPLC method requires a complicated sample preparation step, these techniques are not suitable for daily use.

Capillary electrophoresis (CE) is a promising technique for analysis of oxalate and citrate in human urine. Advantages of CE are easy to use, short analysis time, sufficient sensitivity and low cost. However, CE analysis encounters a low sensitivity problem associated with low UV absorption of oxalate and citrate.^{2,3} Therefore, it is interested in developing a preconcentration method which increases the concentrations of oxalate and citrate prior to CE analysis. In this work, an on-line preconcentration method employing large-volume sample stacking using an electro-osmotic flow (EOF) pump was exploited for determination of oxalate and citrate. This preconcentration technique employed long injection time using hydrodynamic injection. Once a separation voltage was applied, the EOF immediately removed matrix from the sample zone and simultaneously preconcentrated the sample plug.⁴ This simple and effective preconcentration method enhanced the efficiency of CE analysis for determination of oxalate and citrate at low concentrations. Finally, this CE approach was applied for quantitative determination of oxalate and citrate in urine samples.

(Leave a blank line between sections.)

Methodology: *Chemicals and reagents:* A background electrolyte (BGE) consists of potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) which were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol, phosphoric acid and hydrochloric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and sodium hydroxide was purchased from Labscan Asia (Thailand) Co, LTD.

CE Conditions: All CE experiments were performed on an MDQ Beckman CE instrument (Beckman Coulter, Inc., CA). The temperature was maintained at 25 °C and the following conditions were used for CE analysis; voltage of -15 kV, injection time of 10-90 s, an uncoated fused silica capillary column (50 μm i.d. $\times$ 40.2 cm (30 cm to detector)) and UV detection at 195 nm. Prior to analysis for each day, the capillary was rinsed with 0.1 M phosphoric acid for 15 min followed by the running buffer for 15 min. Between each injection, the capillary was rinsed with 0.1 M phosphoric acid and the running buffer for 3 min. The capillary was rinsed with 0.1M phosphoric acid for 20 min and water for 20 min after use at the end of the day.

Solution Preparations: Oxalate and citrate stock standard solutions at a concentration of 1,000 ppm were prepared in Milli-Q water. Five concentrations of working standard solutions including 5, 20, 50, 80 and 100 ppm of oxalate and 10, 50, 100, 300 and 500 ppm of citrate were prepared by diluting the stock solutions with Milli-Q water. Urine samples were diluted and filtered through filter discs with a pore size of 0.2 μm before CE analysis.

Optimization of CE condition: Phosphate buffer solutions at the concentration range of 40-200 mM prepared from KH_2PO_4 and Na_2HPO_4 were used to optimize CE separation of oxalate and citrate. Effects of pH (6.0-8.0) and injection time (10-90s) were also studied.

Validation of the Method:

LOD and LOQ: Various levels of diluted concentration of oxalate and citrate were prepared and the ratios of signal-to-noise (S/N) were determined in order to find limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of the method for determination of oxalate and citrate. LOD and LOQ concentrations were obtained from the S/N equal to 3 and 10 times, respectively. The dynamic ranges were studied using concentrations in the ranges of 5-100 ppm and 10-500 ppm for oxalate and citrate, respectively.

Accuracy and precision: Accuracy and precision of the method for quantitative analysis were assessed by spiking three levels of oxalate (50 ppm) and citrate (100 ppm) in a real urine sample. Intraday precision was evaluated from 10 repetitive runs while interday precision was determined from three consecutive days with 10 repetitive runs for each day.

Application to real samples: Urine samples of patients with renal stone were 2-fold diluted and then quantitatively determined using the optimized CE conditions. Concentrations of oxalate and citrate were calculated from the equations of calibration curves.

(Leave a blank line between sections.)

Results and Discussion: *Optimization of CE conditions:*

Effect of BGE concentrations: Phosphate was used as a preliminary buffer for separation of oxalate and citrate. The concentrations of phosphate buffer were prepared at 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 and 200 mM. When increasing concentration of phosphate buffer, results showed that retention times of oxalate and citrate were decreased, as show in **Figure 1**. This was due to the fact that the EOF of the system was reduced, resulting in faster migration of oxalate and citrate anions.

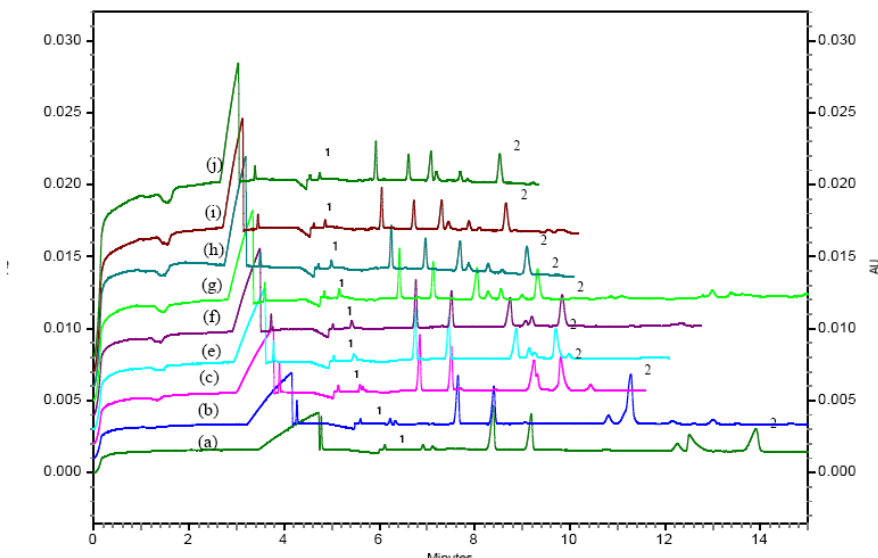


Figure 1. Effect of phosphate buffer concentration on separation of oxalate and citrate in a urine sample. The buffer concentration was (a) 40, (b) 60, (c) 80, (d) 100, (e) 120, (f) 140, (g) 160, (h) 180 and (i) 200 mM. Peak 1 is oxalate and peak 2 is citrate. CE conditions: uncoated fused silica capillary 50 μm i.d. $\times$ 40.2 cm (30 cm to detector), temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, voltage -15 kV, 0.5 psi pressure injection for 10 s and UV detection at 195 nm.

It was found that oxalate and citrate can be separated completely from the matrix when using the buffer concentration of 160 mM (**Figure 1(g)**) onwards. However, 200 mM of phosphate buffer (**Figure 1(j)**) was selected in this work because clearly separated and far apart peaks of oxalate, citrate and matrix were obtained at this buffer concentration (200 mM).

Effect of pH: pH is one of the most critical parameters which alters the selectivity between solutes in a CE separation. Since one of the pK_a values of phosphate is 7.2, oxalate ($\text{pK}_a = 1.27$ and 4.28) and citrate ($\text{pK}_a = 3.13$, 4.28 and 4.76) become negatively charged in the pH range of 6.2–8.2. Accordingly, the pH of buffer determines the extent of ionization of each analyte. Effect of pH on separation of oxalate and citrate is shown in **Figure 2**. At the pH range of 6.0–7.5, oxalate and citrate were appeared in overlapped peaks with the matrix (**Figures 2(a)–(d)**). When increasing pH up to 8.0, better resolution among peaks of matrix, oxalate and citrate was obtained. Thus, pH 8.0 was selected as the optimum pH for determination of oxalate and citrate in this work. In addition, the results showed that when increasing pH, longer migration time of oxalate and citrate were observed. This is because higher pH resulted in stronger EOF, which retarded the movement of oxalate and citrate. These separations were achieved using an applied voltage of -15 kV. However, it was found that lower applied voltages did not improve the resolution of this system.

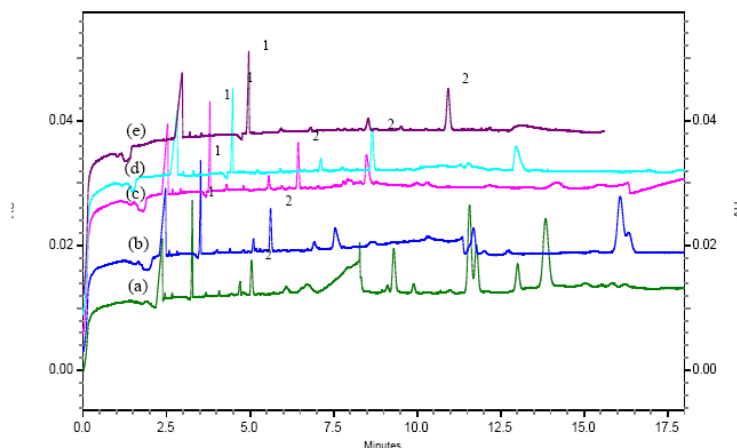


Figure 2. Effect of pH on separation of oxalate and citrate. The phosphate buffer at a concentration of 200 mM was adjusted to pH (a) 6.0, (b) 6.5, (c) 7.0, (d) 7.5 and (e) 8.0. Peak 1 is oxalate and peak 2 is citrate. Other CE conditions are shown in Figure 1.

To study effect of injection time on the preconcentration method, large volume sample injection was performed to increase the concentration of the analytes. **Figure 3** shows a comparison between electropherograms of oxalate and citrate under a normal injection (10 s) (**Figure 3** (a)) and a large volume sample injection (50 s) (**Figure 3** (b)). As seen in **Figure 3**, the 50-s injection time enhanced the peak heights of both oxalate and citrate approximately 50 times. Therefore, this preconcentration method effectively preconcentrated the sample zones, thus improving the sensitivity of the CE analysis. An injection time of 30 s was selected in this work because longer injection time led to shorter analysis time, resulting in high possibility to obtain incomplete separation among peaks of analytes and matrix. Compared with the normal 10-s injection time, the higher sensitivity of approximately 2 times for detecting oxalate and citrate was obtained when using an injection time of 30 s.

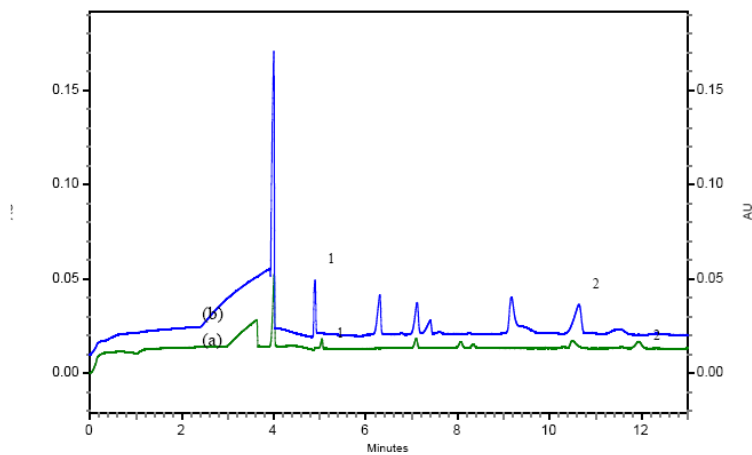


Figure 3. Effect of injection time on separation of oxalate and citrate in a urine sample. (a) normal injection time (10 s) and (b) large volume injection (50 s). The separation was performed using 200 mM phosphate buffer (pH 8.0). Other CE conditions are shown in Figure 1.

Validation of the Method: As shown in **Table 1**, increasing in injection time improved LOD and LOQ effectively. Compared with the normal 10-s injection time, significantly higher sensitivity of approximately 200 times for detecting oxalate and citrate was obtained with the 90-s injection time. LODs of oxalate and citrate obtained in the developed technique when using 90-s injection time were found to be as low as to 0.003 ppm and 0.013 ppm, respectively.

Table 1. Limit of detection and limit of quantitation.

injection time (s)	Oxalate		Citrate	
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
10	0.657	3.285	2.628	6.571
20	0.526	1.314	1.971	5.257
30	0.329	0.657	1.314	3.943
40	0.197	0.329	0.657	2.628
50	0.131	0.197	0.329	1.314
60	0.066	0.131	0.033	0.657
70	0.033	0.066	0.007	0.329
80	0.007	0.033	0.033	0.066
90	0.003	0.013	0.013	0.033

Calibration curves were constructed from concentration levels of mixed standards of oxalate and citrate. Each concentration was determined for 3 repetitive runs and then the concentration was plotted as a function of corrected peak area (A_{corr}), which is the ratio of peak area and migration time (t_m). From the calibration plots in Figure 4, the values of slope, intercept and correlation coefficient (R^2) are summarized in **Table 2**. Good linear relationships were obtained with R^2 values equal to 0.9987 and 0.9997 for oxalate and citrate, respectively.

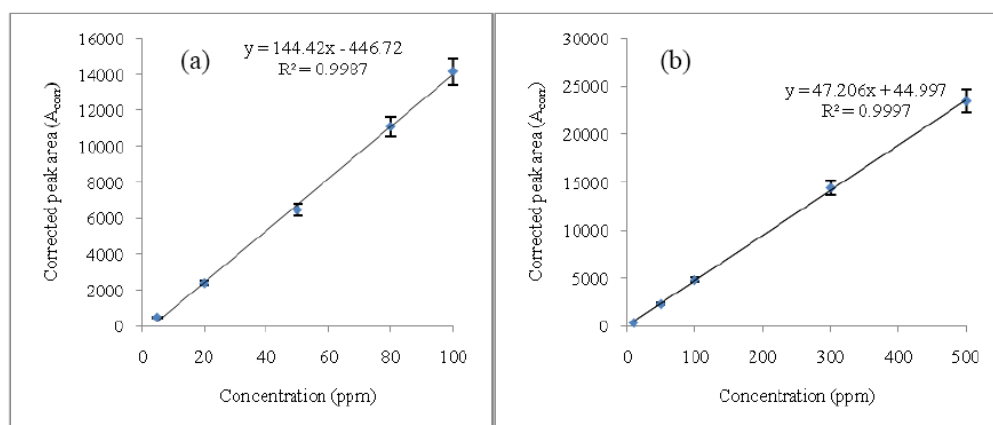


Figure 4. Calibration curves of oxalate (a) and citrate (b). CE conditions: 200 mM phosphate buffer (pH 8.0), uncoated fused silica capillary 50 μm i.d. $\times$ 40.2 cm (30 cm to detector), temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, voltage -15 kV, injection time 10 s and UV detection at 195 nm.

Table 2. Calibration curves of oxalate and citrate.

Analyte	Concentration range (ppm)	Linear equation		
		Slope	Intercept	R ²
oxalate	5-100	114.42	446.72	0.9987
citrate	10-500	47.206	44.997	0.9997

In this work, intraday and interday measurements were investigated at a concentration of 50 ppm for oxalate and 100 ppm for citrate. The intraday precision was obtained from 10 repetitive runs while the interday precision was determined from three consecutive days (10 runs/day). %RSD values of A_{corr} and t_m for intraday precision are shown in **Table 3**. High intraday precision was obtained with %RSD of <4.29% for migration time (t_m) and <3.94% for A_{corr} . The results obtained were excellent because values of %RSD were within the acceptable range.¹¹

Table 3. Intraday precision obtained from 10 repetitive runs (n=10).

Analyte	Added (ppm)	parameter	%RSD	
			10 s injection	30 s injection
oxalate	50	A_{corr}	2.56	0.39
		t_m	0.48	0.77
citrate	100	A_{corr}	3.94	2.06
		t_m	4.29	1.13

Table 4. Interday precision obtained from 3 consecutive day (n= 3).

Analyte	Added (ppm)	parameter	%RSD			
			Day 1	Day 2	Day 3	Overall
oxalate	50	A_{corr}	3.01	1.10	3.15	4.15
		t_m	1.66	0.33	0.47	1.45
citrate	100	A_{corr}	2.18	3.33	2.04	4.35
		t_m	2.62	2.35	2.22	4.55

The %RSD values of A_{corr} and t_m for oxalate and citrate for interday precision were shown in **Table 4**. Results show high interday precision because the %RSD was <2.62% for migration time (t_m) and <3.33% for A_{corr} , which are in the acceptable ranges.¹¹ This confirms high reliability of the method.

Accuracy refers to the closeness between a measured value and a true value. From **Table 5**, the obtained results were excellent because the percent recoveries ranged between 98-108% for oxalate and 103-106% for citrate, which were in the acceptable ranges of 80-110% for the concentration range of 0.1-10 ppm and 90-107% for the concentration range of 100 ppm.¹¹

Table 5. Recovery at three concentration levels of oxalate and citrate.

Analytes	Added (ppm)	Recoveries (%) ($\pm$ SD)
Oxalate	5	108.37 $\pm$ 2.53
	50	98.86 $\pm$ 2.53
	80	98.51 $\pm$ 0.91
Citrate	10	103.57 $\pm$ 6.52
	100	104.95 $\pm$ 4.13
	300	106.29 $\pm$ 3.95

Application to Real Samples: The developed CE method was applied for analysis of oxalate and citrate in human urine. From **Table 6**, results show that the amounts of the oxalate and citrate were in the ranges of 92.08-171.06 ppm and 123.30-164.34 ppm, respectively. Moreover, these results show the analyzed samples herein are the urine samples of patients with renal stones because the concentrations of oxalate and citrate in normal human urine are approximately 40 ppm⁷ and more than 200 ppm⁸, respectively.

Table 6. The amounts of oxalate and citrate in real urine samples.

urine	concentration (ppm) ($\pm$ SD)	
	oxalate	citrate
1	171.06 $\pm$ 0.40	151.81 $\pm$ 6.39
2	121.65 $\pm$ 0.10	164.34 $\pm$ 0.91
3	132.11 $\pm$ 0.77	111.50 $\pm$ 0.99
4	92.08 $\pm$ 0.51	167.32 $\pm$ 1.20
5	150.61 $\pm$ 0.45	123.30 $\pm$ 1.16
6	126.79 $\pm$ 1.12	151.70 $\pm$ 1.46
7	133.97 $\pm$ 0.08	122.17 $\pm$ 1.56

(Leave a blank line before and after Tables.)

Conclusion: In this work, a CE analysis with a simple and powerful preconcentration method by means of large volume sample stacking using an EOF pump for determination of oxalate and citrate in urine was reported. Increasing of injection time to 90 s leveled up the sensitivity of CE analysis by approximately 200 times compared to the normal injection time of 10 s, resulting in limits of detection for oxalate and citrate to be as low as 0.003 and 0.013 ppm, respectively. The CE method was successfully applied to determine the amounts of oxalate and citrate in human urine with high accuracy and precision.

(Leave a blank line between sections.)

References:

1. Tosukhowong, P., Boonla, C., Ratchanon, S., Tanthanuch, M., Poonpirome, K., Supataravanich, P., Dissayabutra, T. and Tungsanga, K. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand. *Asian Biomedicine*. 2007;1:87-95.
2. Suzuki, H., Nagata, M., Ohzono, S. and Fujimoto, C. Determination of oxalate in human serum in the nM range by on-column sample preconcentration-capillary zone electrophoresis with direct absorbance detection. *Chromatographia*. 2005;61:333-337.
3. Garcia, A., Muros, M. and Barbas, C. Measurement of nephrolithiasis urinary markers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 2001;75:287-295.

4. He, Y. and Lee, H. Large-volume sample stacking in acidic buffer for analysis of small and inorganic anion by capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1999;71:995-1001.
5. Muñoz, J., Lopez-Mesas, M. and Valiente, M. Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis. *Talanta*. 2010;81:392-397.
6. Hiirakawa, T., Yoshioka, M., Okamoto, H., Timerbaev, A. and Blaschke, G. High-sensitivity capillary electrophoresis determination of inorganic anions in serum and urine using on-line preconcentration by transient isotachopheresis. *Journal of Chromatography B*. 2004;811:165-170.
7. Siener, R., Ebert, D., Nicolay, C., Hesse, A. Dietary risk factors for hyperoxaluria in calcium oxalate stone formers. *Kidney International*. 2003;63:1037-43.
8. Boonla, C., Thummaborworn, T., Tosukhowong, P. Urolithiasis in udon thani hospital: A rising prevalence of uric acid stone. *Chulalongkorn medical journal*. 2006; 50:77-90.
9. Holmes, R.P. Measurement of urinary oxalate and citrate by capillary electrophoresis and indirect ultraviolet absorbance. *Clinical Chemistry*. 1995;41:1297-1301.
10. Burgi, D.S. Large volume stacking of anion capillary electrophoresis using an electroosmotic flow modifier as a pump. *Analytical Chemistry*. 1993;65:3726-3729.
11. Taverniers, I., Loose, M.D. and Bockstaele, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory II. Analytical method validation and quality assurance. *Analytical Chemistry*. 2004;23:535-552.
12. Khaskhali, M., Bhanger, M. and Khand, F. Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1996;675:147-151.
13. Santamaria, J.R., Coll, R. and Fuentespina, E. Comparative study of two commercial enzymatic kit for determining oxalate concentration in urine. *Clinical Chemistry*. 1993;26:93-96.

(Leave a blank line between sections.)

Acknowledgements: The research was funded by the Thailand Research Fund (TRF: TRG5780174). Miss K. Konhan acknowledges the Graduate School of Chulalongkorn University for provision of a research assistant scholarship.