



การสังเคราะห์เอโซ-แทนนิน (Azo-tannin) เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์
สำหรับชุดตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน (Creatinine) แบบกระดาษ
ในการติดตามระยะของโรคไตเรื้อรัง (CKD) แบบไม่รุกรานจากน้ำลาย

The synthesis of azo-tannin to be used as an indicator for a paper-based method
to measure creatinine levels in monitoring the stages
of chronic kidney disease (CKD) non-invasively from saliva.

กิตติกวิน ยาใจ^{1*}, ทรงกิตติ พรหมณี¹, ปิตาศักดิ์ นามเหลา¹, ธนพัฒน์ ทับไรสง¹

¹โรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬารามราชวิทยาลัย มุกดาหาร, ตำบลบางทรายใหญ่, อำเภอเมือง, จังหวัดมุกดาหาร 49000, ประเทศไทย

*อีเมลล์: 05875@pccm.ac.th

บทคัดย่อ

โรคไตเรื้อรังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก โดยครีเอตินินได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับประเมินสมรรถภาพการทำงานของไต การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์ Azo-Tannin และพัฒนาเป็นชุดตรวจกระดาษสำหรับตรวจวัดครีเอตินินเชิงสีในน้ำลายสังเคราะห์ สาร Azo-Tannin ถูกสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา Azo coupling และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry และ FTIR ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของครีเอตินินในช่วง 0.1–10 mM กับการเปลี่ยนแปลงของสี ศึกษาความเข้มข้นของสาร Azo-Tannin ระยะเวลาในการเคลือบ และจำนวนรอบของการเคลือบ รวมทั้งประเมินผลเชิงปริมาณด้วยการวิเคราะห์ภาพในระบบ RGB ผ่านสมาร์ตโฟน วิเคราะห์ผลด้วย Two-way ANOVA ผลการศึกษาพบว่า สาร Azo-Tannin ที่สังเคราะห์ได้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 410 นาโนเมตร และให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของครีเอตินิน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9913 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมชุดตรวจกระดาษ คือ การใช้สาร Azo-Tannin ความเข้มข้น 1 mg/L แช่กระดาษเป็นเวลา 30 นาที และเคลือบ 2 รอบ ซึ่งให้ความแม่นยำของสีที่ดี ($RSD < 5\%$) ชุดตรวจกระดาษสามารถตรวจวัดครีเอตินินในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษาได้ โดยให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นของค่าความเข้มสีในระบบ RGB ($R^2 = 0.9724$) และให้ผลการตรวจวัดที่เสถียรภายใน 5 นาที ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าช่วงเวลาการวัดและสูตรของชุดตรวจกระดาษมีผลต่อค่าความเข้มสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ชุดตรวจกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีความเรียบง่าย ต้นทุนต่ำ และไม่รุกรานร่างกาย สามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับสมาร์ตโฟนเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ จึงมีศักยภาพสำหรับการตรวจคัดกรองการทำงานของไตเบื้องต้น และสามารถต่อยอดสู่การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัด ณ จุดดูแลผู้ป่วย และการเฝ้าระวังสุขภาพในระดับชุมชนได้ในอนาคต

คำสำคัญ: Azo-Tannin; ครีเอตินิน; ชุดตรวจกระดาษ; โรคไตเรื้อรัง; การตรวจแบบไม่รุกราน

1. บทนำ

โรคไตเรื้อรัง (Chronic Kidney Disease; CKD) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก โดยมี



ผู้ป่วยมากกว่า 850 ล้านคน หรือประมาณร้อยละ 10–13 ของประชากรโลก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และการเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ หากไม่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้น อาจนำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ต้องได้รับการฟอกไตหรือปลูกถ่ายไต ส่งผลผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตและภาระค่าใช้จ่ายด้านสาธารณสุขอย่างมาก (KDIGO, 2024; WHO, 2023)

ครีเอตินิน (Creatinine) เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้ประเมินสมรรถภาพการทำงานของไตอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของกล้ามเนื้อและถูกกำจัดออกจากร่างกายผ่านการกรองของไตเป็นหลัก จึงสะท้อนประสิทธิภาพการกรองของไตได้โดยตรงและใช้ในการคำนวณอัตราการกรองของไต (estimated Glomerular Filtration Rate; eGFR) เพื่อจำแนกระยะของโรคไตเรื้อรัง (Levey et al., 2020) อย่างไรก็ตาม วิธีตรวจวัดครีเอตินินในปัจจุบัน เช่น วิธี Jaffe หรือวิธีเอนไซม์ ยังคงต้องอาศัยการเก็บตัวอย่างเลือด เครื่องมือวิเคราะห์ราคาแพง และบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ ทำให้การติดตามผู้ป่วยอย่างต่อเนื่องยังมีข้อจำกัด โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีทรัพยากรจำกัด (Toora & Rajagopal, 2002; Krishnegowda et al., 2017)

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา น้ำลายได้รับความสนใจในฐานะตัวอย่างชีวภาพทางเลือก เนื่องจากเก็บตัวอย่างได้ง่าย ไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด และสามารถเก็บซ้ำได้บ่อยครั้ง งานวิจัยหลายฉบับรายงานว่าระดับครีเอตินินในน้ำลายมีความสัมพันธ์กับระดับครีเอตินินในเลือด จึงมีศักยภาพสำหรับการตรวจติดตามการทำงานของไตแบบไม่รุกราน (Pillai et al., 2023; Padwal et al., 2023; Adelaars et al., 2025) ขณะเดียวกัน อุปกรณ์วิเคราะห์แบบกระดาษ (Paper-

based Analytical Devices; PADs) ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point-of-Care Testing; POCT) เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ ใช้งานง่าย พกพาสะดวก และสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณร่วมกับสมาร์ทโฟนได้ (Cate et al., 2015)

แม้ว่าจะมีการพัฒนาเซนเซอร์ตรวจวัดครีเอตินินหลายรูปแบบ เช่น เซนเซอร์เชิงไฟฟ้าเคมี เซนเซอร์เรืองแสง และเซนเซอร์ที่ใช้วัสดุนาโน แต่ส่วนใหญ่ยังมีข้อจำกัดด้านต้นทุน ความซับซ้อนของกระบวนการผลิต หรือจำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทาง (Jadhav et al., 2024) ในทางกลับกัน สารประกอบเอโซ (Azo compounds) มีสมบัติการเปลี่ยนสีที่เด่นชัดจากโครงสร้างอิเล็กทรอนิกส์เฉพาะตัว ขณะที่กรดแกลลิก (Gallic acid) มีหมู่ฟีนอลหลายตำแหน่งซึ่งสามารถเกิดอันตรกิริยากับสารเป้าหมายได้ดี จึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารแสดงสี (chromogenic probe) สำหรับการตรวจวัดครีเอตินิน อย่างไรก็ตาม จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ยังมีรายงานการประยุกต์ใช้ Azo–Gallic Acid ร่วมกับชุดตรวจกระดาษเพื่อการตรวจวัดครีเอตินินในน้ำลายค่อนข้างจำกัด ซึ่งสะท้อนถึงช่องว่างขององค์ความรู้ที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติม

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์สาร Azo–Gallic Acid และพัฒนาเป็นชุดตรวจกระดาษสำหรับตรวจวัดครีเอตินินในน้ำลาย โดยศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร การตอบสนองเชิงสีต่อครีเอตินิน และประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจกระดาษในน้ำลายสังเคราะห์ ผลการศึกษาคาดว่าจะ เป็นแนวทางในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดครีเอตินินแบบไม่รุกรานที่มีต้นทุนต่ำ ใช้งานง่าย และเหมาะสมสำหรับการตรวจคัดกรอง ณ จุดดูแลผู้ป่วยและในระดับชุมชน

2. วิธีการดำเนินงาน

2.1 การสังเคราะห์ Azo-Tannin (Gallic-based)

2.1.1 สารเคมีและวัสดุ

กรดแกลลิก (Gallic acid), แทนนิน (Tannin), โซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2), แอนิลินไฮโดรคลอไรด์ (Aniline hydrochloride), กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และครีเอทีนีน (Creatinine) เกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

น้ำปราศจากไอออน (Deionized water; DI water) ถูกใช้ในการเตรียมสารละลายทั้งหมด

สารละลายครีเอทีนีนมาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mM สำหรับใช้ในการศึกษาการตอบสนองของสารแสดงสีและการสร้างกราฟมาตรฐาน

2.1.2 การสังเคราะห์ Azo-Tannin (Gallic-based) ปรับปรุงจากวิธีของ Masoud et al. (2012)

1) เตรียมสารละลายแอนิลินไฮโดรคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ $0-5^\circ\text{C}$

2) เติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) ลงในสารละลายแอนิลินไฮโดรคลอไรด์อย่างช้า ๆ ภายใต้การกวนต่อเนื่อง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Diazotization และสร้างสารประกอบ Diazonium salt

3) เติมสารละลายกรดแกลลิกและสารละลายแทนนินลงในสารละลาย Diazonium salt อย่างช้า ๆ ภายใต้การกวนต่อเนื่อง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Azo coupling จนเกิดสารประกอบ Azo-Tannin ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีส้มถึงสีน้ำตาลแดง

4) แยกผลิตภัณฑ์โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเย็น และทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจนได้สาร Azo-Tannin ในรูปของแข็ง

5) ตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงของสารโดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) เพื่อหาค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max})

6) วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

2.1.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเมื่อทำปฏิกิริยากับครีเอทีนีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมสารละลาย Azo-Tannin ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/L ผสมกับสารละลายครีเอทีนีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mM ในอัตราส่วนปริมาตรเท่ากัน ก่อนเติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรรวม 40 mL

สารละลายที่เตรียมได้ถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) ที่ค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max})

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของครีเอทีนีนด้วยการวิเคราะห์สมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression)

ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสาร Azo-Tannin เป็น 1 และ 5 mg/L ตามลำดับ เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารแสดงสีต่อประสิทธิภาพการตรวจวัด

2.2 การพัฒนาชุดตรวจกระดาษ

2.2.1 การเตรียมชุดตรวจแบบกระดาษ

กระดาษกรอง Whatman No.1 ถูกตัดเป็นแผ่นขนาด 2×5 cm และนำไปแช่ในสารละลาย Azo-Tannin ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 5 mg/L เป็นเวลา 15, 30 และ 60 นาที โดยทำการเคลือบจำนวน 1, 2 และ 3 รอบ



หลังการเคลือบ กระดาษถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และเก็บรักษาในซองออลูมิเนียมฟอยล์ที่ป้องกันแสงและความชื้นจนกว่าจะนำไปใช้งาน

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจกระดาษตรวจ

2.3.1 การตอบสนองเชิงสี

หยาตสารละลายครีเอทีนินมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 หยาตลงบนชุดตรวจกระดาษและบันทึกภาพภายใต้สภาวะแสงเดียวกัน

วิเคราะห์ค่าความเข้มสีในระบบ RGB โดยใช้แอปพลิเคชัน Colorimeter App บนสมาร์ตโฟน

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีและความเข้มข้นของครีเอทีนินด้วยสมการถดถอยเชิงเส้น

2.3.2 การศึกษาความไวในการตอบสนอง

บันทึกค่าความเข้มสีของชุดตรวจกระดาษทุก ๆ 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที หลังการหยาตสารละลายครีเอทีนิน และเปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนสีของชุดตรวจแต่ละสูตรเพื่อเลือกสูตรที่ให้การตอบสนองดีที่สุด

ความแตกต่างของค่าความเข้มสีระหว่างช่วงเวลาการวัด และระหว่างสูตรของชุดตรวจกระดาษวิเคราะห์ด้วย Two-way Analysis of Variance (Two-way ANOVA) ตามด้วย Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test สำหรับการเปรียบเทียบรายคู่ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ .05

2.3.3 การประเมินประสิทธิภาพในการตรวจวัดครีเอทีนินในน้ำลายสังเคราะห์

น้ำลายสังเคราะห์เตรียมโดยดัดแปลงจากสูตรมาตรฐานของ Fusayama-Meyer artificial saliva ซึ่งประกอบด้วยอิเล็กโทรไลต์และสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงน้ำลายมนุษย์ และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.8 ก่อนเติมสารละลายครีเอทีนินมาตรฐานให้มีความเข้มข้นตามที่กำหนด

ชุดตรวจกระดาษที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดถูก

นำมาทดสอบกับน้ำลายสังเคราะห์ที่เติมครีเอทีนิน จากนั้นเปรียบเทียบผลการตรวจวัดกับวิธีมาตรฐานด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)

การเปรียบเทียบผลการตรวจวัดระหว่างชุดตรวจกระดาษและวิธีมาตรฐานด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer วิเคราะห์ด้วย Paired sample t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05

3. ผลการทดลอง

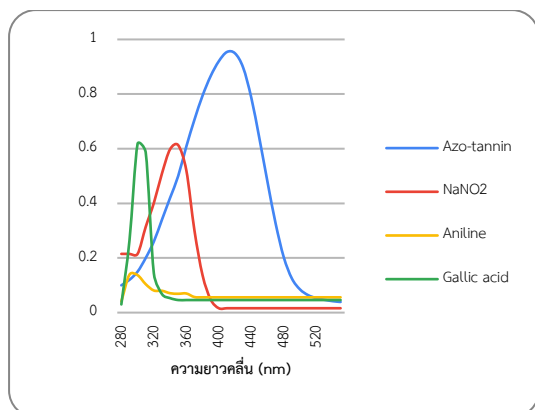
3.1 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร Azo-Tannin (Gallic-based)

สาร Azo-Tannin สามารถสังเคราะห์ได้สำเร็จจากปฏิกิริยา Azo coupling ระหว่างสารประกอบไดอะโซเนียมกับสารประกอบฟีนอลภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำ (0-5 °C) ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาพบว่าสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีส้ม และเปลี่ยนเป็น สีนํ้าตาลแดง เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์ (รูปที่ 1) หลังจากการกรองและทำให้แห้ง ได้ผลิตภัณฑ์ Azo-Tannin เป็นของแข็งสีนํ้าตาลแดง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิดสารประกอบเอโซที่มีระบบอิเล็กตรอนคอนจูเกตภายในโมเลกุล



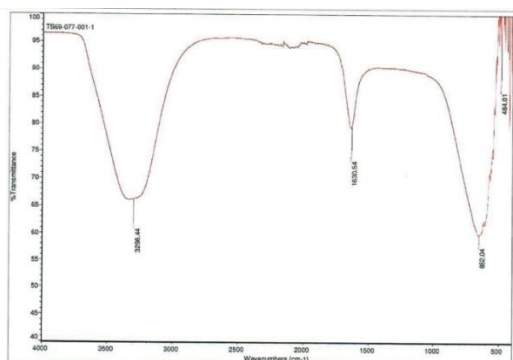
รูปที่ 1 สารละลายเกิดการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีส้ม และเปลี่ยนเป็น สีนํ้าตาลแดง

การศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer พบว่า สาร Azo-Tannin มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) เท่ากับ 410 nm (รูปที่ 2) ซึ่งอยู่ในช่วงแสงที่มองเห็นได้ สอดคล้องกับการเกิดหมู่โครโมฟอร์ (-N=N-) ที่ทำให้โมเลกุลสามารถดูดกลืนแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 2 การดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) (รูปที่ 3) พบแถบการดูดกลืนกว้างที่ 3288.44 cm^{-1} ซึ่งเป็นการสั่นแบบยืด (stretching vibration) ของหมู่ไฮดรอกซิล (O-H stretching) ของสารประกอบฟีนอลิก แถบที่ 1630.54 cm^{-1} สัมพันธ์กับการสั่นของพันธะคาร์บอน-คาร์บอนในวงแหวนอะโรมาติก (C=C stretching) และอาจเกิดการซ้อนทับกับการสั่นของพันธะ azo (--N=N--) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันสำคัญของสารประกอบเอโซ ขณะที่แถบการดูดกลืนที่ 652.04 cm^{-1} และ 484.01 cm^{-1} อยู่ในบริเวณ fingerprint region ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการสั่นภายในโครงสร้างอะโรมาติกและการแทนที่บนวงแหวนเบนซีน ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสนับสนุนการเกิดสารประกอบ Azo-Tannin ที่มีโครงสร้างสอดคล้องกับสารเป้าหมาย



รูปที่ 3 สาร Azo-tannin เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร Azo-Tannin กับครีเอทีนิน

เพื่อประเมินศักยภาพของสาร Azo-Tannin ในการใช้เป็นสารแสดงสีสำหรับตรวจวัดครีเอทีนิน ได้ศึกษาการตอบสนองของสารต่อสารละลายครีเอทีนิน มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mM โดยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) เท่ากับ 410 nm

ผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของครีเอทีนินเพิ่มขึ้น สีของสารละลาย Azo-tannin-buffer เปลี่ยนจากสีเขียว-สีเหลืองอ่อนเป็นสีส้มตามลำดับ (รูปที่ 4) แสดงให้เห็นว่าการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Azo-Tannin และครีเอทีนินส่งผลให้สมบัติการดูดกลืนแสงของสารเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า



(I) (II) (III) (IV) (V) (VI) (VII)

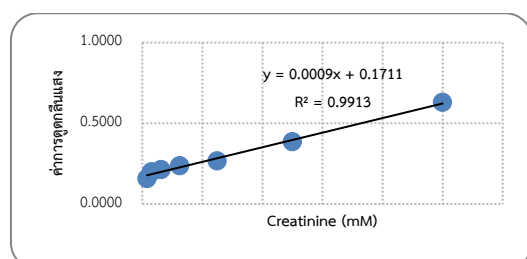
รูปที่ 4 สีของสารละลาย Azo-tannin-creatinine-buffer ที่ความเข้มข้นของสารละลายครีเอทีนิน เท่ากับ (I) 0.1 mM, (II) 0.5 mM, (III) 1 mM, (IV) 5 mM และ (V) 10 mM และ (VII) Azo-tannin-buffer

ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวัดที่ 410 nm มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของครีเอทีนินอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 1) เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของครีเอทีนิน พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดีภายในช่วง 0.1–10 mM โดยให้สมการถดถอยเชิงเส้น

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสาร Azo-Tannin เมื่อทำปฏิกิริยากับครีเอตินิน

ความเข้มข้น ครีเอตินิน (mM)	Absorbance (410 nm) (Mean $\pm$ SD, n = 3)
0.100	0.158 $\pm$ 0.003
0.500	0.200 $\pm$ 0.002
1.000	0.214 $\pm$ 0.003
5.000	0.238 $\pm$ 0.004
10.000	0.268 $\pm$ 0.003

ผลการวิเคราะห์ด้วย Linear Regression พบว่าสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของครีเอตินินมีค่า $R^2 = 0.9913$ ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดีมากของข้อมูลในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของครีเอตินิน

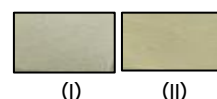
3.3 การพัฒนาชุดตรวจกระดาษ

เพื่อพัฒนาชุดตรวจกระดาษที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดครีเอตินิน ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงสาร Azo-Tannin บนกระดาษกรอง ได้แก่ ความเข้มข้นของสาร Azo-Tannin เวลาในการเคลือบ และจำนวนรอบของการเคลือบ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อปริมาณสารแสดงสีที่ติดบนพื้นผิวกระดาษ ความสม่ำเสมอของการกระจายตัวของสาร และประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อครีเอตินิน ผลการศึกษาถูกนำมาใช้ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมชุดตรวจกระดาษ จากการศึกษา

ปัจจัยทั้งสาม ได้แก่ ความเข้มข้นของสาร Azo-Tannin เวลาในการเคลือบ และจำนวนรอบของการเคลือบ พบว่า การใช้สาร Azo-Tannin ความเข้มข้น 1 mg/L แช่กระดาษเป็นเวลา 30 นาที และเคลือบจำนวน 2 รอบ ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด โดยให้ความเข้มข้นอยู่ในระดับเหมาะสม สามารถแยกความแตกต่างของสีหลังทำปฏิกิริยากับครีเอตินินได้ชัดเจน และให้ความแปรปรวนต่ำ ($RSD < 5\%$) จึงเลือกใช้สภาวะดังกล่าวในการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจกระดาษในขั้นตอนถัดไป

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจกระดาษ

ใช้ชุดตรวจกระดาษที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดมาทดสอบกับสารละลายครีเอตินินมาตรฐานในน้ำลายสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.1–10 mM ผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของครีเอตินินเพิ่มขึ้น สีของชุดตรวจกระดาษเปลี่ยนจากสีเขียว-เหลืองอ่อน-สีส้มอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 7) ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และแสดงถึงการตอบสนองของสาร Azo-Tannin ต่อครีเอตินินอย่างชัดเจน



รูปที่ 7 สีของกระดาษ (I) ก่อนทดสอบ และ (II) หลังทดสอบด้วยสารละลายครีเอตินินในน้ำลายสังเคราะห์

การวิเคราะห์ภาพดิจิทัลด้วยแอปพลิเคชัน Colorimeter ในระบบ RGB พบว่าค่าความเข้มสีเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของครีเอตินิน โดยเฉพาะค่าช่องสี Blue (B) ที่มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ขณะที่ค่าช่องสี Red (R) เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของครีเอตินินสูงขึ้น ส่งผลให้ค่าความแตกต่างของสี (ΔRGB) เพิ่มขึ้นตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความ

เข้มข้นของครีเอตินิน พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด R^2 เท่ากับ 0.9724 แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจกระดาษสามารถใช้ประมาณค่าความเข้มข้นของครีเอตินินเชิงปริมาณได้ภายในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา

นอกจากนี้ ได้ศึกษาระยะเวลาในการตอบสนองของชุดตรวจกระดาษโดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีทุก 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที พบว่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1–3 นาที ก่อนเข้าสู่ภาวะคงที่ที่ประมาณ 5 นาที จึงกำหนดเวลา 5 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการอ่านผลการตรวจวัด เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความเสถียรและสามารถทำซ้ำได้

ผลการวิเคราะห์ด้วย Two-way ANOVA พบว่าปัจจัยด้านช่วงเวลาการวัด ($F = 48.37, p < 0.05$) และสูตรของชุดตรวจกระดาษ ($F = 126.54, p < 0.05$) ส่งผลต่อค่าความเข้มสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างทั้งสองปัจจัย ($F = 7.82, p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มสีในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างกันตามสูตรของชุดตรวจกระดาษ การเปรียบเทียบรายคู่ด้วย Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test พบว่าชุดตรวจกระดาษสูตรที่เลือกมีค่าความเข้มสีแตกต่างจากสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. สรุปผล

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สาร Azo-Tannin (Gallic-based) และพัฒนาเป็นชุดตรวจกระดาษสำหรับตรวจวัดครีเอตินินแบบคัลเลอริเมตริก โดยผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis และ FTIR ยืนยันการเกิดสาร Azo-Tannin ที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดครีเอตินิน ทั้งนี้สาร Azo-Tannin และชุดตรวจกระดาษสามารถ

ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นครีเอตินินในช่วง 0.1–10 mM ได้อย่างมีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดี และสามารถประเมินผลได้จากกราฟวิเคราะห์ภาพในระบบ RGB ร่วมกับสมาร์ทโฟน

นอกจากนี้ ชุดตรวจกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดครีเอตินินในน้ำลายสังเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ใช้งานง่าย และมีต้นทุนต่ำ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Two-way ANOVA แสดงให้เห็นว่าช่วงเวลาการวัดและสูตรของชุดตรวจกระดาษมีผลต่อค่าความเข้มสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จึงแสดงให้เห็นว่าชุดตรวจกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือคัดกรองครีเอตินินเบื้องต้น และสามารถต่อยอดสู่การตรวจวัด ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point-of-Care Testing; POCT) ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการชี้แนะ ให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการวิเคราะห์ผล การตรวจทานเอกสารและการนำเสนอ ตลอดจนให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ จากคุณครูชนพัฒน์ ทับโธสง และคุณครูปิศาศักดิ์ นามเหลา ตลอดจนได้รับการเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่จากสาขาเคมี โรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬาราชมนตรีวิทยาลัย มุกดาหาร จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- Jadhav, R. B., Patil T. & Tiwari A. P. (2024). Trends in sensing of creatinine by electrochemical and optical biosensors. *Applied Surface Science Advances*, 19 (2024), 1-18.
- Krishnegowda, A., Padmarajaiah, N. , Anantharaman, S. & Honnor, K.(2017). Spectrophotometric assay of creatinine in human serum sample. *Arabian Journal of Chemistry*, 2013.
- Padwal, M. K., Momin, A. A., Diwan, A. & Phade, V. (2023). Efficacy of Salivary Creatinine and Urea and their Association with Serum Creatinine and Urea Levels in Severe Chronic Kidney Disease



Patients. *Indian Journal of Medical Biochemistry*,
26(1). 15-19

Toora, B. D. & Rajagopal G. et al. *Indian J Exp Biol*.
(2002). Measurement of creatinine by Jaffe's
reaction determination of concentration of sodium
hydroxide required for maximum color
development in standard, urine and protein free
filtrate of serum. *Indian J Exp Biol*, 2002