

12/0151/41

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิปปูริกในปัสสาวะโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี
Urinary hippuric acid quantitation by spectrophotometry

ชนิดา พลานุเวช

Abstract : Chanida Palanuvej. 1998. Urinary hippuric acid quantitation by spectrophotometry. Thai J Hlth Resch 12(2) : 75 - 88.

The analysis of hippuric acid in urine was performed by ethyl acetate extraction at pH 2 and spectrophotometric determination of the complex formed with acetic anhydride, p-(dimethylamino)benzaldehyde and pyridine. The color reaction was done at room temperature for 1 hour. The absorbance was measured within 30 minutes at 450 nm. The sensitivity of hippuric acid determination was 1 microgram per reaction tube and the linearity was to 20 microgram per reaction tube . The coefficient of variations were 3.93-5.50%. Urinary hippuric acid concentration,determined by this technique, among various population e.g. officials, garage workers, 3 paint manufacturing workers and glue sniffers were 0.31 ± 0.18 , 0.26 ± 0.18 , 0.38 ± 0.22 , 0.21 ± 0.15 , 0.42 ± 0.35 and 6.09 ± 9.58 gram per gram creatinine respectively.

Key words : hippuric acid, analysis, spectrophotometry, urine

บทคัดย่อ : ชนิดา พลานเวช. 2541. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 12 (2) : 75 - 88.

วิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะโดยสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทในสารละลายกรด (pH 2) นำกรดฮิพพิวริกมาทำปฏิกิริยาเกิดสีกับอะซีติคแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ และไพรีดีน ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 30 นาที ที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร วิธีนี้มีความไว 1 ไมโครกรัมต่อหลอดทดลอง วัดปริมาณกรดฮิพพิวริกได้สูงถึง 20 ไมโครกรัมต่อหลอดทดลอง มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนร้อยละ 3.93-5.50 เมื่อใช้วิธีนี้วิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะของประชากรกลุ่มต่างๆ พบว่า พนักงานสำนักงาน คณงานอู่ฟันสิรินธรณต์ คณงานโรงงานสี 3 โรงงาน และผู้เสพติดสารระเหย มีค่าเฉลี่ยของกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะเท่ากับ 0.31 ± 0.18 , 0.26 ± 0.18 , 0.38 ± 0.22 , 0.21 ± 0.15 , 0.42 ± 0.35 and 6.09 ± 9.58 กรัมต่อกรัมครีเอตินีน ตามลำดับ

คำสำคัญ : กรดฮิพพิวริก การวิเคราะห์ สเปคโตรโฟโตเมทรี ปัสสาวะ

บทนำ

กรดฮิพพิวริก (hippuric acid) เป็นสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยา conjugation ระหว่างไกลซีน (glycine) กับกรดเบนโซอิก (benzoic acid) โดยเอนไซม์ในตับ ร่างกายขับถ่ายกรดฮิพพิวริกออกมาในปัสสาวะปกติโดยทั่วไปอยู่แล้ว โดยเมตะบอลิซึมมาจากกรดเบนโซอิกและกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ในอาหาร (Yoshida *et al.*, 1978; Baelum, 1991) ในผู้ติดดมสารระเหยประเภทโทลูอีน (ทินเนอร์ แลคเกอร์ กาว) จะพบกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะสูงกว่าปกติมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากเมตะบอลิซึมของโทลูอีน โดยเอนไซม์ในตับจะเปลี่ยนโทลูอีนเป็น benzyl alcohol และกรดเบนโซอิกตามลำดับ แล้วรวมกับไกลซีนเป็นกรดฮิพพิวริกขับถ่ายออกมาในปัสสาวะ (Baelum, 1991) ความเข้มข้นของกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การได้รับสัมผัสโทลูอีนได้ ซึ่งนำมาสู่การประยุกต์ใช้ในงานอาชีวอนามัย โรงงานอุตสาหกรรมประเภทที่ต้องใช้โทลูอีนเป็นวัตถุดิบ เช่น โรงงานผลิตทินเนอร์ แลคเกอร์ โรงงานผลิตสี โรงพิมพ์ เป็นต้น คนงานที่ทำงานในโรงงานเหล่านี้มีโอกาสสัมผัสโทลูอีน การควบคุมสภาพแวดล้อมในโรงงานโดยการตรวจวัดปริมาณโทลูอีนในบรรยากาศทำให้เกินค่ากำหนดเป็นมาตรการหนึ่งในการเพิ่มความปลอดภัยในการทำงานของคนงาน (นิรนาม, 2520) มาตรการอีกประการหนึ่งคือการติดตามการได้รับสัมผัสโทลูอีนของคนงานโดยวัดระดับโทลูอีนในเลือดหรือระดับกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะซึ่งเป็นดัชนีชีวภาพ (biological exposure index) (IPCS, 1985) การศึกษาในคนทำงานภายใต้บรรยากาศที่มีโทลูอีน 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง พบค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะเมื่อสิ้นสุดการสัมผัสโทลูอีนประมาณ 2.5 กรัมต่อกรัมครีเอตินีน (Lauwerys and Buchet, 1988) ความเข้มข้นของกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะแสดงในรูปสัดส่วนของปริมาณกรดฮิพพิวริกต่อปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ เพราะโดยปกติร่างกายขับถ่ายครีเอตินีนออกมาในปัสสาวะเป็นปริมาณคงที่ในวันหนึ่งๆ (Varley *et al.*, 1980) และมีรายงานว่าสัดส่วนของปริมาณกรดฮิพพิวริกต่อปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ เป็นตัวแทนของปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะที่ไม่ได้เก็บในช่วงเวลาที่แน่นอนได้ (Kuo *et al.*, 1980 ; Dossing *et al.*, 1983)

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะมีหลายวิธี ได้แก่

1. แกสลิกวิดโครมาโตกราฟี (gas-liquid chromatography) โดยสกัดกรดฮิพพิวริกจากปัสสาวะแล้วเตรียมอนุพันธ์ของกรดฮิพพิวริกกับไดอะโซมีเทน (diazomethane) วิธีนี้ต้องทำด้วยความระมัดระวังเป็นพิเศษเพราะไดอะโซมีเทนเป็นสารที่ทำให้เกิดการระเบิดได้ง่าย (Yoshida *et al.*, 1978) การเตรียมอนุพันธ์อีกวิธีหนึ่งคือใช้เมทานอลแห้ง (dried methanol = max. 0.01 % H₂O) และกรดเกลือเข้มข้น วิธีนี้ปลอดภัยกว่าวิธีแรกและค่าใช้จ่ายถูกกว่า (de Carvalho *et al.*, 1991)

2. ลิกวิดโครมาโตกราฟี (high pressure liquid chromatography) วิธีนี้วิเคราะห์กรดฮิพพิวริกโดยตรง จึงเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แต่ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง (Yoshida *et al.*, 1978; Astier and Deutsch, 1980; Hansen and Dossing, 1982)

3. สเปคโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry) ให้กรดฮิพิวริกทำปฏิกิริยากับเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ (benzene sulfonyl chloride) (Tomokuni and Ogata, 1972) หรือ ไดเมทิล อะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (dimethylaminobenzaldehyde) (Ohmori *et al.*, 1977; Hirota *et al.*, 1981) แล้ววัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น วิธีนี้มีความไวสูง แม้ว่าความจำเพาะจะต่ำกว่าสองวิธีแรก แต่เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์น้อยกว่า (Ogata *et al.*, 1980; Ogata, 1981)

รายงานนี้แสดงให้เห็นถึงวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพิวริกในปัสสาวะโดยใช้เทคนิคสเปคโตรโฟโตเมทรี ซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีของ Ohmori และคณะ (1977) และวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ โดยทำปฏิกิริยากับกรดพิคริกในสารละลายต่าง (วิธี alkaline picrate)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

เคมีภัณฑ์

- Hippuric acid (AR grade, BDH, England)
- Benzoic acid (GR grade, E. Merck, Germany)
- Urea (Baker analyzed reagent, J.T. Baker, U.S.A.)
- Creatinine (Biochemical, BDH, England)
- 4-(Dimethyl-amino)benzaldehyde (AR grade, Sigma, U.S.A.)
- Acetic anhydride (กระทรวงสาธารณสุข)
- Pyridine (AR grade, Mallinckrodt, U.S.A.)
- Picric acid (saturated solution, Sigma, U.S.A.)
- Ethyl acetate (Special for chromatography, BDH, England)

เครื่องมือ

- Vortex-mixer (Thermolyne, U.S.A)
- Spectrophotometer (model Spectronic 20, Bausch & Lomb, U.S.A)
- Fume hood

วิธีการ

การศึกษาความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดฮิพิวริก

นำกรดฮิพิวริกมาทำปฏิกิริยาการเกิดสีตามวิธีของ Ohmori และคณะ (1977) โดยนำสารละลายกรดฮิพิวริก 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทิลอะซิเตท มา 50 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้ง เติมน้ำอะซิติกแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (0.5% ใน ไพรีดีน) 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อ่านค่า absorbance ของสารละลายที่ความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 380-540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ใช้สารละลายอะซิติกแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (0.5% ใน ไพรีดีน) 2 มิลลิลิตร เป็นสารละลาย blank

การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของกรดฮิฟพิวริก

นำสารละลายกรดฮิฟพิวริก 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทิลอะซีเตท มา 50 ไมโครลิตร ระบายให้แห้ง เติมอะซีติกแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (0.5% ใน ไพรดีน) 2 มิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) อ่านค่า absorbance ของสารละลายที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร หลังจากทำปฏิกิริยานาน 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที ใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลาย blank และสารละลายอะซีติกแอนไฮไดรด์และพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (0.5% ใน ไพรดีน) เป็น sample blank

การสกัดกรดฮิฟพิวริกจากปัสสาวะ

นำปัสสาวะและสารละลายกรดฮิฟพิวริกมาตรฐาน (เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำ) มาอย่างละ 25 ไมโครลิตร เติมกรดเกลือ (เข้มข้น 1 โมลต่อลิตร) 25 ไมโครลิตร และเอทิลอะซีเตท 250 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตามแนวตั้ง (vortex mixer) นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้น ดูดชั้นเอทิลอะซีเตท (ชั้นล่าง) มา 100 ไมโครลิตร ระบายให้แห้ง

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิฟพิวริก

นำกรดฮิฟพิวริกที่สกัดและระบายแห้งแล้วมาเติมอะซีติกแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (0.5% ใน ไพรดีน) 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง อ่านค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะโดยวิธีอัลคาไลน์พีเคเทท

นำปัสสาวะและสารละลายครีเอตินีนมาตรฐาน (เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำ) มาอย่างละ 25 ไมโครลิตร เติมน้ำ 3 มิลลิลิตร สารละลายกรดพิคริกอิมตัว 0.6 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (15 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร) 0.4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที อ่านค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบ linearity เพื่อดูปริมาณสารต่ำสุด-สูงสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ วัด % recovery เพื่อดูประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร วัดความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์เพื่อดูความแม่นยำของวิธี ทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีกับสารอื่น เช่น ยูเรียและกรดเบนโซอิก เพื่อดูความจำเพาะของปฏิกิริยา

ผล

สารประกอบเชิงซ้อนของกรดฮิฟพิวริกกับอะซีติกแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ และไพรดีน มีค่า absorbance สูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร (รูปที่ 1) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารละลายมีค่า absorbance สูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยานาน 30 นาที และค่า absorbance จะลดลงเรื่อยๆเมื่อทำปฏิกิริยานานขึ้น ส่วนที่อุณหภูมิห้องสารละลายมีค่า absorbance สูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยานาน 1 ชั่วโมง และคงที่เช่นนี้ประมาณ 30 นาทีจึงค่อยๆลดลง (รูปที่ 2)

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกโดยวิธีนี้จึงให้กรดฮิพพิวริกทำปฏิกิริยากับอะซีติกแอนไฮไดรด์ และพาราไดเมทิลอะมีโนเบนซาลดีไฮด์ (0.5% ใน โพรตีน) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง และวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (รูปที่ 3)

วิธีนี้มี linearity ของการวัดปริมาณกรดฮิพพิวริก 1-20 ไมโครกรัมต่อหลอดทดลอง (รูปที่ 4) การสกัดกรดฮิพพิวริกจากปัสสาวะมี % recovery เท่ากับ 101.4-116.7 % (ตารางที่ 1) และการวิเคราะห์มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 3.93-5.50 (ตารางที่ 2) วิธีนี้ไม่ให้สีกับยูเรียและกรดเบนโซอิกปริมาณ 100 ไมโครกรัม

เมื่อนำวิธีนี้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะของประชากรกลุ่มต่างๆ คือพนักงานสำนักงาน คนงานอุ้งพันสีรถยนต์ คนงานโรงงานผลิตสี และผู้เสพติดสารระเหย ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ความถูกต้องของการวัดปริมาณกรดฮิพพิวริกที่สกัดจากปัสสาวะ

| ปริมาณกรดฮิพพิวริกที่เติม ในปัสสาวะ 0.1 มิลลิลิตร (ไมโครกรัม) | ปริมาณกรดฮิพพิวริกที่วัดได้ ในปัสสาวะ 0.1 มิลลิลิตร (ไมโครกรัม) | n | % Recovery |
|---|---|---|------------|
| - | 52.5 | 2 | - |
| 10 | 63.4 | 2 | 101.4 |
| 50 | 112.5 | 2 | 109.8 |
| 100 | 178.0 | 2 | 116.7 |

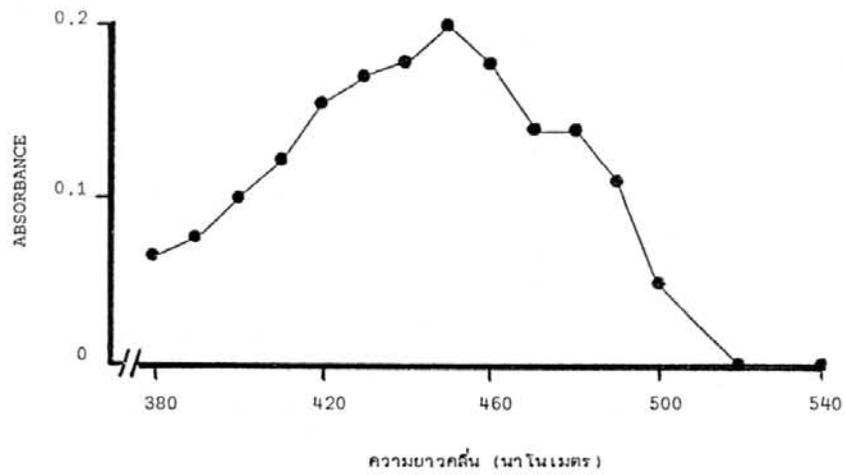
ตารางที่ 2 ความแม่นยำของการวัดปริมาณกรดฮิพพิวริก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี

| การทดลองเดียวกัน | | | ระหว่างการทดลอง | | |
|------------------|----|------|-----------------|----|------|
| X ± S.D. | n | %CV | X ± S.D. | n | %CV |
| 1.65 ± 0.07 | 10 | 4.24 | 1.64 ± 0.07 | 10 | 4.27 |
| 3.69 ± 0.18 | 10 | 4.88 | 3.28 ± 0.17 | 10 | 5.18 |
| 7.13 ± 0.28 | 10 | 3.93 | 6.72 ± 0.37 | 10 | 5.50 |

ตารางที่ 3 ระดับกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะประชากรกลุ่มต่าง ๆ (กรัมต่อกรัมครีเอตินีน)
วิเคราะห์โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี

| กลุ่มประชากร | n | X ± S.D. | min.-max. |
|----------------------|-----|-------------|------------|
| พนักงานสำนักงาน | 17 | 0.31 ± 0.18 | 0.11-0.71 |
| คนงานอุ้งพันสิรถยนต์ | 63 | 0.26 ± 0.18 | 0.04-0.98 |
| คนงานโรงงานสีที่ 1 | 58 | 0.38 ± 0.22 | 0.08-1.07 |
| คนงานโรงงานสีที่ 2 | 191 | 0.21 ± 0.15 | 0.03-1.13 |
| คนงานโรงงานสีที่ 3 | 218 | 0.42 ± 0.35 | 0.05-2.12 |
| ผู้เสพติดสารระเหย | 231 | 6.09 ± 9.58 | 0.08-53.91 |

รูปที่ 1 การดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดฮิพพิวริก



วิธีทำ กรดฮิพพิวริกมาตรฐาน 5 ไมโครกรัม

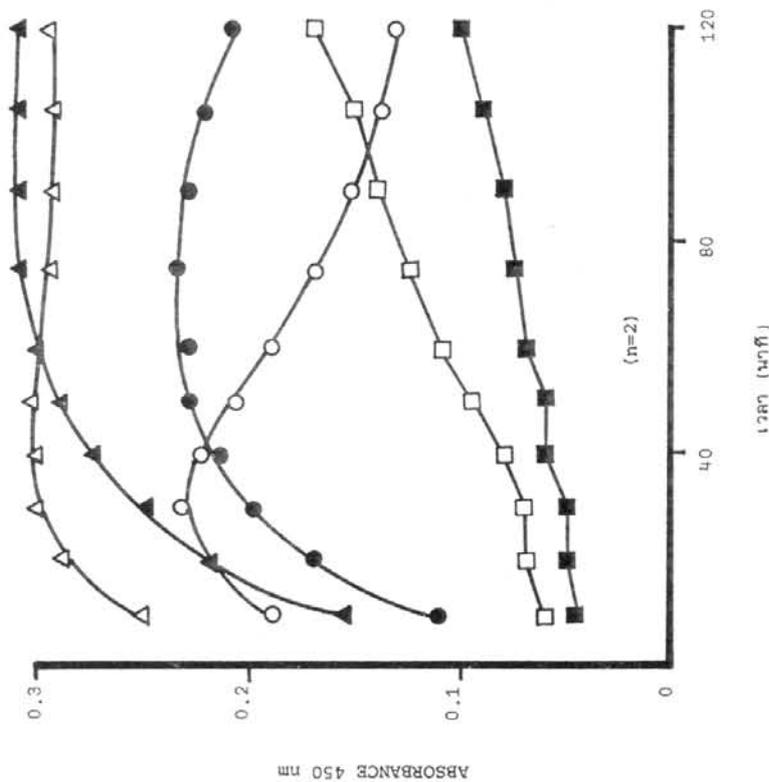
เติมอะซิติกแอนไฮไดรต์ 1 มิลลิลิตร และ พาราโตเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์

0.5% ในโพรพิลีน 2 มิลลิลิตร ที่งัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

อ่านค่า Absorbance ของสารละลายโดยใช้สารละลายอะซิติกแอนไฮไดรต์

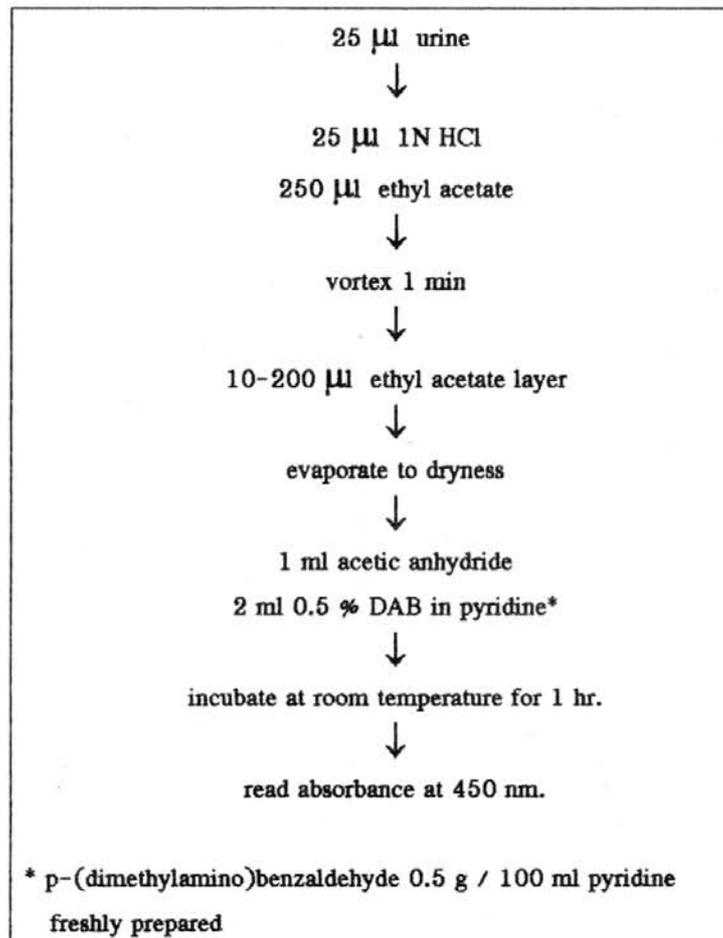
พาราโตเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์และโพรพิลีนเป็น blank

รูปที่ 2 อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอินทรีย์

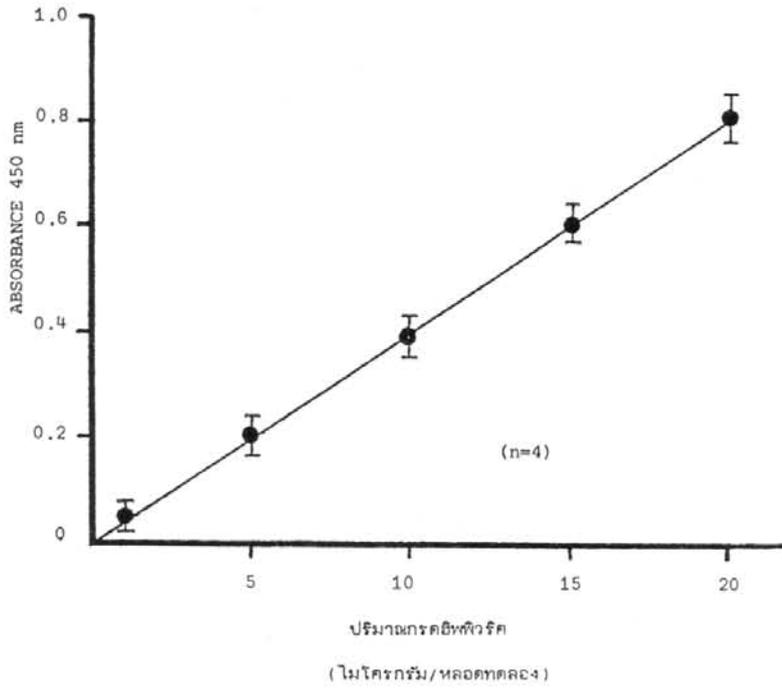


2574 กรดอินทรีย์มาตรฐาน 5 ไมโครกรัม เติมอะซีติกแอนไฮไดรต์ 1 มิลลิลิตร และพาราโตเมทิลอะมิโนเบนซอิลไฮโดรเจน 0.5% ในโพธิ์ 2 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่างๆกัน อ่านค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank เปรียบเทียบกับสารละลายอะซีติกแอนไฮไดรต์ พาราโตเมทิลอะมิโนเบนซอิลไฮโดรเจนที่ทำการทดลองในสภาวะเดียวกัน

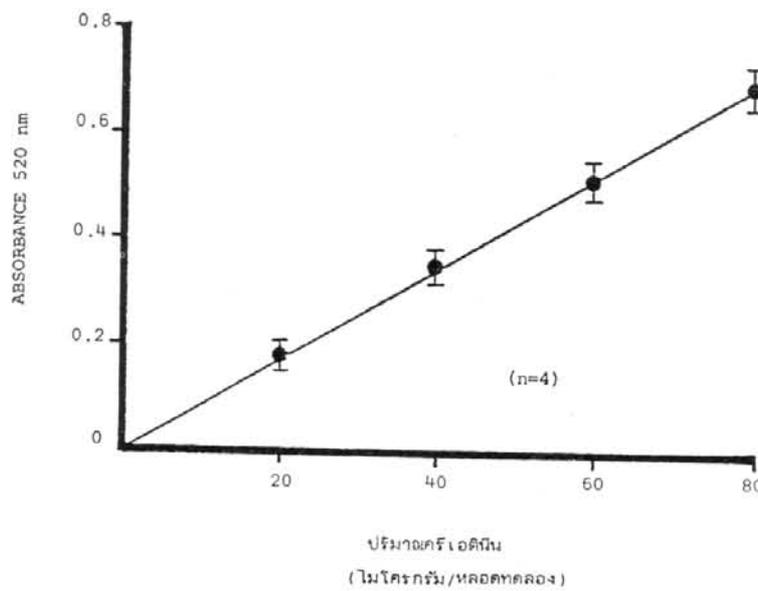
รูปที่ 3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพิวริกในปัสสาวะ



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของกรดฮิพพิวริก



รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของครีเอตินีน



วิจารณ์

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยให้กรดฮิพพิวริกทำปฏิกิริยากับอะซีติกแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ และไพรีดีน ได้สารละลายสีเหลือง มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เพราะการทำปฏิกิริยาที่สภาวะนี้ให้ความเข้มข้นของสีสูงสุดและคงที่อยู่ประมาณ 30 นาที จึงค่อย ๆ ลดลง ขณะที่การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นสีสูงสุดเมื่อใช้เวลา 30 นาที และลดลงเรื่อย ๆ

การสกัดกรดฮิพพิวริกจากปัสสาวะโดยวิธีของ Ohmori และคณะ (1977) คือปรับ pH ของปัสสาวะให้เป็นกรด (pH=2) เติมเกลือแกง (NaCl) จนอิ่มตัวแล้วสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท การทำให้ปัสสาวะอิ่มตัวด้วย NaCl เป็นการเพิ่มอัตราการสกัดกรดฮิพพิวริกออกจากปัสสาวะ (Tomokuni and Ogata, 1972) วิธีการใช้ปัสสาวะตั้งต้น 100 ไมโครลิตร เติม 1N HCl 60 ไมโครลิตร NaCl 0.02 กรัม สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท 1 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 วินาที

ผู้วิจัยลดปริมาตรปัสสาวะเป็น 25 ไมโครลิตร เท่ากับที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ กริเอตินีน เพื่อความสะดวกในการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดพร้อม ๆ กัน และไม่ต้องเติม NaCl แต่เพิ่มเวลาในการสกัดเป็น 1 นาที ทำให้วิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกได้สะดวกรวดเร็วขึ้นและประหยัดการใช้เอทิลอะซีเตทลงด้วย

การวิเคราะห์กรดฮิพพิวริกโดยวิธีนี้สามารถวัดปริมาณกรดฮิพพิวริกได้ตั้งแต่ 1-20 ไมโครกรัม ต่อหลอดทดลอง และมีความแม่นยำและความถูกต้องดี วิธีนี้ไม่เกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับยูเรียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนในปัสสาวะ หรือเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดเบนโซอิกซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดฮิพพิวริกในร่างกาย แต่ข้อจำกัดของการวัดปริมาณกรดฮิพพิวริกด้วยวิธีนี้คือ มีความจำเพาะต่ำกว่าวิธี HPLC และวิธี GC ตัวอย่างเช่นกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ซึ่งเป็นเมตะบอลไลท์ของกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ก็สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำยาวิเคราะห์นี้ได้สารประกอบเชิงซ้อนซึ่งให้สีเช่นเดียวกับกรดฮิพพิวริก (Ogata et al., 1980) แต่โดยปกติแล้วจะไม่พบกรดซาลิไซลิกในปัสสาวะ นอกจากร่างกายได้รับอาหารหรือยาบางชนิดที่มีกรดซาลิไซลิกประกอบอยู่ เช่น สารอนอมอาหาร หรือยาแอสไพริน เป็นต้น (Tomokuni and Ogata, 1972 ; Yoshida et al., 1978) นอกจากนี้กรดเมทิลฮิพพิวริก (methylhippuric acid) ซึ่งเป็นเมตะบอลไลท์ของไซลีน (xylene) ก็ทำปฏิกิริยาเกิดสีเช่นเดียวกันกับกรดฮิพพิวริกด้วย (Lauwerys and Buchet, 1988) มีรายงานว่าปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะคนงานซึ่งต้องทำงานสัมผัสโทลูอีน (time-weight average concentration = 40-100 ppm) ที่วิเคราะห์โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี ให้ค่าสูงกว่าการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และ GC ประมาณ 1.2 เท่า และวิธี HPLC และ GC ให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน (Baelum, 1991)

อย่างไรก็ดีรายงานนี้ก็แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีการวัดสีที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดฮิพพิวริกกับอะซีติกแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ และไพรีดีนนี้ วัดปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะประชากรกลุ่มต่าง ๆ เพื่อดูการได้รับสัมผัสโทลูอีนได้ เช่นกลุ่มผู้เสพติดสารระเหย กลุ่มคนงานโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น (สุนทร และคณะ, 2540 ; วิไล และคณะ, 2540)

วิธีนี้ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงเช่น HPLC หรือ GC ใช้เพียงเครื่อง Spectronic 20 ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการทางเคมีวิเคราะห์เท่านั้น แต่สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ อะซีติกแอนไฮไดรด์ เป็นสารควบคุมต้องขออนุญาตครอบครองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และไพริดีนเป็นสารระเหยซึ่งมีกลิ่นเหม็นและระคายเคืองต่อเยื่อผิวหนัง จึงต้องทำการวิเคราะห์และวัดความเข้มข้นของสีในตู้ดูดควัน (fume hood)

วิธีนี้นับเป็นทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริกในปัสสาวะ สำหรับห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือและบุคลากรสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC หรือ GC ซึ่งเป็นเทคนิควิเคราะห์ที่ต้องใช้ความชำนาญและค่าใช้จ่ายสูงกว่า

เอกสารอ้างอิง

- นิรนาม. 2520. ประกาศกระทรวงมหาดไทย. เรื่อง ความปลอดภัยในการทำงานเกี่ยวกับภาวะแวดล้อม (สารเคมี) ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 94 ตอนที่ 64 วันที่ 12 กรกฎาคม 2520.
- วิไล ชินเวชกิจวานิชย์,สุนทร ศุภพงษ์,ชนิดา พลาอนุเวช,วินัส อุดมประเสริฐกุล,อนุสรณ์ รังสิโยธิน, สมชาย อิศระวานิชย์ และวราพรธม ด้านอุตรา. 2540. ความชุกของการได้รับโทลูอีนเข้าสู่ร่างกายของคณงานโรงงานผลิตสี. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 11(2) : 97-119.
- สุนทร ศุภพงษ์,วิไล ชินเวชกิจวานิชย์,วินัส อุดมประเสริฐกุล,วราพรธม ด้านอุตรา และปริดา ทศนประดิษฐ์. 2540. การศึกษาผลของโทลูอีนต่อสุขภาพของคณงานในโรงงานผลิตสีและพ่นสีรถยนต์. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 11(1) : 25-41.
- Astier A.,and Deutsch AM.1980.High-performance liquid chromatographic determination of hippuric acid in human urine. J Chromatogr 182 : 88-93.
- Baelum J. 1991. Human solvent exposure : Factors influencing the pharmacokinetics and acute toxicity. Pharmacol Toxicol 68 Suppl 1 : 1-36.
- de Carvalho D., Lanchote VL., Bonato PS., Queiroz RHC., Santos AC., and Dreossi SAC. 1991. A new derivatization procedure for the analysis of hippuric acid and *m*-methyl-hippuric acid by gas chromatography. Int Arch Occup Environ Health 63 : 33-37.
- Døssing M., Baelum J., Hansen SH., Lundgvist GR., and Anderson NT. 1983. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to toluene. Br J Ind Med 40 : 470-473.
- Hansen SH., and Døssing M. 1982. Determination of urinary hippuric acid and *o*-cresol, as indices of toluene exposure, by liquid chromatography on dynamically modified silica. J Chromatogr 229 : 141-148.

- Hirota K., Ikeda M., Kawase M., and Ohmori S. 1981. Identification of a chromogen in the assay of hippuric acid with acetic anhydride, pyridine and 4-(dimethylamino) benzaldehyde. *Anal Chem* 53 : 2087-2090.
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. 1985. Environment and Health Criteria 52 : Toluene. World Health Organization, Geneva.
- Kuo TL., Fong JM., and How SW. 1980. Urinary excretion of hippuric acid as a biological parameter of exposure to toluene. *J Formosan Med Assoc* 79 : 686-693.
- Lauwerys R., and Buchet JP. 1988. Biological monitoring of exposure to benzene, toluene and xylene. *IARC Sci Publ* 42(85) : 205-222.
- Ogata M. 1981. Quantitative determination of urinary metabolites in subjects exposed to organic solvents. *Acta Med Okayama* 35 : 385-394.
- Ogata M., Kira S., Shimada Y., Ohsaki H., Sugihara R., and Fujii T. 1980. Comparison of several methods for the measurement of urinary hippuric acid as an index of toluene exposure. *Acta Med Okayama* 34 : 361-366.
- Ohmori S., Ikeda M., Kira S., and Ogata M. 1977. Colorimetric determination of hippuric acid in urine and liver homogenate. *Anal Chem* 49 : 1494-1496.
- Tomokuni K., and Ogata M. 1972. Direct colorimetric determination of hippuric acid in urine. *Clin Chem* 18 : 349-351.
- Varley H., Gowenlock AH., and Bell M. 1980. in *Practical Clinical Biochemistry Vol.1 General Topics and Commoner Tests* 5th ed., pp. 478-484. William Heinemann Medical Books Limited.
- Yoshida Y., Harada A., Kono K., Toyota S., Watanabe M., and Shibuya Y. 1978. Gas and liquid chromatographic determination of urinary hippuric acid as an index of toluene exposure. *Bulletin of the Osaka Medical School* 24 : 68-78.