Thesis MU 71

Contact "Library Services" : info@dss.go.th

CONTENTS

Page

ACKNOWLEDGEMENT iii

ABSTRACT (in English) iv

ABSTRACT (in Thai) v

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xiii

LIST OF ABBREVIATIONS xvi

CHAPTER I LITERATURE SURVEY AND SCOPE OF THIS THESIS 1

1.1 THE IMPORTANT OF OXALTE DETERMINATION 1

1.2 ANALYTICAL METHOD FOR OXALATE 2

1.2.1 Enzymatic Method 2

1.2.2 Gas Chromatography 3

1.3 ANALYSIS OF OXALTE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY 4

1.3.1 Ion-interaction Chromatography 5

1.3.2 Ion Chromatography 6

1.3.2.1 Non-suppressed system 7

1.3.2.2 Suppressed system 8

1.4 AIM AND SCOPE OF THIS THESIS 16

CHAPTER II EXPERIMENTAL 17

2.1 INTRODUCTION 17

2.2 INSTRUMENTATION 17

2.2.1 Ion Chromatography 17

2.2.2 Sample preconcentration system 19

2.3 CHEMICALS AND REAGENTS 19

2.3.1 Solvents 19

		Page
	2.3.2 Chemicals	21
2.4	**PREPARATION OF SOLUTIONS**	22
	2.4.1 Optimal mobile phase	22
	2.4.2 Standard solutions	22
2.5	**SAMPLE PREPARATION**	22
	2.5.1 Urine sample	22
	2.5.2 Plasma sample	24
	2.5.2.1 Preparation of cation-exchange resin	24
	2.5.2.2 Preparation of silver cation-exchange resin	24
	2.5.2.3 Deproteinization of plasma with Amicon membrane	24
	2.5.2.4 Deproteinization of plasma with acetronitrile	25
CHAPTER III	**ION CHROMATOGRAPHY**	28
3.1	**INTRODUCTION**	28
3.2	**EXPERIMENTAL**	29
	3.2.1 Instrumentation	29
	3.2.2 Chemicals and reagents	29
3.3	**RESULTS AND DISCUSSION**	29
	Effect of sodium carbonate / bicarbonate on retention behavior	29
	3.3.2 Optimum condition for Ion chromatography	32
	3.3.3 Effect of PO_4^{3-} and SO_4^{2-} on oxalate analysis	34
	3.3.4 Effect of HCl interference concentration	35
	3.3.5 Calibration curve and detection limit	37
3.4	**APPLICATION TO URINE SAMPLES**	38
	3.4.1 Evaluation of determination of oxalate in urine	38
	3.4.2 Development of sample clean up process for urine analysis	40
3.5	**PRELIMINARY STUDIES OF PLASMA OXALATE DETERMINATION**	42
3.6	**CONCLUSION**	42

Page

CHAPTER IV PRECONCENTRATION OF OXALATE BY COLUMN SWITCHING TECHNIQUE 45

4.1 INTRODUCTION 45
4.2 EXPERIMENTAL 46
4.2.1 Instrumentation 46
4.2.1.1 Sample preconcentration system 46
4.2.1.2 Centrifuge 47
4.2.1.3 pH meter 47
4.2.2 Chemicals 47
4.2.2.1 Mobile phase 47
4.2.2.2 Working standard 47
4.2.2.3 Boric acid solution 47
4.2.2.4 Sodium hydrogen carbonate solution 48
4.2.3 Preparation of eluents 48
4.2.3.1 Sodium carbonate eluent 48
4.2.3.2 Potassium hydrogen phthalate eluent 48
4.2.3.3 Sodium carbonate/bicarbonate eluent 48
4.2.3.4 Gluconate-borate eluent 48
4.2.4 Experimental design 49
4.3 RESULTS AND DISCUSSION 51
4.3.1 Use of mobile phase for conditioning washing and stripping 57
4.3.1.1 Effect of conditioning volume 57
4.3.1.2 Effect of washing volume 58
4.3.1.3 Effect of stripping volume 59
4.3.2 Selection of eluents in preconcentration steps 60
4.3.3 Optimization of volume of gluconate-borate eluent in preconcentration steps 64
4.3.3.1 Effect of conditioning volume 65
4.3.3.2 Effect of washing step 66
4.3.3.3 Effect of volume of water in washing step 66

Page

4.3.3.4 Effect of volume of gluconate-borate in washing step 68
4.3.3.5 Effect of stripping volume 69
4.3.3.6 Effect of flow rate of loading sample 70
4.3.3.7 Effect of sample volume 71
4.3.4 Optimum condition for oxalate preconcentration step 73
4.3.5 Calibration curve and detection limit 76
4.3.6 Breakthrough volume 77
4.4 APPLICATION TO PLASMA SAMPLES 78
4.4.1 Deproteinization of plasma 79
4.4.1.1 Using Amicon membrane for protein separation 79
4.4.2 Using acetronitrile for precipitation of protein 82
4.4.2.1 Recovery of oxalate in plasma sample deproteinated with acetronitrile 82
4.4.2.2 Effect of washing volume on the recovery of oxalate 83
4.4.2.3 Effect of sample pH on %recovery of oxalate in plasma sample 85
4.4.2.4 Recovery of oxalate obtained from the optimum condition of analysis 89
4.5 CONCLUSION 91

CHAPTER V ION-INTERACTION CHROMATOGRAPHY 92
5.1 INTRODUCTION 92
5.2 EXPERIMENTAL 93
5.2.1 Instrumentation 93
5.2.2 Chemicals and reagents 94
5.2.3 Preparation of solutions 95
5.2.3.1 Potassium hydrogen phthalate solution (KHP) 95
5.2.3.2 Tetrabutylammonium hydroxide solution(TBAOH) 95

Page

5.2.3.3 Preparation of mobile phase 95

5.2.3.4 Standard solutions 96

5.3 RESULTS AND DISCUSSSION 96

5.3.1 Effect of TBAOH concentration on retention behavior 98

5.3.2 Effect of KHP concentration on retention behavior 100

5.3.3 Optimum separation for Ion-interaction chromatography 99

5.3.4 Calibration curve and detection limit 100

5.3.5 Interference effects 102

5.3.5.1 Studies of SO_4^{2-} interference 104

5.3.5.2 Studies of HCl interference 105

5.4 CONCLUSION 106

CHAPTER VI CONCLUSION 107

APPENDIX I 111

APPENDIX II 113

REFERENCES 114

BIOGRAPHY 120

3936629 SCAI/M: MAJOR: APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY; M.Sc. (APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY)

KEY WORDS : ION CHROMATOGRAPHY /OXALATE /PRECONCENTRATION /SWITCHING VALVE

MALIWAN AMATATONGCHAI : DETERMINATION OF OXALATE IN URINE AND PLASMA SAMPLES BY ION CHROMATOGRAPHY. THESIS ADVISORS: JUWADEE SHIOWATANA Ph.D., SOMNUEK DOMRONGKITCHAIPORN Ph.D., NOUWARATN SUKHAPANTH Ph.D. 120 p. ISBN 974-662-321-4

The oxalate concentration of body fluids is an indicator for various bodily disorders, especially the growth of kidney stones. An accurate analytical result of urinary and plasma oxalate is an important tool for diagnosis and evaluation of treatment of patients with the above disorder. Ion chromatography (IC) equipped with column suppressor was developed for separation of oxalate. Using a Dionex AS10A column and 9/7 mM of $Na_2CO_3/NaHCO_3$ solution as a mobile phase, separation was achieved and oxalate was detected by conductivity detector. The effect of interferences on the separation behavior was investigated. Interfering compounds in the urinary samples were eliminated by passage of the samples through a preparative C_{18} cartridge before direct injection to IC. For plasma sample, online preconcentration by utilizing column switching technique was performed. The procedure of sample preparation for plasma was deproteinization with Amicon membrane and acetronitrile reagent. Parameters that affect preconcentration system such as volume of eluent used in conditioning, washing and stripping steps were optimized. Two deproteinization methods i.e. by acetronitrile and by Amicon membrane were compared for their effectiveness. The system was applied to the analysis of oxalate in plasma samples. Plasma samples after deproteinization with Amicon membrane gave satisfactory results. Plasma samples deproteinized with acetronitrile required sample pH adjustment to 3.5 - 5.6 to enhance the ability of oxalate to quantitatively retain on the concentrator column.

3936629 SCAI/M : สาขาวิชา : เคมีวิเคราะห์และเคมีอินทรีย์ประยุกต์ : วท.ม. (เคมีวิเคราะห์และเคมีอินทรีย์ประยุกต์)

มะลิวรรณ อมตธงไชย : การวิเคราะห์หาปริมาณอ๊อกซาเลทในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะโดยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี (DETERMINATION OF OXALATE IN URINE AND PLASMA SAMPLES BY ION CHROMATOGRAPHY): คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ยุวดี เชี่ยววัฒนา Ph.D., สมนึก ดำรงกิจชัยพร Ph.D., เนาวรัตน์ ศุขพันธุ์ Ph.D. 120 หน้า. ISBN 974-662-321-4

การศึกษาอุบัติการณ์ของนิ่วและปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะต้องอาศัยการวิเคราะห์สารต่าง ๆ ในปัสสาวะ เช่น Na^+, K^+, Ca^{2+}, citrate, oxalate ฯลฯ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง oxalate ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของการเกิดนิ่ว เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีซึ่งมีระบบซัพเพลสแบบคอลัมน์ได้ถูกพัฒนามาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ oxalate ในตัวอย่างปัสสาวะและเลือด โดยใช้คอลัมน์ Dionex AS10A ในการแยกแล้วตรวจวัดด้วยหน่วยตรวจวัดสภาพนำไฟฟ้า จากการทดลองพบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือสารละลาย Na_2CO_3 9 mM และ $NaHCO_3$ 7 mM โดยจะสามารถแยก oxalate ได้ภายใน 20 นาที จากการศึกษาผลกระทบของสารรบกวน พบว่าเทคนิคนี้ไม่ถูกรบกวนจาก SO_4^{2-}, PO_4^{3-} ซึ่งมีปริมาณสูงในปัสสาวะ และ HCl ซึ่งเติมลงในปัสสาวะเพื่อป้องกันไม่ให้ ascorbate ในปัสสาวะเกิด spontaneous conversion ไปเป็น oxalate ได้ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะโดยใช้ C_{18} cartridge เป็นตัวกำจัดสารรบกวนที่มีอยู่ในตัวอย่างปัสสาวะ พบว่าเป็นวิธีการกำจัดสารรบกวนที่ดีและไม่มีการสูญเสีย oxalate ระหว่างการเตรียมตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค preconcentration โดยใช้ switching valve เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ oxalate ในเลือด ซึ่งมีปริมาณ oxalate ในปริมาณต่ำมากและมีการรบกวนจากองค์ประกอบของสารตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าสารละลายที่มีความแรงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในขั้นตอนการทำ preconcentration คือ borate-gluconate eluent เมื่อทำการปรับสภาวะที่เหมาะสม เช่น ปริมาตรของ eluent ที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน และตรวจสอบความถูกต้องของระบบโดยใช้สารละลายมาตรฐานและนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิธีฉีดโดยตรง พบว่าเทคนิคนี้มีความเที่ยงตรงและแม่นยำสูง เมื่อนำระบบที่ได้พัฒนาขึ้นมาประยุกต์เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ oxalate ในตัวอย่างเลือดซึ่งใช้วิธีกำจัดโปรตีนในการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธีด้วยกันคือ Amicon membrane และ acetronitrile reagent พบว่าตัวอย่างจากวิธีการเตรียมแบบที่ 1 ให้ผลที่น่าพอใจ ส่วนตัวอย่างจากวิธีการเตรียมแบบที่ 2 หลังจากมีปรับสภาวะให้มีพีเอชอยู่ในช่วง 3.5 - 5.6 ให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าพอใจเช่นกัน