

การพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินในปัสสาวะ
ในระบบของไหลจุลภาคแบบพกพา



นางสาวเต็มศิริ ทรงเจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF THE PORTABLE MICROFLUIDIC SYSTEM
FOR DETERMINATION OF URINARY MICROALBUMIN
AND CREATININE



Miss Temsiri Songjaroen

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและ
ครีเอตินินในปัสสาวะ ในระบบของไหลจุลภาคแบบพกพา

โดย

นางสาวเต็มศิริ ทรงเจริญ

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร.อดิศร เตือนทรานนท์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

.....
(อาจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

.....
(ดร.อดิศร เตือนทรานนท์)

.....
(อาจารย์ ดร.วิณา เสียงเพราะ)

เต็มศิริ ทรงเจริญ : การพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ ในระบบของไหลจุลภาคแบบพกพา.(DEVELOPMENT OF THE PORTABLE MICROFLUIDIC SYSTEM FOR DETERMINATION OF URINARY MICROALBUMIN AND CREATININE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร.วนิดา หลายวัฒน์ไพศาล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.อดิสร เตือนตรานนท์, 122 หน้า.

ระบบของไหลจุลภาคแบบง่าย ต้นทุนต่ำ ขนาดเล็ก และพกพาได้ สำหรับตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ ได้ถูกพัฒนาขึ้น โดยใช้หลักปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม และวิธีอัลคาไลน์พีเคเทแบบโคเนติก (แฉฟี่) สำหรับตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอตินินตามลำดับไมโครชิปที่สร้างจากโพลีไดเมธิลไซลอกเซน (พีดีเอ็มเอส) ถูกออกแบบให้มีช่องทางเข้ารูปร่างโดยมีความกว้างของท่อ 500 μm และมีความลึก 100 μm สำหรับเป็นทางเข้าของน้ำยา (100 μL) และสิ่งตัวอย่าง (5 μL) และในบริเวณผสมสาร ได้มีการสร้างสิ่งกีดขวางขนาดเล็กภายในท่อเป็นรูปหัวลูกศร (arrowhead-shaped baffles) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมระหว่างน้ำยาและสิ่งตัวอย่าง ในบริเวณที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยา ได้มีการประยุกต์ใช้โพลิสไตรีนคิวเวตต์ (ระยะแสงผ่าน 10 mm, ปริมาตร 90 μL) และใช้ไฟเบอร์ออปติกสเปคโตรมิเตอร์ สำหรับติดตามปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม และปฏิกิริยาแฉฟี่ ที่ความยาวคลื่น 500 และ 510 nm ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-10 mg/L ($r^2 = 0.993$) และค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 0.81 mg/L ส่วนช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินคือ 0-40 mg/L ($r^2 = 0.997$) และค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 3.27 mg/L เมื่อทำการวิเคราะห์ปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคเบาหวานพบว่าระบบของไหลจุลภาคที่นำเสนอในงานวิจัยนี้ เมื่อนำไปใช้ตรวจวัดอัตราส่วนระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน พบว่ามีความสัมพันธ์กับวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ($r^2 = 0.985$, $n = 15$)

ภาควิชา.....เคมีคลินิก.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา.....2551.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

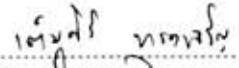
5077206137 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : MICROALBUMIN/CREATININE RATIO / MICROFLUIDIC SYSTEM / PDMS / JAFFÉ REACTION / LATEX AGGLUTINATION / ON-CHIP ABSORBANCE DETECTION

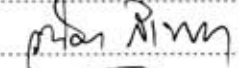
TEMSIRI SONGJAROEN : DEVELOPMENT OF THE PORTABLE MICROFLUIDIC SYSTEM FOR DETERMINATION OF URINARY MICROALBUMIN AND CREATININE. THESIS ADVISOR : WANIDA LAIWATTANAPAISAL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ADISORN TURNTRANONT, Ph.D., 122 pp.

A simple, low cost and portable microfluidic system for determination of urinary albumin and creatinine has been developed. Determination of microalbuminuria and creatinine was based on latex agglutination immunoassay and kinetic alkaline picrate reaction, respectively. Y-shaped microchannel (500-µm width and 100-µm depth) with two inlets for injection of reagent (100 µL) and urine sample (5 µL) was fabricated on the poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchip. The microfabricated arrowhead-shaped baffles within the microchannel were used to enhance the mixing efficiency of reagent and sample. A homemade flow cell detector (10 mm path length, total volume of 90 µL) made from a polystyrene cuvette was incorporated into the PDMS microchip at the detection zone. A miniature fiber optic spectrometer was used for monitoring the absorbance change at 500 nm and 510 nm, for latex agglutination and Jaffé reaction, respectively. For albumin assay, linear range was obtained at 0-10 mg/L ($r^2 = 0.993$), with a detection limit of 0.81 mg/L. Linear range for creatinine assay was found at 0-40 mg/L ($r^2 = 0.997$), with a detection limit of 3.27 mg/L. For determination of albumin/creatinine ratio, the proposed method was highly correlated with the conventional methods when real urine samples from diabetes patients were evaluated ($r^2 = 0.985$, $n = 15$).


Department : ...Clinical Chemistry.....

Student's Signature : 

Field of Study : ...Clinical Biochemistry.....

Advisor's Signature : 

and Molecular Medicine.....

Co-Advisor's Signature 

Academic Year : 2008

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาของ อาจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล และ ดร.อดิสร เตื่อนตรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ช่วยชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในทุกๆ ด้าน จนกระทั่งงานวิจัยนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ อ.ดร.วิณา เสียงเพราะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และให้คำแนะนำในการใช้งานเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ บุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ และศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณนักวิจัย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) หน่วยงาน NECTEC ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสร้างอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกโรงพยาบาลราชวิถี และโรงพยาบาลพญาไท 2 ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยโรคเบาหวานเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ทุนโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้าน Omics-Nano Medical Technology และเงินทุนสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เลขที่ TGIST-01-50-086

ขอบคุณ พี่น้อง สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ และเพื่อนๆ คณะสหเวชศาสตร์ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจเมื่อเกิดปัญหาและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย.....	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
1. ไต.....	8
2. โรคไตจากเบาหวาน.....	11
3. การวัดประสิทธิภาพการทำงานของไต.....	13
4. อัลบูมิน.....	13
5. ครีเอตินิน.....	18
6. การตรวจวัด microalbumin/creatinine ratio.....	22
7. Flow injection analysis.....	24
8. ระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system).....	27
9. ห้องปฏิบัติการบนชิป (Lab-on-a-chip).....	34
10. การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง fiber optic spectrometer.....	35

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
1. ประชากร.....	41
2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	41
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	44
3.1 การสร้าง PDMS microchip.....	44
3.2 การติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller)	50
3.3 การติดตั้งระบบของไหลจุลภาค สำหรับตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน.....	52
3.4 วิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินด้วยระบบของไหลจุลภาค.....	53
3.5 การเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีมาตรฐาน.....	53
3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ.....	54
3.7 การศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้.....	57
3.8 การทดลองตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในผู้ป่วยโรคเบาหวานเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน.....	58
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	60
1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผสมของ micromixer ภายในท่อของ PDMS microchip.....	60
2. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ.....	61
2.1 ผลการทดสอบหาช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม.....	61
2.2 ผลการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของแอนติบอดีและน้ำยาแฉฟิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา.....	65
2.3 ผลการทดสอบหาอัตราการไหล (flow rate) ที่เหมาะสม.....	66
2.4 ผลการทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	68
2.5 ผลการทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์และ pH ที่ใช้ในระบบของไหลจุลภาค.....	71
2.6 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา.....	73
2.7 ผลการทดสอบ carryover ของระบบของไหลจุลภาค.....	75

บทที่	หน้า
3. ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้.....	77
3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)	77
3.2 ผลการศึกษาค่า limit of detection (LOD)	79
3.3 ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)	80
3.4 ผลการศึกษาค่า precision และ reproducibility.....	83
4. ทำการทดลองตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในผู้ป่วย โรคเบาหวานเทียบกับวิธีมาตรฐาน.....	83
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	89
รายการอ้างอิง.....	97
ภาคผนวก.....	114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	122

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	41
3.2	วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย.....	42
3.3	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	43
4.1	ผลของ carryover ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน.....	75
4.2	ผลของ carryover ในการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนิน.....	76
4.3	ผลการทดสอบหาค่า limit of detection ของไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน.....	74
4.4	ผลการตรวจวัดสารรบกวนในตรวจวัดปริมาณอัลบูมินและครีเอทีนินในปัสสาวะ ด้วยระบบของไหลจุลภาค.....	76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะโครงสร้างของไต.....	9
2.2	โครงสร้างของหน่วยไต.....	10
2.3	โครงสร้างของครีเอทีนิน	21
2.4	ส่วนประกอบหลักของระบบ flow injection analysis.....	26
2.5	โครงสร้างทางเคมีของ SU-8.....	28
2.6	โครงสร้างของ Poly(dimethylsiloxane)	29
2.7	ขั้นตอนการสร้าง PDMS microchip.....	30
2.8	พื้นผิว PDMS หลังจากทำ oxygen plasma treatment.....	31
2.9	การดูดกลืนแสงของสารละลาย.....	36
2.10	ส่วนประกอบของ fiber optic.....	38
3.1	ออกแบบ PDMS microchip โดยใช้โปรแกรม L-edit.....	44
3.2	แผ่นซิลิกอนที่ยังไม่ได้ทำการฉายแสง.....	46
3.3	เครื่องเคลือบฟิล์มแบบหมุนเหวี่ยงและขั้นตอนการเคลือบแผ่นซิลิกอนด้วย สารไวแสง SU-8.....	46
3.4	Transparency film ที่มีลวดลายที่ได้ออกแบบไว้บนแผ่นซิลิกอนที่เคลือบด้วย น้ำยาไวแสง.....	47
3.5	แม่แบบซิลิกอนซึ่งมีความหนาของ SU-8 100 μm และมีลวดลายตามที่ ออกแบบไว้.....	47
3.6	ขั้นตอนการกำจัดฟองอากาศที่เกิดขึ้นในเนื้อ PDMS ด้วยเครื่อง vacuum pump.....	48
3.7	แผนภาพแสดงการสร้าง PDMS microchip.....	49
3.8	PDMS microchip ที่สร้างเสร็จแล้ว.....	50
3.9	ส่วนประกอบของเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในงานวิจัย.....	51
3.10	เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ควบคุมอุณหภูมิในระบบของไหล จุลภาค.....	51
3.11	ติดตั้งระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและ ครีเอทีนินในปัสสาวะ.....	52

3.12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ตรวจวัดกับสัญญาณการตรวจวัด.....	57
4.1	การวางแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายในท่อของ PDMS microchip ในการทดสอบประสิทธิภาพการผสมสารของ micromixer.....	61
4.2	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเมื่อตรวจวัดด้วยระบบ batch.....	63
4.3	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ โดยใช้ fiber optic spectrometer.....	64
4.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรน้ำยาและค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน.....	66
4.5	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหล กับค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน.....	68
4.6	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น.....	70
4.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และชนิดของบัฟเฟอร์ ต่อค่าการดูดกลืนแสง.....	72
4.8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้กับอัตราการเกิดปฏิกิริยา.....	74
4.9	กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยระบบของไหลจุลภาค.....	78
4.10	กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินในปัสสาวะด้วยระบบของไหลจุลภาค.....	79
4.11	ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน.....	85
4.12	ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนิน.....	86
4.13	ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน.....	87
4.14	ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินโดยใช้โปรแกรม Sigmaplot.....	88

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวานเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ ซึ่งมีสาเหตุจากทั้งพันธุกรรมและการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม เช่น การรับประทานอาหารที่ไม่ได้สัดส่วน การขาดการออกกำลังกาย เป็นต้น จากสถิติการเกิดโรคเบาหวานทั่วโลกพบว่าในปี ค.ศ.1995 มีผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลก 4.0% และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 5.4% ในปี ค.ศ.2025 จำนวนประชากรที่เป็นโรคเบาหวานจะเพิ่มจาก 135 ล้านคน ในปี 1995 เป็น 300 ล้านคนในปี 2025 ⁽¹⁾ ซึ่งอุบัติการณ์การเกิดโรคเบาหวานพบในประเทศที่พัฒนาแล้วมากกว่าประเทศที่กำลังพัฒนา อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศกำลังพัฒนาอยู่ในช่วง 45-64 ปี และประเทศพัฒนาแล้วผู้ป่วยโรคเบาหวานมีอายุเฉลี่ย 65 ปี ขึ้นไป ส่วนมากพบโรคเบาหวานในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย และในอนาคตจะพบผู้ป่วยโรคเบาหวานมากขึ้นในสังคมเมือง

โรคเบาหวานเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนมากมาย เช่น โรคแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นที่ตา (diabetic retinopathy) ทำให้จอประสาทตาเสื่อม ทำให้ตามัวลงและอาจทำให้ตาบอดในที่สุด โรคของระบบประสาท (diabetic neuropathy) เนื่องจากเลือดไหลเวียนไปที่ระบบประสาทน้อยลง ทำให้เส้นประสาทขาดเลือด เกิดการอักเสบ มีอาการชาตามปลายมือปลายเท้า เกิดแผลที่เท้าได้ง่าย และมีภาวะผนังหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) โรคแทรกซ้อนที่สำคัญและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ป่วยเบาหวานที่พบบ่อยมาก คือโรคไตที่เกิดจากโรคเบาหวาน (diabetic nephropathy) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage renal disease)

โรคไตที่เกิดจากโรคเบาหวาน พบประมาณ 35-45% ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และน้อยกว่า 20% ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยระยะเริ่มแรกของการป่วยซึ่งยังไม่แสดงอาการของโรคนั้น สามารถตรวจพบอัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะ หรือภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (microalbuminuria) ได้ ซึ่งหากตรวจพบว่ามีภาวะดังกล่าวได้เร็ว จะทำให้สามารถหาทางป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายได้ แต่หากไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิดภาวะโปรตีนในปัสสาวะ (proteinuria) ได้ภายใน 17 ปี และจะเกิดภาวะไตวายระยะสุดท้ายได้ภายใน 23 ปี ⁽²⁾ ซึ่งเป็นระยะที่ไตสูญเสียหน้าที่อย่างถาวร ไม่สามารถชดเชยของเสียได้ ทำให้ผู้ป่วยต้องฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมไปตลอดชีวิต ซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก ดังนั้นการตรวจ

พบความผิดปกติของการทำงานของไตตั้งแต่ในระยะเริ่มแรกจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อหาทางป้องกัน รักษา หรือชะลอความเสื่อมของไตให้ช้าที่สุด

ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะคือการที่มีโปรตีนชนิดอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะ ในปริมาณ 30-300 mg ต่อปัสสาวะที่เก็บครบ 24 ชั่วโมง หรือปริมาณ 20-200 μg ต่อนาที จากปัสสาวะที่เก็บเป็นเวลา (time collection urine specimen) หรือปริมาณ 30-300 μg ต่อปริมาณครีเอตินิน 1 mg จากปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่ม (random spot urine test) ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมักจะพบในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 หลังจากตรวจพบโรคเบาหวานแล้วประมาณ 5-10 ปี ส่วนในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งส่วนมากผู้ป่วยมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงนานมากกว่า 6 ปี แล้วกว่าจะตรวจพบว่าเป็นโรคเบาหวาน ดังนั้นจึงอาจมีภาวะไมโครอัลบูมินพร้อมกับการตรวจพบโรคเบาหวานได้⁽³⁾ เนื่องจากการตรวจกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ มีความสำคัญอย่างยิ่งในผู้ป่วยเบาหวาน เพราะสามารถตรวจพบความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโครงสร้าง และการสูญเสียหน้าที่ของไตได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรก ดังนั้นผู้ป่วยเบาหวานทุกรายควรได้รับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ อย่างน้อยปีละหนึ่งครั้ง ตามคำแนะนำของสมาคมแพทย์โรคเบาหวานของสหรัฐอเมริกา⁽⁴⁾ เพื่อเป็นการป้องกันการเป็นโรคไตวายเรื้อรัง นอกจากนี้ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ยังมีความสัมพันธ์กับโรคอื่นๆ เช่น ผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงอย่างไม่ทราบสาเหตุ (essential hypertension)⁽⁵⁾, โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease)⁽³⁾, หัวใจล้มเหลว⁽⁶⁾, โรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease)⁽⁷⁾ และโรคตับแข็ง (cirrhosis)⁽⁸⁾ เป็นต้น

การรายงานผลการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ วิธีมาตรฐานคือการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และรายงานเป็นปริมาณไมโครอัลบูมินต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมง⁽⁹⁾ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และมีความยุ่งยากในการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ ดังนั้นวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็วกว่า คือการเก็บตัวอย่างปัสสาวะแบบสุ่ม แต่เนื่องจากการขับอัลบูมินออกมาในปัสสาวะภายในหนึ่งวันนั้นไม่คงที่ มีความแปรผันตามเวลา โดยอัลบูมินถูกขับออกน้อยในเวลากลางคืนและจะขับออกมากในเวลากลางวัน ดังนั้นการตรวจระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแบบสุ่ม จึงอาจมีความคลาดเคลื่อนไปจากค่าที่แท้จริงได้ เพื่อเป็นการลดความคลาดเคลื่อนในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะจากปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่ม จึงต้องทำการตรวจวัดไมโครอัลบูมินควบคู่กับการตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน⁽¹⁰⁾ ซึ่งครีเอตินินเป็นสารเคมีในเลือดหรือปัสสาวะที่ถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของไตชนิดหนึ่ง ในภาวะที่ไตมีความผิดปกติความสามารถในการกำจัดครีเอตินินออกจากเลือดจะลดลง ทำให้ตรวจพบปริมาณครีเอตินินในเลือดสูงขึ้นและทำให้ระดับครีเอตินินในปัสสาวะต่ำกว่าค่าปกติ ดังนั้นในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ จึงนิยมตรวจวัดปริมาณครีเอตินินควบคู่กับปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ และรายงานผลเป็นค่าอัตราส่วน

ระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน (microalbumin/creatinine ratio) โดยปริมาณไมโครอัลบูมินจะเป็นตัวบ่งชี้พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับไต ส่วนปริมาณครีเอทีนินเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของไตที่ผิดปกติ⁽¹¹⁾

การตรวจปัสสาวะในห้องปฏิบัติการทั่วไป ที่ใช้แถบตรวจ (strip) จุ่มปัสสาวะพบว่ามีความไวไม่พอที่จะตรวจพบภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ แต่เป็นการตรวจกรองปริมาณโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะ ซึ่งถ้าให้ผลบวกแสดงว่าไตมีความเสียหายไปในระดับหนึ่งแล้ว ส่วนแถบตรวจอีกชนิดสำหรับตรวจระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแบบกึ่งปริมาณ (semiquantitative) ในการตรวจใช้หลักการ immunochromatography สามารถใช้ตรวจกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะอย่างง่ายและรวดเร็ว เหมาะสำหรับการใช้งานในภาคสนาม หรือในสถานที่ที่ไม่มีเครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติ แต่ราคาของแถบตรวจค่อนข้างแพง และทราบค่าเป็นช่วงความเข้มข้นของไมโครอัลบูมินเท่านั้น ไม่สามารถบอกค่าเป็นปริมาณที่แท้จริงได้ จึงนิยมใช้เป็นการตรวจกรองเบื้องต้นเท่านั้น การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณส่วนมากใช้หลักการทาง immunoassay เช่น immunoturbidimetry⁽¹²⁾, immunonephelometry⁽¹²⁾, immunofluorescence⁽¹³⁾, ELISA⁽¹⁴⁾, radioimmunoassay⁽¹⁵⁾ เป็นต้น ซึ่งค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดมีราคาแพง เนื่องจากขั้นตอนการผลิตแอนติบอดีมีความยุ่งยาก การตรวจวัดครั้งหนึ่งจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีในปริมาณมาก และเป็นชุดตรวจสอบนำเข้าจากต่างประเทศ ประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตชุดตรวจสอบอัลบูมินในปัสสาวะได้เอง และการตรวจวัดเชิงปริมาณ ปัจจุบันต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ เมื่อติดตั้งแล้วทำการเคลื่อนย้ายได้ลำบาก ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดหนึ่งของการตรวจวัดอัลบูมินโดยวิธี immunoassay

สำหรับวิธีการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินนั้นมีหลายวิธี เช่น วิธีเอนไซม์^(16, 17) ซึ่งมีความจำเพาะกับครีเอทีนินสูง แต่เอนไซม์ที่นำมาใช้ต้องมีความบริสุทธิ์มาก และเป็นวิธีที่มีราคาแพง การตรวจวัดครีเอทีนินโดยวิธีไม่ใช้เอนไซม์ เช่น การใช้ปฏิกิริยาแจฟฟี (Jaffé)⁽¹⁸⁾ วิธีนี้พบว่ามี การรบกวนจากสารอื่นๆ ในสิ่งตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการดัดแปลงการตรวจวัดโดยการตรวจวัดแบบ kinetic เพื่อลดการรบกวนจากสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่ครีเอทีนิน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วไป

ส่วนการตรวจวัดเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน หรือ microalbumin/creatinine ratio ในห้องปฏิบัติการทั่วไปส่วนใหญ่ใช้วิธี immunoturbidimetry ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน และใช้หลักการแจฟฟี (Jaffé) สำหรับการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนิน⁽¹⁹⁾ วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ทราบค่าเป็นปริมาณ (quantitative method) แต่ในการตรวจวัดต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติ ที่มีขนาดใหญ่และไม่สามารถพกพาได้ และยังใช้น้ำยาปริมาณมาก ทำให้ค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดสูง อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดในรูปแบบ

point-of-care testing ที่ใช้ strip ในการตรวจวัด และบอกค่าอัตราส่วนดังกล่าวเป็นช่วงความเข้มข้น⁽²⁰⁾ วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถพกพาได้ ทำการตรวจวัดได้รวดเร็ว แต่ยังมีข้อจำกัดคือเป็นการตรวจวัดแบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) ไม่ทราบค่าเป็นตัวเลขที่แน่นอน ซึ่งเป็นวิธีการตรวจคัดกรองเท่านั้น ซึ่งจำเป็นต้องตรวจเพื่อยืนยันด้วยวิธีเชิงปริมาณซ้ำอีกครั้ง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ให้สามารถตรวจวัดในเชิงปริมาณ โดยสามารถตรวจวัดได้ง่าย รวดเร็ว มีความจำเพาะ และลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดจึงมีความสำคัญที่ต้องพัฒนาขึ้น มีรายงานวิจัยถึงการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน โดยทำการตรวจวัดในรูปแบบไมโครเพลท การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินใช้หลักการ ELISA ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินโดยใช้หลักการเอนไซม์⁽²¹⁾ แต่อย่างไรก็ตาม วิธี ELISA นั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นวิธีที่มีความยุ่งยาก และมีขั้นตอนในการตรวจวัดหลายขั้นตอน ทำให้ใช้เวลานานในการตรวจวัดแต่ละครั้ง นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน เช่นใช้ระบบ sequential injection analysis⁽²²⁾ ซึ่งมีข้อดีคือใช้ปริมาณน้ำยาในการตรวจวัดน้อย และสามารถตรวจวัดสิ่งตัวอย่างได้ปริมาณมาก

ปัจจุบันงานวิจัยทางด้านห้องปฏิบัติการบนชิป (lab-on-a-chip) ได้พัฒนาไปอย่างมาก สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสารเคมีหรือสารน้ำทางชีวภาพได้ โดยทำการบูรณาการเข้ากับระบบของไหลจุลภาค (microfluidic system) ทำให้มีการใช้น้ำยาและสิ่งส่งตรวจปริมาณน้อย ทำให้ลดต้นทุนในการตรวจวัด และยังมีศักยภาพที่จะสามารถพกพาไปใช้ในระดัพบภาคสนามได้

ในงานวิจัยนี้ ได้เสนอระบบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะในระบบของไหลจุลภาค ที่มีการใช้พอลิเมอร์ชนิดโพลีไดเมทิลซิลอกเซน (poly(dimethylsiloxane) หรือ PDMS มาสร้างเป็นไมโครชิป ระบบตรวจวัดที่นำเสนอ มีขนาดเล็ก มีการใช้น้ำยา แอนติบอดี สารเคมี และสิ่งส่งตรวจปริมาณน้อย ซึ่งคาดว่าจะสามารถทำให้ลดต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมาก นอกจากนี้ระบบการตรวจวัดปฏิภานในงานวิจัยนี้ มีการใช้ miniature spectrometer ที่อาศัยเส้นใยแก้วนำแสง (fiber optic) สำหรับใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสงและเป็นตัวตรวจ (detector) ซึ่งทำให้สามารถนำระบบการตรวจวัดดังกล่าวไปใช้ในระดัพบภาคสนามได้ ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในสถานพยาบาล หรือศูนย์สาธารณสุขชุมชนระดับตำบล ที่ยังไม่มีบริการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน จะเป็นผลให้ผู้ป่วยเบาหวาน หรือผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงอื่นๆ ได้รับบริการทางสาธารณสุขอย่างเท่าเทียมกัน สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ นับเป็นมาตรการป้องกันการเกิดโรคไตในผู้ป่วยเบาหวานในเชิงรุก สามารถลดความสูญเสียที่จะเกิดขึ้นทั้งทางด้านสุขภาพและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศได้อย่างมาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาระบบตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ ที่มีค่าใช้จ่ายน้อย ประหยัด
2. เพื่อพัฒนาระบบตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ ที่สามารถนำไปใช้ในระดับภาคสนามได้
3. เพื่อพัฒนาต้นแบบของเครื่องมือขนาดเล็กที่ใช้หลักการวัดเชิงแสง (optical detection) สำหรับการเกิดปฏิกิริยาบน PDMS microchip

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ ในระบบของไหลจุลภาค (microfluidic system) ที่มีการใช้ PDMS microchip โดยมีวัตถุประสงค์ให้มีการใช้น้ำยาและสารเคมีปริมาณน้อย วัดการเกิดปฏิกิริยาของไมโครอัลบูมินโดยการวัดความขุ่นด้วยหลักการ latex agglutination immunoassay ส่วนปริมาณครีเอตินิน ใช้หลักการเกิดปฏิกิริยาแฉงฟีดด้วยวิธี kinetic โดยระบบการตรวจวัดใช้ miniature fiber optic spectrometer ซึ่งมีขนาดเล็ก จึงทำให้สามารถพกพา และนำไปใช้ในระดับภาคสนามได้ โดยกลุ่มตัวอย่างที่นำมาวิจัยคือผู้ป่วยเบาหวาน และใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่ม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินที่มีปริมาณน้อยในปัสสาวะ ควบคู่กับครีเอตินิน ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้น้ำยาในการตรวจวัดปริมาณน้อย ทำให้ลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการตรวจวัด
2. สามารถนำระบบการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ ไปใช้ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะของผู้ป่วยได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยสามารถพกพาไปตรวจในระดับภาคสนามได้ ทำให้สามารถให้บริการกับผู้ป่วยที่อยู่ห่างไกลจากบริการสาธารณสุขได้
3. เป็นการผลิตนวัตกรรมทางการแพทย์ขึ้นใช้เองภายในประเทศ โดยนำไปใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยหรือป้องกันการเกิดโรคได้

4. พัฒนาค้นแบบของเครื่องมือที่ใช้วัดเชิงแสงของการเกิดปฏิกิริยาบน PDMS microchip ซึ่งนอกเหนือจากไมโครอัลบูมินและครีเอตินินแล้ว อาจสามารถพัฒนาต่อเป็นระบบการตรวจวัดสารเคมีอื่นๆ ที่อยู่ในเลือดหรือปัสสาวะ ที่สามารถใช้ในการวัดการดูดกลืนแสง หรือวัดการกระเจิงของแสงได้

5. คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้อง ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง ในหัวข้อเรื่อง “Portable microfluidic device for determination of urinary microalbumin and creatinine” เช่น ใน Analytica Chimica Acta (impact factor 2008 = 3.18)

6. สามารถนำผลงานวิจัยจากโครงการนี้ เพื่อไปนำเสนอผลงานวิชาการระดับนานาชาติ ได้แก่ 2nd International Symposium on Microfluidic (ISM II) ซึ่งจะจัดที่ประเทศจีน ระหว่างวันที่ 1-3 พฤศจิกายน 2551

7. บูรณาการงานวิจัยทางด้านเคมีคลินิกกับงานวิจัยทางด้านไบโอเซนเซอร์ เป็นการพัฒนาวีธีการตรวจวัดสารเคมีหรือชีวภาพในรูปแบบ lab-on-a-chip ที่ใช้หลักการของไหลจุลภาค (microfluidic system) ซึ่งในอนาคตสามารถพัฒนาไปเป็นการตรวจวัดในรูปแบบ Point-of-care-testing ทำให้มีประโยชน์กับผู้ป่วย โดยทำให้การวินิจฉัยโรค สะดวก รวดเร็วมากยิ่งขึ้น

8. วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ มีประโยชน์กับหน่วยงานสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยภาวะไมโครอัลบูมิน ได้แก่ โรงพยาบาล ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ศูนย์สาธารณสุข ชุมชนในระดับตำบล สามารถนำเครื่องมือที่สร้างขึ้นนี้ไปตรวจวินิจฉัยภาวะแทรกซ้อนให้กับผู้ป่วย เบาหวาน และผู้ป่วยที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับไตได้

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

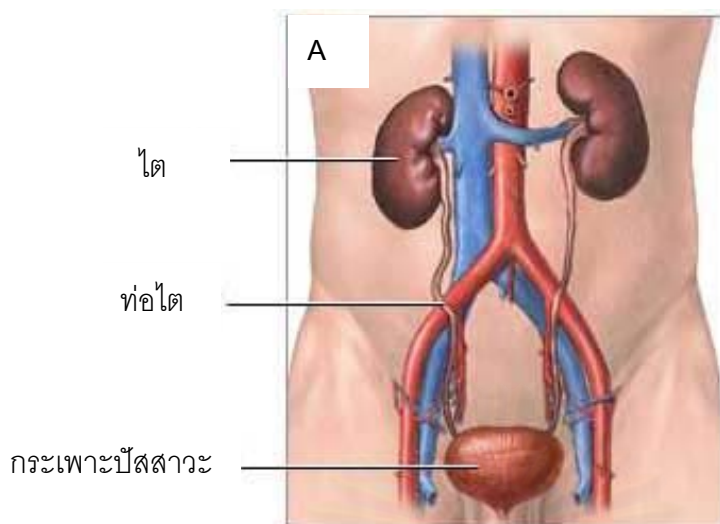
2.1 ไต

2.1.1 โครงสร้างของไต

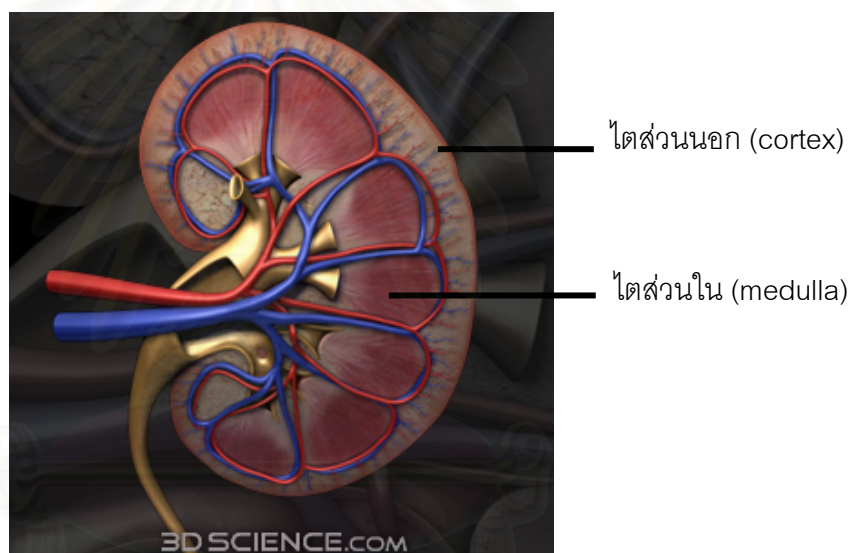
ไตเป็นอวัยวะที่อยู่บริเวณช่องท้องด้านหลัง ติดกับกระดูกสันหลัง มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วจำนวน 1 คู่ ส่วนนอกของไตเรียกว่าคอร์เท็กซ์ (cortex) ประกอบด้วยโกลเมอรูลัส (glomerulus) หลอดไตส่วนต้น (proximal tubule) หลอดไตส่วนปลาย (distal tubule) ส่วนต้นของ loop of Henle's และหลอดไตรวม (collecting tubule) ส่วนในของไตเรียกว่าเมดัลลา (medulla) มีลักษณะเป็นแฉกคล้ายพัด ประกอบด้วยส่วนโค้งกลับของ loop of Henle's หลอดไตรวม และหลอดเลือดฝอยรอบหลอดไต ไตประกอบด้วยหน่วยไต (nephron) (ภาพที่ 2.2) ซึ่งทำหน้าที่ในการกรองเลือด ไตข้างหนึ่งมีหน่วยไตประมาณ 1-1.5 ล้านหน่วย หน่วยไตประกอบด้วย

1. ส่วนต้นของหน่วยไต (renal corpuscle) ซึ่งได้แก่โกลเมอรูลัส (glomerulus) และแคปซูลบาวมัน (Bowman's capsule)
2. proximal tubule
3. loop of Henle's
4. distal tubule
5. collecting tubule

โกลเมอรูลัสและแคปซูลบาวมันทำหน้าที่กรองเลือด โดยมีหลอดเลือดฝอยโกลเมอรูลาร์ นำเลือดมากรองผ่านเยื่อหุ้มแคปซูลบาวมัน ได้สารน้ำออกมา แล้วจึงปล่อยลงไปในหลอดไตส่วนต้น, loop of Henle's และหลอดไตส่วนปลาย ตามลำดับ ซึ่งจะทำหน้าที่ดูดสารที่เป็นประโยชน์กลับคืนสู่ร่างกาย และขับถ่ายสารที่เป็นของไร้ประโยชน์ออกไป หลังจากนั้นน้ำกรองจะเข้าสู่หลอดไตรวม และท่อไตรวม (collecting duct) แล้วเข้าสู่กรวยไต (renal pelvis) ไหลผ่านหลอดไต (ureter) ลงไปเก็บไว้ในกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder) เป็นน้ำปัสสาวะที่เตรียมขับทิ้ง⁽²³⁾ ดังแสดงในภาพที่ 2.1

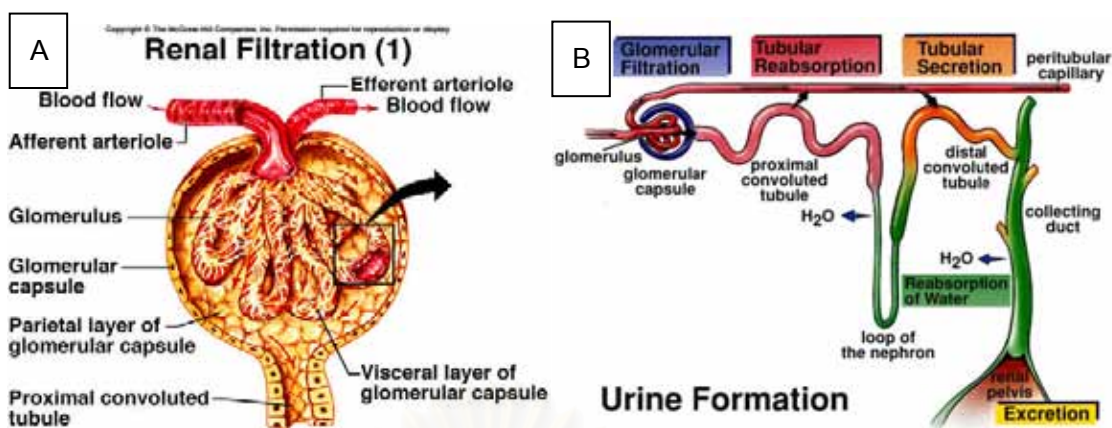


ดัดแปลงจาก http://urology.ucla.edu/images/Conditions_Treated/Kidney_Transplant.jpg



ดัดแปลงจาก <http://inventorspot.com/files/images/kidney.jpg>

ภาพที่ 2.1 (A) แสดงลักษณะของไตที่อยู่บริเวณช่องท้องด้านหลัง รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วจำนวน 1 คู่ อยู่บริเวณกระดูกซี่โครงที่ 11 และ 12 (B) แสดงโครงสร้างของไตที่ผ่าครึ่ง ส่วนนอกของไตเรียกว่าคอร์เท็กซ์ ประกอบด้วยโกลเมอรูลัส หลอดไตส่วนต้น หลอดไตส่วนปลาย ส่วนต้นของ loop of Henle's และหลอดไตรวม ส่วนในของไตเรียกว่าเมดัลลา ประกอบด้วยส่วนโค้งกลับของ loop of Henle's หลอดไตรวม และหลอดเลือดฝอยรอบหลอดไต



ภาพจาก

<http://faculty.southwest.tn.edu/rburkett/urinar14.jpg> และ

http://fau.pearlashes.com/anatomy/Chapter%2041B/images/Chapter%2041B_img_1.jpg

ภาพที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของหน่วยไต (A) renal corpuscle ซึ่งประกอบด้วยโกลเมอรูลัสและแคปซูลบาวมัน มีหน้าที่ในการกรองเลือดที่เข้ามาทางเส้นเลือดที่นำเลือดเข้ามาสู่หน่วยไตเรียกว่า afferent arteriole เมื่อเลือดถูกกรองแล้วจะออกจากไตผ่านทางเส้นเลือด efferent arteriole (B) แสดงโครงสร้างของหน่วยไตที่ประกอบด้วย glomerulus, Bowman's capsule, proximal tubule, loop of Henle's, distal tubule และ collecting tubule

2.1.2 หน้าที่ของไต

1. กรองสารในร่างกาย และดูดซึมสารที่เป็นประโยชน์กลับเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กลูโคส เกลือแร่ สารเหล่านี้เมื่อผ่านการกรองของไตแล้วจะถูกดูดซึมกลับเกือบทั้งหมด

2. ขับถ่ายของเสียออกจากร่างกายในรูปของปัสสาวะ เช่น สารที่เกิดจากการเผาผลาญสารอาหารที่ทานเข้าไป ยูเรีย ครีเอตินิน ยา และสารแปลกปลอมต่างๆ หากไตสูญเสียหน้าที่ ไม่สามารถกำจัดของเสียออกจากร่างกายได้ จะทำให้ของเสียคั่งในร่างกายเกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ (uremia)

3. รักษาสมดุลของน้ำในร่างกาย ไตทำหน้าที่ควบคุมปริมาณน้ำ โดยถ้ามีน้ำมากเกินไปความต้องการของร่างกาย ไตจะทำหน้าที่ขับน้ำออกมาทางปัสสาวะ ถ้าร่างกายอยู่ในภาวะขาดน้ำ ไตจะรักษาปริมาณน้ำไว้ให้ร่างกาย ทำให้ปัสสาวะจะมีปริมาณน้อยและเข้มข้น

4. รักษาสมดุลเกลือแร่ ไตควบคุมระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ เช่น โซเดียม คลอไรด์ โปแตสเซียม เป็นต้น หากไตทำงานผิดปกติ ปริมาณเกลือแร่ในร่างกายก็จะผิดปกติ เช่น

เมื่อไตทำงานบกพร่อง ความเข้มข้นของโปแตสเซียมจะสูงมาก ทำให้หัวใจหยุดเต้นได้ หรือภาวะไฮเดียมไม่เหมาะสม เนื่องจากร่างกายขับโซเดียมไม่ได้ ทำให้เกิดอาการบวม ความดันโลหิตสูง หัวใจทำงานหนัก อาจทำให้หัวใจล้มเหลวได้

4. รักษาสมดุลกรดต่าง ร่างกายจะสร้างกรดขึ้นมาจากการเผาผลาญสารอาหารเพื่อใช้เป็นพลังงาน กรดนี้จะถูกขับทิ้งโดยไต หากไตไม่สามารถขับกรดทิ้งได้ ทำให้ร่างกายมีสภาวะเป็นกรด เป็นอันตรายต่ออวัยวะต่างๆ นอกจากนี้ไตยังมีหน้าที่ดูดกลับต่างหรือไบคาร์บอเนตเพื่อรักษาสภาวะที่เป็นกลาง

5. ควบคุมความดันโลหิต ไตมีหน้าที่ควบคุมสมดุลของน้ำและเกลือแร่ ซึ่งมีผลต่อความดันโลหิต หากไตไม่สามารถควบคุมระดับเกลือแร่ได้ ทำให้ความดันโลหิตสูง และทำให้เกิดไตวายได้

6. สร้างฮอร์โมน เช่น erythropoietin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการสร้างเม็ดเลือดแดง ฮอร์โมน rennin ที่มีหน้าที่ควบคุมความดันโลหิต ปริมาณเกลือแร่ และปริมาณน้ำในร่างกาย นอกจากนี้ไตยังมีหน้าที่สร้างวิตามินดี ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมสมดุลแคลเซียมและฟอสฟอรัสซึ่งมีส่วนในการสร้างกระดูกและฟัน

2.2 โรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy)

2.2.1 สาเหตุของโรคไตจากเบาหวาน

โรคเบาหวานเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดไตเสื่อมหรือไตวายมากที่สุด โรคไตมักจะเกิดตามหลังโรคเบาหวานมากกว่า 10 ปีขึ้นไป สาเหตุเนื่องมาจากภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่ระบบต่างๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะหลอดเลือดทั่วร่างกายจะแข็งและหนา ทำให้เลือดไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกายลดลง ภาวะแทรกซ้อนทางไต ซึ่งเป็นผลจากการที่น้ำตาลในเลือดสูงกว่าระดับปกติ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนเลือดที่ไต ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง กลุ่มเส้นเลือดฝอยที่ไตแข็งตัว (glomerulosclerosis) basement membrane ของโกลเมอรูลัสหนาขึ้น มีการขยายตัวของเซลล์ที่อยู่รอบเส้นเลือดในไต (mesangial cell) เพิ่มขึ้น เนื่องจากการสร้าง extracellular matrix (collagen IV, laminin และ fibronectin) ทำให้โครงสร้างของไตเปลี่ยนแปลง นำไปสู่การสูญเสียหน้าที่ของไต น้ำตาลในเลือดที่เพิ่มมากขึ้น เป็นตัวกระตุ้นให้สร้างไซโตไคน์ เช่น transforming growth factor-B, angiotensin II หรือ growth factors ตัวอื่นๆ ซึ่งจะไปยังยับยั้งการสลายตัวของ extracellular matrix และโปรตีนเกิดการสะสม extracellular matrix ความดันที่โกลเมอรูลัสจึงสูงขึ้น นอกจากนี้ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์ epithelial ของโกลเมอรูลัส ที่ชื่อพอดไซท์ (podocyte) มีจำนวนและความ

หนาแน่นลดลง เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ไต⁽²⁴⁾ ซึ่งนำไปสู่การมีโปรตีนในปัสสาวะ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการเกิดความเสียหายที่ไต และนำไปสู่ภาวะไตวายที่สุด

การที่มีปริมาณโปรตีนปริมาณน้อยๆ รั่วออกมาในปัสสาวะเรียกว่า ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (microalbuminuria) คือ ภาวะที่มีการขับโปรตีนชนิดอัลบูมินออกมาทางปัสสาวะในปริมาณระหว่าง 30 -300 mg/24 ชั่วโมง หรืออัลบูมินปริมาณ 30 – 300 µg ต่อครีเอตินิน 1 mg^(25, 26) และจะต้องพบ 2 ใน 3 ครั้งของปัสสาวะที่เก็บต่างเวลากัน ในระยะเวลา 6 เดือน สามารถใช้ระดับไมโครอัลบูมินเป็นตัวบ่งชี้ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างและการสูญเสียหน้าที่ของไตระยะเริ่มแรกได้ และเป็นสัญญาณสำคัญที่บ่งชี้ว่ามีภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้น โดยการตรวจพบไมโครอัลบูมินในระยะเริ่มแรกเมื่อมีพยาธิสภาพเกิดขึ้นที่ไต และทำการรักษาได้ทันจะช่วยให้อายุผู้ป่วยกลับมามีระดับอัลบูมินในปัสสาวะปกติอีกครั้ง อีกทั้งยังช่วยลดอัตราการเกิดความดันโลหิตสูง ลดปัจจัยเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (cardiovascular disease) และป้องกันไม่ให้อายุผู้ป่วยเป็นโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย⁽²⁷⁾ ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ นับเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันของประชากรทั่วไป โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูง ดังนั้นการวินิจฉัยที่ถูกต้องรวดเร็วอาจช่วยลดอุบัติการณ์หรือชะลอการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ที่จะเกิดขึ้นตามมา โดยการควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในระดับปกติ และให้ยา antihypertensive จะช่วยให้มีระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะลดลง⁽²⁸⁾ ซึ่งจะทำให้มีการพยากรณ์โรคดีขึ้น

2.2.2 อาการของผู้ป่วยโรคไต

การตรวจพบโรคไตระยะเริ่มแรกในผู้ป่วยเบาหวานสามารถทำได้โดยการตรวจโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะเท่านั้น เป็นการบ่งชี้ว่าเริ่มมีความผิดปกติทางไต เนื่องจากผู้ป่วยยังไม่มีอาการ ระยะต่อมาหากไม่รีบรักษาจะเกิดอาการบวม ซึ่งมักจะเริ่มที่เท้าก่อน และจะเกิดอาการบวมตามแขน ขา ใบหน้า และลำตัว เนื่องจากเกิดการสูญเสียโปรตีนทางปัสสาวะหรือมีการคั่งของเกลือ เมื่อไตเริ่มเสื่อมลง ค่ายูเรียไนโตรเจน (BUN) และครีเอตินิน (Creatinine) ในเลือดจะสูงกว่าคนปกติเนื่องจากไตไม่สามารถกำจัดของเสียออกจากร่างกายได้ เมื่อเกิดภาวะไตวายผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน นอนไม่หลับ ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ซาตามปลายมือและเท้า คันตามตัว ชัก และหมดสติ ปริมาณปัสสาวะลดลงจนไม่มีปัสสาวะในระยะสุดท้าย

2.3 การวัดประสิทธิภาพการทำงานของไต

2.3.1 การวัดค่าครีเอตินินในเลือด (serum creatinine)⁽²⁹⁾

การวัดค่าครีเอตินินในเลือดเป็นวิธีที่นิยม เนื่องจากทำได้ง่าย เนื่องจากครีเอตินินเป็นสารที่ถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยไตเป็นส่วนใหญ่ เมื่อไตทำหน้าที่บกพร่อง ทำให้ความสามารถในการขับครีเอตินินลดลง ปริมาณครีเอตินินในเลือดจึงสูงขึ้น ปกติค่าครีเอตินินในเลือดจะอยู่ในช่วง 0.6-1.5 mg/dL หากเพิ่มสูงขึ้นมากกว่านี้แสดงว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นกับไต

2.3.2 การวัดค่าอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate: GFR)

การวัดค่าอัตราการกรองของไตเป็นการทดสอบความสามารถในการทำงานของไตในการกำจัดสาร ทดสอบได้โดยใช้สารฉีดเข้าไปในร่างกายแล้วทดสอบความสามารถของไตในการกำจัดสารนั้นออกจากร่างกาย เช่นฉีดสารกัมมันตภาพรังสี หรืออินนูลิน⁽³⁰⁾ เป็นต้น หรืออาจจะทดสอบสารที่มีอยู่แล้วในร่างกาย คือครีเอตินิน เพราะเป็นสารที่ถูกขับออกทาง glomeruli เท่านั้น และไม่ถูกดูดกลับโดยท่อไต

2.3.3 การตรวจโปรตีนในปัสสาวะ

วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวในการทดสอบการทำงานของไต เนื่องจากสามารถพบโปรตีนในปัสสาวะได้ตั้งแต่ผู้ป่วยยังไม่แสดงอาการทางคลินิก⁽²⁶⁾ โดยสามารถทดสอบจากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง การเก็บปัสสาวะเป็นเวลา หรืออาจใช้ปัสสาวะแบบสุ่ม⁽³¹⁾ ซึ่งต้องทำการทดสอบเปรียบเทียบค่าโปรตีนในปัสสาวะควบคู่กับปริมาณครีเอตินินเพื่อลดความคลาดเคลื่อนจากปริมาณโปรตีนที่ขับออกในแต่ละช่วงเวลาภายในหนึ่งวัน

2.4 อัลบูมิน (albumin)

2.4.1 โครงสร้างของอัลบูมิน

อัลบูมินเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในร่างกาย โดยสร้างขึ้นที่ตับ มีลักษณะเป็นก้อนกลม gene ที่ทำหน้าที่สร้างอัลบูมินอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4⁽³²⁾ ซึ่งประกอบด้วย 16,961 นิวคลีโอไทด์ โครงสร้างของอัลบูมินประกอบด้วย 3 โดเมน มีขนาดโมเลกุล 66 kDa และมีครึ่งชีวิตประมาณ 20 วัน

2.4.2 หน้าที่ของอัลบูมิน

มีหน้าที่รักษาสมดุลของแรงดันน้ำในร่างกาย (oncotic pressure) ถ้ามีปริมาณอัลบูมินในเลือดน้อยเกินไปจะทำให้หน้าที่อยู่ในหลอดเลือดรั่วออกไปอยู่บริเวณอื่นๆ นอกหลอดเลือด

เลือด น้ำจะสะสมได้ผิวหนัง และในช่องท้องจึงเกิดการบวม น้ำ อัลบูมินเป็นโปรตีนสำคัญที่ช่วยในการขนส่งสารต่างๆ เช่น การขนส่งกรดไขมันอิสระ บิลิรูบิน ยา ฮอร์โมน ไทรอยด์ เป็นต้น⁽³³⁾ ระดับอัลบูมินสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะการทำงานของตับ ถ้าปริมาณอัลบูมินในเลือดลดลง แสดงว่าหน้าที่ในการสร้างและการทำงานของตับลดลงด้วย เนื่องจากอัลบูมินมีขนาดโมเลกุลใหญ่ (66 kDa) ในภาวะปกติจะไม่ตรวจพบอัลบูมินในปัสสาวะ หรือพบได้ในปริมาณน้อยกว่า 20 mg/L ในปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่ม⁽³⁴⁾ ความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่ไตจะทำให้อัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะมากกว่าปกติ

2.4.3 วิธีการตรวจวัดปริมาณอัลบูมิน

วิธี non immunoassay

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้วิธี HPLC ใช้ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และความสามารถในการยึดเกาะกับ stationary phase ของสาร โดยสารที่ละลายได้ดีในตัวทำละลาย และไม่ยึดเกาะกับ stationary phase ใน column HPLC จะแยกออกมาได้ก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อย และยึดเกาะกับ stationary phase ได้ดีจะแยกออกมาได้ทีหลัง สามารถหาปริมาณของสารได้โดยดูค่าความสูงและพื้นที่ใต้กราฟของ chromatogram โดยชนิดของ column ที่ใช้หาปริมาณไมโครอัลบูมิน คือ size-exclusion chromatography ซึ่งแยกสารตามขนาดโมเลกุล มวลโมเลกุล และรูปร่างโดยไม่ใช้ปฏิกิริยาเคมี และใช้ phosphate buffer เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีรายงานวิจัยกล่าวไว้ว่าวิธี HPLC สามารถตรวจวัดอัลบูมินได้ทั้ง immunoreactive และ immuno-unreactive form ซึ่ง John H. Contois และคณะ ได้ศึกษาการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ HPLC เปรียบเทียบกับวิธี immunoturbidimetric⁽⁷⁾ พบว่าวิธี HPLC มีช่วงความเป็นเส้นตรงถึง 963 mg/L และค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 6.1 mg/L และเมื่อตรวจวัดในตัวอย่างปัสสาวะพบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้สูงกว่าวิธี immunoturbidimetric ซึ่งผลการศึกษเป็นไปในทางเดียวกันกับ Steven P. Clavant และคณะ ที่พบว่าวิธี HPLC สามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้สูงกว่าวิธี radioimmunoassay (RIA) โดยสามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครที่ไม่ได้เป็นโรคเบาหวาน แล้วพบว่าปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะสูงถึง 30 mg/L ซึ่งวิธี RIA ตรวจวัดได้เพียง 4.8 mg/L⁽³⁵⁾ นอกจากนี้ Matthew J. McQueen และคณะพบว่า การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยวิธี HPLC ให้ค่าการตรวจวัดสูงกว่าวิธี RIA 2-3 เท่า และสูงกว่าวิธี immunonephelometry ถึง 4 เท่า⁽³⁶⁾ แต่อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาวิจัยต่อมาพบว่า วิธี HPLC ที่สามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้สูงกว่าวิธีอื่นๆ นั้น อาจเนื่องมาจากหลักการของวิธี HPLC ซึ่งแยกสารตามขนาด

ของสาร (size-exclusion HPLC) นั้น ไม่สามารถแยกสารอื่นๆ ที่มีขนาดใกล้เคียงกับอัลบูมินได้ ซึ่งโปรตีนที่มีขนาด 40-90 kDa อาจทำให้เกิดการซ้อนทับกันของ peak การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน⁽³⁵⁾ และโปรตีนอื่นๆ ที่พบในปัสสาวะ เช่น transferrin, α_1 -proteinase inhibitor, α_1 -acid glycoprotein และ α_2 -HS glycoprotein ไม่สามารถแยกออกจากอัลบูมินโดยใช้วิธี size-exclusion HPLC นอกจากนี้ peak ของโปรตีนอื่นๆ เช่น IgG, α_1 -microglobulin และ light chain ของ immunoglobulin ทำให้เกิดการซ้อนทับกับ peak ของอัลบูมินได้⁽³⁷⁾ และจึงทำให้ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้สูงกว่าความเป็นจริง การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ non immunoassay อื่นๆ เช่น การใช้หลักการ fluorescent dye binding ใช้สารฟลูออเรสเซนต์ที่มีความจำเพาะกับอัลบูมิน เมื่อมีการจับกับอัลบูมินเป็นสารเชิงซ้อน ทำให้เกิดการวางแสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มสูง และวัดการวางแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ fluorescent detector สีฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้ในการตรวจวัดอัลบูมิน เช่น Albumin Blue 580^(38, 39) ซึ่งมีช่วงความเป็นเส้นตรง 2-200 mg/L และมีค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 1.4 mg/L วิธีนี้มีข้อดีคือ ไม่ต้องใช้แอนติบอดีในการตรวจวัดซึ่งมีราคาแพง สามารถตรวจวัดได้ง่าย รวดเร็ว และขั้นตอนการตรวจวัดไม่ยุ่งยาก ช่วงการทดสอบกว้าง จึงไม่ต้องทำการเจือจางปัสสาวะก่อนนำมาตรวจวัด มีรายงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้วิธีดังกล่าวสำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินโดย เช่นในระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system)⁽⁴⁰⁾ เป็นการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยวัดการวางแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นบน PDMS microchip ซึ่งท่อมีความกว้างและลึก 800 μm โดยอัลบูมินจับกับสี Albumin Blue 580 วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ fiber optic spectrometer ซึ่งมี organic light emitting diode (OLED) เป็นแหล่งกำเนิดแสง วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง 10-100 mg/L มีค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 10 mg/L และยังมีรายงานถึงการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมิน โดยใช้ระบบ Sequential injection analysis (SIA)⁽⁴¹⁾ ซึ่งมีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 1-100 mg/L สามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้ต่ำสุด 0.3 mg/L และทำการตรวจวัดได้รวดเร็ว โดยสามารถตรวจวัดได้ 37 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง ซึ่งการใช้สีฟลูออเรสเซนต์เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยไม่อาศัยแอนติบอดี เนื่องจากมีความยุ่งยากในการผลิต และมีราคาแพง

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในรูปแบบ lab-on-a-chip อื่นๆ เช่นใช้เทคนิค chip electrophoresis⁽⁴²⁾ เป็นการตรวจวัดไมโครอัลบูมินโดยใช้ sodium dodecyl sulfate จับกับอัลบูมิน จากนั้นใช้สีฟลูออเรสเซนต์จับกับ sodium dodecyl sulfate เมื่อผสมสารทั้งสองชนิดกับอัลบูมินแล้ว นำมาผสมกับ internal calibrator ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้อัลบูมินจากไก่ (chicken albumin) จากนั้นใส่สารที่ผสมแล้วลงใน electrophoresis chip เพื่อแยกแถบของโปรตีนเทียบกับ ladder สามารถตรวจวัดปริมาณของอัลบูมินได้โดยการใช้แสงเลเซอร์ ซึ่งวิธีนี้มีช่วงความเป็น

เส้นตรง 5–300 mg/L และมีช่วงความเป็นเส้นตรง 5 mg/L chip electrophoresis วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถตรวจวัดตัวอย่างได้เร็ว 15 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี size-exclusion HPLC แล้วพบว่าสามารถตรวจวัดอัลบูมินได้ทั้งแบบ immunoreactive และ nonimmunoreactive และไม่มีการรบกวนจากโปรตีนอื่นๆ เช่น α_1 -acid glycoprotein, α_1 -antitrypsin และ transferrin

วิธี immunoassay

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ Immunoturbidimetry เป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์⁽⁴³⁾ ซึ่งใช้หลักการจับกันของแอนติบอดีต่ออัลบูมินกับอัลบูมินในปัสสาวะ เกิด antigen-antibody complex วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยใช้เครื่อง spectrometric analyzers ซึ่งมีช่วงความเป็นเส้นตรง 6.25-167 mg/L วิธีนี้มีข้อดีคือ วิธีการตรวจวัดสามารถทำได้ง่าย จึงเป็นที่นิยมใช้มาจนถึงปัจจุบัน แต่ข้อจำกัดของวิธี immunoturbidimetry คือ มีค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ค่อนข้างสูงคือ 5.8 mg/L⁽¹²⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี immunonephelometric method และ particle-enhance turbidimetric inhibition immunoassay ซึ่งมีค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ เป็น 2 mg/L และ 1.3 mg/L ตามลำดับ

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ immunonephelometry มีหลักการคือแอนติบอดีจำเพาะต่ออัลบูมินจับกับอัลบูมินในปัสสาวะ วัดสัญญาณการกระเจิงแสง (light scattering) ที่เกิดจาก antigen-antibody reaction ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของปริมาณอัลบูมิน⁽¹²⁾ จากการศึกษาของ Ottavio Giampietro และคณะพบว่าวิธี immunonephelometry มีความถูกต้องใกล้เคียงกับวิธี RIA⁽⁴⁴⁾ ซึ่งวิธี RIA มีความไวมากกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนในการตรวจวัดแล้ว วิธี immunonephelometry มีความสะดวกมากกว่า เนื่องจากขั้นตอนการตรวจวัดไม่ยุ่งยากและสามารถตรวจวัดได้รวดเร็วกว่าด้วยการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ particle-enhance turbidimetric (latex agglutination immunoassay)⁽¹²⁾ จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับอัลบูมินตรึงบนเม็ดลาเท็กซ์ เมื่อสิ่งตัวอย่างมีแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีที่ตรึงบนเม็ดลาเท็กซ์ จะเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มขึ้น⁽⁴⁵⁾ ซึ่งความเข้มข้นของปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะจะแปรผันโดยตรงกับค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น จากการศึกษาของ Hansa Thakkar พบว่าวิธี particle-enhance turbidimetric สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินมีช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการตรวจวัด 2–250 mg/L ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ 0.4 mg/L⁽⁴⁶⁾ E. A. Medcalf และคณะทำการศึกษาตรวจวัดปริมาณไม

โครอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการเดียวกัน มีค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ 2 mg/L และมีช่วงความเป็นเส้นตรงถึง 200 mg/L⁽⁴⁷⁾

วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน มีวิธีการตรวจวัดดังนี้คือ เคลือบผิว microtiter plates ด้วย polyclonal anti-human albumin antibody และติดฉลากแอนติบอดีตัวเดียวกันนี้ด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase เพื่อใช้สำหรับตรวจติดตาม เมื่ออัลบูมินจับกับแอนติบอดีแบบ sandwich method แล้ว ใส่สารตั้งต้น (substrate) สำหรับเอนไซม์ horseradish peroxidase ลงไป สารผลิตภัณฑ์ซึ่งมีสีเกิดขึ้น และมีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนตามความเข้มข้นของอัลบูมิน จากการศึกษาของ Tsu-Lan Wu สามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้ต่ำสุด 1.6 µg/mL⁽¹⁴⁾ ส่วน Aybay และคณะ พบว่าวิธีการตรวจวัดมีช่วงความเป็นเส้นตรง 10-1,000 ng/mL และสามารถตรวจวัดได้ต่ำสุดถึง 10 ng/mL⁽⁴⁸⁾ วิธีนี้ มีความไว แม่นยำสูง แต่ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากวิธีการทำมีหลายขั้นตอน ใช้เวลา incubate นานมากกว่า 1 ชั่วโมง และต้องมีการล้างสารที่ไม่จับกับแอนติบอดีออกก่อนที่จะมีการเติมสารในขั้นตอนต่อไป จึงทำให้วิธี ELISA ไม่เป็นที่นิยมนัก

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ radioimmunoassay ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงสำหรับการตรวจวัดระดับอัลบูมิน⁽⁴⁹⁾ เป็นการใช้อันติบอดี 2 ชนิด ในการตรวจหาปริมาณไมโครอัลบูมิน โดยอัลบูมินในปัสสาวะ และอัลบูมินที่ติดฉลากด้วย¹²⁵I จะแย่งกันจับกับแอนติบอดีที่บริเวณ binding site หลังจากทำการอุ่น จึงทำการแยก bound form ออกจาก free form ความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะจะเป็นสัดส่วนผกผันกับปริมาณรังสีจาก¹²⁵I⁽¹⁵⁾ วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดอัลบูมิน 15.6-10,000 ng และค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 16 ng วิธี RIA มีความไวมากกว่าวิธี immunonephelometry 5 เท่า และไวกว่าวิธี Immunospectrophotometry 50 เท่า⁽⁴⁴⁾ แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าวิธี RIA จะมีความไวมากกว่าวิธี immunoassay อื่นๆ แต่ยังมีจำกัดคือสารรังสีที่ใช้เป็นอันตรายต่อผู้ทำการตรวจวัด การตรวจวัดมีราคาแพง และใช้เวลานานในการตรวจวัดแต่ละครั้ง จึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยวิธี fluorescent immunoassay โดยติดฉลากอัลบูมินด้วยสาร fluorescence อัลบูมินในปัสสาวะและอัลบูมินที่ติดฉลากด้วย fluorescence จะแย่งจับกับ anti-albumin antibody แยก free form ออกจาก bound form แล้ววัดสัญญาณ fluorescence จากส่วนที่เหลือซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอัลบูมินในตัวอย่าง⁽⁵⁰⁾ Blanche M. และคณะพบว่า การตรวจวัดไมโครอัลบูมินด้วยวิธี fluorescent immunoassay มีช่วงความเป็นเส้นตรง 500-20,000 ng/mL และสามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้ต่ำสุด 500 ng/mL⁽¹³⁾ วิธีนี้มีความไว มากกว่าวิธี radial immunodiffusion แต่วิธีการตรวจวัดมีหลายขั้นตอน จึงยังเป็นข้อจำกัดของวิธีนี้

นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้หลักการ immunoassay สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ Quartz crystal microbalance (QCM) แอนติบอดีต่ออัลบูมินที่ตรึงอยู่บนผิวของผลึกควอตซ์ จะจับกับอัลบูมินทำให้เกิดการสั่น พลังงานกลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นพลังงานไฟฟ้า สามารถหาความเข้มข้นของอัลบูมินได้จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอัลบูมินกับค่าความถี่การสั่นของผลึกควอตซ์ จากการศึกษาของ Makoto Muratsugu และคณะพบว่าวิธี QCM มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0.1-100 pg/mL⁽⁵¹⁾ Yang Luo พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะได้พร้อมๆ กันถึง 4 ชนิด ได้แก่ albumin, α 1-microglobulin, β 2-microglobulin และ IgG ภายใน 15 นาที โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน 0-40 mg/L และสามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้ต่ำสุด 4 μ g/L⁽⁵²⁾

2.5 ครีเอทีนิน

2.5.1 การสร้างครีเอทีนิน

ครีเอทีน (creatinine) สร้างขึ้นที่ไต ตับ และ ตับอ่อน โดยมีการบวนการดังนี้ arginine และ glycine เกิดกระบวนการการ transamidation ทำให้เกิด guanidinoacetic acid จากนั้นเกิดกระบวนการ methylation คือมีการเติมหมู่ methyl (-CH₃) ให้กับ guanidinoacetic acid โดยมี S-adenosylmethionine เป็นตัวให้หมู่ methyl จึงได้ผลิตภัณฑ์เป็น creatine จากนั้น creatine จะถูกขนส่งไปยังอวัยวะ เช่น กล้ามเนื้อ และ สมอง ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา phosphorylated เป็น creatine phosphate ซึ่งเป็นสารที่มีพลังงานสูงสำหรับเป็นแหล่งพลังงานให้กับกล้ามเนื้อ⁽⁵³⁾ creatine และ creatine phosphate สามารถเปลี่ยนเป็น creatinine เพื่อปล่อยพลังงานออกมาใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อ

ครีเอทีนิน (creatinine) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Non protein nitrogen : NPN) ถูกสร้างในปริมาณคงที่ในแต่ละวัน ปริมาณครีเอทีนินในร่างกายขึ้นอยู่กับปริมาณมวลกล้ามเนื้อ ซึ่งในเลือดของเพศชายจะมีปริมาณครีเอทีนินสูงกว่าเพศหญิงและเด็ก เนื่องจากมีมวลกล้ามเนื้อมากกว่า ครีเอทีนินเป็นสารไร้ประโยชน์ (waste product) ซึ่งร่างกายจะกำจัดทิ้งเกือบทั้งหมดโดยไต⁽¹¹⁾ โดยจะถูกกรองผ่านไตอย่างคงที่ สม่ำเสมอและไม่มีการดูดกลับ จึงตรวจพบปริมาณครีเอทีนินในเลือดปริมาณน้อย คือ 0.7 to 1.4 mg/dL⁽⁵⁴⁾ และจะพบในปัสสาวะปริมาณมาก โดยมีปริมาณครีเอทีนินในปัสสาวะ 1-2 g/24 ชั่วโมง เนื่องจากปริมาณครีเอทีนินขึ้นอยู่กับมวลกล้ามเนื้อ ไม่ขึ้นกับปริมาณน้ำ อายุ หรือการออกกำลังกาย ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงระดับครีเอทีนินจึงเกิดจากการทำงานของไตบกพร่องเท่านั้น จึงใช้ครีเอทีนินเป็นตัวบ่งชี้การ

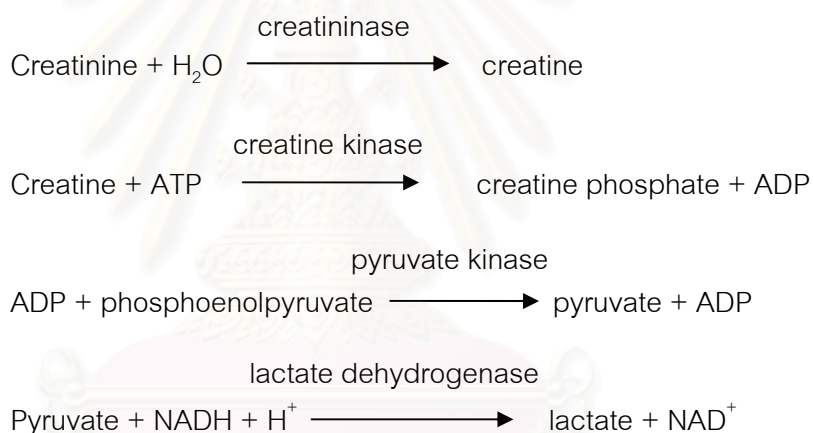
ทำงานที่ผิดปกติของไต⁽⁵⁵⁾ ในภาวะที่ไตทำงานผิดปกติ จะทำให้ความสามารถในการกำจัด ครีเอตินินออกจากเลือดลดลง ทำให้มีปริมาณครีเอตินินในเลือดสูงขึ้นและพบในปัสสาวะน้อยลง

2.5.2 วิธีการตรวจวัดครีเอตินิน

วิธีเอนไซม์

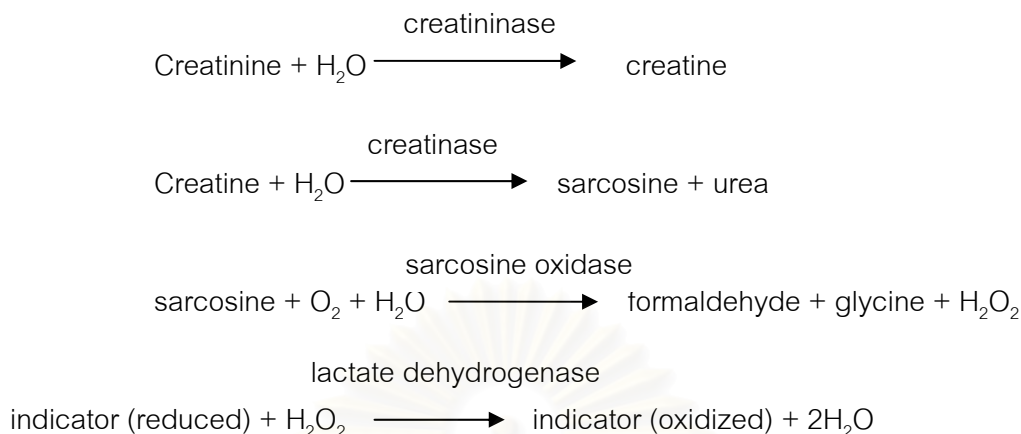
Creatininase (EC 3.5.2.10)

เอนไซม์ creatininase เปลี่ยน creatinine ให้เป็น creatine จากนั้นเอนไซม์ creatine kinase, pyruvate kinase และ lactate dehydrogenase เปลี่ยนสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจนได้ NADH ซึ่งสามารถติดตามการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงถึง 100 mg/L⁽⁵⁶⁾ มีข้อดีคือไม่ต้องตกตะกอนโปรตีน และมีความจำเพาะสูง ปฏิกิริยาของการตรวจวัด ดังแสดงต่อไปนี้



Creatininase (EC 3.5.2.10) และ Creatinase (EC 3.5.3.3)

ตรึงเอนไซม์ creatininase, creatinase และ sarcosine oxidase บน electrode โดยใช้ cellulose acetate membrane เป็นเยื่อเลือกผ่าน (selective permeability) สำหรับ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงถึง 100 mg/L และค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 1 mg/L⁽⁵⁷⁾ ปฏิกิริยาของการตรวจวัด ดังแสดงต่อไปนี้



Creatinine deaminase (EC 3.5.4.21)

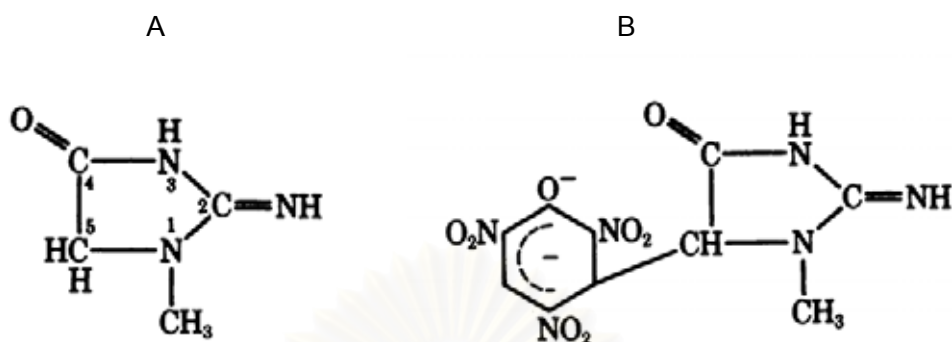
ใช้เอนไซม์ creatinine deiminase เปลี่ยนครีเอทีนินให้เป็น N-methylhydantoin และ ammonia สามารถตรวจวัดปริมาณ ammonia ที่เกิดขึ้นโดยใช้เอนไซม์ glutamate dehydrogenase ซึ่งวิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง 150 mg/L⁽¹⁶⁾ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับวิธีเอนไซม์อื่นๆ และมีความจำเพาะมากกว่าวิธีแจฟฟี หรือใช้วิธี Berthelot reaction ในการตรวจวัดปริมาณ ammonia ที่เกิดขึ้นก็ได้เช่นกัน (Berthelot reaction เป็นปฏิกิริยา ระหว่างแอมโมเนีย ฟีนอล และไฮโปคลอไรท์ในสารละลายที่เป็นด่าง ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน indophenol ซึ่งมีสีฟ้า)

วิธีไม่ใช้เอนไซม์

การตรวจวัดครีเอทีนินด้วยวิธี alkaline picrate (แจฟฟี)

ในการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินโดยใช้หลักการแจฟฟีนั้น alkaline picrate จะจับกับครีเอทีนินในปัสสาวะ เกิดเป็นสารประกอบสีส้มแดง (ภาพที่ 2.3)⁽⁵⁵⁾ ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้โดยวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดขึ้น โดยค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของครีเอทีนินในปัสสาวะ⁽⁵⁸⁾ แต่เนื่องจาก alkaline picrate สามารถจับกับสารชนิดอื่นๆ ในปัสสาวะได้ ดังนั้นจึงทำนียมทำการตรวจวัดครีเอทีนินในรูปแบบ kinetic เพื่อลดการรบกวนจากสารชนิดอื่นๆ ที่อาจพบได้ในปัสสาวะผู้ป่วยโรคเบาหวาน เช่น โปรตีน, กลูโคส, วิตามินซี และบิลิรูบิน⁽⁵⁹⁾ ซึ่งสารแต่ละชนิดมีอัตราเร็วในการจับกับ alkaline picrate ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินก่อนสารที่เกิดปฏิกิริยาที่หลัง และหลังสารที่เกิดปฏิกิริยาก่อนครีเอทีนิน วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่

สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก ไม่ต้องใช้เอนไซม์ในการตรวจวัดซึ่งเอนไซม์ต้องมีความบริสุทธิ์สูงๆ และมีราคาแพง



ภาพที่ 2.3 (A) โครงสร้างของครีเอทีนิน (B) โครงสร้างของครีเอทีนินเมื่อจับกับ alkaline picrate

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินโดยการจับกับสารต่างๆ เช่น 3,5-dinitrobenzoic acid⁽⁶⁰⁾, 3,5-dinitrobenzoyl chloride⁽⁶¹⁾, 1,4-naphthoquinone-2-sulfonate⁽⁶²⁾ และ o-nitrobenzaldehyde⁽⁶³⁾ ซึ่งการจับกับสารเหล่านี้มีข้อจำกัด คือต้องมีการตกตะกอนโปรตีนก่อน และเป็นปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะ มักถูกรบกวนด้วยสาร acetoacetate, glucose และ ascorbate มากกว่าวิธีแฉฟิ ดังนั้นจึงไม่เป็นที่นิยม

การตรวจวัดระดับครีเอทีนินในงานของไหลจุลภาคและไบโอเซนเซอร์

การตรวจวัดระดับครีเอทีนินโดยใช้หลักการ Potentiometric

มีรายงานวิจัยถึงการตรวจวัดระดับครีเอทีนินในปัสสาวะ ระบบ flow injection analysis โดยใช้หลักการ ammonium ion selective electrode⁽⁶⁴⁾ ศึกษาโดยการตรึงเอนไซม์ creatinine deiminase บน ammonium ion-selective membrane เมื่อเอนไซม์เปลี่ยนครีเอทีนินให้เป็น N-methylhydantoin และ ammonium ions ซึ่ง ammonium ions ที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดสัญญาณความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ ion-selective electrode โดยในงานวิจัยใช้ peristaltic pump ในการพาสารที่ต้องการตรวจวัดเข้าสู่ระบบเพื่อทดสอบหาปริมาณของอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง

การตรวจวัดระดับครีเอทีนินโดยใช้หลักการ Amperometric

ในการตรวจวัดจะใช้เอนไซม์ 3 ชนิดคือ Creatinine amidohydrolase, creatine amidohydrolase และ sarcosine oxidase ในการเปลี่ยนครีเอทีนินให้เป็น hydrogen peroxide (H₂O₂) จากนั้นวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดบน amperometric biosensor ขึ้นซึ่งแปรผันตรง

กับปริมาณครีเอตินินในสิ่งตัวอย่าง^(65, 66) การตรวจวัดระดับครีเอตินินโดยใช้ amperometric flow injection analysis (FIA) biosensor⁽⁶⁷⁾ โดยทำการตรึงเอนไซม์ creatinine deiminase, glutamate dehydrogenase และ glutamate oxidase บน controlled-pored glass (CPG) column ใช้ระบบ flow injection ในการพาสิ่งตัวอย่างเข้ามายัง column และมี oxygen electrode เป็นส่วนที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

2.6 การตรวจวัด microalbumin/creatinine ratio

การตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ เป็นที่ยอมรับในการวินิจฉัยของแพทย์ว่ามีความไวสูง สามารถตรวจพบความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโครงสร้าง และการสูญเสียหน้าที่ของไตได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรก⁽⁶⁸⁾ ดังนั้นผู้ป่วยเบาหวานทุกรายควรได้รับการตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะอย่างน้อยปีละหนึ่งครั้ง ตามคำแนะนำของสมาคมแพทย์โรคเบาหวานของสหรัฐอเมริกา⁽⁶⁹⁾ เพื่อเป็นการตรวจกรองและหาทางรักษาได้ทัน เนื่องจากเป็นระยะที่สามารถรักษาให้หายได้ เป็นการป้องกันการพัฒนาไปเป็นโรคไตวายเรื้อรัง เป็นที่ทราบดีว่าภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญในผู้ป่วยโรคเบาหวานคือโรคไตจากเบาหวาน (diabetic nephropathy) ซึ่งมีอุบัติการณ์การเกิดโรคสูง⁽⁷⁰⁾ ซึ่งผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการเป็นโรคเบาหวานมาก่อน

นอกจากนี้การตรวจอื่นๆ ในผู้ป่วยโรคไต ควรตรวจอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate : GFR) โดยดูจากปริมาณครีเอตินินซึ่งเป็นการตรวจการทำงานของไต ในการกำจัดของเสีย คนไข้ที่มีภาวะไตวาย จะมีค่าครีเอตินินในเลือดสูงกว่าปกติแต่ในปัสสาวะจะต่ำลง อย่างไรก็ตามค่าของครีเอตินินจะไม่คงที่ซึ่งอาจแปรผันตามเพศ, เชื้อชาติ และมวลกล้ามเนื้อของแต่ละคน ดังนั้นจึงไม่ควรรายงานค่าครีเอตินินเพียงอย่างเดียว ควรรายงานค่าควบคู่กับตัวบ่งชี้อื่นๆ เช่น BUN (Blood Urea Nitrogen) หรือปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ที่เรียกว่า microalbumin/creatinine ratio⁽⁷¹⁾ ซึ่งจะช่วยให้ผลการตรวจวัดน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น เนื่องจากการเก็บปัสสาวะแบบสุ่ม (spot urine) นั้นจะมีความแตกต่างของค่าไมโครอัลบูมินในระหว่างวัน โดยจะมีการขับออกมากในตอนกลางวันและจะลดลงในช่วงเวลากลางคืน การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินเทียบกับปริมาณครีเอตินิน จึงเป็นการลดความคลาดเคลื่อนในการตรวจวัด ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากกรณีดังกล่าว และนอกจากนี้การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินหรือ microalbumin/creatinine ratio นั้น สามารถใช้แทนการตรวจวัดไมโครอัลบูมินจากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ได้อีกด้วย เพราะมีความสะดวกในการเก็บตัวอย่างมากกว่า จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้รายงานทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

วิธีการตรวจวัด microalbumin/creatinine ratio

การใช้ปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่ม แล้วรายงานค่าเป็น albumin/creatinine ratio นั้นมีความสะดวก รวดเร็วกว่าการใช้ปัสสาวะที่เก็บครบ 24 ชั่วโมง ในห้องปฏิบัติการทั่วไปจะใช้หลักการ immunoturbidimetry ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน และใช้หลักการแจฟฟี (Jaffé) ในการตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน⁽¹⁹⁾ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ที่มีขนาดใหญ่ในการตรวจวัด และยังใช้น้ำยาในการตรวจวัดปริมาณมาก และไม่สามารถพกพาได้ มีรายงานวิจัยถึงวิธีการอื่นๆ สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินได้แก่ การใช้หลักการ Competitive-binding radioimmunoassay (RIA) และใช้หลักการ modified Jaffé reaction สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน⁽⁷²⁾ ซึ่งวิธีนี้มีความไว สามารถตรวจวัดอัลบูมินได้ในระดับต่ำๆ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน 50- 500 µg/L และ detection limit 9 µg/L แต่พบว่าขั้นตอนในการตรวจวัดค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจวัดนาน เนื่องจากต้อง incubate แอนติบอดีและอัลบูมินข้ามคืน

ส่วนการตรวจวัดไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินโดยใช้ enzymatic kit⁽²¹⁾ พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน 30-300 µg/L ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 10 ng/mL ส่วนอีกวิธี ที่ใช้หลักการ ELISA ร่วมกับหลักการ Jaffé⁽⁷³⁾ วิธีนี้สามารถตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอตินินได้ในระดับความเข้มข้นต่ำมากในระดับไมโครกรัมเช่นกัน แต่ใช้เวลาในการตรวจวัดนานถึง 2 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าวิธี radioimmunoassay และ ELISA นั้นสามารถตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินได้ความไวสูง แต่ยังมีข้อจำกัดคือ ใช้เวลาในการตรวจวัดนานมาก

วิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ในรูปแบบที่พกพาได้ ซึ่งทำการตรวจวัดโดยใช้แถบตรวจ strip^(20, 74, 75) นั้นใช้หลักการ dye-binding ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน โดยใช้สี sulfonephthalein ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินใช้เอนไซม์ peroxidase เปลี่ยน copper creatinine complex ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ แล้วเปลี่ยนสีของ strip จากสีส้มเป็นสีเขียว วิธีนี้ราคาถูกกว่าวิธี immunoturbidity และตรวจวัดได้รวดเร็ว แต่วิธีนี้เป็นวิธีกึ่งปริมาณ บอกความเข้มข้นของอัลบูมินที่ตรวจวัดได้เป็นช่วงๆ และจากผลการศึกษาพบว่า วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะต่ำ จึงนิยมใช้สำหรับตรวจคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้น ไม่สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเพื่อยืนยันได้ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในระบบ Sequential injection analysis ซึ่งตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ dye-binding โดยใช้สี Eosin Y และตรวจวัดปริมาณครีเอตินินโดยใช้หลักการ Jaffé reaction⁽²²⁾ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการตรวจวัดอัลบูมิน เท่ากับ 0-20mg/L และค่าต่ำสุดที่วัดได้คือ 0.6

mg/L และช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนีนคือ 0-100 mg/L และค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 3.5 mg/L เมื่อเปรียบเทียบความไวของวิธีนี้กับวิธี RIA หรือ ELISA พบว่าวิธีนี้มีความไวน้อยกว่า แต่วิธีนี้มีข้อได้เปรียบคือสามารถตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอทีนีนได้สะดวก รวดเร็ว โดยภายใน 1 ชั่วโมงสามารถตรวจวัดได้ 18 ตัวอย่าง ใช้น้ำยาในการตรวจวัดปริมาณน้อย (50 μ L) และเครื่องมือที่ใช้มีขนาดเล็ก สามารถพกพาได้

2.7 Flow injection analysis

การตรวจวิเคราะห์สารโดยวิธี flow injection analysis (FIA) เป็นเทคนิคที่เริ่มต้นในปี ค.ศ.1974 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Ruzicka และ Hansen⁽⁷⁶⁾ ซึ่งหลักการของวิธีนี้คือใช้สารที่เป็นตัวพา (carrier buffer) พาสารตัวอย่างและน้ำยาไปยังส่วน detector ซึ่งสารที่เป็นตัวพาจะมีการไหลอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยแรงดันของปั๊ม เมื่อน้ำยาและสารตัวอย่างผสมกันภายในท่อ จะเกิดปฏิกิริยาเคมีขึ้น สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้โดยใช้ระบบตรวจวัด ที่เหมาะสมกับสารผลิตภัณฑ์ (product) ที่เกิดขึ้น วิธีนี้เหมาะสำหรับใช้ในการตรวจวัดตัวอย่างที่มีปริมาณมาก เพราะสามารถตรวจวัดได้รวดเร็ว ใช้เวลาในการตรวจวัดน้อย และใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย

ระบบ FIA นั้น บัพเฟอร์ตัวพาจะไหลในอัตราเร็วคงที่ซึ่งควบคุมโดยปั๊ม การไหลของสารภายในระบบ FIA เป็นการไหลแบบ laminar flow และสารจะผสมกันโดยการแพร่⁽⁷⁷⁾ สิ่งตัวอย่างและน้ำยาจะถูกฉีดเข้ามาในระบบโดยผ่านทาง injection valve สิ่งตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านท่อขนาดเล็กไปยังระบบ detector ซึ่งในระหว่างที่สารกำลังเคลื่อนที่จากส่วน injection valve จนถึงส่วน detector โดยมีบัพเฟอร์เป็นตัวพานั้น จะเกิดการแพร่ของสารภายในท่อขนาดเล็ก และเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่ต้องการตรวจวัดและน้ำยาขึ้น การใช้ท่อขด (mixing coil) จะช่วยทำให้สารผสมกันดียิ่งขึ้น เมื่อสิ่งตัวอย่างและน้ำยาเคลื่อนที่มาถึงส่วน detector จะเกิดสัญญาณขึ้น ซึ่งมีลักษณะเป็น peak ความเข้มข้นของสารจะสัมพันธ์กับความสูงของยอด peak เนื่องจากปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าสู่ระบบ อัตราการแพร่ของสาร และการเกิดปฏิกิริยาในระบบ FIA มีความคงที่ ดังนั้นเมื่อทำการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างซ้ำกันหลายๆ ครั้ง จึงได้สัญญาณเท่าเดิม ทำให้ระบบ FIA มีความแม่นยำสูง ซึ่งอัตราการแพร่ของสารภายในระบบ FIA นั้นสามารถควบคุมให้คงที่ได้โดยการควบคุมอัตราการไหล ขนาดของท่อ และความหนืดของสารให้คงที่

สัญญาณการตรวจวัด หรือความสูงของ peak ที่เกิดขึ้นนั้นมีความสัมพันธ์กับการแพร่ของสารภายในท่อ จากสมการดังนี้

$$D = C_0/C_{\max}$$

ซึ่ง D คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ (dispersion coefficient)

C_0 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารที่ต้องการตรวจวัด

C_{max} คือ ความเข้มข้นของสารที่ ความสูงของ peak สูงสุด

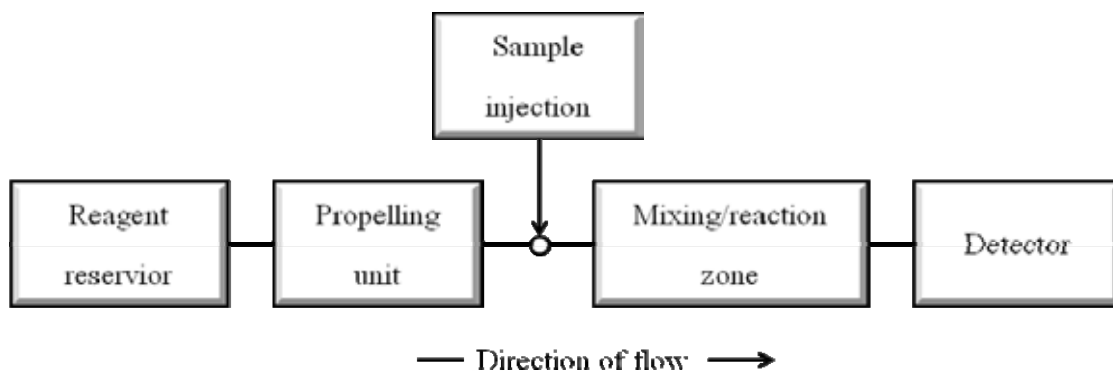
จากสมการพบว่า ถ้าสารเกิดการแพร่มาก จะทำให้สัญญาณการตรวจวัดลดลง⁽⁷⁸⁾ อย่างไรก็ตาม การผสมสารโดยอาศัยหลักการแพร่นั้น จะต้องมีความสมดุลระหว่างเวลาในการเกิดปฏิกิริยากับอัตราการแพร่ของสาร จึงจะทำให้สัญญาณการตรวจวัดเพิ่มขึ้นได้ การเกิดปฏิกิริยาเหมาะสมกับอัตราการแพร่ของสาร จะทำให้ peak มีความสูง พื้นที่ใต้ peak น้อย หากเกิดการแพร่มากกว่าการเกิดปฏิกิริยา จะทำให้ความสูงของ peak ลดลง และพื้นที่ใต้ peak กว้าง สัญญาณการตรวจวัดจึงลดลง

การตรวจวัดความเข้มข้นของสารในระบบ FIA จะต้องทำการเตรียมความเข้มข้นของสารให้อยู่ในช่วงที่ detector สามารถตรวจวัดได้ เมื่อสิ่งตัวอย่างที่จะนำมาตรวจวัดถูกฉีดเข้าระบบ FIA ความเข้มข้นของสารจะถูกเจือจางลงเนื่องจากการแพร่ของสารภายในท่อ สารที่มีความเข้มข้นมากๆ สามารถทำให้เจือจางลงได้โดยการเพิ่มการแพร่ของสาร ซึ่งทำได้โดยลดปริมาตรของสิ่งตัวอย่างที่ฉีดเข้าระบบ หรือ เพิ่มขนาดของท่อ เป็นต้น

การตรวจวัดสารที่มีความเข้มข้นน้อยๆ สามารถเพิ่มความไวของการตรวจวัดได้ โดยการเพิ่มปริมาตรของสิ่งตัวอย่าง ลดขนาดของท่อเพื่อลดปริมาตรของบัฟเฟอร์ตัวพา ลดระยะทางระหว่าง injection valve กับ detector เป็นต้น

ส่วนประกอบของระบบ flow injection analysis

ส่วนประกอบพื้นฐานของระบบ flow injection analysis ประกอบด้วยน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด (reagent reservoir), บั๊มตัวพาสารเข้าไปในระบบ (propelling unit), ส่วนที่ใช้ฉีดตัวอย่าง (sample injection), ส่วนที่ใช้ผสมสารและเกิดปฏิกิริยา (mixing/reaction zone) และส่วนติดตามการเกิดปฏิกิริยา (detector) ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบหลักของระบบ flow injection analysis

ปั๊มที่ใช้ในระบบ FIA มีหน้าที่พาบัฟเฟอร์ตัวพา น้ำยาที่ใช้ตรวจวัด และสารที่ต้องการตรวจวัดเข้ามาในระบบที่อยู่ภายในท่อขนาดเล็กอย่างคงที่⁽⁷⁹⁾ จากนั้นสารตัวอย่างจะถูกพาไปยังส่วนที่ใช้ผสมสารก่อนจะเข้าไปยังส่วน detector ปั๊มมีหลายประเภท เช่น syringe pump, peristaltic pump, isocratic pump, vacuum pump เป็นต้น ปั๊มที่นิยมใช้ในระบบ FIA คือ peristaltic pump ซึ่งสามารถควบคุมอัตราการไหล (flow rate) ให้คงที่ได้ตามต้องการ อัตราการไหลที่ใช้มีตั้งแต่ 0.0005-40 mL/min แต่ peristaltic pump ยังมีข้อจำกัดคือ การทำงานของปั๊มจะทำงานเป็นจังหวะ ซึ่งเมื่อใช้อัตราการไหลที่สูงขึ้นจะทำให้สัญญาณการตรวจวัดเกิดการสั่น ไม่คงที่

ส่วนที่ใช้ฉีดตัวอย่างเข้าไปในระบบ (sample injection) ซึ่งสิ่งตัวอย่างจะเข้าสู่ระบบ FIA ได้โดยผ่านทาง injection valve สามารถฉีดสิ่งตัวอย่างเข้าสู่ระบบได้ตั้งแต่ 5-200 μ L ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาตรของ loop ที่กำหนดขึ้น การฉีดสารผ่าน injection valve นี้สามารถทำซ้ำได้ไม่จำกัดจำนวนครั้ง จึงสามารถตรวจวัดสิ่งตัวอย่างได้อย่างต่อเนื่อง

ส่วนที่ใช้ในการติดตามการเกิดปฏิกิริยา (detector) เมื่อสารที่ต้องการตรวจวัดผสมกับน้ำยาแล้วจะเกิดปฏิกิริยาทางเคมี สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ (signal) ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการติดตามการเกิดปฏิกิริยาแบบ real time หรือทำการหยุดปั๊มเพื่อเก็บสัญญาณที่เกิดขึ้นก็ได้ สามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้หลายวิธี เช่น ใช้หลักการเคมีไฟฟ้า (electrochemical detection), การวัดเชิงแสง (optical detection), การวัดการวาวแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent detection), ion-selective electrode, atomic absorption spectroscopy เป็นต้น

ระบบ FIA มีข้อดีหลายประการ เช่น ทำการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างได้อย่างต่อเนื่อง (continuous monitoring) ประหยัดเวลาในการตรวจวัด มีความแม่นยำสูง (precision) ทำซ้ำแล้ว

ให้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) ตรวจวัดสารได้ปริมาณมาก และลดการปนเปื้อนในการตรวจวัด

การนำระบบ FIA ไปใช้นั้น นิยมนำมาหาปริมาณของสาร โดยการฉีดสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นเข้าไปยังระบบ แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างสัญญาณที่ตรวจวัดได้กับความเข้มข้นของสาร ระบบ FIA นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสารได้หลากหลาย เช่น ใช้ตรวจวัดสารในสิ่งแวดล้อม (environmental) ตรวจวัดสารปนเปื้อนในอาหาร สารชีวภาพในสัตว์ และพืช การตรวจวัดทางเคมีของสารน้ำชีวภาพในร่างกายมนุษย์ ตรวจวัดปริมาณแร่ธาตุ ประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรม และใช้ทดสอบผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับเกษตรกรรม⁽⁷⁸⁾ จะเห็นได้ว่ามีการนำระบบ FIA ไปใช้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งการตรวจวัดทางเคมีคลินิก เช่น การตรวจวัด Cl^- , PO_4^{3-} , total CO_2 , glucose, urea, ethanol⁽⁸⁰⁾ เป็นต้น ซึ่งข้อเด่นของวิธีนี้คือเป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดสารตัวอย่างได้ปริมาณมากและรวดเร็ว (high throughput)

2.8 ระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system)

ระบบของไหลจุลภาค หรือ microfluidic system เป็นสาขาหนึ่งของฟิสิกส์ที่ศึกษาการไหลของของไหลในระดับ microscale คือระบบที่ของไหลมีการไหลภายในท่อขนาดเล็กที่มีขนาด 1 μm ถึง 1 mm นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสารทางเคมี และทางชีวภาพ หรือที่เรียกว่า lab-on-a-chip ซึ่งมีการใช้ปริมาตรของของเหลวในการตรวจวัดลดลง พื้นที่ผิวต่อปริมาตรของของเหลวมากกว่าในระบบของไหลอื่นๆ ที่มีขนาดใหญ่ (macroscale) พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารมากขึ้น การถ่ายเทความร้อนจึงทำได้รวดเร็วกว่า วัสดุที่นิยมนำมาสร้างท่อขนาดเล็กนี้มีทั้ง โลหะ ซิลิกอน แก้ว และ พอลิเมอร์ เช่น พอลิเมททิลเมตอะอะคลิเลท (polymethylmethacrylate: PMMA), พอลิไดเมทิลไซลอกเซน (polydimethylsiloxane: PDMS) ซึ่งนิยมใช้ PDMS มาสร้างท่อขนาดเล็กเพื่อใช้ในการตรวจวัดสาร เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม เช่น เป็นวัสดุที่มีความยืดหยุ่น โปร่งแสง สร้างได้ง่าย ราคาถูก และสามารถใช้งานทางด้านชีววิทยาได้

การสร้างแม่แบบซิลิกอน เพื่อนำมาใช้ในงานของไหลจุลภาค

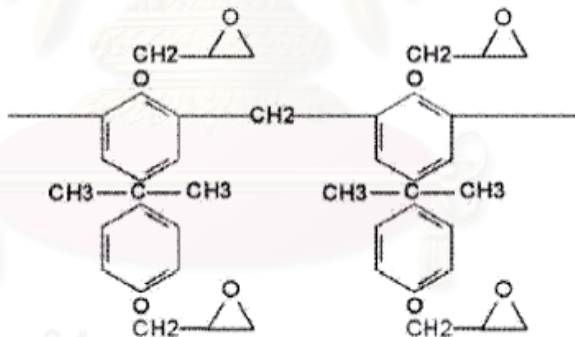
การสร้างแม่พิมพ์แผ่นซิลิกอน

เทคนิคการฉายแสง (photolithography) เป็นเทคนิคการใช้แสงในการทำลวดลายวงจรไฟฟ้าบนแผ่นซิลิกอน นิยมนำมาใช้ในการพิมพ์ลวดลายที่ออกแบบไว้ลงบนแม่แบบซิลิกอน ซึ่งใช้เป็นแม่แบบในการสร้าง PDMS microchip ในการสร้างแม่พิมพ์แผ่นซิลิกอนจะใช้

สารไวแสง ซึ่งมี 2 ชนิดคือ แบบพอสสิทีฟ (positive photoresist) และแบบเนกาทีฟ (negative photoresist) สารไวแสงแบบพอสสิทีฟ เมื่อโดนแสงโครงสร้างของบริเวณที่โดนแสงจะถูกทำลาย ทำให้สามารถละลายในน้ำยาดีเวลลอป (photoresist developer) ได้ ส่วนบริเวณที่ไม่โดนแสงจะไม่ละลายในน้ำยาดีเวลลอป ส่วนสารไวแสงแบบเนกาทีฟนั้น เมื่อโดนแสงแล้วจะทำให้เกิดการสร้างโครงร่างตาข่ายในบริเวณที่โดนแสงทำให้ไม่ละลายในน้ำยาดีเวลลอป แต่ส่วนที่ไม่โดนแสงจะสามารถละลายได้ในน้ำยาดีเวลลอป

เทคนิคการหมุนเหวี่ยง (spin coating) เป็นวิธีที่ใช้ในการเคลือบสารไวแสงบนแผ่นซิลิกอน ซึ่งการเลือกใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง จะทำให้สารไวแสงที่เคลือบบนแผ่นซิลิกอนมีความหนาตามต้องการ

สารไวแสงที่นิยมนำมาใช้ในงานสร้างลวดลายบนแผ่นซิลิกอนคือ SU-8 (ภาพที่ 2.5) ซึ่งเป็นสารโพลีเมอร์ที่มีความหนืด สามารถนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อเคลือบบนผิวซิลิกอนให้มีความหนาตั้งแต่ 1 μm ถึง 2 mm เมื่อทำการฉายแสงลงบน SU-8 จะเกิดการสร้างโครงร่างตาข่ายขึ้น เกิดเป็นลวดลายตามที่ต้องการ ซึ่งเป็นสารปัจจุบันนิยมนำมาใช้ในการสร้างลวดลายบนแผ่นซิลิกอนเพื่อใช้ในงานของไหลจุลภาค เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เข้ากันได้กับสารชีวภาพ



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ SU-8 (negative photoresist)

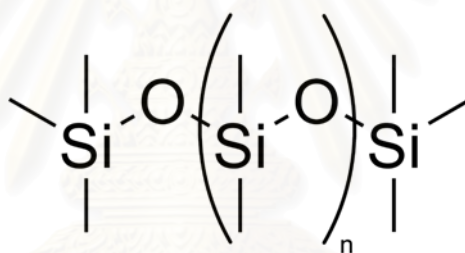
หลักการในการสร้างแม่แบบซิลิกอนและ PDMS microchip

ขั้นตอนการสร้างแม่แบบซิลิกอน ดังแสดงในภาพที่ 2.7 ทำได้โดยเคลือบสารไวแสง SU-8 (negative photoresist) บนผิวของซิลิกอนโดยใช้การหมุนเหวี่ยง (spin coating) ขั้นตอนต่อมา นำ transparency film ที่มีลวดลายที่ได้ออกแบบไว้ วางลงบนแผ่นซิลิกอนที่เคลือบด้วยน้ำยาไวแสง แล้วทำการฉายแสงลงบนแม่แบบซิลิกอน บริเวณที่โดนแสงจะเกิดการสร้างโครง

ร่างตาข่าย เมื่อล้างด้วยล้างน้ำยาดีเวลลอปแล้วจะไม่หลุดออกจากแผ่นซิลิกอน ส่วนบริเวณที่ไม่โดนแสงจะถูกล้างด้วยน้ำยาดีเวลลอป ทำให้หลุดออกไป เหลือแต่บริเวณที่โดนแสงเท่านั้น จึงเกิดลวดลายบนแผ่นซิลิกอน ซึ่งมีขนาดเล็กในระดับไมโครเมตร

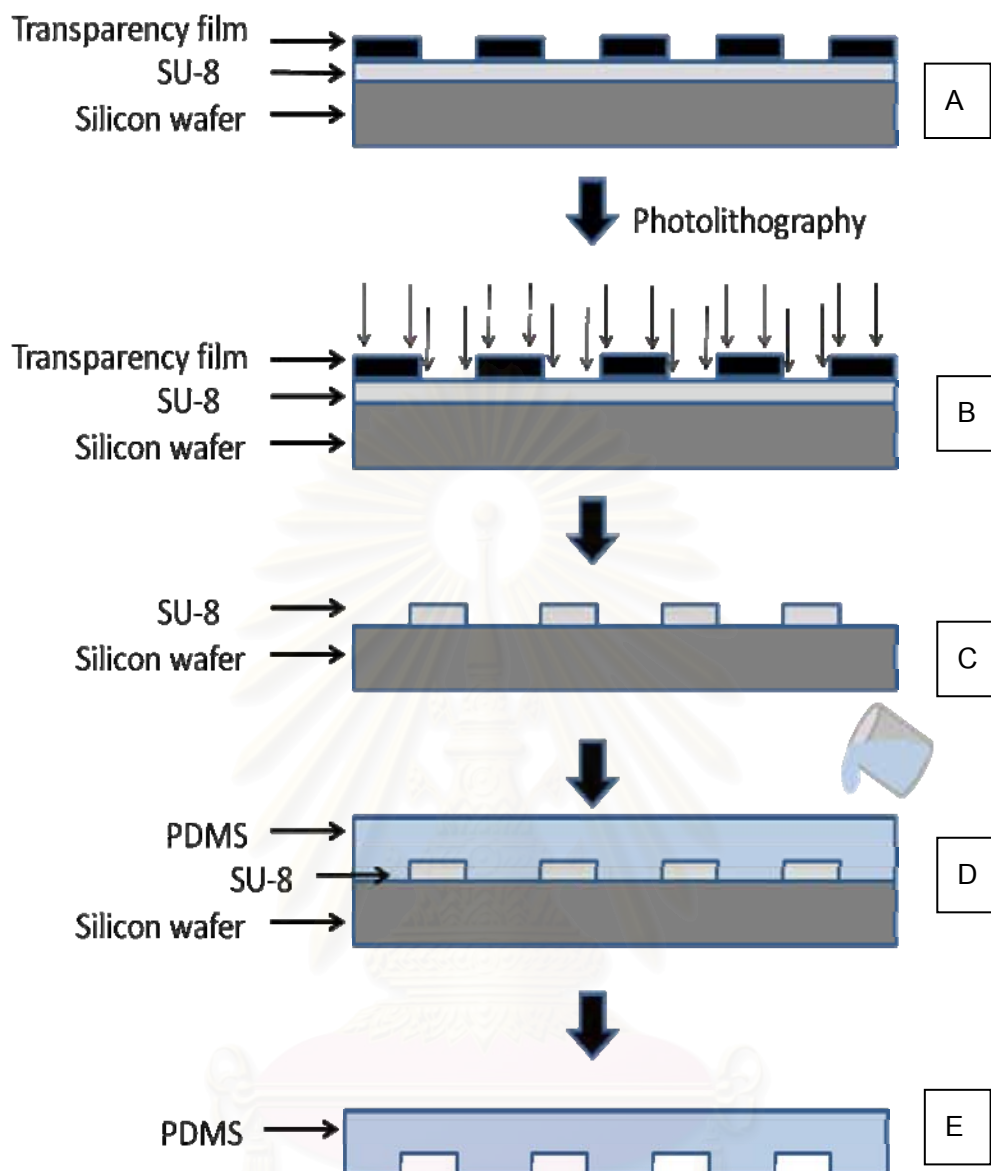
Poly(dimethylsiloxane) (PDMS)

Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.6 เป็นโพลีเมอร์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาใช้ในระบบของไหลจุลภาค (microfluidic system) ^(81, 82) เนื่องจากมีความโปร่งใส ยืดหยุ่น สามารถต่อเข้ากับอุปกรณ์ขนาดเล็กที่ใช้ในงานด้านของไหลจุลภาค เช่น microvalves และ micropumps ได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการตรวจวัด สามารถหล่อขึ้นรูปได้ง่ายตามความต้องการ มีราคาไม่แพง ทนต่ออุณหภูมิสูง ($\sim 186^{\circ}\text{C}$) ⁽⁸³⁾ และนิยมนำมาใช้ในงาน ด้าน lab-on-a-chip



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของ Poly(dimethylsiloxane) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในงาน lab-on-a-chip

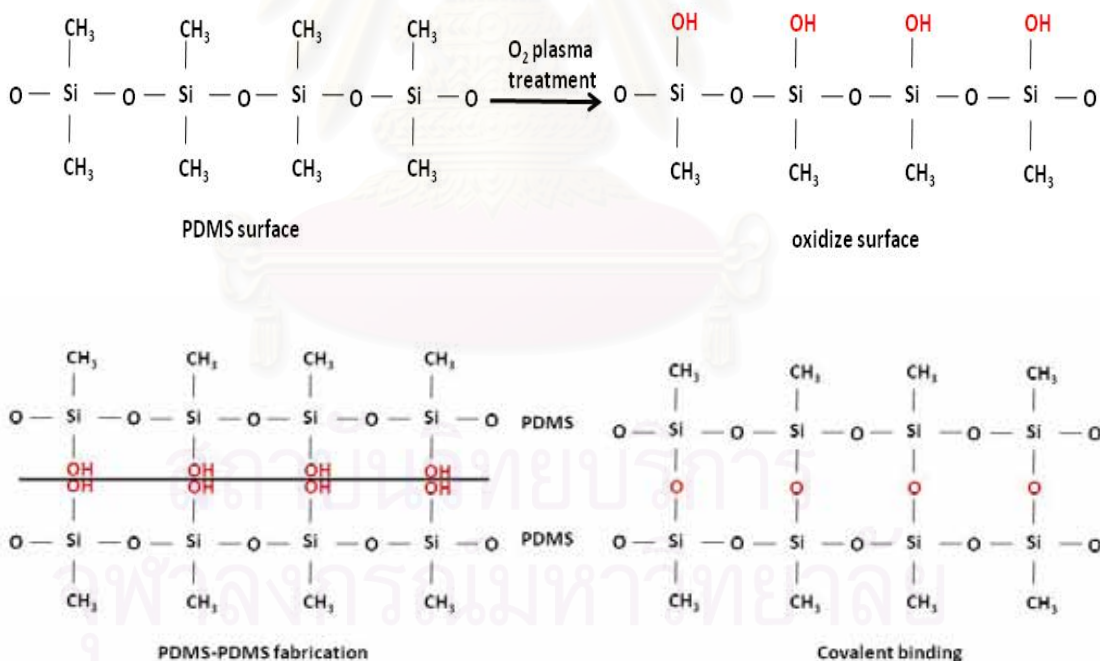
เมื่อทำการเท PDMS ลงบนแผ่นซิลิกอนที่มีลวดลายตามที่ต้องการไว้แล้ว PDMS ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นของเหลว เมื่อผสมกับน้ำยา curing และนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิสูง จะทำให้ PDMS เกิดการแข็งตัว เมื่อลอกออกจากแม่แบบซิลิกอน จะมีลวดลายเหมือนแม่แบบซิลิกอน ซึ่งสามารถนำมาใช้ในงานของไหลจุลภาคหรือ lab-on-a-chip ได้



ภาพที่ 2.7 แสดงหลักการในการสร้างแม่แบบซิลิกอนและการหล่อ PDMS เพื่อใช้ในงานของไหลจุลภาค (A) เคลือบผิวซิลิกอนด้วย SU-8 และวาง transparency film ลงบนผิวของซิลิกอนที่เคลือบ SU-8 แล้ว (B) ฉายแสงลงบนผิวของซิลิกอนเพื่อให้เกิดลวดลายในบริเวณที่โดนแสง (C) เมื่อล้างด้วยน้ำยาดีเวลลอป บริเวณที่ไม่โดนแสงจะถูกล้างออกไป เหลือแต่บริเวณที่โดนแสง (D) เท PDMS ลงไปบนแม่แบบซิลิกอน (E) เมื่อลอก PDMS ออกจากแม่แบบซิลิกอน จะได้ลวดลายบน PDMS ตามที่ออกแบบไว้

การปรับปรุงพื้นผิวของ PDMS ด้วยการทำ oxygen plasma treatment

เนื่องจาก PDMS มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) ซึ่งมีผลทำให้ไม่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งาน เช่น ทำให้มีการดูดซับสารทดลองอย่างไม่จำเพาะ ลดประสิทธิภาพการไหลของสาร เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีรายงานวิธีที่จะปรับปรุงผิวของพีดีเอ็มเอสหลากหลายวิธี เช่น การปรับปรุงผิวด้วยพลาสมา การฉายแสงยูวี การเคลือบผิวพีดีเอ็มเอสด้วยสารอื่น เป็นต้น โดยวิธีง่าย ๆ ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางคือ การปรับปรุงผิวด้วยพลาสมาของออกซิเจน (Oxygen plasma treatment) ซึ่งผลของการทำ oxygen plasma treatment จะทำให้ขจัดสิ่งสกปรกที่พื้นผิวของ PDMS โดยกำจัดสารที่อยู่บนพื้นผิวโดยการเผาด้วยพลาสมา ทำให้เกิดโครงร่างตาข่าย (cross link) ที่พื้นผิวเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของพื้นผิว และเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่พื้นผิวจากหมู่ Si-CH₃ เป็น SiOH หรือที่เรียกว่า หมู่ silanol⁽⁸⁴⁾ เพื่อปรับปรุงปฏิกิริยาทางเคมีและทางกายภาพที่บริเวณรอยต่อของพื้นผิวเมื่อนำ PDMS มาประกบกันจะติดกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ดังแสดงในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 การปรับปรุงพื้นผิวของ PDMS โดยการทำ oxygen plasma treatment

การไหลของของไหลในระบบของไหลจุลภาค

การจัดแบ่งระบบการไหลว่าเป็น macroscale หรือ microscale นั้น จะใช้เกณฑ์วัดจากเลขเรย์โนลด์ส (Reynolds number) ซึ่งเป็นตัวเลขที่แสดงอัตราส่วนระหว่างแรงเฉื่อย (inertial forces) กับแรงหนืด (viscous forces) ของของเหลวภายในท่อ เลขเรย์โนลด์สเป็นตัวชี้วัดว่าการไหลภายในท่อจะเป็นแบบระนาบเดียว (laminar flow) หรือแบบปั่นป่วน (turbulent flow) ท่อที่มีขนาดเล็ก จะมีเลขเรย์โนลด์สน้อย ส่วนท่อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น จะมีเลขเรย์โนลด์สเพิ่มขึ้น ถ้าเลขเรย์โนลด์สมีค่าน้อยกว่า 100 จะเป็นการไหลในระบบ microfluidic การไหลของของเหลวภายในท่อมักเป็นแบบ laminar flow⁽⁸⁵⁾ เนื่องจาก laminar flow เป็นการไหลของของเหลวสองสายที่ไหลขนานกัน การผสมจึงเป็นแบบการแพร่⁽⁸⁶⁾ โดยสารที่มีความเข้มข้นมากกว่าจะแพร่เข้าหาสารที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า จนกระทั่งสารทั้งสองเข้ากันเป็นเนื้อเดียว

การไหลของของไหลใน macroscale จะใช้การไหลแบบ turbulent flow^(85, 87) ซึ่งสามารถผสมสารได้รวดเร็วเนื่องจากเป็นการไหลแบบมีการหมุนวน มีจุดที่กระแสการไหลของทั้งสองสายมาบรรจบกัน ทิศทางการไหลจะตั้งฉากกับผนังท่อ ไม่ได้ไหลแบบขนานเหมือน laminar flow ดังนั้นจึงทำให้ประสิทธิภาพการผสมและการถ่ายเทความร้อนดีขึ้น การไหลแบบนี้ไม่สามารถใช้ในระบบ microfluidic ได้ ซึ่งการไหลแบบ turbulent flow จะมีเลขเรย์โนลด์ส มากกว่า 2,000 ขึ้นไป

การผสมที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วมีความสำคัญอย่างยิ่งในระบบ microfluidic เนื่องจากปฏิกิริยาเคมีจะเกิดขึ้นดีหรือไม่ ขึ้นอยู่กับการผสมสารทั้งสองจนเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีเพียงใด และการผสมสารที่ดีจะเป็นการเพิ่มความไวในการตรวจวัดอีกด้วย แต่การผสมสารภายในท่อที่มีขนาดเล็กของระบบ microfluidic นั้นทำได้ยากกว่าในระบบ macroscale เนื่องจากการไหลของของไหลในระบบ microfluidic การผสมสารเกิดจากการแพร่ซึ่งเกิดขึ้นช้า มีความเร็วไม่พอ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาส่วนช่วยให้มีการผสมสารภายในท่อของระบบ microfluidic ได้เกิดขึ้น

การผสมของสารภายในท่อขนาดเล็ก

การผสมสารภายในท่อขนาดเล็กมีความสำคัญสำหรับการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารทางเคมีและชีวภาพ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น จึงมีการคิดค้นสิ่งที่จะช่วยผสมภายในท่อขนาดเล็ก หรือเรียกว่า micromixer⁽⁸⁸⁾ โดยแบ่งเป็น active micromixer และ passive micromixer

การผสมของสาร แบบ passive micromixer

เป็นการผสมสารแบบไม่ต้องการแรงจากภายนอก ระบบ การไหลแบบ laminar flow ซึ่งมีการผสมโดยใช้การแพร่เท่านั้น ต้องใช้ระยะเวลาและใช้ระยะทางมากเพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน การใช้ passive micromixer มาช่วยในการผสมในการไหลแบบ laminar นั้น จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของสารทั้งสอง ทำให้ลดระยะทางในการแพร่ลง เกิดการแพร่ดีขึ้นและรวดเร็วขึ้น⁽⁸⁹⁾ สารสร้าง passive micromixer ทำได้โดยการทำให้เกิดร่องหรือการสร้างสิ่งกีดขวางขึ้นมาภายในท่อ หรือออกแบบให้ท่อมีความซับซ้อนมากขึ้น เพื่อให้เกิดการไหลแบบไม่เป็นระเบียบ (chaotic flow)⁽⁹⁰⁾ ซึ่งจะช่วยให้สารผสมกันดียิ่งขึ้น มีรายงานว่า การสร้างร่องภายในท่อรูปตัววี (V shape) หรือที่เรียกว่า staggered herringbone groove⁽⁹¹⁾ ซึ่งมีลักษณะคล้ายหัวลูกศรนั้น สามารถใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมสารภายในท่อขนาดเล็กได้ดี นอกจากนี้มีการศึกษาถึงการสร้างสิ่งกีดขวางภายในท่อขนาดเล็กที่เรียกว่า staggered oriented ridges⁽⁹²⁾ โดยมีลักษณะเป็นสันนูนขึ้นมาเป็นคู่ๆ อยู่ชั้นบนและล่างของท่อ ผลการศึกษาพบว่าสิ่งกีดขวางภายในท่อที่สร้างขึ้นมาประสิทธิภาพในการผสมสารอย่างมาก โดยสามารถทำให้เกิดการไหลแบบไม่เป็นระเบียบและเพิ่มความเร็วในการผสมของสารได้ดี หรือการสร้างสิ่งกีดขวางภายในท่อรูปตัวเจ (J-shaped baffles)⁽⁹³⁾ ทำให้เปอร์เซ็นต์ในการผสมสารเพิ่มขึ้นได้ตามจำนวนสิ่งกีดขวางและเลขเรย์โนลด์ส์ที่เพิ่มขึ้น โดยทำการศึกษาในท่อที่มีเลขเรย์โนลด์ส์ในช่วง 50-350 ซึ่งพบว่าสามารถผสมสารได้ดีกว่าท่อที่ไม่มีสิ่งกีดขวางถึง 50 เปอร์เซ็นต์

การผสมของสารแบบ active micromixer

การผสมสารของ active micromixer เป็นการให้แรงจากภายนอกเข้ามาช่วยทำให้สารผสมกันได้ดียิ่งขึ้น เช่น การใช้แรงดันเข้ามาช่วยในการผสม โดยใช้ปั๊มที่มีขนาดเล็ก⁽⁹⁴⁾ การใช้แรงดัน electro-hydrodynamic⁽⁹⁵⁾ การใช้แรงดัน electrokinetic⁽⁹⁶⁾ ช่วยในการผสมสาร เป็นต้น ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก และมีราคาแพง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี passive micromixer

ระบบของไหลจุลภาคมีข้อดีหลายประการ เช่น ลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ตรวจวัดสารเคมีและสารชีวภาพ มีการใช้สารปริมาณน้อยลงและลดความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการตรวจวัด เนื่องจากมีความไวเพิ่มขึ้น ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดลง ลดปริมาณของเสีย (waste) ที่เกิดจากการตรวจวัด ใช้เวลาในการตรวจวัดน้อยลง เนื่องจากท่อมีขนาดเล็ก โมเลกุลของสารใกล้กันมาก จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น สามารถควบคุมปัจจัยในการเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ ลดการสัมผัสกับสารพิษหรือสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และเป็นระบบที่สามารถพกพาได้ เนื่องจากส่วนประกอบที่ใช้ในระบบของไหลจุลภาคมีขนาดเล็ก

ระบบของไหลจุลภาค จึงเป็นระบบที่มีศักยภาพอย่างมากในอนาคต ที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการพัฒนาระบบการตรวจวัดที่มีต้นทุนต่ำ ลดค่าใช้จ่าย ซึ่งทำให้สามารถสร้างเครื่องมือวัด หรือตรวจสอบทางเคมี และทางชีวภาพ ที่มีความทันสมัย และมีประสิทธิภาพมากขึ้น และที่สำคัญ ระบบของไหลจุลภาคมีความเป็นไปได้สูงที่จะพัฒนาเป็นเครื่องตรวจวัดแบบพกพา (portable) สำหรับการใช้งานในภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการตรวจวัดในรูปแบบ Point of care testing⁽⁹⁷⁾ ต่อไปในอนาคต

การนำระบบของไหลจุลภาคไปใช้ประโยชน์

มีการนำระบบของไหลจุลภาคไปใช้อย่างกว้างขวาง เช่น นำไปใช้ในงาน drug discovery และ drug screening เช่น ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อบนชิป แทนการทดลองกับสัตว์ทดลอง⁽⁹⁸⁾ ทำให้ลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลอง การนำระบบของไหลจุลภาคไปใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA โดยการทำ polymerase chain reaction (PCR) และสามารถแยกแถบผลิตภัณฑ์ (PCR product) ที่เกิดขึ้นได้ภายในชิปเดียวกัน จึงทำให้ประหยัดเวลาในการทดสอบ^(99, 100), การหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequencing)⁽¹⁰¹⁾, การตรวจวัดทางอิมมูโนวิทยา (immunoassay)⁽¹⁰²⁾, การตรวจวัดสารโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic assay)⁽¹⁰³⁾, การนับจำนวนเซลล์ แยกชนิดของเซลล์ และการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell counting, cell sorting and cell culture)⁽¹⁰⁴⁾ และใช้ในการศึกษาโปรตีน (proteomics)⁽¹⁰⁵⁾ และการแสดงออกของโปรตีนที่ผิดปกติ⁽¹⁰⁶⁾ ระบบของไหลจุลภาคเป็นที่สนใจของหลายๆ กลุ่ม เช่น นักวิทยาศาสตร์ ภาควิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรม วัสดุศาสตร์ และการแพทย์ เป็นต้น

2.9 ห้องปฏิบัติการบนชิป (Lab-on-a-chip)

Lab-on-a-chip คือการย่อส่วนการตรวจวัดสารชีวภาพจากระบบที่มีขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงในระดับไมโครเมตร การย่อส่วนของห้องปฏิบัติการให้มีขนาดเล็ก ทำให้มีข้อดีหลายประการ เช่น การย่อส่วนเครื่องมือที่มีขนาดใหญ่ให้เล็กลงสามารถรวมอุปกรณ์หลาย ๆ ชิ้นให้อยู่ภายในชิปเพียงอันเดียว ทำให้สามารถพกพาได้ จึงพัฒนาเป็น Point-of-care testing ที่สามารถตรวจวัดได้ทันทีที่ผู้ป่วยมีอาการ ใช้เวลาในการตรวจวัดน้อยลง เนื่องจากชิปมีขนาดเล็ก ผิดสัมผัสระหว่างสารมีมากขึ้น ปฏิกริยาจึงเกิดได้ดีขึ้น ลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างสารที่จะนำมาตรวจวัด เช่นการปั่นตกตะกอน หรือการแยกสารออกจากกัน สามารถรวมขั้นตอนการตรวจวัดเข้าไว้ด้วยกันตั้งแต่ขั้นตอนก่อนการตรวจวัด (pre analysis) และขั้นตอนการตรวจวัด (analysis) เนื่องจากสามารถออกแบบให้มีส่วนที่ใช้แยกสาร ส่วนที่ใช้ในการผสมสาร และส่วนที่ใช้

ตรวจวัดปฏิกิริยาให้อยู่ภายในชิปเดียวได้ ลดปริมาณสารที่ต้องการตรวจวัดและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด สามารถตรวจวัดหลายๆ ตัวอย่างได้พร้อมๆ กัน นอกจากนี้ยังลดการปนเปื้อนจากขั้นตอนการตรวจวัดโดยใช้วิธี manual⁽¹⁰⁷⁾

ในปัจจุบันมีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีเป็นอย่างมาก มีการพัฒนาระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system) ร่วมกับการวิจัยสร้างห้องปฏิบัติการบนชิป (Lab-on-a-chip: LOC) หรือการวิเคราะห์แบบ micrototal analysis system (μTAS)⁽¹⁰⁸⁾ ซึ่งระบบดังกล่าวมีมีขนาดเล็ก ใช้น้ำยาและสารเคมีปริมาณน้อย สะดวก รวดเร็ว และสามารถออกแบบให้ตรวจสอบสารหลายชนิดได้พร้อมกัน ทำให้เปลี่ยนการตรวจวัดที่ต้องทำภายในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ซึ่งต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ ใช้น้ำยาในการตรวจวัดปริมาณมากและต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือเป็นผู้ทดสอบ มาเป็นการตรวจวัดที่ใกล้มือแพทย์ ใช้น้ำยาในการตรวจวัดน้อย และไม่จำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ หรือที่เรียกว่า Point-of-care testing วิธีนี้สามารถลดขั้นตอนที่ยุ่งยากให้รวมอยู่ในขั้นตอนเดียวในระบบที่สามารถพกพาได้ จึงไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ในขณะที่เดียวกันวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่มีราคาถูกลง เพราะใช้น้ำยาปริมาณน้อย ลดระยะเวลาในการตรวจวัด สามารถทราบผลการตรวจวัดได้ทันที ลดปริมาณสิ่งตัวอย่างที่จะใช้ในการตรวจวัดทำให้ผู้ป่วยเจ็บตัวน้อยลง เนื่องจากเครื่องมือที่มีขนาดเล็ก จะใช้สิ่งตัวอย่างน้อยมากในระดับไมโครลิตร หรือใช้เลือดเพียงแค่หยดเดียวก็สามารถทำนายความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยได้ จึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรค และการตรวจติดตามอาการของโรค

ห้องปฏิบัติการบนชิปสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคได้มากมาย เช่น ประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดในระดับโมเลกุล (Molecular diagnostics) ที่ใช้ทดสอบโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม ซึ่งใช้หาความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับ DNA หรือ RNA การประยุกต์ห้องปฏิบัติการบนชิปเพื่อใช้ทดสอบตัวบ่งชี้โรคหัวใจ (cardiac marker)⁽¹⁰⁹⁾ หรือโรคเบาหวานโดยการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด⁽¹¹⁰⁾ ซึ่งวิธีนี้คนไข้สามารถทำการตรวจติดตามการพัฒนาของโรคได้ด้วยตนเองที่บ้านโดยไม่ต้องมาพบแพทย์ การใช้ห้องปฏิบัติการบนชิปในการตรวจวัดระดับสารพิษในร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในคดีอาชญากรรม เช่น การตรวจสารเสพติด การตรวจหาเชื้ออสุจิในคดีข่มขืน⁽¹¹¹⁾ เป็นต้น

2.10 Optical detection and Fiber optic spectrometer

Fiber optic spectrometer คือเครื่องมือที่ใช้วัดความเข้มของแสงในช่วง UV, visible และ infrared ซึ่งสามารถใช้วัดความเข้มของสีหรือความเข้มชั้นของสารที่เกิดจากปฏิกิริยา

ทางเคมีได้ การพัฒนา fiber optic มาใช้กับงานทางด้านวิทยาศาสตร์นั้นทำให้การตรวจวัดสารทำได้ง่ายยิ่งขึ้น สามารถตรวจวัดแบบ real time เป็นเทคโนโลยีที่มีราคาถูก สามารถประยุกต์ใช้ได้กับงานด้านสิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรม การตรวจสอบอาหาร และงานด้านการแพทย์ การประยุกต์ใช้ fiber optic กับงานด้าน biosensor ได้พัฒนาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสามารถใช้ fiber optic เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดสารได้หลากหลาย โดยสามารถนำไปใช้กับเอนไซม์ แอนติบอดี เซลล์ กรดนิวคลีอิก และสารชีวโมเลกุลได้

Fiber optic biosensor สามารถประยุกต์เข้ากับการวัดเชิงแสงได้หลายวิธี เช่น การวัดการดูดกลืนแสง (absorption), การวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence), phosphorescence, Raman, surface Plasmon resonance (SPR) เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวถึงการวัดการดูดกลืนแสง หรือ absorption detection

การวัดการดูดกลืนแสง (absorption detection)

การวัดการดูดกลืนแสง (absorption detection) เป็นการวัดความเข้มของแสงที่ผ่านสิ่งตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด สารชนิดหนึ่งๆ จะมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน สารที่ดูดกลืนแสงได้มาก จะมีแสงส่องผ่านออกมาน้อย



ภาพที่ 2.9 แสดงการดูดกลืนแสงของสารละลาย แสงส่องผ่านไปยังสารละลายจะมีความเข้มแสงหนึ่ง เมื่อถูกดูดกลืนแสงด้วยสารละลาย แสงที่ปล่อยออกมา จะมีความเข้มแสงลดลง

การดูดกลืนแสงของสารจะเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) คือปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนนั้น จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลาย

$$A = abc$$

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร (absorbance)

a คือ ค่าคงที่การดูดกลืนแสงของสาร (absorptivity coefficient)

b คือ ระยะแสงผ่าน (cm)

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย (concentration)

ความสัมพันธ์ของการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสาร ที่เป็นไปตามกฎของเบียร์นั้น เป็นความสัมพันธ์ในเชิงสมการเส้นตรง โดยนำค่าความเข้มข้นมา plot กราฟในแกน x และนำค่าการดูดกลืนแสงมา plot กราฟในแกน y จะได้กราฟมาตรฐาน หรือ standard curve สามารถใช้สมการที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานมาหาค่าความเข้มข้นของสิ่งตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการวัดการดูดกลืนแสง

1. การเลือกใช้ความยาวคลื่นในการตรวจวัด ควรเลือกความยาวคลื่นที่สารนั้นดูดกลืนแสงได้มากที่สุด

2. ความเข้มข้นของสารละลาย หากใช้ความเข้มข้นของสารละลายน้อยเกินไป จะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้ แต่หากความเข้มข้นมากเกินไป การดูดกลืนแสงจะไม่เป็นไปตามกฎของเบียร์ เนื่องจากโมเลกุลของสารไม่เป็นอิสระ อาจทำปฏิกิริยากัน เกิดการชนกัน ทำให้เบี่ยงเบนการหักเหของสารละลาย

3. การเลือกใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม นิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ที่อยู่ในช่วง 0.2-0.8 เนื่องจากเป็นช่วงที่น่าเชื่อถือเพราะมีความคลาดเคลื่อนน้อย หากเลือกช่วงการดูดกลืนแสงน้อยหรือมากเกินไป จะทำให้มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงขึ้น ทำให้ผลการตรวจวัดไม่น่าเชื่อถือ

4. ตัวทำละลายหรือบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวกลางในการตรวจวัด สารที่จะนำมาตรวจวัดต้องอยู่ในรูปสารละลาย ตัวทำละลายที่เหมาะสมต้องไม่ดูดกลืนแสงในช่วงที่ต้องการตรวจวัด และไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการตรวจวัด

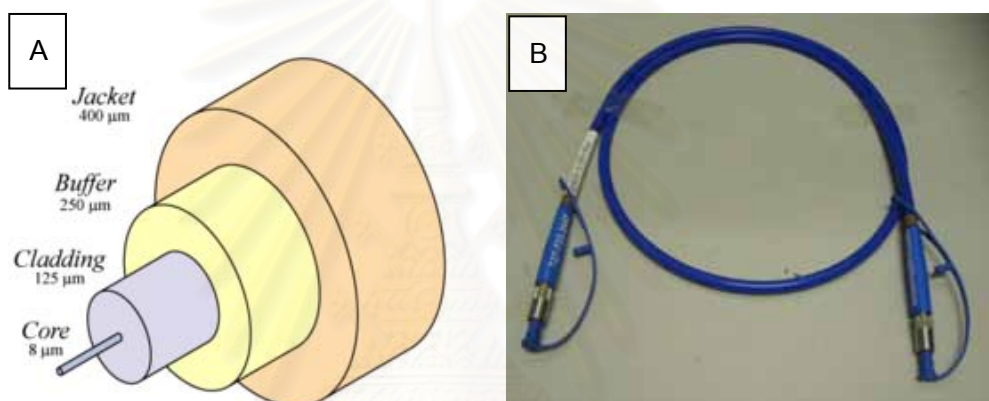
5. ระยะแสงผ่าน จากสูตร $A = abc$ จะเห็นว่า ระยะแสงผ่านมากขึ้น จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นด้วย การเพิ่มระยะแสงผ่านเป็นการเพิ่มความไวในการตรวจวัด

6. อุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจวัด อุณหภูมิมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของสารที่นำมาตรวจวัด การควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดระยะเวลาในการตรวจวัดจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดคงที่สม่ำเสมอ และควรเลือกใช้อุณหภูมิให้เหมาะสมกับแต่ละปฏิกิริยา เช่น เอนไซม์ และ แอนติบอดี จะเกิดปฏิกิริยาดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 30-37 °C เป็นต้น

หลักการของ Fiber optic

Fiber optic เป็นส่วนที่ให้นำแสงจาก light source ไปยังส่วน detector (ภาพที่ 2.10) ประกอบด้วยส่วนแกนกลาง เรียกว่า core และส่วนที่ทำหน้าที่ห่อหุ้ม เรียกว่า cladding ซึ่งในส่วน core จะมีค่าดัชนีหักเหของแสง (refractive index) มากกว่าส่วน cladding เมื่อแสงตก

กระทบตัวกลางทั้งสองที่มีค่าดัชนีหักเหของแสงแตกต่างกัน และมุมตกกระทบมากกว่ามุมวิกฤติ จะเกิดการสะท้อนกลับหมด (total internal reflection: TIR) ดังนั้นลำแสงที่ผ่านไปในแกน จะถูกขังหรือเคลื่อนที่ไปตาม Fiber optic ด้วยขบวนการสะท้อนกลับหมดภายใน โดยมีการสูญเสียพลังงานไปกับสิ่งแวดล้อมน้อยมาก ถัดออกมาด้านนอกซึ่งต่อจาก Cladding เป็นส่วนที่ใช้ป้องกันแสงจากภายนอกไม่ให้เข้ามาที่เส้น Fiber optic และป้องกันมิให้แสงจากท่อ Fiber optic ออกไปสู่ภายนอก นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเส้น fiber optic อีกด้วย fiber optic สามารถผลิตจากพลาสติก แก้ว หรือ ซิลิเกต ก็ได้ สำหรับการนำ fiber optic มาใช้ในงาน spectrometer จะใช้ fused silica (amorphous SiO₂) ซึ่งมีคุณภาพสูงมาผลิตเป็นเส้นใยแก้วนำแสง ซึ่งระบบตรวจวัด (detector) เหมือนเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ทั่วไป



ภาพจาก http://en.wikipedia.org/wiki/File:Singlemode_fibre_structure.svg

ภาพที่ 2.10 (A) แสดงส่วนประกอบของ fiber optic ซึ่งประกอบด้วยแกนกลางที่ทำหน้าที่นำแสง (core), ส่วนห่อหุ้มแกนกลาง (cladding), ส่วนรับแรงปะทะ (buffer) และ ส่วนที่ห่อหุ้มอยู่ชั้นนอกสุด (jacket) (B) แสดงภาพสาย fiber optic ที่พร้อมใช้งาน โดยจะมี probe อยู่ปลายสายทั้งสองด้าน

Detector เป็นส่วนที่ต่อเข้ากับ fiber optic เพื่อรับสัญญาณที่เกิดขึ้น การวัดการดูดกลืนแสงในช่วง UV-Visible ที่มีช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 nm นั้น detector ที่ใช้ส่วนใหญ่มี 3 ประเภทด้วยกัน คือ photomultiplier tubes (PMT), charge coupled devices (CCD) และ photodiodes

การทำงานของ Photomultiplier tubes detector คือ เปลี่ยนสัญญาณแสงให้เป็น electron ทำให้เกิดความต่างศักย์ และแสดงสัญญาณแบบ analog-to-digital (A/D) หลักการคือ ขั้วลบของ PMT จะดูดกลืนแสงที่ส่องมากระทบและปล่อย electron ออกมาเป็นสัดส่วนกับแสงที่

ได้รับ ซึ่ง electron ที่ปล่อยออกมาจะไปชนกับโลหะที่ไวต่อแสงแล้วปล่อย electron ออกมาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เป็นขั้นๆ โดย electron แต่ละตัวจากชั้นที่ 1 จะทำให้เกิด electron เพิ่มอีก 2-4 ตัวในชั้นที่ 2 และเป็นลักษณะเช่นนี้ในขั้นต่อไป การเพิ่มจำนวน electron เป็นการขยายสัญญาณที่เกิดขึ้น ทำให้เครื่องมีความไวสูง แต่มีราคาแพง

Photodiode มีส่วนที่เรียกว่า PN-junction diode ซึ่งทำหน้าที่ผลิตกระแสไฟซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแสงที่ดูดกลืนเข้าไป photodiode ไม่มีตัวขยายสัญญาณ จึงมีความไวน้อยกว่า PMT แต่มีข้อดีคือให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดที่ดี

Charge coupled devices (CCD) เป็น detector พื้นฐานที่ใช้ในการตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วง UV-VIS เพราะใช้ได้กับความยาวคลื่นในช่วง 190-900 nm ทำหน้าที่เปลี่ยนสัญญาณแสงเป็นสัญญาณ analog ส่งเข้าสู่วงจรเปลี่ยนค่า analog เป็นสัญญาณ digital หลักการคือ ส่วนที่เป็น sensor คือแผ่นซิลิกอนที่มีลักษณะเป็นช่องเล็กๆ หลายๆ ช่อง (multi-channel silicon array) จะทำหน้าที่รับแสง เมื่อแสงมากระทบกับแผ่นซิลิกอน จะทำให้เกิด electron ปริมาณเท่ากับแสงที่ดูดกลืนเข้าไป electron ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณ analog-to-digital (A/D) ข้อดีของ CCD คือมีขนาดเล็ก และราคาถูก

การนำไปใช้ประโยชน์

การพัฒนาทางด้าน biosensor ต้องการความง่าย รวดเร็ว สามารถตรวจติดตามได้อย่างต่อเนื่อง (continuous in-situ monitoring techniques) การนำ fiber optic spectrometer เข้ามาใช้ในงานด้านการแพทย์ เกสซ์กรรม สิ่งแวดล้อม กระบวนการชีวภาพ และเทคโนโลยีอาหาร⁽¹¹²⁻¹¹⁶⁾ มีข้อดีหลายประการ เช่น มีความไว ความจำเพาะ สามารถตรวจวัดที่ละเอียด ตัวอย่างพร้อมกันได้ ทำให้การตรวจวัดเชิงแสงทำได้ง่ายขึ้น ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีขนาดใหญ่ การนำ fiber optic spectrometer ไปใช้ในงาน biosensor สามารถสรุปได้ ดังนี้

การใช้ fiber optic spectrometer กับการตรวจวัดโดยใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากเอนไซม์มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) สูง สามารถเกิดปฏิกิริยาได้รวดเร็ว เช่น การตรวจวัดกลูโคส โดยใช้เอนไซม์ glucose oxidase⁽¹¹⁷⁾, การตรวจวัดบิลิรูบิน ด้วยเอนไซม์ bilirubin oxidase⁽¹¹⁸⁾, การตรวจวัดครีเอตินิน ด้วยเอนไซม์ creatinine iminohydrolase⁽¹¹⁹⁾, การตรวจวัด กลูตาเมตด้วยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase⁽¹²⁰⁾ เป็นต้น

การใช้ fiber optic spectrometer กับการตรวจวัดด้าน immunoassay มีข้อดีคือแอนติบอดีมีความจำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจวัด แอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนได้ดี (high

affinity) จะทำให้ความไวและความจำเพาะในการตรวจวัดเพิ่มขึ้น การประยุกต์ fiber optic spectrometer กับงานทางด้าน immunoassay เช่น การตรวจวัด *Salmonella spp.*⁽¹²¹⁾ *E. coli* O157:H7⁽¹²²⁾ *Staphylococcus aureus*⁽¹²³⁾ เป็นต้น

มีการประยุกต์ใช้ fiber optic กับ การตรวจวัดเซลล์ ซึ่งมีข้อดีคือ เซลล์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH และอุณหภูมิ เซลล์สร้างสารที่สามารถตรวจวัดได้ เช่น เอนไซม์ โคแฟคเตอร์ หรือสารที่สามารถเรืองแสงได้ ทำให้ตรวจวัดได้โดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อน จึงไม่ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนทำการตรวจวัด แต่ข้อจำกัดคือใช้เวลาในการตรวจวัดนานและมี selectivity ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเอนไซม์ เซลล์ที่มีรายงานว่านำมาใช้ใน งาน fiber optic biosensor เช่น *Escherichia coli*⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾, *Pseudomonas putida*⁽¹²⁷⁾, *Pseudomonas fluorescens*⁽¹²⁸⁾ และยังมี การใช้ fiber optic กับ การตรวจวัด nucleic acid เช่น การศึกษา DNA hybridization⁽¹²⁹⁾ แต่การตรวจวัด DNA ด้วยการ ใช้ fiber optic biosensor นั้นยังมีข้อจำกัดคือต้องติดฉลากสารที่ต้องการตรวจวัดและวิธีการตรวจวัดจำเป็นต้องใช้หลักการการแย่งจับ (competitive assay) ซึ่งยากต่อการตรวจติดตามแบบ real time สำหรับการศึกษาค้นคว้า hybridization

ปัจจุบันงานด้านไบโอเซนเซอร์ได้ก้าวหน้าไปอย่างมาก การพัฒนาวิธีการตรวจวัดให้มีขนาดเล็กลงช่วยให้สามารถลดปริมาณสารที่ต้องการตรวจวัด น้ำยา และของเสียที่เกิดขึ้นจากการตรวจวัดได้ สามารถนำนวัตกรรมที่คิดค้นขึ้นมาใหม่มาทดแทนการใช้เครื่อง automate ซึ่งมีขนาดใหญ่ ราคาแพง และใช้น้ำยาปริมาณมาก ทำให้สิ้นเปลือง การใช้ fiber optic spectrometer เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะเข้ามาทดแทนการใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ เพราะเป็นเครื่องมือที่ใช้ง่าย มีขนาดเล็ก พกพาได้ สามารถประกอบเข้ากับอุปกรณ์อื่นๆ ได้ง่าย และประยุกต์ใช้ได้กับงานหลายแขนง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประชากร

ปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 15 คน จากโรงพยาบาลราชวิถี จ.

กรุงเทพมหานคร

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัท และประเทศที่ผลิต
1	Spin coater (model WS-400A-6NPP)	Laurell technologies Corp, USA
2	UV-lithography MJB4 mask aligner	SUSS microtec, Germany
3	Oxygen plasma cleaner (PDC-32G)	Harrick scientific Corp, USA
4	Vacuum pump	Harrick scientific Corp, USA
5	Hotplate stirrer	Cole-Parmer Canada Inc., Canada
6	Hot air oven	Memmert, Germany
7	Miniature fiber optic spectrometer (USB4000) with LS-1-LL tungsten light source	Ocean Optics Inc., USA
8	Two channel syringe pump (Fusion 200)	Chemyx, USA
9	Injection valve (V-451)	Upchurch Scientific, USA
10	Temperature controller	Local made, Thailand
11	UV-VIS spectrophotometer (Evolution 600)	Thermo Scientific, USA
12	pH meter	Thermo Scientific, USA
13	Sonicator	Branson, Canada
14	Vortex Mixer	FINEPCR, Korea
15	Centrifuge	Hettich zentrifugen, USA
16	เครื่องผลิตน้ำ MilliQ	Millipore, USA
17	Autoclave	Tomy, California

ตารางที่ 3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัท และประเทศที่ผลิต
1	Silicon wafers	Encompass, USA
2	Transparency film	Thailand
3	Polystyrene cuvette	BrandTech Scientific, USA
4	Tygon Tubing 0.8 mm id.	Bio-Rad Laboratories, California
5	NanoPort™ Assemblies	Upchurch Scientific, USA
6	PTFE Tubing (0.5 mm i.d)	Upchurch Scientific, USA
7	PEEK connectors	Upchurch Scientific, USA
8	Syringe	Syringe Perfection, Mildura, Australia
9	Plastic syringes	Terumo®, Terumo Corporation, Japan
10	Auto pipette	Gilson, France
11	Pipette tip (200, 1000 µL)	Gilson, Inc., USA
12	Glassware	Pyrex, USA
13	Duran bottles	SCHOTT, Germany
14	Membrane filters	Whatman®, Japan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

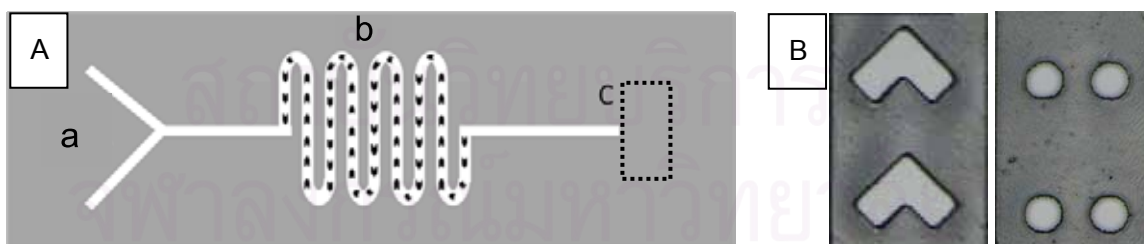
ลำดับ	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัท และประเทศที่ผลิต
1	Poly(dimethylsiloxane) (PDMS, Sylgard 184)	Dow Corning, USA
2	Photoresist (SU-8 2100)	Micro Chem, USA
3	Sulfuric acid	Sigma Aldrich, USA
4	Hydrogen peroxide	Sigma Aldrich, USA
5	Isopropyl alcohol	Sigma Aldrich, USA
6	Silicone rubber	Neoborn, Thailand
7	Epoxy resin	Alpha Techno Company, Japan
8	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Sigma Aldrich, USA
9	Picric acid	ChemAlert Guide, Fisher Scientific
10	Creatinine hydrochloride	Sigma Aldrich, USA
11	Hydrochloric acid	Sigma Aldrich, USA
12	Sodium hydroxide	Merck, Germany
13	Bovine serum albumin	Sigma Aldrich, USA
14	Human serum albumin	Sigma Aldrich, USA
15	Anti-human albumin coated latex beads	Biosystem, USA
16	Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich, USA
17	Tris base	usb corporation, USA
18	Hemoglobin	Sigma Aldrich, USA
19	Human immunoglobulin	Sigma Aldrich, USA
20	Transferrin	Sigma Aldrich, USA
21	Bilirubin	Fluka, Switzerland
22	Sodium chloride	Sigma Aldrich, USA
23	Ascorbic acid	Sigma Aldrich, USA
24	Glucose	Sigma Aldrich, USA

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสร้าง PDMS microchip

3.1.1 การออกแบบ PDMS microchip

ในงานวิจัยนี้ใช้โปรแกรม L-edit (version Pro v8.03) สำหรับการออกแบบรูปร่างและขนาดของท่อภายใน PDMS microchip โดยท่อของ microchip มีความกว้าง 500 μm ลึก 100 μm แบ่งเป็นสามส่วนดังนี้ (i) ส่วนแรกเป็นท่อเป็นรูปตัว Y (Y-shape inlet) ซึ่งใช้เป็นทางเข้าสำหรับน้ำยาและสิ่งตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด เข้าไปยัง microchip (ii) ส่วนที่สองเป็นบริเวณช่วยการผสมสาร (mixing zone) เนื่องจากการไหลของสารภายในท่อที่มีขนาดเล็กมาก จะเกิดการผสมได้ไม่ดี จึงออกแบบให้ท่อตรงส่วนนี้โค้งตรงส่วนปลาย โดยความยาวของส่วนที่ใช้ในการผสม 8 เซนติเมตร และออกแบบให้ท่อตรงส่วนที่ใช้ในการผสมนี้ มีสิ่งกีดขวาง 2 ชนิด ได้แก่ สิ่งกีดขวางภายในท่อขนาดเล็กที่มีลักษณะเป็นหัวลูกศร (arrowed head-shape baffles) และสิ่งกีดขวางที่มีลักษณะเป็นวงกลม (circle-shape baffles) เพื่อให้ทำให้น้ำยากับสารที่ต้องการตรวจวัดผสมกันดียิ่งขึ้น (iii) และจะทำการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผสม ในขั้นตอนต่อไป ส่วนที่สามเป็นส่วนที่ใช้ในการติดตามการเกิดปฏิกิริยา (detection zone) เป็น flow cell ที่ทำขึ้นเองจาก polystyrene cuvette ที่มีระยะแสงผ่าน 1 cm เพื่อเป็นการเพิ่มระยะแสงผ่านทำให้เพิ่มความไว (sensitivity) ในการตรวจวัด และส่วนสุดท้ายเป็นทางออกสำหรับน้ำยาและสารที่ทำการตรวจวัดที่ทำปฏิกิริยาแล้ว (ซึ่งทั้งสองส่วนนี้จะอยู่ในขั้นตอนการสร้าง PDMS microchip) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 เมื่อได้ลวดลายตามที่ออกแบบไว้แล้ว จะนำไปพิมพ์บน transparency film เพื่อที่จะใช้เป็นแบบ ซึ่งจะนำไปใช้ตอนทำแม่พิมพ์บนแผ่นซิลิกอนในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3.1 แสดงการออกแบบ PDMS microchip โดยใช้โปรแกรม L-edit (A) โดยส่วนแรก (a) เป็นทางเข้าสำหรับน้ำยาและสารที่ต้องการตรวจวัดรูปตัว Y (Y-shape inlet) ส่วนที่สอง (b) เป็นส่วนที่ใช้ในการผสมสาร (mixing zone) ส่วนที่สาม (c) เป็นส่วนที่ใช้ติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (detection zone) (B) เป็นสิ่งกีดขวางที่อยู่ภายในท่อขนาดเล็กซึ่งมีลักษณะเป็นหัวลูกศร และวงกลม

3.1.2 การสร้างแม่พิมพ์แผ่นซิลิกอน

เทคนิคการฉายแสง (photolithography) เป็นเทคนิคการใช้แสงในการทำลวดลายวงจรไฟฟ้าบนแผ่นซิลิกอน นิยมนำมาใช้ในการพิมพ์ลวดลายที่ออกแบบไว้ลงบนแม่แบบซิลิกอน ซึ่งใช้เป็นแม่แบบในการสร้าง PDMS microchip ในงานวิจัยนี้จะใช้สารไวแสง SU-8 2100 (negative photoresist) เคลือบบนผิวของซิลิกอนแล้วทำการฉายแสงเพื่อให้เกิดลวดลายบนแม่แบบซิลิกอน โดยขั้นตอนแรกจะเป็นการทำทำความสะอาดแผ่นซิลิกอน (ภาพที่ 3.2) ด้วยสารผสมระหว่างกรดซัลฟิวริกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอัตราส่วน 3:1 (Piranha solution) นำมาต้มที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ deionize แล้วเป่าลมให้แห้ง นำไปอบเพื่อไล่ความชื้นที่ 200 °C เป็นเวลา 10 นาที ต่อมาจะทำการเคลือบด้วยสารไวแสง SU-8 ด้วยวิธีหมุนเหวี่ยง (spin coating) (ภาพที่ 3.3) ด้วยเครื่องเคลือบฟิล์มแบบหมุนเหวี่ยง (Spin coater Laurell technologies corp. model WS-400A-6NPP) โดยการวางแผ่นซิลิกอนลงบนเครื่องเคลือบฟิล์มแล้วเปิดปิดดูดอากาศเพื่อเครื่องดูดแผ่นซิลิกอนไว้ จากนั้นเทสารไวแสง SU-8 2100 ลงไปบนแผ่นซิลิกอน เพื่อให้ได้ความหนาของ SU-8 เท่ากับ 100 μm จึงทำการหมุนเกลี่ย 700 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และหมุนเคลือบ 3,500 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อเสร็จแล้วทำการอบ (soft bake) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และ 95 °C เป็นเวลา 20 นาที ขั้นตอนสุดท้าย จะนำ transparency film ที่มีลวดลายที่ได้ออกแบบไว้ วางลงบนแผ่นซิลิกอนที่เคลือบด้วยน้ำยาไวแสง จากนั้นนำไปฉายแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง MJB4 mask aligner (SUSS microtec) (ภาพที่ 3.4) จากนั้นจะทำการอบ (Post bake) ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 นาที และ 95 °C เป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้ง เพื่อให้เกิดการสร้างโครงร่างตาข่ายในบริเวณที่โดนแสง และทิ้งไว้ในโถดูดความชื้น ที่อุณหภูมิห้องไม่น้อยกว่า 13 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำยาดีเวลลอป น้ำ และ isopropyl alcohol เป่าให้แห้ง จะได้แม่แบบซิลิกอนซึ่งมีความหนาของ SU-8 100 μm และมีลวดลายตามที่ออกแบบไว้ (ภาพที่ 3.5) สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

A



ภาพจาก www.waferserialization.com/waferdicing.php

B



ภาพที่ 3.2 (A) แผ่นซิลิกอนที่ยังไม่ได้ทำการฉายแสง (B) สารผสมระหว่างกรดซัลฟิวริกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Piranha solution) สำหรับทำความสะอาดแผ่นซิลิกอน

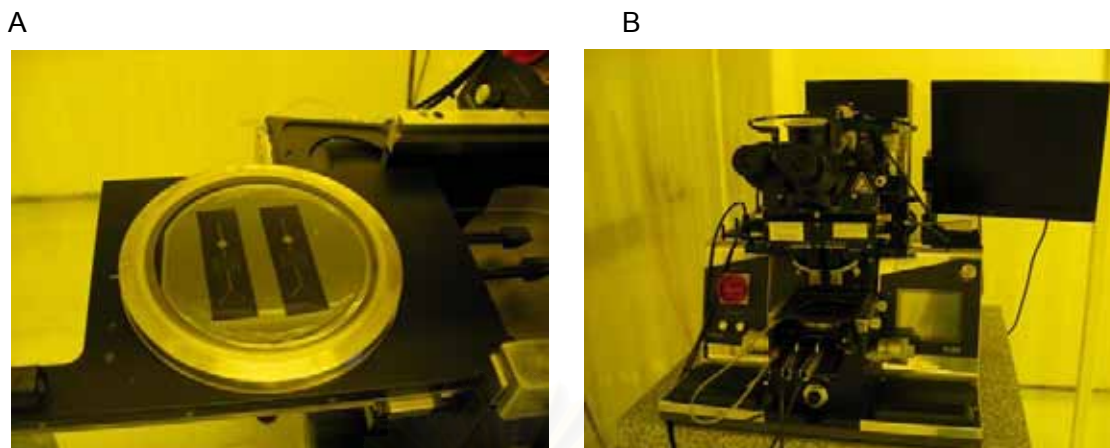
A



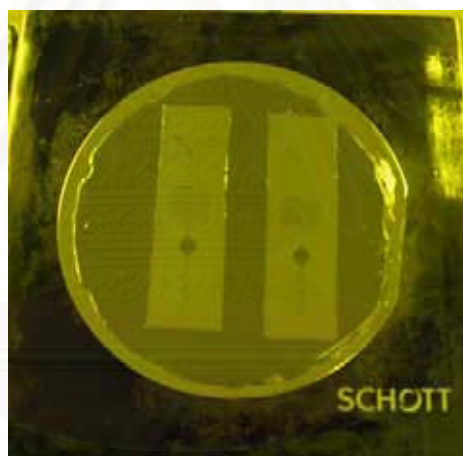
B



ภาพที่ 3.3 (A) เครื่องเคลือบฟิล์มแบบหมุนเหวี่ยง (Spin coater Laurell technologies corp. model WS-400A-6NPP) (B) ขั้นตอนการเคลือบแผ่นซิลิกอนด้วยสารไวแสง SU-8 โดยวิธีหมุนเหวี่ยง (spin coating)



ภาพที่ 3.4 (A) Transparency film ที่มีลวดลายที่ได้ออกแบบไว้บนแผ่นซิลิกอนที่เคลือบด้วยน้ำยาไวแสง สำหรับนำไปฉายแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (B) เครื่องฉายแสง MJB4 mask aligner (SUSS microtec)

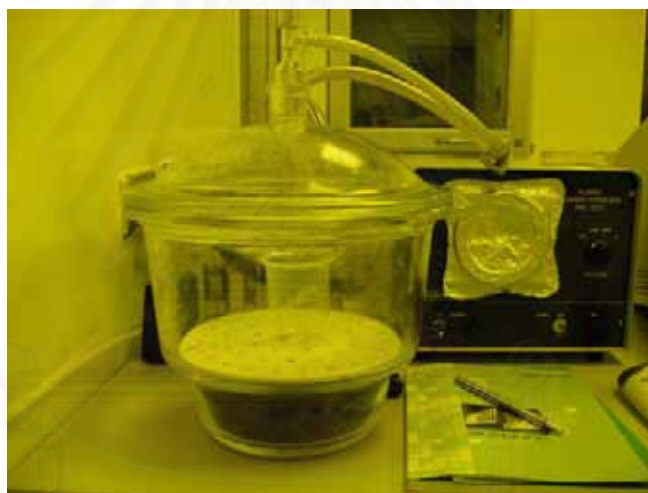


ภาพที่ 3.5 แม่แบบซิลิกอนซึ่งมีความหนาของ SU-8 100 μm และมีลวดลายตามที่ได้ออกแบบไว้

3.1.3 การหล่อ PDMS จากแม่แบบซิลิกอน

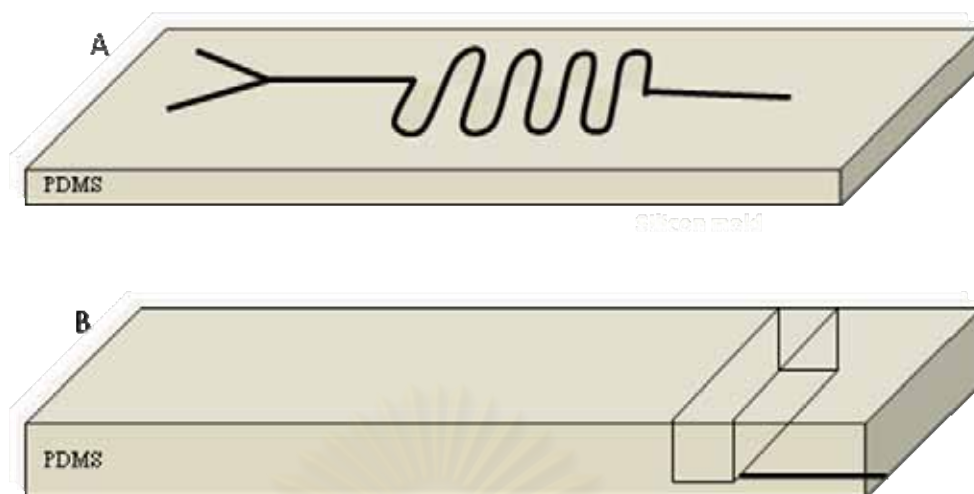
Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) เป็นโพลีเมอร์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาใช้ในระบบของไหลจุลภาค สามารถหล่อขึ้นรูปได้ง่ายตามความต้องการ ในการหล่อ PDMS จะประกอบด้วย PDMS ชั้นส่วนด้านบนซึ่งเป็นส่วนที่หล่อจากแม่แบบซิลิกอน และ PDMS ชั้นส่วนด้านล่าง เนื่องจากการวัดเชิงแสงในระบบของไหลจุลภาค มีข้อจำกัดในด้านความไวในการตรวจวัดน้อย เนื่องจาก chamber บริเวณที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยามีระยะแสงผ่านน้อยมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเพิ่มความไวในการตรวจวัดโดยการเพิ่มระยะแสงผ่านบริเวณที่ทำการ

ตรวจวัด โดยใช้ polystyrene cuvette ที่มีระยะแสงผ่าน 1 cm (กว้าง 3 mm และลึก 3 mm ปริมาตรรวม 90 μL) เข้ากับ PDMS ชั้นล่างในส่วนที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยา (detection zone) และต่อท่อทางออกสำหรับสารที่เกิดปฏิกิริยาแล้วเข้ากับ polystyrene cuvette เพื่อนำมาประกบกับ PDMS ชั้นบนซึ่งมีลวดลายตามที่ต้องการแบบไว้ ขั้นตอนในการหล่อ PDMS ทำได้โดยผสม PDMS 10 ml และน้ำยา curing 1 ml คนให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว ทำการกำจัดฟองอากาศที่เกิดขึ้นในเนื้อ PDMS โดยใช้ปั๊มดูดอากาศเป็นเวลา 15-30 นาที (ภาพที่ 3.6) จากนั้นเท PDMS ลงบนแบบซิลิกอนที่เตรียมไว้ นำไปวางในตู้อบอุณหภูมิ 65 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อ PDMS มีลักษณะแข็งตัว แล้วจึงลอก PDMS ออกจากแม่แบบซิลิกอน จากนั้นเจาะรูเป็นทางของน้ำยาและสารที่ต้องการตรวจวัด บริเวณ Y-shape จะได้แผ่น PDMS ที่สามารถนำมาประกอบเข้าเป็น PDMS microchip ได้ โดยประกอบไปด้วยชั้นส่วนด้านบนซึ่งมีลวดลายตามที่ต้องการแบบเอาไว้ และชั้นส่วนด้านล่างที่มี polystyrene cuvette ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 3.7)



ภาพที่ 3.6 ขั้นตอนการกำจัดฟองอากาศที่เกิดขึ้นในเนื้อ PDMS ด้วยเครื่อง vacuum pump ก่อนนำไปเทลงบนแม่แบบซิลิกอน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



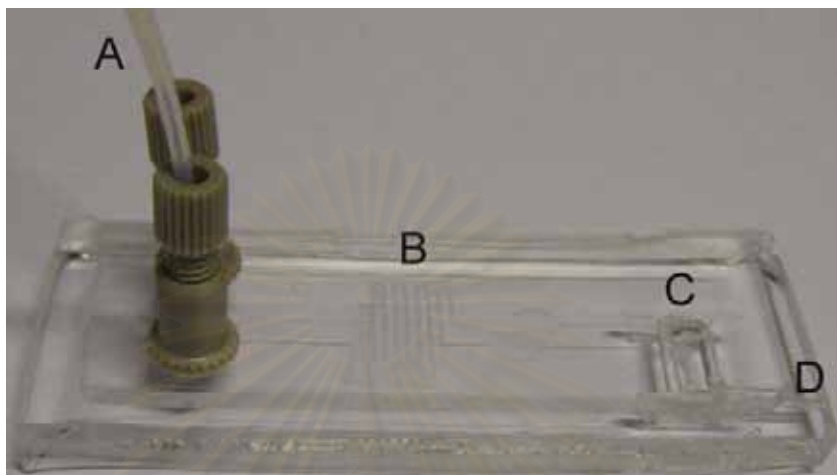
ภาพที่ 3.7 แผนภาพแสดงการสร้าง PDMS microchip (A) microchip ชั้นส่วนด้านบนซึ่งมี ลวดลายตามทีออกแบบเอาไว้ โดยประกอบด้วยทางเข้าของน้ำยาและสารที่ต้องการตรวจวัด และ ส่วนที่ใช้ในการผสมสาร และ (B) microchip ชั้นส่วนด้านล่างที่มี polystyrene cuvette ซึ่งเป็น ส่วนที่ใช้ติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นและส่วนที่เป็นทางออกของสารที่ตรวจวัดแล้ว

3.1.4 การประกอบเป็นไมโครชิป

เมื่อได้ PDMS 2 ชั้นส่วนแล้ว ขั้นตอนต่อมาคือการประกบทั้งสองชั้นเข้าด้วยกัน แต่เนื่องจาก PDMS มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงต้องทำการปรับปรุงผิวด้วยการ ทำความสะอาดผิวด้วยออกซิเจนพลาสมา (oxygen plasma treatment) ซึ่งผลของการทำ ออกซิเจนพลาสมา จะทำให้ขจัดสิ่งสกปรกที่พื้นผิวของ PDMS โดยกำจัดสารที่อยู่บนพื้นผิวโดย การเผาด้วยพลาสมา ทำให้เกิดโครงร่างตาข่าย (cross link) ที่พื้นผิวเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของ พื้นผิว และเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่พื้นผิวเพื่อปรับปรุงปฏิกิริยาทางเคมีและทางกายภาพที่ บริเวณรอยต่อของพื้นผิว

วิธีการทำ oxygen plasma treatment ทำได้โดยนำแผ่น PDMS ทั้งสองส่วนเข้าไป ในเครื่องสร้างพลาสมา (Harrick scientific corp. model PDC-32 G) ทำการปั๊มอากาศออกให้ บริเวณท่อใส่ PDMS เป็นสุญญากาศที่ความดันต่ำกว่า 100 มิลลิทอร์ แล้วปล่อย oxygen เข้าไป ในท่อให้ได้ความดันประมาณ 300-350 มิลลิทอร์ จากนั้นเปิดเครื่องกำเนิดคลื่นความถี่วิทยุเพื่อให้ oxygen แตกตัวเป็น plasma โดยใช้ความถี่ 6.8 วัตต์ เป็นเวลา 1 นาที oxygen จะ oxidize ผิว ของ PDMS ที่มีหมู่ methyl ($-CH_3$) ให้เกิดหมู่ hydroxyl ($-OH$) จากนั้นนำ PDMS มาประกบกันให้ แน่น ซึ่ง PDMS ทั้งสองส่วนสามารถติดกันด้วยพันธะโควาเลนต์ สุดท้ายทำการต่อท่อทางเข้า สำหรับสารตัวอย่างหรือน้ำยา โดยใช้ท่อ Tygon Tubing ขนาด 0.8 mm ID โดยใช้กาวซิลิโคน หรือ

อีพอกซี เป็นตัวเชื่อม หรือใช้ NanoPort™ Assemblies สำหรับเป็นทางเข้าของสาร ดังแสดงในภาพที่ 3.8



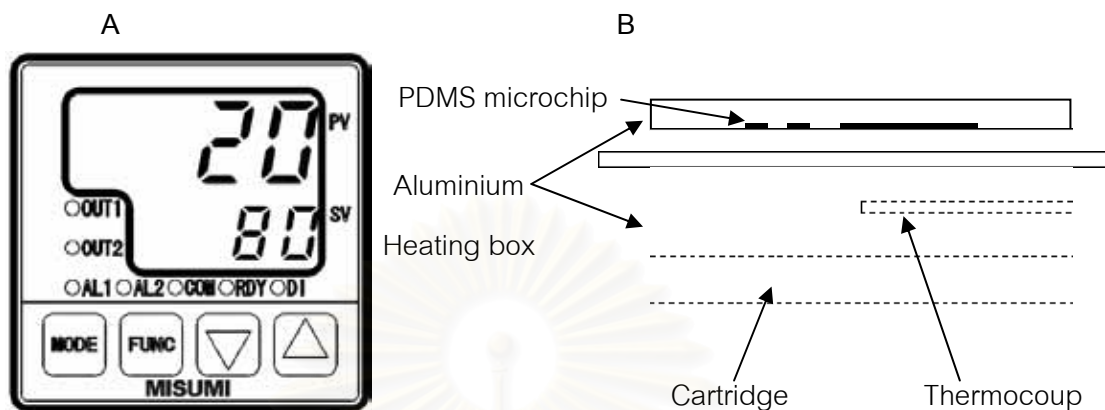
ภาพที่ 3.8 PDMS microchip ที่สร้างเสร็จแล้ว ซึ่งประกอบด้วย (A) ทางเข้าของสาร 2 ช่องทาง (Y-shape inlet) (B) ส่วนที่ใช้ผสมสาร (mixing zone) (C) ส่วนที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยา (detection zone) และ (D) ทางออกของสารที่ทำปฏิกิริยาแล้ว (waste outlet)

3.2 การติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller)

เครื่องควบคุมอุณหภูมินี้เป็นเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นเองเพื่อนำไปควบคุมอุณหภูมิให้กับระบบของไหลจุลภาค ซึ่งอุณหภูมิที่ต้องการคือ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ส่วนที่ใช้ในการควบคุมอุณหภูมินั้นประกอบด้วยตัวให้ความร้อนที่เป็นแบบแท่ง (cartridge heater) กล่องให้ความร้อนอลูมิเนียม (aluminium heating box) และตัววัดอุณหภูมิ (thermocouple หรือ temperature sensor) ซึ่งจะควบคุมการให้ความร้อนด้วย temperature controller ของบริษัท MISUMI (ภาพที่ 3.9 A) ที่สามารถเลือกอุณหภูมิได้ตามต้องการและควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งจะมีค่าผิดพลาดประมาณ $\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$

การติดตั้งส่วนประกอบสำหรับควบคุมอุณหภูมิกับระบบของไหลจุลภาคจะใช้แผ่นอลูมิเนียมเป็น heating box ซึ่งมีน้ำหนักเบาและไม่เป็นสนิม ซึ่งภายในเป็นส่วนที่ใส่ PDMS microchip ผิวของชิปและแผ่นอลูมิเนียมจะสัมผัสกัน ความร้อนจะถูกส่งผ่านจาก heater ไปยัง PDMS microchip ที่วางอยู่ด้านบน ทำให้อุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลอง แล้วทำการติดตั้งตัว

ให้ความร้อนแบบแท่ง (cartridge heater) และตัววัดอุณหภูมิ (thermocouple) ดังในภาพที่ 3.9 B โดยตัววัดอุณหภูมิจะถูกติดตั้งอยู่ระหว่าง heater กับชิปและต้องติดตั้งให้ใกล้กับวัตถุที่ต้องการให้ความร้อนเพื่อให้ค่าอุณหภูมิที่วัดได้นั้นเป็นอุณหภูมิ ณ วัตถุที่ต้องการให้ความร้อนจริง ๆ



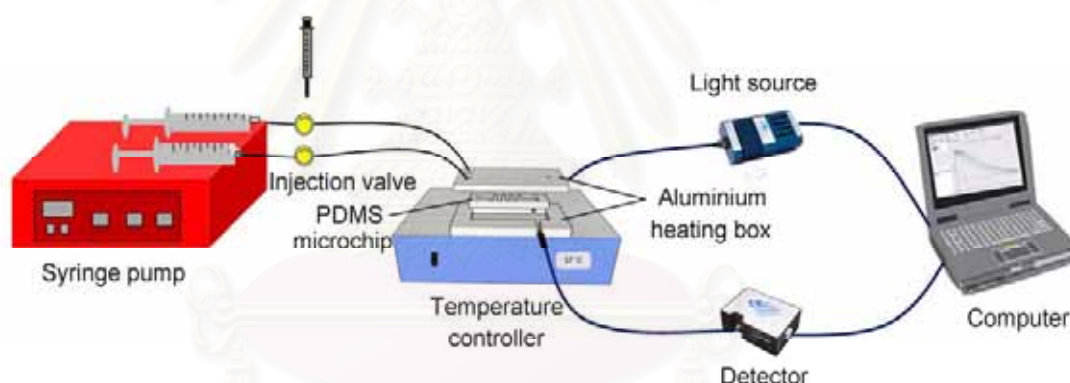
ภาพที่ 3.9 แสดงส่วนประกอบของเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในงานวิจัย (A) ส่วนควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) ของบริษัท MISUMI ที่สามารถเลือกอุณหภูมิได้ตามต้องการ (B) แสดงแผนผังการติดตั้งส่วนประกอบสำหรับควบคุมอุณหภูมิกับระบบของไหลจุลภาคที่ประกอบด้วย ตัวให้ความร้อนแบบแท่ง (cartridge heater) กล่องให้ความร้อนอลูมิเนียม (aluminium heating box) ซึ่งมี PDMS microchip อยู่ภายใน และตัววัดอุณหภูมิ (thermocouple หรือ temperature sensor)



ภาพที่ 3.10 แสดงเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ควบคุมอุณหภูมิในระบบของไหลจุลภาค

3.3 การติดตั้งระบบของไหลจุลภาค สำหรับตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน

ระบบของไหลจุลภาค ดังแสดงในภาพที่ 3.11 ประกอบด้วย syringe pump และ plastic syringe เพื่อทำการพาสเฟออร์ที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินและครีเอตินินผ่านเข้ามาใน PDMS microchip ต่อจากส่วน syringe pump จะเป็นส่วนที่ฉีดน้ำยาและตัวอย่างปัสสาวะ (injection valves) ซึ่งประกอบด้วย injection valve ถ้าไม่กล่าวเป็นอย่างอื่น ในงานวิจัยนี้ น้ำยาที่ใช้ตรวจวัดทั้งอัลบูมินและครีเอตินินจะใช้ปริมาตร 100 μL และใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 5 μL บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 20 mM phosphate buffer pH 7.5 และมีอัตราการไหล 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ เมื่อน้ำยาและตัวอย่างปัสสาวะถูกพาเข้ามาถึง PDMS microchip ที่ติดตั้งอยู่บนเครื่องควบคุมอุณหภูมิ สามารถวัดการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ ณ บริเวณที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยา (detection zone) บน PDMS microchip โดยใช้เครื่อง miniature fiber optic spectrometer ซึ่งประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสง (light Source) และส่วนที่ใช้ตรวจจับสัญญาณที่เกิดขึ้น (USB4000 spectrometer) จากนั้นจะทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรม Ocean Optic SpectraSuit



ภาพที่ 3.11 แสดงการติดตั้งระบบของไหลจุลภาคที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ ซึ่งประกอบด้วย syringe pump, ส่วนที่ฉีดน้ำยาที่ใช้ตรวจวัดและตัวอย่างปัสสาวะ (injection valves), เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller), PDMS microchip, miniature fiber optic spectrometer และเครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผลและวิเคราะห์ผล

3.4 วิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินด้วยระบบของไหลจุลภาค

ถ้าไม่กล่าวเป็นอย่างอื่น ในงานวิจัยนี้การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินด้วยระบบของไหลจุลภาคนั้น ใช้อัตราการไหล (flow rate) ของบัฟเฟอร์ 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ และใช้ 20 mM phosphate buffer pH 7.5 เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้พาสารเข้ามายัง PDMS microchip และยังใช้เป็นบัฟเฟอร์ในการชะปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแล้วออกจาก microchip เพื่อให้สามารถใช้ microchip ซ้ำได้หลายครั้ง เครื่องควบคุมอุณหภูมิถูกตั้งอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ ตลอดเวลาเพื่อช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น ทำการฉีดน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาตร 100 μL และตัวอย่างปัสสาวะปริมาตร 5 μL (การตรวจวัดไมโครอัลบูมินทำการเจือจางปัสสาวะ 15-30 เท่า และการตรวจครีเอตินินเจือจางปัสสาวะ 50-100 เท่า) ผ่านทาง injection valve เมื่อสารที่ต้องการตรวจวัดและน้ำยาเข้ามายังส่วนที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยาแล้วจะทำการ stop pump และติดตามอัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น สำหรับไมโครอัลบูมินทำการติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ 500 nm และครีเอตินินติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ 510 nm เก็บข้อมูลทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 2 นาที หลังจากเก็บข้อมูลครบเวลาที่กำหนดแล้ว ทำการล้างปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นออกจาก microchip เมื่อ baseline ลงมาถึงจุดเริ่มต้นแล้วจึงทำการตรวจวัดตัวอย่างต่อไป

3.5 การเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีมาตรฐาน

3.5.1 การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ Immunoturbidity

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในระบบของไหลจุลภาคจะทำการเปรียบเทียบ กับวิธี immunoturbidity โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Randox (Randox Laboratories) ตามวิธีของบริษัทโดยมีการปรับปรุงเล็กน้อย โดยการลดสัดส่วนน้ำยาที่ใช้เพียง 50% เครื่องมือที่ใช้ตรวจวัดคือ spectrophotometer (Evolution 600) ที่ความยาวคลื่น 340 nm ขั้นตอนการตรวจวัด ดังนี้ ใช้ บัฟเฟอร์ 500 μL ผสมกับสิ่งตัวอย่าง 50 μL และวัดการดูดกลืน และบันทึกเป็น A1 โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank จากนั้นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินปริมาตร 50 μL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง บันทึกเป็น A2 ทำการสร้างกราฟมาตรฐานแบบ semi-log ระหว่างความเข้มข้นของอัลบูมินและค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง (A2-A1) โดยใช้ albumin calibrators ที่มีในชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของบริษัท และทำการตรวจวัด control ทั้งสองระดับควบคุมไปด้วยเพื่อควบคุมคุณภาพผลการทดลอง คำนวณหาความเข้มข้นของปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น

3.5.2 การตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินโดยใช้หลักการแฉฟไฟ

การตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินในระบบของไหลจุลภาค นำมาเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยใช้หลักการแฉฟไฟเช่นเดียวกัน โดยใช้ปริมาตรน้ำยาแฉฟไฟ (0.05 M picric acid และ 0.5 M sodium hydroxide ในอัตราส่วน 1:1) 1 ml ผสมกับสิ่งตัวอย่าง 100 μ L วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Evolution 600) หลังจากผสมสารทั้งสองชนิดที่เวลา 15 วินาที (A1) และหลังจากวัดการดูดกลืนแสงครั้งแรกเป็นเวลา 2 นาที (A2) นำค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 2 ลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงครั้งแรก คำนวณความเข้มข้นของครีเอทีนินเทียบกับครีเอทีนินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว จากสูตร

$$\text{Unknown concentration} = \text{Au/As} \times \text{Cs}$$

Au คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งตัวอย่าง

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของครีเอทีนินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

Cs คือ ความเข้มข้นของครีเอทีนินมาตรฐาน

3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินในปัสสาวะ

3.6.1 ทดสอบหาช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ทำการทดสอบหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมของสารที่จะทำการตรวจวัดและน้ำยา ในช่วง 400-600 nm (เนื่องจากความยาวคลื่นของแหล่งกำเนิดแสงหรือ light source อยู่ในช่วง visible) โดยฉีดอัลบูมินความเข้มข้น 10 mg/L หรือครีเอทีนินความเข้มข้น 40 mg/L ปริมาตร 5 μ L และน้ำยาที่ใช้ตรวจวัด 100 μ L เข้าไปในระบบของไหลจุลภาคแล้ว ทำการ stop pump และจับเวลา ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกริยาระหว่างสารที่ต้องการตรวจวัดและน้ำยาจะเกิดสะสมเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับการ scan spectrum ของปฏิกิริยา latex agglutination ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและปฏิกิริยาแฉฟไฟในการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนิน ในระบบ batch โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ตั้งแต่ความยาวคลื่น 200-800 nm โดยใช้อัลบูมินความเข้มข้น 10 mg/L และครีเอทีนินความเข้มข้น 40 mg/L ปริมาตร 100 μ L และใช้น้ำยาปริมาตร 1 mL เพื่อดูว่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่นใด เพื่อหาช่วงความยาวคลื่นที่ปฏิกิริยาสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด และมีสัญญาณรบกวนน้อยที่สุด และจะ

เลือกใช้ความยาวคลื่นช่วงนั้นในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา latex agglutination และปฏิกิริยา แฉฟี่ สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

3.6.2 ทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของแอนติบอดีและน้ำยาแฉฟี่ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีปัจจัยหนึ่งคือปริมาณที่เหมาะสมระหว่างน้ำยาและสารที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นจึงทำการทดสอบหาสัดส่วนที่เหมาะสมของน้ำยาและสารที่ต้องการตรวจวัด โดยในปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดีจะทดสอบหาสภาวะที่ไม่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่มีแอนติบอดีมากเกินไปจนเกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (prozone phenomenon) หรือความเข้มข้นของแอนติเจนมากเกินไปจนเกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (postzone phenomenon) โดยทำการทดสอบปริมาณน้ำยาที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินโดยใช้น้ำยาลาเท็กซ์และแฉฟี่ปริมาตร 25, 50, 75, 100 และ 125 μL ทดสอบกับอัลบูมินความเข้มข้น 10 mg/L และครีเอตินินความเข้มข้น 40 mg/L ปริมาตร 5 μL จะเลือกใช้ปริมาณน้ำยาที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปีสภาวะ

3.6.3 ทดสอบหาอัตราการไหล (flow rate) ที่เหมาะสม

เนื่องจากการไหลของของไหลในระบบของไหลจุลภาคนั้น หากอัตราการไหลเร็วเกินไป จะทำให้ PDMS microchip ทนแรงบีบอัดไม่ได้ ทำให้ microchip เกิดการร้าวได้ แต่ถ้าอัตราการไหลช้าเกินไป ก็จะทำให้ใช้เวลาในการตรวจวัดนานและสารอาจเกิดปฏิกิริยาก่อนที่จะเดินทางไปถึงส่วนที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้ ดังนั้นจึงทำการทดสอบหาอัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุดที่จะไม่ทำให้ PDMS ร้าวและไม่ใช้เวลาในการตรวจวัดนานเกินไป โดยใช้ปริมาณน้ำยา 100 μL และ สารที่ต้องการตรวจวัด 5 μL ฉีดเข้าไปในระบบของไหลจุลภาค โดยใช้อัตราการไหล 30, 35, 40, 45 และ 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ ตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น อัตราการไหลที่ทำให้เหมาะสม จะนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปีสภาวะ

3.6.4 ทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินนั้นเป็นการตรวจวัดแบบวิธี kinetic ดังนั้นจึงต้องทดสอบหาช่วงที่การเกิดปฏิกิริยาเป็นเส้นตรง โดยสำหรับการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัดไมโครอัลบูมินนั้น ทำการเจือจางปีสภาวะด้วยน้ำกลั่น 15 เท่า

ในการตรวจวัดครีเอทีนินในปัสสาวะ ทำการเจือจางปัสสาวะด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า จากนั้นนำมาทำการตรวจวัดในระบบของไหลจุลภาค ทำการจับเวลาแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟระหว่างเวลาและค่าการดูดกลืนแสง และจะเลือกเวลาช่วงที่เกิดปฏิกิริยายังคงเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินในปัสสาวะ

3.6.5 ทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์และ pH ที่ใช้ในระบบของไหลจุลภาค

ในระบบของไหลจุลภาคนั้น สารที่นำมาตรวจวัดและน้ำยาจะผสมกันโดยการแพร่เข้าหากัน โดยมีบัฟเฟอร์เป็นตัวพา ซึ่งบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจะทำให้การปฏิกิริยาเกิดได้ดี เพื่อหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาดีที่สุด จึงทำการทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์และ pH ที่จะใช้เป็นบัฟเฟอร์ตัวพาสารที่ต้องการตรวจวัดและน้ำยาเข้าไปยังระบบของไหลจุลภาค ซึ่งจะใช้ 20 mM phosphate buffer pH 6, 6.5, 7 และ 7.5 และ 20 mM Tris-HCl buffer pH 8, 8.5 และ 9 เป็นบัฟเฟอร์ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน โดยใช้น้ำยาลาทีกซ์และแจฟฟิ ปริมาตร 100 μL ทำปฏิกิริยากับอัลบูมินความเข้มข้น 5 mg/L หรือครีเอทีนินความเข้มข้น 40 mg/L ปริมาตร 5 μL ชนิดของบัฟเฟอร์และ pH ใดให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด จะนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินในปัสสาวะ และยังใช้เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการล้าง PDMS microchip หลังจากเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว ซึ่งเป็นการ regeneration ผิวของ PDMS สำหรับให้ทำปฏิกิริยาต่อไป

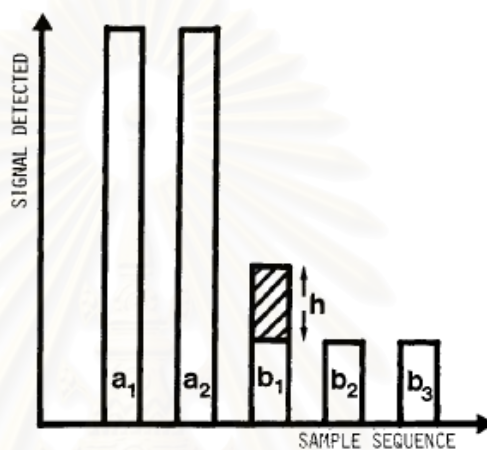
3.6.6 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ในการทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มและปฏิกิริยาแจฟฟิ นั้น ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีอุณหภูมิเหมาะสม ดังนั้นจึงทำการตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้น 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 mg/L และครีเอทีนินความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 mg/L กับน้ำยาที่ใช้ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน ปริมาตร 100 μL โดยเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างที่อุณหภูมิ 25 °C และ 37 °C เพื่อศึกษาว่าการใช้อุณหภูมิตั้งที่ 37 °C นั้น ทำให้ความไวของการตรวจวัดเพิ่มขึ้นจากการใช้อุณหภูมิตั้งที่ 25 °C หรือไม่

3.6.7 ทดสอบการ carryover ของระบบของไหลจุลภาค

การไหลของของไหลในระบบของไหลจุลภาคที่เกิดปฏิกิริยาบน PDMS microchip นั้น อาจเกิดการ carry over ทำให้ค่าการตรวจวัดสูงกว่าความเป็นจริงได้ เนื่องจาก PDMS มีคุณสมบัติในการดูดซับสาร เช่น โปรตีนได้ดี ดังนั้นจึงทำการทดสอบ carryover โดยทำ

การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินความเข้มข้นสูง 10 mg/L ทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นตรวจวัดปริมาณอัลบูมินความเข้มข้นต่ำ 1 mg/L ทำซ้ำกันสามครั้ง ส่วนการทดสอบ carryover ของการตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน ทำการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินความเข้มข้นสูง 40 mg/L ซ้ำกันสองครั้ง และตรวจวัดความเข้มข้นต่ำ 10 mg/L ซ้ำกันสามครั้ง แล้วนำมาหา carryover ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $\text{carryover} = (b_1 - b_3) / (a_2 - b_3)$ ตามวิธีที่รายงานโดย Haeckel, 1991⁽¹³⁰⁾ และลำดับการตรวจวัด samples เพื่อทดสอบ carryover ดังแสดงในภาพที่ 3.12



(มาจาก Haeckel, 1991⁽¹³⁰⁾)

ภาพที่ 3.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ตรวจวัดกับสัญญาณการตรวจวัด a คือค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีความเข้มข้นสูง; b คือค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีความเข้มข้นต่ำ

3.7 การศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterization)

3.7.1 ทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)

ในการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินนั้น จะทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของอัลบูมินมาตรฐาน ซึ่งเตรียมจาก human serum albumin ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, และ 30 mg/L โดยใช้ปริมาตร 5 μL กับน้ำยาลาเท็กซ์ปริมาตร 100 μL แต่ละความเข้มข้นทำการตรวจวัดซ้ำกัน 2 ครั้ง

การหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ครีเอตินินนั้น ทำโดยตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างน้ำยาแฉฟี่ 100 μL กับครีเอตินินความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 mg/L และสร้างกราฟมาตรฐานเช่นเดียวกับการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน เพื่อศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดครีเอตินินของวิธีที่พัฒนาขึ้น

3.7.2 ทดสอบหาค่า limit of detection (LOD)

การทดสอบหาค่า limit of detection นี้เป็นการทดสอบหาค่าต่ำสุดที่วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดได้ วิธีที่มี limit of detection ต่ำๆ จะสามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดีหรือมีความไวมาก โดยทำการทดลองวัด blank ของไมโครอัลบูมินและครีเอตินินอย่างละ 10 ครั้ง ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าที่ตรวจวัดได้มาคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และนำมาหาค่า limit of detection จากสูตร $\text{Limit of detection} = 3.SD/S$ (SD คือ standard derivations ที่ได้จากการวัด blank 10 ครั้ง และ S คือ sensitivity ซึ่งหาได้จากค่าความชันจากการทำกราฟมาตรฐาน)

3.7.3 ทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)

โดยทดสอบว่าสารบางชนิดที่อยู่ในปัสสาวะมีผลต่อการตรวจวัดไมโครอัลบูมินหรือครีเอตินินหรือไม่ โดยนำสารที่อาจพบได้ในปัสสาวะเช่น bilirubin, glucose, NaCl, transferrin, hemoglobin, ascorbic acid, human immunoglobulin (IgG) เป็นต้น เติมลงในสารละลายอัลบูมินมาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้น และให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของอัลบูมินเป็น 5 mg/L หรือเติมสารรบกวนลงในสารละลายครีเอตินินมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของครีเอตินินเป็น 30 mg/L ทำการตรวจวัดหาปริมาณอัลบูมินหรือครีเอตินิน แล้วนำมาคำนวณหา %Recovery เปรียบเทียบกับอัลบูมินและครีเอตินินก่อนและหลังการเติมสารรบกวนแต่ละตัว จากสูตร $\%Recovery = (\text{Recovered concentration}/\text{Added concentration}) \times 100$

3.7.4 การศึกษาค่า precision

Within-run precision ศึกษาโดยทำการตรวจวัดอัลบูมินมาตรฐานความเข้มข้น 10 mg/L หรือการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินความเข้มข้น 20 mg/L จำนวนอย่างน้อย 10 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation)

3.8 ทำการทดลองตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในผู้ป่วยโรคเบาหวานเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะจากกลุ่มประชากร ซึ่งเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 15 คน นำปัสสาวะมาปั่นตกตะกอนที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสมา

เจ็จางด้วยน้ำเกลือ (9 g/L) 15-30 เท่าสำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ latex agglutination immunoassay ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินินด้วยหลักการแจฟฟี บัสสวาระ ถูกเจ็จางด้วยน้ำ 50-100 เท่าก่อนนำไปตรวจวัด และทำวัดการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบน PDMS microchip ด้วยระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น ผลการตรวจวัดนำมาเปรียบเทียบกับวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ซึ่งการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้ใช้หลักการ immunoturbidimetry และตรวจวัดครีเอตินินด้วยหลักการแจฟฟีและวัดแบบ kinetic โดยทั้งสองการทดลองใช้เครื่อง spectrophotometer (Evolution 600) ความสอดคล้องของระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินที่ได้จากระบบของไหลจุลภาคในงานวิจัยนี้ และวิธีที่ใช้ทั่วไปทางห้องปฏิบัติการ นำมาศึกษาความสัมพันธ์ของสองวิธีโดยใช้สถิติ Bland and Altman plot⁽¹³¹⁾ และ Passing-bablok regression⁽¹³²⁾ และทดสอบความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า linear regression โดยใช้โปรแกรม Sigmaplot



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

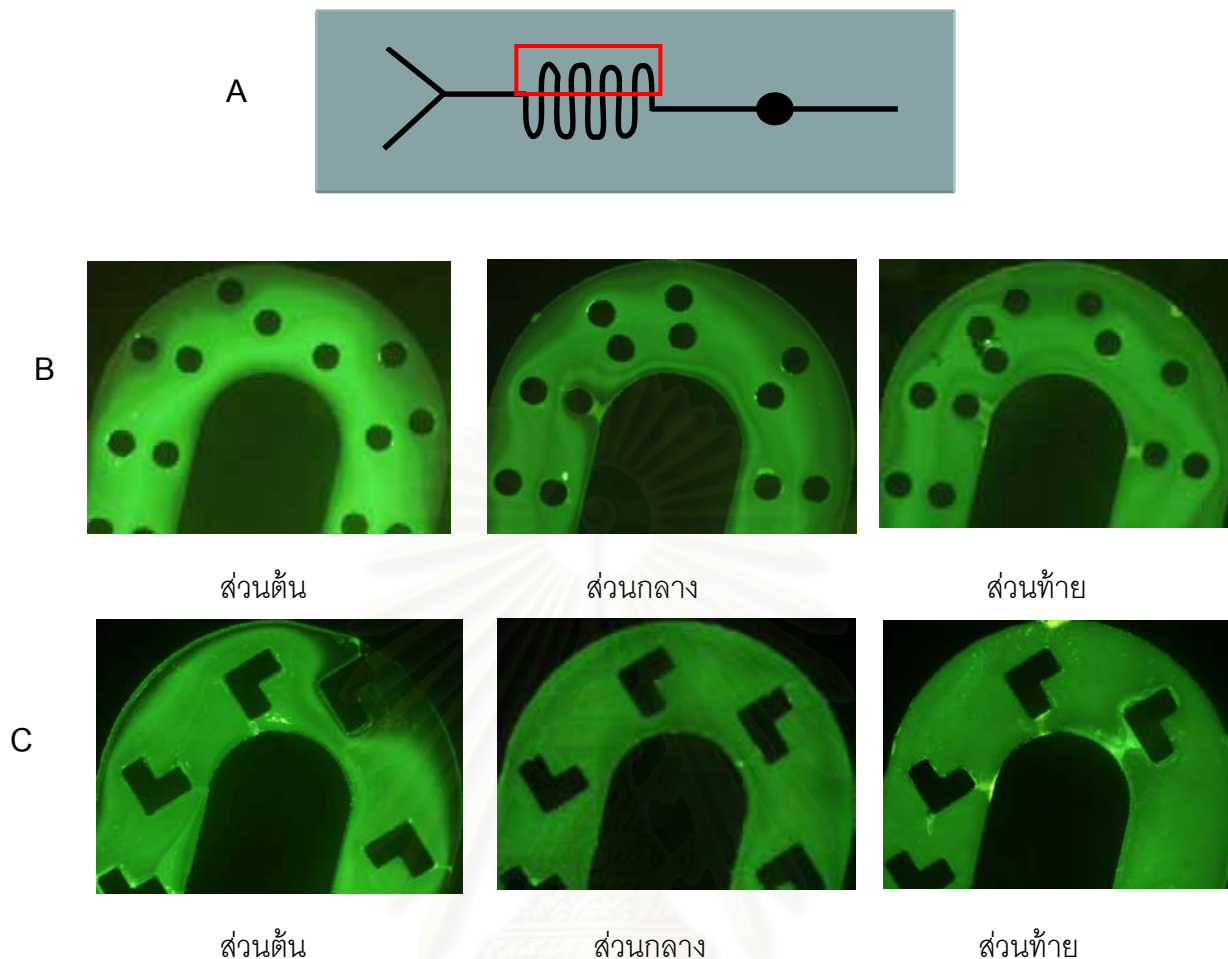
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผสมของ micromixer ภายในท่อของ PDMS microchip

เนื่องจากการผสมกันของสารภายในท่อขนาดเล็กเกิดขึ้นได้ยาก และเป็นการผสมโดยใช้หลักการการแพร่เข้าหากันซึ่งต้องใช้ระยะเวลา ดังนั้นเพื่อให้มีการผสมของสารเกิดขึ้นได้ดีภายในระบบของไหลจุลภาค และเกิดขึ้นได้เร็วภายในพื้นที่จำกัดบน PDMS microchip งานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบให้มีสิ่งกีดขวางขนาดเล็ก ภายในท่อขนาดของไมโครชิปซึ่งมีขนาดความกว้าง 500 μm ณ บริเวณ mixing zone โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสิ่งกีดขวางรูปวงกลม และรูปหัวลูกศร และได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการผสมสาร โดยใช้สารผสมสองชนิดระหว่าง 0.5 mg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC) และ 10 mM phosphate buffer pH 7.4 และติดตามประสิทธิภาพการผสมของสารสองชนิดบนไมโครชิป โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus BX50) กำลังขยาย 40 เท่า ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าภายในท่อที่มีสิ่งกีดขวางรูปวงกลม การผสมของ FITC กับบัฟเฟอร์ไม่เป็นเนื้อเดียวกันทั้งส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนท้ายของท่อที่ทำหน้าที่ในการผสม ส่วนภายในท่อที่มีสิ่งกีดขวางรูปหัวลูกศร พบว่าในส่วนแรกของไมโครชิปนั้น FITC กับบัฟเฟอร์ยังผสมไม่เป็นเนื้อเดียวกันดีนัก แต่เมื่อสารผสมเดินทางมาถึงส่วนกลางและส่วนท้าย พบว่าสารมีความเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิดผสมกันได้ดีตั้งแต่ส่วนกลางของท่อ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สิ่งกีดขวางภายในท่อของไมโครชิปที่มีลักษณะเป็นรูปหัวลูกศรนั้น สามารถช่วยให้มีการผสมของสารสองชนิดได้ดี ดูได้จากความเป็นเนื้อเดียวกันของสารฟลูออเรสเซนซ์กับบัฟเฟอร์ ดังนั้นในการทดลองต่อๆ มา จึงเลือกใช้สิ่งกีดขวางรูปหัวลูกศรในการผสมสาร เพื่อทำการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะในระบบของไหลจุลภาคในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 4.1 แสดงการวางแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายในท่อของ PDMS microchip ในการทดสอบประสิทธิภาพการผสมสารของ micromixer แบบต่างๆ (A) แสดงส่วนต่างๆ ภายใน PDMS microchip สีเหลืองสีแดงแสดงส่วนที่ติดตามการผสมของท่อภายในชิป (B) แสดงสิ่งกีดขวาง รูปวงกลม ภายในท่อของ PDMS microchip (C) แสดงสิ่งกีดขวางรูปหัวลูกศร ภายในท่อของ PDMS microchip

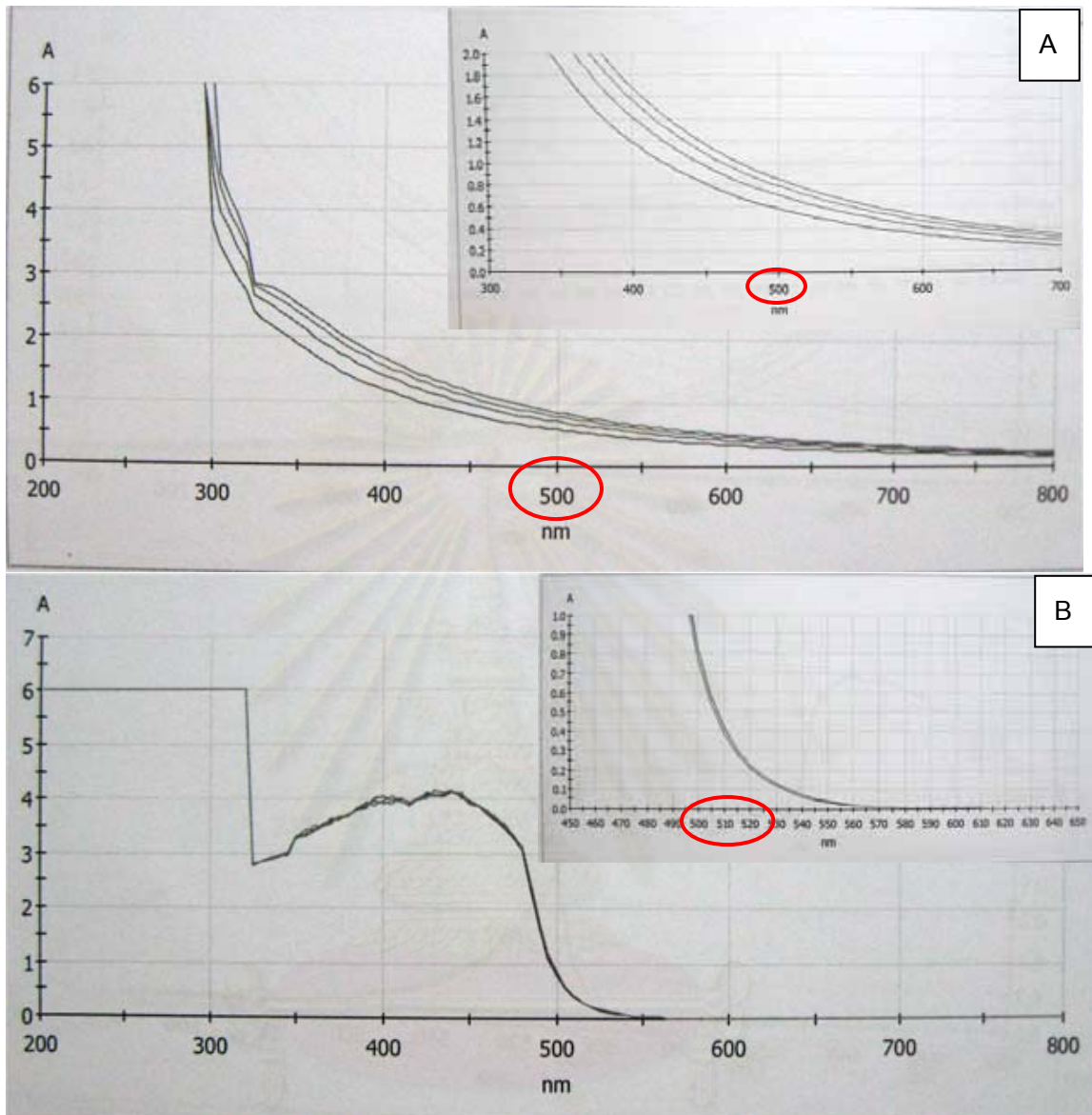
2. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ

2.1 ผลการทดสอบหาช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม

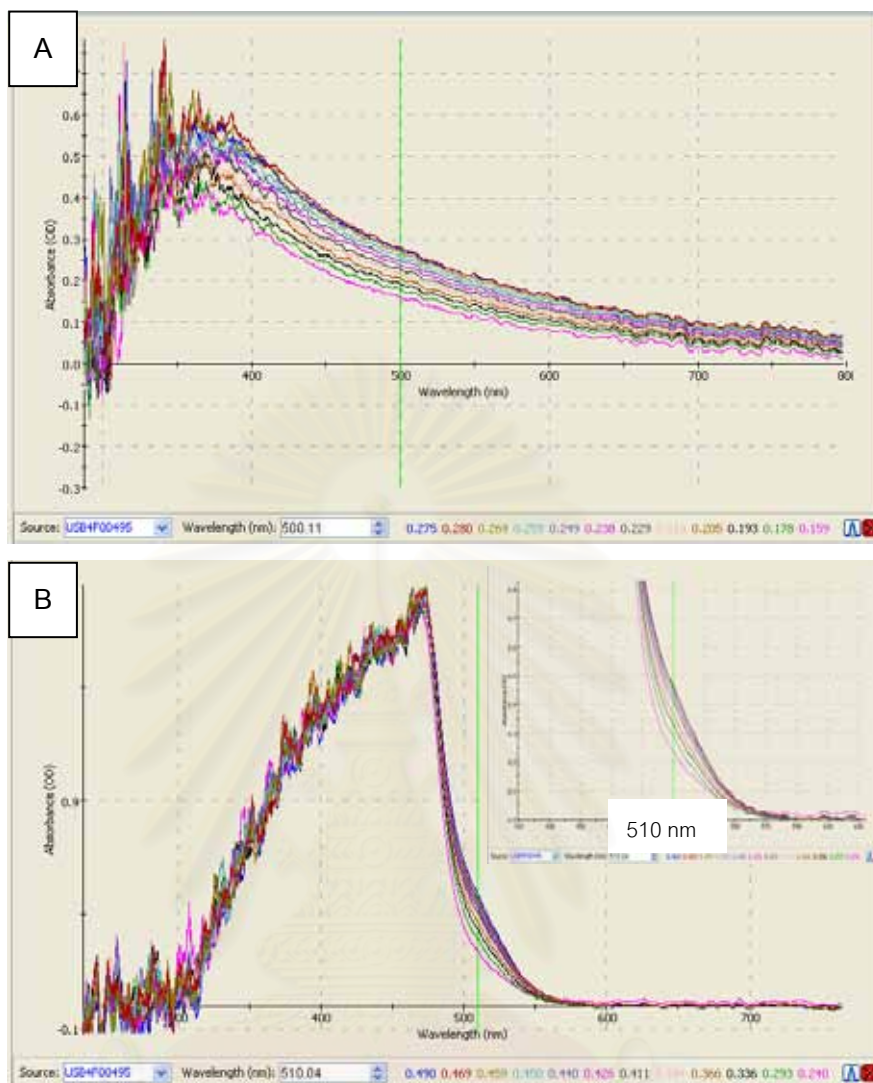
ในการตรวจวัดสารโดยใช้หลักการการดูดกลืนแสงนั้น ความยาวคลื่นที่เหมาะสมมีผลต่อการตรวจวัด เนื่องจากหากความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดไม่เหมาะสม จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้น้อยกว่าความเป็นจริง และผลการตรวจวัดจะไม่น่าเชื่อถือ เนื่องจากสารแต่ละ

ชนิดสามารถดูคลื่นแสงได้ดีที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ จึงต้องทำการทดสอบหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัดสารแต่ละชนิด โดยเบื้องต้นทำการตรวจวัดในระบบ batch ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทำการ scan spectrum เพื่อตรวจสอบความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับทั้งสองปฏิกิริยาการตรวจวัด สำหรับปฏิกิริยา latex agglutination ใช้อัลบูมินความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 100 μ L ทำปฏิกิริยากับน้ำยาลาเท็กซ์ ปริมาตร 1,000 μ L พบว่า ปฏิกิริยา latex agglutination มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงตามความยาวคลื่นที่เพิ่มขึ้น และมีค่าการดูดกลืนแสงดีที่สุดที่ 500 nm เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือ 0.2-0.8 ดังภาพที่ 4.2 A ส่วนปฏิกิริยาแจฟฟีนนั้น ทำการทดสอบด้วยครีเอทีนความเข้มข้น 40 mg/L ปริมาตร 100 μ L และน้ำยาแจฟฟีนปริมาตร 1,000 μ L ผลการ scan spectrum พบว่าในช่วงความยาวคลื่นน้อยกว่า 500 nm มีค่าการดูดกลืนแสงสูงมาก คือมีค่า OD อยู่ในช่วง 3-6 ส่วนช่วงความยาวคลื่นที่มากกว่า 550 nm ขึ้นไป พบว่าไม่มีการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาแจฟฟีน ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถดูคลื่นแสงได้ดีที่สุดในช่วง 500-520 nm ดังในภาพที่ 4.2 B

สำหรับระบบของไหลจุลภาค ได้ทำการทดลองโดยฉีดอัลบูมินความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 5 μ L และน้ำยาลาเท็กซ์ 100 μ L เข้าไปในระบบของไหลจุลภาค เมื่อสารผสมไหลมาถึงบริเวณตรวจวัด ทำการหยุดปั๊มและบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มระหว่างอัลบูมินและน้ำยาลาเท็กซ์จะเกิดสะสมมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้น ดังภาพที่ 4.3 A ในช่วงความยาวคลื่นใน 400-600 nm พบว่าที่ความยาวคลื่น 500 nm ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ดีและมีสัญญาณรบกวนน้อย ส่วนการทดสอบหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนนั้น ทำโดยฉีดครีเอทีน ความเข้มข้น 40 mg/L ปริมาตร 5 μ L และน้ำยา alkaline picrate ปริมาตร 100 μ L เข้าไปในระบบของไหลจุลภาค เมื่อสารผสมไหลมาถึงบริเวณตรวจวัด ทำการหยุดปั๊ม แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสง ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที น้ำยา alkaline picrate จะจับกับครีเอทีนเกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีส้มแดง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามเวลา ดังในภาพที่ 4.3 B พบว่าที่ความยาวคลื่น 510 nm มีค่าการดูดกลืนแสงที่ดีที่สุดสำหรับการตรวจวัดสารเชิงซ้อนของปฏิกิริยา ซึ่งความยาวคลื่นดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า¹³³ ที่เลือกใช้ความยาวคลื่น 500 หรือ 510 nm สำหรับติดตามปฏิกิริยาแจฟฟีน⁽¹³³⁾ และผลการทดสอบสอดคล้องกับ spectrum การดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเมื่อใช้ระบบ batch ดังนั้นจึงเลือกใช้ความยาวคลื่น 500 nm ในการติดตามการเกิดปฏิกิริยา latex agglutination สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน และเลือกใช้ความยาวคลื่น 510 nm ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาแจฟฟีนสำหรับตรวจวัดปริมาณครีเอทีน



ภาพที่ 4.2 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเมื่อตรวจวัดด้วยระบบ batch (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา latex agglutination (B) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาแฉฟี่ สำหรับตรวจวัดปริมาณครีเอทีนิน

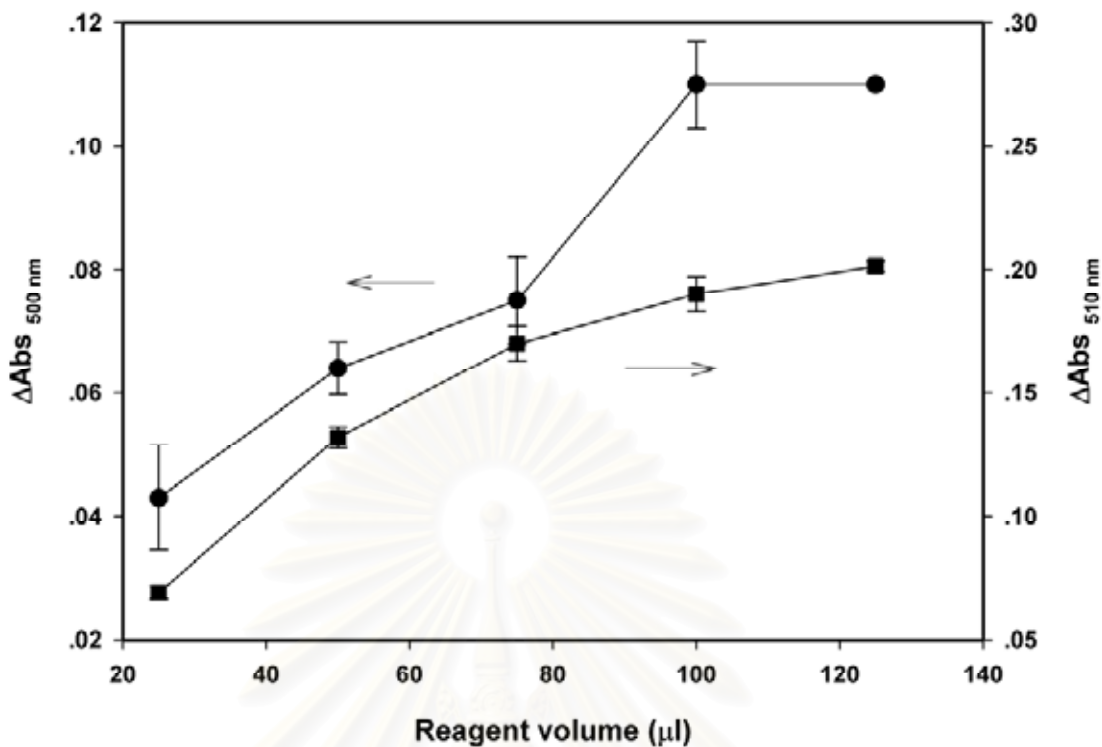


ภาพที่ 4.3 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ โดยใช้ fiber optic spectrometer ที่บันทึกทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที (A) สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของปฏิกิริยา latex agglutination ภายในไมโครชิป ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะคือ 500 nm (B) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของครีเอทีนินโดยปฏิกิริยาแจฟฟี ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินคือ 510 nm

2.2 ผลการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของแอนติบอดีและน้ำยาแฉฟี่ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

ปริมาณที่เหมาะสมระหว่างน้ำยาและสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจวัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดี มีผลต่อความไวและช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบหาสัดส่วนที่เหมาะสมของน้ำยาและสารที่ต้องการตรวจวัด โดยในปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดีจะทดสอบหาสภาวะที่ไม่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่มีแอนติบอดีมากเกินไปจนเกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (prozone phenomenon) หรือความเข้มข้นของแอนติเจนมากเกินไปจนเกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (postzone phenomenon) ซึ่งปรากฏการณ์ทั้งสองทำให้เกิดผลการวิเคราะห์ที่เรียกว่าผลลบลงได้ (false negative results)

ในการวิจัยได้ศึกษาการใช้แอนติบอดีปริมาตรต่างๆ ตั้งแต่ 25, 50, 75, 100 และ 125 μL โดยให้ทำปฏิกิริยากับอัลบูมินมาตรฐานความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 5 μL และติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 500 nm สำหรับการทดสอบหาความเหมาะสมของน้ำยาแฉฟี่ในการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินนั้นได้ทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน ใช้น้ำยาแฉฟี่ปริมาตร 25, 50, 75, 100 และ 125 μL ให้ทำปฏิกิริยากับครีเอทีนินความเข้มข้น 40 mg/L ปริมาตร 5 μL และติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 510 nm สร้างกราฟระหว่างผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงหลังการหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 นาที กับปริมาตรน้ำยาที่ใช้ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่าการใช้น้ำยาลาเทกซ์ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินมากกว่า 100 μL ไม่มีผลต่อสัญญาณการตรวจวัดที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณน้ำยา 100 μL สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินด้วยน้ำยาแฉฟี่นั้น พบว่าความไวของการตรวจวัดเพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วน เมื่อมีการใช้น้ำยาแฉฟี่เพิ่มขึ้น จนถึงปริมาตร 100 μL แม้ว่าที่ปริมาตร 120 μL ให้ความไวการตรวจวัดสูงสุด แต่พบว่าที่ปริมาตรนี้ทำให้ความไวเพิ่มขึ้นเพียง 6% ของปริมาตรน้ำยาที่ 100 μL และเพื่อเป็นการประหยัดการใช้น้ำยา ดังนั้นปริมาตรน้ำยาที่ 100 μL จึงมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ระดับครีเอทีนินในปัสสาวะ ซึ่งสังเกตได้ว่า ปริมาตรที่เหมาะสมของทั้งน้ำยาแอนติบอดีและน้ำยาแฉฟี่ที่ใช้มีปริมาตรเดียวกัน ซึ่งมีข้อดีคือทำให้สามารถใช้ injection loop สำหรับการฉีดน้ำยาเข้าระบบ อันเดียวกันได้ ทำให้สะดวกในการวิเคราะห์ทั้งอัลบูมินและครีเอทีนินต่อเนื่องกันได้ โดยใช้ระบบของไหลจุลภาคเดียวกัน



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำยาและค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ; ● แทนปฏิกิริยา latex agglutination ; ■ แทน Kinetic Jaffe reaction

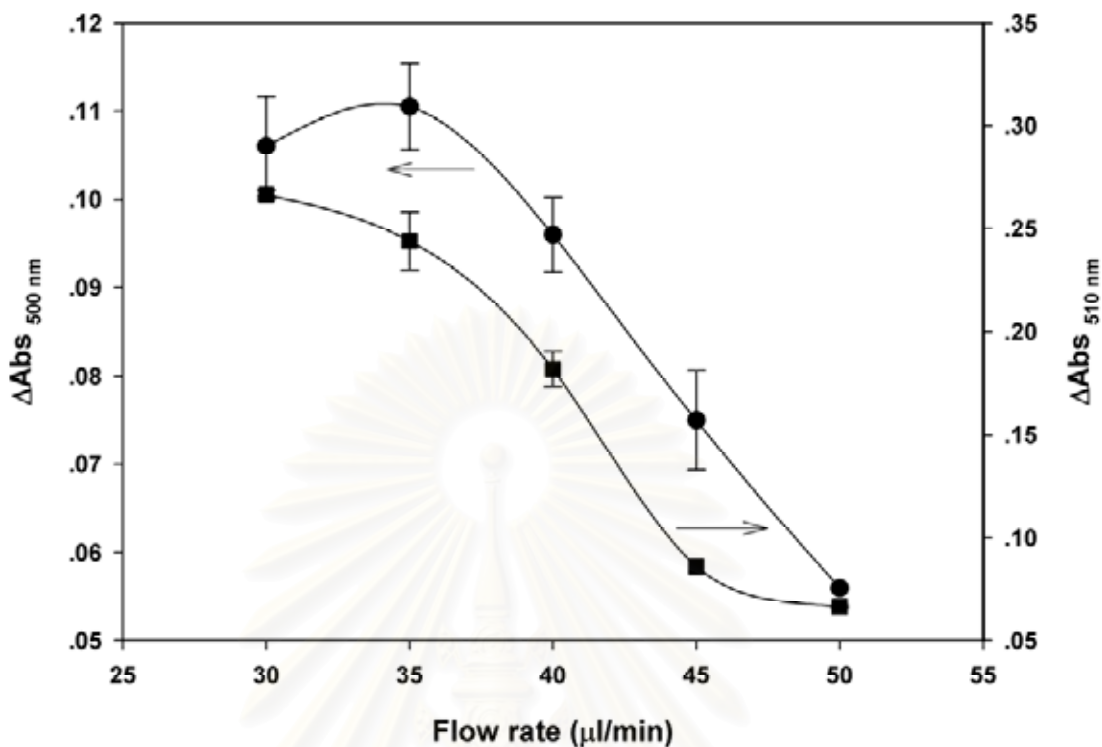
2.3 ผลการทดสอบหาอัตราการไหล (flow rate) ที่เหมาะสม

เนื่องจากท่อในระบบของไหลจุลภาคนั้นมีขนาดเล็กมากระดับไมโครเมตร เช่นในงานวิจัยนี้ขนาดของท่อมีความกว้างเพียง 500 ไมโครเมตร หากใช้อัตราการไหลเร็วเกินไป จะทำให้ PDMS microchip ทนแรงบีบอัดไม่ได้ ทำให้ microchip เกิดการร้าวได้ และสารมีการผสมกันไม่ดี เนื่องจากต้องใช้เวลาในการแพร่เข้าหากันของสารภายในท่อขนาดเล็ก แต่ถ้าใช้อัตราการไหลช้าเกินไป ก็จะทำให้ใช้เวลาในการตรวจวัดนานและสารอาจเกิดปฏิกิริยาก่อนที่จะเดินทางไปถึงส่วนที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้ ดังนั้นจึงได้มีการทดสอบหาอัตราการไหลที่เหมาะสม โดยในการทดสอบหาอัตราการไหลที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินนั้น ทำได้โดยใช้ปริมาณน้ำยาลาเท็กซ์ 100 μL และ อัลบูมินความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 5 μL หรือใช้น้ำยาแจฟฟีปริมาตร 100 μL และครีเอตินินความเข้มข้น 40 mg/L ปริมาตร 5 μL ฉีดเข้าไปในระบบของไหลจุลภาค

จากผลการทดลองเบื้องต้น ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ใช้อัตราการไหลที่ 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ เนื่องจากเป็นอัตราไหลที่ไม่ทำให้ PDMS เกิดการรั่วของของไหล และที่อัตราการไหลนี้พบว่าทำให้น้ำยาและสิ่งส่งตรวจที่ได้ฉีดผ่าน injection loop ไหลมายังบริเวณ detection zone ใช้เวลา 2.5 นาที โดยสังเกตจากสเปกตรัมและค่าการดูดกลืนแสงที่คงที่ ในเบื้องต้นจึงเลือกทำการหยุดปั๊ม หลังการฉีดสาร 2.5 นาที เพื่อบันทึกอัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง และเพื่อศึกษาถึงอัตราการไหลที่ดีที่สุดที่ทำการพาสสารผสมมายังบริเวณตรวจวัดอย่างเหมาะสม และให้สัญญาณการตรวจวัดที่ดี และอยู่ในช่วงที่เกิดปฏิกิริยาเป็นเส้นตรงพอดี จึงได้ทำการศึกษาอัตราการไหลอื่นๆ ได้แก่ ที่ 30, 35, 40, 45 และ 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ โดยตรวจวัดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มและปฏิกิริยาแจฟฟี่ที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 500 nm และ 510 nm ตามลำดับ

ผลการทดสอบหาอัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณอัลบูมิน ดังแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่าอัตราการไหล 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ ให้ค่าการดูดกลืนแสงดีที่สุด ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินพบว่า อัตราการไหล 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด และที่อัตราการไหล 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยที่สุด สำหรับการวิเคราะห์ทั้งไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน อาจเนื่องมาจากอัตราการไหลที่เร็วเกินไป ทำให้อาหารผสมไหลออกบริเวณตรวจวัดแล้ว

เนื่องจากอัตราการไหลที่เลือกใช้ ใช้สำหรับพาสสิ่งตัวอย่างและน้ำยาเข้าไปในระบบของไหลจุลภาค ยังบริเวณ detection zone และเมื่อทำการตรวจวัดเสร็จแล้ว จะทำการล้างปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เพื่อให้สามารถใช้ PDMS microchip ซ้ำได้ ดังนั้นอัตราการไหลจึงมีผลต่อระยะเวลาในการชะล้าง ผลการทดลองพบว่าที่อัตราการไหล 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ จะใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 20 นาที ต่อ 1 การทดสอบ จึงสามารถเริ่มทำการตรวจวัดตัวอย่างต่อไปได้ ส่วนที่อัตราการไหล 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ ใช้เวลาในการตรวจวัดประมาณ 17 นาที ส่วนที่อัตราการไหล 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ จะใช้เวลาในการตรวจวัดต่อ 1 ตัวอย่างเร็วที่สุดคือ 10 นาที อย่างไรก็ตามที่หลังจากพิจารณาาร่วมกันระหว่างสัญญาณการตรวจวัดและระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่าง พบว่าที่อัตราการไหล 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ มีความเหมาะสมที่สุด โดยใช้เวลา 15 นาทีต่อ 1 การทดสอบ และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม และยังเป็นอัตราการไหลที่ PDMS microchip ทนแรงดันได้ดี ดังนั้น สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน ในระบบของไหลจุลภาคในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้อัตราการไหลของบัฟเฟอร์ที่ 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ ตลอดการทดลอง



ภาพที่ 4.5 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหล กับค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ● แทนปฏิกิริยา latex agglutination ; ■ แทน Kinetic Jaffe reaction

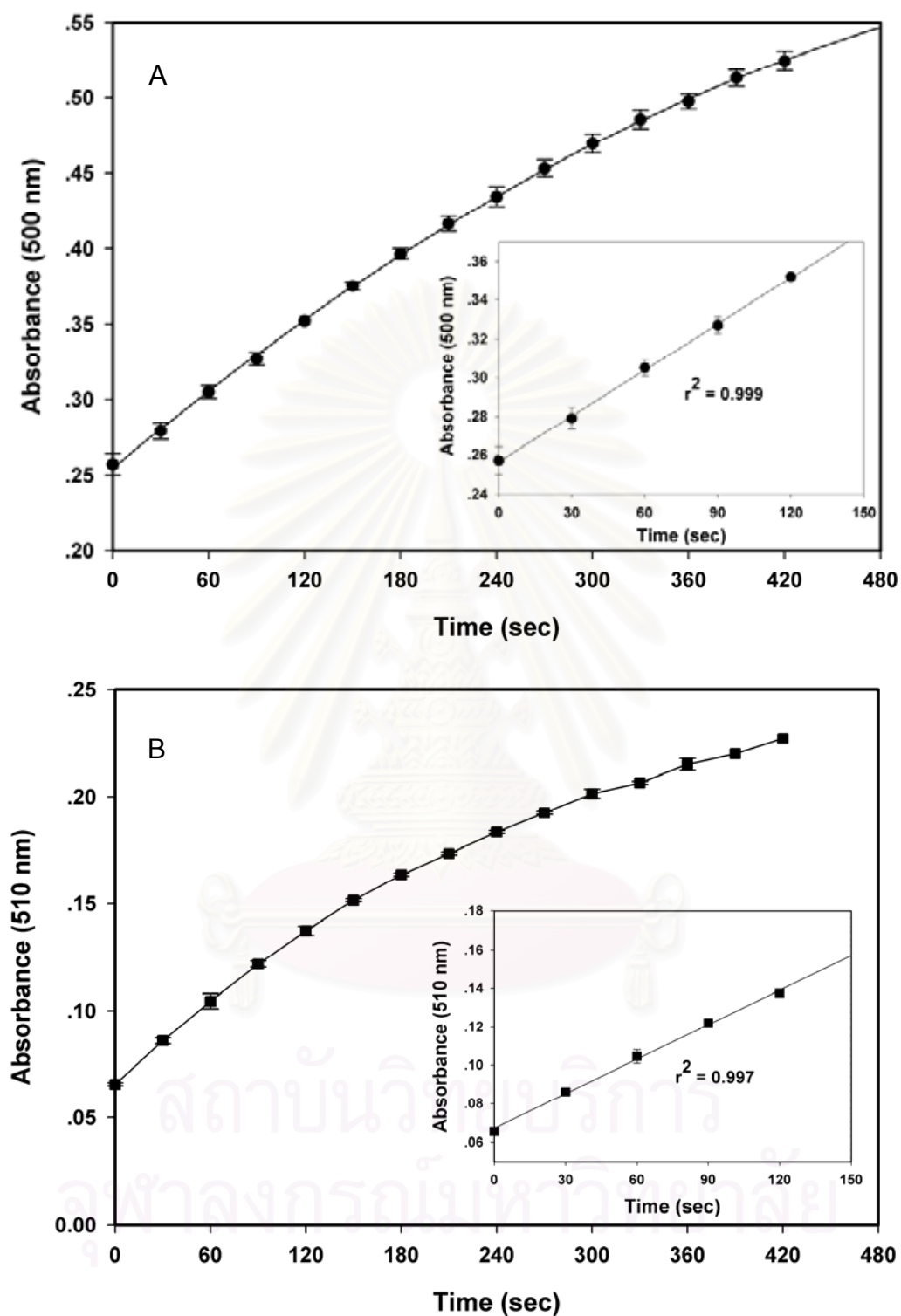
2.4 ผลการทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินนั้นเป็นการตรวจวัดแบบวิธี kinetic การเกิดปฏิกิริยาในช่วงแรกอาจยังไม่อยู่ในภาวะสมดุล (lag phase) การวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงควรเลือกช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเส้นตรง และที่สำคัญ การตรวจวัดครีเอตินินด้วยปฏิกิริยาแจฟฟีนั้น มีรายงานวิจัยว่ามีการเกิดปฏิกิริยาอย่างไม่จำเพาะจากสารที่ไม่ใช่ครีเอตินิน⁽¹³⁴⁾ ซึ่งส่วนมากจะเกิดในช่วงท้ายของปฏิกิริยา และทำให้อัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นไม่เป็นเส้นตรง และถ้าให้มีการเกิดปฏิกิริยานานเกินไป สารที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย alkaline picrate ซ้ำ เช่น โปรตีน กลูโคส วิตามินซี จะรบกวนการตรวจวัด โดยสารดังกล่าวทำการรีดิวซ์ picrate เป็น picramate⁽⁵⁹⁾

โดยในการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินนั้น ทำได้โดยเจือจางปัสสาวะด้วยน้ำกลั่น 15 เท่า จากนั้นนำมาทำการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในระบบของไหลจุลภาค โดยใช้อัตราการไหล 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ ฉีดปัสสาวะที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 μL และน้ำยาลาเท็กซ์ 100 μL ทำการจับเวลา ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 7 นาที แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟระหว่างเวลาและค่าการดูดกลืนแสง เพื่อจะเลือกช่วงที่เกิดปฏิกิริยาเป็นเส้นตรง มาใช้ในการตรวจวัดอัลบูมิน ในการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดครีเอตินินในปัสสาวะนั้น ทำได้โดยการฉีดปัสสาวะที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า ปริมาตร 5 μL กับน้ำยาแจฟฟี 100 μL และ ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ทำการตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยจับเวลาทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 7 นาที แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างเวลากับค่าการดูดกลืนแสง

ผลการตรวจวัดพบว่า การเกิดปฏิกิริยา latex agglutination สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมิน ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น เมื่อใช้เวลานานขึ้น แต่ช่วงท้ายๆ ของปฏิกิริยา อัตราการดูดกลืนแสงจะไม่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วน และสังเกตได้ชัดเจน ในกรณีของปฏิกิริยาแจฟฟี ดังนั้นเมื่อพิจารณาร่วมกันระหว่างความเหมาะสมของระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยากับความไวของการตรวจวัด เวลาที่เหมาะสมสำหรับการติดตามการเกิดปฏิกิริยาของทั้งไมโครอัลบูมินและครีเอตินินคือ 2 นาที โดยปฏิกิริยายังคงอยู่ในช่วงเส้นตรง และมีค่า $r^2 = 0.999$ และ 0.997 สำหรับไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ตามลำดับ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



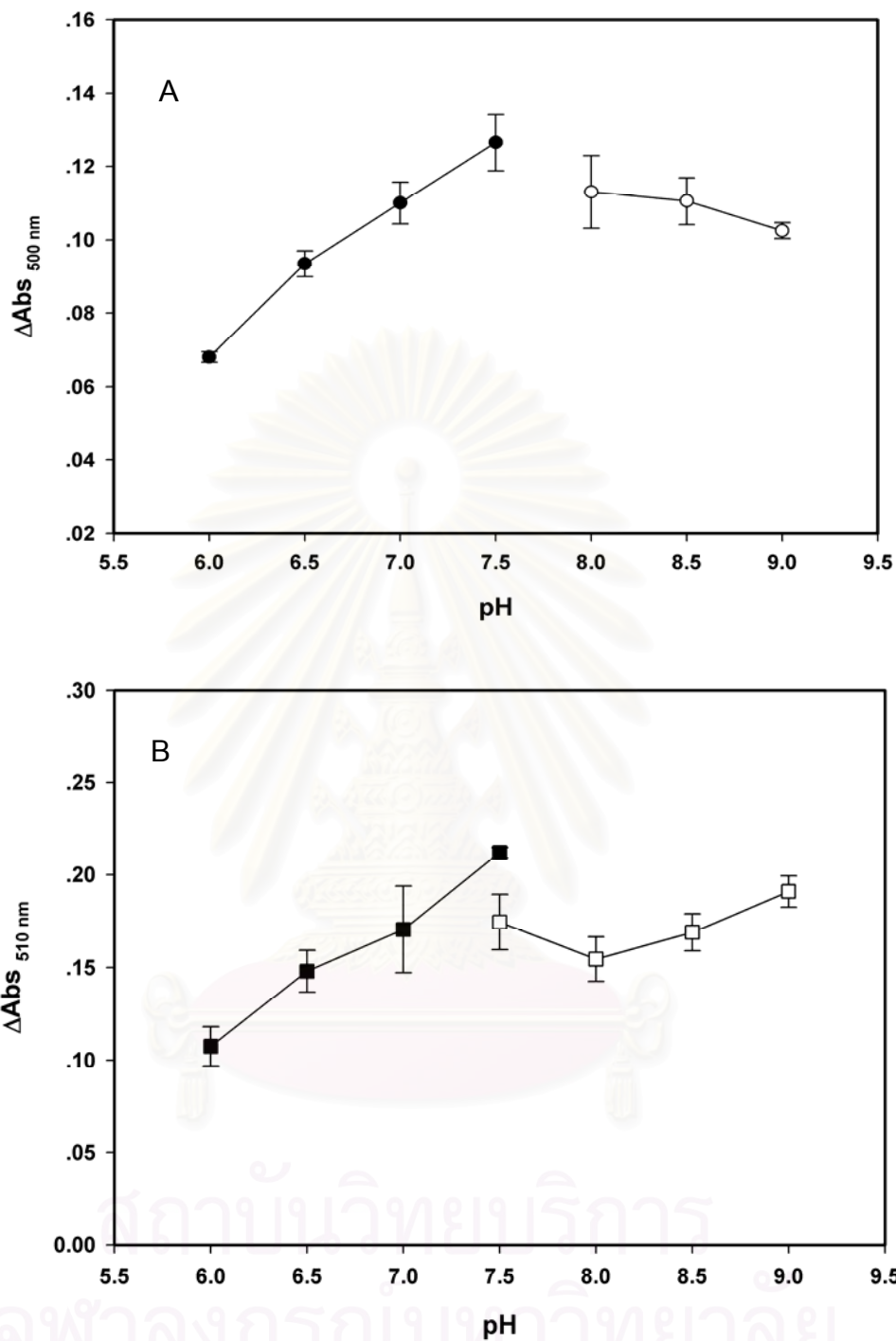
ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น (A) ปฏิกริยา latex agglutination จากการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมิน ภาพแทรก คือช่วงเวลาที่เกิดปฏิกริยาเป็นเส้นตรง ($r^2 = 0.999$) (B) ปฏิกริยาแฉงไฟจากการตรวจวัดระดับครีเอทีนิน ภาพแทรก คือช่วงเวลาที่เกิดปฏิกริยาเป็นเส้นตรง ($r^2 = 0.997$)

2.5 ผลการทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์และ pH ที่ใช้ในระบบของไหลจุลภาค

ในการเกิดปฏิกิริยา latex agglutination และปฏิกิริยาแฉะฟีในระบบของไหลจุลภาคนั้น บัฟเฟอร์ซึ่งเป็นตัวพาสารที่นำมาตรวจวัดและน้ำยาที่ฉีดผ่าน injection loop เข้าไปยังบริเวณตรวจวัด นั้นมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากช่วงรอยต่อระหว่างบัฟเฟอร์กับสารผสม อาจมีการแพร่ของสารละลายเกิดขึ้น และส่งผลต่อ pH ของน้ำยาที่ใช้ตรวจวัด และมีผลต่อสัญญาณการตรวจวัด ในงานวิจัยจึงทำการทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์และ pH ที่เหมาะสมใช้เป็นบัฟเฟอร์ตัวพาสารที่ต้องการตรวจวัดและน้ำยาเข้าไปยังระบบของไหลจุลภาค โดยทดสอบบัฟเฟอร์ pH ตั้งแต่ช่วง 6.0 – 9.0 โดยให้มีช่วงห่างของ pH 0.5 ใช้ 20 mM phosphate buffer ทำการทดสอบ pH ช่วง 6.0 – 7.5 ส่วน pH ช่วง 8.0 – 9.0 ทดสอบด้วย 20 mM Tris-HCl buffer และเพื่อทดสอบว่าชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการตรวจวัดหรือไม่ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณครีเอทีนิน จึงได้เลือกทดสอบกับ Tris-HCl buffer ที่ pH 7.5 ด้วย

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.7 A พบว่าการใช้ 20 mM phosphate buffer เป็นบัฟเฟอร์ตัวพาในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ pH 7.5 แต่เมื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ 20 mM Tris-HCl buffer พบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินโดยใช้ 20 mM phosphate buffer เป็นบัฟเฟอร์ตัวพา พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการใช้ 20 mM Tris-HCl buffer เป็นบัฟเฟอร์ตัวพา แต่เมื่อเปรียบเทียบบัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดพบว่า 20 mM phosphate buffer pH 7.5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่า 20 mM Tris-HCl pH 9 เล็กน้อย ถึงแม้ว่าปฏิกิริยาแฉะฟีจะเกิดดีที่สภาวะเป็นด่างก็ตาม ดังแสดงในภาพที่ 4.7 B แสดงให้เห็นว่านอกเหนือจากความเป็นกรด-ด่างแล้ว ชนิดของบัฟเฟอร์ยังมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาแฉะฟี ดังนั้นจึงเลือกใช้ 20 mM phosphate buffer pH 7.5 เป็นบัฟเฟอร์ตัวพา เพราะให้สัญญาณการตรวจวัดที่ดีสำหรับการตรวจวัดสารทั้งสองตัว และทำให้การติดตั้งระบบของไหลจุลภาคมีความสะดวกยิ่งขึ้น กรณีใช้บัฟเฟอร์ตัวเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และชนิดของบัฟเฟอร์ ต่อค่าการดูดกลืนแสง (A) การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน ● แทนอัลบูมินความเข้มข้น 5 mg/L ที่ทดสอบด้วย 20 mM phosphate buffer ○ แทนอัลบูมินความเข้มข้น 5 mg/L ที่ทดสอบด้วย 20 mM Tris-HCl buffer (B) การตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน ■ แทนครีเอตินินความเข้มข้น 40 mg/L ที่ทดสอบด้วย 20 mM phosphate buffer และ □ แทนครีเอตินินความเข้มข้น 40 mg/L ที่ทดสอบด้วย 20 mM Tris-HCl buffer

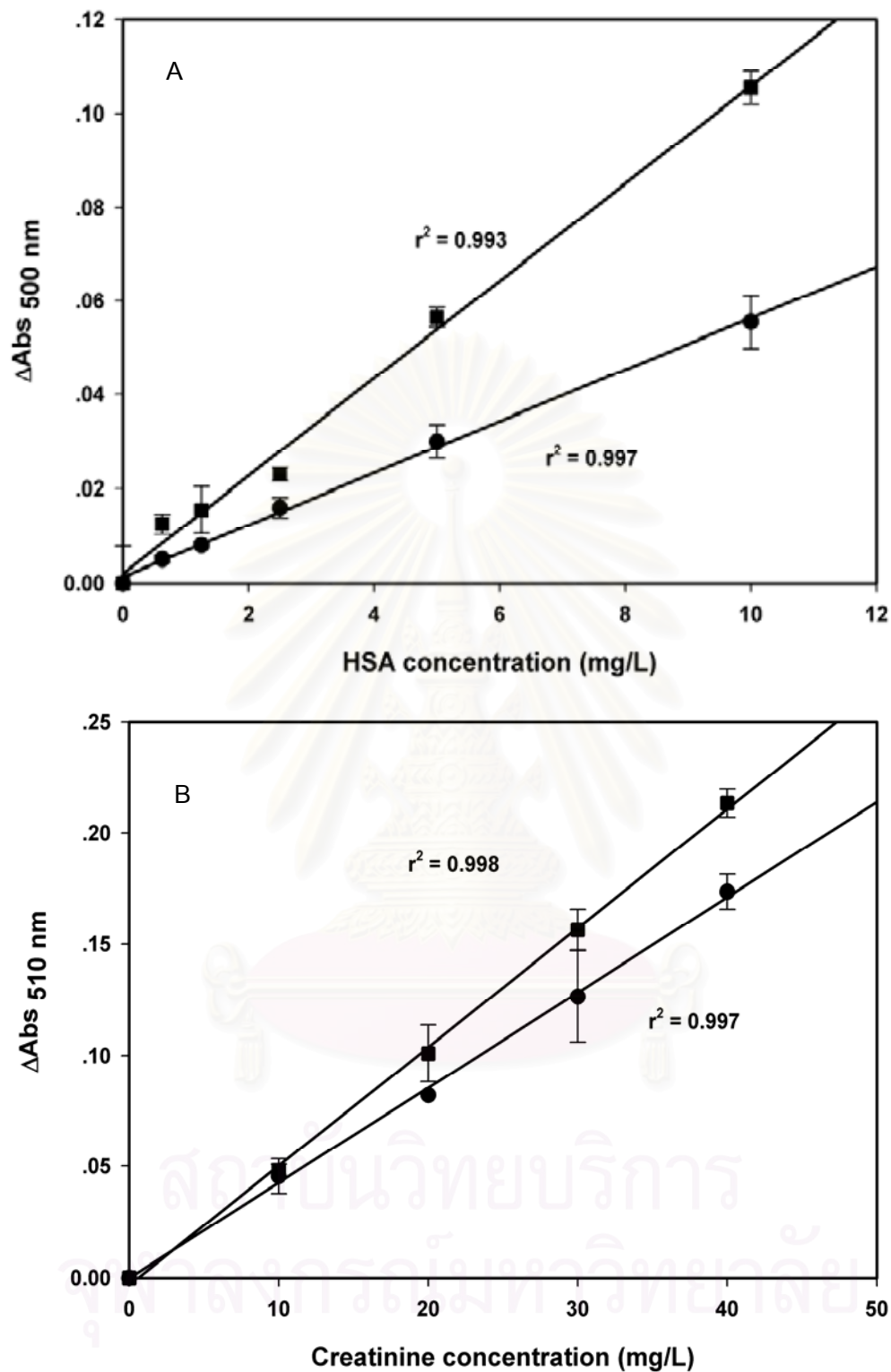
2.6 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม ปฏิกิริยาจะเกิดเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโปรตีน ซึ่งจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม เพราะอุณหภูมิมิมีผลต่อโครงสร้างของโปรตีน หากอุณหภูมิสูงเกินไป โปรตีนอาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (denature) ส่วนอุณหภูมิต่ำเกินไป จะไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน ทำให้แอนติบอดีไม่จับกับแอนติเจน สำหรับการตรวจวัดครีเอทีนินโดยปฏิกิริยาแฉฟีนนั้น ความเร็วของการจับกันของน้ำยาแฉฟีนกับครีเอทีนินขึ้นอยู่กับอุณหภูมิเช่นกัน⁽¹³⁵⁾ เนื่องจากต้องการเปรียบเทียบว่าที่อุณหภูมิห้องกับที่ 37 °C นั้นทำให้ความไวของการตรวจวัดแตกต่างกันหรือไม่ จึงมีการติดตั้งเครื่องควบคุมอุณหภูมิภายในระบบของไหลจุลภาค และทำการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินที่อุณหภูมิ 25 °C และ 37 °C นำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง

จากผลการทดลองพบว่า ปฏิกิริยา latex agglutination สำหรับการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินความเข้มข้นระหว่าง 0-10 mg/L นั้น ความชันของกราฟมาตรฐานที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิตั้งที่ 25 °C มีค่าเท่ากับ 0.0054 mg/L ต่อหน่วยการดูดกลืนแสง ส่วนความชันของกราฟมาตรฐานเมื่อใช้อุณหภูมิตั้งที่ 37 °C มีค่า 0.010 mg/L ต่อหน่วยการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าความชันนี้มากกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 1.85 เท่า ดังแสดงในภาพที่ 4.8 A

ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาแฉฟีนในการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนิน ความเข้มข้นระหว่าง 0-40 mg/L ความชันของกราฟมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0.0042 mg/L และ 0.0053 ต่อหน่วยการดูดกลืนแสง เมื่อใช้อุณหภูมิตั้งที่ 25 °C และ 37 °C ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 37 °C ให้ค่าความชันมากกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C เป็น 1.26 เท่า ดังแสดงในภาพที่ 4.8 B จะเห็นได้ว่าถ้าใช้อุณหภูมิตั้งที่ 37 °C สำหรับติดตามการเกิดปฏิกิริยาทั้ง latex agglutination และปฏิกิริยาแฉฟีน จะทำให้ความไวของการตรวจวัดเพิ่มขึ้นอย่างมาก ดังนั้นในระบบของไหลจุลภาค จึงได้มีเครื่องควบคุมอุณหภูมิและใช้อุณหภูมิตั้งที่ 37 °C ตลอดการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้กับอัตราการเกิดปฏิกิริยา (A) ปฏิกิริยา latex agglutination สำหรับตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมิน (B) ปฏิกิริยาแอฟฟี สำหรับการตรวจวัดระดับครีเอทีนิน ; ■ 37 °C; ● 25 °C

2.7 ผลการทดสอบ carryover ของระบบของไหลจุลภาค

เนื่องจากการตรวจวัดสารโดยใช้ระบบของไหลจุลภาค อาจทำให้เกิดการ carryover ได้ เนื่องจาก PDMS มีคุณสมบัติในการดูดซับสารได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน ทำให้การตรวจวัดซ้ำกันหลายๆ ครั้งมีค่า reproducibility ไม่ดีนัก และทำให้ตรวจวัดสิ่งตัวอย่างได้ค่าสูงมากกว่าความเป็นจริง ดังนั้นจึงทำการทดสอบผลของ carryover ต่อการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินในระบบของไหลจุลภาค โดยทำการตรวจวัดสารความเข้มข้นสูงซ้ำกันสองครั้ง และตามด้วยการตรวจวัดสารความเข้มข้นต่ำซ้ำกันสามครั้ง ความเข้มข้นสูงสำหรับอัลบูมิน และครีเอทีนินที่ใช้ในการตรวจวัดคือ 10 mg/L และ 40 mg/L ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นต่ำใช้อัลบูมินความเข้มข้น 1 mg/L และครีเอทีนิน 10 mg/L เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารความเข้มข้นต่ำและสูงแล้ว นำมาคำนวณค่า %carryover จากสูตร

$$\% \text{ carryover} = (b1-b3)/(a2-b3) \times 100$$

a คือค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีความเข้มข้นสูง

b คือค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีความเข้มข้นต่ำ

ตัวเลขคือครั้งที่ทำการตรวจวัด

ผลการทดลองพบว่า ระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาในงานวิจัยนี้ มีการ carryover สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน คิดเป็น 3.75% และ 1.98% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 ผลของ carryover ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน ด้วยระบบของไหลจุลภาค

albumin (mg/L)	ครั้งที่	A2	A1	A2-A1	สัญลักษณ์
10	1	0.282	0.176	0.106	a1
	2	0.318	0.216	0.102	a2
1	1	0.234	0.209	0.025	b1
	2	0.213	0.187	0.026	b2
	3	0.113	0.091	0.022	b3

$$\begin{aligned} \% \text{ carryover} &= (b1-b3)/(a2-b3) \times 100 \\ &= (0.025-0.022)/(0.102-0.022) \\ &= 0.0375 \times 100 \\ \% \text{ carryover} &= 3.75\% \end{aligned}$$

ตารางที่ 4.2 ผลของ Carry over ในการตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน ด้วยระบบของไหลจุลภาค

creatinine (mg/L)	ครั้งที่	A2	A1	A2-A1	สัญลักษณ์
40	1	0.342	0.136	0.206	a1
	2	0.405	0.197	0.208	a2
10	1	0.129	0.069	0.06	b1
	2	0.115	0.065	0.05	b2
	3	0.121	0.064	0.057	b3

$$\begin{aligned} \% \text{ Carryover} &= (b1-b3)/(a2-b3) \times 100 \\ &= (0.06-0.057)/(0.208-0.057) \\ &= 0.019 \times 100 \\ \% \text{ carryover} &= 1.9\% \end{aligned}$$

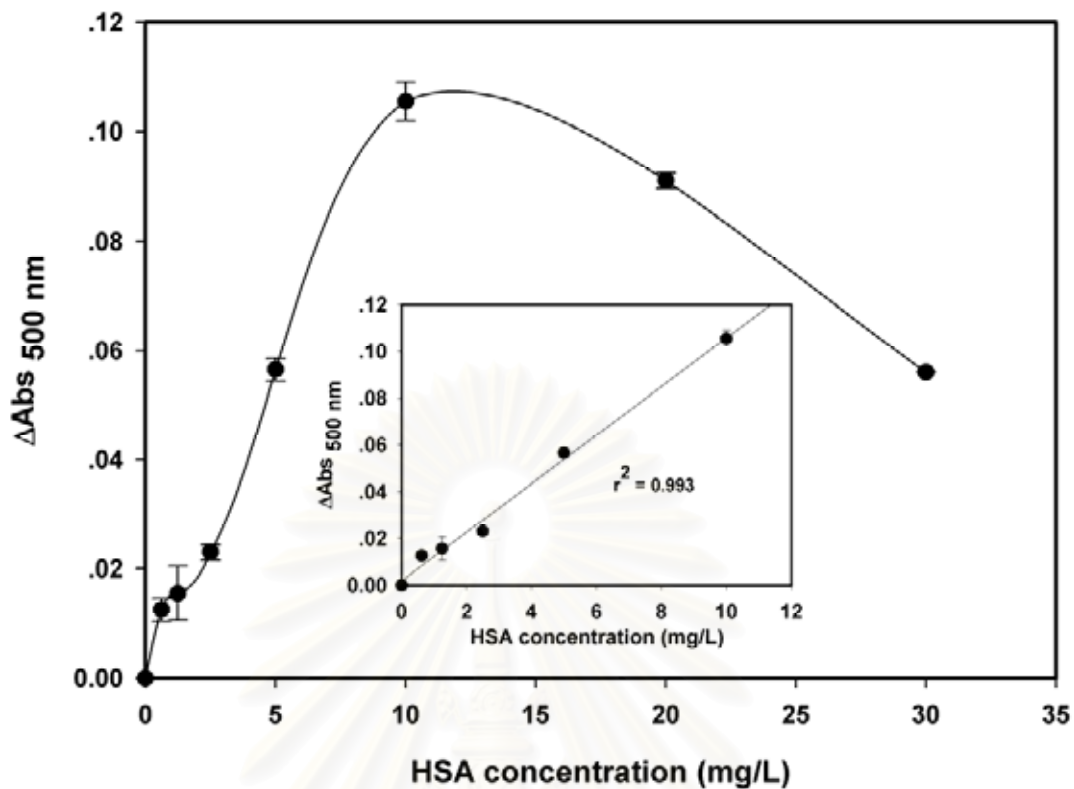
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterization)

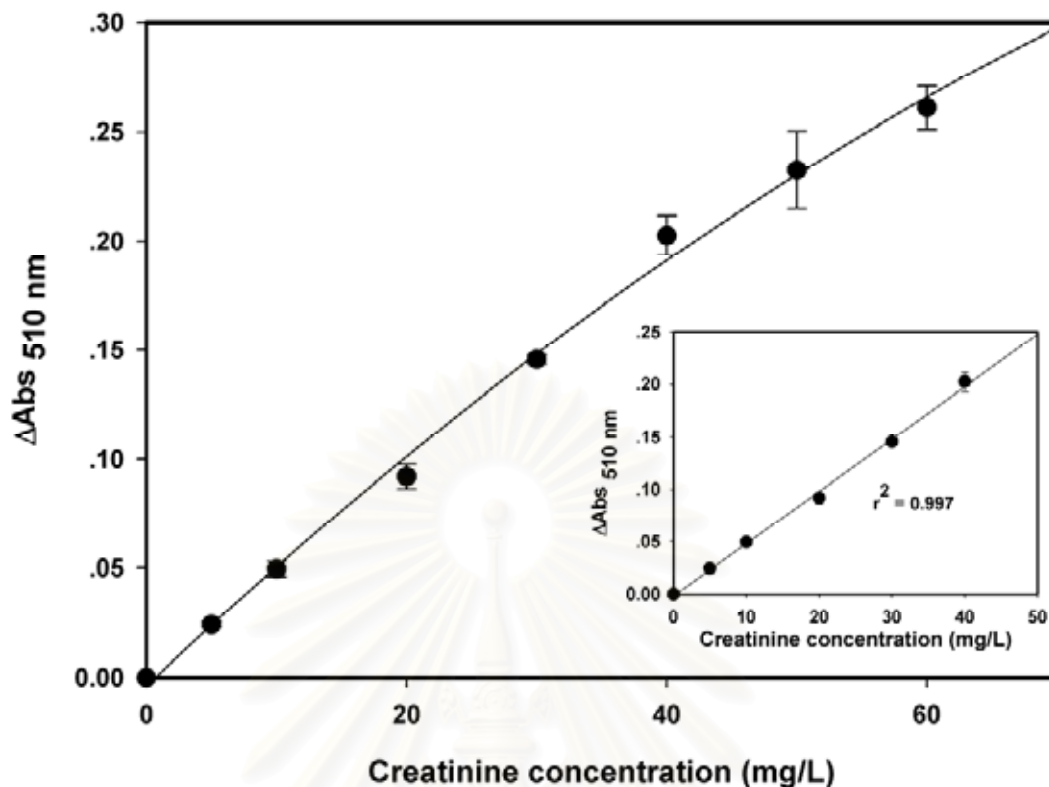
3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)

โดยในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินนั้น จะทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของอัลบูมินที่ทราบความเข้มข้น คือ 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, และ 30 mg/L ปริมาตร 5 μ L กับน้ำยาลาเท็กซ์ปริมาตร 100 μ L โดยใช้ 20 mM phosphate buffer pH 7.5 เป็นบัฟเฟอร์ตัวพา ใช้อัตราการไหล 40 μ L/min อุณหภูมิ 37 °C เมื่อฉีดน้ำยาลาเท็กซ์และอัลบูมินเข้าสู่ระบบแล้ว ทำการหยุดปั๊ม และบันทึกอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 500 nm เป็นเวลา 2 นาที แต่ละความเข้มข้นทำการตรวจวัดซ้ำกัน 2 ครั้ง แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของอัลบูมินกับค่าการดูดกลืนแสง ดังในภาพที่ 4.9 ผลการทดลองพบว่ากราฟมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0-10 mg/L ($r^2 = 0.993$) ความเข้มข้นของอัลบูมินที่ 20 และ 30 mg/L ทำให้อัตราการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงลดลง ทั้งนี้อาจอธิบายได้ด้วยการเกิดปรากฏการณ์ postzone phenomenon คือปริมาณแอนติเจนมากเกินไปจนทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยา⁽¹³⁶⁾ ดังนั้นจึงใช้ช่วงความเข้มข้นของอัลบูมิน 0-10 mg/L ในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะ

สำหรับช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินนั้น ทำโดยตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างน้ำยาแฉฟี่ 100 μ L และ ครีเอตินินความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 mg/L โดยใช้สภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบไมโครอัลบูมินคือใช้ 20 mM phosphate buffer pH 7.5 เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้พาสารเข้าสู่ระบบ ใช้อัตราการไหล 40 μ L/min ทำการตรวจวัดที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อสารถูกพาเข้ามาสู่ microchip แล้ว ทำการ stop pump และเก็บข้อมูลของค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นเป็นเวลา 2 นาที ที่ความยาวคลื่น 510 nm แต่ละความเข้มข้นทำการตรวจวัดซ้ำกัน 2 ครั้ง แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของครีเอตินินกับค่าการดูดกลืนแสง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของครีเอตินินที่เพิ่มขึ้น แต่กราฟเริ่มโค้งเมื่อทดสอบครีเอตินินความเข้มข้น 50 และ 60 mg/L กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดครีเอตินินมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0-40 mg/L ($r^2 = 0.997$) ดังนั้นจึงเลือกใช้ช่วงความเข้มข้นนี้ ในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะ



ภาพที่ 4.9 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยระบบของไหลจุลภาค กราฟมีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-10 mg/L ($r^2 = 0.993$)



ภาพที่ 4.10 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะด้วยระบบของไหล
จุลภาค กราฟมีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-40 mg/L ($r^2 = 0.997$)

3.2 ผลการทดสอบค่า limit of detection (LOD)

ได้ทำการศึกษาค่า limit of detection ของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน
และครีเอตินิน โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank คือทำการฉีดน้ำกลั่นแทนการฉีดสารละลาย
อัลบูมินหรือครีเอตินิน และทำการตรวจวัดทั้งหมด 10 ครั้ง นำค่าที่ตรวจวัดได้มาคำนวณหาค่า
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่า limit of detection คำนวณจากสูตร

$$\text{Limit of detection} = 3.SD/S$$

SD คือ standard derivations ที่ได้จากการวัด blank 10 ครั้ง และ S คือ
sensitivity ซึ่งหาได้จากค่าความชันจากการทำกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าการตรวจวัด
ไมโครอัลบูมินมีค่า limit of detection 0.81 mg/L และการตรวจวัดครีเอตินินมีค่า limit of
detection 3.27 mg/L ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบหาค่า limit of detection ของไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน

ค่าทางสถิติ	ไมโครอัลบูมิน	ครีเอตินิน
SD	0.002828	0.005922
3SD	0.008485	0.017765
slope	0.01045	0.005439
LOD	0.81 mg/L	3.27mg/L

3.3 ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)

การทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน เป็นการทดสอบสารที่อาจพบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งอาจจะมีผลต่อการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ โดยนำสารที่อาจพบได้ในปัสสาวะ ได้แก่บิลิรูบิน (bilirubin), กลูโคส (glucose), NaCl, transferrin, ฮีโมโกลบิน (hemoglobin), วิตามินซี (ascorbic acid), human immunoglobulin (IgG) เติมลงในสารละลายอัลบูมินมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 5 mg/L หรือในสารละลายครีเอตินินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 30 mg/L แล้วทำการตรวจวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้น แล้วนำมาคำนวณหา %Recovery เทียบกับอัลบูมินและครีเอตินินก่อนและหลังการเติมสารรบกวนแต่ละตัว จากสูตร โดยค่า recovery ในช่วง 95-105% ถือว่ายอมรับได้ว่าสารที่นำมาทดสอบไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ

$$\%Recovery = (Recovered\ concentration / Added\ concentration) \times 100$$

ผลการตรวจวัดแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า 6 mg/L hemoglobin, 100 mg/L IgG และ 100 mg/L transferrin รบกวนการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน โดยมี %recovery ในช่วง 125.3 -137.3 % แต่เมื่อทำการเจือจางสารรบกวนลง 30 เท่า พบว่า %Recovery ลดลงอยู่ในช่วง 110.0 -115.3% นอกจากนี้พบว่า bilirubin และ NaCl ความเข้มข้นสูง เช่น 80 mg/L bilirubin และ 1,500 mg/L NaCl, รบกวนการตรวจวัด โดยมี %recovery 110.7-114.0% ส่วน 200 mg/L ascorbic acid และ 1,250 mg/L glucose ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ (recovery 100-101.3%)

ส่วนสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า 6 mg/L hemoglobin, 1,000 mg/L IgG, 700 mg/L ascorbic acid และ 9,000 mg/L glucose รบกวนการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินด้วยวิธีแฉฟี่ โดยมี %recovery ในช่วง 112.2-139.5% อย่างไรก็ตาม เมื่อเจือจางสารรบกวนให้มีความเข้มข้นน้อยลงแล้ว พบว่าให้ค่า %recovery ลดลง อยู่ในช่วง 95.2-101.8% ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ ซึ่งในการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะ จะต้องทำการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ 50 เท่าก่อนนำมาตรวจวัด จึงเป็นการลดการรบกวนจากสารที่อยู่ในปัสสาวะได้ ส่วนสารรบกวนอื่นๆ ได้แก่ 1,500 mg/L NaCl, 10 mg/L bilirubin และ 300 mg/L human serum albumin มี %recovery ในช่วง 94.4-106.7% ซึ่งมีผลรบกวนการตรวจวัดเพียงเล็กน้อย ส่วน 100 mg/L transferrin และ 1,250 mg/L glucose ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ (recovery 95.2-100%)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการตรวจวัดสารรบกวนในตรวจวัดปริมาณอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะด้วยระบบของไหลจุลภาค

สารที่ทดสอบ	ความเข้มข้น	%Recovery	
		ไมโครอัลบูมิน	ครีเอตินิน
albumin	300 mg/L	-	104.8 ± 14.9
	5 mg/L	100.0 ± 3.7	-
creatinine	30 mg/L	-	100.0 ± 6.9
hemoglobin	6 mg/L	125.3 ± 1.8	114.4 ± 9.5
	1 mg/L	-	101.9 ± 1.3
	0.2 mg/L	110.0 ± 2.8	-
IgG	1,000 mg/L	-	112.2 ± 5.2
	100 mg/L	137.3 ± 7.5	-
	20 mg/L IgG	-	101.8 ± 12.0
	3 mg/L	111.3 ± 0.9	-
transferrin	100 mg/L	129.3 ± 0.0	100.0 ± 9.2
	3 mg/L	115.3 ± 2.8	-
bilirubin	116 mg/L	-	95.9 ± 5.0
	80 mg/L	114.0 ± 0.9	-
	10 mg/L	-	106.7 ± 14.9
NaCl	1,500 mg/L	110.7 ± 1.8	94.4 ± 1.3
ascorbic acid	700 mg/L	-	139.5 ± 15.8
	200 mg/L	101.3 ± 3.7	101.9 ± 2.7
glucose	9,000 mg/L	-	130.9 ± 25.3
	1,250 mg/L	100.0 ± 0.0	95.2 ± 1.3

3.4 ผลการศึกษาค่า precision และ reproducibility

Within-run precision ศึกษาโดยทำการตรวจวัดอัลบูมินมาตรฐานความเข้มข้น 10 mg/L หรือการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินความเข้มข้น 20 mg/L จำนวนอย่างน้อย 10 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation)

$$\%CV = (SD/mean) \times 100$$

ผลการทดลองพบว่า %CV ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินคือ 5.10% และ 5.99% ตามลำดับ

4. ผลการทดลองตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะจากกลุ่มประชากร จำนวน 15 คน ซึ่งเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวาน นำปัสสาวะมาปั่นตกตะกอนที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาเจือจาง 15-30 เท่า ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 9 g/L สำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินิน เจือจางปัสสาวะก่อนนำไปตรวจวัดด้วยด้วยน้ำกลั่น 50-100 เท่า ผลการตรวจวัดด้วยระบบของไหลจุลภาคนำมาเปรียบเทียบกับวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

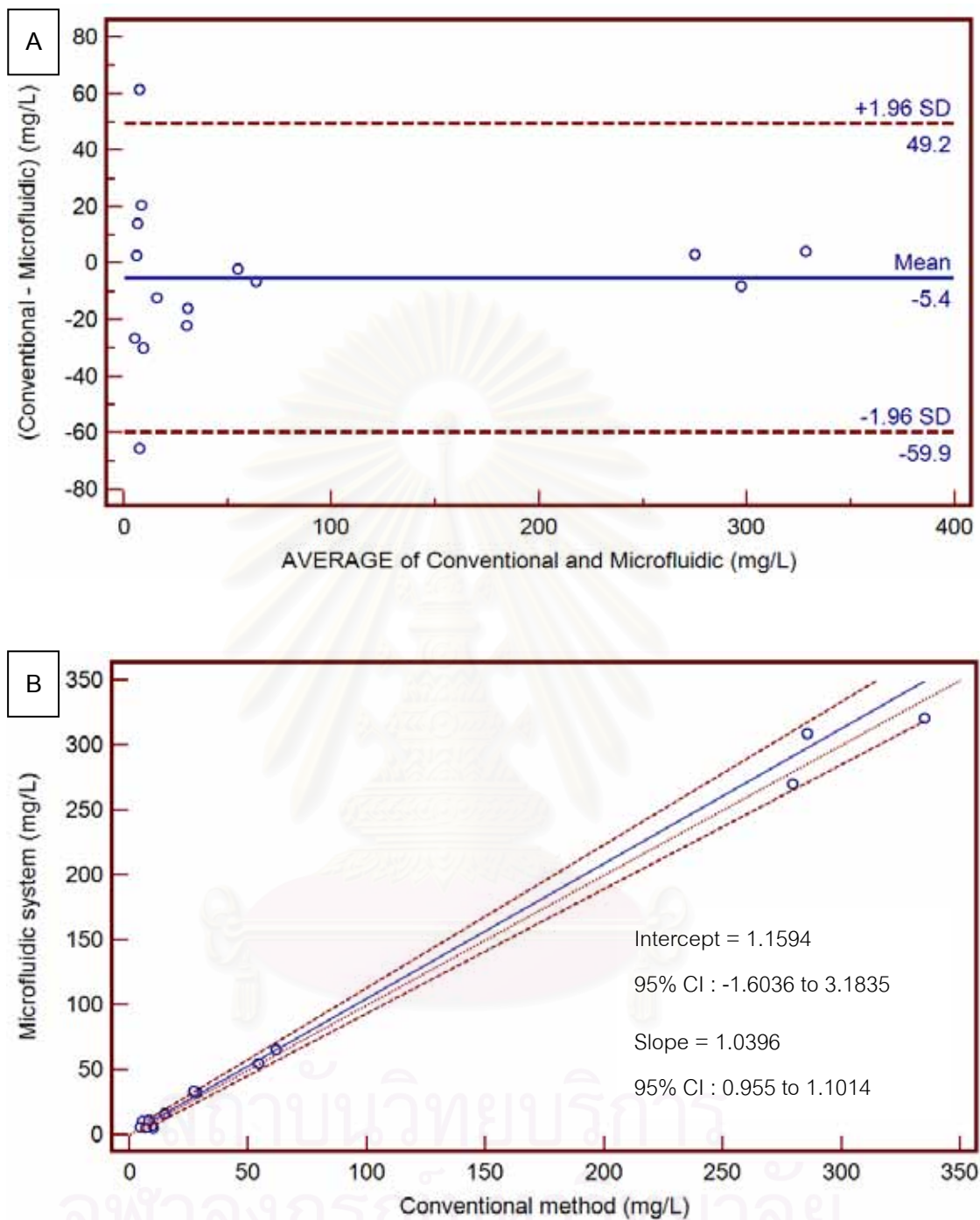
ผลการตรวจวัดทั้งสองวิธี เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Bland and Altman test พบว่าวิธีที่นำเสนอโดยระบบของไหลจุลภาค ไม่มี bias ของการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมิน (ภาพที่ 4.11 A) ครีเอตินิน (ภาพที่ 4.12 A) และค่าอัตราส่วนระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน (ภาพที่ 4.13 A) เนื่องจากผลต่างของวิธีของไหลจุลภาคกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ส่วนมากอยู่ในช่วง ± 1.96 SD

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธี ยังได้มีการใช้สถิติ Passing-bablok regression สำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน ดังแสดงในภาพที่ 4.11 B พบว่าสมการ Passing-bablok regression คือ $y = 1.0396x + 1.1594$ ($y = Ax + B$) ที่ช่วงค่าความเชื่อมั่น 95% ค่าความชัน (slope) ใช้สำหรับทดสอบสมมติฐานว่า $A = 1$ ซึ่งจะยอมรับสมมติฐานก็ต่อเมื่อช่วงความเชื่อมั่นสำหรับ A มีค่า 1 อยู่ด้วย ผลการทดลองดังภาพที่ 4.11 B พบว่าค่า slope อยู่ในช่วง

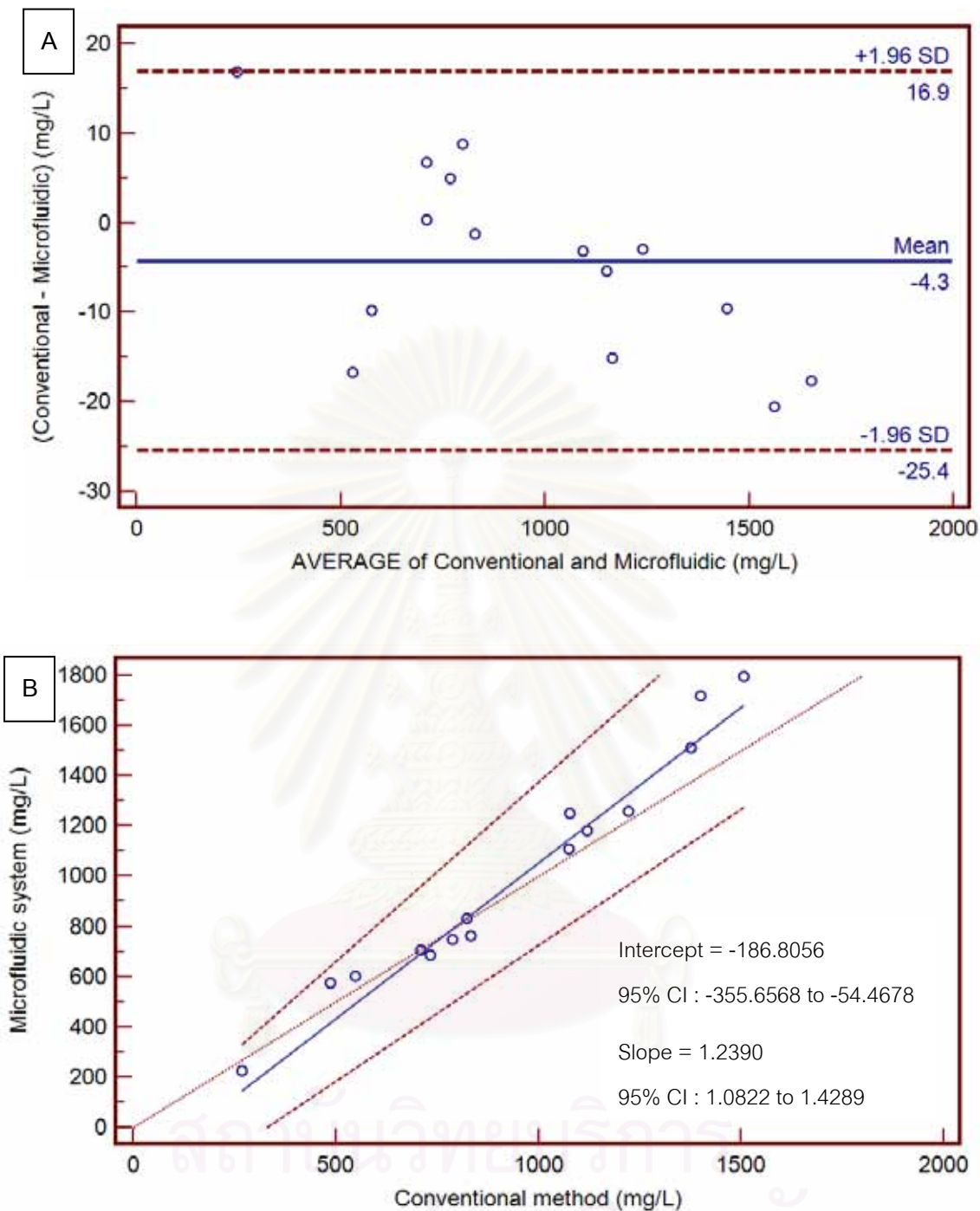
0.955 ถึง 1.1014 ซึ่งมีค่า 1 อยู่ในช่วงดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า สามารถยอมรับว่าค่า slope ของสมการไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่าสถิติแสดงให้เห็นว่าค่าความชัน (1.0396) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ 1 และค่าจุดตัดแกน y ซึ่งใช้ทดสอบสมมติฐานว่า $B = 0$ ซึ่งจะยอมรับสมมติฐานถ้าช่วงความเชื่อมั่นสำหรับจุดตัดนั้นมีค่า 0 อยู่ด้วยในผลการทดลอง ค่าจุดตัดแกนมีค่าอยู่ในช่วง -1.6036 ถึง 3.1835 ซึ่งมีค่า 0 อยู่ในช่วงดังกล่าว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่าจุดตัดแกน y (1.1594) จากสมการข้างต้น มีค่าไม่ต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับการตรวจวัดครีเอทีนินและค่าอัตราส่วนระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Passing-bablok regression ให้ผลที่เป็นไปในลักษณะเดียวกับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมิน คือค่า slope ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ 1 และค่าจุดตัดแกน y มีค่าไม่ต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 4.12 B และ 4.13 B เมื่อนำค่าอัตราส่วนระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินมาสร้างกราฟด้วยโปรแกรม Sigmaplot และนำมาหาค่าความสัมพันธ์ พบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่า $r^2 = 0.985$ ($n = 15$) ดังในภาพที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน ครีเอทีนิน และค่าอัตราส่วนระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน ด้วยระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาในงานวิจัยนี้ มีความสัมพันธ์ดีกับวิธีที่ใช้ตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการทั่วไป

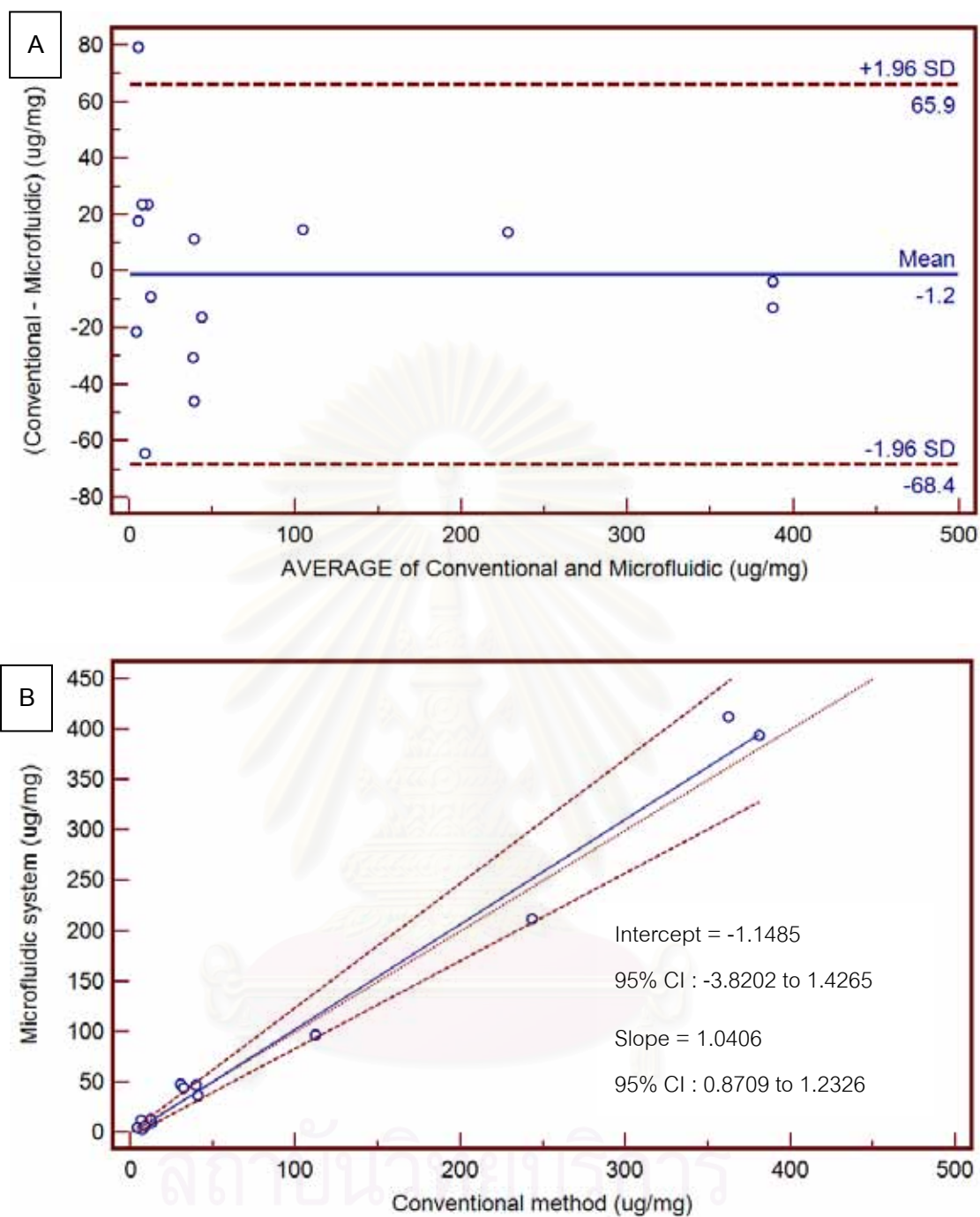
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



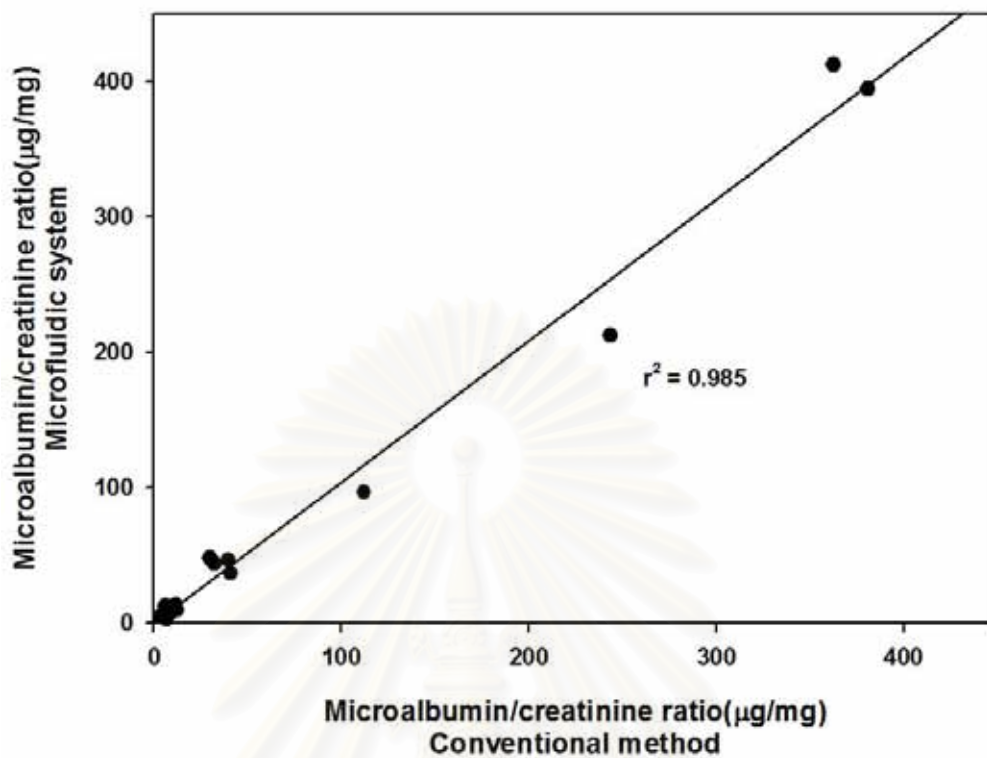
ภาพที่ 4.11 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไนโตรเจน (A) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไนโตรเจนด้วยสถิติ Bland and Altman plot (B) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไนโตรเจนด้วยสถิติ Passing-bablok regression



ภาพที่ 4.12 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน (A) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินด้วยสถิติ Bland and Altman plot (B) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดครีเอตินินด้วยสถิติ Passing-bablok regression



ภาพที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน (A) ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินด้วยสถิติ Bland and Altman plot (B) ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินด้วยสถิติ Passing-bablok regression



ภาพที่ 4.14 ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินโดยใช้โปรแกรม Sigmaplot $r^2 = 0.985$, $n = 15$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะในระบบของไหลจุลภาคแบบพกพา สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ในปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวานได้ โดยระบบของไหลจุลภาค ได้มีการใช้ PDMS microchip ออกแบบให้มีบริเวณช่วยผสมสารสองชนิดให้ผสมกันดี โดยมีการสร้างสิ่งกีดขวางเป็นรูปหัวลูกศรภายในท่อขนาดเล็ก และยังใช้ PDMS microchip เป็นบริเวณตรวจวัดการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยตรงบนชิป โดยการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินใช้หลักการ latex agglutination immunoassay และการวัดปริมาณครีเอตินินใช้หลักการ kinetic Jaffé

ผลการทดลองพบว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการติดตามปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินคือที่ 500 และ 510 nm ตามลำดับ ปริมาณน้ำยาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน และปฏิกิริยาเจฟฟี คือ 100 μ L อัตราการไหลของระบบของไหลจุลภาคที่เหมาะสม ที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงดี พิจารณาร่วมกับระยะเวลาที่เหมาะสม ไม่ทำให้การวิเคราะห์ใช้เวลาอันเกินไปต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่าง สำหรับการตรวจวัดสารทั้งสองคือที่ 40 μ L/min ระยะเวลาที่เหมาะสมในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาแล้วให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรง ของการตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอตินินคือ 2 นาที ชนิดของบัฟเฟอร์และ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นตัวพาสาร์ในระบบของไหลจุลภาค คือ 20 mM phosphate buffer pH 7.5 เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด และมีค่า pH ใกล้ค่าความเป็นกลาง ซึ่งเป็นผลดีในระยะยาวต่อท่อต่างๆ ของระบบของไหลจุลภาค สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ เลือกใช้อุณหภูมิคงที่ที่ 37 $^{\circ}$ C เนื่องจากทำให้ความไวของการตรวจวัดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับที่ 25 $^{\circ}$ C

ผลการศึกษาคณสมบัติของระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาได้ ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน คือ 0-10 mg/L ($r^2 = 0.993$) และการตรวจวัดครีเอตินิน มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-40 mg/L ($r^2 = 0.997$) ค่า limit of detection ของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะ คำนวณได้ เท่ากับ 0.81 mg/L และ 3.27 mg/L ตามลำดับ

การทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ พบว่า 6 mg/L hemoglobin, 100 mg/L IgG และ 100 mg/L transferrin รบกวนการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน (recovery 125.3 -137.3 %) แต่เมื่อทำการเจือจางสารรบกวนลง 30 เท่า พบว่าการรบกวนการตรวจวัดลดลง (recovery 110.0 -115.3%) ส่วน 200 mg/L ascorbic acid และ 1,250 mg/L glucose ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ (recovery 100-101.3%)

การทดสอบสารรบกวนในการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะนั้น พบว่า 6 mg/L hemoglobin, 1,000 mg/L IgG, 700 mg/L ascorbic acid และ 9,000 mg/L glucose รบกวนการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินด้วยวิธีแฉฟฟี่ (Recovery 112.2-139.5%) แต่เมื่อเจือจางสารรบกวนให้มีความเข้มข้นน้อยลงแล้ว พบว่าให้ค่า %recovery ลดลงอยู่ในช่วง 95.2-101.8% ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ ซึ่งในการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะ ในทางปฏิบัติจำเป็นต้องทำการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ 50 เท่าก่อนนำมาตรวจวัด จึงเป็นการลดการรบกวนจากสารที่อยู่ในปัสสาวะได้ส่วนสารรบกวนอื่นๆ ได้แก่ 1,500 mg/L NaCl, 10 mg/L bilirubin และ 300 mg/L human serum albumin มี %recovery ในช่วง 94.4-106.7% พบว่ารบกวนการตรวจวัดเล็กน้อย ส่วน 100 mg/L transferrin และ 1,250 mg/L glucose ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ (recovery 95.2-100%)

ระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาในงานวิจัยนี้ มีความแม่นยำในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน โดยมีค่า Within-run precision เป็น 5.10% (n = 10, 10 mg/L albumin) และ 5.99% (n = 10, 20 mg/L creatinine)

เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในผู้ป่วยโรคเบาหวาน จำนวน 15 คน พบว่าวิธีการตรวจวัดด้วยระบบของไหลจุลภาคและวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีความสัมพันธ์กันดี สำหรับการวิเคราะห์ค่าอัตราส่วนระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ($r^2 = 0.985$, n =15) และเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ Bland and Altman plot และ Passing-bablok regression ซึ่งพบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันทั้งการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน ครีเอตินิน และค่าอัตราส่วนระหว่างไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน เนื่องจากผลต่างของวิธีของไหลจุลภาคกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ส่วนมากอยู่ในช่วง ± 1.96 SD และค่า slope ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ 1 และค่าจุดตัดแกน y มีค่าไม่ต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า วิธีการตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในผู้ป่วยได้จริง

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะนี้ เป็นการพัฒนาวีธีการตรวจวัดปริมาณสารชีวภาพในร่างกายมนุษย์ สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ โดยทำการตรวจวัดในระบบของไหลจุลภาค โดยเป็นระบบที่ไม่ซับซ้อน ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีขนาดเล็กประกอบเข้าด้วยกันเพื่อใช้ในงาน lab-on-a-chip ที่มีศักยภาพนำมาใช้ทดแทนการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งเคลื่อนย้ายไม่ได้และมีการใช้น้ำยาปริมาณมากในการตรวจวัด ในงานวิจัยนี้ได้นำระบบของไหลจุลภาคมาบูรณาการเข้ากับระบบไหลต่อเนื่อง (flow injection analysis) ซึ่งมีข้อดีคือ ใช้สารในการตรวจวัดและน้ำยาปริมาณน้อย ทำการตรวจวัดได้ง่ายและรวดเร็ว โดยมี syringe pump เป็นตัวพาสารและบัฟเฟอร์เข้ามาในระบบของไหลจุลภาคที่สร้างโดยใช้พอลิเมอร์ที่มีราคาถูก และมีความสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง (biocompatibility) เช่น poly(dimethylsiloxane) หรือ PDMS โดยได้ออกแบบให้ภายใน PDMS microchip มีบริเวณตรวจวัดที่มีระยะแสงผ่านมาตรฐาน 1 cm สำหรับติดตามปฏิกิริยาการดูดกลืนแสง และใช้เครื่องมือตรวจวัด (detector) ที่เป็น miniature fiber optic spectrometer ซึ่งมีขนาดเล็ก พกพาง่าย ซึ่งระบบการวัดการดูดกลืนแสงเป็นหลักการที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากมีราคาไม่แพง และการตรวจวัดปฏิกิริยาของสารชีวภาพหลายชนิดในเลือดอาศัยหลักการดูดกลืนแสง ดังนั้นนอกจากการตรวจโปรตีนอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะแล้ว จึงคาดว่าจะสามารถนำระบบของไหลจุลภาคที่พัฒนาขึ้นนี้ มาประยุกต์ใช้ตรวจวัดสารเคมีในเลือดอื่นๆ ได้ เช่นกัน โดยสามารถใช้สิ่งส่งตรวจอื่นๆ ได้ เช่น น้ำไขสันหลัง สารคัดหลั่งอื่นๆ สารเสพติด ยา เป็นต้น

PDMS microchip ที่ออกแบบสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้ มีข้อดีคือสามารถตรวจวัดสารซ้ำได้หลายครั้ง (มากกว่า 30 ครั้ง) โดยสัญญาณไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าผลจากการศึกษา พบว่ามี 3.75% และ 1.9% carryover สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่า reproducibility หรือ precision เมื่อมีการใช้ microchip ซ้ำกันหลายครั้ง ค่า %CV ที่คำนวณได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (5.10% และ 5.99%) เนื่องจากเป็นระบบของไหลต่อเนื่อง เมื่อทำการวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจแล้ว สามารถทำการชะล้าง waste products ออกไปได้อย่างต่อเนื่อง เพื่อใช้ในการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างต่อไปได้ และเนื่องจากผิวของ PDMS ได้ผ่านการปรับปรุงให้ทำปฏิกิริยากับ bovine serum albumin มาก่อนหน้านี้ ทำให้มีคุณสมบัติชอบน้ำมากขึ้น จึงเป็นการลดการจับเกาะอย่างไม่จำเพาะ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งความสามารถในการใช้ซ้ำของไมโครชิป ทำให้ลดต้นทุนในการผลิต และลดขั้นตอนที่ยุ่งยากออกไปกรณีต้องมีการติดตั้งไมโครชิปใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินโดยวิธีอื่นๆ ระบบของไหลจุลภาคใช้น้ำยาในการตรวจวัดเพียง 100 μL ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้น้ำยาปริมาณน้อย ในขณะที่ การตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะด้วยหลักการ radioimmunoassay ซึ่งต้องใช้แอนติบอดี 2 ชนิด คือแอนติบอดีต่ออัลบูมินที่มีสารกัมมันตรังสีติดอยู่และแอนติบอดีที่ไม่มีสารกัมมันตรังสี ซึ่งใช้ปริมาตรแอนติบอดีทั้งหมด 200 μL ^(137, 138) วิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ ELISA ซึ่งต้องใช้แอนติบอดีหลายชนิด คือแอนติบอดีที่ใช้ตรึงบนเพลท และแอนติบอดีชนิดที่สองที่จับกับเอนไซม์ peroxidase ซึ่งใช้แอนติบอดีทั้งหมด 200 μL ⁽⁴⁸⁾ การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ fluorescence immunoassay ซึ่งใช้ปริมาตรแอนติบอดี 200 μL ⁽¹³⁸⁾ และ Immunoturbidimetry ซึ่งใช้แอนติบอดี 120 μL ⁽¹³⁹⁾ ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินโดยวิธีเอนไซม์ จำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ creatinine amidohydrolase, creatine kinase, pyruvate kinase และ lactate dehydrogenase ซึ่งใช้น้ำยาในการตรวจวัดปริมาณมากถึง 3 mL⁽⁵⁶⁾ หรือแม้แต่การตรวจวัดปริมาณครีเอตินินด้วยหลักการแฉฟิโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ก็ใช้น้ำยาในการตรวจวัดถึงตั้งแต่ 450 μL - 2 mL^(57, 140, 141) จะเห็นได้ว่าระบบของไหลจุลภาคที่นำเสนอในงานวิจัยนี้มีการใช้น้ำยาในการตรวจวัดน้อย ทำให้ประหยัดต้นทุนในการตรวจวัดได้อย่างมาก

อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินในปัสสาวะด้วยระบบของไหลจุลภาคในงานวิจัยนี้ แม้เวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่ต้องการตรวจวัดกับน้ำยาที่ใช้ นั้น ใช้เวลาเพียง 2 นาที แต่ใช้เวลาในการ regenerate ผิวของ PDMS เพื่อเตรียมในการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างในครั้งต่อไปนานประมาณ 10-15 นาที เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องอัตราไหลของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะล้าง ไม่สามารถใช้อัตราการไหลที่เร็วเกินไปได้บนไมโครชิป ดังนั้นทำให้ใช้เวลาในการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างรวมแล้วประมาณ 15 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง หากเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินด้วยวิธีอื่นๆ เช่นการใช้ระบบ flow injection analysis (FIA) โดย Siangproh และคณะ (2009) สามารถตรวจวัดอัลบูมินและครีเอตินินได้ 18 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง⁽²²⁾ และ Laiwattanapaisal และคณะ ซึ่งทำการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้ถึง 37 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม แต่เมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินกับวิธี immunoassay อื่นๆ เช่น Silver และคณะ ทำการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ radioimmunoassay และ fluorescence immunoassay ซึ่งใช้เวลาในการ incubate อย่างน้อย 30 นาทีและมีขั้นตอนในการปั่นแยกสารซึ่งใช้เวลาประมาณ 15 นาที⁽¹³⁸⁾ และการศึกษาของ Woo J ซึ่งใช้หลักการ radioimmunoassay ก็ใช้เวลาในการ incubate อย่างน้อย 2 ชั่วโมง⁽¹⁵⁾ การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ ELISA ซึ่งใช้

เวลาในการตั้งแอนติบอดีบนเพลทข้ามคืน และใช้เวลาในการตรวจวัดไม่น้อยกว่า 3 ชั่วโมง⁽⁴⁸⁾ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้เวลาเร็วกว่าวิธีดังกล่าว เนื่องจากขั้นตอนการตรวจวัดทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก เนื่องจากเมื่อน้ำยาและสารที่ต้องการตรวจวัดผสมกันภายในชิปแล้ว จะเกิดปฏิกิริยาทันที จึงสามารถทำการตรวจวัดได้รวดเร็ว ไม่ต้องเสียเวลาในการ incubate และไม่ต้องมีขั้นตอนการปั่นแยกสาร

การใช้อัตราการไหลของของไหลในระบบของไหลจุลภาคนั้น มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้อัตราการไหลที่เร็วมากจนเกินไปได้ เพราะจะทำให้ PDMS microchip เกิดการรั่วซึม ทำให้ผลการตรวจวัดไม่มีความแม่นยำ นอกจากนี้การใช้อัตราการไหลที่เร็วเกินไปจะทำให้สารผสมกันได้ไม่ดีนัก เนื่องจากการไหลของของไหลในท่อขนาดเล็กอาศัยการแพร่เพื่อทำให้สารที่อยู่ภายในท่อผสมกัน หากใช้อัตราการไหลเร็วเกินไป สารจะมีเวลาในการแพร่เข้าหากันน้อยลง สารจึงผสมกันไม่ดี⁽¹⁴²⁾ จึงทำให้ความไวในการตรวจวัดลดลงด้วย แต่การใช้อัตราการไหลเร็วขึ้นมีข้อดีคือทำให้ใช้เวลาในการตรวจวัดต่อหนึ่งตัวอย่างน้อยลง จึงตรวจวัดได้เร็วขึ้น ส่วนอัตราการไหลที่ช้าไป ก็จะทำให้ใช้เวลาในการตรวจวัดนานขึ้น จึงทำให้เสียเวลาในการตรวจวัด ในระบบ FIA แบบดั้งเดิมนั้นสามารถใช้อัตราการไหลเร็วที่เร็วได้ จึงทำให้สามารถตรวจวัดสารได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว เช่น การตรวจวัดปริมาณกลูโคสและกลูตาเมตในอาหาร โดยใช้ระบบ FIA ซึ่งใช้อัตราการไหล 0.5 ml/min นั้น สามารถตรวจวัดปริมาณสารในตัวอย่างได้ถึง 180 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง⁽¹⁴³⁾ แต่ในระบบของไหลจุลภาค จำเป็นต้องใช้อัตราการไหลค่อนข้างช้า ในระดับไมโครลิตรต่อนาที เนื่องจากข้อจำกัดด้านความทนแรงดันของ PDMS microchip เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการไหลในระบบของไหลจุลภาคกับงานวิจัยอื่นๆ อัตราการไหลที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่น เช่น Karuwan และคณะ ได้ทำการศึกษาการตรวจวัด salbutamol ในระบบของไหลจุลภาค ซึ่งใช้อัตราการไหล 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ ซึ่งเท่ากับกับงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ขนาดของท่อภายในชิปยังมีขนาดเท่ากัน คือมีความกว้าง 500 μm และลึก 100 μm ⁽¹⁴⁴⁾ Andrew M. Leach ทำการตรวจวัดสารฟลูออเรสเซนต์ในระบบของไหลจุลภาค ซึ่งใช้อัตราการไหลต่ำ คือ 21 nL/min ซึ่งท่อมีความกว้าง 100 μm และ มีความสูง 10 μm ซึ่งใช้เวลาในการตรวจวัดประมาณ 10 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง⁽¹⁴⁵⁾ จะเห็นได้ว่า การเลือกใช้อัตราการไหลขึ้นอยู่กับขนาดของท่อภายในชิปด้วย ท่อที่มีขนาดเล็ก จะใช้อัตราการไหลช้ากว่าท่อที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับอัตราการไหลแล้ว ยังขึ้นอยู่กับรูปแบบของไมโครชิปที่ใช้ในการศึกษาวิจัยด้วย

ในระบบของไหลจุลภาค ในงานวิจัยนี้ ยังได้ทำการออกแบบให้มีระบบควบคุมอุณหภูมิ การเกิดปฏิกิริยา ซึ่งมีข้อดีคือ ทำให้อุณหภูมิในการตรวจวัดคงที่และเป็นการเร่งปฏิกิริยา ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้นและเป็นการเพิ่มความไวในการตรวจวัด มีงานวิจัยที่บ่งชี้ว่า

อัตราการเกิดปฏิกิริยาของแฉะฟีนีลีนขึ้นกับอุณหภูมิ⁽¹³⁵⁾ และการตรวจวัดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มนิยมใช้ที่อุณหภูมิที่ 37 °C เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดได้ดี ทำให้ใช้เวลาการติดตามปฏิกิริยาสั้น นอกจากนี้ขณะตรวจวัด PDMS microchip จะอยู่ภายใน aluminium heating box ของระบบควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งเป็นระบบปิด ทำให้ป้องกันแสงจากภายนอกที่อาจรบกวนการตรวจวัดได้ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้อุณหภูมิเพื่อให้ความร้อนกับระบบของไหลจุลภาคนั้น มีข้อเสียที่สังเกตได้ชัดคือ พบว่าทำให้เกิดฟองอากาศภายในระบบของไหลจุลภาคได้ โดยเฉพาะภายในท่อที่มีขนาดเล็กหรือบริเวณตรวจวัด ซึ่งปัญหานี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้⁽¹⁴⁶⁾ เนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นจะระเหย ทำให้เกิดฟองอากาศภายในท่อขนาดเล็กได้ ซึ่งอาจรบกวนการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินได้ ในงานวิจัยนี้ได้ประสบปัญหาเรื่องการเกิดฟองอากาศเช่นกันพบว่าเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินเป็นเวลานาน (อย่างน้อย 2 ชั่วโมงขึ้นไป) ความร้อนที่เกิดขึ้นทำให้เกิดฟองอากาศในส่วนของ flow cell ทำให้รบกวนสัญญาณการตรวจวัด ดังนั้นจึงต้องทำการกำจัดฟองอากาศออกก่อนที่จะทำการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างต่อไป

การทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ พบว่า 6 mg/L hemoglobin, 100 mg/L IgG และ 100 mg/L transferrin รบกวนการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน (recovery 125.3 -137.3 %) เนื่องจากการใช้แอนติบอดีในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มหรือ cross-reaction ได้ โดยรายงานก่อนหน้านี้ได้มีการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของแอนติบอดีที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน พบว่าแอนติบอดีต่ออัลบูมินมีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มน้อยๆ กับ hemoglobin และ IgG ได้⁽⁷³⁾ แต่เมื่อทำการเจือจางสารรบกวนลง 30 เท่า พบว่าการรบกวนการตรวจวัดลดลง (recovery 110.0 -115.3%) นอกจากนี้พบว่า bilirubin และ NaCl ความเข้มข้นสูง เช่น 80 mg/L bilirubin และ 1,500 mg/L NaCl, รบกวนการตรวจวัด โดยมี %recovery 110.7-114.0% เนื่องจาก bilirubin เป็นสารที่มีสี เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินที่มี bilirubin เป็นส่วนผสมอยู่ สีของ bilirubin จะรบกวนการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยทำให้กราฟการดูดกลืนแสงมีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม และ NaCl ที่มีความเข้มข้นสูง จะรบกวนการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับอัลบูมิน เพราะความเข้มข้นของเกลือ (ionic strength) มีผลต่อการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี ส่วน 200 mg/L ascorbic acid และ 1,250 mg/L glucose ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ (recovery 100-101.3%)

การทดสอบสารรบกวนในการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะนั้น พบว่า 6 mg/L hemoglobin, 1,000 mg/L IgG, 700 mg/L ascorbic acid และ 9,000 mg/L glucose รบกวนการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินด้วยวิธีแฉะฟีนีลีน (recovery 112.2-139.5%) เนื่องจาก

ascorbate และ glucose สามารถรบกวน alkaline picrate เป็น picramate (reductive interference)⁽¹⁴⁷⁾ ซึ่ง picramate เป็นสารที่สามารถดูดกลืนแสงช่วงที่ทำการตรวจวัดได้ (มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 482 nm) ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงในการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินสูงขึ้น นอกจากนี้โปรตีนยังสามารถจับกับ alkaline picrate ได้^(148, 149) เพราะฉะนั้น hemoglobin และ IgG จึงทำให้ค่า recovery สูงเช่นกัน แต่เมื่อเจือจางสารบวกรวมให้มีความเข้มข้นน้อยลงแล้ว พบว่าเป็นการลดการรบกวนการตรวจวัดจากสารที่อยู่ในปัสสาวะได้⁽¹⁵⁰⁾ ส่วนสารบวกรวมอื่นๆ ได้แก่ 1,500 mg/L NaCl 10 mg/L bilirubin และ 300 mg/L human serum albumin มี %recovery ในช่วง 94.4-106.7% พบว่ารบกวนการตรวจวัดเล็กน้อย ส่วน 100 mg/L transferrin และ 1,250 mg/L glucose ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ (recovery 95.2-100%) ซึ่งในทางปฏิบัติ ตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาตรวจวิเคราะห์ จำเป็นต้องมีการเจือจางก่อนนำมาทำการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนิน จึงเป็นวิธีการลดสารรบกวนได้ในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ การใช้วิธี kinetic จะช่วยลดการรบกวนจากสารรบกวนเหล่านี้ สำหรับการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินได้เช่นกัน โดยสารแต่ละตัวจะจับกับ alkaline picrate ได้ในเวลาต่างกัน⁽¹³⁴⁾ ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินในช่วงก่อนสารที่เกิดปฏิกิริยาที่หลังครีเอทีนิน และหลังสารที่เกิดปฏิกิริยาก่อนครีเอทีนิน

จากการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอทีนินยังแคบ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-10 mg/L ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินมีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-40 mg/L ซึ่งอยู่ในช่วงที่แคบเมื่อเทียบกับวิธีอื่น เช่น การตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ immunoturbidimetric assay ซึ่งมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด 5-300 mg/L⁽¹⁵¹⁾ หลักการ HPLC มีช่วงความเป็นเส้นตรงถึง 963 mg/L⁽⁷⁾ ซึ่งครอบคลุมช่วงไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ จึงไม่จำเป็นต้องเจือจางปัสสาวะก่อนนำมาตรวจวัด หลักการที่ใช้สีฟลูออเรสเซนต์จับกับอัลบูมิน มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-100 mg/L⁽⁴¹⁾ ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอทีนินด้วยหลักการเอนไซม์นั้น มีช่วงความเป็นเส้นตรงถึง 0-100 mg/L^(56, 57) วิธีที่นำเสนอมีช่วงความเป็นเส้นตรงในระดับอัลบูมิน ความเข้มข้นต่ำ ทำให้ต้องเจือจางปัสสาวะก่อนนำมาตรวจวัด เพราะหากความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยที่นำมาตรวจวัดมีปริมาณสูงมากเกินช่วงความเป็นเส้นตรง และไม่ทำการเจือจางก่อนนำมาตรวจวัด อาจทำให้เกิดผลลบปลอม (false negative) ได้ เนื่องจากแอนติเจนที่มากเกินไปจะทำให้การยับยั้งปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มสำหรับการตรวจอัลบูมินได้ และปริมาณครีเอทีนินในปัสสาวะถ้ามีปริมาณสูงมาก หากไม่ทำการเจือจาง ค่าที่ตรวจวัดได้จะไม่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน ทำให้ค่าไม่น่าเชื่อถือ แต่อย่างไรก็ตาม การเจือจางปัสสาวะก่อนนำมาทดสอบนั้นมีข้อดีคือ เป็น

การเจาะสารตัวอื่นๆ ที่อยู่ในปัสสาวะ ซึ่งอาจรบกวนการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินิน ทำให้ลดการรบกวนจากสารรบกวนได้

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวสูงในระดับที่น่าพอใจ สามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินได้ในแม้ในปริมาณต่ำ ซึ่งค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้คือ 0.81 mg/L และ ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดปริมาณครีเอตินินคือ 3.27 mg/L ซึ่งเมื่อเทียบกับวิธีการจุ่ม strip แล้วพบว่าวิธีจุ่ม strip มีความไวต่ำ เนื่องจากไม่สามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินและครีเอตินินที่มีปริมาณน้อยได้⁽¹⁵²⁾ แต่หากเปรียบเทียบกับวิธี raioimmunoassay ซึ่งมีค่า limit of detection ต่ำมาก (9-16 µg/L)^(72, 153) หรือวิธี ELISA ซึ่งมีค่า limit of detection 10-28 µg/L^(21, 73) จะพบว่ามีความไวสูงกว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Immunonephelometry, Immunoturbidimetry และ HPLC ซึ่งมีค่า limit of detection อยู่ในช่วง 2-6 mg/L พบว่า การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้ปริมาณน้อยกว่า ส่วนการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะนั้นั้นวิธีการตรวจวัดไม่จำเป็นต้องมีค่า limit of detection ต่ำมากนัก เนื่องจากครีเอตินินในปัสสาวะมีปริมาณมากอยู่แล้ว ซึ่งการตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะ มีค่า limit of detection อยู่ในช่วง 0.76-3.5 mg/L^(22, 154) แต่การตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในเลือดนั้น มีความจำเป็นที่วิธีการตรวจวัดจะต้องมีค่า limit of detection ต่ำๆ เนื่องจากปริมาณครีเอตินินในเลือดมีน้อย ซึ่งการตรึงเอนไซม์บน electrod สำหรับตรวจวัดปริมาณครีเอตินินในเลือด พบว่ามีค่า limit of detection 3 µM⁽¹⁵⁵⁾ เป็นต้น

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถตรวจวัดไมโครอัลบูมินและครีเอตินินเชิงปริมาณได้ จึงสามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยยืนยันภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในผู้ป่วยได้ หลังการตรวจคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการจุ่ม strip และเป็นระบบที่มีขนาดเล็ก สามารถพกพา นำออกไปใช้ในระดับภาคสนามได้ ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการตรวจวินิจฉัยในผู้ป่วยเบาหวานซึ่งมีจำนวนมากในประเทศ เพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนโรคไตจากเบาหวาน ได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรก

รายการอ้างอิง

- [1] King H; Aubert R and Herman W. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care 21 (1998):1414-31.
- [2] Nathan DM. Long-Term Complications of Diabetes Mellitus. The New England journal of medicine 328 (1993): 1676-85.
- [3] Lane JT. Microalbuminuria as a marker of cardiovascular and renal risk in type 2 diabetes mellitus: a temporal perspective. American journal of physiology Renal physiology 286 (2004):F442-50.
- [4] American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes--2007. Diabetes Care 30 (2007):S4-41.
- [5] Erley C; Haefele U; Heyne N; Braun N and Risler T. Microalbuminuria in essential hypertension. Reduction by different antihypertensive drugs. Hypertension 21 (1993): 810-5.
- [6] Grundy SM; Howard B; Smith S, Jr; Eckel R; Redberg R and Bonow RO. Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Executive Summary: Conference Proceeding for Healthcare Professionals From a Special Writing Group of the American Heart Association. Circulation 105 (2002): 2231-9.
- [7] Contois JH; Hartigan C; Rao LV; Snyder LM and Thompson MJ. Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin. Clinica Chimica Acta 367 (2006): 150-5.
- [8] Totsune K; Takahashi K; Arihara Z; Sone M; Murakami O; Ito S, et al. Elevated plasma levels of immunoreactive urotensin II and its increased urinary excretion in patients with Type 2 diabetes mellitus: association with progress of diabetic nephropathy. Peptides 25 (2004): 1809-14.
- [9] George L. Bakris. Microalbuminuria: What Is It? Why Is It Important? What Should Be Done about It? The Journal of Clinical Hypertension 3 (2001): 99-102.

- [10] Newman DJ; Pugia MJ; Lott JA; Wallace JF and Hiar AM. Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity. Clinica Chimica Acta 294 (2000): 139-55.
- [11] Wyss M and Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism. Physiological reviews 80 (2000): 1107-213.
- [12] Roberts WL; Calcote CB; Cook CB; Gordon DL; Moore ML; Moore S, et al. Comparison of four commercial urinary albumin (microalbumin) methods: implications for detecting diabetic nephropathy using random urine specimens. Clinica Chimica Acta 273 (1998): 21-33.
- [13] Chavers BM; Simonson J and Michael AF. A solid phase fluorescent immunoassay for the measurement of human urinary albumin. Kidney international 25 (1984): 576-8.
- [14] Wu T-L; Chang P-Y; Li C-C; Tsao K-C; Sun C-F and Wu JT. Microplate ELISA for Urine Microalbumin: Reference Values and Results in Patients with Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. Annals of Clinical and Laboratory Science 35 (2005): 149-54.
- [15] Woo J; Floyd M; Cannon D and Kahan B. Radioimmunoassay for urinary albumin. Clinical Chemistry 24 (1978): 1464-7.
- [16] Tanganelli E; Prencipe L; Bassi D; Cambiaghi S and Murador E. Enzymic assay of creatinine in serum and urine with creatinine iminohydrolase and glutamate dehydrogenase. Clinical Chemistry 28 (1982): 1461-4.
- [17] Shih Y and Huang H. A creatinine deiminase modified polyaniline electrode for creatinine analysis. Analytica Chimica Acta 392 (1999): 143-50.
- [18] Bowers L and Wong E. Kinetic serum creatinine assays. II. A critical evaluation and review. Clinical Chemistry 26 (1980): 555-61.

- [19] Shield JP; Hunt LP; Baum JD and Pennock CA. Screening for diabetic microalbuminuria in routine clinical care: which method? Archives of Disease in Childhood 72 (1995): 524-5.
- [20] Croal BL; Mutch WJ; Clark BM; Dickie A; Church J; Noble D, et al. The clinical application of a urine albumin:creatinine ratio point-of-care device. Clinica Chimica Acta 307 (2001): 15-21.
- [21] Magnotti R, Jr; Stephens G; Rogers R and Pesce A. Microplate measurement of urinary albumin and creatinine. Clinical Chemistry 35 (1989): 1371-5.
- [22] Siangproh W; Teshima N; Sakai T; Katoh S and Chailapakul O. Alternative method for measurement of albumin/creatinine ratio using spectrophotometric sequential injection analysis. Talanta In Press, Corrected Proof.
- [23] Chmielewski C. Renal Anatomy and Overview of Nephron Function Nephrology Nursing Journal 30 (2003): 185-90.
- [24] Najafian B and Mauer M. Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. Diabetes Research and Clinical Practice 83 (2009): 1-8.
- [25] Penders J; Fiers T and Delanghe JR. Quantitative Evaluation of Urinalysis Test Strips. Clinical Chemistry 48 (2002): 2236-41.
- [26] Viberti GC; Jarrett RJ; Mahmud U; Hill RD; Argyropoulos A and Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. The Lancet 319 (1982): 1430-2.
- [27] Marre M. Microalbuminuria and prevention of renal insufficiency and cardiovascular diseases. American Journal of Hypertension 11 (1998): 884-6.
- [28] Gross JL; de Azevedo MJ; Silveiro SP; Canani LH; Caramori ML and Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. Diabetes Care 28 (2005): 164-76.

- [29] Levey AS; Bosch JP; Lewis JB; Greene T; Rogers N; Roth D, et al. A More Accurate Method To Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation. Annals of internal medicine 130 (1999): 461-70.
- [30] Windfeld S; Jonassen TEN and Christensen S. [3H]Inulin as a Marker for Glomerular Filtration Rate. American journal of physiology Renal physiology 285 (2003): F575-6.
- [31] I. Vermes PFMJS. Influence of biological variations and sample handling on measured microalbuminuria in diabetic patients. Journal of Clinical Laboratory Analysis 6 (1992): 368-74.
- [32] Minghetti P; Ruffner D; Kuang W; Dennison O; Hawkins J; Beattie W, et al. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. The Journal of biological chemistry 261 (1986): 6747-57.
- [33] Shaklai N; Garlick R and Bunn H. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. The Journal of biological chemistry 259 (1984): 3812-7.
- [34] Kratz A and Lewandrowski KB. MGH Case Records- Normal Reference Laboratory Values. The New England journal of medicine 339 (1998): 1063-72.
- [35] Clavant SP; Sastra SA; Osicka TM and Comper WD. The analysis and characterisation of immuno-unreactive urinary albumin in healthy volunteers. Clinical Biochemistry 39 (2006): 143-51.
- [36] McQueen MJ; Gerstein HC; Pogue J; Mann JFE and Yusuf S. Reevaluation by High-Performance Liquid Chromatography: Clinical Significance of Microalbuminuria in Individuals at High Risk of Cardiovascular Disease in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. American Journal of Kidney Diseases 48 (2006): 889-96.

- [37] Sviridov D; Meilinger B; Drake SK; Hoehn GT and Hortin GL. Coelution of Other Proteins with Albumin during Size-Exclusion HPLC: Implications for Analysis of Urinary Albumin. Clinical Chemistry 52 (2006): 389-97.
- [38] Kessler MA; Meinitzer A and Wolfbeis OS. Albumin Blue 580 Fluorescence Assay for Albumin. Analytical Biochemistry 248 (1997): 180-2.
- [39] Kessler MA; Meinitzer A; Petek W and Wolfbeis OS. Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the Albumin Blue 580 fluorescence assay. Clinical Chemistry 43 (1997): 996-1002.
- [40] Oliver H; Xuhua W; John Cd; Donal DCB and Andrew Jd. Towards microalbuminuria determination on a disposable diagnostic microchip with integrated fluorescence detection based on thin-film organic light emitting diodes. Lab on a chip 5 (2005): 863 - 8.
- [41] Laiwattanapaisal W; Kunanuvat U; Intharachuti W; Chinvongamorn C; Hannongbua S and Chailapakul O. Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria. Talanta In Press, Corrected Proof.
- [42] Chan OTM and Herold DA. Chip Electrophoresis as a Method for Quantifying Total Microalbuminuria. Clinical Chemistry 52 (2006): 2141-6.
- [43] Rifai N; Gubar K and Silverman LM. Immunoturbidimetry: An attractive technique for the determination of urinary albumin and transferrin. Clinical Biochemistry 20 (1987): 179-81.
- [44] Giampietro O; Penno G; Clerico A; Cruschelli L; Lucchetti A; Nannipieri M, et al. Which method for quantifying "microalbuminuria" in diabetics? Acta Diabetologica 28 (1992): 239-45.
- [45] Gella; F; Serra J and Gener J. Latex agglutination procedures in immunodiagnosis. Pure & Appl Chem 63 (1991): 1131-34.

- [46] Thakkar H; Newman DJ; Holownia P; Davey CL; Wang C-C; Lloyd J, et al. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric inhibition assay for urine albumin on the Dade aca(R) analyzer. Clinical Chemistry 43 (1997): 109-13.
- [47] Medcalf E; Newman D; Gorman E and Price C. Rapid, robust method for measuring low concentrations of albumin in urine. Clinical Chemistry 36 (1990): 446-9.
- [48] Aybay C and Karakus R. Measurement of urine albumin levels with a monoclonal antibody based in-house ELISA. Turkish Journal of Medical Sciences 33 (2003): 1-6.
- [49] Pegoraro AA; Peracha W; Hasnain M; Ranginwala N; Shaykh M; Singh AK, et al. Evaluation of a new fluorescent dye method to measure urinary albumin in lieu of urinary total protein. American Journal of Kidney Diseases 35 (2000): 739-44.
- [50] Nargessi RD; Landon J; Pourfarzaneh M and Smith DS. Solid-phase fluoroimmunoassay of human albumin in biological fluids. Clinica Chimica Acta 89 (1978): 455-60.
- [51] Muratsugu M; Ohta F; Miya Y; Hosokawa T; Kurosawa S; Kamo N, et al. Quartz crystal microbalance for the detection of microgram quantities of human serum albumin: relationship between the frequency change and the mass of protein adsorbed. Analytical Chemistry 65 (1993): 2933-7.
- [52] Luo Y; Chen M; Wen Q; Zhao M; Zhang B; Li X, et al. Rapid and Simultaneous Quantification of 4 Urinary Proteins by Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance Immunosensor Array. Clinical Chemistry 52 (2006): 2273-80.
- [53] Taes YEC; Marescau B; An DV; De Deyn PP; Schepers E; Vanholder R, et al. Guanidino compounds after creatine supplementation in renal failure patients and their relation to inflammatory status. Nephrology, dialysis, transplantation 23 (2008): 1330-5.

- [54] Levey AS; Bosch JP; Lewis JB; Greene T; Rogers N; Roth D, et al. A More Accurate Method To Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation. Annals of internal medicine 130 (1999): 461-70.
- [55] Narayanan S and Appleton H. Creatinine: a review. Clinical Chemistry 26 (1980): 1119-26.
- [56] Moss G; Bondar R and Buzzelli D. Kinetic enzymatic method for determining serum creatinine. Clinical Chemistry 21 (1975): 1422-6.
- [57] Tsuchida T and Yoda K. Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum. Clinical Chemistry 29 (1983): 51-5.
- [58] Bonsnes RW and Taussky HH. On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. Journal of Biological Chemistry 158 (1945): 581-91.
- [59] Peake M and Whiting M. Measurement of Serum Creatinine – Current Status and Future Goals. Clinical Biochemistry Reviews 27 (2006): 173–84.
- [60] Langley W and Evans M. The determination of creatinine with sodium 3, 5-dinitrobenzoate. Journal of Biological Chemistry 115 (1936): 333-41.
- [61] Parekh A; Cook S; Sims C and Jung D. A new method for the determination of serum creatinine based on reaction with 3.5-dinitrobenzoyl chloride in an organic medium. Clinica Chimica Acta 73 (1976): 221.
- [62] Sullivan M and Irreverre F. A highly specific test for creatinine. Journal of Biological Chemistry 233 (1958): 530-4.
- [63] Van Pilsum J; Martin R; Kito E and Hess J. Determination of creatine, creatinine, arginine, guanidinoacetic acid, guanidine, and methyl-guanidine in biological fluids. Journal of Biological Chemistry 222 (1956): 225-36.

- [64] Radomska A; Bodenszac E; Glab S and Koncki R. Creatinine biosensor based on ammonium ion selective electrode and its application in flow-injection analysis. Talanta 64 (2004): 603-8.
- [65] Tombach B; Schneider J; Matzkies F; Schaefer RM and Chemnitus GC. Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients. Clinica Chimica Acta 312 (2001): 129-34.
- [66] Shin JH; Choi YS; Lee HJ; Choi SH; Ha J; Yoon IJ, et al. A Planar Amperometric Creatinine Biosensor Employing an Insoluble Oxidizing Agent for Removing Redox-Active Interferences. Analytical Chemistry 73 (2001): 5965-71.
- [67] Chang SRH; Kenji S and Yasuhiko K. Amperometric Assay of Creatinine in Urine by Flow Injection Analysis Based on Conjugated Reactions of Immobilized Enzymes. Annals of the New York Academy of Sciences 672 (1992): 264-71.
- [68] McLaughlin N; Bhatt U; Cu G; Mars R; Nahman Jr N; Center J, et al. A Review of the Diagnosis and Therapy of Diabetic Nephropathy. Northeast Florida Medicine (2005): 27-31.
- [69] Sacks DB; Bruns DE; Goldstein DE; Maclaren NK; McDonald JM and Parrott M. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Clinical Chemistry 48 (2002): 436-72.
- [70] Caramori ML and Mauer M. Diabetes and nephropathy. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 12 (2003): 273-82.
- [71] Mattix HJ; Hsu C-y; Shaykevich S and Curhan G. Use of the Albumin/Creatinine Ratio to Detect Microalbuminuria: Implications of Sex and Race. Journal of the American Society of Nephrology 13 (2002): 1034-9.
- [72] Hutchison A; O'Reilly D and MacCuish A. Albumin excretion rate, albumin concentration, and albumin/creatinine ratio compared for screening diabetics for slight albuminuria. Clinical Chemistry 34 (1988): 2019-21.

- [73] NG L; TENG L; NG M; BS S; DipMLT and KHALID B. Microalbuminuria measurements by two in-house ELISA methods. Malaysian Journal of Pathology 22 (2000): 73-8.
- [74] Meinhardt U; Ammann RA; Fluck C; Diem P and Mullis PE. Microalbuminuria in diabetes mellitus: Efficacy of a new screening method in comparison with timed overnight urine collection. Journal of Diabetes and its Complications 17 (2003): 254-7.
- [75] Wilde HM; Banks D; Larsen CL; Connors G; Wallace D and Lyon ME. Evaluation of the Bayer microalbumin/creatinine urinalysis dipstick. Clinica Chimica Acta 393 (2008): 110-3.
- [76] Ruzicka J and Hansen EH. Flow injection analyses : Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. Analytica Chimica Acta 78 (1975): 145-57.
- [77] Christian GD. Flow analysis and its role and importance in the analytical sciences. Analytica Chimica Acta 499 (2003): 5-8.
- [78] Ranger CB. Flow injection analysis. Principles, techniques, applications, design. Analytical Chemistry 53 (1981): 20A-32A.
- [79] Prados-Rosales RC; Luque-Garcia JL and Luque de Castro MD. Propelling devices: the heart of flow injection approaches. Analytica Chimica Acta 461 (2002): 169-80.
- [80] Harvey D. Modern analytical chemistry. McGraw-Hill Boston, 2000.
- [81] McDonald J and Whitesides G. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. Accounts of chemical research 35 (2002): 491-500.
- [82] Barbier V; Tatoulian M; Li H; Arefi-Khonsari F; Ajdari A and Tabeling P. Stable Modification of PDMS Surface Properties by Plasma Polymerization: Application to the Formation of Double Emulsions in Microfluidic Systems. Langmuir 22 (2006): 5230-2.

- [83] Xia Y and Whitesides GM. SOFT LITHOGRAPHY. Annual Review of Materials Science 28 (1998): 153-84.
- [84] Duffy D; McDonald J; Schueller O and Whitesides G. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). Analytical Chemistry 70 (1998): 4974-84.
- [85] Beebe DJ; Mensing GA and Walker GM. Physics and application of microfluidics in biology. Annual Review of Biomedical Engineering 4 (2002): 261.
- [86] Weigl BH and Yager P. MICROFLUIDICS:Microfluidic Diffusion-Based Separation and Detection. Science 283 (1999): 346-7.
- [87] Hetsroni G; Mosyak A; Pogrebnyak E and Yarin LP. Fluid flow in micro-channels. International Journal of Heat and Mass Transfer 48 (2005): 1982-98.
- [88] Nguyen N and Wu Z. Micromixers—a review. Journal of Micromechanics and Microengineering 15 (2005): R1-R16.
- [89] Koch M; Chatelain D; Evans A and Brunnschweiler A. Two simple micromixers based on silicon. Journal of Micromechanics and Microengineering 8 (1998): 123-6.
- [90] Koch M; Witt H; Evans A and Brunnschweiler A. Improved characterization technique for micromixers. Journal of Micromechanics and Microengineering 9 (1999): 156-8.
- [91] Ansari MA and Kim K-Y. Shape optimization of a micromixer with staggered herringbone groove. Chemical Engineering Science 62 (2007): 6687-95.
- [92] Fu X; Liu S; Ruan X and Yang H. Research on staggered oriented ridges static micromixers. Sensors and Actuators B: Chemical 114 (2006): 618-24.

- [93] Lin Y-C; Chung Y-C and Wu C-Y. Mixing enhancement of the passive microfluidic mixer with J-shaped baffles in the tee channel. Biomedical Microdevices 9 (2007): 215-21.
- [94] Deshmukh A; Liepmann D and Pisano A. Continuous micromixer with pulsatile micropumps. IEEE Workshop on Solid-State Sensors and Actuators (2000): 73-76
- [95] C. Tsouris CTC, D. W. DePaoli, S. C. Jacobson, V. F. de Almeida, J. M. Ramsey,. Electrohydrodynamic mixing in microchannels. AIChE Journal 49 (2003): 2181-6.
- [96] Jacobson SC; McKnight TE and Ramsey JM. Microfluidic Devices for Electrokinetically Driven Parallel and Serial Mixing. Analytical Chemistry 71 (1999): 4455-9.
- [97] Sole S; Alegret S; Ce?spedes F; Fa?bregas E and Di?ez-Caballero T. Flow Injection Immunoanalysis Based on a Magnetoimmunosensor System. Analytical Chemistry 70 (1998): 1462-7.
- [98] Olofsson J; Nolkrantz K; Ryttsen F; Lambie BA; Weber SG and Orwar O. Single-cell electroporation. Current Opinion in Biotechnology 14 (2003): 29-34.
- [99] Kopp MU; Mello AJ and Manz A. Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip. Science 280 (1998): 1046.
- [100] Liu RH; Yang J; Lenigk R; Bonanno J and Grodzinski P. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. Analytical Chemistry 76 (2004): 1824-31.
- [101] Paegel BM; Blazej RG and Mathies RA. Microfluidic devices for DNA sequencing: sample preparation and electrophoretic analysis. Current Opinion in Biotechnology 14 (2003): 42-50.

- [102] Xiang Q; Hu G; Gao Y and Li D. Miniaturized immunoassay microfluidic system with electrokinetic control. Biosensors and Bioelectronics 21 (2006): 2006-9.
- [103] Wang J; Chen G; Muck A; Chatrathi MP; Mulchandani A and Chen W. Microchip enzymatic assay of organophosphate nerve agents. Analytica Chimica Acta 505 (2004): 183-7.
- [104] Auroux P; Iossifidis D; Reyes D and Manz A. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. Analytical Chemistry 74 (2002): 2637-52.
- [105] Niels Lion TCR, Loic Dayon, Isabelle L. Arnaud, Eugen Damoc, Nikolay Youhnovski, Zhi-Yong Wu, Christophe Roussel, Jacques Josserand, Henrik Jensen, Joel S. Rossier, Michael Przybylski, Hubert H. Girault,. Microfluidic systems in proteomics. Electrophoresis 24 (2003): 3533-62.
- [106] Daniel Figeys. Adapting arrays and lab-on-a-chip technology for proteomics. Proteomics 2 (2002): 373-82.
- [107] Figeys D and Pinto D. Lab-on-a-Chip: A Revolution in Biological and Medical Sciences. Analytical Chemistry 72 (2000): 330 A-5 A.
- [108] Oosterbroek RE. Lab-on-a-Chip: miniaturized systems for (bio) chemical analysis and synthesis. Analytica Chimica Acta 343 (2003): 245.
- [109] Kurita R; Yokota Y; Sato Y; Mizutani F and Niwa O. On-Chip Enzyme Immunoassay of a Cardiac Marker Using a Microfluidic Device Combined with a Portable Surface Plasmon Resonance System. Analytical Chemistry 78 (2006): 5525-31.
- [110] Srinivasan V; Pamula VK and Fair RB. Droplet-based microfluidic lab-on-a-chip for glucose detection. Analytica Chimica Acta 507 (2004): 145-50.
- [111] Katie M. Horsman JMB, Kiev R. Blasier, James P. Landers,. Forensic DNA Analysis on Microfluidic Devices: A Review. Journal of Forensic Sciences 52 (2007): 784-99.

- [112] Scheller FW; Wollenberger U; Warsinke A and Lisdat F. Research and development in biosensors. Current Opinion in Biotechnology 12 (2001): 35-40.
- [113] Ivnitski D; Abdel-Hamid I; Atanasov P and Wilkins E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. Biosensors and Bioelectronics 14 (1999): 599-624.
- [114] Kerslake EDS and Wilson CG. Pharmaceutical and biomedical applications of fiber optic biosensors based on infra red technology. Advanced Drug Delivery Reviews 21 (1996): 205-13.
- [115] Marazuela M and Moreno-Bondi M. Fiber-optic biosensors-an overview. Analytical and Bioanalytical Chemistry 372 (2002): 664-82.
- [116] Schmitt H-M; Brecht A; Piehler J and Gauglitz Gn. An integrated system for optical biomolecular interaction analysis. Biosensors and Bioelectronics 12 (1997): 809-16.
- [117] Rosenzweig Z and Kopelman R. Analytical properties of miniaturized oxygen and glucose fiber optic sensors. Sensors & Actuators: B Chemical 36 (1996): 475-83.
- [118] Li X and Rosenzweig Z. A fiber optic sensor for rapid analysis of bilirubin in serum. Analytica Chimica Acta 353 (1997): 263-73.
- [119] Müller C; Hitzmann B; Schubert F and Scheper T. Optical chemo- and biosensors for use in clinical applications. Sensors and Actuators B: Chemical 40 (1997): 71-7.
- [120] Cordek J; Wang X and Tan W. Direct immobilization of glutamate dehydrogenase on optical fiber probes for ultrasensitive glutamate detection. Analytical Chemistry 71 (1999): 1529-33.
- [121] Kramer M and Lim D. A rapid and automated fiber optic-based biosensor assay for the detection of Salmonella in spent irrigation water used in the sprouting of sprout seeds. Journal of food protection 67 (2004): 46-52.

- [122] Simpson JM and Lim DV. Rapid PCR confirmation of E. coli O157:H7 after evanescent wave fiber optic biosensor detection. Biosensors and Bioelectronics 21 (2005): 881-7.
- [123] Rand A; Ye J; Brown C and Letcher S. Optical biosensors for food pathogen detection. Food Technology 56 (2002): 32-9.
- [124] Corbisier P; van der Lelie D; Borremans B; Provoost A; de Lorenzo V; Brown NL, et al. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. Analytica Chimica Acta 387 (1999): 235-44.
- [125] Gu M; Mitchell R and Kim B. Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology 87 (2004): 269-306.
- [126] Ikariyama Y; Nishiguchi S; Koyama T; Kobatake E; Aizawa M; Tsuda M, et al. Fiber-Optic-Based Biomonitoring of Benzene Derivatives by Recombinant E. coli Bearing Luciferase Gene-Fused TOL-Plasmid Immobilized on the Fiber-Optic End. Analytical Chemistry 69 (1997): 2600-5.
- [127] Hansen L and S rensen S. The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems. Microbial ecology 42 (2001): 483-94.
- [128] Bousse L. Whole cell biosensors. Sensors and Actuators B: Chemical 34 (1996): 270-5.
- [129] Abel A; Weller M; Duveneck G; Ehrat M and Widmer H. Fiber-optic evanescent wave biosensor for the detection of oligonucleotides. Analytical Chemistry 68 (1996): 2905-12.
- [130] Haeckel R. Proposals for the description and measurement of carry-over effects in clinical chemistry. Pure and applied chemistry 63 (1991): 301-6.

- [131] Bland JM and Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. Statistical Methods in Medical Research 8 (1999): 135-60.
- [132] Passing H and Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry 21 (1983): 709-20.
- [133] Kroll M; Chesler R; Hagengruber C; Blank D; Kestner J and Rawe M. Automated determination of urinary creatinine without sample dilution: theory and practice. Clinical Chemistry 32 (1986): 446-52.
- [134] Kroll M; Roach N; Poe B and Elin R. Mechanism of interference with the Jaffe reaction for creatinine. Clinical Chemistry 33 (1987): 1129-32.
- [135] Pardue H; Bacon B; Nevius M and Skoug J. Kinetic study of the Jaffe reaction for quantifying creatinine in serum: 1. Alkalinity controlled with NaOH. Clinical Chemistry 33 (1987): 278-85.
- [136] Bernard A; Vyskocil A and Lauwerys R. Determination of beta 2-microglobulin in human urine and serum by latex immunoassay. Clinical Chemistry 27 (1981): 832-7.
- [137] Giampietro O; Miccoli R; Clerico A; di Palma L; Bertolotto A; Anichini R, et al. Urinary albumin excretion in normal subjects and in diabetic patients measured by a radioimmunoassay: Methodological and clinical aspects. Clinical Biochemistry 21 (1988): 63-8.
- [138] Silver A; Dawnay A; Landon J and Cattell W. Immunoassays for low concentrations of albumin in urine. Clinical Chemistry 32 (1986): 1303-6.
- [139] Bakker A. Immunoturbidimetry of urinary albumin: prevention of adsorption of albumin; influence of other urinary constituents. Clinical Chemistry 34 (1988): 82-6.

- [140] Bacon B and Pardue H. Kinetic study of the Jaffe reaction for quantifying creatinine in serum: 2. Evaluation of buffered reagent and comparison of different data-processing options. Clinical Chemistry 35 (1989): 360-3.
- [141] Lustgarten JA and Wenk RE. Simple, Rapid, Kinetic Method for Serum Creatinine Measurement. Clinical Chemistry 18 (1972): 1419-22.
- [142] Kamholz AE and Yager P. Theoretical Analysis of Molecular Diffusion in Pressure-Driven Laminar Flow in Microfluidic Channels. Biophysical Journal 80 (2001): 155-60.
- [143] Mizutani F; Sato Y; Hirata Y and Yabuki S. High-throughput flow-injection analysis of glucose and glutamate in food and biological samples by using enzyme/polyion complex-bilayer membrane-based electrodes as the detectors. Biosensors and Bioelectronics 13 (1998): 809-15.
- [144] Karuwan C; Wisitsoraat A; Matusos T; Phokharatkul D; Sappat A; Jaruwongrungrongsee K, et al. Flow injection based microfluidic device with carbon nanotube electrode for rapid salbutamol detection. Talanta In Press, Corrected Proof.
- [145] Leach AM; Wheeler AR and Zare RN. Flow Injection Analysis in a Microfluidic Format. Analytical Chemistry 75 (2003): 967-72.
- [146] Andrew JdM; Matthew H; N. Llewellyn L; Tom W and Robert CRW. Precise temperature control in microfluidic devices using Joule heating of ionic liquids. Lab on a Chip 4 (2004): 417 – 9.
- [147] Larry DB and Edward TW. Kinetic Serum Creatinine Assays. II. A Critical Evaluation and Review. Clinical Chemistry 26 (1980): 555-56 1.
- [148] Datta P; Graham G and Schoen I. Interference by IgG paraproteins in the Jaffe method for creatinine determination. American Journal of Clinical Pathology 85 (1986): 463-8.

- [149] Weber J and van Zanten A. Interferences in current methods for measurements of creatinine. Clinical Chemistry 37 (1991): 695-700.
- [150] Harry H and Abraham R. Estimation of Creatinine by the Jaffe Reaction A Comparison of Three Methods. Clinical Chemistry 14 (1967): 222-38.
- [151] Parsons MP; Newman DJ; Newall RG and Price CP. Validation of a Point-of-Care Assay for the Urinary Albumin:Creatinine Ratio. Clinical Chemistry 45 (1999): 414-7.
- [152] Comper WD; Jerums G and Osicka TM. Deficiency in the Detection of Microalbuminuria by Urinary Dipstick in Diabetic Patients. Diabetes Care 26 (2003): 3195-6.
- [153] Comper WD; Jerums G and Osicka TM. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. Clinical Biochemistry 37 (2004): 105-11.
- [154] OHIRA S-I; KIRK AB and DASGUPTA PK. Automated measurement of urinary creatinine by multichannel kinetic spectrophotometry. Analytical biochemistry 384 (2009): 238-44.
- [155] Khue NV; Wolff CM; Seris JL and Schwing JP. Immobilized enzyme electrode for creatinine determination in serum. Analytical Chemistry 63 (1991): 611-4.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับการทดลอง

1. การเตรียม 100 mM phosphate buffer pH 6, 6.5, 7 และ 7.5

Solution A คือ KH_2PO_4 0.5 M 68.04 g/L

Solution B คือ K_2HPO_4 0.5 M 87.09 g/L

ตารางที่ 1 การเตรียม phosphate buffer เพื่อใช้ในระบบของไหลจุลภาค

pH	A (mL)	B (mL)
6	175.4	24.6
6.5	137	63
7	78	122
7.5	32	168

เติมน้ำจนครบ 1000 mL สัดส่วนระหว่างสารละลาย A และ B ทำให้ได้ pH ตามต้องการ โดยไม่ต้องปรับ pH

เมื่อจะนำมาใช้ เจือจางบัฟเฟอร์ด้วยน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 20 mM แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman, pore size 0.45 μm) ก่อนนำมาใช้

2. การเตรียม 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 8, 8.5 และ 9

ซึ่ง Tris base (MW = 121.14) 2.42 g เติมน้ำ 900 mL

ปรับ pH โดยใช้ 1 N HCl จนได้ pH ตามต้องการ

เติมน้ำให้ครบ 1,000 mL

3. การเตรียมน้ำยาสำหรับการตรวจวัดครีเอทีนิน

1.0.05 M picric acid (MW = 229.10)

ซึ่ง picric acid 11.45 g

เติมน้ำให้ครบ 1,000 mL

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาใช้

2.0.5 M NaOH (MW = 40)

ชั่ง NaOH 20 g

เติมน้ำให้ครบ 1000 mL

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาใช้

เมื่อจะนำมาใช้ ผสม 0.05 M picric acid 1 ส่วน ต่อ 0.5 M NaOH 1 ส่วน แล้วจึง

นำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณครีเอตินิน

3. creatinine standard 1 mg/ml

ชั่ง creatinine 50 mg

เติมน้ำ 50 mL

เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาใช้

4. การเตรียมน้ำยาสำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน

1. น้ำยาลาเท็กซ์

ผสมน้ำยาลาเท็กซ์ (Biosystem) และ borate buffer ในอัตราส่วน 1:1

จากนั้นเจือจางด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.5 สองเท่า

2. Stock human serum albumin standard 10 mg/mL

ชั่ง human serum albumin 10 mg

เติมน้ำ 1,000 μ l

เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อจะนำมาใช้ให้วางที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะละลาย

แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการก่อนนำมาทำการทดลอง

สถิติที่ใช้ในการคำนวณ

สูตรการคำนวณ %RSD

$$\%RSD = \sqrt{(\sum SD^2)/n} \times 100$$

n คือ จำนวนทั้งหมดของค่า SD ที่นำมาคำนวณ

หรือคำนวณโดยใช้โปรแกรม Excel จากสูตร

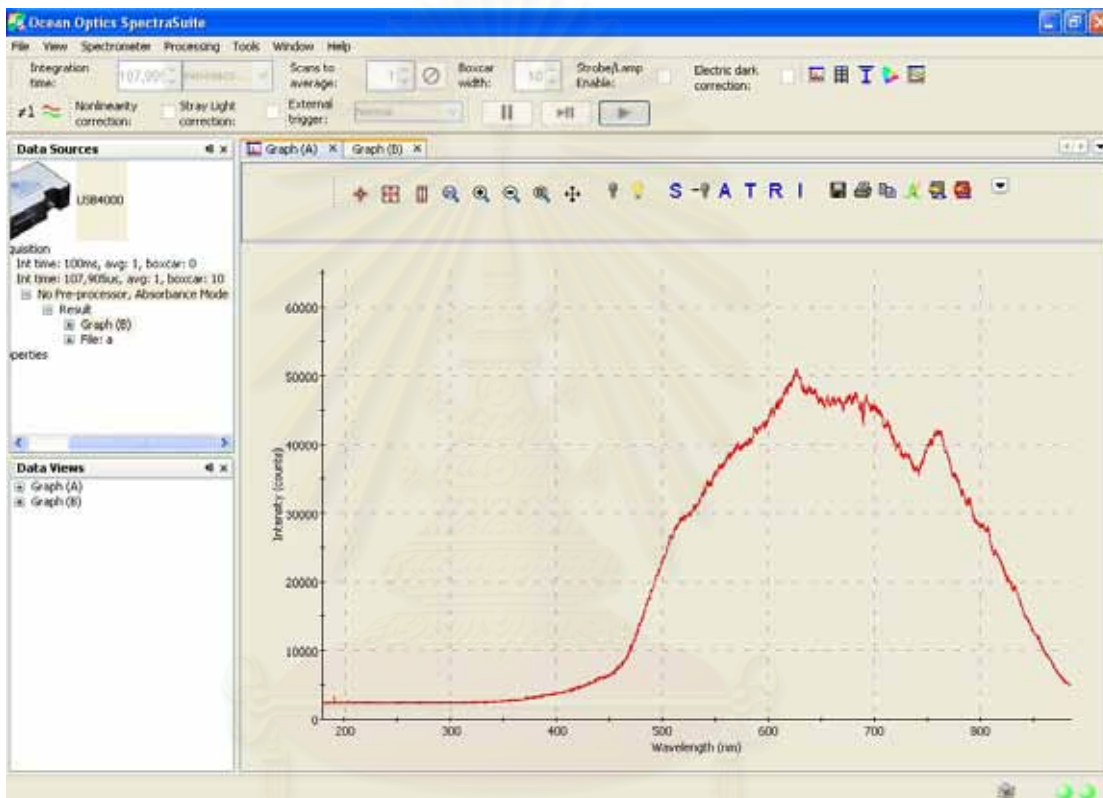
$$\%RSD = \text{SQRT}(\text{SUMSQ}(n_1:n_n)/n)$$

n คือ จำนวนทั้งหมดของค่า SD ที่นำมาคำนวณ

ภาคผนวก ข

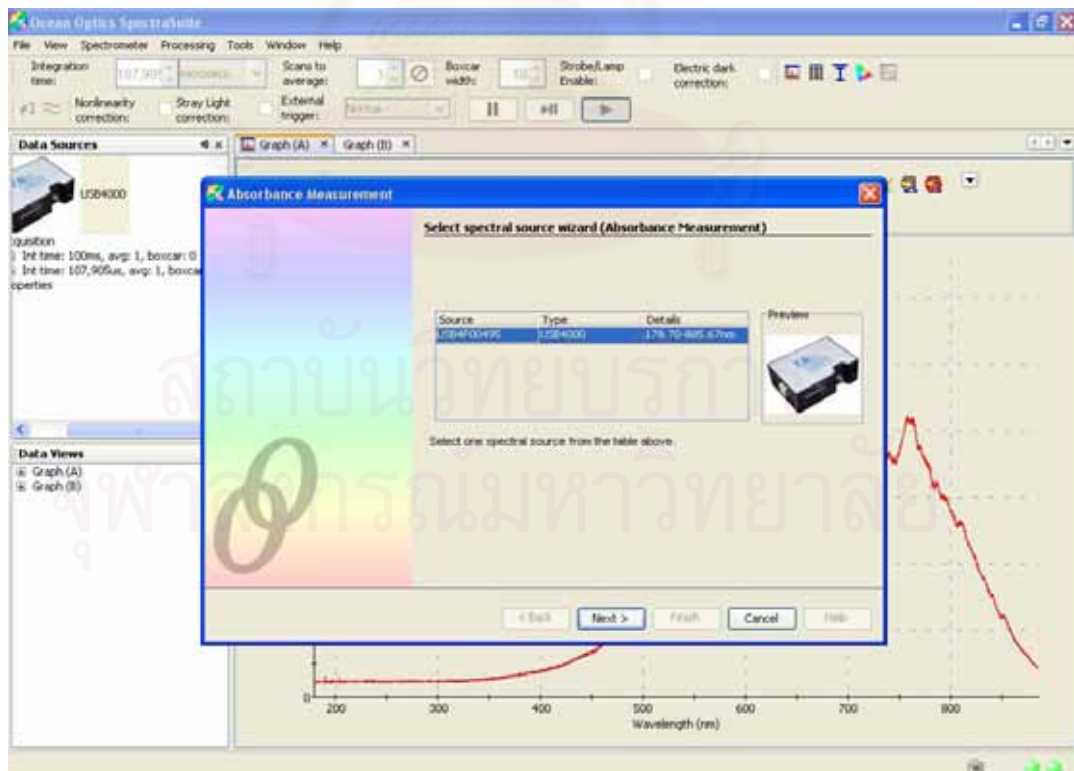
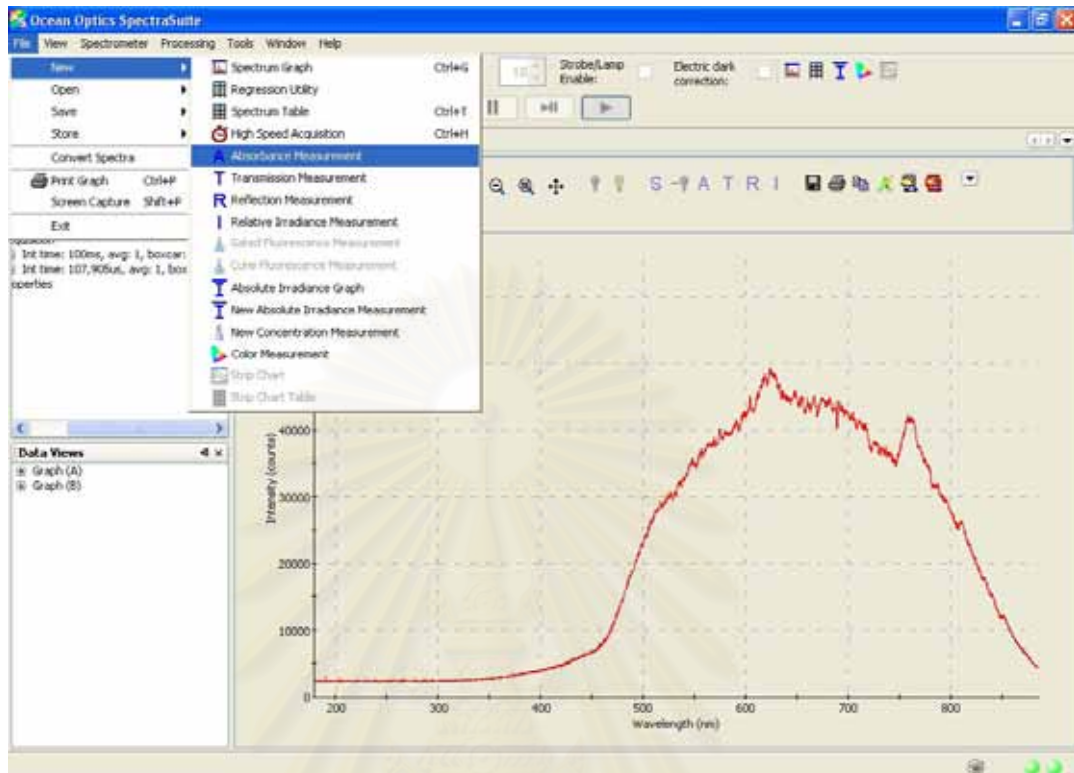
การใช้โปรแกรม Ocean Optic SpectraSuite

1.เปิดโปรแกรม Ocean Optic SpectraSuite และเปิด light source จากนั้นจัดแสงให้ probe ของ fiber optic ที่ต่อเข้ากับ light source และ fiber optic ส่วนที่ต่อเข้ากับ detector ตรงกัน สัญญาณจะเกิดขึ้นดังภาพ

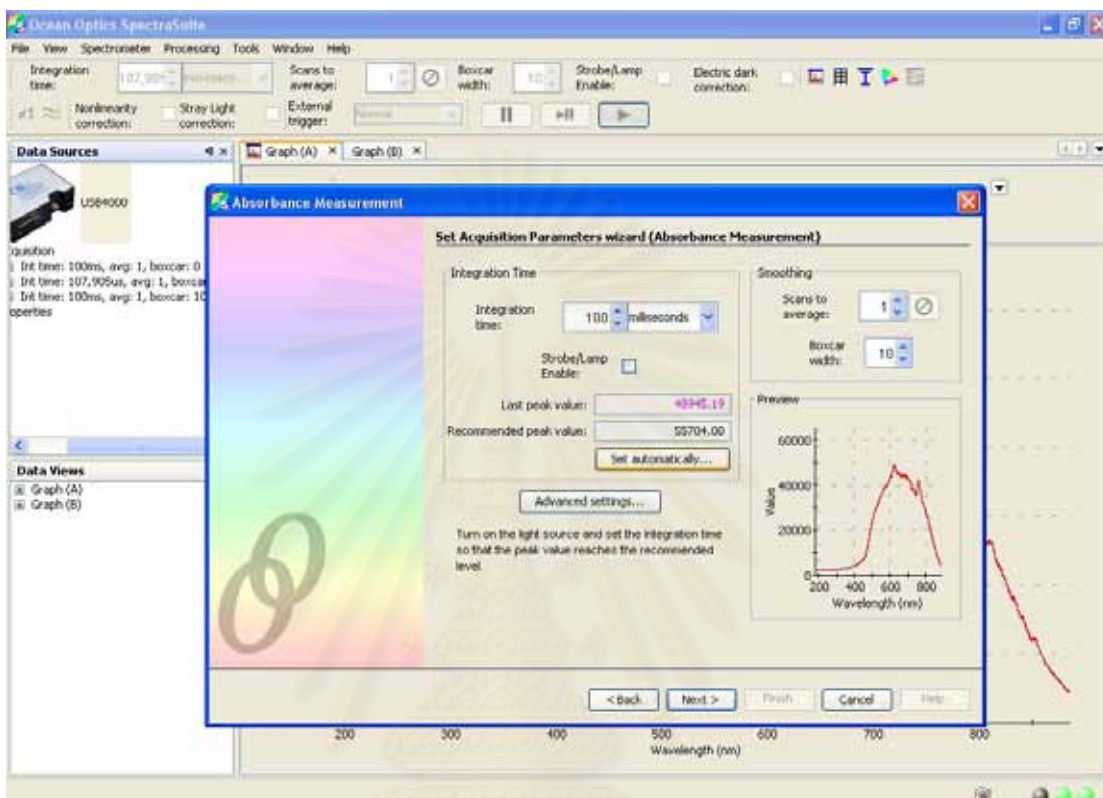


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. คลิกที่ File เลือก New เลือก Absorbance Measurement เมื่อคลิกแล้ว หน้าจอจะขึ้น Set Acquisition Parameters Wizard ให้คลิก Next

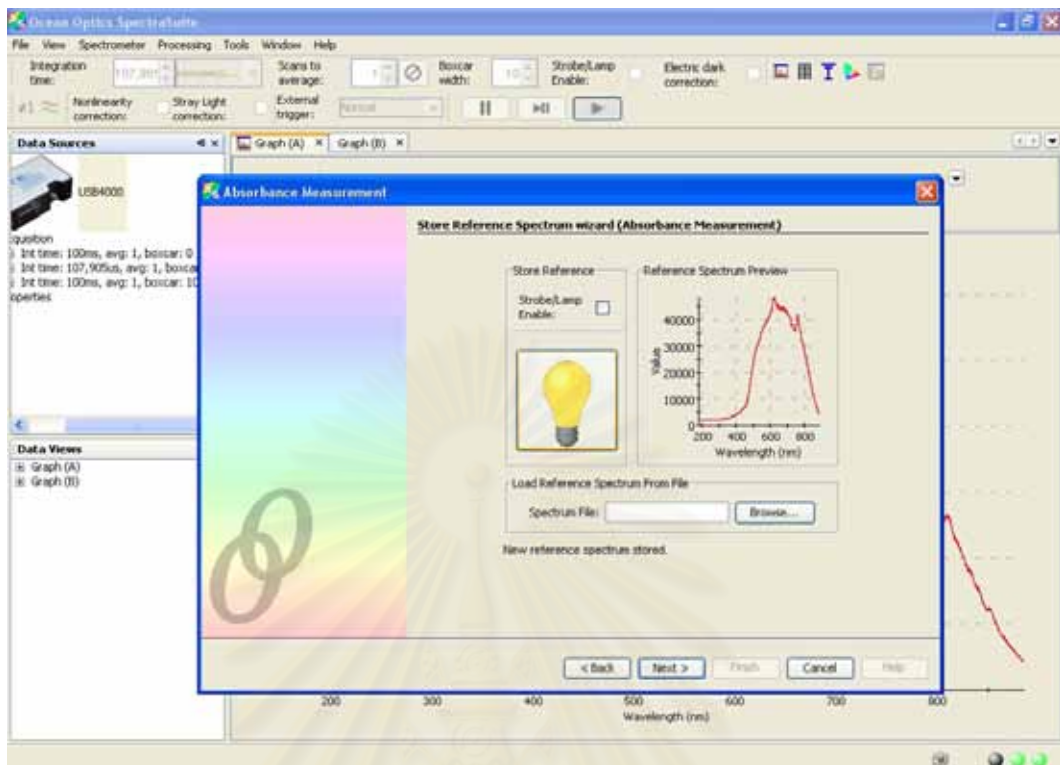


3. คลิกที่ Set automatically เพื่อ set peak value ให้อยู่ในช่วงของ recommended peak value และเลือก boxcar width เท่ากับ 10 เพื่อให้กราฟมีความคม เส้นกราฟจะไม่หนาจนเกินไป จากนั้นคลิกที่ Next

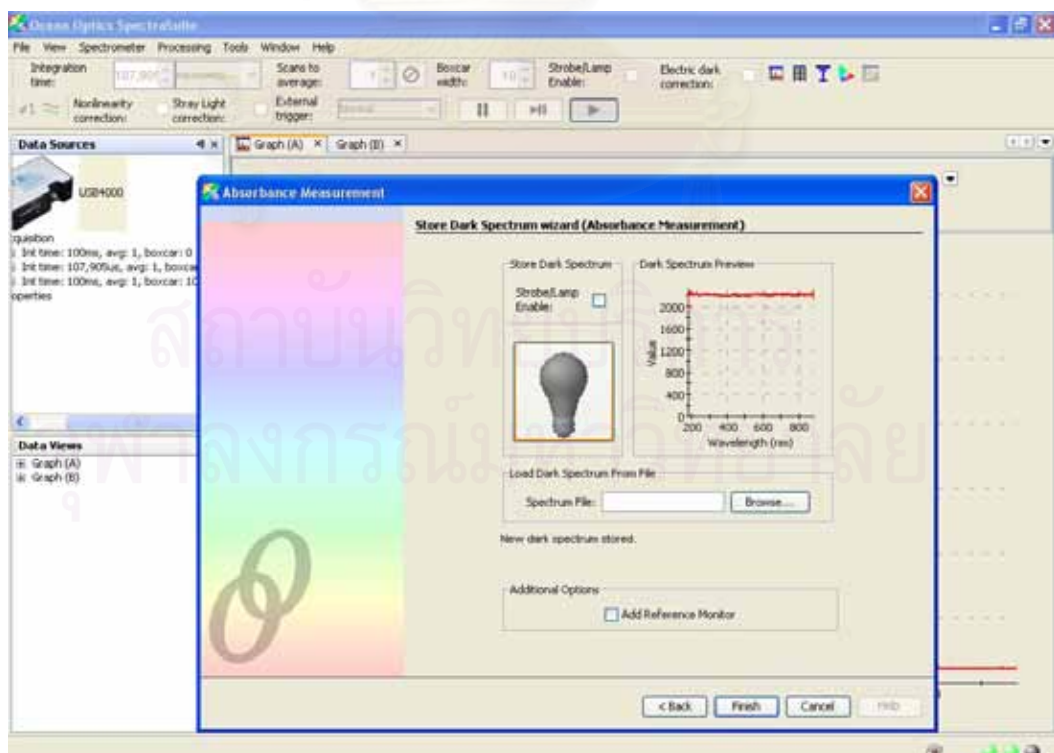


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

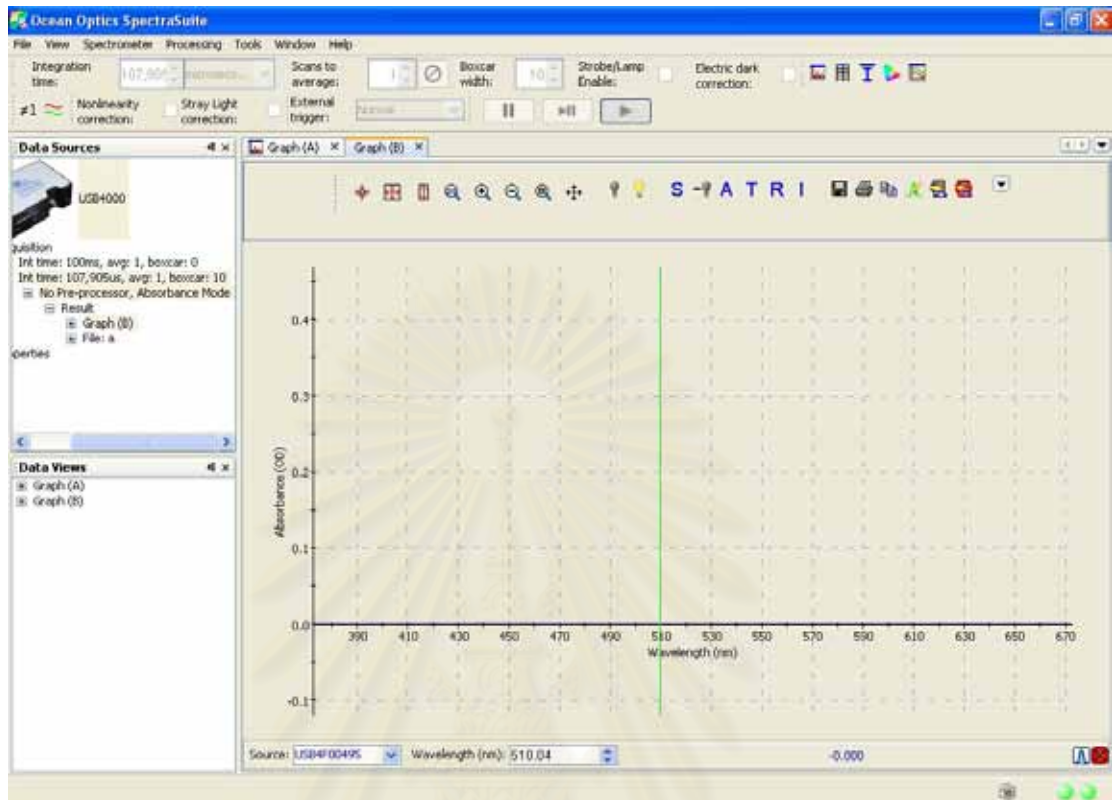
4. คลิกที่ไฟสีเหลืองตรงตำแหน่ง Store Reference และคลิก Next



5. ปิด light source จากนั้นคลิกที่ไฟสีดำ เพื่อ Store Dark Spectrum และคลิก Finish



6.เปิด light source และเลือกความยาวคลื่น โดยใส่ตัวเลขลงในช่อง Wavelength (nm) ด้านล่าง จากนั้นทำการตรวจวัดสารตามต้องการ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเต็มศิริ ทรงเจริญ เกิดเมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม 2527 ที่จังหวัดพิษณุโลก สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2549 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 โดยได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (TGIST) และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย