การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ
สำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วน ด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า

นางสาวจุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICES FOR DETERMINATION OF GLUCOSE IN WHOLE BLOOD BASED ON ELECTROCHEMISTRY

Miss Julaluk Noiphung

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 2012
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วน ด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า
โดย	นางสาวจุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประวิตร เจนวรรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. พรพิมล ศรีทองคำ)

จุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง : การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วน ด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า. (DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICES FOR DETERMINATION OF GLUCOSE IN WHOLE BLOOD BASED ON ELECTROCHEMISTRY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล, 104 หน้า.

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ เป็นอุปกรณ์ที่สร้างได้ง่ายราคาต้นทุนต่ำ เมื่อนำมาใช้ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ทำให้อุปกรณ์ดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งระบบที่สร้างขึ้นได้นำมาใช้ในการตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วน อุปกรณ์ที่สร้างขึ้นออกแบบเป็นรูปดัมเบล ให้มีส่วนสำหรับแยกเลือด 2 ส่วนและส่วนสำหรับตรวจวัด 1 ส่วน โดยส่วนสำหรับตรวจวัดเชื่อมต่อกับขั้วไฟฟ้าพิมพ์ลายที่มี Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เมื่อนำมาทดสอบกับเลือดครบส่วนที่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นอยู่ในช่วง 24-60 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการแยกพลาสมาออกจากเลือดครบส่วนภายใน 4 นาที โดยไม่ต้องเจือจางเลือดก่อน การตรวจวัดระดับกลูโคสใช้หลักการ Glucose oxidase โดยตรึงเอนไซม์ดังกล่าวบริเวณตรวจวัด เมื่อพลาสมาที่แยกจากเลือดครบส่วนไหลไปผสมกับเอนไซม์ เกิดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาคือ H_2O_2 ซึ่งจำเพาะกับขั้วไฟฟ้าที่เลือกใช้งาน H_2O_2 ที่เกิดขึ้นถูกติดตามปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคโคลโนแอมแปรโรเมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่ -0.1 โวลต์เทียบกับ Ag/AgCl ที่ใช้เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง การตรวจวัดกลูโคสจากเลือดครบส่วนมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0-33.1 mM (r^2 = 0.987) และความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 3.4, 6.3 และ 15.6 mM มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ที่ 6.5%, 9.0% และ 8.0% ตามลำดับ เนื่องจากการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้เลือดครบส่วนนั้นพบว่าระดับสารชีวเคมีที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคลรบกวนการตรวจวิเคราะห์ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี standard addition แทน เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กลูโคสจากเลือดครบส่วนด้วยวิธีของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่ใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าในงานวิจัยนี้กับวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ พบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.6996, paired sample t-test, n=14)

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2555

##5377214437: MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEYWORDS: Paper-based microfluidic devices/ wax dipping/ lab-on-paper/ electrochemical detection/ glucose

JULALUK NOIPHUNG : DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICES FOR DETERMINATION OF GLUCOSE IN WHOLE BLOOD BASED ON ELECTROCHEMISTRY. ADVISOR : ASST.PROF. WANIDA LAIWATTANAPAISAL, Ph.D., 104 pp.

Electrochemical paper-based analytical devices (ePADs) with integrated plasma isolation for determination of glucose from whole blood samples have been developed. A dumbbell shaped ePAD containing two blood separation zones (VF2 membranes) with a middle detection zone were fabricated using the wax dipping method. The dumbbell shaped device was designed to separate plasma while generating homogeneous flow to the middle detection zone of the ePAD. The proposed ePADs work with whole blood samples with 24-60% hematocrit without dilution, and the plasma was completely separated within 4 minutes. Glucose in isolated plasma separated was detected using glucose oxidase immobilized on the middle of the paper device. The hydrogen peroxide generated from the reaction between glucose and the enzyme pass through to a Prussian blue modified screen printed electrode (PB-SPEs). The currents measured using chronoamperometry at the optimal detection potential for H_2O_2 (-0.1 V versus Ag/AgCl reference electrode) were proportional to glucose concentrations in the whole blood. The linear range for glucose assay was in the range 0-33.1 mM (r^2 =0.987). The coefficients of variation (CVs) of currents were 6.5%, 9.0% and 8.0 % when assay whole blood sample containing glucose concentration at 3.4, 6.3, and 15.6 mM, respectively. Because each sample displayed intra-individual variation of electrochemical signal, glucose assay in whole blood samples were measured using the standard addition method. Results demonstrate that the ePAD glucose assay was not significantly different from the spectrophotometric method (p = 0.6996, paired sample t-test, n=14).

Department : Clinical Chemistry Student's Signature ____________
Field of Study : Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Advisor's Signature ____________
Academic Year : 2012

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นผู้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา ช่วยแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในการทำงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือสนับสนุนทั้งด้านวิชาการและกำลังใจในการทำงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.พรพิมล ศรีทองคำ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อาจารย์ ดร. วิจิตรา เดือนฉาย และ Prof. Chuck Henry ที่ให้คำแนะนำทางด้านการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้และให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียน จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้าน Omics-Nano Medical Technology และเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก The Korea Foundation for Advanced Studies (KFAS)

ขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ โดยเฉพาะ นางสาวเต็มศิริ ทรงเจริญ ที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี และเพื่อนๆคณะสหเวชศาสตร์ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจเมื่อเกิดปัญหาและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.5 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ	6
2.2 โรคเบาหวาน	19
2.3 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า	27
2.4 ชนิดของขั้วไฟฟ้า	29
2.5 คุณสมบัติของสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน	30
2.5 การนำเทคนิคทางเคมีไฟฟ้ามาใช้ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้ Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	33
1 ประชากรที่ใช้ในการวิจัย	33
2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	33
3 วิธีดำเนินการวิจัย	36
3.1 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Paper-based microfluidic analytical devices, μPADs)	36
3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ μPADs ในการแยกเลือด	39
3.3 การติดตั้ง μPADs เข้ากับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า	39
3.4 วิธีการตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนบน ePADs	40
3.5 การเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ	41
3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนบน ePADs	42

หน้า

3.7 การศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (characterization) 45
3.8 การตรวจวัดปริมาณกลูโคสจากตัวอย่างเลือดจริง 47
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 49
1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ μPADs ที่พัฒนาขึ้นในการแยกเลือดครบส่วน 49
1.1 รูปแบบของ μPADs ที่พัฒนาขึ้น 49
1.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดของ μPADs 50
1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ VF2- μPADs
ในการแยกเลือดที่ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นแตกต่างกัน 53
2 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการตรวจวัดระดับกลูโคส 55
2.1 ผลการทดสอบหาช่วงความต่างศักย์ที่เหมาะสม 55
2.2 ผลการทดสอบปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับวัดปฏิกิริยา 56
2.3 ผลการทดสอบหาความต่างศักย์ที่เหมาะสมในการวัดปฏิกิริยา 57
2.4 ผลการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา 59
2.5 ผลการทดสอบ pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา 60
3 ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (characterization) 61
3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range) 61
3.2 ผลการศึกษาค่า limit of detection (LOD) 62
3.3 ผลการรบกวนสารรบกวนปฏิกิริยา (interference) 63
3.4 ผลการศึกษาค่า precision และ reproducibility 65
4 ผลการทดลองวัดปริมาณกลูโคสในเลือดครบส่วนเปรียบเทียบกับ
วิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ 65
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ 71
รายการอ้างอิง 77
ภาคผนวก 88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 104

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงการเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของเทคนิคที่นำมาใช้ในการสร้าง μPADs 10

2.2 แสดงเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคเบาหวานของ American Diabetes Association ปี 2013 22

2.3 แสดงตัวอย่างเครื่องตรวจวัดระดับกลูโคส (glucometer) ที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบัน 26

2.4 แสดงเทคนิควิธีการทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า 27

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย 33

3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 34

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 35

4.1 ตารางผลการทดสอบค่า limit of detection ของการตรวจวัดระดับกลูโคสบนePADs 63

4.2 ตารางแสดงผลการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดระดับกลูโคสในเลือดครบส่วน บน ePADs 64

4.3 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น (ePADs) เทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ 67

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้วิธี photolithography 7

2.2 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้วิธี wax printing 8

2.3 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้วิธี wax dipping 9

2.4 แสดงความเข้มของสีที่ได้จากการตรวจวัดกลูโคสและโปรตีน 12

2.5 แสดงลักษณะของสีที่เกิดขึ้นบริเวณขอบ μPADs 13

2.6 แสดงตัวอย่างการพิมพ์ขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนลงบน μPADs 14

2.7 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs สำหรับแยกเลือดครบส่วนโดยใช้หลักการ heamagglutination 16

2.8 แสดงตัวอย่างของ μPADs สำหรับแยกเลือด 17

2.9 แสดงลักษณะของ cyclic voltammogram แบบปฏิกิริยาผันกลับได้ 28

2.10 แสดงลักษณะของขั้วไฟฟ้าที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ทาง voltammetry 29

2.11 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ H_2O_2 บนขั้วไฟฟ้า Prussian blue 31

3.1 แสดงขนาดและลักษณะของแม่แบบเหล็กที่นำมาใช้ในการศึกษา 36

3.2 แสดงขนาดและการจัดเรียงกระดาษสำหรับนำมาใช้ในการสร้าง μPADs โดยใช้เทคนิค wax-dipping 37

3.3 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้เทคนิค wax-dipping 38

3.4 แสดงลักษณะแบบจำลองของ μPADs ที่สร้างได้ 38

3.5 แสดงการติดตั้ง Electrochemical paper-based analytical devices (ePADs) 40

3.6 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ H_2O_2 โดยมี Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน 41

3.7 แสดงขั้นตอนการเตรียมเลือดครบส่วนสำหรับทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรงบน ePADs 45

3.8 แสดงขั้นตอนการเตรียมเลือดครบส่วนสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสบน ePADs โดยใช้วิธี standard addition 47

4.1 แสดงลักษณะของ μPADs ที่เตรียมได้ทั้ง 4 แบบ 49

4.2 แสดงลักษณะของพลาสมาที่แยกได้จาก μPADs ที่แยกเลือดด้านเดียว 50

4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรเลือดกับระยะเวลาในการแยกพลาสมาของ μPADs ชนิดแยกเลือดด้านเดียว 51

4.4 แสดงลักษณะของพลาสมาที่แยกได้จาก μPADs แบบรูปดัมเบล 52

4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรเลือดกับระยะเวลาในการแยกพลาสมาของ μPADs ชนิดแยกเลือดสองด้าน 52

4.6 แสดงลักษณะของ VF2 - μPADs ทั้ง 2 แบบในการแยกพลาสมาหลังตรึงเอนไซม์ 53

ภาพที่		หน้า
4.7	แสดงลักษณะของ VF2 - µPADs แบบรูปดัมเบลในการแยกพลาสมาที่ %hematrocrit แตกต่างกัน	54
4.8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%hematrocrit) กับระยะเวลาในการแยกเลือดครบส่วน	54
4.9	กราฟ cyclic voltammogramsแสดงการหาช่วงความต่างศักย์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา	55
4.10	กราฟ cyclic voltammogramsแสดงผลการทดสอบหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการวัดปฏิกิริยา	56
4.11	กราฟแสดง hydrodynamic voltammograms ในการทดสอบค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมของปฏิกิริยา	58
4.12	กราฟแสดงอัตราส่วนของสัญญาณไฟฟ้าของปฏิกิริยาเทียบกับสัญญาณ background	59
4.13	กราฟแสดงผลการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการวัดปฏิกิริยา	60
4.14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH ที่ใช้กับกระแสที่วัดได้จากปฏิกิริยา	61
4.15	กราฟแสดง chronoamperograms ของกระแสที่วัดได้บน ePADs ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างกัน	62
4.16	กราฟแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของกระแสที่วัดได้จากตัวอย่างเลือดครบส่วนที่มีระดับกลูโคสเท่ากัน	66
4.17	กราฟผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้สถิติ Bland and Altman plot และ Passing–bablok regression	68
4.18	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณกลูโคสที่ตรวจวัดได้โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ	70

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถช่วยวินิจฉัยโรค ตรวจคัดกรองโรค ตรวจติดตามการดำเนินของโรคและติดตามผลการรักษาได้ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการการแพทย์ส่วนมาก จำเป็นต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติที่มีราคาแพง เมื่อติดตั้งแล้วเคลื่อนย้ายได้ยาก อีกทั้งยังใช้น้ำยาในการตรวจวัดปริมาณมาก ทำให้ต้นทุนในการตรวจวัดสูง (1, 2) ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวยังไม่เหมาะกับประเทศกำลังพัฒนา เมื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเจริญก้าวหน้ามากขึ้น นักวิจัยได้มีการพัฒนาการตรวจวัดในรูปแบบห้องปฏิบัติการบนชิป (Lab-on-a-Chip, LOC) เพื่อลดปริมาณน้ำยาและขนาดของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดลง โดยใช้เทคโนโลยีของไหลจุลภาคเข้ามาช่วยย่อส่วนในการตรวจวัดให้มีขนาดเล็กลง (1, 3) สามารถตรวจวัดได้เหมือนห้องปฏิบัติการทั่วไปแต่อยู่ในรูปแบบบนชิป ซึ่งมีขนาดเล็กเท่าขนาดกระจกสไลด์ อุปกรณ์ตรวจวัดในระบบ LOC ส่วนมากมีการใช้ polydimethylsiloxane (PDMS) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่หล่อจากแม่แบบซิลิกอน สามารถขึ้นรูปได้ง่ายและมีราคาไม่แพง (4, 5) มีดัชนีหักเหต่ำ และมีความโปร่งแสงที่ความยาวคลื่นมากกว่า 230 นาโนเมตร (6) อย่างไรก็ตามขั้นตอนการทำแม่แบบซิลิกอน ใช้สารเคมีที่มีราคาแพง เช่น SU-8 ซึ่งเป็นสารไวแสง สำหรับใช้ในขั้นตอนการสร้างลวดลายบนแม่แบบซิลิกอนด้วยเทคนิคโฟโตลิโทรกราฟี (photolithography) อีกทั้งเครื่องมือที่ใช้เป็นเครื่องมือพิเศษมีราคาแพง เช่น เครื่องเคลือบผิวแบบปั่นเหวี่ยง (spin coater), เครื่องกำเนิดแสงยูวี เป็นต้น นอกจากนี้ การตรวจวัดในรูปแบบ LOC ยังต้องใช้อุปกรณ์ที่ประกอบเข้าในระบบการตรวจวัด เช่น เครื่องจ่ายสารละลายปริมาตรน้อย (syringe pump) วาล์ว อุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณ (detector/sensor) เป็นต้น รวมทั้งขั้นตอนในการสร้างชิปและการสร้างระบบการตรวจวัดมีความซับซ้อน ยุ่งยาก และใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และงานวิจัยส่วนมากยังไม่จัดเป็น LOC ที่สมบูรณ์ การตรวจวิเคราะห์ทั้งกระบวนการยังต้องอาศัยเครื่องมืออื่นมาทำงานร่วมด้วย เช่นการแยกเลือดต้องอาศัยเครื่องปั่นแยกเลือด (centrifuge) ระบบตรวจวัดต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ มีเพียงแต่ส่วนเกิดปฏิกิริยาเท่านั้นที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นในทางปฏิบัติระบบ LOC ลักษณะนี้ยังไม่สามารถเคลื่อนย้ายนำออกไปใช้ในภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีแนวคิดในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์บนกระดาษขึ้นเพื่อช่วยลดต้นทุนในการตรวจวัดและย่อส่วนอุปกรณ์สำหรับตรวจวัดให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งการตรวจวัดที่ใช้

กระดาษเป็นตัวกลางในการค้ำจุนนั้นมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในรูปแบบของแถบทดสอบหาสารชีวเคมีที่อ่านผลจากการเปลี่ยนสีของกระดาษ (paper based indicator) (7), แถบทดสอบแบบจุ่ม (test strip) (2), แถบทดสอบสำหรับวัดปฏิกิริยาอิมมูโนแอสเซย์ในรูปแบบการไหลแนวนอน (lateral flow immunoassay) (8, 9)เป็นต้น ซึ่งการตรวจวัดด้วยวิธีดังกล่าวมีการใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการตรวจเบื้องต้นและการตรวจวินิจฉัยโรคทั้งในส่วนของผู้ป่วยทั่วไป, ผู้ป่วยฉุกเฉิน, การตรวจติดตามด้วยตนเองและการออกตรวจภาคสนาม เนื่องจากการใช้งานไม่ซับซ้อน,รายงานผลการทดสอบได้รวดเร็ว, และเคลื่อนย้ายได้ง่าย แต่ยังมีข้อจำกัดในแง่ของการรายงานผลการทดสอบเนื่องจากผลการทดสอบที่ได้จะรายงานในเชิงคุณภาพมากกว่าเชิงปริมาณ และเมื่อไม่นานมานี้ Whiteside’sและคณะ ได้พัฒนาอุปกรณ์วิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper based analytical devices, μPADs) หรือห้องปฏิบัติการบนกระดาษ (lab-on-paper) (10) ซึ่งจุดเด่นของ μPADs คือ สร้างจากกระดาษซึ่งเป็นวัสดุที่มีน้ำหนักเบา, ราคาถูก, เคลื่อนย้ายสะดวกและง่ายต่อการจัดเก็บและทำลายทิ้ง นอกจากนั้นกระดาษกรองมีส่วนประกอบเป็นเซลลูโลส ซึ่งสามารถเข้ากันได้กับสารตัวอย่างทางชีวภาพ (2) ทำให้ประยุกต์ใช้ตรวจวัดสารทางชีวภาพได้หลากหลาย ซึ่งหลักการตรวจวัดบนห้องปฏิบัติการบนกระดาษจะไม่เหมือนกับการตรวจวัดบนกระดาษแบบดั้งเดิม เนื่องจากสามารถตรวจวัดสารได้หลายชนิดพร้อมกันบนอุปกรณ์ตรวจวัดชิ้นเดียวกันและสามารถออกแบบบริเวณสำหรับวัดปฏิกิริยาได้หลายรูปแบบตามความต้องการในการใช้งาน ในระบบของไหลจุลภาคฐานกระดาษนั้นต้องมีการสร้างขอบเขตระหว่างบริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนกระดาษ ทำให้สามารถควบคุมของเหลวให้ไหลไปตามท่อโดยใช้แรงดึงของเหลวในท่อขนาดเล็ก (capillary force) จึงไม่จำเป็นต้องใช้แรงจากอุปกรณ์ภายนอกเลย (10) โดยวิธีแรกที่นำมาใช้ในการสร้างลวดลายบนกระดาษคือ photolithography (10) กระดาษที่สร้างได้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic area) เป็นส่วนที่สร้างขึ้นสำหรับเป็นขอบและส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic area) เป็นบริเวณที่ใช้สำหรับวัดปฏิกิริยาและเป็นท่อสำหรับการไหลของสาร นอกจากเทคนิค photolithography ยังได้มีการพัฒนาวิธีในการสร้างลวดลายบนกระดาษขึ้นมาอีกหลายวิธีอาทิเช่น PDMS plotting (11), inkjet printing (12), plasma treatment (13), paper cutting (14), วิธีการพิมพ์แว๊กซ์ (wax printing) (15, 16), วิธีการสกรีนแว๊กซ์ (wax screen printing) (17),และวิธีการจุ่มแว๊กซ์ (wax dipping) (18)เป็นต้น โดย μPADs ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดเชิงปริมาณด้วยหลักการต่างๆ โดยวิธีที่นิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางคือตรวจวัดปฏิกิริยาการเกิดสีบนกระดาษเนื่องจากสามารถมองเห็นได้ง่าย และบันทึกปฏิกิริยาได้ง่ายโดยอุปกรณ์พื้นฐานเช่นกล้องดิจิตอล โทรศัพท์มือถือ หรือเครื่องสแกนเนอร์(19) อย่างไรก็ตามการอ่านสีของปฏิกิริยาถึงแม้จะทำได้ง่ายแต่วิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัด เช่น สีของกระดาษมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุของการเก็บกระดาษทำให้การอ่านสีของปฏิกิริยาผิดพลาดได้(20)

นอกจากนี้การควบคุมการเคลื่อนที่ของสารในท่อขนาดเล็กบนกระดาษทำได้ยากเนื่องจากสารจะไหลไปตามท่อและไปสิ้นสุดที่บริเวณขอบของกระดาษ ทำให้สีของปฏิกิริยาเกิดชัดเจนบริเวณขอบของกระดาษมากกว่าบริเวณที่ใช้สำหรับตรวจวัด และการบันทึกปฏิกิริยาด้วยภาพยังมีปัจจัยเรื่องแสงสว่างเข้ามาเกี่ยวข้อง เพื่อช่วยลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในการอ่านสีของปฏิกิริยา จึงได้มีการนำเทคนิคการวิเคราะห์รูปแบบอื่นมากผนวกเข้ากับ μPADs เช่น การวัดทางเคมีไฟฟ้า (electrochemistry) (21) ถือเป็นทางเลือกที่จะช่วยลดความผิดพลาดที่เกิดขึ้นได้เนื่องจากการวัดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้านั้นจะวัดสารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาโดยตรงทำให้วิธีดังกล่าวมีความถูกต้องและมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่สูงกว่าการอ่านสีบนกระดาษ นอกจากวิธีที่กล่าวมา μPADs ยังสามารถประยุกต์ใช้กับหลักการตรวจวิเคราะห์แบบอื่นได้อีก เช่น การวัดปฏิกิริยาการเรืองแสงทางเคมี (chemiluminescence) (22), ปฏิกิริยา electrochemiluminescence (23), วัดปฏิกิริยาการเรืองแสงฟลูออเรสเซนท์ (fluorescence) (24) เป็นต้น

μPADsที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้กับการตรวจวิเคราะห์ที่หลากหลาย อาทิเช่น การตรวจหาสารชีวเคมีในซีรั่ม (18), สารชีวเคมีในสารควบคุมคุณภาพ (17, 21) และการตรวจหาสารเคมีที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (25, 26) สำหรับตัวอย่างตรวจที่เป็นซีรั่มหรือพลาสมานั้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการปั่นแยกโดยเครื่องปั่นเลือด ซึ่งอุปกรณ์ดังกล่าวส่วนมากมีขนาดใหญ่ไม่เหมาะแก่การเคลื่อนย้าย (1) และไม่สะดวกในการตรวจวัดแบบ POCT ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการแยกเลือดบน μPADs เช่นใช้หลักการเกาะกลุ่มกันของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนกระดาษ (27) และการใช้กระดาษสำหรับแยกเลือดเป็นส่วนของของ μPADs (28, 29) ซึ่งส่วนมากใช้การอ่านผลการเกิดสีจากปฏิกิริยาบนกระดาษ อย่างไรก็ตาม μPADsที่สามารถแยกเลือดได้ และตรวจวัดโดยใช้หลักการเคมีไฟฟ้ายังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

งานวิจัยนี้ได้พัฒนา μPADs รูปแบบใหม่สำหรับแยกเลือดครบส่วนและตรวจวัดด้วยเทคนิคเคมีไฟฟ้าโดยออกแบบและสร้าง μPADs ให้เป็นรูปทรงดัมเบล โดยในงานวิจัยใช้กระดาษแยกเลือดชนิด VF2 จำนวน 2 ชิ้นเชื่อมต่อกับกระดาษกรองWhatman ที่อยู่ตรงกลาง โดยใช้เทคนิค wax dipping μPADsที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถแยกเม็ดเลือดแดงออกจากพลาสมาได้อย่างมีประสิทธิภาพและไหลมาบริเวณ detection zone อย่างสม่ำเสมอและรวดเร็ว ทำให้สัญญาณเคมีไฟฟ้ามีความแม่นยำในการวัดแต่ละครั้ง นอกจากนี้การวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้ายังช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์และลดความผิดพลาดจากอ่านสีของปฏิกิริยาอีกด้วย วิธีที่กล่าวมานี้จึงเหมาะสำหรับนำไปตรวจวัดในรูปแบบ point-of-care testing อีกทั้งเป็นวิธีที่ต้นทุนต่ำ ใช้เครื่องมือพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป จึงสามารถตอบสนองการนำไปประยุกต์ใช้ในประเทศกำลังพัฒนาได้เป็นอย่างดี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า

2. เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคส ด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนและวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยเป้าหมายในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ในครั้งนี้เพื่อที่จะตรวจวัดระดับกลูโคส ได้ครอบคลุมในช่วงค่า 0 – 500 mg/dl โดยใช้เลือดครบส่วนจากทั้งประชากรที่เป็นเบาหวานและในคนปกติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เนื่องจากงานวิจัยทางด้าน lab on paper เป็นเรื่องที่ใหม่และกำลังเป็นที่สนใจในวงวิชาการ และการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าบน lab on paper ที่สามารถแยกเลือดได้นั้น ยังไม่มีรายงานมาก่อน ดังนั้นผลงานวิจัยที่ได้ศึกษา มีโอกาสสูง ที่จะได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ในหัวข้อ
“Microfluidic paper-based electrochemical devices for determination of glucose from whole blood sample” ในวารสาร Analytica Chimica Acta ที่มี Impact factor 4.555 (ปี 2011)

2. ผลงานวิจัยจากโครงการนี้ได้นำเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ “Lab-on-a-chip World Congress” 25-26 September 2012 ที่ San Diego, USA ในหัวข้อเรื่อง
“Electrochemical Detection of Glucose from Whole Blood Using Paper-Based Microfluidic Devices.”

3. งานวิจัยที่สร้างขึ้นสามารถพัฒนาต่อยอดสำหรับ ตรวจสารชีวเคมีชนิดอื่นจากเลือดครบส่วน โดยใช้ได้ทั้งหลักการของเอนไซม์และหลักการอิมมูโนแอสเซย์ ที่ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

4. นิสิตผู้ที่ศึกษาวิจัยมีความรู้ทางด้านเคมีไฟฟ้าและได้มีการบูรณาการความรู้ด้านเคมีวิเคราะห์ กับการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกเข้าด้วยกัน และความรู้ทางวิชาการเหล่านี้จะเป็นพื้นฐาน นำไปสู่งานวิจัยที่อยู่ในลักษณะ micrototal analysis system ที่สมบูรณ์แบบและเหมาะสมกับประเทศกำลังพัฒนาได้ในอนาคต และจะทำให้ประเทศไทยมีการเติบโตของงานวิจัยดังกล่าวได้อย่างเข้มแข็งมากยิ่งขึ้น เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดอื่นๆ ต่อไป

1.5 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

2. ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

บทที่2

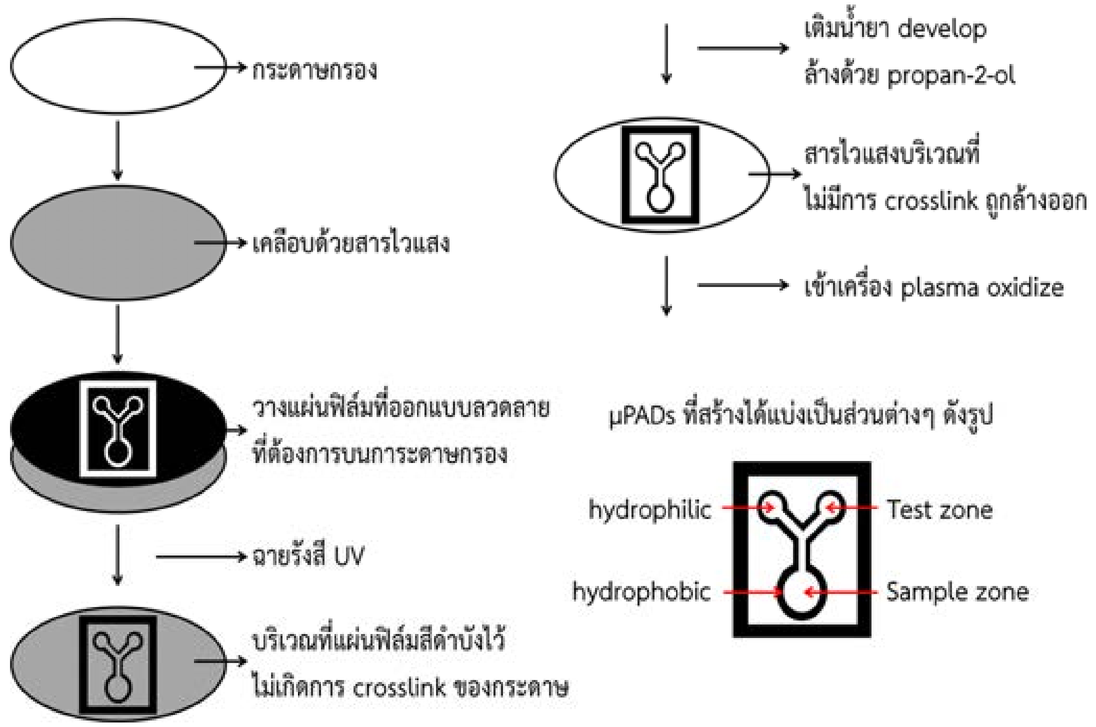
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper-based analytical devices, μPADs)

2.1.1 เทคนิคในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

แนวคิดการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (lab on paper) หรืออุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper-based analytical devices, μPADs) ได้ถูกนำเสนอขึ้นครั้งแรกโดย Whitesides และคณะ (10) ซึ่งหลักการสำคัญของการสร้าง μPADs นั้นคือการสร้างลวดลายบนกระดาษทำให้กระดาษที่สร้างได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เป็นส่วนที่เคลือบด้วยสารที่น้ำไม่สามารถซึมผ่านได้ และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เป็นส่วนของท่อที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากขอบของส่วน hydrophobic ในส่วนของท่อนั้นสามารถควบคุมการเดินทางของสารละลายโดยใช้หลักการไหลของสารในท่อขนาดเล็ก (capillary action) ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้แรงจากภายนอก (10) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการพัฒนาเทคนิคสำหรับสร้าง μPADs ขึ้นมาหลายเทคนิคด้วยกัน ดังนี้

1. Photolithography (การพิมพ์ด้วยแสง) (10, 30, 31) เป็นเทคนิคแรกที่พัฒนาขึ้นสำหรับการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยการเคลือบกระดาษกรองไว้ด้วยสารไวแสง (photoresist) จากนั้นวางทับด้วยแผ่นฟิล์มที่ออกแบบลวดลายที่ต้องการไว้แล้วฉายรังสี UV ลงไป กระดาษส่วนที่สัมผัสรังสี UV จะ crosslink เกิดเป็นส่วน hydrophobic เมื่อเติมน้ำยา develop ลงบนกระดาษบริเวณที่ไม่สัมผัสรังสี UV และไม่มีการ crosslink เกิดขึ้น สารไวแสงที่เคลือบไว้บริเวณดังกล่าวจะถูกชะออกทำให้บริเวณดังกล่าวกลายเป็นส่วนของ hydrophilic ขั้นตอนการสร้าง μPADs ด้วยวิธี photolithography แสดงดังภาพที่ 2.1



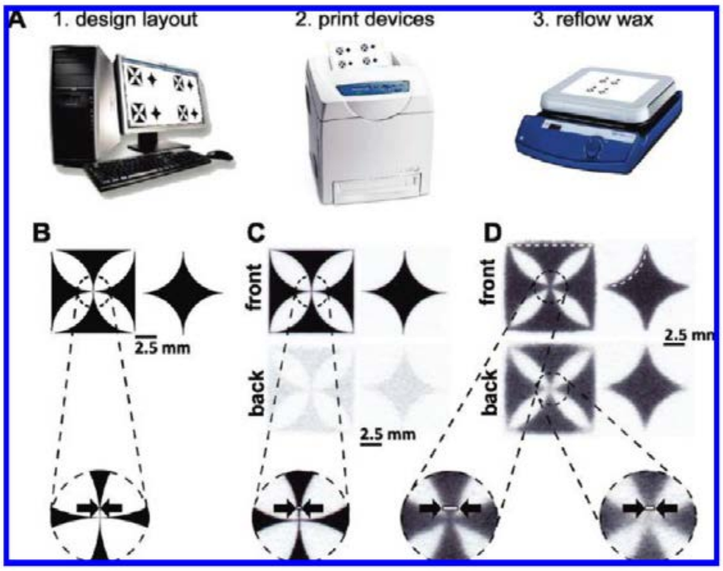
ภาพที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้วิธี photolithography (ดัดแปลงจาก (10))

2. Plotting (11) เป็นเทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยเครื่องพล็อตเตอร์ โดยบรรจุ PDMS/hexane ลงไปในปากกาที่ใช้พล็อตแล้วทำการพล็อต PDMS/hexane ลงบนกระดาษเป็นลวดลายที่ต้องการ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้ PDMS ซึมลงเนื้อกระดาษเกิดเป็นส่วนของ hydrophobic และส่วนที่ไม่ได้พิมพ์ PDMS จะเป็นส่วนของ hydrophilic นอกจากการพล็อตด้วยเครื่องยังมีการพัฒนาการพล็อตด้วยมือ (32) โดยใช้หมึกที่มีคุณสมบัติทนน้ำที่มีเรซินเป็นองค์ประกอบ วาดลวดลายบนกระดาษโดยใช้แผ่นเหล็กที่ออกแบบตามที่ต้องการเป็นแบบในการวาด ซึ่งบริเวณที่วาดลวดลายลงไปนั้นจะเกิดเป็นส่วนของ hydrophobic และส่วนที่ไม่ได้วาดจะเป็นส่วนของ hydrophilic

3. Ink jet etching (12) เป็นเทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยใช้การเคลือบสาร poly(styrene) ใน toluene ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติ hydrophobic ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นพิมพ์สาร toluene ลงบนกระดาษที่เป็น hydrophobic ซึ่ง toluene มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลาย ทำให้บริเวณที่ toluene พิมพ์ลงไปนั้นเป็นบริเวณเกิดเป็นส่วนของ hydrophilic

4. Plasma treatment (13) เป็นเทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยใช้การเคลือบสาร alkyl ketene dimer (AKD) ในสารละลาย heptanes ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาทีเพื่อให้ AKD ซึมลงในกระดาษและเกิดการ crosslink กับกระดาษ แล้ววางแบบเหล็กที่ต้องการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยบริเวณที่ต้องการให้เป็น hydrophobic จะถูกวางทับด้วยแผ่นเหล็ก เมื่อไปเข้าเครื่อง plasma cleaner กระดาษบริเวณที่ไม่มีแผ่นเหล็กวางอยู่จะถูก plasma oxidation เกิดเป็นส่วนของ hydrophilic

5. Wax printing (15, 16) เป็นเทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยใช้เครื่องพิมพ์ชนิดที่ใช้ wax เป็นหมึกพิมพ์ โดยออกแบบลวดลายที่ต้องการแล้วสั่งพิมพ์บนกระดาษกรองจากนั้นนำกระดาษที่พิมพ์ลายไปวางบน hotplate ที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที wax จะหลอมละลายและซึมลงบนกระดาษเกิดเป็นส่วนของ hydrophobic ในขณะทีบริเวณที่ไม่ได้พิมพ์ลายจะคงสภาพความเป็น hydrophilic เช่นเดิมซึ่งขั้นตอนการสร้าง μPADs ด้วยวิธี wax printing แสดงดังภาพที่ 2.2

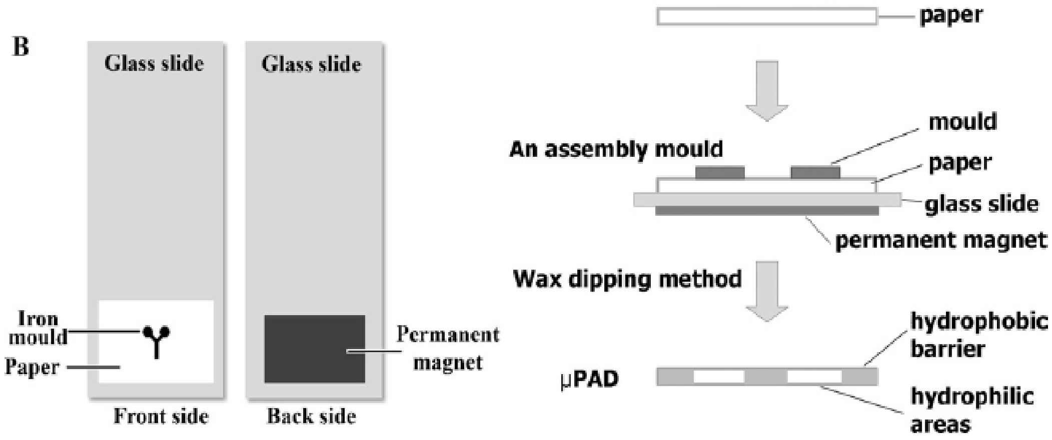


ภาพที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้วิธี wax printing (16)

6. Ink jet printing (33, 34) เป็นเทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยทำการบรรจุสาร alkenyl ketene dimer/heptane ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสาร hydrophobic ลงในตลับหมึกแล้วพิมพ์ลวดลายที่ต้องบนกระดาษจากนั้นนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส 8 นาที เพื่อให้สาร alkenyl ketene dimer ซึมลงบนกระดาษเกิดเป็นส่วนของ hydrophobic ในขณะที่บริเวณที่ไม่ได้พิมพ์สารก็ยังคงสภาพ hydrophilic เหมือนเดิม

7. Wax screen-printing (17) เป็นเทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยใช้แบบสกรีน (ลักษณะคล้ายกับแบบสกรีนเสื้อ) จากนั้นทำการสกรีน wax ลงบนแบบแล้วนำไปวางไว้บน hotplate ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ wax หลอมละลายและซึมลงในเนื้อกระดาษ เกิดเป็นส่วนของ hydrophobic และกระดาษบริเวณที่ไม่มี wax ซึมผ่านก็จะคงสภาพ hydrophilic เช่นเดิม

8. Wax dipping (18) เป็นเทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษโดย ใช้แม่พิมพ์ที่เป็นเหล็ก วางบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนกระจกสไลด์แล้วใช้แม่เหล็กยึดที่ด้านหลังของกระจกสไลด์ จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนที่ประกอบขึ้นลงใน wax ที่หลอมละลายที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วินาที รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วลอก wax ออก ซึ่งกระดาษส่วนที่แท่งเหล็กบังอยู่จะเกิดเป็นส่วนของ hydrophilic และรอบนอกที่ wax เคลือบจะเป็นส่วนของ hydrophobic การสร้าง μPADs ด้วยวิธี wax dipping แสดงดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้วิธี Wax dipping (18)

จากที่กล่าวมาข้างต้นการสร้าง μPADs เริ่มมีการพัฒนาตั้งแต่ปี 2007 (10) จนกระทั่งปัจจุบันยังมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นั้น ส่วนใหญ่เพื่อที่จะทดแทนข้อจำกัดของวิธีที่ได้พัฒนามาก่อนหน้านี้ สำหรับเทคนิคในการสร้าง μPADs ที่กล่าวมาข้างต้นมีข้อดีและข้อเสียดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของเทคนิคที่นำมาใช้ในการสร้าง µPADs

เทคนิค	ข้อดี	ข้อเสีย
Photolithography (10, 30, 31, 35, 36)	1.ลวดลายที่สร้างได้มีความคมชัดสูง ท่อขนาดเล็กสุดที่สร้างได้มีความกว้าง 200 ไมโครเมตร	1. อุปกรณ์และน้ำยาที่ใช้มีราคาสูง และต้องทำในห้องพิเศษที่ปราศจากฝุ่นละออง 2. น้ำยาสัมผัสกับกระดาษโดยตรง ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการวัดปฏิกิริยา
Plotting (11, 35, 36)	1. PDMS มีราคาถูก 2. กระดาษที่สร้างได้มีความยืดหยุ่น 3. ส่วนของ hydrophilic ไม่สัมผัสสารเคมีโดยตรง	1. ใช้ระยะเวลานานในการสร้าง 2. ลวดลายและลวดลายที่สร้างได้มีความคมชัดต่ำ 3. ต้องใช้เครื่องพลอตเตอร์เฉพาะ
Ink jet etching (12, 35, 36)	1. สาร AKD มีราคาถูก	1. ใช้ระยะเวลาในการสร้างนานต้องพิมพ์สาร toluene ซ้ำกันถึง 10 ครั้งจึงจะได้ส่วนของ hydrophilic 2. บริเวณส่วนที่เป็น hydrophilic สัมผัสกับสารเคมีโดยตรง 3. ต้องใช้เครื่องพิมพ์ชนิดพิเศษ
Plasma treatment (13, 35, 36)	1. สาร AKD มีราคาถูก	1. ต้องมีเครื่อง plasma cleaner 2. บริเวณส่วนที่เป็นhydrophilic สัมผัสกับสารเคมีโดยตรง
Wax printing (15, 16)	1. wax ที่ใช้มีราคาถูก 2. สร้างได้ง่ายและสร้างได้ในปริมาณมาก	1. ต้องใช้เครื่องพิมพ์ชนิดพิเศษ 2. มีขั้นตอนในการให้ความร้อนเพื่อให้ wax ซึมลงบนกระดาษ
Ink jet printing (33, 34, 36)	1. สาร AKD มีราคาถูก 2. สร้างได้ง่ายและสร้างได้ในปริมาณมาก	1. ต้องใช้เครื่องพิมพ์ชนิดพิเศษ 2. มีขั้นตอนในการให้ความร้อนเพื่อให้สาร AKD ซึมลงบนกระดาษ

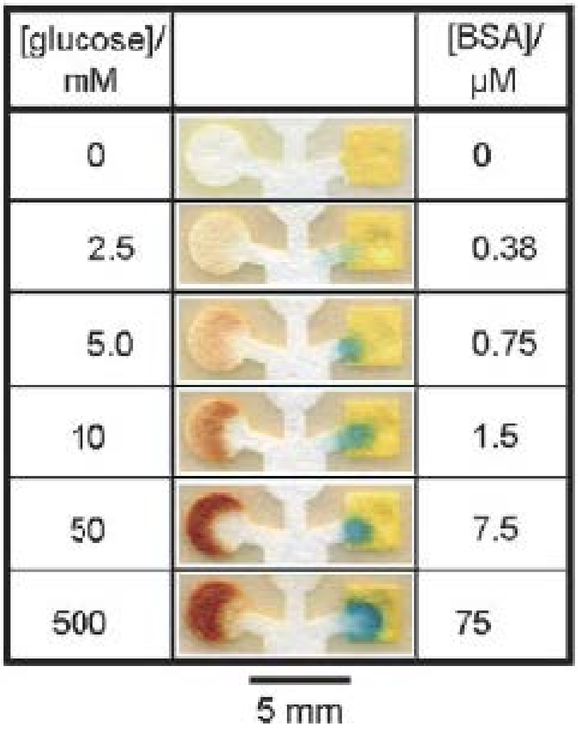
ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบซึ่งข้อดีและข้อเสียของเทคนิคที่นำมาใช้ในการสร้าง µPADs

เทคนิค	ข้อดี	ข้อเสีย
Wax screen-printing (17, 36)	1. wax ที่ใช้มีราคาถูก 2. สร้างได้ง่ายและสร้างได้ในปริมาณมาก	1.แบบที่ได้มีความคมชัดน้อย เนื่องจากในขั้นตอนการพิมพ์ลายต้องใช้แรงที่สม่ำเสมอจากภายนอกในการกดก้อน wax ทุกครั้งที่พิมพ์ 2. มีขั้นตอนในการให้ความร้อนเพื่อให้ wax ซึมลงบนกระดาษ
Wax dipping (18)	1. wax มีราคาถูก 2. สร้างได้ง่ายและสร้างได้ในปริมาณมาก 3. แบบที่ได้มีความคมชัดสูง	1. เพื่อความคมชัดของแบบที่ได้ต้องควบคุมอุณหภูมิของ wax ที่หลอมละลายให้คงที่ตลอดการใช้งาน

2.1.2 การประยุกต์ใช้ µPADs กับเทคนิควิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

ได้มีการนำ µPADs ที่สร้างได้มาใช้ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณมีหลายเทคนิคด้วยกันที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

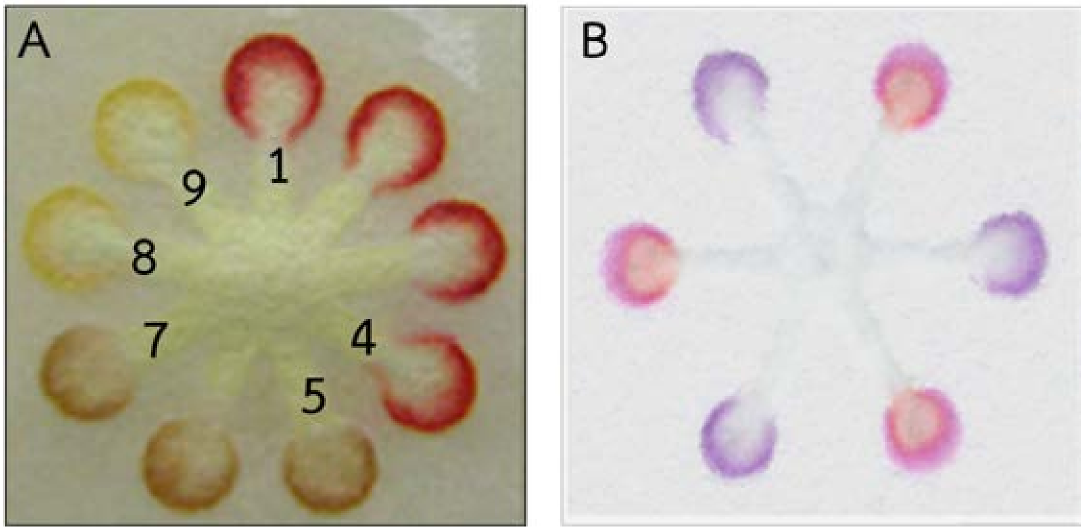
1. Colorimetric detection (การวัดสี) ถือเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดเนื่องจากวิธีดังกล่าวสามารถทำได้ง่ายมีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมองเห็นได้ชัดเจน โดยการทดสอบแรกที่วิเคราะห์โดยการวัดสี คือ การตรวจวัดกลูโคส (10) โดยอาศัยหลักการของเอนไซม์ colorimetric ทำการตรึง potassium iodide กับเอนไซม์ 2 ชนิดคือ horseradish peroxidase และ glucose oxidase บน µPADs เมื่อเติมตัวอย่างที่มีกลูโคสลงไปจะเกิดปฏิกิริยา oxidation ของเอนไซม์ทำให้ iodide เปลี่ยนไปอยู่ในภาพของ iodine วัดสีของปฏิกิริยาจากการเปลี่ยนของ iodide จากไม่มีสีเป็นสีน้ำตาลซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของกลูโคส อีกการทดสอบคือการวัดโปรตีน (10) โดยใช้การเปลี่ยนสีของ tetrabromophenol blue (TBPB) สารดังกล่าวในสภาวะที่ถูก ionizes จะจับกับโปรตีนได้และเปลี่ยนสีของสารจากสีเหลืองเป็นสีฟ้า (10) ดังแสดงดังภาพ 2.4



ภาพที่ 2.4 แสดงความเข้มของสีที่ได้จากการตรวจวัดกลูโคสและโปรตีน (10)

เนื่องจากวิธีการวัดสีเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมาก ทำให้มีการพัฒนาการวัดสารชนิดอื่นๆ ตามมา ได้แก่ ไนไตรท์ (nitrite) (31, 34), กรดยูริค (uric acid) (20, 34, 37), คีโตน (ketones) (31), แลคเตส (lactate) (37), พีเอช (pH) (12), อิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) (38), เชื้อแบคทีเรียก่อโรค (foodborne pathogens) (39), หมู่โลหิต ABO (40), แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP) (13), สารโลหะหนักต่างๆ อาทิเช่น เหล็ก (Fe), นิเกิล (Ni), คอปเปอร์ (Cu) (41)

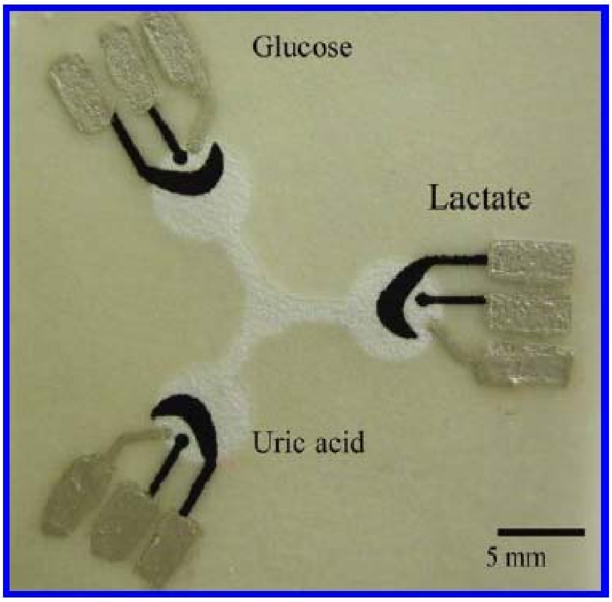
ถึงวิธีการวัดสีจะได้รับความนิยมเป็นอย่างมากแต่วิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ 2 ประการ คือประการที่ 1 ลักษณะของกระดาษที่นำมาใช้ถ้ากระดาษดังกล่าวมีอายุการใช้งานนาน อาจส่งผลให้สีของกระดาษเปลี่ยนแปลงซึ่งปัจจัยดังกล่าวจะส่งผลต่อการวัดสีด้วยเช่นกัน (20) ประการที่ 2 คือ ในการควบคุมการไหลในท่อขนาดเล็กนั้นสารจะไหลและไปสิ้นสุดที่ปลายท่อทำให้สีของปฏิกิริยาเกิดชัดเจนในบริเวณขอบมากกว่าบริเวณที่ต้องการวัดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 2.5 และอัตราการไหลที่รวดเร็วของสารในท่อขนาดเล็กยังส่งผลต่อการวัดปฏิกิริยาอีกด้วยเมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้วสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหายไปอย่างรวดเร็วจึงไม่สามารถวัดสีที่เกิดขึ้นได้ (41)



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะของสีที่เกิดขึ้นบริเวณขอบ μPADs ส่งผลต่อความผิดพลาดในการวัดความเข้มสีได้ (a) แสดงสีของปฏิกิริยาจากการตรวจวัดกลูโคส (ตำแหน่งที่ 1-4), แลคเตส (ตำแหน่งที่ 5-7) และกรดยูริค (ตำแหน่งที่ 8-9) (37) (b) แสดงสีของปฏิกิริยาจากการตรวจวัดไนไตรท์ (สีชมพู) และการตรวจวัดกรดยูริค (สีม่วง) (34)

2. Electrochemical detection (การวัดทางเคมีไฟฟ้า) เป็นวิธีการวัดสารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาต้องมีคุณสมบัติในการให้หรือรับอิเล็กตรอนได้ การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าถือเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจเพราะว่าอุปกรณ์ที่ใช้มีขนาดเล็ก, เคลื่อนย้ายได้ง่าย, มีความไวและความจำเพาะสูงเนื่องจากความต่างศักย์และขั้วไฟฟ้าที่ใช้วัดจะจำเพาะกับสารผลิตภัณฑ์ (21) ในปัจจุบันการวิเคราะห์บน μPADs โดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าทำได้ 2 แบบคือ แบบที่ 1 การพิมพ์, การหยดสารและการเขียนขั้วไฟฟ้าลง μPADs โดยตรง ได้แก่

- การพิมพ์ขั้วไฟฟ้าลงบน μPADs โดยตรง เป็นวิธีแรกที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์บนกระดาษด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยการใช้หมึกคาร์บอนพิมพ์บน μPADs สำหรับใช้เป็นขั้วใช้งาน (working electrode) และขั้วไฟฟ้าร่วม (counter electrode) ใช้หมึกชนิดซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ในส่วนของขั้วไฟฟ้าใช้งานมีการ modified สารชนิด Prussian blue ลงไปด้วย เพื่อนำมาใช้สำหรับตรวจวัดกลูโคส, แลกเตสและกรดยูริคโดยใช้เทคนิค chronoamperometry (21) แสดงดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 แสดงตัวอย่างการพิมพ์ขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนลงบน μPADs (21)

- การหยดสารที่มีคุณสมบัติเป็นขั้วไฟฟ้าลงบนกระดาษอาทิเช่น ทองคำ (gold) แล้วทำการ sputter เพื่อให้สารติดแน่นบนกระดาษ เพื่อนำมาใช้ในการแยก paracetamol และ 4-aminophenol ออกจากกัน โดยใช้เทคนิค amperometry (42)
- การเขียนขั้วไฟฟ้าลงบน μPADs เป็นเทคนิคในการสร้างขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ โดยใช้ดินสอชนิดที่ไส้ดินสอเป็นแกรไฟต์เขียนลงบน μPADs เพื่อใช้เป็นขั้วสำหรับใช้งาน นำมาใช้ในการตรวจวัดกลูโคสโดยใช้สารชนิด 4-aminophenylboronic acid เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนและใช้เทคนิค chronoamperometry ในการวิเคราะห์ (43)

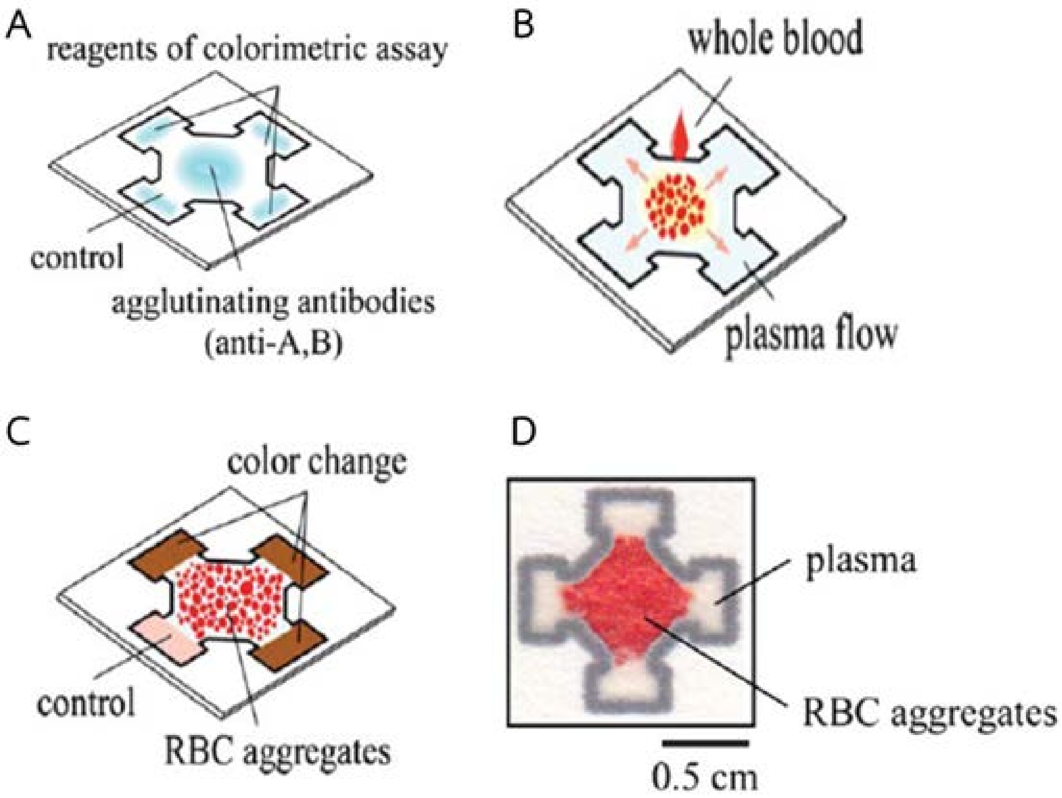
แบบที่ 2 โดยการวาง μPADs ลงบนขั้วไฟฟ้าที่พิมพ์ลายนำ μPADs ที่พิมพ์ลายโดยใช้เทคนิค photolithography สร้างลวดลายบนกระดาษวางบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์ลายบนแผ่นโพลีเอสเตอร์สำหรับตรวจกลูโคสโดยใช้ glucose oxidase เอนไซม์และใช้ potassium ferricyanide เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ในตัวอย่างตรวจที่เป็นปัสสาวะเทียมใช้เทคนิค chronoamperometry และยังใช้อุปกรณ์ดังกล่าวสำหรับวัดปริมาณตะกั่ว (Pb) ในสารละลายผสมระหว่างตะกั่วและสังกะสี (Zn) โดยใช้เทคนิค square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV) (26) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาอุปกรณ์ในรูปแบบที่คล้ายกันใช้เทคนิค SWASV ในการตรวจวัดโดยใช้สาร sodium dodecyl sulfate ตรึงบนกระดาษสำหรับตรวจวัด dopamine ในสารควบคุมคุณภาพ (control serum) (44) อีกด้วย

นอกจาก 2 เทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นแล้วมีการนำ μPADs มาใช้กับการตรวจด้วยเทคนิคอื่นอีกด้วย อาทิเช่น Chemiluminescence สำหรับตรวจหากลูโคส (45) และกรดยูริค (22, 45), Electrochemiluminescence สำหรับวัดปริมาณ NADH (23), และ Fluorescence สำหรับวัดปริมาณกลูโคสและโปรตีน (24)

2.1.3 การพัฒนา μPADs สำหรับแยกเลือดครบส่วน

ในการนำ μPADs มาประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือดนั้น มีข้อจำกัดเนื่องจาก μPADs จะใช้ได้กับตัวอย่างที่เป็นซีรั่ม, พลาสมา เท่านั้น (18, 21, 37) ซึ่งในการแยกซีรั่ม, พลาสมาจากเลือดครบส่วนนั้นต้องมีขั้นตอนในการปั่นแยก (1) เพื่อช่วยลดขั้นตอนดังกล่าวจึงได้มีแนวคิดในการสร้าง μPADs สำหรับแยกเลือดและตรวจวิเคราะห์ได้ในอุปกรณ์เดียวซึ่งในปัจจุบันการสร้าง μPADs สำหรับแยกเลือดนั้นทำได้ 2 แบบดังนี้

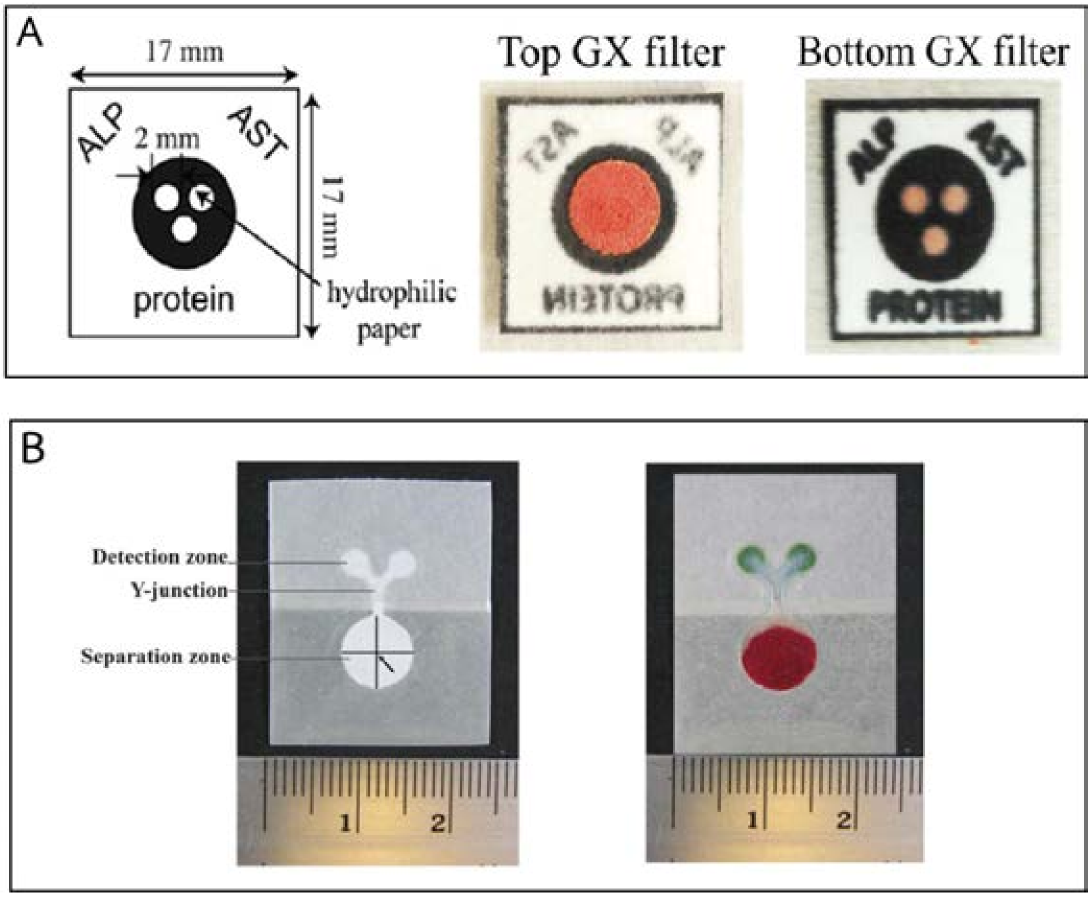
แบบที่ 1 สร้างโดยใช้หลักการเกาะกลุ่มกันของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนกระดาษ โดยทำการตรึง Anti-AB ไว้บนกระดาษกรอง (Whatman no.1) ซึ่งในคนที่มีหมู่โลหิต A มี A antigen, หมู่โลหิต B มี B antigen, หมู่โลหิต AB มีทั้ง A และ B antigen ในส่วนของหมู่โลหิต O นั้นไม่สามารถเกาะกลุ่มกับ Anti-AB ได้แต่หมู่โลหิต O มี H-antigen ที่แรงกว่าหมู่โลหิตอื่น ดังนั้นจึงตรึง Anti-H สำหรับผู้ที่มีหมู่โลหิต O เมื่อหยดเลือดครบส่วนลงไปทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ ทำให้พลาสมาไหลออกมาได้ (27) แสดงดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs สำหรับแยกเลือดครบส่วนโดยใช้หลักการ heamagglutination (a) แสดงขั้นตอนการตรึงแอนติบอดีบริเวณตรงกลางของ μPADs และตรึงน้ำยาบริเวณสำหรับตรวจวิเคราะห์ (b) เมื่อเติมเลือดครบส่วนตรงกลาง μPADs เกิดการเกาะกลุ่มกันของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ (c) ภาพจำลองสีของปฏิกิริยาตรวจวัดกลูโคสที่เกิดบน μPADs (d) แสดงลักษณะของพลาสมาที่แยกได้จริงบน μPADs (27)

แบบที่ 2 ใช้การเชื่อมกระดาษแยกเลือดเข้ากับกระดาษกรอง (Whatman no.1) ซึ่งการแยกเลือดด้วยวิธีนี้มีการพัฒนาใน 2 รูปแบบ คือ แยกในแนวของ vertical flow (28) และแยกในแนวของ lateral flow (29) ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้มีสิ่งที่เหมือนกันคือใช้กระดาษสำหรับแยกเลือดที่มีขนาดรูพรุนของกระดาษน้อยกว่าขนาดของเม็ดเลือดแดง (น้อยกว่า 7 μm) ในส่วนของการแยกเลือดตามแนว vertical flow นั้นจะใช้กระดาษแยกเลือดชนิด GX และ GR plasma filters วางซ้อนกับ μPADs เมื่อหยดเลือดลงบนกระดาษแยกเลือดเม็ดเลือดแดงจะถูกกักเก็บไว้ ในขณะที่พลาสมาไหลตามแนวดิ่ง ซึ่งวิธีดังกล่าวได้นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจแอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP), แอสพาเตตอะมิโนทรานเฟอเรส (AST), และโปรตีนจากเลือดครบส่วน (28), นอกจากนั้นยังได้มีการพัฒนา μPADs สำหรับแยกเลือดโดยใช้กระดาษแยกเลือดชนิด LF1 เชื่อมกับกระดาษกรอง (Whatman no.1) และใช้เทคนิค wax dipping ในการสร้างลวดลายบนกระดาษและเชื่อมกระดาษทั้ง 2 ชนิด เข้าด้วยกัน

นำมาใช้ในการตรวจโปรตีนจากเลือดครบส่วนด้วย (29) ลักษณะของ μPADs ที่พัฒนาได้แสดงดังภาพ 2.8



ภาพที่ 2.8 แสดงตัวอย่างของ μPADs สำหรับแยกเลือด (a) ลักษณะของ μPADs สำหรับแยกเลือดตามแนว vertical flow (28) (b) ลักษณะของ μPADs สำหรับแยกเลือดตามแนว lateral flow (29)

2.1.4 การนำ μPADs มาประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์

จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า μPADs หรือ lab on paper นั้นเป็นหนึ่งในเทคนิคการวิเคราะห์ที่กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก มีหลายงานวิจัยที่พยายามพัฒนาอุปกรณ์ดังกล่าวให้สามารถนำออกไปใช้ได้ในพื้นจริงโดยเฉพาะการนำไปใช้ในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่ง μPADs ที่สร้างขึ้นนั้นได้มีการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจที่หลากหลายแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ ด้วยกัน (46) คือ

1. การตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ โดยส่วนมากแล้ว μPADs ที่พัฒนาขึ้นนิยมนำมาใช้กับการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในร่างกายทั้งในส่วนของเลือดครบส่วน, ซีรั่มหรือพลาสมา, ปัสสาวะและน้ำลาย โดยการทดสอบที่ตรวจวิเคราะห์ได้บน μPADs มีความสามารถตรวจได้ครอบคลุมหลายโรค ทั้งในส่วนของการตรวจวัดสารชีวเคมีทั่วไป เช่น การตรวจวัดกลูโคส (glucose) (10, 18, 21, 26), โปรตีน (10, 29), คีโตน (ketones) (31), คอเลสเตอรอล (Cholesterol) (16), ไนไตรท์ (nitrite) (31, 34), กรดยูริค (uric acid) (20, 34, 37), แลคเตส (lactate) (37), การตรวจวัดระดับเอนไซม์ เช่น แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP), แอสพาเตต อะมิโนทรานเฟอเรส (AST) (28), การตรวจวัดทางอิมมูโนแอสเซย์ (Immunoassays) เช่น สารชี้บ่งของโรคมะเร็ง ได้แก่ AFP, CA153, CA199, CEA (47) และ PSA (32)

2. การตรวจคุณภาพของอาหาร เริ่มมีการนำ μPADs มาประยุกต์ใช้กับการตรวจในอาหาร อาทิเช่น การตรวจ ethanol ในอาหารโดยใช้หลักการทางเคมีไฟฟ้า (48), ตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* โดยใช้หลักการเอนไซม์ colorimetric โดยเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียจะเปลี่ยนสีสารตั้งต้น ซึ่งสีและความเข้มสีจะจำเพาะกับชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน (39)

3. การติดตามทางด้านสิ่งแวดล้อม μPADs ได้นำมาประยุกต์ในส่วนของการตรวจวัดโลหะหนักที่ออกมากับน้ำทิ้งในโรงงานอุตสาหกรรม อาทิเช่น การตรวจวัดทอง (gold) กับ เหล็ก (iron) ควบคู่กันโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับการวัดสีเพื่อแยกทองนำกลับมาใช้ใหม่ (25), การตรวจวัดตะกั่ว (Pb) โดยใช้หลักเคมีไฟฟ้า (26) และการวัดการสัมผัสสารโลหะหนักจากการทำงาน อาทิเช่น เหล็ก (Fe), นิเกิล (Ni), คอปเปอร์ (Cu) (41)

2.2 โรคเบาหวาน

เบาหวานเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบ metabolic ที่เกี่ยวข้องกับนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ซึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะดังกล่าวเกิดจากการที่ β-cell ของตับอ่อนที่ทำหน้าที่ในการสร้างอินซูลินนั้นไม่สามารถสร้างได้, สร้างได้ปริมาณน้อยหรืออินซูลินที่สร้างไม่สามารถทำงานได้ (49, 50) เนื่องจากเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการเก็บสะสมกลูโคสนั้นต้องใช้อินซูลินในการพากลูโคสเข้าเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและเก็บสะสม ซึ่งจากความผิดปกติดังกล่าวเมื่อกลูโคสไม่สามารถเข้าเซลล์ได้จึงส่งผลให้มีระดับกลูโคสสูงในกระแสเลือด

โรคเบาหวานสามารถแบ่งได้เป็น 4 แบบด้วยกันคือ (51)

1. เบาหวานชนิดที่ 1 โรคเบาหวานชนิดนี้พบประมาณ 5-10% โดยจะเป็นโรคตั้งแต่ในวัยเด็ก ซึ่งสาเหตุสำคัญนั้นเกิดจากความผิดปกติของ β-cell ของตับอ่อนที่ไม่สามารถสร้างอินซูลินได้หรือสร้างได้ปริมาณน้อยเนื่องจาก β-cell ของตับอ่อนถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (autoimmune) (49)
2. เบาหวานชนิดที่ 2 โรคเบาหวานชนิดนี้พบประมาณ 90-95% โดยมักจะเกิดในวัยกลางคนหรือในผู้สูงอายุ (49) ซึ่งสาเหตุนั้นเกิดจาก β-cell ของ ตับอ่อนไม่สามารถสร้างอินซูลินได้เพียงพอหรืออินซูลินที่สร้างมาไม่สามารถนำมาใช้งานได้ (เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน) (52) และพบว่าในผู้ที่เป็นโรคอ้วนมีโอกาสเสี่ยงในการเป็นเบาหวานชนิดนี้สูงกว่าคนทั่วไป (50)
3. เบาหวานที่เกิดจากปัจจัยเฉพาะอื่นๆ ได้แก่ เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมของ β-cell, ความผิดปกติทางพันธุกรรมในการทำงานของอินซูลิน, เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับตับอ่อน (cystic fibrosis) และการได้รับยาหรือสารเคมีบางชนิด (ยาต้าน HIV) เป็นต้น (49)
4. เบาหวานขณะตั้งครรภ์ พบประมาณ 2-4% ในหญิงตั้งครรภ์ซึ่งจะเป็นสาเหตุสำคัญที่จะนำไปสู่การเป็นเบาหวานถาวรในแม่และลูก (49)

2.2.1 ความชุกของโรคเบาหวาน

เบาหวานถือเป็นโรคที่พบมากและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ทั้งในประชากรโลกและประชากรในประเทศไทย จากการสำรวจขององค์การอนามัยโลกพบว่าในปี 2000 มีผู้ป่วยเบาหวานประมาณ 171 ล้านคนและมีการคาดการว่าจะเพิ่มขึ้นสูงถึง 366 ล้านคนในปี 2030 (53) ในส่วนของประเทศไทยนั้นได้มีการศึกษาในปี 2004 พบว่ามีผู้ที่เป็นเบาหวานสูงถึง 6.7% ของประชากร

ทั้งหมดและมีผู้ที่มีภาวะเสี่ยงในการเป็นเบาหวาน (Impaired glucose tolerance test) สูงถึง 12.5% (54) เมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านพบว่าความชุกของผู้ป่วยเบาหวานในประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้นจากปี 2000 ซึ่งพบว่ามีผู้ที่เป็นเบาหวาน 4.8% และ Impaired glucose tolerance test 5.4% (55) ในผู้ที่เป็นเบาหวานเรื้อรังและไม่ได้รับการควบคุมที่ดีมีโอกาสเสี่ยงของการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่นำไปสู่การเกิดโรคในระบบต่างๆ ได้

2.2.2 ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวาน

ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดในผู้ป่วยเบาหวานส่งผลต่อการทำงานของอวัยวะหลายระบบด้วยกัน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยหรือเสียชีวิตในผู้ป่วยเบาหวาน (56) ภาวะแทรกซ้อนที่เกี่ยวกับระบบการทำงานของหลอดเลือดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มโรคด้วยกันดังนี้

1. โรคของหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvascular disease) (57) ได้แก่

Nephropathy ภาวะแทรกซ้อนต่อการทำงานของไต เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะไตวายในผู้ป่วยเบาหวาน สาเหตุเกิดจากมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดบริเวณกรวยไต (glomeruli) ส่งผลให้มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นที่บริเวณดังกล่าวทำให้ไตไม่สามารถดูดกลับหรือกรองสารที่จำเป็นได้โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งในระยะแรกมีโปรตีนรั่วออกมาปริมาณน้อยเรียกว่า microalbuminuria แต่ถ้ามีพยาธิสภาพเกิดขึ้นที่บริเวณกรวยไตมาก เช่นมีเปลี่ยนแปลงการสร้างหรือการสลายของสารต่างๆ ของ glomerular basement membrane ได้แก่ collagen หรือ proteoglycans ส่งผลให้เกิดการหนาตัวของบริเวณดังกล่าวขึ้น ทำให้ไตสูญเสียประสิทธิภาพในการกรองสารต่างๆ และนำไปสู่ภาวะไตวายในท้ายที่สุด (58)

Retinopathy ภาวะแทรกซ้อนทางสายตาในผู้ป่วยเบาหวานมักพบสูงถึง 3 ใน 4 ของผู้ที่เป็นเบาหวานเป็นระยะเวลานานมากกว่า 15 ปี ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการมองไม่เห็นในอนาคต ในผู้ป่วยเบาหวานภาวะแทรกซ้อนนี้แบ่งได้ 2 แบบคือ แบบ non proliferative และแบบ proliferative แบบ non proliferative เกิดจากการที่เส้นเลือดฝอยบริเวณเรตินามีการโป่งพอง, มีเลือดออกในชั้นของจอประสาทตา, มีการสูญเสียเรตินา pericytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการรักษาความแข็งแรงของหลอดเลือด, มีการเพิ่มขึ้นของ vascular permeability ของเรตินา ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมานี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดการขาดเลือดไปเลี้ยงบริเวณเรตินา ในส่วนของ proliferative เกิดจากเมื่อมีการขาดเลือดไปเลี้ยงที่จอตามากขึ้นมีกลไกกระตุ้นให้สร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) หลอดเลือดที่

สร้างใหม่จะมีความเปราะบางและเกิดการฉีกขาดได้ง่ายส่งผลให้มีเลือดออกในวุ้นของลูกตา ซึ่งทำให้ตาบอดได้ในท้ายที่สุด (56, 59)

Neuropathy ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดกับระบบประสาทในผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งภาวะดังกล่าวเกิดได้หลายแบบ ทั้งที่เกิดกับเส้นประสาทหลายเส้น, เกิดกับเส้นประสาทเส้นเดียว และเกิดกับเส้นประสาทอัตโนมัติ โดยกลไกที่ส่งผลต่อการเจ็บป่วยในผู้ป่วยเบาหวานนั้นเป็นผลมาจากความผิดปกติของเส้นประสาทหลายเส้นร่วมกับระบบการไหลเวียนของหลอดเลือด ทำให้เลือดไม่สามารถไหลมาบริเวณปลายประสาทเหล่านี้ได้ เมื่อมีแผลเกิดขึ้นจะรักษาไม่หายและท้ายที่สุดต้องตัดแผลหรืออวัยวะบริเวณที่เกิดแผลทิ้ง (56)

2. โรคของหลอดเลือดขนาดใหญ่ (macrovascular disease) (60)

Cardiovascular disease โรคเบาหวานเป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่โรคหัวใจและหลอดเลือดโดยกลไกการกระตุ้นนั้นเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุด้วยกัน ได้แก่ ภาวะดื้อต่ออินซูลิน, ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและภาวะความดันโลหิตสูงเป็นต้น (61) โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคหัวใจนั้นเกี่ยวข้องภาวะ endothelial dysfunction ในผู้ป่วยเบาหวานที่มีสาเหตุจากภาวะดื้อต่ออินซูลินส่งผลต่อการทำงานของ PI3-K pathway ให้การสร้าง nitric oxide และการทำงานของ Na+ pump ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ นอกจากนั้น nitric oxide ยังมีบทบาทสำคัญในการรักษา vascular homeostasis, ควบคุมการแบ่งเซลล์, การยับยั้งการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์, การเกิดลิ่มเลือด, การอักเสบ, ป้องกันอันตรายของผนังหลอดเลือดจากการกระทบกระเทือนจากเซลล์ต่างๆ ในระบบไหลเวียนของหลอดเลือด ซึ่งถ้ากลไกการควบคุมเหล่านี้เสียไปผนังหลอดเลือดก็จะถูกทำลายได้ง่ายและการอักเสบที่เกิดขึ้นจะกระตุ้นให้มีการหลัง pro-inflammatory cytokine ดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวมาที่ผนังหลอดเลือดมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวและเมื่อเข้าภายในผนังหลอดเลือด มีการหลั่ง cytokines, กระตุ้น complements ทำให้มีการสร้าง smooth muscle cells เพิ่มมากขึ้นและมีการสะสมของ fibrous tissue ทำให้เกิด plaque บริเวณหลอดเลือด ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเกิด cardiovascular disease (62) นอกจากนั้นในผู้ที่เป็นเบาหวานมักมีระดับไขมันที่ผิดปกติโดยเฉพาะไขมันชนิด LDL ซึ่งไขมันนี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดเกิดเป็น plaque ซึ่งถ้ามี plaque สะสมในปริมาณมากๆ ทำให้มีการตีบตันของหลอดเลือดได้เช่นกัน (56)

2.2.3 เกณฑ์การวินิจฉัยภาวะโรคเบาหวาน

ในปัจจุบันการวินิจฉัยภาวะเบาหวานนั้นพิจารณาจากระดับของกลูโคสในพลาสมาจาก fasting plasma glucose หรือ 75g OGTT และตั้งแต่ปี 2010 ได้เพิ่ม HbA1c มาใช้เป็น marker ในการวินิจฉัยเบาหวานด้วยซึ่งในการตรวจวิเคราะห์ HbA1c นั้นวิธีที่ใช้ต้องเป็นวิธีที่ได้รับการรับรองจาก NGSP และเป็นวิธีที่ได้ทำการสอบเทียบแล้วกับวิธีอ้างอิง DCCT (51) เกณฑ์ในการวินิจฉัยแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคเบาหวานของ American Diabetes Association ปี 2013 (ดัดแปลงมาจาก (51))

Diagnostic	Impaired fasting glucose(IFG)	Impaired glucose tolerance(IGT)	Diabetes
Fasting plasma glucose(FPG)*	100– 125 mg/dL (5.6 – 6.9 mmol/L)	Not required	$\geq$ 126 mg/dL (7.0 mmol/L)
2-h plasma glucose**	Measurement not recommend (but if measured should be < 11.1 mmol/L)	140 – 199 mg/dL (7.8 – 11.0 mmol/L)	$\geq$ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

*** Fasting is definition as no caloric intake for a least 8 h**

**** 2-h plasma glucose is definition as after ingestion of 75g oral glucose load**

นอกจากจะใช้เกณฑ์การวินิจฉัยจากระดับน้ำตาลในกระแสเลือดแล้ว ยังใช้ระดับ HbA1c มาช่วยในการวินิจฉัยร่วมด้วย โดยเกณฑ์ในการวินิจฉัยภาวะเบาหวานคือระดับ HbA1c $\geq$ 6.5% (51)

2.2.4 วิธีการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด

การตรวจวัดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดถือเป็นพื้นฐานในการตรวจกรอง, ตรวจวินิจฉัยและตรวจติดตามในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (63) การตรวจวัดระดับกลูโคสมีหลากหลายวิธีด้วยกัน โดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้หลักการของเอนไซม์อาทิเช่น glucose oxidase, hexokinase หรือ glucose dehydrogenase (64) นอกจากนั้นยังได้มีการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดกลูโคสให้ในรูปแบบของ point-of-care testing (POCT) หรือ เครื่อง glucometer โดยนำหลักการของเอนไซม์มาใช้

เช่นเดียวกันซึ่งเครื่องมือดังกล่าวที่มีขนาดเล็กลงสามารถตรวจได้ข้างเตียงผู้ป่วยหรือตรวจวัดได้เองที่บ้าน (65) แต่ละวิธีมีหลักการข้อดีและข้อจำกัดดังนี้

1. การตรวจวัดระดับกลูโคสโดยใช้หลักการของ glucose oxidase

การตรวจวัดระดับกลูโคสโดยใช้หลักการของ glucose oxidase นั้นมีขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยาคือ glucose oxidase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ของกลูโคสในสภาวะที่มี O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็น H_2O_2 ปฏิกิริยาในขั้นต่อมา H_2O_2 จะรับอิเล็กตรอนจาก chromogen โดยมี peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็น oxidized chromogen ซึ่งเป็นสารที่มีสี (66) ดังสมการ

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2 \quad (1)$$

$$H_2O_2 + \text{Reduced chromogen} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Oxidized chromogen} + H_2O \quad (2)$$

(colored product)

วัดปฏิกิริยาจากการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นของ oxidized chromogen โดยปริมาณสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณกลูโคส ที่มีอยู่วิธีนี้จะมีความจำเพาะกับกลูโคสสูงแต่ถ้าในซีรั่มหรือพลาสมาที่ส่งตรวจมีระดับ uric acid, bilirubin และ ascorbic acid สูงจะรบกวนการตรวจวัดได้ (67)

2. การตรวจวัดระดับกลูโคสโดยใช้หลักการของ hexokinase

เป็นการตรวจวัดระดับกลูโคสโดยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ ใช้ hexokinase ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกลูโคสเกิดเป็น D-glucose-6-phosphate (G6P) และใช้ glucose-6-phosphate dehydrogenase ในการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ G6P ทำให้ $NADP^+$ ซึ่งเป็น cofactor ของปฏิกิริยาสามารถรับอิเล็กตรอนและเกิดเป็น NADPH ได้ดังสมการ (68)

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{D-glucose-6-phosphate} + \text{ADP} \quad (1)$$

$$\text{D-glucose-6-phosphate} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G-6-P dehydrogenase}} \text{D-6-phosphogluconate} + \text{NADPH} \quad (2)$$

ซึ่ง NADPH ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของกลูโคส จึงสามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 nm ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความจำเพาะต่อกลูโคสสูงและมีสารรบกวนในการตรวจวัดน้อย แต่อาจถูกรบกวนได้จากกรณีที่ซีรั่มหรือพลาสมาที่ส่งตรวจมี hemolysis และระดับความเข้มข้นของ fructose ที่สูงในตัวอย่างตรวจจะทำให้ค่ากลูโคสลดลงได้ (69)

3. การตรวจวัดระดับกลูโคสโดยใช้อุปกรณ์ point-of-care testing

Glucose biosensor หรือ point-of-care testing สำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสได้มีการพัฒนาขึ้นในปี 1970s จากหลักการของเอนไซม์โดยทำการย่อส่วนอุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์ให้มีขนาดเล็กลง ย่นระยะเวลาในการรายงานผล โดยเทคนิคที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้กับ point-of-care testing คือการตรวจวัดในรูปแบบของปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical detection) เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีความไวสูง, มี reproducibility ดี, ง่ายในการดูแลรักษาและราคาไม่แพง (70) โดยทั่วไปการตรวจวัดระดับกลูโคสในรูปแบบของ point-of-care testing นั้น แบ่งตามชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการวัดปฏิกิริยาได้ 2 แบบคือ

แบบที่ 1 ใช้เอนไซม์ glucose oxidase เอนไซม์ดังกล่าวมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานทาง biosensor เนื่องจาก glucose oxidase มีความจำเพาะต่อกลูโคสสูง, หาซื้อได้ง่าย, ราคาถูก และมีความทนทานสูงต่อ pH, ionic strength และอุณหภูมิ (71, 72) การทำงานของ glucose oxidase นั้นเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ β-D-glucose ในสภาวะที่มี O_2 ได้สารผลิตภัณฑ์คือ gluconolactone หรือ gluconic acid และ H_2O_2 นอกจากนั้นในบางการศึกษายังใช้ redox cofactor เข้ามาช่วยในปฏิกิริยาด้วยเช่น FAD แต่สารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยายังเป็น H_2O_2 เช่นเดิม ในการตรวจวัดกลูโคสโดยที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้านั้นสามารถวัดปฏิกิริยาได้ 3 แบบ คือ วัดปริมาณ O_2 ที่ถูกใช้ไป, วัดปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นและวัดจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของปฏิกิริยาไปยังขั้วไฟฟ้า (70) ดังสมการ

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{Gluconolactone} + H_2O_2$$

แบบที่ 2 ใช้เอนไซม์ glucose dehydrogenase (GDH) เอนไซม์ดังกล่าวมีการพัฒนาเป็น 2 รูปแบบคือ ใช้ GDH เร่งปฏิกิริยา oxidation ของกลูโคส โดยมี NAD^+ เป็น co-factor ในการรับอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยา (73) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังสมการ โดยวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ NAD^+ ที่ใช้เป็น co-factor นั้นมีราคาสูงและมีความคงตัวต่ำ (74)

$$\text{Glucose} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Glucose dehydrogenase}} \text{Gluconolactone} + NADH$$

อีกแบบหนึ่งคือการใช้ quinoprotein glucose dehydrogenase โดยอาศัยคุณสมบัติที่ว่า quinoprotein เป็นหนึ่งในรูปแบบของ glucose dehydrogenase (GDH) ซึ่งในการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของกลูโคสของเอนไซม์ดังกล่าวนั้น ต้องใช้ orthoquinone เป็น co-factor ในการรับอิเล็กตรอนที่เกิดจากปฏิกิริยา โดยทั่วไปเครื่อง glucometer ที่พัฒนาขึ้นนั้นมักใช้ pyrroloquinoline quinine (PQQ) เป็น co-factor (75) ดังสมการ ซึ่งข้อดีของการใช้ PQQ-GDH นั้นมีข้อดีคือ ระบบเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงเมื่อเกิดปฏิกิริยาจะมีอัตราในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนได้ไวแต่ราคายังสูงอยู่ (74)

$$\text{Glucose} + \text{PPQ (ox)} \xrightarrow{\text{Glucose dehydrogenase}} \text{Gluconolactone} + \text{PPQ (red)}$$

นับตั้งแต่ปี 1973 ที่ได้มีการพัฒนาเครื่องตรวจระดับกลูโคสเครื่องแรกโดยใช้หลักการของ biosensor จนกระทั่งถึงยุคปัจจุบันเครื่องมือดังกล่าวได้มีการพัฒนาอย่างมากโดยเน้นในด้านของการงานได้ง่าย, ใช้ปริมาณเลือดน้อย (76) และรายงานผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็ว (77) ทำให้การเจริญเติบโตทางด้านการตลาดของอุปกรณ์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นสูงมากและในปัจจุบันนี้ได้มีเครื่องตรวจกลูโคสที่พัฒนาขึ้นและนำมาใช้ในการติดตามระดับน้ำตาลในผู้ป่วยเบาหวานหลากหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงตัวอย่างเครื่องตรวจวัดระดับกลูโคส (glucometer) ที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบัน (ดัดแปลงมาจาก (70))

Manufacturer	Brand	Assay method	Minimal sample volume (uL)	Test time (second)	Assay range (mg/dL)
Abbott	FreeStyle Freedom Lite	GDH-PQQ	0.3	5	20–500
AgaMatrix	WaveSense KeyNote	GOD	0.5	4	20–600
Arkray	Glucocard X-meter	GDH	0.3	5	10–600
Bayer	Ascensia Contour	GDH-FAD	0.6	5	10–600
Bionime	Rightest GM300	GOD	1.4	8	20–600
Diabestic Supply of Suncoast	Advocate Redi-Code*	GOD	0.7	7	20–600
Diagnostic Devices	Prodigy Autocode	GOD	0.6	6	20–600
LifeScan	OneTouch UltraLink	GOD	1.0	5	20–600
Nova Biomedical	Nova Max	GOD	0.3	5	20–600
Roche	Accu-Chek Aviva	GDH-PQQ	0.6	5	10–600

2.2.5 ข้อจำกัดของการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดโดยเครื่อง glucometer

ถึงแม้ว่า glucometer จะได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาใช้ติดตามระดับน้ำตาลในผู้ป่วยเบาหวาน แต่เครื่องมือดังกล่าวยังมีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการที่ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ผิดพลาดได้ อาทิเช่น ค่าของ hematrocrit (Hct) ที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคลเนื่องจาก Hct มีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ของของเหลวต่างๆ ในเลือดครบส่วน ซึ่งความแตกต่างของค่า Hct จะมีผลกระทบอย่างมากในผู้ป่วย polycytemia หรือในเด็กแรกเกิดเนื่องจากมีค่า Hct สูงกว่าคนปกติส่งผลให้ค่ากลูโคสที่วัดได้ต่ำกว่าค่าจริง ในขณะที่เป็นไตวาย (renal failure), ผู้ที่ล้างไต (hemodialysis) หรือร่างกายเสียเลือดมากมีค่า Hct ต่ำกว่าคนปกติส่งผลให้การค่ากลูโคสที่วัดได้สูงกว่าค่าจริง (78) นอกจากปัจจัยเรื่อง Hct แล้วยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องที่ทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ดังนี้

1. การเกิดก้อน clot ขนาดเล็ก หรือการเกิดการรวมตัวกันของ fibrin บนแผ่น strip สำหรับตรวจวัด (78)
2. การเกิด hemolysis ของตัวอย่างเลือดที่ใช้ตรวจวัด (78)

3. ระดับของ PO_2, PCO_2 และ pH ในตัวอย่างตรวจ (79)
4. ผลจากยาบางชนิด ได้แก่ ascorbic acid, acetaminophen, dopamine และ mannitol เป็นต้น (80)

นอกจากนั้นในการตรวจวัดโดยใช้เครื่อง glucometer ระดับของกลูโคสที่วัดได้จะเป็นค่ากลูโคสในตัวอย่างตรวจที่เป็นเลือดครบส่วนซึ่งถ้าจะนำค่าดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับในพลาสมาหรือซีรั่มนั้นจำต้องคูณกลับด้วย 1.11 ตามเกณฑ์ของ IFCC ด้วย (63)

2.3 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า

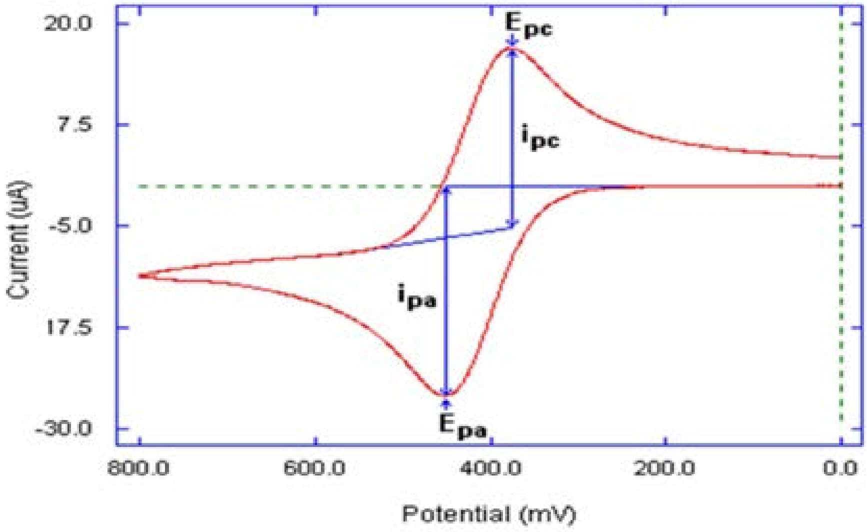
เคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) เป็นศาสตร์ที่ว่าด้วยความสัมพันธ์ระหว่างไฟฟ้ากับการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยหลักการทางเคมีไฟฟ้านี้ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางเคมีมากมาย อาทิเช่น การใช้หลักการเคมีไฟฟ้าในทางเคมีวิเคราะห์หรืออาจเรียกว่าการวิเคราะห์เชิงเคมีไฟฟ้า หลักการวิเคราะห์นี้ได้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์หาปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่ต้องการ ซึ่งเทคนิคที่นำมาใช้ในการศึกษามีอยู่หลายเทคนิคด้วยกัน (81) ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงเทคนิควิธีการทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า (ดัดแปลงมาจาก (81))

เทคนิควิธี	สัญญาณไฟฟ้าที่ให้	ค่าทางไฟฟ้าที่วัด
Potentiometry	กระแส = 0	ศักย์
Amperometry	ศักย์คงที่	กระแส
Voltammetry	ศักย์	กระแส
Coulometry	กระแสหรือศักย์	ปริมาณไฟฟ้า
Electrogravimetry	กระแสหรือศักย์	น้ำหนักของสาร

กล่าวโดยละเอียดถึง 2 เทคนิคที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือเทคนิค cyclic voltammetry และ chronoamperometry ซึ่งทั้ง 2 เทคนิคนี้วัดปฏิกิริยาจากการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าและวัดกระแสที่เกิดจากปฏิกิริยาเหมือนกันต่างกันที่ cyclic voltammetry จะให้เป็นช่วงของศักย์ไฟฟ้าในขณะที่ chronoamperometry จะให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ดังนี้

เทคนิค Cyclic voltammetry เป็นเทคนิคพื้นฐานที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติของสารที่ต้องการศึกษาเบื้องต้น โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าอย่างต่อเนื่องระหว่าง 2 ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ได้กำหนดไว้แล้ว ในอัตราเร็วที่คงที่และติดตามกระแสที่เกิดขึ้นในแต่ละศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ปฏิกิริยา กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry เรียกว่า cyclic voltammogram แสดงดังภาพที่ 2.9 ซึ่งเป็นกราฟที่พลอตระหว่างค่าความต่างศักย์ที่ให้กับขั้วไฟฟ้าและค่าของกระแสที่ได้จากปฏิกิริยา โดยข้อมูลที่ได้จาก voltammogram นั้นคือค่าของกระแสจำกัดที่แปลผันตามความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยาบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า นำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารได้นอกจากนั้นยังใช้ voltammogram ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารจากค่าศักย์ครึ่งคลื่นซึ่งเป็นค่าคงที่ของสารในสารละลายอิเล็กโตรไลต์เกื้อหนุนหนึ่งได้อีกด้วย (82)



รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะของ cyclic voltammogram แบบปฏิกิริยาผันกลับได้ (ดัดแปลงจาก (83))

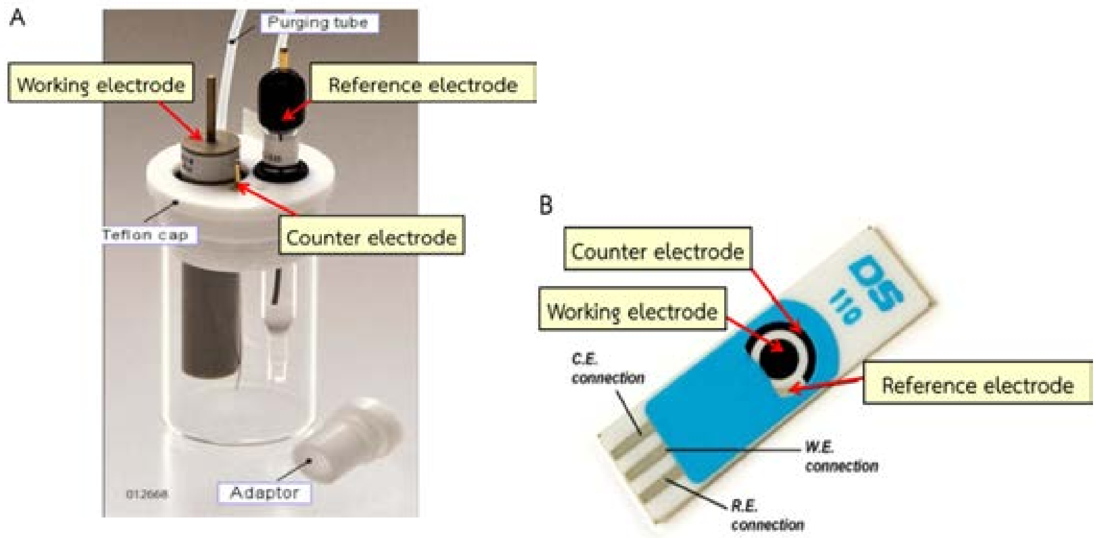
เทคนิค Chronoamperometry เป็นเทคนิคหนึ่งในเทคนิคของ amperometry ที่สำคัญในการนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน ที่เพียงพอในการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างบนขั้วไฟฟ้าได้ แล้ววัดค่ากระแสที่เกิดขึ้นเทียบกับเวลา ซึ่งแสดงออกมาเป็นกราฟที่เรียกว่า chronoamperogram ในการอ่านผลของปฏิกิริยานั้นต้องวัดในช่วงเวลาที่มีการเปลี่ยนแปลงของกระแสน้อยที่สุดและกระแสที่เกิดจากสารที่ต้องการวัดถึงจุดคงที่ (84)

2.4 ชนิดของขั้วไฟฟ้า

ขั้วไฟฟ้า (electrodes) มีหน้าที่เป็นตัวนำไฟฟ้า เป็นตัวเชื่อมระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์และอุปกรณ์วัดสัญญาณไฟฟ้า โดยขั้วไฟฟ้าที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ทาง voltammetry นั้นประกอบด้วยกัน 3 ขั้วคือ (85)

1. ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (working electrode) เป็นขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารละลายในปฏิกิริยา
2. ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode) เป็นขั้วไฟฟ้าที่ค่าศักย์ของขั้วไฟฟ้ามีค่าเฉพาะที่ไม่แปรเปลี่ยนตามการไหลของกระแสในวงจร
3. ขั้วไฟฟ้าร่วม (counter electrode) เป็นขั้วไฟฟ้าที่ช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนหรือกระแสไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าใช้งาน โดยไม่ผ่านขั้วไฟฟ้าอ้างอิงของวงจร

ซึ่งขั้วไฟฟ้าที่นำมาใช้ในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้ามีอยู่ด้วยกันหลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับลักษณะของการใช้งาน อาทิเช่น ขั้วไฟฟ้าแบบดั้งเดิม (traditional three-electrode) ที่ประกอบอยู่ใน electrochemical cell ที่เป็นภาชนะแก้ว (86) ดังแสดงในภาพที่ 2.10 (a), ขั้วไฟฟ้าพิมพ์ลาย (screen printed electrode) ที่ทำการพิมพ์สารที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าลงบนแผ่นพลาสติกหรือแผ่น PVC สำหรับเป็นบริเวณในการเกิดปฏิกิริยาและอีกด้านหนึ่งของขั้วไฟฟ้ามีส่วนสำหรับเชื่อมต่อกับอุปกรณ์วัดสัญญาณ ขั้วไฟฟ้าชนิดนี้เหมาะกับการนำมาใช้สำหรับวิเคราะห์สารตัวอย่างปริมาณน้อยได้เป็นอย่างดี (87) ลักษณะของขั้วไฟฟ้าแสดงดังภาพที่ 2.10 (b)



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะของขั้วไฟฟ้าที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ทาง voltammetry (a) ลักษณะขั้วไฟฟ้าแบบดั้งเดิม (ดัดแปลงจาก (86)) (b) ลักษณะของขั้วไฟฟ้าพิมพ์ลาย (87)

2.5 คุณสมบัติของสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน

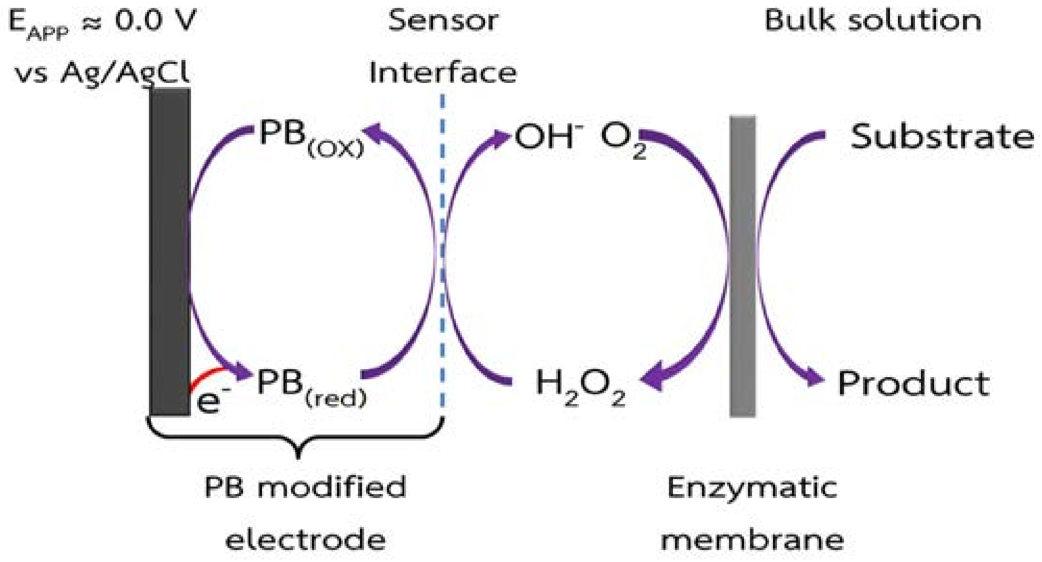
เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของสารผลิตภัณฑ์ที่เราต้องการศึกษา อาทิเช่น H_2O_2, O_2 สารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยา oxidation หรือ reduction ได้บนขั้วไฟฟ้าทั่วไป (bare electrode) (88) แต่ปฏิกิริยาดังกล่าวมักเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าสูง เช่น H_2O_2 จะเกิดปฏิกิริยา oxidation ที่ความต่างศักย์มากกว่า 0.60 V บนขั้วไฟฟ้า platinum (89) เพื่อลดความต่างศักย์ในการเกิดปฏิกิริยาของสารที่เราสนใจได้มีการนำสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (mediator) มาใช้ในการร่วมด้วย คุณสมบัติของ mediator ที่ดีคือต้องเกิดปฏิกิริยา oxidation หรือ reduction ได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำ, สามารถถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ไวและต้องมีความคงตัวสูง (88) ในการวัด H_2O_2 นั้น Prussian blue (PB) หรือ potassium iron (III) hexacyanoferrate (II) (90) เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาเป็นสารตัวกลางสำหรับตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ดังกล่าว (89) โดย Prussian blue มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอน (reduction) ของ H_2O_2 ได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า 0.1 V (vs Ag/AgCl) (89, 91) ซึ่งศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงนี้เกิดจากเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ ประมาณ 0 V Prussian blue (PB) ที่อยู่ในรูปของ oxidized form จะรับอิเล็กตรอนเกิดเป็น Prussian white (PW) ซึ่งอยู่ในรูปของ reduced form และในปฏิกิริยาที่มี H_2O_2 เกิดขึ้น PW สามารถให้อิเล็กตรอนแก่ H_2O_2 ทำให้ H_2O_2 เกิดปฏิกิริยา reduction ขึ้นและสลายเป็น OH^- ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังสมการ (92)

$$\underset{\text{Prussian blue}}{Fe_4^{(III)}[Fe^{(II)}(CN)_6]_3} + 4e^- + 4K^+ \longrightarrow \underset{\text{Prussian white}}{K_4Fe_4^{(II)}[Fe^{(II)}(CN)_6]_3} \quad (1)$$

$$\underset{\text{Prussian white}}{K_4Fe_4^{(II)}[Fe^{(II)}(CN)_6]_3} + 2H_2O_2 \longrightarrow \underset{\text{Prussian blue}}{Fe_4^{(III)}[Fe^{(II)}(CN)_6]_3} + 4OH^- + 4K^+ \quad (2)$$

$$H_2O_2 + 2e^- \longrightarrow 2OH^- \quad (3)$$

โดยขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาบนขั้วไฟฟ้าที่ใช้ Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนแสดงดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ H_2O_2 บนขั้วไฟฟ้าที่ใช้ Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (ดัดแปลงจาก (92))

ถึงแม้การใช้ Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่ H_2O_2 ได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาทำเป็น sensor สำหรับตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ของ oxidase เอนไซม์ (93) แต่สารดังกล่าวมีข้อจำกัดในแง่ของความคงตัวเนื่องจาก ในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นด่างความคงตัวของ Prussian blue จะลดลงเนื่องจากในภาวะดังกล่าว OH^- ที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถจับกับ ferric ion ของ Prussian blue เกิดเป็น $Fe(OH)_3$ นำไปสู่การทำลายพันธะของ Fe-CN-Fe ทำให้ Prussian blue ที่ตรึงไว้บนขั้วไฟฟ้าไม่เสถียร (94)

2.6 การนำเทคนิคทางเคมีไฟฟ้ามาใช้ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้ Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน

จากคุณสมบัติของ Prussian blue ในการให้อิเล็กตรอนแก่ H_2O_2 ได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำประมาณ 0 V ซึ่งที่ศักย์ไฟฟ้าดังกล่าวมีการรบกวนจากสารจำพวก ascorbate, bilirubin, urate และสารชีวเคมีตัวอื่นๆได้น้อยมาก จากคุณสมบัตินี้ทำให้ Prussian blue เป็นสารที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมา modified บนขั้วไฟฟ้าและพัฒนาเป็น sensor สำหรับตรวจวัดสารชีวเคมีหลายชนิดที่ทำปฏิกิริยาได้กับเอนไซม์ oxidase (92, 94) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง glucose sensor ที่ใช้หลักการของ glucose oxidase ในการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของกลูโคสและได้สารผลิตภัณฑ์เป็น H_2O_2 ซึ่ง H_2O_2 ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกลูโคสที่มีในตัวอย่างตรวจ การพัฒนา glucose sensor ที่ใช้ Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนได้มีการรายงานครั้งแรกโดย Karyakin และคณะ โดยใช้หลักการ amperometry และใช้ขั้วไฟฟ้าชนิด rotating disk ในการวัดปฏิกิริยา วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์อยู่ที่ 10 – 5 x 10^3 µM (95) สำหรับการตรวจวัดในตัวอย่างที่เป็นซีรั่มได้มีการพัฒนาขึ้นเช่นกันโดยทำการ modified Prussian blue บนขั้วไฟฟ้าชนิดแกรไฟท์และใช้หลักการ amperometry ในการวิเคราะห์วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์อยู่ที่ 5 µM-4.5 mM ซึ่งตัวอย่างที่เป็นซีรั่มต้องทำการเจือจางใน phosphate buffer ในอัตราส่วน 1:50 ก่อนวิเคราะห์และจากการศึกษานี้ พบว่าการวัดปฏิกิริยา โดยติดตามจาก peak ของ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอน ที่ศักย์ไฟฟ้า -50 mV มีความไวในการตรวจวัดกลูโคสสูงกว่าการวัดปฏิกิริยาการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ H_2O_2 ที่ศักย์ไฟฟ้า +900 mV (96) ในส่วนของขั้วไฟฟ้าพิมพ์ลาย (screenprinted electrode) มีการ modified Prussian blue บนขั้วไฟฟ้าชนิดทองคำและแพททินัมและนำมาใช้ในการวิเคราะห์กลูโคสเช่นกัน (97)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood) จำนวน 14 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างเลือดเหลือจากการตรวจวิเคราะห์ของผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ที่เป็นเบาหวาน ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (COA No.175/2555)

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	UV-VIS Spectrophotometer(Evolution600)	Thermo Scientific, USA
2	Biospec 1601 UV-Vis Spectrophotometer	Shimadzu, Japan
3	pH meter	Thermo Scientific, USA
4	Vortex Mixer	FINEPCR, Korea
5	Centrifuge MIKRO200	Germany
6	เครื่องชั่งสาร AG245	METTLER TOLEDO, Switzerland
7	เครื่องผลิตน้ำ MilliQ	Millipore, USA
8	Autoclave	Tomy, USA
9	Electrochemical analyzer(Autolab PGSTAT101)	Metrohm Autolab, Netherlands
10	HotplateIKA® C-MAG HS7	China
11	ThermometerIKA® C-MAG HS7	China
12	Incubator AccuBlock™ Digital Dry Bath	USA
13	Hematocrit centrifuge	Hawksley, England
14	Hematocrit reader (Micro Capillary Reader Cat No. 2201)	International Equipment Co, Neckham Heights, MA

ตารางที่ 3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	Prussian blue Screen printed electrode SPEs 710	DropsensInc, Spain
2	Whatman No.1 filter paper, Whatman blood separation paper VF1, VF2	Whatman International Ltd.,England
3	Duran bottles	SCHOTT DURAN®, Germany
4	Glassware ได้แก่ Erlenmeyer flask, beaker, cylinder	PYREX, USA
5	Volumetric pipette	HBG, Germany
6	Microcentrifuge tube	Axygen® Scientific, USA
7	Auto pipette	Gilson,Inc.,USA
8	Pipette tip (20, 200, 1000 µL)	Gilson,Inc.,USA
9	แม่แบบเหล็กสั่งตัด (Iron molds)	บริษัท ชูธนวาณิช ประเทศไทย
10	กระจกสไลด์ (Glass slide)	Jiangsu, China
11	แท่งแม่เหล็กถาวร Permanent magnates	ร้านศึกษาภัณฑ์พาณิชย์ ประเทศไทย
12	อุปกรณ์ในการจัดเก็บโลหิต ได้แก่ Heparin vacuum tube, EDTA vacuum tube Needle, Syringe	บริษัท กรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด ประเทศไทย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

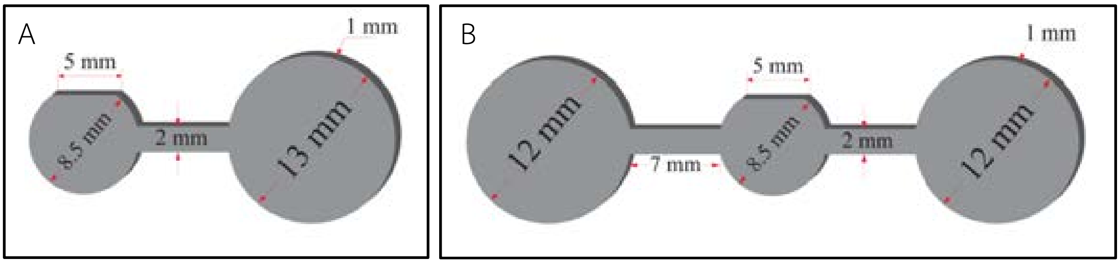
ลำดับที่	**วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย**	**บริษัทและประเทศที่ผลิต**
1	ซีรั่มควบคุมคุณภาพ (Control serum) ชนิด Humatrol N, Humatrol P, Serodose Normal, Serodos Plus Abnormal	HUMAN, Germany
2	Glucose liquicolor	HUMAN, Germany
3	D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, USA
4	Glucose Oxidase from *Aspergillusniger*	Sigma-Aldrich, USA
5	Hemoglobin	Sigma-Aldrich, USA
6	Ascorbic acid	Sigma-Aldrich, USA
7	Uric acid	Sigma-Aldrich, USA
8	30% Hydrogen peroxide	Merck, Germany
9	Potassium dihydrogen phosphate	Merck, Germany
10	Di-potassium hydrogen phosphate	Merck, Germany
11	Potassium Chloride	Merck, Germany
12	Billirubin	Merck, Germany
13	White beeswax	ร้านศึกษาภัณฑ์พาณิชย์ ประเทศไทย

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Paper-based microfluidic analytical devices, µPADs)

3.1.1 การออกแบบ แม่แบบเหล็กสำหรับนำมาใช้สร้างµPADs

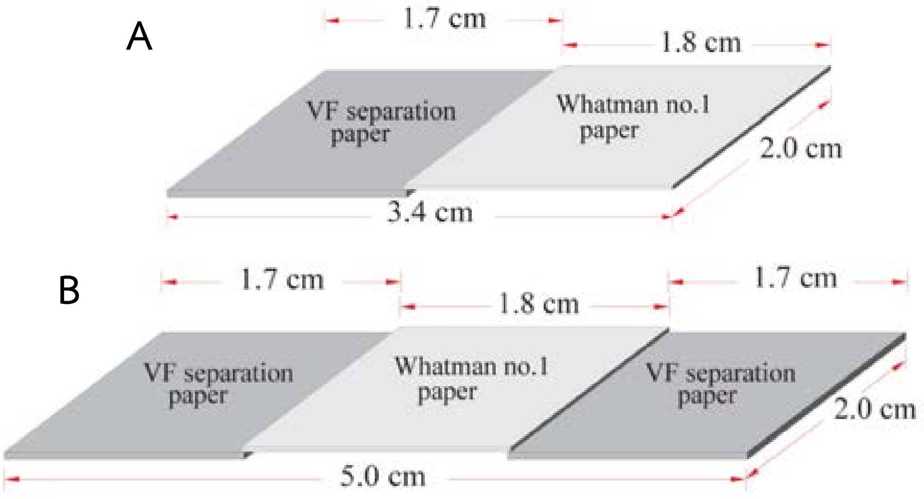
ในขั้นตอนการออกแบบแม่แบบเหล็กเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ใช้โปรแกรม Microsoft office Powerpoint 2007 สำหรับออกแบบรูปร่างและขนาดของท่อ แบบเหล็กที่นำมาใช้ในการศึกษามี 2 ลักษณะด้วยกัน โดยทั้งสองแบบนั้นต่างกันที่บริเวณสำหรับใส่ตัวอย่างจากเลือดครบส่วน ในส่วนของแบบที่ 1 บริเวณดังกล่าวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตรและใส่ตัวอย่างเลือดได้เพียงด้านเดียว แบบที่ 2 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตรและมีบริเวณสำหรับใส่ตัวอย่างเลือด 2 ด้าน ส่วนของท่อและส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดออกแบบเหมือนกันโดยความยาวของท่อจากบริเวณที่ใช้แยกเลือดมายังบริเวณตรวจวัดมีความยาว 7 มิลลิเมตรกว้าง 2 มิลลิเมตร บริเวณสำหรับตรวจวัดออกแบบให้มีลักษณะเป็นรูปวงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 มิลลิเมตรและตัดปลายด้านบนซึ่งพื้นที่บริเวณดังกล่าวพอดีกับขั้วไฟฟ้าที่นำมาใช้งาน ลักษณะของแบบเหล็กแสดงดังภาพที่ 3.1 แบบเหล็กที่ได้ทำการออกแบบแล้วตัดโดยใช้เครื่องตัดชนิดเลเซอร์ของบริษัทชูธนวานิช จำกัด หลังจากได้แม่แบบเหล็กที่ต้องการแล้วนำแม่แบบเหล็กที่ได้มาใช้ในการสร้าง µPADs โดยใช้เทคนิค wax dipping ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3.1แสดงขนาดและลักษณะของแม่แบบเหล็กที่นำมาใช้ในการศึกษา (a) แม่แบบเหล็กที่ใส่ตัวอย่างเลือดได้เพียงด้านเดียว (b) แม่แบบเหล็กที่ใส่ตัวอย่างเลือดได้ 2 ด้าน

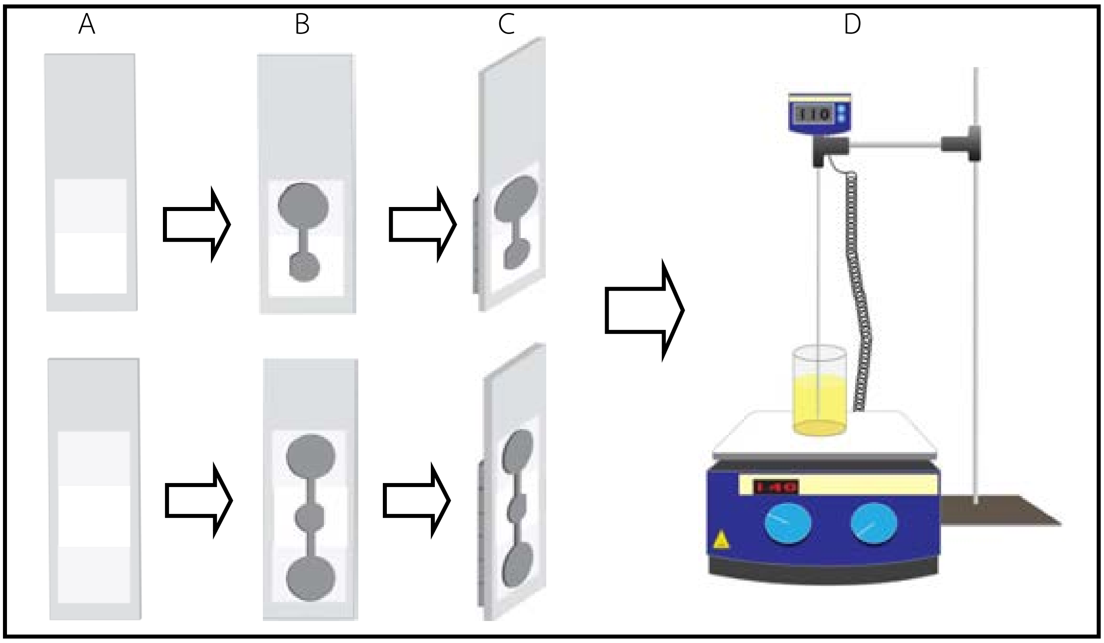
3.1.2 ขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้เทคนิค wax dipping

ในการสร้าง μPADs นั้นใช้กระดาษ 2 ชนิดด้วยกันคือกระดาษกรอง Whatman no.1 และกระดาษแยกเลือด Whatman VF1 และ VF2 โดยกระดาษแยกเลือดทั้ง 2 มีความหนาและผลิตจากวัสดุที่ต่างกันโดย VF1 มีความหนา 632 ไมโครเมตรและเป็นกระดาษชนิด binder-free glass fiber filter ส่วน VF2 มีความหนา 785 ไมโครเมตรและเป็นกระดาษชนิด polyvinyl alcohol-bound glass fiber จากนั้นตัดกระดาษกรอง Whatman no.1 ให้มีขนาด 1.8 x 2.0 เซนติเมตร และกระดาษสำหรับแยกเลือดตัดให้มีขนาด 1.7 x 2.0 เซนติเมตร แล้วนำกระดาษทั้ง 2 ชนิดมาเรียงซ้อนกันบนกระจกสไลด์ โดยวางกระดาษกรองWhatman no.1 ไว้ด้านบนของกระดาษแยกเลือดทั้ง 2 ชนิดซึ่งบริเวณที่ซ้อนทับเหลื่อมกันประมาณ 1 มิลลิเมตร แสดงดังภาพที่ 3.2



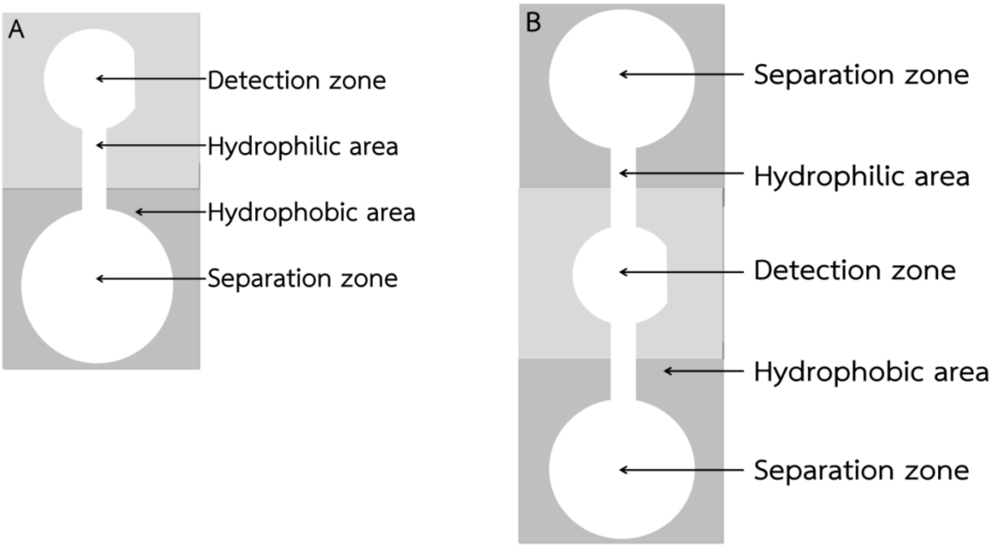
ภาพที่ 3.2 แสดงขนาดและการจัดเรียงกระดาษสำหรับนำมาใช้ในการสร้าง μPADs โดยใช้เทคนิค wax-dipping (a) ลักษณะการจัดเรียงกระดาษสำหรับการแยกเลือดด้านเดียว (b) ลักษณะการจัดเรียงกระดาษสำหรับการแยกเลือดทั้ง 2 ด้าน

หลังจากที่จัดเรียงกระดาษบนแผ่นกระจกสไลด์แล้ว นำแบบเหล็กวางที่ด้านบนของกระดาษและอีกด้านหนึ่งของกระจกสไลด์ประกบด้วยแม่เหล็ก ทำให้เกิดการดูดกันระหว่างแบบเหล็กกับแม่เหล็ก จากนั้นนำแผ่นกระจกสไลด์ดังกล่าวไปจุ่มลงในแว๊กซ์ที่กำลังหลอมละลายที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียสสำหรับกระดาษชนิด VF1 และ 105-130 สำหรับกระดาษชนิด VF2 เป็นเวลา 1 วินาทีขั้นตอนการสร้าง μPADs แสดงดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยใช้เทคนิค wax-dipping (a) ด้านบนของกระจกสไลด์วางด้วยกระดาษแยกเลือด (VF blood separation) ซ้อนทับด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) (b) วางแบบเหล็กที่ด้านบนของกระดาษ (c) ด้านหลังของกระจกสไลด์ประกบด้วยแม่เหล็กทำให้เกิดแรงดูดระหว่างแบบเหล็กและแม่เหล็ก (d) จุ่มชิ้นส่วนที่ประกอบขึ้นลงในแว๊กซ์ที่หลอมละลาย

ลักษณะของ μPADs แบ่งออกเป็นส่วนสำหรับแยกเลือดและส่วนสำหรับวัดปฏิกิริยาแสดงแสดงดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 แสดงลักษณะแบบจำลองของ μPADsที่สร้างได้ (a) แบบจำลองของ μPADs สำหรับแยกเลือดด้านเดียว (b) แบบจำลองของ μPADs สำหรับแยกเลือดสองด้าน

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ μPADs ในการแยกเลือด

3.2.1 การทดสอบปริมาณเลือดที่เหมาะสมและระยะเวลาที่ใช้ในการแยกเลือด

นำμPADsที่เตรียมได้ทั้ง 4 แบบ คือ VF1- μPADs, VF2- μPADs สำหรับแยกเลือดด้านเดียว และ VF1- μPADs, VF2- μPADs สำหรับแยกเลือดสองด้าน มาทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดจากตัวอย่างเลือดครบส่วนของคนปกติโดย VF1- μPADs, VF2- μPADs สำหรับแยกเลือดด้านเดียวทดสอบโดยใช้ปริมาตรเลือดตั้งแต่ 120, 130, 140, 150, 160และ 170 μLตามลำดับและ VF1- μPADs, VF2- μPADs สำหรับแยกเลือดสองด้านใช้ปริมาณเลือดตั้งแต่ 150, 180, 200, 230, 250, 280 และ300 μLตามลำดับเติมลงในส่วนของกระดาษแยกเลือด (separation zone) แล้วจับเวลาที่ใช้ในการแยกพลาสมาออกจากเลือดครบส่วน โดยปริมาณเลือดครบส่วนที่เหมาะสมนั้นต้องแยกพลาสมาออกจากเลือดครบได้เต็มบริเวณที่ใช้สำหรับตรวจวัด (detection zone) พอดีและไม่มีเลือดครบส่วนที่ไม่แยกเหลืออยู่ในบริเวณของ separation zone

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการแยกเลือดที่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%hematocrit) ที่ต่างกัน

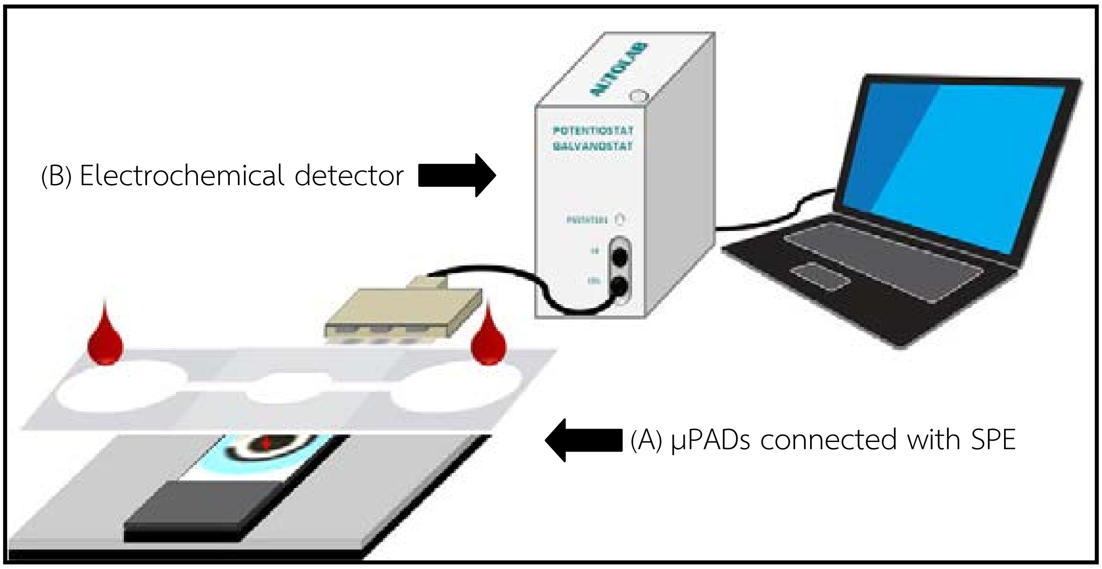
โดยนำ μPADs แบบที่เลือกและปริมาณเลือดที่เหมาะสมในขั้นตอนที่ 3.3.1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดที่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%hematocrit) ที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% และ 60% ตามลำดับ ซึ่ง μPADs ที่เลือกมาใช้ต้องแยกเลือดครบส่วนได้ทั้งที่ %hematocrit ต่ำกว่าค่าปกติ, ค่าปกติ และสูงกว่าค่าปกติ

3.3 การติดตั้ง μPADs เข้ากับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนด้วยคือส่วนของ μPADs ที่ต่อเชื่อมกับscreen printed electrode (SPE) โดย electrode ที่ใช้วางในแนวระนาบบนฐานที่สร้างจากแผ่นเหล็กชนิดบางที่มีขนาด 2.5 x 1.0 เซนติเมตรและใช้แม่เหล็กเป็นตัวยึด electrode ไว้กับฐาน ในส่วนของ μPADs วางที่ด้านบนของ electrode โดยให้ส่วนของ detection zone ของμPADs พอดีกับขั้วไฟฟ้าและใช้กระดาษกาว 2 หน้าแบบบางในการยึดμPADs เข้ากับ electrode อีกส่วนหนึ่งคือส่วนของ electrochemical detector ที่ต่อเชื่อมเข้ากับขั้วไฟฟ้าซึ่งเป็นเครื่องมือสำหรับให้

สัญญาณไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าและวัดค่าทางสัญญาณไฟฟ้าที่เกิดขึ้น โดยในการวัดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้านั้นใช้โปรแกรม NOVA1.7 ในการประมวลผลสัญญาณที่วัดได้

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่ต่อเชื่อมกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้านั้น ในงานวิจัยนี้ได้เรียกว่า “Electrochemical paper-based analytical devices”หรือ ePADs ลักษณะของ ePADs ที่สร้างขึ้น แสดงดังภาพที่ 3.5



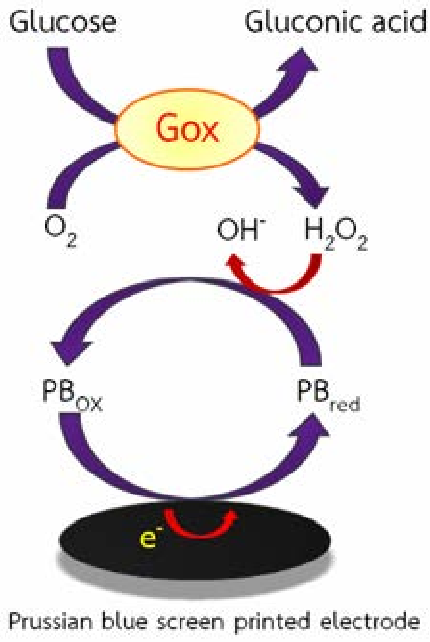
ภาพที่ 3.5 แสดงการติดตั้ง Electrochemical paper-based analytical devices (ePADs) (a) แสดงวิธีการประกอบ μPADs ที่ใช้สำหรับแยกเลือดครบส่วนเข้ากับขั้วไฟฟ้าสำหรับใช้งาน (b) อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าที่ต่อเชื่อมกับขั้วไฟฟ้าและต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผล

3.4 วิธีการตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนบน ePADs

การตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนบน ePADs นั้นเมื่อหยดเลือดครบส่วนลงบนส่วนของ separation zone พลาสมาสามารถแยกออกจากเม็ดเลือดแดงได้โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ช่วยจากภายนอกและเมื่อพลาสมาซึ่งมีกลูโคสอยู่ไหลมาผสมกับ glucose oxidase เอนไซม์ที่ตรึงไว้ที่บริเวณ detection zone สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่มี O_2 และ H_2O และเกิดสารผลิตภัณฑ์เป็น gluconic acid และ H_2O_2 ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ดังสมการ

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose Oxidase}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2$$

H_2O_2 ที่เกิดขึ้นสามารถรับอิเล็กตรอนได้ โดยใช้ Prussian Blue (PB) เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมแก่ขั้วไฟฟ้า Prussian blue ซึ่งอยู่ในรูปของ oxidized form จะเปลี่ยนเป็นรูปของ reduced form ในสภาวะนี้ Prussian blue สามารถให้อิเล็กตรอนแก่ H_2O_2 ทำให้ H_2O_2 สลายเป็น OH^- (93) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพที่ 3.6



ภาพที่ 3.6 แสดงขั้นตอนการเกิด reduction ของ H_2O_2โดยมี Prussian Blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (ดัดแปลงจาก (98))

3.5 การเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

การตรวจวัดปริมาณกลูโคสจากเลือดครบส่วนบน ePADs ได้ทำการเทียบกับวิธี Enzymatic colorimetric โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป Glucose liquid color ของบริษัท Human ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ทางห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดสอบตามเอกสารกำกับน้ำยาของทางบริษัท คือ ใช้ปริมาณน้ำยา 1 mL กับสิ่งตัวอย่าง 10 µL ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}Cเป็นเวลา 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Evolution 600 และ Shimadzu UV1601) และใช้น้ำยาเป็น blank คำนวณความเข้มข้นของกลูโคสกับค่ากลูโคสมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้วจากสูตร

Unknown concentration = Au/As x Cs

Au คือค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งตัวอย่าง

As คือค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

Cs คือความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน

และในการทดสอบทุกครั้งได้ทำการตรวจวัดสารควบคุมคุณภาพทั้ง 2 ระดับควบคู่ไปด้วยเพื่อควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ โดยปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสแสดงดังสมการ

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2 \qquad (1)$$

$$2H_2O_2 + \text{4-aminophenazone} + \text{phenol} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{quinoneimine} + 4H_2O \qquad (2)$$

3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนบน ePADs

3.6.1 ทดสอบหาช่วงค่าความต่างศักย์ที่เหมาะสม

การเลือกศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า เป็นสิ่งที่สำคัญอย่างมาก เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการให้และรับอิเล็กตรอนที่ศักย์ไฟฟ้าต่างกัน ซึ่งถ้าใช้ศักย์ไฟฟ้าไม่ถูกต้องจะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ผิดพลาดได้ โดยทั่วไปแล้วสารพื้นฐานสำหรับการตรวจวัดบนขั้วไฟฟ้าพื้นฐานจะมีค่าศักย์ไฟฟ้าที่กำหนดไว้แล้ว แต่ในการพัฒนาวิธีขึ้นมาใหม่นั้นควรทำการหาค่าศักย์ไฟฟ้าของสารที่ต้องการศึกษาถึงแม้มีการรายงานค่าศักย์ไฟฟ้าของสารนั้นไว้แล้วก็ตาม ซึ่งเทคนิคที่นำมาใช้ในการหาช่วงค่าความต่างศักย์ที่เหมาะสมคือ cyclic voltammetry โดยให้ช่วงความต่างศักย์แก่ขั้วไฟฟ้าและติดตามกระแสที่เกิดขึ้น ในงานวิจัยนี้หาช่วงค่าความต่างศักย์ที่เหมาะสมสำหรับ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 โดยการทำ cyclic voltammetry ใช้ความต่างศักย์ตั้งแต่ -0.4 V ถึง 0.4 V และใช้อัตราเร็วในการสแกน (scan rate) ที่ 50 mV/s เพื่อหาตำแหน่ง peak ของกระแสของปฏิกิริยา สารที่ใช้สำหรับทำ cyclic voltammetry มีดังนี้คือ

1. 0.1 M potassium phosphate buffer pH6.0 สำหรับเป็น blank ของปฏิกิริยา
2. 5 mM H_2O_2 ใน 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.0 สำหรับเป็นตัวแทนของสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการศึกษา
3. 5 mM glucose/glucose oxidase 645 KU/L ปริมาณ 5 µL (ตรึงไว้บนบริเวณสำหรับตรวจวัด) สำหรับยืนยันปฏิกิริยา

โดยในการทดสอบทำการหยดสารทั้งหมดลงในส่วนของกระดาษแยกเลือดเมื่อสารไหลไปจนเต็มส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดจับเวลา 5 นาทีแล้วให้ความต่างศักย์แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งานและติดตาม peak ของกระแสที่เกิดขึ้น

3.6.2 ทดสอบปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการวัดปฏิกิริยา

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ปฏิกิริยาการตรวจวัดเกิดขึ้นได้ดีคือ ประสิทธิภาพของ glucose oxidase เอนไซม์ที่ตรึงลงบน ePADs บริเวณส่วนของ detection zone โดย Activity ของเอนไซม์ที่นำมาใช้นั้นอ้างอิงจากงานวิจัยที่เคยพัฒนาสำหรับการตรวจวัดบน µPADs ทั้งปฏิกิริยาการวัดสีและการวัดทางเคมีไฟฟ้าคือ Activity ที่ 645 KU/L (21, 37) แต่ในส่วนของปริมาณที่ตรึงลงบน µPADs นั้นจะแตกต่างกันขึ้นกับลักษณะของ ePAD ที่ออกแบบขึ้น ได้ทำการทดสอบโดยตรึงเอนไซม์ตั้งแต่ปริมาณ 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 µL ตามลำดับ จากนั้นจากนั้นเติมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 5 mM ลงในส่วนของ separation zone เมื่อสารไหลไปจนเต็มส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัด จับเวลา 5 นาทีแล้วให้ความต่างศักย์แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งานและติดตาม peak ของกระแสที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry ซึ่งปริมาณน้ำยาที่เหมาะสมนั้นต้องให้ peak ของกระแสสูงที่สุด

3.6.3 ทดสอบหาค่าความต่างศักย์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดจากตัวอย่างเลือดครบส่วน

จากการทำ cyclic voltammetry ของสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการวิเคราะห์ (H_2O_2) จะได้ช่วงค่าความต่างศักย์ที่เหมาะสมสำหรับ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 เพื่อเป็นการยืนยันว่าศักย์ไฟฟ้าที่เลือกมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้อง จำเพาะต่อ H_2O_2 และมีสารรบกวนในการตรวจวัดน้อยที่สุดในตัวอย่างตรวจที่เป็นเลือดครบส่วน จึงทำการทดสอบ hydrodynamic voltammetry โดยเลือกศักย์ไฟฟ้า 5 ค่าที่ครอบคลุมช่วงที่เกิด peak ของ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 ทำการทดสอบโดยทำการตรึง glucose oxidase 645 KU/L 5 µL บน ePADs และ ใช้ phosphate buffer สำหรับวัด background ของปฏิกิริยา ใช้กลูโคสจากเลือดครบส่วนเป็นตัวแทนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตัวอย่างทั้งหมดเติมลงในส่วนของ separation zone เมื่อบัฟเฟอร์หรือพลาสมาไหลเต็มส่วนของ detection zone จับเวลาต่ออีก 5 นาทีแล้วให้ความต่างศักย์คงที่แก่ขั้วไฟฟ้าเป็นเวลา 200 วินาที

ทำแบบเดียวกันจนครบ 5 ค่าของความต่างศักย์ จากนั้นเลือกเวลาที่นำมาใช้สำหรับวัดกระแสโดยเวลาที่เลือกนั้นเป็นเวลาที่สารที่เราสนใจถึง steady state และมีการเปลี่ยนแปลงของกระแสที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด ทำการเปรียบเทียบค่าของกระแสที่วัดได้กับ background (signal to background ratio) เลือกค่าความต่างศักย์ที่ให้ค่ากระแสของสารที่ต้องการตรวจวัดสูงสุดและให้สัญญาณของ background น้อยสุดมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.6.4 ทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดจริงในตัวอย่างเลือดครบส่วน

เนื่องจากในการวิเคราะห์ระดับกลูโคสใช้หลักการ Enzymatic ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาส่งผลทั้งในส่วนของการเกิดและการสลายตัวของ H_2O_2 ในการหาระยะเวลาที่เหมาะสมนั้นทำการทดสอบโดยจับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาหลังจากแยกพลาสมาจากเลือดครบส่วนได้เต็มในส่วนของ detection zone โดยเริ่มจับเวลาตั้งแต่ 60, 150, 300, 450 และ 600 วินาที ตามลำดับ แล้วให้ความต่างศักย์ที่เหมาะสมแก่ขั้วไฟฟ้าเป็นเวลา 200 วินาที เลือกระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับวัดปฏิกิริยาโดยดูจากกราฟ chronoamperogram ที่เกิดขึ้น

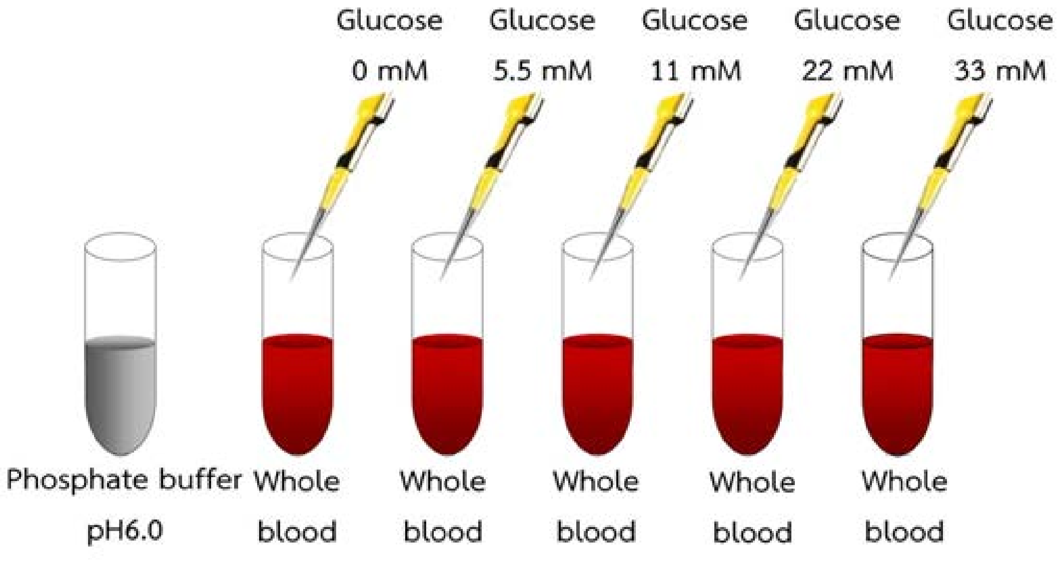
3.6.5 ทดสอบหา pH ที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดจริงในตัวอย่างเลือดครบส่วน

pH ของสารสะลายที่นำมาใช้ในการศึกษามีผลทั้งในส่วนของการทำงานของเอนไซม์ glucose oxidase เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวทำงานได้ดีที่ pH ในช่วง 4-7 (99) นอกจากนั้น Prussian blue ที่นำมาใช้เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนทำงานได้ดีในสภาวะที่ pH เป็นกรด (pHน้อยกว่า 7) (93) เนื่องจากที่ pH เป็นกลางหรือเป็นด่าง ความไวในการตรวจวัดและความคงตัวของสารดังกล่าวจะลดลง (90) โดยในการศึกษานี้เตรียม glucose oxidase 645 KU/L ในสารละลาย phosphate buffer ที่ pH แตกต่างกันตั้งแต่ pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 ตามลำดับ แล้วตรึงบน detection zone ของ ePADs จากนั้นนำตัวอย่างเลือดครบส่วนที่มีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากันเติมลงในส่วนของ separation zone เมื่อพลาสมาแยกและไหลไปเต็มส่วน detection zone แล้วจับเวลาและวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค chronoamperometry

3.7 การศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterization)

3.7.1 ทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)

ในการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดระดับกลูโคสนั้น จะทำการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนที่เติมสารสะลายกลูโคสมาตรฐานลงไปความเข้มข้นของสารละลายที่เติมลงไป คือ 0, 5.5, 11, 22 และ 33 mM ซึ่งทุกความเข้มข้นที่เติมลงไปนั้นจะเติมสารละลายในปริมาณที่เท่ากัน ส่วน blank ของปฏิกิริยานั้นใช้ phosphate buffer เป็นตัวแทนของกลูโคสความเข้มข้น 0 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง mix เลือดเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นแบ่งตัวอย่างที่เตรียมออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปปั่นแยกพลาสมาที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีและนำไปตรวจวัดระดับกลูโคสโดยใช้น้ำยา Glucose liquid color และใช้เครื่อง spectrophotometer ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกส่วนหนึ่งนำมาวัดปริมาณกลูโคสด้วย ePADs โดยใช้เทคนิค chronoamperometry ในแต่ละความเข้มข้นจะทำการตรวจวัดซ้ำกัน 3 ครั้ง ขั้นตอนในการเตรียมเลือดครบส่วนสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานแสดงดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.7 แสดงขั้นตอนการเตรียมเลือดครบส่วนสำหรับทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรงบน ePADs

3.7.2 ทดสอบหาค่า limit of detection (LOD)

การทดสอบหาค่า limit of detection เป็นการทดสอบหาค่าต่ำสุดที่วัดได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยถ้าวิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่มี limit of detection ต่ำๆ จะสามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยๆได้ดีหรือมีความไวมาก โดยทำการทดสอบวัด blank ของปฏิกิริยา 10 ครั้งซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ phosphate buffer เป็น blank นำค่าที่ตรวจวัดได้มาคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และนำมาหาค่า limit of detection จากสูตร Limit of detection = 3.SD/S (SD คือ standard deviations) ที่ได้จากการวัด blank 10 ครั้งและ S คือ sensitivity ซึ่งหาได้จากค่าความชันจากการทำกราฟมาตรฐาน)

3.7.3 ทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)

เป็นการทดสอบว่าสารชีวเคมีที่มีอยู่ในเลือดครบส่วนว่ามีชนิดใดที่มีผลต่อการตรวจวัดระดับกลูโคสในเลือดครบส่วน โดยนำสารที่อาจพบได้ในเลือดครบส่วน เช่น bilirubin, hemoglobin, ascorbic acid และ uric acid เป็นต้น ในขั้นตอนการทดสอบสารรบกวนนั้นทำการการทดสอบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยนำช่วงที่รบกวนการตรวจวัดโดยวิธีมาตรฐานมาทดสอบกับ ePADs ดังนี้ bilirubin ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 16, 18 และ 20 mg/dL, hemoglobin ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 100, 300, 400 และ 500 mg/dL, ascorbic acid ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น1, 2, 3 และ 4 mg/dl และ uric acid ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 mg/dL ตามลำดับ เติมสารรบกวนแต่ละความเข้มข้นลงในตัวอย่างเลือดครบส่วนซึ่งปริมาณของสารรบกวนที่เติมต้องเท่ากันทุกตัวอย่าง จากนั้นทำการวัดกระแสที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค chronoamperometry เทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารรบกวน แล้วนำมาคำนวณหา %Recovery เปรียบเทียบกระแสของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลังจากเติมสารรบกวนลงในตัวอย่างเลือดสูตรที่ใช้สำหรับคำนวณคือ %Recovery = (ค่ากระแสที่วัดได้หลังเติมสารรบกวน/ค่ากระแสที่วัดได้ก่อนเติมสารรบกวน) x 100

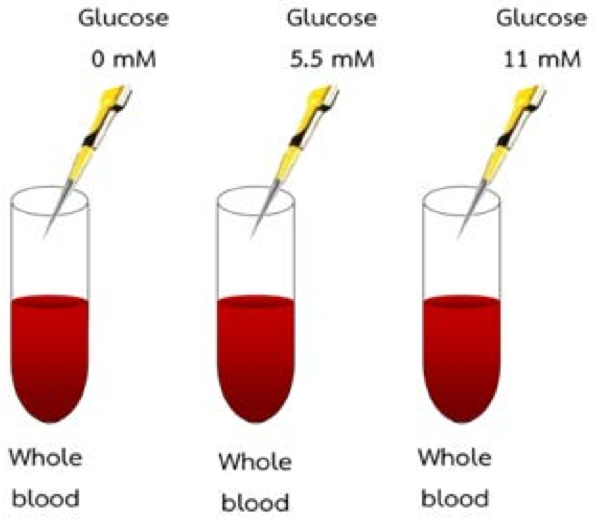
3.7.4 การศึกษาค่า precision

เป็นการทดสอบเพื่อหาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์โดยทำการตรวจวัดระดับกลูโคสในเลือดครบส่วน 3 ความเข้มข้นที่ค่าต่ำ, กลางและสูงกว่าค่าปกติมาทดสอบวัดกระแสที่เกิดจากปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค chronoamperometry จำนวนอย่างน้อย 20 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), และหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) จากสูตร %CV = (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน/ค่าเฉลี่ย) x 100

3.8 การตรวจวัดปริมาณกลูโคสจากตัวอย่างเลือดจริง

ถ้าไม่กล่าวเป็นอย่างอื่น สภาวะที่ใช้ตรวจวัดจากตัวอย่างเลือดจริงใช้สภาวะต่างๆ ดังนี้ ใช้ VF2-μPADs สำหรับแยกเลือด 2 ด้านโดยใช้ปริมาตรเลือด 250 μL ในการแยกพลาสมาออกจากเลือดครบส่วนและใช้ปริมาณเอนไซม์ 645 KU/L, 5 μL ตรึงบนส่วนของ detection zone ในส่วนของการวัดปฏิกิริยานั้นใช้เทคนิค chronoamperometry โดยให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ ที่ -0.10 V เป็นเวลา 200 วินาทีและติดตามกระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ที่วินาทีที่ 150

ซึ่งในการตรวจวัดได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี standard addition (100) ใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนเก็บที่จากกลุ่มประชากรซึ่งเป็นทั้งในคนปกติและผู้ที่เป็นเบาหวาน ตัวอย่างที่ได้แบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 เติมกลูโคส 0 mM โดยใช้ phosphate buffer, ส่วนที่ 2 เติมกลูโคส 5.5 mM และส่วนที่ 3 เติมกลูโคส 11 mM ขั้นตอนในการเตรียมแสดงดังภาพที่ 3.8



ภาพที่ 3.8 แสดงขั้นตอนการเตรียมเลือดครบส่วนสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคสบน ePADs โดยใช้วิธี standard addition

จากนั้นนำตัวอย่างเลือดครบส่วนที่เตรียมได้มาวัดปฏิกิริยาบน ePADs โดยใช้หลักการ chronoamperometry ซึ่งกระแสที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นนั้นเมื่อนำไปพลอตกราฟโดยให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่เติมลงไปในขณะที่แกน y เป็นค่ากระแสที่วัดได้เมื่อลากเส้นกราฟผ่านแกน y ไปตัดแกน x ที่จุดตัดแกน x คือค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอยู่จริงในตัวอย่างตรวจ (101) ผลการตรวจวัดที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ซึ่งการตรวจวัดระดับกลูโคสนั้นจะใช้หลักการของ Enzyme colorimetric assay (Glucose liquid color) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Evolution 600 และ Shimadzu UV1601) ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง นำมาหาความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธีโดยใช้สถิติ Pair sample T-test, Bland and Altman plot (102) และ Passing–bablok regression (103) และทดสอบความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า correlation coefficient โดยใช้โปรแกรม Sigmaplot

บทที่ 4

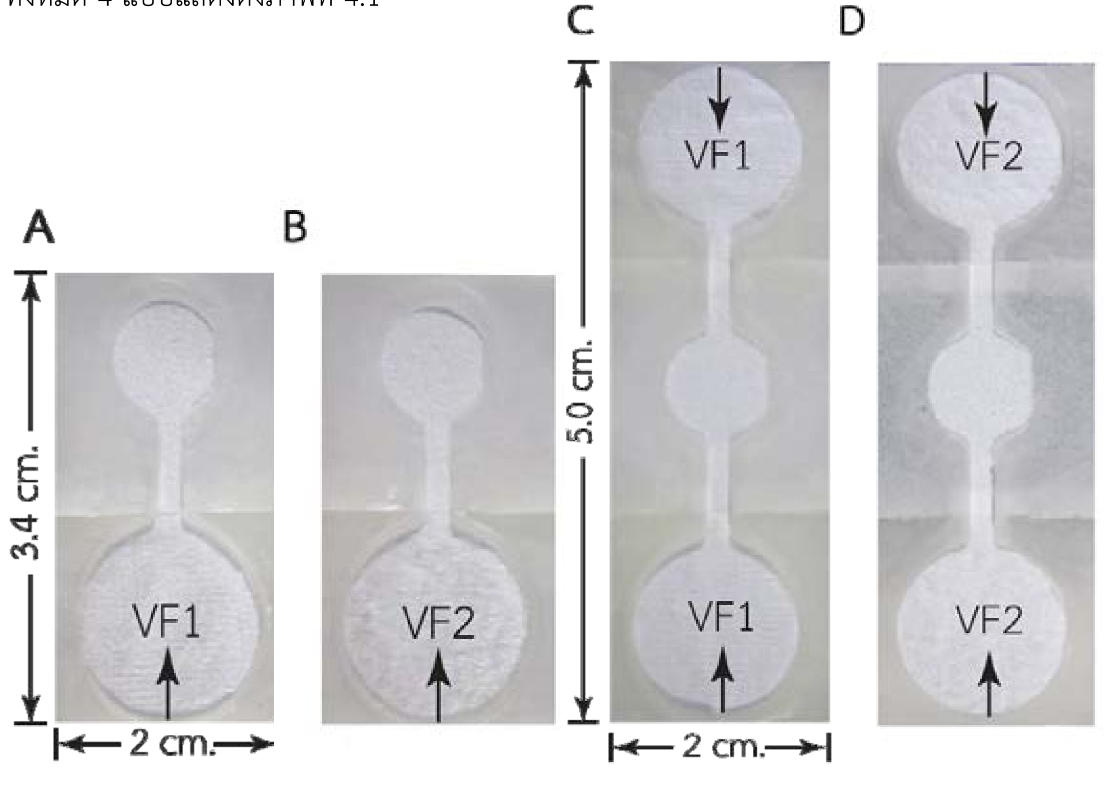
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ μPADs ที่พัฒนาขึ้นในการแยกเลือดครบส่วน

1.1 รูปแบบของ μPADs ที่พัฒนาขึ้น

ลักษณะของ μPADs ที่พัฒนาขึ้นมีทั้งหมด 2 แบบด้วยกันและสร้างจากกระดาษแยกเลือด 2 ชนิดคือกระดาษแยกเลือดชนิด VF1 และกระดาษแยกเลือดชนิด VF2 ทำให้ได้ μPADs ที่ต่างกันทั้งหมด 4 แบบแสดงดังภาพที่ 4.1

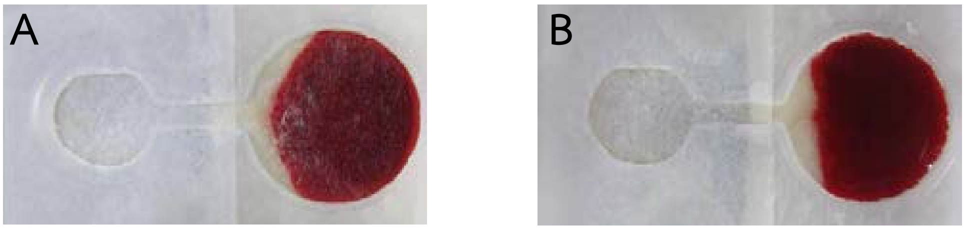


ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของ μPADs ที่เตรียมได้ทั้ง 4 แบบ ตำแหน่งลูกศรชี้คือบริเวณที่ใช้เติมเลือดครบส่วนสำหรับแยกเลือด (a) VF1- μPADs สำหรับแยกเลือดด้านเดียว (b) VF2- μPADs สำหรับแยกเลือดด้านเดียว (c) VF1- μPADs สำหรับแยกเลือดสองด้าน (d) VF2- μPADs สำหรับแยกเลือดสองด้าน

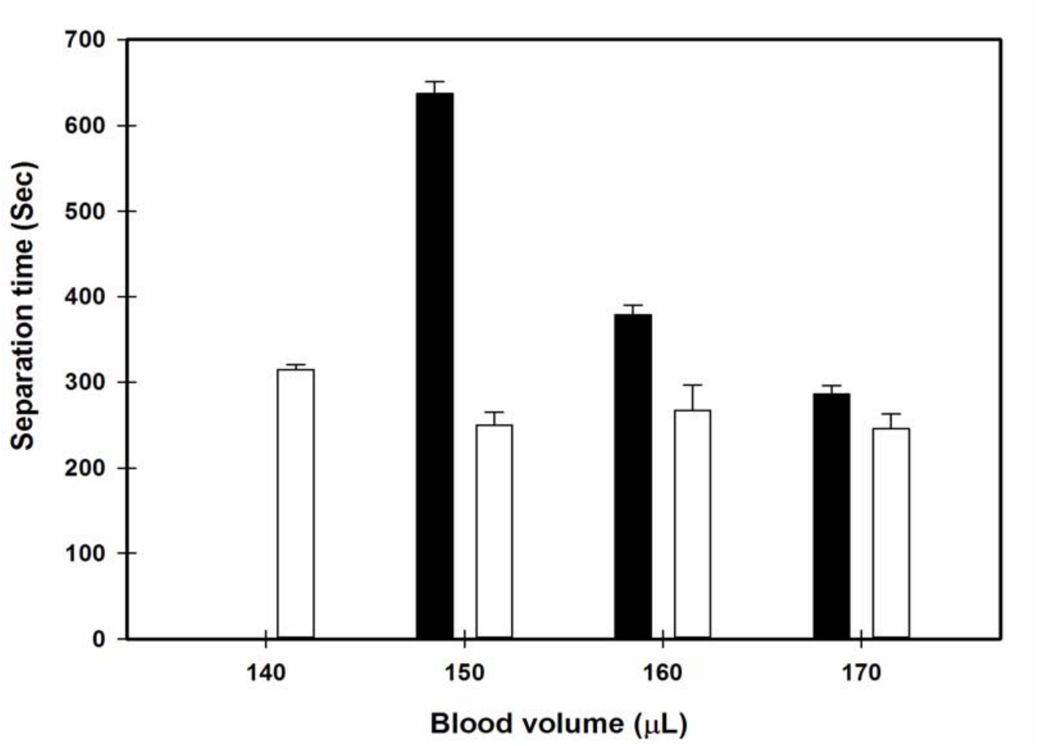
1.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดของ μPADs

ในการพัฒนา μPADs สำหรับนำมาใช้ในการแยกเลือดครบส่วนนั้น ปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ μPADs ที่พัฒนาขึ้นต้องแยกพลาสมาออกจากเลือดครบส่วนได้ภายในระยะเวลาที่สั้นและใช้ปริมาณเลือดครบส่วนน้อยที่สุด จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดเพื่อที่จะเลือก μPADs ที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป การทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดของ μPADs ที่สร้างได้ทั้ง 4 แบบ โดยใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนของคนปกติในการทดสอบสำหรับ VF1- μPADs และ VF2- μPADs ที่แยกเลือดด้านเดียว ทดสอบโดยใช้ปริมาณเลือดตั้งแต่ 120, 130, 140, 150, 160, 170 μLตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม การใช้ปริมาตรเลือด 120 ถึง 130 μL ไม่เพียงพอสำหรับใช้กับ μPADs ทั้ง 2 แบบ เนื่องจากไม่สามารถแยกพลาสมามาได้เต็มส่วนของ detection zone (ไม่ได้แสดงภาพ) กรณี VF1- μPADs เมื่อใช้เลือดปริมาตร 150 μL สามารถแยกพลาสมามาได้เต็มบริเวณ detection zone ใช้ระยะเวลาเฉลี่ยในการแยกอยู่ที่ 10.37 ± 0.14 นาทีและเมื่อใช้ปริมาณเลือดเพิ่มขึ้นระยะเวลาในการแยกจะลดลง เมื่อใช้ปริมาตรเลือด 170 μL สามารถแยกพลาสมาภายในเวลา 4.46 ± 0.10นาที กรณี VF2- μPADs เมื่อใช้เลือดปริมาตร 140 μL สามารถแยกเลือดครบส่วนได้เต็มส่วนของ detection zone พอดี โดยใช้เวลาในการแยกอยู่ที่ 5.15 ± 0.06 นาที และเมื่อเพิ่มปริมาตรเลือดเป็น 150, 160 และ 170 μL จะใช้เวลาในการแยกเลือดไม่ต่างกันคือ 4.10 ± 0.15, 4.27 ± 0.30 และ 4.06 ± 0.17 นาทีตามลำดับ และจากการทดลองพบว่า VF1- μPADs ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ separation zone 13 มิลลิเมตร สามารถรองรับปริมาตรเลือดได้สูงสุด 170 μL ส่วน VF2- μPADs รองรับได้สูงสุด 160 μL ลักษณะของพลาสมาที่แยกได้โดยใช้ VF1- μPADs และ VF2- μPADs แสดงดังภาพที่ 4.2 และผลการทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดแสดงดังภาพที่ 4.3

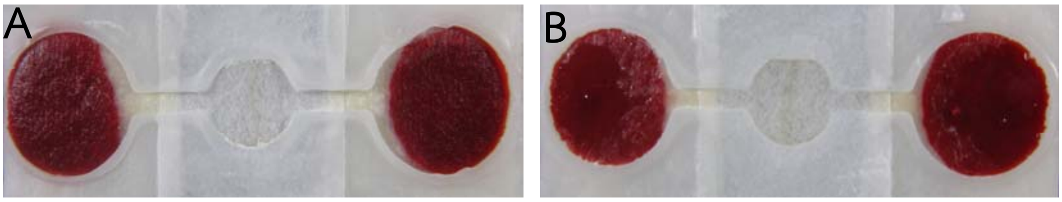


ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะของพลาสมาที่แยกได้จาก μPADs ที่แยกเลือดด้านเดียว (a) VF1- μPADs ปริมาตรเลือด 150 μL (b) VF2- μPADs ปริมาตรเลือด 150 μL

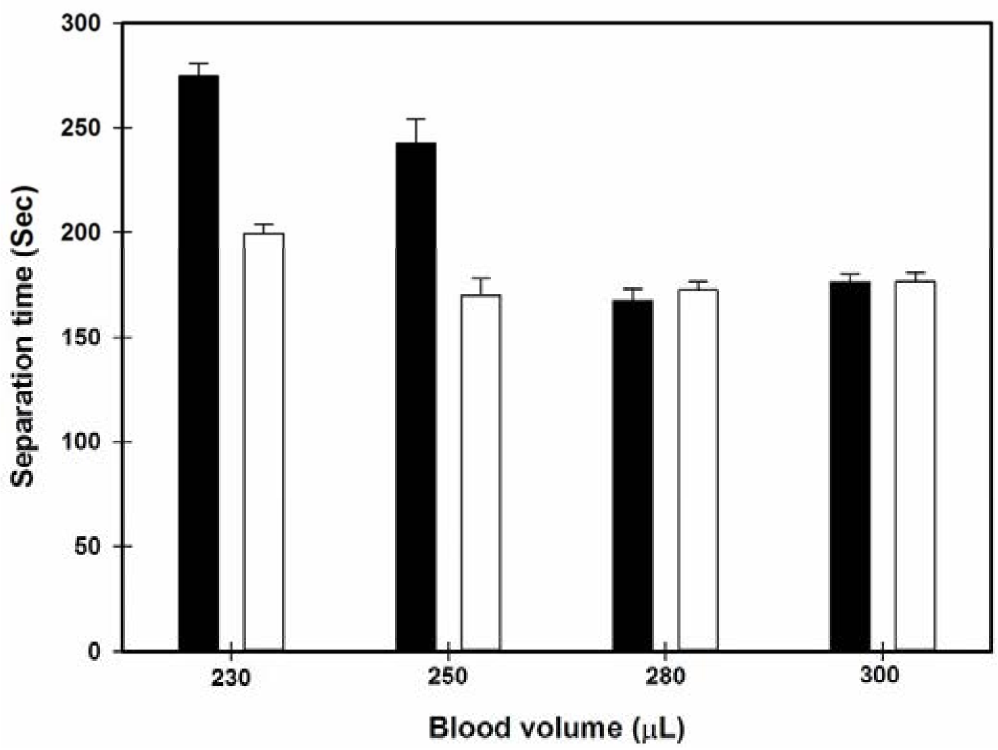


ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรเลือดกับระยะเวลาในการแยกของ μPADs ชนิดแยกเลือดด้านเดียว (■ VF1- μPADs, □ VF2- μPADs)

ในขณะที่ μPADs สำหรับแยกเลือดสองด้านหรือแบบรูปดัมเบล ที่ใช้ปริมาตรเลือดรวมเป็น 150, 180, 200, 230, 250, 280 และ 300 μL ตามลำดับ โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดพบว่าที่ปริมาตรเลือด 150 ถึง 200 μL ทั้ง VF1- μPADs และ VF2- μPADs ไม่สามารถแยกพลาสมาได้เต็มส่วนของ detection zone ปริมาตรต่ำสุดที่ μPADs ทั้ง 2 ชนิดสามารถแยกเลือดครบส่วนได้ คือ 230 μL โดย VF1- μPADs ใช้เวลาในการแยก 4.35 ± 0.06 นาทีVF2 - μPADs ใช้ระยะเวลาในการแยก 3.19±0.07 นาที และเมื่อใช้เลือดปริมาตรเพิ่มขึ้น พบว่าระยะเวลาในการแยกเลือดจะลดลงและระยะเวลาในการแยกเลือดคงที่เมื่อใช้ปริมาตรเลือดที่ 280 μL เป็นต้นไป กรณี VF2- μPADs เมื่อเพิ่มปริมาตรเลือดครบส่วนเป็น 250, 280 และ 300 μL พบว่าระยะเวลาในการแยกเลือดไม่ต่างกัน โดยใช้เวลา 2.50 ± 0.08, 2.53 ± 0.04 และ 2.57 ± 0.04 นาทีตามลำดับ อย่างไรก็ตามบริเวณ separation zone ของ μPADs ทั้ง 2 แบบ ที่มีการใช้กระดาษแยกเลือดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร ไม่สามารถรองรับปริมาตรเลือดที่มากกว่า 280 μL ได้หมดจึงทำให้มีเลือดครบส่วนเหลืออยู่ในส่วนของ separation zone ลักษณะของพลาสมาที่แยกได้โดยใช้ VF1- μPADs และ VF2- μPADs แบบรูปดัมเบล แสดงดังภาพที่ 4.4 และผลการทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเลือดแสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะของพลาสมาที่แยกได้จาก µPADs แบบรูปดัมเบล (a) VF1- µPADs ปริมาตรเลือด 250 µL (b) VF2- µPADs ปริมาตรเลือด 250 µL



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรเลือดกับระยะเวลาในการแยกพลาสมา เมื่อใช้ µPADs ชนิดแยกเลือดสองด้าน (■ VF1- µPADs, □ VF2- µPADs)

โดยในการเลือก µPADs ที่นำมาใช้ในการศึกษานั้นเลือกจาก µPADs ที่มีคุณสมบัติดังนี้คือ ใช้ปริมาตรเลือดน้อยที่สุดที่แยกเลือดได้ในระยะเวลาสั้นที่สุด จากการเปรียบเทียบพบว่า VF2 - µPADs มีประสิทธิภาพในการแยกเลือดได้ไวกว่า VF1 - µPADs ทั้งแบบแยกเลือดด้านเดียวและแยกเลือดสองด้าน อาจเนื่องจากคุณสมบัติของกระดาษแยกเลือดชนิด VF2 มีความสามารถในการดูดของเหลวได้ไวกว่ากระดาษแยกเลือดชนิดVF1 (wicking rate VF1 = 41 และ VF2= 45 s/cm)

(104) โดยปริมาตรเลือดที่เหมาะสมสำหรับ VF2 - µPADs ชนิดแยกเลือดด้านเดียว และแยกเลือดสองด้าน คือ 150 µL และ 250 µL ตามลำดับ

เมื่อนำ µPADs ทั้ง 2 แบบมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการแยกเลือดหลังจากที่ตรึงเอนไซม์ glucose oxidase ลงในส่วน detection zone แล้วเมื่อใช้ตัวอย่างเลือดปริมาตร 250 µL แล้วพบว่า VF2 - µPADs ที่แยกเลือดทั้ง 2 ด้านใช้เวลาในการแยก 5.11 $\pm$ 0.24 นาที แต่ VF2 - µPADs ที่แยกเลือดด้านเดียวเมื่อใช้ปริมาตรเลือด 150 µL ไม่สามารถแยกพลาสมาได้เต็มส่วนของ detection zone ทำให้ไม่สามารถวัดปฏิกิริยาได้ ซึ่งลักษณะของพลาสมาที่แยกได้หลังจากตรึงเอนไซม์แล้วแสดงดังภาพที่ 4.6

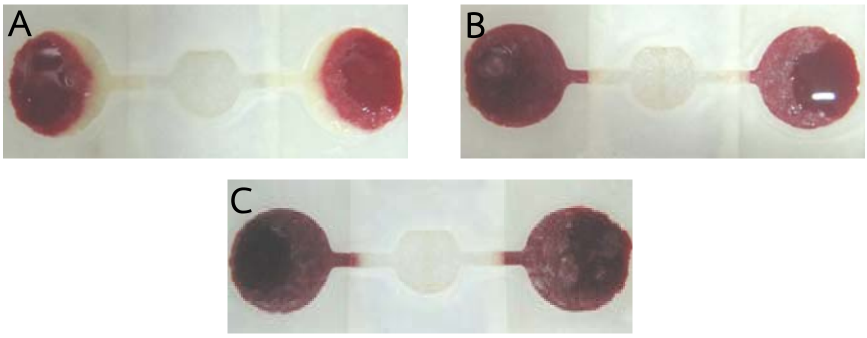
ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ VF2 - µPADs ที่แยกเลือดทั้ง 2 ด้าน (แบบรูปดัมเบล) มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะของ VF2 - µPADs ทั้ง 2 แบบในการแยกพลาสมาหลังตรึงเอนไซม์ (a) แสดงลักษณะของ µPADs ที่ตรึงเอนไซม์บริเวณส่วน detection zone (b) แสดงลักษณะของพลาสมาที่แยกได้หลังจากตรึงเอนไซม์

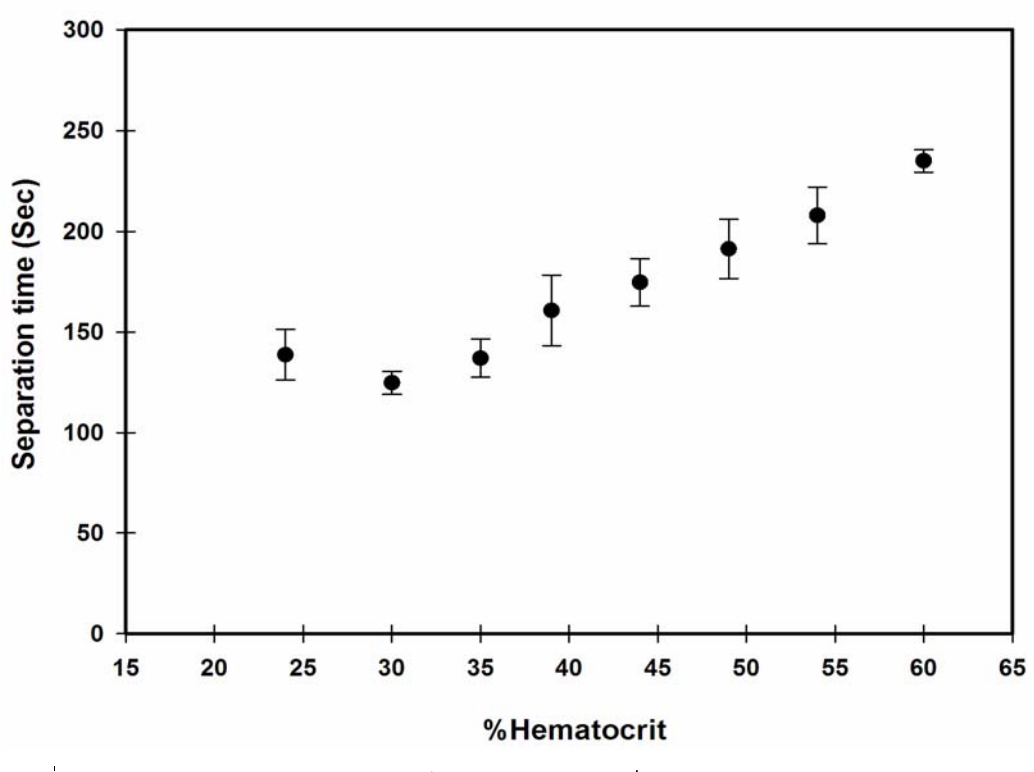
1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ VF2 - µPADs (แบบรูปดัมเบล) ในการแยกเลือดที่ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นแตกต่างกัน

ในการนำ µPADs มาใช้สำหรับแยกเลือดนั้น สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคืออัตราส่วนของเม็ดเลือดแดงที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคลซึ่งส่งผลต่อระยะเวลาในการแยกของพลาสมาและระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของสารที่เราต้องการตรวจวิเคราะห์ จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ µPADs โดยใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนที่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%hematrocrit) ตั้งแต่ 24 ถึง 65% ลักษณะของพลาสมาที่แยกได้แสดงดังภาพที่ 4.7 และผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4.8 จากผลการทดสอบแสดงในเห็นว่า µPADs ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถแยกเลือดครบส่วนได้ทั้งในช่วงปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ต่ำกว่าปกติ ช่วงค่าปกติ และช่วงค่าสูงกว่าปกติ (ค่าปกติในเพศชาย 42-52%

และค่าปกติในเพศหญิง 37-48%) (105) จากการศึกษาพบว่าเมื่อ %hematrocrit เพิ่มขึ้นระยะเวลาที่ใช้ในการแยกพลาสมาเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาสูงสุดที่ใช้ในการแยกพลาสมาไม่เกิน 4 นาที



ภาพที่ 4.7 แสดงลักษณะของ VF2 - μPADs แบบรูปดัมเบลในการแยกพลาสมาที่ %hematrocrit แตกต่างกัน (a) hematrocrit 24% (b) hematrocrit 60% (c) hematrocrit 65%



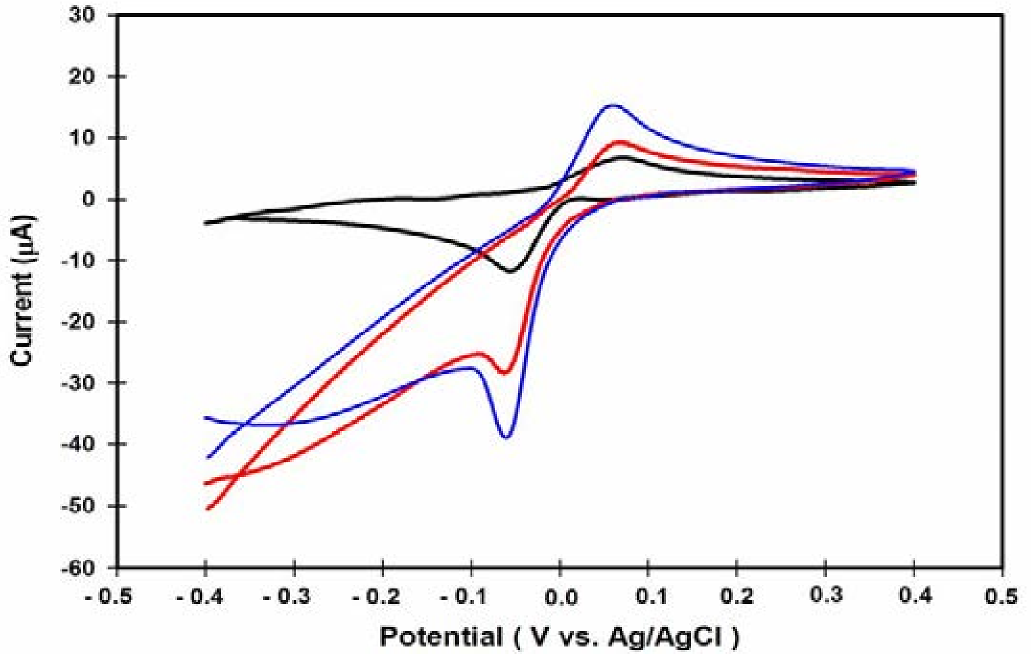
ภาพที่ 4.8   กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%Hematocrit) กับระยะเวลาในการแยกเลือดครบส่วน (n=3)

หลังจากได้ μPADs ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการวัดปฏิกิริยาแล้ว จากนั้นนำ μPADs ที่ได้มาเชื่อมต่อกับขั้วไฟฟ้า (Prussian blue screenprinted electrodes) ซึ่งอุปกรณ์ดังกล่าวจะมีชื่อเรียกว่า electrochemical paper-based analytical devices หรือ ePADs

2. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการตรวจวัดระดับกลูโคส

2.1 ผลการทดสอบหาช่วงความต่างศักย์ที่เหมาะสม

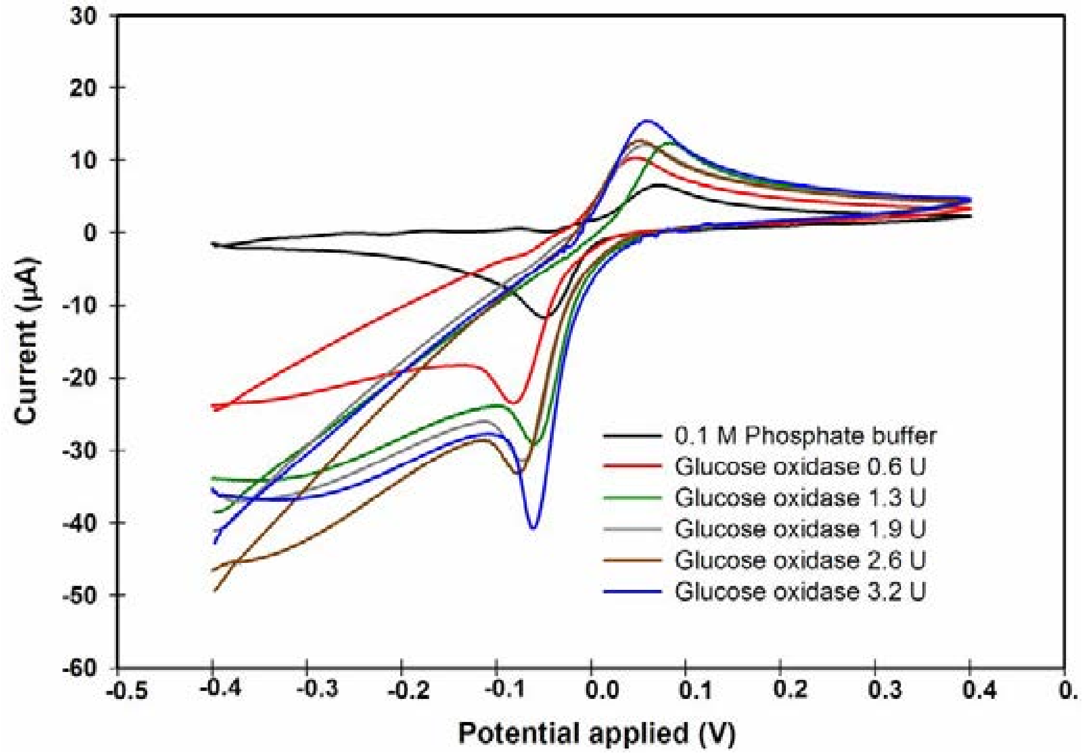
ในการวัดปฏิกิริยาด้วยหลักการทางเคมีไฟฟ้านั้น ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เลือกนำมาใช้มีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากถ้าเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ไม่เหมาะสม ความไวและความจำเพาะกับสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการศึกษาจะลดลง นอกจากนั้นศักย์ไฟฟ้าที่เลือกยังส่งผลต่อสารที่รบกวนในการตรวจวัดอีกด้วยทำให้การตรวจวัดไม่น่าเชื่อถือ โดยในการหาช่วงค่าความต่างศักย์ที่นำมาใช้ในการวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาคือ H_2O_2 นั้น ทำการทดสอบโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry โดยให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -0.4 V ถึง 0.4 V, scan rate 50 mV/s แล้วติดตาม peak ของ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 ที่เกิดขึ้น แสดงดังภาพที่ 4.9 จากกราฟ cyclic voltammograms แสดง peak ของปฏิกิริยาที่เกิดทั้งในส่วนของ oxidation และ reduction ซึ่ง peak ของ oxidation เกิดในช่วง 0.0 ถึง 0.2 V และ peak reduction เกิดในช่วง 0.0 ถึง -0.1 V สำหรับในการศึกษานี้เลือกความต่างศักย์ในช่วงที่เกิดปฏิกิริยา reduction มาใช้เนื่องจากที่ช่วงความต่างศักย์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 และเป็นค่าศักย์ไฟฟ้าที่มีการรบกวนของสารชีวเคมีชนิดอื่นที่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าน้อย (92)



ภาพที่ 4.9 แสดง cyclic voltammograms ของ 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 (เส้นสีดำ), 5mM H_2O_2 (เส้นสีแดง) และ5 mM Glucose กับ 645 KU/L Glucose oxidase 5 µL(เส้นสีน้ำเงิน)

2.2 ผลการทดสอบปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับวัดปฏิกิริยา

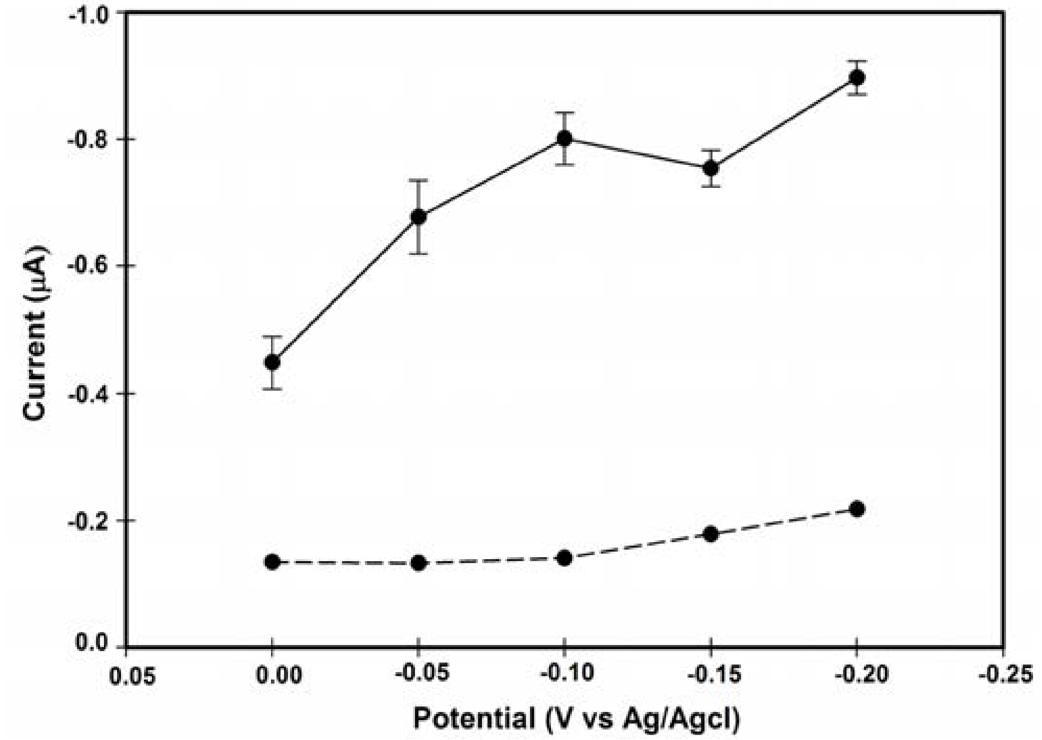
เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมส่งผลต่อความไวของปฏิกิริยาถ้าใช้เอนไซม์น้อยเกินไป ปฏิกิริยาอาจเกิดได้ไม่ดี ในขณะที่ถ้าใช้เอนไซม์มากเกินไปก็จะเป็นการสิ้นเปลืองได้ โดยในการทดสอบนั้นได้ทำการตรึงเอนไซม์ที่มี activity เท่ากับ 0.6, 1.3, 1.9, 2.6, 3.2 และ 3.9 U หรือตรึงเอนไซม์ที่มี activity 645 KU/L ปริมาณ 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 μL ตามลำดับ บน ePADs จากนั้นเติมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 250 μL ลงในส่วนของ separation zone เมื่อสารละลายไหลมาเต็มส่วน detection zone จับเวลา 5 นาทีแล้วให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -0.4 V ถึง 0.4 V, scan rate 50 mV/s แก่ขั้วไฟฟ้า เปรียบเทียบ peak ของกระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาผล cyclic voltammograms ที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.10 จากกราฟแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อ peak ของ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงบน ePADs จึงมีผลต่อสัญญาณในการตรวจวัดและจากการทดสอบพบว่าที่ปริมาณเอนไซม์ 5 μL ให้ peak ของกระแสสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์ที่ปริมาณดังกล่าวซึ่งเท่ากับเอนไซม์ 3.2 U มาศึกษาในขั้นตอนต่อไป ส่วนที่ 6 μL นั้น ไม่ได้นำมาทดสอบเนื่องจากส่วน detection zone ของ ePADs รองรับปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้สูงสุด 5 μL เท่านั้น



ภาพที่ 4.10 cyclic voltammograms แสดงผลการทดสอบหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการวัดปฏิกิริยา

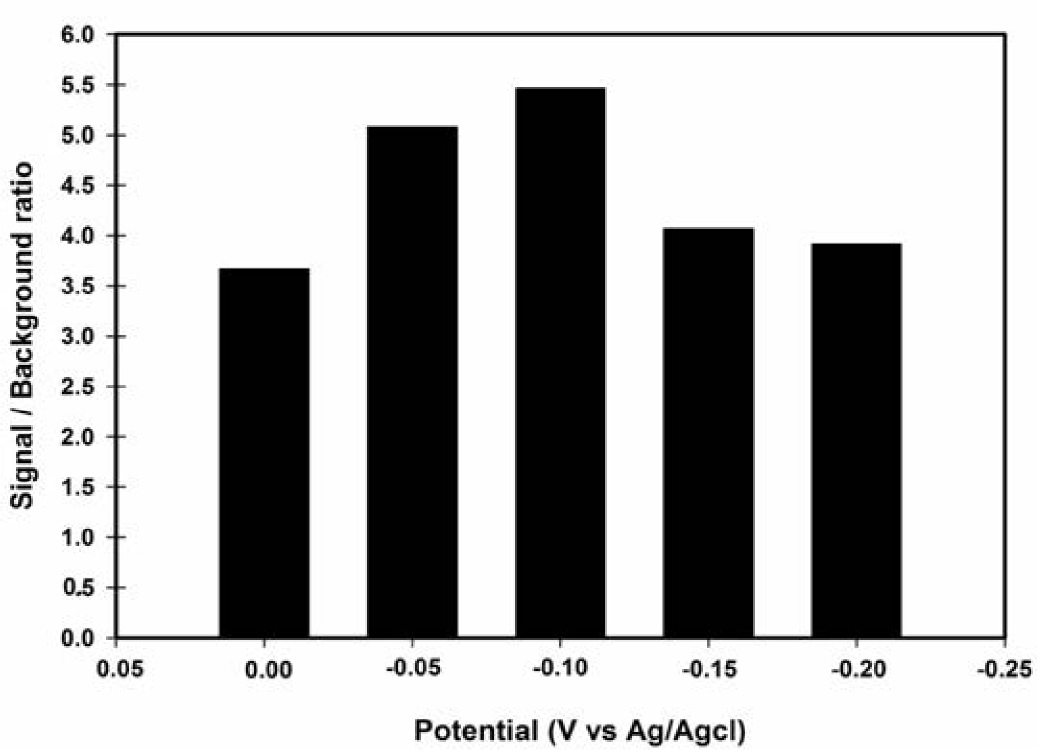
2.3 ผลการทดสอบเพื่อหาค่าความต่างศักย์ที่เหมาะสมในการวัดปฏิกิริยา

จากช่วงค่าความต่างศักย์และปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาที่ได้จากการทำ cyclic voltammetry ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึง peak ของ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 เพื่อให้การวัดปฏิกิริยาที่เราสนใจมีความถูกต้องและจำเพาะกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ได้ทำการทดสอบเพื่อหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค hydrodynamic voltammetry ในการเลือกศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับวัดปฏิกิริยา โดยศักย์ไฟฟ้าที่เลือกนั้นจะต้องให้สัญญาณของปฏิกิริยาสูงที่สุดและให้สัญญาณของสารรบกวนต่ำที่สุดและในขั้นตอนนี้ทำการทดสอบกับตัวอย่างเลือดครบส่วน เพื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่เลือกนั้นเหมาะสมกับตัวอย่างที่ใช้สำหรับตรวจวัดจริง โดยใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ความเข้มข้นของกลูโคส 6.5 mM ใช้ phosphate buffer เป็น background ของปฏิกิริยาทำการตรึง glucose oxidase เอนไซม์ 3.2 U ลงในส่วนของ detection zone รอให้แห้ง 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม phosphate buffer ลงในส่วนของ separation zone เมื่อบัฟเฟอร์ไหลเต็มส่วนของ detection zone แล้วจับเวลา 5 นาที แล้วให้ความต่างศักย์คงที่แก่ขั้วไฟฟ้าตั้งแต่ 0.00, -0.05, -0.10, -0.15 และ -0.20 V ตามลำดับเป็นเวลา 200 วินาที ในส่วนของตัวอย่างที่เป็นเลือดครบส่วนทำการทดสอบเหมือนกันแล้ววัดค่ากระแสที่เกิดขึ้นเทียบกับเวลา ซึ่งตำแหน่งของเวลาที่ใช้วัดกระแสที่เกิดขึ้นนั้นต้องเป็นช่วงที่กระแสคงที่ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เวลาที่ 150 วินาทีในการวัดกระแสที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยา ผลการทดสอบเพื่อหาค่าความต่างศักย์ที่นำมาใช้สำหรับตรวจวัดแสดงดังภาพที่ 4.11 จากกราฟ hydrodynamic voltammograms แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ความต่างศักย์เพิ่มขึ้นในทางลบแก่ปฏิกิริยาสัญญาณของกระแสจะสูงขึ้นตามลำดับทั้งในส่วนของปฏิกิริยาที่ต้องการตรวจวิเคราะห์และ background ของปฏิกิริยาด้วย



ภาพที่ 4.11 แสดงกราฟ hydrodynamic voltammograms ที่ให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่างกันโดยเส้นทึบแสดงกระแสที่วัดได้ของกลูโคส 6.5 mM และเส้นประแสดงค่ากระแสที่วัดได้ของสัญญาณ background

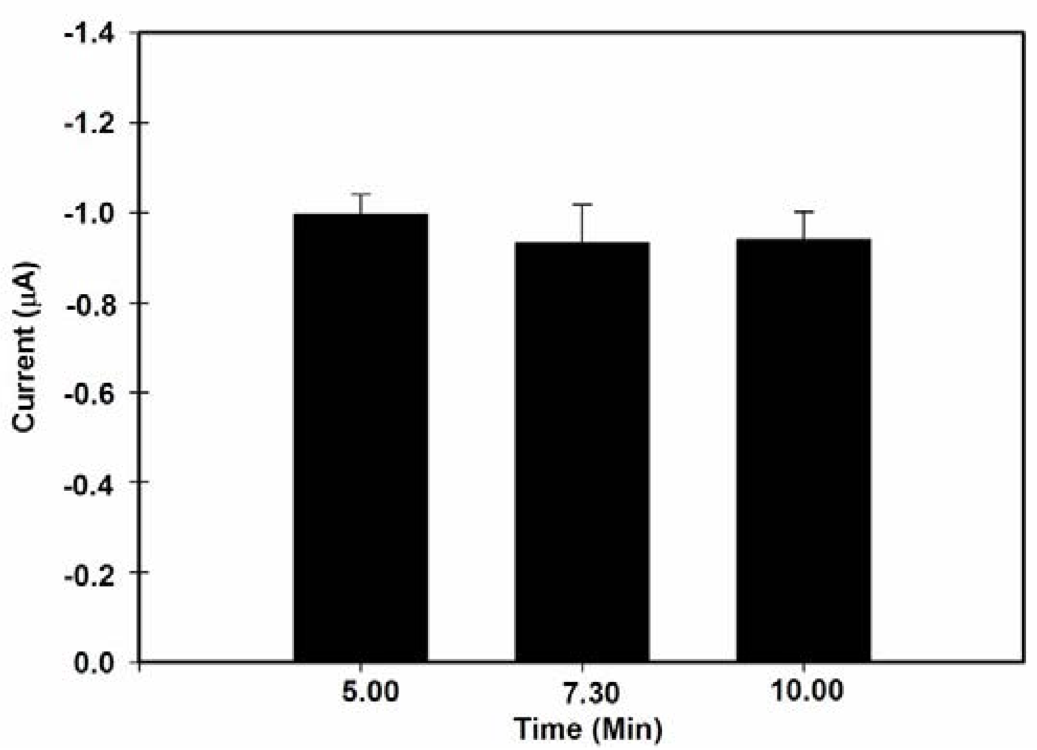
เพื่อเป็นการยืนยันว่าความต่างศักย์ที่เลือกนำมาใช้นั้นให้สัญญาณของปฏิกิริยาสูงที่สุดและให้สัญญาณของสารรบกวนต่ำที่สุด จึงนำค่ากระแสที่วัดได้ในช่วงที่กระแสคงที่ (120-170 วินาที) มาหาอัตราส่วนระหว่างสัญญาณของกลูโคสกับสัญญาณของ background ผลจากการเปรียบเทียบพบว่าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า -0.10 V เป็นค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้อัตราส่วนสัญญาณของกระแสเทียบกับสัญญาณของ background สูงที่สุดแสดงดังภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.12 แสดงอัตราส่วนระหว่างสัญญาณเคมีไฟฟ้า เมื่อทดสอบกับกลูโคสความเข้มข้น 6.5 mM เทียบกับสัญญาณ background ของปฏิกิริยา

2.4 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

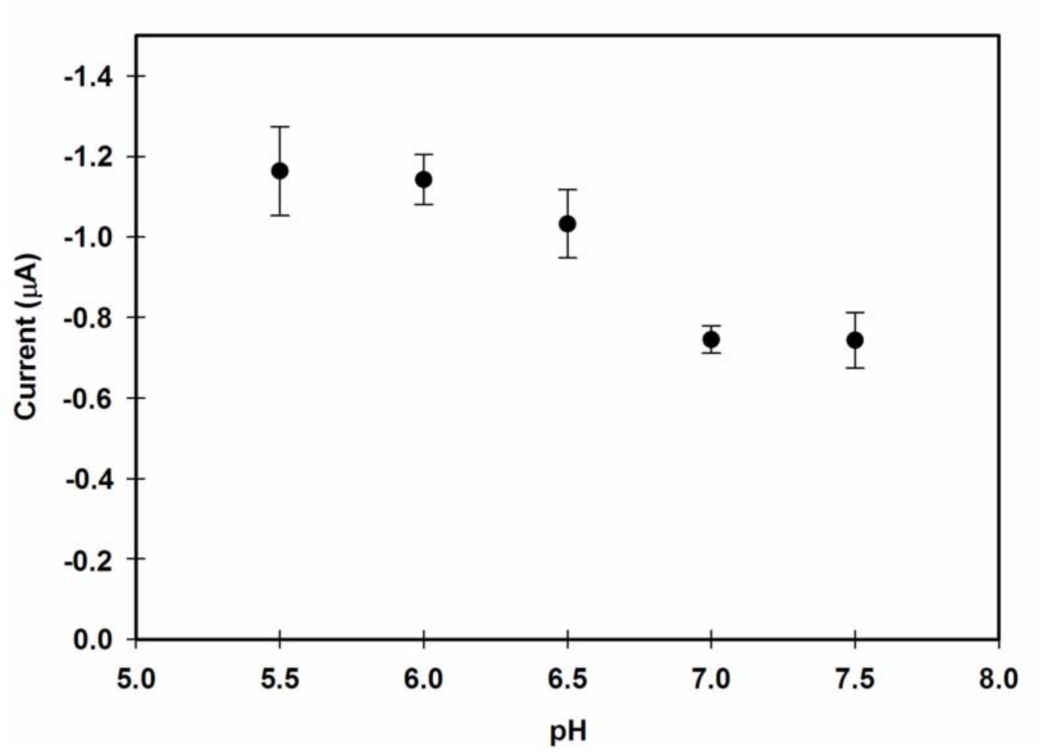
เนื่องจากในการตรวจวัดระดับกลูโคสนั้น ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาส่งผลต่อปริมาณสารผลิตภัณฑ์ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นซึ่งมีผลโดยตรงในการวัดปฏิกิริยา ได้ทำการทดสอบโดยหลังจากแยกพลาสมาเต็มส่วนของ detection zone แล้วจับเวลาต่อเป็นเวลา 1, 2.30, 5, 7.30 และ 10 นาทีตามลำดับจากผลการทดสอบพบว่าที่เวลา 1 และ 2.30 นาทีเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า – 0.10 V เข้าไปกระแสที่เกิดขึ้นไม่คงที่ทำให้ไม่สามารถวัดปฏิกิริยาได้ แต่ตั้งแต่เวลา 5 นาทีเป็นต้นไปกระแสที่เกิดขึ้นคงที่ จึงทำการทดสอบโดยวัดกระแสของปฏิกิริยาที่เวลา 5, 7.30 และ 10 นาทีตามลำดับ ผลของค่ากระแสที่วัดได้แต่ละเวลาแสดงดังภาพที่ 4.13 และจากผลของกระแสที่วัดได้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 5 นาทีให้กระแสสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่เวลาดังกล่าว



ภาพที่ 4.13 กราฟแสดงผลการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการวัดปฏิกิริยา

2.5 ผลการทดสอบ pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

เนื่องจาก pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวัดปฏิกิริยาส่งผลทั้งในส่วนของประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์และความคงตัวของสาร Prussian blue ที่ modified บนขั้วไฟฟ้าด้วย ทำการทดสอบโดยเตรียม glucose oxidase ในสารละลาย phosphate buffer pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 จากนั้นนำมาทดสอบกับเลือดครบส่วนที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากันบน ePADs ที่พัฒนาขึ้นผลการทดสอบ pH สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.14 จากผลการทดสอบพบว่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้นกระแสที่วัดได้จะลดลงตามลำดับ และที่ pH 5.5 จะให้กระแสของปฏิกิริยาสูงที่สุด ถึงแม้ว่าที่ pH ดังกล่าวให้กระแสในการตรวจวัดสูงที่สุด แต่ในการศึกษานี้เลือกใช้ที่ pH 6.0 เนื่องจากในการเตรียม phosphate buffer นั้นค่า pH สุดท้ายของบัฟเฟอร์ไม่ควรมีค่ามากกว่าหรือน้อยกว่า 1.0 ของค่า pKa ของสารที่นำมาใช้ในการเตรียม ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ใช้เตรียมจาก KH_2PO_4 (acid part) และ K_2HPO_4 (base part) และค่า pKa = $pK_{KH_2PO_4}$ = 6.82 ที่ 25°C ดังนั้นบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาควรมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.8 ถึง7.8 (106) และที่ pH 6.0 สัญญาณลดลงเหลือ 97 เปอร์เซ็นต์ของที่ pH 5.5

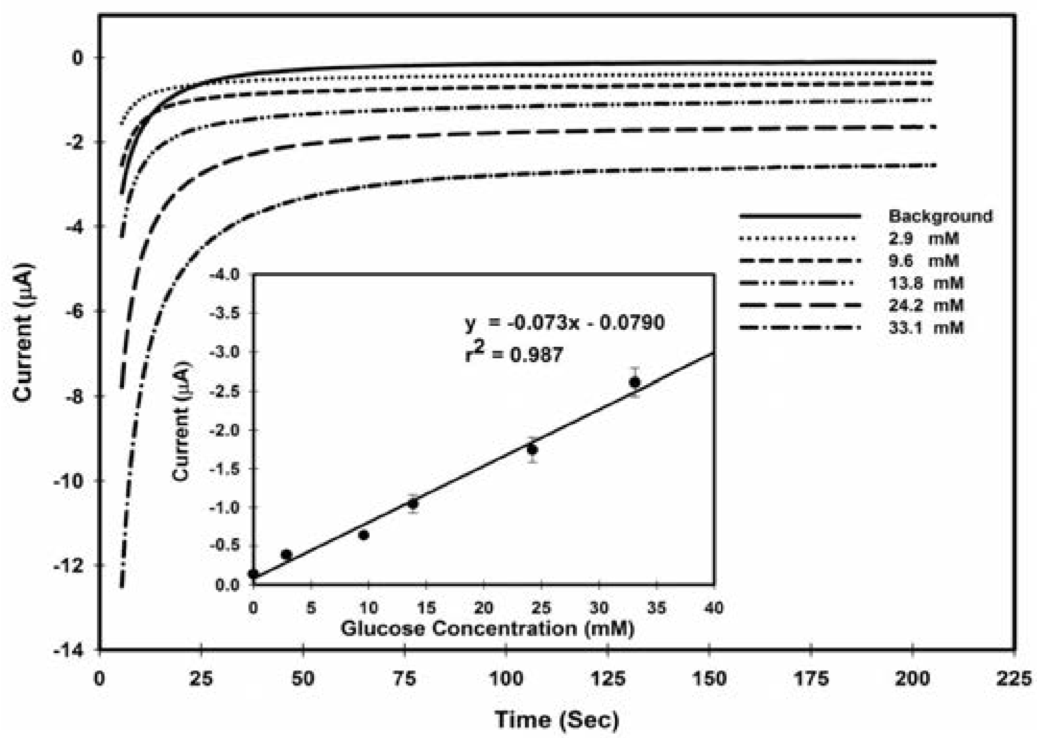


ภาพที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH ที่ใช้กับกระแสที่วัดได้จากปฏิกิริยา

3. ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterization)

3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)

โดยในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสนั้นจะทำการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนที่เติมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 5.5, 11, 22 และ 33 mM ลงในเลือดครบส่วนแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งตัวอย่างที่เตรียมไปปั่นแยกพลาสมาที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 10 นาที นำพลาสมาที่ได้ไปวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้น้ำยา Glucose liquid color วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอยู่จริงในตัวอย่างตรวจหลังจากเติมสารละลายกลูโคสมาตรฐานลงไปแล้ว คือ 2.9, 9.6, 13.8, 24.2 และ 33.1 mM ตามลำดับ ตัวอย่างเลือดอีกส่วนหนึ่งนำไปวัดปริมาณกลูโคสบน ePADs ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิค chronoamperometry โดยให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ ที่ -0.1 V ตลอดระยะเวลาในการวัดเป็นเวลา 200 วินาทีและใช้ค่ากระแสที่เวลา 150 วินาทีซึ่งเวลาดังกล่าวเป็นเวลาที่กระแสของปฏิกิริยาคงที่แล้ว ในการนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานโดยกราฟมาตรฐานที่สร้างได้แสดงดังภาพที่ 4.15



ภาพที่ 4.15 แสดง chronoamperograms ของกระแสที่วัดได้บน ePADs ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ กราฟแทรกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่ากระแสที่วัดได้ที่เวลา 150 วินาที กราฟมีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-33.1 mM (r^2 = 0.987)

3.2 ผลการทดสอบค่า limit of detection (LOD)

ได้ทำการทดสอบค่า limit of detection ของการตรวจวัดปริมาณกลูโคส โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 เป็น blank ทำการเติมบัฟเฟอร์ลงในส่วนของ separation zone เมื่อบัฟเฟอร์ไหลไปในส่วนของ detection zone ที่ได้ทำการตรึง glucose oxidase ไว้แล้วทำการตรวจวัดเช่นเดียวกับการตรวจวัดกลูโคสโดยใช้เทคนิค chronoamperometry จำนวน 10 ครั้ง และเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบ ได้ทำการทดสอบทั้งหมด 2 ครั้ง โดยทำต่างเวลาใช้เอนไซม์และ μPADs ที่เตรียมคนละชุดกัน นำค่าที่ตรวจวัดได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่า limit of detection คำนวณจากสูตร

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

SD คือ standard deviation ที่ได้จากการวัด blank 10 ครั้ง และ S คือ sensitivity ซึ่งหาได้จากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าการตรวจวัดกลูโคสมีค่า limit of detection 0.52 ± 0.031 mM ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบหาค่า limit of detection ของการตรวจวัดกลูโคสบน ePADs

ค่าทางสถิติ	**ครั้งที่1**	**ครั้งที่2**
SD	0.013198	0.012111
3SD	0.039593	0.036333
Slope	0.073	
LOD	0.5423689	0.497715
ค่าเฉลี่ย LOD	0.52 ± 0.031	

3.3 ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)

การทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในเลือดครบส่วนนั้น ทำการทดสอบสารที่มีคุณสมบัติเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าได้ (electroactive substance) ที่พบได้ทั่วไปในเลือดครบส่วนได้แก่ บิลิรูบิน (bilirubin), ฮีโมโกลบิน (hemoglobin), วิตามินซี (ascorbic acid) และกรดยูริค (uric acid) โดยทำการเติมสารดังกล่าวลงในเลือดครบส่วนแล้ววัดกระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติม จากนั้นนำค่ากระแสที่วัดได้มาคำนวณหา %Recovery เทียบกันระหว่างกระแสที่วัดได้หลังเติมสารรบกวนกับกระแสที่วัดได้ก่อนเติมสารรบกวน โดยค่า recovery ในช่วง 95-105% ถือว่ายอมรับได้ว่าสารที่นำมาทดสอบไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ โดยคำนวณจาก

%Recovery = (ค่ากระแสที่วัดได้หลังเติมสารรบกวน/ค่ากระแสที่วัดได้ก่อนเติมสารรบกวน) x 100

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในเลือดครบส่วนบน ePADs

ชนิดของสารรบกวน	**ปริมาณที่เติม (mg/dl)**	**% Recovery**
Ascorbic acid	1	114 ± 4.8
	2	115 ± 6.7
	3	135 ± 7.1
	4	150 ± 11.4
Bilirubin	16	95 ± 4.4
	18	104 ± 7.7
	20	109 ± 3.8
Hemoglobin	100	86 + 1.9
	300	85 + 2.9
	400	77 + 2.0
	500	84 + 7.8
Uric acid	0.5	97 ± 5.7
	1	94 ± 5.3
	2	93 ± 4.8

จากผลการทบสอบสารรบกวนในปฏิกิริยาพบว่าพบว่า ascorbic acid ที่ 1 mg/dL รบกวนการตรวจวัดกระแสของปฏิกิริยาโดยมีค่า recovery ที่ 114%, hemoglobin ที่ 100 mg/dl รบกวนการตรวจวัดกระแสของปฏิกิริยาโดยมีค่า recovery ที่ 86% ส่วน 0.5 mg/dl uric acid และ 18 mg/dl bilirubin ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ recovery เท่ากับ 97% และ 104%

3.4 ผลการศึกษาค่า precision และ reproducibility

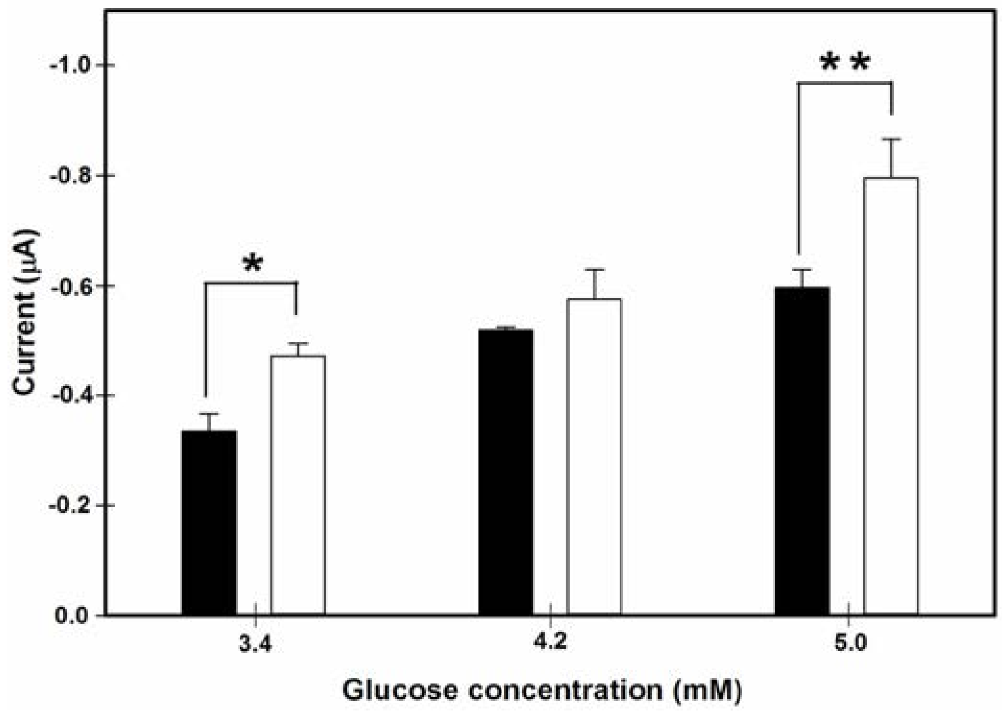
Within-run precision ศึกษาโดยทำการตรวจวัดกระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจากตัวอย่างเลือดครบส่วนที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 3.4, 6.3 และ 15.6 mM ตามลำดับมาทดสอบบน ePADs ความเข้มข้นละ 20 ซ้ำ โดยแต่ละความเข้มข้นจะใช้ μPADs และเอนไซม์ที่เตรียมพร้อมกันและใช้ขั้วไฟฟ้าเดิม นำค่ากระแสที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation) โดยคำนวณจาก

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

จากผลการทดลองที่ความเข้มข้นกลูโคสในเลือดครบส่วน 3.4, 6.3 และ 15.6 mM ได้ค่า %CV 6.5, 9.0 และ 8.0 ตามลำดับ

4. ผลการทดลองตรวจวัดปริมาณกลูโคสในเลือดครบส่วนเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดบน ePADs ที่พัฒนาขึ้นนั้น พบว่าสารชีวเคมีที่อยู่ในกระแสเลือดที่ต่างกันในแต่ละบุคคลอาทิเช่น uric acid, ascorbic acid ส่งผลต่อการวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้า นอกจากนั้นปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา เช่น ปริมาณ O_2 หรือ pH ที่ต่างกันในเลือดครบส่วนที่ตรวจวัดนั้นก็ส่งผลด้วยเช่นกัน (79) จึงได้ทำการยืนยันว่าปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการตรวจวัดจริง โดยทำการทดสอบจากตัวอย่างเลือดครบส่วนที่มีระดับกลูโคสที่เท่ากันจากการวัดด้วยวิธี Spectrophotometer จำนวน 3 ระดับคือที่ระดับกลูโคส 3.4, 4.2 และ 5.0 mM ตามลำดับ โดยทดสอบความเข้มข้นละ 2 ตัวอย่าง มาทดสอบบน ePADs ที่พัฒนาขึ้น พบว่าตัวอย่างเลือดที่มีระดับกลูโคส 3.4 mM เท่ากัน ค่ากระแสที่วัดได้จาก 2 ตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (* *p* value = 0.004) ที่ระดับกลูโคส 4.2 mM ค่ากระแสที่วัดได้จาก 2 ตัวอย่างไม่แตกต่างกัน และที่ระดับกลูโคส 5.0 mM ค่ากระแสที่วัดได้จาก 2 ตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (** *p* value = 0.012) ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 4.16



ภาพที่ 4.16 ผลเปรียบเทียบความแตกต่างของกระแสที่วัดได้ เมื่อตรวจวัดกลูโคสความเข้มข้นเท่ากันจากสิ่งส่งตรวจต่างกัน

จากข้อมูลที่กล่าวมา การวัดกระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาแล้วเทียบกระแสที่เกิดขึ้นกับกราฟมาตรฐานอาจทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงทำการตรวจวัดระดับกลูโคสโดยใช้วิธี standard addition แทน (101) โดยก่อนทำการตรวจวัดจะแบ่งตัวอย่างเลือดครบส่วนออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 เติม phosphate buffer ส่วนที่ 2 เติมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 5.5 mM และส่วนที่ 3 เติมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 11.0 mM จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบบน ePADs ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งกระแสที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นนั้นเมื่อนำไปพลอตกราฟ โดยให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่เติมลงไปในขณะที่แกน y เป็นค่ากระแสที่วัดได้เมื่อลากเส้นกราฟผ่านแกน y ไปตัดแกน x ที่จุดตัดแกน x คือค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอยู่จริงในตัวอย่างตรวจ (101) ผลการตรวจวัดที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้ผลดังตารางที่ 4.3

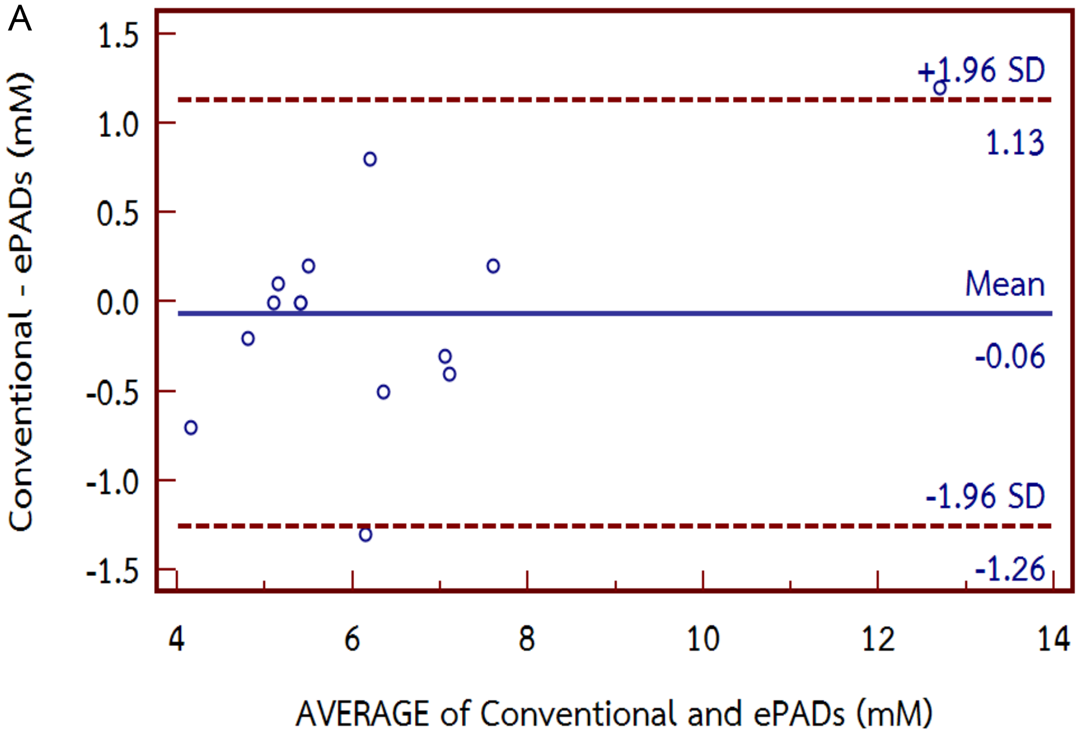
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น (ePADs) เทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

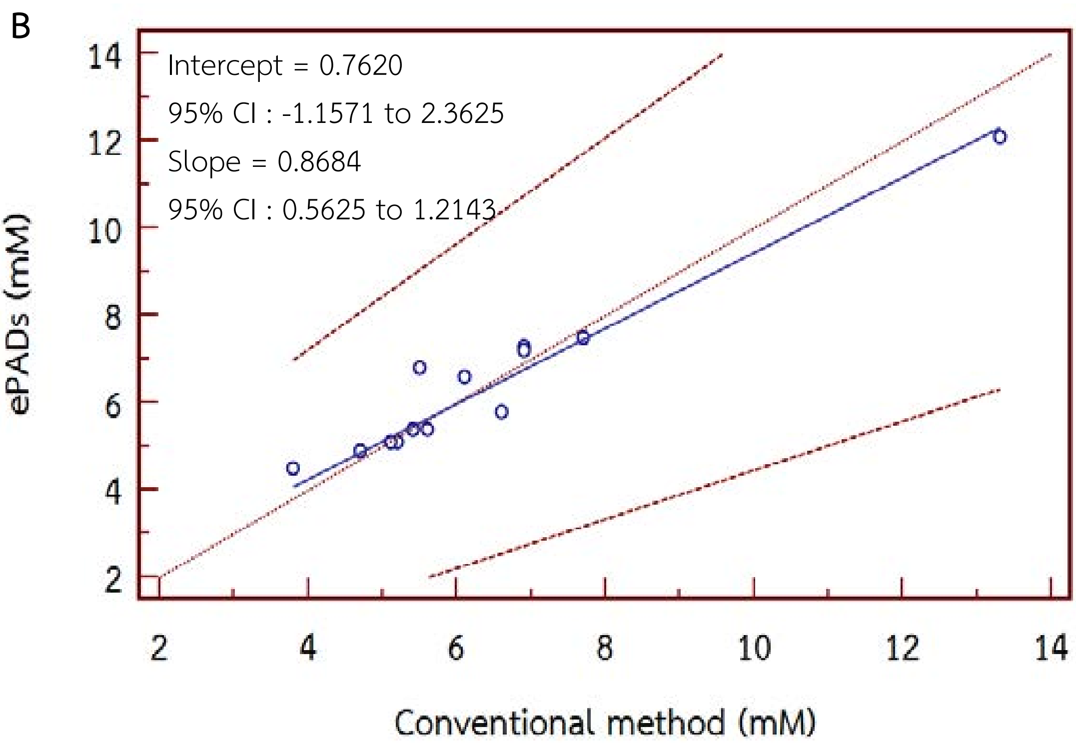
Sample no.	Electrochemical detection (ePADs)		Spectrophotometric method	
	Mean Glucose concentration (mM)	SD*	Mean Glucose concentration (mM)	SD*
1	7.5	0.8	7.7	0.3
2	5.4	0.2	5.6	0.4
3	5.4	0.6	5.4	0.2
4	12.1	1.0	13.3	0.2
5	5.1	1.1	5.2	0.1
6	5.8	0.6	6.6	0.0
7	7.3	0.3	6.9	0.1
8	5.1	0.3	5.1	0.2
9	4.9	0.4	4.7	0.0
10	6.8	0.6	5.5	0.2
11	5.4	0.5	5.4	0.1
12	7.2	0.5	6.9	0.1
13	6.6	0.6	6.1	0.5
14	4.5	0.4	3.8	0.1

SD* ได้จากการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

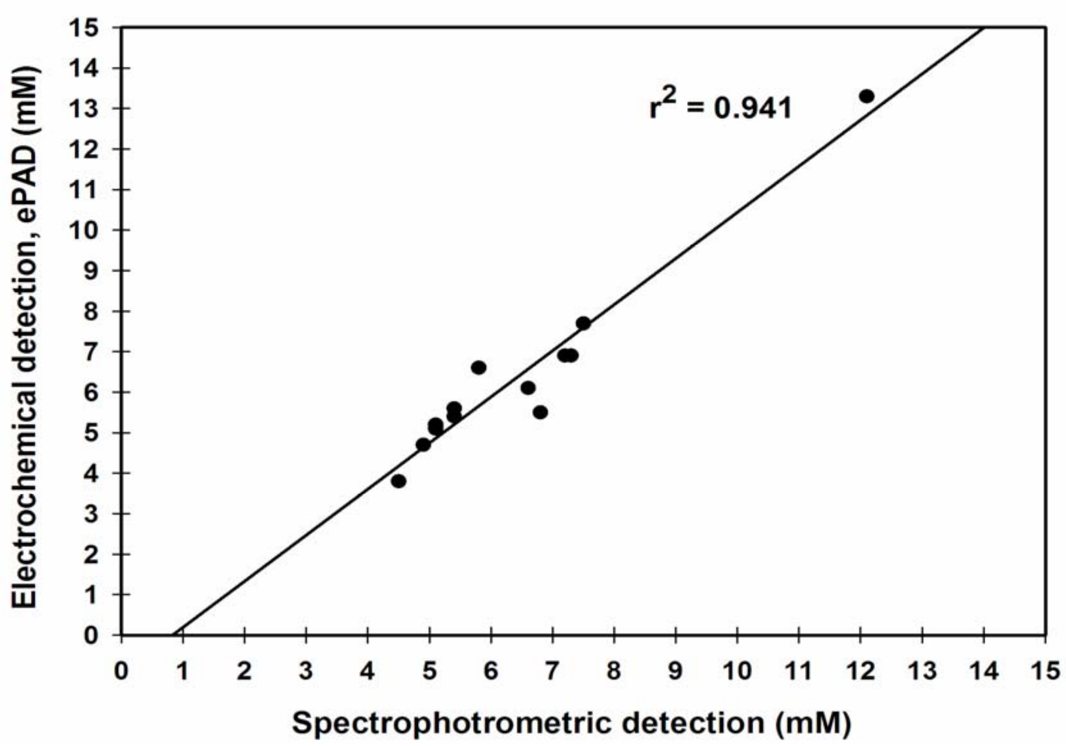
ผลการตรวจวัดของวิธีที่พัฒนาขึ้นเมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Bland and Altman test พบว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น (ePADs) เทียบกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ไม่มี bias ของการตรวจวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญแสดงดังภาพที่ 4.17 A เนื่องจากผลต่างของทั้ง 2 วิธีส่วนมากอยู่ในช่วง ±1.96 และในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธีได้มีการใช้สถิติ Passing-bablok regression แสดงดังภาพที่ 4.17 B พบว่าสมการ Passing–bablok regression คือ y = 0.8684x + 0.7620 (y = Ax + B) ที่ช่วงค่าความเชื่อมั่น 95% ค่าความชัน (slope) ใช้สำหรับทดสอบสมมติฐานว่า A = 1 ซึ่งจะยอมรับสมมติฐานก็ต่อเมื่อช่วงความเชื่อมั่นสำหรับ A มีค่า 1 อยู่ด้วย ผลการทดลองดังภาพที่ 4.17 B พบว่าค่า slope อยู่ในช่วง 0.5625 ถึง 1.2143 ซึ่งมีค่า 1 อยู่ในช่วงดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าสามารถยอมรับว่าค่า slope ของสมการไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและค่าจุดตัดแกน y ซึ่งใช้ทดสอบสมมติฐานว่า B = 0 ซึ่งจะยอมรับสมมติฐานถ้าช่วงความเชื่อมั่นสำหรับจุดตัดนั้น มีค่า 0 อยู่ด้วยในผลการทดลอง ค่าจุดตัดแกนมีค่าอยู่ในช่วง -1.1571 ถึง 2.3625 ซึ่งมีค่า 0 อยู่ในช่วงดังกล่าว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่าจุดตัดแกน y (0.7620) จากสมการข้างต้นมีค่าไม่ต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและใช้โปรแกรม Sigma plot มาหาค่าความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธีพบว่าทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์กับโดยมีค่า r^2 = 0.941 (*n* = 14) แสดงดังภาพที่ 4.18

A





ภาพที่ 4.17 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณกลูโคส (a) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้สถิติ Bland and Altman plot (b) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้สถิติ Passing–bablok regression



ภาพที่ 4.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณกลูโคสที่ตรวจวัดได้โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น (ePADs) เทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้โปรแกรม Sigma plot $r^2 = 0.941$, $n = 14$ ($y = 1.138\ (\pm\ 0.083) - 0.944\ (\pm\ 0.547)$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนด้วยหลักการเคมีไฟฟ้าและนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจกลูโคสจากเลือดครบส่วนของผู้ที่มีระดับกลูโคสในเลือดต่ำกว่าปกติ, ปกติ และสูงกว่าค่าปกติทั้งในผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ที่เป็นเบาหวาน โดยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (μPADs) นั้นได้สร้างลวดลายบนกระดาษและเชื่อมกระดาษกรองกับกระดาษแยกเลือดเข้าด้วยกันโดยเทคนิค wax dipping ทำให้เกิดเป็นบริเวณสำหรับตรวจวัดและส่วนสำหรับแยกเลือด μPADs ที่นำมาใช้ออกแบบให้เป็นรูปดัมเบลให้มีบริเวณสำหรับแยกเลือด 2 ด้านเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกเลือดและพลาสมาที่แยกได้จากเลือดครบส่วนจะไหลมาผสมกับเอนไซม์ที่ตรึงไว้ตรงกลางของบริเวณตรวจวัดพอดี μPADs ที่สร้างขึ้นนำมาเชื่อมต่อเข้ากับขั้วไฟฟ้าพิมพ์ลายที่มี Prussian blue เป็นสารตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนทำให้สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งการนำ μPADs ที่สร้างได้มาเชื่อมต่อกับอุปกรณ์ตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเกิดเป็นอุปกรณ์ใหม่ที่มีชื่อเรียกว่า electrochemical paper-based analytical devices หรือ ePADs สำหรับการตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดย ePADs ที่พัฒนาขึ้นนั้นจะใช้หลักการของ glucose oxidase เอนไซม์และวัดสารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาคือ H_2O_2

จากผลการทดลองพบว่าปริมาตรเลือดครบส่วนที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการแยกเลือดบน μPADs ที่สร้างขึ้นนั้นคือ 250 μLโดยใช้ด้านละ 125 μLและ μPADs มีประสิทธิภาพในการแยกเลือดได้ในช่วง hematrocrit ระหว่าง 24-60% ภายในระยะเวลา 4 นาที ปริมาณของเอนไซม์ glucose oxidase ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาคือ 645 KU/L ปริมาณ 5 μLความต่างศักย์ที่เหมาะสมในการวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาซึ่งคือ H_2O_2 คือ -0.1 V เวลาที่เหมาะสมสำหรับในการเกิดปฏิกิริยาเป็น 5 นาทีและเวลาที่เหมาะสมในการวัดกระแสของปฏิกิริยาเป็นเวลาที่ให้ค่ากระแสคงที่คือ 150 วินาที pH ของบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ที่เหมาะสมทั้งในแง่การทำงานของเอนไซม์และรักษาสภาพของขั้วไฟฟ้าคือ 0.1 M potassium phosphate pH 6.0

ผลการศึกษาคุณสมบัติของ ePADs ที่พัฒนาได้มีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดกลูโคสในเลือดครบส่วน 0-33.1 mM (0-602 mg/dl), r^2 = 0.987 ค่า limit of detection ของการตรวจวัดคำนวณได้เท่ากับ 0.52 ± 0.031mM

การทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดกลูโคสในเลือดครบส่วนโดยทำการเติมสารที่พบทั่วไปในเลือดและมีคุณสมบัติเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าได้ พบว่า ascorbic acid ความเข้มข้น 1 mg/dL รบกวนการตรวจวัดกระแสของปฏิกิริยาโดยมีค่า recovery ที่ 114%, hemoglobin ความเข้มข้น 100 mg/dl รบกวนการตรวจวัดกระแสของปฏิกิริยาโดยมีค่า recovery 86% ส่วน 0.5 mg/dl uric acid และ 18 mg/dl bilirubin ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญโดยมี recovery เท่ากับ 97% และ 104% ตามลำดับ

ePADs ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีความแม่นยำในการวัดปริมาณกลูโคสในเลือดครบส่วนโดยมีค่า Within-run precision 6.5%, 9.0% และ 8.0%สำหรับตรวจวัดกลูโคสความเข้มข้น3.4, 6.3 และ 15.6 mM ตามลำดับ (n=20)

เนื่องจากในตัวอย่างเลือดครบส่วนมีสารรบกวนที่มีคุณสมบัติเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าที่ศักย์ไฟฟ้าเดียวกับที่ใช้วัดปฏิกิริยา โดยพบว่าเมื่อตรวจวัดปริมาณกลูโคสในเลือดครบส่วนจากตัวอย่างต่างกัน แต่มีระดับกลูโคสเท่ากันคือที่ 3.4 mM และ 5.0 mM พบว่าค่ากระแสที่วัดได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p* value = 0.004 และ 0.012 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อตรวจวัดสารตัวอย่าง และอ่านผลจากกราฟมาตรฐานอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ ดังนั้นในการตรวจวัดระดับกลูโคสจากสิ่งตัวอย่าง จึงเลือกใช้วิธี standard addition แทนและอ่านค่ากลูโคสในสิ่งตัวอย่างจากจุดตัดแกน x และผลการทดลองเมื่อทำการทดสอบตัวอย่างเลือดครบส่วนจำนวน 14 ตัวอย่าง (n = 14) พบว่าวิธี ePADs ที่พัฒนาขึ้นและวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สามารถวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของกลูโคสได้ใกล้เคียงกัน มีค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ r^2 = 0.941 เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Paired sample T-test พบว่าการทดสอบทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*= 0.6996) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman plot และ Passing-bablok regression ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันไม่มี bias เนื่องจากผลต่างของวิธี ePADsในงานวิจัยนี้กับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปส่วนมากอยู่ในช่วง $\pm$ 1.96 SD และค่า slope ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ 1 และค่าจุดตัดแกน y มีค่าไม่ต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จึงสามารถสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถใช้ตรวจวัดระดับกลูโคสในเลือดครบส่วนในตัวอย่างผู้ป่วยจริงได้

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารชีวเคมีที่สำคัญที่อยู่ในเลือดครบส่วน เพื่อช่วยในการวินิจฉัยและติดตามการควบคุมระดับกลูโคสในผู้ป่วยเบาหวานและผู้ที่มีสุขภาพดีโดยอุปกรณ์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษหรือ μPADs นั้น สามารถสร้างได้ง่าย ใช้เทคนิคที่ไม่ซับซ้อนและมีต้นทุนต่ำ นอกจากนั้นยังประกอบเข้ากับเครื่องมือที่ใช้ในการวัดปฏิกิริยาได้หลายรูปแบบ โดยเฉพาะการใช้ร่วมกับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้านั้นนอกจากช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์แล้ว เครื่องมือดังกล่าวยังมีราคาไม่แพงและมีขนาดเล็กสามารถเคลื่อนย้ายได้ นอกจากนั้น μPADs ยังมีข้อดีในส่วนของการควบคุมการไหลของสารในท่อขนาดเล็ก ทำให้สารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ไม่ว่าจะเป็นสารเคมีหรือสารชีวเคมีในร่างกาย เช่น ปัสสาวะ, ซีรั่ม, พลาสมา สามารถไหลตามท่อไปยังบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้แรงจากภายนอกเช่น syringe pump เป็นตัวพาสาร และกระดาษกรองที่ใช้เป็นส่วนในการเกิดปฏิกิริยานั้นมีส่วนประกอบเป็นเซลลูโลส ซึ่งสามารถเข้ากันได้กับสารตัวอย่างทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี อีกทั้งกระดาษยังสามารถทำลายได้ง่ายไม่เป็นมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม นอกจากการตรวจวัดกลูโคสในเลือดครบส่วนแล้ว ePADs ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดสารชีวเคมีตัวอื่นในเลือดครบส่วนที่ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาคือ H_2O_2 ได้อีกด้วย เช่น คอเรสเตอรอล, กรดยูริค, การตรวจโดยใช้หลักการทาง Immunoassay โดยใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ peroxidase และติดตามปฏิกิริยาจาก H_2O_2 ที่ลดลง เช่น สารชี้บ่งโรคหัวใจ เช่น Troponin T, CK-MB mass และสารชี้บ่งโรคมะเร็ง เช่น AFP, CEA, PSA, CA125 และ CA199 เป็นต้น

μPADs ที่นำมาใช้ในงานวิจัยหลังจากตรึงเอนไซม์สำหรับตรวจวัดเรียบร้อยแล้ว จะมีราคาต้นทุนอยู่ที่ 7.5 บาท/1 แผ่น ซึ่งถือว่าเป็นอุปกรณ์ที่มีราคาถูก นอกจากนั้น μPADs ยังมีประสิทธิภาพในการแยกเลือดสูงโดยใช้เวลาเพียง 4 นาที ซึ่งช่วยลดขั้นตอนในการปั่นแยกพลาสมาสำหรับการตรวจวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี เมื่อนำ μPADs มาประกอบกับขั้วไฟฟ้าพิมพ์ลายแล้วนำมาตรวจวัดระดับกลูโคสที่ความเข้มข้น ต่ำ, ปกติ และสูง พบว่ากระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไม่ลดลงหรือเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า %CV อยู่ที่ 6.0, 9.0 และ 8.0 ตามลำดับ (อย่างน้อย 20 ครั้ง)

ศักย์ไฟฟ้าที่เลือกนำมาใช้นั้นเหมาะสำหรับ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 บน ePADs ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งส่งผลต่อความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากถ้าเลือกศักย์ไฟฟ้าไม่เหมาะสมจะมีสารอื่นรบกวนการตรวจวัดได้ (90) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมของ Prussian blue ในการเร่งปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ H_2O_2 คือค่าศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0 V (107) หรือในช่วงศักย์ไฟฟ้าระหว่าง 0 ถึง -0.2 V (90) ซึ่งศักย์ไฟฟ้า

-0.1 V ที่เลือกใช้นี้อยู่ในช่วงค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม นอกจากนั้น pH ที่เลือกใช้มีความสำคัญในด้านของความไวของการทดสอบ เนื่องจาก glucose oxidase เอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่ 4-7 (99) และ Prussian blue มีประสิทธิภาพในการรับส่งอิเล็กตรอนได้ดีที่ pH น้อยกว่า 7 (93, 107) เนื่องจากในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นด่างความคงตัวของ Prussian blue จะลดลงจาก OH^- ที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถจับกับ ferric ion ของ Prussian blue เกิดเป็น $Fe(OH)_3$ นำไปสู่การทำลายพันธะของ Fe-CN-Fe ทำให้ Prussian blue ที่ตรึงไว้บนขั้วไฟฟ้าไม่เสถียร (93) ซึ่งการเลือกใช้ 0.1 M potassium phosphate pH 6.0 ช่วยเพิ่มทั้งในส่วนของความจำเพาะและความไวในการทดสอบ

สำหรับ ePADs ที่พัฒนาขึ้นนั้นเมื่อนำมาทดสอบสารรบกวนในระบบพบว่ามีสาร 2 ชนิดที่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญคือ ascorbic acid และ hemoglobin พบว่า ascorbic acid ที่เติมลงในตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ 1 mg/dL รบกวนการตรวจวัดโดยมี %recovery อยู่ที่ 114% สาเหตุเนื่องมาจากในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้านั้น ascorbic acid สามารถให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยาได้ทำให้มีอิเล็กตรอนในระบบมากขึ้นส่งผลให้กระแสที่วัดสูงขึ้นด้วยดังนั้นการตรวจวัดกลูโคสในรูปแบบอื่นที่ใช้หลักการทางเคมีไฟฟ้า อาทิเช่น การใช้เครื่อง glucometer ก็มีการรบกวนจาก ascorbic acid ด้วยเช่นกัน (80) นอกจากนี้ ascorbic acid ยังรบกวนตรวจวัดด้วยหลักการ colorimetric enzyme assay เช่น glucose oxidase ที่ใช้เครื่อง spectrophotometer ในการวัดปฏิกิริยา (108) สำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้านั้นการใช้สาร Nafion ตรึงบนขั้วไฟฟ้าหรือตรึงบน ePADs จะช่วยลดการรบกวนของ ascorbic acid ได้ แต่การตรึงสารหลายชนิดบนขั้วไฟฟ้าหรือบน ePADs ต้องมีความเหมาะสมเนื่องจากสารที่ตรึงลงไปอาจเพิ่มระยะทางของส่วนที่เกิดปฏิกิริยากับขั้วไฟฟ้า (diffusion barrier) ได้ทำให้ความไวในการตรวจวัดลดลง (89, 92) จากงานวิจัยนี้สารรบกวนอีกชนิดคือ hemoglobin เนื่องจาก hemoglobin สามารถย่อยสลาย H_2O_2 ได้จากการที่ hemoglobin ประกอบไปด้วย 4 สายของโพลีเปบไทด์ และ iron พอร์ไฟรินฮีม ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวทำหน้าที่ได้คล้ายกับเอนไซม์ peroxidase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 (109, 110) ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์ควรหลีกเลี่ยงตัวอย่างที่มี hemolysis ซึ่งการแยกเลือดครบส่วนด้วย ePADs ในงานวิจัยนี้ สามารถแยกพลาสมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่มีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงออกมาดังนั้นจึงลดปัญหาการรบกวนจาก hemoglobin ได้

อย่างไรก็ตาม ePADs ในงานวิจัยนี้ มีข้อจำกัดของการทดสอบที่จำเป็นต้องใช้วิธี standard addition ในการหาปริมาณของกลูโคสในสิ่งตัวอย่าง ทำให้ใช้เวลาในการทดสอบมากกว่าการตรวจวิเคราะห์แบบอ่านผลจากกราฟมาตรฐาน (101) ซึ่งในการศึกษานี้ขั้นตอนตั้งแต่แยกเลือดครบส่วนจนกระทั่งวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าใช้เวลาในการทดสอบอยู่ที่ 15 นาทีต่อ 1 ตัวอย่างตรวจ ซึ่งการใช้ standard addition ต้องทำ 3 ความเข้มข้นต่อ 1 ตัวอย่างทำให้ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ถึง 45

นาทีต่อ 1 การทดสอบ ซึ่งถ้าเปรียบเทียบในแง่ของ turnaround time ในการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกที่ต้องรายงานภายใน 60 นาที (111) นั้นถือว่าวิธีนี้ยังอยู่ในช่วงเวลาที่กำหนด แต่ถ้านำมาใช้ในรูปของ point-of-care testing นั้นอาจยังไม่เหมาะสมในด้านเวลาในการรายงานผล ถึงอย่างไรก็ตามถ้านำวิธี standard addition ไปใช้ควบคู่กับเครื่อง electrochemical detection ที่สามารถวัดพร้อมกันได้หลาย port ก็สามารถช่วยลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์เหลือเพียง 15 นาทีได้เช่นกัน

ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วนบน ePADs ที่พัฒนาขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีที่ทั่วทางห้องปฏิบัติการถึงแม้ว่าทั้ง 2 วิธีเมื่อเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ Paired sample T-test มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.6996) แต่การตรวจวัดบน ePADs ค่า standard deviations ในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างตรวจนั้นมีค่ากว้างกว่าวิธีทั่วไปทางห้องปฏิบัติการ อาจมีสาเหตุมาจากการวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษนั้นการควบคุมการไหลของสารในท่อขนาดเล็กและการควบคุมปริมาณของพลาสมาที่แยกได้แต่ละครั้งทำได้ยากกว่าเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ในหลอดทดลอง ซึ่งใช้การปิเปตสารทำให้การควบคุมปริมาตรมีความแม่นยำกว่า

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยวิธีอื่นๆโดยในการเปรียบเทียบนี้จะเปรียบเทียบกับการตรวจวัด 3 แบบ คือ การตรวจวัดเทียบกับวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการโดยใช้ spectrophotometer (63), การตรวจวัดเทียบกับเครื่อง glucometer ที่ใช้ใน point-of-care testing (70, 74) และการตรวจวัดเทียบกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (36) การตรวจวัดกลูโคสในซีรั่มหรือพลาสมาวิธีมาตรฐานที่ใช้คือ หลักการของเอนไซม์ hexokinase โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์สุดท้าย NADPH ที่ความยาวคลื่น340 nm (112) มีช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ 0 – 500 mg/dL (113) และการใช้หลักการของ glucose oxidase วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ คือ quinoneimine ที่ 500 nm มีช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ที่ 0 – 500 mg/dL (114) โดยปกติทั้ง 2 วิธีจะใช้ปริมาณน้ำยาในการทดสอบ 1000 µLและต้องใช้เครื่อง spectrophotometer วัดการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเมื่อเทียบกับ ePADs ในงานวิจัยนี้ ช่วงความเป็นเส้นตรงที่วัดได้ 0-602 mg/dLนั้นตรวจได้ในช่วงที่กว้างกว่าวิธี hexokinase และ glucose oxidase ที่ใช้ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตาม ePADs ใช้ปริมาณน้ำยาสำหรับทดสอบเพียง 5 µL

เมื่อเทียบกับการตรวจวัดในรูปแบบของ point-of-care testing วิธีที่พัฒนาขึ้นมีข้อจำกัดในแง่ของปริมาณตัวอย่างเลือดที่ใช้และระยะเวลาในการรายงานผล แต่ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวิเคราะห์นั้นไม่แตกต่างกันซึ่งโดยทั่วไปเครื่อง glucometer ตรวจวัดได้ในช่วง 10-600 mg/dl (70) ถึงอย่างไรการตรวจโดยใช้เครื่อง glucometer ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการ เช่น

ค่า hematrocrit ที่ต่างกันในแต่ละบุคคลจะรบกวนการตรวจวัดได้ (78) สารรบกวนในตัวอย่างตรวจ อาทิเช่น ยาบางชนิด, ascorbic acid (80) และ O_2 ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงก็รบกวนการตรวจวัดได้เช่นกัน (70) และอีกสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ glucometer พัฒนาให้อยู่ในรูปของระบบปิดดังนั้นถ้ามีก้อน clot ขนาดเล็กหรือมีการเกาะกลุ่มกันของไฟบริน ไม่สามารถมองเห็นได้ ค่าที่ตรวจวัดได้จะต่ำกว่าค่าจริง (78) แต่ ePADs ที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้วิธี standard addition ในการตรวจวิเคราะห์และระบบตรวจวัดเป็นระบบเปิด ส่งผลให้ค่า hematrocrit และสารรบกวนการตรวจวัดที่ต่างกันในแต่ละบุคคลไม่ส่งผลในการตรวจวัด นอกจากนั้นการใช้ระบบเปิดทำให้เห็นได้ว่ามีการ clot ของตัวอย่างเลือดครบส่วนหรือไม่ ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์บน ePADs มีความถูกต้องมากขึ้น

ในส่วนของการเปรียบเทียบกับ μPADs ที่พัฒนามาก่อนหน้านี้ การตรวจวัดกลูโคสโดยใช้ μPADs นั้นมีการพัฒนาขึ้นทั้งหลักการของการวัดสีและวัดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้า สำหรับหลักการของการวัดสีนั้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0-500 mg/dl สำหรับตัวอย่างตรวจที่เป็นซีรั่มหรือพลาสมา (18) และการทดสอบที่ใช้ตัวอย่างที่เป็นเลือดครบส่วนนั้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 50-200 mg/dL(27) สำหรับการวัดระดับกลูโคสโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้านั้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0-1800 mg/dl และใช้ตัวอย่างตรวจจากสารควบคุมคุณภาพ (21) เมื่อเทียบกับ ePADs ที่ได้พัฒนาขึ้นพบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ได้จากเลือดครบส่วนในช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดที่กว้างกว่าวิธีการวัดสีของปฏิกิริยา แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีไฟฟ้าเหมือนกันพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นก่อนหน้ามีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดที่กว้างกว่า แต่โดยทั่วไปแล้วช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดกลูโคสที่ 0-500 mg/dL สำหรับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการถือว่าครอบคลุมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ (114) เนื่องจากเกณฑ์ในการวินิจฉัยในผู้ป่วยเบาหวานคือ $\geq$ 126 mg/dl สำหรับ fasting plasma glucose และ $\geq$ 200 mg/dl สำหรับ 2 hour plasma glucose (51)

กล่าวโดยสรุป ePADs ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดระดับกลูโคสในเชิงปริมาณได้ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดไม่แตกต่างกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจระดับกลูโคสได้ทั้งในผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน การใช้วิธี standard addition ถึงแม้จะเพิ่มเวลาในการทดสอบแต่วิธีดังกล่าวช่วยลดความผิดพลาดที่เกิดจากความแตกต่างของสารชีวเคมีที่มีอยู่ในเลือดครบส่วนของแต่ละบุคคลได้

เอกสารอ้างอิง

(1) Crowley, T.A., and Pizziconi, V. Isolation of plasma from whole blood using planar microfilters for lab-on-a-chip applications. Lab on a Chip 5 (2005): 922-9.

(2) Zhao, W.,Ali, M.M.,Aguirre, S.D.,Brook, M.A., and Li, Y. Paper-based bioassays using gold nanoparticle colorimetric probes. Analytical Chemistry 80 (2008) : 8431-7.

(3) Fang, Q.,Sun, M., and Huang, Y.-Z. Capillary-based microfluidic analysis systems. Analytical and Bioanalytical Chemistry 393 (2009) : 63-6.

(4) Zhang, Q.,Xu, J.J., and Chen, H.Y. Patterning microbeads inside poly (dimethylsiloxane) microfluidic channels and its application for immobilized microfluidic enzyme reactors. Electrophoresis 27 (2006) : 4943-51.

(5) Bao, N.,Zhang, Q.,Xu, J.-J., and Chen, H.-Y. Fabrication of poly (dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer. Journal of Chromatography A 1089 (2005) : 270-5.

(6) Sia, S.K., and Whitesides, G.M. Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies. Electrophoresis 24 (2003) : 3563-76.

(7) Stein, A., and Schmitt, D., Indicator strip. United States Patent 3715192 (1973) : 1-9.

(8) May, K. Home tests to monitor fertility. American Journal of Obstetrics and Gynecology 165 (1991) : 2000-2.

(9) Chen, R., Li, T.M., Merrick, H., Parrish, R.F., Bruno, V., Kwong, A., et al. An internal clock reaction used in a one-step enzyme immunochromatographic assay of theophylline in whole blood. Clinical Chemistry 33 (1987) : 1521-5.

(10) Martinez, A.W.,Phillips, S.T.,Butte, M.J., and Whitesides, G.M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. Angewandte Chemie International Edition 46 (2007) : 1318-20.

(11) Bruzewicz, D.A.,Reches, M., and Whitesides, G.M. Low-cost printing of poly (dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. Analytical Chemistry 80 (2008) : 3387-92.

(12) Abe, K.,Suzuki, K., and Citterio, D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. Analytical Chemistry 80 (2008) : 6928-34.

(13) Li, X.,Tian, J.,Nguyen, T., and Shen, W. Paper-based microfluidic devices by plasma treatment. Analytical Chemistry 80 (2008) : 9131-4.

(14) Fenton, E.M.,Mascarenas, M.R.,López, G.P., and Sibbett, S.S. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. ACS Applied Materials & Interfaces 1 (2008) : 124-9.

(15) Lu, Y.,Shi, W.,Jiang, L.,Qin, J., and Lin, B. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. Electrophoresis 30 (2009) : 1497-500.

(16) Carrilho, E.,Martinez, A.W., and Whitesides, G.M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. Analytical Chemistry 81 (2009) : 7091-5.

(17) Dungchai, W.,Chailapakul, O., and Henry, C.S. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. Analyst 136 (2011) : 77-82.

(18) Songjaroen, T.,Dungchai, W.,Chailapakul, O., and Laiwattanapaisal, W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. Talanta 85 (2011) : 2587-93.

(19) Martinez, A.W.,Phillips, S.T.,Carrilho, E.,Thomas III, S.W.,Sindi, H., and Whitesides, G.M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper- based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. Analytical Chemistry 80 (2008) : 3699-707.

(20) Li, X.,Tian, J., and Shen, W. Quantitative biomarker assay with microfluidic paper-based analytical devices. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396 (2010) : 495-501.

(21) Dungchai, W.,Chailapakul, O., and Henry, C.S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. Analytical Chemistry 81 (2009) : 5821-6.

(22) Yu, J.,Wang, S.,Ge, L., and Ge, S. A novel chemiluminescence paper microfluidic biosensor based on enzymatic reaction for uric acid determination. Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) : 3284-9.

(23) Delaney, J.L.,Hogan, C.F.,Tian, J., and Shen, W. Electrogenerated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors. Analytical Chemistry 83 (2011) : 1300-6.

(24) Liu, H., and Crooks, R.M. Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami. Journal of the American Chemical Society 133 (2011) : 17564-6.

(25) Apilux, A.,Dungchai, W.,Siangproh, W.,Praphairaksit, N.,Henry, C.S., and Chailapakul, O. Lab-on-paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron. Analytical Chemistry 82 (2010) : 1727-32.

(26) Nie, Z., Nijhuis, C.A., Gong, J., Chen, X., Kumachev, A., Martinez, A.W., et al. Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. Lab on a Chip 10 (2010) : 477-83.

(27) Yang, X.,Forouzan, O.,Brown, T.P., and Shevkoplyas, S.S. Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. Lab on a Chip 12 (2012) : 274-80.

(28) Vella, S.J., Beattie, P., Cademartiri, R., Laromaine, A., Martinez, A.W., Phillips, S.T., et al. Measuring markers of liver function using a micropatterned paper device designed for blood from a fingerstick. Analytical Chemistry 84 (2012): 2883-91.

(29) Songjaroen, T.,Dungchai, W.,Chailapakul, O.,Henry, C.S., and Laiwattanapaisal, W. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. Lab on a Chip 12 (2012) : 3392-8.

(30) Martinez, A.W.,Phillips, S.T., and Whitesides, G.M. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. Proceedings of the National Academy of Sciences 105 (2008) : 19606-11.

(31) Klasner, S.A.,Price, A.K.,Hoeman, K.W.,Wilson, R.S.,Bell, K.J., and Culbertson, C.T. Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. Analytical and Bioanalytical Chemistry 397 (2010) : 1821-9.

(32) Nie, J., Zhang, Y., Lin, L., Zhou, C., Li, S., Zhang, L., et al. Low-Cost Fabrication of Paper-Based Microfluidic Devices by One-Step Plotting. Analytical Chemistry 84 (2012) : 6331-5.

(33) Li, X.,Tian, J.,Garnier, G., and Shen, W. Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 76 (2010) : 564-70.

(34) Li, X.,Tian, J., and Shen, W. Progress in patterned paper sizing for fabrication of paper-based microfluidic sensors. Cellulose 17 (2010) : 649-59.

(35) Martinez, A.W.,Phillips, S.T.,Whitesides, G.M., and Carrilho, E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. Analytical Chemistry 82 (2009) : 3-10.

(36) Li, X.,Ballerini, D.R., and Shen, W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. Biomicrofluidics 6 (2012) : 011301.

(37) Dungchai, W.,Chailapakul, O., and Henry, C.S. Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. Analytica Chimica Acta 674 (2010) : 227-33.

(38) Abe, K.,Kotera, K.,Suzuki, K., and Citterio, D. Inkjet-printed paperfluidic immuno-chemical sensing device. Analytical and Bioanalytical Chemistry 398 (2010) : 885-93.

(39) Jokerst, J.C.,Adkins, J.A.,Bisha, B.,Mentele, M.M.,Goodridge, L.D., and Henry, C.S. Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens. Analytical Chemistry 84 (2012) : 2900-7.

(40) Khan, M.S.,Thouas, G.,Shen, W.,Whyte, G., and Garnier, G. Paper diagnostic for instantaneous blood typing. Analytical Chemistry 82 (2010) : 4158-64.

(41) Mentele, M.M.,Cunningham, J.,Koehler, K.,Volckens, J., and Henry, C.S. Microfluidic paper-based analytical device for particulate metals. Analytical Chemistry 84 (2012) : 4474-80.

(42) Shiroma, L.Y.,Santhiago, M.,Gobbi, A.L., and Kubota, L.T. Separation and electrochemical detection of paracetamol and 4-aminophenol in a paper-based microfluidic device. Analytica Chimica Acta 725 (2012) : 44-50.

(43) Santhiago, M., and Kubota, L.T. A new approach for paper-based analytical devices with electrochemical detection based on graphite pencil electrodes. Sensors and Actuators B: Chemical 177 (2013) : 224-30.

(44) Rattanarat, P.,Dungchai, W.,Siangproh, W.,Chailapakul, O., and Henry, C.S. Sodium Dodecyl Sulfate Modified Electrochemical Paper-Based Analytical Device for Determination of Dopamine Levels in Biological Samples. Analytica Chimica Acta 774 (2012) : 1-7.

(45) Yu, J.,Ge, L.,Huang, J.,Wang, S., and Ge, S. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. Lab on a Chip 11 (2011) : 1286-91.

(46) Liana, D.D.,Raguse, B.,Gooding, J.J., and Chow, E. Recent advances in paper-based sensors. Sensors 12 (2012) : 11505-26.

(47) Ge, L.,Wang, S.,Song, X.,Ge, S., and Yu, J. 3D origami-based multifunction-integrated immunodevice: Low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device. Lab on a Chip 12 (2012) : 3150-8.

(48) Nie, Z.,Deiss, F.,Liu, X.,Akbulut, O., and Whitesides, G.M. Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers. Lab on a Chip 10 (2010) : 3163-9.

(49) American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 29 (2006) : S43-8.

(50) Weyer, C.,Bogardus, C.,Mott, D.M., and Pratley, R.E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Journal of Clinical Investigation 104 (1999) :787-94.

(51) American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2013. Diabetes Care 36 (2013) : s12-3.

(52) Butler, A.E.,Janson, J.,Bonner-Weir, S.,Ritzel, R.,Rizza, R.A., and Butler, P.C. β-Cell deficit and increased β-Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes 52 (2003) : 102-10.

(53) Wild, S.,Roglic, G.,Green, A.,Sicree, R., and King, H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 27 (2004) : 1047-53.

(54) Aekplakorn, W., Abbott-Klafter, J., Premgamone, A., Dhanamun, B., Chaikittiporn, C., Chongsuvivatwong, V., et al. Prevalence and Management of Diabetes and Associated Risk Factors by Regions of Thailand Third National Health Examination Survey 2004. Diabetes Care 30 (2007) : 2007-12.

(55) Aekplakorn, W., Stolk, R.P., Neal, B., Suriyawongpaisal, P., Chongsuvivatwong, V., Cheepudomwit, S., et al. The Prevalence and Management of Diabetes in Thai Adults The International Collaborative Study of Cardiovascular Disease in Asia. Diabetes Care 26 (2003) : 2758-63.

(56) Tripathi, B.K., and Srivastava, A.K. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. Medical Science Monitor 12 (2006) : 130-47.

(57) Nathan, D.M. Long-term complications of diabetes mellitus. New England Journal of Medicine 328 (1993) : 1676-85.

(58) Remuzzi, G.,Schieppati, A., and Ruggenenti, P. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. New England Journal of Medicine 346 (2002) : 1145-51.

(59) Fong, D.S., Aiello, L., Gardner, T.W., King, G.L., Blankenship, G., Cavallerano, J.D., et al. Retinopathy in diabetes. Diabetes Care 27 (2004) : s84-7.

(60) Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. Circulation Research 88 (2001) : E14-22.

(61) Grundy, S.M., Benjamin, I.J., Burke, G.L., Chait, A., Eckel, R.H., Howard, B.V., et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circulation 100 (1999): 1134-46.

(62) Hsueh, W.A., and Quiñones, M.J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. The American Journal of Cardiology 92 (2003) : 10-7.

(63) Hagvik, J. Glucose measurement: time for a gold standard. Journal of Diabetes Science and Technology 1 (2007) : 169-72.

(64) Burrin, J.M., and Alberti, K.G.M.M. What is Blood Glucose: Can it be Measured? Diabetic Medicine 7 (1990) : 199-206.

(65) Price, C.P. Point of care testing. British Medical Journal 322 (2001) : 1285-8.

(66) Trinder, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. Journal of Clinical Pathology 22 (1969) : 158-61.

(67) Marks, V. An improved glucose-oxidase method for determining blood CSF and urine glucose levels. Clinica Chimica Acta 4 (1959) : 395-400.

(68) Wright, W.R.,Rainwater, J.C., and Tolle, L.D. Glucose assay systems: evaluation of a colorimetric hexokinase procedure.Clinical Chemistry 17 (1971) : 1010-5.

(69) Peterson, J.I., and Young, D.S. Evaluation of the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method of determination of glucose in urine. Analytical Biochemistry 23 (1968): 301-16.

(70) Yoo, E.-H., and Lee, S.-Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. Sensors 10 (2010) : 4558-76.

(71) Heller, A., and Feldman, B. Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. Chemical Reviews 108 (2008) : 2482-505.

(72) Bankar, S.B.,Bule, M.V.,Singhal, R.S., and Ananthanarayan, L. Glucose oxidase an overview. Biotechnology Advances 27 (2009) : 489-501.

(73) Bartlett, P.N., and Whitaker, R.G. Strategies for the development of amperometric enzyme electrodes. Biosensors 3 (1987) : 359-79.

(74) Newman, J.D., and Turner, A.P.F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) :2435-53.

(75) Jin, W.,Wollenberger, U., and Scheller, F. PQQ as redox shuttle for quinoprotein glucose dehydrogenase. Biological Chemistry379 (1998) : 1207-11.

(76) Alex, C.P.,Manto, J.C., and Garland, J.S. Clinical utility of a bedside blood analyzer for measuring blood chemistry values in neonates. Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association 18 (1998) : 45-8.

(77) Winkelman, J.W.,Wybenga, D.R., and Tanasijevic, M.J. The fiscal consequences of central vs distributed testing of glucose. Clinical Chemistry 40 (1994) : 1628-30.

(78) Tang, Z.,Lee, J.H.,Louie, R.F., and Kost, G.J. Effects of different hematocrit levels on glucose measurements with handheld meters for point-of-care testing. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 124 (2000) : 1135-40.

(79) Tang, Z.,Du, X.,Louie, R.F., and Kost, G.J. Effects of pH on glucose measurements with handheld glucose meters and a portable glucose analyzer for point-of-care testing. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 124 (2000) : 577-82.

(80) Tang, Z.,Du, X.,Louie, R.F., and Kost, G.J. Effects of drugs on glucose measurements with handheld glucose meters and a portable glucose analyzer. American Journal of Clinical Pathology 113 (2000) : 75-86.

(81) เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ. บทนำ. ใน เคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า, หน้า 1-4. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

(82) Grieshaber, D.,MacKenzie, R.,Vörös, J., and Reimhult, E. Electrochemical biosensors-Sensor principles and architectures. Sensors 8 (2008) : 1400-58.

(83) Bioanalytical Systems. Cyclic Voltammetry - Data Analysis. [Online]. 2000. Available from : http://www.basinc.com/mans/EC_epsilon/Techniques/ CycVolt /cv_analysis.html [2013, April 1]

(84) Luppa, P.B.,Sokoll, L.J., and Chan, D.W. Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. Clinica Chimica Acta 314 (2001) : 1-26.

(85) เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ. หลักการขั้นมูลฐานของเคมีไฟฟ้าในการวิเคราะห์. ใน เคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า, หน้า 20. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

(86) ALS. Electrochemical electrodes and accessories. [Online]. 2012. Available from: http://www.als-japan.com/1046.html [2013, April 1]

(87) Metrohm USA. Screen-Printed electrodes (SPEs). [Online]. 2010. Available from:http://www.metrohmusa.com/Products/Echem/DropSenselectrodes /Screen-Printed-Electrodes/index.html [2012, March 15]

(88) Zhou, J.-L.,Nie, P.-P.,Zheng, H.-T., and Zhang, J.-M. Progress of Electrochemical Biosensors Based on Nicotinamide Adenine Dinucleotide (phosphate)-Dependent Dehydrogenases. Chinese Journal of Analytical Chemistry 37 (2009) : 617-23.

(89) Karyakin, A.A.,Karyakina, E.E., and Gorton, L. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. Talanta 43 (1996) : 1597-606.

(90) Moscone, D.,D'ottavi, D.,Compagnone, D.,Palleschi, G., and Amine, A. Construction and analytical characterization of Prussian blue-based carbon paste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors. Analytical Chemistry 73 (2001) : 2529-35.

(91) Karyakin, A.A.,Gitelmacher, O.V., and Karyakina, E.E. Prussian Blue-Based First-Generation Biosensor. A Sensitive Amperometric Electrode for Glucose. Analytical Chemistry 67 (1995) : 2419-23.

(92) Ricci, F., and Palleschi, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. Biosensors and Bioelectronics 21 (2005) : 389-407.

(93) Haghighi, B.,Varma, S.,Alizadeh Sh, F.,Yigzaw, Y., and Gorton, L. Prussian blue modified glassy carbon electrodes—study on operational stability and its application as a sucrose biosensor. Talanta 64 (2004) : 3-12.

(94) Gurban, A.-M.,Noguer, T.,Bala, C., and Rotariu, L. Improvement of NADH detection using Prussian blue modified screen-printed electrodes and different strategies of immobilisation. Sensors and Actuators B: Chemical 128 (2008) : 536-44.

(95) Karyakin, A.A.,Gitelmacher, O.V., and Karyakina, E.E. A high-sensitive glucose amperometric biosensor based on Prussian Blue modified electrodes. Analytical Letters 27 (1994) : 2861-9.

(96) Deng, Q.,Li, B., and Dong, S. Self-gelatinizable copolymer immobilized glucose biosensor based on Prussian Blue modified graphite electrode (dagger). Analyst 123 (1998) : 1995-9.

(97) de Mattos, I.L.,Gorton, L., and Ruzgas, T. Sensor and biosensor based on Prussian Blue modified gold and platinum screen printed electrodes. Biosensors and Bioelectronics 18 (2003) : 193-200.

(98) Lupu, A.,Compagnone, D., and Palleschi, G. Screen-printed enzyme electrodes for the detection of marker analytes during winemaking. Analytica Chimica Acta 513 (2004) : 67-72.

(99) Pazur, J.H., and Kleppe, K. The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from Aspergillus niger*. Biochemistry 3 (1964) : 578-83.

(100) Saxberg, B.E., and Kowalski, B.R. Generalized standard addition method. Analytical Chemistry 51 (1979) : 1031-8.

(101) Košcielniak, P. Nonlinear calibration by the standard addition method. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 47 (1999) : 275-87.

(102) Bland, J.M., and Altman, D.G. Measuring agreement in method comparison studies. Statistical Methods in Medical Research 8 (1999) : 135-60.

(103) Passing, H., and Bablok, W. 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. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 21 (1983) : 709-20.

(104) GE Healthcare. Clinical Diagnostics without boundaries. [Online]. 2010. Available from : http://www.whatman.com/References/Diagnostic_Catalog_21_2010_03 _05_final_LR.pdf [2013, April 26]

(105) Besarab, A., Bolton, W.K., Browne, J.K., Egrie, J.C., Nissenson, A.R., Okamoto, D.M., et al. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. New England Journal of Medicine 339 (1998) : 584-90.

(106) Mohan, C. Buffers. Germany : EMD Biosciences, 2003.

(107) Ricci, F.,Amine, A.,Palleschi, G., and Moscone, D. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. Biosensors and Bioelectronics 18 (2003) : 165-74.

(108) Martinello, F., and da Silva, E.L. Ascorbic acid interference in the measurement of serum biochemical parameters: In vivo and in vitro studies. Clinical Biochemistry 39 (2006) : 396-403.

(109) Yücel, D., and Dalva, K. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical tests. Clinical Chemistry 38 (1992) : 575-7.

(110) Sun, W.,Jiang, H., and Jiao, K. Electrochemical determination of hydrogen peroxide usingo-dianisidine as substrate and hemoglobin as catalyst. Journal of Chemical Sciences 117 (2005) : 317-22.

(111) Hawkins, R.C. Laboratory turnaround time. The Clinical Biochemist Reviews 28 (2007) : 179-94.

(112) Neeley, W.E. Simple automated determination of serum or plasma glucose by a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method. Clinical Chemistry 18 (1972) : 509-15.

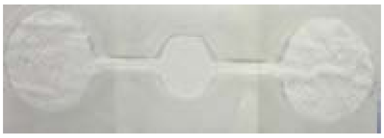
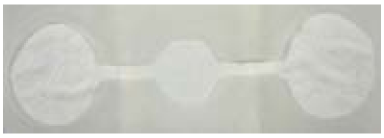
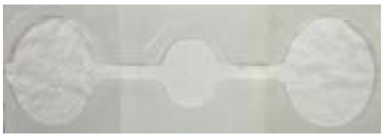
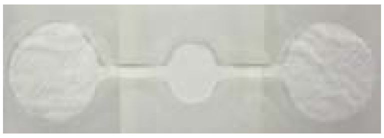
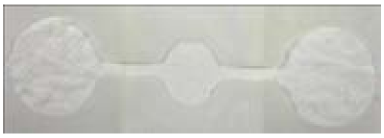
(113) Bondar, R.J., and Mead, D.C. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides in the hexokinase method for determining glucose in serum. Clinical Chemistry 20 (1974) : 586-90.

(114) Basagni, U., and Bonicolini, F., Ready to use liquid reagent for determining the glucose content in blood. United States Patent 5,077,199 (1991) : 1-6.

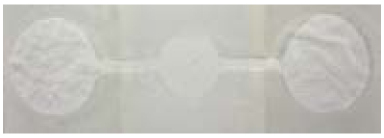
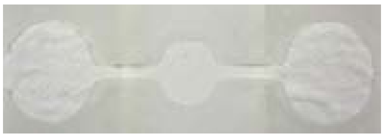
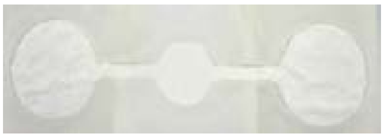
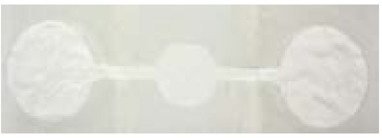
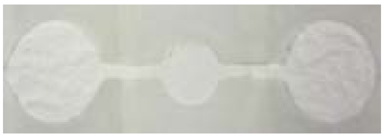
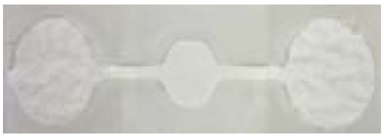
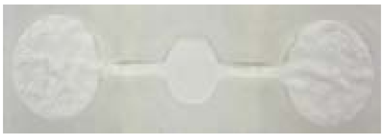
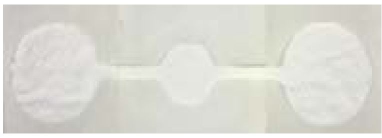
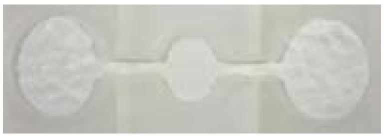
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

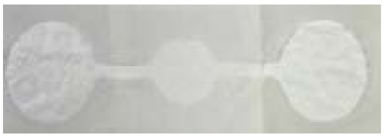
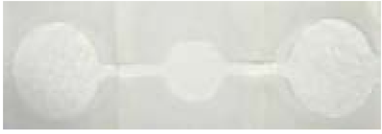
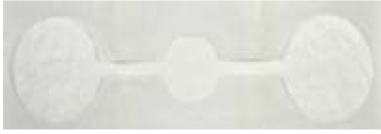
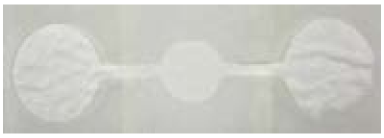
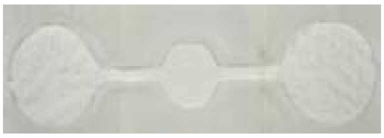
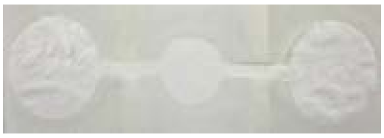
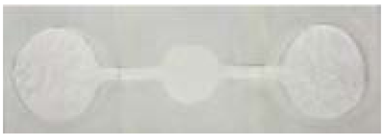
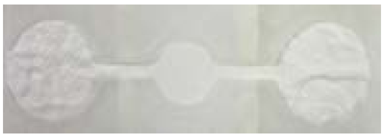
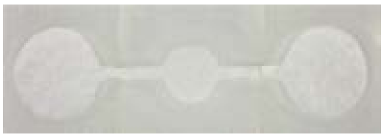
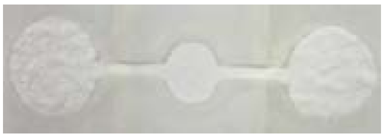
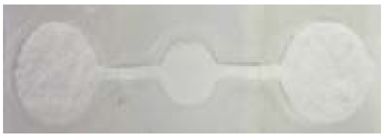
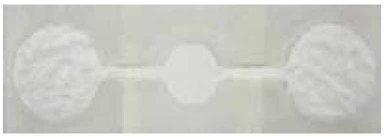
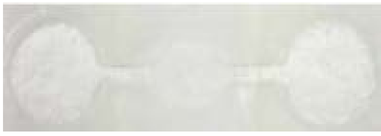
ตารางที่ ก.1 ผลการทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างลวดลายบนกระดาษของ VF2-μPADs

Time (Sec)	Temperature ($^{\circ}$C)	
	100	105
1		
2		
3		
4		
5		
10		
15		

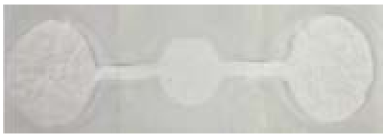
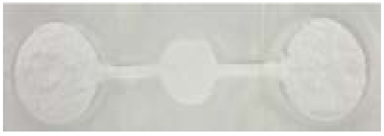
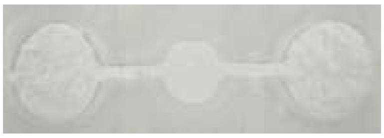
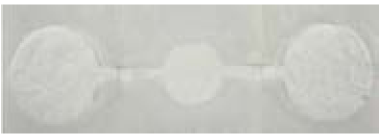
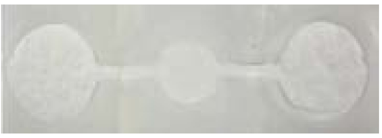
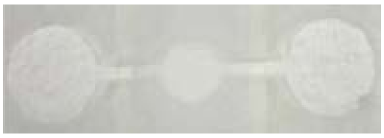
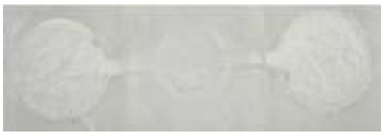
ตารางที่ ก.1 (ต่อ) ผลการทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างลวดลายบนกระดาษของ VF2-μPADs

Time (Sec)	Temperature (^{o}C)	
	110	115
1		
2		
3		
4		
5		
10		
15		

ตารางที่ ก.1 (ต่อ) ผลการทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างลวดลายบนกระดาษของ VF2-μPADs

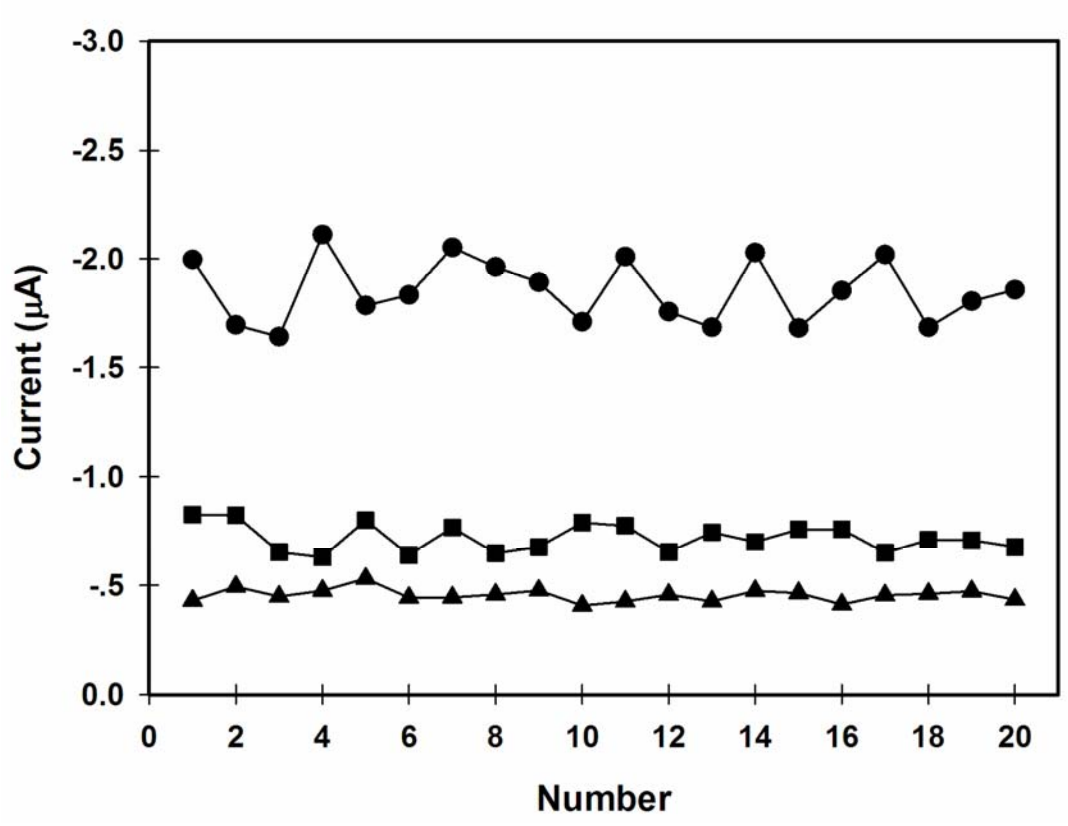
Time (Sec)	Temperature (°C)	
	120	125
1		
2		
3		
4		
5		
10		
15		

ตารางที่ ก.1 (ต่อ) ผลการทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างลวดลายบนกระดาษของ VF2-μPADs

Time (Sec)	Temperature (^{o}C)
	130
1	
2	
3	
4	
5	
10	
15	

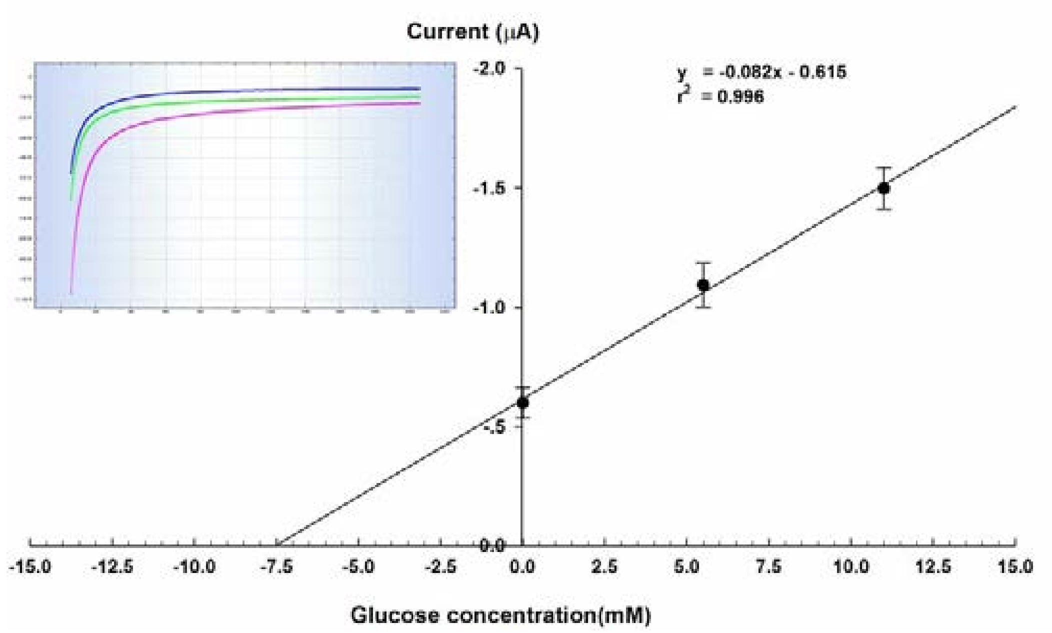
ตารางที่ ก.2 ผลการทดสอบความแม่นยำของ ePADs ในการวัดค่ากระแสที่กลูโคสระดับความเข้มข้นต่างๆ

Glucose conc (mM ± SD) / No.	**3.4 ± 0.1**	**6.3 ± 0.1**	**15.6 ± 0.1**
1	-0.429	-0.825	-1.997
2	-0.493	-0.822	-1.696
3	-0.447	-0.653	-1.642
4	-0.475	-0.628	-2.112
5	-0.530	-0.799	-1.785
6	-0.443	-0.639	-1.834
7	-0.444	-0.765	-2.053
8	-0.457	-0.647	-1.964
9	-0.476	-0.676	-1.893
10	-0.406	-0.788	-1.710
11	-0.425	-0.773	-2.011
12	-0.456	-0.652	-1.756
13	-0.425	-0.743	-1.685
14	-0.474	-0.699	-2.029
15	-0.463	-0.757	-1.681
16	-0.411	-0.758	-1.854
17	-0.454	-0.649	-2.020
18	-0.460	-0.708	-1.685
19	-0.472	-0.706	-1.806
20	-0.433	-0.676	-1.858
Mean current (μA)	**-0.454**	**-0.718**	**-1.854**
SD	**0.03**	**0.06**	**0.15**
%CV	**6.5**	**9.0**	**8.0**

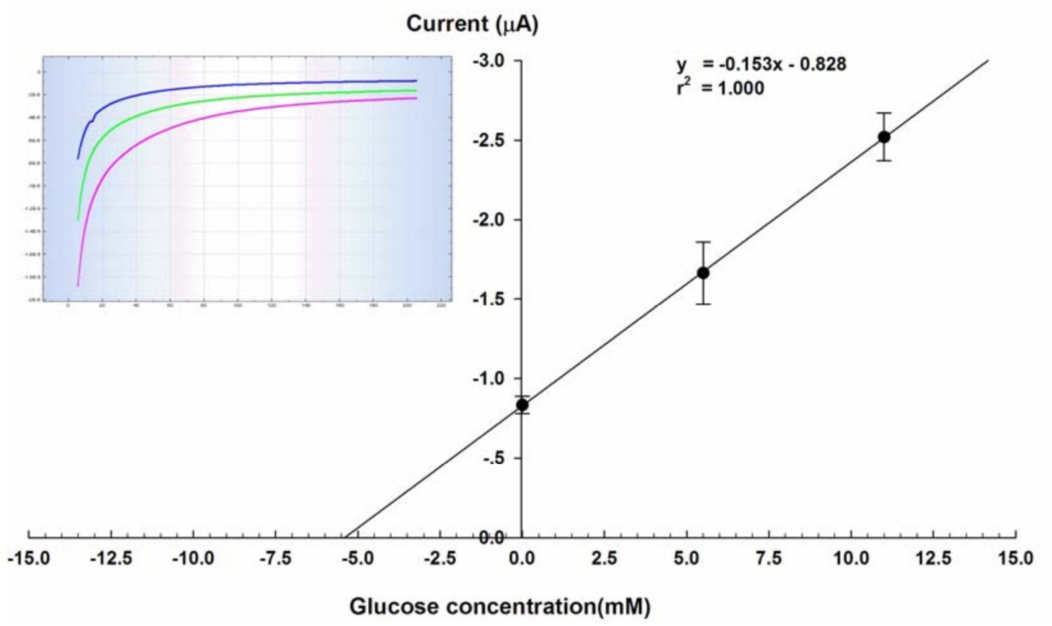


ภาพที่ ก.1 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของ ePADs ในการการวัดค่ากระแสที่กลูโคสระดับความเข้มข้นต่างๆ (▲ แทนความเข้มข้นของกลูโคส 3.4 ± 0.1 mM, ■ แทนความเข้มข้นของกลูโคส 6.3 ± 0.1 mM ● แทนความเข้มข้นของกลูโคส 15.6 ± 0.1 mM)

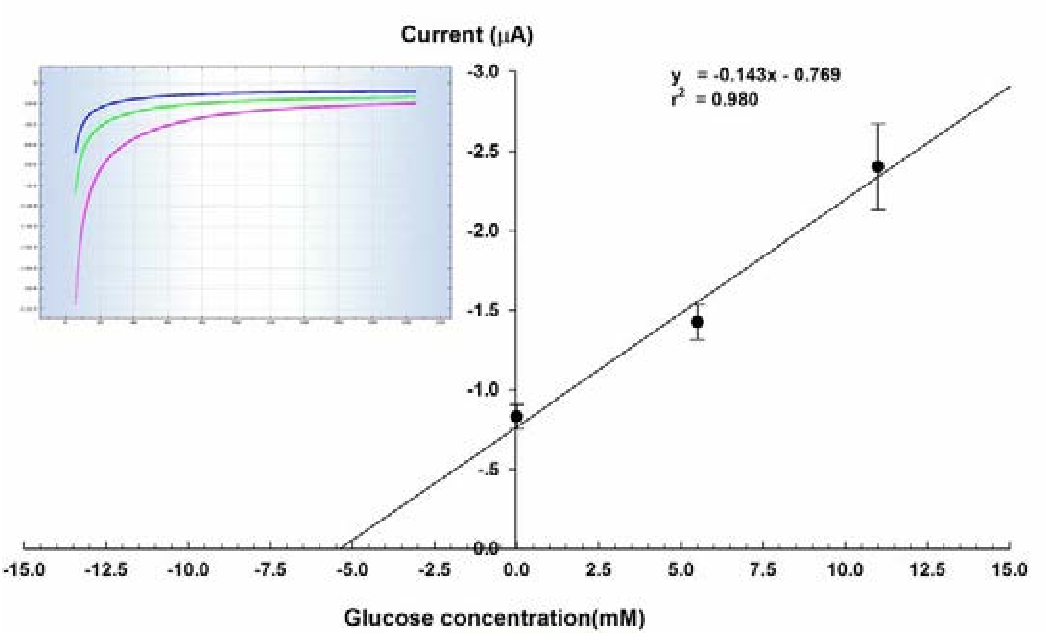
ผลการตรวจวัดระดับจากเลือดครบส่วนบน ePADs ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิค chronoamperometry



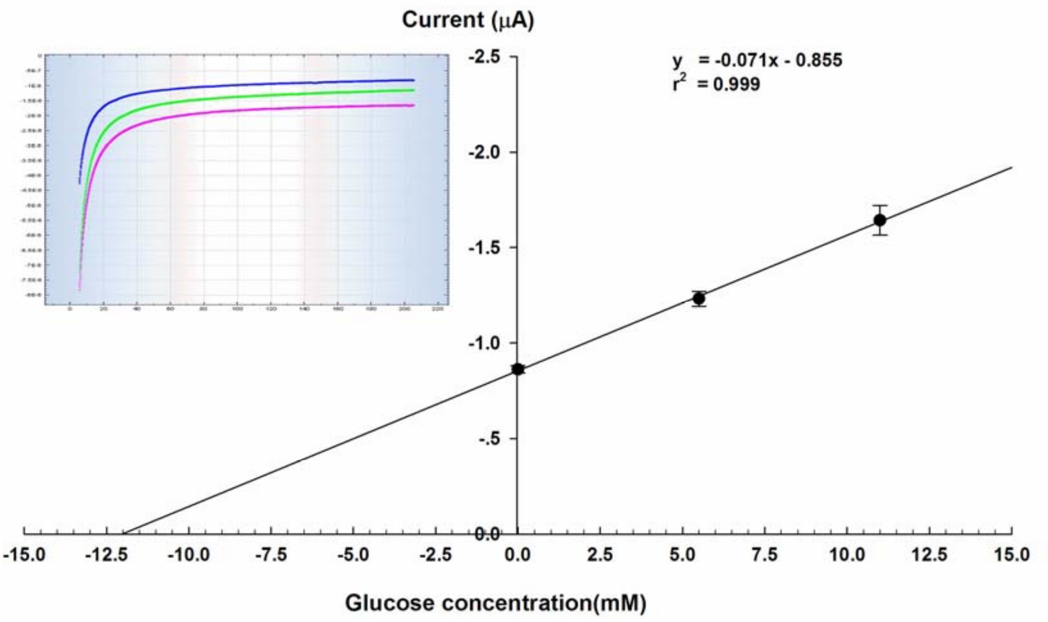
ภาพที่ ก.2 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 1 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



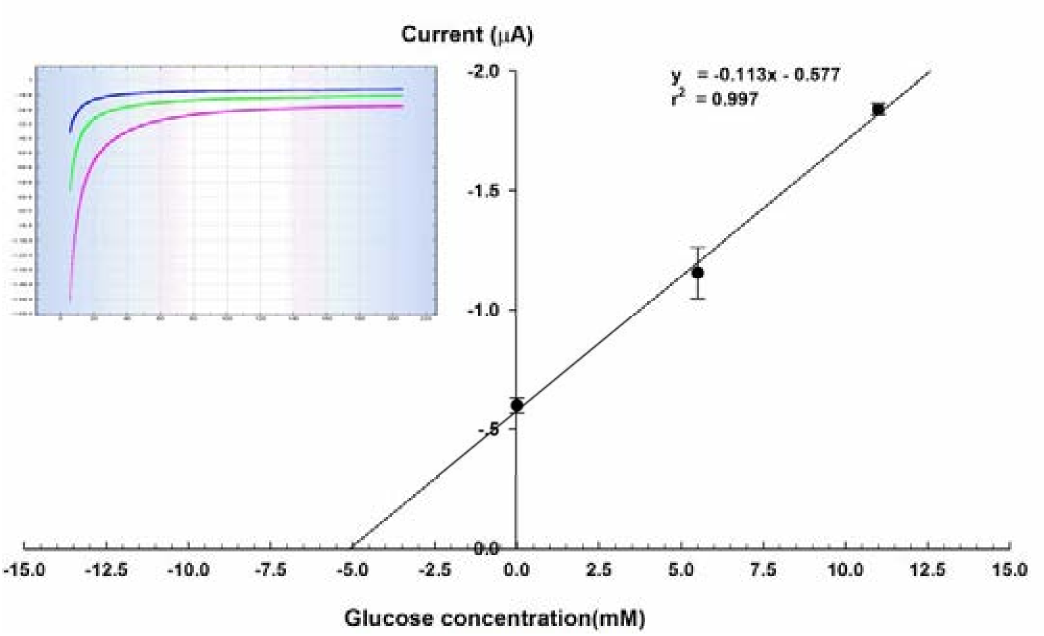
ภาพที่ ก.3 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 2 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



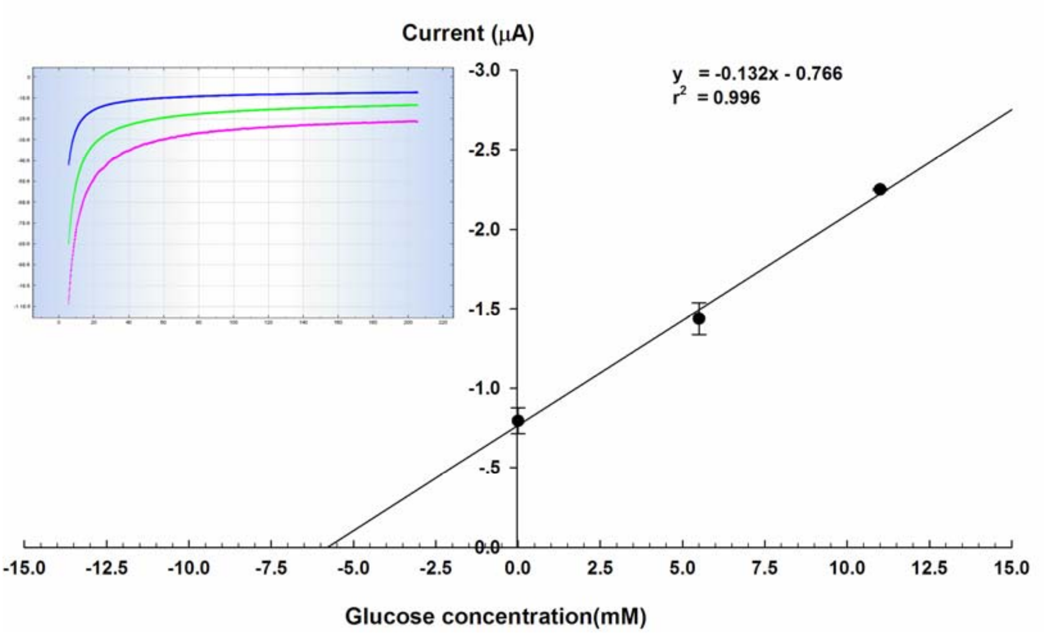
ภาพที่ ก.4 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 3 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



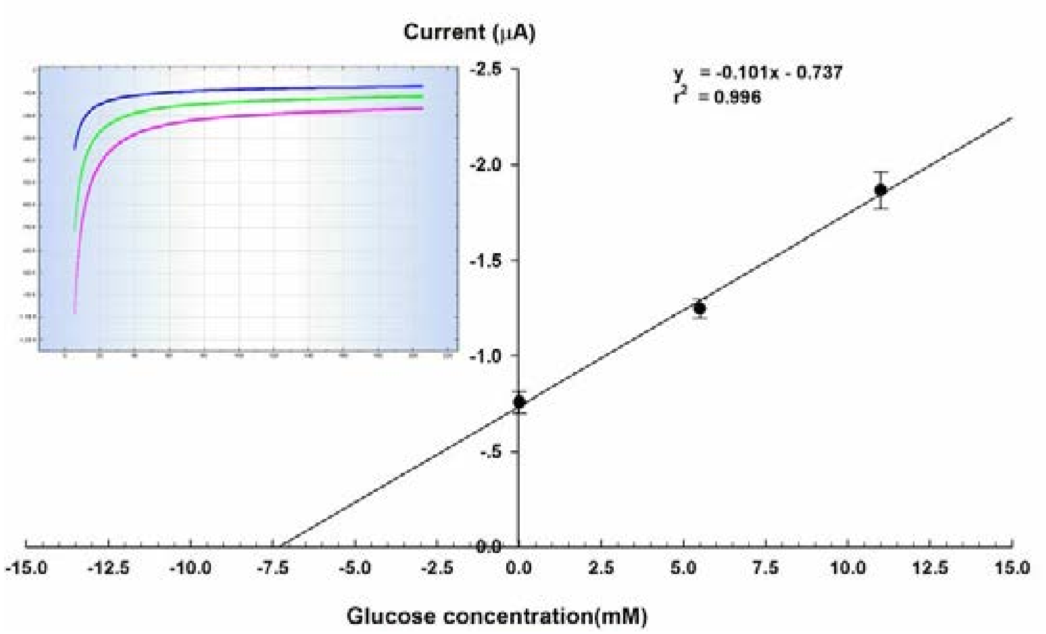
ภาพที่ ก.5 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 4 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



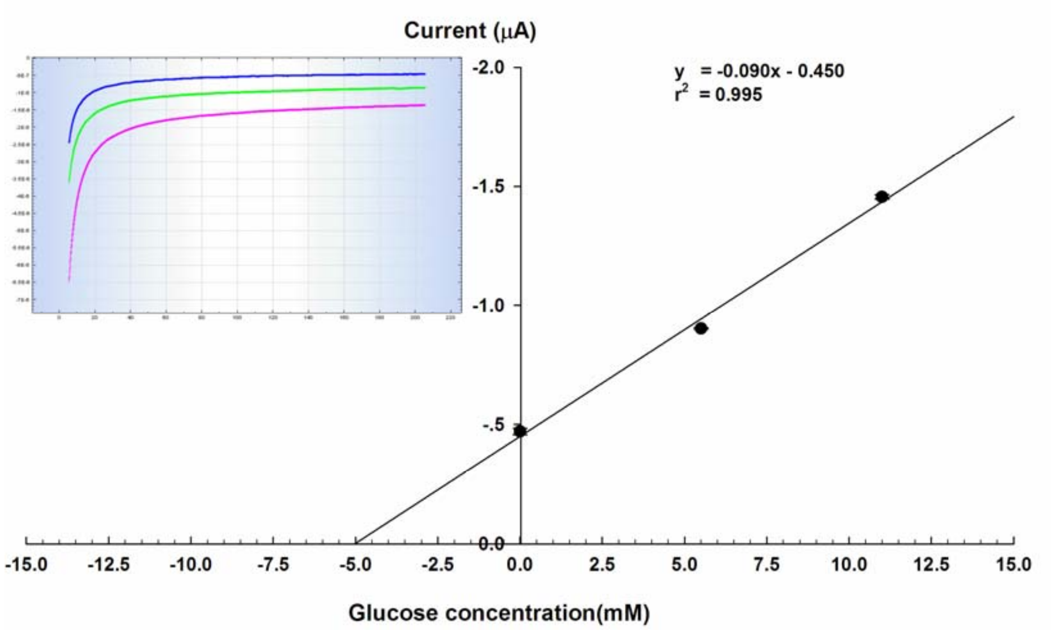
ภาพที่ ก.6 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 5 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



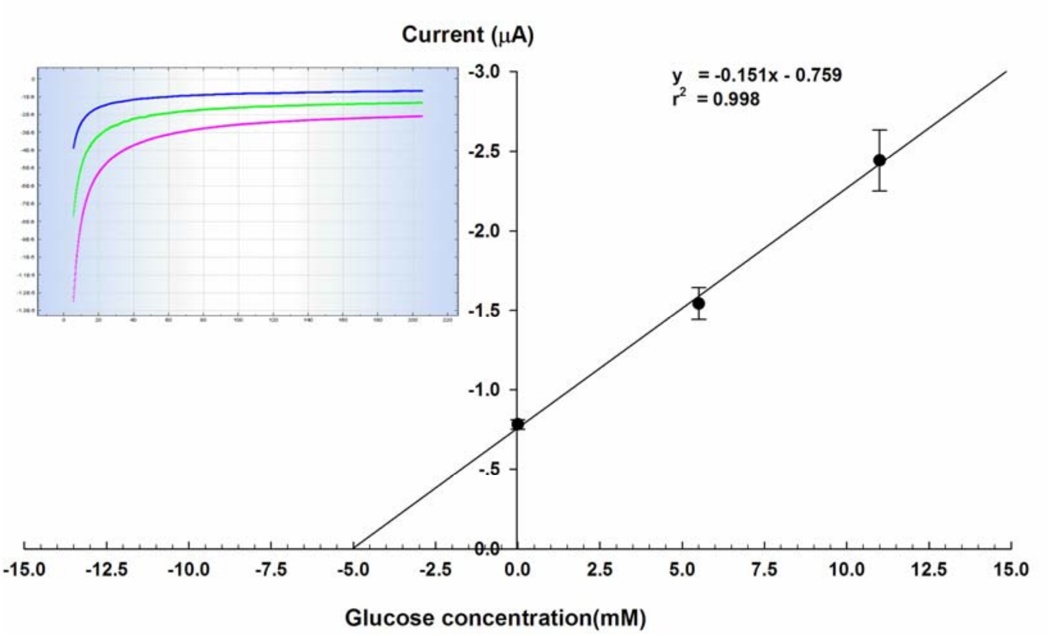
ภาพที่ ก.7 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 6 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



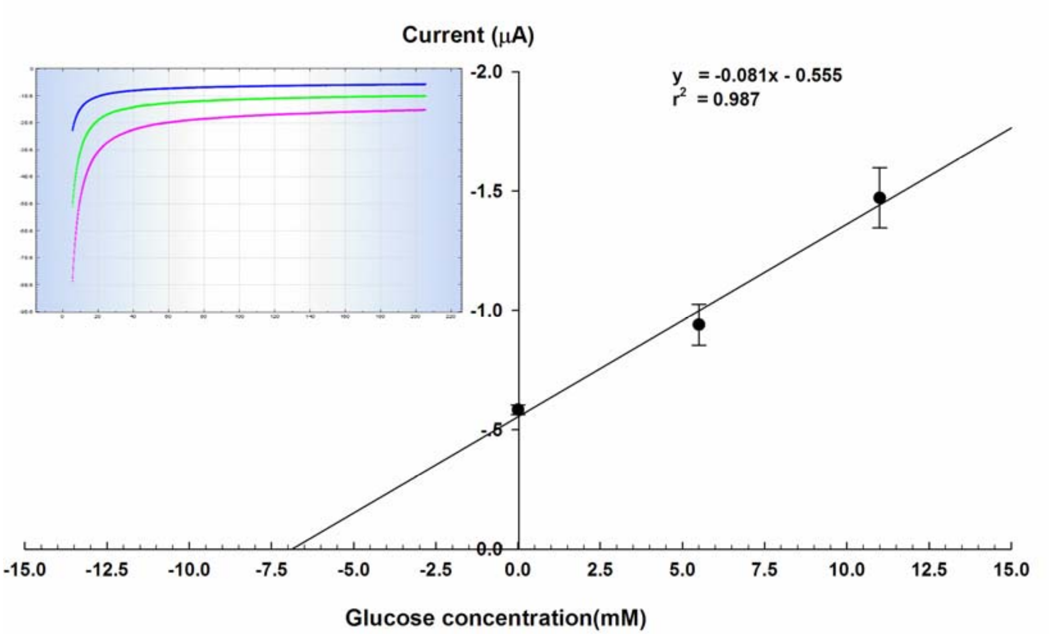
ภาพที่ ก.8 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 7 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



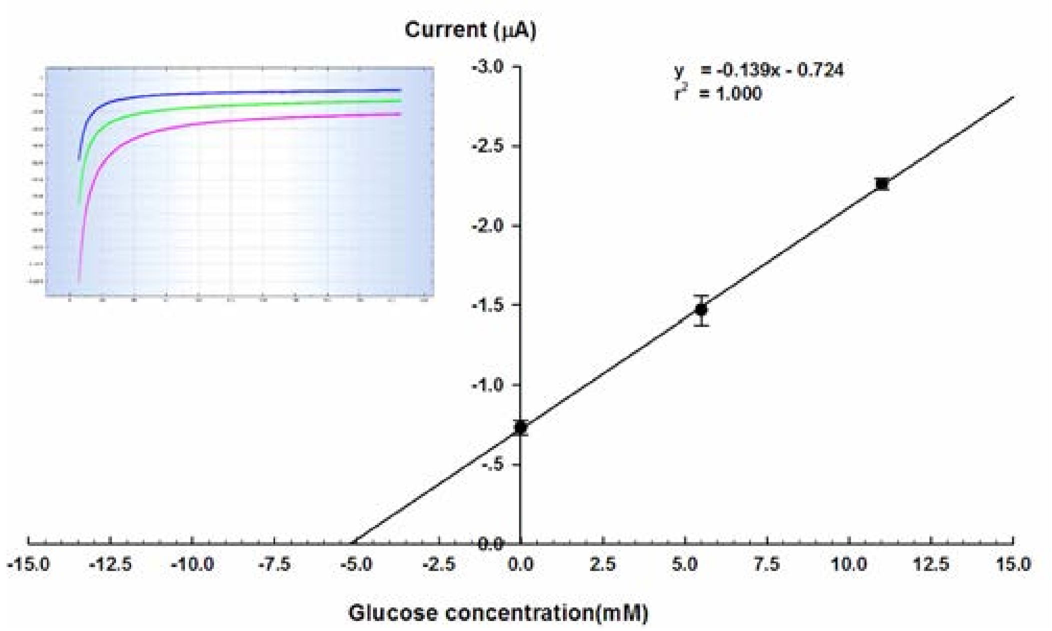
ภาพที่ ก.9 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 8 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



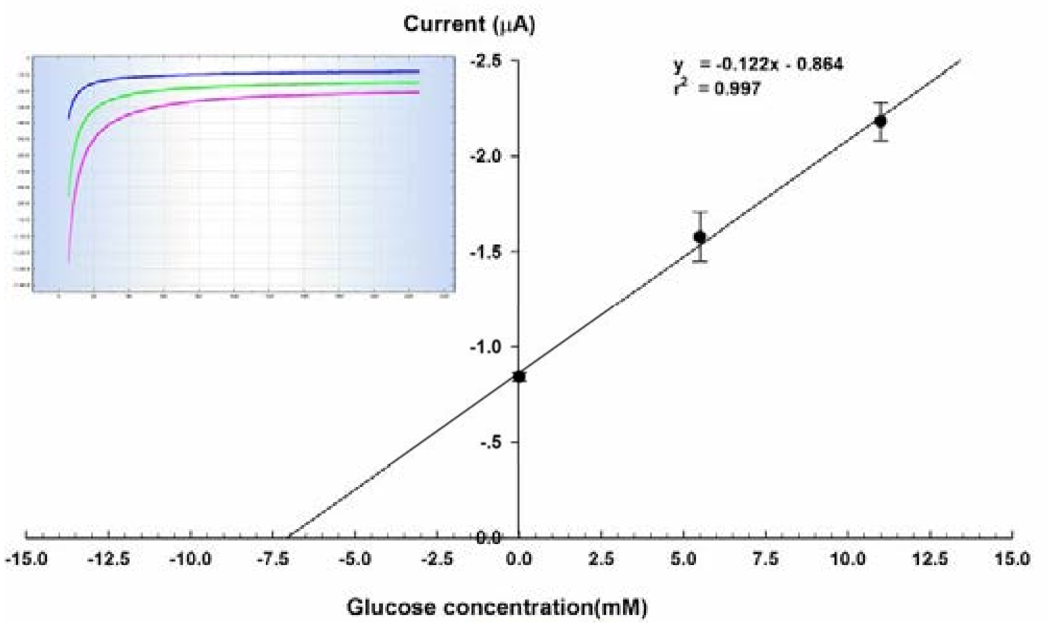
ภาพที่ ก.10 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 9 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



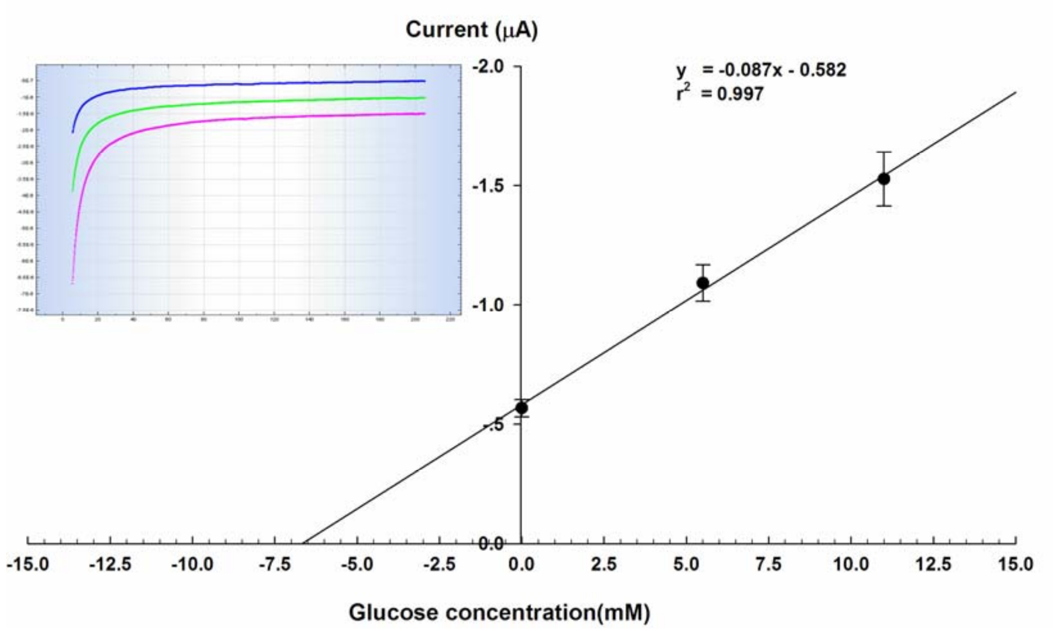
ภาพที่ ก.11 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 10 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



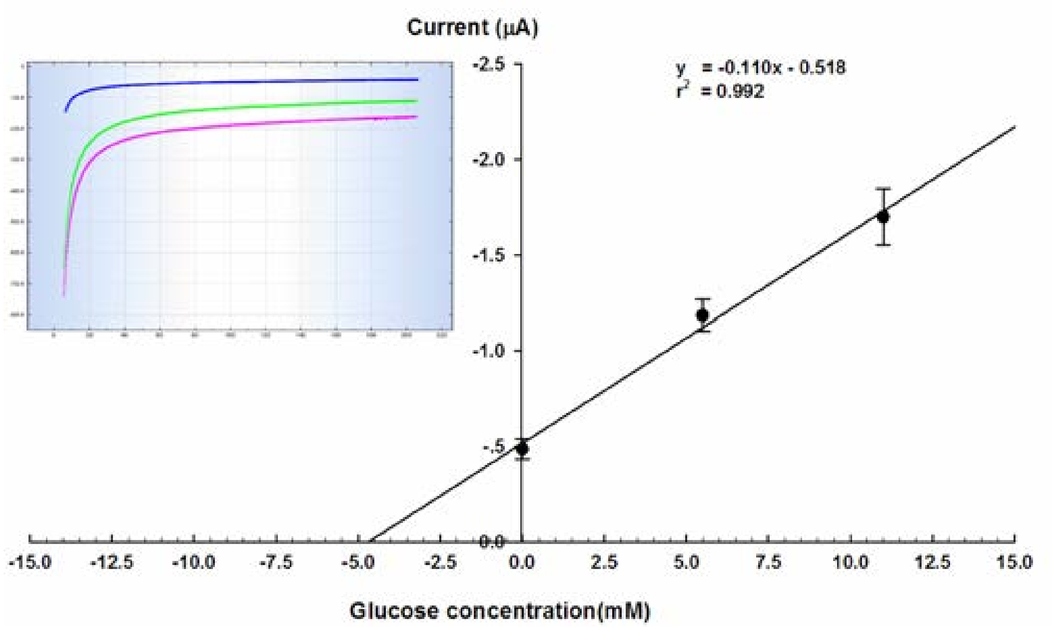
ภาพที่ ก.12 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 11 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



ภาพที่ ก.13 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 12 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



ภาพที่ ก.14 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 13 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)



ภาพที่ ก.15 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ 14 ภาพแทรกแสดง chronoamperogram ของการวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard addition (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับใช้ในการทดลอง

1. การเตรียม 100 mM potassium phosphate buffer

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 ข.1 การเตรียม phosphate buffer

pH	Solution A (mL)	Solution A (mL)
6	17.54	2.46
6.5	13.7	6.3
7	7.8	12.2
7.5	3.2	16.8

ใช้สัดส่วนระหว่างสาร A และ B ตามตารางจากนั้นเติมน้ำอีก 80 mL ให้ครบ 100 mL ทำให้ได้ pH ที่ต้องการโดยไม่ต้องปรับ pH ก่อนนำมาใช้งานให้กรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 µm

2. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส 300 mM

Glucose (MW = 180.16 g/mol)

ชั่ง Glucose 0.54 g

เติมน้ำให้ครบ 10 ml

ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมงเพื่อให้สารละลายกลูโคสเกิดกระบวนการ mutarotate นำเก็บเข้าที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3. ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ Glucose oxidase 645 KU/L (17,300 units/G)

ในการทดสอบทำการเตรียมเอนไซม์ Glucose oxidase ใหม่ทุกครั้งโดย

ชั่ง Glucose oxidase 3.8 mg

เติม 0.1 M potassium phosphate buffer 100 µL

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง เกิดเมื่อวันที่ 23 กุมภาพันธ์ 2527 ที่จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2548 และได้เริ่มงานในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลพญาไท 1 เมื่อ 1 กุมภาพันธ์ 2549 และปี 2552 ได้ปรับเป็นนักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ และลาออกเพื่อเข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 ซึ่งในขณะที่ศึกษานั้นได้รับรางวัลนิสิตดีเด่น ระดับบัณฑิตศึกษาคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยประจำปีการศึกษา 2555 และได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย