การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินิน ในปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์

นางสาวขวัญฤทัย ตาละลักษณ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVERLOPMENT OF AN ENZYMATIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE FOR THE DETERMINATION OF URINE CREATININE

Miss Kwanrutai Talalak

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์
โดย	นางสาวขวัญฤทัย ตาละลักษณ์
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

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

Chulalongkorn University

ขวัญฤทัย ตาละลักษณ์ : การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์ (DEVERLOPMENT OF AN ENZYMATIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE FOR THE DETERMINATION OF URINE CREATININE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล, 123 หน้า.

ครีแอทินินเป็นตัวบ่งชี้หนึ่งที่ถูกใช้ในการประเมินสมรรถภาพการทำงานของไต งานวิจัยนี้พัฒนาอุปกรณ์การตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์ที่มีราคาถูก หรือเรียกว่า enz-PAD โดยใช้ปริมาตรน้ำยาที่เหลือจากตลับน้ำยาสำเร็จรูปของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติในห้องปฏิบัติการทางคลินิกมาสร้าง enz-PAD บนกระดาษ Whatman No.3 ที่มีขนาด 4 x 40 มิลลิเมตรและมีบริเวณในการดูดซับน้ำยา 2 ชนิดแยกส่วนกัน การตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะทดสอบโดยจุ่ม enz-PAD ลงในหลุมที่มีตัวอย่างตรวจ เพื่อให้ครีแอทินินในตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ด้วยแรงแคปิลลารีของกระดาษมาทำปฏิกิริยากับน้ำยาที่ถูกดูดซับไว้ แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีสะสมอยู่ที่บริเวณตรวจวัดสีที่เกิดขึ้น เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ครีแอทินิเนส เอนไซม์ครีแอทิเนส และเอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดสที่เปลี่ยนครีแอทินินในตัวอย่างตรวจเป็น H_2O_2 ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ 4-aminophenazone และ 2,4,6-triiodo-3-hydrozybenzoic acid โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูของ quinoneimine บนพื้นที่สำหรับตรวจวัด การตรวจวัดครีแอทินินด้วย enz-PAD ที่พัฒนาขึ้น มีช่วงความเป็นเส้นตรง 2.5 – 25 mg dL^{-1} (r^2 = 0.983) และความสามารถในการตรวจวัดต่ำสุดเท่ากับ 1.9 mg dL^{-1} เมื่อทำการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะที่ผ่านการเจือจางแล้วด้วย enz-PAD เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั้ง 2 วิธีคือ วิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้น (r^2) เท่ากับ 0.977 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.606, paired sample t-test, n = 40) และวิธีเอนไซม์มีความสัมพันธ์เชิงเส้น (r^2) เท่ากับ 0.911 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.858, paired sample t-test, n = 50) ดังนั้นอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นถือเป็นวิธีทางเลือกใหม่สำหรับตรวจกรองปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ เนื่องจากใช้งานง่าย ราคาถูก อีกทั้งยังมีประโยชน์อย่างมากสำหรับการใช้งานในประเทศกำลังพัฒนา

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557

5576667037 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEYWORDS: LAB-ON-PAPER / PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICES / DEAD-VOLUME REAGENT / ENZYMATIC ASSAY / URINE CREATININE / LOW-COST DIAGNOSTIC

KWANRUTAI TALALAK: DEVERLOPMENT OF AN ENZYMATIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE FOR THE DETERMINATION OF URINE CREATININE. ADVISOR: ASST. PROF. WANIDA LAIWATTANAPAISAL, 123 pp.

Creatinine is one of many markers used to investigate kidney function. This paper describes a low-cost enzymatic paper-based analytical device (enz-PAD) for determining urine creatinine. The disposable dead volumes of creatinine enzyme reagents from an automatic analyser cassette were utilised. Whatman No. 3 paper was cut into long rectangular shapes (4x40 mm) on which the enzyme reagents, R1 and R2, were adsorbed in two consecutive regions. The assay was performed by immersing test strips into urine samples contained in microwells to allow the creatinine in the sample to react with the immobilised active ingredients and, then, traverse via capillary action to the detection area where the chromogen products accumulated. The method is based on hydrogen peroxide (H_2O_2) formation via creatinine conversion using creatininase, creatinase, and sarcosine oxidase. The liberated H_2O_2 reacts with 4-aminophenazone and 2,4,6-triiodo-3-hydroxybenzoic acid to form quinoneimine with a pink-red colour at the detection zone. The linear range of the creatinine assay was 2.5 - 25 mg dL^{-1} (r^2 = 0.983), and the detection limit was 1.9 mg dL^{-1}. The colorimetric enz-PADs for the creatinine assay were highly correlated and were not significantly different with the conventional kinetic alkaline picrate method (r^2 = 0.977; p = 0.606, paired sample t-test, n = 40) and enzymatic method (r^2 = 0.911; p = 0.858, paired sample t-test, n = 50) when real urine samples were evaluated. This simple and nearly zero-cost paper-based device provides a novel alternative method for screen for urinary creatinine.

Department:	Clinical Chemistry	Student's Signature	.....
Field of Study:	Clinical Biochemistry and Molecular Medicine	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2014		

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นผู้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา และแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในการทำงานวิจัย ตลอดจนติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย ทั้งยังให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในทุกๆ ด้าน จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้และให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ นางสาวรสริน แสวงศักดิ์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลพญาไท 1 ที่เอื้อเฟื้อน้ำยาสำเร็จรูป Creatinine plus ver.2 ที่เหลือในตลับน้ำยาจากการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ และขอขอบคุณอาสาสมัครที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด 90 ตัวอย่าง เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเงินทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 25 ครั้งที่ 3/2556 (เลขที่ GCUGR11255725106M) และทุนอุดหนุนการศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เงินทุนสำหรับนิสิตระดับปริญญาโทไปนำเสนอผลงานวิชาการในต่างประเทศ จากบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยบางส่วนจากทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ของศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ โดยเฉพาะนางสาวจุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง และนางสาวเต็มศิริ ทรงเจริญ ที่คอยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญรูปภาพ ..... ฏ

สารบัญตาราง ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

1.5 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

2.1 ไตและหน้าที่ของไต 6

2.2 ครีเอทีน (creatine) 7

2.3 ครีแอทินิน (creatinine) และประโยชน์ของการตรวจวัด 9

2.4 วิธีการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินิน 11

2.4.1 วิธี alkaline picrate Jaffé reaction หรือ modified Jaffé reaction (kinetic assay) 11

2.4.2 วิธีเอนไซม์ (enzymatic method) 12

2.4.3 การตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยวิธีอื่นๆ 17

2.5 กระดาษและประโยชน์ของกระดาษ 20

2.5.1 วิธีการสร้างขอบเขตบนกระดาษ 21

2.5.2 ตัวอย่างเทคนิคในการตรวจวัดบนกระดาษ 26

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 28

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

1. ประชากรที่ใช้ในการวิจัย 28

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 28

3 วิธีการดำเนินการวิจัย 33

3.1 ทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Creatinine plus ver.2 ในหลอด ทดลองและบนกระดาษ 33

3.1.1 ทดสอบปฏิกิริยาของน้ำยาในหลอดทดลอง โดยทดสอบความไวในการเกิดสีของน้ำยา โดยการวัด OD ที่ 552/659 36

3.1.2 ทดสอบความสามารถและปฏิกิริยาของน้ำยาบนกระดาษกรอง 36

3.2 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์ 37

3.2.1 การออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์ ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด 37

3.2.2 การศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมต่อการสร้าง enz-PADs 38

3.2.3 การศึกษาสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนพื้นที่ตรวจวัดของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น 39

3.3 การศึกษาหาปริมาณโปรตีนรวมและการทำงานของเอนไซม์ของน้ำยา Creatinine plus ver.2 40

3.3.1 การตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยน้ำยา Bradford (Bradford's reagent) . 41

3.3.2 การตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ตัวแทนรวม 41

3.3.2.1 การทำงานของเอนไซม์ครีแอทิเนสในน้ำยา R1 42

3.3.2.2 การทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในน้ำยา R2 43

3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการการตรวจวัดระดับครีแอทินิน 44

3.4.1 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจด้วย enz-PADs 44

3.4.2 การศึกษาหาระยะเวลาการอ่านผลที่เหมาะสมของปฏิกิริยาด้วย enz-PADs ... 45

หน้า

3.5 การศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterisation) 45
3.5.1 การศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range) ในการตรวจวัด 45
3.5.2 การศึกษาหาค่าความสามารถในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection: LOD) ด้วย enz-PADs 46
3.5.3 การศึกษาสารรบกวนปฏิกิริยาการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs 46
3.5.4 การทดสอบหาความแม่นยำ (precision) และความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของ enz-PADs 48
3.5.5 การทดสอบหาความคงตัว (stability) ของ enz-PADs 49
3.5.6 การตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ 49
3.5.6.1 การสร้าง หลักการตรวจวัด และการแปลผลการตรวจวัดครีแอทินินด้วย enz-PADs 49
3.5.6.2 การเปรียบเทียบการตรวจวัดครีแอทินินระหว่าง enz-PADs และวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก 52
3.5.6.3 การเปรียบเทียบการตรวจวัดครีแอทินินระหว่าง enz-PADs และวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ 54
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 55
1. ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Creatinine plus ver. 2 ในหลอดทดลองและบนกระดาษ 55
1.1 ผลการทดสอบปฏิกิริยาของน้ำยาในหลอดทดลอง โดยทดสอบความไวในการเกิดสีของน้ำยา โดยวัด OD ที่ 552/659 55
1.2 ผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาบนกระดาษกรอง 56
2. ผลการศึกษาการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์ 59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.1 ผลการออกแบบ และการสร้าง enz-PADs ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด..... 59
2.2 ผลการศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมต่อการสร้าง enz-PADs..... 60
2.3 ผลการศึกษาสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนพื้นที่ตรวจวัดของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น..... 62
3. ผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนรวมและการทำงานของเอนไซม์ของน้ำยา Creatinine plus ver.2..... 67
3.1 ผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนรวมของน้ำยา Creatinine plus ver.2..... 67
3.2 ผลการทดสอบหาการทำงานของเอนไซม์รวมของน้ำยา Creatinine plus ver.2..... 68
4. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการการตรวจวัดระดับครีแอทินิน 71
4.1 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมของตัวอย่างตรวจที่ใช้ในการตรวจด้วย enz-PADs 71
4.2 ผลการศึกษาหาระยะเวลาการอ่านผลที่เหมาะสมของปฏิกิริยาด้วย enz-PADs 73
5. ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterisation)..... 74
5.1 ผลการทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range) ในการตรวจวัด..... 74
5.2 ผลการทดสอบค่าความสามารถในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection: LOD) ด้วย enz-PADs..... 77
5.3 ผลการทดสอบหาสารรบกวนที่รบกวนการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs 79
5.4 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (precision) และความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของ enz-PADs 84
5.5 ผลการทดสอบหาความคงตัว (stability) ของ enz-PADs 90
5.6 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะเปรียบเทียบกับวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก 92
5.7 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ..... 96
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาวิจัย..... 101

Chulalongkorn University

หน้า

สรุปผลการศึกษาวิจัย 101
รายการอ้างอิง 106
ภาคผนวก 114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 123

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 แผนภาพกลไกการสังเคราะห์ครีเอทีนและการกลไกการเกิดครีแอทินิน 8

รูปที่ 2.2 แผนภาพการแย่งจับกันระหว่างครีแอทินินที่ถูกตรึงไว้บน platinum electrode และครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ 18

รูปที่ 2.3 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enzyme-based bar-code-style 19

รูปที่ 2.4 แผนภาพการหลักการของ enzyme-based bar-code-style lateral-flow assay ในการตรวจวัดครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ 19

รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการสร้าง μPADs ด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยแสงสำหรับตรวจวัดกลูโคสและโปรตีนในปัสสาวะ 22

รูปที่ 2.6 แบบที่ได้จากการพิมพ์ลายด้วย PDMS บนกระดาษ 22

รูปที่ 2.7 แบบที่ได้จากการตัดกระดาษเพื่อกำหนดขอบเขตในการเกิดปฏิกิริยา 23

รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยหลักการ ink jet printing 23

รูปที่ 2.9 ขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยหลักการ wax printing 24

รูปที่ 2.10 ขั้นตอนของเทคนิค wax screen-printing 25

รูปที่ 2.11 ขั้นตอนของเทคนิค wax dipping และชิ้นงานที่ได้ 25

รูปที่ 2.12 ขั้นตอนการประกอบกระดาษกรองและกระดาษแยกเลือดด้วยเทคนิค wax dipping และชิ้นงานที่ได้ 26

รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงบริเวณต่างๆ บน enz-PADs 37

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนในการสร้าง enz-PADs สำหรับการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ 38

รูปที่ 3.3 ขั้นตอนในการสร้างและใช้งาน enz-PADs สำหรับการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน 39

รูปที่ 3.4 ตัวอย่าง enz-PADs และพื้นที่การตรึงน้ำยา 50

รูปที่ 3.5 หลักการทำงานของ enz-PADs ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ 52

รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณครีแอทินินที่ OD 552/659 นาโนเมตร ของน้ำยา Creatinine plus ver.2 56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.2 ผลการตรวจวัดปฏิกิริยาการเกิดสีบนกระดาษกรอง (Whatman no.1) เมื่อทำปฏิกิริยากับครีแอทินินความเข้มข้นต่างๆ 57

รูปที่ 4.3 ผลการตรึงน้ำยาแบบผสมบนกระดาษ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 58

รูปที่ 4.4 แผนภาพส่วนประกอบต่างๆ บน enz-PADs 59

รูปที่ 4.5 กราฟแสดงผลการตรวจวัดความแม่นยำในการวัดสีในพื้นที่ตรวจวัด (precision of detections zones) 64

รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนใน bovine serum albumin ที่ OD 595 nm ด้วย bradford's reagent 67

รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ H_2O_2 ที่ OD 570 nm ด้วย peroxidase activity kit 69

รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสี (colour intensity) ของปฏิกิริยาบน enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างตรวจในปฏิกิริยาเปลี่ยนไป (pH) 72

รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสี (colour intensity) ของปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้นเมื่อระยะเวลาการรอปฏิกิริยาเปลี่ยนไป (reaction time) 73

รูปที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานครีแอทินินกับค่าความเข้มของสีที่เพิ่มขึ้น 75

รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเก็บและเปอร์เซ็นต์ความคงตัวของ enz-PADs ในระยะเวลา 20 วัน 91

รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณครีแอทินินที่ตรวจวัดได้โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) เทียบกับวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก 93

รูปที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินของวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติ โดยใช้สถิติ Bland and Altman plot และ Passing–bablok regression 95

รูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณครีแอทินินที่ตรวจวัดได้โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) เทียบกับวิธีเอนไซม์ 97

รูปที่ 4.15 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินของวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยวิธีเอนไซม์ โดยใช้สถิติ Bland and Altman plot และ Passing–bablok regression 100

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GFR และการดำเนินการของโรคไตในระยะต่างๆ..... 10

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างน้ำยาและสารตั้งต้นที่ใช้ในการตรวจวัดครีแอทินิน..... 14

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 28

ตารางที่ 3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 29

ตารางที่ 3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 30

ตารางที่ 3.4 รายละเอียดของน้ำยา Creatinine plus ver.2..... 34

ตารางที่ 3.5 ปริมาตรน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัดต่อหนึ่งการทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c501..... 35

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบของปฏิกิริยาของ enz-PADs ที่สร้างด้วยกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1, 3 และเบอร์ 42..... 61

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าความเข้มสีที่วัดได้ระหว่างการเกิดสีของปฏิกิริยาในส่วนของ detection zone ที่เรียบเนียน และเป็น rocket-like shape..... 62

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบของปฏิกิริยาในส่วนของ detection zone ที่ถูกตรึงด้วยสารต่างๆ ของ enz-PADs ที่สร้างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3..... 65

ตารางที่ 4.4 ความเข้มสีของพื้นที่ขนาดเล็ก (17.5×22.5 pixels) ติดต่อกันจำนวน 16 ช่อง ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมดบน detection zone..... 66

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนรวมของน้ำยา Creatinine plus ver.2..... 68

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบหาการทำงานของเอนไซม์ของน้ำยา Creatinine plus ver.2..... 70

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบหาค่า limit of detection ของครีแอทินินด้วย enz-PADs..... 77

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบสารที่อาจมีผลรบกวนต่อปฏิกิริยาการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน..... 81

ตารางที่ 4.9 การทดสอบความสามารถในการกำจัดครีเอทีนในตัวอย่างตรวจในบริเวณ R1 ของ enz-PADs..... 83

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (within-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน ความเข้มข้น 2..... 85

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (within-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีแอทินิน 3 ความเข้มข้น.. 86

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน (between-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 2 ความเข้มข้น..... 87

ตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน (between-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีแอทินิน 3 ความเข้มข้น..... 88

ตารางที่ ก.1 เตรียม phosphate buffer..... 115

ตารางที่ ก.2 การเตรียม Tris-HCl buffer..... 116

ตารางที่ ก.3 ผลการทดสอบค่าความคงตัว (stability) ของ enz-PAD..... 117

ตารางที่ ก.4 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างวิธี Kinetic alkaline picrate method และ Enzymatic paper-based device..... 118

ตารางที่ ก.5 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างวิธี Colorimetric enzymatic method (automatic analyser) และ Enzymatic paper-based device..... 120

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบัน คนไทยมีการใส่ใจในสุขภาพกันมากขึ้น ทั้งนโยบายต่างๆ ที่รณรงค์ให้มีการรักษาสุขภาพทำให้การตรวจสุขภาพประจำปีหรือการตรวจคัดกรองโรคต่างๆ ขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับ ดังนั้นการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์หรือชุดตรวจคัดกรองสารต่างๆ จึงเป็นที่น่าสนใจในวงการวิจัยทางการแพทย์เป็นอย่างมาก เพื่ออำนวยความสะดวกให้แก่ผู้ใช้งานและสามารถออกผลการทดสอบได้ทันที ทั้งยังเป็นแนวทางเลือกใหม่ที่สามารถเลือกใช้ทดแทนเทคโนโลยีในปัจจุบันที่มีข้อจำกัดในด้านของการใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่มีราคาแพง เคลื่อนย้ายได้ยาก เช่นเดียวกับแนวคิดการตรวจและทราบผลได้ทันที หรือทราบผล ณ จุดบริการผู้ป่วย (point of care testing: POCT) เช่น ชุดเครื่องตรวจระดับน้ำตาลในเลือดด้วยตนเองซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ขนาดใหญ่หรือเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่มีราคาสูงก็สามารถทราบผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็ว ขั้นตอนการทดสอบไม่ยุ่งยาก ทั้งยังง่ายในการเคลื่อนย้าย ทำให้สามารถใช้ในงานภาคสนามได้อีกด้วย จึงสมควรอย่างยิ่งที่จะมีการพัฒนาต่อยอดเทคนิคการตรวจคัดกรองสารทางชีวเคมีในสารน้ำในร่างกายมนุษย์ (เลือด ปัสสาวะ ฯลฯ) ให้สามารถใช้งานได้สะดวก รายงานผลได้อย่างรวดเร็ว ทั้งสามารถใช้อุปกรณ์ในการตรวจวัดที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง ง่ายต่อการเคลื่อนย้าย ไม่เพียงแต่จะเป็นการสร้างทางเลือกใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ ทั้งยังช่วยในเรื่องของการลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ได้

การตรวจทดสอบสมรรถภาพของไตหรือการคัดกรองผู้ป่วยโรคไตเป็นหนึ่งในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่มีการส่งตรวจเป็นลำดับต้นๆ ทำให้มีความน่าสนใจในการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคไตเบื้องต้น เพื่อใช้ประโยชน์ในหน่วยปฏิบัติการสถานพยาบาลเคลื่อนที่และหน่วยพยาบาลขนาดย่อมได้ ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสำคัญของการตรวจวัดค่าครีแอทินิน (creatinine) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีในการคัดกรอง วินิจฉัย ประเมินการรักษา และติดตามการรักษาภาวะโรคไตได้เป็นอย่างดี (1) ทั้งในผู้ที่มีโรคประจำตัวอื่นๆ เช่น โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ยังสามารถนำไปสู่โรคไตเรื้อรังได้หากรักษาไม่เหมาะสม หรือผู้ที่ได้รับยาบางชนิด นอกจากนี้ค่าครีแอทินินในปัสสาวะยังเป็นตัวบ่งชี้สำหรับ

การเจือจางของปัสสาวะอีกด้วย (2) และในปัจจุบันทางการแพทย์นิยมตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ เพื่อการนำผลการทดสอบที่ได้ไปแปลผลร่วมกับผลการทดสอบอื่นๆ สำหรับเป็นค่าที่นำมาใช้ในการ normalized (3) ค่าสัดส่วนระหว่างสารบ่งชี้อื่นๆ ในปัสสาวะร่วมกับปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ เช่น ไมโครอัลบูมิน (microalbumin) (4), โปรตีน (protein) (5), ซิสเตติน ซี (cystatin-c) (6), สารประกอบแอลฟา ไดคาร์บอนิล (α-dicarbonyl compounds) (3) และบิสฟีนอล เอ (bisphenol A: BPA) (7) เป็นต้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่พัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ปริมาณครีแอทินินขึ้น เพื่อประโยชน์ในการคัดกรอง วินิจฉัย ประเมินการรักษา ติดตามการรักษาภาวะโรคไต และประโยชน์อื่นๆ ต่อไป โดยเน้นพัฒนาให้สามารถใช้ได้ในรูปแบบ POCT

การตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะนั้นมีหลายวิธีในการตรวจวัด โดยหลักการที่นิยมใช้ในปัจจุบัน (8) คือ หลักการของแจฟฟี (alkaline picrate Jaffé reaction) (9) และเอนไซม์ (enzymatic method) (10) ซึ่งทั้งสองหลักการก็มีทั้งข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันออกไป โดยหลักการ alkaline picrate การเตรียมน้ำยา มีหลายขั้นตอน ทั้งยังมีสารรบกวนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ครีแอทินินสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) โปรตีน กลูตาไทโอน (glutathione) ไพรูเวท (pyruvate) (11, 12) กลูโคส (glucose) (13) อัลบูมิน (14) ไซโตคีโตน (cytoketone) (15) สารประกอบคาร์บอนิล (16) เป็นต้น แต่ก็มีจุดเด่นในแง่ของต้นทุนที่ถูก และง่ายในการตรวจวัด ในขณะที่หลักการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วยวิธีเอนไซม์ที่มีจุดเด่นในเรื่องของความจำเพาะในการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินินมากกว่า (17) ทั้งนี้ยังเป็นที่ทราบดีในวงการแพทย์ว่าเป็นวิธีที่แพทย์ให้ความเชื่อถือมากกว่าวิธีของแจฟฟี (18) และผลการตรวจวัดปริมาณ ครีแอทินินด้วยวิธีทางเอนไซม์ให้ผลการทดสอบค่าที่ใกล้เคียงกับการทดสอบด้วยวิธี isotope-dilution-mass spectrometry (IDMS) ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงมาตรฐานอีกด้วย (10) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการตรวจวัดทางเอนไซม์มีต้นทุนสูง เนื่องจากการใช้น้ำยาหรือเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาหลายชนิด และการตรวจวัดทางเอนไซม์นิยมตรวจด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ หรือใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติจำเป็นต้องใช้พื้นที่สำหรับวางหรือติดตั้งเครื่องมือ เมื่อติดตั้งแล้วเคลื่อนย้ายไม่สะดวก ทำให้ไม่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ผลแบบใกล้ผู้ป่วย แม้ว่าการตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการของเอนไซม์จะมีต้นทุนสูง แต่เนื่องจากน้ำยาที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารชีวภาพทางห้องปฏิบัติทางการแพทย์ ที่ใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัตินั้นพบว่า มีน้ำยาปริมาณหนึ่งหลงเหลืออยู่ในตลับน้ำยา (dead volume) โดยทั่วไปมักมีน้ำยาหลงเหลืออยู่ประมาณ 1 – 3 มิลลิลิตรต่อตลับน้ำยา เนื่องจากเป็น

ข้อจำกัดของ reagent probe ของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้สำหรับดูดน้ำยาไม่สามารถดูดน้ำยาได้ระดับต่ำไปกว่าตัววัดระยะที่กำหนดไว้ในเครื่องมือนั้นๆ ได้ (level sensor) และโดยปกติแล้วในห้องปฏิบัติการการแพทย์ทั่วไป จะมี dead volume ของน้ำยาที่เหลือในตลับน้ำยา และถูกทิ้งไปในแต่ละวัน อย่างไรก็ตาม ส่วนประกอบในน้ำยาที่เป็น dead volume นั้นๆ เช่น เอนไซม์ (enzymes) และสารตั้งต้น (substrate) ต่างๆ ยังอยู่ในสภาพที่ใช้งานได้ดี เพราะตลับน้ำยาที่นำมาใช้ยังอยู่ในระบบปิด มีเพียงรูเจาะจากหัวเข็มของ reagent probe เท่านั้น ซึ่งน้ำยาที่เหลือปริมาณน้อยๆ นี้โดยทั่วไปไม่เพียงพอสำหรับนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์งานทางห้องปฏิบัติการที่เป็นงานประจำทั่วไป แต่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานวิเคราะห์ที่ปริมาตรของน้ำยาน้อยๆ เช่น ในระบบของไหลจุลภาค (microfluidic system) ไม่ว่าจะเป็น PDMS microchip หรือ อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

อุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based analytical devices: PADs) ซึ่งเป็นอุปกรณ์การตรวจวัดที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานในประเทศกำลังพัฒนาเช่นเดียวกับแนวคิดการตรวจและทราบผลได้ทันที (point of care testing: POCT) ซึ่งอุปกรณ์ฐานกระดาษเป็นอุปกรณ์ที่มีขนาดเล็กที่อาศัยน้ำยาและตัวอย่างในการเกิดปฏิกิริยาปริมาตรน้อย (19) น้ำหนักเบา เคลื่อนย้ายได้ง่าย จึงเป็นที่นิยมในการพัฒนาและใช้งานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ผลแบบใกล้ผู้ป่วย (POCT devices) ยิ่งไปกว่านั้นการสร้างอุปกรณ์ฐานกระดาษสามารถสร้างได้ง่ายและต้นทุนต่ำ (20) นอกจากนี้ยังทำลายได้ง่ายหลังการใช้งานและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเชิงปริมาณ จากการนำน้ำยาปริมาตรที่เหลือ (dead volume) จากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติในห้องปฏิบัติการทางเคมีคลินิกมาประยุกต์ใช้ให้สามารถตรวจวัดบนกระดาษได้ ด้วยวิธีการเกิดสีของปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ (enzymatic colorimetric method) ในที่นี้ใช้น้ำยา Creatinine plus ver.2 ของบริษัท Roche diagnostic โดยน้ำยาประกอบไปด้วยกลุ่มของเอนไซม์ 4 ชนิดที่ทำงานร่วมกันตามหลักการของการตรวจวัดปริมาณครีแอทินิน ดังนี้ 1) เอนไซม์ครีแอทินิเนส (creatininase) 2) เอนไซม์ครีแอทิเนส (creatinase) 3) เอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดส (sarcosine oxidase) เพื่อใช้ในการเปลี่ยนสารครีแอทินินให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถติดตามปฏิกิริยาหรือตรวจวัดได้ คือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (8) ซึ่งการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของปริมาณครีแอทินินในตัวอย่าง ซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้

ด้วยตาเปล่าได้ แต่ในน้ำยาสำเร็จรูปมีสาร 2,4,-6triiodo--3hydroxybenzoic acid (HTIB) และ 4-aminophenazone ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยมี 4) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วเกิดสารประกอบ quinone imine chromogen ซึ่งมีสีชมพูเกิดขึ้น ดังนั้นปริมาณของครีแอทินินในตัวอย่างตรวจจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษ การนำน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือใช้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้นี้ ทำให้ลดต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ได้มาก หรือเรียกได้ว่าต้นทุนแทบจะเป็นศูนย์ เพราะค่าใช้จ่ายมีเพียงค่ากระดาษ ซึ่งมีต้นทุนต่ำมากอยู่แล้ว และชุดตรวจครีแอทินินดังกล่าวมีขนาดเล็ก กระทัดรัด น้ำหนักเบา สามารถพกพาไปใช้ระดับภาคสนามได้ ทำให้เหมาะสำหรับสถานบริการสาธารณสุขที่ห่างไกลได้ ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจในงานวิจัยนี้ จะเหมาะสมและเป็นประโยชน์ต่อประเทศที่กำลังพัฒนาในบางเขตพื้นที่ที่มีจำนวนการทดสอบน้อย ไม่คุ้มค่าในการลงทุนซื้อเครื่องตรวจวิเคราะอัติโนมัติ เช่น โรงพยาบาลชุมชน โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล หรือสถานพยาบาลเคลื่อนที่ เป็นต้น นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้เครื่องมือการวัดที่จำเพาะ เช่น สเปกโตรมิเตอร์ เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดหาได้ง่ายและเคลื่อนย้ายสะดวก ได้แก่ เครื่องสแกน (scanner) หรือกล้องดิจิตัลทั่วไป และคอมพิวเตอร์พกพา (laptop) ทั้งยังเป็นอุปกรณ์ฐานกระดาษนำน้ำยาที่เหลือใช้จากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติมาใช้งานให้เกิดประโยชน์สูงสุดอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดปริมาณครีแอทินิน ที่มีต้นทุนต่ำ ด้วยหลักการเอนไซม์

2. เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษที่สามารถตรวจวัดครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะเชิงปริมาณได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ขอบเขตงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษเพื่อตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเชิงปริมาณด้วยหลักการเอนไซม์ โดยทำการสร้าง enzymatic paper-based analytical devices (enz-PADs) และใช้น้ำยาปริมาตรที่เหลือจากตลับน้ำยาสำเร็จรูปของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (dead volume) โดยอาศัยหลักการเกิดสีจากปฏิกิริยาเคมีของกลุ่มเอนไซม์ในน้ำยากับครีแอทินิน ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ เป้าหมายในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษในครั้งนี้ เพื่อให้สามารถตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะได้ครอบคลุมทั้งในคนที่เป็นโรคไตและในคนปกติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับครีแอทินินในปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไวและความจำเพาะสูง เสียค่าใช้จ่ายต่ำ และนำไปสู่การใช้ตรวจกรองโรค เพื่อป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ในระยะยาว

2. สามารถพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับครีแอทินินในปัสสาวะ ที่สามารถพกพาไปใช้ตรวจวัดได้ในระดับภาคสนาม ทำลายง่าย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

3. สามารถผลิตนวัตกรรมทางการแพทย์ เพื่อใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยหรือป้องกันการเกิดโรคที่ใช้งานได้ง่าย โดยอ่านปฏิกิริยาจากการเกิดสีบนกระดาษ

4. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดขนาดเล็ก เช่นระบบ Lab-on-a-chip ที่สามารถพัฒนาเป็นการตรวจวัดแบบ Point-of-care-testing ร่วมกับภาคอุตสาหกรรม เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์การตรวจวิเคราะห์โรคใช้เองภายในประเทศ และจะเป็นประโยชน์สูงสุดต่อสุขภาพโดยรวมของประชากรทั้งประเทศ

6. สามารถนำผลงานการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น หน่วยงานด้านสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องกับโรคไต หรือใช้ในการตรวจร่วมสารอื่นๆ ในปัสสาวะ เช่น โปรตีน กลูโคส เป็นต้น

1.5 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไตและหน้าที่ของไต

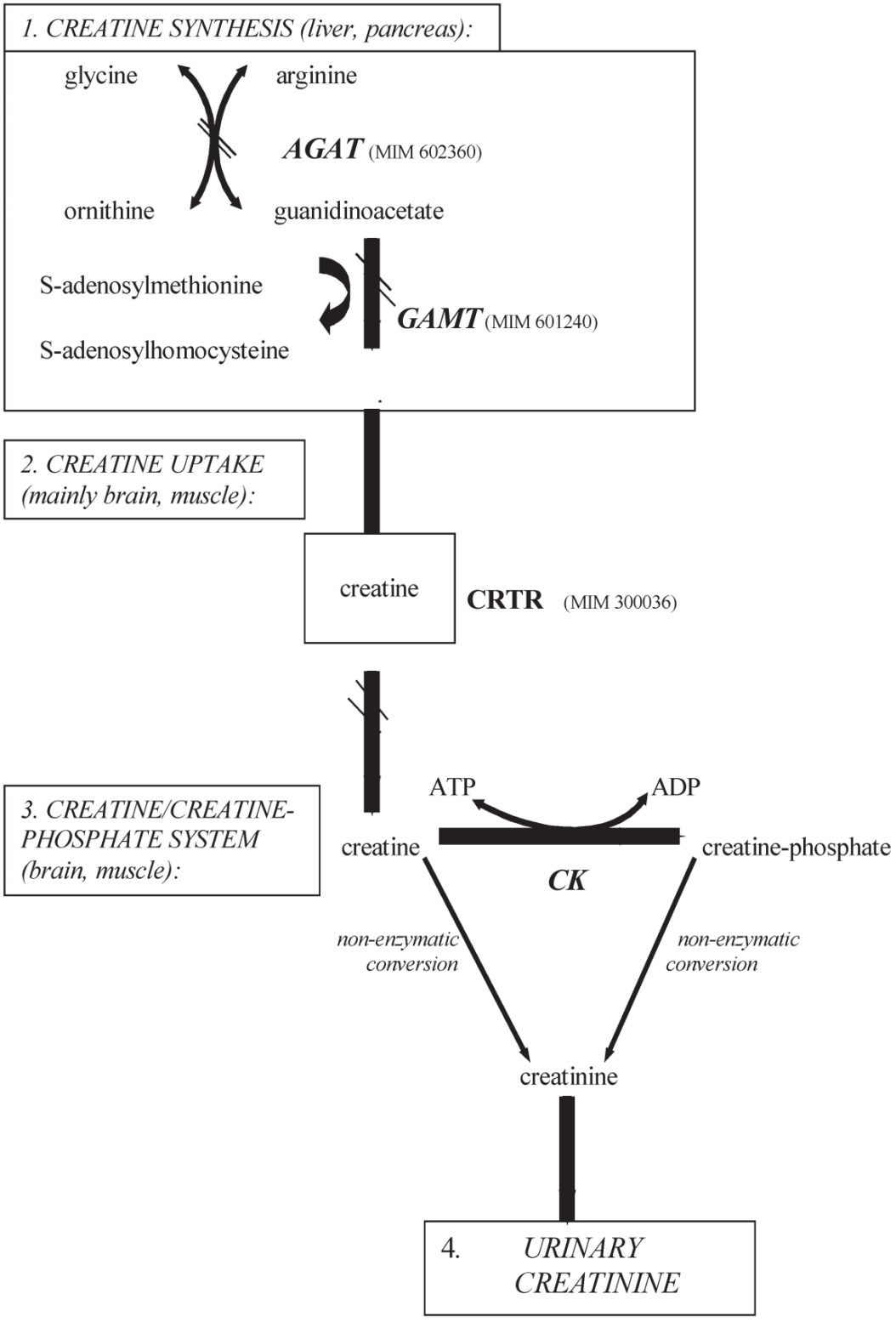
ไตเป็นอวัยวะที่สำคัญของระบบขับถ่ายของร่างกาย ประกอบไปด้วยหน่วยไต (Nephron) ย่อยเล็กๆ จำนวนมาก ไตแต่ละข้างจะมีหน่วยไตประมาณ 1.0 – 1.25 ล้านหน่วย ซึ่งหน่วยไตประกอบด้วย กรวยไต (glomerulus) มีหน้าที่กรองสาร และท่อไต (tubule) ทำหน้าที่ขับถ่าย (secrete) และดูดซึมสารกลับ (reabsorb) (17)

ไตทำหน้าที่หลักที่สำคัญ 3 ประการ ได้แก่ 1) หน้าที่ในการกำจัดของเสียที่เกิดขึ้น โดยกำจัดน้ำส่วนเกิน ของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) สารพิษและสารแปลกปลอมผ่านปัสสาวะ ซึ่งจะเก็บรักษาสารที่จำเป็นต่อร่างกายโดยการดูดกลับที่ท่อไต เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กลูโคส เป็นต้น 2) ทำหน้าที่ในการปรับสมดุลแร่ธาตุ แรงดันออสโมติกของของเหลว ควบคุมสมดุลน้ำและความเป็นกรด – ด่างของของเหลวในร่างกาย และ 3) ทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมน ได้แก่ erythropoirtin และ renin (17) ซึ่งของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมนั้น ประกอบไปด้วย 1) สารประกอบไนโตรเจน จำพวกโปรตีน (protein nitrogen) และ 2) สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่สารจำพวกโปรตีน (non-protein nitrogen) เป็นส่วนใหญ่ ประกอบไปด้วย ยูเรีย (urea) ประมาณร้อยละ 45 กรดอะมิโน (amino acids) ร้อยละ 25 กรดยูริก (uric acid) ประมาณร้อยละ 15 และอีกร้อยละ 15 ได้แก่ ครีแอทินิน ครีเอทีน แอมโมเนีย (NH_3) เป็นต้น ซึ่งสารประกอบ ยูเรีย ครีแอทินิน และกรดยูริก มีความสำคัญทางคลินิกเกี่ยวข้องกับโรคไต เพราะเป็นสารไร้ประโยชน์ (waste product) ที่ร่างกายไม่ต้องการ จึงถูกขับออกจากร่างกายโดยไต ดังนั้นเมื่อร่างกายขับสารเหล่านี้ออกมาในปัสสาวะในปริมาณที่ผิดปกติไป จึงสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงการทำหน้าที่ขับถ่ายของเสียของไตได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2 ครีเอทีน (creatine)

ครีเอทีนเป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (21) ซึ่งเป็นที่สังเคราะห์ภายในร่างกายจากกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ อาร์จินีน (arginine) และไกลซีน (glycine) ที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีน กรดอะมิโนทั้งสองจะทำปฏิกิริยากันภายในไต ตับ เยื่อบุลำไส้เล็ก และตับอ่อน (17) โดยมีเอนไซม์ arginine:glycine amidinotransferase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็น guanidinoacetate ซึ่งจะถูกขนส่งไปยังตับ แล้วถูกเมทธิลเลท (methylate) ด้วยหมู่เมทธิล (methyl group: $-CH_3$) ที่ได้จากสารเมทไธโอนีน (methionine) เป็นครีเอทีนผ่านเข้าสู่กระแสเลือดและกระจายอยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อเป็นส่วนใหญ่ และสมอง แล้วจะถูกฟอสฟอรีเลท (phosphorylate) เป็นครีเอทีนฟอสเฟต (creatine phosphate) ด้วยเอนไซม์ creatine kinase ซึ่งครีเอทีนฟอสเฟตเป็นสารพลังงานสูงหรือเป็นแหล่งพลังงาน (source of energy) ให้กับกล้ามเนื้อ และพลังงานแก่สมอง (17, 21) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ในแต่ละวันครีเอทีนฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนจากเป็นครีแอทินินโดยปฏิกิริยาแบบทางเดียว (irreversible) ซึ่งเกิดขึ้นเองอย่างสม่ำเสมอ เพื่อปล่อยพลังงานออกมาใช้เกี่ยวกับการยืดหรือหดตัวของกล้ามเนื้อ ครีเอทีนสามารถพบได้ในปัสสาวะในเพศชาย 0 – 40 มิลลิกรัมต่อวัน ในขณะที่เพศหญิงพบได้ 0 – 80 มิลลิกรัมต่อวัน และเนื่องจากคนปกติปัสสาวะจะถูกขับออกมาปริมาตร 1 – 2 ลิตร (17) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ในสภาวะการขับปัสสาวะ 1.5 ลิตรต่อวัน (22) ในเพศชายจะพบ ครีเอทีนในปัสสาวะประมาณ 0 - 2.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และในเพศหญิงจะพบครีเอทีนในปัสสาวะประมาณ 0 - 5.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร



รูปที่ 2.1แผนภาพกลไกการสังเคราะห์ครีเอทีนและการกลไกการเกิดครีแอทินิน (23)

2.3 ครีแอทินิน (creatinine) และประโยชน์ของการตรวจวัด

ครีแอทินินเป็นสารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกาย มีแหล่งกำเนิดหลักจากกระบวนการสร้างพลังงานของกล้ามเนื้อหรือการสลายตัวของครีเอทีน (24) จากการที่ครีเอทีนจะถูกฟอสฟอรีเลท (phosphorylate) เป็นครีเอทีนฟอสเฟต (creatine phosphate) ซึ่งเป็นสารที่มีหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน (source of energy) เกี่ยวกับการยืดหรือหดตัวของกล้ามเนื้อ (17)

ครีแอทินินเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญตัวหนึ่งในการประเมินประสิทธิภาพในการทำงานของไตได้ในทางห้องปฏิบัติการ (1) เนื่องจากครีแอทินินเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายหรือของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในของครีแอทินที่มีในเซลล์กล้ามเนื้อ โดยครีแอทินินจะถูกสร้างภายในร่างกายในปริมาณที่คงที่ (25, 26) และถูกกำจัดออกจากเลือดโดยผ่านการกรองของหน่วยไต และขับออกมาทางปัสสาวะเกือบทั้งหมดในปริมาณคงที่ประมาณ 1.6– %1.7ต่อวัน (27) เมื่อมีปริมาณครีแอทินินเพิ่มขึ้นในเลือด หรือลดลงในปัสสาวะ ทำให้สามารถประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไตได้ครีแอทินินเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีในการคัดกรอง วินิจฉัย ประเมินการรักษาและติดตามการรักษาภาวะโรคไตได้เป็นอย่างดี ทั้งยังเป็นตัวบ่งชี้ที่เป็นที่ยอมรับในการติดตามผลกระทบต่อการรักษาของผู้ป่วยที่ฟอกไตอีกด้วย (25) โดยคนปกติจะสามารถตรวจพบครีแอทินินในกระแสเลือดและปัสสาวะได้ประมาณ 1.5 – 0.6 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และ 20 – 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg dL^{-1}) (28) ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถใช้ปริมาณครีแอทินินประเมินหน้าที่หรือการทำงานของไต (Estimating glomerulus function) ได้ หากผลการตรวจวัดที่ได้ออกมาพบว่าครีแอทินินในกระแสเลือดมีค่าที่สูงหรือในปัสสาวะที่ต่ำผิดปกติแสดงให้เห็นถึงภาวะไตล้มเหลวทั้งเฉียบพลัน (acute kidney failure) และเรื้อรัง (chronic kidney failure) ทางเดินปัสสาวะอุดตัน (urinary tract obstructive) และภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมน (hypothyroidism) นอกจากนี้ครีแอทินินยังสามารถใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ในการตรวจวัดสารบ่งชี้วัดทางชีวภาพในปัสสาวะ (urinary biomarker) อื่นๆ เพื่อทำให้เป็นบรรทัดฐานเดียวกัน (normalize) (3) เช่น ค่ากลูโคส โปรตีนในปัสสาวะ เป็นต้น ทั้งยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับภาวะที่ปัสสาวะถูกเจือจาง อย่างเช่นประโยชน์ในการตรวจหาสารยาโด๊บในนักกีฬาสารเสพติดในผู้ป่วยได้อีกด้วย (29)

นอกจากนี้แล้ว การตรวจสมรรถภาพการทำงานของไตยังทำได้ด้วยการประเมินอัตราการกรองของไต (Glomerulus filtration rate: GFR) ในหน่วยมิลลิลิตรต่อนาที (ml/min) ซึ่งเป็นการตรวจวัดความสามารถของไตในการกรองสารโดยการเจาะเลือดตรวจหาค่าครีแอทินินในพลาสมา (Plasma creatinine; P_{cr}) ร่วมกับการเก็บปัสสาวะตลอด 24 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณครีแอทินินที่ขับออกมาในปัสสาวะ (U_{cr}และนำปริมาตรปัสสาวะในหน (วยมิลลิตรต่อนาที (V) มาใช้ในการคำนวนค่า GFR ดังสูตร (17)

$$GFR = \frac{U_{cr} \times V}{P_{cr}} \quad \text{หรือ} \quad \frac{Creatinine_{urine} \times Volume_{urine}\,(ml)}{Creatinine_{serum} \times [Time\ (hours) \times 60]}$$

หากปรับตามพื้นที่ผิวกาย (body surface area) (A) จะมีหน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร ดังสูตร (17)

$$GFR = \frac{U_{cr} \times V}{\frac{Pcr \times 1.73}{A}}$$

โดยผลการคำนวนสามารถแปลผลได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GFR และการดำเนินการของโรคไตในระยะต่างๆ

Glomerular Filtration Rate	Stage	
>90 mL/min/1.73 m^2	0	If no proteinuria/hematuria present, no risk factor.
>90 mL/min/1.73 m^2	1	With proteinuria or hematuria.
60–89 mL/min/1.73 m^2	2	Mild disease with decreased GFR.
30–59 mL/min/1.73 m^2	3	Moderate chronic kidney disease.
15–29 mL/min/1.73 m^2	4	Severe chronic kidney disease.
<15 mL/min/1.73 m^2	5	End-stage renal disease or end-stage renal failure.

ที่มา National Kidney Foundation Guideline (17)

แต่อย่างไรก็ตาม ในการประเมินในปัจจุบันการประเมินอัตราการกรองของไตนิยมใช้การคำนวนด้วยสูตรของ Cockkroft-Gault เนื่องจากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เป็นขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยาก จึงนิยมคำนวนค่า Creatinine clearance จากปริมาณ serum creatinine ดังสูตร (17)

$$\text{Creatinine clearance} = \frac{(140 - \text{AGE in years}) \times \text{Weight in kg} \times 1.23 \text{ if male } (1.04 \text{ if female})}{\text{Serum creatinine } (\mu\text{mol/L})}$$

นอกจากสูตรข้างต้นแล้ว ยังมีสูตรอื่นๆ ในการคำนวนอีกมากมาย แต่อย่างไรก็ตาม การหาค่า Creatinine clearance นั้นก็มีข้อจำกัดในเรื่องของการใช้ระยะเวลามาก (time consuming) ในการเก็บตัวอย่าง ใช้แรงงานมาก (labour intensive) และเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมในทางปฏิบัติในการประเมินผลการทำงานของไตในคนไข้ที่ต้องได้รับการผ่าตัด (22) แต่อย่างไรก็ตามการประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไตในปัจจุบัน ยังคงอาศัยใช้ค่า Creatinine clearance กันอย่างแพร่หลาย

2.4 วิธีการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินิน

หลักการในตรวจหาปริมาณครีแอทินินที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่

2.4.1 วิธี alkaline picrate Jaffé reaction หรือ modified Jaffé reaction (kinetic assay)

เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน โดยไม่ต้องทำการตกตะกอนโปรตีนก่อน โดยสารครีแอทินินในตัวอย่างตรวจจะทำปฏิกิริยากับกรดพิคริก (picric acid) ในสารละลายที่เป็นด่างแก่ แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง ดังปฏิกิริยา (30)

$$\text{Creatinine} + \text{Picric acid} \xrightarrow{\text{NaOH}} \text{Creatinine-alkaline picrate complex}$$

และหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างจากค่าอัตราการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่กำหนดของสารประกอบเชิงซ้อนของ creatinine-alkaline picrate complex ที่ความยาวคลื่น 490 - 500 นาโนเมตร จำนวน 2 ครั้ง โดยครั้งแรกอ่านค่าเป็น A1 หลังเกิดปฏิกิริยาแล้วเป็นเวลา 20 วินาที ระยะเวลาดังกล่าวเป็นการวัดความเข้มสีที่เกิดจากสารที่ไม่ใช่ครีแอทินิน ซึ่งจะทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว (fast reacting pseudo creatinine) และอ่านค่าที่สองเป็น A2 หลังจาก A1 เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใช้ค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น ซึ่งอัตราดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ ซึ่งข้อจำกัดของวิธีแจฟฟี คือ การอ่านค่าการดูดกลืนแสง A2 หากอ่านช้ากว่าที่กำหนดจะมีสารรบกวนจำพวกที่ทำปฏิกิริยาช้า (slow reacting pseudo creatinine) หรือสารรบกวนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ครีแอทินินสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ (non-specific chromogen) เช่น คีโตน กลูโคส (31) โปรตีน)albumin, IgG) (32) วิตามินซี และยาบางชนิด (cephalosporins) ทั้งสารบิลิรูบินปริมาณสูงยังให้ผลการทดสอบที่ผิดพลาดไปในทางค่าต่ำกว่าความเป็นจริงอีกด้วย (17) แต่อย่างไรวิธีแจฟฟี มีข้อดีคือ สามารถใช้น้ำยาสำเร็จรูปที่มีขายทั่วไปในท้องตลาด ที่มีราคาถูก ซึ่งมีขั้นตอนการตรวจวัดที่ไม่ซับซ้อน และสามารถประยุกต์ใช้ตรวจกับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติได้ (33) ทำให้เป็นที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

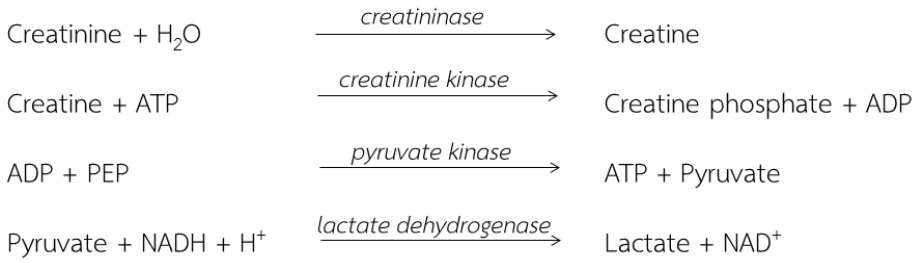
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.2 วิธีเอนไซม์ (enzymatic method)

การตรวจหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างด้วยการทำงานของกลุ่มของเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนครีแอทินินไปเป็นสารอื่นที่สามารถตรวจวัดเพื่อหาปริมาณของครีแอทินินได้ วิธีเอนไซม์ มีจุดเด่นในเรื่องของความจำเพาะในการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินิน (17) ทั้งนี้ยังมีความน่าความเชื่อถือมากกว่าวิธีแจฟฟี (18) เนื่องจากสิ่งรบกวนปฏิกิริยาน้อยกว่าของวิธีแจฟฟี (34) สำหรับหลักการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วยเอนไซม์ มีดังนี้

2.4.2.1 หลักการตรวจโดยใช้เอนไซม์ครีแอทินิเนส (Creatininase)

เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณของครีแอทินินโดยใช้เอนไซม์ครีแอทินิเนส (Creatininase, Creatinine amidohydrolase; EC 3.5.2.1.0) ในการสลายครีแอทินิน และใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์อื่นๆ ร่วมด้วย ได้แก่ ครีแอทินิน ไคเนส ไพรูเวทไคเนส และแลคเตทดีไฮโดรจีเนส โดยอาศัยการติดตามปฏิกิริยาของ NADH ที่ลดลง หรือการออกซิเดชั่นของ NADH ไปเป็น NAD^+ ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (24) ด้วยเครื่องสเปกโตมิเตอร์ ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันตรงกับปริมาณความเข้มข้นของครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ ดังสมการ (35)



แต่เนื่องจากวิธีการตรวจวัดข้างต้นนี้ อาศัยคุณสมบัติของการออกซิเดชั่นของ NADH ไปเป็น NAD^+ และอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จึงจำเป็นต้องมีเครื่องวัดการดูดกลืนแสงหรือสเปกโตมิเตอร์ที่สามารถวัดได้ในช่วง UV ปัจจุบันวิธีการตรวจวัดนี้จึงไม่เป็นที่นิยม

2.4.2.2 หลักการตรวจโดยใช้เอนไซม์ครีแอทินิเนสและครีแอทิเนส) Creatininase และ Creatinase)

เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณของครีแอทินินโดยใช้เอนไซม์ครีแอทินิเนส (EC 3.5.2.10) และครีแอทิเนส (EC 3.5.3.3) ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาควบคู่กับเอนไซม์ซาโคซีน ออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ คือ H2O2 ที่จะทำปฏิกิริยาต่อไปกับสารตั้งต้น (substrate) แล้วเกิดสีต่อไป โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณครีแอทินินในตัวอย่าง ดังสมการ (35)

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatininase}} \text{Creatine}$$

$$\text{Creatine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatinase}} \text{Sarcosine} + \text{Urea}$$

$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\textit{Sarcosine oxidase}} \text{Glycine} + \text{formaldehyde} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{colorless substrate} \xrightarrow{\textit{peroxidase}} \text{colored produce} + 2H_2O$$

จากสมการข้างต้น สามารถหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจทางอ้อม โดยตรวจหาสารประกอบสีเชิงซ้อน (colored product) ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นจำเพาะกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั้นๆ ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณความเข้มข้นของครีแอทินินในตัวอย่าง การเกิดสารผลิตภัณฑ์ที่มีสี อาศัยการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อเร่งปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และสารตั้งต้นให้เกิดสารประกอบสีเชิงซ้อนที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งที่ใช้จะขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิตที่แตกต่างกันไป ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างน้ำยาและสารตั้งต้นที่ใช้ในการตรวจวัดครีแอทินิน

ชื่อน้ำยา (บริษัท)	**สารตั้งต้น**	**ผลิตภัณฑ์**	**ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัด**
Creatinine plus ver.2 (Roche)	4-aminophenazone + HTIB*	Quinone imine chromogen	522/659 nm
Creatinine Liquid Reagents Assay (Diazyme)	4-aminoantipyrine + Toos	Quinone dye	550 nm (λmax 556)
CR-E Creatinine (Beckman coulter)	4-aminoantipyrine + ESPMT**	Quinoneimine	560 nm

* 2,4,6-triiodo-3-hydrozybenzoic acid

** N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)-3-methylaniline

โดยหลักการข้างต้นมักถูกนำมาใช้กับการตรวจครีแอทินินในลักษณะ POCT โดยตรวจวัดด้วยหลักการทางเคมีไฟฟ้า ชนิดโพลาโรกราฟิก (polarographic detection) อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์ครีแอทินิเนส และเอนไซม์ครีแอทิเนส ในการหาปริมาณครีแอทินินนี้ พบว่าบิลิรูบินและวิตามินซีมักรบกวนปฏิกิริยา ในน้ำยาตรวจจึงมีการเติมโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (potassium hexacyanoferrate(II)) หรือเอนไซม์ บิลิรูบินออกซิเดส (bilirubin oxidase) เพื่อในการกำจัดบิลิรูบินที่รบกวนปฏิกิริยา และเติมเอนไซม์แอสคอร์บิกออกซิเดส (ascorbic oxidase) เพื่อใช้ในการกำจัดวิตามินซีในสารตัวอย่างที่ทำการตรวจวัด นอกจากนี้แล้วยังมีการลดการรบกวนจากครีเอทีนที่มีอยู่แล้วในตัวอย่าง (endogenous creatine) โดยการบ่มปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ครีแอทิเนส (creatinase) ก่อน เพื่อทำการกำจัดครีเอทีนในตัวอย่างตรวจ (36)

นอกจากนี้ด้วยการใช้หลักการของเอนไซม์ครีแอทินิเนส และเอนไซม์ครีแอทิเนสนี้ยังมีการตรวจวัดการรีดักชั่นของ NAD^+ ด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ด้วยเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (formaldehyde dehydrogenase) อีกด้วย ดังสมการ (36)

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{creatininase} \text{Creatine}$$

$$\text{Creatine} + H_2O \xrightarrow{creatinase} \text{Sarcosine} + \text{Urea}$$

$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{sarcosine\ oxidase} \text{Glycine} + \text{formaldehyde} + H_2O_2$$

$$\text{Formaldehyde} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow[dehydrogenase]{formaldehyde} HCOOH + NADH + H^+$$

2.4.2.3 หลักการตรวจโดยใช้เอนไซม์ครีแอทินิน ดีอะมิเนส)Creatinine Deaminase, Creatinine iminohydrolase)

เป็นวิธีการตรวจที่ใช้เอนไซม์ครีแอทินิน ดีอะมิเนส (Creatinine Deaminase; EC 3.5.4.21.) ในการย่อยครีแอทินิน เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย (NH_3) ดังสมการ (36)

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{creatinine\ deaminase} \text{N-methylhydantoin} + NH_3$$

โดยแอมโมเนียที่เกิดขึ้นสามารถถูกวัดปริมาณได้ด้วยวิธี Berthelot reaction หรือเกิดปฏิกิริยาควบคู่กับเอนไซม์แอล-แมทิลไฮแดนโทอิเนส (L-metylhydantoinase; N-metylhydantoin amidohydrolase) เอนไซม์แอล-คาร์บาโมอิลซาโคซีน อะมิโนไฮโดรเลส (L-carbamoylsarcosine aminohydrolase) ซาโคซีนออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส โดยมีตัวติดตามปฏิกิริยาดูสีที่เปลี่ยนไป เช่น การใช้ bromophenol blue เป็นต้น ปฏิกิริยาการตรวจวัดครีแอทินิน ดังแสดงในสมการต่อไปนี้ (36)

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatinine deaminase}} \text{N-methylhydantoin} + NH_3$$

$$\text{N-methylhydantoin} + \text{ATP} + H_2O \xrightarrow{\textit{L-metylhydantoinase}} \text{Carbamoylsarcosine} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

$$\text{Carbamoylsarcosine} + H_2O \xrightarrow[\textit{aminohydrolase}]{\textit{L-carbamoylsarcosine}} \text{Sarcosine} + \text{CO2} + \text{NH3}$$

$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\textit{sarcosine oxidase}} H_2O_2 + \text{Glycine} + \text{formaldehyde}$$

$$\text{Indicator (reduced)} + H_2O_2 \xrightarrow{\textit{peroxidase}} \text{Indicator (reduced)} + 2H_2O$$

ซึ่งข้อดีของการเพิ่มปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์แอล-แมทิลไฮแดนโทอิเนส เป็นการหลีกเลี่ยงการตรวจวัดสารแอมโมเนียโดยตรง เนื่องจากแอมโมเนียเป็นสารที่ระเหยง่าย ทำให้เกิดความคาดเคลื่อนในการตรวจวัดได้ นอกจากนี้หลักการข้างต้นครีเอทีนที่มีอยู่แล้วในตัวอย่างไม่รบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัด (37)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.2.4 หลักการตรวจแบบ dry chemistry

เป็นการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยหลักการของเอนไซม์ที่อาศัยปฏิกิริยาเช่นเดียวกับสมการในข้อ 2.4.2.3 โดยมีทั้งการตรวจวัดแอมโมเนียและเอ็น-แมทิลไฮแดนโทอินที่เกิดขึ้นอย่างสัมพันธ์กับปริมาณครีแอทินินในตัวอย่าง สำหรับการติดตามปฏิกิริยาของแอมโมเนียจะอาศัยการซึมผ่านของแอมโนเนียไปทำปฏิกิริยายังแถบตรวจที่มีตัวติดตามปฏิกิริยา คือ bromophenol blue ซึ่งจะเปลี่ยนสีตามความเข้มข้นของครีแอทินิน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ 600 นาโนเมตร ทั้งนี้แถบตรวจจะมีแถบ blank เพื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยา โดยบนแถบ blank จะไม่ถูกตรึงด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (36) นอกจากนี้มีการติดตามปฏิกิริยาของเอ็น-แมทิลไฮแดนโทอิน ด้วยการพัฒนาชุดตรวจของบริษัท Roche

diagnostics โดยอาศัยปฏิกิริยาของกลุ่มเอนไซม์ข้างต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นคือ H_2O_2 ที่สามารถเปลี่ยนตัวติดตามปฏิกิริยาให้เกิดสีที่เปลี่ยนไป

2.4.3 การตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยวิธีอื่นๆ

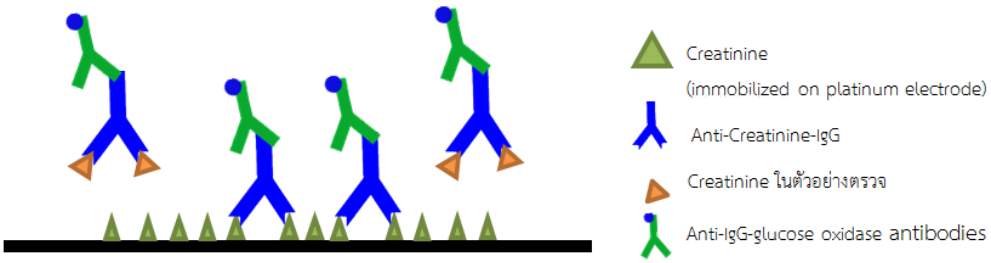
2.4.3.1 วิธีการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทรกราฟี (chromatography)

วิธีการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทรกราฟี เช่น Isotope-dilution mass spectrometry (IDMS) (38) เป็นวิธีอ้างอิงมาตรฐาน (gold standard method) ในการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจโดยใช้ creatinine-$^{13}C_2$ เป็นสารมาตรฐานภายในชนิดที่ติดฉลากด้วยคาร์บอนไอโซโทปอะตอม (labeled internal standard) และตรวจด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (39) และ Capillary electrophoresis (40) แต่เทคนิคดังกล่าวก็ยังมีข้อจำกัด เช่น ใช้เวลาในการตรวจวัดนาน ทำให้ทราบผลการทดสอบช้า เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ทั้งยังต้องมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างก่อนการทำการทดสอบและต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์ หรือความชำนาญในการใช้เครื่องมือดังกล่าวในการตรวจวัดและแปลผลอีกด้วย (41) ดังนั้นหลักการดังกล่าวจึงไม่เหมาะสมในการใช้ในการตรวจในงานประจำในห้องปฏิบัติการ

2.4.3.2 เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical methods)

การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เป็นการนำหลักการ Jaffé reaction (40, 42) หรือวิธี alkaline picrate chromogenic assay ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบบการปรับปรุงต่อจากวิธีแจฟฟี่ที่วัดแบบไคเนติก (modified kinetic Jaffé reaction) มาประยุกต์ เนื่องจากเป็นวิธีที่น้ำยาในการตรวจวัดมีราคาถูก และมีเสถียรภาพ (stable) เหมาะกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า และปัจจุบันนิยมใช้หลักการเอนไซม์ สำหรับตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการเคมีไฟฟ้าเช่นกัน (11, 12) เนื่องจากวิธีเอนไซม์มีความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังมีการใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoassay) หรือการใช้แอนติบอดี แบบแย่งจับ (43) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยทำการตรึงครีแอทินินไว้บนอิเลคโตรดชนิดแพลตินัม (platinum electrode) แล้วทำการบ่มตัวอย่างตรวจร่วมกับ anti-creatinine IgG และ anti-IgG-glucose oxidase ลง

ไปเพื่อให้ครีแอทินินในตัวอย่างกับที่อยู่บนเมมเบรนแย่งกันจับกับ anti-creatinine IgG เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงทำการล้างส่วนที่ไม่มีการจับกับครีแอทินินบนอิเลคโตรดออกไป จากนั้นเติมกลูโคสลงไป เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยสัญญาณทางเคมีไฟฟ้า

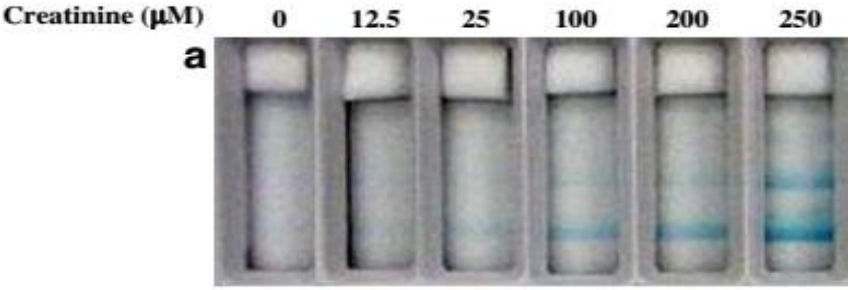


รูปที่ 2.2 แผนภาพการแย่งจับกันระหว่างครีแอทินินที่ถูกตรึงไว้บน platinum electrode และครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ

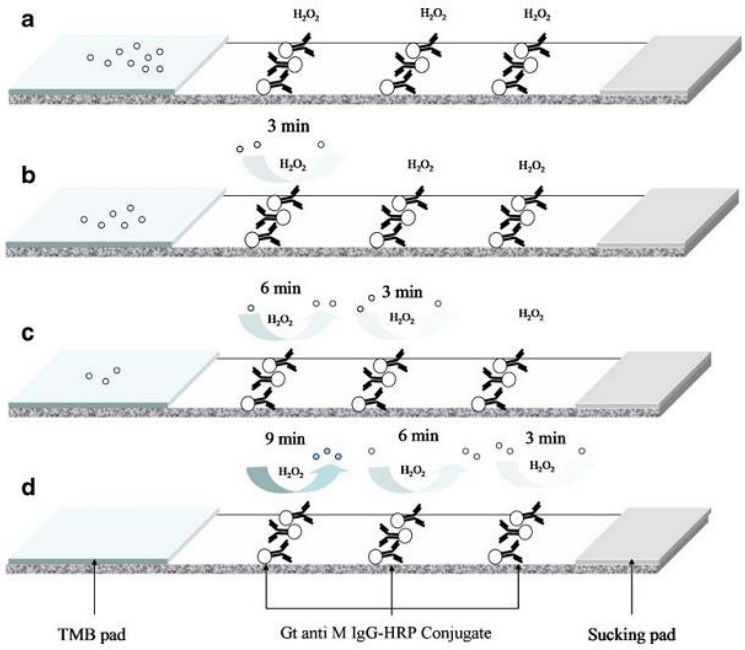
2.4.3.3 การตรวจวัดแบบให้ผลเร็ว (rapid test)

การตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วยชุดการตรวจวัดที่ให้ผลการทดสอบแบบให้ผลเร็วมีรายงานในงานวิจัย เช่น enzyme-based bar-code-style lateral-flow assay (44) เป็นการพัฒนาการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยการอาศัยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ครีแอทินิเนส เอนไซม์ครีแอทิเนสและเอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดส จากนั้นครีแอทินินในตัวอย่างที่ถูกเปลี่ยนเกิดเป็น H_2O_2 จากนั้นเติมสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate phosphate buffer) โดย H_2O_2 ที่เกิดขึ้น และ 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (TMB) ที่ถูกตรึงไว้บน peroxidase substrate pad จะถูกปล่อยออกมาแล้วเคลื่อนที่ไปทำปฏิกิริยากับ Goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate (Gt anti M IgG-HRP) ที่ถูกตรึงเป็นแถบไว้บนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) แล้วเกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน ซึ่ง H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับสัดส่วนของปริมาณครีแอทินินในตัวอย่าง ดังนั้น แถบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของครีแอทินิน โดยสามารถทำการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินได้แบบกึ่งปริมาณ ในช่วง 0 – 400 ไมโครโมลาร์ (μM) ผลการทดสอบสามารถอ่านจากจำนวนแถบที่เกิดขึ้นโดยไม่ต้อง

อาศัยเครื่องมือในการอ่านผลอื่นๆ โดยผลการทดสอบหากขึ้น 1 แถบ หมายถึง มีปริมาณ ครีแอทินินในตัวอย่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ไมโครโมลาร์ ผลการทดสอบให้สี 2 แถบ หมายถึง มีปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างระหว่าง 50- 250 ไมโครโมลาร์ และหากผลการทดสอบให้สี 3 แถบ หมายถึง มีปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างระหว่าง 250 - 400 ไมโครโมลาร์ และระยะเวลาในการอ่านผลการทดสอบ คือ 19 นาที ตัวอย่างการเกิดแถบสีจากผลการทดสอบดังรูปที่ 2.3 และหลักการการของ strip ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enzyme-based bar-code-style lateral-flow assay (44)



รูปที่ 2.4 แผนภาพการหลักการของ enzyme-based bar-code-style lateral-flow assay ในการตรวจวัดครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ (44)

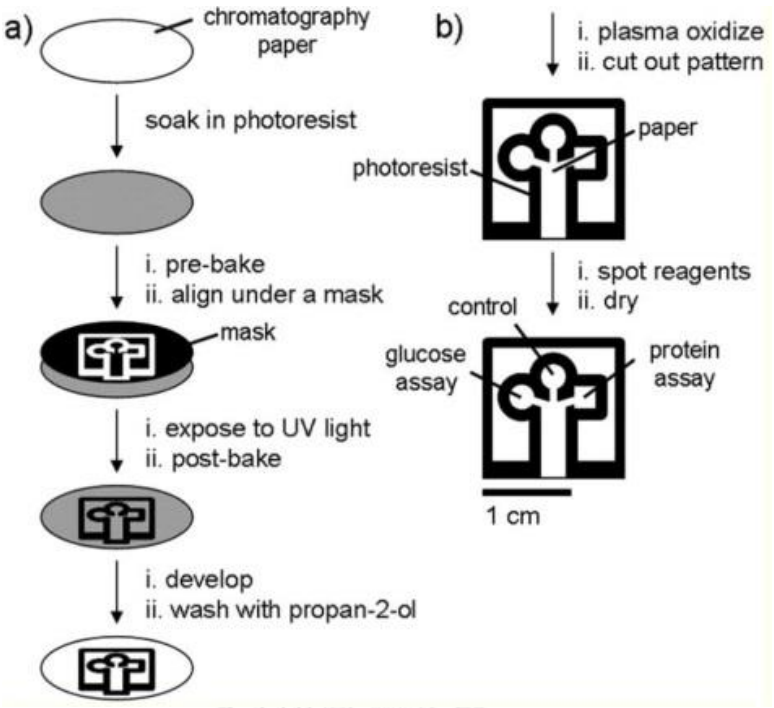
นอกจากนี้ยังมียังมีการพัฒนาการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะด้วยแถบจุ่ม (urine dipstick) ด้วยหลักการรวมตัวกับสี (dye-binding) โดยสารประกอบทองแดง-ครีแอทินิน (copper-creatinine complexes) จะทำปฏิกิริยากับ 3,3'5,5,'-tetramethylbenzidine (TMB) และ diisopropyl benzene dihydroperoxide (DBDH) และอาศัยการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase activity) ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นแล้วเกิดสารประกอบสี ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณครีแอทินินในตัวอย่าง และสามารถตรวจครีแอทินินได้ในช่วง 100 – 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของการรบกวนปฏิกิริยาจากฮีโมโกลบิน แม้จะมีการลดการรบกวนลงด้วยการเติมสาร 4-hydroxy-2-methyl quinolone แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบตัวอย่างปัสสาวะที่มีเลือดปน หรือให้ผลบวกกับ dipstick blood test ไม่ควรทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นดังกล่าว (45)

2.5 กระดาษและประโยชน์ของกระดาษ

กระดาษเป็นวัสดุที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ หาซื้อได้ทั่วไปและราคาถูก กระดาษถูกนำมาใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น การเขียน การวาดภาพ การพิมพ์และการบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วกระดาษก็ยังถูกนำมาใช้งานเกี่ยวกับการวิเคราะห์สารในห้องปฏิบัติการอีกด้วย ในทางห้องปฏิบัติการกระดาษมักถูกใช้ในการกรองสารและงานโครมาโทกราฟี ปัจจุบันกระดาษถูกทำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีต่างๆ เช่น การวัดสารเคมีเชิงคุณภาพบนกระดาษ การหาปริมาณของสารที่ต้องการทราบบนกระดาษ หรือใช้ในการทำชุดตรวจทราบผลเร็ว (strip and dipsticks) และปัจจุบันในงานวิจัยมีการนำกระดาษมาประยุกต์ใช้ในเพื่อพัฒนาเครื่องตรวจวัดให้สามารถทราบผลได้ทันทีเรียกว่าห้องปฏิบัติการบนกระดาษ (lab-on-paper) หรืออุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper-based analytical devices; μPADs) ซึ่งเป็นการย่อส่วนห้องปฏิบัติการให้เล็กลง ให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้บนกระดาษแผ่นเล็กๆ ได้ เนื่องจากกระดาษนั้นมีราคาที่ถูก มีคุณสมบัติในการดูดซับสารละลายจึงทำให้สารละลายสามารถไหลผ่านกระดาษได้โดยแรงแคปิลลารี (capillary action) โดยไม่ต้องอาศัยแรงจากภายนอก (46) นอกจากนี้ กระดาษยังมีขนาดบาง เล็ก สะดวกต่อการเคลื่อนย้าย มีความเข้ากันได้กับสารน้ำในร่างกาย ง่ายต่อการกำจัด เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถสร้างแบบสำหรับการทดสอบต่างๆได้ง่าย ทั้งยังใช้เป็นวัสดุสำหรับการตรวจวัดสารด้วยหลักการเกิดสีอย่างแพร่หลายอีกด้วย

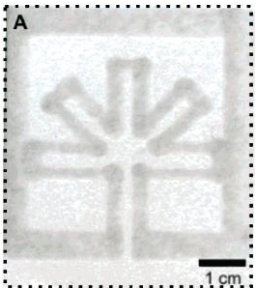
2.5.1 วิธีการสร้างขอบเขตบนกระดาษ

ขอบเขตในการทดสอบปฏิกิริยาของสารต่างๆ บนกระดาษสามารถสร้างได้จากการสร้างแบบให้มีพื้นที่ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เพื่อให้ส่วนที่เป็นส่วนที่ชอบน้ำสามารถใช้เป็นพื้นที่ในการเกิดปฏิกิริยาได้ เนื่องจากส่วนนี้จะยอมให้สารละลายเคลื่อนที่หรือไหลไปตามท่อที่สร้างขึ้นบนกระดาษด้วยแรงแคปิลลารีได้ ซึ่งความสามารถในการไหลของสารละลายบนกระดาษนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของกระดาษและความกว้างของท่อส่วนที่ชอบน้ำ ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และความชื้นด้วย (47) เทคนิคการสร้างแบบของชุดทดสอบบนกระดาษ เพื่อสร้างขอบเขตในการทดสอบสารต่าง ๆ ที่พบในได้ปัจจุบัน มีดังนี้ เทคนิคพิมพ์ด้วยแสง (photolithography) (46) การพิมพ์ลายโดยใช้วัสดุพอลิเมอร์ (polydimethylsiloxane; PDMS) (48) การตัดกระดาษ (paper cutting) เพื่อกำหนดขอบเขต (49) การพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ (ink jet printing) (50) การพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) (51) การสกรีนด้วยขี้ผึ้ง (wax screen-printing) (52) และการจุ่มกระดาษลงในสารละลายขี้ผึ้ง (wax dipping) (53) เพื่อกำหนดขอบเขตของพื้นที่สำหรับปฏิกิริยาที่ต้องการตรวจวัด เป็นต้น โดยเทคนิคการพิมพ์ด้วยแสงเริ่มถูกนำมาใช้สร้างแบบบนกระดาษเมื่อ Whitesides และคณะ (46) ใช้แสงในการพิมพ์ลวดลายบนกระดาษ โดยแช่กระดาษกรองในสารที่มีปฏิกิริยาไวต่อแสงอัลตร้าไวโอเลท (photoresist) แล้วฉายแสงอัลตร้าไวโอเลท (UV light) ผ่านแบบฟิล์มใส (transparency film) ที่เป็นแม่แบบ เพื่อทำให้เกิดการกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารบนกระดาษให้เป็นโพลีเมอร์ ซึ่งจะได้พื้นที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำเป็นตัวกำหนดขอบเขตในการเกิดปฏิกิริยา และส่วนที่ไม่ถูกฉายแสงจะไม่ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลิเมอร์บนกระดาษ ทำให้สามารถล้างสารออกได้ เพื่อให้ได้ส่วนที่ชอบน้ำซึ่งเป็นพื้นที่ที่สามารถยอมให้สารละลายผ่านได้สำหรับเกิดปฏิกิริยาต่อไป ดังรูปที่ 2.5



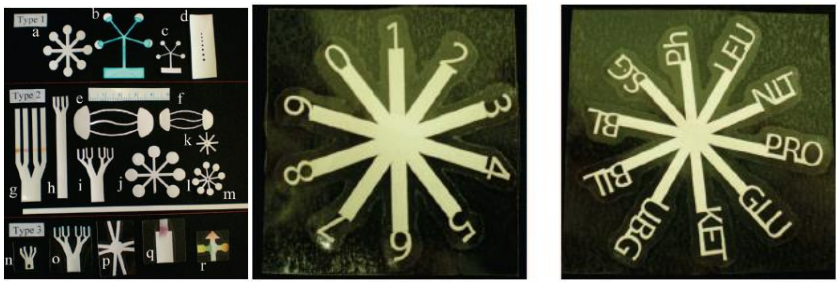
รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการสร้าง μPADs ด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยแสงสำหรับตรวจวัดกลูโคสและโปรตีนในปัสสาวะ (46)

ต่อมา Bruzewicz และคณะ (48) ได้พัฒนาการพิมพ์ลายบนกระดาษโดยละลาย PDMS ในเฮกเซน อัตราส่วน 3:1โดยใช้เครื่องพิมพ์แบบตั้งโต๊ะที่ประยุกต์ขึ้นมา เพื่อสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนกระดาษ ดังรูปที่ 2.6



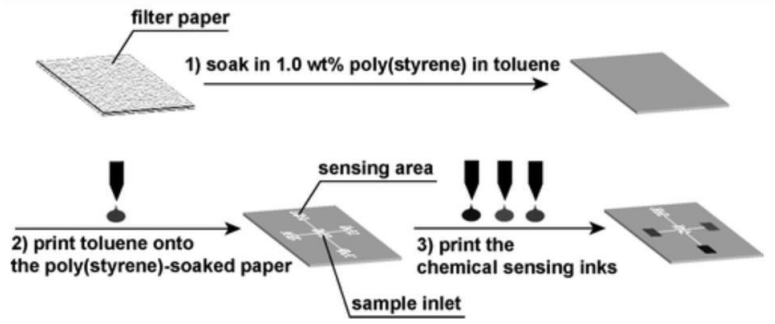
รูปที่ 2.6 แบบที่ได้จากการพิมพ์ลายด้วย PDMS บนกระดาษ (48)

Erin และคณะใช้การตัดกระดาษ เพื่อการกำหนดขอบเขตการเกิดปฏิกิริยาด้วยรูปแบบต่างๆ (49) ดังรูปที่ 2.7



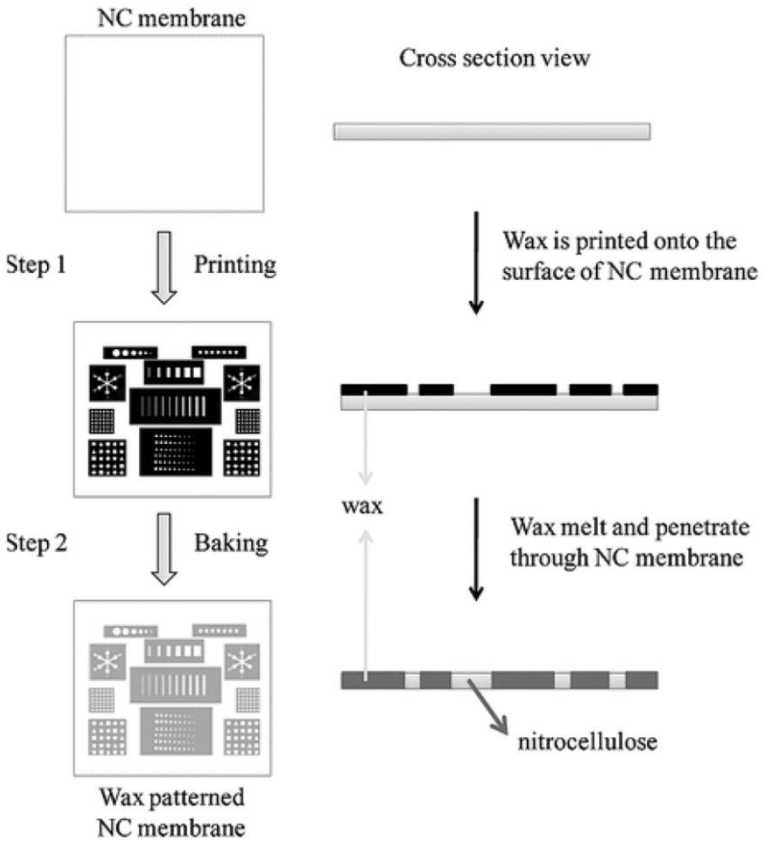
รูปที่ 2.7 แบบที่ได้จากการตัดกระดาษเพื่อกำหนดขอบเขตในการเกิดปฏิกิริยา (49)

Abe และคณะ (50) ใช้วิธีแช่กระดาษกรองด้วยโพลีสไตรีนที่ถูกละลายในโทลูอีน แล้วประยุกต์ใช้เครื่องพิมพ์แบบอิงค์เจทในการพิมพ์ตัวทำละลายหรือโทลูอีนลงบนกระดาษ เพื่อให้ไปละลายส่วนที่เป็นโพลีเมอร์อยู่ ซึ่งจะได้พื้นที่ว่างที่สามารถใช้ในการเกิดปฏิกิริยาต่อไป ดังรูปที่ 2.8



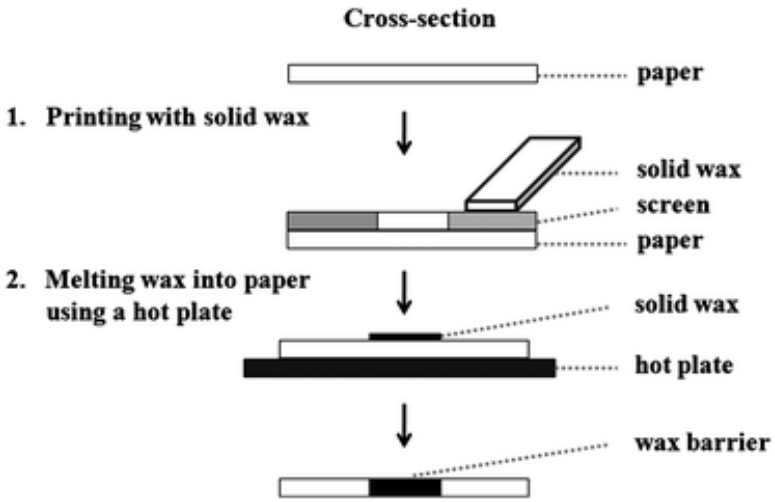
รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยหลักการ ink jet printing (50)

Lu และคณะได้เริ่มใช้เทคนิค wax printing เพื่อกำหนดขอบเขตของพื้นที่ในการเกิดปฏิกิริยา (51) ดังรูปที่ 2.9



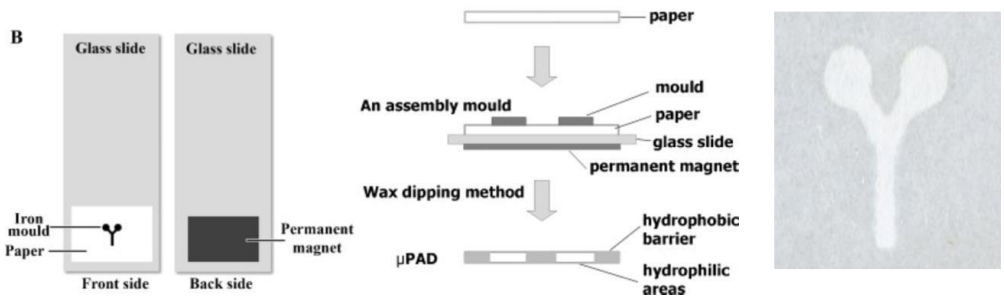
รูปที่ 2.9 ขั้นตอนการสร้าง μPADs โดยหลักการ wax printing (51)

นอกจากนี้การสร้างห้องปฏิบัติการบนกระดาษโดยทีมนักวิจัยไทย เช่น การพิมพ์สกรีนด้วยขี้ผึ้ง (wax screen-printing) โดย Dungchai และคณะ (52) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำการถูเทียนไขลงบนตะแกรงที่เป็นแม่แบบสำหรับสกรีนแบบลงกระดาษกรอง แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเพื่อให้เทียนไขทำหน้าที่กั้นขอบเขตบนกระดาษ ดังรูปที่ 2.10

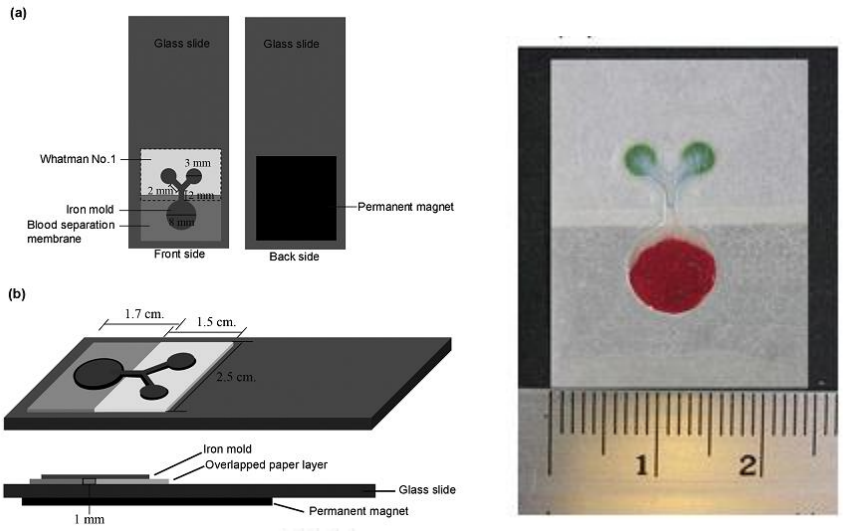


รูปที่ 2.10 ขั้นตอนของเทคนิค wax screen-printing (52)

และการจุ่มด้วยขี้ผึ้ง (wax dipping) โดย Songjaroen และคณะ (53) วิธีนี้ใช้แม่พิมพ์เหล็กวางบนกระดาษกรองที่วางบนกระจกสไลด์ แล้วใช้แม่เหล็กติดด้านหลังของกระจกสไลด์ เพื่อยึดแม่พิมพ์แผ่นเหล็กไว้ชั่วคราว จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนที่ประกอบเข้าด้วยกันนี้ลงในขี้ผึ้งเหลว รอเย็นเพื่อให้ขี้ผึ้งเกาะตัวบนกระดาษแล้วแกะแบบออกเพื่อให้ได้ชิ้นงานที่ต้องการ ดังรูปที่ 2.11 และมีการประยุกต์ใช้ในการแยกเลือดด้วยการประกอบกระดาษกรองเข้ากับกระดาษแยกเลือดชนิด LF1 (blood separation membrane) เพื่อสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดปริมาณโปรตีนบนกระดาษได้ในขั้นตอนเดียว (54) โดยเม็ดเลือดแดงจะถูกกักเก็บไว้ในกระดาษแยกเลือด และพลาสมาจะถูกแยกออกมาทำตามแนวท่อที่ออกแบบไว้แล้วเคลื่อนที่ไปทำปฏิกิริยากับน้ำยาที่ตรึงไว้บนกระดาษ และแปลผลการตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่สัมพันธ์กับความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.11 ขั้นตอนของเทคนิค wax dipping และชิ้นงานที่ได้ (53)



รูปที่ 2.12 ขั้นตอนการประกอบกระดาษกรองและกระดาษแยกเลือดด้วยเทคนิค wax dipping และชิ้นงานที่ได้ (54)

2.5.2 ตัวอย่างเทคนิคในการตรวจวัดบนกระดาษ

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ทำการตรวจวัดสารต่างๆ บนกระดาษเป็นจำนวนมาก เช่นการตรวจน้ำตาลและกรดยูริก (55) การตรวจวัดปริมาณน้ำตาลและโปรตีน (53) ซึ่งจะติดตามปริมาณสารที่ต้องการวัดด้วยการดูความเข้มสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษโดยสัมพันธ์กับความเข้มข้น (colorimetric method) นอกจากหลักการดังกล่าวแล้ว ยังมีและการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดครบส่วนบนกระดาษ โดยมีการใช้กระดาษแยกเลือดในการแยกเฉพาะซีรัมให้ไหลออกมาตามท่อเพื่อไปยังพื้นที่เกิดปฏิกิริยาด้วยหลักการของเอนไซม์ (enzymatic method) (56) และการตรวจวัดปริมาณคอเรสเตอรอลโดยใช้ขั้วชนิดแกรฟีนประยุกต์ที่ผลิตขึ้นมา (graphene /polyvinylpyrrolidone/ polyaniline nanocomposite) โดยหลักการทางเคมีไฟฟ้า (electrochemistry) ชนิดแอมเพอโรมิทรี (amperometry) เพื่อติดตามปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (57) การตรวจหา alpha-fetoprotein (AFP), cancer antigen 125 (CA125) และ carcinoembryonic antigen (CEA) บนกระดาษด้วยหลักการ chemiluminescence ELISA (58) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการตรวจวัดบนกระดาษโดยอาศัยหลักการวัดระยะทางในการไหลของสารในปฏิกิริยา เช่น การตรวจวัดหาปริมาณของกลูต้าไธโอนบนกระดาษโดย Cate และคณะ (59) โดยวัดระยะทางในการเคลื่อนที่ของกลูต้าไธโอนที่จับกับอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร หากมีปริมาณกลูต้าไธโอนที่แตกต่างกันจะทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับอนุภาคเงินระดับนาโนเมตรใหญ่ขึ้นตามสัดส่วนความเข้มข้น ส่งผลให้อัตราเร็วในการไหลของสารมีความแตกต่างกันไปด้วย นั่นคือ หากมีปริมาณกลูต้าไธโอนมาก มีการเกาะกลุ่มของอนุภาคเงินระดับนาโนมาก การเคลื่อนที่จะช้าลงกว่าเมื่อมีปริมาณกลูต้าไธโอนน้อยกว่า

Khan และคณะใช้เทคนิคการจับกลุ่มกันอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจหมู่เลือด แต่เปลี่ยนพื้นที่การทำปฏิกิริยาจากสไลด์แก้วมาเป็นกระดาษกรอง โดยอ่านผลจากการวิเคราะห์ถ่ายภาพเคลื่อนไหวของการเกิดปฏิกิริยาแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Image-Pro Plus 5.0 software) เพื่อแปลผลเป็นหมู่เลือดต่อไป (60) นอกจากนี้ Ballerini และคณะใช้เทคนิคการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อกันเช่นเดียวกับหลักการของวิธีหลอดทดลองและสไลด์ แต่เลือกใช้เทคนิคที่ประหยัดขึ้น ใช้วัสดุที่หาได้ง่าย ราคาถูก อย่างเช่น ด้าย (thread) ที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลส (Cellulose) และโพลีเอสเตอร์ (Polyester) มาใช้ในการตรวจ ทั้งใช้น้ำยาและสิ่งส่งตรวจที่ปริมาณน้อยกว่าเทคนิคอื่นๆ เพื่อใช้ประโยชน์ในบางพื้นที่ที่ต้องการใช้ในงานฉุกเฉิน โดยแปลผลจากความยาวของซีรัมที่เคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าเมื่อแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะนั้นๆ (61) ยิ่งไปกว่านั้นมีการพัฒนาการตรวจหมู่เลือด Rh และ ABO แบบ cell grouping และ serum grouping ภาพในชุดตรวจเดียวกันอีกด้วย (20)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างปัสสาวะแรกหลังตื่นนอนตอนเช้า หรือ first morning midstream urine จำนวน 90 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะจากอาสาสมัครผู้ที่มีสุขภาพดี เพื่อใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก (conventional kinetic alkaline picrate) ที่นิยมใช้ทั่วไปทางห้องปฏิบัติการในการตรวจวัดปริมาณครีแอทินิน จำนวน 40 ตัวอย่าง และใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีตรวจปริมาณครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์ (enzymatic method) จำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (COA No. 159/2557)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัท และประเทศที่ผลิต
1	เครื่องปั่นเหวี่ยง (MIKRO 200)	Hettich, Germany
2	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Evolution 600)	Thermal Scientific, USA
3	เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH)	Thermal Scientific, USA
4	เครื่องอ่าน microplate (Synergy Mx)	BioTeK, USA
5	เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน พร้อมเครื่องวัดอุณหภูมิ	IKA® C-MAG HS7, China
6	เครื่องผสมสาร (vortex)	Scientific Industries, USA
7	เครื่องผลิตน้ำ MilliQ	Millipore, USA
8	ตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HVP-50	Hiclave™, Japan

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัท และประเทศที่ผลิต
9	เครื่องชั่งสาร	Mettler Toledo, Switzerland
10	เครื่องสแกนเอกสาร (HP Deskjet F(370	HP, USA
11	เครื่องปริ้นเอกสาร (HP LaserJet P1102)	HP, USA

ตารางที่ 3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัท และประเทศที่ผลิต
1	กระดาษกรอง Whatman No.1, 3 และ 42	Whatman™, England
2	กระดาษแยกเลือด Whatman ชนิด VF1, VF2 และ MF1	Whatman™, England
3	กระปุกเก็บปัสสาวะ	บริษัท กรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด ประเทศไทย
4	96-well plates	Corning® , USA
5	ขวด Duran	CHOTT DURAN®, Germany
6	Glassware ได้แก่ Erlenmeyer flask, beaker, Cylinder	PYREX, USA
7	Volumetric pipette	HBG, Germany
8	Microcentrifuge tube	Axygen® Scientific, USA
9	Auto pipette	Gilson,Inc.,USA
10	Pipette tip (20, 200, 1000 µL)	Gilson,Inc.,USA
11	Corning tube (15, 50 mL)	Corning® , USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	น้ำยาและสารเคมี	การใช้งาน	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	ขี้ผึ้งขาว	สร้างขอบเขตของกระดาษให้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ	ร้านศึกษาภัณฑ์พาณิชย์ ประเทศไทย
2	น้ำยา creatinine plus ver.2 (ref.03263991, lot no. 687743)	สำหรับประยุกต์ใช้น้ำยาปริมาตรเหลือ เพื่อใช้ในการสร้าง enz-PAD สำหรับตรวจหาปริมาณครีแอทินิน	Roche Diagnostics, Germany
3	Creatinine ($C_4H_7N_3O$)	สำหรับใช้เป็นสารมาตรฐานครีแอทินิน	Merck, Germany
4	น้ำยา Bio-Rad Protein assay	สำหรับตรวจหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของน้ำยา	Bio-Rad, USA
5	Peroxidase Activity Assay Kit	สำหรับการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในน้ำยา R2	Sigma-Aldrich, Germany
6	Creatine anhydrous ($H_2NC(=NH)N(CH_3)CH_2CO_2H$)	สำหรับการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ครีแอทิเนสในน้ำยา R1	Sigma-Aldrich, Germany
7	p – dimethylamino-benzaldehyde	สำหรับการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ครีแอทิเนสในน้ำยา R1	Sigma-Aldrich, Germany
8	Dimethylsulfoxide (DMSO)	สำหรับการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ครีแอทิเนสในน้ำยา R1	Sigma-Aldrich, Germany

ตารางที่ 3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ลำดับ	น้ำยาและสารเคมี	การใช้งาน	บริษัทและประเทศที่ผลิต
9	Hydrochloric acid (HCl)	สำหรับการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ครีแอทิเนสในน้ำยา R1 (DAB solution) และสำหรับเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, Germany
10	D-(+)-Glucose	สำหรับการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs	Sigma-Aldrich, USA
11	Human serum albumin	สำหรับการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs	Sigma-Aldrich, USA
12	Hemoglobin	สำหรับการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs	Sigma-Aldrich, USA
13	Ascorbic acid	สำหรับการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs	Sigma-Aldrich, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ลำดับ	น้ำยาและสารเคมี	การใช้งาน	บริษัทและประเทศที่ผลิต
14	Bilirubin	สำหรับการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs	Fluka, Germany
15	Uric acid ($C_5H_4N_4O_3$)	สำหรับการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs	Sigma-Aldrich, Germany
16	Creatine monohydrous ($C_4H_9N_3O_2 \cdot H_2O$)	สำหรับการทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs	Merck, Germany
17	Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	สำหรับเตรียมสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	Merck, Germany
18	Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	สำหรับเตรียมสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	Merck, Germany
19	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	สำหรับเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์	Bio-Rad, USA
20	Creatinine Liquicolor	ตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะ	Human diagnostic, Germany

3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Creatinine plus ver.2 ในหลอดทดลองและบนกระดาษ

น้ำยา Creatinine plus ver.2 ของบริษัท Roche diagnostics ใช้หลักการทางเอนไซม์ (enzymatic colorimetric method) ในการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ โดยน้ำยาดังกล่าวใช้ประกอบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ COBAS c501 โดยในงานวิจัยนี้ได้นำเอาน้ำยาปริมาตรที่เหลือจากการที่ reagent probe สำหรับดูดน้ำยาของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติไม่สามารถดูดนำมาใช้งานได้มาประยุกต์ใช้ เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์ โดยหลักการและการเกิดสีของน้ำยาเป็นดังสมการ

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{\text{creatininase}} \text{Creatine}$$

$$\text{Creatine} + H_2O \xrightarrow{\text{creatinase}} \text{Sarcosine} + \text{Urea}$$

$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{sarcosine oxidase}} \text{Glycine} + HCHO + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-aminophenazone} + \text{HTIB} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{Quinone imine chromogen} + H_2O + HI$$

กล่าวคือ เมื่อนำน้ำยา Creatinine plus ver.2 มาทำปฏิกิริยากับสารครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ เอนไซม์ครีแอทินิเนส เอนไซม์ครีแอทิเนส และเอนไซม์ซาร์โคซีนออกซิเดสจะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ เกิดเป็นไกลซีน ฟอร์มาลดีไฮด์ และ H_2O_2 จากนั้น H_2O_2 ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณครีแอทินินจะทำปฏิกิริยากับ 4-aminophenozone และ 2,4,6-triiodo-3-hydroxybenzoic acid โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูแดง (quinone imine chromogen) ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นของ quinone imine chromogen จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ ส่วนประกอบของน้ำยา Creatinine plus ver.2 จำนวน 1 กล่อง ประกอบไปด้วยน้ำยา 2 ขวด ได้แก่ น้ำยาขวดที่ 1 (R1) และน้ำยาขวดที่ 2 (R2) ซึ่งประกอบไปด้วยสารต่างๆ โดยสารหรือเอนไซม์แต่ละชนิดมีปริมาณของความเข้มข้น (คำนวณจากเอกสารแนบประกอบน้ำยา) ดังตารางที่ 3.4

น้ำยา R1 ประกอบไปด้วยเอนไซม์ครีแอทิเนส และเอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดส ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิด จะทำปฏิกิริยากับตัวอย่างตรวจก่อน เพื่อกำจัดครีเอทีนที่มีในตัวอย่างก่อนเกิดเป็น H_2O_2 ซึ่งเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ในน้ำยา R1 จะทำหน้าที่ในการกำจัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้นนั้น จากนั้นเมื่อเติมน้ำยา R2 ที่มีเอนไซม์ครีแอทินิเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเข้าไปในปฏิกิริยา ครีแอทินินในตัวอย่างตรวจจะเริ่มทำปฏิกิริยากับกลุ่มของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ดังสมการข้างต้น สำหรับเอนไซม์แอสคอร์เบทออกซิเดส (ascorbate oxidase) ในน้ำยา R1 เป็นเอนไซม์สำหรับลดการรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดจากวิตามินซี และโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (42) ในน้ำยา R2 เป็นสารสำหรับลดการรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดจากบิลิรูบินในตัวอย่างตรวจ (35)

การหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยน้ำยา Creatinine plus ver.2 ใช้ปริมาตรของน้ำยารวม 115 ไมโครลิตร และใช้ตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยมีการเจือจางตัวอย่างก่อน 50 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.4 รายละเอียดของน้ำยา Creatinine plus ver. 2

รายละเอียดน้ำยา	**ความเข้มข้น**
R1	
Creatinase	0.0190 U/µl
Sarcosine oxidase	0.0079 U/µl
Ascorbate oxidase	0.0020 U/µl
HTIB	0.0120 mg/µl
N-tris-(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid (TAPS)	0.3 µmol/µl
Catalase	0.0001 U/µl

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.4 ข้อมูลรายละเอียดของน้ำยา Creatinine plus ver.2 (ต่อ)

รายละเอียดน้ำยา	**ความเข้มข้น**
R2	
Creatininase	0.0299 U/µl
Peroxidase	0.0010 U/µl
4-aminophenazone	0.5 mg/µl
Potassium hexacyanoferrate (II)	0.06 mg/µl
N-tris-(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid (TAPS)	0.5 µmol/µl

ตารางที่ 3.5 ปริมาตรน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัดต่อหนึ่งการทดสอบ ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c501

Serum, plasma, urine*	**Reagent volume (µL)**	**Diluent (H_2O) (µL)**
R1	77	
Sample	2	5
R2	38	
Total volume	**122**	

* Pre-dilution factor = 20

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.1 ทดสอบปฏิกิริยาของน้ำยาในหลอดทดลอง โดยทดสอบความไวในการเกิดสีของน้ำยา โดยการวัด OD ที่ 552/659

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดของน้ำยาปริมาตรที่เหลือจากการใช้งานของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ มีความไวในการตรวจวัดอย่างไร และความเข้มของสีของที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดสอบด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำยา Creatinine plus ver.2 กับสารมาตรฐานครีแอทินินใน 96-wells plate ตามขั้นตอนในเอกสารแนบประกอบน้ำยา ดังแสดงในตารางที่ 3.5 โดยทำการเติมน้ำยา R1 ลงในหลุมปฏิกิริยาหลุมละ 77 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หลุมละ 2 ไมโครลิตร ตามด้วยเติมน้ำกลั่น หลุมละ 5 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยเขย่า 96-well plate บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเติมน้ำยา R2 หลุมละ 38 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยเขย่า plate อีกครั้ง จากนั้นทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัด OD ที่ 522/659 นาโนเมตร แบบ endpoint ด้วยเครื่อง microplate reader (Synergy Mx, BioTeK) โดยค่า OD ที่ 522 นาโนเมตรเป็นการวัดสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (สีชมพู) และค่า OD ที่ 659 นาโนเมตร เป็นการวัดสีของสิ่งรบกวน (background) จากสีของตัวอย่างตรวจ (สีเหลือง) จากนั้นนำค่า OD ที่ 552 นาโนเมตร ลบกับ OD ที่ 659 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ OD 552 - 659 นาโนเมตร และนำผลการทดสอบที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของครีแอทินิน (mg dL^{-1}) และค่าการดูดกลืนของแสงต่อไป แล้วศึกษาความไวในการทดสอบโดยดูค่าจากความชัน (a) ของกราฟเส้นตรง จากสมการ $y = ax + b$

3.1.2 ทดสอบความสามารถและปฏิกิริยาของน้ำยาบนกระดาษกรอง

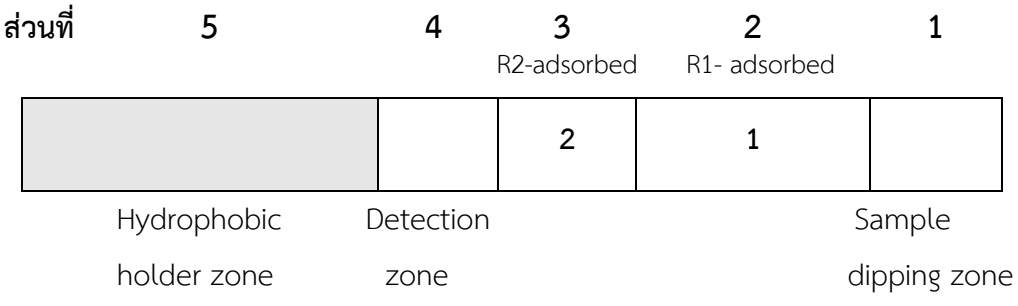
เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีบนกระดาษ โดยทำการทดสอบเบื้องต้นกับกระดาษกรอง Whatman No.1 เนื่องจากเป็นกระดาษที่นิยมในงานทางวิทยาศาสตร์และงานวิจัยทั่วไป ราคาถูก มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด โดยผสมน้ำยา R1 และ R2 ใน สัดส่วน 77 ไมโครลิตร ต่อ 38 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้น้ำยาพร้อมใช้งาน (mix reagent) จากนั้นตรึงน้ำยาที่ผสมแล้ว จำนวน 3 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรอง (ปริมาตรพอดีกับพื้นที่ทดสอบบนกระดาษกรอง) จากนั้นรอให้น้ำยาที่ตรึงลงบน

กระดาษกรองแห้งสนิทเป็นเวลา 10 นาที แล้วหยดสารมาตรฐานครีแอทินิน 0, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จำนวน 3 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษที่ตรึงน้ำยาไว้ สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนกระดาษ จากนั้นรอปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที และทำการบันทึกผลการทดสอบด้วยเครื่องสแกนเอกสาร (HP Deskjet F(370

3.2 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์

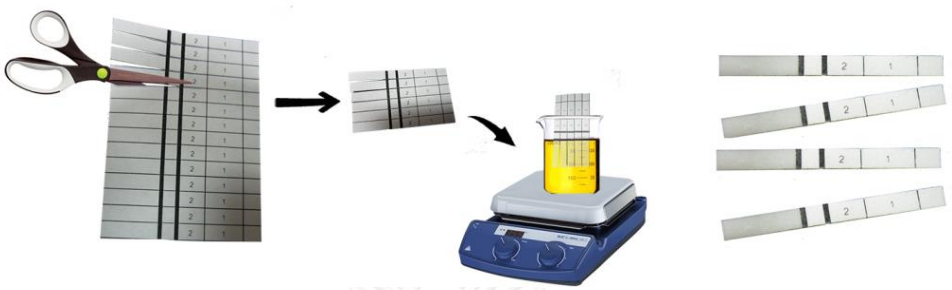
3.2.1 การออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์ ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด

ในขั้นตอนการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์ (enzymatic paper-based analytical devices, enz-PADs) ที่ใช้ในวิจัยนี้ ใช้โปรแกรม Microsoft Office Word 2010 สำหรับออกแบบรูปร่างและขนาดของพื้นที่ในการตรวจวัด และการสร้างเส้นขอบเขตของการทดสอบบนกระดาษโดย HP LaserJet P1102 printer สำหรับแบบ enz-PADs ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดนั้น มีการออกแบบให้มี 5 ส่วน อันได้แก่ ส่วนที่ 1 พื้นที่สำหรับจุ่มตัวอย่าง ส่วนที่ 2 พื้นที่สำหรับตรึงน้ำยา R1 ส่วนที่ 3 พื้นที่สำหรับตรึงน้ำยา R2 ส่วนที่ 3 พื้นที่สำหรับการอ่านปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น และ ส่วนที่ 5 พื้นที่สำหรับจับ PADs โดยออกแบบให้เป็นชนิด hydrophobic holder zone ซึ่งเป็นพื้นที่ส่วนที่กลัวน้ำหรือไม่ชอบน้ำ จึงสามารถกั้นไม่ให้สารผสมที่เกิดจากปฏิกิริยาไหลผ่าน ทำให้สารละลายทั้งหมดที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาสิ้นสุดและหยุดเคลื่อนที่ ณ บริเวณพื้นที่ตรวจวัด ด้วยเทคนิค wax dipping เพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ และสามารถบันทึกผลการทดสอบและแปลผลต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงบริเวณต่างๆ บน enz-PADs

สำหรับ hydrophobic holder zone ผู้วิจัยสร้างขอบเขตจำกัดพื้นที่ในการไหลของสารโดยใช้เทคนิค wax dipping (53) ด้วยการจุ่มปลายในส่วนของ hydrophobic holder zone ลงในขี้ผึ้งที่กำลังหลอมละลายที่อุณหภูมิ 108 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วินาที ดังขั้นตอนการสร้าง enz-PADs ในรูปที่ 3.2



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนในการสร้าง enz-PADs สำหรับการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ โดยออกแบบและพิมพ์แบบที่ได้ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นตัดแยกแบบตามภาพ (ก) นำด้านสำหรับจับ hydrophobic holder zone จุ่มลงในขี้ผึ้งที่กำลังหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 108 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วินาที ดังภาพ (ข) ปล่อยให้ขี้ผึ้งจับตัวแข็งแล้วตัดแยก PADs ออกจากกันดังภาพ (ค)

3.2.2 การศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมต่อการสร้าง enz-PADs

ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้กระดาษกรอง Whatman เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาอุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษ เนื่องจากกระดาษกรองเป็นวัสดุที่ราคาถูก ทั้งยังมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการไหลของของเหลวคือ แรงแคปิลลารี โดยไม่อาศัยแรงจากภายนอก (46) นอกจากนี้กระดาษยังมีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกันให้เลือกใช้หลายขนาด ทำให้มีอัตราการไหลของของเหลวที่ระยะเวลาต่างๆ กัน จึงสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับการนำมาการพัฒนา enz-PADs สำหรับการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินได้เป็นอย่างดี

ในการศึกษาเลือกใช้กระดาษกรองที่เหมาะสมในการสร้าง enz-PADs กระดาษกรองเบอร์ 1, 3 และ 42 ถูกเลือกนำมาใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา โดยทำการสร้าง PADs ด้วยกระดาษกรองทั้ง 3 ชนิดดังรูปที่ 3.2 (ค) ซึ่งแบบที่ใช้นั้นได้ผ่านการทดสอบปริมาตรน้ำยาที่เหมาะสมในการตรึงเรียบร้อยแล้ว ได้แก่ ทำการตรึงน้ำยา R1 บนพื้นที่ R1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และตรึงน้ำยา R2 บนพื้นที่ R2

ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร โดยอัตราส่วนของน้ำยา R1 ต่อ R2 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นไปตามเอกสารประกอบน้ำยา Creatinine plus ver.2 คือ 2 : 1 จากนั้นรอให้น้ำยาที่ตรึงไว้แห้งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำ enz-PADs ที่ผ่านการตรึงน้ำยามาทดสอบด้วยสารมาตรฐานครีแอทินินความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงขั้นตอนในรูปที่ 3.3 สังเกตและบันทึกผลการทดสอบ ผู้วิจัยเลือกใช้กระดาษกรองเบอร์ที่ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด ทั้งผลการทดสอบในเรื่องการไหลของสารและสีที่เกิดจากปฏิกิริยา เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ และให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนที่สุดต่อไป

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 3.3 ขั้นตอนในการสร้างและใช้งาน enz-PADs สำหรับการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน (ก) ตรึงน้ำยา R1 บน R1 zone (หมายเลข 1) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และตรึงน้ำยา R2 บน R2 zone (หมายเลข2) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นปล่อยให้น้ำยาแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จะได้ enz-PADs พร้อมใช้งาน (ข) แสดงลักษณะการจุ่ม enz-PADs ลงใน sample wells (96-well plate) (ค) แสดงตัวอย่างของ enz-PADs ที่ทำการทดสอบเรียบร้อยแล้ว

3.2.3 การศึกษาสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนพื้นที่ตรวจวัดของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น

ทำการสร้าง enz-PADs ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 โดยทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อหาสารที่เหมาะสมในการตรึงบนส่วนพื้นที่ตรวจวัดก่อนทำมาใช้ทดสอบตรวจหาปริมาณครีแอทินิน เนื่องจากกระดาษกรองเมื่อมีการสัมผัสกับน้ำหรือสารละลายเยื่อของเซลลูโลสจะมีการพองตัว (62) จึงสันนิษฐานว่าการตรึงสารละลายบนพื้นที่ตรวจวัดก่อนนำมาทดสอบปฏิกิริยา เพื่อวัดความเข้มสี จะทำให้ปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นเรียบเนียนขึ้นได้จึงทำการทดสอบตรึงน้ำกลั่น (distilled water) และ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับการไม่ตรึงสารใดๆ ลงบนพื้นที่ตรวจวัดพร้อมๆ กับการตรึงน้ำยาแล้วทำการทดสอบ

กับสารมาตรฐานครีแอทินินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จากนั้นอ่านค่าความเข้มสีบนพื้นที่เกิดปฏิกิริยาด้วยโปรแกรม Adobe photoshop CS2 ด้วยขนาดของพื้นที่การวัดคงที่ที่ 70X90 pixels ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ของพื้นที่ตรวจวัดเกือบทั้งหมด จากนั้นเลือกใช้สารที่ให้ผลการทดสอบดีที่สุดในการตรึงบนพื้นที่ตรวจวัด

3.3 การศึกษาหาปริมาณโปรตีนรวมและการทำงานของเอนไซม์ของน้ำยา Creatinine plus ver.2

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้นำเอาน้ำยา Creatinine plus ver.2 ของบริษัท Roche diagnostic ส่วนที่เหลือจากก้นตลับน้ำยาจากการที่ reagent probe สำหรับดูดน้ำยาของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติไม่สามารถดูดน้ำมาใช้ได้มาประยุกต์ใช้ในการสร้าง enz-PADs เพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ จึงนำน้ำยาสำเร็จรูป Creatinine plus ver.2 ซึ่งประกอบด้วยน้ำยา R1 และ R2 มาทำการตรวจหาปริมาณโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์ตัวแทนรวมในน้ำก่อนนำมาใช้งานจริงเพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติของน้ำยาที่นำมาใช้ในการสร้าง enz-PADs ในงานวิจัยนี้และป้องกันความหลากหลายของความเข้มข้นและการทำงานของเอนไซม์ในน้ำยาในการผลิตแต่ละครั้งของน้ำยา (reagent's lot) ด้วยการตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยน้ำยา Bradford's (BioRad) และการทำงานของตัวแทนเอนไซม์ (enzyme activity) ในน้ำยา R1 และ R2 คือ เอนไซม์ครีแอทิเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ เนื่องด้วยน้ำยา Creatinine plus ver.2 มีอายุในการใช้งานหลังเปิดใช้เป็นเวลา 2 เดือน และผู้วิจัยใช้น้ำยาดังกล่าวอายุตั้งแต่ 2 สัปดาห์ (หลังเปิดใช้งานสำหรับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ) มาใช้ในการสร้าง enz-PADs ดังนั้นจึงทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนและการทำงานของตัวแทนรวมในน้ำยา 2 ชุด ได้แก่ น้ำยาอายุน้ำยา 2 สัปดาห์ (ก่อนการใช้งาน (และน้ำยาอายุน้ำยา 2 เดือน (น้ำยาหลังการใช้งาน) ดังนั้น ตัวอย่างที่ทำการทดสอบ 4 ตัวอย่าง คือ น้ำยา R1 อายุ 2 สัปดาห์, น้ำยา R2 อายุ 2 สัปดาห์, น้ำยา R1 อายุ 2 เดือน และน้ำยา R2 อายุ 2 เดือน โดยทำการเตรียมตัวอย่างหรือน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัดทั้งสองกลุ่มดังนี้ คือ นำน้ำยา R1 ผสมรวมกัน จำนวน 10 กล่อง และ R2 ผสมรวมกัน จำนวน 10 กล่อง เพื่อให้ได้ปริมาตรที่มากพอต่อการใช้งานในงานวิจัยนี้แล้วนำมาวัดหาปริมาณโปรตีนและการทำงานของตัวแทนเอนไซม์รวมของน้ำยาทั้งสองระหว่างการใช้งาน

3.3.1 การตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยน้ำยา Bradford (Bradford's reagent)

ทำการเจือจาง Bradford's reagent 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 4 ส่วน เพื่อใช้เป็น working reagent จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเจือจาง เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยาต่อไป จากนั้นทดสอบตัวอย่างที่เตรียมไว้ทั้ง 4 ตัวอย่าง พร้อมกับการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยการใช้ Bradford's reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่า OD ที่ 595 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนใน BSA ที่ OD 595 นาโนเมตร ด้วย Bradford's reagent และคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างต่อไป

3.3.2 การตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ตัวแทนรวม

ทำการตรวจหาปริมาณการทำงานของตัวแทนเอนไซม์ในน้ำยา R1 เอนไซม์ คือ เอนไซม์ครีแอทิเนส และน้ำยา R2 คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้ตัวอย่างชุดเดียวกับการทดสอบข้างต้นในการหาค่าการทำงานของเอนไซม์นี้ เพื่อให้ทราบถึงปริมาณการทำงานของเอนไซม์ที่มีในน้ำยาที่ถูกนำมาใช้ในงานวิจัย และป้องกันปัญหาของความหลากหลายของน้ำยาในแต่ละครั้งของการผลิต (lot-to-lot variation)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Enzyme activity (Unit) คือ ปริมาณ (μmole or μg) ของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาเฉพาะของเอนไซมจำนวนหนึ่งภายในหนึ่งหนวยเวลา (min or sec)

3.3.2.1 การทำงานของเอนไซม์ครีแอทิเนสในน้ำยา R1

สำหรับน้ำยา R1 ถูกทำการตรวจวัดหาปริมาณการทำงานของเอนไซม์รวมของเอนไซม์ครีแอทิเนส 2 ตัวอย่าง (total creatinase activity in R1 reagent) ได้แก่ น้ำยา R1 อายุ 2 สัปดาห์ และน้ำยา R1 อายุ 2 เดือน โดยหลักการตรวจวัดเป็นไปตามสมการ

$$\text{Creatine} + H_2O \xrightarrow{\text{creatinase}} \text{Sarcosine} + \text{Urea}$$

$$\text{Urea} + \text{DAB} \longrightarrow \text{Yellow dye}$$

การสร้างสารประกอบสีเหลืองในปฏิกิริยาของ *p*–dimethylaminobenzaldehyde (DAB) และยูเรีย ตามสมการ Ehrlich reaction (63) วัด OD ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 435 นาโนเมตร

สามารถหาได้โดยเติมสารละลายตั้งต้น (substrate คือ 0.1 M creatine solution) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมตัวอย่างตรวจ (enzyme solution คือ R1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DAB (ภาคผนวก) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา บ่มทิ้งไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัด OD ที่ 435 นาโนเมตร โดยทำการเทียบกับ blank ที่ทำการทดสอบไปพร้อมกับการตรวจวัดตัวอย่าง โดยผสมสารละลายตั้งต้น (0.1 M creatine solution) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กับสารละลาย DAB ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมตัวอย่างตรวจ (R1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัด OD ที่ 435 นาโนเมตร จากนั้นหาการทำงานของเอนไซม์จากสูตร

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{\triangle OD\ (\triangle OD\ \text{test} - \triangle OD\ \text{blank}) \times Vt \times 11 \times df}{4.65 \times 1.0 \times t \times Vs}$$

$$= \triangle OD \times 7.33 \times df$$

3.3.2.2 การทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในน้ำยา R2

สำหรับการตรวจหาการทำงานรวมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในน้ำยา R2 ถูกทำการตรวจวัดหาปริมาณการทำงานของเอนไซม์รวมของเปอร์ออกซิเดส 2 ตัวอย่าง (total peroxidase activity in R2 reagent) ได้แก่ น้ำยา R2 อายุ 2 สัปดาห์ และน้ำยา R2 อายุ 2 เดือน หาได้จาก peroxidase activity kit (Sigma-Aldrich) จากการสร้างกราฟมาตรฐาน H_2O_2 (standard curve for colorimetric detection) โดยเตรียมสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยทำการเจือจางจาก 12.5 มิลลิโมลาร์ของสารละลาย H_2O_2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรด้วย assay buffer ปริมาตร 1,240 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ลงใน 96-well plate ปริมาตร 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นเติม assay buffer ให้แต่ละหลุมได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อเจือจางให้สารละลายมาตรฐาน H2O2 มีความเข้มข้น 0 (blank), 1, 2, 3, 4 และ 5 นาโนโมลต่อหลุมของสารมาตรฐาน (nmole/well standard) และเตรียม reaction mix โดยใช้ Fluorescent Peroxidase Substrate : HRP Positive control ในอัตราส่วน 2 : 48 จากนั้นเติม reaction mix ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตามด้วยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา วัดค่า OD ที่ได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน H_2O_2 จากนั้นนำกราฟมาตรฐานที่ได้ใช้ในการเทียบหาปริมาณการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสต่อไป โดยการเตรียมตัวอย่างที่จะใช้ในการตรวจวัดทำได้โดยการเจือจางตัวอย่างด้วย assay buffer สำหรับในการทดสอบจะใช้ตัวอย่างตรวจที่ทำการเจือจางแล้ว เติมลงในหลุมปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียม master reaction mix โดยใช้ assay buffer : Fluorescent Peroxidase Substrate : 12.5 มิลลิโมลาร์ของสารละลาย H_2O_2 ในอัตราส่วน 46 : 2 : 2 ทดสอบค่าการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในตัวอย่าง โดยการเติม master reaction mix ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย pipetting จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (หรือ 25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำการวัดค่า OD ที่ 570 นาโนเมตร เป็น T(initial) และวัด OD ต่อไปเรื่อยๆ ทุกๆ 2 นาที ในสภาวะไร้แสงตลอดระยะเวลาการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (หรือ 25 องศา

เซลเซียส) จนกระทั้ง OD ของตัวอย่างนั้นๆ ได้ค่า OD ใกล้เคียงกับ linear range ค่าสูงสุดของกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะถูกทำการวัดที่ ที่ 570 นาโนเมตร เป็น T(final) จากนั้น นำค่า OD ของ T(initial) และ T(final) มาใช้ในการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Peroxidase activity (milliunit/mL)} = \frac{B \times \text{Sample Dilution Factor}}{(\text{Reaction Time}) \times V}$$

เมื่อ B = จำนวนโมลของ H_2O_2 (nmol) ที่ reduced ไประหว่าง T(initial) และ T(final)

3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการการตรวจวัดระดับครีแอทินิน

3.4.1 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจด้วย enz-PADs

ในการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมของตัวอย่างทำการทดสอบโดยหาค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในส่วนของพื้นที่ตรวจวัดบน enz-PADs เมื่อทำปฏิกิริยากันระหว่างน้ำยาที่ถูกตรึงไว้กับตัวอย่างตรวจ ในที่นี้ใช้สารมาตรฐานครีแอทินินที่ทำการเจือจางด้วย buffer ที่ pH ต่างๆ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของครีแอทินินที่ใช้ในการทดสอบ คือ 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จากนั้นทำการจุ่มแถบตรวจลงในสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วจับเวลาในการไหลของสารจนกระทั่งสารละลายไหลครอบคลุมในส่วนของพื้นที่ตรวจวัด เป็นเวลา 4 นาที แล้วยก enz-PADs ขึ้นจากหลุมตัวอย่าง รอให้สารละลายบน enz-PADs แห้ง ทำการบันทึกภาพโดยการสแกนด้วยเครื่องสแกนเอกสาร (HP Deskjet F370) หลังจากยก enz-PADs ขึ้นจากหลุมตัวอย่างเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหาค่าความเข้มของสีในพื้นที่อ่านปฏิกิริยา เพื่อใช้ในการแปลผลการทดสอบแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของตัวอย่างตรวจและความเข้มของสีที่ได้จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในส่วนของพื้นที่ตรวจวัดบน enz-PADs จากนั้นเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเจือจางตัวอย่างปัสสาวะที่ใช้สีของปฏิกิริยาดีที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อๆ ไป

3.4.2 การศึกษาหาระยะเวลาการอ่านผลที่เหมาะสมของปฏิกิริยาด้วย enz-PADs

ในการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการอ่านผลการทดสอบ ทำการทดสอบโดยหาค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในส่วนของพื้นที่ตรวจวัดบน enz-PADs เมื่อทำปฏิกิริยากันระหว่างน้ำยาที่ถูกตรึงไว้กับตัวอย่างตรวจ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยใช้ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ ที่ pH 7.5 เป็นตัวเจือจางสารมาตรฐานครีแอทินิน เมื่อสารละลายไหลครอบคลุมในส่วนของพื้นที่ตรวจวัด เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นทำการยก enz-PADs ขึ้นจากหลุมตัวอย่าง แล้วจับเวลาต่อเนื่องเป็นเวลา 15 นาที โดยสารละลายบนพื้นที่ตรวจวัดจะแห้งภายใน 3 นาทีแรก จากนั้นตั้งแต่นาทีที่ 3 ถึงนาทีที่ 15 ทำการสแกนผลการทดสอบทุกๆ 1 นาที เป็นจำนวน 13 ครั้ง นำผลการทดสอบที่ได้นำไปหาค่าความเข้มสีบนพื้นที่ตรวจวัดแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการอ่านผลการทดสอบกับความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาบน enz-PADs เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผลการทดสอบต่อไป

3.5 การศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterisation)

3.5.1 การศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range) ในการตรวจวัด

ในการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ทำโดยการทดสอบปฏิกิริยาต่อสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 และ 40 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยใช้ปริมาตรของสารมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร เติมลงใน 96-wells plate โดย blank จะใช้ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ที่ pH 7.5 เป็นตัวแทนของครีแอทินินความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จากนั้นจุ่มแถบ enz-PADs ลงในหลุมเป็นเวลา 4 นาที ยกแถบ enz-PADs ขึ้นพร้อมกับซับสารละลายส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จับเวลาต่อเป็นเวลา 7 นาที ดังนั้นระยะเวลาของปฏิกิริยาในการตรวจวัดคือ 11 นาที บันทึกผลการทดสอบด้วยเครื่องสแกนและแปลผลการทดสอบเป็นความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม Adobe photoshop CS2 โดยแต่ละความเข้มข้นทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของครีแอทินินและความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเมื่อทำการตรวจวัดด้วย enz-PADs เพื่อศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดครีแอทินินที่พัฒนาขึ้น

3.5.2 การศึกษาหาค่าความสามารถในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection: LOD) ด้วย enz-PADs

การทดสอบค่าความสามารถในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วย enz-PADs ที่พัฒนาได้ วิธีที่มี limit of detection (LOD) ต่ำๆ จะสามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดีหรือมีความไวมาก ซึ่งวิธีการการหาค่า LOD สามารถหาได้จากการทดลองวัด blank หรือตัวอย่างครีแอทินินที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร 20 ครั้ง ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ ที่ pH 7.5 เป็น blank จากนั้นนำค่าความเข้มของสีที่วัดได้มาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (9) และนำมาหาค่า LOD จากสูตร

$$\text{Limit of detection (LOD)} = \frac{3 \times SD}{S}$$

เมื่อ SD คือ standard derivation ที่ได้จากการวัด blank 20 ครั้ง และ S คือ sensitivity ซึ่งหาได้จากค่าความชันจากการทำกราฟมาตรฐาน

3.5.3 การศึกษาสารรบกวนปฏิกิริยาการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs

การศึกษาหาสารที่มีอยู่ในปัสสาวะที่อาจมีผลกระทบในการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน สารที่มีการรายงานว่ามีการรบกวนในปฏิกิริยาการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน อันได้แก่ กลูโคส (glucose) โปรตีนไข่ขาว (human serum albumin) ฮีโมโกลบิน (haemoglobin) วิตามินซี (ascorbic acid) บิลิรูบิน (bilirubin) และกรดยูริก (uric acid) (26) ถูกเลือกมาใช้ในการทดสอบโดยทำการเติมสารดังกล่าวลงไปในสารมาตรฐานครีแอทินินที่ทราบความเข้มข้น และให้มีปริมาณสารครีแอทินินสุดท้ายมีความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จากนั้นทำการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น แล้วนำมาคำนวณหา %Measurment เปรียบเทียบกับปริมาณครีแอทินินก่อนและหลังการเติมสารรบกวนแต่ละตัวด้วยการคำนวณหาค่าความเข้มข้นจากความเข้มของสีที่ได้จากการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จากสูตร

$$\%\text{Measurment} = \frac{\text{Creatinine concentration (no added)}}{\text{Creatinine concentration (added)}} \times 100$$

นอกจากนี้สารครีเอทีนถูกนำมาทดสอบหาความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีผลต่อการรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดหาปริมาณของครีแอทินินด้วย enz-PADs เนื่องจากครีเอทีนเป็นสารที่สามารถพบได้ในปัสสาวะ ซึ่งปริมาณครีเอทีนที่พบได้ในปัสสาวะจะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล ต่างเพศ ต่างวัย (21) ซึ่งครีเอทีนสามารถพบได้ในปัสสาวะในเพศชาย 0 – 40 มิลลิกรัมต่อวัน ในขณะที่เพศหญิงพบได้ 0 – 80 มิลลิกรัมต่อวัน และเนื่องจากคนปกติปัสสาวะจะถูกขับออกมาปริมาตร 1 – 2 ลิตร (17) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ในสภาวะการขับปัสสาวะ 1.5 ลิตรต่อวัน (22) ในเพศชายจะพบครีเอทีนในปัสสาวะประมาณ 0 - 2.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และในเพศหญิงจะพบครีเอทีนในปัสสาวะประมาณ 0 - 5.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ครีแอทินิเนสสามารถเปลี่ยนครีแอทินินไปเป็นครีเอทีนได้ดังสมการ

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatininase}} \text{Creatine}$$

ดังนั้นครีเอทีนที่มีอยู่แล้วในตัวอย่างปัสสาวะจะสามารถดำเนินปฏิกิริยาไปได้จนถึงปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายและเกิดสีของ quinone imine chromogen ได้ดังสมการ

$$\text{Creatine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatinase}} \text{Sarcosine} + \text{Urea}$$

$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\textit{sarcosine oxidase}} \text{Glycine} + HCHO + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-aminophenazone} + \text{HTIB} \xrightarrow{\textit{peroxidase}} \text{Quinone imine chromogen} + H_2O + HI$$

จึงมีการทดสอบความสามารถของน้ำยา R1 ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์ครีแอทิเนสและเอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดสในการกำจัดครีเอทีนในตัวอย่างตรวจ แล้วเกิดเป็น H_2O_2 ก่อนในพื้นที่ R1 บน enz-PADs จากนั้นเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ในน้ำยา R1 จะทำหน้าที่ในการกำจัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้นนั้น ตัวอย่างตรวจจะเคลื่อนที่ด้วยแรงแคปิลลารีของกระดาษนำเอาน้ำยา R1 เคลื่อนที่มาพร้อมกันแล้วเคลื่อนที่พาไปรวมตัวกับน้ำยา R2 ในพื้นที่ R2 ซึ่งมีสารโซเดียมเอไซด์ (sodium azide: NaN_3) ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาตาเลส (64) และที่สำคัญในน้ำยา R2 มีเอนไซม์ครีแอทินิเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอยู่มากเกินพอที่จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนครีแอทินินที่มีอยู่ในตัวอย่างตรวจ เมื่อมีกลุ่มเอนไซม์ครบปฏิกิริยา คือ เอนไซม์ครีแอทินิเนส เอนไซม์ครีแอทิเนส เอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ครีแอทินินในตัวอย่างตรวจจะถูกเปลี่ยนเกิด

เป็นผลิตภัณฑ์ H_2O_2 ที่จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารตั้งต้นให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูบนพื้นที่การตรวจวัด ซึ่งเป็นขั้นตอนในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างอย่างแท้จริง ดังสมการ

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatininase}} \text{Creatine}$$
$$\text{Creatine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatinase}} \text{Sarcosine} + \text{Urea}$$
$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\textit{sarcosine oxidase}} \text{Glycine} + HCHO + H_2O_2$$
$$H_2O_2 + \text{4-aminophenazone} + \text{HTIB} \xrightarrow{\textit{peroxidase}} \text{Quinone imine chromogen} + H_2O + HI$$

ดังนั้น เพื่อเป็นการทดสอบความสามารถของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นจากการใช้น้ำยาสำเร็จรูป Creatinine plus ver.2 ปริมาตรที่เหลือจากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ในการกำจัด สารครีเอทีนในตัวอย่างบนพื้นที่ R1 ก่อนเคลื่อนที่ไปยังพื้นที่ R2 สารครีเอทีน แอนไฮดรัส (creatine anhydrous) จึงถูกนำมาทดสอบหาความเข้มข้นสูงสุดที่เติมลงในตัวอย่างตรวจ แล้วไม่รบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดปริมาณครีแอทินิน ของ enz-PADs

3.5.4 การทดสอบหาความแม่นยำ (precision) และความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของ enz-PADs

ทำการศึกษาความแม่นยำของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยนำ enz-PADs มาทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 5 และ 20 มิลลกรัมต่อเดซิลิตร โดยทำการเตรียม enz-PADs ในสภาวะและเวลาเดียวกัน จำนวน 20 ชิ้น (ความเข้มข้นละ 10 ชิ้น) จากนั้นนำไปทดสอบค่าความแม่นยำภายใน 1 วัน (with-in day precision) (n = 10) และเตรียม enz-PADs สำหรับการตรวจวัดตัวอย่างในแต่ละวัน วันละ 20 ชิ้น (ความเข้มข้นละ 10 ชิ้น เป็นเวลาติดต่อกัน (3 วัน เพื่อทดสอบหาแม่นยำระหว่างวัน (between day precision) (n = 30)

นอกจากนี้ทำการทดสอบความแม่นยำกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีแอทินิน 12, 170 และ 330 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งเป็นตัวแทนค่าครีแอทินิน ค่าต่ำ กลาง และสูง ตามลำดับ โดยทำการเตรียม enz-PADs ในสภาวะและเวลาเดียวกัน จำนวน 60 ชิ้น จากนั้นนำไปทดสอบค่าความแม่นยำภายใน 1 วัน (with-in day precision) (n = 20) และเตรียม enz-PADs สำหรับการตรวจวัดตัวอย่างทั้ง 3 ระดับในแต่ละวัน วันละ 9 ชิ้น (ความเข้มข้นละ 3 ชิ้น เป็นเวลาติดต่อกัน (10 วัน เพื่อทดสอบหาแม่นยำระหว่างวัน (between day precision) (n = 30) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วน

เบี่ยงเบนมาตรฐาน (9) จากนั้นนำผลที่ได้คำนวณหาค่าความแปรปรวน หรือ % coefficient of variations (%CV) ต่อไป

3.5.5 การทดสอบหาความคงตัว (stability) ของ enz-PADs

ศึกษาความคงตัวของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยทำการสร้าง enz-PADs ขึ้นในสภาวะเดียวกัน จำนวน 180 อัน สำหรับใช้ทดสอบหาค่าความคงตัวระยะเวลา 20 วัน วันละ 9 อัน ซึ่งประกอบไปด้วย ทดสอบกับตัวอย่าง ได้แก่ สารมาตรฐานครีแอทินินความเข้มข้น 0, 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร อย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำ enz-PADs ที่ได้ปิดผนึกด้วยเครื่องผนึกถุงระบบสูญญากาศ (vacuum sealer) เก็บไว้ในตู้เย็น 2-4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะครบกำหนดเวลาในการทดสอบ โดยในแต่ละวันที่ทำการทดสอบจะนำค่าจากการทดสอบ enz-PADs ที่ถูกเตรียมขึ้นใหม่ทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในวันนั้นๆ เป็นค่าเทียบมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทำการทดสอบ จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคงตัวของ enz-PADs ดังสูตร

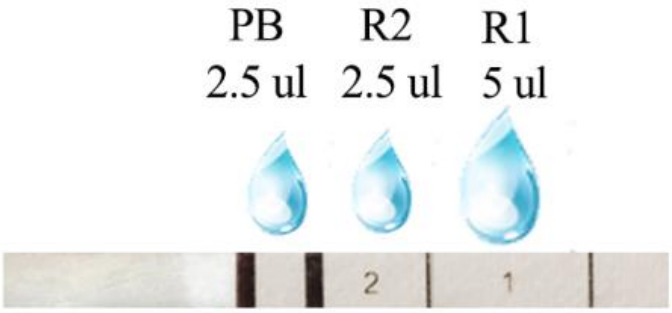
$$\text{เปอร์เซ็นต์ความคงตัวของ enz-PADs (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของครีแอทินินที่วัดได้ในแต่ละวัน} \times 100}{\text{ความเข้มข้นของครีแอทินินที่วัดได้ของ enz-PADs ที่เตรียมใหม่}}$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.5.6 การตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

3.5.6.1 การสร้าง หลักการตรวจวัด และการแปลผลการตรวจวัดครีแอทินินด้วย enz-PADs

สำหรับการเตรียม enz-PADs ถ้าไม่กล่าวเป็นอย่างอื่น PADs จะถูกตรึงน้ำยา R1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บริเวณช่องเลข 1 น้ำยา R2 ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร บริเวณช่องเลข 2 และ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.5 ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร บริเวณพื้นที่ตรวจวัด จากนั้นรอให้น้ำยาทั้งสองชนิดแห้งสนิทเป็นเวลา 30 นาที ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ตัวอย่าง enz-PADs และพื้นที่การตรึงน้ำยา

หลักการการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจเป็นไปตามหลักการของน้ำยา Creatinine plus ver.2 ดังสมการ

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatininase}} \text{Creatine}$$

$$\text{Creatine} + H_2O \xrightarrow{\textit{creatinase}} \text{Sarcosine} + \text{Urea}$$

$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\textit{sarcosine oxidase}} \text{Glycine} + HCHO + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-aminophenazone} + \text{HTIB} \xrightarrow{\textit{peroxidase}} \text{Quinone imine chromogen} + H_2O + HI$$

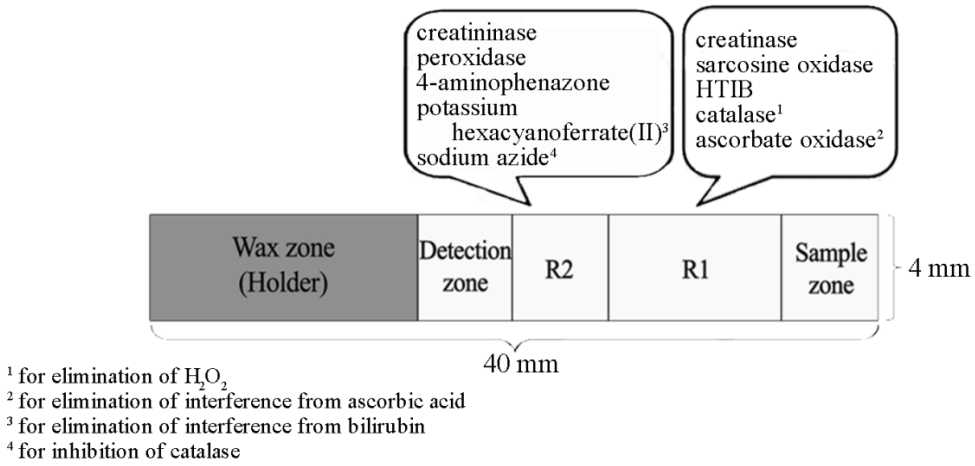
กล่าวคือ น้ำยา Creatinine plus ver.2 ประกอบไปด้วยน้ำยา R1 และน้ำยา R2 ซึ่งใช้ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจด้วยหลักการเอนไซม์ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน คือ เอนไซม์ครีแอทิเนส (ในน้ำยา R1) เอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดส (ในน้ำยา R1) เอนไซม์ครีแอทินิเนส (ในน้ำยา R2) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ในน้ำยา R2) โดยกลุ่มของเอนไซม์ดังกล่าวทำงานดังสมการข้างต้น เพื่อเปลี่ยนครีแอทินินในตัวอย่างตรวจเกิดเป็น H_2O_2 แล้วเปลี่ยน 4-aminophenazone และ HTIB โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูของ quinone imine chromogen ที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของครีแอทินินในตัวอย่าง

สำหรับหลักการการทำงานของ enz-PADs ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจนั้น สามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 3.5 ตัวอย่างตรวจจะทำปฏิกิริยากับน้ำยาบนพื้นที่ R1 ของ enz-PADs หากตัวอย่างตรวจมีครีเอทีนอยู่ เอนไซม์ครีแอทิเนส และเอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดสในพื้นที่ R1 จะทำปฏิกิริยากับครีเอทีนแล้วเกิด H_2O_2 ซึ่งจะถูกกำจัดออก

จากปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์คาตาเลสที่ผสมอยู่ในน้ำยา R1 นั้น ในระยะทาง 10 มิลลิเมตร เป็นเวลาประมาณ 2 นาที และเอนไซม์คาตาเลสจะถูกยับยั้งการทำงานด้วย NaN_3 (64) ที่มีอยู่ในน้ำยา R2 เมื่อสารผสมระหว่างตัวอย่างตรวจและน้ำยา R1 ที่ถูกดูดซับไว้บนพื้นที่ R1 เคลื่อนที่มายังพื้นที่ R2 ที่มีเอนไซม์ครีแอทินิเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสถูกดูดซับไว้ ทำให้เอนไซม์สำหรับการตรวจวัดครีแอทินินครบปฏิกิริยาและเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพู (quinone imine chromogen) เคลื่อนที่จนถึงพื้นที่ตรวจวัด ซึ่งเป็นพื้นที่สำหรับการอ่านปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น และสารละลายทั้งหมดจะสิ้นสุดและหยุดเคลื่อนที่ เนื่องจากมี hydrophobic holder zone เป็นส่วนที่กลัวน้ำหรือไม่ชอบน้ำกั้นไม่ให้สารผสมที่เกิดจากปฏิกิริยาไหลผ่านไปได้ ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มจุ่ม enz-PADs ลงในหลุมตัวอย่างทั้งสิ้นรวมเป็น 4 นาที เมื่อครบเวลาแล้วทำการยก enz-PADs จากหลุม แล้วทำการซับน้ำส่วนเกินออก จากนั้นจับเวลาต่อไปอีก 7 นาที เพื่อการเกิดปฏิกิริยาและการพัฒนาของสีของ quinone imine ที่สมบูรณ์บนพื้นที่ตรวจวัดและบันทึกผลการทดสอบด้วยเครื่องสแกนภาพ (HP Deskjet F370) ด้วยความละเอียด 600 dot per inch (dpi) ชนิดไฟล์ JPEG จากนั้นหาค่าความเข้มของสีในพื้นที่ตรวจวัดขนาด 90 X 70 pixels ในโหมดสี (RGB mode) จาก histogram panal ด้วยโปรแกรม Photoshop CS2 ซึ่งค่าความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรมเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มสีในพื้นที่ที่ทำการตรวจวัดทั้งหมด จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณเทียบค่าปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะที่ทำการตรวจไปพร้อมๆ กันต่อไป

นอกจากนี้ในพื้นที่ R1 มีเอนไซม์แอสคอร์เบทออกซิเดส สำหรับการกำจัดวิตามินซี ซึ่งเป็นสารรบกวนปฏิกิริยาและพื้นที่ R2 มีโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (42) สำหรับการกำจัดบิลิรูบิน ซึ่งเป็นสารรบกวนปฏิกิริยาอีกด้วย (36)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 3.5 หลักการทำงานของ enz-PADs ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ

3.5.6.2 การเปรียบเทียบการตรวจวัดครีแอทินินระหว่าง enz-PADs และวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก

ในการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะช่วงกลางจากเวลาแรกในการตื่นนอนตอนเช้าจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 40 ราย นำปัสสาวะที่ได้มาปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาเจือจางด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.5 10-20 เท่า ก่อนการทดสอบด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น

ก่อนการทำการตรวจวัดตัวอย่างปัสสาวะ จะทำการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณครีแอทินินและความเข้มสีที่ได้ก่อน เพื่อนำไปใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้ โดยทำ enz-PADs พร้อมใช้งานจุ่มลง 96-wells plate ที่มีสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณเทียบค่าปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะที่ทำการตรวจไปพร้อมๆ กันต่อไป โดยขั้นตอนในการทดสอบเป็นไปตามข้อ 3.5.6.1

จากนั้นนำตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 40 ตัวอย่างที่ผ่านการปั่นตกตะกอนแล้ว นำเอาส่วนใสมาทำการเจือจางปัสสาวะด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า ก่อนนำมาทำการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก (kinetic alkaline picrate method) โดยใช้น้ำยาตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกที่ใช้ทั่วไปทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Creatinine Liquicolor, Human diagnostic, Germany) ตามวิธีที่พัฒนามาจากวิธีของแจฟฟี คือในสภาวะเป็นด่างครีแอทินิน จะรวมตัวกับ picric acid ได้เป็นสารประกอบสีเหลืองส้ม อัตราการเกิดสี (ความเข้มของสี) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ การวัดใช้ rate – blanking เพื่อลดการรบกวนจากบิลิรูบิน ดังสมการ

$$\text{Creatinine + picric acid} \xrightarrow{\text{Alkaline pH}} \text{yellow-orange complex}$$

ทำการวัด OD ที่ 500 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ (Evolution 600) โดยทำการเตรียมน้ำยาพร้อมใช้งาน (working reagent) ดังนี้ 1) เจือจาง NaOH ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 4 (1 + 4) 2) ผสมสารละลายกรดพิคริก (Picric acid solution) กับ NaOH ที่ทำการเจือจางแล้วจาก 1) ในอัตราส่วน 1 : 1 (1 + 1) 3) เจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า จากนั้นผสม working reagent 1000 ไมโครลิตร กับตัวอย่างตรวจ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจับเวลา 30 วินาที แล้วอ่านค่า OD ที่ 500 นาโนเมตร กำหนดให้เป็น A1 จากนั้นจับเวลาต่อไปอีก 2 นาที เมื่อครบเวลาอ่านค่า OD ที่ 500 นาโนเมตรอีกครั้ง กำหนดให้เป็น A2 จากนั้นนำค่า A2 –A1 นำค่า OD ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ OD ที่ได้จากการตรวจวัดค่าสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เมื่อได้ค่าความเข้มข้นครีแอทินินในตัวอย่างตรวจแล้ว นำผลที่ได้มาศึกษาความสอดคล้องของผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินที่ได้จาก enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ โดยนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสองวิธีโดยใช้สถิติ paired sample *t*-test เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการตรวจวัดทั้งสองวิธี ทดสอบความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า correlation coefficient โดยใช้โปรแกรม

Sigmaplot และศึกษาความสอดคล้องของวิธีตรวจทั้งสองด้วยสถิติ Bland and Alman plot และ Passing-bablok regression

3.5.6.3 การเปรียบเทียบการตรวจวัดครีแอทินินระหว่าง enz-PADs และวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ

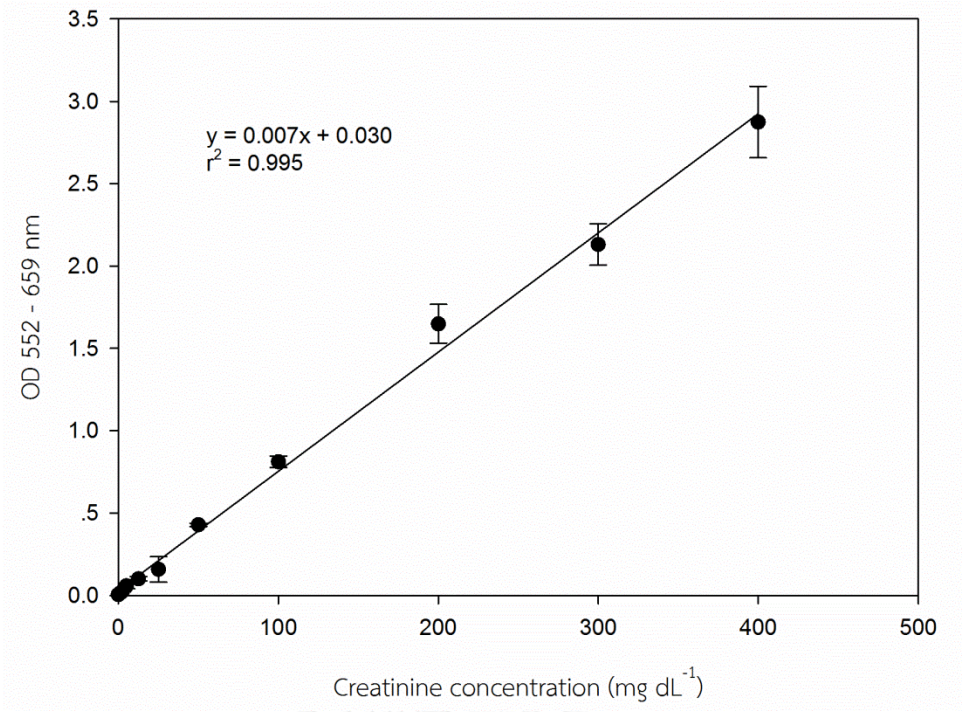
ทำการทดสอบตรวจหาค่าครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะช่วงกลางจากเวลาแรกในการตื่นนอนตอนเช้าจากอาสาสมัครจำนวน 50 ตัวอย่าง มาทำการปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาเจือจางด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.5 จำนวน 10 - 20 เท่า สำหรับการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 3.5.6.2 สำหรับผลการตรวจวัดค่าความเข้มของสีที่ได้ที่ต่ำกว่าค่าของ blank จะทำการลดการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะนั้นๆ ลงจนสามารถด้วยวัดได้ด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยผลการทดสอบที่ได้จากวิธี enz-PADs จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับค่าการตรวจวัดครีแอทินินในตัวอย่างเดียวกันด้วยหลักการเอนไซม์เช่นกัน คือ colorimetric enzymatic method โดยตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บจากอาสาสมัคร 50 ราย จะถูกนำส่งไปยังบริษัท โปรเฟสชั่นแนล ลาโบราทอรี่ แมเนจเม้นท์ คอร์ป จำกัด (Professional Laboratory Management) หรือ Prolab เพื่อตรวจหาปริมาณครีแอทินิน แล้วนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสองวิธีโดยใช้สถิติ paired sample *t*-test เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการตรวจวัดทั้งสองวิธี ทดสอบความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า correlation coefficient โดยใช้โปรแกรม Sigmaplot และศึกษาความสอดคล้องของวิธีตรวจทั้งสองด้วยสถิติ Bland and Alman plot และ Passing-bablok regression ต่อไป

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Creatinine plus ver. 2 ในหลอดทดลองและบนกระดาษ

1.1 ผลการทดสอบปฏิกิริยาของน้ำยาในหลอดทดลอง โดยทดสอบความไวในการเกิดสีของน้ำยา โดยวัด OD ที่ 552/659

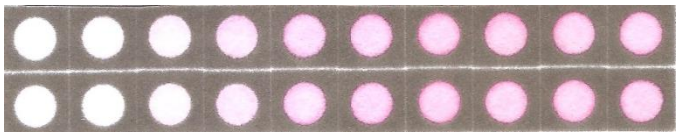
การทดสอบปฏิกิริยาของน้ำยา Creatinine plus ver.2 ที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่า เมื่อนำสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร มาทดสอบตามขั้นตอนของเอกสารแนบประกอบน้ำยาด้วยเครื่อง microplate reader (Synergy Mx, BioTeK) โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง ช่วงค่าความเป็นเส้นตรงที่น้ำยา Creatinine plus ver.2 สามารถตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินินได้คือ 0 – 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และมีความสัมพันธ์เชิงเส้น หรือ r^2 = 0.995 ได้ดังรูปที่ 4.1 โดยความชันของกราฟมาตรฐานหรือความไวสำหรับการทดสอบนี้คือ 0.007 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ต่อหน่วยการดูดกลืนแสง ซึ่งช่วงค่าความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการทดสอบนี้นำไปสู่การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของสีบนกระดาษกรองต่อไป ทั้งนี้ผลการทดสอบที่ได้ให้ช่วงความสามารถในการตรวจวัดไม่ต่างจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ คือ 1.13 – 452 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (ข้อมูลจากเอกสารประกอบน้ำยา) ในสภาวะการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วยน้ำกลั่น 20 เท่า



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณครีแอทินินที่ OD 552/659 นาโนเมตร ของน้ำยา Creatinine plus ver.2

1.2 ผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาบนกระดาษกรอง

ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีบนกระดาษกรอง (Whatman no.1) โดยผสมน้ำยา R1 และ R2 ใน สัดส่วน 77 ไมโครลิตร ต่อ 38 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้น้ำยาพร้อมใช้งาน (mix reagent) จากนั้น ตรึง mix reagent จำนวน 3 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง รอให้น้ำยาที่ตรึงลงไปแห้งสนิทเป็นเวลา 10 นาที แล้วหยดสารมาตรฐานครีเอตินีน 0, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จำนวน 3 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษที่ตรึงน้ำยาไว้ จากนั้นรอปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้น้ำยา Creatinine plus ver.2 ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้นต่างๆ และบันทึกผลการทดสอบด้วยเครื่องสแกน พบว่าที่ได้สีของปฏิกิริยาบนกระดาษเริ่มเห็นสีชมพูอ่อนตั้งแต่ความเข้มข้นของครีแอทินิน 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และสีที่เกิดขึ้นเริ่มคงที่ที่ความเข้นข้นครีแอทินิน 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งสีที่เกิดขึ้นในช่วงครีแอทินิน 5 - 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรให้ความเข้มสีที่ไม่แตกต่างกันมาก (สังเกตด้วยตาเปล่า) ทำให้ยากที่จะสามารถบอกถึงปริมาณของ ครีแอทินินในแต่ละความเข้มข้นได้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 4.2

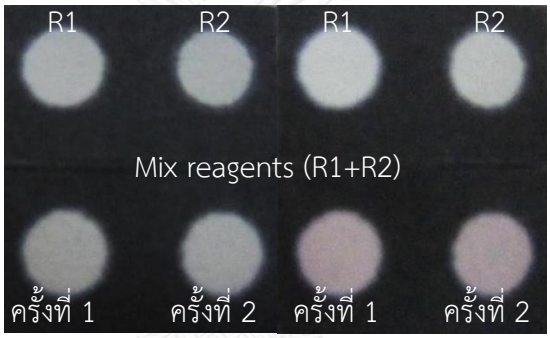


รูปที่ 4.2 ผลการตรวจวัดปฏิกิริยาการเกิดสีบนกระดาษกรอง (Whatman no.1) เมื่อทำปฏิกิริยากับครีแอทินินความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของกลุ่มเอนไซม์ในน้ำยา Creatinine plus ver.2 พบว่า การแยกน้ำยา R1 และ R2 ก่อนทำปฏิกิริยากับตัวอย่างตรวจมีความสำคัญในเรื่องของการกำจัดสารครีเอทีนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างตรวจ ในขั้นตอนการเติมน้ำยา R1 คือ น้ำยา R1 ประกอบไปด้วยเอนไซม์ครีแอทิเนส และซาโคซีนออกซิเดส ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิด จะทำปฏิกิริยากับตัวอย่างตรวจก่อน เพื่อกำจัดครีเอทีนที่มีในตัวอย่างก่อนเกิดเป็น H_2O_2 ซึ่งเอนไซม์คาตาเลสในน้ำยา R1 จะทำหน้าที่ในการกำจัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้น โดยเอนไซม์คาตาเลสนี้จะถูกยับยั้งด้วย NaN_3 ในน้ำยา R2 ทำให้ไม่รบกวนปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยเมื่อมีการเติมน้ำยา R2 ที่มีเอนไซม์ครีแอทินิเนสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเข้าไปในปฏิกิริยา ครีแอทินินในตัวอย่างตรวจจะเริ่มทำปฏิกิริยากับกลุ่มของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด เกิดผลิตภัณฑ์เป็น H_2O_2 และเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูที่สามารถวัดค่าความเข้มสีได้ต่อไป จากผลการทดสอบข้างต้นและความรู้ทางหลักการเอนไซม์ของน้ำยานำไปสู่การออกแบบแบบที่เหมาะสมในการสร้าง enz-PADs ต่อไป ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษด้วยหลักการเอนไซม์ (enz-PADs) ในการหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ โดยทำการแยกพื้นที่ในการดูดซับเอนไซม์ในน้ำยา R1 และ R2 แยกออกจากกัน และอาศัยการเคลื่อนที่ของสารละลายตัวอย่างที่จะเคลื่อนที่ขึ้นมาตามแนวกระดาษหรือ enz-PADs ด้วยแรงแคปิลลารี ซึ่งหลักการเคลื่อนที่นี้จะเป็นการเพิ่มปริมาตรตัวอย่างในการตรวจวัด ซึ่งมีประโยชน์ในการเพิ่มความไวในการตรวจวัดของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น

ทั้งนี้หากนำน้ำยา Creatinine plus ver.2 มาผสมกันระหว่างน้ำยา R1 และ R2 แล้ว เมื่อเวลาผ่านไปน้ำยาทั้งสองจะสามารถทำปฏิกิริยากันเอง ทำให้เกิดสีชมพูอ่อนเกิดขึ้น เนื่องจากผลการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในน้ำยา R1 ที่สามารถรีดิวซ์ HTIB ในน้ำยา R2 โดยมี 4-aminophenazone ที่มีอยู่ในน้ำยา R1 ทำหน้าที่เป็นสาร co-oxidation ของ HTIB ทำให้เกิด

background ของสีขึ้นเองได้ ดังรูปที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบเมื่อทำการหยด mix reagent ลงบนกระดาษ สังเกตสีของน้ำยาที่ถูกตรึงที่เปลี่ยนไปเป็นสีชมพูอ่อนเมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง (รูปซ้าย) และจะเข้มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อทิ้งไว้ข้ามคืน (รูปขวา) ประกอบกับผลการทดสอบเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้ mix reagent ในการตรึงบนกระดาษทันทีไม่เหมาะสมต่อการสร้างอุปกรณ์ตรวจหาปริมาณครีแอทินินบนกระดาษกรอง Whatman No.1 เนื่องจากผลการทดสอบเบื้องต้นที่ได้ไม่สามารถแยกความเข้มข้นต่างๆ ของครีแอทินินได้อย่างชัดเจน และการผสมน้ำยาทิ้งไว้จะทำให้เกิดสีชมพูอ่อนได้เองจึงนำไปสู่การออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดให้มีรูปแบบที่เหมาะสมต่อไป



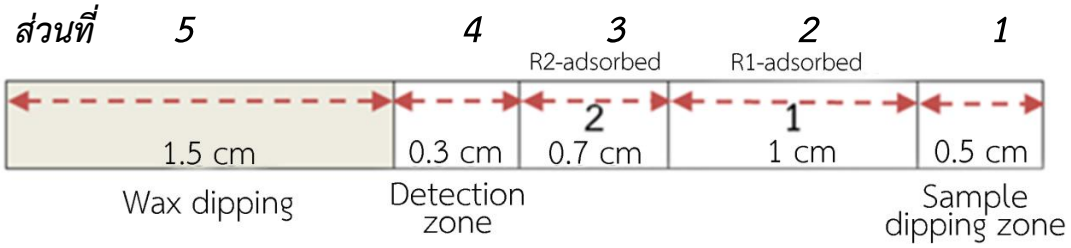
รูปที่ 4.3 ผลการตรึงน้ำยาแบบผสมบนกระดาษ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. ผลการศึกษาการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับตรวจวัดครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์

2.1 ผลการออกแบบ และการสร้าง enz-PADs ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด

สำหรับแบบ enz-PADs ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณครีแอทินิน ออกแบบได้โดยแบ่งพื้นที่ออกเป็น 5 ส่วน ดังต่อไปนี้ ส่วนที่ 1 คือ sample dipping zone เป็นพื้นที่สำหรับจุ่มลงในหลุมที่มีตัวอย่างตรวจ (4x5 มิลลิเมตร) เพื่อให้ครีแอทินินทำปฏิกิริยากับน้ำยาที่ถูกตรึงไว้ในพื้นที่ส่วนที่ 2 ที่มีเอนไซม์ครีแอทิเนส และเอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดสถูกดูดซับไว้ด้วยวิธีทางกายภาพ (physical adsorption) โดยเทคนิคการปิเปตต์น้ำยา R1 ลงบนกระดาษ เพื่อให้ตัวอย่างตรวจได้ทำปฏิกิริยากับครีเอทีนในตัวอย่างในพื้นที่ R1 (4x10 มิลลิเมตร) ในระยะทาง 10 มิลลิเมตร เป็นเวลาประมาณ 2 นาที โดย H_2O_2 จะถูกกำจัดออกจากปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์คาตาเลสที่มีในน้ำยา R1 ก่อน จากนั้นแม้ว่าเอนไซม์คาตาเลสได้เคลื่อนที่ไปยังบริเวณของ R2 ก็จะถูกยับยั้งการทำงานด้วย NaN_3 (64) ที่มีอยู่ในน้ำยา R2 ปฏิกิริยาการวัดครีแอทินินเกิดสมบูรณ์เมื่อเอนไซม์จาก R1 เคลื่อนที่มายัง R2 (4x7 มิลลิเมตร) ที่มีเอนไซม์ครีแอทินิเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีในส่วนที่ 4 คือ detection zone เป็นพื้นที่สำหรับการอ่านปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (4x3 มิลลิเมตร) และสารละลายทั้งหมดจะสิ้นสุดและหยุดเคลื่อนที่ที่ส่วนที่ 5 hydrophobic holder zone ซึ่งเป็นส่วนที่จับของ enz-PADs และเป็นส่วนที่กลัวน้ำหรือไม่ชอบน้ำ (4x15 มิลลิเมตร) จึงสามารถกั้นไม่ให้สารผสมที่เกิดจากปฏิกิริยาไหลผ่าน เพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์และอยู่ในพื้นที่ตรวจวัดเท่านั้น และสามารถบันทึกผลการทดสอบและแปลผลต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แผนภาพส่วนประกอบต่างๆ บน enz-PADs

ทั้งนี้ พื้นที่สำหรับการดูดซับน้ำยา R1 และ R2 ถูกออกแบบขนาดให้พอเหมาะกับปริมาตรของน้ำยาที่ใช้ และเหมาะสมต่อการป้องกันการสัมผัสกันของน้ำยาทั้งสองเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

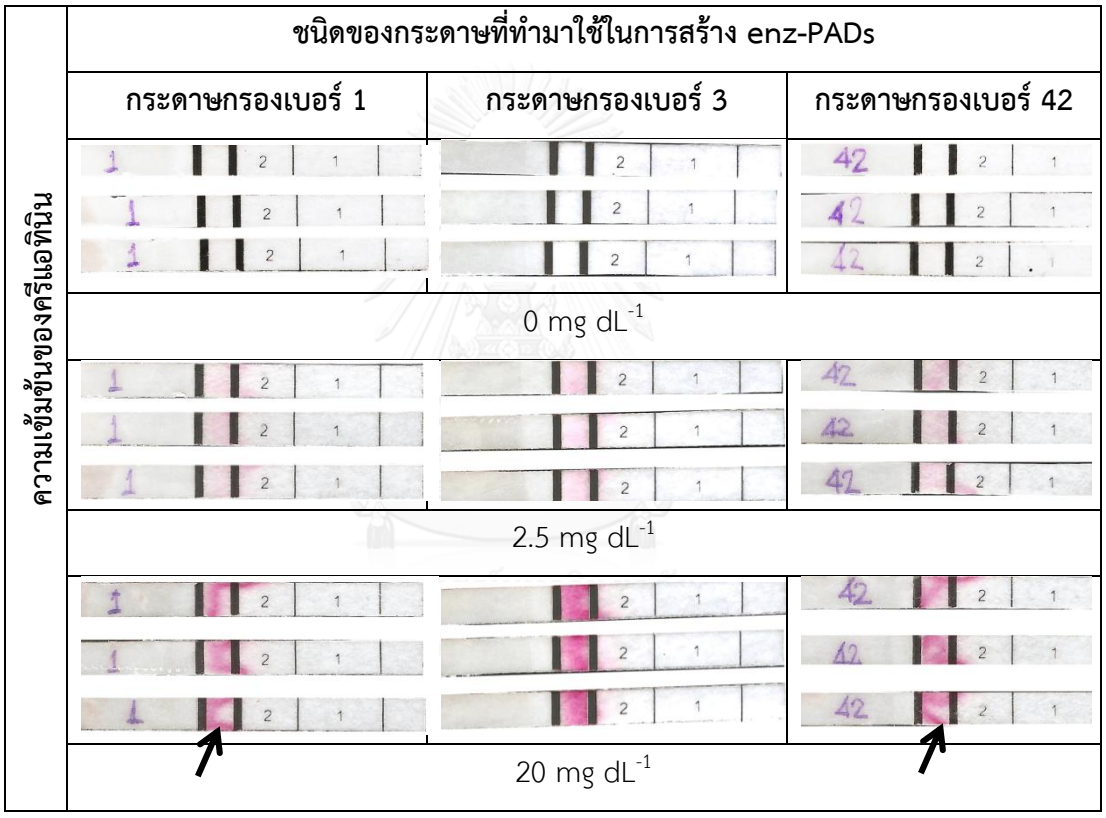
2.2 ผลการศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมต่อการสร้าง enz-PADs

กระดาษกรองเบอร์ 1, 3 และ 42 ถูกเลือกนำมาใช้ในการทดสอบ เพื่อเลือกชนิดกระดาษกรองที่เหมาะสมในการสร้าง enz-PADs พบว่า กระดาษกรองเบอร์ 3 เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของ enz-PADs มากที่สุด ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.1 เนื่องจากการเกิดสีของปฏิกิริยาในส่วนพื้นที่ตรวจวัดให้ผลที่เรียบเนียนที่สุด อันเนื่องมาจากกระดาษกรองเบอร์ 3 มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 6 ไมโครเมตร ซึ่งเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 11 ไมโครเมตร นั่นคือ ความแตกต่างของขนาดของรูพรุนกระดาษมีผลต่ออัตราการไหลของของเหลว กระดาษกรองเบอร์ 3 มีอัตราการไหลอยู่ที่ 90 วินาทีต่อของเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขณะที่กระดาษกรองเบอร์ 1 มีอัตราการไหลที่เร็วกว่า คือ 40 วินาทีต่อของเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งอัตราการไหลของสารที่เร็วกว่าของกระดาษกรองเบอร์ 1 นี้ทำให้การพัฒนาการเปลี่ยนแปลงของสีในปฏิกิริยาบนพื้นที่ตรวจวัดให้ผลการทดสอบในลักษณะหัวจรวด (rocket-like shape) คือ สีของพื้นที่ตรวจวัดจะมีลักษณะสีเข้มติดเฉพาะส่วนของขอบๆ ในขณะที่ตรงกลางจะมีสีซีดจางกว่า ทำให้เมื่อนำภาพที่ได้จากการสแกนไปประมวลผลออกมาเป็นค่าความเข้มของสี มีความคลาดเคลื่อนจากลักษณะที่ปรากฏดังกล่าว การเป็นเนื้อเดียวกันของสีที่เกิดบนส่วนพื้นที่ตรวจวัด อาจจะให้ผลดีขึ้นหากเลือกชนิดของกระดาษที่ให้อัตราการไหลของสารที่ช้าลง จึงได้ทดสอบเพิ่มเติมด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ซึ่งมีขนาดของรูพรุน 2.5 ไมโครเมตร และอัตราการไหลของของเหลว 240 วินาทีต่อ 100 มิลลิลิตร แต่ผลการทดสอบพบว่า การเกิดสีของปฏิกิริยาบนส่วน detection zone ของกระดาษกรองเบอร์ 3 ให้สีที่เรียบเนียนกว่ากระดาษกรองเบอร์ 42 (หนา 200 นาโนเมตร) จากการเปรียบเทียบคุณสมบัติของกระดาษทั้งสองชนิด พบว่า กระดาษกรองเบอร์ 3 มีคุณสมบัติพิเศษ คือ มีความหนา (390 นาโนเมตร) ที่เหมาะสมในการดูดซับสารละลาย (adsorption) ซึ่งในงานวิจัยนี้ อาศัยแรงแคปิลลารีของกระดาษ เพื่อดูดเอาสารละลายตัวอย่างให้เคลื่อนที่ขึ้นมาตามแนวกระดาษ โดยกระดาษกรองเบอร์ 3 มีความสามารถในการดูดซับสารละลายได้ดี จึงทำให้ลดอัตราการเคลื่อนที่ของของเหลวไปยังพื้นที่ตรวจวัดได้ ส่งผลให้การเกิดสีหรือสารประกอบสีเชิงซ้อนบนพื้นที่ตรวจวัดเกิดอย่างสมบูรณ์มากขึ้น ทั้งกระดาษกรองเบอร์ 3 (742 บาท*) มีราคาที่ถูกกว่ากระดาษกรองเบอร์ 42 (1400 บาท*) ประมาณ 2 เท่า ดังนั้น กระดาษกรองเบอร์ 3 จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดครีแอทินิน บนกระดาษในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ขนาดของพื้นที่ตรวจวัด

รูปสี่เหลี่ยม ขนาด 4x3 มิลลิเมตรบนกระดาษกรองเบอร์ 3 เหมาะสมต่อการเห็นสีของปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า และสามารถวัดหาค่าความเข้มของสีเพื่อการแปลผลการทดสอบต่อไปได้

(*) อ้างอิงจากราคากระดาษกรองจาก Sigma-Aldrich® ราคาต่อ 1 กล่อง (100 แผ่น) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกระดาษ 90 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบของปฏิกิริยาของ enz-PADs ที่สร้างด้วยกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1, 3 และเบอร์ 42



หมายเหตุ: ลูกศร แสดงการเกิดสีบนกระดาษลักษณะหัวจรวด (rocket-like shape)

2.3 ผลการศึกษาสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนพื้นที่ตรวจวัดของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น

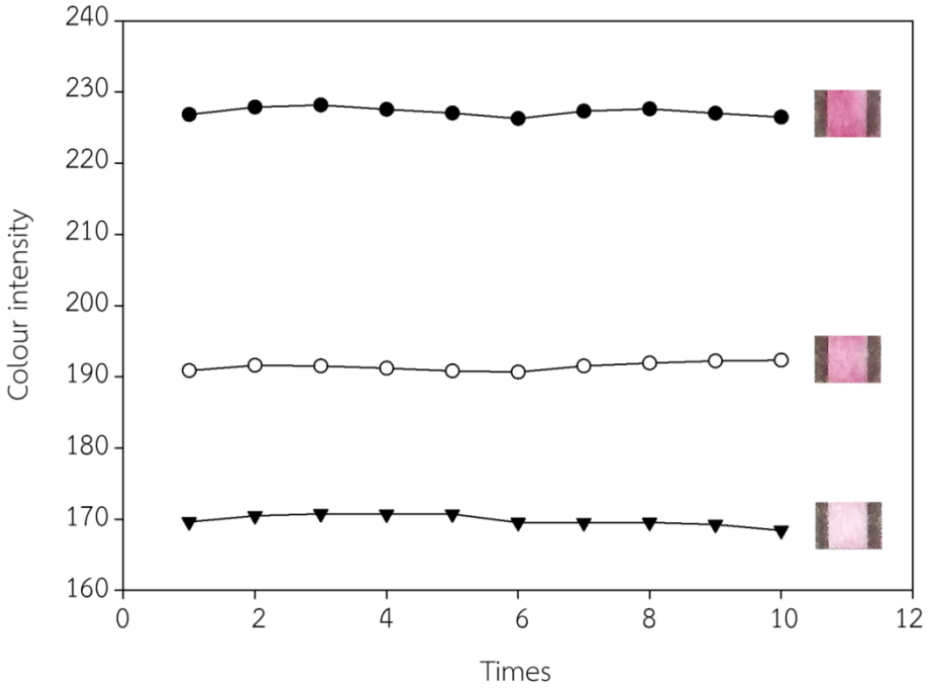
จากผลการทดสอบข้างต้น เมื่อสร้าง enz-PADs ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 และทดสอบเบื้องต้นกับสารมาตรฐานครีแอนิทินที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า สีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นยังไม่สม่ำเสมอ ยังคงพบลักษณะหัวจรวด (rocket-like shape) ในบริเวณส่วนของพื้นที่ตรวจวัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินินที่มีความเข้มข้นสูง การเกิดลักษณะดังกล่าวจะทำให้ผลการวัดความเข้มสีบนพื้นที่ตรวจวัดขัดแย้งกับความเข้มสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ดังผลการอ่านค่าความเข้มสีในตารางที่ 4.2 เพื่อทดสอบการอ่านค่าความเข้มสีบนพื้นที่ตรวจวัดของที่ให้สีที่เรียบเนียนเปรียบเทียบกับผลการทดสอบที่มีลักษณะหัวจรวด ซึ่งในงานวิจัยนี้วัดความเข้มสีบนพื้นที่เกิดปฏิกิริยาด้วยโปรแกรม Adobe photoshop CS2 จาก histogram panel ของโปรแกรม โดยกำหนดขนาดของพื้นที่การวัดคงที่ที่ 70X90 pixels ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ของพื้นที่ตรวจวัดเกือบทั้งหมด ซึ่งความเข้มสีที่อ่านได้เป็นค่าเฉลี่ยของความเข้มสีในพื้นที่ที่ทำการตรวจวัดทั้งหมด โดยผลการวัดค่าความเข้มของสีของภาพที่เกิดสีสม่ำเสมอ คือ 82.76 ในขณะที่ภาพที่ให้ลักษณะ rocket-like shape มีความเข้มข้องสี 64.66 ซึ่งเป็นค่าที่แตกต่างกันมาก นำไปสู่การแปลผลความเข้มข้นที่ผิดพลาดต่อไป

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าความเข้มสีที่วัดได้ระหว่างการเกิดสีของปฏิกิริยาในส่วนของ detection zone ที่เรียบเนียน และเป็น rocket-like shape

ภาพที่ได้จากการสแกน	**ความเข้มของสี (colour intensity)**		
	Blank	**Test**	**Result**
Detection zone ให้สีของปฏิกิริยาที่เรียบเนียน	249.00	166.24	82.76
Detection zone ให้สีของปฏิกิริยาเป็น rocket-like shape	249.36	184.7	64.66

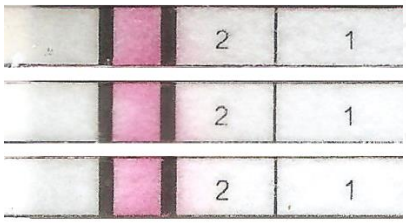
ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อหาสารที่ใช้ในการดูดซับไว้บนส่วน detection zone ที่เหมาะสมก่อนนำมาใช้ทดสอบตรวจหาปริมาณครีแอทินินต่อไป จึงทำการทดสอบโดยใช้น้ำกลั่น (distilled water) และสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ (potassium phosphate buffer) pH 7.5 ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร โดยหยดบริเวณพื้นที่ตรวจวัดเปรียบเทียบกับการไม่มีสารใดๆ ดูดซับบน พื้นที่ตรวจวัดก่อน แล้วทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผลการทดสอบ พบว่าการไม่มีสารใดๆ มาดูดซับบนพื้นที่ตรวจวัดก่อนนั้น สีที่เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอกันอย่างเห็นได้ชัดกว่าการที่พื้นที่ตรวจวัดถูกดูดซับด้วยน้ำกลั่น และสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ โดยเมื่อทำการทดสอบความเข้มสีที่เกิดขึ้นในบริเวณต่างๆ ของพื้นที่ตรวจวัดโดยกำหนดขนาดการวัดความเข้มสีที่ 17.5 x 22.5 pixels จำนวน 16 ช่อง ผลการทดลองพบว่า ความเข้มสีบนพื้นที่ตรวจวัดที่ไม่ดูดซับด้วยสารใดๆ มีค่าความแปรปรวนสูงสุด โดยมี %CV เท่ากับ 5.35%, ในขณะที่การใช้น้ำกลั่น หรือสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ มาหยดให้ดูดซับบริเวณพื้นที่ตรวจวัดก่อนการตรวจวัด มีความแปรปรวนใกล้เคียงกัน มี %CV เท่ากับ 54.86% และ 4.63% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 สีที่เรียบเนียนขึ้นของบนพื้นที่ตรวจวัดที่ถูกดูดซับด้วยน้ำกลั่นและสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ อาจเกี่ยวข้องกับเยื่อของเซลลูโลสของกระดาษกรองนั้นมีคุณสมบัติการบวมน้ำ (swelling) (62) จึงทำให้กระดาษมีการพองตัวขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการหยดสารละลายลงบนส่วนพื้นที่ตรวจวัด ทำให้เยื่อเซลลูโลสของกระดาษเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบมากขึ้น จึงทำให้ปฏิกิริยาของการเกิดสีที่เกิดเรียบเนียนขึ้นได้ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อใช้สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัพเฟอร์ pH.7.5 ในการดูดซับบนพื้นที่ตรวจวัดก่อนใช้งาน พบว่าสีที่เกิดขึ้นเรียบเนียน สีเข้มและชัดเจน (46.18 ± 1.42) กว่าการตรึงด้วยน้ำกลั่น (44.86 ± 1.60) จากผลการทดสอบ สามารถอธิบายได้ว่าเป็นผลจากค่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ในน้ำยาทั้งสอง โดยเอนไซม์ครีแอทินิเนส ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม (pH optimum) คือ 7 ถึง 9 เอนไซม์ครีแอทิเนส ค่า pH optimum คือ 7.5 ถึง 8 เอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดส ค่า pH optimum คือ 8 ถึง 9 (33) และเอนไซม์ เปอร์ออกซิเดส ค่า pH optimum คือ 5 ถึง 9 (65) ทั้งนี้ได้ทำการวัดความแม่นยำขอพื้นที่การตรวจวัด โดยกำหนดขอบเขตในการตรวจวัดความเข้มสีออกเป็นสีเหลี่ยมเล็กๆ (17.5 × 22.5 pixels) ติดต่อกันจำนวน 16 ช่อง ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมดบนพื้นที่ตรวจวัด ดังตารางที่ 4.4 ผลการตรวจวัดความเข้มสีเมื่อ enz-PADs ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้น 2.5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ให้ %CV เท่ากับ 2.94, 4.38 และ 6.45 ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อทำการทดสอบวัดความ

แม่นยำในพื้นที่การตรวจวัด (precision of detection zones) โดยทำการกำหนดขอบเขตในการวัดคงที่ที่ขนาด 70 × 90 pixels ซึ่งเป็นขนาดที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบของ enz-PADs ในงานวิจัยนี้ แล้วตรวจวัดซ้ำพื้นที่ตรวจวัด โดยเลื่อนกรอบการวัดความเข้มสีเป็นจำนวน 10 ครั้ง ผลการตรวจวัดความเข้มสีเมื่อ enz-PADs ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้น 2.5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ให้ %CV เท่ากับ 0.26, 0.19, 0.28 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ดังนั้นในงานวิจัยนี้ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.5 จึงเหมาะสมที่จะเลือกใช้เป็นสารละลายที่ใช้ตรึงพื้นที่ตรวจวัดก่อนทำการทดสอบต่อไป



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงผลการตรวจวัดความแม่นยำในการวัดสีในพื้นที่ตรวจวัด (precision of detections zones) (▼) ครีแอทินินความเข้มข้น 2.5 mg dL^{-1} (%CV = 0.26); (◯) ครีแอทินินความเข้มข้น 10 mg dL^{-1} (%CV = 0.19); (●) ครีแอทินินความเข้มข้น 25 mg dL^{-1} (%CV = 0.28)

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบของปฏิกิริยาในส่วนของ detection zone ที่ถูกตรึงด้วยสารต่างๆ ของ enz-PADs ที่สร้างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3

ชนิดสารที่ตรึง	**ภาพที่ได้จากการสแกน**	**ความเข้มของสี (Blank - Test) (n =3)** (mean ± sd)	**%CV** **(ขนาด 17.5x22.5 pixels: 16 ช่อง)**	
ไม่ตรึงสารใด		45.06 ± 6.74	5.54% 5.42% 5.08%	5.35%
น้ำกลั่น		44.86 ± 1.60	5.00% 4.88% 4.69%	4.86%
โพแทสเซียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์		46.18 ± 1.42	4.08% 4.87% 4.93%	4.63%

ตารางที่ 4.4 ความเข้มสีของพื้นที่ขนาดเล็ก (17.5×22.5 pixels) ติดต่อกันจำนวน 16 ช่อง ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมดบน detection zone

Colour intensity (RGB mode)	**Creatinine**		
	2.5 mg dL^{-1}	10 mg dL^{-1}	25 mg dL^{-1}
ช่องที่ 1	227.80	190.78	164.53
ช่องที่ 2	233.46	197.31	172.26
ช่องที่ 3	230.69	198.44	169.56
ช่องที่ 4	218.20	189.47	160.19
ช่องที่ 5	232.81	191.18	163.13
ช่องที่ 6	239.09	203.97	175.39
ช่องที่ 7	238.03	201.80	174.75
ช่องที่ 8	231.80	193.56	155.59
ช่องที่ 9	231.97	189.18	180.79
ช่องที่ 10	239.24	202.94	180.79
ช่องที่ 11	237.41	193.00	167.56
ช่องที่ 12	229.83	177.43	154.43
ช่องที่ 13	229.52	183.87	193.04
ช่องที่ 14	227.95	198.58	186.35
ช่องที่ 15	224.77	192.63	170.83
ช่องที่ 16	215.84	174.75	159.93
Mean ± SD	**230.53 ± 6.77**	**192.43 ± 8.43**	**170.57 ± 11.00**
%CV	**2.94**	**4.38**	**6.45**

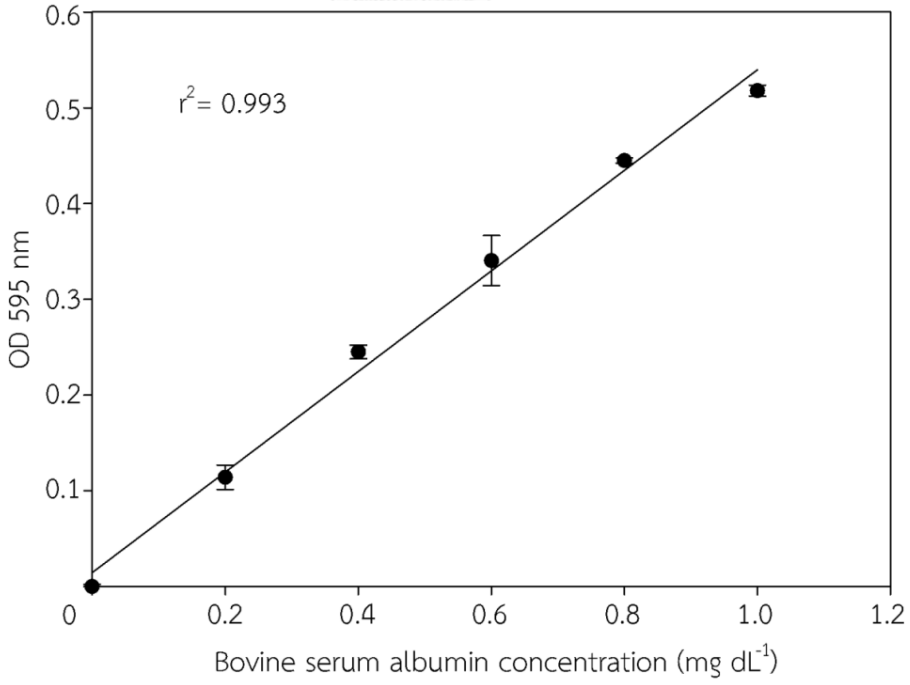
หมายเหตุ: ค่า colour intensity จากตารางเป็นข้อมูลดิบที่ไม่ได้ทำการลบค่า colour intensity ของ blank

3. ผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนรวมและการทำงานของเอนไซม์ของน้ำยา Creatinine plus ver.2

น้ำยา Creatinine plus ver.2 ของบริษัท Roche diagnostic ถูกนำมาวัดหาปริมาณโปรตีนรวมของน้ำยาทั้งสองระหว่างการใช้งานในงานวิจัยนี้ โดยทำการตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมเบื้องต้นด้วยน้ำยา Bradford's reagent และตรวจหาปริมาณการทำงานของตัวแทนเอนไซม์ในน้ำยา R1 เอนไซม์ คือ เอนไซม์ครีแอทิเนส และน้ำยา R2 คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยเพื่อป้องกันปัญหาของความแปรผันของน้ำยาในแต่ละครั้งของการผลิต (lot-to-lot variation)

3.1 ผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนรวมของน้ำยา Creatinine plus ver.2

ผลการทดสอบปริมาณโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนใน BSA ที่ OD 595 นาโนเมตร ด้วย Bradford's reagent ดังรูปที่ 4.6 พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมของน้ำยา R1 และ R2 ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 4.76 ± 0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.73 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนใน bovine serum albumin ที่ OD 595 nm ด้วย bradford's reagent

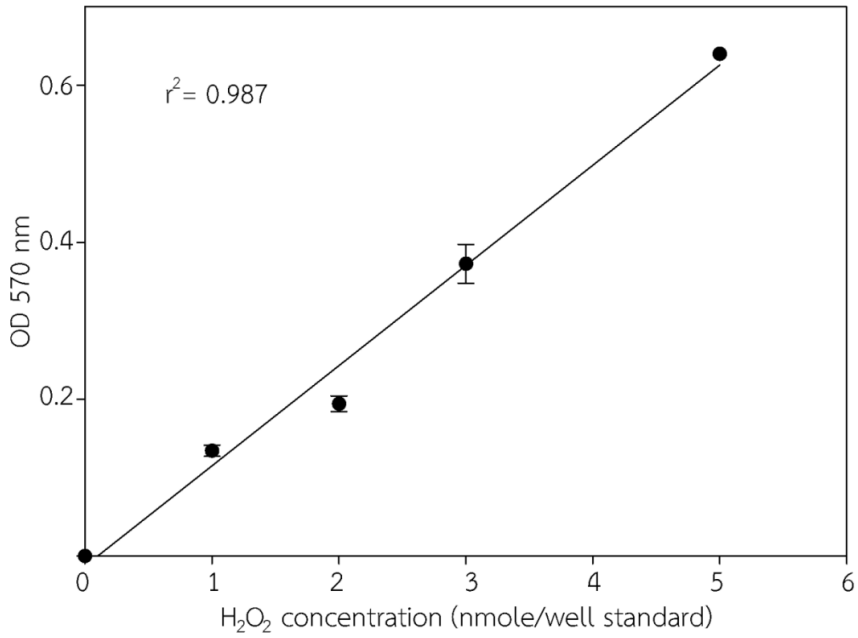
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนรวมของน้ำยา Creatinine plus ver.2

ครั้งที่	ระยะเวลาของน้ำยาที่นำมาทดสอบหลังเก็บ	ปริมาณโปรตีนรวม (mg mL^{-1}) (Bradford's reaction)	
		R1	R2
1	2 สัปดาห์	5.10	0.80
2		5.13	0.71
1	2 เดือน	4.16	0.69
2		4.64	0.74
Total (n = 4)	**Mean (mg ml^{-1})**	**4.76**	**0.73**
	SD	**0.46**	**0.05**
	%CV	**9.61**	**6.21**

3.2 ผลการทดสอบหาการทำงานของเอนไซม์รวมของน้ำยา Creatinine plus ver.2

ผลการตรวจหาปริมาณการทำงานของตัวแทนเอนไซม์ (enzyme activity) ในน้ำยา R1 คือ เอนไซม์ครีแอทิเนส และน้ำยา R2 คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ได้ผลดังนี้ การทำงานของเอนไซม์ครีแอทิเนส ที่อายุ 2 สัปดาห์ คือ 27.46 ± 1.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (%CV = 4.38, *n* = 4) และที่อายุ 2 เดือน มีค่าเท่ากับ 28.01 ± 1.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (%CV = 6.63, *n* = 4) ซึ่งพบว่าการทำงานของเอนไซม์ครีแอทิเนส จากการทดสอบให้ผลใกล้เคียงและสอดคล้องกับข้อมูลในเอกสารประกอบน้ำยา คือ ≥ 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และการทำงานของเอนไซม์ตัวแทนในน้ำยา R2 ที่ได้จากการเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน H_2O_2 ดังรูปที่ 4.7 คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส อายุน้ำยา 2 สัปดาห์ เมื่อทำการตรวจวัดการทำงานที่ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 28.80 ± 2.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (%CV = 7.47, *n* = 2) และ 37.87 ± 1.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (%CV = 2.31, *n* = 2) ตามลำดับ และที่อายุน้ำยา 2 เดือน เมื่อทำการตรวจวัดการทำงานที่ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 34.87 ± 1.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (%CV = 3.66, *n* = 2) และ 32.28 ± 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (%CV = 1.19, *n* = 2) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งผลการทดสอบของการหาการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในน้ำยา R2 ให้ผลการทดสอบที่มากกว่าข้อมูลใน

เอกสารประกอบน้ำยาอยู่ประมาณ 30 เท่า ซึ่งเป็นผลจากน้ำยา R2 มีสาร co-oxidation คือ 4-aminophenazone ซึ่งสามารถเสริมปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารจำพวกฟีนอลและใน peroxidase activity kit ที่นำมาใช้ในการทดสอบมีสารตั้งต้นในการตรวจวัด คือ OxiRed™ หรือ 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine จึงทำให้ผลการทดสอบให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ค่าที่สูงกว่าความเป็นจริง



รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ H_2O_2 ที่ OD 570 nm ด้วย peroxidase activity kit

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า น้ำยาที่นำมาใช้ในการทดสอบตลอดงานวิจัยนี้ น้ำยา R1 มีปริมาณโปรตีนรวม 4.76 ± 0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาตรการทำงานเอนไซม์รวมของเอนไซม์ครีแอทิเนส (total activity creatinase in R1 reagent) เท่ากับ 27.74 ± 1.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (n = 8) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และน้ำยา R2 มีปริมาณโปรตีนรวม 073. ± 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาตรการทำงานเอนไซม์รวมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (total activity peroxidase in R2 reagent) เท่ากับ 31.84 ± 3.79 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (n = 4) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และน้ำยา 34.98 ± 3.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (n = 4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดสอบด้วย peroxidase activity assay kit (Sigma-Aldrich, Germany) ดังผลสรุปในตารางที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบหาการทำงานของเอนไซม์ของน้ำยา Creatinine plus ver.2

ครั้งที่	ระยะเวลาของน้ำยาที่นำมาทดสอบหลังเก็บ	การทำงานของเอนไซม์ (U mL^{-1}) ที่อุณหภูมิ (° c)	
		25	37
Total creatinase enzyme activity ในน้ำยา R1			
1	2 สัปดาห์	-	29.22
2			26.58
3			27.19
4			26.84
1	2 เดือน		29.74
2			29.04
3			25.52
4			27.72
Total (n = 8)	**Mean (U mL^{-1})**		**27.73**
	SD		**1.20**
	%CV		**5.33**
Total peroxidase enzyme activity ในน้ำยา R2			
1	2 สัปดาห์	33.97	32.01
2		35.78	32.55
1	2 เดือน	30.32	37.07
2		27.28	38.30
Total (n = 4)	**Mean (U mL^{-1})**	**31.84**	**34.98**
	SD	**3.79**	**3.17**
	%CV	**11.91**	**9.06**

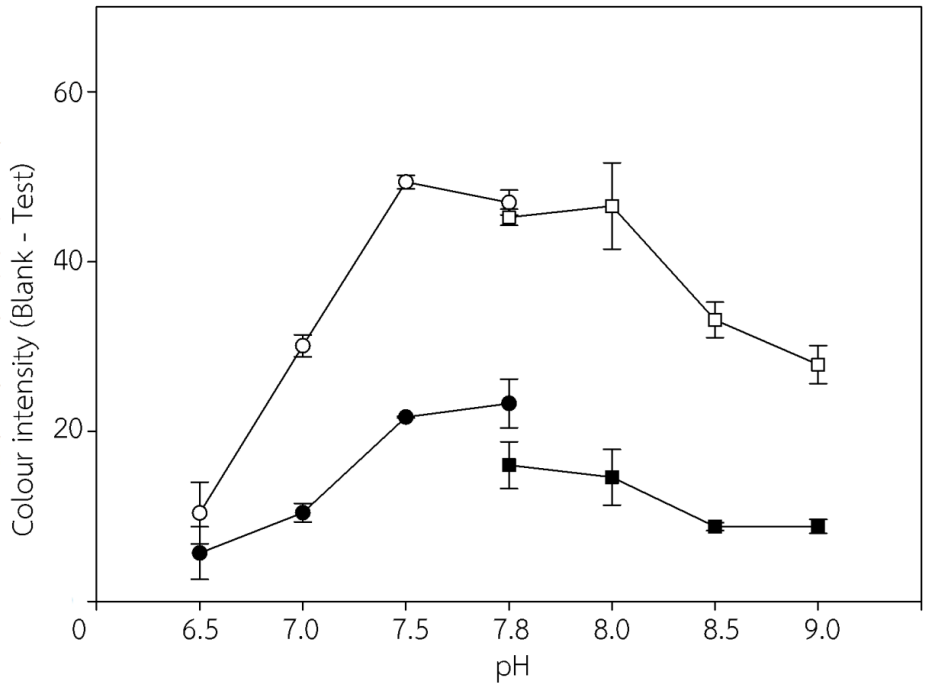
4. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับการการตรวจวัดระดับครีแอทินิน

4.1 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมของตัวอย่างตรวจที่ใช้ในการตรวจด้วย enz-PADs

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณครีแอทินินด้วยวิธีเอนไซม์ ค่า pH ในปฏิกิริยามีอิทธิพลกับการทำงานของเอนไซม์และการพัฒนาความเข้มของสี เนื่องจาก enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น ใช้ปริมาตรของตัวอย่างปัสสาวะในหนึ่งการทดสอบมากกว่าปริมาตรของน้ำยาที่ถูกดูดซับอยู่บนกระดาษอยู่มาก ดังนั้นตัวอย่างปัสสาวะที่จะนำมาทดสอบด้วย enz-PADs นี้ควรจะทำการปรับค่า pH ที่เหมาะสมก่อนทำมาทำการทดสอบ โดยค่าเฉลี่ยของ pH ของปัสสาวะในคนสุขภาพดี มีค่าอยู่ในช่วง 6.5 ถึง 8.0 ดังนั้น ในการทดสอบนี้จึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ในช่วง 6.5 ถึง 9.0 มาใช้ในการทดสอบหาค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยที่ pH ช่วง 6.5 - 7.8 ใช้ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) และที่ pH ช่วง 7.8 - 9.0 ใช้ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer) ในการเจือจางตัวอย่างก่อนทำการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในสิ่งส่งตรวจด้วยอัตราส่วนตัวอย่างปัสสาวะ 1 ส่วน ในบัฟเฟอร์ 9 ส่วน หรือตัวอย่างปัสสาวะ 1 ส่วน ในบัฟเฟอร์ 19 ส่วน หากค่าความเข้มสีที่ได้เกินช่วงความสามารถในการตรวจวัด และลดอัตราส่วนในการเจือจางลงหากค่าความเข้มสีที่ต่ำกว่าช่วงการตรวจวัดที่สามารถวัดได้หรือช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดด้วย enz-PADs แล้วทำการเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่ค่า pH ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการตรวจวัดค่าปริมาณครีแอทินิน ดังแสดงในรูปที่ 4.8

ผลการทดสอบ พบว่า ค่าความเข้มของสี (blank – test) มีค่าสูงขึ้นเมื่อค่า pH เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อ pH ของตัวอย่างตรวจเพิ่มขึ้นมากกว่า 7.5 (potassium phosphate buffer) การพัฒนาของสีของปฏิกิริยาไม่เพิ่มจากเดิม และเมื่อค่า pH มีค่าสูงกว่า 7.8 (Tris-HCl buffer) ค่าความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยามีค่าลดลง ยกเว้นการทดสอบกับครีแอทินินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์มีการเพิ่มขึ้นของความเข้มสีเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากผลการวัดความเข้มสีที่คลาดเคลื่อนกว่าจุดการทดสอบอื่นๆ สังเกตได้จากค่า SD ที่ค่อนข้างกว้าง ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.5 ในการเจือจางตัวอย่างก่อนทำการตรวจวัด

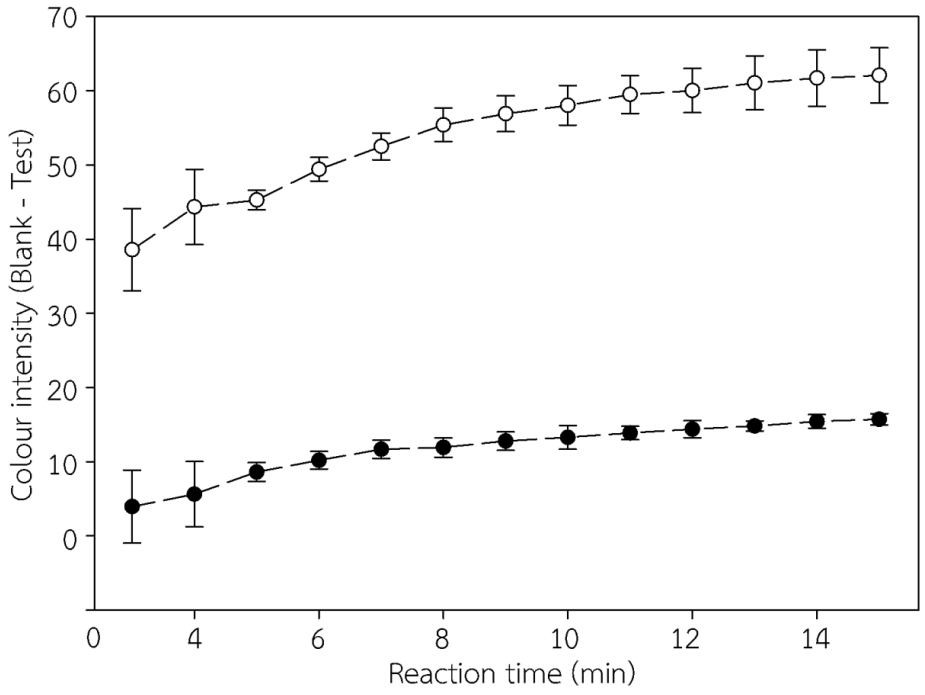
ด้วย enz-PADs เนื่องจากให้ผลการทดสอบของการเกิดสีของปฏิกิริยาในการตรวจวัดดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินินความเข้มข้น 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสี (colour intensity) ของปฏิกิริยาบน enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างตรวจในปฏิกิริยาเปลี่ยนไป (pH) ; ผลการทดสอบของปฏิกิริยา (●) แทนของครีแอทินินความเข้มข้น 5 mg dL^{-1} ที่เจือจางด้วย 100 mM potassium phosphate buffer (○) แทนครีแอทินินความเข้มข้น 20 mg dL^{-1} ที่เจือจางด้วย 100 mM potassium phosphate buffer (■) แทนครีแอทินินความเข้มข้น 5 mg dL^{-1} ที่เจือจางด้วย 100 mM Tris-HCl buffer (□) แทนครีแอทินินความเข้มข้น 20 mg dL^{-1} ที่เจือจางด้วย 100 mM Tris-HCl buffer

4.2 ผลการศึกษาหาระยะเวลาการอ่านผลที่เหมาะสมของปฏิกิริยาด้วย enz-PADs

เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยการทดสอบตามสภาวะที่เหมาะสมกับสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้น 2.5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ด้วยการจุ่มแถบตรวจลงในหลุมตัวอย่างรอเวลาให้ตัวอย่างไหลอย่างอิสระขึ้นมาปกคลุมส่วนของพื้นที่การตรวจวัด เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำแถบตรวจขึ้นจากหลุมแล้วจับเวลาต่อ 15 นาที แล้วทำการบันทึกภาพการทดสอบตั้งแต่นาทีที่ 3 ถึงนาทีที่ 15 ทุกๆ 1 นาที จากนั้นวัดค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม photoshop CS2 ซึ่งได้ผลการทดสอบดังนี้



รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสี (colour intensity) ของปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้นเมื่อระยะเวลาการรอปฏิกิริยาเปลี่ยนไป (reaction time) (●) แทนครีแอทินินความเข้มข้น 2.5 mg dL^{-1} (○) แทนครีแอทินินความเข้มข้น 20 mg dL^{-1} โดยแต่ละจุดแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ error bars แสดงถึง standard deviation

จากผลการการทดสอบข้างต้น พบว่าสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาบนกระดาษในช่วงระยะเวลาตั้งแต่นาทีที่ 3 ถึง 7 มีการพัฒนาของความเข้มของสีขึ้นเล็กน้อยเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาในการบันทึกผล และค่อนข้างคงที่หรือไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลาที่ทำการบันทึกผลตั้งแต่นาทีที่ 7 เป็นต้นไป ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ในการทดสอบนี้ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการทดสอบ คือ 7 นาที เป็นเวลาที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาค่อนข้างสมบูรณ์แล้วบนกระดาษ ทั้งยังทำให้ระยะเวลาการตรวจวัดทั้งระบบไม่ยาวนานเกินไปอีกด้วย ดังนั้นรวมทั้งระบบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ใช้ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา 11 นาที

5. ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterisation)

5.1 ผลการทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range) ในการตรวจวัด

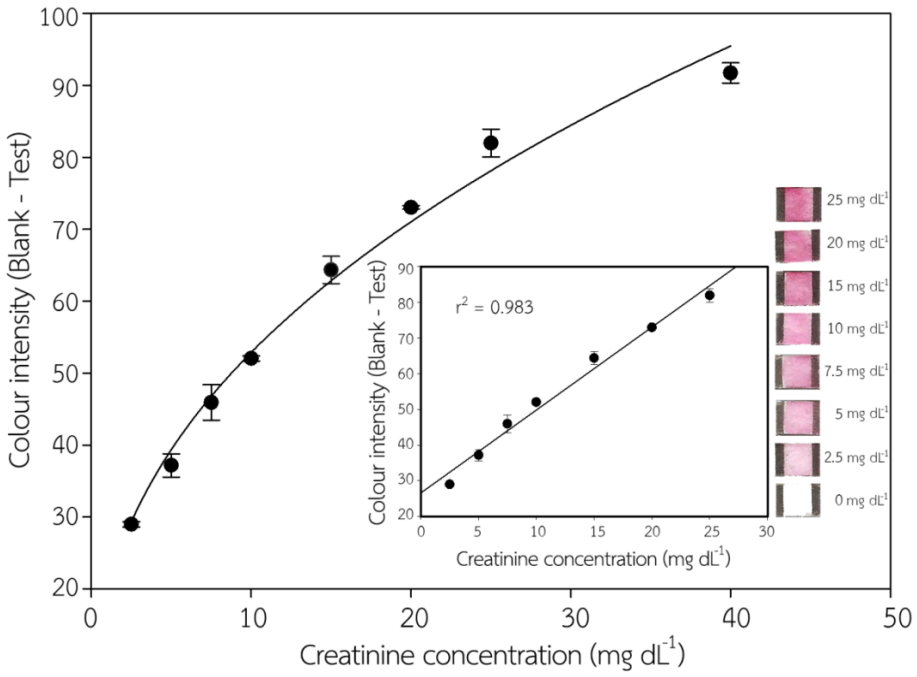
เพื่อศึกษาความสามารถในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังผลการทดสอบข้างต้น สำหรับการหาช่วงความสามารถในการตรวจวัดนั้น ผู้วิจัยทดสอบใช้ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นทดสอบตรวจสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 40 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง จากผลการทดสอบเมื่อนำไปสร้างกราฟเส้นตรง พบว่า ที่ความเข้มข้นครีแอทินินตั้งแต่ 2.5 - 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร อยู่ในช่วงเส้นตรง มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (r^2) เท่ากับ 0.983 ดังแสดงในรูปที่ 4.10

Chulalongkorn University

จากกราฟมาตรฐานที่ได้ สามารถสรุปได้ว่า enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะได้ในช่วง 25 – 250 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เมื่อทำการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ด้วยอัตราส่วน 1:10 ซึ่งครอบคลุมค่าสำคัญทางคลินิก นอกจากนี้หากค่าความเข้มของสีที่ได้เกินช่วงการเกิดปฏิกิริยาเป็นเส้นตรง สามารถนำตัวอย่างปัสสาวะนั้นๆ เจือจางด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนต่างๆ ทำให้ enz-PADs สามารถตรวจหาปริมาณครีแอทินินได้ช่วงที่กว้างขึ้นอีกด้วย

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ที่มีการพัฒนาเพื่อตรวจวัดปริมาณครีแอทินินและรายงานก่อนหน้านี้ วิธีการตรวจหาปริมาณครีแอทินินที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) ค่าช่วงการตรวจวัดที่มี

ศักยภาพในการตรวจวัดไม่แตกต่างจากวิธีอื่นๆ ที่พัฒนาขึ้น เช่น การตรวจวัดปริมาณครีแอทินินที่อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของแจฟฟี่ที่พัฒนาขึ้นโดย Chen และคณะ ได้พัฒนาเครื่องมือตรวจวัดโดยอาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical sensors based on the Jaffé reaction) ซึ่งมีค่า linear range เท่ากับ 4.19 ถึง 40.72 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (66) สำหรับวิธี Zone fluidic multichannel kinetic spectrophotometry ที่พัฒนาโดย Ohira และคณะ สามารถตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วได้ในช่วง 0 ถึง 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (67) ในขณะที่การพัฒนาชุดตรวจวัดของไหลจุลภาคขนาดพกพา (portable microfluidic system) ได้ในช่วง 0 ถึง 4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (68) นอกจากนี้ Ming Li และคณะได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะด้วยเทคนิค Stamping surface enhanced Raman scattering (S-SERS) ด้วย nanoporous gold disk (NPGD) สามารถตรวจหาปริมาณครีแอทินได้ 0.001 ถึง 1.131 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (69) แต่อย่างไรก็ตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้นนั้นจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีระบบซับซ้อน และผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือและการแปลผลการทดสอบต่อไป



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานครีแอทินินกับค่าความเข้มของสีที่เพิ่มขึ้น จากการใช้ enz-PADs (ภาพแทรก คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานครีแอทินินที่เกิดปฏิกิริยาเป็นเส้นตรง: r^2 = 0.983)

นอกจากนี้ Michael และคณะ พัฒนาการตรวจวัดครีแอทินินด้วย urine dipstick โดยอาศัยหลักการการเกิดสีระหว่าง Copper-creatinine complex ที่มีใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการย่อย 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ที่สามารถตรวจวัดได้ในช่วง 10 ถึง 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร แต่อย่างไรก็ตาม dipstick ดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องการรบกวนจากฮีโมโกลบิน (45) การตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วยชุดการตรวจวัดที่ให้ผลการทดสอบแบบให้ผลเร็วด้วยหลักการ enzyme-based bar-code-style lateral-flow assay วัดปริมาณครีแอทินินได้แบบกึ่งปริมาณในช่วง 0 – 400 ไมโครโมลาร์ การอ่านผลการทดสอบสามารถอ่านจากจำนวนแถบที่เกิดขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือในการอ่านผลอื่นๆ ระยะเวลาในการอ่านผลการทดสอบ คือ 19 นาที (44) และในปัจจุบันมีเครื่องตรวจวัดระดับครีแอทินินให้ผลเร็ว (portable POCT) เช่น Clinitek® (Siemens) ที่ให้ผลการตรวจวัดควบคู่กับการตรวจวัด microalbumin ที่ให้ผลการทดสอบกึ่งปริมาณ หรือรายงานเป็นช่วงค่าความเข้มข้นของสารโดยปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะจะให้ผลการตรวจวัดในช่วง 10 ถึง 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยไม่ต้องทำการเจือจางตัวอย่างก่อนทำการตรวจวัด แต่เครื่อง Clinitek® มีข้อจำกัดในเรื่องของราคาที่สูง ประมาณ 108 ถึง 202 บาทต่อหนึ่งการทดสอบ นอกจากนี้หากตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีปริมาณฮีโมโกลบินหรือไมโอโกลบินมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร อาจทำให้เกิดผลการทดสอบผิดพลาดต่อทั้งการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินและครีแอทินินอีกด้วย

แม้ว่า enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นได้จะไม่สามารถตรวจวัดค่าครีแอทินินต่ำๆ ได้อย่างเครื่องมืออื่นๆ แต่ความไวของ enz-PADs ก็เป็นที่น่าพึงพอใจและมีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการตรวจวัดทางคลินิก นอกจากนี้ช่วงความสามารถในการตรวจวัดยังครอบคลุมทั้งค่าครีแอทินินของคนปกติ และคนเป็นโรคอีกด้วย ดังนั้น enz-PADs ที่พัฒนาได้นี้สามารถใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะจริงได้ ยิ่งไปกว่านั้นการใช้ประโยชน์จาก 96-well microplates ของ enz-PADs สามารถทำการตรวจวัดตัวอย่างได้หลายๆ ตัวอย่างพร้อมๆ กัน เนื่องจาก enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นใช้ระยะเวลาในการทดสอบ 11 นาที ดังนั้นในระยะเวลา 1 ชั่วโมงจะสามารถทำการตรวจวัดได้ด้วย enz-PADs ประมาณ 480 ตัวอย่าง (ผลจากการคำนวณ) และสามารถตรวจวัดได้มากยิ่งขึ้นหากทำทำตรวจวัดแบบ interval time ทุกๆ 4 นาที โดยความเร็วในการตรวจวัดเร็วพอๆ กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ที่สามารถทดสอบตัวอย่างได้ถึง 600 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ซึ่งความรวดเร็วในการตรวจวัดนี้มี

ความสำคัญต่อการวินิจฉัยผลทางคลินิก และเป็นประโยชน์ในงานภาคสนาม ความถี่ในการตรวจวัดด้วย enz-PADs ให้ผลที่ดีกว่าวิธีทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical sensors) และระบบของไหล (flow injection) ในการวิเคราะห์ (1, 66, 68, 70)

5.2 ผลการทดสอบค่าความสามารถในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection: LOD) ด้วย enz-PADs

ทำการทดสอบหาค่า limit of detection ของการตรวจวัดปริมาณครีแอทินิน โดยใช้ 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.5 เป็น blank ทำการตรวจเช่นเดียวกับการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น จำนวน 20 ครั้ง และค่าความสามารถในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วย enz-PADs หรือ limit of detection (LOD) ถูกหาจากสูตร

$$\text{Limit of detection (LOD)} = \frac{3 \times SD}{S}$$

เมื่อ SD คือ standard derivation ที่ได้จากการวัด blank 20 ครั้ง และ S คือ sensitivity ซึ่งหาได้จากค่าความชันจากการทำกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าการตรวจวัดหาค่าครีแอทินินด้วย enz-PADs มีค่า limit of detection เท่ากับ 1.9 mg dL^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.7

Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบหาค่า limit of detection ของครีแอทินินด้วย enz-PADs

ค่าทางสถิติ	ค่าความเข้มของสี (blank-test) ของครีแอทินิน 0 mg/dL^{-1}
SD	1.507
3SD	4.522
Slope	2.324
LOD (mg/dL^{-1})	1.9 (1.945)

จากผลการทดสอบความสามารถต่ำสุดที่ enz-PADs สามารถตรวจวัดปริมาณครีแอทินินได้ในปัสสาวะ (limit of detection) คือ 1.9 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับการงานวิจัยก่อนหน้านี้แล้ว limit of detection ของ enz-PADs ให้ความไว (sensitivity) ในการตรวจวัดไม่แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น การตรวจวัดปริมาณครีแอทินินที่อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของแจฟฟี่ที่พัฒนาขึ้นโดย Chen และคณะ ได้พัฒนาเครื่องมือตรวจวัดโดยอาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical sensors based on the Jaffé reaction) ซึ่งมีค่า limit of detection เท่ากับ 0.97 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (1) แต่อย่างไรก็ตาม enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นมีความไวน้อยกว่าวิธีดังกล่าวอยู่ 2 เท่า สำหรับวิธี zone fluidic multichannel kinetic spectrophotometry ที่พัฒนาโดย Ohira และคณะ ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.076 mg dL^{-1} ซึ่งสามารถตรวจวัดครีแอทินินในความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นอยู่ 25 เท่า (67) ในขณะที่การพัฒนาชุดตรวจวัดของไหลจุลภาคขนาดพกพา (portable microfluidic system) สามารถตรวจวัดค่าได้ต่ำสุดเท่ากับ 0.33 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณต่ำสุดได้ดีกว่าวิธี enz-PAD อยู่ 6 เท่า (68) วิธีการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค Stamping surface enhanced Raman scattering (S-SERS) สามารถตรวจวัดค่าครีแอทินินต่ำสุดได้ 0.68 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (69) แต่อย่างไรก็ตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้นนั้นจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีระบบซับซ้อน และผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือและการแปลผลการทดสอบต่อไป และค่าความสามารถในการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินต่ำสุดของ enz-PAD ที่พัฒนาได้ เพียงพอต่อความต้องการในการใช้งานจริงเพื่อการทดสอบและแปลผลทางการแพทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.3 ผลการทดสอบหาสารรบกวนที่รบกวนการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs

เนื่องจากปัจจุบันการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจด้วยวิธีเอนไซม์เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการด้านเคมีคลินิกทางการแพทย์ เนื่องจากมีจุดเด่นในแง่ของความจำเพาะที่สูงกว่าวิธีอื่นๆ ที่มีพื้นฐานทางวิธีของแจฟฟี่ (Jaffé-based assays) และเพื่อเป็นการศึกษาหาสารที่มีผลกระทบในการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน สารที่มีการรายงานว่ามีการรบกวนในปฏิกิริยาการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน อันได้แก่ กลูโคส (glucose) โปรตีนไข่ขาว (human serum albumin) ฮีโมโกลบิน (haemoglobin) วิตามินซี (ascorbic acid) บิลิรูบิน (bilirubin) กรดยูริก (uric acid) และครีเอทีน (creatine) ถูกเลือกมาใช้ในการทดสอบโดยทำการเติมสารดังกล่าวลงไปในสารมาตรฐานครีแอทินินเพื่อให้ได้ปริมาณสารครีแอทินินสุดท้ายมีความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.7 ที่ได้จากการคำนวณหาคาเปอรเซ็นตการคืนกลับหรือ % Measurment เทียบกับครีแอทินินก่อนการเติมสารรบกวนแต่ละตัว จากสูตร

$$\%\text{Measurment} = \frac{\text{Creatinine concentration (no added)}}{\text{Creatinine concentration (added)}} \times 100$$

โดยกำหนดค่า %Measurment ในช่วง 95 – 105% ถือว่ายอมรับได้ว่าสารที่นำมาทดสอบไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าในสภาวะการไม่ทำการเจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นครีแอทินินสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เมื่อมีการเติมสารรบกวนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายให้ได้โปรตีนไข่ขาวความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ฮีโมโกลบินความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร วิตามินซีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร บิลิรูบินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และกรดยูริกความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร รบกวนการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยมี %Measurment ในช่วง 77.4 - 121.1% ซึ่งความเข้มสีที่ลดลงจากการเติมสารบิลิรูบินเพิ่มในสารมาตรฐานครีแอทินินนั้น เกิดจากบิลิรูบินที่ปริมาณความเข้มข้นสูง ๆ (ในงานวิจัยนี้ คือ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) จะทำลายส่วนหนึ่งของ reactive intermediate forms ในปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีผลต่อการรบกวนปฏิกิริยา ทำให้การเกิด chromopore ลดลง และสำหรับกรดยูริกมีผลรบกวนต่อปฏิกิริยาได้ เนื่องจากกรดยูริกสามารถ

ฟอกขาว (bleaching) chromogen ให้สีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการเกิด H_2O_2 จางลงได้ ทำให้อ่านผลของปฏิกิริยาได้ต่ำกว่าความเป็นจริง (71) สำหรับฮีโมโกลบินสามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation ต่อ สารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic substrates) ได้ (72) เมื่อทำการตรวจวัดครีแอทินินด้วย enz-PADs สารฮีโมโกลบินในตัวอย่างตรวจจะสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำยาในพื้นที่ R1 ก่อน ซึ่งมี HTIB (chromogen) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบอะโรมาติกชนิดหนึ่ง ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยา oxidation ไปก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับ 4-aminophenazone แบบ coupling reaction ทำให้สีของปฏิกิริยาเกิดได้น้องลง นอกจากนี้วิตามินซีมีรายงานว่าเป็นสาร reducing agent (73) ที่สามารถสลาย H_2O_2 ได้ ดังนั้นเมื่อ H_2O_2 ในปฏิกิริยาลดน้อยลง ทำให้สีของปฏิกิริยาเกิดได้น้อยลงนั่นเอง

แต่เมื่อมีการเจือจางสารรบกวนลงให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนไข่ขาวความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ฮีโมโกลบินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร วิตามินซีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร บิลิรูบินความเข้มข้น 35 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และกรดยูริกความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร พบว่าไม่รบกวนต่อการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (%Measurment เท่ากับ 96.3 - 103.9%) นอกจากนี้พบว่ากลูโคสปริมาณสูง คือกลูโคสความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ไม่รบกวนปฏิกิริยาตรวจวัด ครีแอทินินด้วย enz-PADs ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นไม่ถูกรบกวนการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยสารรบกวนข้างต้น เนื่องด้วยในการทดสอบตัวอย่างปัสสาวะจริงนั้นจะต้องทำการเจือจางตัวอย่างด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.5 จำนวน 10 ถึง 20 เท่าก่อนมาทำการตรวจวัดด้วย enz-PADs

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบสารที่อาจมีผลรบกวนต่อปฏิกิริยาการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน

ชนิดของสารรบกวน	**ความเข้มข้นของสารรบกวนสุดท้าย (mg dL^{-1})**	**%Measurment**
Glucose	0	100.0 ± 10.0
	300*	96.0 ± 8.5
	150*	95.9 ± 4.3
Human serum albumin	0	100.0 ± 10.0
	300	105.7 ± 10.0
	150*	101.5 ± 3.4
Haemoglobin	0	100.0 ± 5.7
	200	90.3 ± 3.3
	100*	97.2 ± 8.8
Ascorbic acid	0	100.0 ± 0.2
	100	92.2 ± 1.5
	50*	99.7 ± 3.5
Bilirubin	0	100.0 ± 9.4
	50	78.8 ± 8.9
	35*	101.5 ± 10.1
Uric acid	0	100.0 ± 6.9
	30	77.4 ± 6.5
	20*	96.3 ± 9.2

หมายเหตุ (*) แสดงถึงความเข้มข้นของสารที่ไม่รบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สำหรับการทดสอบความสามารถในการกำจัดครีเอทีนในตัวอย่างตรวจในบริเวณ R1 ของ enz-PADs ให้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.8 คือเมื่อพิจารณาค่า %Measurment ของการตรวจวัดครีแอทินินด้วย enz-PADs เมื่อมีการเติมสารครีเอทีนเพิ่มลงไปในสารมาตรฐานครีแอทินินและตัวอย่างปัสสาวะที่ครีเอทีนความเข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และ 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร มีค่า %Measurment อยู่ในช่วง 95 – 105% ที่ถือว่ายอมรับได้ว่าสารที่นำมาทดสอบไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงผลการทดสอบในตารางที่ 4.9 ดังนั้นสรุปได้ว่าความสามารถในการกำจัดครีเอทีนในตัวอย่างปัสสาวะของ enz-PAD ที่พัฒนาได้ คือ 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เมื่อปัสสาวะถูกเจือจางด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 เท่า ก่อนทำการตรวจวัด

เนื่องจากครีเอทีนสามารถพบได้ในปัสสาวะในเพศชาย 0 – 40 มิลลิกรัมต่อวัน ในขณะที่เพศหญิงพบได้ 0 – 80 มิลลิกรัมต่อวัน (36) และในคนสุขภาพดีปัสสาวะจะถูกขับออกมาปริมาตร 1 – 2 ลิตร (17) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ในสภาวะการขับปัสสาวะ 1.5 ลิตรต่อวัน (22) ในเพศชายจะพบครีเอทีนในปัสสาวะประมาณ 0 - 2.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และในเพศหญิงจะพบครีเอทีนในปัสสาวะประมาณ 0 - 5.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ดังนั้น สรุปได้ว่า ปริมาณครีเอทีนที่มีในปัสสาวะของคนปกติในช่วงดังกล่าวไม่รบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น

นอกจากนี้ อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นอาศัยหลักการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยเอนไซม์ครีแอทินิเนสและเอนไซม์ครีแอทิเนสในการหาปริมาณครีแอทินิน ซึ่งมักมีสารรบกวนปฏิกิริยา คือบิลิรูบินและวิตามินซี แต่อย่างไรก็ตามในน้ำยาที่นำมาใช้ในการประยุกต์สร้าง enz-PAD มีสารโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการกำจัดบิลิรูบินที่รบกวนปฏิกิริยา และเอนไซม์แอสคอร์เบสออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดวิตามินซีในสารตัวอย่างจึงทำให้ enz-PAD ที่พัฒนาขึ้นไม่ถูกรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดด้วยสารดังกล่าว และการออกแบบ PAD ให้มีเวลาและระยะทางในการเคลื่อนที่ของตัวอย่างในการสัมผัสกับน้ำยา R1 ที่เหมาะสม ทำให้ครีเอทีนที่อาจมีในตัวอย่างตรวจจะถูกกำจัดด้วยการทำการบ่มปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ครีแอทิเนสและเอนไซม์ซาโคซีนออกซิเดสในพื้นที่ R1 ก่อน เพื่อทำการกำจัดครีเอทีนในตัวอย่างตรวจดังผลข้างต้น ทำให้ enz-PAD ที่พัฒนาขึ้นไม่ถูกรบกวนจากครีเอทีน

ตารางที่ 4.9 การทดสอบความสามารถในการกำจัดครีเอทีนในตัวอย่างตรวจในบริเวณ R1 ของ enz-PADs

ความเข้มข้นสุดท้าย (mg dL^{-1})		**ผลการทดสอบที่ได้จาก enz-PADs**		
Creatinine	**Creatine ที่เติม**	**Colour intensity (Blank – Test)****	**ความเข้มข้นของ creatinine (mg dL^{-1})**	**% Measurment**
สารมาตรฐานครีแอทินิน (10 mg dL^{-1})	0	24.92 ± 3.57	10.00 ± 1.43	100.00%
	1*	25.38 ± 5.76	10.18 ± 2.31	101.83%
	1.5	30.17 ± 1.53	12.11 ± 0.61	121.05%
	2	36.54 ± 2.68	14.66 ± 1.08	146.63%
	2.5	36.84 ± 2.44	14.78 ± 0.98	147.85%
	5	39.36 ± 4.69	15.79 ± 1.88	157.93%
ปัสสาวะ	0	208.04 ± 2.06	118.70 ± 8.25	100.00%
	10*	207.25 ± 1.36	121.87 ± 5.45	102.67%
	15	200.20 ± 1.43	150.16 ± 5.74	126.50%
	20	189.73 ± 3.17	192.16 ± 12.73	161.89%
	25	189.54 ± 5.77	192.92 ± 23.16	162.53%
	50	188.52 ± 3.68	197.04 ± 14.78	166.00%

หมายเหตุ (*) แสดงถึงความเข้มข้นของสารที่ไม่รบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัด

(**) ทำซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.4 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (precision) และความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของ enz-PADs

ทำการศึกษาความแม่นยำของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยนำ enz-PADs มาทดสอบกับสารละลายมาตรฐานครีแอทินินที่มีความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เป็นสิ่งตัวอย่าง สำหรับการทดสอบความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (with-in day precision) ทำการเตรียม enz-PADs จำนวน 20 ชิ้น ในสภาวะและเวลาเดียวกัน จากนั้นนำ enz-PADs ที่ได้ไปทดสอบภายใน 1 วัน จำนวน 10 ชิ้นต่อหนึ่งความเข้มข้น (n = 10) และทำการวัดความเข้มสีที่ได้ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ในโหมด RGB จากนั้นทำการเทียบผลจากความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานครีแอทินินกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นต่อไป ค่าที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.9 คำนวณเป็นผลค่าความแปรปรวน (%CVs) ของการทดสอบด้วยครีแอทินิน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร คือ 8.82% และครีแอทินินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร คือ 6.86% นอกจากนี้ได้ทำการเตรียม enz-PADs จำนวน 60 ชิ้น ในสภาวะและเวลาเดียวกัน จากนั้นนำ enz-PADs ที่ได้ไปตรวจวัดครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะจริง 3 ความเข้มข้น (ค่าต่ำ กลาง และสูง) ทดสอบภายใน 1 วัน จำนวน 20 ชิ้นต่อหนึ่งความเข้มข้น (n = 20) ผลการทดสอบค่าความแม่นยำของการค่าครีแอทินินความเข้มข้น 12, 170 และ 330 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร คำนวณเป็นผลค่าความแปรปรวน (%CVs) ได้ 14.21%, 6.93% และ 5.86% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10

จากการทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (between day precision) จากการเตรียม enz-PADs ในสภาวะเดียวกันในแต่ละวันติดต่อกันจำนวน 3 วัน วันละ 10 ชิ้น (n = 30) ต่อความเข้มข้น จากนั้นนำไปทดสอบหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานครีแอทินินที่วัดได้ในแต่ละวันจากกราฟมาตรฐาน ความเข้มสีของการทดสอบต่อครีแอทินินความเข้มข้น 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่าที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.11 คำนวณเป็นผลค่าความแปรปรวน (%CVs) ของการทดสอบด้วยครีแอทินินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร คือ 11.57% และครีแอทินินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร คือ 9.39% นอกจากนี้ได้ทำการเตรียม enz-PADs ในสภาวะและเวลาเดียวกันติดต่อกันจำนวน 10 วัน วันละ 3 ชิ้น (n = 30) ต่อความเข้มข้น จากนั้นนำ enz-PADs ที่ได้ไปตรวจวัดครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะจริง 3 ความเข้มข้น (ค่าต่ำ กลาง และสูง) ผลการทดสอบค่าความแม่นยำของการค่าครีแอทินินความเข้มข้น 12, 170 และ 330 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร คำนวณเป็นผลค่า

ความแปรปรวน (%CVs) ได้ 16.55%, 6.44% และ 6.14% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.12 จากผลการทดสอบความแม่นยำข้างต้น พบว่า enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น มีผลการทดสอบเป็นที่น่าพึงพอใจสำหรับใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะต่อไป

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (within-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 2 ความเข้มข้น

การทดสอบ	**Within-day precision (*n*=10)**	
	ความเข้มข้นของครีแอทินินที่ใช้ในการทดสอบ (mg dL^{-1})	
	ความเข้มข้นที่วัดได้	
ความเข้มข้นจริง	**5**	**20**
ครั้งที่ 1	4.36	16.69
ครั้งที่ 2	4.26	16.97
ครั้งที่ 3	4.19	14.42
ครั้งที่ 4	4.38	16.51
ครั้งที่ 5	5.22	16.09
ครั้งที่ 6	5.40	17.40
ครั้งที่ 7	4.76	18.28
ครั้งที่ 8	4.94	18.55
ครั้งที่ 9	4.88	17.19
ครั้งที่ 10	4.57	16.62
ความเข้มข้นครีแอทินิน	**5**	**20**
Mean (mg dL^{-1})	**4.70**	**16.87**
SD	**0.41**	**1.16**
%CV	**8.82**	**6.86**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (within-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีแอทินิน 3 ความเข้มข้น

การทดสอบ	Within-day precision (n=20)		
	ความเข้มข้นของครีแอทินินในปัสสาวะที่ใช้ในการทดสอบ (mg dL^{-1})		
	ความเข้มข้นที่วัดได้		
ความเข้มข้นจริง	**ค่าต่ำ (12)**	**ค่ากลาง (170)**	**ค่าสูง (330)**
ครั้งที่ 1	12.36	159.74	326.35
ครั้งที่ 2	10.48	174.18	335.13
ครั้งที่ 3	10.90	167.99	330.48
ครั้งที่ 4	12.30	188.15	317.99
ครั้งที่ 5	10.37	189.47	315.03
ครั้งที่ 6	11.89	161.75	339.05
ครั้งที่ 7	15.09	163.76	309.42
ครั้งที่ 8	8.74	161.16	314.92
ครั้งที่ 9	12.68	184.55	373.76
ครั้งที่ 10	12.08	172.12	367.94
ครั้งที่ 11	10.67	166.67	305.50
ครั้งที่ 12	13.57	155.24	312.59
ครั้งที่ 13	9.31	160.42	333.44
ครั้งที่ 14	9.88	197.62	333.65
ครั้งที่ 15	9.54	179.74	347.72
ครั้งที่ 16	12.17	167.09	308.25
ครั้งที่ 17	14.24	156.72	329.21
ครั้งที่ 18	12.25	176.67	340.53
ครั้งที่ 19	11.39	177.04	317.25
ครั้งที่ 20	12.42	178.73	305.50

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (within-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีแอทินิน 3 ความเข้มข้น (ต่อ)

ความเข้มข้นครีแอทินิน	**ค่าต่ำ (12)**	**ค่ากลาง (170)**	**ค่าสูง (330)**
Mean (mg dL^{-1})	11.62	171.94	328.19
SD	1.65	11.91	19.22
%CV	14.21	6.93	5.86

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน (between-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 2 ความเข้มข้น

การทดสอบ	**Between-day precision (3 days, *n*=30)**					
	ความเข้มข้นของครีแอทินินที่ใช้ในการทดสอบ (mg dL^{-1})					
	ความเข้มข้นที่วัดได้					
	วันที่ 1		**วันที่ 2**		**วันที่ 3**	
ความเข้มข้นจริง	**5**	**20**	**5**	**20**	**5**	**20**
ครั้งที่ 1	4.36	16.69	4.56	18.96	4.97	15.73
ครั้งที่ 2	4.26	16.97	4.57	19.11	4.24	16.66
ครั้งที่ 3	4.19	14.42	5.82	19.11	5.35	18.56
ครั้งที่ 4	4.38	16.51	5.09	19.35	4.40	16.84
ครั้งที่ 5	5.22	16.09	5.57	13.83	5.92	18.03
ครั้งที่ 6	5.40	17.40	4.72	17.44	5.55	18.66
ครั้งที่ 7	4.76	18.28	4.88	19.48	6.12	15.81
ครั้งที่ 8	4.94	18.55	4.41	17.28	3.65	16.36
ครั้งที่ 9	4.88	17.19	4.46	20.42	4.31	19.87
ครั้งที่ 10	4.57	16.62	4.92	19.52	3.49	20.16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน (between-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 2 ความเข้มข้น (ต่อ)

ความเข้มข้นครีแอทินิน	**5**	**20**
Mean (mg dL^{-1})	4.89	17.66
SD	0.57	1.66
%CV	11.57	9.39

ตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน (between-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีแอทินิน 3 ความเข้มข้น

การทดสอบ		**Between-day precision (10 days, *n*=30)**		
		ความเข้มข้นของครีแอทินินในปัสสาวะที่ใช้ในการทดสอบ (mg dL^{-1})		
		ความเข้มข้นที่วัดได้		
วันที่	**ครั้งที่**	**ค่าต่ำ (12)**	**ค่ากลาง (170)**	**ค่าสูง (330)**
1	1	12.36	159.74	326.35
	2	10.48	174.18	335.13
	3	10.90	167.99	330.48
2	4	12.42	152.28	313.12
	5	15.05	167.41	315.98
	6	13.67	150.95	320.32
3	7	11.39	166.35	353.65
	8	10.52	173.81	349.10
	9	14.52	184.66	360.00
4	10	11.17	162.38	314.29
	11	10.88	159.58	340.00
	12	8.93	160.00	344.44

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน (between-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีแอทินิน 3 ความเข้มข้น (ต่อ)

การทดสอบ		Between-day precision (10 days, *n*=30)		
		ความเข้มข้นของครีแอทินินในปัสสาวะที่ใช้ในการทดสอบ (mg dL^{-1})		
		ความเข้มข้นที่วัดได้		
วันที่	**ครั้งที่**	**ค่าต่ำ (12)**	**ค่ากลาง (170)**	**ค่าสูง (330)**
5	13	10.43	173.28	315.98
	14	9.02	178.89	348.57
	15	12.57	178.68	351.96
6	16	11.49	180.32	359.68
	17	13.88	163.49	326.03
	18	11.62	158.84	368.78
7	19	10.75	165.98	299.89
	20	11.87	163.54	306.67
	21	10.88	166.46	312.17
8	22	11.85	154.87	315.13
	23	10.67	150.48	300.42
	24	17.33	178.57	367.41
9	25	14.69	176.46	360.85
	26	16.38	165.13	328.47
	27	10.41	165.98	327.51
10	28	13.63	154.81	346.35
	29	13.42	136.46	349.63
	30	13.12	165.98	355.03

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน (between-day precision) ของ enz-PADs เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีแอทินิน 3 ความเข้มข้น (ต่อ)

ความเข้มข้นครีแอทินิน	**ค่าต่ำ (12)**	**ค่ากลาง (170)**	**ค่าสูง (330)**
Mean (mg dL^{-1})	12.21	165.25	334.78
SD	2.02	10.65	20.54
%CV	16.55	6.44	6.14

5.5 ผลการทดสอบหาความคงตัว (stability) ของ enz-PADs

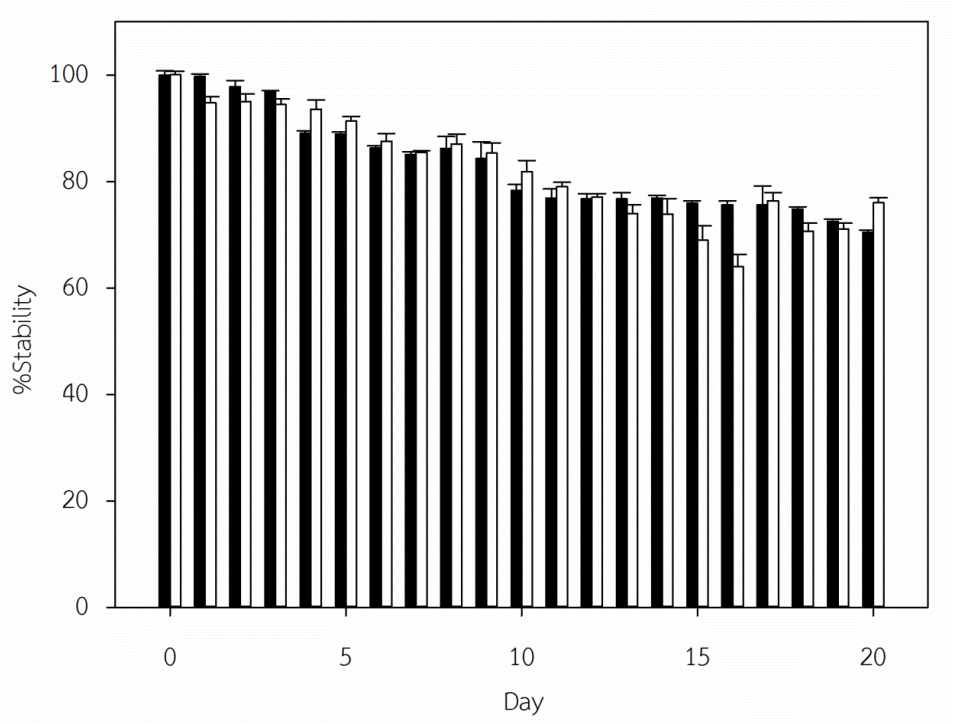
ทำการศึกษาความคงตัวของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยทำการสร้าง enz-PADs ขึ้นในสภาวะเดียวกัน จำนวน 180 อัน สำหรับใช้ทดสอบหาค่าความคงตัวระยะเวลา 20 วัน วันละ 9 อัน อันประกอบไปด้วย ทดสอบกับตัวอย่าง ได้แก่ สารมาตรฐานครีแอทินินความเข้มข้น 0, 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร อย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำ enz-PADs ที่ได้ปิดผนึกด้วยเครื่องผนึกถุงระบบสูญญากาศ (vacuum sealer) เก็บไว้ในตู้เย็น 2-4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะครบกำหนดเวลาในการทดสอบ โดยในแต่ละวันที่ทำการทดสอบจะนำค่าจากการทดสอบ enz-PADs ที่ถูกเตรียมขึ้นใหม่ทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในวันนั้นๆ เป็นค่าเทียบมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทำการทดสอบ ดังสูตร

$$\text{ความเข้มข้นครีแอทินินในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)} = \frac{10 \times sCI}{CI}$$

เมื่อ sCI หมายถึง ความเข้มของสีที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของตัวอย่าง (Blank – Test) และ CI หมายถึง ความเข้มของสีที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานครีแอทินินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (Blank – Test) ที่ทำการเตรียม enz-PADs ขึ้นใหม่ ณ วันนั้นๆ จากนั้นทำการหาเปอร์เซ็นต์ความคงตัวจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความคงตัวของ enz-PADs (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของครีแอทินินที่วัดได้ในแต่ละวัน} \times 10}{\text{ความเข้มข้นของครีแอทินินที่วัดได้ของ enz-PADs ที่เตรียมใหม่}}$$

พบว่า enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น สามารถดูดซับน้ำยาและทำการผนึกถุงระบบสูญญากาศ (vacuum sealer) เก็บไว้ในตู้เย็น 2-4 องศาเซลเซียส ได้นาน 14 วัน หรือ 2 สัปดาห์ โดยประสิทธิภาพในการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินจะลดลงเหลือประมาณร้อยละ 90 เมื่อทำการตรึงน้ำยาทิ้งไว้เป็นเวลา 4 วัน (89.06% เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร, 93.57% เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) ประสิทธิภาพลดลงเหลือประมาณร้อยละ 80 เมื่อทำการตรึงน้ำยาทิ้งไว้เป็นเวลา 9 วัน (82.68% เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร, 83.20% เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) และประสิทธิภาพลดลงเหลือประมาณร้อยละ 70 เมื่อทำการตรึงน้ำยาทิ้งไว้เป็นเวลา 20 วัน รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ก.3 (ภาคผนวก) และรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเก็บและเปอร์เซ็นต์ความคงตัวของ enz-PADs ในระยะเวลา 20 วัน (■) แทนครีแอทินินความเข้มข้น 5 mg dL^{-1} (□) แทนครีแอทินินความเข้มข้น 20 mg dL^{-1}

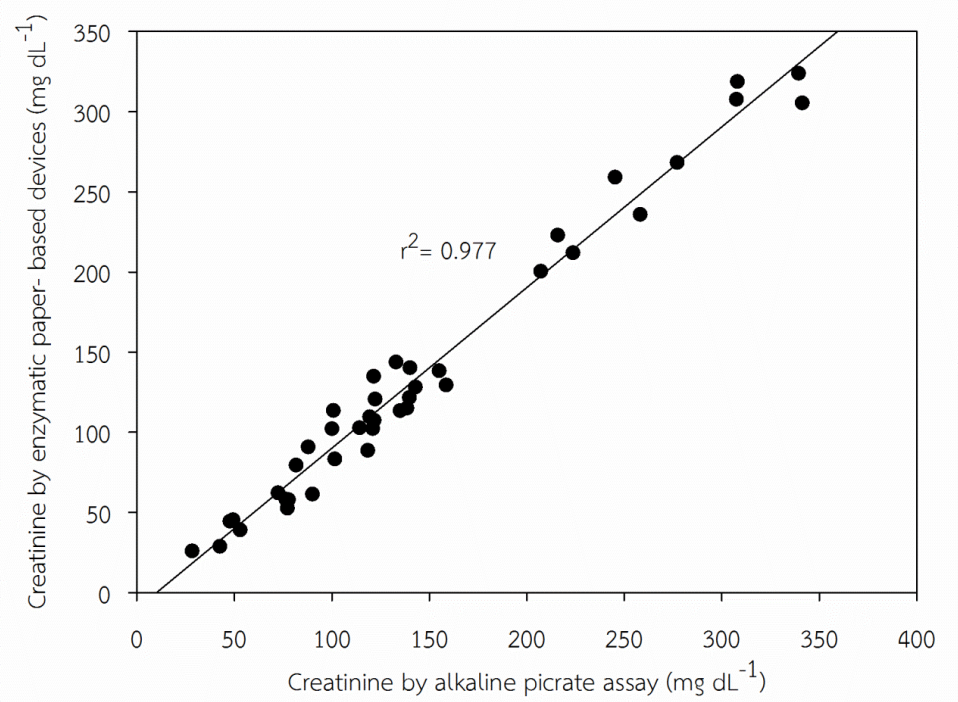
ทั้งนี้ ผลการทดสอบความคงตัวของ enz-PAD พบว่า เมื่อทำการดูดซับน้ำยาเก็บไว้ ผลการทดสอบจะให้ค่าความเข้มสีที่ลดลงเรื่อยๆ ในแต่ละวัน อาจเป็นผลเนื่องจากรูปร่างที่เปลี่ยนไป (conformation change) ของ active site ของเอนไซม์ หรือการ folding ของเอนไซม์ที่ไม่เหมาะสม เมื่อเอนไซม์ถูกดูดซับไว้บนกระดาษ ทำให้เอนไซม์นั้นๆ มีการทำงานที่ลดต่ำลง ดังนั้น เพื่อประสิทธิภาพในการตรวจวัดครีแอทินินที่ดี ควรเตรียม enz-PADs แล้วใช้งานทันที หรือเตรียมไว้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ เพื่อให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ยังคงอยู่มากกว่าร้อยละ 85 หากต้องการให้ enz-PADs มีประสิทธิภาพในการใช้งานเพิ่มขึ้น อาจต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในน้ำยาที่นำมาใช้งานบนกระดาษต่อไป

5.6 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะเปรียบเทียบกับวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก

เพื่อศึกษาความถูกต้องแม่นยำของ enz-PADs ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะ ทำการเก็บปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้าหลังจากตื่นนอนทันทีของอาสาสมัครที่สุขภาพดี จำนวน 40 ราย ซึ่งทำการเก็บเฉพาะปัสสาวะช่วงกลาง โดยถ่ายปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อน เก็บเฉพาะปัสสาวะช่วงกลาง และถ่ายปัสสาวะช่วงท้ายทิ้งไป นำมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเอาส่วนใสมาเจือจาง 10-20 เท่าด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.5 ก่อนนำไปตรวจวัดด้วย enz-PADs ผลการการตรวจวัดปริมาณครีแอทินิน ด้วย enz-PADs นำมาเปรียบเทียบกับวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คือวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก ได้ผลดังแสดงในตารางที่ ก.4 (ภาคผนวก)

ผลการตรวจวัดทั้งสองวิธี เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีแอทินินที่ได้จากวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติกและวิธีที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) พบว่าสมการ regression analysis relation คือ $y = 1.002\ (\pm 0.025)x - 10.136\ (\pm 4.178)$ ($y = Ax+B$) และได้ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (coefficient of determination) หรือ $r^2 = 0.977$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1 ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงความแปรผันที่เกิดขึ้นกับตัวแปรตามในที่นี้คือ วิธีที่พัฒนาขึ้น enz-PADs มีผลเนื่องมาจากตัวแปรต้นในที่นี้ คือวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติกคิดเป็นร้อยละ 97.7 หมายความว่า อิทธิพลของการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะด้วยวิธี enz-PADs ต่อวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติกคิดเป็น

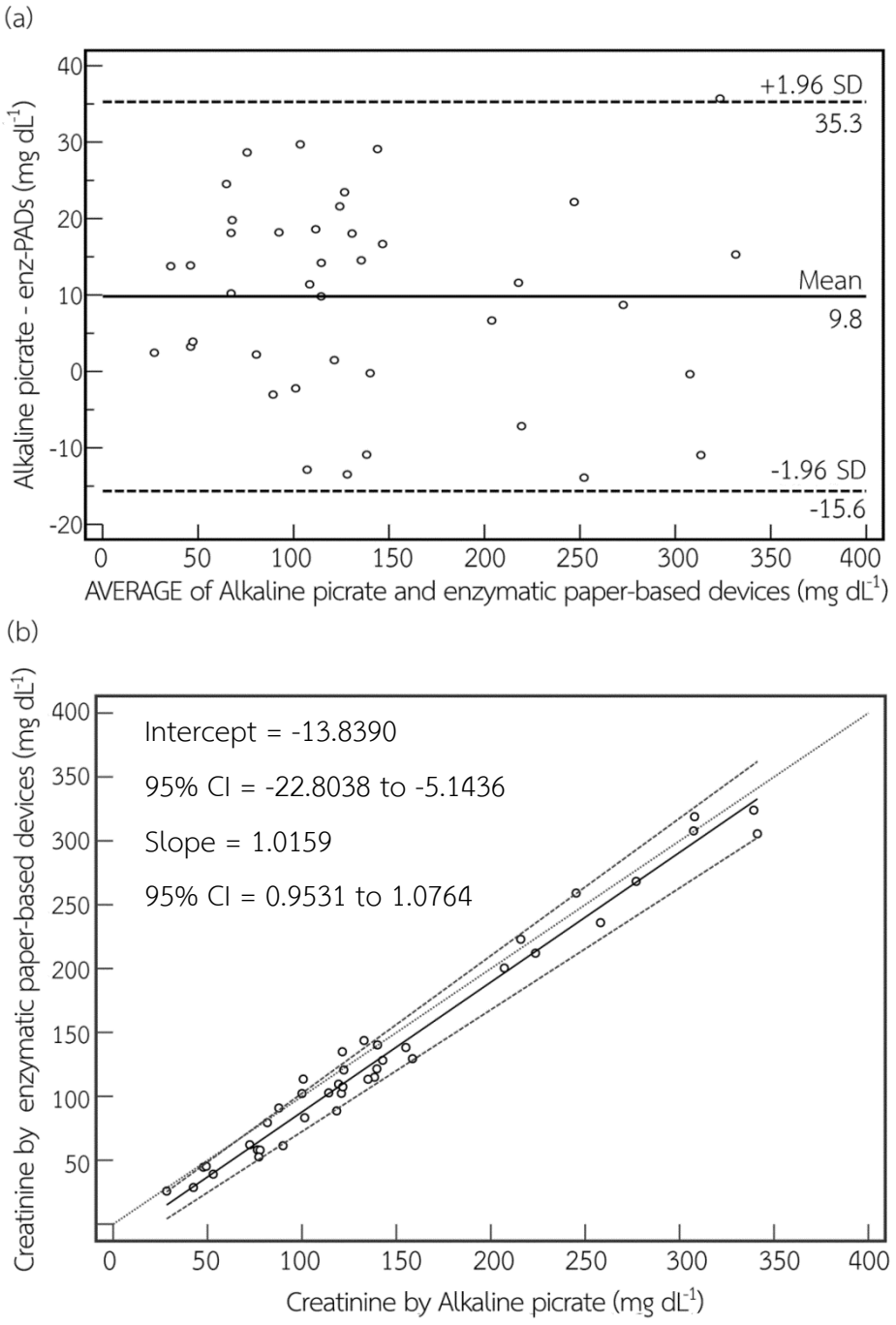
ร้อยละ 97.7 ที่เหลืออีกร้อยละ 2.7 เป็นผลอันเนื่องมาจากตัวแปรอื่น ดังรูปที่ 4.12 และสมการการประมานค่า y = 1.002 (±0.025)x – 10.136 (±4.178) มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานในการประมานค่าความต่างระหว่างค่าที่ได้จากการหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะระหว่าง 2 วิธีได้ สามารถสรุปได้ว่า enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก และเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Paired sample T-test พบว่าการทดสอบทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p= 0.606)



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณครีแอทินินที่ตรวจวัดได้โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) เทียบกับวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก โดยใช้โปรแกรม Sigmaplot r^2 = 0.977, n =40 (y = 1.002 (±0.025)x -10.174 (±4.178))

นอกจากนี้ เมื่อนำผลของการตรวจทั้งสองวิธีมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Bland and Altman test พบว่าวิธีที่นำเสนอโดยใช้ enz-PADs ไม่มี bias ของการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากผลต่างของวิธี enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก ส่วนมากอยู่ในช่วง ±1.96 SD ดังแสดงในรูปที่ 4.13 (a) การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีโดยใช้สถิติ Passing and Bablok regression สำหรับการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน ดังรูปที่ 4.13 (b) ข้างล่าง พบว่าสมการ Passing and Bablok regression คือ y = 1.0159x – 13.8390 (y = Ax +B) ที่ช่วงค่าความเชื่อมั่น 95% ค่าความชัน (slope) ใช้สำหรับทดสอบสมมติฐานว่า A = 1 ซึ่งจะยอมรับสมมติฐานก็ต่อเมื่อช่วงความเชื่อมั่นสำหรับ A มีค่า 1 อยู่ด้วย ผลการทดสอบ พบว่าค่า slope อยู่ในช่วง 0.9531 ถึง 1.0764 ซึ่งมีค่า 1 อยู่ในช่วงดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า สามารถยอมรับว่าค่า slope ของสมการไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่าสถิติแสดงให้เห็นว่าค่าความชัน (1.0159) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ 1 และค่าจุดตัดแกน y ซึ่งใช้ทดสอบสมมติฐานว่า B = 0 ซึ่งจะยอมรับสมมติฐานถ้าช่วงความเชื่อมั่นสำหรับจุดนั้นมีค่าเท่ากับ 0 อยู่ด้วยในผลการทดลอง แต่เนื่องจากค่าจุดตัดแกนอยู่ในช่วง -22.8038 ถึง -5.1436 คือไม่มี 0 อยู่ในช่วงดังกล่าว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่าจุดตัดแกน y (-13.8390) จากสมการข้างต้น มีค่าต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นหมายถึงวิธีที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) มีความต่างในเชิงลบจากวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติกอยู่ที่ค่าคงที่เท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานที่ว่าการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วยวิธีเอนไซม์จะให้ค่าต่ำกว่าผลที่ได้จากวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถถูกรบกวนปฏิกิริยาได้จาก pseudo-chromogen (10)

สถาบันวิทยบริการ
Chulalongkorn University



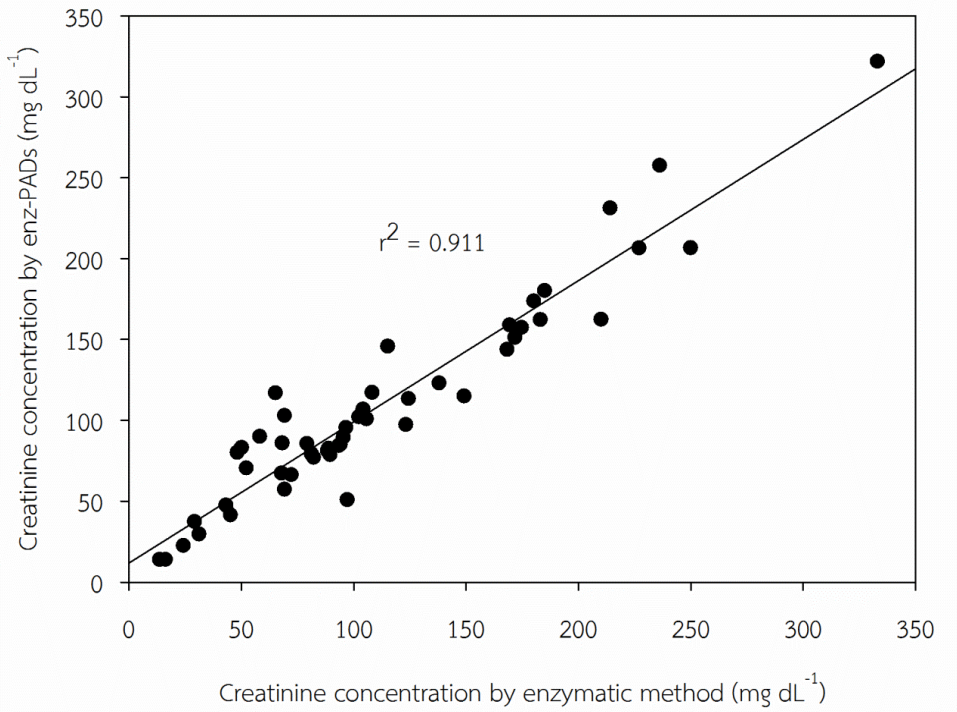
รูปที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินของวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติ (a) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินโดยใช้สถิติ Bland and Altman plot (b) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินโดยใช้สถิติ Passing–bablok regression

5.7 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ

เนื่องจาก enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น อาศัยหลักการเอนไซม์ในการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินิน จึงมีการศึกษาความถูกต้องแม่นยำของ enz-PADs ในการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเปรียบเทียบกับการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยวิธีเอนไซม์ (colorimetric enzymatic method) ในที่นี้ได้นำเอาปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้าหลังจากตื่นนอนทันทีของอาสาสมัครที่สุขภาพดี จำนวน 50 ตัวอย่าง นำส่งบริษัท โปรเฟสชั่นแนล ลาโบราทอรี่ แมเนจเม้นท์ คอร์ป จำกัด หรือ Prolab เพื่อทดสอบหาค่าครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์ (น้ำยา Creatinine plus ver.2 ของบริษัท Roche diagnostic) จากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 50 ตัวอย่างมาทำการตรวจวัดหาปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ที่ได้พัฒนาขึ้น สำหรับผลการตรวจวัดค่าความเข้มของสีที่ได้ที่ต่ำกว่าค่าของ blank จะทำการลดการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะนั้นๆ ลงจนสามารถด้วยวัดได้ด้วย enz-PADs เมื่อเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานที่ทำการสร้างภายในวันเดียวกัน จากนั้นนำผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบกับวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ผลการตรวจวัดแสดงดังตารางที่ ก.5 (ภาคผนวก)

ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์ด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีแอทินินที่ได้จากวิธีเอนไซม์ (แกน x) และวิธีที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) (แกน y) พบว่าสมการ regression analysis relation คือ $y = 0.873\ (\pm 0.0394)\ x + 11.795\ (\pm 5.140)$ ($y = Ax+B$) และได้ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (coefficient of determination) หรือ $r^2 = 0.911$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1 ดังรูปที่ 4.14 ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงความแปรผันที่เกิดขึ้นกับตัวแปรตามในที่นี้ คือวิธีที่พัฒนาขึ้น enz-PADs มีผลเนื่องมาจากตัวแปรต้น ในที่นี้คือวิธีเอนไซม์คิดเป็นร้อยละ 91.1 หมายความว่า อิทธิพลของการตรวจหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะด้วยวิธี enz-PADs ต่อวิธีเอนไซม์คิดเป็นร้อยละ 91.1 ที่เหลืออีกร้อยละ 8.9 เป็นผลอันเนื่องมาจากตัวแปรอื่น และสมการการประมานค่า $y = 0.873\ (\pm 0.0394)\ x + 11.795\ (\pm 5.140)$ มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานในการประมานค่าความต่างระหว่างค่าที่ได้จากการหาปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะระหว่าง 2 วิธีได้ สามารถสรุปได้ว่า enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับวิธีเอนไซม์และเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Paired

sample *t*-test พบว่าค่าเฉลี่ยของการทดสอบทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.858)



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณครีแอทินินที่ตรวจวัดได้โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) เทียบกับวิธีเอนไซม์ โดยใช้โปรแกรม Sigmaplot r^2 = 0.911, n = 50
(y = 0.873 (±0.0394) x + 11.795 (±5.140))

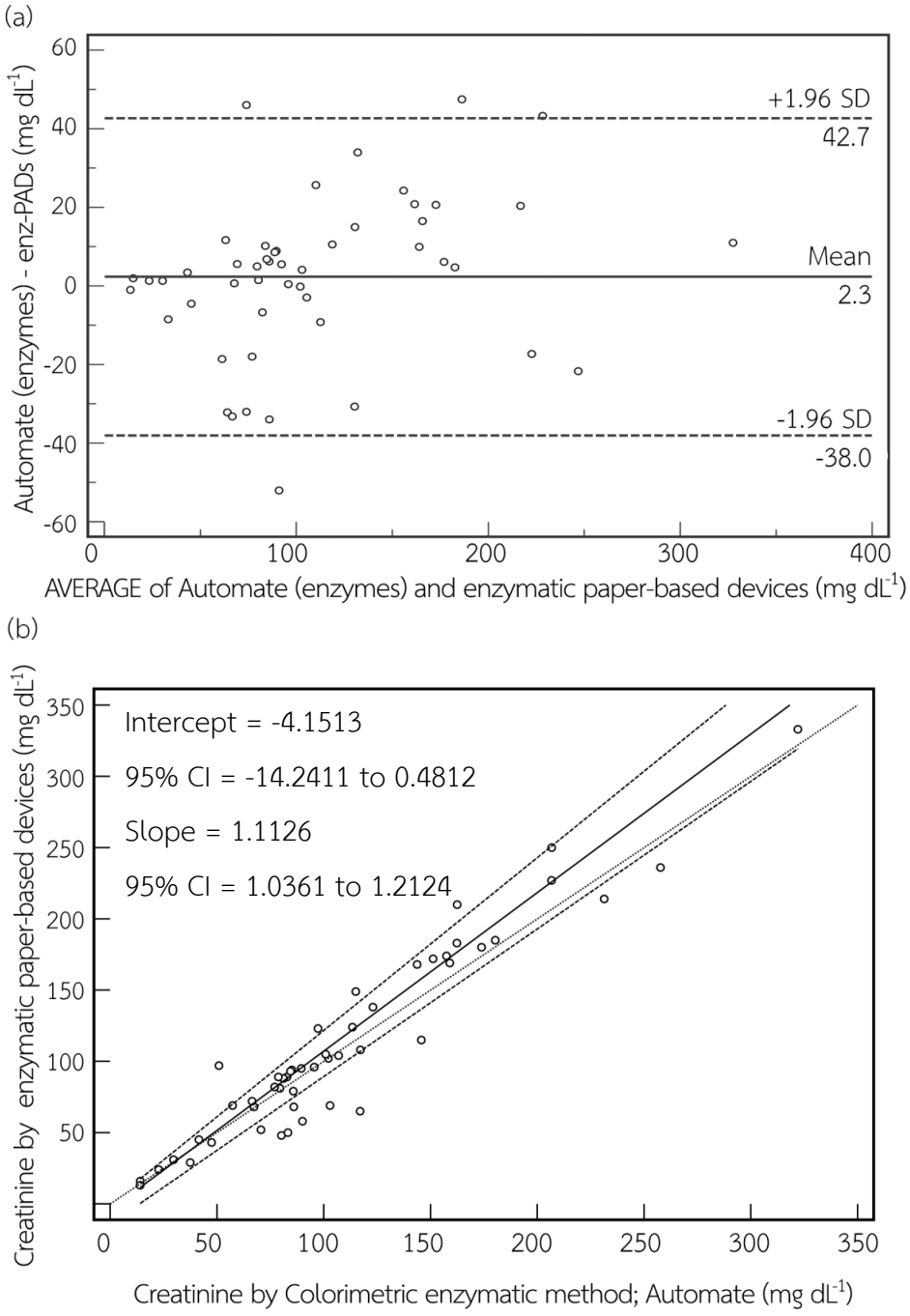
ผลการตรวจหาปริมาณครีแอทินินด้วยหลักการเอนไซม์ทั้งสองวิธี คือ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นและวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Bland and Altman test พบว่าวิธีที่นำเสนอโดยใช้ enz-PADs พบว่า มี bias ของการตรวจวัดเพียง 3 จุดหรือให้ผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้องกัน แต่เนื่องจากเป็นตัวอย่างปัสสาวะที่อยู่ในกลุ่มของค่าครีแอทินินของคนปกติ จึงไม่มีผลกระทบต่อการวินิจฉัยโรค ดังนั้น enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถใช้งานได้จริง เนื่องจากผลต่างของวิธี enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีเอนไซม์ ส่วนมากอยู่ในช่วง ±1.96 SD คือ มีเพียง 3 จุดที่อยู่นอกช่วง ±1.96 SD ดังรูปที่ 4.15 (a) การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีโดยใช้สถิติ Passing and Bablok regression สำหรับการตรวจหาปริมาณครีแอทินิน ดังรูปที่ 4.15 (b) ข้างล่าง พบว่า

สมการ Passing and Bablok regression คือ y = 1.1126x – 4.1513 (y = Ax +B) ที่ช่วงค่าความเชื่อมั่น 95% ค่าความชัน (slope) ใช้สำหรับทดสอบสมมติฐานว่า A = 1 ซึ่งจะยอมรับสมมติฐานก็ต่อเมื่อช่วงความเชื่อมั่นสำหรับ A มีค่า 1 อยู่ด้วย แต่เนื่องจากจากผลการทดสอบ พบว่าค่า slope อยู่ในช่วง 1.0361 ถึง 1.2124 คือไม่มี 1 รวมอยู่ด้วย ดังนั้น slope ของสมการจึงแตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นหมายถึงผลการทดสอบสัดส่วนความแตกต่างระหว่างค่าครีแอทินินที่ได้จากสองวิธีข้างต้นไม่เท่ากับ 1 (proportional systematic errors) เหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากความแม่นยำในการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติและการตรวจวัดบนกระดาษมีความแตกต่างกันมาก กล่าวคือ เครื่องอัตโนมัติ (cobas c501) ที่ใช้ในการเปรียบเทียบค่าครีแอทินินมีเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ (%CV) ต่อน้ำยา creatinine plus ver.2 ภายในวันเดียวกัน (within-day precision) คือ 0.8% และ 1.8% เมื่อทำการทดสอบกับสาร control level 1 (106 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) และ control level 2 (232 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) (ข้อมูลจากเอกสารแนบประกอบน้ำยาของ Creatinine plus ver.2) ในขณะที่ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ (%CV) ภายในวันเดียวกัน (within-day precision) คือ 14.21%, 6.93% และ 5.86% เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะที่มีปริมาณครีแอทินิน 12, 170 และ 330 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ทำให้ค่าการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นได้ค่าการตรวจวัดมีความแม่นยำน้อยกว่าเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ เนื่องจากการตรวจวัดสีบนกระดาษมีข้อจำกัดในเรื่องของความการกระจายตัวของสีบนกระดาษที่เกิดในปฏิกิริยาการตรวจวัด ประสิทธิภาพในการเกิดสีของ chromogen บนกระดาษที่ด้อยกว่าการเกิดปฏิกิริยาในสารละลาย ทำให้ค่าความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวัดบนกระดาษมีความหลายหลายมากกว่าการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสี ทำให้ผลการเปรียบเทียบสัดส่วนความแตกต่างระหว่างค่าครีแอทินินที่ได้จาก enz-PADs ซึ่งใช้วิธีการวัดความเข้มสีบนกระดาษและวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่อาศัยหลักการการดูดกลืนแสงสีความยาวคลื่นที่จำเพาะของสารละลายสีที่เกิดขึ้นไม่เท่ากับ 1 คือเกิด proportional systematic errors หรือ random error ขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการวิธีการวัดความเข้มสีบนกระดาษเป็นวิธีที่ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว ง่ายต่อการทดสอบ ทั้งยังไม่ต้องอาศัยเครื่องมือการตรวจวัดที่ซับซ้อนหรือเครื่องมือราคาแพงมาใช้ในการตรวจวัด การตรวจวัดความเข้มสีที่เกิดจากปฏิกิริยาบนกระดาษจึงเหมาะสมต่อการพัฒนา เพื่อใช้ในการตรวจหาสารบ่งชี้ที่ไม่ต้องการความแม่นยำสูงๆ อย่างการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะ เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตามค่าจุดตัดแกน y ซึ่งใช้ทดสอบสมมติฐานว่า B = 0 ซึ่งจะยอมรับสมมติฐานถ้าช่วงความเชื่อมั่นสำหรับจุดนั้นมีค่าเท่ากับ 0 อยู่ด้วยในผลการทดลอง เนื่องจากค่าจุดตัดแกนอยู่ในช่วง –14.2411 ถึง 0.4812 ซึ่งมี 0 อยู่ในช่วงดังกล่าว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่าจุดตัดแกน y (-4.1513) จากสมการข้างต้น มีค่าไม่ต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่า ผลการวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PADs ให้ผลไม่ต่างจากค่าที่วัดได้ด้วยวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางสถิติ

ดังนั้น วิธีการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินด้วย enz-PAD ที่พัฒนานี้ สามารถใช้ในการตรวจวัดปริมาณตัวอย่างปัสสาวะได้จริง โดยให้ผลการตรวจวัดที่สอดคล้องกับวิธีวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติกที่ใช้ในการตรวจวัดทั่วไปทางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงสามารถใช้ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นแทนการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะแทนวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติกได้ และผลการเปรียบเทียบด้วยวิธีเอนไซม์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ แม้ว่าค่าที่ได้จากการตรวจวัดด้วย enz-PADs ในบางการทดสอบจะให้ค่าที่แตกต่างอยู่มาก (55.26 – 80.08%) แต่ผลการทดสอบเหล่านั้น ไม่ทำให้เกิดการแปลผลผิดพลาดทั้งแบบผลบวกปลอม (false positive) หรือผลลบปลอม (false negative) คือ enz-PADs ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกับการตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทุกการทดสอบ จึงสามารถใช้งานได้จริง เป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจคัดกรองปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเพื่อคัดกรองผู้ป่วยโรคไตได้ และตรวจวัดปริมาณครีแอทินร่วมกับสารบ่งชี้อื่นๆ ในปัสสาวะ ทั้งอุปกรณ์ที่พัฒนาได้ยังมีขนาดเล็ก สามารถพกพาได้ง่าย เหมาะสำหรับใช้งานในภาคสนาม และในพื้นที่ห่างไกลต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.15 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินของวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยวิธีเอนไซม์ (a) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินโดยใช้สถิติ Bland and Altman plot (b) ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินโดยใช้สถิติ Passing–bablok regression

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาวิจัย

สรุปผลการศึกษาวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์ (enzymatic paper-based analytical devices; enz-PADs) ซึ่ง enz-PADs ถูกสร้างขึ้นโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป (Creatinine plus ver.2) ปริมาตรเหลือที่ reagent probe สำหรับดูดน้ำยาไม่สามารถดูดขึ้นมาใช้งานได้ของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดที่อาศัยแรงแคปิลลารี่ (capillary action) ของกระดาษที่สามารถดูดสารละลายให้มีการเคลื่อนที่ไปยังพื้นที่ที่ออกแบบไว้ได้ เพื่อให้น้ำยาที่ถูกดูดซับไว้ต่างบริเวณสามารถเคลื่อนที่มาทำปฏิกิริยากันได้อย่างสมบูรณ์ในพื้นที่ที่กำหนด (detection zone) และใช้เทคนิค wax dipping สร้างขอบเขตเพื่อกั้นสารละลายไม่ให้ออกไปยังนอกพื้นที่การตรวจวัดจากแรงแคปิลลารี่ดังกล่าว ซึ่งสามารถเห็นสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนพื้นที่ตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่า บันทึกผลด้วยเครื่องสแกนและอ่านค่าวัดความเข้มสีที่ได้ด้วยโปรแกรมพื้นฐาน Adobe Photoshop เพื่อนำไปคำนวนหาความเข้มข้นของครีแอทินินในตัวอย่าง (quantitative) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มสีที่วัดได้และความเข้มข้นครีแอทินิน

จากผลการทดลองพบว่า กระดาษกรอง Whatman No.3 มีคุณสมบัติทั้งในเรื่องของอัตราการไหลและความสามารถในการดูดซับสารละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้าง enz-PADs ในขั้นตอนการสร้าง enz-PADs ส่วนของพื้นที่ตรวจวัดอาศัยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ในการเตรียมเยื่อเซลลูโลสและ pH ที่เหมาะสมในการเกิดสีของปฏิกิริยา เพื่อประสิทธิภาพในการเกิดสีที่สม่ำเสมอบนพื้นที่ตรวจวัดและเพื่อการแปลผลที่แม่นยำขึ้น จากนั้นตรึงน้ำยา R1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตรและ R2 ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรแยกพื้นที่กันแบบ physical adsorption สำหรับตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาใช้ในการทดสอบจำเป็นต้องทำการเจือจางด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.5 เพื่อปรับให้ตัวอย่างมี pH ที่พอเหมาะต่อการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ก่อนนำมาทำการตรวจวัดด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยสามารถตรวจหาปริมาณครีแอทินินได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างกลุ่มเอนไซม์และเกิดผลิตภัณฑ์ คือสาร H_2O_2 ที่ทำ

ปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (4-aminophenazone และ HTIB) โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วเกิดเป็นสารประกอบสีเชิงซ้อนสีชมพู (quinone imine chromogen) ที่สามารถตรวจวัดได้จากการวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยาที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างตรวจ ในการตรวจปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะด้วย enz-PADs ทำได้โดยจุ่ม enz-PADs ลงในสารละลายตัวอย่างจที่ถูกใส่ลงในหลุมเล็กๆ ของ 96-wells plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้แรงแคปิลลารีของกระดาษดูดซับสารละลายปัสสาวะเพื่อเคลื่อนที่มาทำปฏิกิริยากับน้ำยาและนำพาน้ำยาที่ถูกดูดซับไว้เคลื่อนที่ไปยังพื้นที่ตรวจวัดแล้วเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ หลังจากนำ enz-PADs ขึ้นจากหลุมตัวอย่างแล้วรอให้การพัฒนาของสีเกิดขึ้นสมบูรณ์เป็นเวลาอีก 7 นาที รวมเวลาที่การตรวจวัดทั้งสิ้น 11 นาที

ผลการศึกษาคุณสมบัติของ enz-PADs ที่พัฒนาได้มีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะ 2.5 - 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (r^2 = 0.983) ค่า limit of detection ของการตรวจวัดคำนวณได้เท่ากับ 1.9 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

การทดสอบสารรบกวนการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะ โดยทำการเติมสารที่สามารถพบได้ในปัสสาวะ และมีการรายงานว่ารบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัดได้ลงในสารมาตรฐานครีแอทินินที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยทำการทดสอบแบบไม่เจือจางตัวอย่างตรวจพบว่ากลูโคสความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร, โปรตีนไข่ขาวความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ฮีโมโกลบินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร วิตามินซีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร บิลิรูบินความเข้มข้น 35 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และกรดยูริกความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญโดยมี %Measurment เท่ากับ 96.0%, 101.5%, 97.2%, 99.7%, 101.5% และ 96.3% ตามลำดับ

ผลการทดสอบความสามารถของ enz-PADs ในการกำจัดสารครีเอทีนที่อาจพบในตัวอย่างปัสสาวะ คือ น้ำยาในพื้นที่ R1 ของ enz-PADs มีประสิทธิภาพในการกำจัดครีเอทีนได้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (%Measurment 101.83%) เมื่อทำการทดสอบกับสารมาตรฐานครีแอทินินในสภาวะไม่เจือจางตัวอย่างตรวจ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบในตัวอย่างปัสสาวะจริงเมื่อทำการ

เจือจางตัวอย่างลง 10 เท่าด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พบว่า สามารถกำจัดครีเอทีนได้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (%Measurment 102.67%)

ผลการทดสอบความแม่นยำของ enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้พบว่า เมื่อทำการทดสอบตรวจวัดครีแอทินินกับสารมาตรฐานครีแอทินินความเข้มข้น 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในสภาวะไม่เจือจางตัวอย่างตรวจ ค่า within-day precision ที่ได้เท่ากับ 8.82% และ 6.86% ตามลำดับ (n = 10) และเมื่อทำการทดสอบค่าความแม่นยำในตัวอย่างปัสสาวะจริงความเข้มข้น 12, 170 และ 330 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ได้เท่ากับ 14.21%, 6.93% และ 5.86% (n=20) ตามลำดับ

ผลการทดสอบค่า between-day precision เท่ากับ 11.57% และ 9.39% สำหรับตรวจวัดครีแอทินินความเข้มข้น 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ (3 วัน, n = 30) และผลการทดสอบค่าความแม่นยำของครีแอทินินในปัสสาวะจริงความเข้มข้น 12, 170 และ 330 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ได้เท่ากับ 16.55%, 6.44% และ 6.14% (10 วัน, n = 30) ตามลำดับ

ผลการทดสอบค่าความคงตัวของ enz-PADs เมื่อทำการตรึงน้ำยาและทำการผนึกถุงระบบสูญญากาศ (vacuum sealer) เก็บไว้ในตู้เย็น 2-4 องศาเซลเซียส ได้นาน 20 วัน พบว่า ประสิทธิภาพในการตรวจวัดความเข้มสีของปฏิกิริยาที่ทำการตรวจวัดกับสารมาตรฐานครีแอทินินลดลง 70.47% และ 75.98% เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานครีแอทินิน 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และ 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองเมื่อทำการทดสอบหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นและวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก จำนวน 40 ตัวอย่าง (n = 40) พบว่าค่าครีแอทินินที่ทำการตรวจวัดด้วยวิธี enz-PADs และวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติกได้ผลใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Paired sample t-test พบว่าการทดสอบทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.6075) ทั้งผลการตรวจวัดทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันดีที่ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ r^2 = 0.977 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman plot และ Passing-bablok regression ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันไม่มี bias เนื่องจากผลต่างของวิธี enz-PADs ในงานวิจัยนี้กับวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติก ส่วนมากอยู่ในช่วง ± 1.96 SD และค่า slope ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ 1 และค่าจุดตัดแกน y มีค่าต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นหมายถึงวิธีที่

พัฒนาขึ้น (enz-PADs) มีความต่างในเชิงลบจากวิธีอัลคาไลน์พิเครทแบบไคเนติกอยู่ที่ค่าคงที่ประมาณ 13.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จึงสามารถสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณครีแอทินินจากปัสสาวะด้วยหลักการทางเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถใช้ตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะจริงได้

นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะด้วย enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยหลักการเอนไซม์โดยน้ำยา Creatinine plus ver.2 เช่นกัน จำนวน 50 ตัวอย่าง (n = 50) พบว่าวิธี enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นมีค่าความเข้มข้นของครีแอทินินได้ผลใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Paired sample t-test พบว่าการทดสอบทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.8578$) ทั้งผลการตรวจวัดทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์สอดคล้องกันดีที่ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ $r^2 = 0.911$ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman plot พบว่าผลต่างของวิธี enz-PADs ในงานวิจัยนี้กับผลการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยหลักการทางเอนไซม์ส่วนมากอยู่ในช่วง ± 1.96 SD โดยผลการทดสอบตัวอย่างปัสสาวะ 3 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้องกัน แต่เนื่องจากเป็นกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มของค่าครีแอทินินของคนปกติ จึงไม่มีผลกระทบต่อการวินิจฉัยโรค ดังนั้น enz-PADs พัฒนาขึ้นจึงสามารถใช้งานได้จริง และผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing-bablok regression ทั้งสองวิธีมี slope ของสมการแตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นหมายถึงผลการทดสอบสัดส่วนความแตกต่างระหว่างค่าครีแอทินินที่ได้จากสองวิธีข้างต้นไม่เท่ากับ 1 (proportional systematic errors) แต่อย่างไรก็ตามค่าจุดตัดแกน y มีค่าไม่ต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นหมายถึงค่าปริมาณครีแอทินินที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้น (enz-PADs) ไม่มีความต่างจากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยหลักการทางเอนไซม์ จึงสามารถสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณครีแอทินินจากปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถใช้ตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในตัวอย่างปัสสาวะจริงได้

ดังนั้นในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะด้วยหลักการเอนไซม์นี้สามารถใช้งานได้จริง ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจวัดที่เร็ว และสามารถตรวจวัดตัวอย่างได้ปริมาณมากในเวลาอันสั้น ยิ่งไปกว่านั้น enz-PADs ที่พัฒนาขึ้นใช้น้ำยาสำหรับการตรวจวัดปริมาณน้อย ทั้งยังใช้น้ำยาที่เหลือจากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติอีกด้วย จึงทำให้ enz-PADs ที่สร้างขึ้นมีราคาที่ถูกมาก และเป็นการตรวจวัดครีแอทินินในปัสสาวะที่ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่ใหม่ และมีผลการทำซ้ำที่ดี ดังนั้นอุปกรณ์ตรวจวัดปริมาณครีแอทินินบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางเลือกใหม่ที่มีราคาถูก สร้างได้ง่าย และเป็นประโยชน์อย่างมากในการคัดกรองโรคในประเทศที่มีรายได้น้อยหรือกำลังพัฒนาต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้หลักการตรวจวัดข้างต้นประยุกต์ใช้ในการสร้าง enz-PADs สำหรับการตรวจวัดสารอื่นๆ ที่ใช้หลักการทางเอนไซม์ได้ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

(1) Chen, C.-H.; Lin, M. S. A novel structural specific creatinine sensing scheme for the determination of the urine creatinine. Biosensors and Bioelectronics. 31 (2012): 90-94.

(2) Gamagedara, S.; Shi, H.; Ma, Y. Quantitative determination of taurine and related biomarkers in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 402 (2012): 763-770.

(3) Hurtado-Sanchez Mdel, C.; Espinosa-Mansilla, A.; Rodriguez-Caceres, M. I.; Martin-Tornero, E.; Duran-Meras, I. Development of a method for the determination of advanced glycation end products precursors by liquid chromatography and its application in human urine samples. Journal of Separation Science. 35 (2012): 2575-2584.

(4) Siangproh, W.; Teshima, N.; Sakai, T.; Katoh, S.; Chailapakul, O. Alternative method for measurement of albumin/creatinine ratio using spectrophotometric sequential injection analysis. Talanta. 79 (2009): 1111-1117.

(5) Xin, G.; Wang, M.; Jiao, L.-l.; Xu, G.-b.; Wang, H.-y. Protein-to-creatinine ratio in spot urine samples as a predictor of quantitation of proteinuria. Clinica Chimica Acta. 350 (2004): 35-39.

(6) Uchida, K.; Gotoh, A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. Clinica Chimica Acta. 323 (2002): 121-128.

(7) McGuinn, L. A.; Ghazarian, A. A.; Joseph Su, L.; Ellison, G. L. Urinary bisphenol A and age at menarche among adolescent girls: Evidence from NHANES 2003–2010. Environmental Research. 136 (2015): 381-386.

(8) Arzideh, F.; Wosniok, W.; Haeckel, R. Reference limits of plasma and serum creatinine concentrations from intra-laboratory data bases of several German and Italian medical centres: Comparison between direct and indirect procedures. Clinica Chimica Acta. 411 (2010): 215-221.

(9) Husdan, H.; Rapoport, A. Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. Clinical Chemistry. 14 (1968): 222-238.

(10) Panteghini, M. Enzymatic assays for creatinine: time for action. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 46 (2008): 567-572.

(11) Pandey, P. C.; Mishra, A. P. Novel potentiometric sensing of creatinine. Sensors and Actuators B: Chemical. 99 (2004): 230-235.

(12) Lad, U.; Khokhar, S.; Kale, G. M. Electrochemical Creatinine Biosensors. Analytical Chemistry. 80 (2008): 7910-7917.

(13) Viraraghavan, S.; Blass, K. G. Effect of glucose upon alkaline picrate: a Jaffe interference. Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. 28 (1990): 95-105.

(14) Pardue, H. L.; Bacon, B. L.; Nevius, M. G.; Skoug, J. W. Kinetic study of the Jaffe reaction for quantifying creatinine in serum: 1. Alkalinity controlled with NaOH. Clinical Chemistry. 33 (1987): 278-285.

(15) Kroll, M. H.; Roach, N. A.; Poe, B.; Elin, R. J. Mechanism of interference with the Jaffe reaction for creatinine. Clinical Chemistry. 33 (1987): 1129-1132.

(16) Weber, J. A.; van Zanten, A. P. Interferences in current methods for measurements of creatinine. Clinical Chemistry. 37 (1991): 695-700.

(17) Dasgupta, A.; Wahed, A. Renal Function Tests. In: Wahed AD, editor. Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. San Diego: Elsevier; 2014. p. 197-212.

(18) Grinstein, M.; Schultheiss, T. M. How to Build a Kidney. In: Moody SA, editor. Principles of Developmental Genetics 2ed. Oxford: Academic Press; 2015. p. 469-485.

(19) Apilux, A.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V.; Tantimongcolwat, T. Paper-based Acetylcholinesterase Inhibition Assay Combining a Wet System for Organophosphate and Carbamate Pesticides Detection. Experimental and Clinical Sciences. (2015): In press.

(20) Noiphung, J.; Talalak, K.; Hongwarittorrn, I.; Pupinyo, N.; Thirabowonkitphithan, P.; Laiwattanapaisal, W. A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups. Biosensors and Bioelectronics. 67 (2015): 485-489.

(21) Rodríguez, J.; Berzas, J. J.; Castañeda, G.; Mora, N.; Rodríguez, M. J. Very fast and direct capillary zone electrophoresis method for the determination of creatinine and creatine in human urine. Analytica Chimica Acta. 521 (2004): 53-59.

(22) Mouton, R.; Holder, K. Laboratory tests of renal function. Anaesthesia & Intensive Care Medicine. 7 (2006): 240-243.

(23) Sykut-Cegielska, J.; Gradowska, W.; Mercimek-Mahmutoglu, S.; Stockler-Ipsiroglu, S. Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes. Acta Biochimica Polonica. 51 (2004): 875-882.

(24) Serafín, V.; Hernández, P.; Agüí, L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode. Electrochimica Acta. 97 (2013): 175-183.

(25) Randviir, E. P.; Banks, C. E. Analytical methods for quantifying creatinine within biological media. Sensors and Actuators B: Chemical. 183 (2013): 239-252.

(26) Mohabbati-Kalejahi, E.; Azimirad, V.; Bahrami, M.; Ganbari, A. A review on creatinine measurement techniques. Talanta. 97 (2012): 1-8.

(27) Boeniger, M. F.; Lowry, L. K.; Rosenberg, J. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. American Industrial Hygiene Association Journal. 54 (1993): 615-627.

(28) Xue, F.; Wu, J.; Chu, H.; Mei, Z.; Ye, Y.; Liu, J., et al. Electrochemical aptasensor for the determination of bisphenol A in drinking water. Microchimica Acta. 180 (2013): 109-115.

(29) Simpson D, J. D., Moore FM. Measurement of creatinine in urine screening for drugs of abuse. Clinical Chemistry. 39 (1993): 698-706.

(30) Jaffe, M. Ueber den Niederschlag welchen Pikrinsa¨ure in normalen Harn erzeugt und u¨ber eine neue reaction des Kreatinins. Zeitschrift für physiologische Chemie. 10 (1886): 391-400.

(31) Boutten, A.; Bargnoux, A. S.; Carlier, M. C.; Delanaye, P.; Rozet, E.; Delatour, V., et al. Enzymatic but not compensated Jaffe methods reach the desirable

specifications of NKDEP at normal levels of creatinine. Results of the French multicentric evaluation. Clinica Chimica Acta. 419 (2013): 132-135.

(32) Cobbaert, C. M.; Baadenhuijsen, H.; Weykamp, C. W. Prime time for enzymatic creatinine methods in pediatrics. Clinical Chemistry. 55 (2009): 549-558.

(33) Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. Physiological Reviews. 80 (2000): 1107-1213.

(34) Greenberg, N.; Roberts, W. L.; Bachmann, L. M.; Wright, E. C.; Dalton, R. N.; Zakowski, J. J., et al. Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. Clinical Chemistry. 58 (2012): 391-401.

(35) Jung, K. Creatinine, Urea, and Uric acid. In: Carl A. Burtis ERA, and David E. Bruns, editor. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6 ed. St Louis, Missouri: Saunders/Elsevier; 2008. p. 363-366.

(36) Burtis, C. A.; Ashwood, E. R.; Bruns, D. E. Tietz fundamentals of Clinical Chemistry. 5 ed. St Louis, Missouri: Saunders/Elsevier; 2001.

(37) Koyama, M. C. O. K. C.; Akashi, T. C. O. K. C., inventors; Konica Corporation, assignee. Multi-layer analytical element for creatinine analysis patent EP0281000 A2. 1988.

(38) Welch, M. J.; Cohen, A.; Hertz, H. S.; Ng, K. J.; Schaffer, R.; Van der Lijn, P., et al. Determination of serum creatinine by isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method. Analytical chemistry. 58 (1986): 1681-1685.

(39) Tsikas, D.; Wolf, A.; Frölich, J. C. Simplified HPLC Method for Urinary and Circulating Creatinine. Clinical Chemistry. 50 (2004): 201-203.

(40) de Araújo, W. R.; Salles, M. O.; Paixão, T. R. L. C. Development of an enzymeless electroanalytical method for the indirect detection of creatinine in urine samples. Sensors and Actuators B: Chemical. 173 (2012): 847-851.

(41) Haufroid, V.; Lison, D. Urinary cotinine as a tobacco-smoke exposure index: a minireview. International Archives of Occupational and Environmental Health. 71 (1998): 162-169.

(42) Randviir, E. P.; Kampouris, D. K.; Banks, C. E. An improved electrochemical creatinine detection method via a Jaffe-based procedure. Analyst. 138 (2013): 6565-6572.

(43) Benkert, A.; Scheller, F.; Schossler, W.; Hentschel, C.; Micheel, B.; Behrsing, O., et al. Development of a creatinine ELISA and an amperometric antibody-based creatine sensor with a detection limit in the nanomolar range. Analytical Chemistry. 72 (2000): 916-921.

(44) Fung, K. K.; Chan, C. P.; Renneberg, R. Development of a creatinine enzyme-based bar-code-style lateral-flow assay. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 393 (2009): 1281-1287.

(45) Pugia, M. J.; Lott, J. A.; Wallace, J. F.; Cast, T. K.; Bierbaum, L. D. Assay of creatinine using the peroxidase activity of copper-creatinine complexes. Clinical Biochemistry. 33 (2000): 63-70.

(46) Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. Angewandte Chemie International Edition. 46 (2007): 1318-1320.

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

(48) Bruzewicz, D. A.; Reches, M.; Whitesides, G. M. Low-cost printing of poly (dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. Analytical Chemistry. 80 (2008): 3387-3392.

(49) Fenton, E. M.; Mascarenas, M. R.; López, G. P.; Sibbett, S. S. Multiplex Lateral-Flow Test Strips Fabricated by Two-Dimensional Shaping. ACS Applied Materials & Interfaces. 1 (2008): 124-129.

(50) Abe, K.; Suzuki, K.; Citterio, D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. Analytical chemistry. 80 (2008): 6928-6934.

(51) Lu, Y.; Shi, W.; Qin, J.; Lin, B. Fabrication and Characterization of Paper-Based Microfluidics Prepared in Nitrocellulose Membrane By Wax Printing. Analytical Chemistry. 82 (2009): 329-335.

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

(53) Songjaroen, T.; Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Laiwattanapaisal, W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. Talanta. 85 (2011): 2587-2593.

(54) Songjaroen, T.; Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Henry, C. S.; Laiwattanapaisal, W. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. Lab on a Chip. 12 (2012): 3392-3398.

(55) Chen, X.; Chen, J.; Wang, F.; Xiang, X.; Luo, M.; Ji, X., et al. Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices. Biosensors and Bioelectronics. 35 (2012): 363-368.

(56) Noiphung, J.; Songjaroen, T.; Dungchai, W.; Henry, C. S.; Chailapakul, O.; Laiwattanapaisal, W. Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices. Analytica Chimica Acta. 788 (2013): 39-45.

(57) Ruecha, N.; Rangkupan, R.; Rodthongkum, N.; Chailapakul, O. Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/polyvinylpyrrolidone/polyaniline nanocomposite. Biosensors and Bioelectronics. 52 (2014): 13-19.

(58) Wang, S.; Ge, L.; Song, X.; Yu, J.; Ge, S.; Huang, J., et al. Paper-based chemiluminescence ELISA: lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing. Biosensors and Bioelectronics. 31 (2012): 212-218.

(59) Cate, D. M.; Dungchai, W.; Cunningham, J. C.; Volckens, J.; Henry, C. S. Simple, distance-based measurement for paper analytical devices. Lab on a Chip. 13 (2013): 2397-2404.

(60) Khan, M. S.; Thouas, G.; Shen, W.; Whyte, G.; Garnier, G. Paper Diagnostic for Instantaneous Blood Typing. Analytical Chemistry. 82 (2010): 4158-4164.

(61) Ballerini, D. R.; Li, X.; Shen, W. An inexpensive thread-based system for simple and rapid blood grouping. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 399 (2011): 1869-1875.

(62) Bao, Y.; Ma, J.; Sun, Y. Swelling behaviors of organic/inorganic composites based on various cellulose derivatives and inorganic particles. Carbohydrate Polymers. 88 (2012): 589-595.

(63) Yatzidis, H.; Garidi, M.; Vassilikos, C.; Mayopoulou, D.; Akilas, A. An improved method for the simple and accurate colorimetric determination of urea with Ehrlich's reagent. Journal of Clinical Pathology. 17 (1964): 163-164.

(64) Hirao, Y., inventor; Denka Seiken Co., Ltd., assignee. Method of reducing measurement error caused by catalase inhibition by azide patent EP2199404 B1. 2013.

(65) Schomberg, D., Salzmann, M., and Stephan, D. EC 1.11.1.7. Enzyme Handbook 7. Berlin, Heidelberg: Springer 1993. p. 1-6.

(66) Chen, J. C.; Kumar, A. S.; Chung, H. H.; Chien, S. H.; Kuo, M. C.; Zen, J. M. An enzymeless electrochemical sensor for the selective determination of creatinine in human urine. Sensors and Actuators B: Chemical. 115 (2006): 473-480.

(67) Ohira, S. I.; Kirk, A. B.; Dasgupta, P. K. Automated measurement of urinary creatinine by multichannel kinetic spectrophotometry. Analytical Biochemistry. 384 (2009): 238-244.

(68) Songjaroen, T.; Maturos, T.; Sappat, A.; Tuantranont, A.; Laiwattanapaisal, W. Portable microfluidic system for determination of urinary creatinine. Analytica Chimica Acta. 647 (2009): 78-83.

(69) Li, M.; Du, Y.; Zhao, F.; Zeng, J.; Mohan, C.; Shih, W.-C. Reagent- and separation-free measurements of urine creatinine concentration using stamping surface enhanced Raman scattering (S-SERS). Biomedical Optics Express. 6 (2015): 849-858.

(70) Ponhong, K.; Teshima, N.; Grudpan, K.; Vichapong, J.; Motomizu, S.; Sakai, T. Successive determination of urinary bilirubin and creatinine employing simultaneous injection effective mixing flow analysis. Talanta. 133 (2015): 71-76.

(71) Witte, D. L.; Brown, L. F.; Feld, R. D. Effects of bilirubin on detection of hydrogen peroxide by use of peroxidase. Clinical Chemistry. 24 (1978): 1778-1782.

(72) Li, D.; Zhang, X.; Loni, Y.; Sunz, X. Inactivation of hemoglobin by hydrogen peroxide and protection by a reductant substrate. Life Science Journal.

(73) Deutsch, J. C. Ascorbic Acid Oxidation by Hydrogen Peroxide. Analytical Biochemistry. 255 (1998): 1-7.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. ขั้นตอนการเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับใช้ในการทดลอง

2.1 การเตรียม 100 mM potassium phosphate buffer

Solution A คือ KH_2PO_4 0.5 M (68.04 g L^{-1})
Solution B คือ K_2HPO_4 0.5 M (87.06 g L^{-1})

ในงานวิจัยนี้ใช้ 100 nM potassium phosphate buffer ในการทดสอบหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ โดยทำการเตรียมดังตาราง ก.1 โดยใช้สัดส่วนระหว่างสาร A, B และเติมน้ำกลั่นตามตารางจะทำให้ได้ pH ที่ต้องการโดยไม่ต้องปรับ pH ทั้งนี้เมื่อทำการเตรียมแล้วเสร็จ จะทำการวัด pH เพื่อยืนยันค่า pH ที่ได้ต่อไป

ตารางที่ ก. 1 เตรียม phosphate buffer

pH	Solution A (mL)	Solution B (mL)	Distilled water (mL)
6.5	17.54	2.46	80
7	13.7	6.3	80
7.5	7.8	12.2	80
7.8	3.2	16.8	80

2.2 การเตรียม 100 mM Tris-HCl buffer

Solution A คือ Tris 0.2 M (23.23 g L^{-1})
Solution B คือ HCl 1 M

ในงานวิจัยนี้ใช้ 100 nM Tris-HCl buffer ในการทดสอบหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ โดยทำการเตรียมดังตาราง ก.2 โดยใช้สัดส่วนระหว่างสาร A, B และเติมน้ำกลั่นตามตาราง ทั้งนี้เมื่อทำการเตรียมแล้วเสร็จ จะทำการวัด pH เพื่อยืนยันค่า pH ที่ได้ต่อไป หาก pH ไม่เป็นไปตามต้องการ ทำการปรับ pH ด้วย Solution A หรือ B ต่อไป

ตารางที่ ก. 2 การเตรียม Tris-HCl buffer

pH	Solution A (mL)	Solution B (mL)	Distilled water (mL)
7.8	50	3.25	46.75
8	50	2.68	47.32
8.5	50	1.65	48.35
9	50	0.5	49.50

2. ขั้นตอนการเตรียมสารในการหาปริมาณการทำงานของเอนไซม์รวมของ creatinase ในน้ำยา R1

2.1 การเตรียม 50 mM phosphate buffer, pH 7.5

Solution A คือ KH_2PO_4 0.5 M (68.04 g L^{-1})
Solution B คือ K_2HPO_4 0.5 M (87.06 g L^{-1})

ในเตรียม 0.1M creatine solution ใช้ 50 mM phosphate buffer, pH 7.5 ในการละลาย creatine anhydrous ทำการเตรียม 50mM phosphate buffer, pH 7.5 ปริมาตร 200 mL โดยใช้สาร A ปริมาตร 3.3 mL, สาร B ปริมาตร 16.7 mL และเติมน้ำกลั่น 180.0 mL ทั้งนี้เมื่อทำการเตรียมแล้วเสร็จ จะทำการวัด pH เพื่อยืนยันค่า pH ที่ได้ หาก pH ไม่เป็นไปตามต้องการ ทำการปรับ pH ด้วย Solution A หรือ B ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 การเตรียม 0.1 M creatine solution (substrate solution)

เติม 50 mM phosphate buffer, pH 7.5 ปริมาตร 763 µL ลงใน creatine anhydrous 10 mg เพื่อให้ได้ 0.1 M creatinine solution โดยทำการเตรียมใหม่สำหรับการทดสอบในวันนั้นๆ

2.3 การเตรียม DAB solution

ชั่งสาร *p* – dimethylaminobenzaldehyde (DAB) 2.0 g ละลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) 100 mL จากนั้นเติม 37% Hydrochloric acid (HCl) ปริมาตร 15 mL

ตารางที่ ก. 3 ผลการทดสอบค่าความคงตัว (stability) ของ enz-PAD

วันที่	**%Stability**	
Creatinine	**5**	**20**
(mg dL^{-1})	**(Mean ± SD**)**	**(Mean ± SD**)**
0	100.00 ± 0.76	100.00 ± 0.64
1	99.78 ± 0.37	94.80 ± 1.10
2	97.80 ± 1.14	95.02 ± 1.43
3	96.81 ± 0.22	94.44 ± 1.01
4	89.06 ± 0.44	93.57 ± 1.77
5	88.89 ± 0.35	91.34 ± 0.90
6	86.25 ± 0.41	87.58 ± 1.43
7	85.10 ± 0.53	85.49 ± 0.24
8	86.20 ± 2.24	87.03 ± 1.84
9	84.27 ± 3.21	85.35 ± 1.91
10	78.33 ± 1.11	81.86 ± 2.08
11	76.89 ± 1.71	79.04 ± 0.80
12	76.73 ± 0.98	77.06 ± 0.67
13	76.73 ± 1.17	73.99 ± 1.63
14	76.89 ± 0.47	73.87 ± 2.91
15	75.92 ± 0.46	68.95 ± 2.74
16	75.60 ± 0.72	64.02 ± 2.30
17	75.60 ± 3.59	76.40 ± 1.56
18	74.80 ± 0.44	70.69 ± 1.52
19	72.55 ± 0.40	71.05 ± 1.11
20	70.47 ± 0.44	75.98 ± 0.95

หมายเหตุ (**) หมายถึง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ก. 4 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างวิธี Kinetic alkaline picrate method และ Enzymatic paper-based device

Samples (n = 40)	Kinetic alkaline picrate method (mg dL^{-1} ± SD[a])	Enzymatic paper-based device (mg dL^{-1} ± SD[b])	% Difference
Sample 1	87.79 ± 8.61	90.82 ± 0.88	3.45
Sample 2	341.22 ± 24.83	305.50 ± 7.21	-10.47
Sample 3	76.34 ± 0.00	58.22 ± 5.53	-23.74
Sample 4	142.75 ± 11.88	128.21 ± 10.63	-10.19
Sample 5	81.68 ± 5.40	79.47 ± 6.68	-2.71
Sample 6	140.00 ± 2.18	140.22 ± 12.43	0.15
Sample 7	120.93 ± 6.58	102.33 ± 7.51	-15.38
Sample 8	138.46 ± 6.53	115.00 ± 9.99	-16.94
Sample 9	100.00 ± 8.08	102.21 ± 6.18	2.21
Sample 10	90.00 ± 0.00	61.35 ± 3.99	-31.83
Sample 11	139.68 ± 13.47	121.63 ± 11.41	-12.93
Sample 12	77.78 ± 4.49	57.98 ± 3.25	-25.46
Sample 13	215.87 ± 20.20	223.02 ± 6.43	3.31
Sample 14	307.94 ± 24.69	318.87 ± 7.74	3.55
Sample 15	72.39 ± 1.06	62.18 ± 3.94	-14.10
Sample 16	119.40 ± 0.00	109.57 ± 6.50	-8.23
Sample 17	47.76 ± 2.11	44.51 ± 3.58	-6.80
Sample 18	114.18 ± 5.28	102.77 ± 1.11	-9.99
Sample 19	122.14 ± 1.01	120.65 ± 2.74	-1.22
Sample 20	52.99 ± 1.06	39.12 ± 2.86	-26.18
Sample 21	77.16 ± 4.45	52.62 ± 5.14	-31.80
Sample 22	155.00 ± 1.01	138.32 ± 2.32	-10.76

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ก.4 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างวิธี Kinetic alkaline picrate method และ Enzymatic paper-based device (ต่อ)

Samples (n = 40)	Kinetic alkaline picrate method (mg dL^{-1} ± SD[a])	Enzymatic paper-based device (mg dL^{-1} ± SD[b])	% Difference
Sample 23	28.36 ± 2.11	25.90 ± 2.58	-8.67
Sample 24	42.54 ± 3.17	28.76 ± 1.57	-32.39
Sample 25	101.47 ± 2.08	83.28 ± 4.54	-17.93
Sample 26	207.14 ± 0.00	200.47 ± 4.94	-3.22
Sample 27	49.26 ± 1.04	45.36 ± 5.23	-7.92
Sample 28	121.64 ± 5.28	107.43 ± 10.70	-11.68
Sample 29	100.71 ± 1.01	113.57 ± 2.98	12.76
Sample 30	118.38 ± 3.12	88.66 ± 2.49	-25.11
Sample 31	339.29 ± 5.05	323.98 ± 10.35	-4.51
Sample 32	158.57 ± 4.04	129.47 ± 13.32	-18.35
Sample 33	132.86 ± 2.02	143.74 ± 9.16	8.19
Sample 34	135.00 ± 5.05	113.41 ± 9.90	-15.99
Sample 35	121.43 ± 4.04	134.90 ± 7.61	11.09
Sample 36	223.65 ± 0.96	212.04 ± 8.61	-5.19
Sample 37	258.11 ± 1.91	235.93 ± 8.13	-8.59
Sample 38	277.03 ± 17.20	268.32 ± 6.66	-3.14
Sample 39	307.43 ± 18.16	307.79 ± 7.01	0.12
Sample 40	245.27 ± 12.42	259.16 ± 17.00	5.66
Mean	**144.74**	**134.92**	**-6.78**

หมายเหตุ (*) หมายถึง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

(**) หมายถึง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ก. 5 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างวิธี Colorimetric enzymatic method (automatic analyser) และ Enzymatic paper-based device

Samples (n = 50)	Colorimetric enzymatic method (mg dL^{-1}) (automatic analyser)	Enzymatic paper-based device (mg dL^{-1} ± SD[a])	% Difference
Sample 1	67.73	67.34 ± 0.77	-0.58
Sample 2	249.83	206.74 ± 5.53	-17.25
Sample 3	43.01	47.53 ± 3.54	10.51
Sample 4	169.15	159.06 ± 9.81	-5.97
Sample 5	95.17	± 89.504.41	-5.95
Sample 6	93.84	85.11 ± 8.12	-9.31
Sample 7	72.09	66.43 ± 4.81	-7.85
Sample 8	23.98	± 22.701.11	-5.32
Sample 9	16.14	± 14.070.92	-12.82
Sample 10	124.19	± 113.4710.34	-8.63
Sample 11	96.37	95.55 ± 1.93	-0.85
Sample 12	137.8	123.02 ± 2.48	-10.73
Sample 13	184.89	± 180.3010.55	-2.48
Sample 14	88.62	82.78 ± 2.83	-6.60
Sample 15	174.47	± 157.525.95	-9.71
Sample 16	171.6	± 151.213.95	-11.88
Sample 17	93.18	84.45 ± 6.73	-9.37
Sample 18	102.1	± 102.193.44	0.09
Sample 19	88.16	81.20 ± 8.06	-7.90

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ก.5 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างวิธี Colorimetric enzymatic method (automatic analyser) และ Enzymatic paper-based device (ต่อ)

Samples (n = 50)	Colorimetric enzymatic method (mg dL^{-1}) (automatic analyser)	Enzymatic paper-based device (mg dL^{-1} ± sd[a])	% Difference
Sample 20	78.98	± 85.729.09	8.53
Sample 21	89.33	± 78.813.31	-11.78
Sample 22	105.49	100.88 ± 7.91	-4.37
Sample 23	13.45	± 14.021.32	4.26
Sample 24	182.94	162.37 ± 2.20	-11.25
Sample 25	226.84	206.64 ± 8.32	-8.91
Sample 26	65	117.05 ± 4.01	80.08
Sample 27	214	231.32 ± 15.76	8.09
Sample 28	52	70.60 ±7.06	35.77
Sample 29	115	145.71 ±7.80	26.71
Sample 30	123	97.32 ±3.17	-20.88
Sample 31	31	29.69± 2.96	-4.22
Sample 32	149	115.01 ± 6.55	-22.81
Sample 33	29	37.49 ± 3.16	29.26
Sample 34	97	50.97 ± 4.18	-47.45
Sample 35	168	143.74 ± 11.19	-14.44
Sample 36	210	162.52 ± 6.43	-22.61
Sample 37	81	79.51 ± 7.50	-1.84
Sample 38	180	173.88± 5.07	-3.40

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ก.5 ผลการตรวจวัดปริมาณครีแอทินินในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างวิธี Colorimetric enzymatic method (automatic analyser) และ Enzymatic paper-based device (ต่อ)

Samples (n = 50)	Colorimetric enzymatic method (mg dL^{-1}) (automatic analyser)	Enzymatic paper-based device (mg dL^{-1} ± sd[a])	% Difference
Sample 39	82	77.05 ± 4.25	-6.03
Sample 40	108	117.20 ± 9.91	8.51
Sample 41	236	257.71± 5.85	9.20
Sample 42	69	102.96 ±4.51	49.22
Sample 43	48	80.16 ± 6.63	67.00
Sample 44	333	322.01 ± 9.85	-3.30
Sample 45	50	83.21 ± 7.80	66.42
Sample 46	58	90.05 ± 8.87	55.26
Sample 47	104	106.95 ± 4.47	2.84
Sample 48	69	57.32 ± 5.52	-16.93
Sample 49	68	86.00 ± 2.70	26.47
Sample 50	45	41.59 ± 1.20	-7.58
Mean	**111.47**	**109.11**	**-2.12**

หมายเหตุ (**) หมายถึง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวขวัญฤทัย ตาละลักษณ์ เกิดเมื่อวันที่ 29 มีนาคม 2532 ที่จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 ซึ่งในขณะที่ศึกษานั้นได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนจากคณะสหเวชศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัย:

(1) Songjaroen, T.; Noiphung, J.; Hongwarittorrn, I.; Talalak, K.; Laiwattanapaisal, W. Assay time reduction and thermal stability improvement of a low-cost, wax-dipping paper-based microfluidic device. Journal of Chemical & Pharmaceutical Research. 6 (2014).

(2) Noiphung, J.; Talalak, K.; Hongwarittorrn, I.; Pupinyo, N.; Thirabowonkitphithan, P.; Laiwattanapaisal, W. A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups. Biosensors and Bioelectronics. 67 (2015): 485-489.

(3) Talalak, K.; Noiphung, J.; Songjaroen, T.; Chailapakul, O.; Laiwattanapaisal, W. A facile low-cost enzymatic paper-based assay for the determination of urine creatinine. Talanta. 144 (2015) 915–921.