

อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณอัลบูมิน ครีอะตินิน  
และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน

MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE FOR  
SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ALBUMIN, CREATININE  
AND URIC ACID IN URINE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2566

KMITL-2023-SC-M-012-063

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE FOR  
SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ALBUMIN, CREATININE  
AND URIC ACID IN URINE



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE  
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN APPLIED CHEMISTRY  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY SCHOOL OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2023

KMITL-2023-SC-M-012-063

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2023

SCHOOL OF SCIENCE

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณอัลบูมิน ครีอะตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรรณกานต์ วิสัยชนม์
รหัสประจำตัว	62605055
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมีประยุกต์)
ภาควิชา	เคมี
พ.ศ.	2566
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ เจริญชัย

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน หลักการตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาเคมี ดังนี้: (1) อัลบูมินกับเตตระโบรโมฟีนอลฟทาไลน์เอธิลเอสเทอร์ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 3.2) (2) ครีอะตินินกับกรดพิคริกในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1.0 M) และ (3) กรดยูริกกับเพอริกไซยาไนด์และเพอริกคลอไรด์ โดยออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษเป็น 2 ชั้น ประกอบด้วย 1. ชั้นหยดและกรองตัวอย่างปัสสาวะ และ 2. ชั้นตรวจวัด สำหรับหยดสารเคมี, สารละลายมาตรฐาน และถ่ายรูปลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ ขั้นตอนการเตรียมอุปกรณ์จะใช้วิธีการประทับตราด้วยหมึกกันน้ำลงบนกระดาษกรอง เพื่อสร้างสวดลายส่วนที่ไม่ชอบน้ำ การตรวจวัดทำได้โดยถ่ายรูปลักษณ์ผลิตภัณฑ์ด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และประมวลผลค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J™ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยอาศัยหลักการเติมสารมาตรฐาน มีความเป็นเส้นตรงที่ดีในช่วง 5 – 100 mg L<sup>-1</sup>, 100 – 1000 mg L<sup>-1</sup> และ 5 – 25 mg dL<sup>-1</sup> สำหรับอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก ตามลำดับ (R<sup>2</sup> > 0.98) มีความเที่ยงสูง (RSD < 4.6 %) มีค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 90.3 - 109.9 เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะ พร้อมเปรียบเทียบผลวิเคราะห์กับวิธีมาตรฐาน (Immunoassay สำหรับอัลบูมิน และ HPLC สำหรับครีอะตินินและกรดยูริก) พบว่า ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paired t-test ( $t_{\text{stat}} = 0.09$ ,  $t_{\text{cri}} = 3.18$  สำหรับอัลบูมิน,  $t_{\text{stat}} = 1.60$ ,  $t_{\text{cri}} = 3.18$  สำหรับครีอะตินิน และ  $t_{\text{stat}} = 2.90$ ,  $t_{\text{cri}} = 3.18$  สำหรับกรดยูริก)

**คำสำคัญ :** กรดยูริก, ครีอะตินิน, ปัสสาวะ, อัลบูมิน, อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis Title</b>	Microfluidic paper-based analytical device for simultaneous determination of albumin, creatinine and uric acid in urine
<b>Student Name</b>	Wannakan Wisaichon
<b>Student ID</b>	62605055
<b>Degree</b>	Master of Science (Applied Chemistry)
<b>Department</b>	Chemistry
<b>Year</b>	2023
<b>Thesis Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Nathawut Choengchan

### Abstract

In this work, a microfluidic paper-based device was developed for the simultaneous determination of albumin, creatinine and uric acid in urine. The detection principles based on the following chemical reactions: (1) albumin and tetrabromophenolphthalein ethyl ester in acetate buffer (pH 3.2), (2) creatinine and picric acid in 1.0 M sodium hydroxide, and (3) uric acid with ferric cyanide and ferric chloride. The PAD consists of 1. Auxilliary layer for dropping and filtering urine samples and 2. Detection layer for dropping of reagents and standards and for detection. The hydrophobic barrier was fabricated by stamping with the water-proof ink onto a filter paper. The colored products were developed on the paper device and were then captured by a smartphone. The color intensities were evaluated by ImageJ™. Under optimal conditions, the standard addition plots were observed in the concentration ranges of 5-100 mg L<sup>-1</sup> albumin, 100-1000 mg L<sup>-1</sup> creatinine and 5-50 mg dL<sup>-1</sup> uric acid with good linearity ( $R^2 > 0.98$ ). High precision (RSD < 4.62 %) with good recovery (90.3 – 109.9 %) were achieved. The developed method was applied to urine. They were validated against immunoassay (albumin) and HPLC (creatinine and uric acid). The results were not significantly difference at 95 % confidence by Paired  $t$ -test ( $t_{\text{stat}} = 0.09$ ,  $t_{\text{cri}} = 3.18$  for albumin,  $t_{\text{stat}} = 1.60$ ,  $t_{\text{cri}} = 3.18$  for creatinine and  $t_{\text{stat}} = 2.90$ ,  $t_{\text{cri}} = 3.18$  for uric acid)

**Keywords :** Uric acid, Creatinine, Urine, Albumin, Paper-based device.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน จัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิทยานิพนธ์นี้ สามารถดำเนินการสำเร็จล่วงไปได้ด้วยดีตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง ตลอดจนการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน จึงขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา อุไรสินธุ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวภาคย์ อีราทรง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาแนะนำ และตรวจสอบเพื่อแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความถูกต้อง และสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชุตินา มัยยัสส์สุข เพชรกระจ่าง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะด้วยวิธี HPLC

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบทุน Research Assistant/Teaching Assistant (RA/TA-2562-M-040) สนับสนุนการศึกษาตลอดระยะเวลาของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์

ขอขอบพระคุณ หน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ตลอดการดำเนินการของวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ คุณสุภาวี วงศ์ประดิษฐ์ คุณพีรวิชญ์ โพธิ์โชติ และคุณสุรเชษฐ์ ทองจันทร์ ที่ศึกษาในเบื้องต้น และต่อยอดผลวิจัยให้ครบถ้วนโดยสมบูรณ์ รวมถึงขอขอบพระคุณ นักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอก ในหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ทุกท่าน ที่ได้คำปรึกษา แนะนำแนวทางต่าง ๆ และให้การสนับสนุนจนสามารถดำเนินงานจนสำเร็จล่วง

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่เป็นกำลังใจสำคัญ เป็นแรงผลักดัน และเป็นผู้ให้การสนับสนุนการศึกษามาจนถึงวันนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดท้ายนี้ ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์นี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใดต้องขออภัยมา ณ ที่นี้

นางสาววรรณกานต์ วิสัยขันธ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ฅ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 โรคไตและการวินิจฉัยโรคไต.....	4
2.1.1 โรคไต.....	4
2.1.2 การวินิจฉัยโรคไต.....	5
2.2 ข้อมูลเกี่ยวกับอัลบูมิน ครีเอตินิน และกรดยูริก.....	5
2.2.1 อัลบูมิน.....	5
2.2.2 ครีเอตินิน.....	6
2.2.3 กรดยูริก.....	7
2.3 หลักการตรวจวัดอัลบูมิน ครีเอตินิน และกรดยูริก.....	8
2.3.1 หลักการตรวจวัดอัลบูมิน.....	8
2.3.2 หลักการตรวจวัดครีเอตินิน.....	8
2.3.3 หลักการตรวจวัดกรดยูริก.....	9
2.4 อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	9
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.1 การตรวจวัดอัลบูมิน ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	10
2.5.2 การตรวจวัดครีอะตินิน ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	14
2.5.3 การตรวจวัดกรดยูริก ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	18
2.5.4 การตรวจวัดสารปั่งชี้ทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยโรค ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	20
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>32</b>
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	32
3.1.1 สารเคมี.....	32
3.1.2 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือตรวจวัด.....	33
3.2 การเตรียมสารละลาย.....	34
3.2.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการตรวจวัดอัลบูมิน.....	34
3.2.1.1 สารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 5, 50, 100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	34
3.2.1.2 สารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 3.2.....	34
3.2.1.3 สารละลายเตตระโบรโมฟีนอล์ฟทาไลน์เอธิลเอสเทอร์ (TBPE) ความเข้มข้น $5 \times 10^{-4}$ โมลาร์.....	35
3.2.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการตรวจวัดครีอะตินิน.....	35
3.2.2.1 สารละลายมาตรฐานครีอะตินิน ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	35
3.2.2.2 สารละลายกรดพิคริก ความเข้มข้น 0.052 โมลาร์.....	35
3.2.2.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์.....	35
3.2.2.4 สารละลายพิเครท ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ในสารละลาย 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์.....	35
3.2.3 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการตรวจวัดกรดยูริก.....	36
3.2.3.1 สารละลายมาตรฐานกรดยูริก ความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร.....	36
3.2.3.2 สารละลายโพแทสเซียมเพอริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์....	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3.3 สารละลายเฟอริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์.....	36
3.2.4 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาชนิดของตัวרבวง.....	36
3.2.4.1 สารละลายยูเรีย ความเข้มข้น 20000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	36
3.2.4.2 สารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	36
3.2.4.3 สารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	37
3.2.4.4 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	37
3.2.4.5 สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร	37
3.2.4.6 สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร	37
3.2.4.7 สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร...	37
3.3 การเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัด.....	37
3.3.1 การออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	38
3.3.2 การเตรียม $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัด.....	39
3.4 วิธีการทดลอง.....	39
3.4.1 การศึกษา Cross-Reactivity.....	39
3.4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม.....	41
3.4.2.1 ปริมาตรของสารละลายที่เหมาะสม.....	41
(ก) สารละลายตัวพา.....	41
(ข) สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา.....	41
(ค) สารละลายมาตรฐานที่ใช้เป็น Spiked standard.....	41
3.4.2.2 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ.....	41
3.4.2.3 การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการแพร่ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น บนกระดาษ.....	42
3.4.2.4 การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการถ่ายรูป.....	42
3.4.2.5 การศึกษาอิทธิพลของความสว่างของไฟในการถ่ายรูป.....	43
3.4.3 การศึกษาความเสถียรของ Reagents บน Detection layer.....	43
3.4.4 การศึกษาอิทธิพลของตัวרבวง.....	44
3.4.5 การศึกษาคูณลักษณะของวิธีวิเคราะห์.....	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.5.1 ความเที่ยง (Precision).....	45
3.4.5.2 ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery).....	46
3.4.5.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้บนกระดาษ (Minimum detection level, MDL).....	46
3.4.6 การตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะ.....	46
3.4.6.1 การตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	46
3.4.6.2 การตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะ ด้วยวิธีมาตรฐาน.....	47
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>49</b>
4.1 ผลการศึกษา Cross-Reactivity.....	49
4.2 ผลการศึกษาเบื้องต้น: อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชั้นเดียว.....	50
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด.....	51
4.3.1 ปริมาตรของสารละลายที่ใช้.....	51
(ก) สารละลายตัวพา.....	51
(ข) สารเคมีและสารมาตรฐานที่ใช้ทำปฏิกิริยา.....	52
4.3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ.....	53
4.3.3 เวลาในการแพร่ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษ.....	55
4.3.4 เวลาในการถ่ายรูป.....	57
4.3.5 ความสว่างของไฟในการถ่ายรูป.....	59
4.4 ผลการศึกษาความเสถียรของ Reagents.....	61
4.5 ผลการศึกษอิทธิพลของตัวรบกวน.....	63
4.6 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์.....	64
4.7 การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะ.....	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	69
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	69
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	70
เอกสารอ้างอิง.....	71
ภาคผนวก.....	76
ภาคผนวก ก.....	77
ภาคผนวก ข.....	79
ภาคผนวก ค.....	85
ประวัติผู้เขียน.....	88



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ระยะเวลาของโรคไตแบ่งตามค่าการทำงานของไต (GFR).....	4
2.2 ระยะเวลาของโรคไตแบ่งตามอัตราส่วนความเข้มข้นอัลบูมินต่อครีอะตินินในปีสภาวะ.....	6
2.3 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดอัลบูมินด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.	13
2.4 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดครีอะตินิน ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	17
2.5 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดกรดยูริกด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ	20
2.6 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดสารบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยโรค ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	30
3.1 แสดงขั้นตอนการหยดรีเอเจนต์เพื่อการตรวจวัด.....	39
3.2 ตำแหน่งในการหยดสารละลายสำหรับศึกษาอิทธิพลของตัวรบกวน.....	44
4.1 ลักษณะการแพร่ของสารละลายสีผสมอาหารสีแดงใน detection zone เมื่อใช้ปริมาตรที่แตกต่างกัน.....	53
4.2 แสดงผลการศึกษาคู่คุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ของอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ แบบ 2 ชั้น สำหรับตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก.....	65
4.3 สรุปผลการศึกษาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ.....	65
4.4 แสดงค่าความเข้มข้นของอัลบูมินในปีสภาวะ.....	67
4.5 แสดงค่าความเข้มข้นของครีอะตินินในปีสภาวะ.....	67
4.6 แสดงค่าความเข้มข้นของกรดยูริกในปีสภาวะ.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงโครงสร้างของอัลบูมิน.....	5
2.2 แสดงโครงสร้างของครีอะตินิน.....	7
2.3 แสดงโครงสร้างของกรดยูริก.....	7
2.4 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรวจวัดอัลบูมิน.....	8
2.5 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรวจวัดครีอะตินิน.....	9
2.6 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรวจวัดกรดยูริก.....	9
2.7 แสดงส่วนประกอบของอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	10
2.8 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชิป ( $\mu$ PB-chip) และกล่องวิเคราะห์ ขนาดเล็กสำหรับตรวจวัดอัลบูมิน.....	11
2.9 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชิป 3 มิติร่วมกับไมโครตรวจวัดแบบอัจฉริยะ สำหรับตรวจวัดอัลบูมินในเลือด.....	11
2.10 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะที่ใช้หลักการ Electrochemical- chemical (EC) redox cycling.....	12
2.11 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดอัลบูมินที่อาศัยการให้สนามไฟฟ้าโดยการออกแบบช่องสำหรับ การไหลบนกระดาษแบบ 2 มิติ.....	13
2.12 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดครีอะตินิน.....	14
2.13 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดครีอะตินินด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ แถบกระดาษ (Paper strip).....	15
2.14 แสดงการตรวจวัดครีอะตินินด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษผ่านกลไกการ แลกเปลี่ยนประจุ.....	15
2.15 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาครีอะตินิน ณ จุดข้างเตียงผู้ป่วย โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสี.....	16
2.16 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้เอนไซม์ (Enzymatic paper-based analytical device, enz-PAD) สำหรับตรวจวัดครีอะตินินในปัสสาวะ.....	17
2.17 แสดงการตรวจวัดกรดยูริกในเลือดโดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสี.....	18
2.18 แสดงอุปกรณ์ไบโอเซ็นเซอร์รูปแบบใหม่สำหรับตรวจวัดกรดยูริก.....	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.19 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับวิเคราะห์ครีอะตินินและกรดยูริกในปัสสาวะ ภายในคราวเดียวกัน.....	20
2.20 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดอัลบูมินและฟรุกโตซามีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	21
2.21 แสดงการตรวจวัดกลูโคสและกรดยูริกด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษโดยใช้ Dual-enzyme inorganic hybrid nanoflowers (HNFs).....	22
2.22 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดอัตราส่วนอัลบูมินต่อครีอะตินิน อย่างง่ายและรวดเร็วในตัวอย่างปัสสาวะ.....	22
2.23 แสดงหลักการทำงานของ Drawing-PADs สำหรับประเมินอัตราส่วนความเข้มข้น ของอัลบูมินต่อครีอะตินินในปัสสาวะ.....	23
2.24 แสดงการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีสำหรับหาปริมาณกรดยูริกและกลูโคสด้วย อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบหลายชั้น.....	24
2.25 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณกลูโคสและกรดยูริกในปัสสาวะ ภายในคราวเดียวกัน.....	24
2.26 แสดงการตรวจวัดกลูโคสและกรดยูริกด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษโดยการ ตรวจวัดสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น.....	25
2.27 แสดงการตรวจวัดกรดยูริกและครีอะตินินในปัสสาวะภายในคราวเดียวกันด้วย Screen-printed electrode.....	26
2.28 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้แล้วทิ้งซึ่งอาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้า สำหรับการวิเคราะห์กรดยูริกและครีอะตินินภายในคราวเดียวกัน.....	26
2.29 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 3 มิติ (3D-μPAD) สำหรับตรวจวัดกลูโคส และอัลบูมิน.....	27
2.30 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้แล้วทิ้งสำหรับตรวจหากลูโคส, ครีอะตินิน และกรดยูริก.....	28
2.31 แสดงการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับกลูโคส, กรดยูริก, อัลบูมิน และไนไตรต์โดยวิธีการประทับตรา.....	29
2.32 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหากลูโคส, กรดยูริก, แลคเตท และโคลีน ภายในคราวเดียวกัน.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.1 แสดงลวดลายบนอุปกรณ์การตรวจวัดบนกระดาษสำหรับส่วนตรวจวัดที่เป็น (ก) Auxiliary layer (ข) Detection layer.....	38
3.2 อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับศึกษา Cross-Reactivity.....	40
4.1 แสดงอิทธิพลของรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัด ที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	49
4.2 (ก) แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชั้นเดียว (Single-layered PAD) สำหรับการ ตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก ภายในคราวเดียวกันด้วย อาศัยวิธีการเติมสาร ละลายมาตรฐาน และ (ข) แสดงรูปถ่ายผลการทดลองของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบน Single- layered PAD.....	50
4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก.....	51
4.4 แสดงการแพร่กระจายของสารละลายสีผสมอาหารสีแดงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ เมื่อเปิดในปริมาตรที่แตกต่างกัน.....	52
4.5 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ ตรวจวัดบนกระดาษ.....	54
4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก.....	55
4.7 แสดงอิทธิพลของเวลาในการแพร่ของของเหลวที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น บนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	56
4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับเวลาในการแพร่ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษ (นาที่) เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก.....	57
4.9 แสดงอิทธิพลของเวลาในการถ่ายรูปที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น บนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ.....	58
4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับเวลาในการถ่ายรูป (นาที่) เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก.....	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 แสดงอิทธิพลของความสว่างของไฟที่ใช้ในการถ่ายรูปที่มีผลต่อความเข้มสีของ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาศ.....	60
4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับระดับความสว่างของไฟในการถ่ายรูป เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก.....	61
4.13 แสดงอิทธิพลของความเสถียรของรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดบน Detection layer ที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาศ.....	62
4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับวันที่ทำการเก็บอุปกรณ์ตรวจวัดที่เตรียมไว้ เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก.....	63
4.15 แสดงอิทธิพลของตัวรบกวนที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ ตรวจวัดบนกระดาศ เมื่อเปิดตัวรบกวนชนิดต่าง ๆ ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาศ ที่มีการตรึงรีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิด.....	64

## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
ACR	อัตราส่วนความเข้มข้นของอัลบูมินต่อครีอะตินิน
GFR	ระดับค่าการทำงานของไต (Glomerular filtration rate)
POCT	การตรวจทางห้องปฏิบัติการ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point-of-care testing)
$\mu$ PAD	อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (Paper-based analytical device)
Alb	อัลบูมิน
Cre	ครีอะตินิน
HSA	Human Serum Albumin
TBPE	Tetrabromo phenolphthalein ethyl ester
TX-100	Triton X – 100
$K_3[Fe(CN)_6]$	Potassium ferric cyanide
$FeCl_3$	Ferric chloride
$mg L^{-1}$	หน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร
$mg dL^{-1}$	หน่วยมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
HPLC	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
B/R	อัตราส่วนความเข้มสี Blue/Red
R/G	อัตราส่วนความเข้มสี Red/Green

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

“ไมโครอัลบูมินูเรีย” คือ อาการความผิดปกติของไตในระยะเริ่มต้น หากตรวจพบในระยะนี้ จะรักษาผู้ป่วยได้ทันเวลาที่และลดความเสี่ยงต่อภาวะไตวาย ค่าไมโครอัลบูมินูเรียหาได้จาก “อัตราส่วนความเข้มข้นของอัลบูมินต่อครีเอตินิน” (Albumin-to-Creatinine Ratio, ACR) [1] การหาค่า ACR นี้ ทำเพื่อลดความผิดพลาด เนื่องจากการเจือจางของอัลบูมินที่ขับออกมาพร้อมปัสสาวะในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน ดังนั้น ในการวินิจฉัยโรคไต จึงต้องมีการตรวจวัดอัลบูมินควบคู่ไปกับครีเอตินินเสมอ เนื่องจากปริมาณครีเอตินินที่ถูกขับถ่ายออกมากับปัสสาวะในแต่ละบุคคลจะมีปริมาณคงที่ในแต่ละวัน และสำหรับในผู้ป่วยโรคไตบางราย นอกจากจะตรวจพบว่ามีปริมาณอัลบูมินสูงกว่าคนปกติแล้ว ยังอาจพบได้ว่ามีปริมาณกรดยูริกสูงด้วย ซึ่งอาจทำให้เกิดการตกผลึกและสะสมที่กรวยไต ส่งผลให้กรวยไตอักเสบและทำงานผิดปกติ ดังนั้น การตรวจปริมาณกรดยูริกในปัสสาวะนอกเหนือจากการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินและครีเอตินิน จึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วย

ในปัจจุบัน วิธีการตรวจหาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะ ยังไม่มีวิธีหรือเครื่องมือใด ๆ ที่สามารถวิเคราะห์สารทั้งสามตัวพร้อมกันได้ ต้องวิเคราะห์คร่าวละตัว ซึ่งจะมีหลักการตรวจวัดที่แตกต่างกัน ใช้เวลานานกว่าจะรู้ผล อีกทั้งวิธีและเครื่องมือที่ใช้ มักเป็นเครื่องมือขั้นสูง เช่น โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง [2] และเทคนิค Immunoturbidimetry ที่ใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ [3] เครื่องมือดังกล่าวเป็นเครื่องมือขนาดใหญ่ ราคาแพง ไม่สามารถทำการทดสอบในลักษณะการตรวจวัดข้างเตียงผู้ป่วย (Point-of-Care Testing; POCT) หรือการตรวจวัดนอกห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีวิธีตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินูเรียและกรดยูริกในปัสสาวะที่ทำได้ง่าย ผู้ป่วยสามารถตรวจวัดได้เอง และให้ผลการตรวจวัดที่รวดเร็ว

ในงานวิจัยนี้ จึงมีความมุ่งหวังจะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน โดยมุ่งเน้นให้เป็นวิธีอย่างง่าย อุปกรณ์ตรวจวัดที่ใช้มีขนาดเล็ก สามารถพกพาหรือใช้วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทดแทนการใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ได้ โดยจะพัฒนาเป็นอุปกรณ์การตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาค (Microfluidics device) ในรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices,  $\mu$ PADs) ขั้นตอนการเตรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์จะใช้วิธีการประทับตรา (Stamping) ด้วยหมึกกันน้ำลงบนกระดาษรอง เพื่อสร้างลวดลาย ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก ภายในคราวเดียวกันที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ [4] เป็นแบบชั้นเดียว (Single-layered  $\mu$ PAD) และพบว่า ผลวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษบางแผ่นเกิดการเปลี่ยนแปลงสีบนกระดาษที่ไม่เด่นชัดและไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากเกิด Coffee ring effect ทำให้ของเหลวไหลไปรวมกันบริเวณขอบวง ทำให้บริเวณขอบของวงมีสีเข้มกว่าบริเวณอื่น ซึ่งอาจทำให้ผลวิเคราะห์คลาดเคลื่อน ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบสองชั้น (Double-layered  $\mu$ PAD) เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ทั้งนี้ การออกแบบเป็นอุปกรณ์สองชั้นยังมีความมุ่งหวังให้อุปกรณ์ชั้นบนทำหน้าที่ในการกรองตัวอย่างปัสสาวะ โดยตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้วจะไหลลงไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ตรึงไว้บนอุปกรณ์ชั้นล่าง เกิดการทำปฏิกิริยา ถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เพื่อทำการตรวจวัดต่อไป หลักการตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาเคมี ดังนี้ คือ: (1) อัลบูมินกับเตตระโบรโมฟีนอล์ฟทาไลน์เอซิลเอสเทอร์และอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 3.2 (2) ครีเอตินินกับกรดพิคริกในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และ (3) กรดยูริกกับเฟอริกไซยาไนด์และเฟอริกคลอไรด์ ถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และประมวลผลค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J™ จากนั้นทำการศึกษาสภาพที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก ประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างปัสสาวะ รวมถึงทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ สำหรับวิเคราะห์อัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก ภายในคราวเดียวกัน
- 2) เพื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์อัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะ

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ เริ่มจากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก งานวิจัยเกี่ยวกับการเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบต่าง ๆ แล้วทำการออกแบบอุปกรณ์การตรวจวัดบนกระดาษแบบสองชั้น (Double-layered  $\mu$ PAD) และสร้างลวดลายส่วนที่ไม่ชอบน้ำโดยวิธีการประทับตราด้วยหมึกกันน้ำ ศึกษาสภาพที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด ประเมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์กับตัวอย่างปัสสาวะ ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ และรวบรวมผลการวิเคราะห์เพื่อทำการเผยแพร่ผลงานวิจัยต่อไป

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคสำหรับหาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับปัสสาวะได้จริง โดยเป็นวิธีที่สะดวก ให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 โรคไตและการวินิจฉัยโรคไต

#### 2.1.1 โรคไต [5]

โรคไต คือ กลุ่มโรคหรือภาวะที่ทำให้ไตทำงานผิดปกติ ทำให้การรักษาสมดุลต่าง ๆ ในร่างกาย รวมถึงความสามารถในการฟอกเลือดหรือการกำจัดของเสียออกจากเลือดผิดปกติ สาเหตุและอาการของโรคไตแตกต่างกันไปตามชนิดของการเจ็บป่วย เช่น ไตวาย หรือภาวะที่ไตสูญเสียความสามารถในการกรองของเสียออกจากเลือด จนไม่สามารถขับของเสียจากร่างกายผ่านทางปัสสาวะได้ ทำให้มีของเสียตกค้าง ทำให้ระดับน้ำและแร่ธาตุต่าง ๆ ในร่างกายไม่สมดุล โดยอาการของไตแบ่งออกเป็น 5 ระยะ ตามระดับค่าการทำงานของไตหรือ GFR (Glomerular filtration rate) ซึ่งแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ระยะของโรคไตแบ่งตามค่าการทำงานของไต (GFR)

ระยะของโรค	ค่าการทำงานของไต (GFR; $\text{mg min}^{-1}$ )	รายละเอียดของระยะต่าง ๆ
ระยะที่ 1	$\geq 90$	ไตเริ่มเสื่อม
ระยะที่ 2	60 – 89	ไตเสื่อม
ระยะที่ 3	30 - 59	การทำงานของไตลดลง
ระยะที่ 4	15 – 29	การทำงานของไตลดลงอย่างมาก
ระยะที่ 5	$< 15$	ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย

ในปัจจุบัน ประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังจำนวนมากขึ้น จากข้อมูลของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย พบว่า คนไทยป่วยเป็นโรคไตเรื้อรัง ร้อยละ 17.6 ของประชากรหรือประมาณ 8 – 10 ล้านราย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ดังนั้น การตรวจวินิจฉัยโรคไต จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

### 2.1.2 การวินิจฉัยโรคไต [6]

แพทย์สามารถทำการตรวจวินิจฉัยโรคไต เพื่อหาความผิดปกติต่าง ๆ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

- **การตรวจเลือด** เพื่อตรวจระดับของเสียในเลือด ตรวจอัตราการทำงานของเสียออกจากเลือด โดยไต รวมไปถึงตรวจหาแคลเซียมและกรดยูริก ในกรณีที่สงสัยว่าเป็นนิ่วในไต
- **การตรวจปัสสาวะ** เพื่อตรวจหาปริมาณอัลบูมิน ครีอะตินิน โปรตีนที่ปนอยู่ในปัสสาวะ
- **การตรวจจากภาพถ่าย** เพื่อตรวจลักษณะ การอุดตัน รวมไปถึงการทำงานของไต ด้วยการถ่ายภาพเอกซเรย์ ทำอัลตราซาวด์ การทำ CT Scan หรือ MRI Scan
- **การตรวจชิ้นเนื้อ** ในบางกรณี แพทย์อาจใช้เข็มเจาะ นำตัวอย่างเซลล์เนื้อเยื่อไตไปส่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

## 2.2 ข้อมูลเกี่ยวกับอัลบูมิน ครีอะตินิน และกรดยูริก

### 2.2.1 อัลบูมิน [7]

อัลบูมิน (Albumin) คือ โปรตีนชนิดหนึ่งที่พบในกระแสเลือด ผลิตขึ้นจากตับและมีปริมาณมากกว่าโปรตีนชนิดอื่น มีหน้าที่ในการสร้างเม็ดเลือดและซ่อมแซมส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย รวมไปถึงช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับร่างกาย เพื่อต่อต้านการติดเชื้อต่าง ๆ ลักษณะโครงสร้างของอัลบูมิน แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของอัลบูมิน [8]

ในคนปกติจะไม่พบอัลบูมินในปัสสาวะ หากตรวจพบแสดงว่าการทำงานของไตเริ่มผิดปกติ ซึ่งอาจเกิดจากโรคไตเองหรือเป็นภาวะแทรกซ้อนจากโรคอื่น ๆ การตรวจอัลบูมินที่หลุดออกมาพร้อมปัสสาวะจึงเป็นการตรวจวินิจฉัยโรคที่นิยม แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่เป็นที่ยอมรับ คือ การตรวจวิเคราะห์ 24 ชั่วโมง (24-h urine) ซึ่งมีความยุ่งยากและไม่สะดวก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากต้องเก็บปัสสาวะอย่างต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง ดังนั้น การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่เก็บเพียงครั้งเดียวในเวลาใดเวลาหนึ่ง (Spot urine) จึงมีความสะดวกต่อผู้ป่วยมากกว่า ทั้งนี้ การเก็บตัวอย่างปัสสาวะในลักษณะนี้ อาจยังมีความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ เนื่องจากปริมาตรของปัสสาวะที่เก็บในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน ส่งผลให้อัตราส่วนการเจือจางแตกต่างกัน ดังนั้น หากเก็บตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีนี้จึงจำเป็นต้องหาปริมาณครีอะตินินร่วมด้วย แล้วรายงานในรูปอัตราส่วนความเข้มข้นอัลบูมินต่อครีอะตินิน ซึ่งร่างกายของผู้ป่วยแต่ละรายจะหลั่งปริมาณครีอะตินินคงที่ โดยอัตราส่วนความเข้มข้นอัลบูมินต่อครีอะตินิน สามารถบ่งชี้อาการของโรคไตในแต่ละระยะได้ดังต่อไปนี้

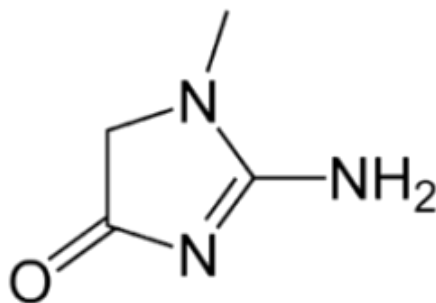
ตารางที่ 2.2 ระยะของโรคไตแบ่งตามอัตราส่วนความเข้มข้นอัลบูมินต่อครีอะตินินในปัสสาวะ [23]

ระยะของโรคไต	ค่าอัตราส่วนอัลบูมินต่อครีอะตินิน (mg Alb/g Cre)
ปกติ	< 30
ไมโครอัลบูมินูเรีย	30-300
แมโครอัลบูมินูเรีย	> 300

### 2.2.2 ครีอะตินิน [9]

ครีอะตินิน (Creatinine) เป็นของเสียที่เกิดจากการทำงานหรือการสลายของกล้ามเนื้อ ซึ่งจะถูกกำจัดโดยไต ในภาวะปกติครีอะตินิน จะถูกกรองผ่านไตและขับออกมากับปัสสาวะทั้งหมด ในการตรวจระดับครีอะตินิน จึงต้องทำการตรวจในกระแสเลือดหรือในปัสสาวะร่วมด้วยในบางครั้ง โดยปกติร่างกายจะขับครีอะตินินด้วยอัตราคงที่เสมอในแต่ละคน ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (หัวข้อ 2.2.1) ดังนั้น หากครีอะตินินที่ถูกขับออกมากับปัสสาวะในปริมาณที่มากกว่าปกติ ระบุได้ว่าไตทำงานผิดปกติ

การตรวจหาครีอะตินิน เป็นตัวบ่งชี้ในการคัดกรอง วินิจฉัย รักษา และติดตามการรักษาภาวะโรคไตได้เป็นอย่างดี ค่าปกติของครีอะตินินในเพศหญิงจะมีค่าน้อยกว่าเพศชาย โดยในเพศชายจะมีค่าอยู่ที่ 6 - 12 มิลลิกรัมต่อลิตร และในเพศหญิงจะอยู่ในช่วง 5 - 11 มิลลิกรัมต่อลิตร

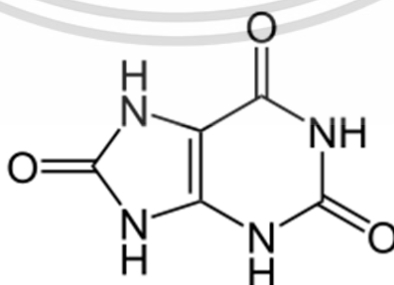


รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของครีอะตินิน [10]

### 2.2.3 กรดยูริก [11,12,13]

กรดยูริก (Uric acid) เป็นสารประกอบชีวเคมีที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง และได้รับจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิวรีน (Purine) สูงมากจนเกินไป ซึ่งสารพิวรีนจะพบมากในสัตว์ปีก เครื่องในสัตว์ และอาหารทะเลบางชนิด โดยปกติร่างกายจะสามารถขับกรดยูริกออกมาทางปัสสาวะได้ แต่ถ้าขับออกจากร่างกายได้ไม่หมดหรือมีกรดยูริกปริมาณที่มากเกินไป อาจเกิดจากการที่ไตทำงานผิดปกติ หรือมีโรคแทรกซ้อนทางไต ซึ่งส่งผลให้กรวยไตกรองปัสสาวะได้ในอัตราการไหลผ่านที่ต่ำลง หรือทำให้ไตผลิตน้ำปัสสาวะได้น้อยกว่าปกติ ทำให้มีกรดยูริกสะสมอยู่ในร่างกาย และตกผลึกตามข้อ กระดูก ผังหนังหลอดเลือด และไต ทำให้เกิดอาการเจ็บปวดและเป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคเก๊าต์

การตรวจกรดยูริก คือ การตรวจเพื่อให้ทราบว่าในร่างกายมีกรดยูริกสูงถึงระดับที่อยู่ในอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคเก๊าต์หรือไม่ เนื่องจากหากปล่อยให้มีค่าสูงเกินกว่าปกติไปนาน ๆ ย่อมมีโอกาสเสี่ยง ซึ่งจะทำให้มีอาการปวดร้าวตามข้อกระดูกต่าง ๆ ได้ โดยค่าปกติของกรดยูริกในปัสสาวะสำหรับเพศชายจะอยู่ที่ 250 - 800 มิลลิกรัมต่อ 24 ชั่วโมง และ 250 - 750 มิลลิกรัมต่อ 24 ชั่วโมง สำหรับเพศหญิง



รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของกรดยูริก [14]

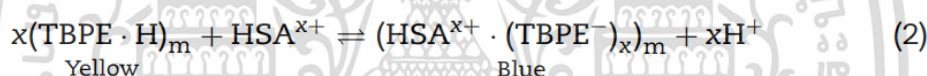
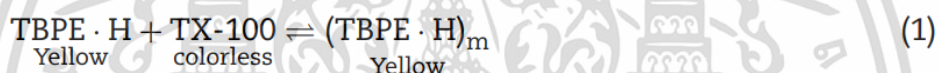
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 หลักการตรวจวัดอัลบูมิน ครีอะตินิน และกรดยูริก

ในงานวิจัยนี้ จะใช้หลักการตรวจวัดทางสี (Colorimetric detection) ในการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก ด้วยปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแต่ละสารที่สนใจตรวจวัด โดยหลักการของแต่ละปฏิกิริยาเป็นดังต่อไปนี้

### 2.3.1 หลักการตรวจวัดอัลบูมิน

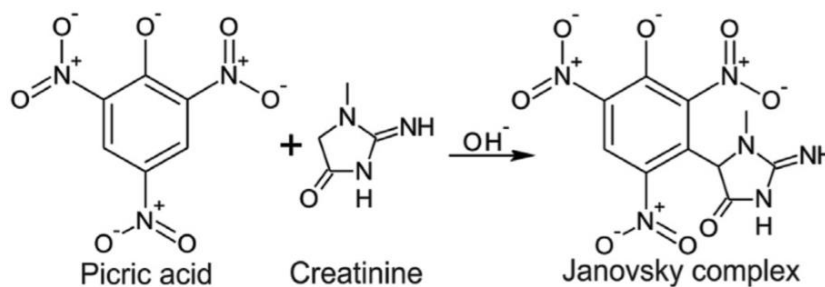
หลักการที่ใช้ในการตรวจวัดอัลบูมิน คือ ใช้ Tetrabromophenolphthalein ethyl ester (TBPE) ในสภาวะที่มีอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 3.2 ซึ่งสารละลายจะมีสีเหลือง เมื่ออัลบูมินเข้าทำปฏิกิริยา อัลบูมินจะเข้าไปดึงโปรตอนออกจากโครงสร้างของ TBPE ทำให้สีของสารละลาย TBPE เปลี่ยนเป็นสีฟ้า และหากความเข้มข้นของอัลบูมินเพิ่มมากขึ้น สีฟ้าของผลิตภัณฑ์ก็จะมีมากขึ้น กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงได้ดังสมการด้านล่าง



รูปที่ 2.4 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรวจวัดอัลบูมิน [15] โดยตัวย่อของสารแต่ละตัวเป็นดังนี้: TBPE คือ Tetrabromophenolphthalein ethyl ester, TX-100 คือ Triton X-100 และ HSA คือ Human serum albumin.

### 2.3.2 หลักการตรวจวัดครีอะตินิน

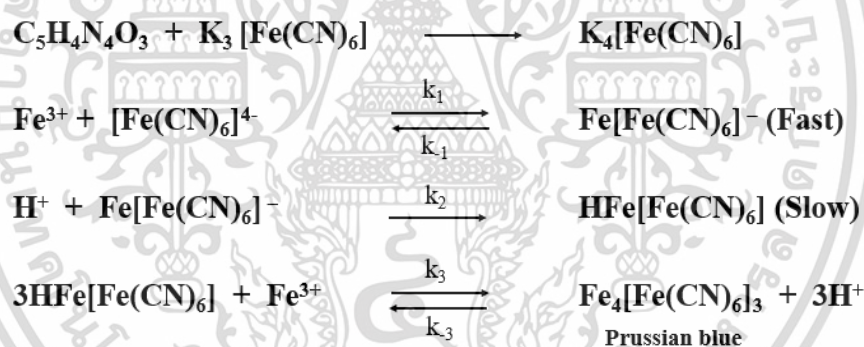
หลักการตรวจวัดครีอะตินิน จะใช้หลักการตามวิธีของจาฟเฟ่ [16] โดยครีอะตินินจะทำปฏิกิริยากับกรดพิคริกซึ่งเตรียมในสารละลายเบส เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง และสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีความเข้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของครีอะตินิน กลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรวจวัดครีเอตินิน [16]

### 2.3.3 หลักการตรวจวัดกรดยูริก

การตรวจวัดกรดยูริก อาศัยหลักการที่กรดยูริกทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ เกิดเป็นโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ จากนั้นโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกคลอไรด์ ได้เป็นผลิตภัณฑ์สีฟ้า (Prussian blue) ซึ่งจะมีความเข้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดยูริกเพิ่มขึ้น กลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรวจวัดกรดยูริก [17]

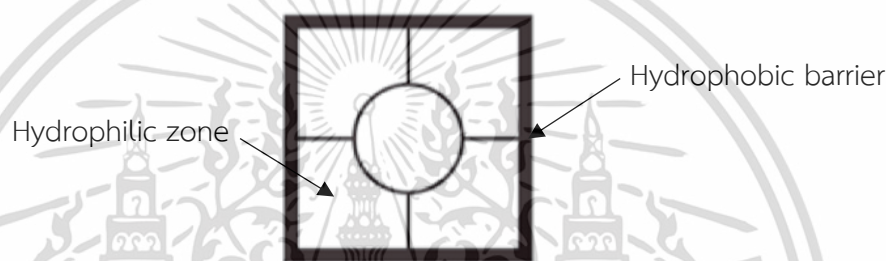
### 2.4 อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ [18]

อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษหรืออุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices,  $\mu$ PADs) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่ใช้เพื่อทำการทดลองและตรวจวัดบนกระดาษกรองซึ่งใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยจะเตรียมให้อุปกรณ์การตรวจวัดบนกระดาษประกอบด้วย 2 ส่วน คือ 1) ส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) เป็นส่วนสำหรับเกิดปฏิกิริยา และ 2) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) เป็นส่วนของลวดลายที่สร้างด้วยหมึกกันน้ำหรือขี้ผึ้ง (Wax) เพื่อกำหนดขอบเขตพื้นที่สำหรับการเกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 2.7) อุปกรณ์ตรวจวัดบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษมีข้อดีคือ เป็นอุปกรณ์การวิเคราะห์ที่สร้างและใช้งานง่าย ต้นทุนต่ำ มีน้ำหนักเบา และสะดวกต่อการพกพาไปใช้วิเคราะห์นอกห้องปฏิบัติการ

การสร้างลวดลายของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การพิมพ์ด้วยหมึก (Inkjet printing) การพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (Wax printing) การพิมพ์สกรีน (Screen printing) รวมถึงวิธีการประทับตรา (Stamping) โดยวิธีการประทับตราด้วยหมึกกันน้ำ นับเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดที่สุดวิธีหนึ่ง สามารถสร้างลวดลายได้โดยทำการออกแบบตราตามรูปแบบที่ต้องการ จากนั้นเติมหมึกกันน้ำลงบนตราลาย แล้วทำการประทับตราลงบนกระดาษกรองที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการเคมี นำไปให้ความร้อนหรือวางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไป



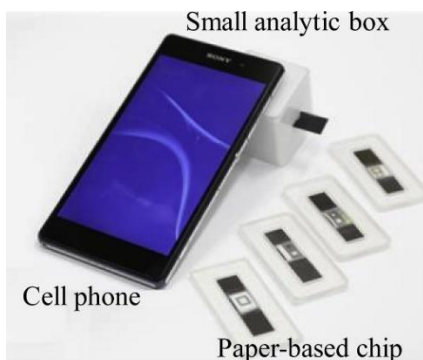
รูปที่ 2.7 แสดงส่วนประกอบของอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ [19]

## 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.5.1 การตรวจวัดอัลบูมิน ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

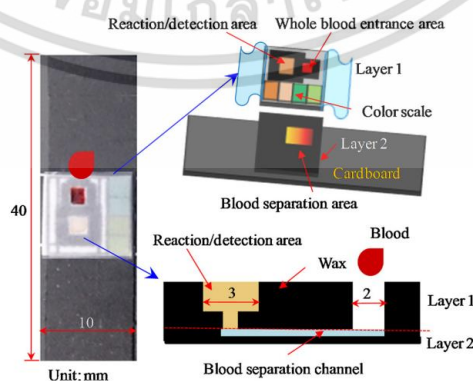
Yang, R.J. และคณะ [20] พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชิป (microfluidic paper-based chip,  $\mu$ PB-chip) และกล่องวิเคราะห์ขนาดเล็กสำหรับตรวจวัดอัลบูมิน ดังรูปที่ 2.8 ขั้นตอนการวิเคราะห์ ทำการหยดตัวอย่างลงบริเวณตรวจวัดบนชิป จากนั้นหยดโบรโมครีซอลกรีนรีเอเจนต์ (Bromocresol green, BCG) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีสีฟ้า ทำการถ่ายรูปด้วยโทรศัพท์มือถือและวิเคราะห์ผลความเข้มสีต่อไป อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดอัลบูมินได้ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 5 กรัมต่อเดซิลิตร ทำการทดสอบกับตัวอย่างจากผู้ป่วยอาสาสมัคร 36 ตัวอย่าง พบว่า ผลการวิเคราะห์มีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีทั่วไปในห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9912 แสดงให้เห็นว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่สะดวก และมีความน่าเชื่อถือสำหรับการตรวจวัดอัลบูมินในมนุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชิป (microfluidic paper-based chip,  $\mu$ PB-chip) และกล่องวิเคราะห์ขนาดเล็กสำหรับตรวจวัดอัลบูมิน [20]

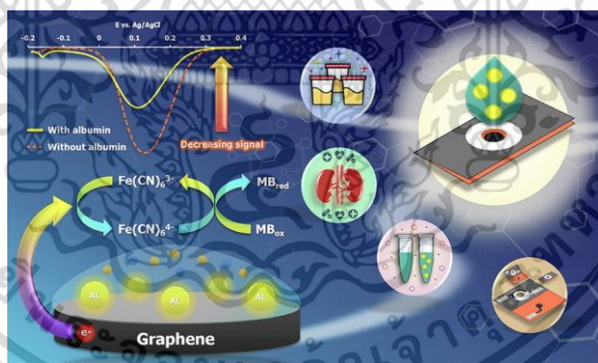
Yang, R.J. และคณะ [21] นำเสนอวิธีตรวจวัดอัลบูมินในเลือดของมนุษย์ โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชิป 3 มิติร่วมกับโมดูลตรวจวัดแบบอัจฉริยะ การผลิตชิป ทำการตรึงรีเอเจนต์โบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green, BCG) ลงบริเวณสำหรับเกิดปฏิกิริยา จากนั้นเก็บไว้ในสถานะที่มีไนโตรเจน ( $N_2$ ) ที่อุณหภูมิ  $-15$  องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน ขั้นตอนการตรวจวัด ทำการหยดตัวอย่างเลือดลงบริเวณทางเข้าของชิป จากนั้นพลาสติกในเลือดจะเกิดการแพร่ผ่านช่องทางการไหล และเกิดปฏิกิริยาระหว่างอัลบูมินในพลาสมากับ BCG ที่บริเวณสำหรับเกิดปฏิกิริยา เมื่อให้ความร้อนที่  $37$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $6$  นาที ทำการถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และวิเคราะห์ความเข้มข้นของอัลบูมินด้วยแอปพลิเคชันบนโทรศัพท์มือถือ เมื่อใช้อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้ วิเคราะห์ตัวอย่างอัลบูมินบริสุทธิ์  $40$  ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือด  $30$  ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีดั้งเดิมในห้องปฏิบัติการ พบว่า ผลการวิเคราะห์จากทั้ง 2 วิธีมีความสอดคล้องกัน ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ  $0.9831$  และ  $0.9968$  ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ตรวจวัดอัลบูมินในเลือดได้ อุปกรณ์ตรวจวัดแสดงดังรูปด้านล่าง



รูปที่ 2.9 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชิป 3 มิติร่วมกับโมดูลตรวจวัดแบบอัจฉริยะสำหรับตรวจวัดอัลบูมินในเลือด [21]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yomthiangthae, P. และคณะ [22] นำเสนอกระบวนการ electrochemical-chemical (EC) redox cycling แบบใหม่สำหรับการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะอย่างง่ายและรวดเร็ว หลักการตรวจวัดจะใช้เฟอริกไซยาไนด์ (Ferricyanide,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) ร่วมกับเมทิลีนบลู (Methylene blue, MB) สำหรับการขยายสัญญาณการตรวจวัดโดยไม่ต้องทำการตัดแปลงพื้นผิวอิเล็กโทรด การหาปริมาณอัลบูมินจะเป็นการตรวจวัดแบบอ้อมคือ เมื่อไม่มีอัลบูมิน การถ่ายโอนอิเล็กตรอนจะเกิดผ่านกระบวนการ EC redox ซึ่งจะเกิดได้ง่าย ส่งผลให้เกิดสัญญาณทางไฟฟ้าเคมีจำนวนมาก ในทางกลับกันถ้าในสารละลายรีดอกซ์มีอัลบูมิน สัญญาณจะเกิดได้น้อย เนื่องจากโมเลกุลของอัลบูมินจะไปขัดขวางการถ่ายโอนอิเล็กตรอนบนพื้นผิวอิเล็กโทรด ทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์อัลบูมินคือ 1 ถึง 500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.072 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าสามารถวิเคราะห์อัลบูมินที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้โดยตรง ไม่ต้องทำการแก้ไขค่าด้วยการวิเคราะห์ครีอะตินินควบคู่ นอกจากนี้ได้มีการนำอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะจริง พบว่า ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าพอใจ มีแนวโน้มที่ดี และสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง และยังสามารถนำไปใช้วินิจฉัยโรคไตเบื้องต้นบริเวณจุดข้างเตียงผู้ป่วยได้ อุปกรณ์ตรวจวัดแสดงดังรูป 2.10

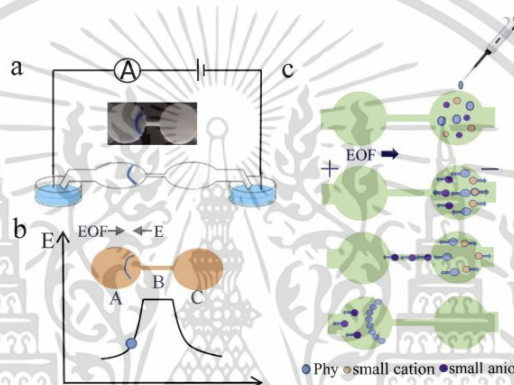


รูปที่ 2.10 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะที่ใช้หลักการ electrochemical-chemical (EC) redox cycling [22]

Cai, Y. และคณะ [23] นำเสนอวิธีการใหม่สำหรับนำการไล่ระดับสนามไฟฟ้า และการขยายสัญญาณโดยการออกแบบช่องสำหรับการไหลบนกระดาษแบบ 2 มิติสำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมินูเรียในปัสสาวะ ดังแสดงในรูป 2.11 ผลการทดลองพบว่า แรงกระตุ้นของสนามไฟฟ้าสามารถถ่ายโอนโปรตีนจากปัสสาวะไปไหลได้อย่างมีประสิทธิภาพถึง 93.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเรียงซ้อนกันเป็นแถบแคบ ๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่ทำการออกแบบไว้ ในการวิเคราะห์อัลบูมินมีช่วงไดนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิกอยู่ที่ 10 ถึง 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 10 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.991 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เท่ากับ 6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของอัลบูมินโดยการย้อมสีด้วยโบรโมเฟินอลบลู (Bromophenol blue, BPB) นำไปตรวจวัดไมโครอัลบูมินูเรียในปัสสาวะ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีวิเคราะห์ทางคลินิก พบว่า เมื่อใช้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ อัลบูมินในปัสสาวะที่มีการนำไฟฟ้าสูง จะถูกไหลและสามารถตรวจวัดได้โดยตรงโดยไม่ต้องทำการเตรียมตัวอย่าง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีความไวในการวิเคราะห์สูง สามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยโรคไตเบื้องต้น ณ จุดข้างเตียงผู้ป่วยนอก ห้องปฏิบัติการได้



รูปที่ 2.11 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดอัลบูมินที่อาศัยการให้สนามไฟฟ้าโดยการออกแบบช่องสำหรับการไหลบนกระดาษแบบ 2 มิติ [23]

ตารางที่ 2.3 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดอัลบูมิน ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

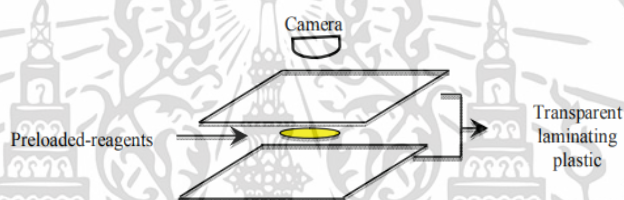
Techniques	Reagents	Working range	Limit of detection (LOD)	Ref.
Colorimetric	Bromocresol green	0 – 5 g dL <sup>-1</sup>	0.25 g dL <sup>-1</sup>	[20]
Colorimetric	Bromocresol green	3.68 – 81.0 g L <sup>-1</sup>	3.68 g L <sup>-1</sup>	[21]
Electrochemical	Ferricyanide, Methylene blue	1 – 500 mg L <sup>-1</sup>	0.072 mg dL <sup>-1</sup>	[22]
Electrochemical	Bromophenol blue	10 – 100 mg L <sup>-1</sup>	6.5 mg L <sup>-1</sup>	[23]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

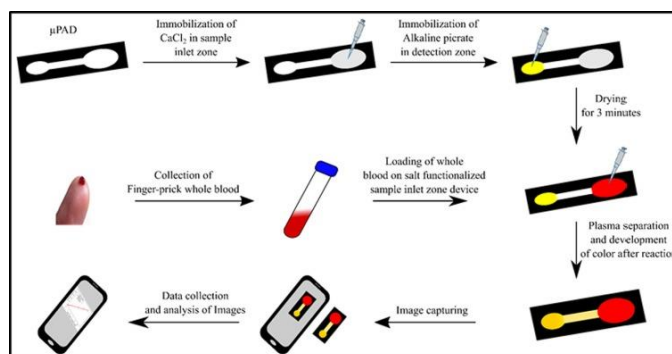
## 2.5.2 การตรวจวัดครีอะตินิน ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

Tambaru, D. และคณะ [24] พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดครีอะตินินราคาถูก และไม่ต้องการอาศัยเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เพียงกระดาษและสมาร์ทโฟน หลักการตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาจากฟเฟ (Jaffe reaction) ครีอะตินินทำปฏิกิริยากับกรดพิคริกในสภาวะเบส เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีส้มแดง ถ่ายรูปสีที่เกิดขึ้นด้วยสมาร์ทโฟน และประมวลผลความเข้มสีด้วยแอปพลิเคชัน Microsoft Visual c# 2010I Express จากการศึกษา พบว่า อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงที่ 5.55 เปอร์เซ็นต์, ความแม่นยำ 0.74 เปอร์เซ็นต์, ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับเท่ากับ  $96.73 \pm 6.12$  เปอร์เซ็นต์ และมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 8.02 มิลลิกรัมต่อลิตร สรุปได้ว่า อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้งานง่าย ราคาไม่แพง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดครีอะตินินนอกห้องปฏิบัติการได้ อุปกรณ์ตรวจวัดแสดงดังรูป 2.12



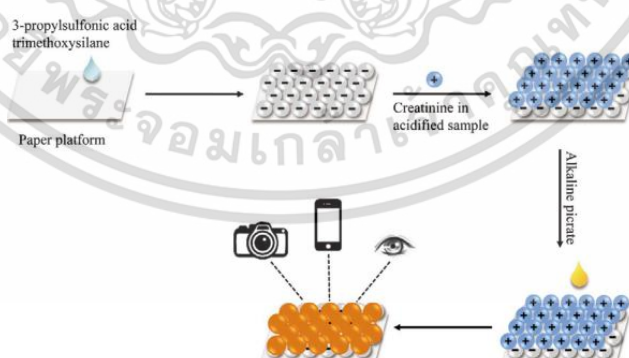
รูปที่ 2.12 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดครีอะตินิน [24]

Chattopadhyay, และคณะ [25] พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดครีอะตินินในเลือดที่สร้างและใช้งานง่ายเป็นรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบแถบกระดาษ (Paper strip) แสดงดังรูป 2.13 ขั้นตอนการตรวจวัด ทำการหยดตัวอย่างเลือด 1 หยดลงบริเวณเก็บตัวอย่างของแถบกระดาษที่มีการตรึงเกลือแคลเซียมไว้ พลาสมาในเลือดจะแยกตัวไป เนื่องจากเกิดการรวมตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBCs) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออน โดยพลาสมานั้นจะเคลื่อนที่ไปบริเวณตรวจวัด และเกิดปฏิกิริยากับอัลคาไลน์พิครท เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีขึ้น ทำการถ่ายรูปด้วยสมาร์ทโฟน และประมวลผลความเข้มสีต่อไป ขั้นตอนการตรวจวัดทั้งหมดใช้เวลา 2 ถึง 3 นาที โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใด ๆ ในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ใช้เครื่องมือวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ผลวิเคราะห์ที่ได้จากอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษมีความแม่นยำ 94 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์การแปรผกผันอยู่ในช่วง 0.64 ถึง 6.4 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังสามารถใช้งานได้ง่าย ไร้เจอนต์ที่ใช้มีความเสถียร ใช้ทดสอบนอกห้องปฏิบัติการได้ และผู้ใช้งานไม่จำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญสูง



รูปที่ 2.13 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดครีเอตินินด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบแถบกระดาษ (Paper strip) [25]

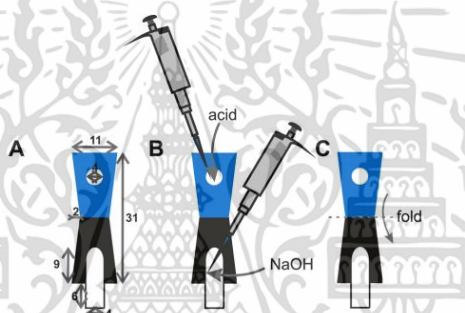
Sittiwong, J. และคณะ [26] พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษดังรูป 2.14 สำหรับหาครีเอตินินด้วยปฏิกิริยาการตรวจวัดสี โดยกระดาษกรองจะถูกเคลือบด้วย 3-Propylsulfonic acid trimethoxysilane ซึ่งจะทำให้ครีเอตินินประจุบวกถูกสกัดลงบนกระดาษผ่านกลไกการแลกเปลี่ยนไอออน จากนั้นจะไปทำปฏิกิริยากับอัลคาไลน์พิกเรท เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีเหลืองส้ม สีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และสามารถทำการตรวจวัดเชิงปริมาณได้ โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มสี ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของครีเอตินิน จากการศึกษา พบว่า การตรวจวัดครีเอตินินมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 10 ถึง 60 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน เพื่อยืนยันว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดครีเอตินินในตัวอย่างปัสสาวะมนุษย์ได้จริง อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ปริมาณรีเอเจนต์น้อย



รูปที่ 2.14 แสดงการตรวจวัดครีเอตินินด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษผ่านกลไกการแลกเปลี่ยนประจุ [26]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lewinska, I และคณะ [27] นำเสนออุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดครีอะตินินิน ณ จุดข้างเตียงผู้ป่วย อ่านสัญญาณได้จากแอปพลิเคชันบนสมาร์ตโฟน ดังรูป 2.15 หลักการตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาตรวจวัดสี 2 วิธี คือ (1) ใช้ 3,5-Dinitrobenzoic acid เป็นรีเอเจนต์ และตรวจวัดสีด้วยระบบ RGB, (2) ใช้ปฏิกิริยาจากฟลูออโรสโตน ซึ่งจะวิเคราะห์สีด้วยระบบ HSV เปรียบเทียบกันพบว่า วิธีตรวจวัดทั้ง 2 วิธีให้ความเป็นเส้นตรงครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่สำคัญในการวิเคราะห์ครีอะตินินในปัสสาวะ มีความแม่นยำสูง (RSD < 5 เปอร์เซ็นต์) ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.82 และ 1.05 มิลลิโมลาร์ สำหรับวิธี 3,5-Dinitrobenzoic acid และวิธีจากฟลูออโรสโตน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดครีอะตินินในปัสสาวะที่ไม่มีการเจือจางเมื่อทำการยืนยันผลการวิเคราะห์โดยทดสอบกับปัสสาวะเทียม มีค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วง 70 ถึง 129 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2.15 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาครีอะตินิน ณ จุดข้างเตียงผู้ป่วย โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสี [27]

Talalak, K และคณะ [28] นำเสนออุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้เอนไซม์ (Enzymatic paper-based analytical device, enz-PAD) สำหรับตรวจวัดครีอะตินินในปัสสาวะ ขั้นตอนการตรวจวัดทำการจุ่มกระดาษกรองที่ตัดเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า และมีการตรึงเอนไซม์ไว้ลงในตัวอย่างปัสสาวะ ครีอะตินินในปัสสาวะจะเคลื่อนที่บนกระดาษกรองด้วยแรงแคปิลารี และทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่ตรึงไว้ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่บริเวณตรวจวัด หลักการตรวจวัดอาศัยการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ผ่านกระบวนการคอนเวอร์ชันของครีอะตินินกับเอนไซม์ Creatininase, Creatinase และ Sarcosine oxidase โดย  $H_2O_2$  ที่เกิดขึ้นนี้จะไปทำปฏิกิริยากับ 4-Amino phenazone และ 2,4,6-Triiodo-3-hydroxybenzoic acid เกิดเป็น Quinoneimine ที่มีสีชมพูแดงที่บริเวณตรวจวัด จากการศึกษา พบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดครีอะตินินอยู่ที่ 2.5 ถึง 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ( $R^2 = 0.983$ ) มีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และเมื่อนำไปทดสอบกับปัสสาวะจริง พบว่า ผลการตรวจวัดครีอะตินินด้วยวิธีที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พัฒนาขึ้นนี้มีแนวโน้มเป็นไปได้ในทางเดียวกับการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน ( $R^2 = 0.977$ ,  $n = 40$ ) กล่าวได้ว่า อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดครีอะตินินที่เรียบง่าย ต้นทุนต่ำ และยังเป็นวิธีทางเลือกใหม่ที่มีประโยชน์อย่างมากในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยเบื้องต้นในประเทศที่กำลังพัฒนา อุปกรณ์ตรวจวัดที่นำเสนอแสดงดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 2.16 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้เอนไซม์ (Enzymatic paper-based analytical device, enz-PAD) สำหรับตรวจวัดครีอะตินินในปัสสาวะ [28]

ตารางที่ 2.4 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดครีอะตินิน ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

Techniques	Reagents	Working range	Limit of detection (LOD)	Ref.
Colorimetric	Picric acid	20 – 140 mg L <sup>-1</sup>	8.02 mg L <sup>-1</sup>	[24]
Colorimetric	Picric acid	0.1 – 15 mg L <sup>-1</sup>	-	[25]
Colorimetric	3-Propylsulfonic acid trimethoxysilane, Picric acid	10 – 60 mg L <sup>-1</sup>	4.2 mg L <sup>-1</sup>	[26]
Colorimetric	(1) 3,5-Dinitro benzoic acid (2) Picric acid	(1) 0.82 – 10.0 mmol L <sup>-1</sup> (2) 1.05 – 20.0 mmol L <sup>-1</sup>	0.82 mmol L <sup>-1</sup> 1.05 mmol L <sup>-1</sup>	[27]

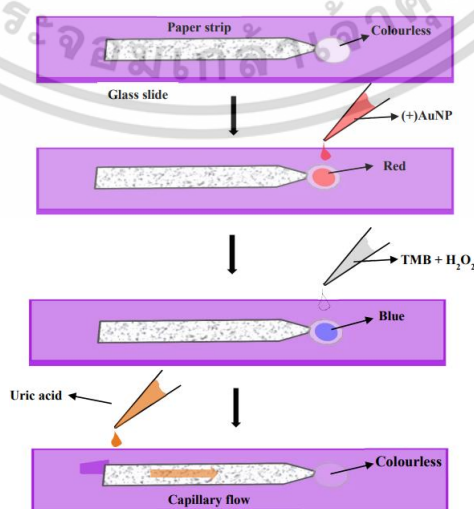
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดครีอะตินิน ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (ต่อ)

Techniques	Reagents	Working range	Limit of detection (LOD)	Ref.
Colorimetric and enzymatic	4-Aminophe nazono, 2,4,6-Triiodo-3-hydroxybenzoic acid	2.5 – 25 mg dL <sup>-1</sup>	2.0 mg dL <sup>-1</sup>	[28]

### 2.5.3 การตรวจวัดกรดยูริก ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

Kumar, A. และคณะ [29] พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณกรดยูริกที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ โดยอาศัยการเกิดออกซิไดซ์ของ 3,5,3',5'-Tetramethyl benzidine (TMB) ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) และอนุภาคนาโนประจุบวก ((+)AgNPs) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีฟ้าอมเขียว ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นไม่มีสีเมื่อเกิดปฏิกิริยากับกรดยูริกที่บริเวณตรวจวัด จากการศึกษา พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดกรดยูริกได้ในช่วงความเข้มข้น 0.0 ถึง 83.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 8.1 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์ได้ภายใน 20 นาที กล่าวได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้เป็นอีก 1 วิธีทางเลือกสำหรับการตรวจวัดกรดยูริก โดยอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นแสดงดังรูป 2.17



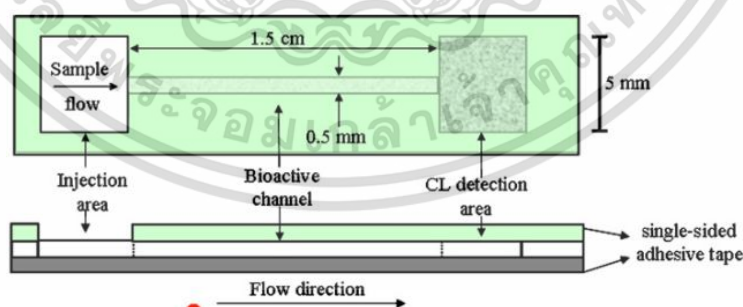
รูปที่ 2.17 แสดงการตรวจวัดกรดยูริกในเลือดโดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสี [29]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Piermarini, S. และคณะ [30] นำเสนอไบโอเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดกรดดยูริกในรูปแบบ Screen-printed electrodes (SPEs) ที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยสีย้อมปรัสเซียนบลู (Prussian blue, PB) ควบคู่กับเครื่องมือตรวจวัดขนาดเล็ก การตรวจวัดอาศัยหลักการของ Cyclic voltammetry และ Chronoamperometry วัดกระแสที่เกิดขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ PB ซึ่งจะแปรไปตามความเข้มข้นของกรดดยูริก โดยช่วงความเข้มข้นของกรดดยูริกที่ตรวจวัดได้เป็น 0.03 ถึง 0.3 มิลลิโมลาร์ และมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.01 มิลลิโมลาร์ เมื่อนำอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดกรดดยูริกในตัวอย่างเลือด 85 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีตรวจวัดสีทั่วไป พบว่า ผลวิเคราะห์จากทั้ง 2 วิธีมีความสอดคล้องกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.981 กล่าวได้ว่า อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ตรวจวัดกรดดยูริกในตัวอย่างเลือดได้จริง และสามารถใช้ในการวินิจฉัยนอกห้องปฏิบัติการได้

Yu, J และคณะ [31] พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษร่วมกับวิธีการเคมีลูมิเนสเซนซ์ (Chemiluminescence, CL) เพื่อสร้างไบโอเซ็นเซอร์รูปแบบใหม่สำหรับตรวจวัดกรดดยูริก ซึ่งแสดงดังรูป 2.18 โดยหลักการตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ขึ้นบนกระดาษ และ  $H_2O_2$  ที่เกิดขึ้นนี้จะไปทำปฏิกิริยา CL กับอนุพันธ์ของโรดานีน (Rhodanine) ในสภาวะกรด เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ขึ้น ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดกรดดยูริกได้อย่างแม่นยำ มีความเสถียร สามารถวิเคราะห์แบบทำซ้ำได้เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 10 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังเป็นอุปกรณ์ที่มีราคาไม่แพง ใช้งานง่าย ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย และพกพาสะดวก



รูปที่ 2.18 แสดงอุปกรณ์ไบโอเซ็นเซอร์รูปแบบใหม่สำหรับตรวจวัดกรดดยูริก [31]

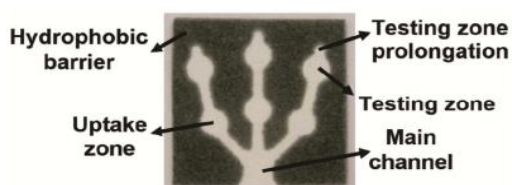
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.5** สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดกรดตุริกริก ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

Techniques	Reagents	Working range	Limit of detection (LOD)	Ref.
Colorimetric	AgNPsTMB – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.0 – 83.0 mg L <sup>-1</sup>	8.1 mg L <sup>-1</sup>	[29]
Colorimetric	Prussian blue	0.03 – 0.3 mmol L <sup>-1</sup>	0.01 mmol L <sup>-1</sup>	[30]
Chemiluminescence	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Rhodanine derivative	2.6 – 49.0 mmol L <sup>-1</sup>	1.9 mmol L <sup>-1</sup>	[31]

**2.5.4 การตรวจวัดสารบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยโรค ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ**

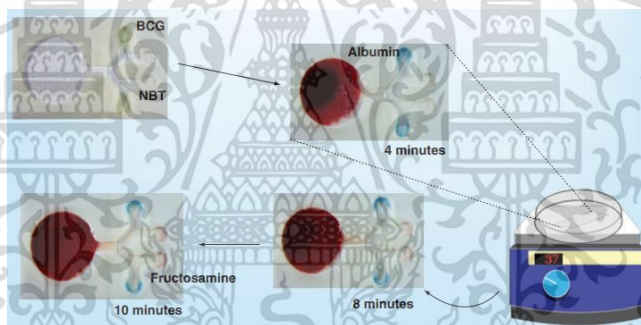
Rossini E. L. และคณะ [16] ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับวิเคราะห์ครีอะตินินและกรดตุริกริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน ดังรูป 2.19 โดยหลักการการตรวจวัดครีอะตินิน คือ ครีอะตินินจะทำปฏิกิริยากับกรดพิคริกในสารละลายเบสแก่ เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีเหลืองเป็นสีส้มแดง และสำหรับหลักการการตรวจวัดกรดตุริกริก กรดตุริกริกจะไปรีดิวซ์ Fe<sup>3+</sup> ให้เป็น Fe<sup>2+</sup> จากนั้นจะใช้เกิดปฏิกิริยากับ 1,10-อโทปีแนมโทโรลีนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง โดยช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ครีอะตินินเท่ากับ 50 ถึง 600 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 15.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กรดตุริกริกเท่ากับ 50 ถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 16.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้อดีของวิธีนี้คือ ใช้ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการวิเคราะห์ อีกทั้งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีโครมาโทกราฟี



**รูปที่ 2.19** แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับวิเคราะห์ครีอะตินินและกรดตุริกริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน [16]

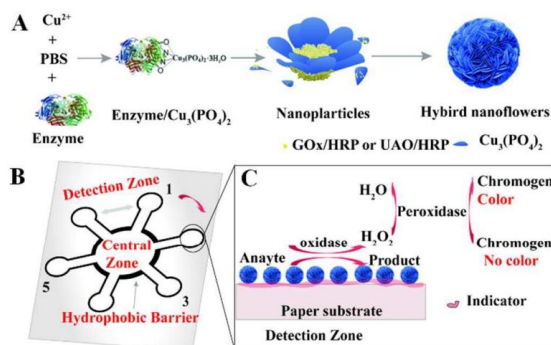
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Boonyasit Y. และคณะ [32]** พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษในการตรวจหาอัลบูมินและฟรุกโตซามีนในตัวอย่างเลือดพร้อมกันดังแสดงในรูป 2.20 หลักการตรวจวัดอาศัยการตรวจวัดสีอัลบูมินจะจับกับโบโรโมครีซอลกรีนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีฟ้า และเมื่อวางอุปกรณ์ตรวจวัดบน Hot plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ฟรุกโตซามีนในสารละลายอัลคาไลน์จะเกิดเป็น eneaminolols ไปรีดีนซ์สี่ย้อมไนโตรบลูเตตระโซลียมคลอไรด์ (Nitroblue tetrazolium chloride, NBT) และเกิดเป็นฟอร์มมาซาน (Formazan) โดยอัตราการเกิดจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟรุกโตซามีน ผลการศึกษา พบว่า อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างต่อเนื่อง เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 10 นาที โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.50 กรัมต่อเดซิลิตร และ 0.58 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรวจวัดอัลบูมินและฟรุกโตซามีน ตามลำดับ (S/N = 3) ผลการศึกษาอิทธิพลจากองค์ประกอบของตัวอย่างต่อการรบกวนการวิเคราะห์ พบว่า มีค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 95.1 ถึง 106.2 แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของตัวอย่างไม่รบกวนการตรวจวัด



รูปที่ 2.20 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดอัลบูมินและฟรุกโตซามีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ [32]

**Huang J. และคณะ [33]** ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับวิเคราะห์กลูโคสและกรดยูริกในเลือดพร้อมกัน ดังรูป 2.21 การเตรียมส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์ใช้วิธีการพิมพ์ด้วยซีพิ้ง และมีการตรึงเอนไซม์ 2 ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคสและกรดยูริกในตำแหน่ง Detection zones บนอุปกรณ์ตรวจวัดโดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนในลักษณะ Hybrid nanoflowers (HNFs) เอนไซม์ที่ใช้คือ Glucose oxidase (GOx) และ Horseradish peroxidase (HRP) สำหรับกลูโคส และสำหรับกรดยูริกใช้ Uricase (UAO) ร่วมกับ HRP จากการศึกษา พบว่า อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของกลูโคสและกรดยูริก เท่ากับ 60 และ 25 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ อีกทั้งยังสามารถผลิตได้ในราคาถูก ใช้งานง่าย มีความไวในการวิเคราะห์สูง และมีแนวโน้มที่เป็นไปได้สำหรับการทดสอบภายนอกห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 2.21 แสดงการตรวจวัดกลูโคสและกรดยูริกด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษโดยใช้ Dual-enzyme inorganic hybrid nanoflowers (HNFs) [33]

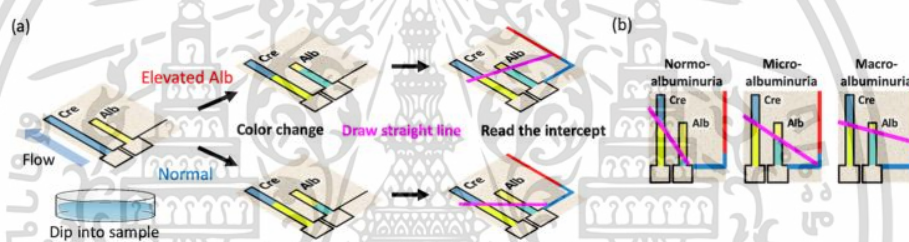
Chaiyo S. และคณะ [34] ได้ทำการตรวจวัดอัตราส่วนอัลบูมินต่อครีเอตินิน (ACR) อย่างง่ายและรวดเร็วในตัวอย่างปัสสาวะ ด้วยการใช้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ โดยใช้ Bromocresol green ใน Phosphate buffer ที่ pH 4 เป็นรีเอเจนต์ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งอัลบูมินและครีเอตินิน สารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเหลืองไปเป็นสีน้ำเงินอมเขียว และใช้กรดพิคริกที่เตรียมในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.25 โมลาร์ ในการตรวจวัดเฉพาะครีเอตินินเท่านั้น ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า ช่วงใช้งานคือ 10 ถึง 350 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 7.1 และ 5.4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร สำหรับการตรวจวัดอัลบูมิน+ครีเอตินิน และครีเอตินิน ตามลำดับ ประเมินการทำซ้ำ ได้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 8.23 (n = 10) เมื่อนำอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในการวิเคราะห์หาอัลบูมิน ครีเอตินิน และอัตราส่วนอัลบูมินต่อครีเอตินินในตัวอย่างปัสสาวะ ผลวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวัดอัลบูมิน ครีเอตินิน และอัตราส่วนอัลบูมินต่อครีเอตินินได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ ใช้งานง่าย มีความไวในการวิเคราะห์สูงและมีแนวโน้มที่ดีสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคไตเรื้อรัง (Chronic kidney disease, CKD) อุปกรณ์ตรวจวัดแสดงดังรูปด้านล่าง



รูปที่ 2.22 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดอัตราส่วนอัลบูมินต่อครีเอตินิน (ACR) อย่างง่ายและรวดเร็วในตัวอย่างปัสสาวะ [34]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hiraoka R. และคณะ [35] นำเสนออุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษในรูปแบบของ Drawing-PADs เพื่อประเมินค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของอัลบูมินต่อครีอะตินินในปัสสาวะ โดยสามารถประเมินอัตราส่วนดังกล่าวด้วยตาเปล่า อาศัยหลักการ Distance-based measurement วัดระยะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีบนกระดาษ โดยอัลบูมินจะทำปฏิกิริยากับ Tetrabromophenol blue (TBPB) ในสภาวะของ Citrate buffer pH 3.0 เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีเหลืองเป็นสีฟ้า และครีอะตินินจะเข้าไปแทนที่ Chrome azurol S (CAS) ในสารเชิงซ้อน Palladium(II)-CAS ( $\text{Pd}^{2+}$ -CAS) ที่มีสีฟ้า เกิดการแลกเปลี่ยนลิแกนด์เป็น  $\text{Pd}^{2+}$ -Creatinine ซึ่งมีสีเหลือง โดยระยะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอัลบูมินและครีอะตินินเพิ่มขึ้น การประเมินอัตราส่วนความเข้มข้นของอัลบูมินต่อครีอะตินินในปัสสาวะทำได้โดยการวาดเส้นตรงที่เชื่อมต่อด้านบนของช่องสำหรับตรวจวัดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีสองส่วน (ช่องอัลบูมินและครีอะตินิน) และพิจารณาตำแหน่งจุดตัดแกนของเส้นตรงที่วาด ดังรูป 2.23

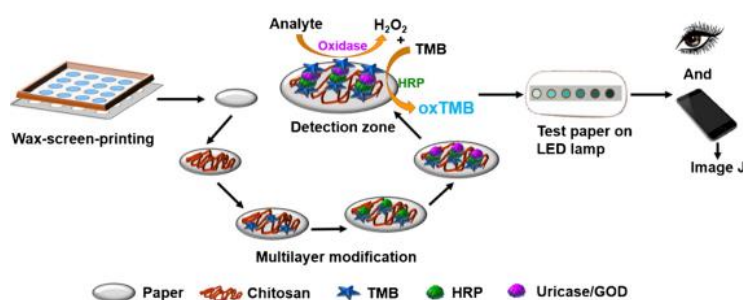


รูปที่ 2.23 แสดงหลักการการทำงานของ Drawing-PADs สำหรับประเมินอัตราส่วนความเข้มข้นของอัลบูมินต่อครีอะตินินในปัสสาวะ [35]

Wang X. และคณะ [36] ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่ใช้กระดาษแบบหลายชั้น เพื่อช่วยเพิ่มความสม่ำเสมอและความเข้มของสีของผลิตภัณฑ์บนกระดาษที่เกิดขึ้น โดยในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดยูริกและกลูโคส โดยใช้โคโตซาน, สารเคมีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ และ Horseradish peroxidase (HRP) ร่วมกับเอนไซม์ออกซิเดส เช่น Uricase หรือ Glucose oxidase (GOD) ซึ่งถูกตรึงบนพื้นผิวกระดาษ ดังแสดงในรูป 2.24 โดย Oxidase (Uricase หรือ GOD) จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (กรดยูริกหรือกลูโคส) ทำให้เกิดสีของผลิตภัณฑ์ และนำกระดาษวางไว้ที่ด้านบนของหลอด LED เพื่อป้องกันผลกระทบจากแสงภายนอกแล้วทำการถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ด้วยกล้องสมาร์ทโฟน จากนั้นคำนวณค่าสีเทา (Gray scale) เพื่อทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป พบว่า ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ตั้งแต่ 0.01 ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกรดยูริก และ 0.02 ถึง 4.0 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกลูโคส ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.003 และ 0.014 มิลลิโมลาร์ สำหรับกรดยูริกและกลูโคส ตามลำดับ อุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้กับการตรวจหากรดยูริกและกลูโคสในตัวอย่างจริงได้ และยังมีแนวโน้มจะทำการวิเคราะห์แบบ POCT ได้อีกด้วย

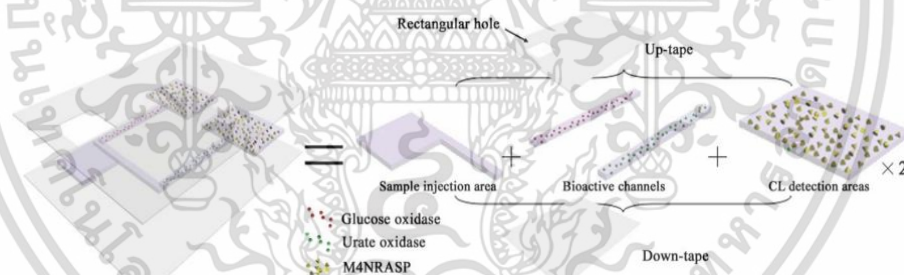
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังประชาชนด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.24 แสดงการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีสำหรับหาปริมาณกรดยูริกและกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบหลายชั้น [36]

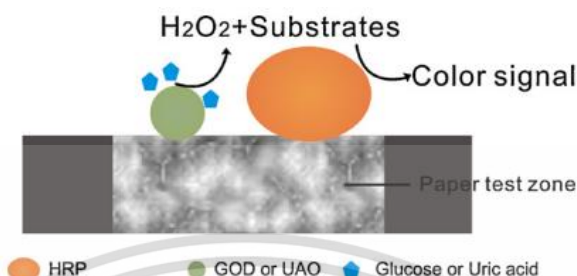
Yu J. และคณะ [37] ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณกลูโคสและกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน ดังรูป 2.25 โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและกรดยูริกกับเอนไซม์ Glucose oxidase และ Urate oxidase เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ที่จะทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์ของโรดามีนในสารละลายยกรด แล้วตรวจวัดการเรืองแสงทางเคมีต่อไป พบว่า อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษนี้สามารถเก็บไว้ใช้งานได้นานถึง 10 สัปดาห์ หากเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.25 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณกลูโคสและกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน [37]

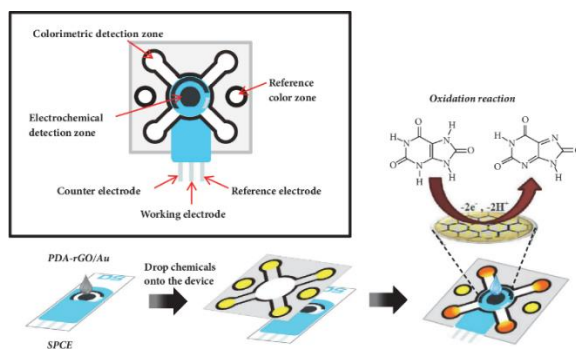
Chen X. และคณะ [38] ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษเพื่อตรวจหาปริมาณกลูโคสและกรดยูริก โดยใช้การตรวจวัดสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น หลักการตรวจวัดแสดงดังรูปที่ 2.26 อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและกรดยูริกกับ Glucose oxidase และ Uricase ตามลำดับ เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ซึ่งจะไปจับกับ Substrates และ Horseradish peroxidase (HRP) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี และจะถูกบันทึกโดยเครื่องถ่ายภาพสำหรับวิเคราะห์เจลและกล้องถ่ายภาพทั่วไป โดยเครื่องถ่ายภาพที่วิเคราะห์เจล ให้ชัดเจนที่สุดในการตรวจวัดของกลูโคสและกรดยูริกเท่ากับ  $3.81 \times 10^{-5}$  และ  $4.31 \times 10^{-5}$  โมลาร์ ตามลำดับ แต่เมื่อใช้กล้องถ่ายภาพทั่วไปพบว่า มีความเอกซารนี้เป็นเอกซารที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวในการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า กล่าวคือ มีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของกลูโคสและกรดยูริกเท่ากับ  $2.13 \times 10^{-4}$  และ  $2.87 \times 10^{-4}$  โมลาร์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้งานง่าย ต้นทุนต่ำ รวดเร็ว และมีความไวในการวิเคราะห์สูง



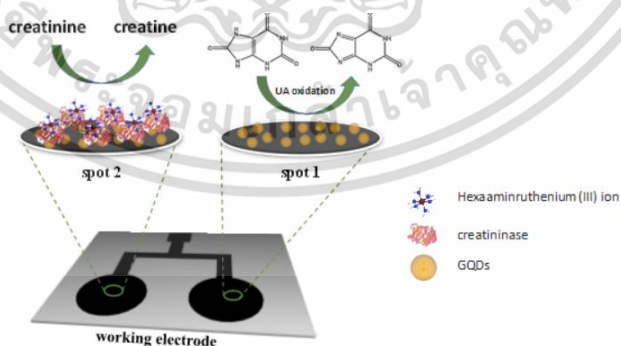
รูปที่ 2.26 แสดงการตรวจวัดกลูโคสและกรดยูริกด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษโดยการตรวจวัดสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น [38]

Income, K. และคณะ [39] ได้นำเสนอวิธีการตรวจวัดอัตราส่วนระหว่างกรดยูริกและครีเอตินินในปัสสาวะ เพื่อช่วยแยกความแตกต่างของโรคไตที่เกิดจากกรดยูริกสูงเฉียบพลัน และจากภาวะไขมันในเลือดสูงที่ทำให้เกิดไตวายได้ โดยปกติอัตราส่วนนี้จะมากกว่า 0.9 ในโรคไตที่จะมีกรดยูริกสูงเฉียบพลัน และน้อยกว่า 0.7 ในภาวะไขมันในเลือดสูง ซึ่งในงานวิจัยนี้ ได้ทำการพัฒนาขั้วนาโนคอมโพสิตกราฟีนออกไซด์ - ทอง ที่พิมพ์ด้วยเทคนิค Screen-printed แบบใช้แล้วทิ้ง เพื่อการวิเคราะห์กรดยูริก และใช้ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษในการตรวจวัดครีเอตินิน ที่มีความไวในการวิเคราะห์สูง มีความจำเพาะเจาะจง ง่าย และรวดเร็ว โดยภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการใช้ Screen-printed electrode ที่พัฒนาขึ้นนี้ ให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ ในช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง (2.5 - 1,000 ไมโครโมลาร์) โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด เท่ากับ 0.74 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ยังไม่มีการรบกวนจากตัวรบกวนต่าง ๆ ในปัสสาวะ สำหรับการตรวจวัดครีเอตินินจะใช้ปฏิกิริยาจากฟิโพรระหว่างครีเอตินินและกรดพิคริกในสภาวะเบส สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มแดงเมื่อมีครีเอตินิน และความเข้มของสีส้มแดงที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณครีเอตินิน ในช่วงความเป็นเส้นตรง 0.20 ถึง 6.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด เท่ากับ 180 ไมโครโมลาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดยูริก และครีเอตินินในปัสสาวะภายในคราวเดียวกันได้ อุปกรณ์ที่เสนอดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 2.27 แสดงการตรวจวัดกรดยูริกและครีอะตินินในปัสสาวะภายในคราวเดียวกันด้วย Screen-printed electrode [39]

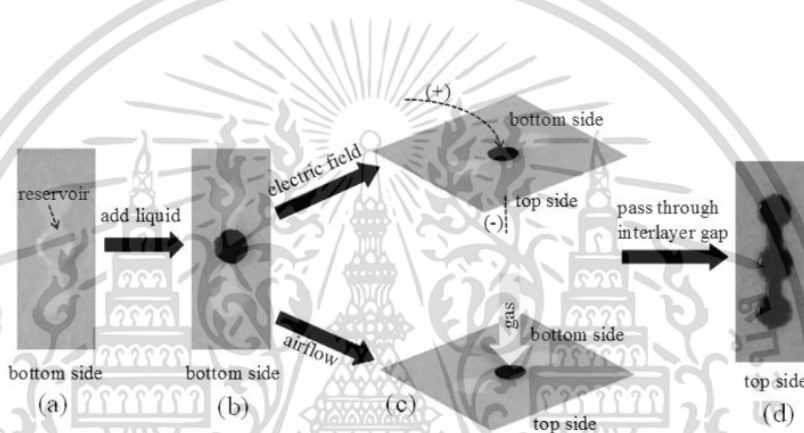
Cincotto F. H. และคณะ [40] ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้แล้วทิ้งอาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้าในการตรวจวัด ซึ่งจะประกอบไปด้วยเซ็นเซอร์ตรวจวัดสองจุดในช่วงใช้งานอันเดียว สำหรับการวิเคราะห์กรดยูริกและครีอะตินินภายในคราวเดียวกัน โดยแสดงดังรูป 2.28 ในการตรวจวัดกรดยูริก พื้นผิวของจุดที่ 1 ถูกดัดแปลงด้วย Graphene quantum dots เพื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดยูริกโดยตรง และสำหรับการตรวจวัดครีอะตินิน พื้นผิวจุดที่ 2 ถูกดัดแปลงด้วย Creatininase และ Ruthenium electrochemical mediator สำหรับการวิเคราะห์ จะใช้หลักการ Square wave voltammetry ในการวิเคราะห์หากรดยูริกและครีอะตินินพร้อมกัน ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ในช่วง 0.010 ถึง 3.0 ไมโครโมลต่อลิตร อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดี ชีตจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเป็น 8.4 และ 3.7 นาโนโมลต่อลิตร สำหรับกรดยูริกและครีอะตินิน ตามลำดับ อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์สูง ให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กรดยูริก และครีอะตินินในตัวอย่างปัสสาวะได้



รูปที่ 2.28 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้แล้วทิ้งอาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้าในการตรวจวัด สำหรับการวิเคราะห์กรดยูริกและครีอะตินินภายในคราวเดียวกัน [40]

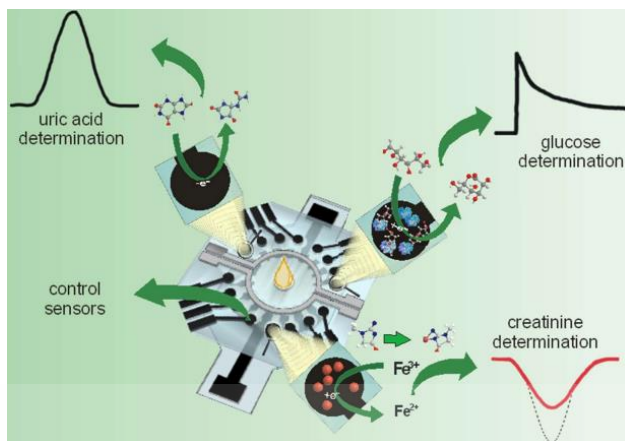
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fu, X. และคณะ [41] ได้นำเสนออุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 3 มิติ (3D- $\mu$ PAD) ดังรูป 2.29 ที่ใช้เทคโนโลยีการพิมพ์ 3 มิติโดยอัตโนมัติ ในกระบวนการผลิตจะมีการตั้งค่าการหยุดการพิมพ์ระหว่างสองชั้น เพื่อวางกระดาษลงในถังเรซิน ซึ่งเรซินบนกระดาษจะถูกยึดติดกับชั้นกระดาษเกิดการยึดและการจัดแนวระหว่างชั้นกระดาษโดยอัตโนมัติ ในงานวิจัยนี้จะใช้สนามไฟฟ้าและกระแสลมกระตุ้นการไหลของของเหลว และแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการควบคุมการไหลโดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสี ชีตจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดกลูโคสและอัลบูมินเท่ากับ 0.8 และ 3.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอสำหรับข้อกำหนดทางคลินิก และเมื่อพิจารณาถึงคุณลักษณะของอุปกรณ์ พบว่า 3D- $\mu$ PAD ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีศักยภาพที่ดีในการทำการตรวจวัดที่ซับซ้อนบนกระดาษโดยอัตโนมัติและสามารถตั้งโปรแกรมตามต้องการได้



รูปที่ 2.29 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 3 มิติ (3D- $\mu$ PAD) สำหรับตรวจวัดกลูโคสและอัลบูมิน [41]

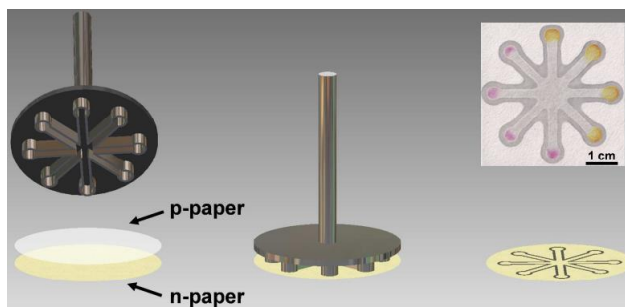
Fava E. L. และคณะ [42] ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้แล้วทิ้งอาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical paper-based device, ePAD) โดยผู้ใช้งานจะทำงานแบบมัลติเพล็กซ์ ซึ่งอุปกรณ์ประกอบด้วยช่องทางการไหลขนาดเล็กจำนวน 16 ช่อง มีขั้วไฟฟ้า 16 ตัวจัดเรียงกันสำหรับตรวจหา กลูโคส, ครีเอตินิน และกรดยูริก โดยหลักการตรวจวัดกลูโคสอาศัยการถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดย Ferrocene carbonic acid บนพื้นผิวที่ปรับปรุงด้วย Glucose oxidase, ครีเอตินินติดตามปฏิกิริยารีดักชันของ  $Fe^{3+}$  ที่เหลือ และสำหรับกรดยูริกติดตามกระแส Anode ที่เกิดขึ้นบนขั้วทำงานที่พื้นผิวทำการดัดแปลงด้วย Carbon black nanoparticles ดังรูป 2.30 ในการวิเคราะห์แบบมัลติเพล็กซ์นั้น มีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.120, 0.084 และ 0.012 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกลูโคส, ครีเอตินิน และกรดยูริก ตามลำดับ อีกทั้งยังสามารถนำอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 2.30 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบใช้แล้วทิ้งสำหรับตรวจหากรูโคส, ครีเอตินิน และ กรดยูริก [42]

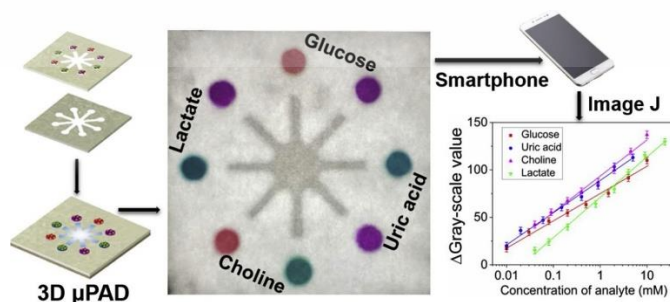
Garcia, P.T. และคณะ [43] ได้นำเสนอถึงการใช้ตราประทับแบบพกพาและน้ำหนักเบา สำหรับสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ ร่วมกับการปรับเปลี่ยนพื้นผิวกระดาษทางเคมีเพื่อการตรวจวัดค่าสีที่ดีขึ้น ดังรูป 2.31 รูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษถูกสร้างขึ้นโดยวิธีการประทับตรา โดยก่อนประทับตรา พื้นผิวกระดาษจะถูกออกซิไดซ์ เพื่อกระตุ้นการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อัลดีไฮด์ เพื่อให้ตรึงเอนไซม์ลงบนกระดาษได้ดีขึ้น จากนั้นกระดาษกรองจะถูกชุบด้วย พาราฟิน และประกบด้วย Native paper (n-paper) ที่ถูกออกซิไดซ์ก่อนหน้านี้ ตราประทับโลหะจะถูกทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปสัมผัสกับกระดาษชุบพาราฟิน (P-paper) เพื่อให้เกิดการถ่ายเทความร้อนจาก p-paper ไปยัง n-paper จากนั้นสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ภายใต้แรงดัน 0.1 เมกะปาสคาล เป็นเวลา 2 วินาที ความกว้างของช่องทางการไหลและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เท่ากับ  $2.6 \pm 0.1$  และ  $1.4 \pm 0.1$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) สำหรับการตรวจวัดกลูโคสและกรดยูริกลดลงจาก 40 เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ และจาก 20 เป็น 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นเพราะมีการดัดแปลงพื้นผิวของกระดาษก่อนทำการตรึงเอนไซม์ สรุปได้ว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปตรวจวัดกลูโคส, กรดยูริก, อัลบูมิน และไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้นเดียวกับวิธีมาตรฐานทางคลินิกได้ และเมื่อทำการวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิดเชิงกึ่งปริมาณ พบว่า มีความผิดพลาดน้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษนี้ มีความสะดวกทั้งในขั้นตอนการผลิต และการใช้งาน อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัย ณ จุดข้างเตียงผู้ป่วยนอกห้องปฏิบัติการได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.31 แสดงการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับกลูโคส, กรดยูริก, อัลบูมิน และไนไตรต์ โดยวิธีการประทับตรา [43]

Li, F. และคณะ [44] นำเสนออุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบสองชั้น (Double-layered microfluidic paper-based device) ที่ใช้อินดิเคเตอร์หลายชนิดสำหรับตรวจวัดกลูโคส, กรดยูริก, แลคเตท และโคลีนภายในคราวเดียวกัน อุปกรณ์ตรวจวัดประกอบด้วย ชั้นบน (Detection layer) สำหรับการตรวจวัด และชั้นล่าง (Auxiliary layer) ที่มีช่องทางการไหลแบบ 3 มิติ พื้นที่ตรวจวัดบน detection layer มีการตรึงรีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดสี, เอนไซม์ต่าง ๆ (Glucose oxidase, Uricase, Lactate oxidase และ Choline oxidase) และ Horseradish peroxidase (HRP) ซึ่งรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดสีที่ถูกตรึงไว้นั้น จะถูกออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์กับ analytes แต่ละตัว โดยมี HRP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีสีแตกต่างกันตามชนิดของสารที่วิเคราะห์ จากการศึกษาค้นคว้ามาตรฐานสำหรับการตรวจวัดกลูโคส, กรดยูริก, แลคเตท และโคลีน มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01 ถึง 10.0, 0.01 ถึง 5.0, 0.04 ถึง 10.0 และ 0.04 ถึง 24.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.003, 0.005, 0.03 และ 0.01 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดที่ดี มีความไวในการวิเคราะห์สูง ช่วงการวิเคราะห์กว้าง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสารทั้ง 4 ชนิดในตัวอย่างจริงได้ โดยอุปกรณ์ตรวจวัดและการใช้งานแสดงดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 2.32 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหา กลูโคส, กรดยูริก, แลคเตท และโคลีนภายในคราวเดียวกัน [44]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (มากกว่า 1 ตัว) ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

Simultaneous determination	Working range	Limit of detection (LOD)	Ref.
(1) Creatinine	(1) 50 – 600 mg L <sup>-1</sup>	(1) 15.7 mg L <sup>-1</sup>	[16]
(2) Uric acid	(2) 50 – 500 mg L <sup>-1</sup>	(2) 16.5 mg L <sup>-1</sup>	
(1) Fructosamine	(1) 1.61 – 2.68 mmol L <sup>-1</sup>	(1) 0.58 mmol L <sup>-1</sup>	[32]
(2) Albumin	(2) 3.5 – 5.5 g dL <sup>-1</sup>	(2) 0.50 g dL <sup>-1</sup>	
(1) Glucose	(1) 0.1 – 2.0 mmol L <sup>-1</sup>	(1) 60 µmol L <sup>-1</sup>	[33]
(2) Uric acid	(2) 0.1 – 10.0 mmol L <sup>-1</sup>	(2) 25 µmol L <sup>-1</sup>	
(1) Albumin	(1) 10 – 350 mg dL <sup>-1</sup>	(1) 7.1 mg dL <sup>-1</sup>	[34]
(2) Creatinine	(2) 10 – 350 mg dL <sup>-1</sup>	(2) 5.4 mg dL <sup>-1</sup>	
(1) Albumin	(1) 0 – 1000 mg L <sup>-1</sup>	-	[35]
(2) Creatinine	(2) 0 – 3000 mg L <sup>-1</sup>		
(1) Uric acid	(1) 0.01 – 1.0 mmol L <sup>-1</sup>	(1) 0.003 mmol L <sup>-1</sup>	[36]
(2) Glucose	(2) 0.02 – 4.0 mmol L <sup>-1</sup>	(2) 0.014 mmol L <sup>-1</sup>	
(1) Uric acid	(1) 1.4 – 47.0 mmol L <sup>-1</sup>	(1) 0.14 mmol L <sup>-1</sup>	[37]
(2) Glucose	(2) 0.42 – 50 mmol L <sup>-1</sup>	(2) 0.52 mmol L <sup>-1</sup>	
(1) Uric acid	(1) 3.0 × 10 <sup>-4</sup> – 1.0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>	(1) 2.87 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	[38]
(2) Glucose	(2) 3.0 × 10 <sup>-4</sup> – 1.0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>	(2) 2.13 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	
(1) Uric acid	(1) 2.5 – 1000 µmol L <sup>-1</sup>	(1) 0.74 µmol L <sup>-1</sup>	[39]
(2) Creatinine	(2) 0.20 – 6.0 mmol L <sup>-1</sup>	(2) 180 µmol L <sup>-1</sup>	
(1) Uric acid	(1) 0.010 – 3.0 µmol L <sup>-1</sup>	(1) 8.4 nmol L <sup>-1</sup>	[40]
(2) Creatinine	(2) 0.010 – 3.0 µmol L <sup>-1</sup>	(2) 3.7 nmol L <sup>-1</sup>	
(1) Glucose	(1) 1 – 20 mmol L <sup>-1</sup>	(1) 0.8 mmol L <sup>-1</sup>	[41]
(2) Albumin	(2) 4 – 40 µmol L <sup>-1</sup>	(2) 3.5 µmol L <sup>-1</sup>	
(1) Glucose	(1) 0.625 – 20 mmol L <sup>-1</sup>	(1) 0.120 mmol L <sup>-1</sup>	[42]
(2) Creatinine	(2) 0.106 – 4.500 mmol L <sup>-1</sup>	(2) 0.084 mmol L <sup>-1</sup>	
(3) Uric acid	(3) 0.05 – 3.00 mmol L <sup>-1</sup>	(3) 0.012 mmol L <sup>-1</sup>	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 สรุปการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (มากกว่า 1 ตัว) ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (ต่อ)

Simultaneous determination	Working range	Limit of detection (LOD)	Ref.
(1) Nitrite	(1) 0 – 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(1) 13.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$	[43]
(2) Glucose	(2) 0 – 12 $\text{mmol L}^{-1}$	(2) 0.7 $\text{mmol L}^{-1}$	
(3) Uric acid	(3) 0 – 5 $\text{mmol L}^{-1}$	(3) 0.3 $\text{mmol L}^{-1}$	
(1) Glucose	(1) 0.01 – 15.00 $\text{mmol L}^{-1}$	(1) 0.003 $\text{mmol L}^{-1}$	[44]
(2) Uric acid	(2) 0.01 – 8.00 $\text{mmol L}^{-1}$	(2) 0.005 $\text{mmol L}^{-1}$	
(3) Lactate	(3) 0.04 – 24.00 $\text{mmol L}^{-1}$	(3) 0.03 $\text{mmol L}^{-1}$	
(4) Choline	(4) 0.04 – 13.00 $\text{mmol L}^{-1}$	(4) 0.01 $\text{mmol L}^{-1}$	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

##### 3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ยี่ห้อและประเทศผู้ผลิต
อัลบูมิน (Albumin)	N/A	Sigma-Aldrich, USA
กรดอะซิติก (Acetic acid)	CH <sub>3</sub> COOH	Carlo erba, France
โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate)	CH <sub>3</sub> COONa	RANKEM, India
เตตระโบรมอฟีนอล์ฟทาลีนเอธิลเอสเทอร์ (Tetrabromophenolphthalein ethyl ester, TBPE)	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, USA
ไตรทอน เอกซ์-100 (Triton X-100)	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>9-10</sub>	Sigma-Aldrich, USA
ครีเอตินิน (Creatinine)	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	Sigma-Aldrich, USA
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	NaOH	RANKEM, India
กรดพิคริก (Picric acid)	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Merck, USA
กรดยูริก (Uric acid)	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, USA
โพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide)	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Carlo erba, France
เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride)	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, USA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคส (Glucose)	$C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich, USA
ยูเรีย (Urea)	$CH_4N_2O$	Honeywell, Germany
กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)	$C_6H_8O_6$	Sigma-Aldrich, USA
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	NaCl	Loba chemie, India
แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride)	$NH_4Cl$	Carlo erba, France
โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)	KCl	ChemeX, USA
แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate)	$MgSO_4$	Sigma-Aldrich, USA

### 3.1.2 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือตรวจวัด

1. ขวดวัดปริมาตร	ขนาด	10.0	มิลลิลิตร	12	ขวด
	ขนาด	25.0	มิลลิลิตร	2	ขวด
	ขนาด	50.0	มิลลิลิตร	3	ขวด
	ขนาด	100.0	มิลลิลิตร	3	ขวด
2. ปีกเกอร์	ขนาด	25.0	มิลลิลิตร	10	ใบ
	ขนาด	50.0	มิลลิลิตร	4	ใบ
	ขนาด	100.0	มิลลิลิตร	1	ใบ
3. ไมโครปิเปต	ปริมาตร	0.5 – 10	ไมโครลิตร		
	ปริมาตร	20 – 200	ไมโครลิตร		
4. หลอดทดลอง	ขนาด	13 x 100		33	หลอด
5. หลอดหยด					
6. แท่งแก้วคนสาร					
7. กระจกนาฬิกา					
8. กระดาษกรอง Whatman™ เบอร์ 1					
9. หมึกกันน้ำตราม้าสีดำ	ขนาด	30	มิลลิลิตร		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ทรายาง สำหรับสร้างลวดลายอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ
11. ไดร์เป่าผม - Panasonic Hair dryer 1200 วัตต์ รุ่น EH-ND51
12. สแตนดาร์ดพร้อมที่จับ
13. กล้องสตูดิโอสำหรับถ่ายรูป
14. เครื่องวัด pH - Mettler Toledo, FEP20
15. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง - Ohaus Model: PA214, USA
16. เครื่องทำน้ำปราศจากไอออน (DI water) Zeneer up 9000
17. โทรศัพท์มือถือ (iPhone SE และ iPhone 11 pro)

## 3.2 การเตรียมสารละลาย

### 3.2.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการตรวจวัดอัลบูมิน

#### 3.2.1.1 สารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 5, 50, 100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งอัลบูมิน 0.0500 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เป็น 50.0 มิลลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเปิดสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.05, 0.5 และ 1 มิลลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 5, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 3.2.1.2 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 3.2

- เตรียมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยตวงกรดอะซิติก ร้อยละ 98 โดยน้ำหนัก 1.14 มิลลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้เป็น 100.0 มิลลิตร

- เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ชั่งโซเดียมอะซิเตท 2.7216 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 100.0 มิลลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

- ผสมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 98.23 มิลลิตร กับสารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 1.77 มิลลิตร จากนั้นทำการวัดค่าพีเอช แล้วปรับพีเอชให้เป็น 3.2 ด้วยกรดอะซิติกหรือโซเดียมอะซิเตท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.1.3 สารละลายเตตระโบรโมฟีนอล์ฟทาซีนเอธิลเอสเทอร์ (TBPE) ความเข้มข้น $5 \times 10^{-4}$ โมลาร์

ละลาย 0.0088 กรัม TBPE ด้วยไททรอนเอ็กซ์-100 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล ร้อยละ 98 โดยปริมาตร จนได้ 25.0 มิลลิลิตร

## 3.2.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการตรวจวัดครีอะตินิน

### 3.2.2.1 สารละลายมาตรฐานครีอะตินิน ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งครีอะตินิน 0.0500 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เป็น 50.0 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานครีอะตินิน ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายมาตรฐานครีอะตินิน ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 3.2.2.2 สารละลายกรดพิคริก ความเข้มข้น 0.052 โมลาร์

ชั่งกรดพิคริก 0.2978 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร บ่นกวน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปกรอง จะได้สารละลายกรดพิคริก ความเข้มข้น 0.052 โมลาร์

### 3.2.2.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร

### 3.2.2.4 สารละลายพิเครท ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ในสารละลาย 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์

ผสมสารละลายกรดพิคริก ความเข้มข้น 0.052 โมลาร์ ปริมาตร 4.81 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10.0 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.3 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการตรวจวัดกรดยูริก

#### 3.2.3.1 สารละลายมาตรฐานกรดยูริก ความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ชั่งกรดยูริก 0.2500 กรัม ละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เป็น 50.0 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดยูริก ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดยูริก ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ปริมาตร 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายมาตรฐานกรดยูริกความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ

#### 3.2.3.2 สารละลายโพแทสเซียมเพอริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

ละลายโพแทสเซียมเพอริกไซยาไนด์ 0.0329 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรให้ได้ 10.0 มิลลิลิตร

#### 3.2.3.3 สารละลายเพอริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

ชั่งเพอริกคลอไรด์ 0.0162 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้เป็น 10.0 มิลลิลิตร

### 3.2.4 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาชนิดของตัวรับกวน

#### 3.2.4.1 สารละลายยูเรีย ความเข้มข้น 20000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งยูเรีย 0.2 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 10.0 มิลลิลิตร

#### 3.2.4.2 สารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

1. ชั่งกลูโคส 0.0025 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 10.0 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ปิเปตสารละลายในข้อ 1 ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร และปรับปริมาตรจนเป็น 10.0 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.4.3 สารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

1. ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.0025 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 10.0 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายในข้อ 1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร และปรับปริมาตรจนเป็น 10.0 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

### 3.2.4.4 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 10.0 มิลลิลิตร

### 3.2.4.5 สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.03 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 10.0 มิลลิลิตร

### 3.2.4.6 สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.03 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 10.0 มิลลิลิตร

### 3.2.4.7 สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.03 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 10.0 มิลลิลิตร

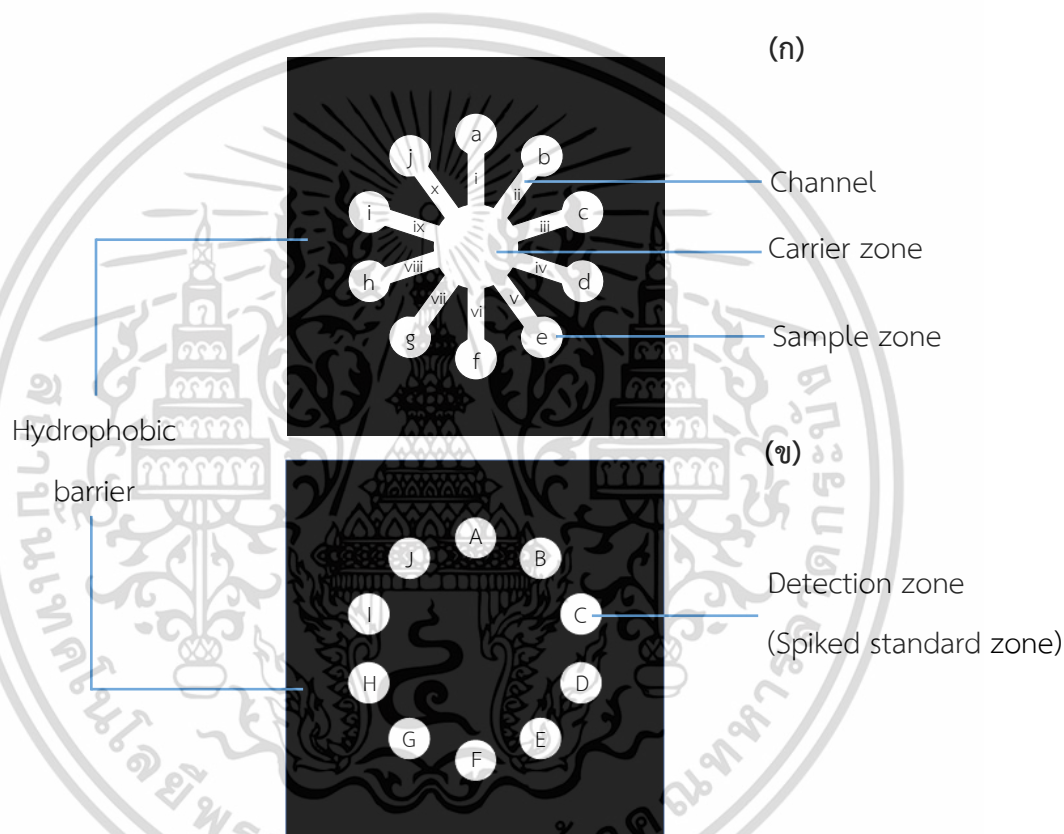
## 3.3 การเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัด

ในงานวิจัยนี้ ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาค สำหรับหาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน เป็นรูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.1 การออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

ในงานวิจัยนี้ พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 2 ชั้น (Double-layered  $\mu$ PAD) ได้แก่ Auxiliary layer ใช้สำหรับหยดตัวอย่างปัสสาวะและสารละลายตัวพา โดยชั้นนี้จะทำหน้าที่กรองและคัดแยกสิ่งเจือปน ซึ่งอาจเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ออกจากตัวอย่างปัสสาวะ และ Detection layer ใช้สำหรับการตรวจวัดโดยการถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษ รายละเอียดการออกแบบ และการสร้างลวดลายบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ จะใช้วิธีการประทับตรา (Stamping) ด้วยหมึกกันน้ำ ซึ่งได้ออกแบบเป็น 2 ลวดลาย ดังรูป 3.1 (ก) และ (ข)



รูปที่ 3.1 แสดงลวดลายบนอุปกรณ์การตรวจวัดบนกระดาษ

สำหรับส่วนตรวจวัดที่เป็น (ก) Auxiliary layer (ข) Detection layer

อุปกรณ์ดังรูปที่ 3.1 เตรียมโดยขั้นตอนดังนี้

1. หยดหมึกกันน้ำลงบนตราของ Detection layer ไว้จนกว่าหมึกจะเต็มตรา จากนั้นใช้กระดาษทิชชูซับน้ำหมึกส่วนเกินออก

2. นำตราไปประทับลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยให้น้ำหมึกกันน้ำซึมทะลุผ่านจากด้านหน้าไปยังด้านหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำกระดาษที่ทำการประทับตราแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที
4. ทำชั้นตอนที่ 1-3 ซ้ำ แต่เปลี่ยนทรายางเป็นของส่วนที่จะผลิต Auxiliary layer

### 3.3.2 การเตรียม $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัด

ทำการตรึงสารละลายเคมีสำหรับตรวจวัดลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษชั้น Detection layer ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 ขั้นตอนการหยดรีเอเจนต์เพื่อการตรวจวัด

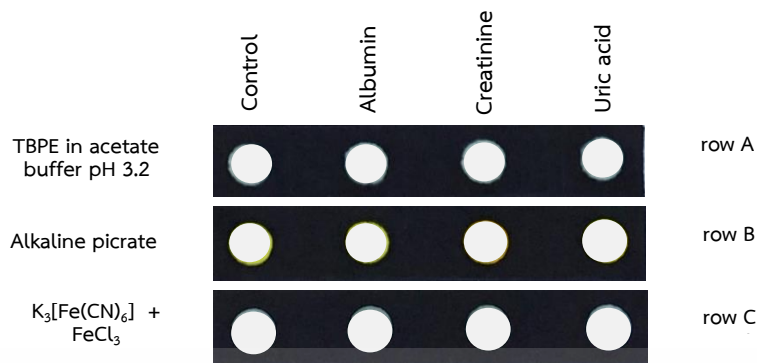
ตำแหน่ง	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	รอบที่ 5
B, C, D (สำหรับ Albumin)	1.5 $\mu$ L TBPE	1.5 $\mu$ L TBPE	1.5 $\mu$ L Acetate buffer pH 3.2	1.5 $\mu$ L Acetate buffer pH 3.2	1.5 $\mu$ L Std. albumin (5, 50, 100 mg L <sup>-1</sup> , respectively)
E, F, G (สำหรับ Creatinine)	1.5 $\mu$ L Alkaline picrate	1.5 $\mu$ L Alkaline picrate	-	-	1.5 $\mu$ L Std. creatinine (100, 500, 1000 mg L <sup>-1</sup> , respectively)
H, I, J (สำหรับ Uric acid)	1.5 $\mu$ L FeCl <sub>3</sub>	1.5 $\mu$ L FeCl <sub>3</sub>	1.5 $\mu$ L FeCl <sub>3</sub>	-	1.5 $\mu$ L K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] + Std. uric acid (5, 25, 50 mg dL <sup>-1</sup> , respectively)

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การศึกษา Cross-Reactivity

ทำการการศึกษา Cross-reactivity ของการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก บนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่ได้ออกแบบ ดังรูป 3.2 โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับศึกษา cross-reactivity

1. หยดสารละลาย TBPE ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงบนช่องสำหรับตรวจวัดแถว A
2. หยดสารละลายพิเครท ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงบนช่องสำหรับตรวจวัดแถว B
3. หยดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงบนช่องสำหรับตรวจวัดแถว C
4. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที
5. ทำการทดลองข้อ 1 – 4 ซ้ำ 1 ครั้ง
6. หยดสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 3.2 ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงบนช่องสำหรับตรวจวัดแถว A
7. หยดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงบนช่องสำหรับตรวจวัดแถว C
8. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที
9. ทำการทดลองข้อ 6 และ 8 ซ้ำ 1 ครั้ง
10. หยดสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรลงบนแถว C
11. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที
12. หยดสารละลายมาตรฐานอัลบูมินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, ครีเอตินีนความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดยูริกความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ลงในช่องที่ 2, 3 และ 4 ของทุกแถว ตามลำดับ
13. ถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
14. ทำการทดลองข้อ 1 – 13 ซ้ำ 1 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.2 ศึกษาสถานะที่เหมาะสม

#### 3.4.2.1 ปริมาตรของสารละลายที่เหมาะสม

##### (ก) สารละลายตัวพา

1. ปิเปตสารละลายสีผสมอาหารสีแดง ปริมาตร 80, 85, 90, 95, 100, 105 และ 110 ไมโครลิตร หยดลงบริเวณ Carrier zone บน Auxiliary layer ตามลำดับ
2. สังเกตการแพร่ของสารละลายจาก Auxiliary layer ลงไปสู่ Detection layer และทำการถ่ายภาพด้วยกล้องจากโทรศัพท์มือถือ
3. ทำการทดลองข้อ 1 และ 2 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

##### (ข) สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายสีผสมอาหารสีแดงหยดลงบริเวณ Detection zone บน Detection layer ที่ตำแหน่ง A - J ปริมาตร 1, 1.5 และ 2.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ
2. สังเกตการแพร่ของสารละลายใน Detection zone แต่ละตำแหน่ง และทำการถ่ายภาพด้วยกล้องจากโทรศัพท์มือถือ
3. ทำการทดลองข้อ 1 และ 2 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

##### (ค) สารละลายมาตรฐานที่ใช้เป็น Spiked standard

1. ปิเปตสารละลายสีผสมอาหารสีแดงหยดลงบริเวณ Detection zone บน Detection layer ที่ตำแหน่ง A - J ปริมาตร 1, 1.5 และ 2.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ
2. สังเกตการแพร่ของสารละลายใน Detection zone แต่ละตำแหน่ง และทำการถ่ายภาพด้วยกล้องจากโทรศัพท์มือถือ
3. ทำการทดลองข้อ 1 และ 2 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

#### 3.4.2.2 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ

เตรียม  $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัดตามหัวข้อ 3.3.2 จากนั้นทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ประกอบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษทั้ง 2 ชั้นให้แนบสนิท และปิเปตสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิกรัมต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตรต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง a - j และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ปิเปิดน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที จากนั้นทำการถ่ายรูป Detection layer ด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และประมวลผลความเข้มสีด้วย ImageJ™

3. ทำการทดลองเหมือนข้อ 1 – 2 แต่เปลี่ยนจากรอให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นนำ  $\mu$ PAD เข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที ตามลำดับ

### 3.4.2.3 การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการแพร่ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบน

#### กระดาษ

เตรียม  $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัดตามหัวข้อ 3.3.2 จากนั้นทำการศึกษาอิทธิพลของเวลาในการแพร่ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ประกอบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษทั้ง 2 ชั้นให้แนบสนิท และปิเปิดสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิลิตรต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิลิตรต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150 มิลลิลิตรต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง a - j และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ปิเปิดน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดการแพร่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที วางทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นทำการถ่ายรูป Detection layer ด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และประมวลผลความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ™

3. ทำการทดลองเหมือนข้อ 1 – 2 แต่เปลี่ยนจากรอให้เกิดการแพร่ 1 นาที เป็น 2, 3 และ 4 นาที ตามลำดับ

### 3.4.2.4 การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการถ่ายรูป

เตรียม  $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัดตามหัวข้อ 3.3.2 จากนั้นทำการศึกษาอิทธิพลของเวลาในการถ่ายรูป ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ประกอบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษทั้ง 2 ชั้นให้แนบสนิท และปิเปิดสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิลิตรต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิลิตรต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150 มิลลิลิตรต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง a - j และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปิเปิดน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที วางทิ้งไว้ 30 วินาทีจากนั้นทำการถ่ายรูป Detection layer ด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และประมวลผลความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ™

3. ทำการทดลองเหมือนข้อ 1 – 2 แต่เปลี่ยนจากวางทิ้งไว้ 30 วินาทีก่อนนำไปถ่ายรูป เป็น 1, 2 และ 3 นาที ตามลำดับ

### 3.4.2.5 การศึกษาอิทธิพลของความสว่างของไฟในการถ่ายรูป

เตรียม  $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัดตามหัวข้อ 3.3.2 จากนั้นทำการศึกษาอิทธิพลของความสว่างของไฟในการถ่ายรูป ดั้งชั้นตอนต่อไป

1. ประกอบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษทั้ง 2 ชั้นให้แนบสนิท และปิเปิดสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิกรัมต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง a - j และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ปิเปิดน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที วางทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นทำการถ่ายรูปในสตูดิโอสำหรับถ่ายรูป Detection layer ด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ โดยปรับความสว่างของไฟไปที่ระดับ 5 (ขีดที่ 5) และประมวลผลความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ™

3. ทำการทดลองเหมือนข้อ 1 – 2 แต่เปลี่ยนจากความสว่างของไฟระดับที่ 5 เป็นระดับที่ 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ตามลำดับ

### 3.4.3 การศึกษาความเสถียรของ Reagents บน Detection layer

เตรียม  $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัดตามหัวข้อ 3.3.2 แล้วเก็บแผ่น Detection layer ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาความเสถียรของ Reagents บน Detection layer ดั้งชั้นตอนต่อไป

1. ประกอบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษทั้ง 2 ชั้นให้แนบสนิท และปิเปิดสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิกรัมต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง a - j และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปีเปิดน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที วางทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นทำการถ่ายรูป Detection layer ด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และประมวลผลความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ™

### 3.4.4 การศึกษาอิทธิพลของตัวรบกวน

ทำการทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของตัวรบกวนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก โดยจะทำการทดลองบน Detection layer โดยตรง ซึ่งการทดลองจะแบ่งเป็น 3 ชุด ดังนี้

#### (ก) รีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดอัลบูมิน

1. หยดสารละลาย TBPE ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงในตำแหน่ง A – J และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที
2. ทำการทดลองข้อ 1 ซ้ำอีก 1 ครั้ง
3. หยดสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 3.2 ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงในตำแหน่ง A – J และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที
4. หยดสารละลายต่าง ๆ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ตำแหน่งในการหยดสารละลายสำหรับศึกษาอิทธิพลของตัวรบกวน

ตำแหน่ง	สารละลาย
A	น้ำปราศจากไอออน (control)
B	สารละลายยูเรีย ความเข้มข้น 20000 มิลลิกรัมต่อลิตร
C	สารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร
D	สารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
E	สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร
F	สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร
G	สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร
H	สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร
J	สารละลายมาตรฐาน (อัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, ครีอะตินิน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดยูริก 50 มิลลิกรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที
6. ถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

#### (ข) รีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดครีอะตินิน

1. หยดสารละลายพิเครท ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรลงในตำแหน่ง A – J และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ทำการทดลองข้อ 1 ซ้ำอีก 1 ครั้ง
3. หยดสารละลายต่าง ๆ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 3.2
4. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที
5. ถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

#### (ค) รีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดกรดยูริก

1. หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงในตำแหน่ง A – J และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ทำการทดลองข้อ 1 ซ้ำอีก 2 ครั้ง
3. หยดสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรลงในตำแหน่ง A – J และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

4. หยดสารละลายต่าง ๆ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 3.2
5. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที
6. ถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

### 3.4.5 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์

#### 3.4.5.1 ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยง (Precision) เป็นค่าที่ระบุความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์ซ้ำแต่ละครั้ง สามารถประเมินได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, % RSD) หากค่าที่ได้มีค่าน้อย แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงสูง โดยค่า % RSD หาได้จากสมการ (3.1)

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100 \quad (3.1)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

$\bar{X}$  คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

### 3.4.5.2 คำร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery)

คำร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery) เป็นค่าที่ใช้ประเมินความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ หากค่าที่ได้ใกล้เคียง 100 % แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความแม่นยำองค์ประกอบอื่น ๆ ในตัวอย่างไม่รบกวนการวิเคราะห์ ค่า % Recovery หาได้จากสมการ (3.2)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_{\text{spiked}} - C_{\text{sample}}}{C_{\text{standard}}} \times 100 \quad (3.2)$$

เมื่อ  $C_{\text{spiked}}$  คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน

$C_{\text{sample}}$  คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

$C_{\text{standard}}$  คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม

### 3.4.5.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้บนกระดาษ (Minimum detection level, MDL) [45]

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้บนกระดาษ (Minimum detection level, MDL) มักใช้ความเข้มข้นของช่วงการใช้งาน (Working range) หาได้จากการลดความเข้มข้นจากจุดต่ำสุดของ Working range และวัดสัญญาณการวิเคราะห์ จุดต่ำสุดที่เห็นสัญญาณคือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

### 3.4.6 การตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะ

#### 3.4.6.1 การตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

##### 1) ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ

เก็บตัวอย่างปัสสาวะจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง ทำการปัสสาวะตัวอย่าง ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.0 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2) ขั้นตอนการเตรียม $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัด

ทำการตรึงสารละลายเคมีสำหรับตรวจวัดลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษชั้น Detection layer ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1 ในหัวข้อ 3.3.2

## 3) ขั้นตอนการตรวจวัด

ก่อนทำการตรวจวัด ประคบแผ่น Auxiliary layer และ Detection layer เข้าด้วยกัน โดยให้ตำแหน่งของ Sample zone และ Detection zone แต่ละตำแหน่งพอดีกัน จากนั้นทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ที่ตำแหน่ง a – j แล้วเป่าให้แห้ง 30 วินาที
2. ปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออนลงใน Carrier zone ของแผ่น Auxiliary layer ปริมาตร 105 ไมโครลิตร รอให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเป่าแห้ง 1 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ทำการถ่ายภาพของ Detection layer ด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และทำการประมวลผลภาพถ่ายด้วยโปรแกรม Image J<sup>TM</sup>

### 3.4.6.2 การตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะด้วยวิธีมาตรฐาน

#### 1) การตรวจวัดอัลบูมิน

ทำการวิเคราะห์อัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะโดยใช้เทคนิค Turbidimetric immunoassay คือ อัลบูมินทำหน้าที่เป็นแอนติเจน (Antigen) ไปจับกับแอนติบอดี (Antibody) ที่มีความจำเพาะเจาะจงเกิดเป็นตะกอน ซึ่งจะทำให้สารละลายมีความขุ่น และตรวจวัดความขุ่นของสารละลายที่เกิดขึ้น โดยปริมาณความขุ่นจะแปรผันตามความเข้มข้นของอัลบูมิน อนึ่งในการตรวจวัดอัลบูมินด้วย Turbidimetric immunoassay นี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ลพบุรี เซ็นทรัล แล็บ ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

#### 2) การตรวจวัดครีอะตินิน และกรดยูริก

ทำการวิเคราะห์ครีอะตินิน และกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ระบบจะใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอลัมน์ C-18 (3.9 mm x 150 mm, 5  $\mu$ M) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้การชะแบบ Isocratic โดยให้ Ammonium dihydrogen orthophosphate ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase, MP) ให้อัตราการไหล (Flow rate) เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector วัดการดูดกลืนแสง (UV-absorbance) ที่ความยาวคลื่น 231 นาโนเมตร ตัวอย่างปัสสาวะจะถูกเจือจางด้วย MP และกรองผ่านเมมเบรน (Nylon membrane) ขนาด 0.22 ไมโครเมตรก่อนฉีดเข้าเครื่อง โดยปริมาตรการฉีดคือ 20 ไมโครลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

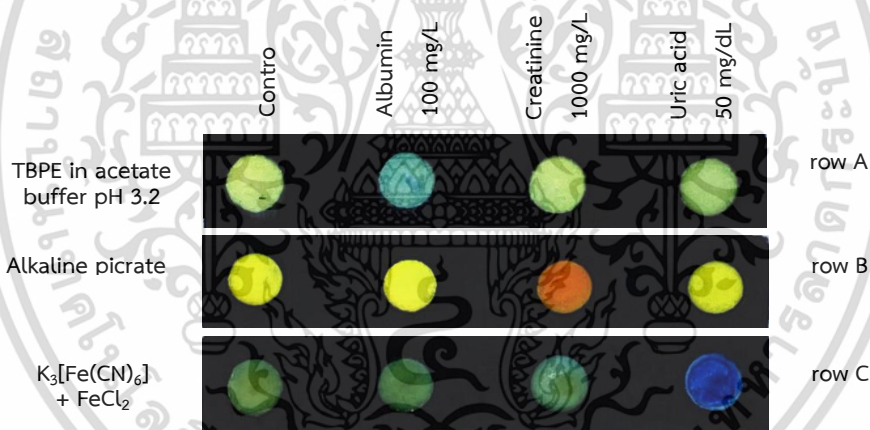
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ในงานวิจัยนี้ ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน ในรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 2 ชั้น มีผลการวิจัยดังต่อไปนี้

#### 4.1 ผลการศึกษา Cross-reactivity

ทำการศึกษา Cross-reactivity ของการตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิด โดยทำการตรวจวัดอัลบูมิน ครีเอตินิน และกรดยูริกด้วยรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดสารตัวอื่น ๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ ที่ได้ออกแบบดังรูปที่ 3.2 ให้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 4.1



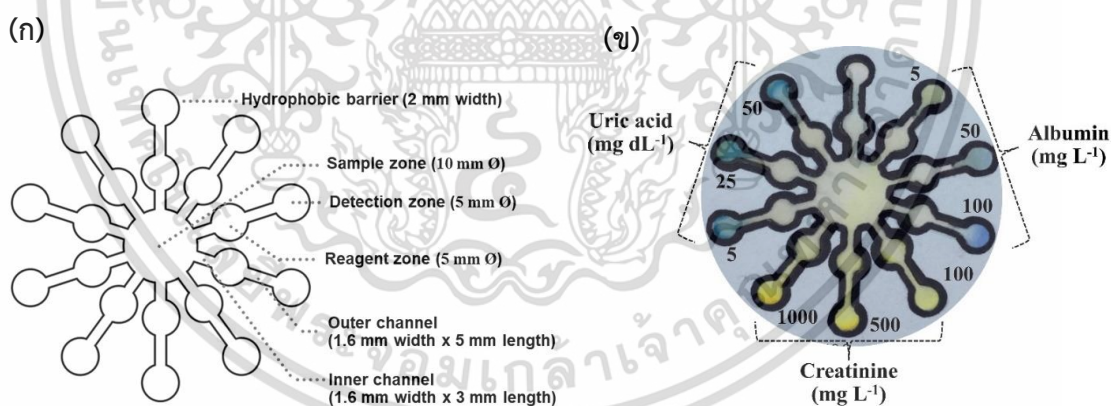
รูปที่ 4.1 แสดงอิทธิพลของรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัด ที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ : แถว A รีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดอัลบูมิน, แถว B รีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดครีเอตินิน และแถว C รีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดกรดยูริก

จากรูปที่ 4.1 พบว่า รีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดอัลบูมิน ไม่ทำปฏิกิริยากับครีเอตินินและกรดยูริก, รีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดครีเอตินิน ไม่เกิดปฏิกิริยากับอัลบูมินและกรดยูริก และรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดกรดยูริก ไม่ทำปฏิกิริยากับอัลบูมินและครีเอตินิน กล่าวคือ รีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิด เป็นรีเอเจนต์ที่จำเพาะเจาะจงสูงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์

## 4.2 ผลการศึกษาเบื้องต้น: อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชั้นเดียว (Single-layered $\mu$ PAD)

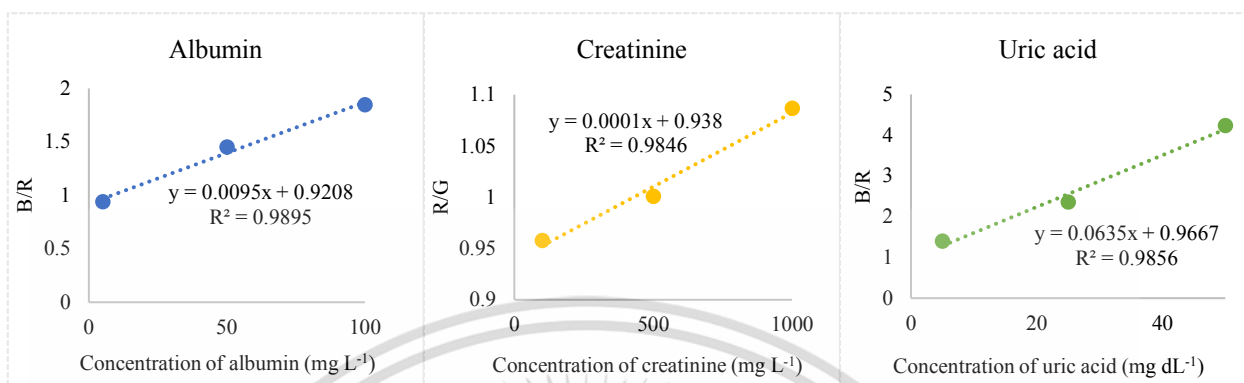
ในเบื้องต้นได้ศึกษาการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชั้นเดียว (Single-layered  $\mu$ PAD) ซึ่งได้ออกแบบตัวอุปกรณ์เป็นดังรูปที่ 4.2 (ก) และอาศัยการสร้างลดทอนส่วนไม่ชอบน้ำด้วยวิธีการประทับตราด้วยหมึกกันน้ำ ส่วนประกอบของอุปกรณ์ได้แก่ (1) ส่วนหยดตัวอย่างปัสสาวะ/สารละลายมาตรฐาน (Sample zone) (2) ช่องด้านใน (Inner channel) สำหรับหยดสารละลายมาตรฐานเพื่อทำการวิเคราะห์แบบวิธีการเติมสารมาตรฐาน (Standard addition) บนกระดาษ (3) ส่วนหยดสารเคมีที่มีความจำเพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการตรวจวัดแต่ละตัว (Reagent zone) (4) ช่องด้านนอก (Outer channel) ซึ่งเป็นบริเวณให้ของเหลวเคลื่อนที่เข้าสู่ (5) ส่วนตรวจวัด (Detection zone) ซึ่งเป็นบริเวณที่จะถ่ายรูปสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

เมื่อนำ Single-layered  $\mu$ PAD ที่ได้ออกแบบนี้ ไปวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก ภายในคราวเดียวกัน ในตัวอย่างปัสสาวะซึ่งเก็บจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี โดยอาศัยวิธีการเติมสารละลายมาตรฐาน พบว่า ได้ผลการทดลองในเบื้องต้น เป็นดังรูปที่ 4.2 (ข)



รูปที่ 4.2 (ก) แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชั้นเดียว (Single-layered  $\mu$ PAD) สำหรับการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก ภายในคราวเดียวกันด้วย อาศัยวิธีการเติมสารละลายมาตรฐาน และ (ข) แสดงรูปถ่ายผลการทดลองของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบน Single-layered  $\mu$ PAD

เมื่อพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด ได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของ (ก) อัลบูมิน, (ข) ครีเอตินิน และ (ค) กรดยูริก

จากกราฟเส้นตรงทั้ง 3 พบว่า ผลการศึกษาด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบชั้นเดียวให้ความเป็นเส้นตรงอยู่ในเกณฑ์ที่ดี แต่จากรูปที่ 4.2 (ข) จะเห็นว่า มี Coffee ring effect ทำให้สีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอ จึงได้ทำการปรับปรุงและออกแบบเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 2 ชั้น (Double-layered  $\mu$ PAD) เพื่อหวังแก้ปัญหา Coffee ring ที่เกิดขึ้น ซึ่งได้ทำการศึกษาและประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 2 ชั้น (ดังที่ได้ออกแบบและแสดงในรูปที่ 3.1 หัวข้อ 3.3.1) กับตัวอย่างปัสสาวะต่อไป

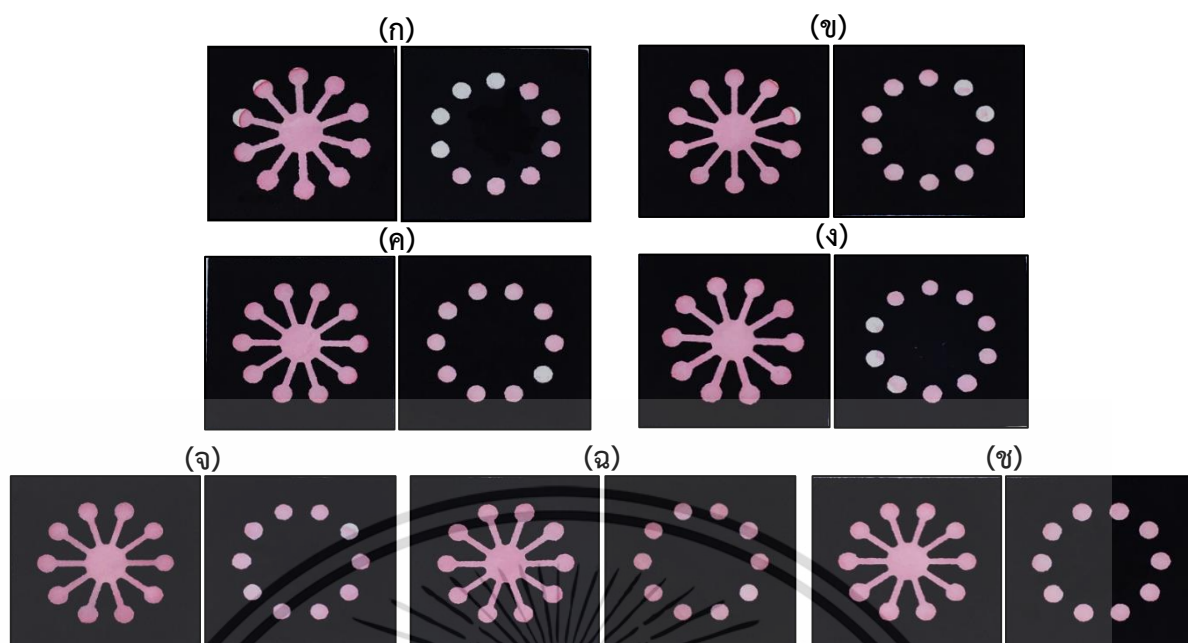
### 4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด

#### 4.3.1 ปริมาตรของสารละลายที่ใช้

##### (ก) สารละลายตัวพา

ทำการศึกษาปริมาตรของสารละลายตัวพาที่ใช้ในการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษดังได้ออกแบบ ตามรูปที่ 3.1 (ก) และ 3.1 (ข) เมื่อเปิดสารละลายสีผสมอาหารสีแดง ซึ่งสมมติให้เป็นสารละลายตัวพา ในปริมาตรต่าง ๆ ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัด และทำการถ่ายรูปอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




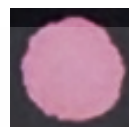
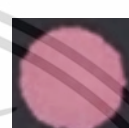
รูปที่ 4.4 แสดงการแพร่กระจายของสารละลายสีผสมอาหารสีแดงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษเมื่อเปิดในปริมาตรที่แตกต่างกัน : (ก) 80, (ข) 85, (ค) 90, (ง) 95, (จ) 100, (ฉ) 105 และ (ช) 110 ไมโครลิตร ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.4 พบว่า ที่ปริมาตรสารละลายสีผสมอาหารสีแดงเท่ากับ 105 และ 110 ไมโครลิตร สารละลายสีแดงสามารถแพร่กระจายได้เต็มวงในชั้น Auxiliary layer และยังสามารถซึมผ่านลงไปยังชั้น Detection layer แล้วเกิดการแพร่เต็มวงได้ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรของสารละลายตัวพาเท่ากับ 105 ไมโครลิตร เป็นปริมาตรที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นปริมาตรที่น้อยที่สุดที่สามารถแพร่กระจายเต็มวงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษทั้ง 2 ชั้น

(ข) ปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาและสารมาตรฐานที่ใช้เป็น Spiked standard

ทำการศึกษาปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาและสารละลายมาตรฐานที่ใช้เป็น Spiked standard ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษดังได้ออกแบบ ตามรูปที่ 3.1 (ข) เมื่อเปิดสารละลายสีผสมอาหารสีแดง ซึ่งสมมติให้เป็นสารเคมีและสารละลายมาตรฐาน ปริมาตรต่าง ๆ ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัด และทำการถ่ายรูปอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ ได้ผลการทดลองแสดงตารางที่ 4.1

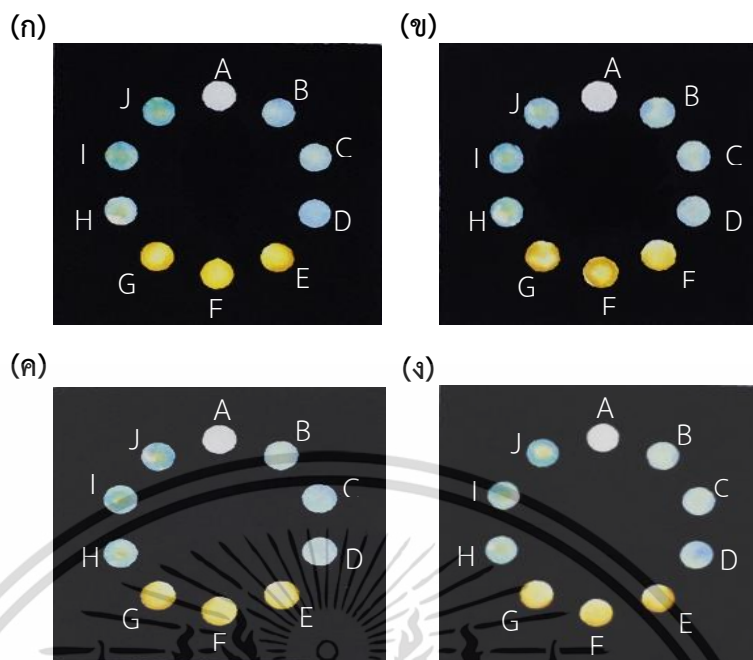
ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะการแพร่ของสารละลายสีผสมอาหารสีแดงใน detection zone เมื่อใช้ ปริมาตรที่แตกต่างกัน : 1.0, 1.5 และ 2.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ

ปริมาตร ( $\mu\text{L}$ )	การแพร่บนอุปกรณ์ตรวจวัด
1.0	
1.5	
2.0	

จากตารางที่ 4.1 พบว่า ที่ปริมาตรสารละลายสีผสมอาหารสีแดงเท่ากับ 1.5 และ 2.0 ไมโครลิตร สารละลายสีแดงสามารถแพร่กระจายได้เต็มวง Detection zone ในงานวิจัยนี้จึง เลือกรูปแบบของสารเคมีและสารละลายมาตรฐานเท่ากับ 1.5 ไมโครลิตร เป็นปริมาตรที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นปริมาตรที่น้อยที่สุดที่สามารถแพร่กระจายเต็มวงบน Detection zone

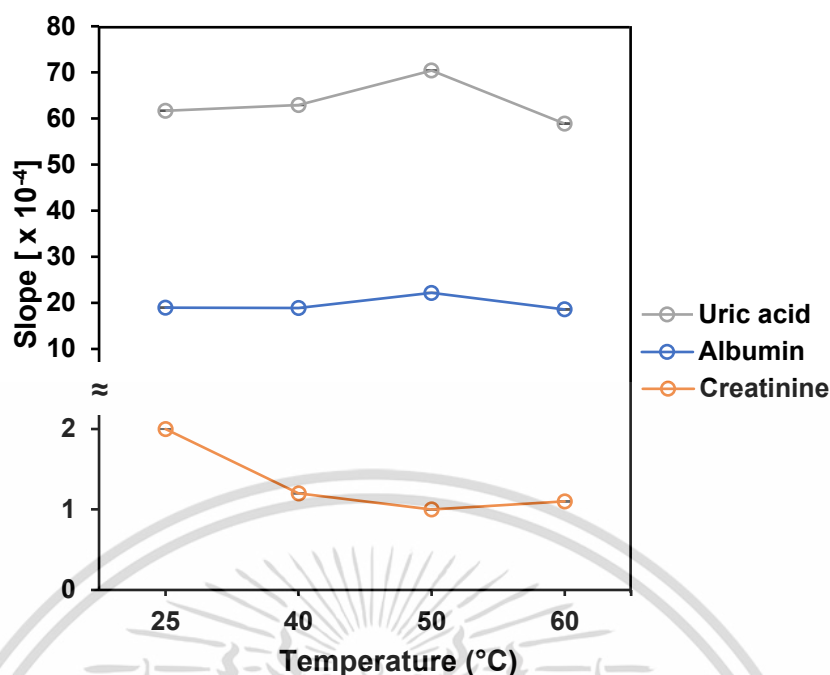
#### 4.3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ

ทำการศึกษอิทธิพลของอุณหภูมิ ซึ่งการศึกษาในหัวข้อนี้ จะศึกษาด้วยปฏิกิริยาจริงที่ใช้ ตรวจวัด และใช้สารละลายมาตรฐานในการศึกษา โดยหลังจากหยดสารละลายตัวพาแล้วรอให้ เกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนสุดท้าย รอให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง และนำเข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาน : ตำแหน่ง A เป็นตำแหน่งควบคุม, ตำแหน่ง B, C และ D เป็นการตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้น 5, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, ตำแหน่ง E, F และ G เป็นการตรวจวัดครีอะตินีนความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และตำแหน่ง H, I และ J เป็นการตรวจวัดกรดยูริกความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ เมื่อรอให้เกิดปฏิกิริยาที่ : (ก) อุณหภูมิห้อง (~25 องศาเซลเซียส), (ข) 40, (ค) 50 และ (ง) 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.5 นำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จะได้ค่าความชันของกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงถึงค่าความไวในการวิเคราะห์ นำค่าความไวในการวิเคราะห์ไปสร้างกราฟเทียบกับอุณหภูมิที่ทำการศึกษา ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6

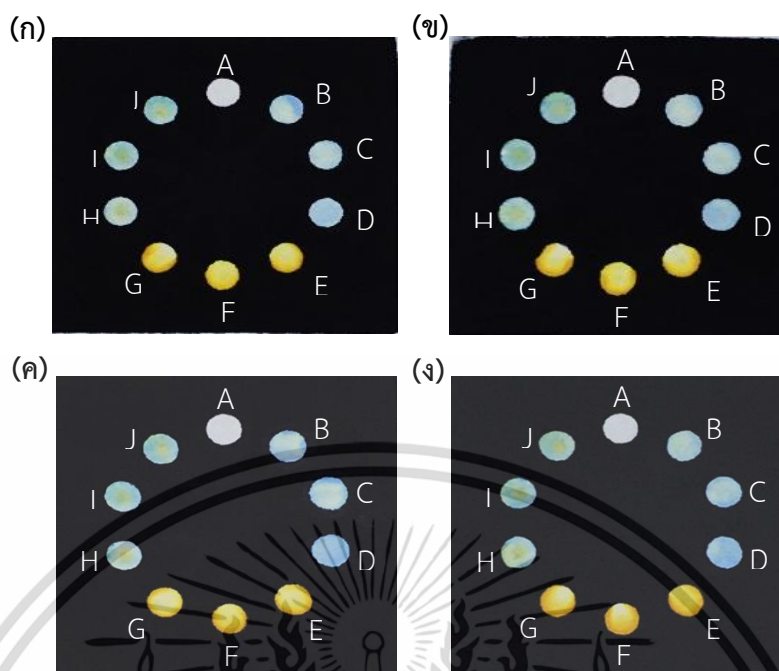


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก

จากรูปที่ 4.6 พบว่า ในการตรวจวัดอัลบูมินและกรดยูริก ค่าความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 50 องศาเซลเซียส แต่จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และสำหรับการตรวจวัดครีอะตินิน เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ค่าความไวในการวิเคราะห์ลดลง กล่าวคือ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่าความไวในการวิเคราะห์อัลบูมินและกรดยูริกสูงที่สุด และที่อุณหภูมิห้องให้ค่าความไวในการวิเคราะห์ครีอะตินินสูงที่สุด ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิห้อง เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจวัด เนื่องจากมีความสะดวกในการปฏิบัติมากกว่า

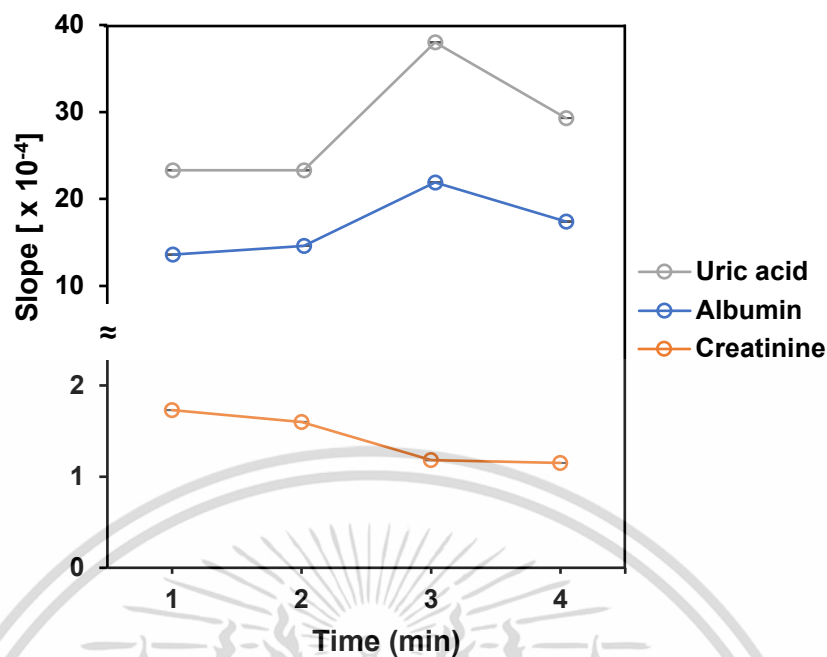
#### 4.3.3 เวลาในการแพร่ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษ

ทำการศึกษาเวลาในการแพร่ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษ โดยหลังจากหยดสารละลายตัวพาลงใน Carrier zone ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 นาที ให้ผลกระทดลองดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงอิทธิพลของเวลาในการแพร่ของของเหลวที่มีผลต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ : ตำแหน่ง A เป็นตำแหน่งควบคุม, ตำแหน่ง B, C และ D เป็นการตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้น 5, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, ตำแหน่ง E, F และ G เป็นการตรวจวัดครีอะตินินความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และตำแหน่ง H, I และ J เป็นการตรวจวัดกรดยูริกความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเป็น : (ก) 1, (ข) 2, (ค) 3 และ (ง) 4 นาที ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.7 นำค่าความเข้มข้นที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นกับความไวในการวิเคราะห์ไปสร้างกราฟเทียบกับเวลาในการแพร่ของของเหลวที่มีผลต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8

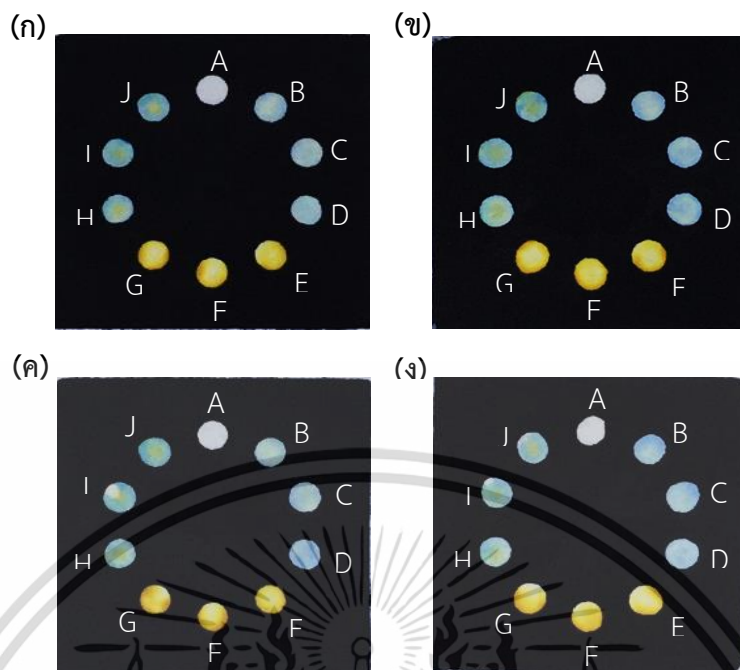


รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับเวลาในการแพร่ของของเหลวที่มีผลต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (นาที่) เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก

จากผลการทดลองที่แสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่า ในการตรวจวัดอัลบูมินและกรดยูริก เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ความไวในการวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้นจนถึงนาที่ที่ 3 และในการตรวจวัดครีเอตินิน จะเห็นว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ความไวในการวิเคราะห์กลับต่ำลง แต่อย่างไรก็ตาม ในตัวอย่างปัสสาวะนั้นจะมีปริมาณครีเอตินินมากกว่าปริมาณของอัลบูมินและกรดยูริก ดังนั้น เกณฑ์ในการเลือกเวลาสำหรับการรอให้เกิดการแพร่ของของเหลวและเกิดผลิตภัณฑ์ ควรพิจารณาจากการตรวจวัดอัลบูมินและกรดยูริกเป็นหลัก ในงานวิจัยนี้จึงเลือกเวลาที่ 3 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสม

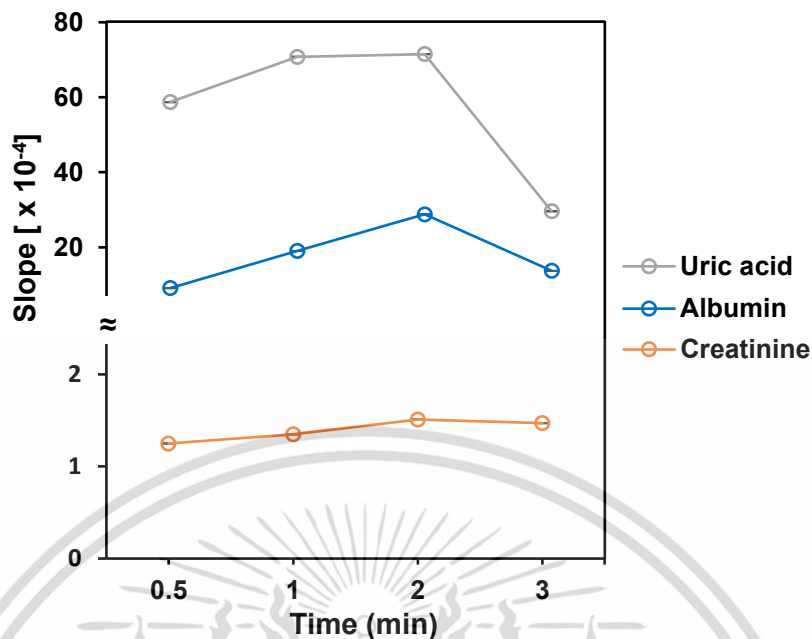
#### 4.3.4 เวลาในการถ่ายรูป

ทำการศึกษาเวลาในการถ่ายรูป โดยหลังจากขั้นตอนการตรวจวัดจับเวลาก่อนจะนำไปถ่ายรูปเป็นเวลา 30 วินาที, 1, 2 และ 3 นาที ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงอิทธิพลของเวลาในการถ่ายรูปที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาศ : ตำแหน่ง A เป็นตำแหน่งควบคุม, ตำแหน่ง B, C และ D เป็นการตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้น 5, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, ตำแหน่ง E, F และ G เป็นการตรวจวัดครีอะตินินความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และตำแหน่ง H, I และ J เป็นการตรวจวัดกรดยูริกความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาที่รอในการถ่ายรูปเป็น : (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2 และ (ง) 3 นาที ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.9 นำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จะได้ค่าความชันของกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงถึงค่าความไวในการวิเคราะห์ นำค่าความไวในการวิเคราะห์ไปสร้างกราฟเทียบกับเวลาในการถ่ายรูป ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.10

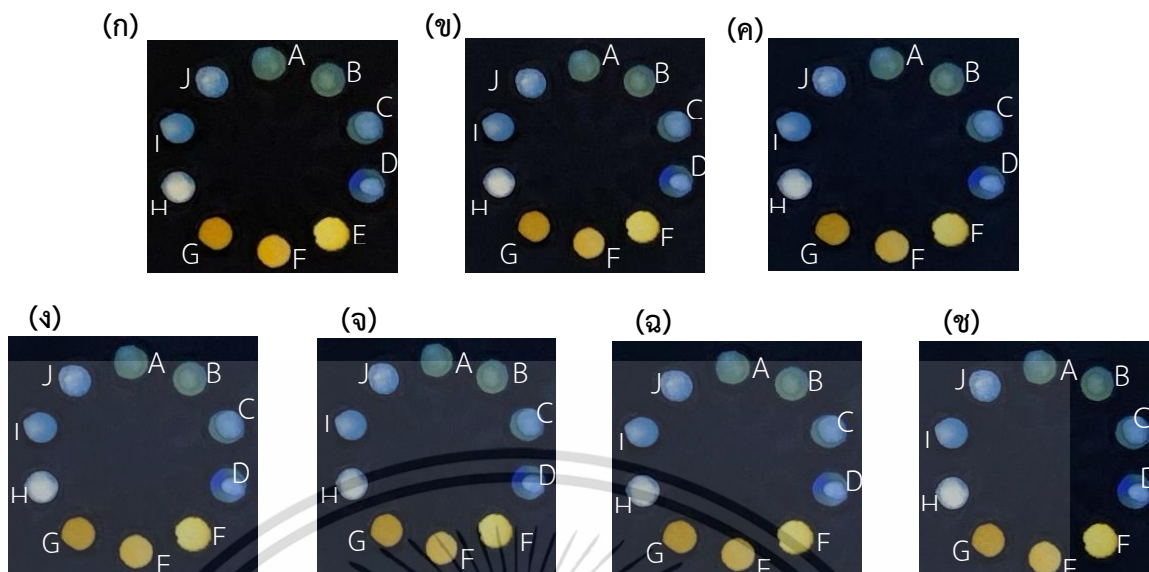


รูปที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับเวลาในการถ่ายรูป (นาที) เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก

จากผลการทดลองที่แสดงดังรูปที่ 4.10 พบว่า การตรวจวัดอัลบูมินและกรดยูริก เมื่อเวลาในการถ่ายรูปเพิ่มขึ้นจะทำให้ความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นจนถึง 2 นาที แต่ที่ 3 นาที ค่าความไวในการวิเคราะห์กลับต่ำลง และในการตรวจวัดครีเอตินิน เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ความไวในการวิเคราะห์มีค่าเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อเวลาถึง 2 นาที เมื่อพิจารณาทั้งในแง่ความไวของการวิเคราะห์และในแง่ของเวลาที่ใช้ จึงเลือกเวลาถ่ายรูปที่ 2 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสม

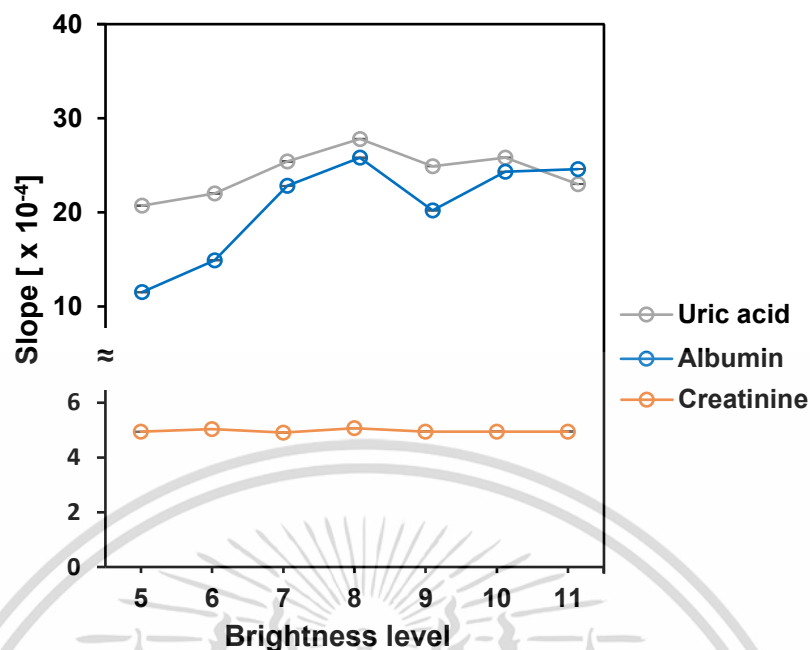
#### 4.3.5 ความสว่างของไฟในการถ่ายรูป

ทำการศึกษาความสว่างของไฟในการถ่ายรูป โดยหลังจากหยดสารละลายตัวพาลงใน Carrier zone ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปถ่ายรูปในสตูดิโอสำหรับถ่ายรูป โดยปรับระดับความสว่างของไฟสตูดิโอเป็น 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงอิทธิพลของความสว่างของไฟที่ใช้ในการถ่ายรูปที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ : ตำแหน่ง A เป็นตำแหน่งควบคุม, ตำแหน่ง B, C และ D เป็นการตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้น 5, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, ตำแหน่ง E, F และ G เป็นการตรวจวัดครีอะตินินความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และตำแหน่ง H, I และ J เป็นการตรวจวัดกรดยูริกความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ เมื่อระดับความสว่างของไฟที่ใช้ในการถ่ายรูปเป็น : (ก) 5 (ข) 6, (ค) 7, (ง) 8, (จ) 9, (ฉ) 10 และ (ช) 11 ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.11 นำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จะได้ค่าความชันของกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงถึงค่าความไวในการวิเคราะห์ นำค่าความไวในการวิเคราะห์ไปสร้างกราฟเทียบกับระดับความสว่างของไฟที่ใช้ในการถ่ายรูป ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.12

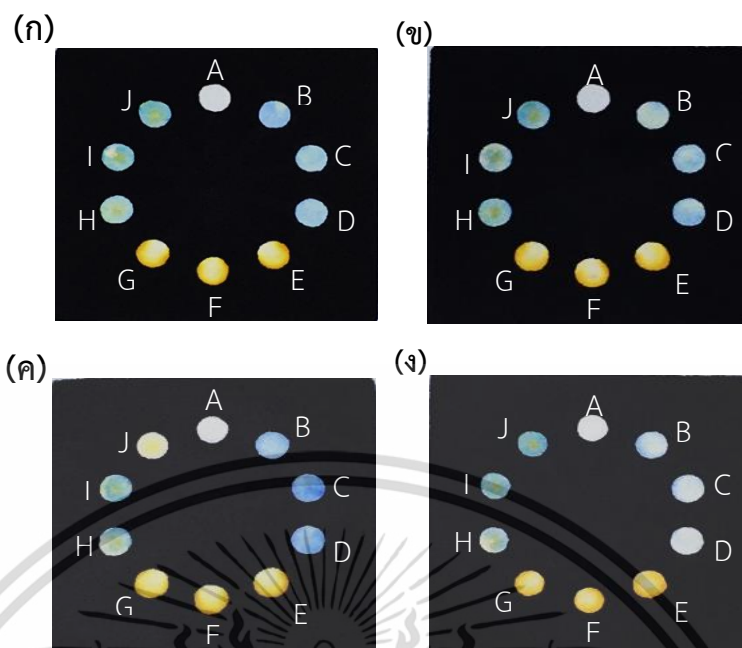


รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับระดับความสว่างของไฟในการถ่ายรูป เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก

จากรูปที่ 4.12 พบว่า ในการตรวจวัดอัลบูมินและกรดยูริก ความไวในการวิเคราะห์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความสว่างเพิ่มขึ้นถึงระดับที่ 8 แต่จะมีค่าลดลงเมื่อมีความสว่างสูงขึ้น สำหรับการตรวจวัดครีเอตินิน พบว่า ค่าความไวในการวิเคราะห์ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปลี่ยนระดับความสว่างของไฟ จึงเลือกใช้ความสว่างของไฟในการถ่ายรูประดับที่ 8 เป็นระดับความสว่างที่เหมาะสม

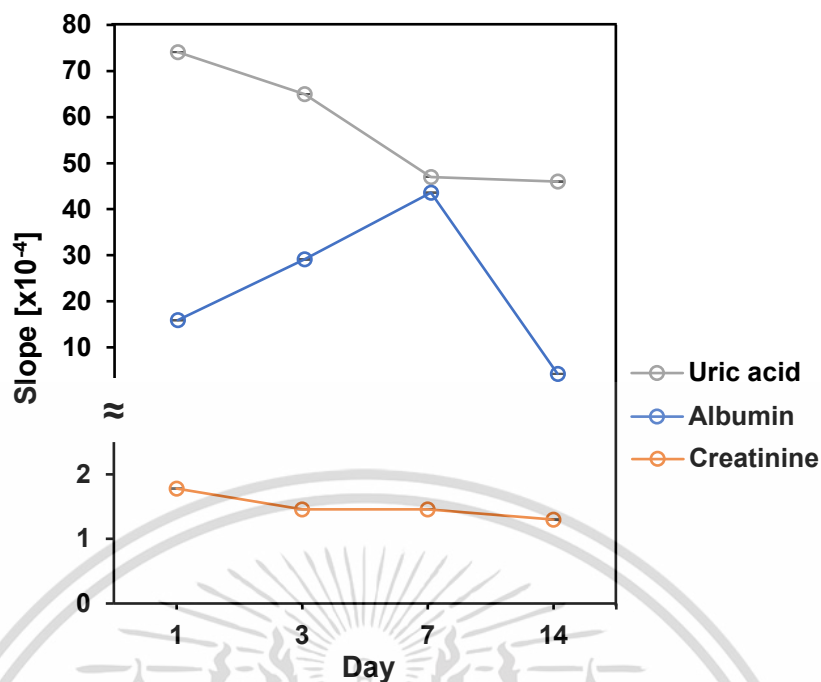
#### 4.4 ผลการศึกษาความเสถียรของ Reagents

ทำการศึกษาความเสถียรของรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัด โดยหลังหยดรีเอเจนต์ในการตรวจวัดทั้งหมดลงบน Detection zone ของ Detection layer แล้วเก็บ Detection layer ไว้เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน จึงนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงอิทธิพลของความเสถียรของรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดบน Detection layer ที่มีผลต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ : ตำแหน่ง A เป็นตำแหน่งควบคุม, ตำแหน่ง B, C และ D เป็นการตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้น 5, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, ตำแหน่ง E, F และ G เป็นการตรวจวัดครีอะตินินความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และตำแหน่ง H, I และ J เป็นการตรวจวัดกรดยูริกความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัดเก็บไว้เป็นเวลา : (ก) 1, (ข) 3, (ค) 7 และ (ง) 14 วัน ตามลำดับ

นำค่าความไวในการวิเคราะห์ที่ได้จากการประมวลผลการทดลองในรูปที่ 4.13 ไปสร้างกราฟเทียบกับวันที่ทำการเก็บอุปกรณ์ตรวจวัดที่เตรียมไว้ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.14

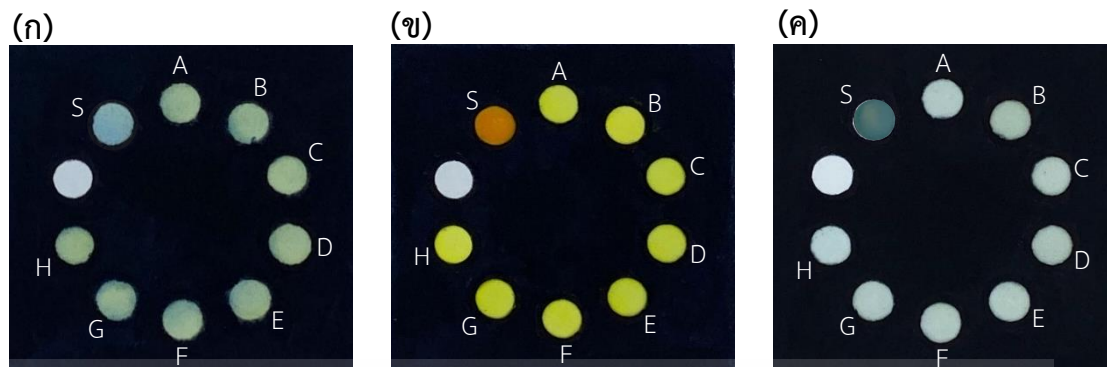


รูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) กับวันที่ทำการเก็บอุปกรณ์ตรวจวัดที่เตรียมไว้ เมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก

จากรูปที่ 4.14 พบว่า การตรวจวัดอัลบูมิน มีความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้นเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานขึ้นถึง 7 วัน แต่ให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำลงเมื่อเก็บไว้นานกว่า 7 วัน สำหรับการตรวจวัดครีเอตินินและยูริก พบว่า ความไวในการวิเคราะห์ลดต่ำลงเมื่อเก็บอุปกรณ์ตรวจวัดไว้เป็นเวลานานขึ้น ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเสถียรของอุปกรณ์ตรวจวัดโดยยึดครีเอตินินและกรดยูริกเป็นหลัก จึงเลือกเวลาในการเก็บอุปกรณ์ตรวจวัดก่อนใช้งานที่ 1 วัน เพื่อให้ประสิทธิภาพในการตรวจวัดที่ดีที่สุด

#### 4.5 ผลการศึกษาอิทธิพลของตัวรบกวน

ทำการศึกษาอิทธิพลของตัวรบกวนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก โดยปีเปตตัวรบกวนลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษชั้น Detection layer ที่มีการตรึงรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิด ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แสดงอิทธิพลของตัวรบกวนที่มีผลต่อความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ เมื่อเปิดตัวรบกวนชนิดต่าง ๆ ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่มีการตรึงรีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิด : (ก) รีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดอัลบูมิน, (ข) รีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดครีอะตินิน และ (ค) รีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดกรดยูริก โดย A = Control, B = Urea, C = Glucose, D = Ascorbic acid, E = NaCl, F =  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , G = KCl, H =  $\text{MgSO}_4$  และ S = Analyte

จากรูปที่ 4.15 พบว่า ตัวรบกวนทุกชนิดที่ศึกษาไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก กล่าวคือ ไม่มีสารชนิดใดรบกวนการวิเคราะห์อัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

#### 4.6 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear working range), ความเที่ยง (Precision) ซึ่งประเมินได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้บนกระดาษ (Minimum detection level, MDL) ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาคูณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ของอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 2 ชั้น สำหรับตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกภายในคราวเดียวกัน

Analytical performances	Kinds of Analytes		
	Albumin	Creatinine	Uric acid
Linear working range	5-100 mg L <sup>-1</sup>	100-1000 mg L <sup>-1</sup>	5-25 mg dL <sup>-1</sup>
RSD	3.07 %	2.13 %	4.62 %
MDL	5 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	5 mg dL <sup>-1</sup>

จากตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 2 ชั้นมีความเป็นเส้นตรงที่ดี เมื่อประเมินความเที่ยงโดยการทดสอบการทำซ้ำ 6 ครั้ง พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่า 4.62 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษมีความเที่ยงสูง และความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้บนกระดาษมีความครอบคลุมอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้วินิจฉัยโรคไตและโรคเก๊าท์ได้

#### ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery)

ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ ทำโดยเติมสารละลายมาตรฐานอัลบูมินความเข้มข้น 100 mg L<sup>-1</sup>, ครีเอตินินความเข้มข้น 1000 mg L<sup>-1</sup> และกรดยูริกความเข้มข้น 50 mg dL<sup>-1</sup> ลงในตัวอย่างปัสสาวะและวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 สรุปผลการศึกษาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery)

Sample code	Analytes	Concentration		Recovery (%)
		Added	Founded	
M1	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	102.10	102.1
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	1052.47	105.2
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	52.69	105.4
M2	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	101.85	101.9
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	1071.08	107.1
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	46.88	93.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 สรุปผลการศึกษาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery) (ต่อ)

Sample code	Analytes	Concentration		Recovery (%)
		Added	Founded	
M3	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	101.19	101.2
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	1061.86	106.2
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	48.50	97.0
M4	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	105.74	105.7
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	982.08	98.2
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	49.13	98.3
M5	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	99.50	99.5
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	903.26	90.3
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	48.30	96.6
W1	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	104.23	104.2
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	986.84	98.7
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	53.20	106.4
W2	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	103.84	103.8
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	942.92	94.3
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	47.56	95.1
W3	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	99.95	99.9
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	1023.32	102.3
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	48.54	97.1
W4	Albumin (mg L <sup>-1</sup> )	100	97.80	97.8
	Creatinine (mg L <sup>-1</sup> )	1000	1099.04	109.9
	Uric acid (mg dL <sup>-1</sup> )	50	48.58	97.2

จากตารางที่ 4.3 พบว่า ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับของอัลบูมิน, ครีเอตินิน และ กรดยูริกด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบ 2 ชั้น อยู่ในช่วง 90.3 ถึง 109.9 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบอื่น ๆ ในตัวอย่างปัสสาวะไม่รบกวนการวิเคราะห์

#### 4.7 การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรด ยูริกในตัวอย่างปัสสาวะ

ทำการวิเคราะห์อัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 4 ตัวอย่าง ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นอาศัยหลักการวิเคราะห์แบบการเติมสารละลายมาตรฐาน และทำการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้กับผลวิเคราะห์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Immunoassay (สำหรับอัลบูมิน) และวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (สำหรับครีอะตินิน และกรดยูริก) เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยการทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วยวิธีทางสถิติ คือ Paired *t*-test พบว่า ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4, 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าความเข้มข้นของอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของอัลบูมิน (mg/L, mean $\pm$ SD (n = 3))	
	วิธี Immunoassay	วิธีตรวจวัดบนกระดาษ
M1	50.06 $\pm$ 0.98	49.40 $\pm$ 0.29
M2	47.92 $\pm$ 0.78	46.90 $\pm$ 0.19
W1	51.31 $\pm$ 1.01	51.60 $\pm$ 0.83
W2	49.01 $\pm$ 1.69	50.60 $\pm$ 0.28
$t_{\text{stat}} = 0.09, t_{\text{critical}} = 3.18$		

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเข้มข้นของครีอะตินินในตัวอย่างปัสสาวะ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของครีอะตินิน (mg/L, mean $\pm$ SD (n = 3))	
	วิธี HPLC	วิธีตรวจวัดบนกระดาษ
M1	351.29 $\pm$ 9.21	350.18 $\pm$ 1.05
M2	239.66 $\pm$ 10.35	240.00 $\pm$ 0.77
W1	384.23 $\pm$ 8.51	383.33 $\pm$ 0.66
W2	311.09 $\pm$ 9.36	310.70 $\pm$ 0.42
$t_{\text{stat}} = 1.60, t_{\text{critical}} = 3.18$		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าความเข้มข้นของกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของกรดยูริก (mg/dL, mean $\pm$ SD (n = 3))	
	วิธี HPLC	วิธีตรวจวัดบนกระดาษ
M1	20.99 $\pm$ 0.99	20.79 $\pm$ 0.28
M2	19.23 $\pm$ 1.23	18.80 $\pm$ 0.29
W1	18.98 $\pm$ 1.04	18.15 $\pm$ 0.08
W2	20.07 $\pm$ 0.42	19.84 $\pm$ 0.26

$t_{\text{stat}} = 2.90, t_{\text{critical}} = 3.18$

จากตารางที่ 4.4, 4.5 และ 4.6 พบว่า ค่า  $t_{\text{stat}} < t_{\text{critical}}$  กล่าวคือ ปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 4 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีมาตรฐาน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษแบบสองชั้นที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับหาปริมาณอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในคราวเดียวกัน โดยอาศัยหลักการเติมสารละลายมาตรฐาน อุปกรณ์ตรวจวัดประกอบด้วยชั้นบนหรือ Auxiliary layer ทำหน้าที่ในการกรองตัวอย่างปัสสาวะ โดยตัวอย่างที่ผ่านการกรองจะไหลลงไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ตรึงไว้บนอุปกรณ์ชั้นล่างหรือ Detection layer แล้วเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีขึ้นในบริเวณตรวจวัด ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ สรุปได้ดังนี้: (1) การตรวจวัดอัลบูมิน ใช้สารละลายเตตระโบรโมฟีนอลฟทาลีนเอธิลเอสเทอร์ ความเข้มข้น  $5 \times 10^{-4}$  โมลาร์ ในสภาวะกรดของอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 3.2 (2) ครีเอตินิน ใช้สารละลายพิเครท ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และ (3) กรดยูริกใช้สารละลายโพแทสเซียมเพอริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ และสารละลายเพอริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ สภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัด คือ ปริมาตรของสารละลายตัวพาที่ใช้เท่ากับ 105 ไมโครลิตร ปริมาตรสารเคมี, สารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างเท่ากับ 1.5 ไมโครลิตร อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาคืออุณหภูมิห้อง เวลาในการแพร่ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษ 3 นาที เวลาในการรถ่ายรูปรูป 2 นาที ความสว่างของไฟในสตูดิโอในการถ่ายรูปรูปคือระดับ 8 ความเสถียรของสารเคมีที่ตรึงไว้บนกระดาษก่อนการตรวจวัดเป็น 1 วัน บันทึกสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ ประมวลผลค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J<sup>TM</sup> และวิเคราะห์สีด้วยระบบสี RGB ทำการศึกษาอิทธิพลของตัวรบกวน โดยศึกษาสารละลายต่อไปนี้: ยูเรีย, กลูโคส, กรดแอสคอร์บิก, โซเดียมคลอไรด์, แอมโมเนียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟต พบว่า สารทุกชนิดที่ศึกษาไม่รบกวนการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกบนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยอาศัยหลักการเติมสารมาตรฐาน มีความเป็นเส้นตรงในช่วง  $5 - 100 \text{ mg L}^{-1}$  สำหรับอัลบูมิน,  $100 - 1000 \text{ mg L}^{-1}$  สำหรับครีเอตินิน และ  $5 - 25 \text{ mg dL}^{-1}$  สำหรับกรดยูริก ( $R^2 > 0.98$ ) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ประเมินจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) มีค่าเท่ากับ 3.07, 2.13 และ 4.62 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริก ตามลำดับ เมื่อนำอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้ในตรวจวัดอัลบูมิน, ครีเอตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะได้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง

90.3 - 109.9 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบผลวิเคราะห์กับวิธีมาตรฐาน: Immunoassay สำหรับอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ HPLC สำหรับครีอะตินินและกรดยูริก พบว่า ผลวิเคราะห์จากทั้ง 2 วิธี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ไม่ควรใช้สารเคมีที่เก็บไว้เป็นเวลานาน อาจทำให้ผลวิเคราะห์คลาดเคลื่อน เนื่องจากการเสื่อมสภาพ

5.2.2 การประกอบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ 2 ชั้นเข้าด้วยกัน ควรประกอบให้ตรงตำแหน่งและแนบสนิททั่วทั้งแผ่น เพื่อให้ตัวอย่างจากชั้น Auxiliary layer ลงไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีในชั้น Detection layer ได้ทั้งหมด

5.2.3 เพื่อลดปัญหาความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ ที่อาจเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาบนกระดาษที่ไม่สม่ำเสมอ อาจมีการพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดบนชิปที่สามารถหมุนเหวี่ยงได้ (Centrifugal lab-on-chip) สำหรับวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดภายในคราวเดียวกัน โดยหวังให้ปฏิกิริยาในรูปแบบสารละลายเกิดได้สม่ำเสมอ ผสมกันเป็นเนื้อเดียว (Homogeneous mixing) เพื่อให้สัญญาณการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Bakker, A.J. 1999. "Detection of microalbuminuria. Receiver operating characteristic curve analysis favors albumin-to-creatinine ratio over albumin concentration." *Diabetes Care*. 22(2) : 307-313.
- [2] Comper, W.D. Jerums, G. and Osicka, T.M. 2004. "Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography." *Clinical Biochemistry*. 37(2) : 105-111.
- [3] Teppo A.M. 1982. "Immunoturbidimetry of albumin and immunoglobulin G in urine." *Clinical Chemistry*. 28(6) : 1359-1361.
- [4] จิรนนท์ สิงห์ล่อ และณัฐพล โชติอนันต์พร. 2561. "อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับวิเคราะห์อัลบูมิน ครีอะตินิน และกรดยูริกในปัสสาวะภายในแผ่นเดียวกันอาศัยหลักการการเติมสารละลายมาตรฐาน." โครงการพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [5] สิริ สุภาพ. 2560. การเป็นโรคไตเรื้อรังจะเพิ่มความเสี่ยงในการเสียชีวิตก่อนวัยอันควร. [ออนไลน์]. Available : <https://www.bumrungrad.com/th/health-blog/june-2017/ckd-risks>.
- [6] Dominique D. และคณะ. 2560. การวินิจฉัยโรคไต. [ออนไลน์]. Available : <https://www.pobpad.com/การวินิจฉัยโรคไต>.
- [7] AMPRO health. 2560. อัลบูมิน คืออะไร? (Albumin). [ออนไลน์]. Available : <https://amprohealth.com/nutrition/albumin/>.
- [8] Albumin. [ออนไลน์]. Available : <https://www.rxreasoner.com/substances/albumin>.
- [9] Siamhealth. 2558. การเจาะเลือดตรวจ Creatinine. [ออนไลน์]. Available : [https://www.siamhealth.net/public\\_html/Health/Lab\\_interprete/creatinin.html](https://www.siamhealth.net/public_html/Health/Lab_interprete/creatinin.html).
- [10] NutriScience Innovations, LLC. 2563. Creatinine. [ออนไลน์]. Available : <https://fabricheminc.com/pharmaceutical-ingredients/creatinine-nf/>.
- [11] เมดไทย (Medthai). 2561. การตรวจกรดยูริก (Uric acid) ในเลือด คืออะไร?. [ออนไลน์]. Available : <https://medthai.com/การตรวจกรดยูริก/>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [12] ศูนย์กระดูก ไขข้อและกล้ามเนื้อ โรงพยาบาลเซนต์หลุยส์. 2562. โรคเก๊าท์. [ออนไลน์]. Available : [https://www.saintlouis.or.th/article/show/\\_9-6-2019-14:27](https://www.saintlouis.or.th/article/show/_9-6-2019-14:27).
- [13] AMPRO health. 2560. การตรวจปัสสาวะหาค่ากรดยูริก (Uric Acid) หรือ Urine Uric Acid. [ออนไลน์]. Available : <https://amprohealth.com/checkup/urine-uric-acid/>.
- [14] คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล. 2553. ภาวะกรดยูริกเกินในเลือด. [ออนไลน์]. Available : <https://www.si.mahidol.ac.th/th/healthdetail.asp?aid=829#:~:text=กรดยูริกในเลือดที่,ได้ยื่นและการทรงตัวได้>.
- [15] Watla-iad, K. Sakai, T. Teshima, N. Katoh, S. and Grudpan, K. 2007. “Successive determination of urinary protein and glucose using spectrophotometric sequential injection method.” *Analytica Chimica Acta*. 604(2) : 139-146.
- [16] Rossini, E.L. Milani, M.I. Carrilho, E. Pezza, L. and Pezza, H.R. 2018. “Simultaneous determination of renal function biomarkers in urine using a validated paper-based microfluidic analytical device.” *Analytica Chimica Acta*. 997 : 16-23.
- [17] Islam, M.N. Ahmed, I. Anik, M.I. Ferdous, M.S. and Khan, M.S. 2018. “Developing paper based diagnostic technique to detect uric acid in urine.” *Frontiers in Chemistry*. 6.
- [18] Dornelas, K.L. Dossi, N. and Piccin, E. 2015. “A simple method for patterning poly(dimethylsiloxane) barriers in paper using contact-printing with low-cost rubber stamps.” *Analytica Chimica Acta*. 858 : 82-90.
- [19] Myers, N.M. Kernisan, E.N. and Lieberman, M. 2015. “Lab on Paper: Iodometric Titration on a Printed Card.” *Analytical chemistry*. 87 : 3764–3770.
- [20] Yang, R.J. Tseng, C.C. Ju, W.J. Wang, H.L. and Fu, L.M. 2018. “A rapid paper-based detection system for determination of human serum albumin concentration.” *Chemical Engineering Journal*. 352 : 241–246.
- [21] Yang, R.J. Tseng, C.C. Ju, W.J. Fu, L.M. and Syu, M.P. 2018. “Integrated microfluidic paper-based system for determination of whole blood albumin.” *Sensors and Actuators B: Chemical*. 273 : 1091–1097.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [22] Yomthiangthae, P. Chailapakul, O. and Siangproh, W. 2022. "Rapid urinary albumin detection using a simple redox cycling process coupled with a paper-based device." *Journal of Electroanalytical chemistry*. 911 : 116230.
- [23] Cai, Y. Niu, J.C. Du, X.L. Fang, F. and Wu, Z.Y. 2019. "Novel field amplification for sensitive colorimetric detection of microalbuminuria on a paper-based analytical device." *Analytica Chimica Acta*. 1080 : 146–152.
- [24] Tambaru, D. Rupilu, R.H. Nitti, F. Gauru, I. and Suwari. 2017. "Development of paper-based sensor coupled with smartphone detector for simple creatinine determination." *Chemical Process and Engineering*. 1823 : 020095-1-020095-6.
- [25] Chattopadhyay, S. Ram, R. Sarkar, A and Chakraborty, S. 2022. "Smartphone-based automated estimation of plasma creatinine from finger-pricked blood on a paper strip via single-user step sample-to-result integration." *Measurement*. 199 : 111492.
- [26] Sittiwong, J. and Unob, F. 2016. "Paper-based Platform for urinary creatinine detection." *Analytical sciences*. 32(6) : 639–643.
- [27] Lewinska, I. Speichert, M. Granica, M. and Tymeck, L. 2021. "Colorimetric point-of-care paper-based sensors for urinary creatinine with smartphone readout." *Sensors and Actuators B: Chemical*. 340 : 129915.
- [28] Talalak, K. Noiphung, J. Songjaroen, T. Chailapakul, O. and Laiwattanapaisal, W. 2015. "A facile low-cost enzymatic paper-based assay for the determination of urine creatinine." *Talanta*. 144 : 315-921.
- [29] Kumar, A. Hens, A. Arun, R.K. Chatterjee, M. Mahato, K. Layek, K. and Chanda, N. 2015. "A paper based microfluidic device for easy detection of uric acid using positively charged gold nanoparticles." *Analyst*. 140(6) : 1817-1821.
- [30] Piermarini, S. Migliorelli, D. Volpe, G. Massoud, R. Pierantozzi, A. Cortese, C. and Palleschi, G. 2013. "Uricase biosensor based on a screen-printed electrode modified with Prussian blue for detection of uric acid in human blood serum." *Sensors and Actuators B: Chemical*. 179 : 170-174.

- [31] Yu, J. Wang, S. Ge, L. and Ge, S. 2011. "A novel chemiluminescence paper microfluidic biosensor based on enzymatic reaction for uric acid determination." *Biosensors and Bioelectronics*. 26(7) : 3284-3289.
- [32] Boonyasit, Y. and Laiwattanapaisal, W. 2015. "A Microfluidic Paper-Based Analytical Device for the Assay of Albumin-Corrected Fructosamine Values from Whole Blood Samples." *Bioanalysis*. 7(1) : 79-90.
- [33] Huang, J. Zhu, X.L. Wang, Y.M. Ge, J.H. Liu, J.W. and Jiang, J.H. 2018. "A Multiplex Paper-Based Nanobiocatalytic System for Simultaneous Determination of Glucose and Uric Acid in Whole Blood." *Analyst*. 143(18) : 4422-4428.
- [34] Chaiyo, S. Kalcher, K. Apilux, A. Chailapakula, O. and Siangproh, W. 2018. "A novel paper-based colorimetry device for the determination of the albumin to creatinine ratio." *Analyst*. 143 : 5453-5460.
- [35] Hiraoka, R. Kuwahara, K. Wen, Y. Yen, T. Hiruta, Y. Cheng, C. and Citterio, D. 2020. "Paper-Based Device for Naked Eye Urinary Albumin/Creatinine Ratio Evaluation." *ACS Sensors*. 5 : 1110-1118.
- [36] Wang, X. Li, F. Cai, Z. Liu, K. Li, J. Zhan, B. and He, J. 2018. "Sensitive colorimetric assay for uric acid and glucose detection based on multilayer-modified paper with smartphone as signal readout." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410 : 2647-2655.
- [37] Yu, J. Ge, L. Huang, J. Wang, S. and Ge, S. 2011. "Microfluidic Paper-Based Chemiluminescence Biosensor for Simultaneous Determination of Glucose and Uric Acid." *Lab Chip*. 11 : 1286-1291.
- [38] Chen, X. Chen, J. Wang, F. Xiang, X. Luo, M. Ji, X. and He, Z. 2012. "Determination of Glucose and Uric Acid with Bienzyme Colorimetry on Microfluidic Paper-Based Analysis Devices." *Biosensors and Bioelectronics*. 35 : 363-368.
- [39] Income, K. Ratnarathorn, N. Khamchaiyo, N. Srisuvo, C. Ruckthong, L. and Dungchai, W. 2019. "Disposable Nonenzymatic Uric Acid and Creatinine Sensors Using  $\mu$ PAD Coupled with Screen-Printed Reduced Graphene Oxide-Gold Nanocomposites." *Hindawi International Journal of Analytical Chemistry*.

- [40] Cincotto, F.H. Fava, E.L. Moraes, F.C. Fatibello-Filho, O. and Faria, R.C. 2019. “A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers.” *Talanta*. 195 : 62-68.
- [41] Fu, X. Xia, B. Ji, B. Lei, S. and Zhou, Y. 2019. “Flow controllable three-dimensional paper-based microfluidic analytical devices fabricated by 3D printing technology.” *Analytica Chimica Acta*. 1065 : 64-70.
- [42] Fava, E.L. do Prado, T.M. Silva, T.A. de Moraes, F.C. Faria, R.C. and Fatibello-Filho, O. 2020. “New Disposable Electrochemical Paper-based Microfluidic Device with Multiplexed Electrodes for Biomarkers Determination in Urine Sample.” *Electroanalysis*. 32 : 1075-1083.
- [43] Garcia, P.T. Garcia Cardoso, T.M. Garcia, C.D. Carrilho, E. and Coltro, W.K.T. 2014. “A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays.” *RSC Advances*. 4 : 37637-37644.
- [44] Li, F. Wang, X. Liu, J. Hu, Y. and He, J. 2019. “Double-layered microfluidic paper-based device with multiple colorimetric indicators for multiplexed detection of biomolecules.” *Sensors and Actuators B: Chemical*. 288 : 266 – 273.
- [45] Aguiar, J.I.S. Ribeiro, S.O. Leite, A. Rangel, M. Rangel, A.O.S.S. and Mesquita, R.B.R. 2023. “Iron Determination in Natural Waters Using a Synthesised 3-Hydroxy-4-Pyridione Ligand in a Newly Developed Microfluidic Paper-Based Device.” *Chemosensors*., 11(2) : 101.



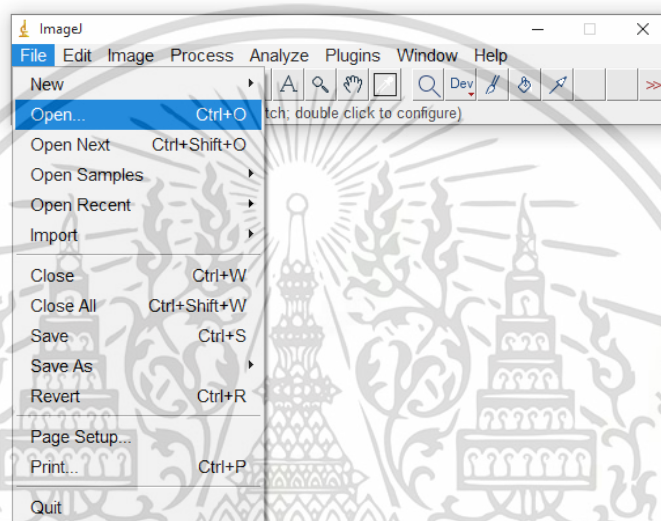
## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

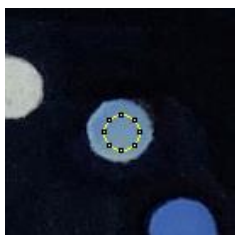
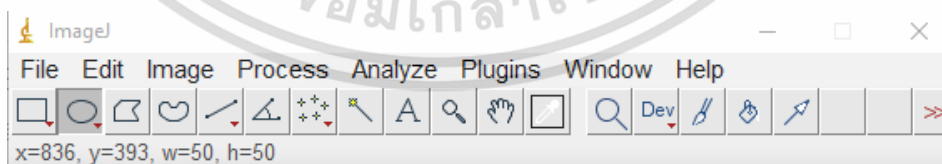
### การวิเคราะห์ค่าสี RGB จากโปรแกรม Image J™

1. ติดตั้งโปรแกรม Image J™
2. เปิดโปรแกรม Image J™ จากนั้นเลือกเมนู File > Open เพื่อเปิดรูปที่ต้องการหาค่าสี RGB



รูป ก.1 เลือกรูปที่ต้องการวิเคราะห์

3. กำหนดพื้นที่ในการวิเคราะห์เป็นวงกลม
4. กด Shift พร้อมคลิกเมาส์และลากที่รูปภาพเพื่อสร้างกรอบวงกลมบริเวณที่ต้องการ ดังรูป ก.2

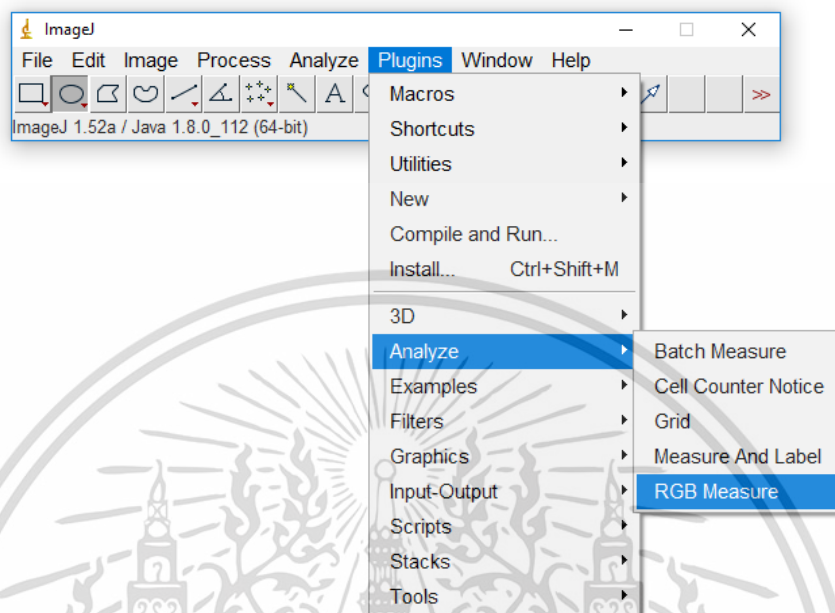


รูป ก.2 การเลือกพื้นที่ในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เลือกที่เมนู Plugins > Analyze > RGB measure เพื่อทำการวิเคราะห์ค่าความเข้มแสง

ดังรูป ก.3



รูป ก.3 วิธีการเปิดหน้าต่างวิเคราะห์ค่าความเข้มแสง

6. เมื่อกดเมนู RGB Measure ในข้อ 5 จะปรากฏหน้าต่าง Result เพื่อแสดงผลการวิเคราะห์

ดังรูป ก.4

File	Edit	Font	Results
Label	Area	Mean	Min Max
1 Red	1976	83.836	50 130
2 Green	1976	119.083	86 166
3 Blue	1976	176.160	141 224
4 (R+G+B)/3	1976	126.323	93 173
5 0.299R+0.587G+0.114B	1976	115.021	82 162

รูป ก.4 หน้าต่าง Results แสดงผลการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การศึกษารูปแบบการหยดสารละลาย

#### ก. รูปแบบที่ 1

##### (1) การเตรียม $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัด

1. ปิเปตสารละลาย TBPE ความเข้มข้น  $5 \times 10^{-4}$  โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง b, c และ d เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

2. ปิเปตสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.2 ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Channel ตำแหน่ง ii, iii และ iv เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 5, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Channel ตำแหน่ง ii, iii และ iv ตามลำดับ เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

4. ปิเปตสารละลายกรดพิคริก ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ใน 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง e, f และ g เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

5. ปิเปตสารละลายมาตรฐานครีอะตินิน ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Channel ตำแหน่ง v, vi และ vii ตามลำดับ เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

6. ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Channel ตำแหน่ง viii, ix และ x เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

7. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดยูริก ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Channel ตำแหน่ง viii, ix และ x ตามลำดับ เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

8. ปิเปตสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง h, i และ j เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

## (2) ขั้นตอนการตรวจวัด

1. ปิเปตสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิกรัมต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Channel ตำแหน่ง i - x และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ปิเปตน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 5 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที จากนั้นทำการถ่ายรูปด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และประมวลผลความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ™

## ข. รูปแบบที่ 2

### (1) การเตรียม $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัด

1. ปิเปตสารละลาย TBPE ความเข้มข้น  $5 \times 10^{-4}$  โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ในส่วน Detection zone ตำแหน่ง B, C และ D เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

2. ปิเปตสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.2 ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง b, c และ d เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน ความเข้มข้น 5, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง b, c และ d ตามลำดับ เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

4. ปิเปตสารละลายกรดพิคริก ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ใน 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ในส่วน Detection zone ตำแหน่ง E, F และ G เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

5. ปิเปตสารละลายมาตรฐานครีอะตินิน ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง e, f และ g ตามลำดับ เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ปิเปตสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ในส่วน Detection zone ตำแหน่ง H, I และ J เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

7. ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง h, i และ j เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

8. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดยูริก ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง h, i และ j เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

## (2) ขั้นตอนการตรวจวัด

1. ปิเปตสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิกรัมต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Channel ตำแหน่ง i - x และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ปิเปตน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 5 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที จากนั้นทำการถ่ายภาพด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือ และประมวลผลความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ™

## ค. รูปแบบที่ 3

### (1) การเตรียม $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัด

ในการเตรียม  $\mu$ PAD รูปแบบที่ 3 สำหรับการวิเคราะห์อัลบูมินและครีอะตินินจะทำการทดลองเช่นเดียวกันกับรูปแบบที่ 2 ทุกประการ แต่การวิเคราะห์กรดยูริก จะทำการทดลอง ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ปิเปตสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ในส่วน Detection zone ตำแหน่ง H, I และ J เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

2. ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ในส่วน Detection zone ตำแหน่ง H, I และ J เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดยูริก ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง h, i และ j เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

## (2) ขั้นตอนการตรวจวัด

1. ปิเปตสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิกรัมต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Channel ตำแหน่ง i - x และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ปิเปตน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 5 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที จากนั้นทำการถ่ายรูปด้วยกล้อง โทรศัพท์มือถือ และประมวลผลความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ™

## ง. รูปแบบที่ 4

### (1) การเตรียม $\mu$ PAD เพื่อการตรวจวัด

#### ขั้นตอนการหยด Reagents รอบที่ 1

1. ปิเปตสารละลาย TBPE ความเข้มข้น  $5 \times 10^{-4}$  โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ส่วน Detection zone ที่ตำแหน่ง B, C และ D

2. ปิเปตสารละลายกรดพิคริก ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ใน 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ส่วน Detection zone ที่ตำแหน่ง E, F และ G

3. ปิเปตสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ในส่วน Detection zone ตำแหน่ง H, I และ J

4. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

#### ขั้นตอนการหยด Reagents รอบที่ 2

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับขั้นตอนการหยด Reagents รอบที่ 1 ทุกประการ

### ขั้นตอนการหยด Reagents รอบที่ 3

1. ปิเปตสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.2 ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ส่วน Detection zone ที่ตำแหน่ง B, C และ D
2. ปิเปตสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ในส่วน Detection zone ตำแหน่ง H, I และ J
3. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

### ขั้นตอนการหยด Reagents รอบที่ 4

1. ปิเปตสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.2 ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ส่วน Detection zone ที่ตำแหน่ง B, C และ D
2. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

### ขั้นตอนการหยด Spiked Standard

หลังจากการหยด Reagents รอบที่ 4 เสร็จแล้ว ทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานอลูมิเนียม ความเข้มข้น 5, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ส่วน Detection zone ที่ตำแหน่ง B, C และ D ตามลำดับ
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานครีอะตินิน ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ส่วน Detection zone ที่ตำแหน่ง E, F และ G ตามลำดับ
3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดยูริก ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Detection layer ในส่วน Detection zone ตำแหน่ง H, I และ J ตามลำดับ
4. เป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

## (2) ขั้นตอนการตรวจวัด

1. ปิเปตสารละลาย Mixed standard (200 มิลลิกรัมต่อลิตร อัลบูมิน, 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ครีอะตินิน และ 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร กรดยูริก) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Auxiliary layer ในส่วน Sample zone ตำแหน่ง a - j และเป่าให้แห้งเป็นเวลา 30 วินาที

2. ปิเปตน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ลงใน Carrier zone บน Auxiliary layer รอให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 5 นาที เป่าให้แห้ง 1 นาที จากนั้นทำการถ่ายรูปด้วยกล้อง โทรศัพท์มือถือ และประมวลผลความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ™

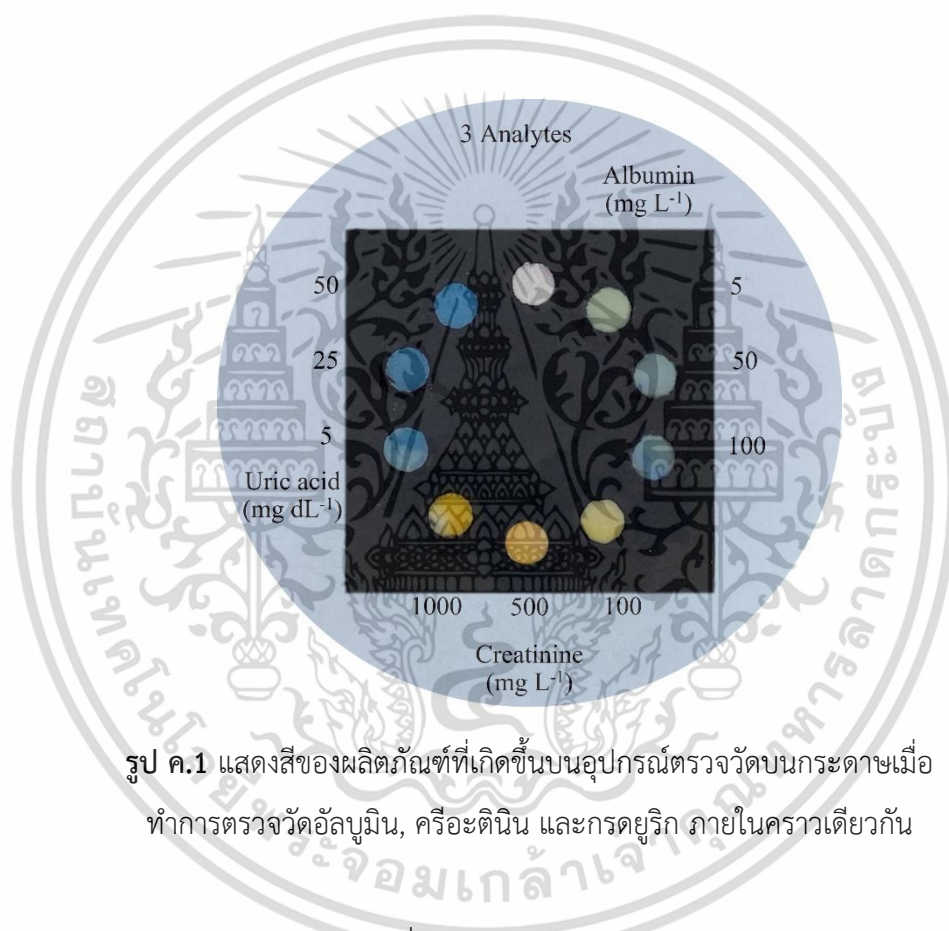


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### การตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก ภายในคราวเดียวกันด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

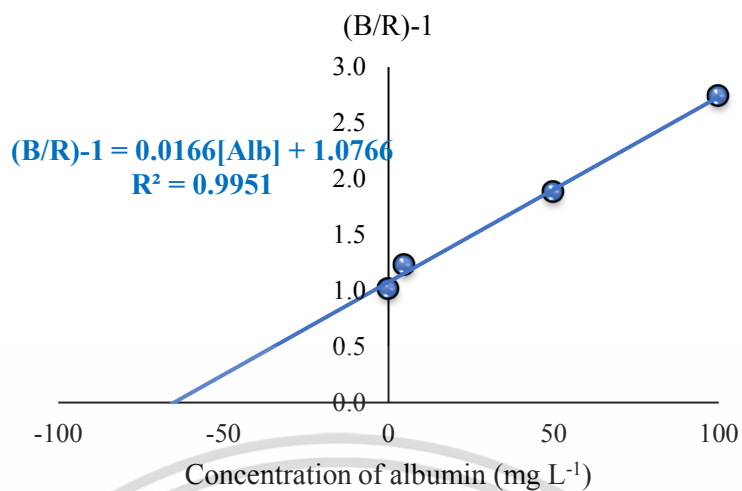
ทำการศึกษาการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริกภายในคราวเดียวกันด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ ได้ผลการทดลองดังรูป ค.1



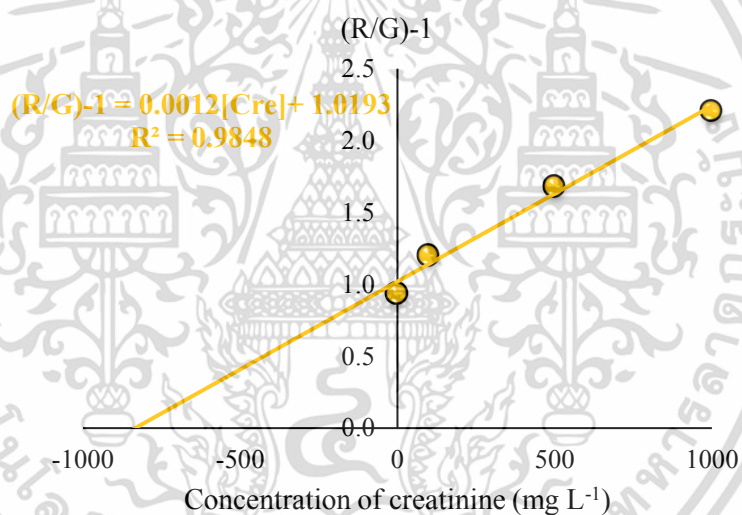
รูป ค.1 แสดงสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษเมื่อทำการตรวจวัดอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก ภายในคราวเดียวกัน

จากรูป ค.1 นำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละตัว ได้ดังรูป ค.2, ค.3 และ ค.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

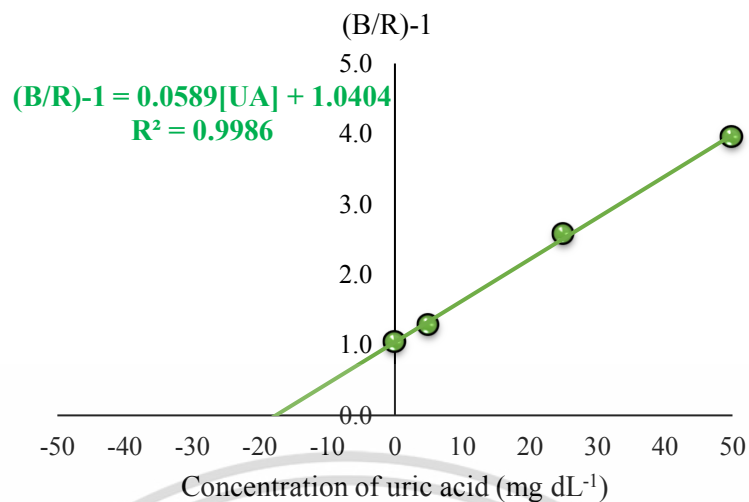


รูป ค.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า (B/R)-1 กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน



รูป ค.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า (R/G)-1 กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานครีเอตินิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป ค.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า (B/R)-1 กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดยูริก

จากรูป ค.2, ค.3 และ ค.4 พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน, ครีอะตินิน และกรดยูริก มีความเป็นเส้นตรงที่ดี อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างปัสสาวะจริงได้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววรรณกานต์ วิสัยชนม์
วัน เดือน ปีเกิด	4 กันยายน 2539
ที่อยู่ปัจจุบัน	46 หมู่ 2 ต.หนองบ่อ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	(2561) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมีอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 3.47 (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย (RA/TA) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. A Simple and Green Approach for Colorimetric Ammonia Determination by Combining Pervaporation with Paper Impregnated Anthocyanins Extracted from Red Cabbage

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้