

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาชุดตรวจไมโครอัลบูมินและโปรตีนในปัสสาวะ พร้อมโปรแกรม
คำนวณเพื่อประเมินผู้ป่วยโรคไตระยะแรกเริ่มสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน
Development of Biosensor for Urine Microalbumin and Protein
Detection and Program calculation for predictor of progressive renal
disorders in diabetes patients

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรมล ธรรมวิริยสดี

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

เลขสัญญาทุน AHS ๐๖/๒๕๖๖

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.सानิตา สิงห์สนั่น สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลธิดา กล้ารอด สาขาวิชากายภาพบำบัด คณะสหเวชศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๖ (ที่ได้รับเงินอุดหนุนฯ)

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม /ปี พ.ศ.๒๕๖๗ ที่จัดทำรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
คำนำ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.5 นิยามศัพท์.....	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไตและหน้าที่ของไต.....	4
2.2 ครีเอตินิน.....	5
2.3 อัลบูมิน.....	5
2.4 ภาวะไตวายเรื้อรัง	9
2.5 ทฤษฎีเกี่ยวกับไบโอเซนเซอร์.....	11
2.6 การยืนยันความถูกต้องของวิธี.....	13
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 ประชากร.....	20
3.2 กลุ่มตัวอย่างและสุ่มตัวอย่าง.....	20
3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	21
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	22
3.5 ระยะเวลาการวิจัย.....	23
3.6 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี.....	23
3.7 การสร้างอุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษ.....	25
3.8 การประสิทธิภาพการตรวจวัดครีเอตินินและอัลบูมินด้วยชุดตรวจวัดแบบกระดาษ.....	25
3.9 การทดสอบประสิทธิภาพอ่านค่ากึ่งเชิงปริมาณจากการเปลี่ยนแปลงของสี.....	27
ด้วยตาเปล่าในการใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	
3.10 การทดสอบประสิทธิภาพการแปลผล UACR ด้วยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น.....	28
เปรียบเทียบกับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ด้วยโปรแกรมกรมคำนวณ	

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 ผลการวิจัย.....	29
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม.....	31
4.3 การทดสอบหาปริมาณครีอะตินินด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษ.....	33
4.4 การทดสอบหาปริมาณอัลบูมินด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษ.....	34
4.5 ผลการทวนสอบประสิทธิภาพการใช้ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น.....	35
และเปรียบเทียบผลกับค่าที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ	
4.6 อภิปรายผล.....	38
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	41
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	42
บรรณานุกรม.....	43
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. เอกสารใบรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์	
ภาคผนวก ข. แบบตอบรับการนำเสนอผลงานวิจัยที่ประชุมนานาชาติของนิสิตปริญญาโท	
บทคัดย่อและการนำเสนอส่วนหนึ่งของผลงานโครงการวิจัย	
ภาคผนวก ค. หลักฐานการยื่นคำขออนุสิทธิบัตร 2 เรื่อง	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 : การประมาณค่าอัตราการกรองของไตด้วยซีรัมครีเอตินิน..... โดยสมการ CKD-EPI creatinine equation	6
ตารางที่ 2.2 : ผลการคำนวณการแปลผล.....	6
ตารางที่ 2.3 : ระดับของค่า Albumin.....	9
ตารางที่ 2.4: ระยะของโรคไตเรื้อรัง.....	11
ตารางที่ 3.1: ปริมาตรของสารละลายสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานที่ปีเปิดจากสารละลายมาตรฐาน..... ครีเอตินินความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร	24
ตารางที่ 4.1 แสดงประสิทธิภาพของความไว และความจำเพาะของการตรวจวัดครีเอตินินในซีรัม... ด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจากเครื่องตรวจ วิเคราะห์อัตโนมัติ	35
ตารางที่ 4.2 แสดงประสิทธิภาพของความไว และความจำเพาะของการตรวจวัดครีเอตินิน..... ในปัสสาวะด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจาก เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ	35
ตารางที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพของความไว และความจำเพาะของการตรวจวัดอัลบูมิน..... ในซีรัมด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจาก เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ	36
ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพของความไว และความจำเพาะของการตรวจวัดอัลบูมิน..... ในปัสสาวะด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน จากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ	37

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบภายในไต.....	4
ภาพที่ 3.1 แสดงโปรแกรมและการคำนวณสัดส่วน UACR.....	28
ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับเวลาในการเกิดปฏิกิริยา..... ระหว่าง Picric acid และสารละลาย Creatinine มาตรฐาน	29
ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานครีอะตินินกับ.... ค่าความเข้มข้นของสีที่เพิ่มขึ้น	30
ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานอัลบูมินกับ..... ค่าความเข้มข้นของสีที่เพิ่มขึ้น	32
ภาพที่ 4.4 ชุดตรวจวัดปริมาณครีอะตินินเชิงกึ่งปริมาณ ในช่วง 0-1,000 mg/dL.....	33
ภาพที่ 4.5 ชุดทดสอบแบบหยดและการอ่านแปลผลของชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีน..... อัลบูมินเชิงกึ่งปริมาณ 0-300 mg/mL	34
ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของอัลบูมินต่อครีอะตินินในปัสสาวะ (UACR) จากชุดทดสอบแบบกระดาษกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ	38

หัวข้อวิจัย การพัฒนาชุดตรวจไมโครอัลบูมินและโปรตีนในปัสสาวะ พร้อมโปรแกรมคำนวณเพื่อ
ประเมินผู้ป่วยโรคไตระยะแรกเริ่มสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน

ชื่อผู้วิจัย ผศ.ดร.นิรมล ธรรมวิริยสดี และคณะ

หน่วยงาน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ปีงบประมาณ ๒๕๖๖

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและสร้างชุดตรวจวัดครีเอตินินและอัลบูมินบนกระดาษที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์และแปลผลของค่า UACR กับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้ในโรงพยาบาลตามวิธีมาตรฐาน ประเมินประสิทธิภาพและทวนสอบผลของการทดสอบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปัสสาวะแปลผลผ่านโปรแกรมคำนวณเพื่อเปรียบเทียบการแปลผลและความเป็นไปได้ในการนำงานจริงเพื่อประเมินนำมาใช้กลุ่มเสี่ยงโรคไตในผู้ป่วยเบาหวาน

ผลการวิจัยพบว่า ชุดทดสอบตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ระดับครีเอตินินได้ระยะเวลา 40 นาที ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 100-1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ส่วนการหาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) อยู่ที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) คือ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เมื่อทดสอบตัวอย่างปัสสาวะพบว่า ให้ความถูกต้อง (% Accuracy) ที่ 98.81% ผลการทดสอบตรวจวัดสามารถวิเคราะห์อัลบูมินอุปกรณ์นี้มีความเที่ยงสูง สามารถทำซ้ำได้ LOD เท่ากับ 1.26 g/dL และ LOQ เท่ากับ 2.18 g/dL ส่วนการทดสอบการในการลงตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน Control normal ให้ความถูกต้อง (%Accuracy) ที่ 96.45% วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของครีเอตินินกับอัลบูมินในปัสสาวะที่ได้จากชุดทดสอบอัลบูมิน-ครีเอตินินพบว่า ค่า UACR ที่คำนวณได้จากการอ่านด้วยตาเปล่าจากชุดทดสอบสอดคล้องกันกับค่า UACR ที่ได้จากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติเป็นเส้นตรง ($r = 0.31, p < 0.05$) อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า ชุดตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างจากการคิดคำนวณด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ผลการทดสอบประสิทธิภาพและทวนสอบผลในการทดสอบในสิ่งส่งตรวจปัสสาวะ ชุดตรวจวัดปริมาณครีเอตินินและอัลบูมินบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณจากการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นเพื่อบอกระดับครีเอตินินและโปรตีนอัลบูมินที่พบในเลือดและปัสสาวะ ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยตัวเองและให้ผลภายใน 15-30 นาที ให้ผลที่รวดเร็ว อ่านและแปลผลได้ง่ายจากการเทียบสีบอกระดับได้ ซึ่งชุดตรวจนี้สามารถใช้ตรวจทั้งครีเอตินินไปพร้อมกับระดับโปรตีนอัลบูมินจากการใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่ได้ผ่านการใช้โปรแกรมคำนวณตามที่กำหนด ในการนำมาใช้ประเมินความเสี่ยงในผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนผิดปกติทางไต ในผู้ป่วยโรคไตระยะแรกเริ่มทั้งในกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นกลุ่มเสี่ยงหลัก ที่ให้ประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

Title	Development of Biosensor for Urine Microalbumin and Protein Detection and Program calculation for predictor of progressive renal disorders in diabetes patients
Researcher	Assist Prof. Niramorn Thamwiriyasati and <i>et al.</i>
Affiliation	Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University
Year	2023

Abstract

The purpose of this research was to develop and create a paper-based test kit for measuring creatinine and albumin, compare the analytical efficiency and interpretation of UACR values with those from an automated analyzer used in hospitals according to standard methods, and assess the performance and validation of test results in urine samples through a calculation program to compare results and feasibility for use in high-risk groups for kidney disease, particularly diabetic patients.

The research findings revealed that the developed paper-based test kit could analyze creatinine levels within 40 minutes, with a linear range of 100-1000 mg/dL. The limit of detection (LOD) was 1.25 mg/dL, and the limit of quantification (LOQ) was 100 mg/dL. Testing of urine samples showed an accuracy of 98.81%. For albumin, the device demonstrated high precision with an LOD of 1.26 g/dL and an LOQ of 2.18 g/dL. Testing of standard control serum samples yielded an accuracy of 96.45%. The relationship between creatinine and albumin ratio in urine, as measured by the albumin-creatinine test kit, was found to be linearly correlated with the UACR values obtained from the automated analyzer ($r = 0.31$, $p < 0.05$), indicating that the developed test kit's performance is comparable to that of the automated analyzer. The effectiveness and validation of the paper-based creatinine and albumin test kit showed that it can provide both qualitative and semi-quantitative analysis through color change, reflecting creatinine and albumin levels in urine and blood. The test can be self-administered, delivering results within 15-30 minutes with easy interpretation using color comparison. This kit allows simultaneous measurement of creatinine and albumin levels from urine samples using a specified calculation program, making it useful for evaluating risk in patients with early-stage kidney complications, including normal individuals and diabetic patients, with performance comparable to that of automated analyzers.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอีกปัญหาหนึ่งคือปัญหาโรคไตเรื้อรัง ซึ่งรวมทั้งโรคไตวายระยะสุดท้าย เนื่องจากมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงมาก ทำให้รัฐต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนมากในการดูแลรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้ จากรายงานของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย เมื่อปี 2547 อุบัติการณ์ของผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายอยู่ที่ 300 คน ต่อประชากร 1 ล้านคนต่อปี ภาวะที่ผู้ป่วยเป็นโรคไตวายเรื้อรังมากขึ้น ทำให้มีแนวคิดในการป้องกันการเกิดโรคไตวายระยะสุดท้าย หากมีวิธีการค้นหาผู้ป่วยในระยะต้น ซึ่งยังไม่มีอาการ และให้การดูแลรักษาอย่างเหมาะสม อาจช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคไตวายเรื้อรัง

โรคไตวายเรื้อรัง (Chronic kidney disease) หรือ CKD เป็นภาวะที่ไตทำงานได้ลดลงซึ่งส่วนใหญ่ มักจะพบในผู้สูงอายุ และเป็นภัยเงียบเนื่องจากแสดงอาการออกมาเมื่อไตเสียการทำงานไปมากกว่า 70% และมักพบในผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่ได้รับการรักษาหรือควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดี อาจนำไปสู่การเป็นโรคไต ระยะสุดท้าย และโรคหลอดเลือดหัวใจได้ แพทย์จึงต้องตรวจดูการทำงานของไตเป็นระยะ ๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อสังเกตการณ์ วิธีการตรวจประเมินความเสี่ยงการเกิดโรคไตระยะแรกเริ่ม ที่ง่าย สะดวก และตรวจได้ บ่อยครั้งจะทำให้สามารถสังเกตและเฝ้าระวังการดำเนินการของโรคที่นำไปสู่ภาวะรุนแรงได้ โดยปกติในทาง คลินิก การตรวจค่า อัลบูมิน (Albumin) ที่สูงในน้ำปัสสาวะเพียงอย่างเดียว ก็สามารถบ่งชี้ถึงปัญหา สุขภาพไตได้ แต่ค่าที่ได้ในน้ำปัสสาวะไม่แน่นอนและผันแปรตามปริมาตรน้ำ ดังนั้นเพื่อความแม่นยำมากขึ้นจึงได้มีการคิดสัดส่วนของ “อัลบูมิน” (Albumin) ต่อ “ครีเอตินิน” (Creatinine) หรือ Urine albumin-to-creatinine ratio (UACR) โดยการตรวจเพียงครั้งเดียว (spot test) เพื่อตัดปัจจัยเรื่องน้ำ ออกไป โดยไม่จำเป็นต้องรวบรวมปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

คณะผู้วิจัยมุ่งเน้นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่สามารถตรวจไมโครอัลบูมินและระดับ โปรตีนในปัสสาวะ พร้อมโปรแกรมคำนวณเพื่อประเมินผู้ป่วยโรคไตระยะแรกเริ่มสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน ที่ สามารถตรวจวัด Spot Urine albumin-to-creatinine ratio (UACR) บนกระดาษ โดยใช้หยดตรวจวัด และสิ่งตัวอย่างปริมาณน้อย ลดต้นทุนการตรวจ มีศักยภาพสูงที่จะนำมาใช้ในงานระดับภาคสนาม ซึ่งวิธีที่ พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย สอดคล้องตามแผนยุทธศาสตร์ของชาติภายใต้ไทยแลนด์ 4.0 รองรับ การลงทุนอุตสาหกรรม Super Cluster อุตสาหกรรมการแพทย์ครบวงจร โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือและความ พิเศษที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและเข้าใจง่าย สามารถแปลผลผ่านโปรแกรมการ คำนวณเพื่อประเมินความเสี่ยงได้ด้วยตนเองที่บ้าน

โดยงานวิจัยนี้จะพัฒนาจากชุดตรวจให้มีประสิทธิภาพเทียบเท่าห้องปฏิบัติการคลินิก คู่มือปฏิบัติของการเกิดสีจากสารเคมีในน้ำยาที่ชุบบนกระดาษ และดูความเข้มของสีที่เปลี่ยนแปลงไป แปลเป็นระดับความ เข้มข้นของสารอัลบูมินและครีเอตินินกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) ที่ได้จากการทดสอบทางห้องแลป และนำระดับความเข้มของทั้งสองการทดสอบมาคำนวณหาอัตราส่วน UACR แปลความหมายของ ผลทดสอบต่อความเสี่ยงของโรคไตระยะแรกเริ่มเพื่อผลประโยชน์ของคนไข้ หรือเว็บไซต์คำนวณและแปล ผลออนไลน์ที่ง่ายต่อความเข้าใจและเข้าใจง่ายไม่ซับซ้อน เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจที่

พัฒนาขึ้นกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้ในโรงพยาบาลตามวิธีมาตรฐานและประเมินประสิทธิภาพและทวนสอบผลของการทดสอบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปัสสาวะ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้ออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ให้สามารถวิเคราะห์ครีเอตินิน (Creatinine) และอัลบูมิน (Albumin) ได้พร้อมกัน (Design and fabrication) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์การทดสอบแต่ละ assay บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้ออกแบบขึ้น สภาวะที่จำเป็นต้องศึกษา เช่น ชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม เวลาในการเกิดปฏิกิริยา ความเข้มข้นเริ่มต้น และความเข้มข้นของสีที่เกิดปฏิกิริยา โดยสภาวะที่ดีจะต้องสามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ให้ความไวสูง มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่รวดเร็ว (Colorimetric detection) ทั้งในสภาพเปียกและแห้ง ออกแบบวิธีวิเคราะห์บนกระดาษที่ทำให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดพร้อมใช้งาน (Ready to use)

โดยมีวัตถุประสงค์คือ

- 1) เพื่อพัฒนาชุดตรวจ Urine spot albumin to-creatinine ratio
- 2) เพื่อสร้างโปรแกรมการคิดสัดส่วน UACR ในการแปลผลเพื่อประเมินความเสี่ยงการเกิดไตระยะเริ่มแรก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลผลิตหลัก (Output)

1. ชุดตรวจวัด spot UACR ตรวจวัดอัลบูมิน และครีเอตินิน แบบกระดาษ และโปรแกรมการคิดประเมินสัดส่วน UACR ในการประเมินความเสี่ยงการเกิดไตระยะเริ่มแรก
2. ผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ Q2 จำนวน 1 เรื่อง

ร่าง Manuscript “Paper-Based Coloric Test Kit for Naked Eye Urinary Albumin/Creatinine Ratio Evaluation”

3. ได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตรการประดิษฐ์ จำนวน 2 เรื่อง
 - 1) ชุดทดสอบวัดระดับครีเอตินินกึ่งเชิงปริมาณ ได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตรการประดิษฐ์ “กรรมวิธีการผลิตชุดตรวจวัดระดับครีเอตินินแบบกระดาษ เลขที่คำขอ 2403001557 วันที่ยื่นคำขอ วันที่ 29 พ.ค. พ.ศ. 2567
 - 2) ชุดทดสอบวัดระดับอัลบูมินกึ่งเชิงปริมาณ ได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตรการประดิษฐ์ “กรรมวิธีการผลิตชุดตรวจวัดระดับอัลบูมินแบบกระดาษ เลขที่คำขอ 2403001555 วันที่ยื่นคำขอ วันที่ 29 พ.ค. พ.ศ. 2567

ผลผลิตรอง

1. ผลิตภัณฑ์ระดับปริญญาโท จำนวน 1 คน
2. พัฒนานักวิจัยปริญญาตรี จำนวน 2 คน

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ให้สามารถวิเคราะห์ครีเอตินิน (Creatinine) และอัลบูมิน (Albumin) ได้พร้อมกัน (Design and fabrication) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์การทดสอบแต่ละ assay บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้ออกแบบขึ้น สภาวะที่จำเป็นต้องศึกษา เช่น

ปริมาณของสาร เวลาในการเกิดปฏิกิริยา ความเข้มข้นเริ่มต้น และความเข้มข้นของสีที่เกิดปฏิกิริยา โดยสถานะที่ดีจะต้องสามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ให้ความไวสูง มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่รวดเร็ว (Colorimetric detection) ทั้งในสภาพเปียกและแห้ง ออกแบบวิธีวิเคราะห์บนกระดาษที่ทำให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดพร้อมใช้งาน (Ready to use) โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมรีเอเจนต์ขึ้นมาใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ทดสอบประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น (Method validation) ด้วยสารละลายมาตรฐาน โดยคำนวณค่าทางวิเคราะห์ (Method validation) เช่น ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ค่าการทำซ้ำ (reproducibility, %RSD) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) ขีดจำกัดในการหาปริมาณ (limit of quantitation) เป็นต้น และนำมาทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะ 100 ราย เปรียบเทียบผลระหว่างชุดตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้ในโรงพยาบาลตามวิธีมาตรฐานและประเมินประสิทธิภาพและทวนสอบผลของการทดสอบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปัสสาวะ แปลผลผ่านโปรแกรมคำนวณในการแปลผลและนำมาใช้งานจริง

1.5 นิยามศัพท์

ADH	Antidiuretic hormone
BUN	Blood Urea Nitrogen
Cr	Creatinine
CN	Control normal
CP	Control pathogen
dL	Deciliter
g	gram
GFR	Glomerular Filtration Rate
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Milligrams
min	Minute
mL	Milliliter
NaOH	Sodium Hydroxide
nm	Nanometer
R	Coefficient of variation
RSD	Relative Standard Deviation
U	unified atomic mass unit u
UA	Uric acid
μL	Microlitre

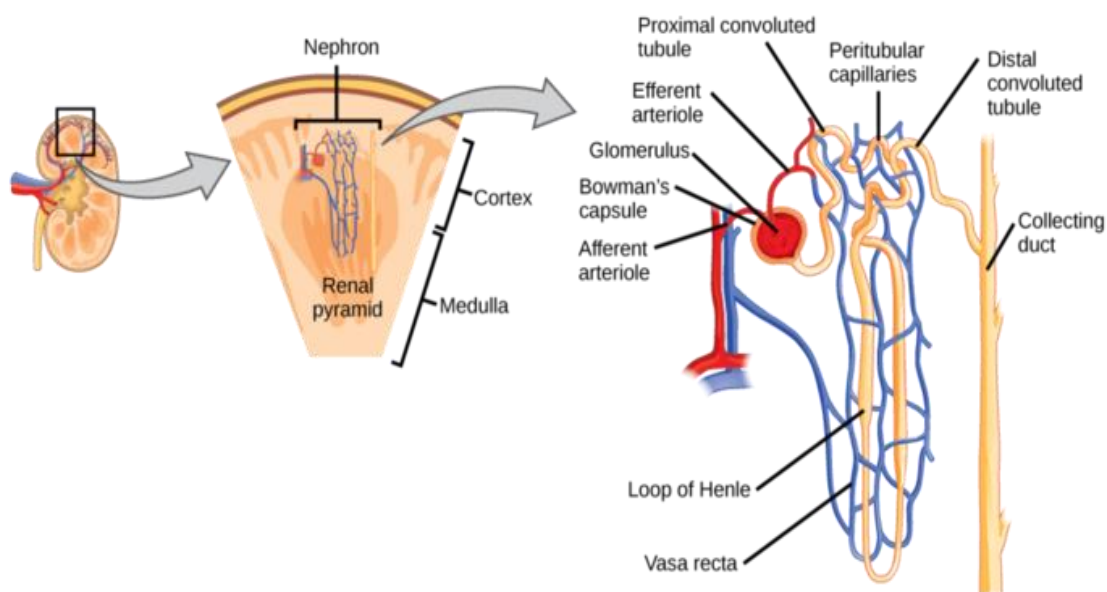
บทที่ 2

วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไตเรื้อรังพบเป็นปัญหาสำคัญก่อนเข้าสู่วัยสูงอายุ โดยเฉพาะอายุเลย 30 ปีขึ้นไป ไตจะเสื่อมเนื่องจากปริมาณเลือดไปเลี้ยงไตลดลงและมีการลดปริมาณของหน่วยไตลง ปัจจัยเสี่ยงได้แก่ พฤติกรรมสุขภาพและการเจ็บป่วยด้วยโรคต่างๆ เช่น ความดันโลหิตสูง และเบาหวาน วิธีการที่ได้ผลดี คือ การป้องกันและรักษาโรคดังกล่าวก่อนที่จะเกิดไตเสื่อมเรื้อรัง เช่น การบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพไต หลีกเลี่ยงพฤติกรรมที่ส่งเสริมการทำงานของไตลดลง ดังนั้น การคัดกรองบุคคลที่มีความเสี่ยงต่อไตเสื่อมในระยะแรก รวมทั้งการให้ความรู้ด้านสุขภาพเพื่อปรับเปลี่ยนพฤติกรรม จึงจำเป็นเพื่อควบคุมโรคและช่วยเหลือไม่ให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เมื่ออายุเพิ่มขึ้นการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ จะเสื่อมลงโดยเฉพาะวัยสูงอายุไตจะทำงานลดลงเนื่องจากขนาดและจำนวนหน่วยไตที่ทำงานได้ลดลงร่วมกับปริมาณเลือดมาเลี้ยงไตลดลง ซึ่งปกติไตจะทำหน้าที่อย่างคงที่ตั้งแต่ทารกจนถึงวัยผู้ใหญ่ตอนปลาย เมื่ออายุเลย 30 ปีขึ้นไปอัตราการกรองที่ไตจะลดลง 1 มิลลิลิตร/นาที/1.73 ตารางเมตร และยังพบว่าโครงสร้างของไตมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงไตจะลดลงร้อยละ 1 และเมื่ออายุ 70 ปี หน้าที่ไตจะลดลงร้อยละ 50 หรือมากกว่า (Ali & Gray-Vickrey, 2011)

2.1 ไตและหน้าที่ของไต

ไต เป็นอวัยวะที่สำคัญของระบบขับถ่ายของร่างกาย ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยไต (Nephron) ย่อยเล็ก ๆ จำนวนมากดังภาพที่ 2.1 ไตแต่ละข้างจะมีหน่วยไตประมาณ 1.0-1.25 ล้านหน่วย ซึ่งหน่วยไตจะประกอบไปด้วย กรวยไต (glomerulus) มีหน้าที่กรองของเสีย และท่อไต (tubule) ทำหน้าที่ขับถ่าย (secrete) และดูดกลับสารกลับ (reabsorb)



ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบภายในไต

ที่มา: <https://bio.libretexts.org/>

ไตทำหน้าที่หลักสำคัญที่สำคัญ 3 ประการ ได้แก่ 1) หน้าที่ในการกำจัดของเสียที่เพิ่มขึ้น โดยจะกำจัดน้ำส่วนเกิน ของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) สารพิษและสารแปลกปลอมผ่านปัสสาวะ ซึ่งจะเก็บรักษาสารที่จะเก็บรักษาที่จำเป็นต่อร่างกายโดยการดูดกลับที่ท่อหน่วยไต เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กลูโคส เป็นต้น 2) ทำหน้าที่ในการปรับสมดุลแร่ธาตุ แรงดันออสโมติกของเหลว ควบคุมสมดุลน้ำและความเป็นกรดต่างของของเหลวในร่างกายและ 3) ทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมน ได้แก่ erythropoietin ทำหน้าที่เร่งการสร้างเม็ดเลือดแดง rennin ที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับและโพแทสเซียมในเลือดและ cholecalciferol (active vitamin D) ที่ควบคุมปริมาณแคลเซียมและฟอสเฟตในเลือด ซึ่ง

2.2 ครีเอตินิน (Creatinine)

ครีเอตินิน (Creatinine) เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานหรือการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยกล้ามเนื้อจะได้รับพลังงานจากการถ่ายเทกลุ่มฟอสเฟตของสารที่มีพลังงานสะสมสูง (high energy phosphate) คือ creatinine-phosphate ให้ adenosine diphosphate (ADP) ได้ผลผลิตเป็น ATP และ Creatinine โดย ATP ที่ได้จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในการหดตัวของกล้ามเนื้อ ดังนั้นปริมาณครีเอตินินที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายจึงสัมพันธ์กับการทำงานของกล้ามเนื้อ โดยขึ้นกับมวลกล้ามเนื้อและพื้นที่ผิว (surface area) ของร่างกายโดยสัมพันธ์กับอายุและเพศ ในเด็กที่มีมวลกล้ามเนื้อน้อยกว่าผู้ใหญ่จึงมีค่าครีเอตินินในเลือดต่ำกว่าผู้ใหญ่ ผู้สูงอายุที่กล้ามเนื้อบางส่วนมีการเสื่อมลงหรือฝ่อลีบตามวัยจะมีค่าครีเอตินินในเลือดลดลง แต่โดยทั่วไปจะพบค่าครีเอตินินในผู้สูงอายุเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเสื่อมชราตามวัยของไตร่วมด้วยเสมอ หญิงมีมวลกล้ามเนื้อน้อยกว่าชายที่อยู่ในช่วงอายุเดียวกันและมีน้ำหนักตัวเท่ากัน ค่าปกติของครีเอตินินในชายจึงสูงกว่าในหญิง ในภาวะปกติรายวันปริมาณครีเอตินินในเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากหรือค่อนข้างคงที่ ชนิดของอาหารการกินโดยปกติจะมีไม่สัมพันธ์กับค่าครีเอตินินในเลือด การขาดน้ำหรือสูญเสียน้ำของร่างกาย หากยังไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเนื้อไต จะไม่มีผลให้เกิดความผิดปกติของค่าครีเอตินินในเลือด การฉีกขาดหรือการทำลายเซลล์กล้ามเนื้อ ไม่มีผลให้ค่าครีเอตินินในเลือดผิดปกติ ภาวะที่อาจทำให้ค่าครีเอตินินในเลือดสูงโดยไม่มีพยาธิสภาพคือ การใช้งานกล้ามเนื้อมากกว่าปกติ เช่น การออกกำลังกายหักโหมภาวะชักเกร็งอย่างรุนแรง

ปริมาณครีเอตินินที่ร่างกายสร้างขึ้นในแต่ละวันจะค่อนข้างคงที่ ไม่แปรปรวนตามชนิดของอาหารที่ร่างกายได้รับในแต่ละวัน การเปลี่ยนแปลงค่าครีเอตินินในเลือดจึงขึ้นกับอัตราการขับทิ้งหรือการทำงานของไตเป็นหลัก ค่าครีเอตินินในเลือดจึงมีความจำเพาะกับพยาธิสภาพของไตมาก ไตที่ปกติจะขับทิ้งครีเอตินินให้เหลืออยู่ในกระแสเลือดน้อยที่สุด หากไตทำงานผิดปกติจะเกิดการคั่งสะสมของครีเอตินินในกระแสเลือด แต่ค่าครีเอตินินในกระแสเลือดไม่ไวต่อการวินิจฉัยโรคไต ทั้งนี้เป็นเพราะ reserve capacity ของไต ความผิดปกติของค่าครีเอตินินในเลือดจะปรากฏเมื่อเหลือไตที่ทำงานได้น้อยมากหรือสูญเสียเนื้อไตมากเกินไปขีดความสามารถของ reserve capacity ของไตแล้ว ค่าครีเอตินินในเลือดจึงนิยมใช้ประโยชน์ในการติดตามผลการรักษา และการพยากรณ์หรือดูความรุนแรงของโรคไตมากกว่าใช้ในการวินิจฉัยโรคไต แต่หากใช้กับค่าครีเอตินินในเลือดร่วมกับค่าครีเอตินินในปัสสาวะเก็บ 24 ชั่วโมง (24 h urine) จะช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัยโรคไตได้ เช่น หากพบค่าครีเอตินินในเลือดสูงแม้จะไม่มาก แต่มีค่าครีเอตินินในปัสสาวะ 24 ชั่วโมงต่ำ บ่งชี้ความเป็นไปได้ที่ผู้ป่วยจะเป็นโรคไต (วีรวรรณ เล็กสกุลไชย, 2555)

นอกจากนี้แล้ว การตรวจสอบสมรรถภาพการทำงานของไตยังทำได้ด้วยการประมาณอัตราการกรองของไต (Glomerulus filtration rate: GFR) ในหน่วยมิลลิลิตรต่อนาที (ml/min) ซึ่งเป็นการตรวจวัดความสามารถของไตในการกรองสารโดยการเจาะเลือดตรวจหาค่าครีเอตินินในซีรัม ร่วมกับการเก็บปัสสาวะตลอด 24 ชั่วโมง เพื่อหาครีเอตินินที่ขับออกมาในปัสสาวะ (U_{Cr} และนำปริมาตรปัสสาวะในหน่วยมิลลิลิตรต่อนาที (V) มาใช้ในการคำนวณค่า GER ดังสูตร

$$GFR = \frac{U_{Cr} \times V}{P_{Cr}}$$

แต่อย่างไรก็ตาม ในการประเมินในปัจจุบันการประเมินอัตราการกรองของไตนิยมใช้สมการที่เรียกว่า 2009 CKD-EPI creatinine equation ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การประมาณค่าอัตราการกรองของไตด้วยซีรัมครีเอตินิน โดยสมการ CKD-EPI creatinine equation

เพศ	ค่าซีรัมครีเอตินิน (มก.ดล)	eGFR _{creat} (มล./นาที่/1.73 ตร.ม.)
หญิง	≤0.7	$144 \times (SCr/0.7)^{-0.329} \times 0.993^{Age}$
หญิง	>0.7	$144 \times (SCr/0.7)^{-1.209} \times 0.993^{Age}$
ชาย	≤0.9	$141 \times (SCr/0.9)^{-0.411} \times 0.993^{Age}$
ชาย	>0.9	$141 \times (SCr/0.9)^{-1.209} \times 0.993^{Age}$

โดยผลการคำนวณสามารถแปลผลได้ ดังตาราง 2.2

ลำดับขั้นของ GFR	GFR (มล./นาที่/1.73 ตร.ม)	ชื่อเรียก
G1	≥90	ปกติหรือสูงเล็กน้อย
G2	60-89	ลดลงเล็กน้อย
G3a	45-59	ลดลงเล็กน้อยถึงปานกลาง
G3b	30-44	ลดลงปานกลางถึงมาก
G4	15-29	ลดลงมาก
G5	<15	ไตวาย

ที่มา: National Kidney Foundation Guideline

ค่า GFR จะลดลงเมื่อมีพยาธิสภาพของ glomerulus เสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ เนื่องจากค่าอัตราการขับปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับอัตราการไหลของเลือดไปเลี้ยงไต (RBF) ในช่วงเวลาเดียวกัน ดังนั้น GFR จะลดลงในภาวะที่มีอัตราการไหลที่ลดลง เช่น ภาวะเสียเลือดมาก ภาวะขาดน้ำอย่างรุนแรง เป็นต้น (วีรวรรณ เล็กสกุลไชย, 2555)

การตรวจหาปริมาณครีเอตินิน โดยวิธี alkaline picrate Jaffé reaction

Creatinine ใน serum หรือ plasma จะทำปฏิกิริยากับกรด picric acid ในสารละลายที่เป็นด่าง แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง ดังปฏิกิริยา



และหาปริมาณครีเอตินินใน NaOH จากค่าอัตราการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่กำหนดของสารประกอบเชิงซ้อนของ Creatinine-alkaline picrate complex ที่ความยาวคลื่น 490-500 นาโนเมตร จำนวน 2 ครั้ง โดยครั้งแรกอ่านค่าเป็น A1 หลังเกิดปฏิกิริยาแล้วเป็นเวลา 20 วินาที ระยะเวลาดังกล่าวเป็นการวัดความเข้มสีที่เกิดจากสารที่ไม่ใช่ครีเอตินิน ซึ่งจะทำการปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และค่าที่สองเป็น A2 หลังจาก A1 เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใช้ค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น ซึ่งอัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของครีเอตินินในตัวอย่าง ตรวจ ซึ่งข้อจำกัดของวิธี แจฟฟี คือ การอ่านค่าการดูดกลืนแสง A2 หากอ่านช้ากว่าที่กำหนดจะมีสารรบกวนปฏิกิริยาได้ เช่น คีโตน กลูโคส โปรตีน วิตามินซี และยาบางชนิด (cephalosporins) ทั้งสารบิลิรูบินปริมาณสูงยังให้ผลการทดสอบที่ผิดพลาดไปในทางต่ำกว่าความเป็นจริงอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามวิธีแจฟฟี มีข้อดีคือ สามารถใช้น้ำยาสำเร็จรูปที่มีขายทั่วไปในท้องตลาด ที่มีราคาถูก ซึ่งมีขั้นตอนการตรวจวัดที่ไม่ซับซ้อน และสามารถประยุกต์ใช้ตรวจกับวิเคราะห์อัตราอัตโนมัติ ทำให้เป็นที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ซึ่งค่าปกติ ในซีรัม ผู้ชาย 0.9-1.5 mg/dL ,ผู้หญิง 0.7-1.4 mg/dL และในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ผู้ชาย 1000-2000 mg/24hrs ,ผู้หญิง 600-1500 mg/24hrs

2.3 อัลบูมิน (Albumin)

อัลบูมิน (Albumin) เป็นโปรตีนที่สร้างจากตับเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำเหลืองของเลือด ระดับ albumin เป็นการบ่งบอกความสมดุลของการสร้างที่ตับและการขับ albumin ออกทางไตพบว่า albumin จะเป็นสัดส่วนได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของ Total protein ที่ผลิตจากตับ (siamhealth, 2018) อัลบูมิน มีหน้าที่ควบคุม oncotic pressure ของน้ำเลือดในหลอดเลือด หรือการดึงน้ำให้อยู่ภายในหลอดเลือดไม่ให้ซึมออกไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ หรือในช่องของร่างกาย เมื่อ Albumin ลดลง ค่าแรงดัน Oncotic Pressure ก็จะลดลงตามไปด้วย ส่งผลให้น้ำเคลื่อนตัวออกนอกหลอดเลือด เกิดเป็นภาวะบวมในที่สุด **ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์**คอยจับกับ H^+ ที่เกิดขึ้นในร่างกาย ทำให้ความเป็นกรดในเลือดลดลง อยู่สภาวะปกติได้ อัลบูมินในกระแสเลือดยังมีบทบาทในการเป็นโปรตีนนำพาโดยจับกับสารต่างๆในน้ำเลือด เช่น ยารักษาโรค ฮอร์โมน เกลือแร่ และ unconjugated bilirubin เพื่อพาไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทำให้ช่วยลดความเป็นพิษของสารบางชนิดได้ ช่วยส่งเสริมการละลายยาในพลาสมา ช่วยในการละลายกรดไขมันในพลาสมา เป็นต้น อัลบูมินมีค่าครึ่งชีวิตยาวประมาณ 17 – 26 วัน โดยเฉลี่ย 21 วัน นอกจากนี้ อัลบูมินบางส่วนยังถูกเก็บไว้ในนอกหลอดเลือดและสามารถดึงมาใช้ทดแทนส่วนที่พร่องไปในกระแสเลือดได้ เรียกอัลบูมินส่วนนี้ว่า extravascular albumin storage pool ดังนั้น ในช่วงแรกของการเกิดพยาธิที่ตับ เช่น โรคตับอักเสบเฉียบพลันจะไม่พบค่าอัลบูมินในเลือดต่ำ จะพบค่าอัลบูมินในเลือดต่ำเมื่อมีพยาธิสภาพที่ตับแบบเรื้อรังต่อเนื่องเป็นเวลาหลายเดือน จนไม่เหลือเซลล์ตับมากพอที่จะสร้างอัลบูมินขึ้นทดแทนอัลบูมินส่วนที่หมดอายุและ extravascular albumin storage pool ที่ถูกดึงไปใช้ได้ อีก ค่าอัลบูมินในเลือดจึงไม่ไวต่อการวินิจฉัยโรคตับ แต่ใช้บ่งบอกถึงระยะเวลาการดำเนินของโรคตับ ค่าอัลบูมินในเลือดต่ำพบในระยะท้ายของตับอักเสบเรื้อรัง มะเร็งตับระยะลุกลาม และตับแข็ง

อย่างไรก็ดีความผิดปกติของ Albumin ในเลือดสามารถพบได้หลายแบบ ได้แก่ Analbuminemia เป็นลักษณะของการตรวจไม่พบ อัลบูมิน (Albumin) ในเลือดเลยหรือพบในปริมาณที่น้อยมากๆ ถือเป็นความผิดปกติที่เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ส่งผลให้คนรุ่นต่อมา มีความบกพร่องในการสังเคราะห์ Albumin อย่างไรก็ตาม อาการที่ว่ามีไม่ได้มีผลร้ายแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้

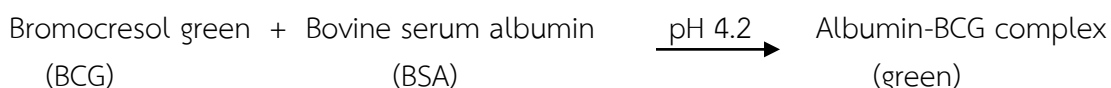
Hypoalbuminemia เป็นลักษณะของการมีปริมาณ Albumin ในเลือดน้อยมาก แต่เกิดจากสาเหตุที่แตกต่างจากกรณีของความผิดปกติแบบแรก เช่น มีภาวะการทำงานที่ผิดปกติของตับ มีการสูญเสีย Albumin ทางปัสสาวะเนื่องจากโรคไตบางชนิด การสูญเสียผ่านทางผิวหนังจากผู้ที่เคยประสบอุบัติเหตุจนเซลล์ผิวหนังเสียหาย การขาดสารอาหารโดยเฉพาะอาหารประเภทโปรตีน ในผู้ป่วยระยะพักฟื้นที่กินอาหารได้น้อยจนมีภาวะสมดุลไนโตรเจนเป็นลบ (negative nitrogen balance) คือ ภาวะที่มีการสูญเสียสารประกอบไนโตรเจนอย่างยูเรียและครีเอตินีนออกจากร่างกาย นอกจากนี้ในระยะพักฟื้นร่างกายยังดึงโปรตีนไปใช้ในการซ่อมแซมส่วนที่สูญเสียไปด้วย จึงทำให้เหลือกรดอะมิโนสำหรับการสร้างอัลบูมินน้อย ในผู้ที่ได้รับบาดเจ็บสาหัส เสียเลือดมาก มีการทำลายเนื้อเยื่อจึงมีการสูญเสียโปรตีนไปกับเลือดและเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ภาวะที่ลำไส้ไม่สามารถดูดซึมสารอาหารประเภทโปรตีนได้ (protein losing enteropathy) และในโรคไตรั่ว (protein losing glomerulopathy, nephrotic syndrome) ซึ่งภาวะเหล่านี้จะมีผลให้ค่าโปรตีนรวมในเลือดต่ำกว่าปกติด้วย อาการหลักที่พบในภาวะอัลบูมินในเลือดต่ำ คือ ภาวะบวมทั่วตัว (generalized edema) อาจพบมีน้ำในช่องต่างๆ ของร่างกาย เช่น ภาวะท้องมาน มีน้ำในปอดหรือน้ำท่วมปอดร่วมด้วย

Hyperalbuminaemia เป็นภาวะที่มีระดับ Albumin สูงกว่าปกติมาก หลายครั้งพบว่าเกิดจากร่างกายขาดน้ำ (dehydration) จึงทำให้ความเข้มข้นในกระแสเลือดเปลี่ยนแปลงไป รับประทานอาหารที่มีโปรตีนมาก รั่วแขนบริเวณที่เจาะเลือดนานไป หรืออาจเกิดโรคมะเร็งไขกระดูก (multiple myeloma) (วีรวรรณ เล็กสกุลไชย, 2555)

การตรวจอัลบูมินต้องงดอาหารก่อนเจาะเลือดอย่างน้อย 8 ชั่วโมง การตรวจอัลบูมินในเลือดอาจมีความเบี่ยงเบนมีค่าสูงขึ้นหรือต่ำลงผิดปกติไปจากที่ควรจะเป็นได้ ซึ่งสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น กำลังตั้งครรภ์, การได้รับฮอร์โมน (ฮอร์โมนเพศ ฮอร์โมนเร่งการเติบโต ฮอร์โมนอินซูลิน ฯลฯ), ร่างกายนอนพักบนเตียงนานเกินไปในบางกรณี เช่น อัมพาต หรือมีโรคร้ายแรงที่ต้องพักฟื้น, อาจบริโภคอาหารตามปกติไม่ได้ในช่วงนั้น, ร่างกายอยู่ระหว่างการติดเชื้อหรือมีอาการบาดเจ็บรุนแรง (MedThai, 2018)

การตรวจหาปริมาณอัลบูมิน (Albumin)

การตรวจหาอัลบูมิน โดยวิธี dye binding โดย bromocresol green (BCG) จะจับกันอย่างจำเพาะกับอัลบูมิน (Albumin) ที่สภาวะกรด pH 4.2 อัลบูมินจะมีประจุเป็นบวก และจับกับ BCG ที่มีประจุลบ เกิดเป็นสารประกอบสีเขียว สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร



ตารางที่ 2.3 ระดับของค่า Albumin

ระดับ	Albumin
ค่าปกติ	3.5 – 5 g/dL
ต่ำเล็กน้อย	3 – 3.4 g/dL
ต่ำปานกลาง	2.4 – 2.9 g/dL
ต่ำมาก	< 2.4 g/dL

2.5 ภาวะไตวายเรื้อรัง (Chronic renal failure)

Chronic renal failure หรือภาวะไตวายเรื้อรังเป็นภาวะที่การทำงานของไตค่อย ๆ ลดลงตามสัดส่วนของเนื้อไตที่ถูกทำลาย เนื้อไตถูกทำลายทีละน้อยอย่างช้าๆ มีการเสียโครงสร้างของไตอย่างต่อเนื่อง จนในที่สุดเกิน reverse capacity ของไต เนื้อไตส่วนใหญ่ถูกทำลายจนข้างนั้นไม่สามารถทำงานต่อไปได้อีก เข้าสู่ภาวะ end stage renal failure จึงจะปรากฏอาการชัดเจน สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากความดันโลหิตสูง และเบาหวานที่ไม่ได้รับการควบคุม (uncontrolled DM)

ในระยะเริ่มแรกของไตวายเรื้อรัง อาการมักไม่ชัดเจน ผู้ป่วยจึงไม่ทราบว่าเป็นโรคไต การตรวจเลือดและปัสสาวะเป็นระยะเพื่อติดตามการดำเนินของโรคหรือการสะสมของเสียอย่างยูเรียและครีเอตินิน จะมีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคไตวายเรื้อรังในระยะแรก นำไปสู่การดูแลรักษาได้ทัน ซึ่งจะเป็นการหยุดทำลายเนื้อไต ทำให้เหลือเนื้อไตที่ดีไว้ทำงานต่อไปได้ ไม่เข้าสู่ระยะ end stage renal failure แต่ถ้าไม่ได้รับการรักษา โรคจะดำเนินต่อไปจนไตไม่สามารถสร้างปัสสาวะได้ เกิดการคั่งของน้ำและของเสียในร่างกาย ดังนั้นผู้ป่วยจึงต้องได้รับการล้างไตหรืออาจต้องมีการเปลี่ยนไตในที่สุด

ในระยะที่ไตไม่สามารถทำงานได้แล้วจะพบการสะสมของครีเอตินิน ยูเรีย และกรดยูริกในเลือดมาก ยูเรียที่สะสมในเลือดเมื่อผ่านไปที่ทางเดินอาหารจะถูกแบคทีเรียเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้พบค่าแอมโมเนียในเลือดสูงได้ แต่ถ้าไตยังทำงานได้ดี แอมโมเนียส่วนนี้จะถูกแปลงกลับเป็นยูเรียสะสมในเลือดตามเดิม ไตที่ไม่สามารถตอบสนองต่อแอลโดสเตอโรน จะทำให้ค่าโพแทสเซียมในเลือดสูง จึงเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรงและเมื่อยล้า ไตที่ไม่สามารถตอบสนองต่อ PTH ทำให้ค่าแคลเซียมในเลือดต่ำ เกิดอาการกล้ามเนื้อเป็นตะคริวหรือกระดูกและภาวะกระดูกพรุน ไตไม่สามารถควบคุมการขับทิ้งไฮโดรเจนและควบคุมปริมาณไบคาร์บอเนตในกระแสเลือดได้ ทำให้มีความผิดปกติของสมดุลกรด-ด่าง ไตไม่สามารถกรองเก็บอัลบูมินได้ ทำให้เกิดภาวะบวม น้ำแบบกดบวม มีค่าอัลบูมินในเลือดต่ำ มีค่าอัลบูมินในปัสสาวะสูง ปริมาตรปัสสาวะที่ผู้ป่วยขับถ่ายในแต่ละวันจะลดลงเรื่อยๆ มีน้ำคั่งในร่างกาย น้ำปริมาณมากที่คั่งในร่างกายจะรบกวนการทำงานของหัวใจและปอด ทำให้เกิดภาวะแน่นอก หัวใจวาย น้ำท่วมปอด หายใจลำบาก นอนราบไม่ได้ ผู้ป่วยจะมีภาวะโลหิตจาง เนื่องจากไตไม่สามารถสร้างฮอร์โมน erythropoietin และกระดูกของผู้ป่วยจะไม่แข็งแรง เปราะหักง่าย เนื่องจากไตไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ vitamin D ได้ ทำให้การดูดซึมแคลเซียมจากอาหารที่กินเข้าไปได้ลดลง และการมีปริมาณแคลเซียมในเลือดต่ำจะกระตุ้นการหลั่ง PTH ทำให้เกิดการดึงแคลเซียมออกจากกระดูก เสริมให้เกิดภาวะกระดูกพรุนมากขึ้น

การตรวจวัดค่า creatinine ยังสามารถหาได้จากปัสสาวะ ทั้งที่เป็น random urine และ 24 hours urine แล้วมาคำนวณหาค่า creatinine clearance ซึ่งสามารถบอกถึง glomerular filtration rate (GFR) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Creatinine clearance} = \frac{U}{S} \times \frac{V \text{ (mL)}}{1440}$$

V (volume) = ปริมาณของปัสสาวะ (mL/min) เป็น

Total volume ของ urine 24 ชั่วโมง / 24 x 60 = 1440 นาที

U (urine) = Creatinine ในปัสสาวะ (mg/dL)

S (serum) = Creatinine ในซีรัม หรือพลาสมา (mg/dL)

ปัจจุบันมีการกำหนดความหมายของภาวะไตเสื่อมโดย National kidney Foundation มีการกำหนดเงื่อนไขที่บ่งชี้ว่าเป็นโรคไตเสื่อม คือ อัตราการกรองของหน่วยไตต่ำกว่า 60 มิลลิลิตร/นาที/1.73 ตารางเมตรเป็นเวลา 3 เดือนหรือมากกว่า 3 เดือน โดยอาจมีหรือไม่มีการทำลายไต หรือมีความผิดปกติโครงสร้างหรือหน้าที่ของไตร่วมกับการลดลงหรือไม่มีการลดลงของอัตราการกรองเท่ากับหรือมากกว่า 3 เดือน และกำหนดความรุนแรงของไตเสื่อมเป็น 5 ระยะ โดยการเสื่อมหน้าที่ไตจะเสื่อมไปเรื่อย ๆ ไม่สามารถกลับคืนเป็นปกติเนื่องจากไตถูกทำลายถาวรและตัวบ่งชี้ของหน่วยไตเมื่อถูกทำลาย คือ การรั่วของโปรตีนและอัลบูมินออกมาทางปัสสาวะ ความรุนแรงของภาวะไตเสื่อมระยะ 1-2 เป็นระยะที่มีความเสียหายกับไตโดยที่การทำงานของไตยังปกติ ส่วนระยะ 3-4 เป็นระยะที่อัตราการกรองของหน่วยไตลดลงต่ำลง ส่วนระยะที่ 5 อัตราการกรองของหน่วยไตลดลงมากและจำเป็นต้องให้การบำบัดทดแทนไต

การจำแนกระยะการเสื่อมของไต (ตารางที่ 6-4) ดังนี้

ระยะที่ 1 มีการทำลายไตโดยอัตราการกรองของหน่วยไตปกติหรือลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 90 มิลลิลิตร/นาที/1.73 ตารางเมตร ระยะนี้จะมีร่องรอยโรคไตแต่ไตยังทำหน้าที่ปกติ ค่าครีเอตินินในเลือดไม่เกิน 1.2 มิลลิกรัม/เดซิลิตร จะพบอัลบูมินในปัสสาวะ โปรตีนในปัสสาวะ และปัสสาวะเป็นเลือด

ระยะที่ 2 มีการทำลายไตเล็กน้อยร่วมกับการลดลงของอัตราการกรองของหน่วยไต 60-89 มิลลิลิตร/นาที/1.73 ตารางเมตร ระยะนี้มีโรคไตและไตทำหน้าที่ลดลง จะพบอัลบูมินในปัสสาวะ โปรตีนในปัสสาวะและปัสสาวะเป็นเลือด อาจพบความดันโลหิตสูง

ระยะที่ 3 มีการทำลายไตปานกลางร่วมกับการลดลงของอัตราการกรองของหน่วยไต 30-59 มิลลิลิตร/นาที/1.73 ตารางเมตร หน้าที่ไตพร่องลงเป็นเรื้อรัง ระยะเริ่มแรก ระยะนี้โรคไตเป็นมากขึ้นจะซับซ้อนของเสียที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบลดลงต่ำกว่าครึ่งและมีอาการซีด

ระยะที่ 4 มีการทำลายไตรุนแรงร่วมกับการลดลงของอัตราการกรองของหน่วยไต 15-29 มิลลิลิตร/นาที/1.73 ตารางเมตร ไตทำหน้าที่พร่องลงเป็นเรื้อรังในระยะหลัง ผู้ป่วยซีดมากขึ้น เริ่มมีภาวะเลือดเป็นกรด ไขมันในหลอดเลือดสูง อาจพบภาวะน้ำเกิน หัวใจวายและโพแทสเซียมสูงในเลือด

ระยะที่ 5 ไตสูญเสียหน้าที่ อัตราการกรองของหน่วยไตน้อยกว่า 15 มิลลิลิตร/นาที/1.73 ตารางเมตร จะพบไตวายระยะสุดท้ายและมีของเสียคั่งมาก

ตารางที่ 2.3 ระยะของโรคไตเรื้อรัง

ระยะ	GFR	คำอธิบาย
มีความเสี่ยงสูง	> 90	มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไต เช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง มีประวัติครอบครัว
1	≥90	มีความเสียหายเกิดขึ้นที่ไต แต่ไตยังทำงานได้ปกติ
2	89 to 60	มีความเสียหายเกิดขึ้นที่ไต ไตเริ่มสูญเสียการทำงาน
3a	59 to 44	ไตสูญเสียการทำงานเล็กน้อยถึงปานกลาง
3b	44 to 30	ไตสูญเสียการทำงานปานกลางถึงรุนแรง
4	29 to 15	ไตสูญเสียการทำงานอย่างรุนแรง
5	<15	ไตวาย

ที่มา: National Kidney Foundation. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification., 2003

2.6 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์ (biosensor) คือ เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อวิเคราะห์ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการการจับกันอย่างจำเพาะของโมเลกุล เป็นเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์ได้แม้มีปริมาณตัวอย่างน้อยมาก ความแม่นยำสูง ความไวสูง (sensitivity) ใช้ระยะเวลาสั้นในการตรวจวิเคราะห์ ต้นทุนการผลิตต่ำ ขนาดเล็ก สามารถพกพาไปใช้ในงานภาคสนาม (Ligler et al., 2007) เพื่อใช้วินิจฉัยโรคในระบบใกล้ชิดผู้ป่วยได้ (point of care) (Mascini and Tombelli, 2008) ไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ

1. ส่วนของตัวตรวจจับสารชีวภาพ (recognition element) ที่มีคุณสมบัติสามารถจับกับสารได้อย่างจำเพาะ โดยตัวตรวจจับจะถูกเชื่อมอยู่กับตัววัดสัญญาณ (transducer) ทำหน้าที่รับสัญญาณเพื่อการวิเคราะห์ข้อมูล และแสดงผลในรูปแบบที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ค่าทางไฟฟ้า ค่าทางเคมีไฟฟ้า ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ (De Corcuera and Cavalieri, 2003)

2. ส่วนวัสดุยึดเกาะ (interface) สำหรับตัวตรวจจับ และตัววัดสัญญาณ สามารถเลือกใช้วัสดุต่างๆ เช่น พลาสติกสำหรับไบโอเซนเซอร์แบบชิป (chipbased biosensor) และกระดาษสำหรับไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษ (paper-based biosensor) ตามความเหมาะสมเพื่อให้อุปกรณ์มีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งนี้การจำแนกชนิดของไบโอเซนเซอร์สามารถจำแนกได้หลายแบบทั้ง ชนิดของตัวตรวจจับ ตัววัดสัญญาณ และรูปแบบของวัสดุที่ใช้ เป็นไบโอเซนเซอร์

2.6.1 การออกแบบไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารชีวภาพ

การใช้กระดาษสำหรับงานตรวจวิเคราะห์สารชีวภาพ หรือใช้เป็นวัสดุพื้นผิวในการตรึงไบโอเซนเซอร์ ในระยะเริ่มต้นใช้กระดาษกรองแต่ละแบบจะมีความแตกต่างกันทั้งรูพรุน การที่รูพรุนมีขนาดใหญ่จะเพิ่มอัตราการไหล และการแทรกผ่านของสารละลาย และสามารถสร้างแนวการไหลของสารบนกระดาษด้วยวิธีการพิมพ์น้ำหมึกได้ง่าย นอกจากกระดาษกรองแล้วยังมีการดัดแปลงคุณสมบัติทางเคมีของกระดาษให้เหมาะสมกับการใช้งาน กระดาษไนโตรเซลลูโลสถูกดัดแปลงให้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ทำให้มีความเหมาะสมในการตรึงโมเลกุลไบโอเซนเซอร์ เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี หรือ ดีเอ็นเอ แต่ก็อาจทำให้เกิดการจับกันแบบไม่จำเพาะของไบโอเซนเซอร์ได้ง่าย จึงมีแนวคิดการพิมพ์แนวการไหลของสารด้วยแว็กซ์ (wax) โดยใช้ความร้อน ปรากฏว่า การไหลของสารละลายมีความเสถียรมากขึ้น ลดการสูญเสียตัวอย่าง และการแทรกตัวของแว็กซ์ผ่านกระดาษ ไนโตรเซลลูโลสก่อนที่จะแห้งตัว เกิดขึ้นช้ากว่ากระดาษกรอง

2.6.2 การวิเคราะห์ผลปริมาณสารชีวภาพโดย ไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษ

2.6.2.1 การวิเคราะห์ผลเชิงคุณภาพ ในยุคเริ่มต้นที่มีการนำไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษมาใช้กับงานทางด้านวิทยาศาสตร์เพื่อวิเคราะห์หาสารชีวภาพที่ต้องการมีการวิเคราะห์ผลด้วยสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ตัวอย่างชุด ตรวจวิเคราะห์ผลเชิงคุณภาพที่มีใช้แพร่หลาย ได้แก่ ชุดตรวจการตั้งครรภ์ มีข้อดีคือประชาชนสามารถใช้ได้เอง และมีการแสดงผลในรูปแบบที่ทำความเข้าใจได้ง่าย ซึ่งสามารถแสดงผลในรูปแบบ “บวก” หรือ “ลบ” กรณีที่แสดงผลเป็นบวกคือการทดสอบนั้นมีสารชีวภาพที่ต้องการ และแสดงผลเป็นลบเมื่อไม่พบสารชีวภาพชนิดนั้นในตัวอย่าง แต่ข้อเสียของการวิเคราะห์ผลเชิงคุณภาพ คือ อาจเกิดข้อผิดพลาดจากหลายปัจจัยการวิเคราะห์สารชีวภาพที่มีความละเอียดอ่อนจึงต้องการข้อมูลในเชิงปริมาณเพื่อยืนยันความถูกต้อง

2.6.2.2 การวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ ในงานทางด้านวิทยาศาสตร์ที่เพิ่มความจำเพาะเจาะจงหรือการวิเคราะห์ข้อมูลในเชิงลึก ต้องการผลเชิงปริมาณสำหรับการศึกษา และวิเคราะห์ข้อมูลต่อไปในอนาคต จำเป็นต้องมีการเลือกใช้ตัววัด สัญญาณที่เหมาะสม ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งระบบเคมีไฟฟ้า และระบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ ที่จะให้ข้อมูลในรูปแบบค่าของสัญญาณซึ่งสามารถแปลผลเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไบโอเซนเซอร์สามารถตรวจวัดได้ อีกทั้งยังมีการพัฒนาตัววัดสัญญาณที่แสดงผลในระบบสีให้สามารถวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณได้โดยการบันทึกภาพ ไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษจากการถ่ายรูปหรือการสแกน (Scan) รูปภาพที่อาจจะมีความแตกต่างเพียง เล็กน้อยไม่สามารถจำแนกได้ด้วยตาเปล่า เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความเข้มของสีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานจากนั้นจะแปลผลการวิเคราะห์เป็นข้อมูลในเชิงปริมาณได้

2.6.3 การวัดสัญญาณ ไบโอเซนเซอร์ แบ่งออกเป็น

2.6.3.1 ระบบตรวจวัดสี (colorimetry) ตัววัดสัญญาณที่สามารถทำให้เกิดสีได้มีหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี ไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษชนิดแรกมีการวิเคราะห์ผลในระบบนี้ คือ การตรวจวัด น้ำตาลกลูโคส และโปรตีน เมื่อมีการหยดตัวอย่างจะทำให้บริเวณทดสอบมีการเปลี่ยนสีมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือ หรือเทคนิคอื่นๆเพิ่มเติมในการวิเคราะห์ผล หรือระบบเอนไซม์ ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีทำให้สามารถจำแนกความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ นอกจากนี้ยังมีอีก รูปแบบหนึ่งในการวิเคราะห์ผลการตรวจวัดตัวอย่างทางชีวภาพ คือ การเชื่อมตัววัดสัญญาณเข้ากับอนุภาคทองคำระดับนาโนที่มีขนาดประมาณ 10-50 นาโนเมตร เมื่อเกิดการรวมตัวกันจะเกิดสีทำให้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเช่นกัน

2.6.3.2 ระบบเคมีไฟฟ้า (electrochemical) การวิเคราะห์ตัวอย่างชีวภาพโดยใช้ตัววัดสัญญาณระบบเคมีไฟฟ้าจำเป็นต้องมีส่วนสำคัญ คือ อิเล็กโทรด (electrode) ในกรณีที่เป็นไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษมีการคั่นน้ำหมึกที่มีคุณสมบัติเป็นอิเล็กโทรด (Jagadeesan et al., 2012) เช่น น้ำหมึกคาร์บอน (carbon ink) น้ำหมึกแกรไฟต์ (graphite ink) น้ำหมึกเงิน (silver ink) เพื่อพิมพ์ลงบนเยื่อกระดาษ และในขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างจะมีการใช้เครื่อง potentiostat เพื่อวัดค่าศักย์ไฟฟ้าของตัวอย่างซึ่งต้องมีการดัดแปลงให้มีขนาดเล็กพอที่จะสามารถนำมาใช้เป็นอุปกรณ์ขนาดพกพา

2.6.3.3 ระบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ (chemiluminescent) การเกิดสารเคมีลูมิเนสเซนซ์เป็นปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ของโรดามีน (rhodamine derivative) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีการใช้ไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษและออกแบบแนวการไหลของสารเป็น 2 บริเวณสำหรับทำปฏิกิริยา คือ บริเวณที่มีการตรึงเอนไซม์ และบริเวณที่จะเกิดสารเคมีลูมิเนสเซนซ์ ตัวอย่างจะต้องถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ออกซิเดส ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของตัวอย่าง จากนั้นจะทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์ของโรดามีนกลายเป็นสารเคมีลูมิเนสเซนซ์ และสามารถวิเคราะห์ได้ในรูปแบบเส้นกราฟความเข้มของสัญญาณ

2.6.3.4 ระบบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent) ควอนตัมดอทเป็นอนุภาคระดับนาโนสังเคราะห์ขึ้นจากโมเลกุล เช่น แคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) แคดเมียมเทลลูไรด์ (CdSe) แคดเมียมเทลลูไรด์ (CdTe) มีคุณสมบัติเรืองแสงให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่แตกต่างตามคุณสมบัติของโมเลกุล ซึ่งใช้เป็นองค์ประกอบในการสังเคราะห์ นอกจากนี้ผิวเคลือบของควอนตัมดอทยังสามารถทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับโมเลกุลได้หลายประเภท รวมทั้งตัวตรวจจับทางชีวภาพ สามารถนำควอนตัมดอทไปใช้เป็นตัววัด สัญญาณเพื่อแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์

2.7 การยืนยันความถูกต้องของวิธี (Method validation)

เป็นกระบวนการที่จะทำในกรณีที่จะใช้ยืนยันความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่ผู้วิเคราะห์พัฒนาขึ้นหรือดัดแปลงมาจาก Reference method เพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการของ ห้องปฏิบัติการ เป็นการยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับ ได้ หากมีการเปลี่ยนแปลงวิธีการวิเคราะห์ที่ผ่านการทวนสอบแล้ว (validated) แล้ว จำเป็นต้องมีการทบทวน แก้ไข และทำการตรวจสอบวิธีการ (Method validation) ใหม่ การตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ประกอบด้วยตัวชี้วัด ดังนี้ 1.) ความถูกต้องหรือความแม่นยำ (Accuracy) , 2.) การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยง (Precision), 3.) ความเป็นเส้นตรงและช่วง (Linearity and Range) ,4.) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) , 5.) สภาพไว (Sensitivity), 6.) ความจำเพาะ (Selectivity หรือ Specificity) ,7.) ความคงทน (Robustness และ Ruggedness) (นพวัฒน์ เฟื่องคำสร, 2560)

2.7.1 ความถูกต้องหรือความแม่นยำ (Accuracy)

ความถูกต้องหรือความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุดแสดงว่าการวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้องสูง (high accuracy) แต่ถ้าค่าที่วัดได้ ห่างไกลจากค่าที่แท้จริงแสดงว่าการทดสอบนั้นมีความถูกต้องน้อย (low accuracy) (นพวัฒน์ เฟื่องคำสร, 2560)

2.7.1.1 วิธีการประเมิน Accuracy

1) วิเคราะห์สารอ้างอิง (Reference material) แล้วเปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าเป้าหมาย (target values) ของ Reference material

2) เปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่ให้ความถูกต้องสูงที่สุด (Definitive method) หรือ Reference method โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันทั้งการวิเคราะห์ที่ต้องการทดสอบ (Test method) และ Reference method หรือ Definitive method คำนวณหาการวิเคราะห์การถดถอย (Regression equation) จากนั้นคำนวณหา Bias ค่าที่ได้ต้องไม่เกินค่า Allowable Bias จึงจะถือว่า Test method มี Accuracy เช่นเดียวกับ Reference method หรือ Definitive method

3) เปอร์เซ็นวิเคราะห์การกลับคืน (%Recovery) โดยเติมสารละลายมาตรฐาน (Standard) ลงในตัวอย่างแล้วนำไปตรวจวัดหาความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ขณะเดียวกันเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับ Standard ลงในตัวอย่างอีกหลอดหนึ่ง และนำไปตรวจวัดความเข้มข้นที่ได้ (นิรมลธรรมวิริยสติ, 2559)

2.7.1.2 การหาค่า Accuracy

1) แบบโดยตรง (Direct) ทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุม (Reference material) 3 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่ต้องการประเมินซ้ำกันอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วค่าหาเฉลี่ย (Mean Value) ตัวอย่างควบคุม 3 ตัวอย่างที่ใช้ควรมีค่าต่างกัน คือ ค่าที่อยู่ในช่วงปกติ, ค่าที่ต่ำกว่าปกติ และค่าที่สูงกว่าค่าปกติ ซึ่งค่า Accuracy ที่ดีควรมีค่าใกล้เคียง 100% ค่า Accuracy คำนวณได้จากสูตร

$$\%Accuracy = \left[1 - \frac{|\text{Mean value} - \text{Actual value}|}{\text{Actual value}} \right] \times 100$$

2) แบบโดยอ้อม (Indirect) ทำได้โดยการวิเคราะห์การกลับคืน (Recovery) ซึ่งเป็นการประเมินวิธีการวิเคราะห์เพื่อประมาณการเกิดความคลาดเคลื่อนเชิงระบบ (Systemic error) โดยความคลาดเคลื่อนจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น การหาค่าการวิเคราะห์การกลับคืน ทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ในตัวอย่างตรวจหรือซีรัมรวมแหล่ง (Pooled serum) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีที่จะศึกษาว่าสามารถแสดงผลความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นได้อย่างถูกต้องหรือไม่ วิธีการศึกษานี้บางครั้งเรียกว่า การทำ Spike โดยทั่วไปการเติมสารที่ต้องการวิเคราะห์โดยใช้สารละลายมาตรฐานจะทำ 3 ระดับ แล้วทำการวิเคราะห์แบบ 2 ซ้ำ (Duplicate) คำนวณได้จากสูตร

$$\text{Added Concentration} = \text{Standard concentration} \times \frac{\text{Vol standard}}{\text{Vol standard} + \text{Vol serum}}$$

โดย Added Concentration	: ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น
Standard Concentration	: ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน
Vol standard	: ปริมาณสารละลายมาตรฐานที่เติม (mL)
Vol serum	: ปริมาณ Pooled serum หรือตัวอย่างตรวจ (mL)

ในการทดสอบ Recovery test จะต้องทำการเพิ่มสารที่ต้องการวิเคราะห์โดยใช้สารละลายมาตรฐาน (Standard) 3 ความเข้มข้น ลงใน Pooled serum ที่อยู่ในหลอดทดลอง โดยทำทั้งหมดจำนวน 4 หลอดทดลอง เติมสารในหลอดทดลองที่มี Pooled serum ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 (Baseline) : เติมน้ำกลั่น

ตัวอย่างที่ 2 (Spike) : เติม Standard 1

ตัวอย่างที่ 3 (Spike) : เติม Standard 2

ตัวอย่างที่ 4 (Spike) : เติม Standard 3

การหาค่าการวิเคราะห์หักกลับคืน (Recovery) คำนวณจากสูตร

$$\begin{aligned}\% \text{Recovery} &= \frac{\text{Recovery concentration}}{\text{Added concentration}} \times 100 \\ &= \frac{[\text{Measured concentration}_{2/3/4} - \text{Baseline concentration}] \times 100}{\text{Added concentration}}\end{aligned}$$

โดย Recovered concentration : ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจาก baseline

Measured concentration : ความเข้มข้นของ Sample no. 2, 3, 4

Baseline concentration : ความเข้มข้นของ Sample no.1 (Baseline)

2.7.2 การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยง (Precision)

การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยง (Precision) หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำๆ กันหลายครั้ง ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ นี้ มักจะแสดงเป็นค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) (นพวัฒน์ เฟื่องคำศร, 2560)

$$\% \text{RSD} = (\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน} \times 100) / \text{ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด}$$

การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์มี 2 ลักษณะ คือ 1.) ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำโดยปัจจัยเดียวกัน (Repeatability) ซึ่งหมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสถานะเดียวกันโดยใช้ วิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เพื่อให้มีความน่าเชื่อถือจะทำการวิเคราะห์ในช่วงสั้นๆ ประมาณ 2 ถึง 3 วัน เป็นต้น 2.) ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำโดยปัจจัยต่างกัน (Reproducibility) ซึ่งหมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน แต่ผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือคนละเครื่องกัน และทำในห้องปฏิบัติการคนละแห่งกัน ซึ่งมักจะวิเคราะห์ ซ้ำโดยใช้ช่วงเวลายาวพอสมควร ระดับของความแม่นยำขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ (นพวัฒน์ เฟื่องคำศร, 2560)

2.7.3 ความเป็นเส้นตรงและช่วง (Linearity study)

เป็นการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีส่วนใหญ่ใช้วิธีเปรียบเทียบผลการตรวจวัดคุณสมบัติของสารที่จะตรวจในตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบค่า เช่น วัดคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์จากการ เกิดปฏิกิริยาตรวจวิเคราะห์เทียบกับของผลิตภัณฑ์กรณีให้สารมาตรฐานเกิดปฏิกิริยาเดียวกัน ค่าการดูดกลืนแสงนี้ แปรผันตรงกับปริมาณสารที่เข้าทำปฏิกิริยาตามกฎของเบียร์ (Beer's law) ความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่างค่า ดูดกลืนแสงและความเข้มข้นนี้มีข้อจำกัด โดยเฉพาะกรณีสารที่ทำปฏิกิริยา มีความเข้มข้นมาก ค่าดูดกลืนแสงไม่แปรผันตรงกับความเข้มข้น ดังนั้น วิธีวิเคราะห์จึงมีช่วงการวิเคราะห์ (analytical range) ที่เชื่อถือได้ ค่ามากที่สุดที่เชื่อถือได้ของการวิเคราะห์เรียกว่า ไหลเนยลิตี (linearity) ซึ่งก็คือ ค่ามากที่สุดของผลตรวจวิเคราะห์ที่ยังมีสัมพันธ์ แบบเส้นตรงกับค่าตรวจวัดของวิธี

วิเคราะห์ ตัวอย่างเช่น การตรวจวัดครีอะตินินด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของ ผลลัพธ์ของปฏิกิริยาระหว่างครีอะตินินกับกรดพริกในสารละลายต่าง วิธีนี้ค่าดูดกลืนแสงของผลลัพธ์แปรผันตรง กับความเข้มข้นของครีอะตินินที่ทำปฏิกิริยา ดังนั้น กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นจึงเป็นเส้นตรง แต่ความสัมพันธ์ไม่เป็นเส้นตรงกับทุกความเข้มข้น โดยเฉพาะค่าความเข้มข้นที่มากๆ ค่าความเข้มข้น มากที่สุดที่ยังให้ความแบบเส้นตรงกับค่าดูดกลืนแสงคือค่าไลเนียร์ลิตีของการตรวจวัด (วิสุทธิ์ กังวาลตระกูลม, 2554)

วิธีตรวจวิเคราะห์ที่ผลิตขายโดยทั่วไปมักกำหนดค่าไลเนียร์ลิตีของวิธีให้ หรือผู้ที่ใช้สามารถสืบค้นค่าไลเนียร์ลิตีของวิธีได้ อย่างไรก็ตาม ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งควรที่จะศึกษาหาค่าไลเนียร์ลิตีของวิธีที่นำมาใช้ภายใต้สิ่งแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ ค่าไลเนียร์ลิตีของวิธีวิเคราะห์ควรครอบคลุมค่าผลวิเคราะห์ที่จะตรวจวัดได้ในตัวอย่าง ถ้าไม่ครอบคลุมจะทำให้ต้องเจือจางตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ใหม่จำนวนมาก ซึ่งเป็นต้นทุนที่มากและไม่สะดวกในการปฏิบัติงาน

การศึกษาค่าไลเนียร์ลิตีของการตรวจวิเคราะห์ทำได้โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารกับค่าตรวจวัดได้ของเครื่องตรวจวิเคราะห์ ความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาควรครอบคลุมระหว่างค่าต่ำใกล้เคียง ศูนย์ไปจนถึงความเข้มข้นที่สูงประมาณ 1.5 เท่าของความเข้มข้นที่จะตรวจพบในตัวอย่างในงานประจำวัน กรณีใช้สารมาตรฐานเป็นตัวอย่างศึกษาควรทำให้สมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับตัวอย่างในงานประจำวัน การเจือจางให้ได้ค่าความเข้มข้นต่างๆ ควรเจือจางจากตัวอย่างตั้งต้นเดียวกัน เพื่อป้องกันความผิดพลาดจากความคาดเคลื่อนของเครื่องตรวจวัด ตัวอย่างศึกษาที่เจือจางได้ควรตรวจวัด 3 ครั้งในแต่ละค่าความเข้มข้น แล้วนำค่าเฉลี่ยไปใช้ในการวิเคราะห์

กรณีศึกษาโดยใช้ตัวอย่างค่าสูงมาเจือจางเป็นค่าต่างๆ ให้เขียนกราฟระหว่างค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับค่าที่คำนวณได้จากการเจือจาง โดยให้แกน x เป็นค่าที่คำนวณจากการเจือจาง แกน y เป็นค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ถ้าเส้นตรงของกราฟมีค่า slope เท่ากับ 1.00 แสดงว่าค่าความเข้มข้นที่ศึกษาอยู่ในช่วงไลเนียร์ลิตีของการตรวจ วิเคราะห์ ค่า slope ควรได้ในช่วง 1.00 ± 0.03 และจุดตัดบนแกน y ควรได้ $0 \pm$ ความแม่นยำภายในชุดการวิเคราะห์ จึงจะยอมรับเพื่อวิเคราะห์ค่าไลเนียร์ลิตีจากข้อมูลนั้น ค่า slope นี้ยังใช้ประมาณค่า %recovery ของวิธี ตรวจวิเคราะห์ได้ด้วย เช่น ถ้า slope เท่ากับ 0.94 % recovery ก็คือ 94%

การวิเคราะห์อาจพิจารณาจากการนำค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับค่าที่คำนวณได้จากการเจือจางไปคำนวณ ค่าร้อยละความแตกต่าง โดยยอมรับข้อมูลเพื่อใช้วิเคราะห์ค่าไลเนียร์ลิตี เมื่อร้อยละความแตกต่างไม่เกิน 10% และเครื่องหมายบวก/ลบของค่าร้อยละความแตกต่างของความเข้มข้นค่าน้อยสุดและค่ามากที่สุดไม่ต่างจาก เครื่องหมายบวก/ลบของค่าความเข้มข้นช่วงกลางตรวจวัด (วิสุทธิ์ กังวาลตระกูลม, 2554)

2.7.4 ขีดจำกัดในการตรวจหา (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

LOD (limit of detection) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

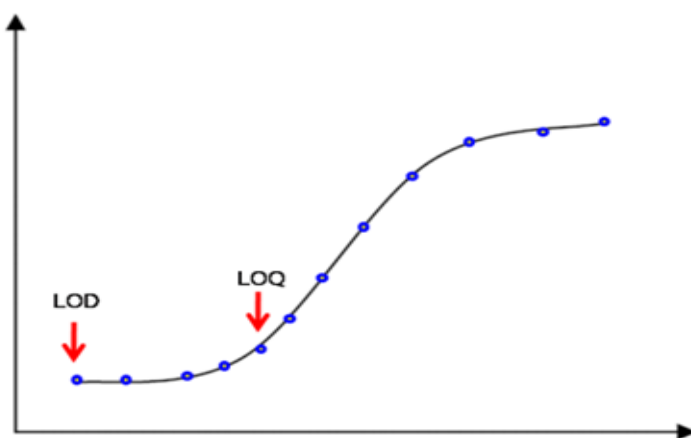
LOQ (limit of quantitation) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ หรือรายงานผลโดยมี accuracy และ precision ที่ยอมรับได้

LOD และ LOQ หาได้โดยการวัด blank อย่างน้อย 7 ครั้งและนำมาคำนวณตามสูตร

$$\text{LOD} = \frac{3\text{SD blank}}{\text{Slope}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10\text{SD blank}}{\text{Slope}}$$

อีกวิธีหนึ่งสามารถหา LOD และ LOQ ได้จากการเตรียมความเข้มข้นของสารที่จะทำการวิเคราะห์ โดยการเจือจางหลายความเข้มข้นภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ที่กำหนด อาจกล่าวได้ว่า LOD เป็นความเข้มข้นแรกต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้ หากสารตัวอย่างมีปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำกว่านี้จะไม่สามารถตรวจพบได้ ส่วน LOQ เป็นความเข้มข้นแรกต่ำสุดที่อยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linear range) ซึ่งสามารถนำไปคาดการณ์ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารได้ (นพวัฒน์ เฟื่องคำศร, 2560) ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2: แสดงการหาค่า LOD และ LOQ โดยการเจือจางหลายความเข้มข้น
(ที่มา: นพวัฒน์ เฟื่องคำศร, การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม 2560)

2.7.5 สภาพไว (Sensitivity)

Sensitivity หมายถึง ความสามารถในการวัดความเข้มข้นที่แตกต่างกันน้อยที่สุด วิธีการวิเคราะห์ที่มี ความไวสูงจะสามารถตรวจวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยมากหรือเป็นวิธีที่สามารถแยกความเข้มข้นของสารที่ แตกต่างกันน้อยมากได้ถูกต้อง (นพวัฒน์ เพ็งคำศร, 2560)

2.7.6 ความจำเพาะ (Selectivity หรือ Specificity)

ความจำเพาะ (Selectivity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยไม่ถูกรบกวนจากระบบ blank หรือวิธีการวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการจะวัด

ความจำเพาะ (Specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในระบบการวิเคราะห์ ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มี หรือ เติมสารรบกวนอื่น แล้วตรวจสอบดูว่าสารรบกวนเหล่านั้นมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์หรือไม่ (นพวัฒน์ เพ็งคำศร, 2560)

2.7.7 ความคงทน (Stability)

ความคงทน (Stability) หมายถึง ความคงทนของวิธีการทดสอบที่แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงระบบเพียงเล็กน้อย ซึ่งจะทำในห้องปฏิบัติการเดิมก็ให้ผลการทดสอบที่มีความคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อย หรือ อาจจะไม่มียผลกระทบต่อการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ (นพวัฒน์ เพ็งคำศร, 2560)

โดยสรุป คุณสมบัติของวิธีที่สำคัญสำหรับ method validation ประกอบด้วย ความเลือกจำเพาะ (specificity), ความแม่นยำ (accuracy), ความเที่ยงตรง (precision), ขีดจำกัดของการตรวจวัด (detection limit; LOD), ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (quantitation limit; LOQ), สภาพไว (sensitivity), ช่วงการใช้งาน (working range), ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity), ความคงทน (robustness) และการวิเคราะห์การกลับคืน (recovery) ของสารที่ทราบปริมาณ โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเป็นส่วนที่สำคัญอย่างยิ่งของการพัฒนาหรือปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ซึ่งการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีนั้นเกี่ยวข้องกับแนวทางการออกแบบวิธีการทดลองเพื่อยืนยันหรือพิสูจน์วิธีวิเคราะห์นั้น ๆ มีความเชื่อมั่นเพียงพอที่จะทำให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องภายในขอบเขตการใช้งานที่ต้องการได้ ดังนั้นผู้วิเคราะห์ต้องทำความเข้าใจหลักการพื้นฐานของกระบวนการวิเคราะห์ และข้อจำกัดของวิธีการทดสอบแต่ละวิธี ซึ่งผลลัพธ์จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี สามารถใช้ประเมินผลที่เกี่ยวข้องกับความน่าเชื่อถือและความสอดคล้องของผลการวิเคราะห์ หากวิธีการตรวจสอบความใช้ได้ยังไม่ได้ดำเนินการหรือดำเนินการในลักษณะที่ไม่เพียงพอ วิธีวิเคราะห์นั้นจะไม่ได้การยืนยันถึงผลลัพธ์ที่ได้ว่ามีความน่าเชื่อถือเพียงพอ โดยสิ่งที่สำคัญของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี คือการกำหนดขอบเขตของวิธีการตรวจสอบซึ่งจะเป็นการกำหนดพารามิเตอร์ เช่น คุณสมบัติ เงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการที่จะต้องประเมินและตรวจสอบในระหว่างการดำเนินการวิเคราะห์

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เครื่องมือที่สามารถวัดค่าความเข้มข้นได้จากการดูดกลืนแสงมีหลายชนิดและพบเห็นทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เช่น Spectrophotometry, Blood chemistry automation, Microplate reader และ Semi-automate Human analyzer เป็นต้น โดยเครื่องมือที่สามารถวัดค่าดูดกลืนแสงที่ใช้ในการตรวจวัด Creatinine, Blood urea nitrogen (BUN) , Uric acid ในกระแสเลือดในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ ยังมีการทดสอบวิเคราะห์ creatinine, urea และ albumin บนกระดาษแต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ได้ชัดเจน และครอบคลุมการตรวจทุกชนิดของสิ่งส่งตรวจ ทั้ง serum และ ปัสสาวะ และเป็นเพียงการทดสอบอย่างใดอย่างหนึ่ง

ตัวอย่างงานวิจัย ของ Kumar และคณะ 2000 สร้างชุดตรวจ Strip ในการประเมิน urea ในซีรัม (Kumar et al., 2000) โดยการนำ urease มาตรึงบน chromatographic paper ร่วมกับ chromogen phenol red ซีรัมที่มียูเรียจะทำปฏิกิริยากับ urease และน้ำได้เป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแอมโมเนียจะทำให้ค่า pH เปลี่ยนแปลงไป สามารถติดตามได้โดย chromogen phenol red การทดสอบนี้มีข้อดีคือ ใช้น้ำยารีเอเจนต์เพียงขั้นตอนเดียว ตรวจได้ภายใน 50 วินาทีที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มข้นของยูเรียที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้คือ 0.15 g/L

งานวิจัยของ Sittiwong & Unob., 2016 สร้าง platform กระดาษในการตรวจครีเอตินินในปัสสาวะ โดยกระดาษจะตรึงด้วย 3-propylsulfonic acid trimethoxyline ซึ่งครีเอตินินจะอยู่ในรูป cationic จะสามารถจับกับกระดาษผ่านการแลกเปลี่ยนไอออนและสามารถตรวจวัดได้ด้วยโดยใช้ปฏิกิริยาของ Jeffé จะพบสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองส้มเกิดขึ้น สามารถมองเห็นความเข้มสีได้ด้วยตาเปล่า และพบช่วงความเป็นเส้นตรงของครีเอตินินอยู่ที่ 10-60 mg/L และค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) เท่ากับ 4.2 mg/L

งานวิจัยของ Sandeep K Sharma & et.al , 2002 ใช้แถบทดสอบ albumin เพื่อตรวจหาภาวะ albuminuria ในคนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งในการทดสอบสามารถประเมิน albumin ในเชิงคุณภาพและกึ่งปริมาณในปัสสาวะ วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ตรวจวัดอย่างรวดเร็ว ง่าย ประหยัด และใช้เทคนิคพื้นฐาน ซึ่งกระดาษจะตรึงด้วย chromogen immobilized ที่จำเพาะบนแผ่นทำปฏิกิริยากับ albumin ในปัสสาวะ และเปลี่ยนสีของแถบจากสีเหลืองเป็นสีเขียว การเปลี่ยนแปลงสีสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เวลาทำปฏิกิริยาประมาณ 20 วินาที และพบช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 10 ถึง 2000 mg / dL

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

รหัสโครงการวิจัย : HS030/2567 โครงการวิจัยเรื่อง: การพัฒนาชุดตรวจไมโครอัลบูมินและโปรตีนในปัสสาวะ พร้อมโปรแกรมคำนวณเพื่อประเมินผู้ป่วยโรคไตระยะแรกเริ่มสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน ได้รับการรับรองการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ เอกสารการรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ IRB1-062/2567 (ภาคผนวก)

โดยขอยกเว้นการใช้เอกสารแสดงความยินยอมฯ เนื่องจากโครงการเป็นการวิจัยโดยใช้สิ่งส่งตรวจที่เหลือจากโครงการ มาตรฐานระดับอัลบูมินและครีเอตินินในเลือดและปัสสาวะเพิ่มเติมเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับโปรแกรมการคำนวณจากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติกับชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นผู้วิจัยใช้ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่เหลือจากอาสาสมัครที่ลงนามยินยอมใน consent form ของโครงการ G-HS 068/2566 ได้รับการรับรองการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ เอกสารการรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ IRB3-104/2566 (ภาคผนวก)

3.1 ประชากร

ในการศึกษาครั้งนี้ กำหนดให้มีอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการจำนวน 134 คน ได้แก่ อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ที่นักวิจัยดำเนินการเอง และขอตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่เหลือจากการตรวจโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเป็นอาสาสมัครผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่ยินยอมให้นำตัวอย่างเลือดเหลือมาวิเคราะห์ต่อของโครงการ รวมจำนวน 134 ราย

คำนวณหรือกำหนดค่าอ้างอิงมาจากงานวิจัย ดังต่อไปนี้

1. Development of a creatinine enzyme-based bar-code-style lateral-flow assay (Ka-Kei Fung et al., 2009)
2. Development of a europium nanoparticles lateral flow immunoassay for NGAL detection in urine and diagnosis of acute kidney injury (Moli Yin et al., 2022)

3.2 กลุ่มตัวอย่างและสุ่มตัวอย่าง

กระบวนการเก็บตัวอย่าง โดยผู้วิจัยจะทำการเก็บตัวอย่างจากท่านทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเลือด และปัสสาวะ

สิ่งส่งตรวจเลือด

ผู้วิจัยจะใช้ 70% Ethyl alcohol เช็ดบริเวณผิวหนังที่เจาะเลือด ทำการเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำประมาณ 5-10 มิลลิลิตร หลีกเลียงการรัดแขนขณะเจาะเลือดนานเกิน 1 นาที และหลีกเลียงปัจจัยที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยเลือดที่เก็บได้ 3-5 มิลลิลิตร จะแบ่งเก็บใส่หลอดเก็บเลือดชนิดไม่มีสารกันเลือดแข็ง หรือหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งลิเทียมเฮพาริน และนำไปปั่นเพื่อแยกซีรัมหรือพลาสมาที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ได้แก่ ระดับน้ำตาล ไขมัน รวมถึงสารบ่งชี้ความผิดปกติของการทำงานของไต ได้แก่ Creatinine Albumin

การเก็บปัสสาวะ

เก็บปัสสาวะส่วนกลางของการขับถ่าย (Mid-stream urine) โดยผู้วิจัยจะแจกจ่ายภาชนะสำหรับเก็บสิ่งส่งตรวจให้แก่อาสาสมัคร โดยให้อาสาสมัครใช้ห้องน้ำภายในบริเวณชั้น 4 ทำความสะอาดบริเวณอวัยวะที่ใช้ปัสสาวะและถ่ายปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อน จากนั้นจึงเก็บปัสสาวะช่วงกลางของการขับถ่ายประมาณ 10 – 15 มิลลิลิตร (ครึ่งหนึ่งของภาชนะ) ปิดฝาให้สนิทนำส่งแก่ผู้วิจัย โดยผู้วิจัยจะนำภาชนะที่บรรจุสิ่งส่งตรวจมาพันขอบฝาด้วยพาราฟิล์มให้เรียบร้อยเพื่อป้องกันการปนเปื้อน บรรจุในถุงพลาสติกปิดผนึกอีกครั้ง

ซึ่งตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง โดยผู้วิจัยจะดำเนินการตรวจตัวอย่างทั้งหมดด้วยตนเอง โดยใช้เครื่องตรวจวัดอัตโนมัติ Clinical Chemistry Automatic PKL PPC 125 ที่ห้อง 406 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นผู้วิจัยจึงจะวิเคราะห์ผลและความสัมพันธ์ในการเกิดโรคต่างๆทางสถิติเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากชุดตรวจไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น และวิเคราะห์ความสอดคล้องหรือแตกต่างของผลทางชีวเคมีที่พบในเลือด ปัสสาวะ ของกลุ่มประชากรสุขภาพดี เปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรที่เป็นโรคไตเรื้อรัง

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

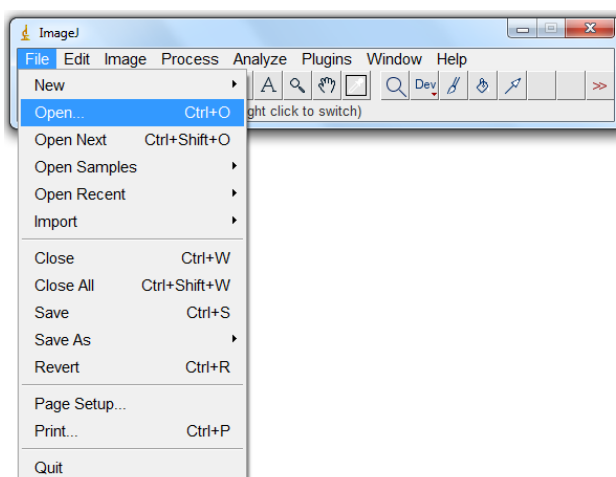
เกณฑ์การคัดเข้าในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี ได้แก่ อาสาสมัครที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป จำนวน 50 คน ซึ่งอาสาสมัครแต่ละท่านจะได้รับเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย และเอกสารแสดงความยินยอมจากผู้วิจัยก่อน โดยจะมีการสอบถามข้อมูลประเมินความเสี่ยง และตรวจสุขภาพเบื้องต้นของอาสาสมัคร ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง BMI รวมถึงโรคประจำตัว

เกณฑ์การคัดเข้าในกลุ่มอาสาสมัครโรคไต ได้แก่ อาสาสมัครที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป และเป็นจำนวน 50 คน ที่เข้าทำการรักษาที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยบูรพา/คลินิกหมอครอบครัวและศูนย์สุขภาพชุมชนด้วยโรคไต ระยะที่ 3 และ 4 ตามนิยามของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2558 นั่นคือ มีค่าดัชนีบ่งชี้ของภาวะโรคไต ได้แก่ ค่าอัตราการกรองของไตในเลือด (estimated glomerular filtration rate, eGFR) น้อยกว่า 60 mL/min/1.73m² ติดต่อกันเกิน 3 เดือน ร่วมกับมีปริมาณของอัลบูมินในปัสสาวะ (albumin creatinine ratio, ACR) ตั้งแต่ 30 มิลลิกรัม/กรัม ขึ้นไป

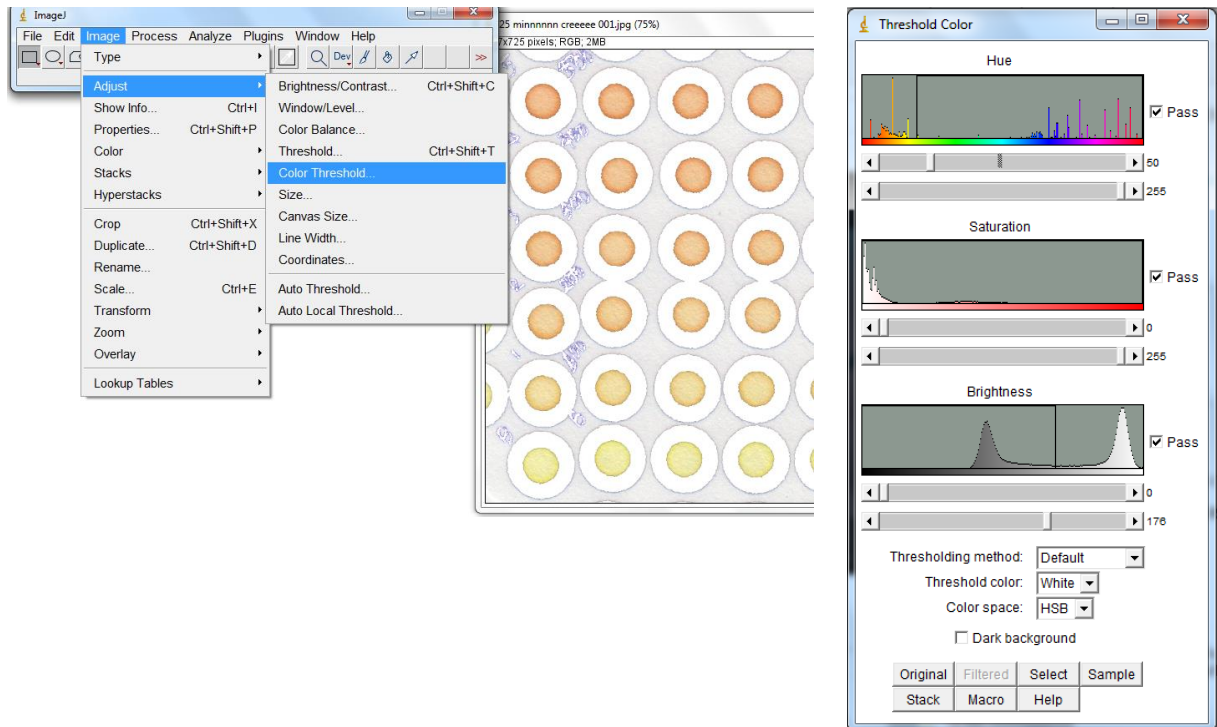
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.1 การวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J

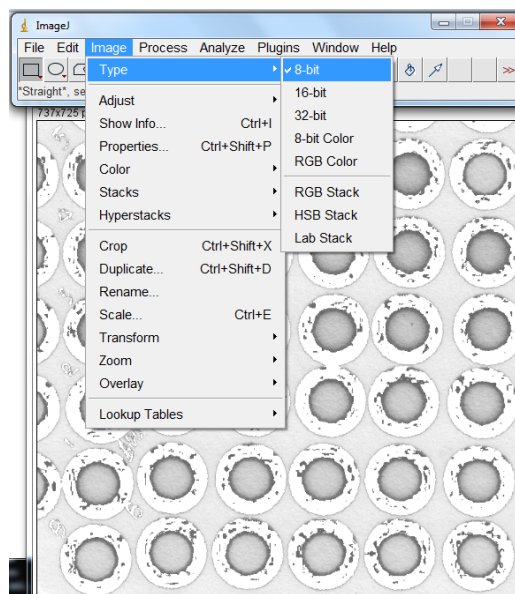
1) เปิดโปรแกรม Image J ไปที่ File >Open เลือกรูปภาพที่ต้องการประมวลผล Image



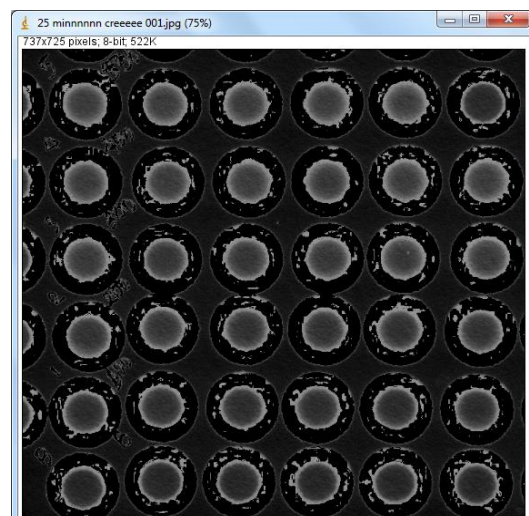
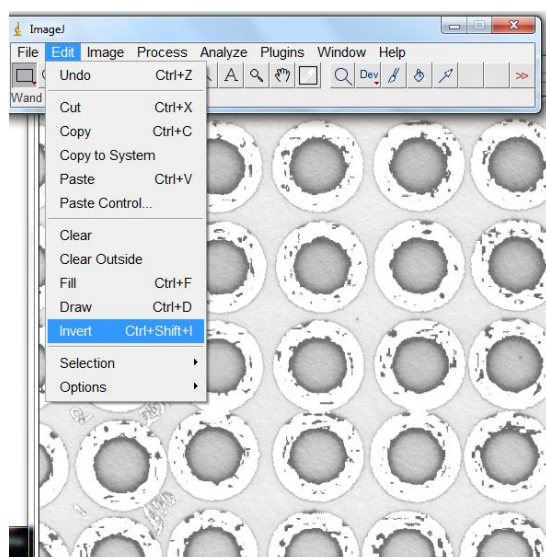
- 2) ปรับรูปให้เหลือเฉพาะสีที่ต้องการตรวจวัดโดยการไปที่ Image J>adjust>Color threshold เมื่อมีแถบขึ้นให้เลือก pass ทั้งหมด เลือก Threshold: White, Color space: HSB ปรับสไลด์เลื่อน scale บริเวณ Hue ส่วน scale อื่นๆตั้งค่าต่างๆดังนี้



- 3) ปรับให้รูปเป็นไฟล์ 8 bit gray scale โดยไปที่ Image > Type > 8 bit



4) ปรับให้เป็น gray intensity โดยเลือก Edit> invert



3.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลและความสัมพันธ์ในการเกิดโรคต่างๆทางสถิติ โดยใช้สถิติของ Kolgomorov-Smirnov test ในการวิเคราะห์โดยใช้ mean และ Standard error of mean (SEM) และหาค่าความแตกต่างของกลุ่มประชากรของกลุ่มเสี่ยงกับกลุ่มควบคุมโดยการใช้ Student's t test ที่ P values < 0.05 ส่วนในการหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรพารามิเตอร์กับระยะการดำเนินของโรค CKD ใช้การวิเคราะห์ one way ANOVA ที่ P values < 0.05 การวิเคราะห์สถิติทำโดยใช้โปรแกรม SPSS version 11 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

3.5 ระยะเวลาการวิจัย

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

งบประมาณที่ได้รับ 250,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1.8 ปี

เริ่มทำการวิจัยเมื่อวันที่ 22 พฤศจิกายน พ.ศ. 2565 ถึงวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2567

3.6 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

3.6.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 0.5-10,10-100,100-1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf (ประเทศเยอรมันนี)
2. ไมโครปิเปตทิป ขนาด 10,100 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Thermo Scientific
3. เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo
4. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 4 บริษัท Whatman™ (ประเทศอังกฤษ)
5. Scanner รุ่น Cannon LiDE 110
6. โปรแกรม Image J (Free Download, Nation Institute of health)
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Semi-Automatic Biochemistry Analyzer Humalyzer 3500 Human

3.6.2 สารเคมี

1. Creatinine anhydrous ($\text{H}_2\text{NC}(=\text{NH})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), Sigma-Aldrich, Germany
2. Urea $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, VWR CHEMICAL
3. Bovine serum Albumin Fraction-V, HIMEDIA
4. ชุดน้ำยาการตรวจการวิเคราะห์ Creatinine โดยวิธี Kinetic (Jaffé reaction) Photometric Colorimetric Test

โดยใช้ชุดทดสอบมาตรฐาน มีสารเคมี ดังนี้

1×100 ml Picric acid 26 mmol/l

1×100 ml Sodium Hydroxide (NaOH) 1.6 mol/l

5. ชุดน้ำยาการตรวจการวิเคราะห์ Albumin โดย BCG –Method Photometric Colorimetric Test

โดยใช้ชุดทดสอบมาตรฐาน มีสารเคมี ดังนี้

-Reagent

Citrate buffer (pH 4.2) 30 mmol/l

Bromocresol green 260 $\mu\text{mol/l}$

3.6.3 การเตรียมสารละลาย

- 1) สารละลายมาตรฐานครีเอตินิน

เตรียมสารละลายมาตรฐานครีเอตินินความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยชั่งผงครีเอตินิน 1 กรัม ลงในบีกเกอร์ ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และปิเปตกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานครีเอตินิน 5 ความเข้มข้น ปริมาตรแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาตรของสารละลายสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานที่ปิเปตจากสารละลายมาตรฐานครีเอตินินความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ระดับความเข้มข้น	ความเข้มข้นที่เตรียม (mg /dL)	ปริมาตรครีเอตินิน (μL)	ปริมาตรน้ำกลั่น (μL)	ปริมาตรสุทธิ (μL)
1	800	400	100	500
2	600	300	200	500
3	400	200	300	500
4	200	100	400	500
5	100	50	450	500

2) สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) โดยชั่ง ผง BSA 200 มิลลิกรัมลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจาง 2 เท่า (two fold dilution) ด้วยน้ำกลั่น เป็น dilution 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 และ 1:512

3) สารละลายซีรัมมาตรฐาน

เตรียมสารละลายตัวอย่างซีรัม (Human control N และ Human control P) โดยปิเปตน้ำกลั่นลงในตัวอย่างซีรัมปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.7 การสร้างอุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษ

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ครีอะตินินและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินและยูเรีย สร้างพื้นที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier) ด้วยวิธีพิมพ์ไข (wax printing) ทำการออกแบบกระดาษโดยใช้โปรแกรม Adobe Illustrator ออกแบบส่วนตรวจวัดแบบหลุม (well format) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สำหรับการตรวจวิเคราะห์ครีอะตินินและ เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรสำหรับการตรวจวัดอัลบูมินและยูเรีย จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 1 นาที หลังจากนั้นติดอุปกรณ์กระดาษหลังด้วยเทปใสเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารละลายที่ใช้ในการทำการวิเคราะห์

3.8 การประสิทธิภาพการตรวจวัดครีอะตินินและอัลบูมินด้วยชุดตรวจวัดแบบกระดาษ

3.8.1 ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (Analytical features) ครีอะตินินด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

1) ศึกษาหาระยะเวลาการอ่านผลที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

ในการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการอ่านผลการทดสอบ ทำการทดสอบโดยการหยดสารละลายไปยังบริเวณทดสอบ ในการหยดละลายตัวต่อไปในแต่ละครั้ง จะต้องทำให้สารละลายแห้งโดยการเป่าลมเย็น ลำดับแรกหยดสารละลาย Picric Acid ความเข้มข้น 26 mmol/L ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลำดับต่อไปหยดสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1.6 mol/L ที่ทำการเจือจางแล้วตามใบกำกับน้ำยา ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และลำดับสุดท้ายหยดสารละลายครีอะตินินมาตรฐาน 5 ระดับความเข้มข้น ดังตารางที่ 3.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และจับเวลา โดยสารละลายบนบริเวณทดสอบจะแห้งภายใน 3 นาทีแรก จากนั้นตั้งแต่นาทีที่ 5 ถึงนาที 60 ทำการสแกนผลการทดสอบทุกๆ 5 นาทีด้วยโปรแกรม Image J เป็นจำนวน 12 ครั้งและวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นละ 5 ครั้ง และนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความเข้มข้น เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผลการทดสอบต่อไป

2) ศึกษาช่วงความเข้มข้น (Linear range)

ทำการศึกษาความเป็นเส้นตรงของครีอะตินิน โดยหยดสารละลายไปยังบริเวณทดสอบ ในการหยดสารละลายตัวต่อไปในแต่ละครั้ง จะต้องทำให้สารละลายแห้งโดยการเป่าลมเย็น ลำดับแรกหยดสารละลาย Picric Acid ความเข้มข้น 26 mmol/L ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลำดับต่อมาหยดสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1.6 mol/L ที่ทำการเจือจางตามเอกสารกำกับน้ำยา ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และลำดับสุดท้ายหยดสารละลายครีอะตินินมาตรฐาน 5 ระดับความเข้มข้น ดังตารางที่ 3.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และจับเวลา วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นละ 5 ครั้ง

เมื่อสารละลายแห้งแล้วนำอุปกรณ์ไปสแกนภาพแล้ววิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ Image J จากนั้นนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของครีเอตินินและความเข้มข้นที่เกิดขึ้น เพื่อศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดครีเอตินินที่พัฒนาขึ้น

3) ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ทำการทดลองคล้ายข้อ 2) แต่ใช้สารละลายครีเอตินินที่มีความเข้มข้น 100,600 และ 1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 5 ครั้ง หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (%RSD)

4) การหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

การทดสอบค่าความสามารถในการตรวจหาปริมาณครีเอตินินต่ำสุดที่สามารถตรวจพบที่พัฒนาขึ้นวิธีที่มี limit of detection (LOD) ต่างๆจะสามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดีหรือมีความไวมาก ซึ่งวิธีการหาค่า LOD สามารถหาได้จากความเข้มข้นของครีเอตินินที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นนำค่าไปแทนในสมการ (4.1) และ (4.2) เพื่อหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) ตามลำดับ

$$LOD = \frac{3SD_{blank}}{Slope} \quad (4.1)$$

$$LOQ = \frac{10SD_{blank}}{Slope} \quad (4.2)$$

เมื่อ SD คือ Standard derivation ที่ได้จากการวัด blank 10 ครั้ง และ slope คือ ค่าความชันจากการทำกราฟมาตรฐาน

4) การศึกษาค่าการคืนกลับ Recovery ในตัวอย่างปัสสาวะ

นำตัวอย่างปัสสาวะมาเจือจาง 10 เท่า แล้วละลายผงครีเอตินินที่ปริมาณแตกต่างกัน 3 ความเข้มข้นดังตาราง 3.2 แล้วนำไปตรวจวัดหาความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ และนำค่าที่ได้มาแทนค่าลงในสมการที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์วิเคราะห์การคืนกลับ (%Recovery) โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง เมื่อสารละลายแห้งแล้วจึงนำอุปกรณ์ไปสแกนภาพแล้ววิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ Image J จากนั้นนำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปเทียบกับกราฟความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

ตาราง 3.2 แสดงวิธีการเตรียมสารตัวอย่างในการหาเปอร์เซ็นต์วิเคราะห์การคืนกลับ (%Recovery)

Sample	วิธีการเตรียม	ความเข้มข้นสุทธิ (mg/ dL)
1 (baseline)	ปัสสาวะที่เจือจาง 10 เท่า 10 mL	-
2	ปัสสาวะที่เจือจาง 10 เท่า 10 mL + ผงครีเอตินิน 10 mg	100 mg/dL
3	ปัสสาวะที่เจือจาง 10 เท่า 10 mL + ผงครีเอตินิน 50 mg	500 mg/dL
4	ปัสสาวะที่เจือจาง 10 เท่า 10 mL + ผงครีเอตินิน 100 mg	1000 mg/dL

3.8.2 ศึกษาค่าทางวิเคราะห์ (Analytical features) อัลบูมินด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

1) ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range)

ทำการศึกษาความเป็นเส้นตรงของอัลบูมิน โดยหยดสารละลายไปยังบริเวณทดสอบ ในการหยดสารละลายตัวต่อไปในแต่ละครั้ง จะต้องทำให้สารละลายแห้งโดยการเป่าด้วยลมเย็น ลำดับแรกหยดรีเอเจนต์ ปริมาตร 2.00 ไมโครลิตร และหยดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50, 10.00, 15.00 และ 20.00 กรัมต่อเดซิลิตร ปริมาตร 2.00 ไมโครลิตร วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เมื่อสารละลายแห้งแล้วนำอุปกรณ์ไปสแกนภาพแล้ววิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ Image J จากนั้นนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับความเข้มสี แล้วพิจารณาความสัมพันธ์สหสัมพันธ์ (R^2)

2) ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ทำการทดลองคล้ายข้อ 1) วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

3) การหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

ทำการทดลอง วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปแทนในสมการ (4.1) และ (4.2) เพื่อหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) ตามลำดับ

4) การศึกษาค่าการคืนกลับ Recovery ในตัวอย่างปัสสาวะ

นำตัวอย่างปัสสาวะมาเจือจาง 10 เท่า แล้วละลายผงอัลบูมินที่ปริมาณแตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น แล้วนำไปตรวจวัดหาความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ และนำค่าที่ได้มาแทนค่าลงในสมการที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery) โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง

3.9 การทดสอบประสิทธิภาพอ่านค่ากึ่งเชิงปริมาณจากการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยตาเปล่าในการใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

นำตัวอย่างเลือดเพื่อแยกซีรัมจากอาสาสมัคร และปัสสาวะของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ โดยนำตัวอย่างตรวจอ่านค่าครีเอตินิน (Creatinine) และโปรตีนอัลบูมิน (Albumin) ด้วยตามเปล่าตามการแบ่งช่วงค่าของการ์ดสี ซึ่งระบุความเข้มสีในการบอกระดับค่ากึ่งเชิงปริมาณจากการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยตาเปล่าในการใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยประเมินการอ่านของการผู้อ่านจำนวน 5 ท่านในการประเมินค่า และนำค่าเฉลี่ยมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลที่ได้ระหว่างเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิกโดยใช้น้ำยาตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก

3.10 การทดสอบประสิทธิภาพการแปลผล UACR ด้วยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ด้วยโปรแกรมกรณคำนวณ

ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครโครงการ จำนวน 103 ราย โดยนำตัวอย่างตรวจวิเคราะห์จะเทียบระหว่างเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิกโดยใช้น้ำยาตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก Creatinine Albumin อ่านค่ากึ่งเชิงปริมาณจากการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยตาเปล่าในการใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น นำค่าที่อ่านได้ตามข้อ 3.9 มากรอกตัวเลขเข้าโปรแกรมการแปลผลที่เวปไซด์ [ช่วย คำนวณ และ แปลผล Urine Albumin Creatinine Ratio \(UACR\) Calculation](https://drlogy.com/calculator/albumin-creatinine-ratio-acr) <https://drlogy.com/calculator/albumin-creatinine-ratio-acr>

Albumin Creatinine Ratio (ACR) Calculator For Kidney Disease

Albumin Creatinine Ratio Calculator	
Albumin (mg/dL)	Result
Creatinine (mg/dL)	

ภาพที่ 3.1 แสดงโปรแกรมและการคำนวณสัดส่วน UACR

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

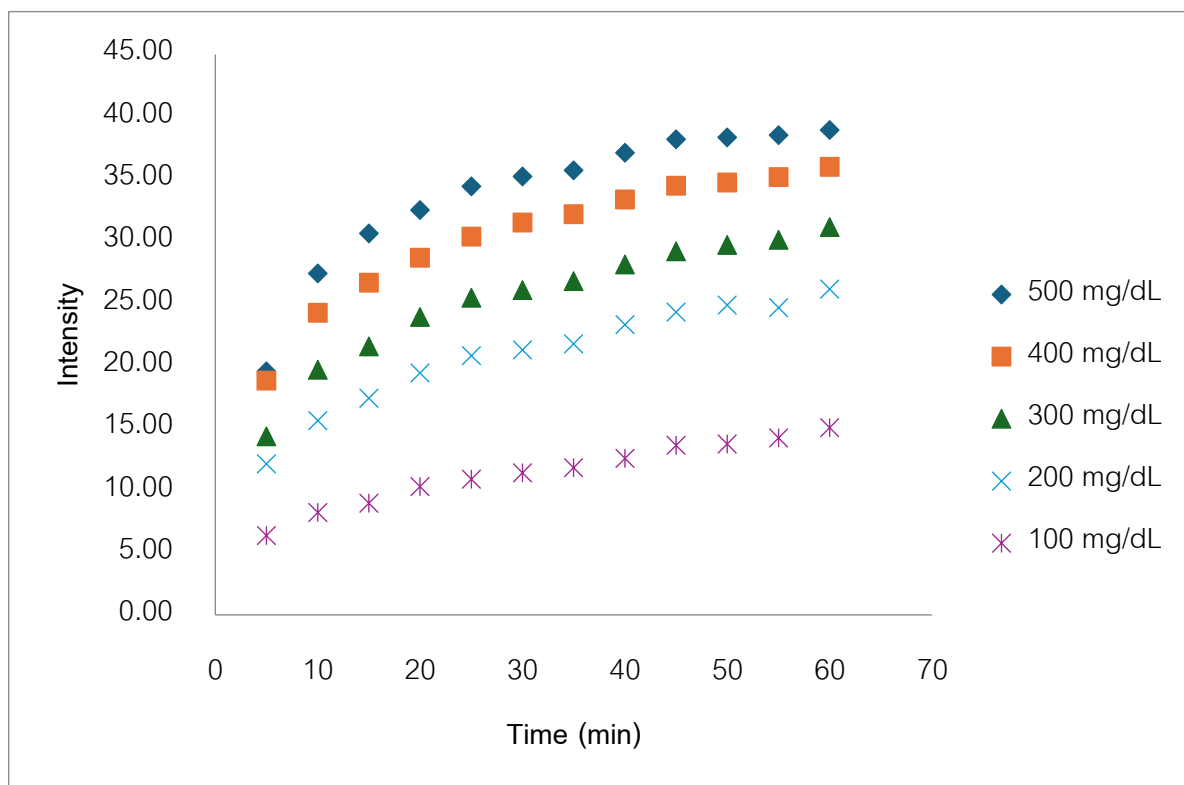
ในการศึกษาครั้งนี้ พัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ระดับครีเอตินินและอัลบูมินในปัสสาวะ ทดสอบประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น (Method validation) และนำมาทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะ 105 ราย เปรียบเทียบผลระหว่างชุดตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้ในโรงพยาบาลตามวิธีมาตรฐานและประเมินประสิทธิภาพและทวนสอบผลของการทดสอบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปัสสาวะแปลผลผ่านโปรแกรมคำนวณเพื่อเปรียบเทียบการแปลผลและความเป็นไปได้ในการนำงานจริงเพื่อประเมินนำมาใช้กลุ่มเสี่ยงโรคไตในผู้ป่วยเบาหวาน

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 ผลการตรวจวัดครีเอตินินด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

4.1.1.1 ศึกษาหาระยะเวลาการอ่านผลที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

การศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง picric acid กับ creatinine ในสารละลายที่เป็นด่าง ซึ่งจะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง ทำได้โดยหยดสารละลาย picric acid ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นหยดสารละลาย NaOH ที่ทำการเจือจาง 1:4 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และตามด้วยสารละลายครีเอตินินมาตรฐาน ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำการสแกนภาพทุกๆ 5 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วนำภาพที่ได้มาเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อตรวจวัดความเข้มสีจะได้กราฟดังแสดงในภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Picric acid และสารละลาย creatinine มาตรฐาน

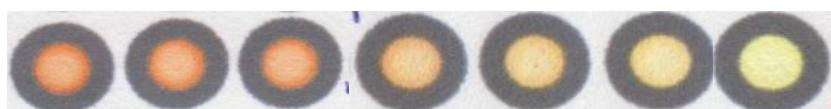
จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง picric acid และ creatinine พบว่าความเข้มสีมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มคงที่ที่ระยะเวลา 40 นาที ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ระยะเวลาในการทดสอบ คือ 40 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

4.1.1.2 ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (Analytical features) ครีอะตินินที่พัฒนาขึ้น

1) ศึกษาช่วงความเส้นตรง (Linear range)

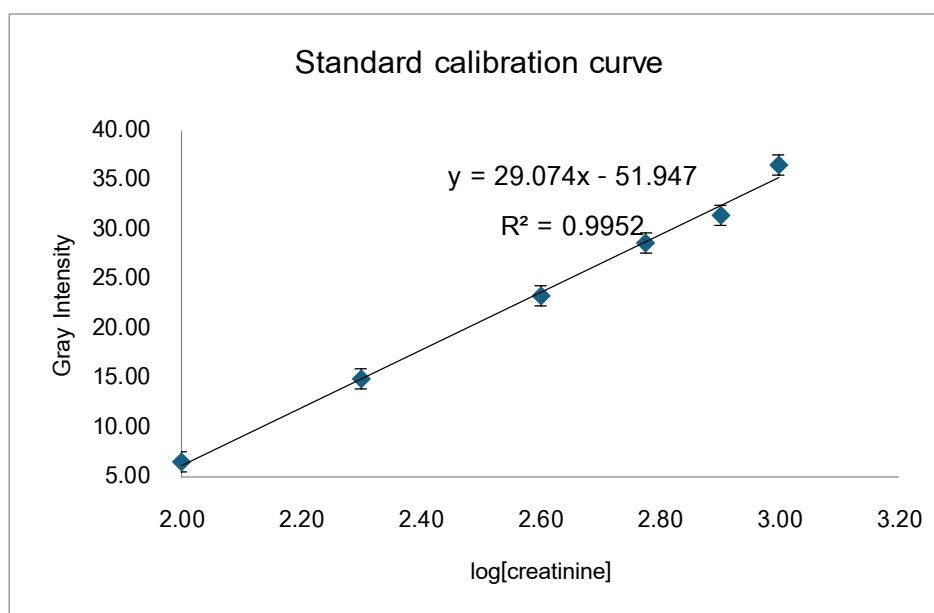
จากการทดลองการวิเคราะห์ครีอะตินินในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าความเข้มสีที่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณ ครีอะตินิน เมื่อปริมาณครีอะตินินเพิ่มขึ้นสัญญาณที่ได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และสามารถพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับ $\log [\text{Creatinine}]$ เพื่อขยายช่วงความเส้นตรง จากกราฟให้ความเป็นเส้นตรงที่ 100-1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานคือ $y = 29.074x - 51.947$ ($R^2 = 0.9952$) ดังแสดงดังภาพที่ 4.2

(ก)



[Creatinine] 1000 800 600 400 200 100 0

(ข)



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของสารมาตรฐานครีอะตินินกับค่าความเข้มของสีที่เพิ่มขึ้น

(ก) ความเข้มสีของครีอะตินิน 0-1,000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับ $\log [\text{creatinine}]$

2) ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารละลายครีอะตินินมาตรฐาน โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของครีอะตินินมาตรฐาน ในช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 100, 600 และ 1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร พบได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation,%RSD) เท่ากับ 14.22, 4.95 และ 3.48 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าดังกล่าวพบว่าในการตรวจวัดสารละลาย ครีอะตินินมาตรฐาน ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูง สามารถทำซ้ำได้

3) การหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัด

การหาปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

ในการหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณของการวิเคราะห์ครีอะตินิน นำสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ครีอะตินินความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 10 ครั้ง พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) อยู่ที่ความเข้มข้นคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) คือ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

4) การทดสอบการลงตัวอย่างปัสสาวะ

จากการนำตัวอย่างปัสสาวะไปวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Semi-automatic biochemistry analyzer Humalyzer 3500 Human พบว่ามีความเข้มข้นของครีอะตินินที่ตรวจวัดได้ คือ 137.85 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ส่วนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น เมื่อทำการเจือจาง 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาตรวจหาปริมาณครีอะตินินพบว่าให้ความเข้มข้น คือ 136.20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งสามารถคำนวณ % Accuracy ได้ 98.81% ส่วนการคำนวณ %Recovery ได้ทำการเจือจางปัสสาวะเป็น 10 เท่า แล้วเติมสารครีอะตินินตามตารางที่ 3.2 พบว่า ให้ค่า %Recovery คือ 106.36%, 72.73%และ 86.54% แสดงว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีความถูกต้อง สามารถที่จะนำไปใช้กับตัวอย่างได้จริง

4.1.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อัลบูมินด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

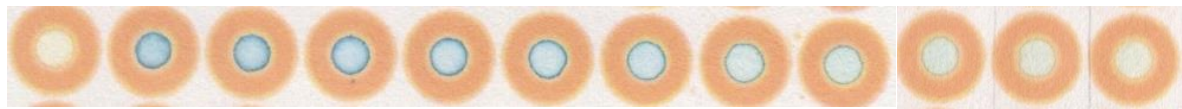
การตรวจวัดอัลบูมิน มีหลักการทั่วไปคือ bromocresol green (BCG) จะจับกันอย่างจำเพาะกับอัลบูมิน ที่สภาวะกรด pH 4.2 อัลบูมินจะมีประจุเป็นบวก และจับกับ BCG ที่มีประจุลบ เกิดเป็นสารประกอบสีเขียว โดยวัดความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นกับปริมาณอัลบูมิน สามารถวิเคราะห์ความเข้มสีได้โดยใช้โปรแกรมประมวลผลภาพ

4.1.2.1 ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (Analytical features) อัลบูมินด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

1) ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range)

จากการทดลองการวิเคราะห์อัลบูมินในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าความเข้มสีที่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณอัลบูมิน เมื่อปริมาณเพิ่มขึ้นสัญญาณที่ได้จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงจุดที่ความเข้มสีคงที่ และพล็อตกราฟแสดง ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับ $\log [\text{Albumin}]$ เพื่อขยายช่วงความเข้มข้นของอัลบูมิน จากกราฟให้ความเป็นเส้นตรงที่ 0.039 -20.00 กรัมต่อเดซิลิตร และได้สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานคือ $y = 17.505x + 27.005$ ($R^2=0.9972$) ($n=3$)

(ก)

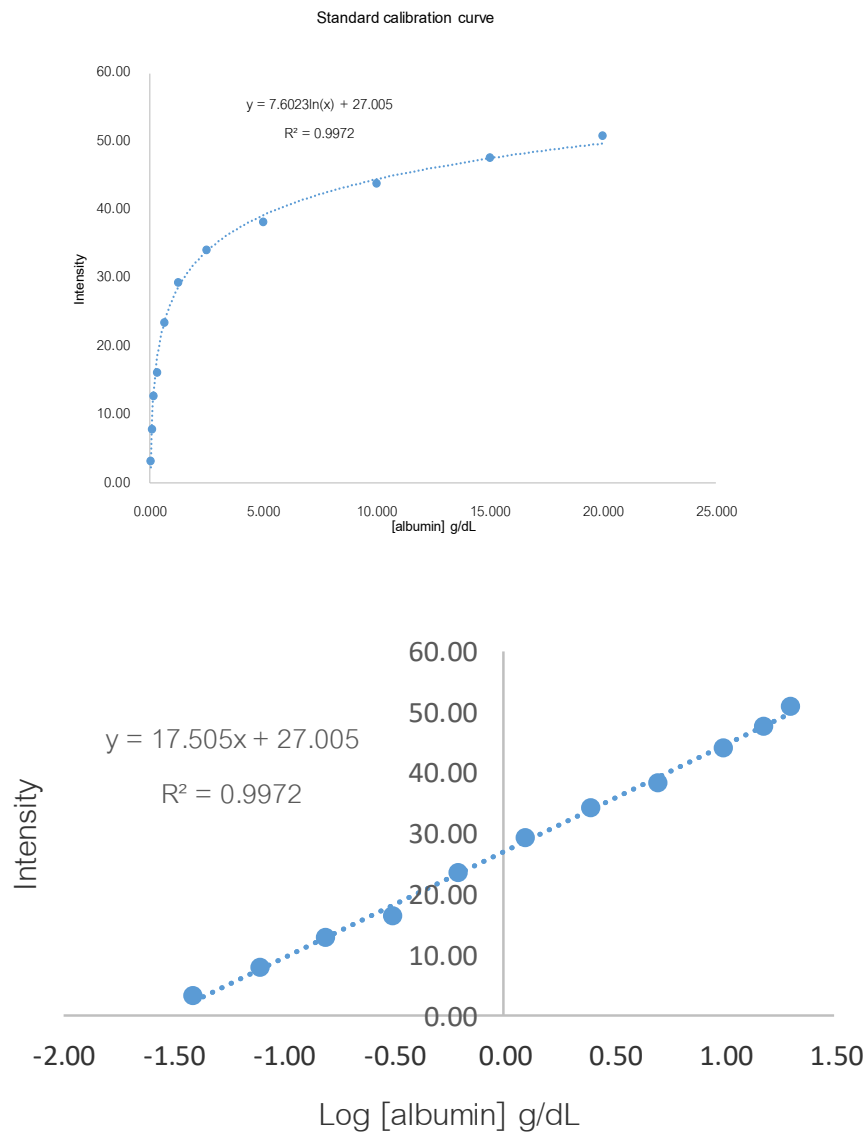


0.039

[Albumin]

g/dL

(ข)



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานอัลบูมินกับค่าความเข้มของสีที่เพิ่มขึ้น

(ก) ความเข้มข้นของอัลบูมิน 0.039 -20.00 กรัมต่อเดซิลิตร

(ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับ log [Albumin]

4.2.2.2 ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารละลายอัลบูมินมาตรฐาน โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของอัลบูมินมาตรฐาน ในช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 0.078, 2.50 และ 20.00 กรัมต่อเดซิลิตร พบได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) เท่ากับ 4.64, 3.65 และ 1.32 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าดังกล่าวพบว่าในการตรวจวัดสารละลายอัลบูมินมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูง สามารถทำซ้ำได้

4.2.2.3 การหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

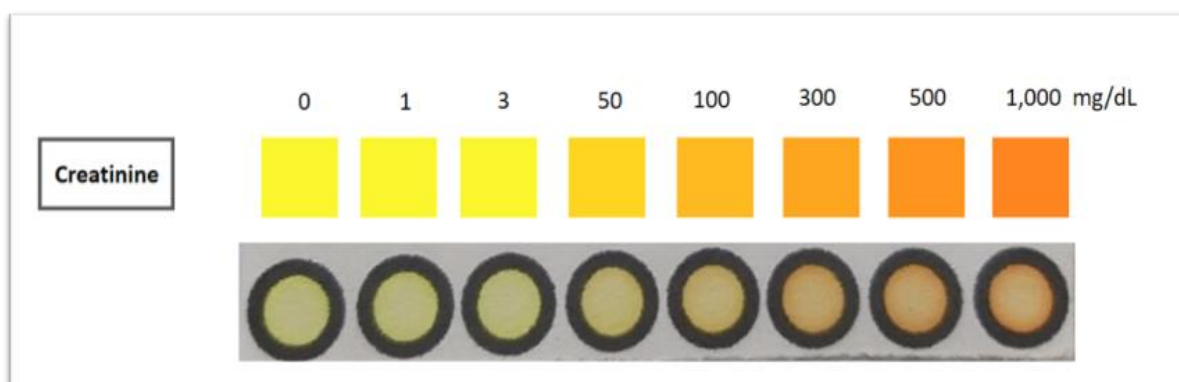
ในการหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณของการวิเคราะห์อัลบูมิน นำสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์อัลบูมินความเข้มข้น 0 กรัมต่อเดซิลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 8 มาคำนวณตามสมการ (4.1) และ (4.2) ในบทวิธีดำเนินการ พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) อยู่ที่ความเข้มข้นคือ 1.26 g/dL และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) คือ 2.18 g/dL

4.3 การทดสอบหาปริมาณครีเอตินินด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษ

ผลการทดสอบวัดระดับครีเอตินินเชิงปริมาณ ได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตรการประดิษฐ์ “กรรมวิธีการผลิตชุดตรวจวัดระดับครีเอตินินแบบกระดาษ เลขที่คำขอ 2403001557 วันที่ยื่นคำขอ วันที่ 29 พ.ค. พ.ศ. 2567

รายละเอียดการประดิษฐ์ ดังนี้

ชุดตรวจวัดระดับครีเอตินินแบบกระดาษเชิงปริมาณ ตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วย ชุดแผ่นทดสอบ และชุดน้ำยา ที่สามารถตรวจสอบระดับครีเอตินินได้ 8 ระดับ ในช่วง 0-1,000 mg/dL โดยออกแบบให้ใช้ชุดแผ่นทดสอบแบบหยด ตัวอย่างตรงบริเวณตรวจวัด จำนวน 1 หยด และชุดน้ำยาสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินินที่ผสมแล้ว จำนวน 1 หยด ลงบนจุดโซนทดสอบของแผ่นทดสอบ รอให้แห้ง อย่างน้อยเป็นเวลา 5-10 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า สีสั้มนจนถึงสีน้ำตาลเข้มที่เกิดขึ้น แสดงว่าพบระดับความเข้มข้นของครีเอตินินในช่วง 0-1,000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dL) แสดงดังรูปที่ 4.4 โดยระดับความเข้มของสีสั้มนจนถึงน้ำตาลเข้มที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับครีเอตินินที่พบ



ภาพที่ 4.4 ชุดตรวจวัดปริมาณครีเอตินินเชิงปริมาณ ในช่วง 0-1,000 mg/dL

4.4 การทดสอบหาปริมาณอัลบูมินด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษ

ผลการทดสอบวัดระดับอัลบูมินกึ่งเชิงปริมาณ ได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตรการประดิษฐ์ “กรรมวิธีการผลิตชุดตรวจวัดระดับอัลบูมินแบบกระดาษ เลขที่คำขอ 2403001555 วันที่ยื่นคำขอ วันที่ 29 พ.ค. พ.ศ. 2567

การประดิษฐ์นี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อสร้างชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีนอัลบูมินเชิงคุณภาพและเชิงกึ่งปริมาณแบบกระดาษ สำหรับใช้ในการตรวจวัดสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่บ่งชี้ความเสี่ยงในการเกิดโรคไตเรื้อรังได้ ด้วยวิธีการที่รวดเร็ว สะดวก มีการใช้งานได้ง่าย ลดค่าใช้จ่าย และมีต้นทุนในการผลิตที่ราคาไม่สูง ทำให้ผู้บริโภคสามารถตรวจวัดได้ด้วยตนเอง โดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ กรรมวิธีการผลิตชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีนอัลบูมินแบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงกึ่งปริมาณ คือ การตรวจหาระดับอัลบูมินที่พบปริมาณน้อยในปัสสาวะเพื่อประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคไตเรื้อรังระยะแรกเริ่ม ที่มีความไวจำเพาะในการตรวจที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ให้ผลที่รวดเร็ว อ่านและแปลผลได้ง่ายจากการเทียบสี บอกระดับได้ ชุดตรวจตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วยชุดแผ่นทดสอบที่สามารถตรวจวัดระดับของสารบ่งชี้ทางชีวภาพโปรตีนอัลบูมินในเลือด และไม่โครอัลบูมินในปัสสาวะ โดยชุดตรวจประกอบด้วย ชุดแผ่นทดสอบ สามารถทำได้ 2 แบบ คือ ชุดแผ่นทดสอบแบบหยดและชุดแผ่นทดสอบแบบจุ่ม โดยใช้ชุดน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนอัลบูมิน

แบบที่ 1 ชุดแผ่นทดสอบแบบหยด โดยหยดชุดน้ำยาที่ผสมแล้ว จำนวน 1 หยด ลงบนจุดโซนทดสอบของแผ่นทดสอบ รอให้แห้ง อย่างน้อยเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ ซีรัม หรือ ปัสสาวะ จำนวน 1 หยด ลงบนจุดโซนทดสอบของแผ่นทดสอบ ทั้งไว้ให้แห้ง เป็นเวลา 1 นาที วัดระดับโปรตีนอัลบูมินในสารตัวอย่าง โดยอ่านผลด้วยตาเปล่า เทียบระดับสีจากระดับความเข้มของสี เขียวอมน้ำเงินจนถึงสีน้ำเงินเข้มที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับโปรตีนอัลบูมินที่พบ ดังภาพ

แบบที่ 2 ชุดแผ่นทดสอบแบบจุ่ม โดยออกแบบกระดาษกรองตัดเป็นกระดาษสี่เหลี่ยมจัตุรัสยึดติดด้วยแผ่นใสแถบยาว เพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารละลายที่ใช้ระหว่างการวิเคราะห์ จะได้ชุดแผ่นทดสอบแบบกระดาษที่สามารถทดสอบด้วยการจุ่ม ทำได้โดยจุ่มชุดกระดาษลงในชุดน้ำยาที่ผสมแล้วให้ท่วมแผ่น ทั้งไว้ให้แห้ง อย่างน้อยเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจุ่มลงในสารตัวอย่างปัสสาวะที่ต้องการทดสอบ ทั้งไว้ให้แห้ง เป็นเวลาอย่างน้อย 1 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า วัดระดับความเข้มของสีฟ้าน้ำเงินเข้มที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับโปรตีนอัลบูมินที่พบ ดังภาพ



ภาพที่ 4.5 ชุดทดสอบแบบหยดและการอ่านแปลผลของชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีนอัลบูมินเชิงกึ่งปริมาณ 0-300 mg/mL

4.5 ผลการทวนสอบประสิทธิภาพการใช้ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น และเปรียบเทียบผลกับค่าที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

4.5.1 ผลการทวนสอบประสิทธิภาพการใช้ชุดตรวจวัดระดับครีเอตินิน

ผลการศึกษาหาปริมาณครีเอตินินจากชุดทดสอบแบบกระดาษในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครโครงการ โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างซีรัมจำนวน 134 ราย และปัสสาวะจำนวน 103 ราย โดยกำหนดค่า Cut-off ของเกณฑ์การตรวจพบครีเอตินินอยู่ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ในการทดสอบตัวอย่างซีรัมซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างซีรัมที่มีครีเอตินินมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรจำนวน 81 ราย และกลุ่มที่มีซีรัมครีเอตินินน้อยกว่า 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรจำนวน 53 ราย ตรวจพบตัวอย่างซีรัมที่มีครีเอตินินมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรสอดคล้องกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติจำนวน 134 ราย โดยการทดสอบนี้มีความไวเท่ากับ 100 % ความแม่นยำเท่ากับ 60.45 % ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงประสิทธิภาพของความไว และความจำเพาะของการตรวจวัดครีเอตินินในซีรัมด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ

Serum Specimen		Clinical Chemistry Automatic PKL PPC 125		รวม
		ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	
Paper-based Creatinine	ตรวจพบ	81	53	134
	ตรวจไม่พบ	0	0	0
รวม		81	53	134

ในการทดสอบตัวอย่างปัสสาวะซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างปัสสาวะที่มีครีเอตินินจากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรจำนวน 103 ราย ซึ่งเมื่อนำมาตรวจหาครีเอตินินด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษ พบว่า ตัวอย่างปัสสาวะที่มีครีเอตินินมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรสอดคล้องกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติจำนวน 103 รายเช่นเดียวกัน โดยการทดสอบนี้มีความไวเท่ากับ 100 % ความจำเพาะเท่ากับ 100 % ความแม่นยำเท่ากับ 100 % ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงประสิทธิภาพของความไว และความจำเพาะของการตรวจวัดครีเอตินินในปัสสาวะด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ

Urine specimen		Clinical Chemistry Automatic PKL PPC 125		รวม
		ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	
Paper-based Creatinine	ตรวจพบ	103	0	103
	ตรวจไม่พบ	0	0	0
รวม		103	0	103

4.5.2 ผลการทวนสอบประสิทธิภาพการใช้ชุดตรวจวัดระดับอัลบูมิน

ผลความถูกต้อง (Accuracy) ในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินด้วยวิธีการตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน (control serum) ทั้งตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน Control normal และ Control pathogen ที่ทราบระดับความเข้มข้นของอัลบูมินที่แน่นอน ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง สามารถหาปริมาณอัลบูมินจากตัวอย่างมาตรฐานทั้งสองได้โดยนำค่าความเข้มข้นที่ได้แทนค่าลงในสมการเส้นตรง $y = 17.505x + 27.005$ ($R^2 = 0.9972$) จากกราฟมาตรฐานและนำค่าความเข้มข้นอัลบูมินที่วิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์หาค่าความถูกต้องแบบโดยตรง (Direct Accuracy) ซึ่งอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้วัดตัวอย่างซีรัมมาตรฐานปกติได้ 3.66 กรัมต่อเดซิลิตร เป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ 2.60 – 4.16 กรัมต่อเดซิลิตร (ค่าเฉลี่ย = 3.38 กรัมต่อเดซิลิตร) และวัดตัวอย่างซีรัมมาตรฐานผิดปกติได้ 8.10 กรัมต่อเดซิลิตร เป็นค่าที่ไม่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ 2.76 – 4.40 กรัมต่อเดซิลิตร (ค่าเฉลี่ย = 72 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)

ทำการทดสอบวัดปริมาณอัลบูมินจากชุดทดสอบแบบกระดาษในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครโครงการ โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างซีรัมจำนวน 134 ราย และปัสสาวะจำนวน 103 ราย โดยกำหนดค่า Cut-off ของเกณฑ์การตรวจพบอัลบูมินอยู่ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ในการทดสอบตัวอย่างซีรัมซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างซีรัมที่มีอัลบูมินมากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรจำนวน 134 ราย ซึ่งเมื่อนำมาตรวจหาอัลบูมินด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษ พบว่ามีตัวอย่างซีรัมที่มีอัลบูมินมากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรสอดคล้องกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติจำนวน 134 รายเช่นเดียวกัน โดยการทดสอบนี้มีความไวเท่ากับ 100 % ความจำเพาะเท่ากับ 100 % ความแม่นยำเท่ากับ 100 % ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพของความไว และความจำเพาะของการตรวจวัดอัลบูมินในซีรัมด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ

Serum specimen		Clinical Chemistry Automatic PKL PPC 125		รวม
		ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	
Paper-based Albumin	ตรวจพบ	134	0	134
	ตรวจไม่พบ	0	0	0
รวม		134	0	134

ในการทดสอบตัวอย่างปัสสาวะซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างปัสสาวะที่มีอัลบูมินมากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรจำนวน 101 ราย และตัวอย่างปัสสาวะที่มีอัลบูมินน้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรจำนวน 2 ราย ซึ่งเมื่อนำมาตรวจหาอัลบูมินด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษ พบว่ามีตัวอย่างซีรัมที่มีอัลบูมินมากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรสอดคล้องกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติจำนวน 31 ราย และมีผลที่ไม่สอดคล้องกันจำนวน 72 ราย โดยการทดสอบนี้มีความไวเท่ากับ 30.69 % ความจำเพาะเท่ากับ 100 % ความแม่นยำเท่ากับ 32.04 % ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพของความไว และความจำเพาะของการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะ ด้วยชุดทดสอบแบบกระดาษเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจากเครื่องตรวจวิเคราะห์หัตโนมิติ

Urine specimen		Clinical Chemistry Automatic PKL PPC 125		รวม
		ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	
Paper-based Albumin	ตรวจพบ	31	0	31
	ตรวจไม่พบ	70	2	72
รวม		101	2	103

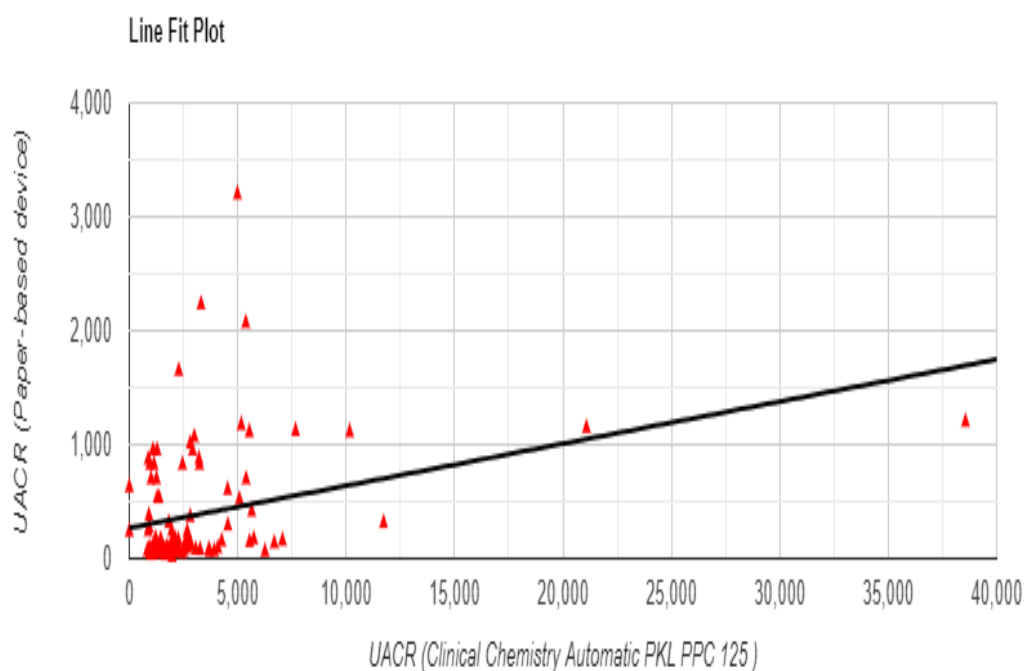
4.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ Paper-based test เทียบกับการตรวจวัด Urine Albumin-to-Creatinine Ratio (UACR) ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หัตโนมิติ

หาปริมาณครีเอตินินกับอัลบูมินจากชุดตรวจครีเอตินิน-อัลบูมินแบบกระดาษเปรียบเทียบกับเครื่องตรวจวิเคราะห์หัตโนมิติ โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะจากอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจำนวน 103 ราย นำค่าครีเอตินิน และอัลบูมินที่ได้มาคำนวณโดยใช้สูตรสำหรับหาค่า Urine albumin-to-creatinine ratio ดังนี้

$$\text{Urine albumin-to-creatinine ratio} = \frac{\text{Microalbumin in urine (mg)} \times 1000}{\text{Urine creatinine (g)}}$$

(ค่าปกติในผู้ใหญ่ < 30 mg albumin/g creatinine)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของครีเอตินินกับอัลบูมินในปัสสาวะที่ได้จากชุดทดสอบอัลบูมิน-ครีเอตินิน เปรียบเทียบกับอัตราส่วนของครีเอตินินกับอัลบูมินในปัสสาวะที่ได้จากเครื่องตรวจวิเคราะห์หัตโนมิติ พบว่า ค่า UACR ที่คำนวณได้จากทั้งสองวิธีการมีความสัมพันธ์ในลักษณะเป็นเส้นตรง ($r = 0.31, p < 0.05$) ซึ่งค่าของ UACR ที่คำนวณได้จากการอ่านด้วยตาเปล่าสอดคล้องกันกับค่า UACR ที่ได้จากเครื่องตรวจวิเคราะห์หัตโนมิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่แสดงให้เห็นว่า ชุดตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างจากการคิดคำนวณด้วยเครื่องวิเคราะห์หัตโนมิติ



ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของอัลบูมินต่อครีอะตินินในปัสสาวะ (UACR) จากชุดทดสอบแบบกระดาษกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ

4.6 อภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ ครีอะตินิน อัลบูมิน และ ยูเรีย โดยการใช้ชุดน้ำยาจากบริษัท Human มาทำการวิจัย ซึ่งทำการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ สร้างพื้นที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier) ด้วยวิธีพิมพ์ไข (wax printing)

จากการตรวจวัดครีอะตินินด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษจะต้องมีการศึกษาหาระยะเวลาการอ่านผลที่เหมาะสมของปฏิกิริยาเนื่องจากปฏิกิริยาของ Jeffé เป็นแบบ Kinetic assay ซึ่งในการทดลองจะทำการหยดหยดสารละลาย picric acid ความเข้มข้น 26 mmol/L ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้ง ลำดับถัดมา หยด NaOH ความเข้มข้น 1.6 mol/L ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และตามด้วยสารละลายครีอะตินินมาตรฐาน 2 ไมโครลิตรจากนั้นตั้งแต่นาทีที่ 5 ถึงนาทีที่ 60 ทำการสังเกตผลการทดสอบทุกๆ 5 นาที และจากผลการทดลองพบว่า นาทีที่ 40 เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการอ่านปฏิกิริยา

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ครีอะตินิน พบว่าความเข้มข้นที่ได้ขึ้นกับปริมาณของครีอะตินิน และให้เป็นเส้นตรงที่ 100-1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานคือ $y = 29.074x - 51.947$, $R^2 = 0.9952$ ($n = 3$) ค่าความสามารถในการทำซ้ำที่ความเข้มข้นของครีอะตินินที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 100, 600 และ 1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ให้ค่า %RSD คือ 14.22, 4.95 และ 3.48 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับได้ ส่วนการหาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) อยู่ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/dL และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) คือ 100 mg/dL

ผลการทดลองในการลงตัวอย่างปัสสาวะเพื่อการหาปริมาณครีเอตินิน พบว่า เมื่อนำไปวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์กึ่งอัตโนมัติ ให้ค่าคือ 137.85 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ส่วนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น เมื่อทำการเจือจาง 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาตรวจหาปริมาณครีเอตินินพบว่าให้ความเข้มข้นคือ 136.20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งสามารถคำนวณค่าความถูกต้อง (%Accuracy) ได้ 98.81% ส่วนการคำนวณค่าการกลับคืน (%Recovery) ได้ทำการเจือจางปัสสาวะเป็น 10 เท่า แล้วเติมสารครีเอตินินตามตารางที่ 3.2 พบว่า ให้ค่า %Recovery คือ 106.36%, 72.73% และ 86.54% จะเห็นได้ว่าค่า %Accuracy และ %Recovery อยู่ในช่วงยอมรับได้ ซึ่งมากกว่า 80 % และสาเหตุที่เกิดการคลาดเคลื่อนอาจเกิดจากในปัสสาวะอาจมีสารที่รบกวนปฏิกิริยาในการตรวจวัด เช่น คีโตน กลูโคส โปรตีน วิตามินซี และยาบางชนิด (cephalosporins) ซึ่งส่งผลให้ค่าความเข้มข้นอาจลดลงได้ ดังนั้นในการลงตัวอย่างควรมีการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ หรือทำการปั่นตกเพื่อให้สารรบกวนปฏิกิริยาลดลงไป

จากการทดลองการตรวจวัดอัลบูมิน โดยหยดสารละลายลงไปยังบริเวณทดสอบ ในลำดับแรกหยดรีเอเจนต์ ปริมาตร 2.00 ไมโครลิตร และหยดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00, 15.00 และ 20.00 กรัมต่อเดซิลิตร ปริมาตร 2.00 ไมโครลิตร วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เมื่อสารละลายแห้งแล้วนำอุปกรณ์ไปสแกนภาพแล้ววิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ Image J พบว่าความเข้มสีที่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณอัลบูมิน เมื่อปริมาณเพิ่มขึ้นสัญญาณที่ได้จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และพลอตกราฟซึ่งให้ความเป็นเส้นตรงที่ 0.039 -20.00 กรัมต่อเดซิลิตร และสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานคือ $y = 17.505x + 27.005$ ($R^2=0.9972$) ($n=3$) ค่าความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารละลายอัลบูมินมาตรฐาน โดยจะศึกษาในช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 0.078, 2.50 และ 20.00 กรัมต่อเดซิลิตร วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation,%RSD) เท่ากับ 4.64, 3.65 และ 1.32 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับได้คือน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณของการวิเคราะห์อัลบูมิน โดยนำสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์อัลบูมินความเข้มข้น 0 กรัมต่อเดซิลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) อยู่ที่ความเข้มข้นคือ 1.26 กรัมต่อเดซิลิตร และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) คือ 2.18 กรัมต่อเดซิลิตร

จากนั้นจะทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่ตรวจวัด (Accuracy) โดยใช้ตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน (control serum) ทั้งตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน Control normal และ Control pathogen ที่ระบุความเข้มข้นของอัลบูมินที่แน่นอน ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง พบว่า ตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน Control normal มีค่า Accuracy เท่ากับ 96.45 เปอร์เซ็นต์ และมี Control pathogen ค่า Accuracy เท่ากับ 26.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหลุดช่วงค่าที่ยอมรับได้ เนื่องจากใน Control pathogen น่าจะมีสารรบกวนส่งผลให้ค่าความเข้มสีที่ตรวจวัดได้มีค่ามากกว่าความเป็นจริง

จากการทดลองลำดับการใส่น้ำยารีเอเจนต์ของยูเรีย พบว่าลำดับการใส่น้ำยารีเอเจนต์ 1 ตามด้วยสารที่ต้องการทดสอบ (S) และสุดท้ายใส่น้ำยารีเอเจนต์ 2 (R1:R2:S) เป็นลำดับการใส่ที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา เนื่องจากน้ำยารีเอเจนต์ 1 มี pH เท่ากับ 7 และมีองค์ประกอบ urease ผสมอยู่ ซึ่ง urease สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7 แต่ถ้าหากทำการผสมน้ำยารีเอเจนต์ 1 กับน้ำยารีเอเจนต์ 2 ก่อนใส่ตัวอย่าง จะทำให้ pH ไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของ urease จึงทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยา หรือการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น ที่ลำดับการใส่น้ำยารีเอเจนต์ 1 ตามด้วย น้ำยารีเอเจนต์ 2 และสุดท้ายใส่สารที่ต้องการทดสอบ (S) (R1:S:R2)

จากการทดลองการตรวจวัดยูเรีย ในสัดส่วนน้ำยารีโอเจนต์ 1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ ตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร และตามด้วยน้ำยารีโอเจนต์ 2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาเป็น ระยะเวลา 10 นาที เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากค่าของ Control normal ที่มีความเข้มข้น ยูเรียเฉลี่ยอยู่ที่ 29.2 ไมโครลิตร มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับยูเรียมาตรฐาน 30 mg/dL มากที่สุด ส่วน สัดส่วน R1:S:R2 อื่นๆ ไม่ว่าจะเป็น 5:1:5 และ 10:1:10 Control normal จะให้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า ยูเรียมาตรฐาน โดยที่สัดส่วน 5:1:5 ให้ความเข้มข้นที่สูงที่สุด รองลงมาคือสัดส่วน 10:1:10 และที่ใกล้ที่สุดคือ 20:1:20 แสดงให้เห็นว่า ยิ่งปริมาณน้ำยารีโอเจนต์มากขึ้นยิ่งมีความใกล้เคียงมากยิ่งขึ้น และหลุมกระดาศ สามารถรับปริมาตรได้มากที่สุดประมาณ 40 ไมโครลิตร น้ำยารีโอเจนต์และตัวอย่างที่มีสัดส่วน 20:1:20 เหมาะสมในการตรวจวัดมากที่สุด ส่วนการศึกษาความเป็นเส้นตรง พบว่าค่าความเข้มข้นที่ได้แปรผันตรงกับ ปริมาณยูเรียในตัวอย่าง ให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ 7.8-500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร สมการเส้นตรงที่ได้จาก กราฟมาตรฐาน คือ $y = 34.074x - 18.252$, $R^2 = 0.9917$ ($n=3$) และค่าความสามารถในการทำซ้ำแบบ intermediate precision ที่ความเข้มข้นของยูเรียที่อยู่ในช่วงของความเป็นเส้นตรง คือ 500, 62.5 และ 7.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.10, 1.94 และ 2.44 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับได้คือน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าค่าขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ความ เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และขีดจำกัดการหาปริมาณอยู่ที่ความเข้มข้น 1.11 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

จากนั้นจะทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่ตรวจวัด (Accuracy) โดยค่าเป้าหมายของความ ถูกต้องนี้ ต้องมีค่ามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะสามารถยอมรับได้มีการวิเคราะห์กับซีรัมมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด ดังนี้ ค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของการโดยใช้ตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน Control normal มีค่า Accuracy เท่ากับ 99.73 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน Control pathogen มีค่า Accuracy เท่ากับ 79.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหลุดจากช่วงค่าที่ยอมรับได้ เนื่องจากใน Control pathogen น่าจะมีสาร รบกวนจึงทำให้รบกวนการเกิดสี ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นต่ำลง และจากการศึกษาพบว่าในงานวิจัยนี้ผลการ ทดลองของการวิเคราะห์ค่ายูเรียมีความถูกต้องและมีความจำเพาะมากขึ้นอีกทั้งค่าความเข้มข้นที่สามารถ ตรวจวัดได้มีค่าต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kumar และคณะ

ผลการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะ 105 ราย เปรียบเทียบผลระหว่างชุดตรวจวัดบนกระดาศที่ พัฒนาขึ้นกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้ในโรงพยาบาลตามวิธีมาตรฐานและประเมิน ประสิทธิภาพและทวนสอบผลของการทดสอบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปัสสาวะ แปลผลผ่านโปรแกรมคำนวณ แสดงให้เห็นว่า การอ่านค่าระดับจากชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นเพื่ออ่านค่า UACR ไม่แตกต่างกัน และมีความ เป็นไปได้ในการนำมาใช้งานจริงเพื่อประเมินระดับกลุ่มเสี่ยงโรคไตในผู้ป่วยเบาหวานตามวัตถุประสงค์ของ โครงการ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและสร้างชุดตรวจวัดครีเอตินินและอัลบูมินบนกระดาษที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์และแปลผลของค่า UACR กับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้ในโรงพยาบาลตามวิธีมาตรฐาน ประเมินประสิทธิภาพและทวนสอบผลของการทดสอบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปัสสาวะแปลผลผ่านโปรแกรมคำนวณเพื่อเปรียบเทียบการแปลผลและความเป็นไปได้ในการใช้งานจริงเพื่อประเมินนำมาใช้กลุ่มเสี่ยงโรคไตในผู้ป่วยเบาหวาน

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการวิจัยพบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ ครีเอตินิน ได้ระยะเวลา 40 นาที ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 100-1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ส่วนการหาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) อยู่ที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) คือ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และการทดสอบในการลงตัวอย่างปัสสาวะพบว่า ให้ความถูกต้อง (% Accuracy) ที่ 98.81% และค่าการกลับคืน (%Recovery) คือ 106.36%, 72.73% และ 86.54%

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์อัลบูมินได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากอุปกรณ์นี้มีความเที่ยงสูง สามารถทำซ้ำได้ สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานคือ $y = 17.505x + 27.005$ ($R^2=0.9972$) ($n=3$) LOD เท่ากับ 1.26 g/dL และ LOQ เท่ากับ 2.18 g/dL ส่วนการทดสอบการในการลงตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน Control normal ให้ความถูกต้อง (%Accuracy) ที่ 96.45 %

ชุดตรวจวัดปริมาณครีเอตินินและอัลบูมินแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงกึ่งปริมาณจากการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มสี เพื่อบอกระดับครีเอตินินและโปรตีนอัลบูมินที่พบในเลือดและปัสสาวะ ในการตรวจที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ตามแผ่น chat สี ระดับที่กำหนด ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยตัวเองและให้ผลภายใน 15-30 นาที ให้ผลที่รวดเร็ว อ่านและแปลผลได้ง่ายจากการเทียบสีบอกระดับได้ ซึ่งชุดตรวจนี้สามารถใช้ตรวจทั้งครีเอตินินไปพร้อมกับระดับโปรตีนอัลบูมินจากการใช้ตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อเทียบอัตราส่วนโปรตีนอัลบูมินต่อครีเอตินิน (urine albumin creatinine ratio) ที่ได้ผ่านการใช้โปรแกรมคำนวณตามที่กำหนด ในการนำมาใช้ประเมินความเสี่ยงในผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนผิดปกติทางไต ในผู้ป่วยโรคไตระยะแรกเริ่มทั้งในกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นกลุ่มเสี่ยงหลัก ที่ให้ประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ได้จริง ลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ สามารถนำไปตรวจวัดภาคสนามหรือตรวจประเมินความเสี่ยงได้ด้วยตัวเอง Point of Care Testing ได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการตรวจหาปริมาณครีอะตินิน ใช้เวลาค่อนข้างมาก คือ 40 นาที อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของสารละลาย Picric acid และ NaOH ที่ได้จากชุดน้ำยาของบริษัท อาจไม่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้สำหรับการตรวจด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษ ดังนั้น ในการวิจัยครั้งต่อไป อาจจะต้องมีการเตรียมสารละลาย Picric acid และ NaOH ด้วยตนเอง หรืออาจจะมีการเติมสารหยุดปฏิกิริยา (stop reaction) เพื่อไม่ให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปได้ และเนื่องจากสังเกตได้ว่าการกระจายของสีมีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอบริเวณที่ทดสอบ ดังนั้นควรจะต้องมีการดัดแปลงพื้นผิวบริเวณที่ทดสอบ (modified surface) และควรจะมีการศึกษาสารที่สามารถรบกวนปฏิกิริยา ซึ่งจะทำให้ผลการทดลองมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

เนื่องจากอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการตรวจหาปริมาณอัลบูมิน พบว่าเมื่อทำการทดสอบจะให้สีที่มีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอบนบริเวณที่ทดสอบ ซึ่งอาจส่งผลต่อการตรวจวัดได้ ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไป ควรจะมีการศึกษาสารที่สามารถตรึงอนุภาคของสีให้กระจายอย่างสม่ำเสมอบนบริเวณที่ทดสอบได้ เช่น PEC และ APTES เป็นต้น เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการตรวจวัดสัญญาณความเข้มสี

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการตรวจหาปริมาณครีอะตินิน อัลบูมิน และยูเรียในการศึกษานี้ยังเป็นการศึกษาการตรวจวัดแบบแยกหลุมตรวจ แยกกระดาษ สัดส่วนในการหยดตัวอย่าง และชนิดตัวอย่างที่ใช้ตรวจมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาในอนาคตควรมีการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการตรวจหาปริมาณครีอะตินิน อัลบูมิน ยูเรียที่อยู่ในกระดาษแผ่นเดียวกัน และสามารถทดสอบการหาปริมาณของสารทั้ง 3 ชนิดได้เพียงแค่หยดสารตัวอย่างเพียงครั้งเดียวในสัดส่วนสถานะที่เหมาะสมกับทั้ง 3 การทดสอบ จะทำให้ผลการตรวจมีความรวดเร็ว และสะดวกในการใช้งานมากยิ่งขึ้น ถ้าหากพัฒนาอุปกรณ์ได้สำเร็จและนำไปใช้ในการตรวจทางคลินิกได้จริง จะทำให้ลดค่าใช้จ่ายของการตรวจตรวจพบโรคตั้งแต่ระยะแรกๆ และรักษาได้อย่างทันท่วงที อีกทั้งผู้ป่วยยังสามารถเข้าถึงการตรวจได้ง่ายอีกด้วย

บรรณานุกรม

- Apilux, A., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Prachayasittikul, V., Tantimongcolwat, T. Paper-based Acetylcholinesterase Inhibition Assay Combining a Wet System for Organophosphate and Carbamate Pesticides Detection. *Experimental and Clinical Sciences*. 2015; 14:307-309
- Bishop ML, Fody EP, Siclen CV., Mistler JM. *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations*. 9th ed. Philadelphia: Jones & Bartlett, 2022.
- Belouafa S., Habti F., Saïd Benhar S., Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. *Int. J. Metrol. Qual. Eng.* 2017, 8, 1-8
- Carrilho E, Martinez A.W, Whitesides G.M. Understanding Wax Printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics 2009; 81: 7091-7095.
- Chauhan A., Mittu B., Chauhan P. Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. *J. Anal. Bioanal. Tech.*, 2015, 6: 100-233.
- Cogan D, Cleary J, Fay C, Rickard A, Jankowski K, Phelan T, Bowkett M, Diamond D. The development of an autonomous sensing platform for the monitoring of ammonia in water using a simplified Berthelot method, *Analytical methods*. 2014 ;6, 7606-7614
- De Corcuera, J. I. R., Cavalieri, R. P. Biosensors. In *Encyclopedia of agricultural, food, and biological engineering*, 2003; pp. 119-123
- Jagadeesan, K. K., Kumar, S., Sumana, G. Application of conducting paper for selective detection of troponin. *Electrochemistry Communications*, 2012 20(0): 71-74
- Kaplan LA. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. 5th ed. Missouri: Elsevier, 2020.
- Kumar H ,Kumar A, Kumari P,N.B.Tulsani . A test strip for the estimation of Urea in serum . *Indian Journal of Clinical Biochemistry* ,2000 ;15(2):124-127
- Ligler, F. S., Sapsford, K. E., Golden, J. P., Shriver-Lake, L. C., Taitt, C. R., Dyer, M. A., Barone, S., Myatt, C. J. The Array Biosensor: Portable, Automated Systems. *Analytical Sciences*, 2007; 23(1): 5-10.
- Magnusson B., Ornemark, U., 2014, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed., <https://www.eurachem.org/index.php/mnu-tsk-mv>
- Mascini, M., Tombelli, S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. *Biomarkers* ,2008; 13(7-8): 637- 657
- Nigon DL. *Clinical Laboratory management: Leadership Principles for the 21st century*. New York: McGraw-Hill, 2000.
- Sharma, K.S, Bala M, Tulsani .B.N, Sehgal N, Kumar A. Albumin test strip for quick detection of albuminuria in human .*Indian Journal of Chemical Technology*, 2002;9:496-498

Sittiwong J ,Unob F .Paper-based Platform for Urinary Creatinine Detection. Analytical science. 2016; 32:639-643

การตรวจ Albumin (อัลบูมิน) ในเลือด .[ออนไลน์] : เข้าถึงได้จาก : <https://medthai.com/%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8> .(วันที่สืบค้นข้อมูล 11 ตุลาคม 2561)

ณรงค์ อภิกุลวณิช. กรมการแพทย์ชี้พบผู้ป่วย โรคไตเรื้อรัง 8 ล้านคนแนะประชาชนดูแลไตให้แข็งแรง. [ออนไลน์] : เข้าถึงได้จาก : www.prold.moph.go.th/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew (วันที่สืบค้นข้อมูล : 11 ตุลาคม 2561)

นพวัฒน์ เพ็ญคำศรี. (2560). การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม. [ออนไลน์]; เข้าถึงได้จาก: ccpe.pharmacycouncil.org/showfile (วันที่ค้นข้อมูล: 11 ตุลาคม 2561).

นิรมล ธรรมวิริยสติ. (2559). การประเมินคุณภาพคุณสมบัติของการตรวจวิเคราะห์ (Method validation). ใน: คู่มือวิชาชีพปฏิบัติการเคมีคลินิก 2 (682334). หน้า 1-11.

วิสุทธิ กังวานตระกูล. (2554). Analytical Method Evaluation. [ออนไลน์]; เข้าถึงได้จาก: <https://home.kku.ac.th/wiskun/462313/AMEv54.pdf> (วันที่ค้นข้อมูล: 11 ตุลาคม 2561)

วิกุล วีรานูวัตต์ . เคมีคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เวชสาร; 2525

วีรวรรณ เล็กสกุลไชย .ตำราพยาธิวิทยาการตรวจสารเคมีในเลือดและสิ่งส่งตรวจ.สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ;2555

สุธาทิพย์ พิชญ์ไพบุลย์. “การแปลผลห้องปฏิบัติการสำหรับเภสัชกร.” ใน : การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ. หน้า 7-56 . กรุงเทพฯ : เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2544.