

การพัฒนาระบบตรวจวัดแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะเพื่อการคัดกรองโรคนิ่วไต



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF CALCIUM OXALATE MEASUREMENT SYSTEM IN URINE FOR KIDNEY
STONE DISEASE SCREENING



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biomedical Engineering

Common Course

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาแบบตรวจวัดแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะ เพื่อการคัดกรองโรคนิ่วไต
โดย	นายพิชิตต์ม์ ฤกษ์นันทน์
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ภาคภูมิ สมบูรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาภรณ์ อีรัมย์คลรัศมี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ภาคภูมิ สมบูรณ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. เทคนิคการแพทย์หญิงวัชรีย์ บุญลือ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิศาล พัฒน์ชู)

พิชญุตม์ ฤกษ์นันท์ : การพัฒนาระบบตรวจวัดแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะเพื่อการคัดกรองโรคนิ่วไต. (DEVELOPMENT OF CALCIUM OXALATE MEASUREMENT SYSTEM IN URINE FOR KIDNEY STONE DISEASE SCREENING) อ.ที่ปรึกษาหลัก :
อ. ดร.ภาคภูมิ สมบูรณ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.ชาญชัย บุญหล้า

วิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการพัฒนาระบบตรวจคัดกรองผู้ที่มีโอกาสเสี่ยงต่อโรคนิ่วไต (Kidney stone disease) โดยใช้วิธี Indole Calcium Oxalate Crystallization Index : iCOCI ซึ่งเป็นการตรวจวัดความเข้มข้นที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างออกซาเลตในปัสสาวะกับสาร Indole reagent โดยได้ทำการศึกษาลงตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวัดเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของวิธี iCOCI ซึ่งพบว่าสามารถลดเวลาในขั้นตอนการบ่มปัสสาวะได้เหลือเพียง 10 นาที และการใช้ Indole reagent ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml สามารถให้ความแยกชัดในการตรวจคัดกรองได้สูงที่สุด จากนั้นได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจคัดกรองโดยนำตัวอย่างปัสสาวะของกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มละ 60 ตัวอย่างมาทำการตรวจวัดโดยใช้วิธี iCOCI ร่วมกับระบบวัดทางแสงที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เซนเซอร์อาร์เรย์ที่ตอบสนองต่อแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ซึ่งพบว่าการใช้ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 600 nm จะสามารถให้ประสิทธิภาพของการตรวจคัดกรองได้สูงสุดคือได้ค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจคัดกรองมากกว่า 70% ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปใช้งานเพื่อตรวจคัดกรองในทางคลินิก นอกจากนี้ยังได้ทำการพัฒนาระบบผสมและนำส่งสาร และระบบแปลและแสดงผลการตรวจคัดกรองเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาเป็นระบบแบบอัตโนมัติโดยใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์ในการควบคุม ซึ่งจากการทดสอบพบว่าระบบทั้งหมดที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดที่ใกล้เคียงกับการนำไปใช้งานจริงนอกสถานพยาบาลได้อย่างเหมาะสม จึงทำให้มีความเป็นไปได้ในการนำระบบที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในการตรวจคัดกรองโรคนิ่วไตแบบไม่รุกราน (Non-invasive) ได้ต่อไป

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5970368721 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORD: Kidney stone disease, Calcium oxalate, iCOCI, Screening, sensor array

Pichayut Rerkshanandana : DEVELOPMENT OF CALCIUM OXALATE MEASUREMENT SYSTEM IN URINE FOR KIDNEY STONE DISEASE SCREENING.

Advisor: Pakpum Somboon, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. CHANCHAI BOONLA

This study has developed the measurement system for Kidney stone disease screening based on an Indole-reacted Calcium Oxalate Crystallization Index (iCOCI), which the change in color intensity affected by reactions between oxalate in urine and Indole reagent can be measured. We have studied various measurement parameters in order to improve the efficiency of the iCOCI method. We have found that the incubation time can be minimized to 10 minutes and the Indole reagent at a concentration of 2.5 mg/ml provides the highest sensitivity and specificity of the screening test. After that, the efficiency of the developed screening test was examined by measuring urine samples of healthy people (n=60) and kidney stones group (n=60) using the iCOCI method together with a developed optical measurement system based on a multi-wavelength sensor array. It was found that using the light absorbance value of the sample at a wavelength of 600 nm can provide the highest screening efficiency which its sensitivity and specificity are both more than 70%. This obtained efficiency might be sufficient for clinical practice. Moreover, the solution mixing and delivery system together with the display screen were developed to express the possibility of developing the whole system into an automated system controlled by microcontroller (MCU). From the tests, it was found that all developed systems could be used in measurements that imitated the actual field test outside the hospital. Therefore, it is possible to use this developed system for screening kidney disease as the optional non-invasive method.

Field of Study: Biomedical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ภาคภูมิ สมบูรณ์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก วิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ในเรื่องด้านวิชาการ การใช้ชีวิตและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนการแก้ไขปรับปรุงงานวิจัยฉบับนี้ให้ สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาภรณ์ ธีรมงคลรัศมี ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ทนพญ.วัชรีย์ บุญลือ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิศาล พัฒน์ชู ที่กรุณาเป็น กรรมการและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมถึงความผิดพลาดต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับ นี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิศวกรรมชีวเวช ภาควิศวกรรมไฟฟ้า รวมถึง เจ้าหน้าที่คณะแพทยศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและให้ความกรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ รวมถึง อำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในการทำการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ พี่น้อง ภาควิศวกรรมชีวเวช ภาควิศวกรรมไฟฟ้า และสมาชิก CB Lab 806 ทุกคนที่ให้คำปรึกษา ให้การสนับสนุนในทุกอย่างตลอดมา รวมถึงเป็นกำลังใจในการทำ วิทยานิพนธ์มาโดยตลอด จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และน้อง ผู้ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา และให้ความ ช่วยเหลือเสมอมา รวมถึงเป็นแรงผลักดันจนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายบุคคลที่ข้าพเจ้าไม่ได้กล่าวถึงและมีส่วนร่วมในความสำเร็จในครั้งนี้ ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณบุคคลเหล่านั้นไว้ ณ ที่นี้ด้วย

พิชยุตม์ ฤกษ์นันท์

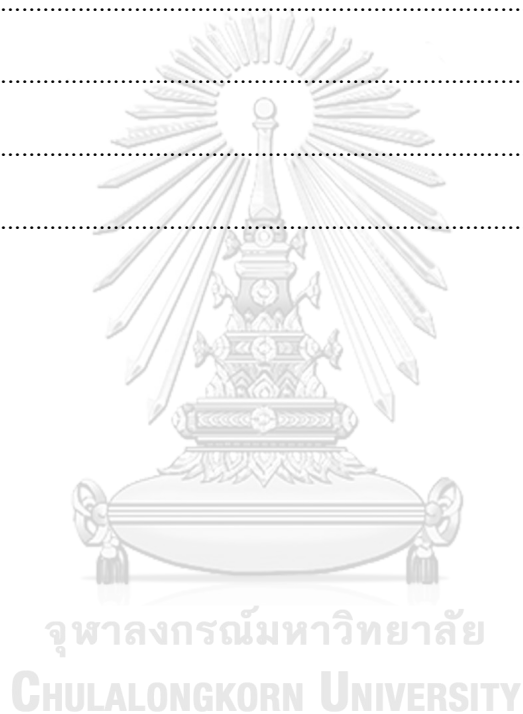
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
สารบัญตาราง.....	12
สารบัญภาพ.....	14
บทที่ 1 บทนำ.....	17
1.1) ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	17
1.2) วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	19
1.3) ขอบเขตของงานวิจัย.....	19
1.4) ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	20
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
2.1) โรคนิวไท.....	21
2.1.1) โครงสร้างของไต.....	21
2.1.2) สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิวไท.....	22
2.1.3) กลไกการเกิดนิวไท.....	23
2.1.4) ชนิดของก้อนนิวไท.....	23
2.1.5) การรักษาและตรวจสอบโรคนิวไท.....	24
2.1.5.1) กรณีก้อนนิวไทมีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร.....	24

2.1.5.2) กรณีก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่เกินไม่สามารถจะหลุดออกมาได้เอง	24
2.2) การตรวจคัดกรองโรค (Screening Test)	27
2.2.1) Sriboonlue’s indirect method	27
2.2.2) Bonn-risk Index (BRI).....	28
2.2.3) Calcium Oxalate Crystallization Index (COCI).....	28
2.2.4) Indole-reacted Calcium Oxalate Crystallization Index (iCOCI).....	29
2.3) แนวทางการประเมินประสิทธิภาพของวิธีตรวจคัดกรองผู้ที่มีความเสี่ยง	30
2.3.1) 2x2 table.....	31
2.3.2) Receiver Operating Characteristic (ROC) Curves	32
2.4) ระบบตรวจวัดแคลเซียมออกซาลาเต	33
2.4.1) ระบบผสมและนำส่งสาร	33
2.4.1.1) ป้อนโรตารีแบบเกียร์	34
2.4.2) ระบบวัดแสง.....	34
บทที่ 3 วัสดุและแผนผังการดำเนินงานวิจัย	40
3.1) วัสดุและสารเคมี	40
3.2) อุปกรณ์และเครื่องมือ	41
3.3) แผนผังการดำเนินงาน	43
3.4) การวิเคราะห์ทางสถิติ	44
3.5) สถานที่ดำเนินงานวิจัย	44
บทที่ 4 กระบวนการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง	45
4.1) การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ	45
4.1.1) กลุ่มประชากรเป้าหมาย	45
4.1.2) กลุ่มประชากรควบคุม.....	45
(Healthy controls).....	45

4.2) การทดสอบด้วยวิธี COCI (แบบเดิม).....	45
4.3) การทดสอบความถูกต้องของการวัดด้วยอุปกรณ์มาตรฐาน	47
4.3.1) การปรับเปลี่ยนเครื่องมือตรวจวัดมาตรฐาน.....	47
4.3.1.1) การวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Nanodrop.....	47
4.3.1.2) การเปรียบเทียบความคลาดเคลื่อนของเครื่องวัด Nanodrop	48
4.3.1.3) การใช้เครื่อง GENESYS ในการวัด Absorbance.....	50
4.3.1.4) การเปรียบเทียบความคลาดเคลื่อนของเครื่องวัด Nanodrop และ GENESYS	50
4.3.1.5) การทดสอบด้วย Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR).....	52
4.4) การศึกษาตัวแปรที่มีผลกระทบต่อการใช้วิธี COCI.....	56
4.4.1) การศึกษาผลกระทบของ Incubation Time.....	57
4.4.2) การศึกษาผลกระทบของความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ(pH)	57
4.4.3) การศึกษาผลกระทบของปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ	59
4.5) การพัฒนาวิธี iCOCI	60
4.5.1) การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน COM ที่เหมาะสมต่อการใช้งานกับเครื่องมือวัด	63
4.5.2) การหาความเข้มข้น indole reagent ที่เหมาะสมต่อการเตรียมสารละลายมาตรฐาน	64
4.5.3) การทดสอบวัดปริมาณออกซาเลตกับตัวอย่างปัสสาวะจริง.....	68
4.5.4) ความเสถียรของ Indole reagent.....	70
4.6) การทดสอบเปรียบเทียบระบบวัดแสงต้นแบบกับเครื่องมือวัดมาตรฐาน.....	73
4.7) ผลการวัด COCI, iCOCI ด้วยระบบมาตรฐาน และ iCOCI ด้วยระบบวัดต้นแบบที่พัฒนาขึ้น	76
กับชุดฝึก 60 ตัวอย่าง และชุดทดสอบ 60 ตัวอย่าง	76
4.8) การพัฒนาระบบวัดเพื่อการทำงานแบบอัตโนมัติ.....	78
4.8.1) ระบบวัดแสง.....	81

4.8.1.1) การทดสอบระบบวัดแสงเบื้องต้น.....	85
4.8.2) ระบบผสมและนำส่งสาร.....	88
4.8.2.1) การทดสอบระบบผสมแบะนำส่งสาร.....	91
4.8.3) การแสดงผล.....	92
4.8.4) การทดสอบวัดเพื่อคัดกรองตัวอย่างปัสสาวะ.....	94
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะเบื้องต้น.....	95
5.1 สรุปผล.....	95
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	96
บรรณานุกรม.....	97
ประวัติผู้เขียน.....	100



สารบัญตาราง

หน้า

No table of figures entries found.



สารบัญรูปภาพ

หน้า

No table of figures entries found.



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงสรุปข้อดีและข้อด้อยของวิธีการตรวจคัดกรองปัสสาวะสำหรับโรคนี้่วไต	29
ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติของเซนเซอร์แสง AS7262.....	38
ตารางที่ 3 แสดงค่า Average, SD และ CV (Coefficient of variation) รวมของค่า OD สารละลาย	49
ตารางที่ 4 แสดงค่า Average, SD และ CV (Coefficient of variation) รวมของค่า OD ของ สารละลายมาตรฐานออกซาเลต (ใช้อุปกรณ์วัดของคณะวิศวกรรมศาสตร์)	49
ตารางที่ 5 แสดงค่า Average, SD และ CV ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตจากเครื่องGENESYS	51
ตารางที่ 6 แสดงค่า Average และCV ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตจากเครื่อง GENESYS จากการทำการทดลองซ้ำ 3 รอบ.....	51
ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างปัสสาวะที่ผ่านการปรับ pH.....	58
ตารางที่ 8 แสดงผลของปริมาณโปรตีน HSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อค่า COCI ที่ได้	60
ตารางที่ 9 แสดงการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน COM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (± 10 , 20% จากค่า cut-off)	64
ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน COM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (± 5 , 10% จากค่า cut-off)	65
ตารางที่ 11 แสดงการเลือกตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่า COCI ใกล้เคียงกับค่า cut-off.....	68
ตารางที่ 12 แสดงผลจากการวัดความเสถียรของ Indole reagent ภายใน 1 วัน	70
ตารางที่ 13 แสดงผลการหาค่า cut-off และค่าความแม่นยำของวิธีวัด iCOCI ของกลุ่มชุดฝึกที่ได้จากการสุ่ม โดยวัดผ่านเครื่องมือมาตรฐานและระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น.....	77
ตารางที่ 14 แสดงผลการหาค่า cut-off และค่าความแม่นยำของวิธีวัด iCOCI ของกลุ่มชุดทดสอบที่ เหลือจากการสุ่ม โดยวัดผ่านเครื่องมือมาตรฐานและระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น.....	78
ตารางที่ 15 แสดงค่าที่วัดได้จากเครื่องวัดแสง ผ่านโปรแกรม Aduino	85

ตารางที่ 16 แสดงการควบคุมทิศทางของปั๊ม.....	89
ตารางที่ 17 แสดงคุณสมบัติของโมดูล I ² C LCD	93



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างภายในของไตและนิ่วไต	22
รูปที่ 2 ลักษณะการเกิดโรคนิ่วไต.....	23
รูปที่ 3 ก้อนนิ่วชนิดต่าง ๆ ที่พบมากในผู้ป่วยโรคนิ่วไต.....	24
รูปที่ 4 แสดงการสลายนิ่วโดยใช้คลื่นความถี่สูง	25
รูปที่ 5 แสดงการกำจัดนิ่วโดยการใช้ Nephroscope.....	26
รูปที่ 6 แสดงการกำจัดนิ่วด้วยวิธี Ureteroscopic stone removal (URS).....	26
รูปที่ 7 แสดงการคำนวณค่าคาดหวังด้วย 2x2 table	31
รูปที่ 8 แสดงกราฟ Sensitivity Specificity และ Accuracy	31
รูปที่ 9 แสดงกราฟ Receiver Operator Characteristic (ROC) Curve	33
รูปที่ 10 ปี่มโรตารีแบบเกียร์.....	34
รูปที่ 11 การเกิดอันตรกิริยาของสารเคมีกับการแผ่รังสีของแสง	36
รูปที่ 12 แสดงช่วงสีที่เซนเซอร์แสงตอบสนอง	37
รูปที่ 13 แสดงรูปเซนเซอร์แสง AS7262	38
รูปที่ 14 ภาพรวมวงจรแปลและแสดงผล.....	39
รูปที่ 15 แผนผังการดำเนินงานวิจัย.....	43
รูปที่ 16 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรต.....	46
รูปที่ 17 แสดงค่า OD ที่วัดได้จากเครื่อง Nanodrop 2000c spectrophotometer.....	48
รูปที่ 18 แสดงเครื่อง Nanodrop 2000c spectrophotometer.....	48
รูปที่ 19 แสดงเครื่อง GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer.....	50
รูปที่ 20 แสดงเครื่อง Nicolet FT-IR spectrometer.....	52
รูปที่ 21 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ก้อนนิ่วชนิด CaOx ด้วยวิธี FTIR.....	53
รูปที่ 22 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ก้อนนิ่วชนิด CaP ด้วยวิธี FTIR.....	53

รูปที่ 23 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ก๊อนนิวชนิด CaOx+CaP ด้วยวิธี FTIR.....	54
รูปที่ 24 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ก๊อนนิวชนิด Uric acid ด้วยวิธี FTIR.....	54
รูปที่ 25 แสดงโปรแกรม GraphPad Prism 5.01 สำหรับวิเคราะห์ ROC curve.....	55
รูปที่ 26 แสดงกราฟ ROC curve ของกลุ่มผู้ป่วยที่มีตัวอย่างก๊อนนิวชนิดที่มี CaOx / CaP เป็นส่วนประกอบหลัก.....	55
รูปที่ 27 แสดงผลการวิเคราะห์ ค่า Sensitivity Specificity และ ค่า cut-off จาก ROC curve	56
รูปที่ 28 แสดงผลการทดสอบเปรียบเทียบเวลาในการบ่มระหว่างน้ำกลั่นกับตัวอย่างปัสสาวะจริง...	57
รูปที่ 29 แสดงการปรับค่า pH ของปัสสาวะด้วย HCL	59
รูปที่ 30 แสดงขั้นตอนการวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตด้วยวิธี iCOCl ตามลำดับ.....	62
รูปที่ 31 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐาน COM ที่ทดสอบด้วย indole reagent เข้มข้น 1 mg/ml	63
รูปที่ 32 แสดงกราฟ a) ผลจากการวัดด้วยเครื่อง GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer และ b) Microplate Multiskan GO ที่ความยาวคลื่น 530 nm.....	64
รูปที่ 33 แสดงกราฟผลการทดสอบ indole reagent ที่ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 mg/ml.....	65
รูปที่ 34 แสดงการหาค่า cut-off ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.01 ของเครื่องมือมาตรฐาน (GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer)	66
รูปที่ 35 แสดงผลการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของ Indole reagent ที่เหมาะสมกับเครื่องมือวัดมาตรฐาน GENESYS	67
รูปที่ 36 แสดงผลการทดสอบ iCOCl กับตัวอย่างปัสสาวะจริง	69
รูปที่ 37 แสดงกราฟผลจากการทดสอบเสถียรภาพของ Indole reagent รอบที่ 1	71
รูปที่ 38 แสดงกราฟผลจากการทดสอบเสถียรภาพของ Indole reagent ครั้งที่ 2	71
รูปที่ 39 แสดงกราฟผลจากการทดสอบเสถียรภาพของ Indole reagent ครั้งที่ 3	72
รูปที่ 40 ระบบวัดต้นแบบที่พัฒนาขึ้น (แบบใช้คิวเวทท์พลาสติกในการบรรจุสารตัวอย่าง)	73
รูปที่ 41 ผลการทดสอบจากเครื่องมือวัดมาตรฐาน	74
รูปที่ 42 แสดงผลการทดสอบปริมาณ CaOx ของระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น	75

รูปที่ 43 แสดงค่าสเปกตรัมสีเหลืองของปัสสาวะที่ได้จากการวัดด้วยระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น.....	76
รูปที่ 44 แสดงขั้นตอนและส่วนประกอบของเครื่องมือวัด.....	80
รูปที่ 45 แสดงแผนภาพการทำงานของระบบวัดแสงและระบบผสมและนำส่งสาร.....	81
รูปที่ 46 แสดงแผนผังระบบวัดแสง และวงจรส่วนต่าง ๆ.....	82
รูปที่ 47 แสดงแผนผังการทำงานของระบบวัดแสง.....	83
รูปที่ 48 แสดงการทำงานของระบบวัดแสง.....	83
รูปที่ 49 แสดงการออกแบบ Holder ผ่านโปรแกรม SketchUp.....	84
รูปที่ 50 แสดงผลจากการวัดสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่องมือวัด.....	86
รูปที่ 51 แสดงกราฟเปรียบเทียบผลจากการทดสอบวิธี iCOCl ด้วย indole reagent ความเข้มข้น 1 และ 2.5 mg/ml ของเครื่องมือวัดมาตรฐาน.....	87
รูปที่ 52 แสดงกราฟเปรียบเทียบผลจากการทดสอบวิธี iCOCl ด้วย indole reagent ความเข้มข้น 1 และ 2.5 mg/ml ของระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น.....	87
รูปที่ 53 แสดงชุดควบคุมมอเตอร์ L298N.....	88
รูปที่ 54 แสดงแผนผังการต่อระบบผสมและนำส่งสาร.....	90
รูปที่ 55 แสดงระบบผสมและนำส่งสาร.....	91
รูปที่ 56 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักและปริมาตรของ Indole reagent.....	91
รูปที่ 57 แสดงปริมาตร indole reagent ที่ได้จากการทดสอบด้วยระบบผสมและนำส่งสาร.....	92
รูปที่ 58 แสดงโมดูล I ² C LCD และการติดตั้ง.....	93
รูปที่ 59 แสดงผลการทดสอบจากระบบวัดแสงของตัวอย่างปัสสาวะ 11 ตัวอย่าง.....	94

บทที่ 1 บทนำ

1.1) ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

นิ่วไต (Kidney stone or Urinary stone) เป็นภาวะที่ร่างกายสร้างผลึก เช่น ผลึกจากแคลเซียมหรือกรดยูริกมากเกินไปที่ร่างกายจะกำจัดได้จนเกิดเป็นก้อนนิ่ว เมื่อก่อนนิ่วมีการเติบโตจะทำให้เกิดการอุดตันตามระบบทางเดินปัสสาวะและเกิดการอุดตันทางเดินปัสสาวะฉับพลันทำให้การไหลของปัสสาวะมีความผิดปกติ [1] การมีนิ่วไตทำให้ไตเสื่อมสภาพลง อาจร้ายแรงจนถึงเกิดภาวะไตวายเรื้อรังและทำให้เสียชีวิตได้ ความชุกของโรคนี้ในคนไทยมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งในประเทศไทยและทุกภูมิภาคทั่วโลก [2] โดยในประเทศไทยพบอุบัติการณ์การเกิดได้มากที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้โรคนี้ยังเป็นโรคที่มีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูงภายหลังการรักษาด้วยวิธีการมาตรฐาน นิ่วไตมีหลายชนิด หากจำแนกด้วยแร่ธาตุและสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในก้อนนิ่ว แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นนิ่วประเภทที่พบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 80 โดยนิ่วที่พบมากในประเภทนี้คือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (Calcium Oxalate : CaOx) นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium Phosphate : CaP) ส่วนอีกประเภท คือนิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ นิ่วกรดยูริก นิ่วสตรูไวท์ และนิ่วซีสทีนพบประมาณร้อยละ 15-20 [3]

ปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจหา นิ่วไต เช่น การเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (Computerized Tomography Scan : CT Scan) การตรวจคลื่นความถี่สูง (Ultrasound) หรือการฉีดสีเพื่อตรวจไตและระบบทางเดินปัสสาวะ (Intravenous Pyelography : IVP) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง [4] แต่ยังมีค่าใช้จ่ายในการเข้าตรวจค่อนข้างแพง และบางวิธีใช้เวลาในการตรวจค่อนข้างนาน [5] นอกจากนี้ยังไม่สามารถนำออกไปทำการตรวจคัดกรองคนไข้นอกสถานพยาบาลได้ ดังนั้นเพื่อลดเวลาและค่าใช้จ่ายจากการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานดังกล่าวปัจจุบันจึงมีหลายวิธีที่ใช้สำหรับการตรวจคัดกรองคนไข้ก่อนการเข้าตรวจกับวิธีมาตรฐานตามสถานพยาบาล เช่น ในปี ค.ศ. 1998 Sriboonlue [6] และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะขึ้นโดยมีพื้นฐานมาจากการตกตะกอนของผลึก CaOx ในตัวอย่างปัสสาวะด้วยสภาวะที่มีปริมาณแคลเซียม และเอทานอลมากเกินไป ในการทดลองได้มีการวัดระดับแคลเซียมในผลึก CaOx ที่ตกตะกอนด้วยเครื่อง spectrophotometry และระดับออกซาเลตในปัสสาวะโดยการใช้เอนไซม์ oxalate oxidase ในผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้แล้ว พบว่า ระดับแคลเซียมในผลึก CaOx ที่ตกตะกอนมีปฏิสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับออกซาเลตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้แล้ว หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 2000 Laube และคณะ ได้พัฒนา Bonn-risk Index (BRI) ในการประมาณค่าความสามารถในการเกิดก้อนนิ่วในปัสสาวะจริง [7] โดย BRI จะคำนวณอัตราส่วนของปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนอิสระต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมออกซาเลตที่ถูกใส่ไปในขั้นตอนแรกเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนของ CaOx

[7, 8] วิธีนี้ได้มีการใช้อย่างแพร่หลาย และใช้ได้ดีสำหรับการแยกแยะก้อนนิ่ว CaOx จากกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี (sensitivity 69.7% , specificity 100%) แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ความซับซ้อนของขั้นตอนในการวัดทำให้ยังต้องการผู้ชำนาญ และข้อจำกัดทางค่าใช้จ่ายในการทดสอบ [8]

ในปี ค.ศ. 2011 Bowei และคณะได้พัฒนา Calcium Oxalate Crystallization Index (COCI) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และเชื่อถือได้ ในการหาความสามารถในการตกตะกอนของ CaOx ในตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อแยกแยะผู้ป่วยที่เป็นโรคนิ่วไตออกจากผู้ที่ไม่เป็นโรค โดยวิธีนี้ได้นำหลักการจาก Sriboolue และคณะมาใช้ร่วมด้วย [6] โดยมีความแตกต่างตรงที่วิธีของ Sriboolue และคณะ วัดปริมาณแคลเซียมจากการตกตะกอนของ CaOx เพื่อประมาณค่าความเข้มข้นออกซาเลตในปัสสาวะ แต่การทดสอบด้วยวิธี COCI ใช้การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ในการหาค่าปริมาณออกซาเลตจากการตกตะกอนของ CaOx เพื่อประมาณค่าความสามารถของปัสสาวะในการตกผลึก CaOx [9] การทดสอบการวัดการเกิดผลึกของแคลเซียมออกซาเลตด้วยวิธี COCI ถือเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถวัดการอันตรายเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วไตได้ มีความแม่นยำค่อนข้างสูง (sensitivity 83.33%, specificity 97.18%, accuracy 90.21%) ใช้ตัวอย่างปัสสาวะน้อยและมีการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะก่อนการวัด แต่วิธีนี้ยังถูกจำกัดด้วยเรื่องของเวลา กล่าวคือ ใช้เวลาค่อนข้างนาน (2-3 ชั่วโมงต่อ 1 รอบ) และต้องทำภายในห้องวิจัย ไม่สามารถเคลื่อนย้ายออกไปตรวจสอบนอกห้องวิจัยได้ อีกทั้งในเชิงการทำระบบวัดต้องใช้ตัวรับแสง (Detector) ที่ตรวจวัดแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง

ข้อจำกัดของวิธี COCI ดังกล่าว Boontla และคณะได้พัฒนาวิธี iCOCI (Indole-reacted Calcium oxalate crystallization index) ขึ้นมาเพื่อทดแทนข้อจำกัดในเรื่องการวัดความยาวคลื่นของวิธี COCI [10] ให้อยู่ในความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (visible light) ถือเป็นขั้นตอนที่ทำต่อจากวิธี COCI กล่าวคือ ตัวอย่างสารที่เกิดจากการตกตะกอนผลึกของ CaOx ด้วยวิธี COCI (Calcium oxalate crystallization index) จะถูกนำมาทดสอบด้วย indole reagent ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่าง Indole ($C_8H_8N^+$) และกรดซัลฟูริกเข้มข้น ในสัดส่วน 1:1 โดยตัวอย่างปัสสาวะจะทำปฏิกิริยากับ Indole reagent ด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm เพื่อหาปริมาณ CaOx ในปัสสาวะต่อไป

จากข้อจำกัดต่างของระบบวัดต่าง ๆ ที่พัฒนาขึ้นเพื่อการตรวจคัดกรองโรคไตดังที่กล่าวมาในข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการพัฒนาระบบตรวจคัดกรองโรคไตโดยอาศัยการวัดการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลต โดยจะทำการศึกษาและพัฒนา 1) ขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการตกผลึกของแคลเซียมออกซาเลตจากตัวอย่างปัสสาวะ และ 2) ระบบวัดและแปลผลปริมาณผลึก

แคลเซียมออกซาลेटในตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อให้ได้ระบบตรวจคัดกรองที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานมากยิ่งขึ้น

1.2) วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1) พัฒนาขั้นตอนในการทำให้เกิดการตกผลึกของแคลเซียมออกซาลेट (COCI) ในปัสสาวะเพื่อให้สามารถตรวจวัดได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นระบบแบบพกพา

1.2.2) ศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อการวัดผลึกแคลเซียมออกซาลेट (COCI) ในปัสสาวะ

1.2.3) ออกแบบและพัฒนาระบบวัดและแปรผลปริมาณแคลเซียมออกซาลेट (iCOCI) แบบตามเวลาจริง เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วย

1.2.4) เปรียบเทียบความแม่นยำในการตรวจคัดกรองระหว่างระบบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน

1.3) ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1) พัฒนาขั้นตอนและวิธีการวัดการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาลेट (COCI) ในตัวอย่างปัสสาวะคนไข้เฉพาะก้อนนี้ที่มีส่วนประกอบจากแคลเซียม ให้มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองโรคนี้ไว้

1.3.2) ศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ต่อวิธีการวัดการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาลेट (COCI) ในปัสสาวะ โดยตัวแปรที่ศึกษามีดังนี้

- ผลของเวลาในการบ่มปัสสาวะ (incubation time)
- ผลของปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ
- ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ

1.3.3) พัฒนาการวัดการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาลेट (iCOCI) ในตัวอย่างปัสสาวะคนไข้เฉพาะก้อนนี้ที่มีส่วนประกอบจากแคลเซียม ให้มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองโรคนี้ไว้

1.3.4) ศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ต่อวิธีการวัดการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาลेट (iCOCI) ในปัสสาวะ โดยตัวแปรที่ศึกษามีดังนี้

- ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Indole reagent ต่อการนำไปใช้ในการวัดกับเครื่องมือมาตรฐาน
- ผลการทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะจริง
- ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการใช้งาน Indole reagent

1.3.5) พัฒนาระบบการวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตแบบพกพาที่สามารถติดตามผลการวัดแบบตามเวลาจริงและเปรียบเทียบความถูกต้องกับวิธีมาตรฐาน

1.4) ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1) ได้วิธีการวัดการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลต (COCI) ในปัสสาวะให้มีความถูกต้องเพื่อการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยผู้ป่วยโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.4.2) ได้วิธีลดขั้นตอนและเวลาที่ใช้ในการวัดการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลต (COCI) ในปัสสาวะเพื่อให้ได้ผลที่รวดเร็วและมีความสะดวกต่อการวัดมากยิ่งขึ้น

1.4.3) ได้ระบบการวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตที่สามารถติดตามผลการวัดแบบตามเวลาจริงที่สะดวกในการพกพาและสามารถคำนวณค่าระดับปริมาณแคลเซียมออกซาเลตเพื่อคัดกรองผู้ป่วยได้

1.4.4) ได้วิธีการวัดการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลต (iCOCI) ซึ่งใช้ควบคู่กับระบบวัดแบบพกพาได้อย่างเหมาะสม

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

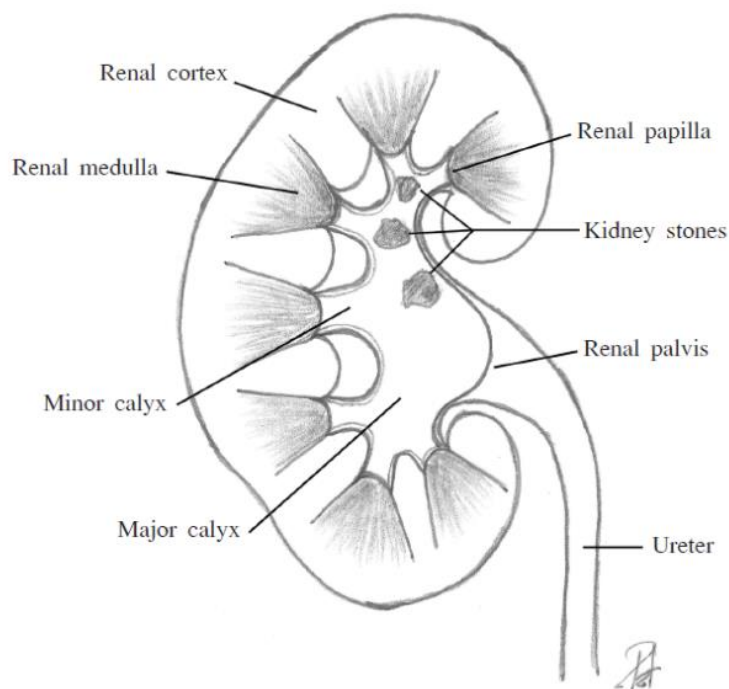
2.1) โรคนิ่วไต

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาที่พบมากทั่วโลก และอุบัติการณ์ในการเกิดโรคนิ่วไตมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์โรคนิ่วไตสูงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือประมาณร้อยละ 10-16 การมีนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะจะส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหลายอย่าง เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การทำงานของไตเสื่อมลง และอาจร้ายแรงจนถึงเกิดภาวะไตวายเรื้อรังและโรคไตระยะสุดท้าย ซึ่งทำให้ถึงแก่ความตายได้ นอกจากนี้โรคนิ่วไตมีอุบัติการณ์การเป็นนิ่วซ้ำสูงมาก มีการศึกษาอัตราการกลับเป็นนิ่วซ้ำหลังสลายนิ่วที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีผู้ป่วยส่วนใหญ่มาจากภาคกลาง พบสูงถึงร้อยละ 25 ภายหลังจากสลายนิ่วแล้ว 3 ปี และการศึกษาในโรงพยาบาลขอนแก่น พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 39 ภายหลังจากผ่าตัดเอานิ่วออกไปแล้ว 2 ปี เนื่องจากผู้ป่วยมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อไต เช่น พบการอักเสบ การบวมและการบาดเจ็บภายในเนื้อไต อีกทั้งขาดการประเมินความผิดปกติทางเมตาบอลิก จึงเป็นสาเหตุสำคัญในการกลับเป็นนิ่วซ้ำ [3] ด้วยเหตุการณดังกล่าวนี้ทั้งผู้ป่วยและภาครัฐต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำสูงมาก ดังนั้นโรคนิ่วไตจึงจัดเป็นปัญหาทางสุขภาพที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของคนไทยมากยิ่งขึ้น

2.1.1) โครงสร้างของไต

ไต เป็นอวัยวะที่อยู่ส่วนล่างของช่องท้องอยู่หลังเยื่อช่องท้อง (retroperitoneal organ) มีสองข้างโดยไตข้างซ้ายอยู่ระดับกระดูกสันหลังส่วนเอว ส่วนข้างขวายู่ต่ำกว่าเล็กน้อยเนื่องจากมีตับอยู่ด้านบน [10] โครงสร้างที่สำคัญของไตประกอบด้วย 3 ส่วน คือ **1. เนื้อไตส่วนนอก(Renal Cortex)** เป็นส่วนของเนื้อไตที่อยู่ติดกับเปลือกหุ้ม เนื้อไตมีสีน้ำตาลแดงอยู่นอกสุดของไต มีสีเหลืองปนแดงเนื่องจากเป็นบริเวณที่เลือดมาหล่อเลี้ยงมาก กลุ่มของเส้นเลือดแดงฝอยที่มาเรียงเป็นกลุ่มเรียกว่า โกลเมอรูลัส (Glomerulus) ทำหน้าที่ในการกรองของเสียจากเลือด โดยรอบๆ โกลเมอรูลัสมีถุงหุ้มที่คอยรองรับน้ำปัสสาวะหรือน้ำที่กรองได้จากเลือดที่ เรียกว่า โบว์แมนส์แคปซูล (Boeman's capsule) ซึ่งต่อโดยตรงกับหลอดไตส่วนต้น (proximal convoluted tubules) **2. เนื้อไตส่วนใน (Renal Medulla)** เป็นส่วนของเนื้อไตชั้นในที่อยู่รอบกรวยไต (Renal pelvis) มี collecting duct และบางส่วนของ nephron loop อยู่ในไตเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่กรองของเสียออกจากเลือดและขับออกในรูปของปัสสาวะ โดยไหลผ่านท่อที่รวบรวมน้ำปัสสาวะ (collecting duct) ที่ต่อจากหลอดไตส่วนปลาย (distal convoluted tubule) มาเปิดออกที่ส่วนปลายของ renal medulla ซึ่งมีลักษณะเป็นรูเปิดขนาดเล็ก เรียกว่า renal papilla ไหลลงสู่ท่อขนาดเล็ก(minor calyx) โดยท่อขนาดเล็กนี้ 2-3 ท่อจะรวมกันกลายเป็นช่องว่างที่มีขนาดใหญ่ (major calyx) ลงสู่กรวยไต (renal pelvis) **3. กรวยไต(Renal Pelvis)** เป็นส่วนในสุดที่รับน้ำปัสสาวะมาจาก renal papilla แล้วไหล

ลงสู่หลอดไต (ureter) ซึ่งบริเวณที่เกิดนิ่วในไต ได้แก่ โครงสร้างตั้งแต่ minor calyx จนถึง กรวยไต (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างภายในของไตและนิ่วไต[2]

2.1.2) สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วไต

นิ่วเกิดจาก “สารก่อนิ่ว” ที่มีอยู่ในปัสสาวะทั่วไป ได้แก่ แคลเซียม ฟอสเฟต ออกซาเลต ยูเรต ถ้าสารก่อนิ่วเหล่านี้มีอยู่ในปัสสาวะในปริมาณที่มากเกินไป เช่น ภาวะ hypercalciuria จากการที่ต่อมพาราไทรอยด์ทำงานมากเกินไป ทำให้มีการสลายแคลเซียมในกระดูกมากขึ้น ส่งผลให้แคลเซียมในกระแสเลือดมีปริมาณมากยิ่งขึ้นและไหลเวียนไปสู่ไตมากขึ้น [11] แล้วถูกขับออกมาในปัสสาวะมากขึ้นแคลเซียมจะรวมตัวกับสารก่อนิ่วอื่น ๆ จนกลายเป็นก้อนนิ่วขนาดเล็ก เมื่อมีการรวมตัวกันมากขึ้นของสารก่อนิ่วจะทำให้ก้อนนิ่วมีขนาดที่ใหญ่ขึ้นตาม ส่วนสารที่ทำหน้าที่ป้องกันการก่อเกิดผลึกในปัสสาวะเรียกว่า “สารยับยั้งนิ่ว” ได้แก่ ซิเตรต โปแทสเซียม และแมกนีเซียม ในคนปกติที่มีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะสูงเพียงพอจะสามารถยับยั้งการก่อตัวของผลึกนิ่วได้ โดยสารเหล่านี้จะไปแย่งจับกับสารก่อนิ่ว เช่น แมกนีเซียมจับกับออกซาเลต หรือซิเตรตจับกับแคลเซียม ทำให้เกิดเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี และขับออกไปพร้อมกับน้ำปัสสาวะ โดยปัจจัยเสี่ยงด้านความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคนิ่วไตของคนไทย คือการมีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะต่ำ ได้แก่ ภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ

ซึ่งพบได้ประมาณร้อยละ 70-90 และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำพบได้ประมาณร้อยละ 40-60 [12, 13]

2.1.3) กลไกการเกิดนิ่วไต

เมื่อมีสารก่อนิ่ว (แคลเซียม ฟอสเฟต ออกซาเลต ยูเรต) ในปัสสาวะสูงกว่าระดับสารยับยั้งนิ่ว (ซิเตรต โพแทสเซียม และแมกนีเซียม) ร่วมกับปัจจัยเสริมคือ ปริมาตรของปัสสาวะน้อย จากพฤติกรรม การบริโภคหรือ การดำเนินชีวิต ส่งผลให้เกิดภาวะอิ่มตัววดยิ่งของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ จึงเกิดผลึกที่ไม่ละลายน้ำขึ้น เช่น แคลเซียมออกซาเลต แคลเซียมฟอสเฟต และยูเรต ผลึกนิ่วที่เกิดขึ้นในท่อไต จะกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) และการอักเสบในท่อไต ส่งผลให้ เซลล์บุบริเวณท่อไตได้รับความเสียหาย ซึ่งเป็นพื้นที่ให้ผลึกนิ่วยึดเกาะและรวมกลุ่มกัน เกิดการสะสมของผลึกนิ่วเป็นเวลานานจนกลายเป็นก้อนนิ่วได้ [14]

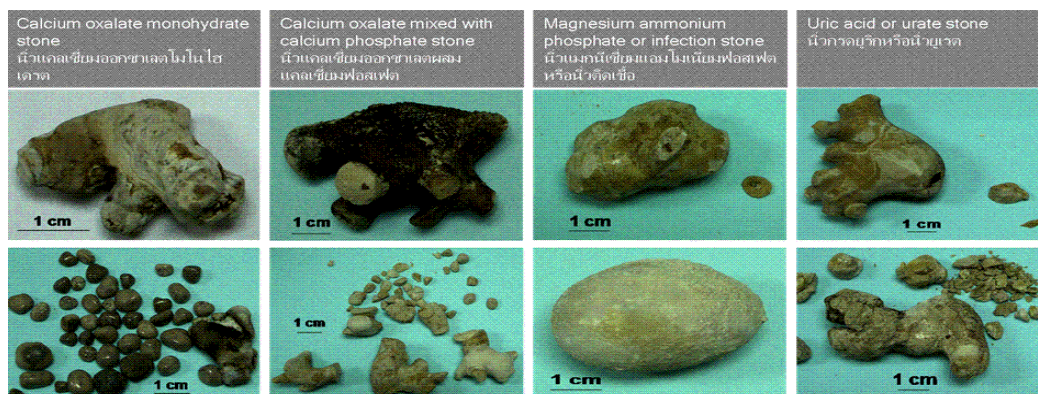


รูปที่ 2 ลักษณะการเกิดโรคนิ่วไต [14]

2.1.4) ชนิดของก้อนนิ่วไต

นิ่วไตมีหลายชนิดจำแนกตามสารเคมีหรือแร่ธาตุที่ประกอบเป็นผลึกในก้อนนิ่ว สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่คือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (Calcium stones) ได้แก่ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (Calcium stone, CaOx) นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate, CaP) นิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟต และนิ่วแคลเซียมออกซาเลตกับยูริก โดยพบนิ่วประเภทที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบมากที่สุดประมาณร้อยละ 80 นิ่วประเภทแคลเซียมออกซาเลตพบมาก

ที่สุดในกลุ่มนิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ นิ่วชนิดนี้มีอัตราการเกิดซ้ำถึง 30% และมีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำบ่อยที่สุดในช่วง 10 ปี [15] ร้อยละ 20 ที่เหลือจะเป็นนิ่วประเภทที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (non-calcium stones) ได้แก่ นิ่วกรดยูริก (Uric acid stone) นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือนิ่วสตรูไวท์ (Infection stone หรือ struvite stone) และนิ่วซิสทีน (cystine stone)



รูปที่ 3 ก้อนนิ่วชนิดต่าง ๆ ที่พบมากในผู้ป่วยโรคนิ่วไต [14]

องค์ประกอบทางเคมีของก้อนนิ่ว ส่วนใหญ่จะเป็นนิ่วเนื้อผสม (mixed stone) คือมีองค์ประกอบของเกลือมากกว่าสองชนิดขึ้นไป ส่วนนิ่วที่มีองค์ประกอบทางเคมีเพียงชนิดเดียวจัดเป็นนิ่วเนื้อบริสุทธิ์ (pure stone) พบว่าชนิดและองค์ประกอบของก้อนนิ่วในประเทศต่าง ๆ มีสัดส่วนที่แตกต่างกัน

2.1.5) การรักษาและตรวจสอบโรคนิ่วไต

แนวทางการรักษานิ่วไตคือ การกำจัดนิ่วออกจากไต รักษาตามสาเหตุและอาการของการเกิดนิ่ว โดยให้มีผลข้างเคียงจากการรักษาน้อยที่สุด โดยมีปัจจัยที่มีผลต่อการตัดสินใจในการเลือกวิธีการรักษา คือ ขนาด จำนวน องค์ประกอบของนิ่ว หรือชนิดของนิ่ว รวมทั้งกายวิภาคของไต และสภาพของผู้ป่วย ได้แก่

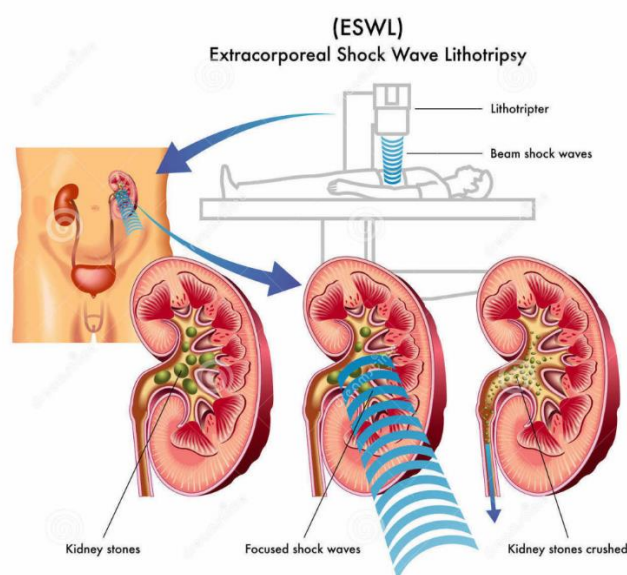
2.1.5.1) กรณีก้อนนิ่วมีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร

นิ่วสามารถหลุดออกมาเองได้จากการดื่มน้ำในปริมาณมาก ๆ และอาจร่วมกับยาช่วยละลายนิ่ว หรืออาจจะยังไม่ต้องทำการรักษาใด ๆ แต่ต้องมีการนัดมาตรวจเป็นระยะ ๆ เพราะว่านิ่วอาจจะโตขึ้นหรือผู้ป่วยอาจมีผลแทรกซ้อนจากนิ่วได้

2.1.5.2) กรณีก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่เกินไม่สามารถจะหลุดออกมาได้เอง

ก้อนนิ่วมีขนาดโตขึ้นจากการสะสมของผลึกนิ่วเป็นเวลานาน อาจทำให้ก้อนนิ่วอุดกั้นทางเดินปัสสาวะ หรือทำให้เกิดการติดเชื้อ จะต้องรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดเพื่อเอานิ่วออกมา ซึ่งวิธีการผ่าตัดมีดังนี้

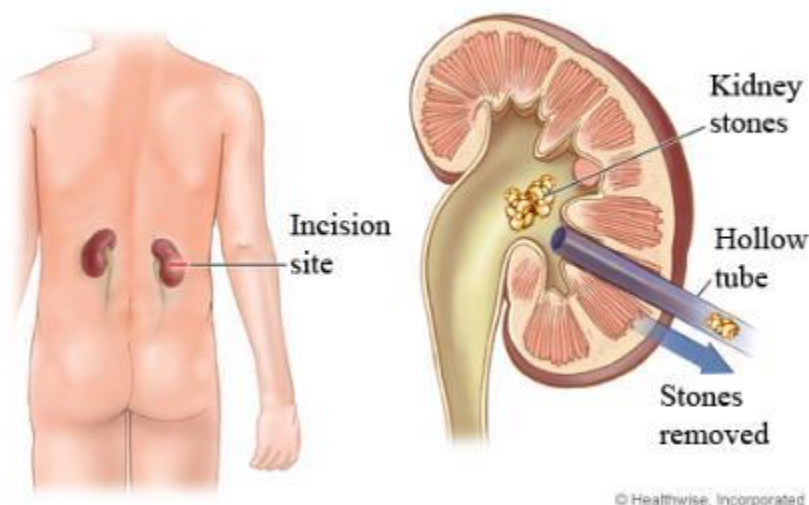
Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) จะเป็นการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงส่งพลังผ่านผิวหนังไปสู่ก้อนนิ่ว โดยไม่ทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อเมื่อคลื่นถูกก้อนนิ่วแพทย์จะมองเห็นรอยร้าวหรือแตกบนก้อนนิ่ว ก้อนนิ่วจะสลายตัวหลังจากใช้เครื่องสลายนิ่วประมาณ 1 ชั่วโมง และจะถูกขับออกมาพร้อมกับปัสสาวะภายหลังการรักษาแล้วหลายวันถึง 1 สัปดาห์ แต่ก้อนนิ่วจะต้องมีขนาดไม่เกิน 2.5 เซนติเมตร และอยู่เหนือท้องน้อย มักใช้กับนิ่วชนิดที่เกิดจากการติดเชื้อในไต (struvite stone) ใช้ไม่ได้ผลกับนิ่วชนิดซิสทีน (cystine stone) มีอัตราความสำเร็จประมาณ 70-90% ไม่มีแผลเป็น หายเร็ว ไม่ต้องนอนพักในโรงพยาบาล และเป็นการรักษาแต่ภายนอก แต่จะมีอาการแทรกซ้อนที่สำคัญคือ อาจเป็นรอยขีดในบริเวณที่รักษา มีเลือดปนในปัสสาวะ รู้สึกปวด 2-3 วันหลังการรักษา ผู้ป่วยควรกลับไปพบแพทย์เพื่อตรวจหลังการรักษา (แอสไพริน (Aspirin) ทำให้เลือดไม่จับตัวกัน ถ้ารับประทานก่อนทำ ESWL อย่างน้อย 2 สัปดาห์) ผู้ป่วยทั่วไปสามารถรักษาด้วยวิธีนี้ได้ ยกเว้นในผู้ป่วยที่เป็นโรคความดันโลหิตสูง การแข็งตัวของเลือดไม่ปกติ มีภาวะเลือดออกผิดปกติ อ้วนมาก มีการอุดทางเดินปัสสาวะ และทางเดินปัสสาวะอักเสบ ควรแจ้งให้แพทย์ทราบก่อนล่วงหน้า สำหรับหญิงตั้งครรภ์ไม่สามารถใช้วิธีนี้ในการรักษาได้



รูปที่ 4 แสดงการสลายนิ่วโดยใช้คลื่นความถี่สูง

(ที่มา : <https://comprehensive-urology.com/urinary-stones/lithotripsy/>)

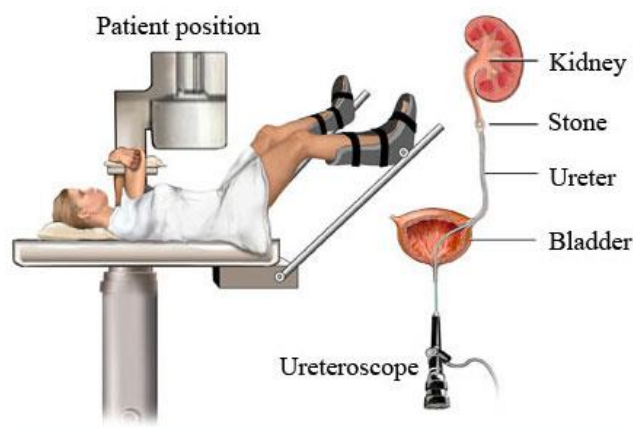
Percutaneous nephrolithotomy (PCNL) เป็นการใช้กล้อง Nephroscope ส่องเข้าสู่ไตผ่านทาง Nephrostomy tract ที่แทงผ่านผิวหนังบริเวณเอวเข้าสู่ไตโดยตรง แล้วใช้เครื่องมือคีบเอานิ่วออก มักใช้ในกรณีที่ใช้เครื่องสลายนิ่ว (ESWL) แล้วไม่ได้ผล หรือนิ่วชนิดซิสทีน หรือนิ่วที่มีขนาดใหญ่



รูปที่ 5 แสดงการกำจัดนิ่วโดยการใช้นephroscope

(ที่มา : <https://www.webmd.com/kidney-stones/percutaneous-nephrolithotomy>)

Ureteroscopic stone removal (URS) เป็นการใช้กล้อง Ureteroscope ที่มีขนาดเล็กส่องผ่านทางกระเพาะปัสสาวะเข้าสู่ท่อไต และใช้เครื่องมือคล้องนิ่ว (Basket) หรือกรอหินให้แตกโดยใช้ Laser หรือ Ballistic lithotripsy มักใช้กับนิ่วที่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร และอยู่ต่ำกว่ากระดูกสะโพก



รูปที่ 6 แสดงการกำจัดนิ่วด้วยวิธี Ureteroscopic stone removal (URS)

(ที่มา : <http://www.urologistindia.com/ureteroscopy/>)

การรักษาโรคนิ่วด้วยยาและมะนาวผง เป็นการรักษาที่ช่วยป้องกันการเติบโตของก้อนนิ่วและป้องกันการเกิดโรคนิ่วซ้ำได้ เนื่องจากการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดนั้นไม่ได้ครอบคลุมไปถึงการรักษาภาวะผิดปกติของเมตาบอลิซึม ดังนั้นการให้ยารักษาจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรแนะนำแก่ผู้ป่วยภายหลังการรักษา ซึ่งการรักษาทางยานี้มีจุดประสงค์สำคัญ คือ เพื่อแก้ไขภาวะผิดปกติทางเมตาบอลิซึมในผู้ป่วย เพื่อเพิ่มสารยับยั้งการก่อนิ่ว เพื่อลดสารก่อนิ่ว เพื่อลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการบาดเจ็บของเซลล์และความผิดปกติของการทำงานของไต โดยยาที่นำมาใช้

รักษานั้นมักพบทั้งที่อยู่ในรูปสารสังเคราะห์ รวมไปถึงสารในธรรมชาติต่าง ๆ เช่น กรดไฟติก สารต้านอนุมูลอิสระ น้ำมันปลา กล้วยาหนดแมวหรือกล้วยาหนดตา ผลไม้ มะนาวผง เป็นต้น แพทย์จะพิจารณาให้การรักษาด้วยยาอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมที่ทราบแน่นอน ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการทำงานของไต หรือมีโรคที่กำลังเป็นอยู่ หรือผู้ป่วยที่มีนิวซ์้า

2.2) การตรวจคัดกรองโรค (Screening Test)

การตรวจคัดกรองผู้ป่วยที่เป็นหรือไม่เป็นโรคถือเป็นวิธีหนึ่งในทางภาคสนามที่สำคัญที่ช่วยแบ่งแยกกลุ่มผู้ป่วยออกเป็นหลายกลุ่มตามกรณีที่น่าสนใจ เพื่อให้ง่ายต่อการจัดข้อมูลและดำเนินการตรวจโรค องค์การอนามัยโลกได้วางหลักเกณฑ์การตรวจคัดกรองด้านสุขภาพไว้ว่าควรเป็น “โรคหรือภาวะที่เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของประเทศ เป็นโรคที่สามารถรักษาหายได้ และต้องมีความพร้อมด้านเครื่องมือที่ใช้วินิจฉัย เป็นการตรวจคัดกรองโรคหรือภาวะที่อยู่ในระยะที่ยังไม่แสดงอาการชัดเจน ผู้คัดกรองต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับการดำเนินโรคหรือภาวะนั้นเป็นอย่างดี และควรเป็นกระบวนการที่ทำอย่างต่อเนื่อง” [16] ในการเก็บตัวอย่างปัสสาวะของผู้อาสาสมัครเพื่อตรวจโรคนี้ไต การคัดกรองผู้ป่วยก่อนการตรวจกับวิธีมาตรฐานถือเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยอำนวยความสะดวก โดยปกติการตรวจคัดกรองเบื้องต้นควรประกอบด้วยการศึกษาประวัติเรื่องโรคประจำตัว ยาที่ใช้อยู่ โรคประจำตัวของบุคคลในครอบครัว ประวัติการโภชนาการ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะนำไปประกอบการตัดสินใจของแพทย์เกี่ยวกับผลจากการตรวจโรคว่าผู้ป่วยมีความเสี่ยงมากน้อยเพียงใด

ในส่วนของผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้ไตนอกเหนือจากข้อมูลการคัดกรองเบื้องต้นแล้ว ในทางปฏิบัติจะมีการขอตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยเพื่อนำมาตรวจคัดกรองก่อนนำไปตรวจกับวิธีมาตรฐาน เช่น ซีทีสแกน เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันมีหลากหลายวิธีในการตรวจปัสสาวะเบื้องต้น โดยวิธีตรวจสามารถบอกถึงความเสี่ยงของผู้ป่วยต่อโรคนี้ไตได้ ซึ่งสิ่งที่เป็หัวใจในการตรวจปัสสาวะผู้ป่วยเพื่อบอกความเสี่ยงของโรคนี้ไต มีหลายตัวแปร ซึ่งตัวแปรที่เราสนใจในงานวิจัยนี้ คือ ปริมาณแคลเซียมออกซาเลตซึ่งเป็นสารก่อเนื้องอกที่พบได้ในปัสสาวะทั่วไป ซึ่งถ้ามีมากในปัสสาวะจะมีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นเนื้องอก ผู้วิจัยได้ศึกษาวิธีการตรวจคัดกรองปัสสาวะโดยมีตัวแปรที่สำคัญ คือ ปริมาณแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะ โดยมี 4 วิธีที่น่าสนใจ ดังนี้

2.2.1) Sriboonlue's indirect method

ปี ค.ศ. 1998 Sriboonlue และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะโดยอาศัยการตกตะกอนของผลึก CaOx ในตัวอย่างปัสสาวะด้วยสภาวะที่มีปริมาณแคลเซียมและเอทานอลมากเกินพอ โดยวัดปริมาณแคลเซียมในผลึก CaOx ที่ตกตะกอนด้วยวิธีทางแสง (ด้วยเครื่อง spectrophotometry) และระดับออกซาเลตในปัสสาวะ (โดยการใช้เอนไซม์ oxalate oxidase) ในการทดลองมีการเปรียบเทียบปัสสาวะปลอม (Artificial Urine) และปัสสาวะของผู้ป่วยที่

เป็นโรคนิวไต พบว่า ปริมาณแคลเซียมในผลึก CaOx ที่ตกตะกอนมีปฏิสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับออกซาเลตทั้งในปัสสาวะปดอมและปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไต นอกจากนี้ การทดลองนี้ยังพบตัวกวนที่สำคัญ คือ แคลเซียมฟอสเฟต ที่ทำให้ค่าปริมาณแคลเซียมในปัสสาวะสูงขึ้นเนื่องจากไปเกาะที่ผลึกของแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งสามารถกำจัดได้ด้วยการล้างด้วย Acetic acid 0.1 M

2.2.2) Bonn-risk Index (BRI)

เป็นวิธีในการประมาณค่าความเสี่ยงในการเกิดก้อนนิ่วในปัสสาวะจริงที่ยังไม่ได้มีการเตรียมของ Laube และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 มีพื้นฐานจากการตกตะกอนของแคลเซียมออกซาเลต ซึ่ง BRI จะคำนวณอัตราส่วนของปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนอิสระต่อความเข้มข้นของออกซาเลตไอออนอิสระจากแอมโมเนียมออกซาเลตที่ถูกใส่ไปในขั้นตอนแรกเพื่อทำให้เกิดการตกตะกอนของ CaOx ซึ่งในการทดลองนี้จะจำแนกกลุ่มของปัสสาวะจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่มีความเสี่ยง (BRIs < 1/L) และกลุ่มที่มีความเสี่ยง (BRIs > 1/L) [7, 8] วิธีนี้ใช้ได้ดีสำหรับการแยกแยะผู้ที่มีก้อนนิ่ว CaOx จากกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี (sensitivity 69.7% , specificity 100%) แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ความซับซ้อนของวิธีทำการทดลองที่ต้องการผู้ชำนาญ และข้อจำกัดทางค่าใช้จ่ายในการทดสอบ

2.2.3) Calcium Oxalate Crystalization Index (COCI)

เป็นวิธีที่ใช้หลักการร่วมกับวิธีของ Sriboonlue ตั้งแต่ในขั้นแรกที่มีการเติมแคลเซียมมากเกินไปให้เกิดการตกตะกอนของ CaOx แต่ยังมีความแตกต่างกันตรงที่วิธีของ Sriboonlue วัดปริมาณแคลเซียมที่ตกตะกอนเป็น CaOx เพื่อประเมินปริมาณความเข้มข้นออกซาเลตในปัสสาวะ แต่วิธี COCI ใช้การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ในการหาค่าปริมาณออกซาเลตจากการตกตะกอนของ CaOx เพื่อประมาณค่าความสามารถของปัสสาวะในการตกผลึก CaOx [9] โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน เป็นการหาความสามารถในการตกตะกอนของ CaOx ในตัวอย่างปัสสาวะ เรียกอีกอย่าง คือ การหาปริมาณการตกตะกอนของ CaOx ในปัสสาวะเพื่อแยกแยะผู้ป่วยที่เป็นโรคนิวไตออกจากผู้ที่ไม่เป็นโรค การทดสอบการวัดการเกิดผลึกของแคลเซียมออกซาเลตด้วยวิธี COCI ถือเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถวัดการอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคนิวไตได้ มีความแม่นยำค่อนข้างสูง (sensitivity 83.33%, specificity 97.18%, accuracy 90.21%) ใช้ตัวอย่างปัสสาวะน้อยและมีการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะก่อนการวัด นอกจากนี้วิธีนี้ไม่มีการใช้เอนไซม์หรือสารเคมีที่มีราคาแพง

2.2.4) Indole-reacted Calcium Oxalate Crystallization Index (iCOCI)

เป็นวิธีที่พัฒนาเพิ่มเติมต่อจากวิธี COCI เนื่องจากวิธี COCI ยังมีข้อเสียในการสังเกตผลการทดลอง กล่าวคือ ในการวัดความเข้มข้นของ CaOx ด้วยวิธี COCI จะใช้การวัดการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่นที่ 215 nm ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นของรังสี UV ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่วิธี iCOCI จะมีการใส่ Indole reagent ลงในสารละลาย CaOx (ที่ผ่านวิธี COCI จนถึงขั้นสุดท้ายก่อนการวัด OD) ที่พร้อมวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วทำการวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 530 nm ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ ภายหลังจากการทำปฏิกิริยาจะเกิดสีชมพู โดยความเข้มสีที่มองเห็นจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของปริมาณออกซาเลตในสารละลายที่ต้องการตรวจ

ตารางที่ 1 แสดงสรุปข้อดีและข้อด้อยของวิธีการตรวจคัดกรองปัสสาวะสำหรับโรคนิ่วไต

วิธีการตรวจคัดกรอง	ข้อดี	ข้อด้อย	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
Sriboonlue's indirect method	ใช้งานง่าย ใช้งานได้ มีความน่าเชื่อถือ และสามารถนำไปใช้ในทางคลินิกได้	- ใช้ enzyme ผู้ใช้ต้องมีความชำนาญ และต้องเก็บรักษาอย่างระมัดระวัง เนื่องจากเป็นโปรตีน สามารถเสื่อมสภาพได้ด้วยอิทธิพลของอุณหภูมิ นอกจากนั้นยังมีราคาแพง - ยังมีผลการรบกวนจาก ฟอสเฟต และการตกตะกอนของออกซาเลต ยังเกิดได้ไม่สมบูรณ์	[6]
Bonn-risk Index (BRI)	รวดเร็ว ไม่มีความเสี่ยงกับตัวคนไข้ มีความคุ้มค่า และสามารถทำซ้ำได้	- มีความซับซ้อนในการใช้งาน ผู้ใช้ต้องมีความเชี่ยวชาญ - ใช้สารตัวอย่างปัสสาวะในปริมาณมาก	[7, 8, 17]

Calcium Oxalate Crystalization Index (COCI)	มีความแม่นยำสูง ใช้้งานง่าย ใช้ตัวอย่างปัสสาวะปริมาณน้อย ใช้สารเคมีที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีความน่าเชื่อถือ	- ใช้เวลาในการทดสอบค่อนข้างนาน (2-3 ชั่วโมง) - ใช้การดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นของรังสี UV จึงทำให้ระบบวัดมีราคาแพง	[9]
Indole Test (iCOCI)	สังเกตผลการทดสอบได้ง่าย จากการสังเกตสีของสารหลังเกิดปฏิกิริยา ใช้เวลาน้อย และราคาถูก	- ต้องการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีอย่างต่อเนื่อง - ยังไม่มีการศึกษาถึงการประยุกต์ใช้รวมถึงระดับค่าที่เหมาะสมในการใช้ตรวจคัดกรอง	[18]

เนื่องจากวิธีการคัดกรองปัสสาวะสำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงโรคนีวดังกล่าวข้างต้นยังมีข้อจำกัดการใช้งานต่าง ๆ (ดังตารางที่ 1) เช่น การใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อน ต้องมีผู้เชี่ยวชาญในการทำงาน อุปกรณ์ต่าง ๆ รวมถึงวิธีการเหล่านี้ยังไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคนีวไตนอกสถานที่ เนื่องด้วยต้องมีการเตรียมสาร และอุปกรณ์ที่จำเพาะ อีกทั้งสารเคมีบางอย่างมีราคาแพงจึงต้องระมัดระวังในการใช้งานเป็นอย่างมาก ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงข้อจำกัดของวิธีการดังกล่าวข้างต้น ประกอบกับศึกษาข้อมูลแล้วจึงมีความคิดที่จะพัฒนาระบบตรวจวัดแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะเพื่อการคัดกรองผู้ป่วยโรคนีวไต ให้สามารถตรวจคัดกรองผู้ป่วยที่มีโอกาสเสี่ยงต่อโรคนีวไตได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2.3) แนวทางการประเมินประสิทธิภาพของวิธีตรวจคัดกรองผู้ที่มีความเสี่ยง

ในการประเมินงานวิจัยเกี่ยวกับวิธีในการตรวจคัดกรองโรคมะเร็งในการพิจารณา คือ ระเบียบวิธีวิจัยมีความน่าเชื่อถือหรือไม่ และการพิจารณาประสิทธิภาพของงานวิจัยว่ามีผลมาน้อยเพียงใด

ในการประเมินระเบียบวิธีวิจัยมีความน่าเชื่อถือหรือไม่ พิจารณาจากการศึกษานั้นมีการเลือกกลุ่มตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีความเหมาะสมหรือไม่ และต้องมีการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ซึ่งในการศึกษานี้เลือกกลุ่มตัวอย่างจากผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ที่เป็นโรคนีวไต อำเภอแกดดำ จังหวัดมหาสารคาม ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งจัดว่าเป็นพื้นที่ที่มีรายงานการเกิดโรคนีวไตมากที่สุดในประเทศไทย [3] นอกจากนั้น งานวิจัยนี้ยังมีการเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีมาตรฐาน (Gold

standard) ในการตรวจนิวไต์ คือ CT scan ซึ่งได้ทดสอบกับอาสาสมัครทั้งหมดที่เข้าร่วม

ส่วนการพิจารณาประสิทธิภาพของงานวิจัยว่ามีผลมากน้อยเพียงใด ผู้วิจัยได้เลือกทำการทดสอบโดยใช้ 2x2 table ควบคู่กับการทำ Receiver Operating Characteristic (ROC) Curves เพื่อเลือกค่าคาคัดหมายที่สามารถยอมรับได้ในทางการแพทย์ โดยมีวิธีในการทดสอบดังนี้

2.3.1) 2x2 table

เป็นวิธีที่ใช้ในการหาค่าความไว(Sensitivity) ความจำเพาะ(Specificity) และ ความถูกต้อง(Accuracy) ของวิธีที่ต้องการทดสอบโดยเทียบกับผลของวิธีมาตรฐาน โดยผลจากการทดสอบด้วยวิธี COCI จะถูกนำมาเทียบกับวิธีมาตรฐาน (CT scan) โดยมีการจัดวางตัวเลขลงในตาราง 2x2 ดังรูป

		การวินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐาน (Gold standard)	
		เป็นโรค	ไม่เป็น
ผลการตรวจที่ต้องการทดสอบ (Diagnostic test)	ผลบวก	a (True positive)	b (False positive)
	ผลลบ	c (False negative)	d (True negative)

รูปที่ 7 แสดงการคำนวณค่าคาคัดหมายด้วย 2x2 table

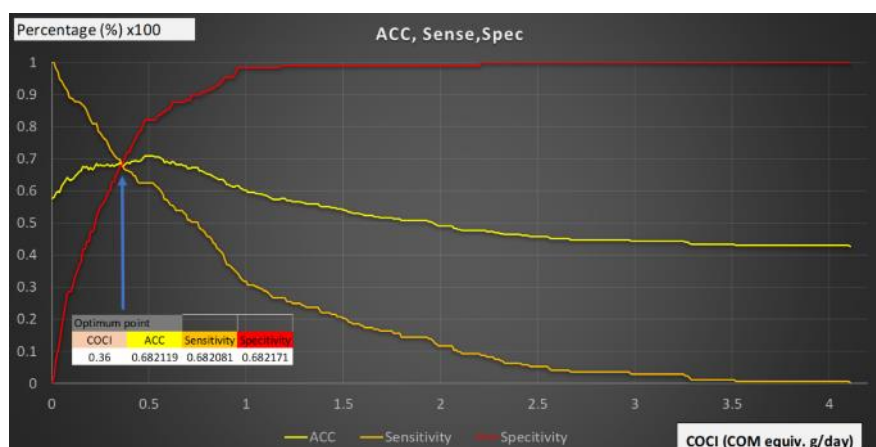
จากรูปข้างต้น สามารถคำนวณค่าต่าง ๆ ได้จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Sensitivity} = a / (a + c)$$

$$\text{Specificity} = d / (b + d)$$

$$\text{Accuracy} = (a + d) / (a + b + c + d)$$

ภายหลังจากการคำนวณค่าต่าง ๆ สามารถสร้างกราฟได้ดังนี้



รูปที่ 8 แสดงกราฟ Sensitivity Specificity และ Accuracy

จากรูปที่ 8 เป็นกราฟตัวอย่างที่ได้จากการหาปริมาณ CaOx ด้วยวิธี COCl ในปัสสาวะผู้ป่วยจำนวน 302 ราย โดยวัดผ่านเครื่องวัดมาตรฐาน GYNESIS spectrophotometer ด้วยความยาวคลื่น 215 nm แล้วนำไปหาค่า COCl จากนั้นทำการตรวจสอบความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และ ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธี COCl ได้จากการทดสอบด้วย 2x2 table ดังกล่าว แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟได้ดังรูปข้างต้น รูปกราฟแสดงแนวโน้มของค่าคาดหวังทั้ง 3 ค่า โดยจุดตัดระหว่างเส้นกราฟทั้ง 3 เส้นบ่งบอกถึง ค่า COCl ที่ทำให้ค่าคาดหวังทั้ง 3 ค่า มีค่าใกล้เคียงกัน จากกราฟที่ค่า COCl 0.36 ได้ผลลัพธ์ของค่าคาดหวังทั้ง 3 ค่าของวิธีการวัด COCl มีค่า 68.21 % แต่ทั้งนี้การเลือกค่าคาดหวังที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับดุลพินิจของแพทย์และผู้เชี่ยวชาญ

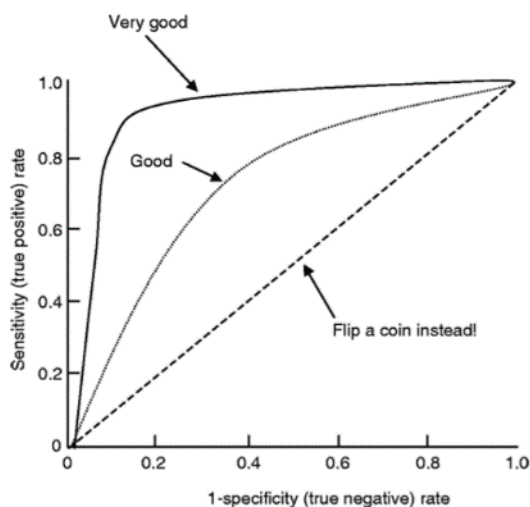
ค่าความไว (Sensitivity) หรือ “true positive rate” ของการตรวจคือสัดส่วนของผู้ป่วยที่ให้ผลการทดสอบเป็น บวกต่อผู้ป่วยทั้งหมด ในทางปฏิบัติควรเลือกใช้การตรวจที่มีค่า Sensitivity สูงๆ ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยสำหรับโรคที่มีความรุนแรงมากแต่สามารถรักษาได้ ซึ่งหากผู้ป่วยไม่ได้รับการวินิจฉัยทั้งที่เป็นโรคจะทำให้ ผู้ป่วยเสียประโยชน์มาก นอกจากนี้ยังเหมาะจะใช้เป็นการตรวจเบื้องต้นเพื่อลดจำนวนผู้ป่วยที่จะต้องทำการ ตรวจที่จำเพาะขึ้นเพื่อการวินิจฉัยต่อไป

วิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยที่มีค่าความจำเพาะ (Specificity) หรือ “true negative rate” สูง หมายความว่า ผู้ป่วยที่ให้ผลการตรวจเป็นบวกมีโอกาสที่จะเป็นโรครจริงสูง ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการยืนยันการวินิจฉัยในกรณีที่มีข้อมูลจากการตรวจอื่นชี้แนะมาบ้างแล้วว่าผู้ป่วยน่าจะป่วยด้วยโรคนั้น การตรวจที่มีคุณสมบัตินี้มีประโยชน์ในกรณีที่ผลบวกจะก่อให้เกิดผลเสียแก่ผู้ป่วยอย่างมากทั้งด้านจิตใจ และการรักษาเสี่ยงต่ออันตราย เช่น กรณีของโรคมะเร็ง หรือทางด้านค่าใช้จ่ายในการรักษา เป็นต้น ดังนั้นการตรวจที่มี Specificity สูงจึงมีประโยชน์มากในกรณีที่ผลการทดสอบเป็นบวก [19]

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยมุ่งเน้นค่าคาดหวังที่มีค่าความไวสูงและค่าความจำเพาะ ไม่ต่ำกว่า 60 % มาใช้ในงานวิจัยเพื่อใช้แยกผู้ป่วยที่เสี่ยงและไม่เสี่ยงต่อโรคนิวไตออกจากกัน

2.3.2) Receiver Operating Characteristic (ROC) Curves

วิธีการที่สามารถนำมาใช้เพื่อเลือกจุดตัด (cut-off point) ที่เหมาะสมได้ คือการสร้าง Receiver Operator Characteristic (ROC) Curve คือสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง True Positive Rate (Sensitivity) กับ False Positive Rate (1-Specificity) โดยการแปรค่าจุดตัด (cut-off point) ที่ใช้ต่าง ๆ กัน ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงกราฟ Receiver Operator Characteristic (ROC) Curve [19]

วิธีการคัดกรองโรคที่ดีควรมีค่า Sensitivity สูง และมี Specificity สูง ซึ่งการมีค่า Specificity สูง จะทำให้มี False Positive Rate ต่ำ ส่งผลให้ ROC curve แนบชิดมุมซ้ายบนมากที่สุด นอกจากนี้การสร้าง ROC curve ยัง ช่วยในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัย ได้จากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้เส้นโค้งของการวิธีการตรวจคัดกรองโรคแต่ละวิธี โดยพื้นที่ใต้โค้งที่มากกว่าแสดงถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่า [20]

2.4) ระบบตรวจวัดแคลเซียมออกซาเลต

การพัฒนาาระบบตรวจวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตอาศัยหลักการการวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตด้วยวิธี iCOCl โดยแต่ละขั้นตอนจะถูกออกแบบให้ระบบตรวจวัดสามารถทำงานได้ โดยจะประกอบด้วยทั้งหมด 5 ระบบย่อย คือ ระบบกรองสาร ระบบผสมและนำส่งสาร ระบบสร้างความร้อน ระบบปั่นเหวี่ยง และระบบวัดแสง ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการพัฒนาในส่วน of ระบบผสมและนำส่งสาร และระบบวัดแสง ให้สามารถทำงานร่วมกันในการทดสอบหาปริมาณแคลเซียมออกซาเลตสำหรับใช้คัดกรองผู้ป่วยโรคนี้ไว้ ซึ่งหลักการการทำงานของระบบมีดังต่อไปนี้

2.4.1) ระบบผสมและนำส่งสาร

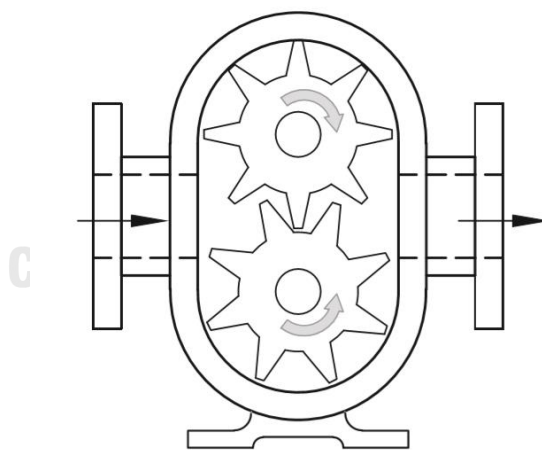
ในการผสมและนำส่งสารจะใช้ปั๊มโรตารี (Rotary Pumps) ด้วยมอเตอร์ทำงานโดยอาศัยหลักการแทนที่ของเหลว ภายในห้องของตัวปั๊มด้วยการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วน ซึ่งหมุนเพื่อทำให้เกิดความแตกต่างของความดันภายในระบบของเหลวจะถูกดูดเข้าและอัดทำให้เกิดแรงดันสูงขึ้นแล้วปล่อยออกมาทางด้านปล่อย ชิ้นส่วนที่หมุนดังกล่าวเรียกว่าโรเตอร์(Rotor) การหมุนของโรเตอร์ จะ

ก่อให้เกิดการแทนที่ของของเหลวขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ของไหลที่ไหลผ่านปั๊มมีอัตราการไหลอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ดังหัวข้อ 2.4.1.1) [21]

ปั๊มแบบนี้จะมีอัตราการสูบน้ำต่ำกว่าปั๊มประเภทอื่น ๆ เนื่องจากอัตราการแทนที่ของเหลวมีค่าต่ำ โดยทั่วไปจะมีประสิทธิภาพประมาณ 80 – 85 % [21] ขึ้นอยู่กับการสูญเสียเนื่องจากความเสียดทาน และคุณลักษณะของของไหลที่ถูกสูบ

2.4.1.1) ปั๊มโรตารีแบบเกียร์

ปั๊มชนิดนี้นิยมใช้กันแพร่หลาย ของเหลวจะถูกดูดด้วยอัตราคงที่ ทำให้การไหลเป็นไปอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา เหมาะกับงานที่ต้องการสูบของเหลวที่มีความหนืดสูง เช่น ในระบบไฮดรอลิกส์ [22] ในระบบหล่อลื่นของเครื่องยนต์ทั่ว ๆ ไป เป็นต้น ภายในปั๊มจะประกอบด้วยเฟืองเกียร์ 2 ตัว หมุนขบกันอยู่ ซึ่งง่ายต่อการซ่อมแซม ทำความสะอาด และสามารถถอดประกอบใหม่ได้ โดยประสิทธิภาพการทำงานของปั๊มประเภทนี้ค่อนข้างสูง เมื่อทำงานกับของไหลที่มีคุณสมบัติเป็นสารหล่อลื่น ซึ่งในระบบผสมและนำส่งสารผู้วิจัยเลือกใช้ปั๊มประเภทนี้ในการดูด Indole reagent เพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายผลึกแคลเซียมออกซาเลต



รูปที่ 10 ปั๊มโรตารีแบบเกียร์[23]

2.4.2) ระบบวัดแสง

ระบบวัดแสงประกอบไปด้วยส่วนเซนเซอร์แสง และส่วนควบคุม โดยการทำงานของเซนเซอร์แสงจะมีหลักการคล้ายการทำงานของทรานส์ดิวเซอร์ (Transducer) คือ ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงค่าความเข้มแสง หรือปริมาณทางฟิสิกส์ให้เป็นปริมาณทางไฟฟ้า

ในการใช้งานเซนเซอร์ในระบบวัดแสงเพื่อที่จะได้ผลการวัดที่ถูกต้อง มีความน่าเชื่อถือ และไม่เป็นอุปสรรคในการวัดนั้น เซนเซอร์ควรมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ

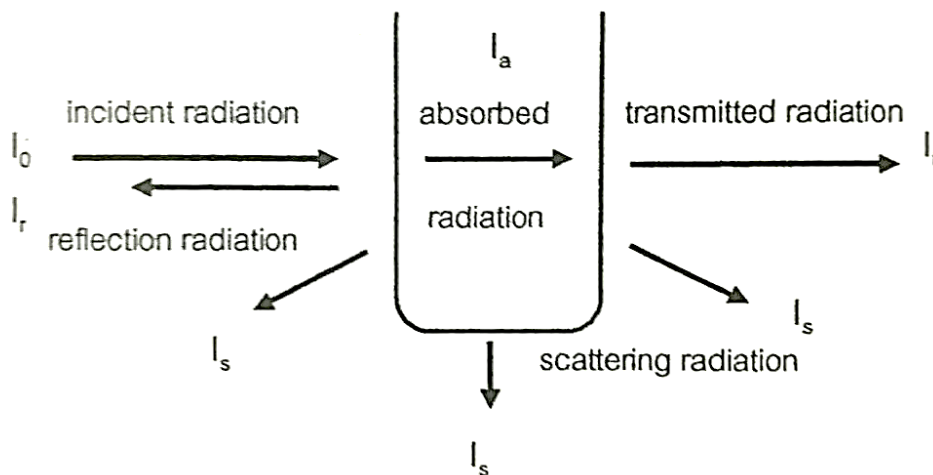
- ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) หมายถึง ความสามารถในการเลือกหรือความจำเพาะในการวัด เนื่องจากเซนเซอร์ที่ดีควรจะตอบสนองกับสิ่งที่เป้าหมายในการวัดเท่านั้น
- ความไว (Sensitivity) หมายถึง ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งที่เป้าหมายในการวัด กล่าวคือ หากเซนเซอร์มีความไวในการวัดสูงจะทำให้มีความละเอียดในการวัดที่ดีตามมา
- ช่วงของการวัด (Range) เซนเซอร์ควรมีช่วงของการวัดที่กว้างในช่วงของปริมาณที่เราสนใจ โดยทั่วไปพิสัยของการวัดยิ่งกว้างจะทำให้สามารถใช้งานได้อย่างกว้างขวาง ในบางกรณีจะใช้คำว่า ช่วงที่สามารถวัดได้ (Dynamic range) กล่าวคือ ในเซนเซอร์บางชนิดจะมีช่วงของการวัดที่กว้างมากตั้งแต่ปริมาณต่ำ ๆ ถึงสูงมาก ๆ โดยทั่วไปความไวในการวัดนั้นจะดีเฉพาะปริมาณบริเวณกลาง ๆ และความไวจะต่ำลง ที่ปริมาณต่ำและสูงมาก ๆ ในกรณีเช่นนี้จะใช้คำว่าพิสัยเชิงจลน์แสดงในช่วงเฉพาะปริมาณบริเวณกลาง ๆ เท่านั้น
- ความเที่ยง (Precision) หรือความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) หมายถึง เมื่อปริมาณของเป้าหมายไม่มีการเปลี่ยนแปลง เซนเซอร์ควรมีความสามารถในการวัดโดยที่ยังให้ค่าเดิมและการกระจายของข้อมูลมีไม่มาก
- ความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึง เซนเซอร์ควรจะให้ผลการวัดที่ตรงกับค่าจริงของสิ่งที่ทำการวัด ความแม่นยำเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้อง [24]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับเซนเซอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเซนเซอร์สำหรับใช้ในการวัดแสงโดยใช้หลักการทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) เพื่อใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาชีวเคมีระหว่างออกซาลेटในสารละลายแคลเซียมออกซาลेटกับ indole reagent ให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกิริยาข้างต้นภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

การวัดโดยใช้หลักการทางสเปกโทรสโกปีจะทำการวัดการดูดกลืนแสงที่เกิดจากสีของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ กล่าวคือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่คงที่และต่อเนื่อง (Incident radiation, I_0) จะส่องผ่านหลอดทดลองหรือคิวเวทท์ ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงขึ้นกับความเข้มข้นของตัวอย่าง (Absorbed radiation, I_a) แสงที่ไม่ถูกดูดกลืนจะทะลุผ่านออกมา (Transmitted radiation, I_t) นอกจากนี้แสงบางส่วนเกิดการสะท้อน (Reflection radiation, I_r) และบางส่วนเกิดการกระเจิง (Scattering radiation, I_s) [25] ดังแสดงในรูปที่ 11 แต่แสงจากการสะท้อนและการกระเจิง

โดยทั่วไปมีค่าน้อยมาก จึงสามารถละเลยได้ ดังนั้นความเข้มแสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะเท่ากับ ความเข้มแสงที่ถูกดูดกลืนและความเข้มแสงที่ทะลุผ่าน



รูปที่ 11 การเกิดอันตรกิริยาของสารเคมีกับการแผ่รังสีของแสง[25]

จากกฎ Lambert-Beer การดูดกลืนแสง (Absorbance, A) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (Concentration, C) ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่าง (Length, L) และสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (Absorptivity, ϵ) ดังสมการที่ 1 การวัดการดูดกลืนแสงนั้นในบางกรณีก็สามารถที่จะทำการวัดการทะลุผ่านของแสง (Transmission, T) แทน เนื่องจากการดูดกลืนแสงและการทะลุผ่านของแสงในสารตัวอย่างจะแปรผกผันกัน โดยในทางปฏิบัติการดูดกลืนแสงหาได้จากอัตราส่วนระหว่างความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงกับความเข้มแสงที่ทะลุผ่าน โดยในที่นี้ความเข้มแสงที่ทะลุผ่านจะเท่ากับความเข้มแสงที่วัดได้ขณะที่มีออกซาเลตในสารละลายตัวอย่าง (I_{solution}) และความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงจะเท่ากับความเข้มแสงที่วัดขณะที่มีตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (I_{solvent}) ดังแสดงในสมการที่ 2

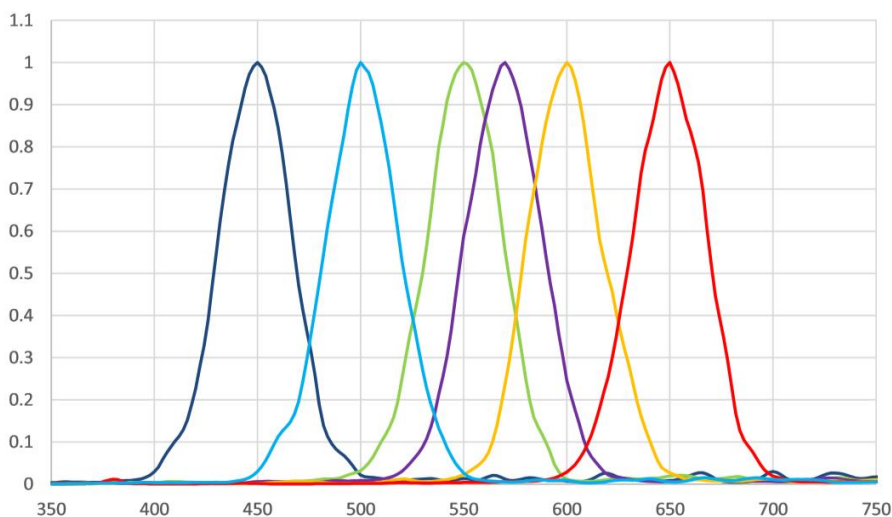
$$A = \epsilon \times l \times c \quad (1)$$

$$A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0} = -\log \frac{I_{\text{solution}}}{I_{\text{solvent}}} \quad (2)$$

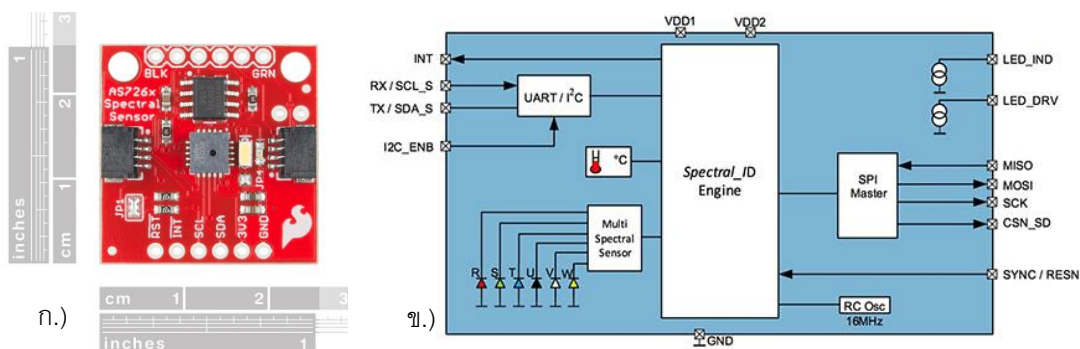
การวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยหลักการทางสเปกโทรสโกปี ในกรณีที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เพียงสารเดียว จะใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างมีการดูดกลืนแสงมากที่สุดเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (Blank) นำค่าที่วัดได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย เลือกพิสัยที่มีคุณสมบัติเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน จากนั้นเมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ก็จะสามารถหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้โดยการเทียบค่าจากกราฟมาตรฐาน [24]

ระบบวัดทางแสงมีข้อดี คือ สามารถตัดสัญญาณรบกวนทางไฟฟ้า เช่น สัญญาณรบกวนที่ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ของไฟฟ้ากระแสสลับ 220 โวลต์ได้ เนื่องจากไม่ได้วัดสัญญาณไฟฟ้าโดยตรง ง่ายต่อการเข้าใจและจัดการ มีความแม่นยำและความไวในการวัดสูง เครื่องมือที่ผลิตมีขนาดเล็กลง พกพาสะดวกออกนอกสถานที่ได้ และมีราคาไม่สูง [24, 25]

โดยในงานวิจัยนี้จะนำอุปกรณ์ AS7262 ซึ่งเป็นเซนเซอร์แสงที่ตอบสนองและแสดงผลของแสงได้ 6 ช่วงคลื่นสีดังรูปที่ 12 ภายในเซนเซอร์สามารถกรองแสงเพื่อลดแสงรบกวนจากภายนอกได้ด้วย CMOS ซิลิกอน มีลักษณะการทำงานโดยแต่ละพิกเซลจะมีวงจรร้อยย่อยเปลี่ยนค่าแสงที่เข้ามาเป็นสัญญาณดิจิทัลในทันที



รูปที่ 12 แสดงช่วงสีที่เซนเซอร์แสงตอบสนอง



รูปที่ 13 แสดงรูปเซนเซอร์แสง AS7262 ก.) ลักษณะภายนอกของเซนเซอร์ ข.)ระบบภายในเซนเซอร์

ข้อดีของการใช้โมดูลเซนเซอร์นี้ คือ มีความเสถียรในการกรองแสงแม้จะใช้งานในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง และค่าที่ได้ยังมีความคงที่เมื่อผ่านการใช้งานเป็นเวลานานเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ตอนแรกเริ่มทดสอบ นอกจากนี้ในตัวเซนเซอร์มี Chip AS7262 ที่คอยประมวลผลการทดสอบซึ่งช่วยลดต้นทุนในการผลิต และยังสามารถให้แสงกับตัวอย่างโดยไม่ต้องใช้แหล่งกำเนิด แสงจากเครื่องมืออื่นอีกด้วย โดยคุณสมบัติพื้นฐานของเซนเซอร์มีดังนี้

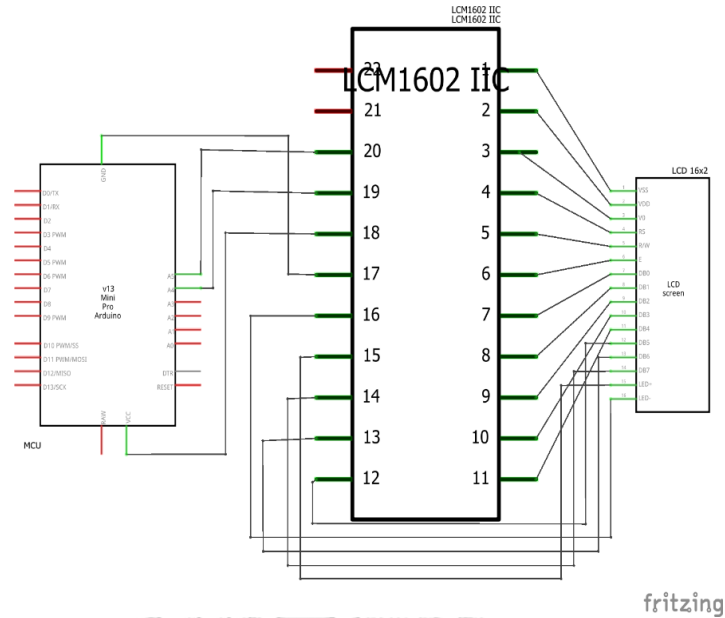
ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติของเซนเซอร์แสง AS7262

Sensor Type	6-channel visible interference 430-670nm
Application(s)	Color/Content analysis, visible spectrometry
I/O	I ² C master or UART (mode configurable)
Package	20-pin LGA with aperture
Size [mm]	4.5 x 4.7 x 2.5
Supply Voltage [V]	2.7 to 3.6
Temperature Range [°C]	-40 to 85

2.4.3) ระบบแปลและแสดงผล

ในการแปลผลการทดสอบจากระบบวัดแสง หลังจากที่ผู้วิจัยจะทำการทดสอบหาค่าทางการแพทย์ของกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งจะได้ค่า cut-off ที่เหมาะสมมา หลังจากนั้นจะทำการโปรแกรมสั่งให้ MCU ในระบบวัดแสงเก็บค่า cut-off ที่เหมาะสมจากการทดสอบก่อนหน้า เมื่อทำการวัดตัวอย่างปัสสาวะที่สนใจหาค่าที่ได้มากกว่าค่า cut-off ที่เก็บไว้ใน MCU ระบบจะแสดงผลค่าที่วัดได้และแสดงสถานะ “Patient” เพื่อบอกถึงความเสี่ยงสูงต่อโรคนิวไต ออกทางหน้าจอ LCD

กลับกันหากค่าที่วัดได้น้อยกว่า cut-off ระบบจะแสดงผลค่าที่วัดได้และแสดงสถานะ “Healthy”
เพื่อบอกถึงความเสี่ยงต่อโรคโควิด โดยมืวงจรระบบดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ภาพรวมวงจรแปลและแสดงผล

บทที่ 3 วัสดุและแผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.1) วัสดุและสารเคมี

3.1.1 Calcium oxalate monohydrate ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})$, Sigma-Aldrich laborchemikalien, Germany)

3.1.2 Oxalic acid ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.W. 126.07)

3.1.3 Calcium Chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EMSURE®, Germany)

3.1.4 Hydrochloric acid 37% (HCL, Code: H8040-1-2501 151740-0419, QRëCTM, New Zealand)

3.1.5 Sulfuric acid (H_2SO_4 95-97%, EMSURE®, Germany)

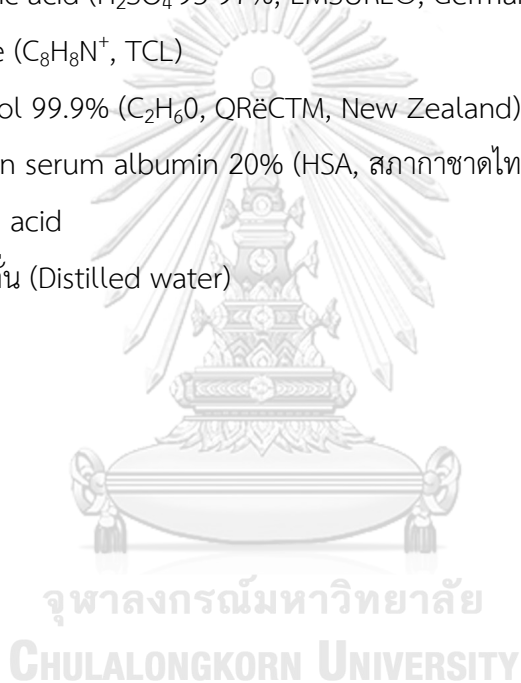
3.1.6 Indole ($\text{C}_8\text{H}_8\text{N}^+$, TCL)

3.1.7 Ethanol 99.9% ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, QRëCTM, New Zealand)

3.1.8 Human serum albumin 20% (HSA, สภาภาษาชชาติไทย)

3.1.9 Acetic acid

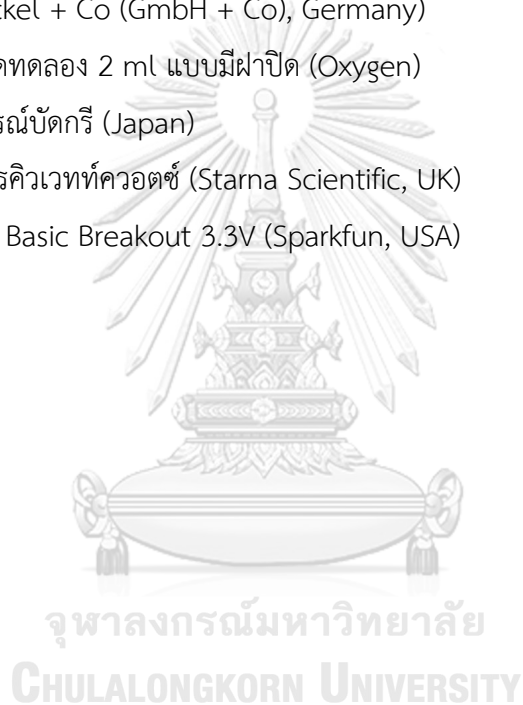
3.1.10 น้ำกลั่น (Distilled water)



3.2) อุปกรณ์และเครื่องมือ

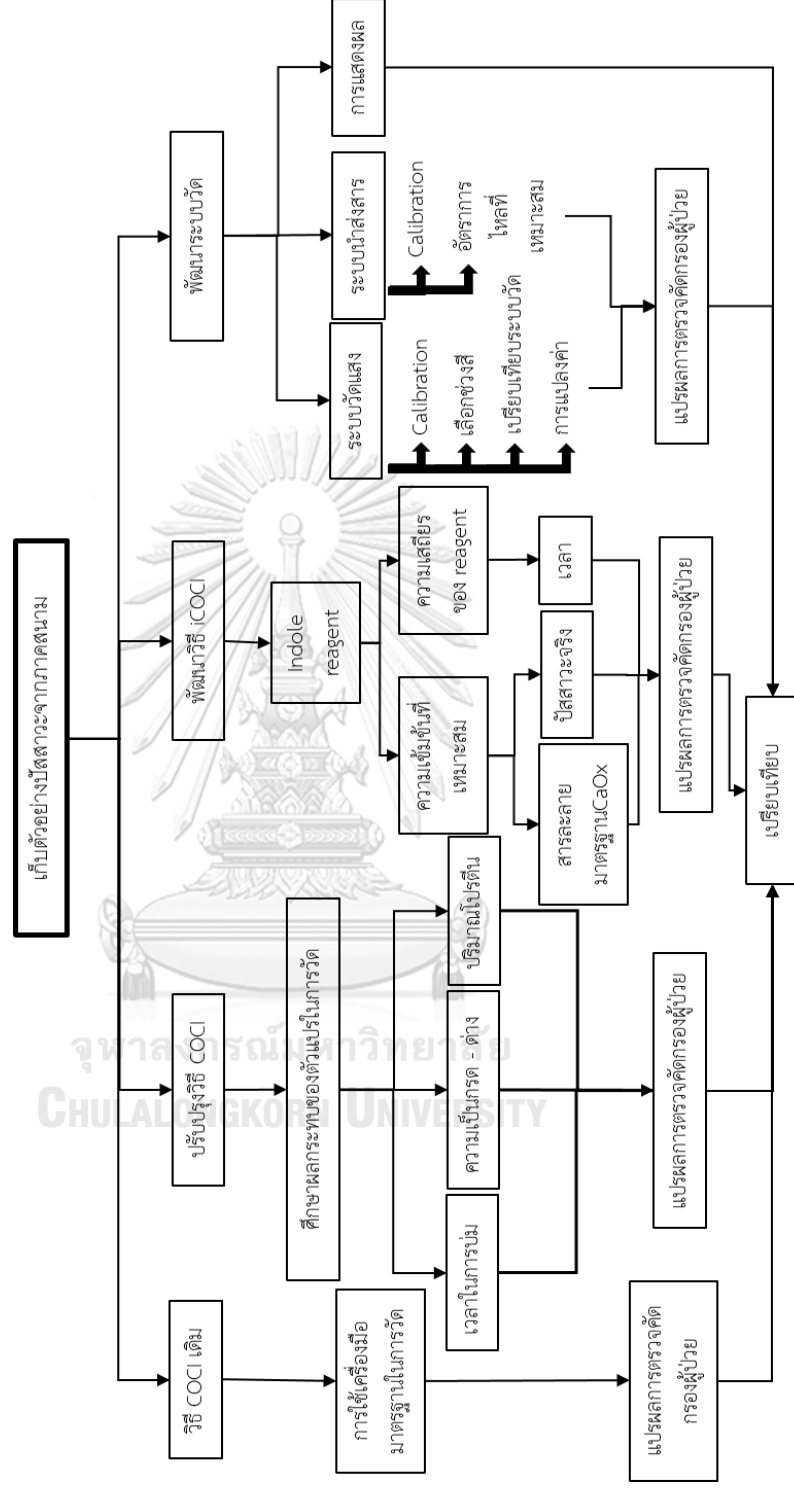
- 3.2.1 เครื่องชั่งน้ำหนักจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ช่วง 0.01g-210g) (OHAUS, รุ่น Pioneer® Plus Analytical, บริษัท Mettler-Toledo AG, Switzerland)
- 3.2.2 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, HANNA, รุ่น HI-2002 Edge®, Hanna Instruments, UK)
- 3.2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (MIKRO 220, Hettich, Germany)
- 3.2.4 GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- 3.2.5 Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- 3.2.6 Pipette 1-10 µL (Eppendorf, Hamburg Germany)
- 3.2.7 Pipette 20-100 µL (Eppendorf, Hamburg Germany)
- 3.2.8 Pipette 100-100 µL (Eppendorf, Hamburg Germany)
- 3.2.9 Pipette Micro Tips (ZEROTIP™, Guangzhou JET Bio-Filtration Co., Ltd, China)
- 3.2.10 ตู้เย็น อุณหภูมิ 4°C (Panasonics, รุ่น NR-BU343SN, Panasonics, Japan)
- 3.2.11 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 °C (SANDENINTERCOOL, บริษัท Sanden Intercool, Thailand)
- 3.2.12 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -40 °C (Haier, บริษัท Haier, Lahore Pakistan (Made in China))
- 3.2.13 ตู้ดูดควัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.2.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath - Digital Heat, รุ่น DH-30-110, บริษัท SciPro, Thailand)
- 3.2.15 อ่างน้ำวน
- 3.2.16 เครื่องล้างทำความสะอาดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Elma Elmasonic S, DKSH)
- 3.2.17 Microplate spectrophotometer (Thermo Scientific , Multiskan™ GO,USA)
- 3.2.18 เครื่องปั่นเหวี่ยง 15000 rpm
- 3.2.19 ตู้อบหลอดทดลอง
- 3.2.20 เครื่อง Laboratory power supply จ่ายไฟ 12 V
- 3.2.21 Rotary pump 12 V
- 3.2.22 Motor drive L298N (Arduinoall, Thailand)
- 3.2.23 AS7262 Spectrum sensing (Sparkfun, USA)

- 3.2.24 LCD 1602 + module I²C (China)
- 3.2.25 บอร์ด Arduino UNO (R3, Italy)
- 3.2.26 บอร์ด Arduino Pro mini (Italy)
- 3.2.27 ท่อยางทนกรดเทฟลอน(PTFE) 4x6 และ 2x4 มม. (Westbound, Thailand)
- 3.2.28 ตัวต้านทานปรับค่าได้ 3 ขา
- 3.2.29 White LED
- 3.2.30 Vial glass tube 5 ml
- 3.2.31 ปีกเกอร์ ขนาด 50 ml, 1,000ml และ 2,000 ml (Beaker, ยี่ห้อ BOECO, บริษัท Boeckel + Co (GmbH + Co), Germany)
- 3.2.32 หลอดทดลอง 2 ml แบบมีฝาปิด (Oxygen)
- 3.2.33 อุปกรณ์บัดกรี (Japan)
- 3.2.34 ไมโครคิวเวทท์ควอตซ์ (Starna Scientific, UK)
- 3.2.35 FTDI Basic Breakout 3.3V (Sparkfun, USA)



3.3) แผนผังการดำเนินงาน

แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย เป็นดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 15 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.4) การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (C.V.) และข้อมูลบางส่วนจะถูกนำมาหาค่าความแม่นยำ(Accuracy) ค่าความไว(Sensitivity) และค่าความจำเพาะ(Specificity) ด้วยโปรแกรม Graphpad prism 5.0

3.5) สถานที่ดำเนินงานวิจัย

- ห้องหลักสูตรวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ห้อง CB Lab 806 ตึกแพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 4 กระบวนการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1) การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

การเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเก็บตัวอย่าง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มคนสุขภาพดีและ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดยทั้งสองกลุ่มจะถูกเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจะทำการเก็บก่อนนิ่วไตด้วย เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาประเภทของนิ่ว โดยการเก็บตัวอย่างนิ่วจะทำการผ่าตัดโดยศัลยแพทย์ที่ชำนาญการในหน่วยวิทยาทางเดินปัสสาวะ ที่โรงพยาบาลมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม ในส่วนของกลุ่มตัวอย่างที่ได้เป็นชาวบ้านที่อาศัยอยู่ใน อำเภอแกลง จังหวัดมหาสารคาม โดยปัสสาวะที่ได้จะนำมาแช่แข็งเพื่อเป็นสารตัวอย่างในการนำมาวัดทดสอบต่อไป

4.1.1) กลุ่มประชากรเป้าหมาย(Target Population)

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria) : ผู้ป่วยโรคนิ่วไต อายุระหว่าง 18 ปีขึ้นไปที่มีประวัติการเข้ารับการได้รับการรักษาจากฝ่าย Urology โรงพยาบาลมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) : ผู้ป่วยที่มีปัสสาวะสีแดงปนเลือด หรือกินยาที่ทำให้ปัสสาวะเกิดการเปลี่ยนสี รวมถึงผู้ป่วยเป็นโรคชนิดอื่น เช่น ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ และผู้ป่วยที่งดอาหาร ให้น้ำเกลือเลือด หรือสารอื่นทางหลอดเลือด

4.1.2) กลุ่มประชากรควบคุม(Healthy controls) วิทยาลัย

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria) : อาสาสมัครสุขภาพดีช่วงอายุ 18 ปีขึ้นไป

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) : ประชากรกลุ่มอาสาสมัครที่มีอาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ รวมถึงผู้ป่วยที่เป็นโรคนิ่วไต

4.2) การทดสอบด้วยวิธี COCI (แบบเดิม)[9]

ตัวอย่างปัสสาวะที่ได้จากการเก็บที่ภาคสนามจะถูกนำมาทดสอบหาปริมาณแคลเซียมออกไซด์ (CaOx) ในปัสสาวะด้วยการทำให้เกิดการตกตะกอน CaOx ในปัสสาวะด้วยวิธี COCI เพื่อเป็นการเก็บข้อมูลและประเมินความเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิ่วไตของอาสาสมัครทุกคนที่เข้าร่วมรับการทดสอบ ซึ่งการทดสอบด้วยวิธีนี้สามารถใช้ได้กับผู้ป่วยที่เป็นนิ่วชนิด CaOx โดยขั้นตอนในการทดสอบด้วยวิธี COCI มีดังนี้

1) นำปัสสาวะที่ถูกเก็บ 24 ชั่วโมงจากกลุ่มตัวอย่างคนสุขภาพดีและกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคนิ่วมากรองด้วย 0.22 μm membrane filter เพื่อกรองโปรตีนและสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออกไป ทั้งนี้แคลเซียมไอออน ออกซาเลตไอออน รวมถึงสารที่ต้องการวัดจะไม่ถูกกรองออกไป

2) ใส่สารละลาย oxalate 2 mM ปริมาณ 50 μL (เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างผลึก) , สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 100 mM จำนวน 1 mL และใส่ตัวอย่างปัสสาวะที่ต้องการตรวจสอบ 950 μL จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubated 37°C ที่อ่างน้ำร้อนแบบนิ่ง 60 นาที

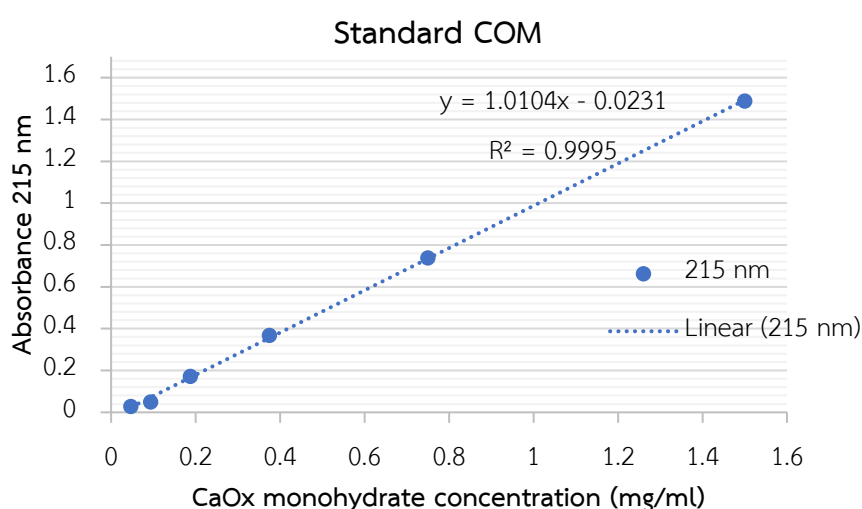
3) นำสารจากข้อที่แล้วไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 15,000 rpm 15 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย acetic acid 2 M 500 mL แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

4) นำสารที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 15,000 rpm 15 นาที อีกครั้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 rpm 15 นาที แล้วดูสัดส่วนใส่ออกให้เหลือเพียงตะกอน

5) ละลายตะกอน CaOx ที่เหลือด้วย HCl 2 N ปริมาณ 0.5 mL และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 nm ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000c

6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Calcium oxalate monohydrate (COM) ที่ความเข้มข้น 0.094, 0.188, 0.375, 0.75 และ 1.5 mg/mL ตามลำดับ เพื่อใช้เป็น standard curve ในการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของ CaOx ที่วัดได้จากตัวอย่างปัสสาวะ

หมายเหตุ : ในการหาค่า COCI จะมีการเตรียมสารละลายออกซาเลต 2 mM ในน้ำกลั่นทุกครั้งเพื่อใช้หาค่า Absorbance ที่ใส่ไปในขั้นแรกของการทดลองเพื่อให้ทราบค่า Absorbance จริงของตัวอย่างปัสสาวะนั้น



รูปที่ 16 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต

โดยสามารถคำนวณค่า COCI ได้ดังนี้

$$OD_{urine} = OD_{Ox-spiked\ urine} - OD_{STD\ 2\ mM\ Ox}$$

ค่าการดูดกลืนแสงหรือ OD ที่วัดได้จากเครื่องวัดจะเป็น $OD_{Ox-spiked\ urine}$ ยังไม่ใช่ค่า OD จริงของตัวอย่างปัสสาวะที่วัดได้ซึ่งจะต้องไปหักลบกับ $OD_{STD\ 2\ mM\ Ox}$ ซึ่งเตรียมไว้ในตอนแรกของการทำการทดลอง(เตรียมใหม่ทุกครั้งทำการทดลอง) จึงจะได้ค่า OD จริงของตัวอย่างปัสสาวะ (OD_{urine}) จากนั้นเพื่อหาค่า COCI จะใช้สูตรต่อไปนี้

$$COCI = (OD_{urine} + C) / \text{Slope of STD curve}$$

เมื่อค่า C เป็นค่าคงตัวจากสมการสารละลายมาตรฐานที่นำมาใช้เทียบค่า

ภายหลังจากได้ค่า COCI จะนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน คือ CT scan รวมทั้งการวิเคราะห์ชนิดของก้อนนิ่วด้วยวิธี FTIR ต่อไป

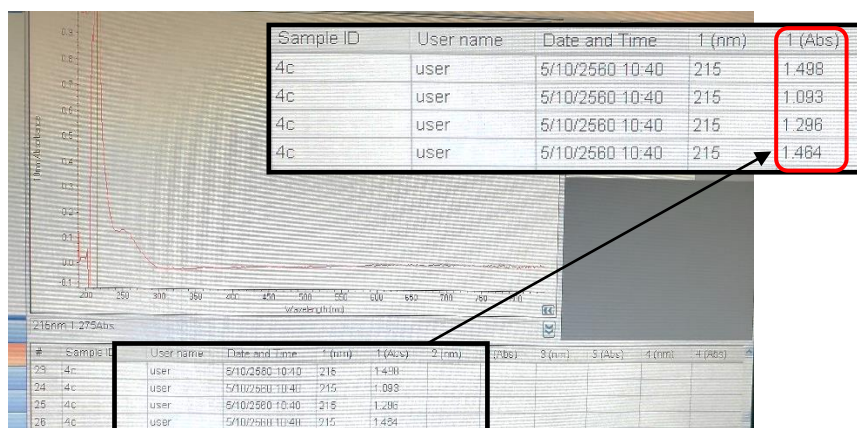
4.3) การทดสอบความถูกต้องของการวัดด้วยอุปกรณ์มาตรฐาน

4.3.1) การปรับเปลี่ยนเครื่องมือตรวจวัดมาตรฐาน

ในส่วนการปรับเครื่องมือตรวจวัดมาตรฐาน จะมุ่งเน้นการนำเสนอถึงปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลอง รวมถึงการแก้ไข และปรับเปลี่ยนระบบในการวัดให้มีความคลาดเคลื่อนน้อยลง และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

4.3.1.1) การวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Nanodrop

ในช่วงแรกของการวิจัย ผู้วิจัยได้ลองทดสอบการวัดปริมาณแคลเซียมออกซาลेटในปัสสาวะผู้ป่วยด้วยวิธี COCI โดยใช้เครื่อง Nanodrop 2000c spectrophotometer ในการอ่านแปลผลค่าการดูดกลืนแสงแล้วแสดงผลผ่านโปรแกรม พบว่า ค่า OD ที่วัดได้จากเครื่องค่อนข้างไม่คงที่ ดังรูปที่ 12



รูปที่ 17 แสดงค่า OD ที่วัดได้จากเครื่อง Nanodrop 2000c spectrophotometer

จากรูปที่ 16 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง Nanodrop 2000c ในตัวอย่างปัสสาวะเดียวกัน มีความคลาดเคลื่อนของข้อมูลค่อนข้างมาก (ค่าน้อยสุดและมากที่สุดที่วัดได้ คือ 1.093 และ 1.498 ตามลำดับ) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบกับเครื่องวัด Nanodrop 2000c รุ่นเดียวกันอีกเครื่องหนึ่งเพื่อยืนยันผลการวัด



รูปที่ 18 แสดงเครื่อง Nanodrop 2000c spectrophotometer
(ที่มา : <https://www.labandprocess.com/en/products/nanodrop-2000c>)

4.3.1.2) การเปรียบเทียบความคลาดเคลื่อนของเครื่องวัด Nanodrop

เพื่อยืนยันผลการทดลองที่มีความคลาดเคลื่อนของข้อมูลมากกว่า 20 % ผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบผลการทดลองจากการเตรียมสารละลายมาตรฐานเครื่องมือวัดรุ่นเดียวกัน (Nanodrop 2000c spectrophotometer) แต่เป็นคนละเครื่องกัน โดยผลการทดลองมีดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงค่า Average, SD และ CV (Coefficient of variation) รวมของค่า OD สารละลาย
มาตรฐานออกซาเลต (ใช้อุปกรณ์วัดของคณะแพทยศาสตร์)

Oxalate Conc. (mM)	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	SD	CV(%)
1	2.125	1.597	1.754	1.825	0.271	14.854
1.5	0.623	0.634	0.657	0.638	0.017	2.719
2	0.938	0.822	0.871	0.877	0.058	6.640
3	0.862	0.845	1.006	0.904	0.088	9.781
4	1.028	1.018	1.006	1.017	0.011	1.083

ตารางที่ 4 แสดงค่า Average, SD และ CV (Coefficient of variation) รวมของค่า OD ของ
สารละลายมาตรฐานออกซาเลต (ใช้อุปกรณ์วัดของคณะวิศวกรรมศาสตร์)

Oxalate Conc. (mM)	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	SD	CV(%)
1	2.190	2.267	2.022	2.160	0.125	5.801
1.5	0.701	0.724	0.682	0.702	0.021	2.995
2	0.938	0.912	0.939	0.930	0.015	1.647
3	0.870	0.890	1.031	0.930	0.088	9.432
4	1.142	1.154	0.923	1.073	0.130	12.120

จากตารางที่ 3 และ 4 จะสังเกตเห็นวงกลมสีแดงซึ่งบ่งบอกตัวเลขค่าความคลาดเคลื่อนของ
ผลการทดลองที่เกิดจากเครื่องมือวัดซึ่งเครื่อง Nanodrop 2000c ของทางคณะแพทยศาสตร์ และ
วิศวกรรมศาสตร์ได้ค่าความคลาดเคลื่อนของข้อมูล 14.854 และ 12.120 % ตามลำดับ

4.3.1.3) การใช้เครื่อง GENESYS ในการวัด Absorbance

ภายหลังจากทราบค่าความคลาดเคลื่อนจากเครื่องวัด Nanodrop 2000c จึงได้ใช้เครื่อง Thermo Scientific GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer ดังรูปที่ 18 ซึ่งมีความสามารถในการตอบสนองต่อการวัดแสงในช่วงความยาวคลื่น 190-1100 nm ในการทดสอบวัดควบคู่กับเครื่อง Nanodrop 2000c



รูปที่ 19 แสดงเครื่อง GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer

4.3.1.4) การเปรียบเทียบความคลาดเคลื่อนของเครื่องวัด Nanodrop และ GENESYS

เมื่อได้เครื่อง Thermo Scientific GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer หรือเครื่อง GENESYS มาทางผู้วิจัยจึงได้ทำการหาค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากเครื่องมือวัดนี้ รวมถึงเปรียบเทียบค่าความคลาดเคลื่อนกับเครื่อง Nanodrop 2000c โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตแล้วทำการวัดด้วยเครื่อง GENESYS ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 5 แสดงค่า Average, SD และ CV ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตจากเครื่อง GENESYS

Oxalate Conc. (mM)	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	SD	CV(%)
1	0.224	0.223	0.223	0.223	0.001	0.448
1.5	0.395	0.394	0.394	0.394	0.001	0.258
2	1.038	1.039	1.040	1.039	0.001	0.096
3	1.458	1.457	1.456	1.457	0.001	0.069
4	1.974	1.974	1.974	1.974	0.000	0.000

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากเครื่อง GENESYS ซึ่งมีน้อยมากเพียง **0.448 %** เมื่อเทียบกับเครื่อง Nanodrop 2000c ซึ่งมีค่าความคลาดเคลื่อนมากกว่า (Error 12-14 %) เครื่อง GENESYS ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่อง GENESYS เป็นเครื่องมือที่ใช้หาค่าความเข้มข้นของ CaOx ด้วยวิธี COCl แทนการใช้เครื่อง Nanodrop ที่ให้ค่าความคลาดเคลื่อนมากกว่า นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองทำซ้ำเพื่อหาค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากการทดลองซ้ำและวัดโดยเครื่อง GENESYS โดยทำการทดลองในแบบตารางที่ 5 ข้างต้น ซ้ำจำนวน 3 รอบโดยมีเงื่อนไขของวิธีการทดลองเหมือนกันแต่มีการปรับเปลี่ยนช่วงของปริมาณออกซาเลตที่นำมาใช้ทดลองเป็น 2 – 4 mM โดยตัดช่วงของปริมาณออกซาเลตที่ต่ำกว่า 2 mM ออกไปเนื่องจากมีความคลาดเคลื่อนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงอื่น ๆ ภายหลังจากการทดลองค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่า CV ของแต่ละรอบ รวมถึงการหา CV รวมจากผลการทดลองซ้ำทั้ง 3 รอบ ได้ผลดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงค่า Average และ CV ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตจากเครื่อง GENESYS

จากการทำการทดลองซ้ำ 3 รอบ

Ox Final conc. (mM)	AVG1	CV1 (%)	AVG2	CV2 (%)	AVG3	CV3 (%)	CV ALL (%)
2	1.059	4.508	1.149	1.329	1.150	4.311	4.906
2.5	1.291	6.834	1.343	2.256	1.390	1.735	4.623
3	1.571	1.158	1.664	2.377	1.586	1.566	2.998
3.5	1.816	0.805	1.847	1.752	1.787	2.097	1.928
4	1.968	1.774	2.087	0.914	2.044	1.774	2.777

จากตารางที่ 6 จะได้ผลจากการทดลองซ้ำ 3 รอบ แสดงค่าความคลาดเคลื่อนสูงสุดที่เกิดจากการวัดด้วยวิธี COCI มีค่าเท่ากับ 4.906 % ซึ่งเป็นค่าที่รวมค่าความผิดพลาดของผู้ทำการทดลองและค่าความผิดพลาดของเครื่องมือวัด โดยค่านี้จะถูกนำไปใช้เป็นค่าอ้างอิงในการบอกช่วงของค่า Sensitivity และ Specificity เพื่อใช้ในการคัดกรองต่อไป

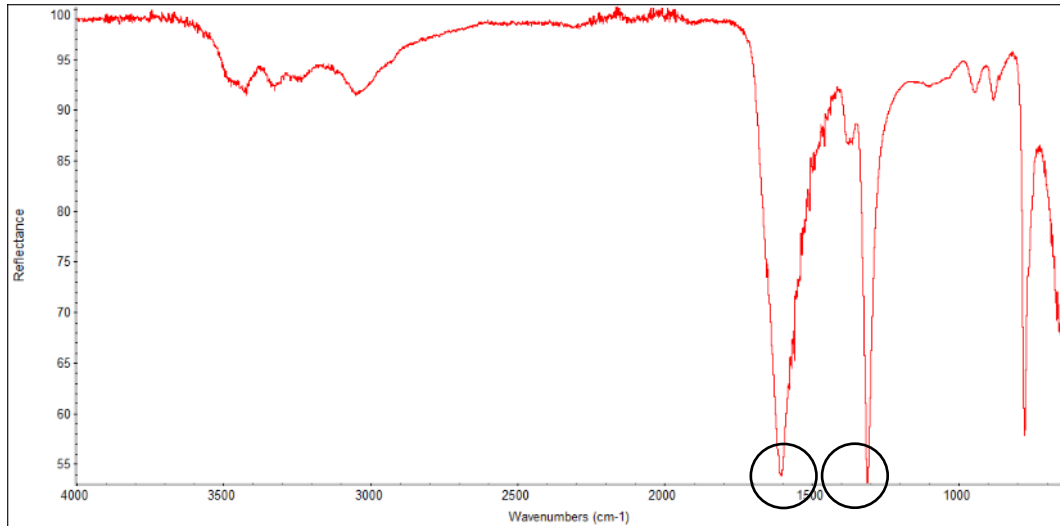
4.3.1.5) การทดสอบด้วย Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR)

เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อวิเคราะห์หาประเภทของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยการใช้รังสีอินฟราเรด ในการวิเคราะห์หาสารหรือธาตุที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างที่ต้องการวัด ในการทดลองครั้งนี้ใช้เครื่อง Thermo Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer เพื่อวิเคราะห์หาประเภทของนิ่ว ซึ่งนิ่วที่ได้นั้นได้มาจากผู้ป่วย โรงพยาบาลมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม โดยมีตัวอย่างก้อนนิ่ว รวมทั้งสิ้น 44 ตัวอย่าง โดยจะทำการวิเคราะห์ประเภทของนิ่ว 3 ประเภทได้แก่ Calcium oxalate, calcium phosphate และ Uric acid โดยตัวอย่างการวัดเป็นดังแสดงในรูปที่ 20-23



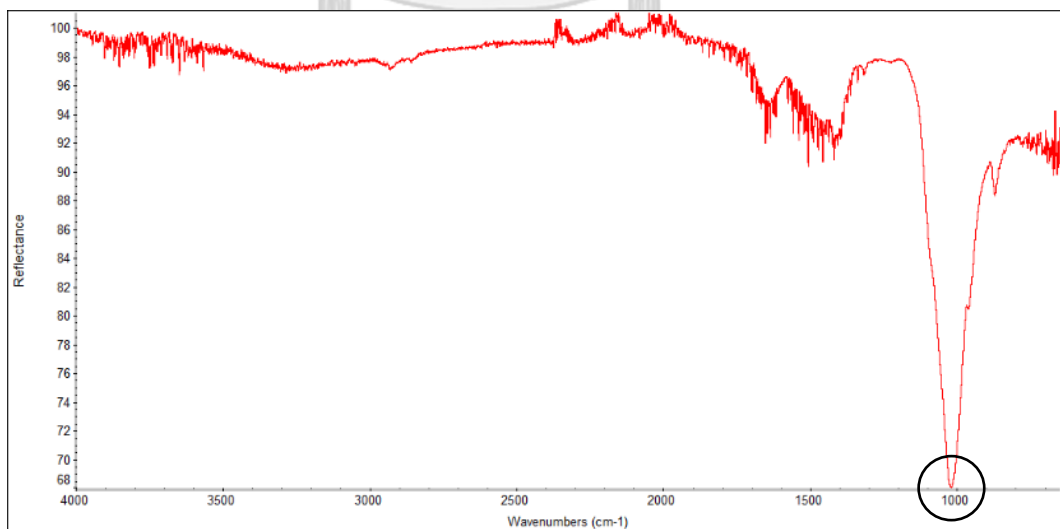
รูปที่ 20 แสดงเครื่อง Nicolet FT-IR spectrometer

Calcium oxalate : จะสามารถเห็นจุดยอดที่ 1400 และ 1600 cm^{-1} ดังรูป



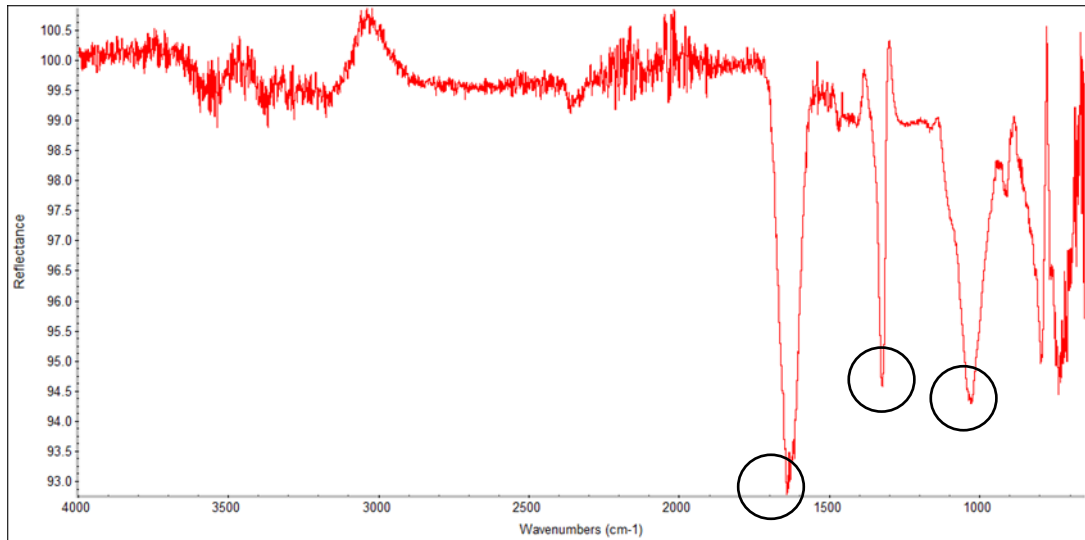
รูปที่ 21 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ก่อนนิวชนิด CaOx ด้วยวิธี FTIR

Calcium Phosphate : จะสามารถเห็นจุดยอดที่ 1000 cm^{-1} ดังรูป



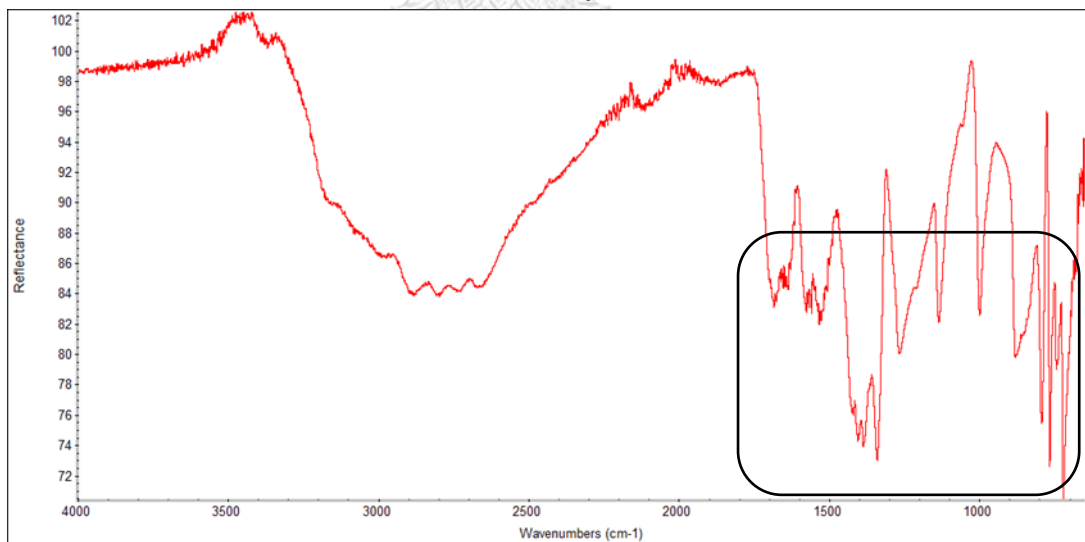
รูปที่ 22 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ก่อนนิวชนิด CaP ด้วยวิธี FTIR

Calcium oxalate + Calcium Phosphate : จะสามารถเห็นจุดยอดที่ 1000, 1400 และ 1600 cm^{-1} ดังรูป



รูปที่ 23 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ก่อนนิ่วชนิด CaOx+CaP ด้วยวิธี FTIR

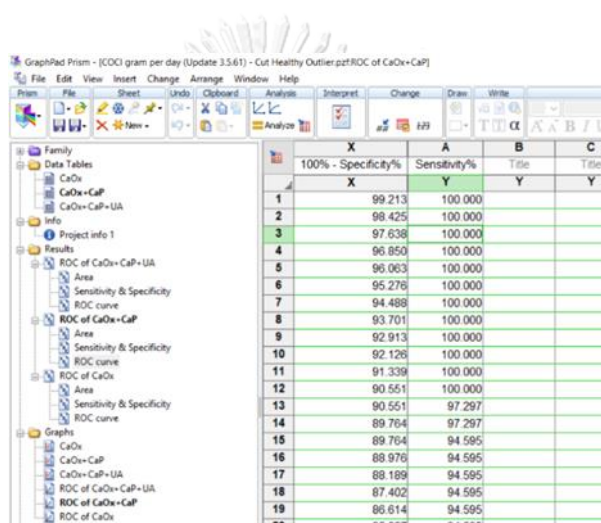
Uric Acid : จะมีหลายจุดยอดอยู่ในช่วงต่ำกว่า 1700 cm^{-1}



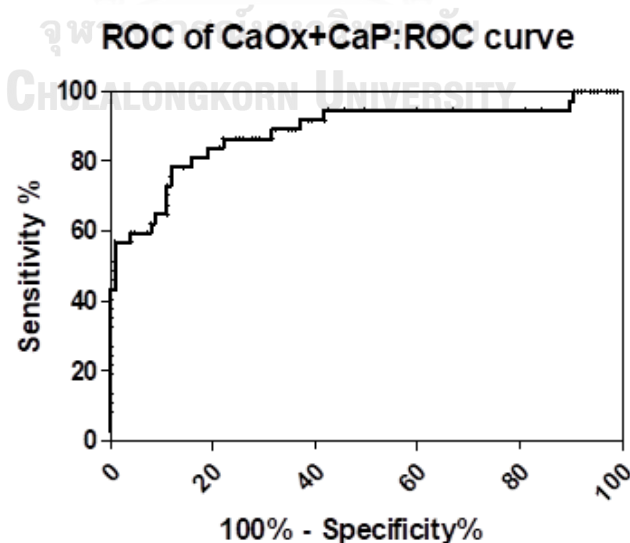
รูปที่ 24 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ก่อนนิ่วชนิด Uric acid ด้วยวิธี FTIR

จากการเปลี่ยนมาเลือกใช้เครื่อง GENESYS ที่มีความถูกต้องในการวัดสูง แทนเครื่อง Nanodrop ผู้วิจัยได้ทำการหาค่า COCI ใหม่ จากตัวอย่างปัสสาวะ 302 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง GENESYS จากนั้นนำผลการวัดมาศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลของผู้ป่วยที่มีตัวอย่างก้อนนิ่ว จำนวน 44 คน

(positive CT scan) กับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี จำนวน 127 คน (negative CT scan) จากกลุ่มประชากรทั้งหมด 302 คน ซึ่งในผู้ป่วยจำนวน 44 คน แบ่งเป็นผู้ป่วยที่พบนิ่วชนิด CaOx, CaP และ Uric acid จำนวน 30, 7 และ 7 คน ตามลำดับ โดยอ้างอิงผลจากการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของก้อนนิ่วด้วยวิธี FTIR ดังกล่าว เพื่อสร้าง ROC curve โดยทำการแบ่งกลุ่มการทดสอบออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1.กลุ่มผู้ป่วยที่มีตัวอย่างก้อนนิ่วชนิด CaOx 2.กลุ่มผู้ป่วยที่มีตัวอย่างก้อนนิ่วชนิด CaOx + CaP 3.กลุ่มผู้ป่วยที่มีตัวอย่างก้อนนิ่วชนิด CaOx + CaP + Uric acid ตามลำดับ ในการสร้าง ROC curve ผู้ทดลองเลือกใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.01 ดังรูปที่ 25 ส่วนตัวแปรที่ถูกนำมาวิเคราะห์คือ ค่าความเข้มข้นของปริมาณแคลเซียมออกซาเลตในตัวอย่างปัสสาวะ หรือค่า COCI



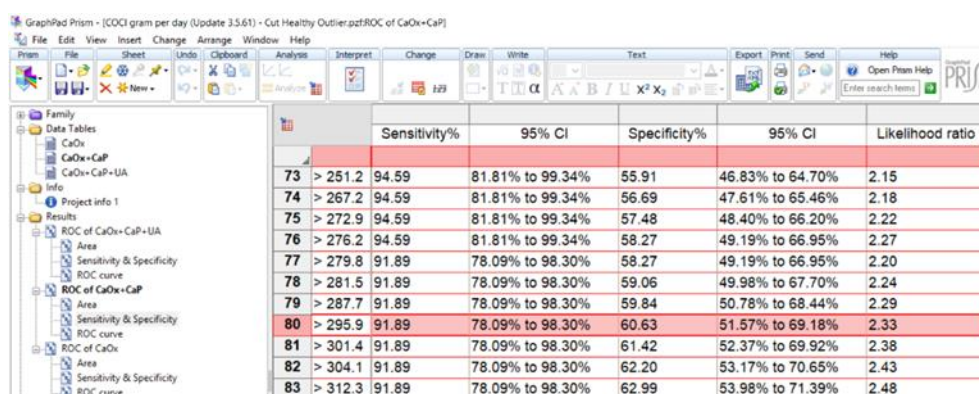
รูปที่ 25 แสดงโปรแกรม GraphPad Prism 5.01 สำหรับวิเคราะห์ ROC curve



รูปที่ 26 แสดงกราฟ ROC curve ของกลุ่มผู้ป่วยที่มีตัวอย่างก้อนนิ่วชนิดที่มี CaOx / CaP เป็นส่วนประกอบหลัก

ในการคัดเลือกกลุ่มผู้ป่วย ผู้วิจัยสนใจเฉพาะกลุ่มนิ่วที่มีองค์ประกอบของแคลเซียม ดังนั้นกลุ่มเป้าหมายที่เป็นนิ่วชนิด Uric acid จะทำการตัดออกจากการคำนวณ ROC curve จำนวน 7 คน เหลือเพียงกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นนิ่วชนิด CaOx และ CaP รวม 37 คน (จากทั้งหมด 44 คน) ที่ถูกเลือกนำไปใช้ในการคำนวณ ROC curve

จากผลการวิเคราะห์ด้วย ROC curve ได้ข้อสรุปคือ เลือกค่า COCI 295.9 mg/day เป็นค่า cut-off ที่ใช้แบ่งกลุ่มตรวจคัดกรองผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้เสี่ยงเป็นนิ่วไตโดยมีค่า Sensitivity 91.89% และค่า Specificity 60.63% ดังรูปด้านล่าง



		Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
73	> 251.2	94.59	81.81% to 99.34%	55.91	46.83% to 64.70%	2.15
74	> 267.2	94.59	81.81% to 99.34%	56.69	47.61% to 65.46%	2.18
75	> 272.9	94.59	81.81% to 99.34%	57.48	48.40% to 66.20%	2.22
76	> 276.2	94.59	81.81% to 99.34%	58.27	49.19% to 66.95%	2.27
77	> 279.8	91.89	78.09% to 98.30%	58.27	49.19% to 66.95%	2.20
78	> 281.5	91.89	78.09% to 98.30%	59.06	49.98% to 67.70%	2.24
79	> 287.7	91.89	78.09% to 98.30%	59.84	50.78% to 68.44%	2.29
80	> 295.9	91.89	78.09% to 98.30%	60.63	51.57% to 69.18%	2.33
81	> 301.4	91.89	78.09% to 98.30%	61.42	52.37% to 69.92%	2.38
82	> 304.1	91.89	78.09% to 98.30%	62.20	53.17% to 70.65%	2.43
83	> 312.3	91.89	78.09% to 98.30%	62.99	53.98% to 71.39%	2.48

รูปที่ 27 แสดงผลการวิเคราะห์ ค่า Sensitivity Specificity และ ค่า cut-off จาก ROC curve

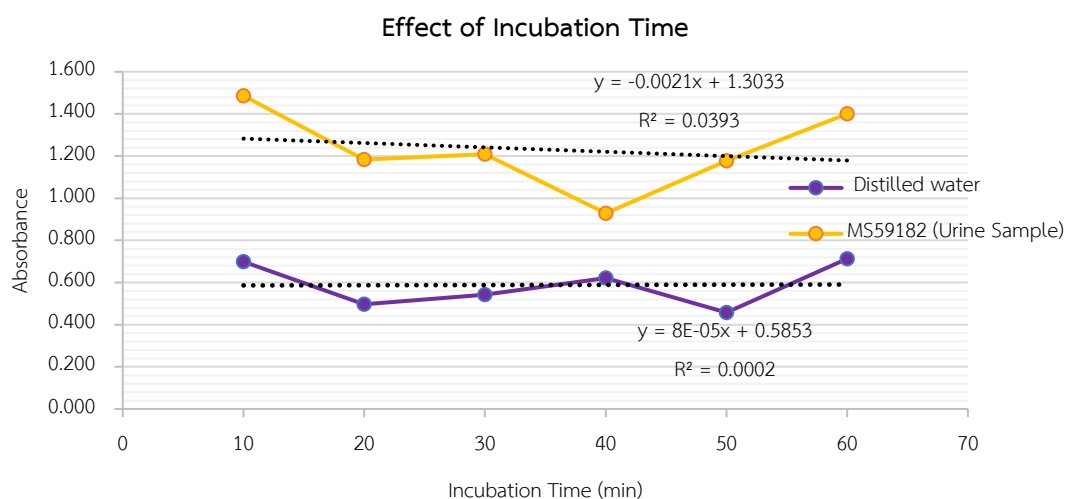
โดยในแผนงานต่อไปจะทำการพัฒนาระบบ Indole test โดยเลือกใช้ค่า Sensitivity 91.89% และค่า Specificity 60.63% เป็นค่าอ้างอิงในการเปรียบเทียบกับวิธีและระบบที่จะพัฒนาขึ้นต่อไปเพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้เสี่ยงเป็นนิ่วไตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.4) การศึกษาตัวแปรที่มีผลกระทบต่อการวัดด้วยวิธี COCI

นอกเหนือจากการปรับเปลี่ยนระบบวัดแล้ว ในการทดลองยังมีการศึกษาถึงผลกระทบของตัวแปรต่าง ๆ ที่อาจมีผลทางตรงหรือทางอ้อมต่อการวัดด้วยวิธี COCI จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีผลกระทบต่อผลการตรวจวัดด้วยวิธี COCI ของ Bowei และคณะ [9] ได้มีการศึกษาผลของความเข้มข้นของปัสสาวะ ออกซาเลต และฟอสเฟตในปัสสาวะ พบว่า ตัวแปรเหล่านี้มีค่าแปรผันตรงกับค่า COCI ส่วนการศึกษาความเข้มข้นของ โพแทสเซียมและโซเดียมในปัสสาวะ พบว่า ไม่มีผลกระทบต่อวิธี COCI อย่างมีนัยสำคัญ [3] แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาผลกระทบของเวลาในการบ่มปัสสาวะ ในขั้นการวัด รวมถึงปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ และ ความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ ต่อการวัดด้วยวิธี COCI งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาในส่วนนี้เพิ่มเติม

4.4.1) การศึกษาผลกระทบของ Incubation Time

หนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญมากของวิธีการวัดปริมาณ CaOx ในปัสสาวะด้วยวิธี COCI คือ Incubation Time ซึ่งเป็นกระบวนการแรกเริ่มที่ช่วยให้แคลเซียมไอออนอิสระ และออกซาเลตไอออนในสารละลายปัสสาวะเกิดการจับตัวกันเป็น CaOx และกลายเป็นผลึกเมื่อมีการจับกันมากขึ้น ซึ่งปัจจัยที่มีผลคือ ระยะเวลา ในการศึกษาของ Bowei และคณะ ได้ใช้เวลาในกระบวนการนี้ 60 นาที ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะลดเวลาในขั้นตอนนี้ลง จึงออกแบบการทดลองขึ้น โดยการเปลี่ยนตัวแปรของเวลาเป็น 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ในขั้นตอนการ Incubation ปัสสาวะ โดยทดสอบเทียบระหว่าง control (น้ำกลั่น) กับ ตัวอย่างปัสสาวะจริง ได้ผลการทดสอบดังนี้



รูปที่ 28 แสดงผลการทดสอบเปรียบเทียบเวลาในการบ่มระหว่างน้ำกลั่นกับตัวอย่างปัสสาวะจริง จากผลการทดสอบข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเวลาในการบ่มที่เวลา 60 นาที ของทั้งน้ำกลั่น (เส้นสีน้ำเงิน) และตัวอย่างปัสสาวะจริง (เส้นสีส้ม) ให้ผลไม่แตกต่างกับผลการทดสอบที่เวลาบ่ม 10 นาที ดังนั้น จากผลการทดสอบนี้สรุปได้ว่า สามารถลดเวลาในการบ่มปัสสาวะในวิธี COCI จาก 60 นาที เหลือ 10 นาทีได้

4.4.2) การศึกษาผลกระทบของความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ(pH)

ในการทดสอบผลกระทบของ pH ต่อการวัดด้วยวิธี COCI จะแบ่งเป็น 2 กรณี คือ

ปัสสาวะมีสภาวะเป็นกรด : ในการทดลองจะนำปัสสาวะที่เก็บไว้มาตรวจสอบความเป็นกรด-ด่างก่อน แล้วเตรียม pH ในปัสสาวะตัวอย่างเดียวกัน ให้อยู่ในช่วง 4-6.5 ซึ่งอาจแบ่งค่า pH เป็น 4, 4.5, 5, 5.5, 6, และ 6.5 ตามลำดับ ในการทดลองจะใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ในการปรับค่าความเป็นกรดในปัสสาวะให้ได้ค่า pH ตามที่ต้องการ

ปัสสาวะมีสภาวะเป็นด่าง : จะมีการเตรียมปัสสาวะให้มีค่า pH อยู่ในช่วง 7-8 ซึ่งอาจแบ่งค่า pH เป็น 7, 7.5 และ 8 ตามลำดับ โดยจะใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในการปรับค่าความเป็นด่างในปัสสาวะให้ได้ค่า pH ตามที่ต้องการ โดยทั้ง 2 กรณีนี้จะทำพร้อมกันโดยใน 1 การทดลองจะมีตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่า pH ตั้งแต่ 4-8 ซึ่งแบ่งเป็นแต่ละกรณีทางด้านบน เมื่อตัวอย่างปัสสาวะมีค่า pH ดังที่ต้องการแล้วจะนำเข้าสู่กระบวนการกรองและผ่านเข้าสู่วิธี COCI ต่อไป ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างปัสสาวะที่ผ่านการปรับ pH

pH	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Mean	SD	CV(%)
4	1.227	1.226	1.228	1.227	0.001	0.081
4.5	1.359	1.358	1.359	1.359	0.001	0.042
5	1.235	1.237	1.236	1.236	0.001	0.081
5.5	1.226	1.226	1.226	1.226	0.000	0.000
6	1.283	1.280	1.281	1.281	0.002	0.119
6.5	1.233	1.231	1.232	1.232	0.001	0.081
7	1.167	1.168	1.168	1.168	0.001	0.049
7.5	1.250	1.251	1.250	1.250	0.001	0.046
8	1.197	1.198	1.199	1.198	0.001	0.083
HCL(Blank)	1.293	1.294	1.295	1.294	0.001	0.077

CV Mean = 4.346 %

หมายเหตุ : * = ค่า Absorbance ที่วัดได้ - ค่า Absorbance ของไฮโดรคลอริก (~ 1.295)

จากตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่างปัสสาวะที่มี pH แตกต่างกัน (pH 4-8) ภายหลังจากผ่านวิธี COCI (การทดลองที่ 2) มาแล้วพบว่าค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือ ปริมาณ pH ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงไม่ได้ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่าการดูดกลืนที่ได้รับ ซึ่งทำให้สามารถบอกได้ว่า pH ไม่ได้มีผลต่อการวัดด้วยวิธี COCI อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 29 แสดงการปรับค่า pH ของปัสสาวะด้วย HCL

4.4.3) การศึกษาผลกระทบของปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ

เนื่องจากในปัสสาวะสามารถพบองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน โปรตีนอัลบูมิน วิตามิน หรืออื่น ๆ อีกมากมาย ซึ่งผู้วิจัยได้เห็นว่าโปรตีนอาจเป็นตัวแปรหนึ่งที่สามารถส่งผลกระทบต่อหรืออาจเป็นสารรบกวน (Interference) ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงในวิธี COCl โดยการศึกษาค่าผลของโปรตีนของงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะเป็นการเพิ่มโปรตีนในสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้แล้วดูผลของการวัดเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ไม่ได้ใส่โปรตีนเข้าไป

ในการทดลองนี้จะใช้ปัสสาวะจริงที่รวบรวมไว้ทำการทดสอบผลของโปรตีน โดยทุกครั้งที่ทำการทดลองจะมีการทำสารละลายมาตรฐานสำหรับเทียบค่าปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่ทำการทดสอบ สำหรับโปรตีนที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นโปรตีนชนิด Human serum albumin (HSA) 20% จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยจะทำการวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่รวบรวมไว้ก่อนว่ามีปริมาณอยู่เท่าไรแล้วจึงใส่โปรตีนอัลบูมินเพิ่มเข้าไปให้มีปริมาณ 25, 50, 100, 150, 300 และ 500 mg/L ตามลำดับ จากนั้นนำปัสสาวะที่มีการใส่โปรตีนเหล่านี้เข้ากระบวนการวัดปริมาณ CaOx ด้วยวิธี COCl โดยมีผลการทดลองเบื้องต้นดังนี้

ตารางที่ 8 แสดงผลของปริมาณโปรตีน HSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อค่า COCI ที่ได้

Con.c HSA 20% (20000 mg/dL) mg/L	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Mean	SD	CV (%)
0	1.404	1.405	1.406	1.405	0.001	0.071
25	1.492	1.488	1.487	1.489	0.003	0.178
50	1.548	1.550	1.552	1.550	0.002	0.129
100	1.492	1.497	1.496	1.495	0.003	0.177
150	1.368	1.370	1.370	1.369	0.001	0.084
300	1.485	1.487	1.488	1.487	0.002	0.103
500	1.465	1.466	1.467	1.466	0.001	0.068

CV Mean = 4.123 %

หมายเหตุ : * = ค่า Absorbance ที่วัดได้ - ค่า Absorbance ของไฮโดรคลอริก (~ 1.261)

จากตารางที่ 8 ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างปัสสาวะ ไม่ได้ส่งผลทำให้ค่า COCI ที่ได้มีแนวโน้มมากขึ้นหรือลดลง ซึ่งผู้วิจัยลองพิจารณาปริมาณโปรตีนเฉพาะในช่วง 0-50 mg/L ซึ่งเป็นปริมาณที่พบได้ในคนปกติ พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในช่วงนี้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในความเป็นจริงในการตรวจคัดกรองสามารถพบเจอผู้ที่มีความผิดปกติของไตซึ่งสามารถพบปริมาณโปรตีนในปัสสาวะได้มากกว่า 1 g/day หรือ เฉลี่ยมากกว่า 500 mg/L ได้ [26] ซึ่งจากตารางข้างต้นแสดง ค่า COCI ที่ได้ไม่สูงขึ้นตามปริมาณโปรตีนที่มากขึ้น ดังนั้น จากการทดลองทั้งหมดข้างต้นสามารถยืนยันได้ว่าวิธี COCI ถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองโรคนี้ไว้

4.5) การพัฒนาวิธี iCOCI

จากการปรับปรุงวิธีการ COCI ในการทดลองก่อนหน้าเราทราบถึงผลกระทบต่าง ๆ ในการวัดและเนื่องด้วยวิธี COCI มีข้อจำกัดหลัก ๆ อยู่ 2 ประการคือ 1. สารละลายที่ใช้ในการวัดไม่มีสีซึ่งทำให้สังเกตเพื่อนำมาแปรผลโดยผู้วัดได้ยาก และ 2. ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการใช้การวัดออกซาเลตในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก คือ 215 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในย่านความยาวคลื่นของรังสียูวี ทำให้ค่อนข้างยุ่งยากและใช้งบประมาณค่อนข้างสูงหากนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือวัดเพื่อการตรวจคัดกรองผู้ป่วย

ทางคณะผู้วิจัยได้มีการพัฒนาวิธีการวัดปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะอีกวิธีหนึ่งชื่อว่า Indole-reacted Calcium Oxalate Crystallization Index โดยมีชื่อย่อ iCOCI ซึ่งจะมีขั้นตอน

บางส่วนคล้ายกับวิธีการ COCI วิธีการนี้สามารถวัดปริมาณออกซาเลตในสารละลายแล้วให้สีชมพูอ่อนจนถึง สีแดงอิฐ ซึ่งสามารถสังเกตสีและการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย รวมถึงสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรซึ่งอยู่ในช่วงคลื่นแสงที่ตามนุษย์สามารถมองเห็นได้

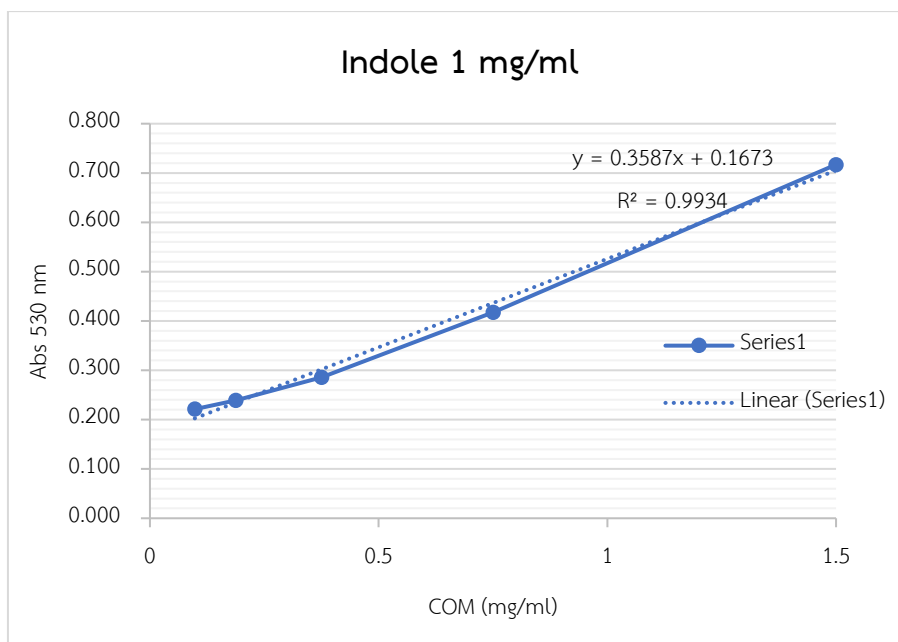
โดยวิธี iCOCI อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร indole ($C_8H_8N^+$) กับ กรดซัลฟูริก ความเข้มข้นสูง ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 กลายเป็น indole reagent(สีเหลือง) เมื่อ indole reagent ทำปฏิกิริยากับสารละลายที่มีออกซาเลตจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากเหลืองเป็นชมพู และสีของสารละลายจะเข้มข้นตามความเข้มข้นของออกซาเลตในสารละลายที่มากขึ้น ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าวิธีนี้มีความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือตรวจวัดได้ง่าย และใช้งบประมาณที่ไม่มากนัก ผู้วิจัยจึงมีความตั้งใจในการศึกษาและปรับปรุงวิธีการนี้ให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นระบบคัดกรองผู้ป่วยโรคไตได้อย่างเหมาะสม โดยวิธีการวัดปริมาณออกซาเลตในสารละลาย iCOCI มีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำตัวอย่างปัสสาวะที่จากกลุ่มตัวอย่างคนสุขภาพดีและกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคนิ่วมากรองด้วย 0.22 μm membrane filter เพื่อกรองโปรตีนและสารที่มีขนาดใหญ่ออกไป
- 2) ปิเปิดตัวอย่างปัสสาวะที่ต้องการตรวจสอบ 950 μL ใน plastic tube 2 ml ใส่สารละลาย oxalate 2 mM ปริมาณ 50 μL , สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 100 mM จำนวน 1 mL และ จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubated 37°C ที่อ่างน้ำร้อนแบบนิ่ง 10 นาที
- 3) นำสารจากข้อที่แล้วไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 15,000 rpm 15 นาที แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 rpm 15 นาที แล้วดูดส่วนใสออกให้เหลือเพียงตะกอน
- 4) ละลายผลึก CaOx ที่เหลือด้วย HCl 2 N ปริมาณ 0.5 mL
- 5) เตรียม indole reagent จากการนำสาร indole 1 mg ผสม กับ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 mL (อัตราส่วน 1 ต่อ 1) แล้วคนให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน
- 6) ผสม indole reagent ที่เตรียมเสร็จกับสารละลายผลึก CaOx จากข้อ 4) แล้วนำไป incubated 80°C ที่อ่างน้ำร้อนแบบหมุนวน 45 นาที
- 7) นำสารที่ incubated เสร็จไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm ด้วยเครื่อง GENESYS และ microplate

8) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Calcium oxalate monohydrate (COM) ที่มีความเข้มข้น 0.094, 0.188, 0.375, 0.75 และ 1.5 mg/mL ตามลำดับ ผสมกับ indole reagent ที่เตรียมเสร็จ แล้วนำไป incubated 80°C ที่อ่างน้ำร้อนแบบหมุนวน 45 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm ด้วยเครื่อง GENESYS เพื่อใช้เป็น standard curve ในการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของ CaOx ที่วัดได้จากตัวอย่างปัสสาวะ



รูปที่ 30 แสดงขั้นตอนการวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตด้วยวิธี iCOCl ตามลำดับ



รูปที่ 31 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐาน COM ที่ทดสอบด้วย indole reagent เข้มข้น 1 mg/ml

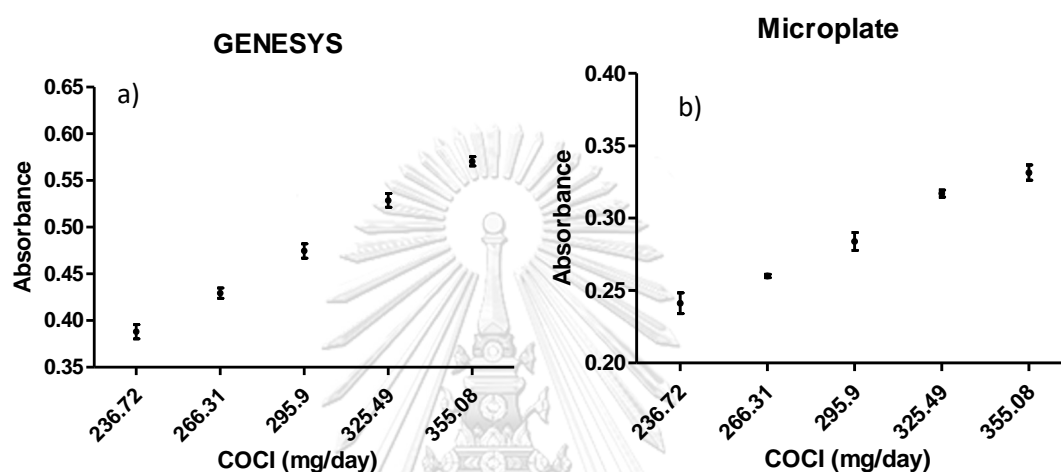
ในส่วนการพัฒนาวิธี iCOCI ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมุ่งเน้นพัฒนา 2 หัวข้อหลัก คือ ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งานกับเครื่องมือวัด และความเสถียรภาพของ indole reagent ภายหลังจากการเตรียมสารเสร็จ โดยศึกษาปัจจัยทางด้านเวลาเป็นหลัก

4.5.1) การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน COM ที่เหมาะสมต่อการใช้งานกับเครื่องมือวัด

จากการทดสอบด้วยวิธี COCI ผลการวิเคราะห์ด้วย ROC curve จากหัวข้อ 4.3.1.5) ได้ข้อสรุปคือ เลือกค่า **COCI 295.9 mg/day** เป็นค่า cut-off ที่ใช้แบ่งกลุ่มตรวจคัดกรองผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ที่เป็นนิ่วได้โดยมีค่า **Sensitivity 91.89%** และค่า **Specificity 60.63%** โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณปัสสาวะของคนไทยต่อ 1 วัน ประมาณ 2 ลิตร [27] ผู้วิจัยจึงเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีค่าความเข้มข้นของ CaOx ให้มีค่าใกล้เคียงกับที่ค่า cut-off ที่ได้ โดยกำหนดให้ค่าความเข้มข้นที่ค่า cut-off เป็นที่ความเข้มข้น 100% และเตรียมความเข้มข้นอื่น ๆ อีก ได้แก่ 80%, 90%, 110% และ 120% ($\pm 10, 20\%$ จากค่า cut-off) แล้วนำมาทดสอบกับ indole reagent เข้มข้น 1 mg/ml ตามวิธีของ iCOCI เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการแยกชัดของวิธีนี้ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 9 แสดงการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน COM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ($\pm 10, 20\%$ จากค่า cut-off)

คิดเป็น (%)	80	90	100	110	120
[COM] (mg/day)	236.72	266.31	295.9	325.49	355.08
[COM] (mg/ml)	0.1183	0.1331	0.148	0.1627	0.1775



รูปที่ 32 แสดงกราฟ a) ผลจากการวัดด้วยเครื่อง GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer และ b) Microplate Multiskan GO ที่ความยาวคลื่น 530 nm

จากกราฟข้างต้นจะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จากเครื่องวัดทั้งสองมีค่าแตกต่างกันแต่มีแนวโน้มกราฟไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งจากกราฟดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นนี้เครื่องมือวัดมาตรฐานสามารถแยกขีดสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น $\pm 10, 20\%$ จากค่า cut-off ได้

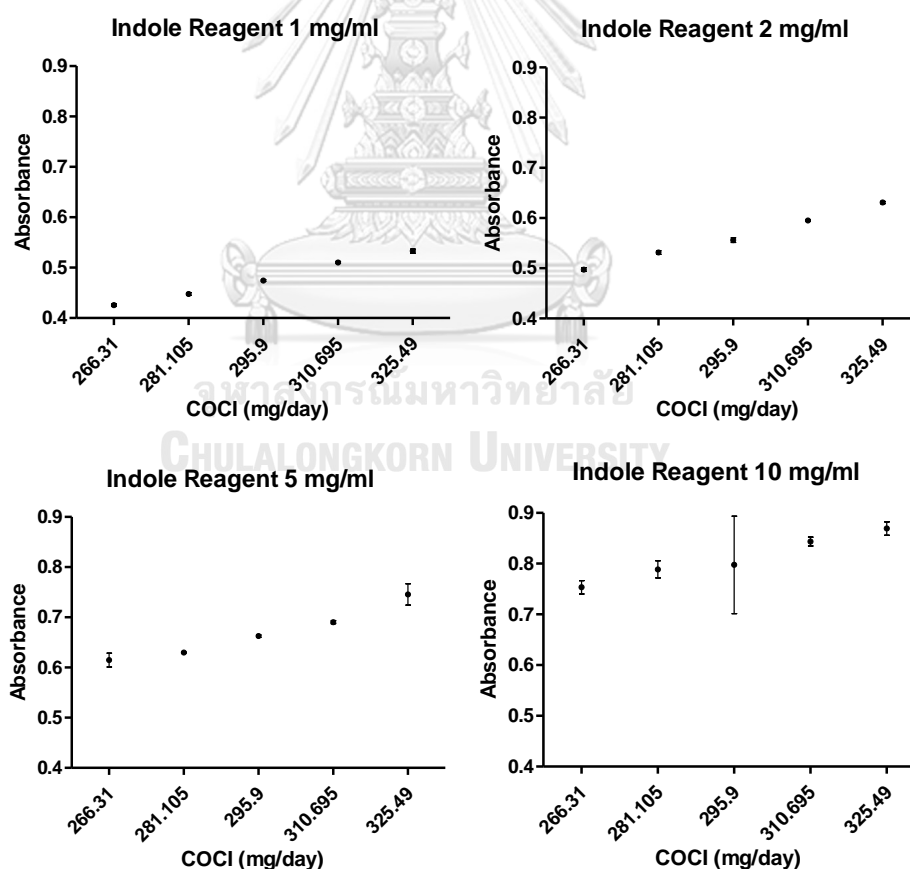
4.5.2) การหาความเข้มข้น indole reagent ที่เหมาะสมต่อการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

จากผลการทดลองก่อนหน้านำมาสู่การหาความเข้มข้น indole reagent ที่เหมาะสมต่อการเตรียมสารละลายมาตรฐานแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (COM) เนื่องด้วย ความเข้มข้น indole reagent 1 mg/ml (อัตราส่วน 1:1 ระหว่าง indole กับ กรดซัลฟูริก) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้อ้างอิงจากรายงานผลการทดลองที่ผ่านมา ทางผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพื่อทดสอบหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้ค่าความเข้มข้นใกล้เคียงค่า cut-off (295.9 mg/day) คล้ายกันกับการทดลองก่อนหน้า เพื่อทดสอบว่าจะค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่แตกต่างจากเดิมหรือไม่

โดยในการศึกษานี้ผู้วิจัยออกแบบการทดลองโดยการเตรียม indole reagent ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 mg/ml แล้วนำไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน COM ที่มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ cut-off (100%), $\pm 5\%$ และ $\pm 10\%$ จากค่า cut-off แล้วทำการวัดด้วยเครื่อง GENESYS เพื่อทดสอบความแยกชัดของวิธี iCOCI และเพื่อเลือกความเข้มข้น indole reagent ที่เหมาะสมสำหรับการคัดกรองต่อไป โดยผลการทดลองที่ได้มีดังนี้

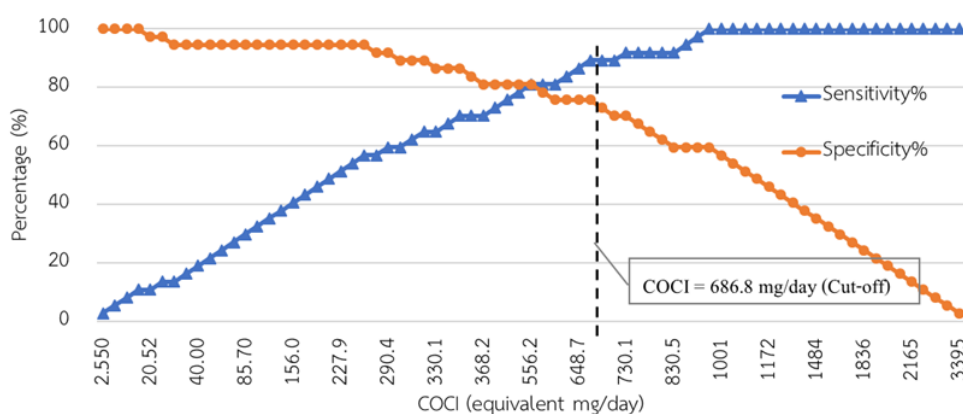
ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน COM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ($\pm 5, 10\%$ จากค่า cut-off)

คิดเป็น (%)	90	95	100	105	110
[COM] (mg/2L)	266.31	281.105	295.9	310.695	325.49
[COM] (mg/ml)	0.1331	0.1405	0.148	0.1553	0.1627



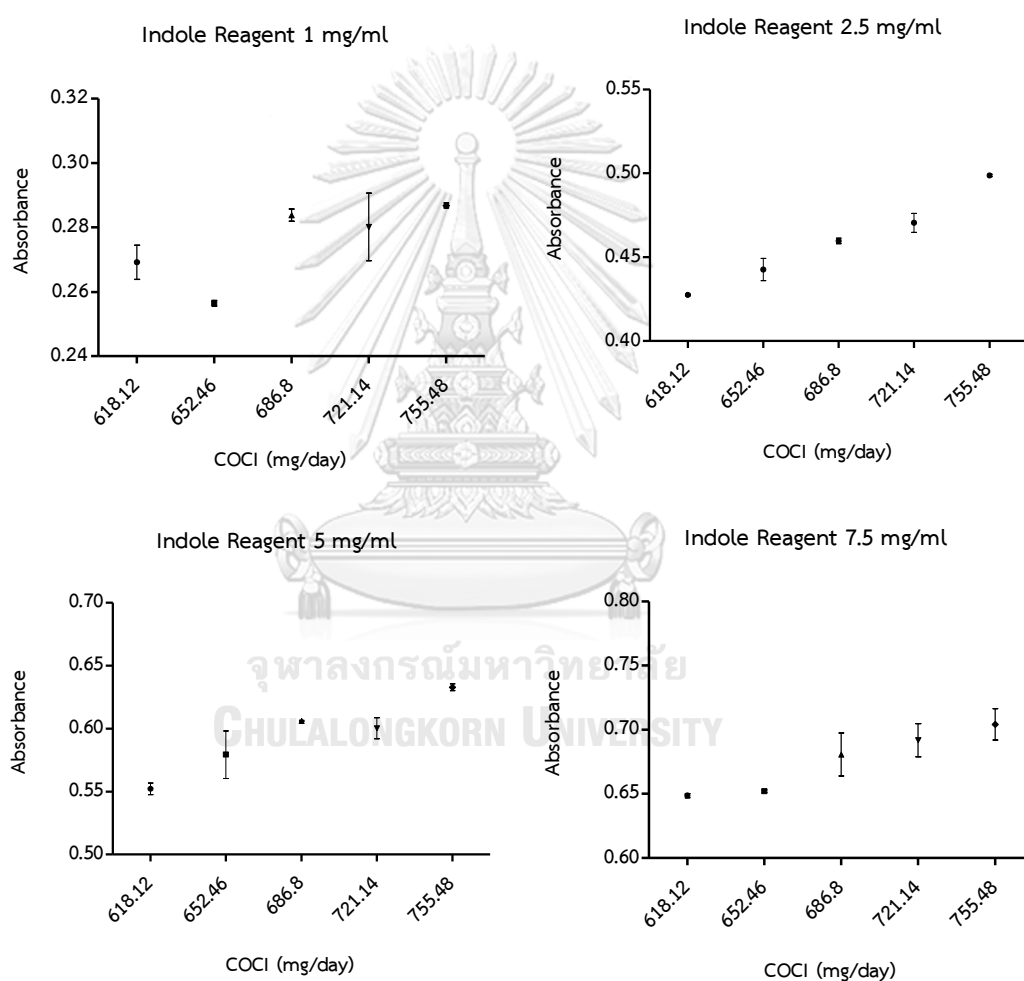
รูปที่ 33 แสดงกราฟผลการทดสอบ indole reagent ที่ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 mg/ml

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 31 พบว่า ที่ความเข้มข้น indole reagent 1,2 และ 5 mg/ml ให้ผลการทดลองที่ดีกว่า indole reagent ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml กล่าวคือ สิ่งตกที่กราฟความเข้มข้น 10 mg/ml ที่ค่า COCI 295.9 mg/day จะเห็นว่าแถบความคลาดเคลื่อนของข้อมูล (Error bar) ค่อนข้างกว้างและครอบคลุมค่า COCI ที่ได้ของความเข้มข้นอื่น ๆ ด้วย และที่แต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้วัดจะ พบว่า แถบความคลาดเคลื่อนของข้อมูล ค่อนข้างกว้างกว่าจุดอื่น ๆ ด้วย ดังนั้นข้อสรุปในการทดลองนี้ คือ ความเข้มข้น indole reagent 10 mg/ml ไม่เหมาะสมต่อการนำมาทดสอบกับวิธี iCOCI และผู้วิจัยจึงตัดความเข้มข้นนี้ออกแล้วทำการทดสอบอีกรอบ โดยเปลี่ยนค่า cut-off ที่ใช้ใหม่ โดยจากเดิมค่า cut-off เก่า (295.9 mg/ml) ซึ่งได้จากการคำนวณโดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต (CaOx) และแคลเซียมฟอสเฟส (CaP) รวมกัน จำนวน 37 คน ต่อตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 127 คน (37 : 127) เปลี่ยนเป็นไปใช้จำนวนตัวอย่างผู้ป่วย 37 คน ต่อ จำนวนผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 37 คน (37 : 37) โดยเกณฑ์ในการเลือกผู้ที่มีสุขภาพดีทั้ง 37 คน คือ จะต้องไม่มีเพศและอายุใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยทั้ง 37 คน ซึ่งภายหลังจากการคำนวณค่า cut-off ใหม่ ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.01 โดยให้ผู้เชี่ยวชาญทางคลินิกเป็นผู้ตัดสินใจเลือกค่า cut-off ที่ให้ ค่าความแม่นยำ(accuracy) ค่าความไว(sensitivity) และค่าความจำเพาะ(specificity) ที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองทางการแพทย์ โดยค่า cut-off ใหม่นี้มีค่าเท่ากับ **686.8 mg/day** (ค่าปริมาตรที่ใช้คำนวณเท่ากับ 1385 ml ซึ่งเกิดจากการเฉลี่ยปริมาตรปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยและผู้ที่มีสุขภาพดีทั้ง 74 คน) ซึ่งให้ค่า **sensitivity 89.19%** และ **ค่า specificity 75.68%** เหตุที่เลือกค่านี้นี้ เนื่องจากเป็นค่าที่ได้รับการปรึกษากับผู้เชี่ยวชาญแล้วว่ามีค่า cut-off ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้คัดกรองโรค กล่าวคือ มีค่า sensitivity ค่อนข้างสูง(มากกว่า 80 %) และค่า specificity ไม่ต่ำมาก (มากกว่า 70%) ซึ่งยอมรับได้สำหรับใช้ในการตรวจคัดกรองโรคทางการแพทย์



รูปที่ 34 แสดงการหาค่า cut-off ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.01 ของเครื่องมือมาตรฐาน (GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer)

ภายหลังจากการคำนวณค่า cut-off ใหม่ ผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองเพิ่มเติมเพื่อทดสอบความเข้มข้นของ indole reagent ที่เหมาะสม โดยเตรียม reagent ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5 และ 7.5 mg/ml แล้วนำมาทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน COM ที่ความเข้มข้น cut-off ใหม่ ได้แก่ 618.12(90%), 652.46(95%), 686.8(100%), 721.14(105%) และ 755.48(110%) mg/day(1385 ml) ตามวิธีทดสอบ iCOCI แล้วทำการวัดกับเครื่องมือมาตรฐาน GENESYS โดยวัดผลที่ได้รอบละ 3 ครั้ง จำนวน 3 รอบ ได้ผลการทดลองดังนี้



รูปที่ 35 แสดงผลการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของ Indole reagent ที่เหมาะสมกับเครื่องมือวัดมาตรฐาน GENESYS

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าที่ความเข้มข้น indole reagent 1 mg/ml แนวโน้มค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไม่ไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ที่สารละลายมาตรฐาน COM ความเข้มข้นต่ำสุด ควรจะได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด แต่ผลกลับได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าจุดอื่นบางจุด ซึ่งโดยรวม

ค่าที่ได้ค่อนข้างไม่คงที่และมีความผิดพลาดหลายจุด เช่นเดียวกับที่ indole reagent ความเข้มข้น 5 mg/ml ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ส่วนที่ความเข้มข้น 7.5 mg/ml ผลที่ได้มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันแต่ค่าความผิดพลาดภายในกลุ่มตัวอย่างยังมีอยู่ค่อนข้างมากที่ความเข้มข้นสูงกว่าค่า cut-off โดยที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองซ้ำทั้ง 3 รอบ กล่าวคือ ค่าความคลาดเคลื่อนสารละลายมาตรฐาน COM ภายในกลุ่มเดียวกันมีไม่มาก และผลจากการทำซ้ำค่อนข้างนิ่ง นอกจากนั้น error bar ที่เกิดขึ้นไม่เหลื่อมทับกับค่าที่ได้ของสารละลายมาตรฐาน COM ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ทำให้ที่ความเข้มข้น indole reagent 2.5 mg/ml เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด และเลือกใช้เพื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะจริง

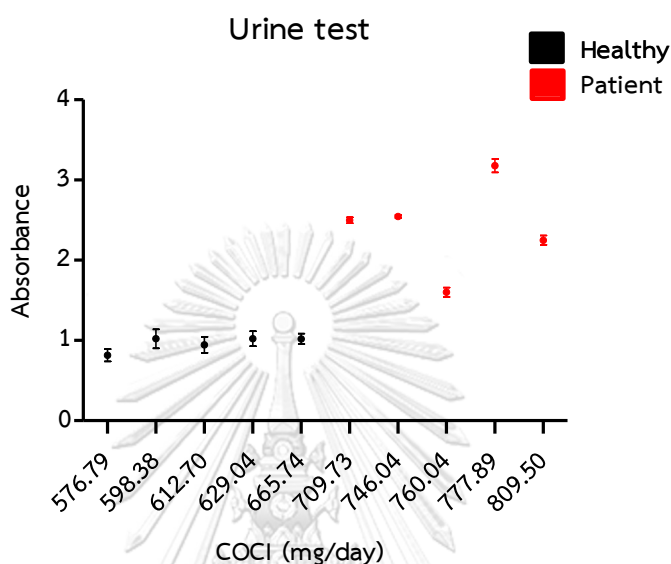
4.5.3) การทดสอบวัดปริมาณออกซาเลตกับตัวอย่างปัสสาวะจริง

การทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยทำการสุ่มเลือกตัวอย่างปัสสาวะขึ้นมาอีกรอบโดยใช้หลักเกณฑ์คล้ายเดิม คือ เลือกปัสสาวะ 5 ตัวอย่าง ที่มีค่า COCI ต่ำและปัสสาวะ 5 ตัวอย่าง จากที่มีค่า COCI สูงกว่าค่า cut-off และในการทดสอบรอบนี้ผู้ทดลองเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่ห่างจากค่า cut-off เป็นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยตัวอย่างปัสสาวะที่เลือกมาทำการทดสอบมีดังนี้

ตารางที่ 11 แสดงการเลือกตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่า COCI ใกล้เคียงกับค่า cut-off

sample code	COCI (COM equiv. mg/Day)	Stone Type
MS59135	576.7911625	Healthy
MS59127	598.3838799	Healthy
MS59120	612.7027861	Healthy
MS59088	629.0365591	Healthy
MS59107	665.7417498	Healthy
MS59075	709.7296752	+ No stone
MS59241	746.0412678	CaOx
MS59225	760.0382409	CaOx
MS59065	777.8948961	+ No stone
MS59098	809.4967742	CaOx

ในการทดสอบนี้ ตัวอย่างปัสสาวะ 5 ตัวอย่าง ที่มีค่า COCI น้อยกว่า ค่า cut-off จะนำมาจากกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีทั้งหมด ส่วนตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่า COCI สูงกว่า ค่า cut-off จะนำมาจากกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด โดยผลการทดสอบข้างต้นมีดังนี้



รูปที่ 36 แสดงผลการทดสอบ iCOCI กับตัวอย่างปัสสาวะจริง

จากรูปผลการทดลองที่ 36 ข้างต้น พบว่า กลุ่มสีดำ คือ ตัวอย่างปัสสาวะจากกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี มีการค่าการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มสีแดง จะเห็นว่าค่าที่ได้ค่อนข้างสูง กล่าวคือ ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรค ค่าเฉลี่ยปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะจะสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพดี เป็นผลทำให้แนวโน้มค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร สูงกว่า กลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพดีดังรูป โดยที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรเป็นช่วงที่จำเพาะกับปริมาณออกซาเลตในสารละลาย ดังนั้น จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยเครื่องมือมาตรฐาน GENESYS กับตัวอย่างปัสสาวะ ด้วยวิธี iCOCI สามารถใช้ในการคัดกรองกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคออกจากกลุ่มที่มีสุขภาพดีได้

การทดสอบนี้ทำให้ผู้วิจัยทราบว่าวิธี iCOCI สามารถใช้ในการคัดกรองกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ที่เป็นโรคนิวไตไตได้ ซึ่งค่าความเข้มข้น indole reagent และค่า cut-off ที่ใช้จะถูกนำไปทดสอบกับระบบวัดที่สร้างขึ้นในหัวข้อถัด ๆ ไป

4.5.4) ความเสถียรของ Indole reagent

Indole เป็นสารเคมีที่จะทำปฏิกิริยากับออกซาเลตในสารละลายที่เป็นกรด ขณะทำปฏิกิริยากับออกซาเลตจะเกิดควันขึ้น จึงควรทดสอบในตัวดูดควัน หากผู้ใช้ไม่ได้รับการฝึกฝนสำหรับการใช้งาน indole อาจส่งผลกระทบต่อผลได้ เนื่องจากในบางครั้ง หากสารละลายที่นำมาทดสอบมีปริมาณออกซาเลตสูง เมื่อเกิดปฏิกิริยากับ indole reagent อาจปล่อยควันหรือฟองอากาศออกมา เยอะจนอาจล้นหลอดทดลองได้

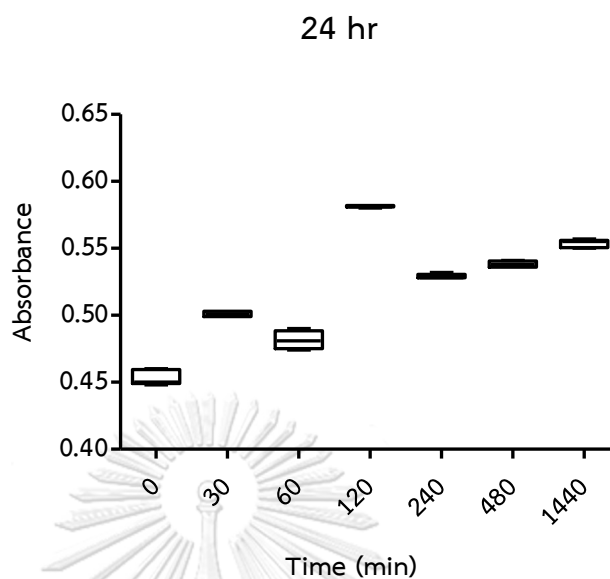
ข้อเสียอีกประการของ Indole reagent คือมีความไวต่อแสง เพื่อความถูกต้องและแม่นยำของผลการทดลอง ขณะทำการทดลองควรปิดไฟ หรืออยู่บริเวณที่ที่มีแสงผ่านปริมาณน้อย นอกจากนั้น indole reagent เมื่อเตรียมสารเสร็จควรใช้ให้หมด ไม่ควรเก็บไว้ใช้วันรุ่งขึ้น โดยเวลาในการใช้งานของ indole reagent ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าใช้ได้ประมาณกี่นาที ก็ขึ้นอยู่กับความไวของผู้วิจัยสนใจ เพื่อหาคำตอบนี้ โดยออกแบบการทดลองเพื่อหาค่าระยะเวลาในการใช้งาน indole reagent ที่เหมาะสม ด้วยการทดสอบด้วยวิธี ICOCI

ในการออกแบบการทดลองผู้วิจัยทำการเตรียม Indole reagent จาก Indole ผสมกับกรดซัลฟูริกความเข้มข้นสูง ในอัตราส่วน 2.5 : 1 (เข้มข้น 2.5 mg/ml) แล้วนำมาทดสอบความเสถียรของเวลาโดยการตั้งทิ้งไว้ 0, 30, 60, 120, 240, 480 และ 1440 นาที ตามลำดับ (เตรียมสารรอบเดียว) ภายหลังจากการตั้งทิ้งไว้ตามเวลาข้างต้น Indole reagent จะถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยทำซ้ำทั้งสิ้น 3 รอบ ใน 1 รอบวัดค่า 3 ซ้ำ ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 12 แสดงผลจากการวัดความเสถียรของ Indole reagent ภายใน 1 วัน

Time (min)	Duplicate 1			Duplicate 2			Duplicate 3			Mean	SD	CV
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.4	Rep.5	Rep.6	Rep.7	Rep.8	Rep.9			
0	0.450	0.450	0.450	0.448	0.448	0.450	0.459	0.460	0.460	0.453	0.005	1.157
30	0.502	0.503	0.499	0.501	0.503	0.499	0.501	0.503	0.499	0.501	0.002	0.352
60	0.482	0.481	0.481	0.490	0.489	0.488	0.475	0.475	0.474	0.482	0.006	1.297
120	0.581	0.581	0.581	0.582	0.581	0.580	0.582	0.582	0.582	0.581	0.001	0.122
240	0.528	0.528	0.528	0.528	0.528	0.528	0.531	0.532	0.530	0.529	0.002	0.299
480	0.536	0.536	0.536	0.540	0.541	0.541	0.538	0.538	0.539	0.538	0.002	0.383
1440	0.550	0.550	0.551	0.555	0.555	0.555	0.557	0.556	0.556	0.554	0.003	0.498

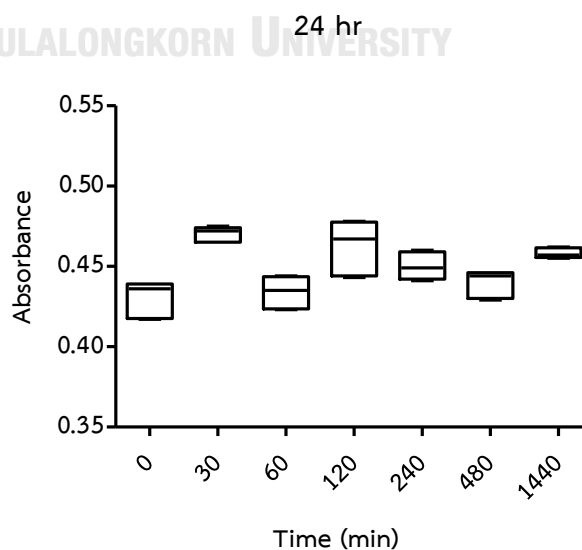
เมื่อนำมาสร้างกราฟได้ผลดังนี้



รูปที่ 37 แสดงกราฟผลจากการทดสอบเสถียรภาพของ Indole reagent รอบที่ 1

จากกราฟข้างต้นจะเห็นได้ว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีแนวโน้มสูงขึ้นจากเวลาเริ่มต้น โดยลักษณะจะเป็นการเพิ่มขึ้นแล้วลดลงสลับกันไป โดยที่เวลา 120 นาที ค่าการดูดกลืนแสงจะสูงที่สุดหลังจากนั้นค่าจะลดลง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ยังหาข้อสรุปได้ไม่ชัดเจน ผู้วิจัยจึงทำการทดลองซ้ำ โดยมีใช้เงื่อนไขและวิธีการแบบเดิม ได้ผลดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

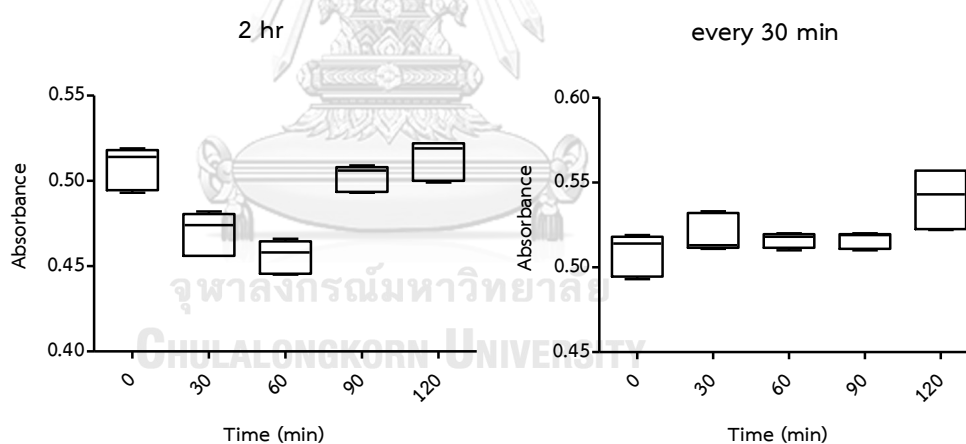


รูปที่ 38 แสดงกราฟผลจากการทดสอบเสถียรภาพของ Indole reagent ครั้งที่ 2

จากการทดสอบรอบที่ 2 พบว่า ที่เวลา 120 นาที ค่าการดูดกลืนแสงไม่ได้เพิ่มขึ้นมาก เช่นเดียวกับผลจากการทดลองในรอบที่ 1 (รูปที่ 37) แต่รูปแบบการเพิ่มขึ้นสลับกับการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงยังคงเป็นเหมือนเดิม

ในการทดลองต่อไป ผู้วิจัยสังเกตเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงของ Indole reagent ไม่ได้เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เวลาหลังจาก 120 นาที และค่าที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงทุก 30 นาที ทำให้ผู้วิจัยออกแบบการทดลองเพิ่มเติมโดยการทำการทดลองซ้ำแต่จำกัดเวลาให้อยู่ในช่วง 120 นาที และแบ่งช่วงการทดสอบออกเป็นช่วงละ 30 นาที โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยเปรียบเทียบกัน คือ

- 1) ทำการเตรียม indole reagent 1 ครั้ง โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่เวลาที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 ตามลำดับ
- 2) ทำการเตรียม indole reagent ทุก ๆ 30 นาที โดยเริ่มวัดตั้งแต่เวลาที่ 0 จากนั้นเตรียมสารใหม่แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่ที่นาที 30 ทำจนครบ 120 นาที แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

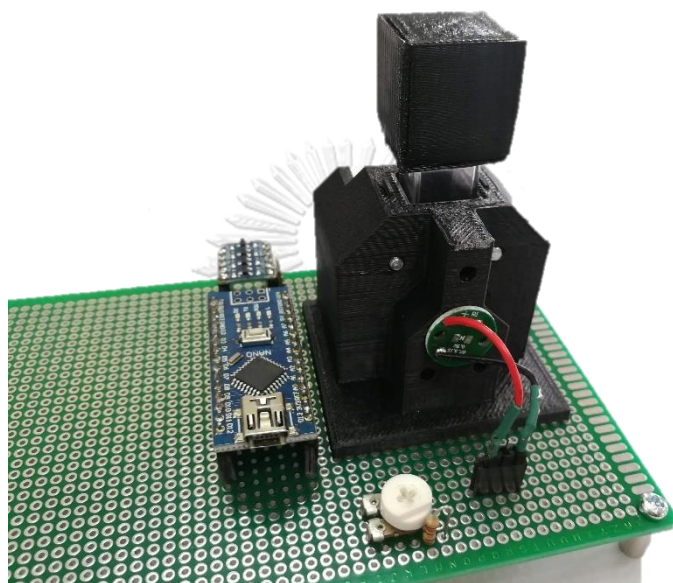


รูปที่ 39 แสดงกราฟผลจากการทดสอบเสถียรภาพของ Indole reagent ครั้งที่ 3

ผลจากการทดสอบ พบว่า หากทำการเตรียม stock สารเพื่อเอาไว้ใช้ภายใน 2 ชม. ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะค่อนข้างไม่คงที่ แต่ถ้าหากทำการเตรียมสารทุก 30 นาที จะให้ผลที่ค่อนข้างคงที่มากกว่า ดังนั้น ข้อเสนอสำหรับการทดลองนี้ คือ การใช้งาน indole reagent ให้เกิดประสิทธิภาพสูงที่สุด ควรเตรียมสารใหม่ทุกครั้ง หรือใช้งานสารให้หมดภายในเวลา 30 นาที เพื่อลดความผิดพลาดจากข้อจำกัดของ Indole reagent

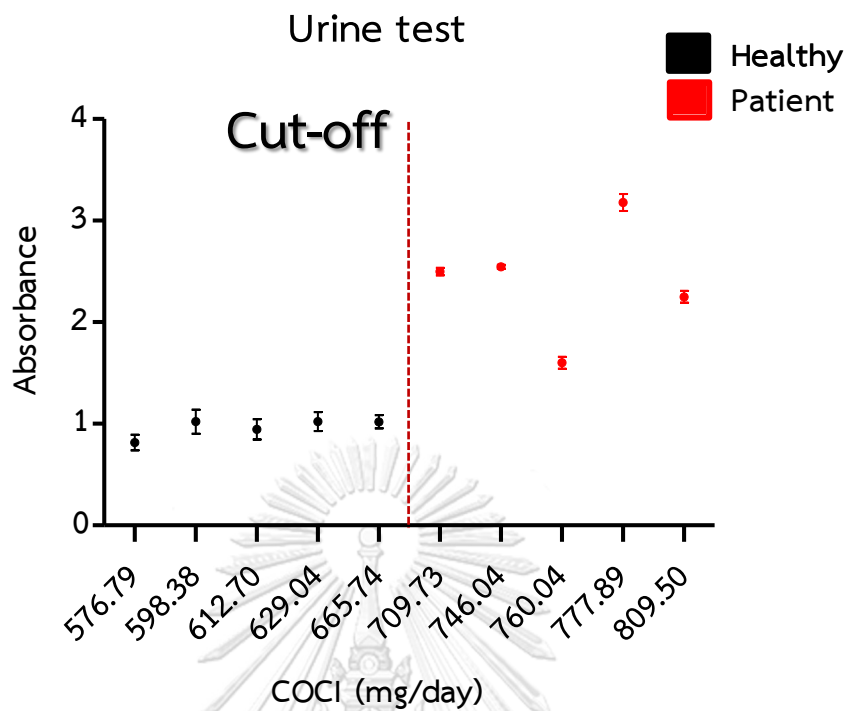
4.6) การทดสอบเปรียบเทียบระบบวัดแสงต้นแบบกับเครื่องมือวัดมาตรฐาน

ได้นำเซนเซอร์โมดูล AS7262 มาทำการพัฒนาเป็นระบบวัดแสงต้นแบบเพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างปัสสาวะ (ซึ่งจะกล่าวถึงโดยละเอียดในหัวข้อ 4.8) โดยใช้ร่วมกับคิเวทท์พลาสติกทรงสี่เหลี่ยมในการบรรจุสารตัวอย่างเพื่อทำการวัด โดยระบบวัดแสงต้นแบบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นดังแสดงในรูปที่ 38



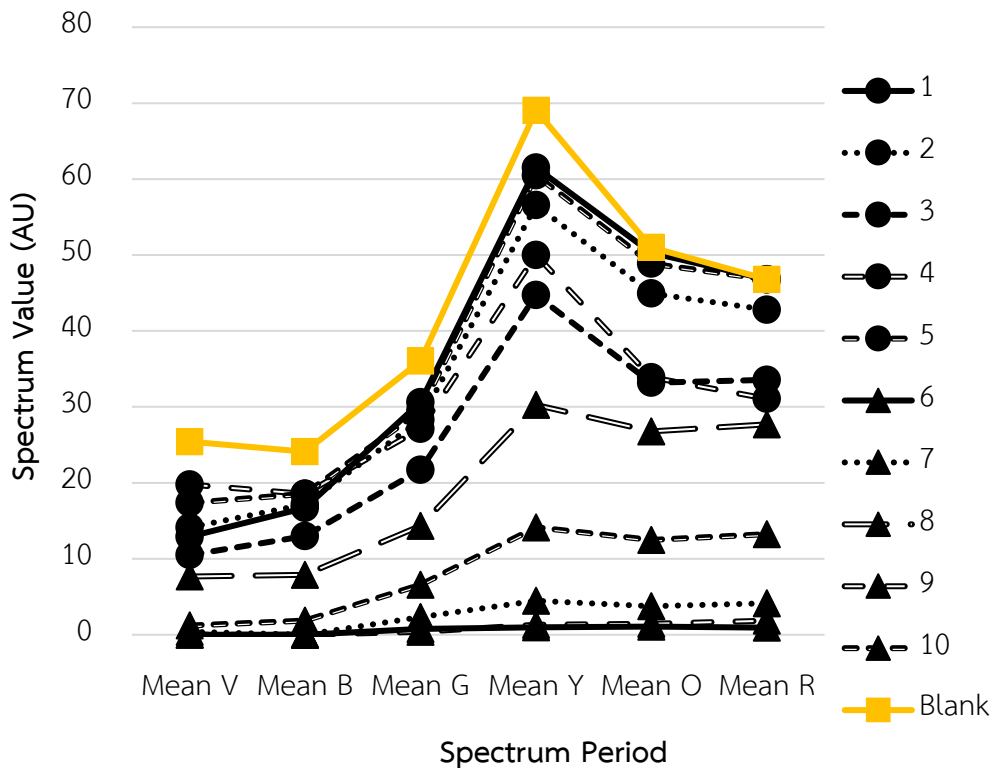
รูปที่ 40 ระบบวัดต้นแบบที่พัฒนาขึ้น (แบบใช้คิเวทท์พลาสติกในการบรรจุสารตัวอย่าง)

จากนั้นได้ทำการทดสอบระบบที่พัฒนาขึ้นนี้ในเบื้องต้น โดยได้นำตัวอย่างปัสสาวะ 10 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างจากผู้ป่วยและผู้มีสุขภาพดีอย่างละ 5 ตัวอย่าง โดยได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเครื่องมือวัดมาตรฐาน (Thermo Scientific GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer) กับระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้นผ่านวิธี iCOCl โดยตัวอย่างที่ 1-5 (ความเข้มข้น 576.79-665.74 mg/ml) เป็นตัวอย่างปัสสาวะที่ได้มาจากการสุ่มของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ส่วนตัวอย่างที่ 6-10 (ความเข้มข้น 709.73-809.50 mg/ml) เป็นตัวอย่างปัสสาวะที่ได้มาจากการสุ่มของอาสาสมัครที่เป็นโรคนิ่วไต โดยตัวอย่างปัสสาวะทั้งสองกลุ่มที่เลือกมามีค่า COCl ต่างจากค่าที่จุด cut-off ไม่เกิน 30 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 41 ผลการทดสอบจากเครื่องมือมาตรฐาน

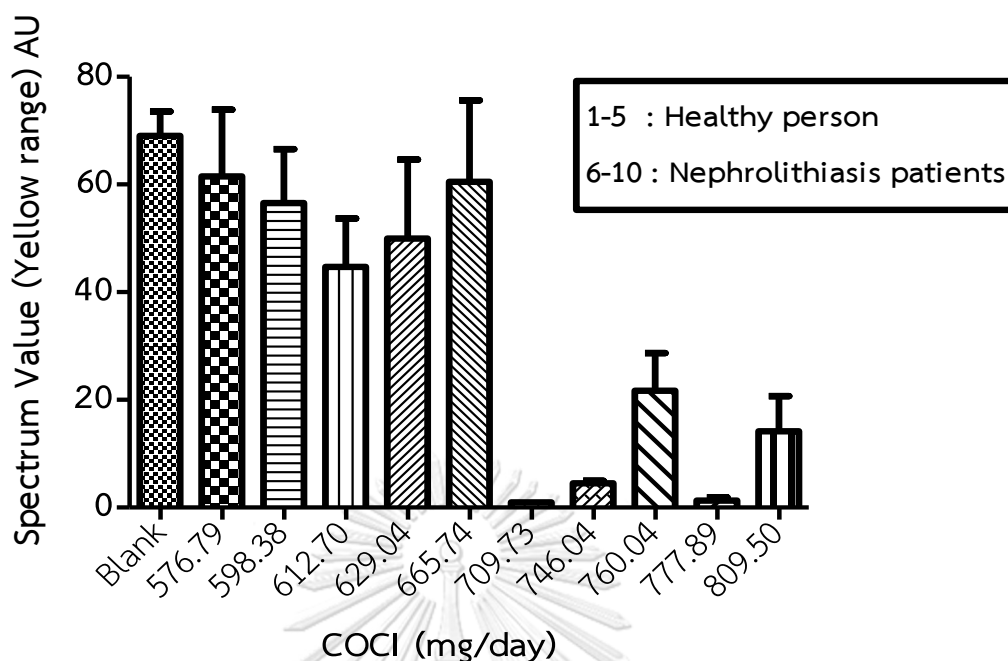
จากรูปที่ 41 เป็นผลการทดสอบของเครื่องมือมาตรฐาน (อ้างอิงจากการทดลองหัวข้อ 4.5.3) จะพบว่า ตัวอย่างที่ 1-5 (ค่า COCI 576.79 ถึง 665.74 mg/day ตามลำดับ) ดังรูปที่ 41 ของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 1.5 AU ทุกตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ 6-11 (ค่า COCI 709.73 ถึง 809.5 mg/day ตามลำดับ) ของอาสาสมัครที่เป็นโรคนิวไต พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าสูงกว่า 1.5 AU ทุกตัวอย่าง กล่าวคือ จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเครื่องมือมาตรฐานสามารถใช้แบ่งกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรค ออกจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีได้



รูปที่ 42 แสดงผลการทดสอบปริมาณ CaOx ของระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น

เมื่อนำตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 10 ตัวอย่างมาทดสอบกับระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 41 ซึ่งแสดงค่า output ของค่าสเปกตรัมของแต่ละช่วงสี พบว่า ที่ช่วงค่าสเปกตรัมสีเหลือง (Mean Y: 565-590 nm) แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าสเปกตรัม (Spectrum Value) มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับที่สเปกตรัมช่วงอื่น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกช่วงนี้มาใช้ในการแยกแยะเพื่อหาจุด cut-off ของระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้นสำหรับใช้แบ่งกลุ่มผู้ที่มีเสี่ยงต่อโรคนิ่วไตและผู้ที่มีสุขภาพดี นอกจากนั้นผลการทดลองข้างต้นยังแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกกลุ่มของผู้ที่เป็นโรคนิ่วไต (เส้นจุดสามเหลี่ยม) กับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี (เส้นจุดวงกลม) ออกจากกันได้ อย่างชัดเจน

เมื่อนำข้อมูลสเปกตรัมช่วงสีเหลืองของตัวอย่างปัสสาวะที่ทำการสุ่มทั้ง 10 ตัวอย่างมาพิจารณา พบว่า สามารถเลือกค่า cut-off ในเบื้องต้นของค่าสเปกตรัมสีเหลืองที่ 35 AU ซึ่งเกิดจากการนำมาเฉลี่ยระหว่างค่าสเปกตรัมสีเหลืองที่น้อยที่สุดในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีและสเปกตรัมสีเหลืองที่มากที่สุดของกลุ่มผู้ที่เป็นโรคนิ่วไต เพื่อใช้เป็นค่าสำหรับใช้ในการคัดกรองผู้ที่เป็นโรคนิ่วไตกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีได้ดังรูปที่ 42



รูปที่ 43 แสดงค่าสเปกตรัมสีเหลืองของปัสสาวะที่ได้จากการวัดด้วยระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น

จากผลข้างต้นจะเห็นว่าสามารถนำข้อมูลสเปกตรัมช่วงสีเหลืองมาใช้ในการแยกแยะตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยและผู้มีสุขภาพดีได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในระบบวัดต้นแบบที่พัฒนาขึ้นนี้จะนำข้อมูลสเปกตรัมช่วงสีเหลืองที่ได้จากการวัดโดยเซนเซอร์โมดูลนี้มาใช้ในการตรวจคัดกรองในหัวข้อต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7) ผลการวัด COCI, iCOCI ด้วยระบบมาตรฐาน และ iCOCI ด้วยระบบวัดต้นแบบที่พัฒนาขึ้น กับชุดฝึก 60 ตัวอย่าง และชุดทดสอบ 60 ตัวอย่าง

หลังจากการทดลองที่ผ่านทางคณะแพทย์ได้มีการปรับเปลี่ยนข้อมูลของตัวอย่างปัสสาวะจากเดิมมีผู้ป่วยที่ทราบชนิดของนิ่วว่าเป็นนิ่วชนิด CaOx และ CaP รวมจำนวน 37 คน เปลี่ยนเป็น 60 คน ทำให้ผู้วิจัยทำการทดลองในรูปแบบเดิมซ้ำ กล่าวคือ ทำการวัดปริมาณ CaOx ในตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยทั้ง 60 คน เทียบกับผู้ที่ไม่มีสุขภาพดี 60 คน โดยจะต้องมีเพศและอายุใกล้เคียงกัน จากนั้นทำการสุ่มเลือกผลจากตัวอย่างปัสสาวะ 30 ตัวอย่างจากผู้ป่วยและผู้มีสุขภาพดี โดย 30 ตัวอย่างที่เลือกจะถูกจัดให้อยู่ใน ชุดฝึก (Training set) ส่วนตัวอย่างปัสสาวะที่เหลือของทั้งกลุ่มผู้ป่วยและผู้มีสุขภาพดีจะถูกจัดให้อยู่ใน ชุดทดสอบ (Test set) จากนั้นทำการหาค่า cut-off โดยใช้ข้อมูลจาก Train group ผ่านโปรแกรม GraphPad prism 5 แล้วใช้ค่า cut-off ที่ได้จาก Train group เป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อดูค่าความแม่นยำของการวัดแคลเซียมออกซาเลตด้วยวิธี iCOCI ผ่าน

เครื่องมือวัดมาตรฐานและระบบวัดแสงต้นแบบที่พัฒนาโดยใช้คิวเวทท์พลาสติกในการบรรจุสารตัวอย่างเมื่อทำการวัด โดยผลที่ได้มีดังนี้

ตารางที่ 13 แสดงผลการหาค่า cut-off และค่าความแม่นยำของวิธีวัด iCOCI ของกลุ่มชุดฝึกที่ได้จากการสุ่ม โดยวัดผ่านเครื่องมือมาตรฐานและระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น

Random Group	Cut-off (mg/ml)	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Area
Test Group COCI _m	< 0.92	76.67	73.33	75.00	0.79
Test Group iCOCI _m	< 0.44	73.33	70.00	71.67	0.77
Test Group iCOCI _{dc}	< 32.72	76.67	76.67	76.67	0.84

หมายเหตุ : COCI_m คือ ผลที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องมือมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 215 nm
 iCOCI_m คือ ผลที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องมือมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 530 nm
 iCOCI_{dc} คือ ผลที่ได้จากการวัดด้วยระบบวัดแสงต้นแบบโดยใช้ค่าในช่วงคลื่นสีเหลือง (565-590 nm) เป็นสัญญาณในการวัด

จากผลการทดสอบจากตารางที่ 13 ข้างต้นทำให้ผู้วิจัยทราบถึงค่า cut-off ของตัวอย่างปัสสาวะในกลุ่มชุดฝึก ได้ผลดังนี้

- 1) ค่า cut-off สำหรับใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างปัสสาวะที่ทดสอบด้วยวิธี COCI ผ่านเครื่องมือมาตรฐาน GENESYS ที่ความยาวคลื่น 215 nm คือ **0.92 mg/ml**
- 2) ค่า cut-off สำหรับใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างปัสสาวะที่ทดสอบด้วยวิธี iCOCI ผ่านเครื่องมือวัดมาตรฐาน GENESYS ที่ความยาวคลื่น 530 nm คือ **0.44 mg/ml**
- 3) ค่า cut-off สำหรับใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างปัสสาวะที่ทดสอบด้วยวิธี iCOCI ผ่านระบบวัดแสงต้นแบบที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ค่าในช่วงคลื่นสีเหลือง (565-590 nm) เป็นสัญญาณในการวัด คือ **32.72 AU**

จากการทดลองข้างต้น จะได้ ค่าความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำของค่า cut-off จากตัวอย่างปัสสาวะชุดฝึกดังตารางที่ 13 ซึ่งค่า cut-off ดังกล่าวจะถูกนำมาใช้เป็นค่าอ้างอิงในการแยกแยะ ชุดทดสอบของผู้ป่วยและผู้มีสุขภาพดีกลุ่มละ 30 คน ที่เหลือ โดยผลการทดสอบวัดปริมาณ CaOx จากชุดทดสอบได้ผลดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงผลการหาค่า cut-off และค่าความแม่นยำของวิธีวัด iCOCl ของกลุ่มชุดทดสอบที่
เหลือจากการสู่ม โดยวัดผ่านเครื่องมือมาตรฐานและระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น

Random Group	Cut-off (mg/ml)	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Area
Train Group COClm	< 0.92	73.33	70.00	71.67	0.81
Train Group iCOClm	< 0.44	70.00	56.67	63.34	0.70
Train Group iCOCl dc	< 32.72	73.33	73.33	73.33	0.74

หมายเหตุ : COClm คือ ผลที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องมือมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 215 nm

iCOClm คือ ผลที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องมือมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 530 nm

iCOCl dc คือ ผลที่ได้จากการวัดด้วยระบบวัดแสงในช่วงคลื่นสีเหลือง (565-590 nm)

โดยทำการแปลงค่าแล้ว

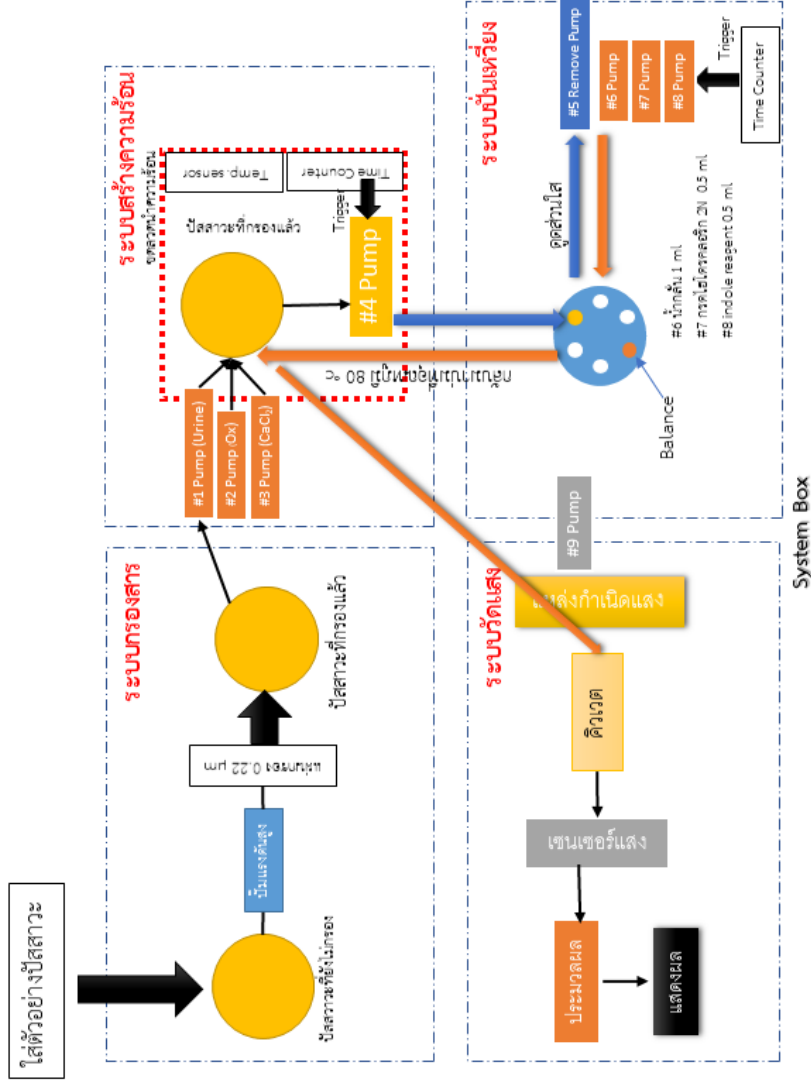
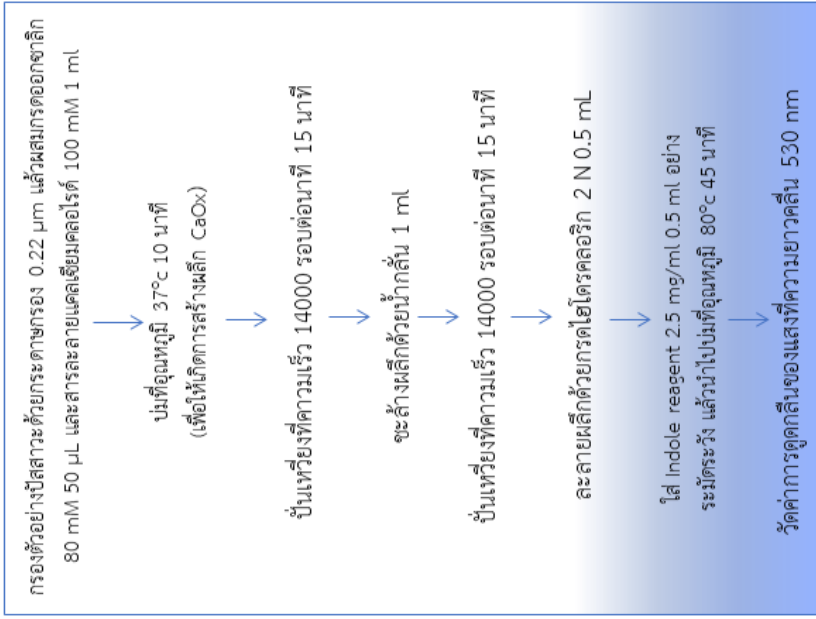
จากผลการทดสอบจากตารางที่ 14 ข้างต้นทำให้ผู้วิจัยทราบถึงค่า ความไว ความจำเพาะ และ ความแม่นยำ ของตัวอย่างปัสสาวะในกลุ่มชุดทดสอบมีค่าที่ใกล้เคียงกับของกลุ่มชุดฝึกในกรณีของวิธี COCl และวิธี iCOCl จากระบบวัดต้นแบบที่พัฒนาขึ้น (iCOCl dc) ส่วนผลที่ได้จากวิธี iCOCl ที่วัดด้วยเครื่องมือมาตรฐาน (iCOClm) จะมีความไวใกล้เคียงกับชุดฝึกแต่มีความจำเพาะลดลงกว่าที่ได้จากชุดฝึก ซึ่งจากผลการทดสอบทั้งหมดจาก 120 ตัวอย่างปัสสาวะข้างต้นจะเห็นได้ว่าวิธี iCOCl ของระบบวัดแสงต้นแบบที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองใกล้เคียงกับวิธี COCl โดยมีทั้งค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจคัดกรองมากกว่า 70% ซึ่งทำให้สามารถประยุกต์ใช้วิธีการวัดและระบบวัดที่พัฒนาขึ้นนี้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคไตได้อย่างมีประสิทธิภาพได้

4.8) การพัฒนาระบบวัดเพื่อการทำงานแบบอัตโนมัติ

การพัฒนาระบบตรวจวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตจะประกอบด้วยทั้งหมด 5 ระบบย่อย คือ ระบบกรองสาร ระบบผสมและผสมและนำส่งสาร ระบบสร้างความร้อน ระบบปั่นเหวี่ยง ระบบวัดแสง และระบบแปลและแสดงผล ดังที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 โดยภาพรวมการทำงานของทั้งระบบมีดังนี้

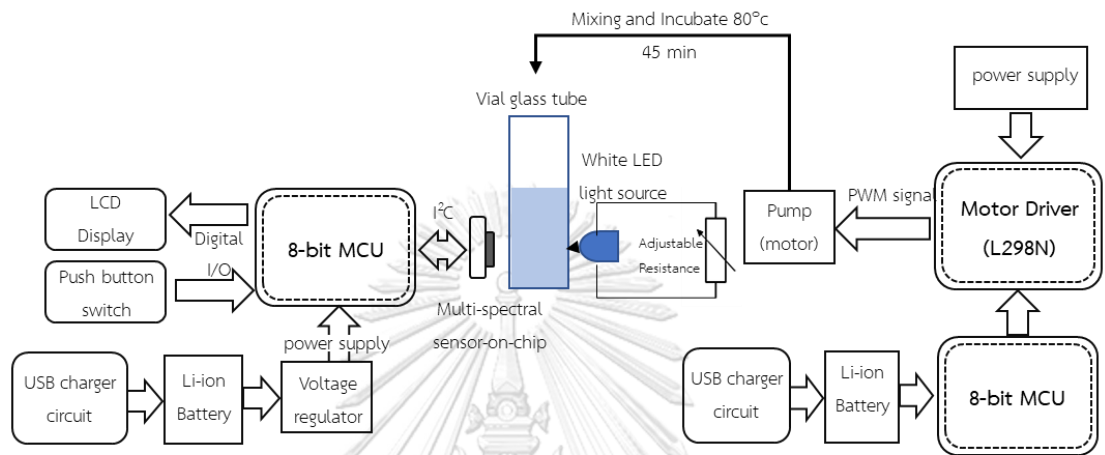
เริ่มต้นจากการนำตัวอย่างปัสสาวะเข้าสู่กระบวนการกรองในระบบกรองสารโดยในระบบนี้จะประกอบด้วยไฮโดรลิกปั๊มที่ทำหน้าที่ปั๊มตัวอย่างปัสสาวะเข้าสู่แผ่นกรอง 0.22 μm ในขั้นตอนนี้จะทำการกรองโปรตีนที่มีอนุภาคใหญ่ออกจากปัสสาวะ เนื่องจากโปรตีนมีประจุลบอาจเป็นตัวกวนในระบบโตะการแยงออกซาเลตในปัสสาวะจับกับแคลเซียมไอออนแล้วทำให้ไม่เกิดการสร้างผลึก

แคลเซียมออกซาเลต ภายหลังจากการกรองจะมีการดูดตัวอย่างปัสสาวะ 950 μL โดยปั๊มตัวที่ 1 ที่ถูก ออกแบบ ผสมกับสารละลายกรดออกซาลิก 80 mM 50 μL และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 100 mM 1 mL ด้วยปั๊มตัวที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยสารเหล่านี้จะถูกดูดไปรวมที่ภาชนะในระบบ สร้างความร้อน ในระบบนี้จะทำการสร้างความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (จำลองอุณหภูมิ ร่างกาย) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นสารละลายตัวอย่างจะถูกปั๊มตัวที่ 4 ดูดเพื่อนำไประบบปั่น เหวียง ในส่วนนี้จะมีหลอด balance ใส่รอไว้อยู่แล้วโดยมีปริมาตรเท่ากับสารละลายตัวอย่าง โดยโรเตอร์จะทำการหมุนที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปั๊มตัวที่ 5 จะ ทำหน้าที่ดูดของเหลวส่วนใสออกให้เหลือเพียงตะกอนที่ก้นหลอด หลังจากนั้น ปั๊มตัวที่ 6 จะทำการ ดูดน้ำกลั่นลงไป ในหลอดทดลองเพื่อชะล้างผลึกแล้วทำการปั่นเหวียงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เสร็จสิ้นกระบวนการดังกล่าว ปั๊มตัวที่ 5 จะทำหน้าที่ดูดของเหลวส่วนใสออกให้ เหลือเพียงตะกอนที่ก้นหลอด เมื่อเสร็จแล้วปั๊มตัวที่ 7 จะทำการดูดสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 N 500 μL ลงในหลอดทดลองเพื่อละลายผลึกที่ก้นหลอดจากนั้นปั๊มตัวที่ 8 จะดูด indole reagent เข้มข้น 2.5 mg/ml ที่เตรียมไว้ผสมกับสารละลายผลึกแคลเซียมออกซาเลตลงในหลอดทดลอง เมื่อ ผสมกันแล้วจะมีปั๊มตัวที่ 9 ลำเลียงสารผสมกันนี้ไปที่หลอดทดลองในระบบสร้างความร้อนโดยจะบ่ม สารด้วยความร้อน 80 องศาเซลเซียส 45 นาที ภายหลังจากการบ่มสารปั๊มตัวที่ 9 จะทำการดูดสาร ไปที่คิวเวทท์ของระบบวัดแสง โดยจะทำการวัดการดูดกลืนแสงโดยอาศัยหลักของสเปกโทรสโกปี โดย มีเซนเซอร์สีที่ทำการเปลี่ยนค่าทางฟิสิกส์เป็นค่าทางไฟฟ้า แล้วส่งข้อมูลที่ไปที่หน่วยประมวลผล เพื่อทำการวิเคราะห์แล้วแสดงผลออกผ่านทางหน้าจอแสดงผล ดังรูปที่ 42



รูปที่ 44 แสดงขั้นตอนและส่วนประกอบของเครื่องมีวัตต์

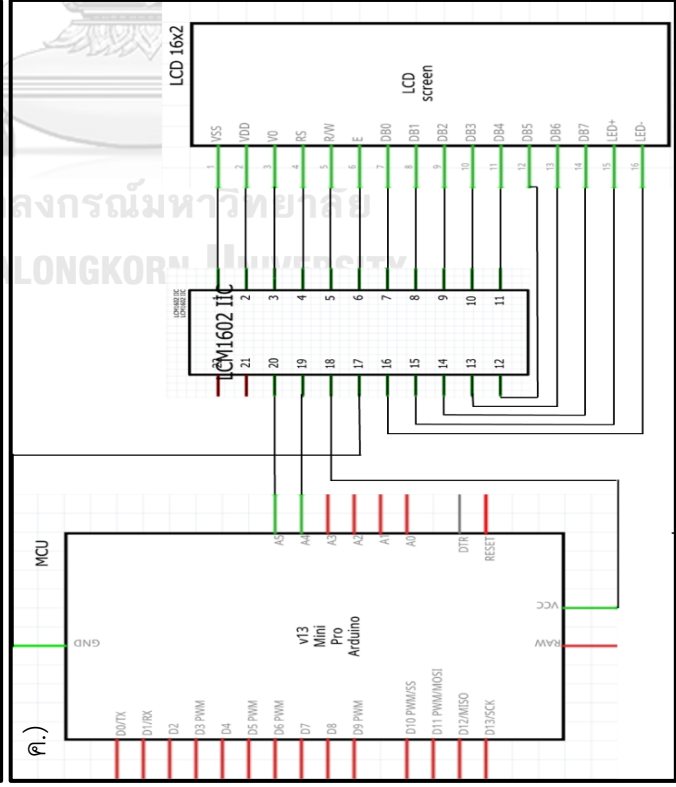
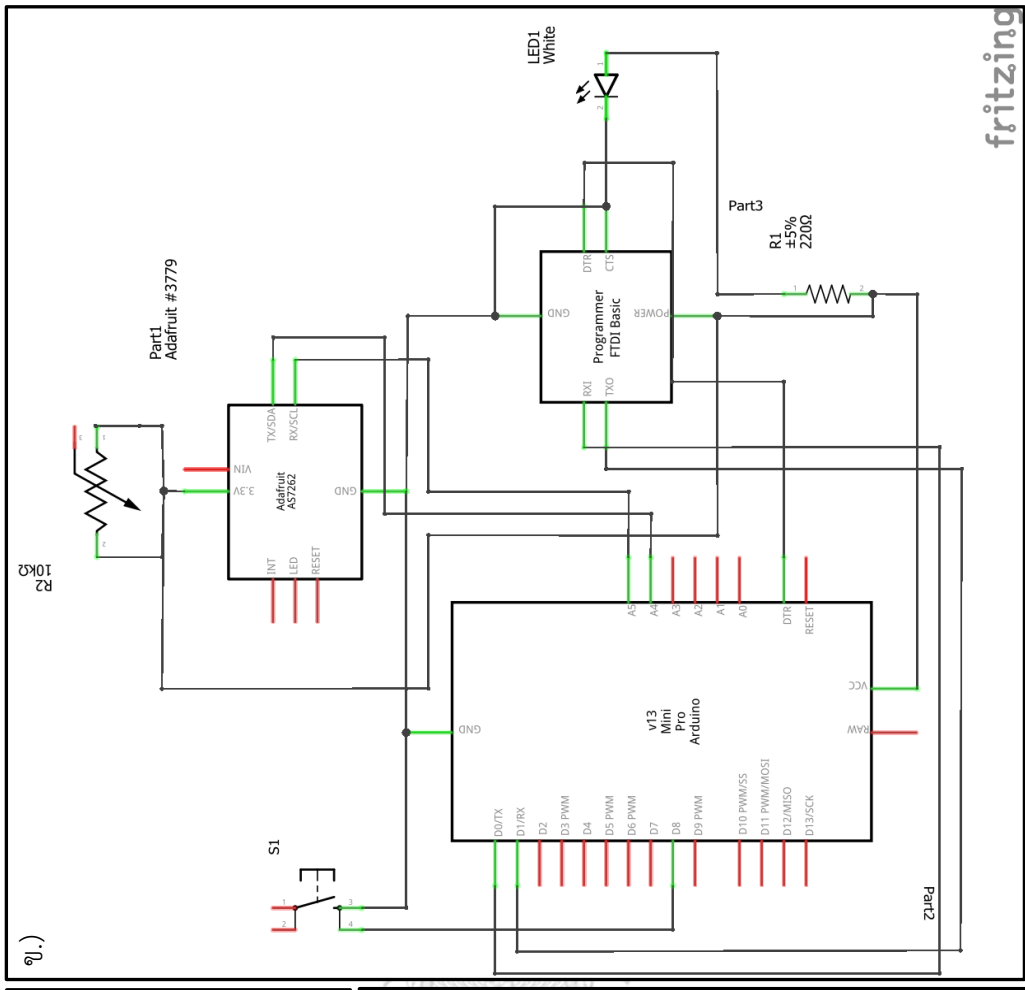
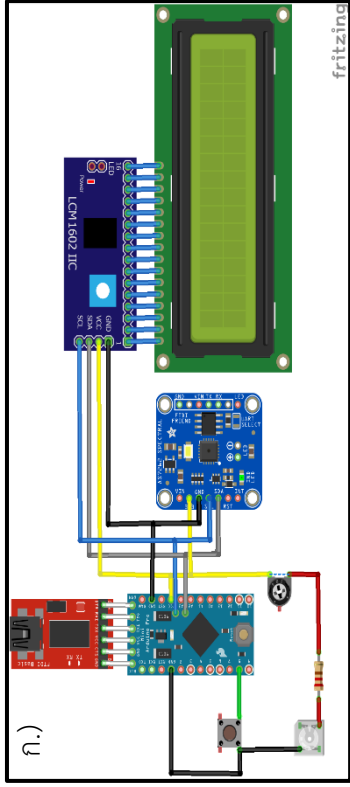
ผู้วิจัยได้พัฒนาในระบบวัดแสงและระบบผสมและนำส่งสาร และระบบแปลและแสดงผล ให้มีการทำงานแบบกึ่งอัตโนมัติขึ้นเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาเป็นระบบแบบอัตโนมัติเพื่อใช้ในคัดกรองผู้ป่วยโรคไตได้ต่อไป โดยมีระบบที่พัฒนาขึ้นนี้มีหลักการทำงานดังรูปที่ 44 ในส่วนการพัฒนาของแต่ละระบบที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นมีดังนี้



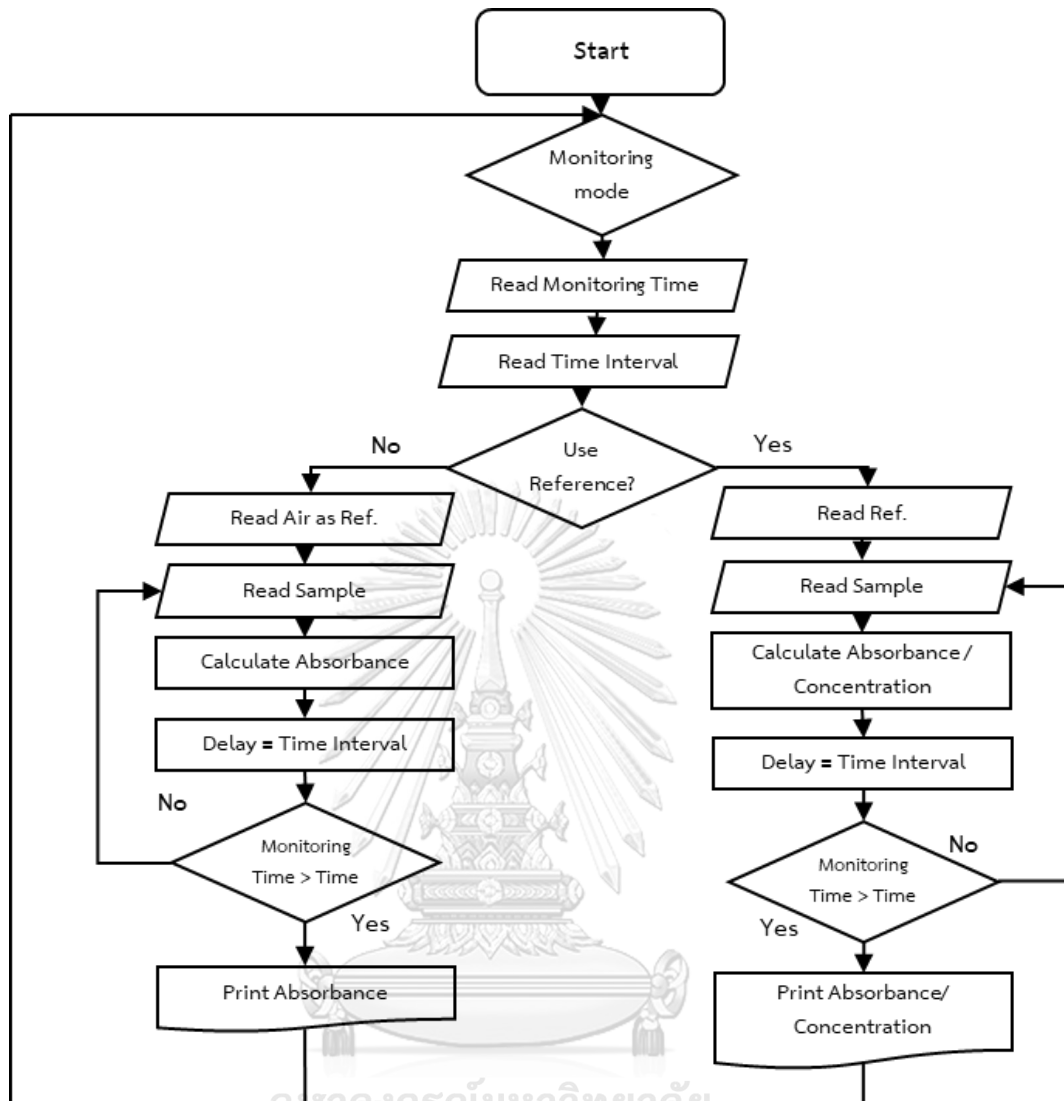
รูปที่ 45 แสดงแผนภาพการทำงานของระบบวัดแสงและระบบผสมและนำส่งสาร

4.8.1) ระบบวัดแสง

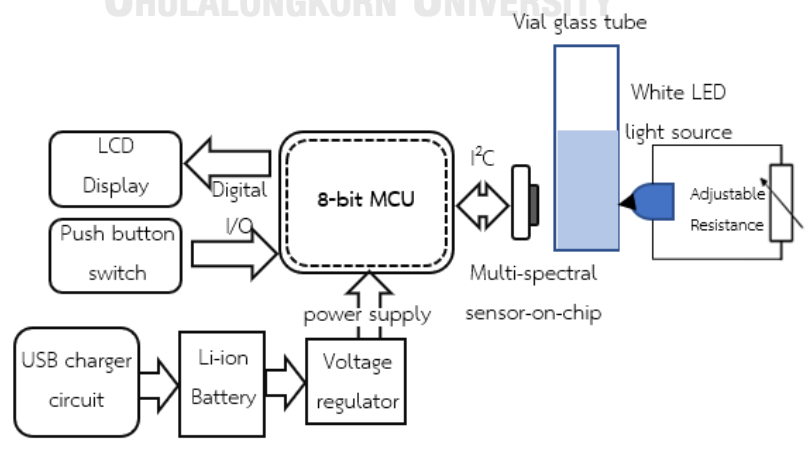
ระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้นเป็นดังแสดงในรูปที่ 45 โดยจะประกอบด้วยอุปกรณ์เซนเซอร์ (AS7262, ams) ที่สามารถวัดแสงที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน 6 ช่วงความยาวคลื่น (6-channel multi-spectral) ที่อยู่ในช่วง 430 ถึง 670 นาโนเมตร โดยในการตรวจวัดสารตัวอย่างจะทำการวัดแสงจากแหล่งกำเนิดไดโอดเปล่งแสงสีขาว (LED) ที่ทะลุผ่านสารตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในคิวเวท (Cuvette) จากนั้นข้อมูลของความเข้มแสงที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ ที่วัดได้โดยอุปกรณ์เซนเซอร์นี้จะถูกส่งไปให้หน่วยประมวลผลกลาง (MCU) ที่ใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์ชนิด 8-bit (Atmega328, Atmel) ผ่านการเชื่อมต่อแบบ I²C จากนั้นหน่วยประมวลผลกลางจะนำข้อมูลที่ได้ไปประมวลและแปรผลออกมาเป็นผลการตรวจคัดกรองผู้ป่วยและแสดงผลออกมาทางจอแสดงผล นอกจากนี้ระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้นยังมีการใช้แบตเตอรี่และวงจรชาร์ตเพื่อให้สามารถใช้งานเป็นระบบวัดแบบพกพาได้ โดยมีแผนผังการทำงานของระบบวัดแสงดังรูปที่ 46



รูปที่ 46 แสดงแผนผังระบบบอร์ดแสง และวงจรถ่ายส่วนต่าง ๆ ก.) แผนผังระบบบอร์ดแสง ค.) วงจรการแสดงผล



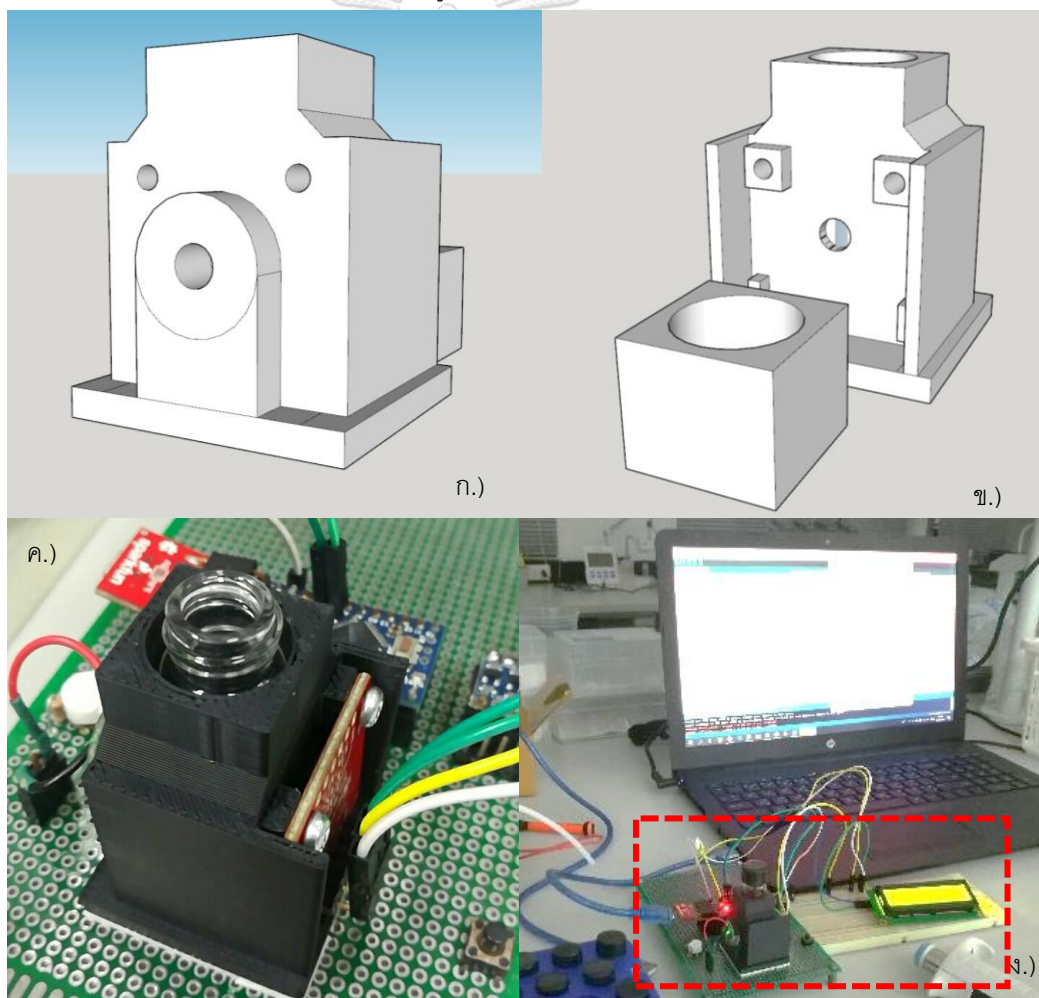
รูปที่ 47 แสดงแผนผังการทำงานของระบบวัดแสง



รูปที่ 48 แสดงการทำงานของระบบวัดแสง

ระบบนี้ได้นำ vial glass tube เข้ามาแทน cuvette สำหรับบรรจุสารและใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงจากเซนเซอร์ เนื่องจาก vial glass tube สามารถทนอุณหภูมิสูง หาง่าย ราคาไม่แพงและสะดวกต่อการทำงานของระบบวัดแบบอัตโนมัติ ซึ่งค่าที่ได้จากการทดสอบจะนำเสนอในหัวข้อถัดไป

นอกจากนี้ในส่วนตัวระบบวัดผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ holder สำหรับติดตั้งแหล่งกำเนิดแสง เซนเซอร์แสงและ ช่องสำหรับใส่ vial glass tube สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างปัสสาวะ โดยทำการออกแบบด้วยโปรแกรม SketchUP 2017 ดังรูปที่ 47 โดยทางด้านหน้า holder จะติดตั้ง LED สีขาวทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสง ตรงกลาง holder จะมีช่องสำหรับบรรจุ vial glass tube สำหรับนำตัวอย่างมาวัด ส่วนด้านหลังเป็นส่วนสำหรับติดตั้งเซนเซอร์แสง ในส่วนของขนาดของ holder จะมีความกว้าง 35.93 มม. ยาว 33.5 มม. สูง 44.13 มม. และฝาสำหรับครอบ vial glass tube ขณะวัดมีความกว้าง 26.7 มม. ยาว 20 มม. สูง 17 มม.



รูปที่ 49 แสดงการออกแบบ Holder ผ่านโปรแกรม SketchUp

- ก.) ด้านหน้า holder ข.) ด้านหลัง holder ค.) holder ที่ได้จากการพิมพ์สามมิติ
 ง.) ระบบวัดแสงที่ใช้งานจริง

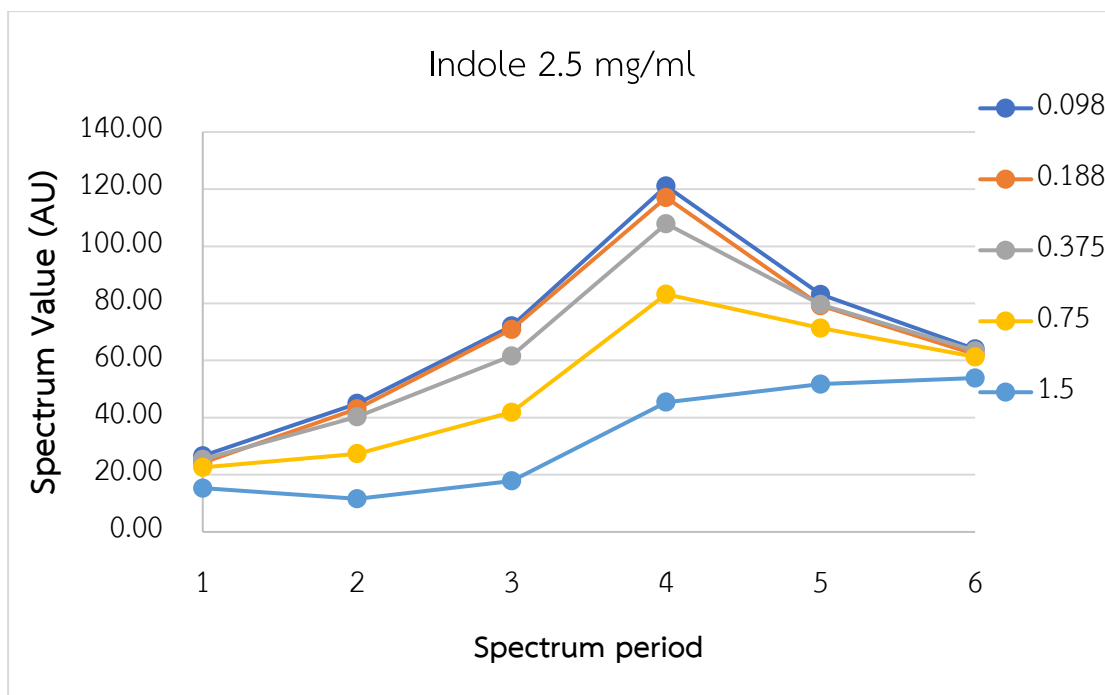
4.8.1.1) การทดสอบระบบวัดแสงเบื้องต้น

ในการทดสอบเบื้องต้นผู้วิจัยได้เตรียมสารละลายมาตรฐานแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (COM) ที่ความเข้มข้น 0.094, 0.188, 0.375, 0.75 และ 1.5 mg/mL ตามลำดับ สำหรับใช้ในการทดสอบกับระบบวัดแสง จากนั้นนำไปสารละลายข้างต้นทดสอบด้วยวิธี iCOCI โดยผลการทดสอบด้วยระบบวัดแสงจะแสดงผลผ่านโปรแกรม Arduino IDE ทาง serial monitor ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 15 แสดงค่าที่วัดได้จากเครื่องวัดแสง ผ่านโปรแกรม Arduino

[STD COM] mg/ml	Mean V (Violet)	Mean B (Blue)	Mean G (Green)	Mean Y (Yellow)	Mean O (Orange)	Mean R (Red)
0.098	26.63	44.96	72.08	121.02	83.13	64.03
0.188	24.21	43.11	70.92	117.08	79.20	62.18
0.375	25.42	40.32	61.62	107.87	79.56	63.41
0.75	22.60	27.35	41.85	83.20	71.35	61.26
1.5	15.34	11.58	17.83	45.38	51.73	53.87

โดยผลการทดสอบที่ได้มาในแต่ละความเข้มข้นจะมี 6 ค่าแบ่งตามช่วงสี เนื่องจากเซนเซอร์สีที่ใช้จะแสดงผลออกมา 6 ช่วงความยาวคลื่น และเมื่อนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟได้ผลดังนี้

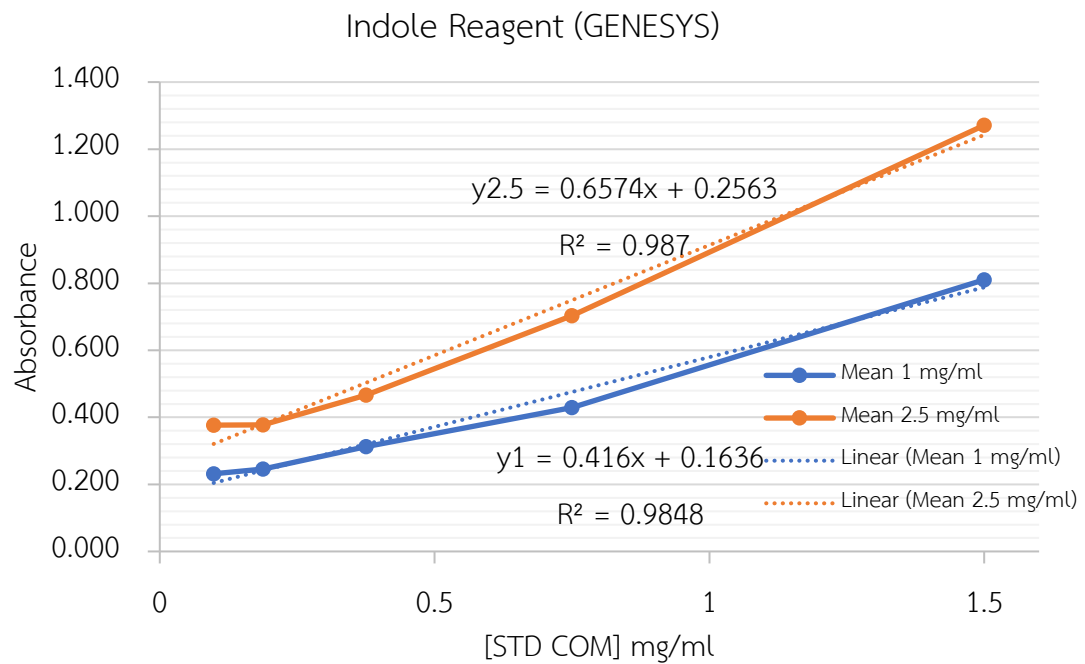


รูปที่ 50 แสดงผลจากการวัดสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่องมือวัด

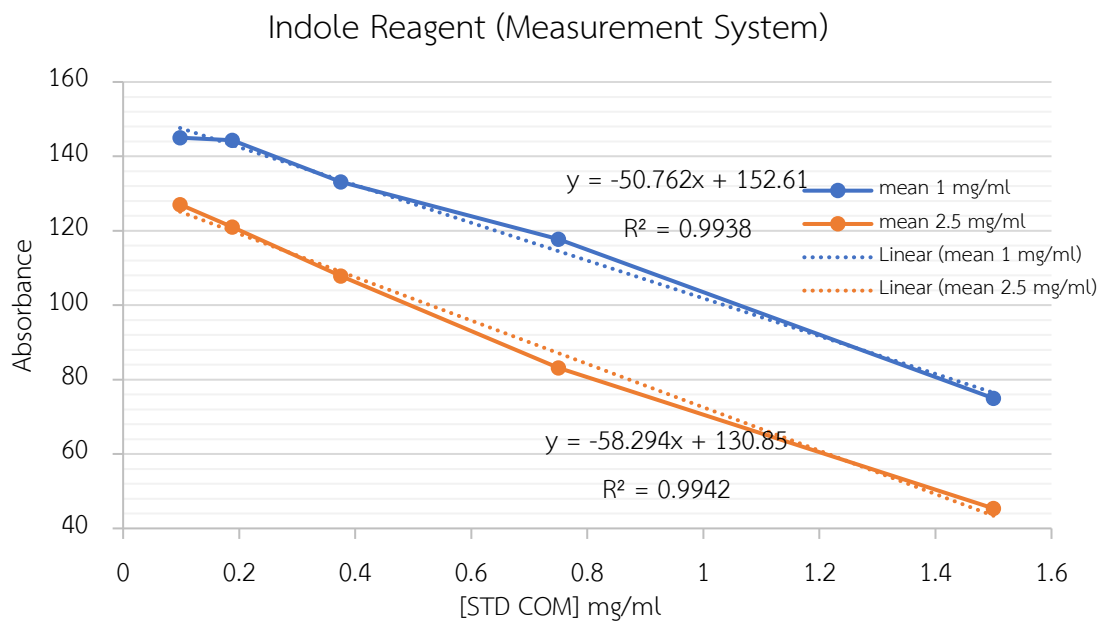
หมายเหตุ: เมื่อ 1= ช่วงสีม่วง, 2=ช่วงสีฟ้า, 3=ช่วงสีเขียว, 4=ช่วงสีเหลือง, 5=ช่วงสีส้ม, 6=ช่วงสีแดง

จากผลข้างต้นจะเห็นได้ว่าเครื่องวัดแสงที่พัฒนาขึ้นมีความสามารถในการแยกขีดสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นได้โดยเฉพาะในช่วงความยาวคลื่นสีเหลืองซึ่งสามารถแบ่งแยกสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับผลการทดลองในหัวข้อ 4.6

จากนั้นผู้วิจัยออกแบบการทดลองเพื่อยืนยันผลของความเข้มข้น Indole reagent ที่เหมาะสมสำหรับการวัดด้วยวิธี iCOCI ผ่านเครื่องมือมาตรฐานและระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น โดยการเตรียม สารละลายมาตรฐานแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรต (COM) ที่ความเข้มข้น 0.094, 0.188, 0.375, 0.75 และ 1.5 mg/mL ตามลำดับ ทดสอบกับ Indole reagent ความเข้มข้น 1 และ 2.5 mg/ml โดยจะทำการวัดผลทั้งเครื่องมือวัดมาตรฐานและระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น โดยผลการทดสอบมีดังนี้



รูปที่ 51 แสดงกราฟเปรียบเทียบผลจากการทดสอบวิธี iCOCl ด้วย indole reagent ความเข้มข้น 1 และ 2.5 mg/ml ของเครื่องมือวัดมาตรฐาน



รูปที่ 52 แสดงกราฟเปรียบเทียบผลจากการทดสอบวิธี iCOCl ด้วย indole reagent ความเข้มข้น 1 และ 2.5 mg/ml ของระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น

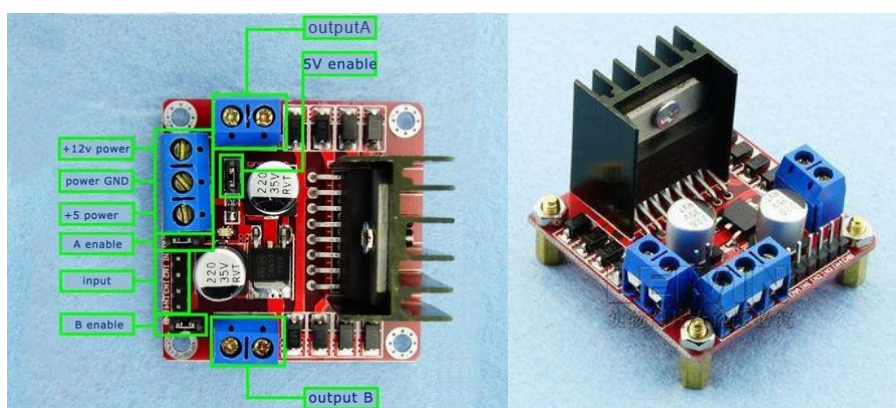
จากผลการทดลองดังรูปที่ 49 และ 50 กราฟเส้นสีน้ำเงิน คือ ผลการทดสอบด้วย indole reagent ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ส่วนกราฟเส้นสีส้ม คือ ผลการทดสอบด้วย indole reagent ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml จากกราฟทั้ง 2 จะพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) หรือค่า R^2 ของผลการทดสอบด้วย indole reagent ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml มีค่ามากกว่า indole reagent ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เล็กน้อยทั้งผลจากเครื่องวัดมาตรฐานและระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองนี้ช่วยยืนยัน indole reagent ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml เป็นความเข้มข้นเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

4.8.2) ระบบผสมและนำส่งสาร

ขั้นตอนการผสมและนำส่งสารมีหลายขั้นตอนและสามารถเลือกใช้ปั๊มในการผสมและนำส่งสารได้หลากหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับผู้ใช้ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบระบบผสมและนำส่งสารในขั้นตอนการนำ indole reagent มาผสมกับสารละลายผลึกแคลเซียมออกซาลेटของวิธี iCOCI ในขั้นตอนก่อนการนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 45 นาที

ในระบบนี้จะประกอบได้ด้วยปั๊มโรตารีแบบเกียร์ 12 V DC เป็นแกนหลักในการผสมและนำส่งสาร โดยตัววัสดุส่วน chamber ที่สัมผัส indole reagent ทำมาจากโพลีฟีนีลีนอีเทอร์ (Polyphenylene Ether :PPE) ซึ่งมีคุณสมบัติทนกรดและความร้อนที่อุณหภูมิสูงได้ [28] ส่วนการควบคุมตัวปั๊ม ทางผู้วิจัยได้ใช้โมดูล L298N เป็นชุดขับมอเตอร์ชนิด H-Bridge สามารถควบคุมการทำงานของมอเตอร์พร้อมกัน 2 ตัว มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมการทำงานของปั๊มในการผสมและนำส่งสารละลายในระบบวัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 53 แสดงชุดควบคุมมอเตอร์ L298N

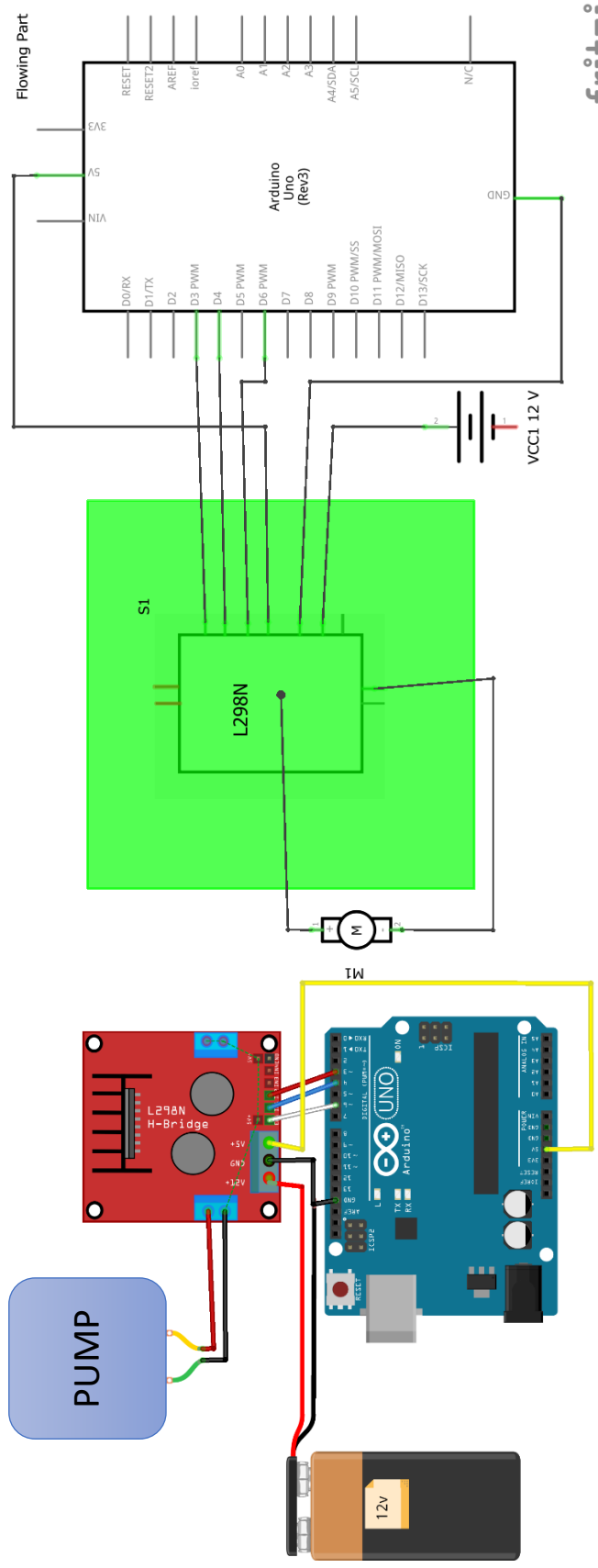
โดยอัตราการไหลของของเหลวจะถูกควบคุมโดยใช้สัญญาณ PWM (Pulse Width Modulation) ที่สร้างจากขา PWM ของ Arduino ที่มีขนาดแรงดัน 5 V ป้อนเข้ากับโมดูล L298N และจากโมดูล L298N จะได้สัญญาณในระดับ 12 V ป้อนให้กับปั๊ม โดยสัญญาณ PWM ของ Arduino จะมีความละเอียด 8 bit ทำให้สามารถปรับอัตราการไหลของของเหลวโดยการควบคุมการทำงานของปั๊มได้ 255 ระดับ

ผู้วิจัยได้ทดสอบกับปั๊ม 1 ตัว โดยทำการต่อขา ENA จากชุดขับเคลื่อนมอเตอร์กับบอร์ด Arduino UNO ขาดิจิตอลขาใดก็ได้ที่รองรับการส่งสัญญาณ PWM โดยขานี้ทำหน้าที่ควบคุมอัตราการไหลของของเหลวจากปั๊มผ่านการส่งสัญญาณ PWM ไปที่มอเตอร์ ในการทดลองต่อเข้ากับขา 6 (สีขา) ของบอร์ด Arduino ดังรูปที่ 52 (ซ้าย) และอีก 2 สายที่สำคัญคือ IN1 และ IN2 ต่อเข้ากับขาที่ 3 (สีแดง) และ 4 (สีฟ้า) ตามลำดับ เพื่อควบคุมทิศทางของปั๊มในชุด Indole reagent ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงการควบคุมทิศทางของปั๊ม

IN1	IN2	IN3	IN4	Direction
0	0	0	0	Stop
1	0	1	0	Forward
0	1	0	1	Reverse
1	0	0	1	Left
0	1	1	0	Right

จากนั้นทำการจ่ายไฟเลี้ยง 12 V ด้วย Laboratory Power Supply ให้โมดูล L298N ผ่านทางสายสีแดงและสีดำ ดังรูปที่ 52 (ซ้าย) และไฟเลี้ยง 5 V จากบอร์ด Arduino ผ่านทางสายสีเขียวเหลืองดังรูป

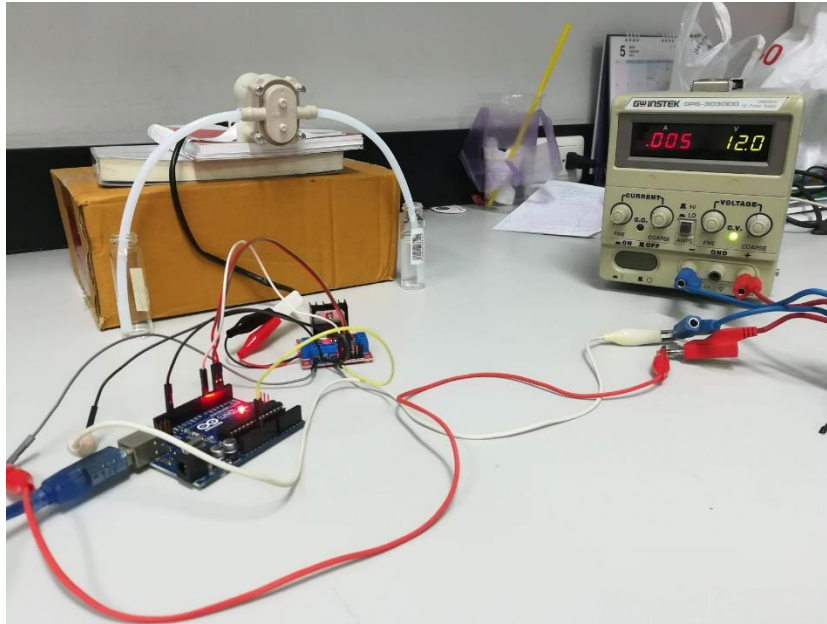


รูปที่ 54 แสดงแผนผังการต่อระบบผสมและนำส่งสาร

fritzing

fritzing

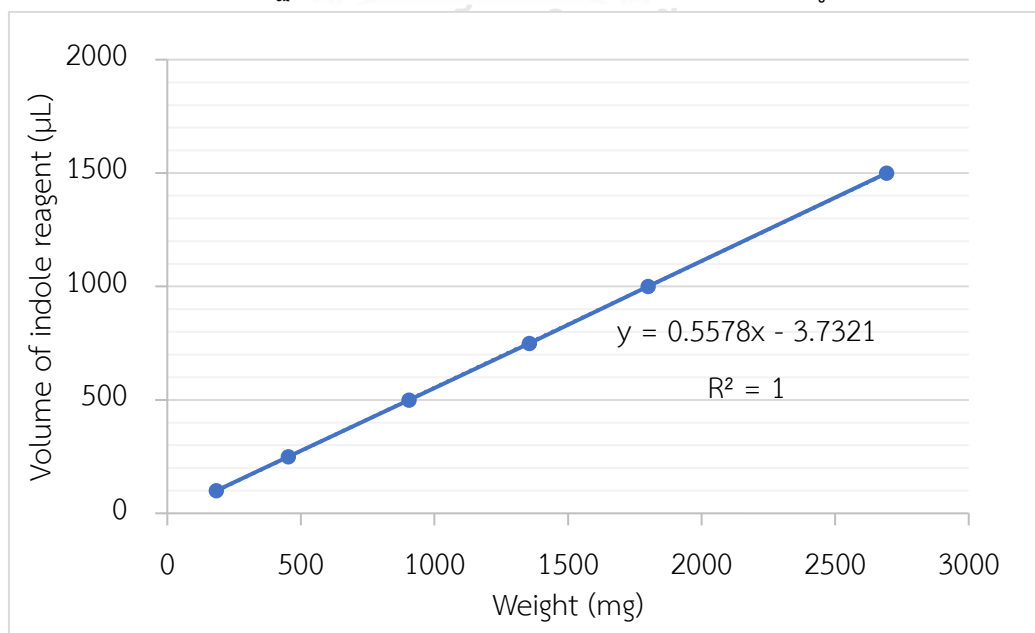
TY



รูปที่ 55 แสดงระบบผสมและนำส่งสาร

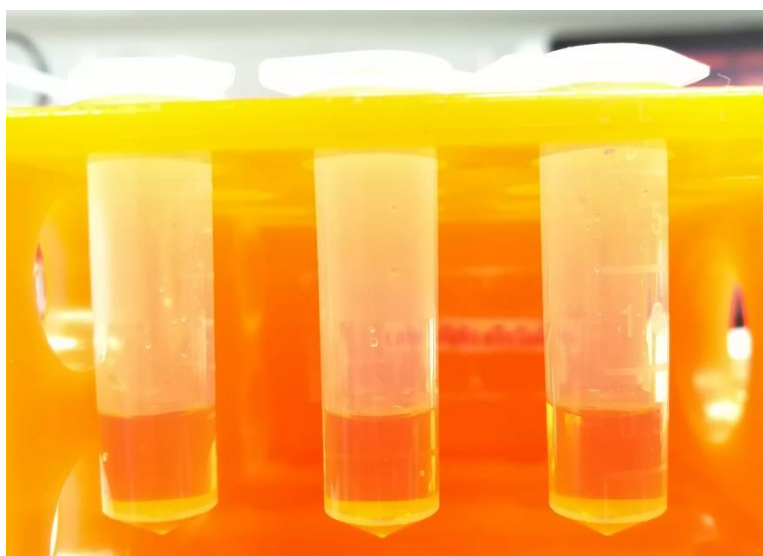
4.8.2.1) การทดสอบระบบผสมและนำส่งสาร

ในการสั่งการทำงานของ Microcontroller Unit (MCU) จะทำการออกแบบชุดคำสั่งผ่านโปรแกรม Arduino IDE ซึ่งในการออกแบบการทดลองผู้วิจัยจะทำการปรับค่าตัวแปร PWM ในการควบคุมอัตราการไหลของของเหลวที่ออกจากปั๊ม และเวลาที่ปั๊มทำงาน เพื่อให้ปริมาตรสุดท้ายที่ออกมา มีค่าใกล้เคียง 0.5 mL มากที่สุด ปริมาตรของเหลวที่ได้จากปั๊มจะถูกนำไปเทียบหาปริมาตรจริงจากกราฟมาตรฐานปริมาตรต่อน้ำหนักของ indole reagent ดังรูปที่ 54



รูปที่ 56 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักและปริมาตรของ Indole reagent

ในการทดสอบหาค่า PWM และเวลา ที่เหมาะสมสำหรับหาปริมาณสุดท้ายที่ออกมา มีค่าใกล้เคียง 0.5 mL จะทำการทดสอบกับ indole reagent เข้มข้น 2.5 mg/ml โดยตรง โดยทำการปรับค่า PWM และเวลา ในโปรแกรม Arduino IDE ได้ผลการทดสอบเหมาะสม คือ ค่า PWM ที่มี duty cycle เท่ากับ 78.4% (200/255) และ เวลาในการป้อนสัญญาณ PWM ให้กับปั๊มเป็นเวลาเท่ากับ 300 ms ซึ่งจะได้ปริมาตร 0.5 ± 0.05 mL ดังรูป



รูปที่ 57 แสดงปริมาณ indole reagent ที่ได้จากการทดสอบด้วยระบบผสมและนำส่งสาร

สำหรับการนำไปใช้งานจริงผู้วิจัยจะกำหนดให้ปั๊มดูด Indole reagent มาค้างที่สายยางก่อนด้วยเงื่อนไข PWM 255 เวลา 1500 ms แล้วจึงให้ปั๊มปล่อย reagent ออกที่เงื่อนไข PWM ที่มี duty cycle เท่ากับ 78.4% และใช้เวลา 300 ms ซึ่งได้ปริมาตรเท่ากับ 0.5 ± 0.05 mL

4.8.3) การแสดงผล

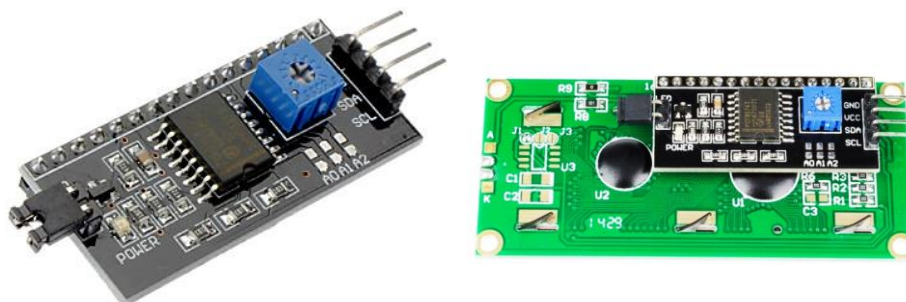
ระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้นมีความสามารถในการวัดและแสดงผลด้วยตัวเองได้ ส่วนของการแสดงผลที่เลือกใช้เป็นหน้าจอชนิดผลึกเหลว (Liquid crystal display, LCD) แบบ 16 ตัวอักษร 2 บรรทัด ร่วมกับโมดูล I²C โดยกำหนดให้แสดงผลค่าที่วัดได้จากระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้น และผลการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะว่าอยู่ในเกณฑ์สุขภาพดีหรือเสี่ยงต่อโรคนิ่วไต

เนื่องจากปกติการต่อจอ LCD กับ MCU จะใช้สายไฟหลายเส้นในการต่อใช้งาน ทำให้บางครั้งมีข่าไม่พอที่จะควบคุมและยังทำให้การเดินสายไฟต่อใช้งานไม่สะดวก ทำให้ผู้วิจัยเลือกใช้งานโมดูล I²C ซึ่งมีวงจรแปลงสัญญาณสำหรับติดต่อจอ LCD แบบอินเทอร์เฟซ I²C ซึ่งช่วยลดการใช้สายไฟหลาย ๆ เส้น ให้เหลือเพียง 2 เส้น ทำให้การเขียนโปรแกรมและการต่อวงจรทำได้ง่ายขึ้น โดย

โมดูล I²C LCD จะมีตัวต้านทานปรับค่าได้สำหรับปรับความสว่างหน้าจอ และใช้ Chip PCF8574 ของ NXP ซึ่งทำหน้าที่รับสัญญาณจาก I²C มาและกระจายของตามขาที่ LCD ต้องใช้ โดยโมดูลนี้มีคุณสมบัติพื้นฐานดังนี้

ตารางที่ 17 แสดงคุณสมบัติของโมดูล I²C LCD

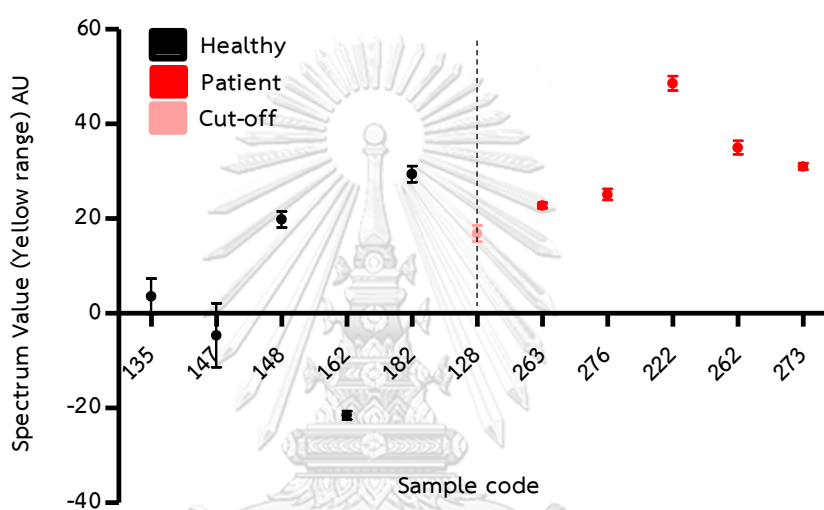
Supply voltage	5 V
backlight and contrast	Adjustable
Compatible	1602 , 2004 LCD
Weight	5 g
Size	5.5x2.3x1.4 cm



รูปที่ 58 แสดงโมดูล I²C LCD และการติดตั้ง

4.8.4) การทดสอบวัดเพื่อคัดกรองตัวอย่างปัสสาวะ

ในการทดสอบนี้จะเป็นการทดลองที่พิสูจน์ความสามารถของระบบผสมและนำส่งสาร ที่ทำหน้าที่ดูด indole reagent ผสมกับตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนของวิธี iCOCI และระบบวัดแสง ที่ทำหน้าที่วัดการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างแล้วนำมาวิเคราะห์ โดยการทดสอบนี้จะทำการสุ่มเลือกปัสสาวะจากกลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยมา กลุ่มละ 5 ตัวอย่างและเลือกตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่า COCI และ iCOCI ใกล้เคียงกับค่า cut-off (หัวข้อ 4.7.1) รวมทั้งสิ้น 11 ตัวอย่างได้ผลการทดสอบดังรูปที่ 53



รูปที่ 59 แสดงผลการทดสอบจากระบบวัดแสงของตัวอย่างปัสสาวะ 11 ตัวอย่าง

จากผลการทดสอบข้างต้น พบว่าในตัวอย่างปัสสาวะในกลุ่มสุขภาพดี(สีดำ) ค่อนข้างต่ำและมีบางตัวอย่างมีค่าที่ได้ติดลบ(ตัวอย่าง 147 และ 162) ซึ่งเป็นผลมาจากการนำไปลบกับค่า blank ของการทดลองและมีกลุ่มสุขภาพดี 2 ตัวอย่างจาก 5 ที่ให้ผลการทดสอบเกินผลจากตัวอย่างที่เป็นค่า cut-off ของระบบ ส่วนในกลุ่มผู้ป่วย พบว่า ค่าที่ได้ค่อนข้างสูง โดยทั้ง 5 ตัวอย่างที่สุ่มมาทดสอบให้ผลสูงกว่าตัวอย่างที่เป็นค่า cut-off ของระบบทุกตัว หากนำข้อมูลดังกล่าวมาหาค่าความไว และความจำเพาะของการทดสอบนี้ จะมีค่าเท่ากับ 100 และ 60 % ตามลำดับ หากพิจารณาจากผลการทดสอบดังกล่าว การทดสอบหาปริมาณแคลเซียมออกซาลेटในปัสสาวะด้วยวิธี iCOCI ผ่านระบบวัดที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยโรคนี้ไว้ได้

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะเบื้องต้น

5.1 สรุปผล

งานวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการพัฒนาระบบวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตโดยอาศัยการตกผลึกของแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะโดยมีพื้นฐานมาจากวิธี iCOCI โดยแคลเซียมออกซาเลตที่ละลายในกรดไฮโดรคลอริกจะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับ Indole reagent ความเข้มข้น 2.5 mg/ml ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 45 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาแคลเซียมออกซาเลตที่ละลายในกรดไฮโดรคลอริกจะเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูถึงแดงอิฐ ซึ่งความเข้มของสีที่ปรากฏจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของแคลเซียมออกซาเลตในสารละลาย จึงทำให้สามารถวัดความเข้มข้นโดยอาศัยหลักการของสเปกโทรสโคปีได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

ปัจจุบันมีผู้ป่วยที่เป็นโรคนิ่วไตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วยสภาพอากาศที่ร้อนชื้นและพฤติกรรมส่วนบุคคลที่ทำให้เสี่ยงต่อโรค เช่น การกินน้ำน้อย การกินอาหารที่มีออกซาเลตสูงหรือการกินอาหารที่มีซีเตรตต่ำ เป็นต้น ในทางการแพทย์มีวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบโรคนิ่วไตได้ด้วยวิธีการ CT Scan หรือ Ultrasound ซึ่งให้ความแม่นยำค่อนข้างสูง แต่ก็มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง อันตรายจากกัมมันตภาพรังสี และเวลาในการรอผลการทดสอบ ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าหากสามารถพัฒนาระบบตรวจวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลตโดยอาศัยวิธี iCOCI สำหรับใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้จะช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐานได้

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีการวัดปริมาณแคลเซียมออกซาเลต COCI และ iCOCI ให้มีประสิทธิภาพในการวัดมากยิ่งขึ้น ในส่วนของการพัฒนาวิธี COCI ผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวัดมาตรฐานจากเครื่อง Nanodrop 2000c Spectrophotometer ของห้องแลป 830 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเป็นเครื่อง Thermo Scientific GENESYS 10S UV/Vis Spectrophotometer ซึ่งให้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นยูวีได้ดีกว่า นอกจากนั้นยังทำการศึกษาผลกระทบของเวลาในการบ่ม ปริมาณโปรตีน และความเป็นกรด-เบสของปัสสาวะ ผลที่ได้คือ สามารถลดเวลาในการบ่มตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาทดสอบในวิธี COCI ลงได้ จาก 60 นาที เป็น 10 นาที (ลดเวลาในการทดสอบลง 50 นาที) ส่วนปริมาณโปรตีนและความเป็นกรด-เบส ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการวัด

ส่วนของการพัฒนาวิธี iCOCI ผู้วิจัยได้ทำการหาความเข้มข้น Indole reagent ที่เหมาะสมต่อระบบวัด จากเดิมที่ใช้ความเข้มข้น 1 mg/ml เปลี่ยนมาใช้ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml ซึ่งให้ผลที่ดีกว่า ด้านของความเสถียรของ Indole reagent ควรทดสอบบริเวณที่มีแสงน้อย และภายหลังจากการเตรียม reagent ควรใช้งานสารให้หมดภายในเวลา 30 นาที เพื่อลดความผิดพลาดจากข้อจำกัดของ Indole reagent

ส่วนระบบวัดที่พัฒนาขึ้น ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพและการใช้งานร่วมกันของ 2 ระบบ คือ ระบบวัดแสง และระบบผสมและนำส่งสาร โดยในระบบวัดแสงนั้นจะได้ประยุกต์ใช้โมดูล เซนเซอร์แสง AS7262 มาใช้ในการตรวจวัด ของระบบวัด ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกข้อมูลช่วงสีเหลือง (565-590 นาโนเมตร) จากเซนเซอร์สำหรับใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างปัสสาวะและได้ทำการ เปรียบเทียบการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองกับเครื่องมือมาตรฐาน ซึ่งจากผลการ ทดลองพบว่าระบบวัดแสงที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการคัดกรองกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วย โรคนี้วัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในการทดสอบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วัด กลุ่มละ 60 ตัวอย่าง ได้ค่าความไวและความจำเพาะของการตรวจคัดกรองมากกว่า 70 %

ส่วนของระบบผสมและนำส่งสารผู้วิจัยได้ทำการปรับค่า PWM และเวลา ในโปรแกรม Arduino IDE เพื่อให้สารที่ดูดออกมาจากปั๊มมีปริมาตรใกล้เคียง 0.5 mL จากการทดสอบได้ค่า คือ ค่า PWM ที่มี duty cycle เท่ากับ 78.4% (200/255) และ เวลาในการป้อนสัญญาณ PWM ให้กับปั๊มเป็นเวลาเท่ากับ 300 ms ซึ่งจะได้ปริมาตรของของเหลวที่มีความแม่นยำเพียงพอต่อ การประยุกต์ใช้งานคืออยู่ในช่วง 0.5 ± 0.05 mL ซึ่งภายหลังจากการนำทั้งสองระบบมาผนวกและใช้ งานร่วมกัน สามารถสรุปได้ว่า ระบบที่พัฒนาขึ้นเบื้องต้น สามารถนำไปใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยโรคนี้ วัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาระบบตรวจคัดกรองนี้ให้มีการทำงาน แบบอัตโนมัติได้ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทดสอบความเสถียรของ Indole reagent อาจมีการทดสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับความ เสถียรของค่าการดูดกลืนแสงภายหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 80 °c เป็นเวลา 45 นาที เทียบกับเวลาที่ เพิ่มมากขึ้นเพื่อจำกัดจำนวนตัวอย่างปัสสาวะในการทดสอบแต่ละรอบให้มีความเหมาะสม นอกจากนั้น

บรรณานุกรม

1. Mehmet, N.M. and O. Ender, *Effect of urinary stone disease and its treatment on renal function*. World journal of nephrology, 2015. **4**(2): p. 271-276.
2. Chanapa, P., *The Risk Factors of Kidney Stones Focusing on Calcium and Oxalate*. Songklanagarind Medical Journal, 2011. **29**(6): p. 299-308.
3. Boonla C., T.P., *Kidney Stone- From Molecular Lithogenesis to Stone Prevention*. จุฬาลงกรณ์เวชสาร, 2007. **2**: p. 103-123.
4. Kokorowski, P.J., K. Hubert, and C.P. Nelson, *Evaluation of pediatric nephrolithiasis*. Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India, 2010. **26**(4): p. 531-535.
5. Lim, G.S., et al., *Comparison of Non-contrast-Enhanced Computed Tomography and Intravenous Pyelogram for Detection of Patients With Urinary Calculi*. Korean journal of urology, 2014. **55**(2): p. 120-123.
6. Sriboonlue, P., S. Suwantraï, and V. Prasongwatana, *An indirect method for urinary oxalate estimation*. Clinica Chimica Acta, 1998. **273**(1): p. 59-68.
7. Laube, N., A. Schneider, and A. Hesse, *A new approach to calculate the risk of calcium oxalate crystallization from unprepared native urine*. Vol. 28. 2000. 274-80.
8. Porowski, T., et al., *Bonn Risk Index Based Micromethod for Assessing Risk of Urinary Calcium Oxalate Stone Formation*. The Journal of Urology, 2010. **183**(3): p. 1157-1162.
9. Yang, B., et al., *Calcium Oxalate Crystallization Index (COCI): an Alternative Method for Distinguishing Nephrolithiasis Patients from Healthy Individuals*. Annals of Clinical & Laboratory Science, 2014. **44**(3): p. 262-271.
10. Frederic H. Martini, M.J.T., Robert B. Tallitsch, *Human Anatomy, 6th Edition*. The kidney. 2009, San Francisco: Pearson Education.
11. Domrongkitchaiporn, S., W. Stitchantrakul, and W. Kochakarn, *Causes of Hypocitraturia in Recurrent Calcium Stone Formers: Focusing on Urinary Potassium Excretion*. American Journal of Kidney Diseases, 2006. **48**(4): p. 546-

- 554.
12. Sriboonlue, P., et al., *Nutritional potassium status of healthy adult males residing in the rural northeast Thailand*. Vol. 81. 1998. 223-32.
 13. Zerwekh, J.E., et al., *Reduction of Renal Stone Risk by Potassium-Magnesium Citrate During 5 Weeks of Bed Rest*. *The Journal of Urology*, 2007. **177**(6): p. 2179-2184.
 14. Tosukhowong P. , B.C., โรคนิ่วไต สร้างเสริมสุขภาพอย่างไรให้ห่างไกลจากโรคนิ่ว. 2018.
 15. Singh, P., et al., *Stone Composition Among First-Time Symptomatic Kidney Stone Formers in the Community*. Vol. 90. 2015.
 16. ยูวพัฒน์วงศ์, ช. ประโยชน์ของการตรวจคัดกรองสุขภาพ.
 17. Porowski, T., et al., *Normative data on the Bonn Risk Index for calcium oxalate crystallization in healthy children*. Vol. 22. 2007. 514-20.
 18. Bergerman, J. and J.S. Elliot, *Method for Direct Colorimetric Determination of Oxalic Acid*. *Analytical Chemistry*, 1955. **27**(6): p. 1014-1015.
 19. อิงค์สาธิต, อ. เอกสารประกอบการสอนหลักการพิจารณานำงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจวินิจฉัยมาประยุกต์ในเวชปฏิบัติ (*Evidence-based medicine on Diagnostic study*).
 20. Galley, H., *Editorial II: Solid as a ROC*. *British Journal of Anaesthesia*, 2004. **93**(5): p. 623-626.
 21. กระทรวงพลังงาน, ก., ตอนที่ 4 บทที่ 1 ระบบอัดอากาศ ป้อนน้ำ และพัดลม. 2004. p. 1-72.
 22. Institute, H., *Welcome to the Hydraulic Institute*.
 23. Stewart, M., *5 - Rotary pumps*, in *Surface Production Operations*, M. Stewart, Editor. 2019, Gulf Professional Publishing: Boston. p. 415-440.
 24. ศรียุทธศักดิ์, ม., *ตัวตรวจรู้ชีวภาพ: ไบโอสเซนเซอร์*. 1993, กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
 25. อมรสิทธิ์, แ., *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. 1996, กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.
 26. Isles, C., *Chapter 65 - Proteinuria*, in *Comprehensive Hypertension*, G.Y.H. Lip and J.E. Hall, Editors. 2007, Mosby: Philadelphia. p. 793-800.
 27. MIKESH, L., *Normal Urinary Output for an Adult*. 2013.
 28. Itsikson, L.B. and L.A. Shulgaitser, *Investigation of the isomeric composition of polyphenyl ethers by high-temperature gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1975. **108**(2): p. 358-360.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายพิชณุตม์ ฤกษ์นันท์
วัน เดือน ปี เกิด	12 ตุลาคม 2536
สถานที่เกิด	จังหวัดพิจิตร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	99/9 หมู่ 2 ตำบลชะมัง อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร 66000



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY