

Thesis Title Automatic Quantitative Analysis Systems with Flow Based Approach for Aiding the Clinical Diagnosis and Quality Control of Pharmaceutical Samples

Author Miss Supada Khonyoung

Degree Doctor of Philosophy (Chemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suporn Kradtap Hartwell Advisor

Prof. Dr. Kate Grudpan Co-advisor

Assoc. Prof. Dr. Jaroon Jakmunee Co-advisor

ABSTRACT

Analytical methods based on flow based techniques have been developed for clinical and pharmaceutical analysis including *i*) screening of thalassemia trait, *ii*) rapid screening of chondroitin sulfate-supplements for routine quality control and *iii*) automatic immunoassay process for quantitative analysis of chondroitin sulfate as a biomarker for osteoarthritis disease and ovarian cancer.

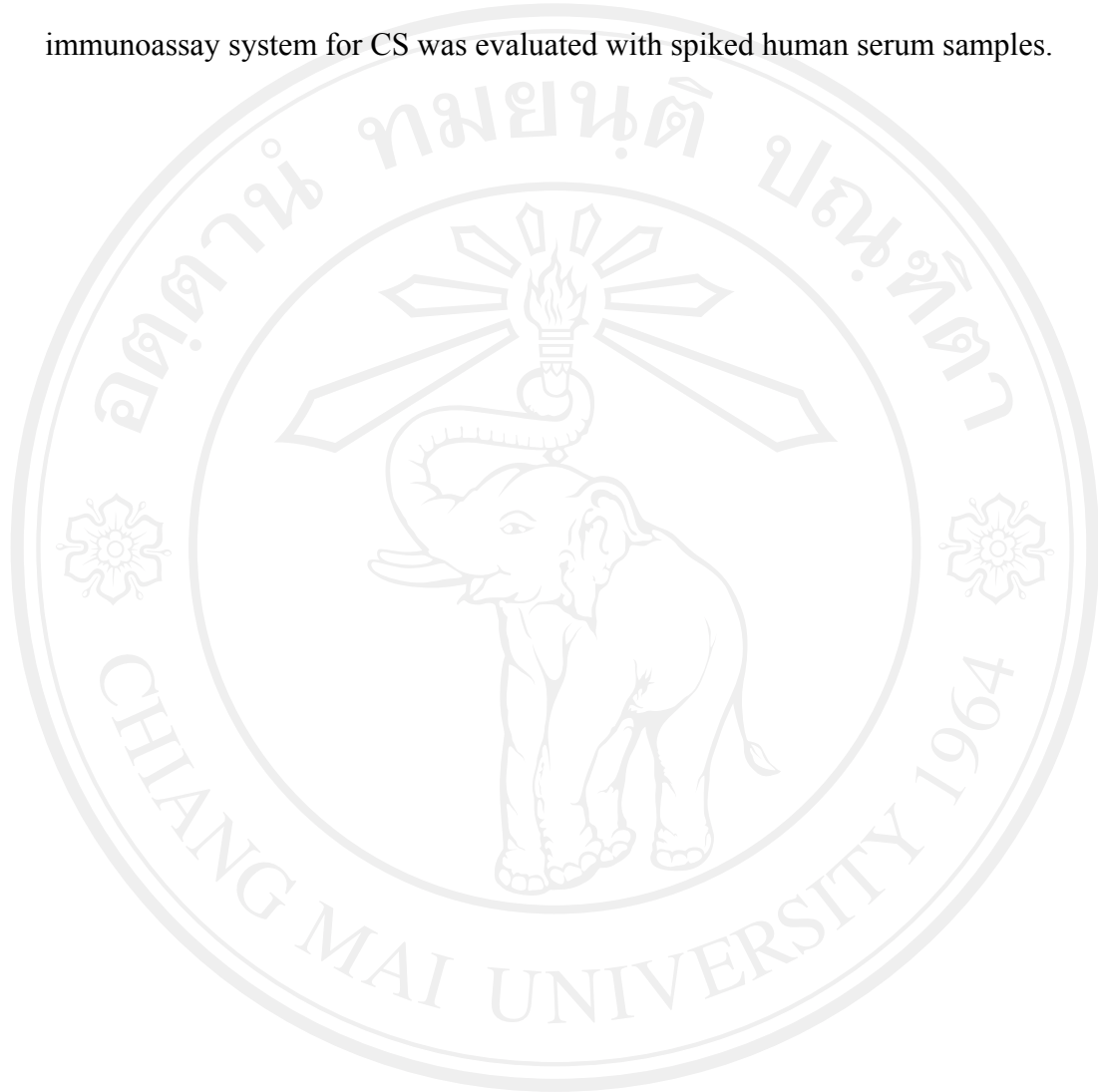
A simple stopped flow system coupled to hydrodynamic injection (SF-HI) and spectrophotometric detection was developed for automatic osmotic fragility test (OFT). OFT is a test for abnormal red blood cells based on the kinetics of their rupturing in a hypotonic saline solution. A portion of red cells was merged on-line with a hypotonic saline solution. They were mixed while flowing into the detector and were stopped for a short period for continuously monitoring the change of turbidity based on a transmission signal. As compared to the conventional batchwise OFT, the proposed system offered shorter analysis time (about 80 second vs. 2 min

per sample), lower amount of blood samples consumption (10 μL vs. 20 μL) and it helped to protect the operator from of direct contact with blood samples. The results obtained from the SF-HI system agreed well with those obtained from the conventional OFT and it could differentiate thalassemia patients and thalassemia carriers from healthy people. Therefore, this system has a potential to be used as an automatic technique for routine thalassemia screening.

A simple flow injection system for rapid screening of chondroitin sulfate (CS) in dietary supplement was also developed. The method is based on changes in the light absorption of the methylene blue (MB) bound to CS. A standard/ sample solution was injected into the stream of methylene blue. The solution was mixed and flowed to a spectrophotometric flow through cell. The decrease in absorbance of MB was monitored at 664 nm in corresponding to the increasing of CS concentration. A calibration graph in the range of 1-10 ppm was obtained with a limit of quantitation (LOQ) at 1 ppm. This flow system offered fast analysis (144 injection h^{-1}) and minimized Schlieren effect which should be suitable for routine quality control. However, the low selectivity of MB led to low accuracy in analysis of real samples. Other reagents should be explored.

An automatic immunoassay system for an assay of chondroitin sulfate (CS) was developed based on the sequential injection technique. Modified low cost glass capillary was employed as a solid surface for immobilization of proteoglycans. Competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted based on the competition between immobilized shark A1 (Sh-A1) and CS in serum (or Sh-A1 (CS equivalence) standard) for a limited amount of CS-C specific monoclonal antibody (IgM) namely, WF6. Absorbance detection was done with a

spectrophotometer after addition of horseradish peroxidase (HRP) enzyme conjugated anti-IgM and substrate. The performance of the sequential injection capillary immunoassay system for CS was evaluated with spiked human serum samples.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ระบบการวิเคราะห์เชิงปริมาณแบบอัตโนมัติที่ใช้หลักการไหลเพื่อช่วยในการวินิจฉัยทางคลินิกและการควบคุมคุณภาพตัวอย่างทางเภสัชกรรม	
ผู้เขียน	นางสาวสุภาดา คนยัง	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาภรณ์ ทรัพย์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ศาสตราจารย์ ดร. เกตุ กรุดพันธ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รองศาสตราจารย์ ดร. จรุง จักรมณี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้หลักการไหลเพื่อช่วยในการวิเคราะห์ทางคลินิกและทางเภสัชกรรมขึ้น ซึ่งประกอบด้วย 1) การตรวจคัดกรองผู้เป็นพาหะโรคธาลัสซีเมีย 2) การตรวจกรองอย่างรวดเร็วเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารเสริมคอนครอยดินซัลเฟต และ 3) ระบบอิมมูโนแอสเสย์แบบอัตโนมัติในการหาปริมาณคอนครอยดินซัลเฟตที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคข้อเสื่อมและโรคมะเร็งรังไข่

ระบบสโตปโฟลอย่างง่ายร่วมกับไฮโดรไดนามิกอินเจกชัน โดยมีการตรวจวัดด้วยสเปคโตรโฟโตเมตรีได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้การทดสอบออสโมติกพราจิลิตีมีความอัตโนมัติ ออสโมติกพราจิลิตีเป็นการทดสอบเม็ดเลือดแดงที่มีความผิดปกติโดยขึ้นกับอัตราของการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงเมื่ออยู่ในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นภายในเซลล์ เม็ดเลือดแดงจะผสมกับสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นภายในเซลล์แล้วไหลเข้าสู่เครื่องตรวจวัดและจะถูกหยุดไว้ที่เซลล์ตรวจวัดเป็นระยะเวลาสั้นๆ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น โดยตรวจวัดสัญญาณจากแสงส่งผ่าน ระบบที่พัฒนาขึ้นจะใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วกว่า (ประมาณ 80 วินาทีเทียบกับ 2 นาทีต่อตัวอย่าง), ใช้ตัวอย่างเลือดปริมาณน้อยกว่า (10 ไมโครลิตรเทียบกับ 20 ไมโครลิตร) และยังป้องกันผู้ทำการทดลองจากการสัมผัสกับตัวอย่างเลือดโดยตรงเมื่อเทียบกับการทดสอบออสโมติกพราจิลิตีแบบเบซท์ทั่วไป ผลที่ได้จากระบบที่พัฒนาขึ้นสัมพันธ์กับผลจากการทดสอบออสโมติกพราจิลิตีแบบเบซท์ทั่วไป และสามารถบอกความแตกต่างของผู้ป่วยและพาหะธาลัสซีเมียจากคนปกติได้ ดังนั้นระบบนี้จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นเทคนิคอัตโนมัติเพื่อการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียในงานประจำ

ได้พัฒนาระบบโฟลอินเจกชันอย่างง่ายเพื่อใช้ในการตรวจกรองคอนครอยดินซัลเฟตในตัวอย่างอาหารเสริมอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสเปคตรัมการดูดกลืนแสงของเมทิล

ลีนบลูเมื่อจับกับคอนครอยตินซัลเฟต ซึ่งจะนิคสารมาตรฐานหรือตัวอย่างเข้าสู่กระแสการไหลของเมทิลลีนบลู สารผสมจะไหลเข้าสู่เซลล์ตรวจวัดของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำการตรวจวัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของเมทิลลีนบลูที่ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร ซึ่งจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของคอนครอยตินซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 1-10 พีพีเอ็มและความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้คือในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณเท่ากับ 1 พีพีเอ็ม ระบบนี้วิเคราะห์ได้รวดเร็ว (144 อินเจกชันต่อชั่วโมง) และลดการรบกวนจาก Schlieren effect ได้ ซึ่งน่าจะเหมาะสมสำหรับงานประจำในการควบคุมคุณภาพ แต่อย่างไรก็ตาม ความไม่เฉพาะเจาะจงของเมทิลลีนบลู ทำให้การวิเคราะห์ตัวอย่างจริงมีความถูกต้องไม่ดีพอ ควรมีการศึกษาหาวิธีอื่นที่เหมาะสมกว่านี้

ได้พัฒนาระบบอิมมูโนแอสเสย์ที่เป็นอัตโนมัติโดยใช้หลักการของซีเควนเซียลอินเจกชันเพื่อใช้ในการวิเคราะห์คอนครอยตินซัลเฟต มีการปรับปรุงคาปิลลารีแก้วราคาถูกใช้เป็นพื้นที่ผิวในการตรึงโปรตีนโกลบูลินและนำเทคนิคเอ็นไซม์ลิงค์อิมมูโนแอสเสย์แบบแข่งขันมาใช้ โดยอาศัยหลักการแข่งขันระหว่างส่วน A1 ที่สกัดจากฉลาม (Sh-A1) ที่ถูกตรึงไว้บนผิวแก้ว กับคอนครอยตินซัลเฟตที่มีอยู่ในตัวอย่างซีรัม (หรือสารมาตรฐาน Sh-A1) เพื่อจับกับแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะกับคอนครอยตินซัลเฟตชนิด C ซึ่งเรียกว่า WF6 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์หลังจากที่แอนติแอนติบอดีชนิด IgM คอนจูเกตกับเอ็นไซม์ฮอราดิสเพอร์ ออกซิเดสและซับสเตรตถูกเติมลงไป ประเมินประสิทธิภาพของระบบซีเควนเซียลอินเจกชันคาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์สำหรับคอนครอยตินซัลเฟตด้วยการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างซีรัมมนุษย์