



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ  
สำหรับตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจากเลือดครบถ้วน

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล และคณะ

มิถุนายน 2555

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ  
สำหรับตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจากเลือดครบถ้วน

### ผู้วิจัย

### สังกัด

- |  |  |
|--|--|
| 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล | คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย   |
| 2. ศาสตราจารย์ ดร. อรรรรณ ชัยลภากุล          | คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย   |
| 3. ศาสตราจารย์ชาร์ลส์ เฮนรี                  | มหาวิทยาลัยโคโลราโดสเตท ประเทศสหรัฐอเมริกา   |
| 4. อาจารย์ ดร.วิจิตรา เตือนฉาย               | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี   |
| 5. นางสาวเต็มศิริ ทรงเจริญ                   | หลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์<br>คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ : MRG5380170

ชื่อโครงการ : การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ สำหรับตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจากเลือดครบส่วน

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.วนิดา หลายวัฒน์ไพศาล และคณะ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail address: [wanida.k@chula.ac.th](mailto:wanida.k@chula.ac.th)

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

### บทคัดย่อ

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper-based analytical devices,  $\mu$ PADs) เป็นเทคโนโลยีทางเลือกหนึ่งของการสร้างอุปกรณ์ตรวจวินิจฉัยโรคทางคลินิก ที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ พกพาได้ สามารถใช้แล้วทิ้ง สำหรับใช้ในประเทศกำลังพัฒนา ในงานวิจัยนี้ ได้พัฒนา  $\mu$ PADs สำหรับการตรวจวิเคราะห์สิ่งตัวอย่างจากเลือดครบส่วน โดยใช้วิธีจุ่มแวกซ์ ซึ่งเป็นวิธีใหม่ รายงานโดยคณะผู้วิจัย วัสดุที่ใช้ประกอบด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 และกระดาษสำหรับแยกเลือด ซึ่งทำให้เชื่อมติดกันโดยการจุ่มกระดาษที่ประกบกับแม่แบบที่เป็นเหล็ก ลงไปในแวกซ์ที่กำลังหลอมเหลวด้วยความร้อน โดยแม่แบบที่เป็นเหล็กที่สังัดให้มีรูปแบบและขนาดที่ต้องการด้วยการใช้เทคนิคเลเซอร์ ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้แวกซ์ซึมเข้าสู่กระดาษ จึงเกิดเป็นบริเวณที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำอยู่บนกระดาษ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง  $\mu$ PADs คือ 120-130 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่เหมาะสมในการจุ่มแวกซ์คือ 1 วินาที ขนาดท่อบริเวณชอบน้ำที่เล็กที่สุดที่สามารถสร้างได้  $639 \pm 7$  ไมโครเมตร และมีความสามารถในการให้ผลซ้ำ (reproducibility) โดยมีค่า RSDs เท่ากับ 1.48% และ 6.30% สำหรับการสร้างขอบเขตบริเวณชอบน้ำของ test zone และ sample zone ตามลำดับ

กระดาษแยกเลือดที่เหมาะสมสำหรับสร้าง  $\mu$ PADs คือชนิด LF1 โดย LF1- $\mu$ PADs สามารถใช้แยกเลือดที่มีค่าฮีมาโทคริต (hematocrit) ความเข้มข้นระหว่าง 24-55% ได้ภายใน 2 นาที เมื่อใช้เลือดปริมาณ 15-22  $\mu$ L โดยไม่จำเป็นต้องเจือจางเลือดก่อน เมื่อได้ทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าพลาสมาที่แยกได้บน  $\mu$ PADs นี้ ไม่มีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงหรือการแตกของเม็ดเลือดแดง การตรวจวัดปฏิกิริยาการเกิดสีบน  $\mu$ PADs มีความแม่นยำสูง มีค่า within-day precision เท่ากับ 2.62% (n =10) และ between day precision เท่ากับ 5.84% (n =30) เมื่อนำ  $\mu$ PADs ไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเลือด (n = 5) โดยใช้หลักการจับกับสี bromocresol green ผลการทดลองพบว่าผลตรวจโดยใช้ LF1- $\mu$ PADs ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการการแพทย์ทั่วไป (p > 0.05, pair t-test) โดยสรุป  $\mu$ PADs ที่นำเสนอในงานวิจัยนี้ มีศักยภาพนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการการแพทย์ โดยใช้สิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดครบส่วนได้ในขั้นตอนเดียว ทำให้ลดระยะเวลาการเตรียมตัวอย่างและลดระยะเวลาตรวจวัด เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีต้นทุนต่ำ จึงเหมาะสำหรับประเทศกำลังพัฒนาเป็นอย่างยิ่ง

คำสำคัญ : อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ, วิธีการจุ่มแวกซ์, ห้องปฏิบัติการบนกระดาษ, การแยกเลือด, การตรวจวัดปริมาณโปรตีน

**Project Code :** MRG5380170

**Project Title :** Development of microfluidic paper-based analytical devices for determination of biomarkers from whole blood sample

**Investigators :** Asst. Prof. Dr. Wanida Laiwattanapaisal et al Department of Clinical Chemistry, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University

**E-mail address:** [wanida.k@chula.ac.th](mailto:wanida.k@chula.ac.th)

**Project Period :** 2 years

### **Abstract**

Microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs) are an alternative technology for fabricating simple, low-cost, portable and disposable platforms for clinical diagnosis in developing countries. In this paper, wax dipping, a new method described by our group, was used for fabricating the  $\mu$ PAD for blood separation. The final device was composed of a blood separation membrane combined with patterned Whatman No.1 paper. The designed pattern was transferred onto paper by dipping an assembly iron mold into melted wax. The optimal melting temperature was in the range of 120-130 °C, and the optimal dipping time was 1 second. The smallest hydrophilic channel that could be created by the wax dipping method was  $639 \pm 7 \mu\text{m}$  in size. The reproducibility of the  $\mu$ PAD fabrication for hydrophilic channel width of the test zone and sample zone was 1.48% and 6.30%, respectively.

The LF1- $\mu$ PAD was shown to be functional with human whole blood of 24-55% hematocrit without dilution, and effectively separated blood cells from plasma within 2 minutes when blood volumes 15-22  $\mu\text{L}$  were added to the device. Microscopy was used to confirm that the device isolated plasma with high purity and showed no blood cells or cell hemolysis at the detection zone of the  $\mu$ PAD. The colorimetric measurement reproducibility on the  $\mu$ PAD was 2.62 % (n =10) and 5.84% (n =30) for within-day and between day precision, respectively. The efficiency of blood separation on  $\mu$ PAD was studied by plasma protein detection using the bromocresol green (BCG) colorimetric assay. The results revealed that protein detection on the  $\mu$ PAD was not significantly different from the conventional method ( $p > 0.05$ , pair t-test). Our proposed blood separation on  $\mu$ PAD has the potential for reducing turnaround time, sample volume, sample preparation and detection processes for clinical diagnosis and point-of care testing, especially in developing countries.

**Keywords:** Paper-based microfluidic devices, wax dipping, lab-on-paper, blood separation, protein determination

## บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

### Executive Summary

- (ภาษาไทย) การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ สำหรับตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจากเลือดครบส่วน
- (ภาษาอังกฤษ) Development of microfluidic paper-based analytical devices for determination of biomarkers from whole blood sample

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถช่วยวินิจฉัยโรค ตรวจคัดกรองโรค ตรวจติดตามการดำเนินของโรคและติดตามผลการรักษาได้ แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ส่วนมาก จำเป็นต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติที่มีราคาแพง เมื่อติดตั้งแล้วเคลื่อนย้ายได้ไม่สะดวก อีกทั้งยังใช้น้ำยาในการตรวจวัดปริมาณมาก ทำให้ต้นทุนในการตรวจวัดสูง (1, 2) และการตรวจวัดสารบางชนิด สามารถทำได้เฉพาะโรงพยาบาลขนาดใหญ่เท่านั้น ข้อจำกัดนี้จึงทำให้เทคโนโลยีทางการแพทย์ไม่สามารถเข้าถึงชนบทที่อยู่ห่างไกลความเจริญได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา เมื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเจริญก้าวหน้ามากขึ้น นักวิจัยได้มีการพัฒนาการตรวจวัดในรูปแบบห้องปฏิบัติการบนชิป (Lab-on-a-Chip, LOC) เพื่อลดปริมาณน้ำยาและขนาดของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดลง โดยใช้เทคโนโลยีของไหลจุลภาคเข้ามาช่วยย่อส่วนในการตรวจวัดให้มีขนาดเล็กลง (1, 3) สามารถตรวจวัดได้เหมือนห้องปฏิบัติการทั่วไปแต่อยู่ในรูปแบบบนชิป ซึ่งมีขนาดเล็กเท่าขนาดกระดาษสไลด์ อุปกรณ์ตรวจวัดในระบบ LOC ส่วนมากมีการใช้ polydimethyl(siloxane) (PDMS) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่หล่อจากแม่แบบซิลิกอน ขึ้นรูปได้ง่ายและมีราคาไม่แพง (4) มีดัชนีหักเหต่ำ และมีความโปร่งแสงที่ความยาวคลื่นมากกว่า 230 นาโนเมตร (5, 6) อย่างไรก็ตามขั้นตอนการทำแม่แบบซิลิกอน ใช้สารเคมีที่มีราคาแพง เช่น SU-8 ซึ่งเป็นสารไวแสง สำหรับใช้ในขั้นตอนการสร้างลวดลายบนแม่แบบซิลิกอน ด้วยเทคนิคโฟโตลิโทกราฟี (photolithography) อีกทั้งเครื่องมือที่ใช้ เป็นเครื่องมือพิเศษมีราคาแพง เช่น เครื่องเคลือบผิวแบบปั่นเหวี่ยง (spin coater), เครื่องฉายแสง เป็นต้น นอกจากนี้ การตรวจวัดในรูปแบบ LOC ยังต้องใช้อุปกรณ์ที่ประกอบเข้าในระบบการตรวจวัด เช่น เครื่องจ่ายสารละลายปริมาณน้อย (syringe pump) วาล์ว อุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณ (detector/sensor) เป็นต้น (7) รวมทั้งขั้นตอนในการสร้างชิปและการสร้างระบบการตรวจวัดมีความซับซ้อน ยุ่งยาก และใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และงานวิจัยส่วนมาก ยังไม่จัดเป็น LOC ที่สมบูรณ์ การตรวจวิเคราะห์ทั้งกระบวนการยังต้องอาศัยเครื่องมืออื่นมาทำงานร่วมด้วย เช่นการแยกเลือด ต้องอาศัยเครื่องปั่นเซนต์ริฟัจ ระบบตรวจวัดต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ มีเพียงแต่ส่วนเกิดปฏิกิริยาเท่านั้นที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นในทางปฏิบัติระบบ LOC ลักษณะนี้ ยังไม่สามารถ

เคลื่อนย้ายนำออกไปใช้ในภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อไม่นานมานี้ Whitesides และคณะ (8) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices,  $\mu$ PAD) หรือห้องปฏิบัติการบนกระดาษ (lab-on-paper) ซึ่งกระดาษได้มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวกลางค้ำจุนสำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยาอิมมูโนแอสเซย์ในรูปแบบการไหลแนวอน (lateral flow immunoassay หรือใช้การทดสอบแบบแถบจุ่ม (9-11) เทคนิคโครมาโทกราฟี (12),(13) และอิเล็กโทรโฟรีซิส (14) นอกจากนี้ กระดาษเป็นวัสดุที่มีน้ำหนักเบา เคลื่อนย้ายสะดวก ง่ายต่อการจัดเก็บหรือทำลายทิ้ง และกระดาษกรองมีส่วนประกอบเป็นเซลลูโลส ซึ่งสามารถเข้ากันได้กับสารตัวอย่างทางชีวภาพ ทำให้ประยุกต์ใช้ตรวจวัดสารทางชีวภาพได้หลากหลาย หลักการตรวจวัดบนห้องปฏิบัติการบนกระดาษไม่เหมือนกับการตรวจวัดบนกระดาษแบบดั้งเดิม เนื่องจากสามารถตรวจวัดสารได้หลายชนิดพร้อมกันบนอุปกรณ์ตรวจวัดชิ้นเดียวกัน (15) นอกจากนี้ การตรวจวัดเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์บนกระดาษได้สะดวกด้วยหลักการต่างๆ และการตรวจวัดปฏิกิริยาการเกิดสีบนกระดาษได้ใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถมองเห็นได้ง่าย บันทึกได้ง่ายโดยใช้อุปกรณ์พื้นฐาน เช่น กล้องดิจิทัล โทรศัพท์มือถือ หรือเครื่องสแกนเนอร์ (15, 16) ยิ่งไปกว่านั้น  $\mu$ PAD ยังสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับหลักการตรวจวัดต่างๆ เช่น เคมีไฟฟ้า (17, 18), การส่งผ่านแสง (19) ฟลูออเรสเซนซ์ การดูดกลืนแสง (19, 20) เป็นต้น

ได้มีรายงานวิจัยตีพิมพ์วิธีการสร้าง  $\mu$ PADs ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น ใช้กระบวนการโฟโตลิโทกราฟี (Photolithography) ซึ่งเป็นเทคนิคการฉายแสงเพื่อกำหนดรูปแบบ นับเป็นวิธีแรกที่ใช้สำหรับการสร้างห้องปฏิบัติการบนกระดาษ รายงานโดย Whitesides และคณะ (8) โดยเนื้อกระดาษที่เคลือบสารไวแสง (Photoresist) และสัมผัสกับแสง UV จะเปลี่ยนคุณสมบัติจากชอบน้ำไปเป็นไม่ชอบน้ำ ทำให้เกิดขอบเขตระหว่างบริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ เป็นช่องทางไหลที่เล็กและละเอียด มีความคมชัดสูง (high resolution) สามารถสร้างท่อขนาดเล็กบนกระดาษมีความกว้างเล็กที่สุดคือ 200 ไมโครเมตร วิธี PDMS plotting (21) โดยใช้เครื่อง desktop plotter ในการพิมพ์ช่องทางเดินของไหลที่ได้ออกแบบไว้ลงบนกระดาษกรอง จำเป็นต้องใช้สาร PDMS มาเจือจางใน hexane มาเป็นหมึกพิมพ์ ซึ่งหมึกพิมพ์ดังกล่าวจะซึมผ่านเข้าเนื้อกระดาษกรอง และเกิดเป็นบริเวณไม่ชอบน้ำ (21) วิธี Plasma etching (22) มีหลายขั้นตอนและใช้สารเคมีและเครื่องมือพิเศษ เช่น alkyl ketene dimer-heptane และเครื่อง vacuum plasma reactor เพื่อสร้างช่องทางไหลบนกระดาษ (23) วิธี Inkjet Printing (24) เริ่มด้วยการนำกระดาษกรองที่ได้ไปพิมพ์ด้วยหมึกที่เป็น alkenyl ketene dimer-heptane solution (5%, v/v) ตามลวดลายที่ได้ทำการออกแบบไว้ ซึ่งสารละลายดังกล่าวนี้ จะไปทำปฏิกิริยากับสารที่เคลือบไว้ก่อนหน้านี้ ทำให้เกิดบริเวณที่เป็นส่วนที่ชอบน้ำขึ้นมา (23) การสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการพิมพ์แว็กซ์ (Wax printing) (25-27) โดยการพิมพ์สารละลายแว็กซ์ให้เป็นรูปร่างที่ต้องการไว้บนกระดาษกรอง จากนั้นนำไปกระดาษไปให้ความร้อน จะทำให้แว็กซ์ที่อยู่ด้านบนซึมผ่านกระดาษกรองลงไป บริเวณที่แว็กซ์ซึมผ่านลงไปในนั้น กระดาษจะเปลี่ยนเป็นคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ จึงเกิดเป็นลวดลาย ช่องทางเดินของไหลตามทีออกแบบไว้ วิธีนี้ต้องมีการคำนวณการแพร่ที่สม่ำเสมอของแว็กซ์บนกระดาษกรอง (15) และใช้เครื่องพิมพ์แว็กซ์พิเศษ จะเห็นได้ว่าวิธี

ต่างๆ ที่กล่าวมายังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น มีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน ต้องพิจารณาเลือกใช้สารเคมีที่เข้ากันได้กับกระดาษกรองและไม่ส่งผลต่อสารตัวอย่างที่จะทำการทดสอบ การที่เนื้อกระดาษส่วนที่ต้องการออกแบบเป็นทางเดินของไหล ถ้ามีการสัมผัสกับสารเคมีหรือปฏิกิริยาบางชนิด อาจทำให้พื้นผิวของกระดาษมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปได้ อีกทั้งมาในขั้นตอนการสร้าง  $\mu$ PADs ด้วยวิธีต่างๆ ที่กล่าวมา ยังต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และสารเคมีบางชนิดมีราคาแพง ดังนั้นจึงยังไม่เหมาะสมกับประเทศกำลังพัฒนา

วิธีการสร้างช่องทางไหลขนาดเล็กบนกระดาษ ที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ เหมาะสำหรับประเทศกำลังพัฒนา เช่นวิธีการสกรีนแว็กซ์ (Wax screen printing) (28) ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ อาศัยเพียงเครื่องให้ความร้อนเช่น hot plate และไม่ใช้สารเคมีใดๆ ใช้แว็กซ์ที่เป็นก้อนแข็งถูผ่านลงไปยังแผ่นซิลล์สกรีนที่ออกแบบลวดลายไว้ผ่านไปยังกระดาษกรอง โดยให้แว็กซ์ลอดผ่านลงไปยังบริเวณที่ต้องการให้เป็นบริเวณไม่ชอบน้ำ จากนั้นนำกระดาษไปให้ความร้อนจนแว็กซ์หลอมซึมผ่านลงไปในเนื้อกระดาษกรองเกิดเป็นบริเวณไม่ชอบน้ำ (28) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความสามารถในการทำซ้ำค่อนข้างต่ำ ( $\%CV$  ประมาณ 11%) เนื่องจากมีความแปรปรวนจากแรงที่ถูแว็กซ์ผ่านกระดาษ จึงส่งผลต่อความคมชัดของช่องทางไหลของ  $\mu$ PADs แต่ละชิ้นที่ทำได้มีความแปรปรวนสูง

ในงานวิจัยนี้ ได้นำเสนอวิธีการสร้าง  $\mu$ PADs แบบใหม่ โดยให้ชื่อว่า “วิธีการจุ่มแว็กซ์ (wax dipping method) โดยใช้แม่พิมพ์เหล็กที่ถูกออกแบบและสั่งตัดตามต้องการโดยใช้เทคนิคเลเซอร์ วางประกบบนกระดาษกรองและยึดติดกับกระจกสไลด์ด้วยแม่เหล็กถาวร เมื่อนำจุ่มในในสารละลายแว็กซ์ที่กำลังหลอมเหลว บริเวณที่มีแม่แบบเหล็กประกบไว้จะยังคงสภาพเป็นบริเวณชอบน้ำ วิธีนี้ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีต้นทุนต่ำ และมี reproducibility ที่ดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจโปรตีนและกลูโคสในพลาสมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการตรวจวัดสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการการแพทย์ ส่วนใหญ่นิยมใช้สิ่งตัวอย่างที่เป็นซีรัมหรือพลาสมา (29) จึงต้องมีขั้นตอนการปั่นแยกเม็ดเลือดออกจากพลาสมาก่อนตรวจวิเคราะห์ ทำให้ต้องเสียเวลาในการเตรียมตัวอย่างเลือด และจำเป็นต้องใช้เครื่องมือเพิ่มเติม มีรายงานการใช้  $\mu$ PADs สำหรับการตรวจปฏิกิริยาการเกิดสีพร้อมๆ กันหลายชนิด โดยใช้สิ่งตัวอย่างที่เป็นพลาสมา ที่ผ่านการเตรียมมาก่อนหน้านี้ (14) ส่วนงานวิจัยของ Yang และคณะ ได้รายงานว่าสามารถใช้  $\mu$ PADs แยกพลาสมาจากเลือดครบส่วนได้ (30) โดยใช้หลักการการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เพื่อให้พลาสมาไหลแยกออกมาด้วยแรงแคพิลลารี โดยไม่ต้องใช้แรงดันจากภายนอก แม้ว่าเทคนิคนี้มีความใหม่ และสามารถใช้แยกเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีต่อหมู่เลือดทุกหมู่ ตรึงไว้บนกระดาษ เพื่อให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และได้พลาสมาไหลแยกออกไป การใช้แอนติบอดีจึงเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการเตรียมสิ่งตัวอย่างก่อนวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการสร้าง  $\mu$ PADs สำหรับวิเคราะห์สารบ่งชี้ทางชีวภาพจากเลือดครบส่วนวิธีใหม่ โดยออกแบบให้เม็ดเลือดแดงถูกแยกออกจากพลาสมา โดยการใช้กระดาษที่มีคุณสมบัติในการกักเก็บเม็ดเลือดแดงเชื่อมต่อกับกระดาษกรองสำหรับใช้เป็นบริเวณตรวจวัด โดยใช้เทคนิคการจุ่มแว็กซ์  $\mu$ PADs ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถแยกเม็ดเลือดแดงออกจากพลาสมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถ

ออกแบบให้ตรวจวัดสารเคมีในเลือดหลายชนิดพร้อมกันจากสิ่งตัวอย่างเดียวกันได้ในขั้นตอนเดียว โดยไม่มีการใช้แรงดันภายนอก ไม่มีการใช้สารเคมี หรือแอนติบอดีเคลือบบนผิวกระดาษก่อน ด้วยวิธีนี้ ช่องทางไหลบนกระดาษบริเวณขอบน้ำ ไม่สัมผัสสารเคมีใดๆ จึงทำให้คงสภาพเดิมที่สุด จึงทำให้ของเหลวสามารถเคลื่อนที่บนกระดาษด้วยแรงแคปิลลารีตามปกติ ทำให้แยกพลาสมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีที่นำเสนอสามารถลดระยะเวลาการเตรียมสิ่งตัวอย่าง เหมาะสำหรับนำไปตรวจวัดในรูปแบบ point-of-care testing อีกทั้งเป็นวิธีที่ต้นทุนต่ำ ใช้เครื่องมือพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป จึงสามารถตอบสนองการนำไปประยุกต์ใช้ในประเทศกำลังพัฒนาได้เป็นอย่างดี สอดคล้องกับคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกที่กล่าวว่าการตรวจวัดโดยใช้ห้องปฏิบัติการบนกระดาษมีความเป็นไปได้และมีศักยภาพสูงที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องมือตรวจวินิจฉัยโรคในประเทศกำลังพัฒนา (15)

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษวิธีใหม่ ที่เหมาะกับประเทศกำลังพัฒนา
2. พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ สำหรับแยกเลือดครบส่วน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบบ่งชี้ชีวภาพในเลือด

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และสิ่งตัวอย่าง

กระดาษกรอง Whatman No.1, LF1, MF1, VF1 และ VF2 เป็นสินค้าของบริษัท Whatman International Ltd. (Maidstone, England) เม็ดแก้วซีลิวาซื้อจากร้านศึกษาภัณฑ์พาณิชย์ ในกรุงเทพมหานคร กระดาษไลต์เป็นสินค้าของ Sail Brand (Jiangsu, China) แม่แบบซึ่งทำจากเหล็กที่มีความหนา 1 มิลลิเมตร สั่งทำตามแบบที่ต้องการ โดยใช้เทคนิคเลเซอร์ จากร้านในกรุงเทพมหานคร แม่เหล็กถาวร ซื้อจากร้านค้าทั่วไป

อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วยกล้องดิจิทัล (Canon, Powershot A570 IS 7.1 ล้านพิกเซล) เต้าหัดความร้อน (IKA® hotplate (C-MAG HS7, Wilmington, USA) กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX50, Tokyo, Japan) เครื่องปั่นฮีมาโทคริต (Hawksley, England) และเครื่องอ่านฮีมาโทคริต (Micro Capillary Reader Cat No. 2201, International Equipment Co, Neckham Heights, MA)

กลูโคส (D-(+)-Glucose) เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (จาก *Aspergillus niger* - Type II) เอนไซม์เปอออกซิเดส โพแทสเซียม ไอโอไดด์ (potassium iodide), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), Brij™ 35 และซีรัมอัลบูมินจากวัว (bovine serum albumin) เป็นสินค้าที่ซื้อจากร้าน Sigma-Aldrich โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) และกรดซัคซินิก ซื้อจากร้าน Merck บรอมครีซอล กรีน (Bromocresol green) ซื้อจากร้าน BDH chemicals ชุดน้ำยาตรวจวัดกลูโคส (GLUCOSE liquicolor) และซีรัมควบคุมคุณภาพการตรวจวัด (Humatrol N และ Humatrol P) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท HUMAN (Wiesbaden, Germany) เครื่องตรวจน้ำตาลจากปลายนิ้ว (Accu-Chek) เป็นสินค้าของบริษัท Roche Diagnostics น้ำยาทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยเตรียมจากน้ำชนิด MilliQ

สิ่งตัวอย่างเลือดได้จากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 23 ราย โดยงานวิจัยนี้ ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (COA No.079/2011) โดยตัวอย่างเลือดจำนวน 6 ราย เก็บในหลอดที่มีเฮปาริน (heparin) เป็นสารกันเลือดแข็งสำหรับตรวจวัดปริมาณโปรตีน ส่วนตัวอย่างอื่นๆ เก็บในหลอดที่มี K<sub>3</sub>EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ในแต่ละการทดลอง แต่ละตัวอย่างจะวัดซ้ำ 4 ครั้ง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

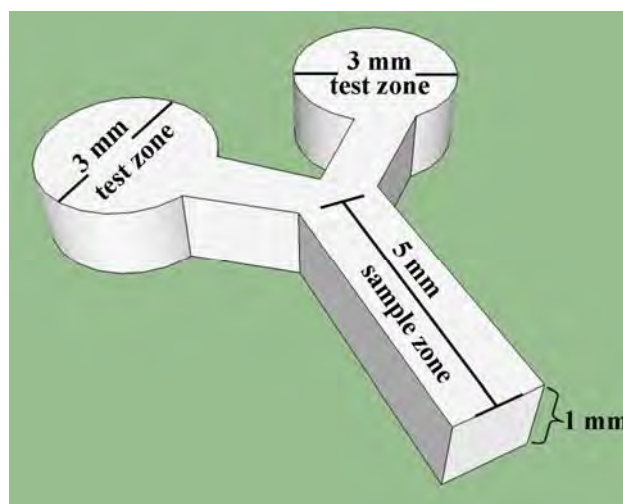
ตัวอย่างเลือดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใช้ภายในหนึ่งสัปดาห์ สำหรับการวัดระดับฮีมาโทคริต เก็บตัวอย่างเลือดครบส่วนที่เจาะจากปลายนิ้วในหลอดแคปิลลารีและดูดด้วยดินน้ำมันก่อนนำไปปั่นที่ 10,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่องปั่นฮีมาโทคริต (Hawksley, England) จากนั้นนำหลอดแคปิลลารีที่มีเม็ดเลือดแดงอัดแน่นไปวัดโดยใช้เครื่องอ่านฮีมาโทคริต (Micro Capillary Reader Cat No.

2201, International Equipment Co, Neckham Heights, MA) รายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงต่อปริมาณเลือดทั้งหมด

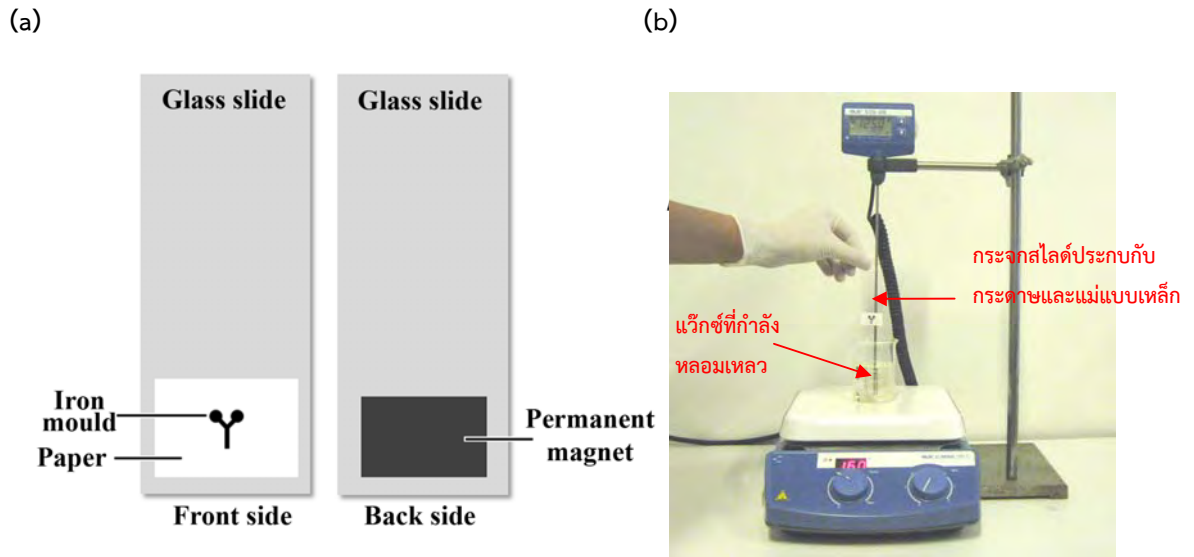
## 2. วิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices, $\mu$ PAD)

### 2.1 การสร้างต้นแบบของ $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มแว็กซ์

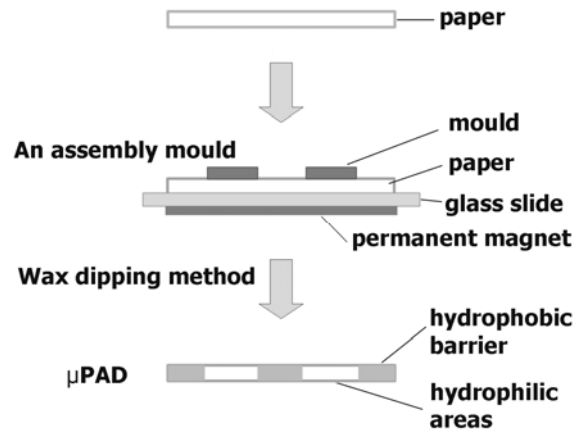
ทำการสร้างแม่แบบเหล็ก (iron mold) สำหรับสร้างลวดลายบนกระดาษ โดยสังัดตามต้องการ โดยร้านตัดเหล็กด้วยการใช้เลเซอร์ ในงานวิจัยได้ออกแบบเป็นรูปตัววาย (Y-shape) มีความยาวของ sample zone 5 มิลลิเมตร บริเวณ test zone มีสองด้าน เป็นรูปวงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร และแม่แบบเหล็กมีความหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร (รูปที่ 1) ก่อนจะทำการจุ่มแว็กซ์ นำกระดาษกรอง Whatman No.1 ตัดให้มีขนาดกว้าง 15 มิลลิเมตร ยาว 25 มิลลิเมตร วางบนกระดาษสไลด์ จากนั้นนำแม่แบบเหล็กมาวางทับบนกระดาษกรอง นำแม่เหล็กถาวรประกบด้านหลังกระดาษสไลด์เพื่อยึดแม่แบบให้ติดกับกระดาษ (รูปที่ 2a) จากนั้นนำส่วนที่ประกอบขึ้นไปจุ่มในแว็กซ์ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที (จุ่มแล้วยกขึ้นทันที) โดยหลอมแว็กซ์ในปีกเกอร์ด้วยการใช้เตาทำความร้อน (hot plate) ที่ติดตั้งเซ็นเซอร์ควบคุมอุณหภูมิ (รูปที่ 2b) เมื่อจุ่มเสร็จแล้วรอให้แว็กซ์แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงแยกแม่แบบออกจากกระดาษโดยการนำแม่เหล็กถาวรออก จะได้  $\mu$ PAD ที่มีท่อของไหลซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำถูกกั้นด้วยเนื้อแว็กซ์ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (รูปที่ 3) โดยเป็นลวดลายตามที่ออกแบบไว้



รูปที่ 1. ขนาดและรูปร่างของแม่แบบเหล็ก สำหรับใช้ในการสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีจุ่มแว็กซ์



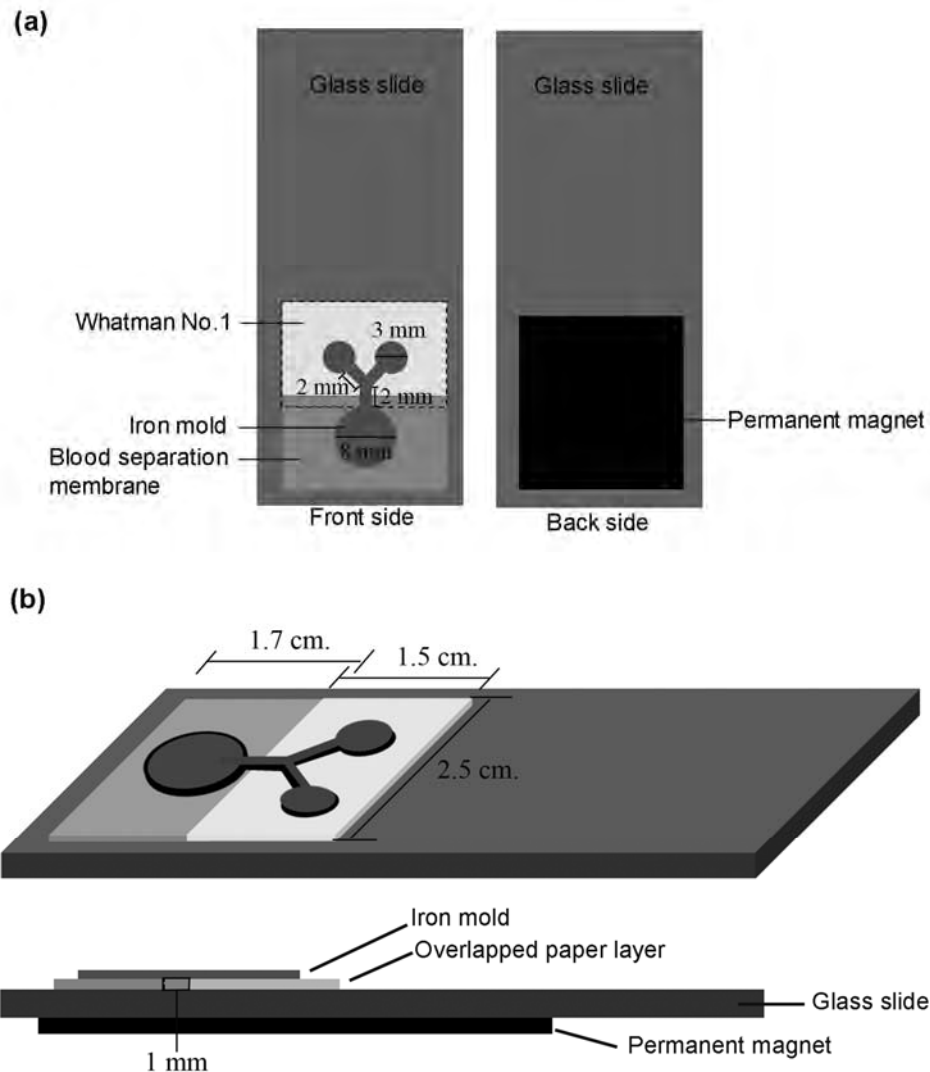
รูปที่ 2. องค์ประกอบของการสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มแว็กซ์ (a) การประกอบกระดาดและแม่แบบเหล็กบนกระจกสไลด์ก่อนนำไปจุ่มแว็กซ์ (b) อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการ  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มแว็กซ์



รูปที่ 3. แผนภาพแสดงการเกิดบริเวณชอบน้ำ และบริเวณไม่ชอบน้ำบน  $\mu$ PAD ที่สร้างด้วยวิธีการจุ่มแว็กซ์

## 2.2 การสร้าง $\mu$ PAD สำหรับแยกเลือดครบส่วน

สำหรับการสร้าง  $\mu$ PAD สำหรับแยกเลือดครบส่วนนั้น มีวิธีการคล้ายกับการสร้าง  $\mu$ PAD ที่อธิบายในข้อ 2.1 ต่างกันที่ การออกแบบให้มีส่วนบริเวณแยกเลือดเป็นวงกลมขนาดต่างๆ และใช้กระดาษแยกเลือดชนิดต่างๆ ได้แก่ LF1, MF1, VF1 วางซ้อนกับกระดาษ Whatman No.1 โดยให้เหลื่อมกันประมาณ 1 มิลลิเมตร ก่อนนำประกอบบนกระจกสไลด์และไปจุ่มแว็กซ์ ดังแสดงในรูปที่ 4a และ 4b



รูปที่ 4. แสดงการสร้าง  $\mu$ PAD สำหรับแยกเลือดครบส่วน โดยวิธีการจุ่มแว็กซ์ : (A) แสดงมุมมองด้านหน้าและด้านหลัง; (B) แสดงมุมมองด้านข้าง จากการประกอบกระดาษ กระดาษแยกเลือด และแม่แบบเหล็กบนกระจกสไลด์ก่อนนำไปจุ่มแว็กซ์

### 3. การทดสอบความสามารถของ $\mu$ PAD ไปใช้ตรวจวิเคราะห์ทางคลินิก

#### 3.1 การทดสอบความใช้ได้ของ $\mu$ PAD ที่สร้างด้วยวิธีจุ่มแวกซ์

ในการทดลองส่วนแรก เป็นการประเมินการวัดปฏิกิริยาเกิดสีบน  $\mu$ PAD ที่สร้างโดยใช้เทคนิคการจุ่มแวกซ์ โดยออกแบบกระดาษให้เป็นรูปตัววาย (Y shape) ซึ่งประกอบด้วย two test 2 ด้าน แต่ละด้านมีลักษณะเป็นวงกลม มีความกว้าง 3 มิลลิเมตร สำหรับตรวจวัดกลูโคสและโปรตีนพร้อมๆ กัน

สำหรับการตรวจวัดกลูโคส น้ำยาที่ใช้ประยุกต์มาจาก Self-Stik reagent strips (Chungdo pharm. Co., LTD, Korea) ทำการปิเปตสารละลาย potassium iodide ความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษบริเวณ test zone และทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที จากนั้นหยดสารละลายที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ glucose oxidase (451 U/mL) และ 186 U/mL peroxidase ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษบริเวณ test zone อีกครั้ง

สำหรับใช้ตรวจวัดโปรตีน ปิเปตน้ำยา 10x bromocresol green (BCG) [24] ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ลงบนอีกด้านของ test zone จากนั้นรอให้กระดาษแห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะทำการวัดสิ่งตัวอย่าง จุ่มด้านปลายของ  $\mu$ PAD ลงสิ่งตัวอย่าง และรอให้สิ่งตัวอย่างไหลเคลื่อนที่มายังบริเวณ test zone ทั้งสองด้านซึ่งความเข้มของสีสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ถ่ายภาพสีที่เกิดขึ้นบริเวณ test zones ด้วยกล้องดิจิทัล และนำภาพถ่ายมาวิเคราะห์ความเข้มของสี ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2

#### 3.2 การทดสอบความใช้ได้ของ $\mu$ PAD สำหรับใช้แยกเลือดครบส่วน

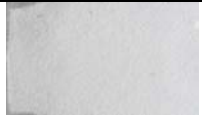
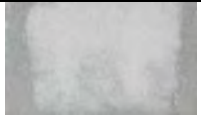



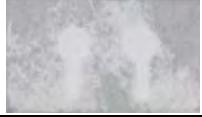
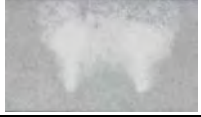






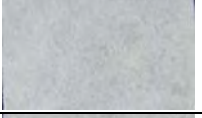
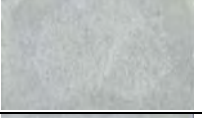


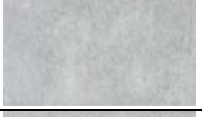

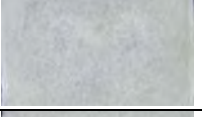

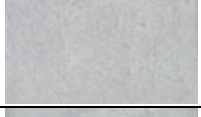



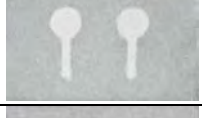

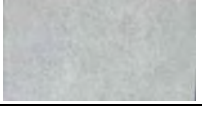

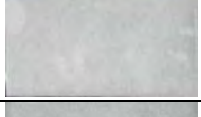

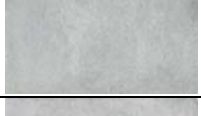
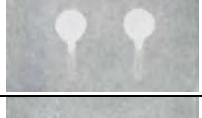



เมื่อได้  $\mu$ PAD สำหรับแยกเลือดแล้ว ทำการตรึงน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัดตัวบ่งชี้โรค (ในการทดลองนี้ เป็นการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเลือด) บนกระดาษในส่วน detection zone จากนั้นรอให้น้ำยาแห้ง เมื่อน้ำยาแห้งแล้ว สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ได้ โดยหยดตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ใช้เฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็ง ถ้าไม่กล่าวเป็นอย่างอื่น ปริมาตรเลือดที่ใช้เป็น 8 ไมโครลิตร สำหรับกระดาษแยกเลือดชนิด LF-1 ที่มีพื้นที่ 28 ตารางมิลลิเมตร ลงในส่วน separation zone พลาสมาที่แยกได้จะไหลไปยังบริเวณ detection zone จากนั้นสิ่งตัวอย่างในพลาสมาจะทำปฏิกิริยากับน้ำยาทำให้เกิดสีขึ้น การตรวจระดับโปรตีนในเลือด จะใช้หลักการจับกับสารสี โดยใช้สี bromocresol green (BCG) ในการจับกับอัลบูมินในเลือด BCG สามารถจับกับอัลบูมินอย่างจำเพาะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ความเข้มของสีจะแปรผันตามความเข้มข้นของอัลบูมินในเลือด ทำการถ่ายภาพหรือสแกนภาพบริเวณ detection zone แล้ววัดความเข้มของสีโดยใช้โปรแกรม Photoshop แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มของสีของสารละลายโปรตีนมาตรฐานและความเข้มของสีที่เกิดขึ้น

## ผลการทดลอง

### 1. ผลการทดสอบอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสร้าง $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มแก้ว

เนื่องจากอุณหภูมิและเวลาในการจุ่มแก้ว มีผลต่อความคมชัดระหว่างบริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์การตรวจวัดบนกระดาษ ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมโดยการจุ่มกระดาษในแก้วที่อุณหภูมิ 90-160 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ในช่วง 1-20 วินาที โดยใช้แม่แบบที่ประกอบด้วย sample zone มีความกว้าง 1 มิลลิเมตร และส่วน detection zone มีความกว้าง 4 มิลลิเมตร ผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างอุปกรณ์การตรวจวัดบนกระดาษอยู่ในช่วง 120-130 องศาเซลเซียส และเวลาที่เหมาะสมคือ 1 วินาที อุณหภูมิที่น้อยกว่า 120 องศาเซลเซียส ทำให้แก้วไม่สามารถซึมเข้าสู่กระดาษได้ ทำให้บริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษไม่คมชัด เมื่อใช้เวลามากกว่า 1 วินาที ในการจุ่มแก้ว แก้วจะซึมเข้าสู่กระดาษมากเกินไป สามารถลอดผ่านแม่แบบเหล็กที่บังกระดาษไว้ได้ ทำให้ไม่เกิดเป็นท่อบริเวณชอบน้ำบนกระดาษ นอกจากนี้อุณหภูมิของแก้วที่มากกว่า 130 องศาเซลเซียส และเวลาในการจุ่มแก้วมากกว่า 5 วินาที เป็นอุณหภูมิที่ร้อนเกินไป และเวลานานเกินไป ทำให้แม่แบบ กระดาษ และแม่เหล็กไม่สามารถทนความร้อนได้ จึงเกิดการแยกออกจากกันไม่สามารถสร้างลวดลายบนกระดาษได้ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการจุ่ม สำหรับการสร้าง  $\mu$ PADs ด้วยวิธีการจุ่มแก้วซ์

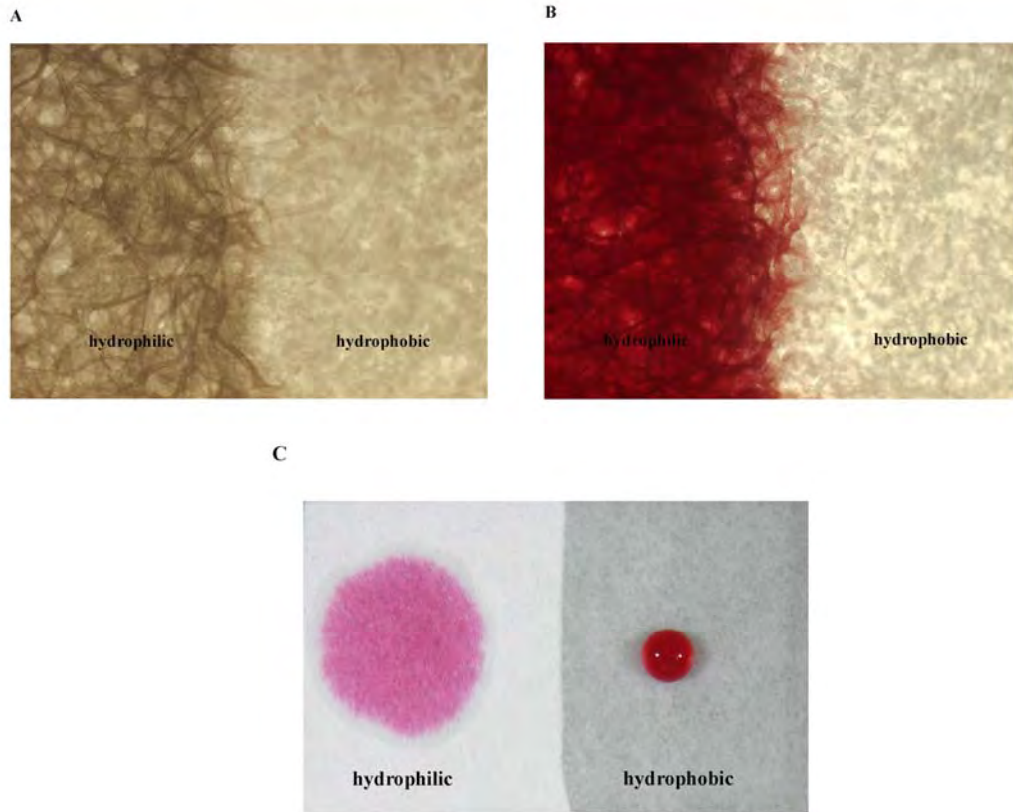
Temp (°C)	Dipping time (sec)				
	1	5	10	15	20
90					
95					
100					
115					
120					
125				*	*
130			*	*	*
135			*	*	*
140			*	*	*
150		*	*	*	*
160		*	*	*	*

\* ได้มีการทดสอบสถานะดังกล่าว แต่เนื่องจากอุณหภูมิที่สูง หรือเวลาในการจุ่มนานเกินไป ทำให้แม่แบบเหล็กแยกออกจากกระดาษและกระจกสไลด์

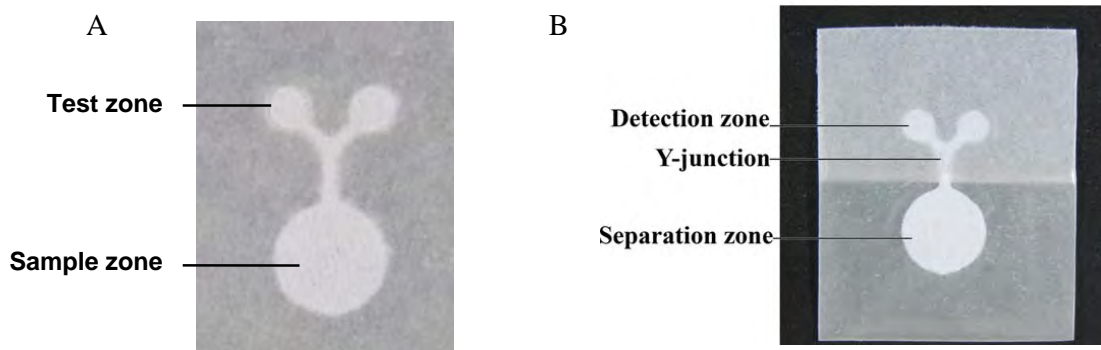
## 2. ผลของการสร้าง $\mu$ PADs ด้วยวิธีการจุ่มแว็กซ์

เทคนิคการสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มแว็กซ์ ทำให้แว็กซ์ซึมไปบนเนื้อกระดาษและสร้างเป็นขอบเขตของบริเวณไม่ชอบน้ำ ส่วนบริเวณชอบน้ำบนกระดาษ คือบริเวณที่ถูกปิดด้วยแม่แบบเหล็ก เมื่อนำ  $\mu$ PADs ที่สร้างได้ไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX50) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อกระดาษ พบว่าผิวของกระดาษบริเวณไม่ชอบน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเนื่องจากมีแว็กซ์เคลือบอยู่ ดังแสดงในรูปที่ (รูป 5a) ด้านซ้ายของรูปเป็นเนื้อกระดาษที่ยังไม่สัมผัสแว็กซ์ ด้านขวามีแว็กซ์เคลือบอยู่และเปลี่ยนคุณสมบัติเป็นไม่ชอบน้ำอย่างสมบูรณ์ รูป 5b แสดงให้เห็นว่าสีผสมอาหารที่หยดลงไป ไหลไปยังบริเวณชอบน้ำของกระดาษเท่านั้นไม่สามารถซึมผ่านไปยังบริเวณไม่ชอบน้ำได้ รูป 5c แสดงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของ  $\mu$ PAD บริเวณที่มีแว็กซ์เคลือบอยู่ เมื่อมีการหยดสีผสมอาหารลงไป สีผสมอาหารยังคงรูปร่างเป็นหยดน้ำไม่กระจายตัวไปตามเนื้อกระดาษซึ่งแตกต่างจากการหยดสีลงบนบริเวณชอบน้ำอย่างเห็นได้ชัด

ภาพของต้นแบบ  $\mu$ PAD ที่สร้างโดยเทคนิคการจุ่มแว็กซ์ดังแสดงในรูป 6a และ 6b จะเห็นได้ว่า  $\mu$ PAD สำหรับใช้แยกพลาสติกจากเลือดครบส่วน มีการใช้กระดาษสองชนิดเชื่อมต่อกันอย่างเห็นได้ชัด โดยการเชื่อมของกระดาษ ไม่มีการใช้กาว หรือวัสดุอื่นเพิ่มเติม กระดาษสองชนิดสามารถถูกเชื่อมต่อกันด้วยเนื้อแว็กซ์ขณะทำการจุ่มกระดาษลงในแว็กซ์หลอมเหลว และเมื่อสร้างเสร็จกระดาษทั้งสองแผ่นได้เชื่อมกันเป็นแผ่นเดียว



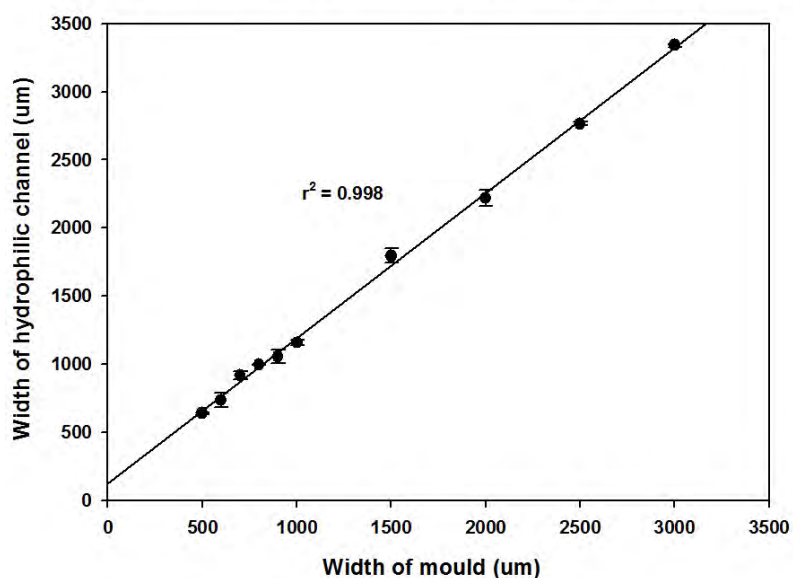
รูปที่ 5. แสดงภาพของกระดาษที่สร้างโดยเทคนิคการจุ่ม: (a) บริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของกระดาษเมื่อสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x magnification); (b) ลักษณะของกระดาษเมื่อหยดสีผสมอาหารลงไปบริเวณชอบน้ำ; (c) เปรียบเทียบลักษณะของสีผสมอาหารเมื่อหยดลงบนบริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของกระดาษ



รูปที่ 6. แสดงส่วนต่างๆ ของ  $\mu$ PAD ที่สร้างเสร็จแล้ว (a) ภาพของต้นแบบ  $\mu$ PAD ที่สร้างโดยเทคนิคการจุ่มแว็กซ์ (b) ภาพของ  $\mu$ PAD สำหรับใช้แยกพลาสติกจากเลือดครบส่วน

### 3. ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของแม่แบบกับท่อบน $\mu$ PAD

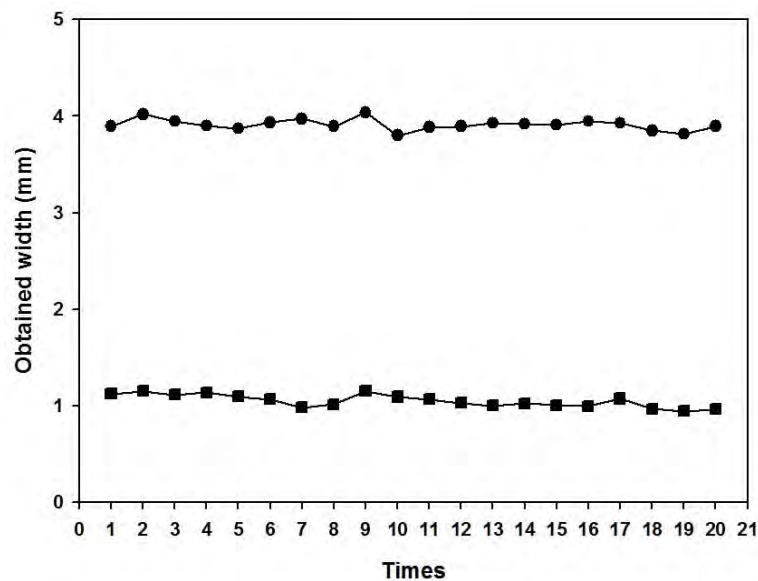
ความกว้างของท่อบน  $\mu$ PAD ขึ้นอยู่กับขนาดของแม่แบบที่เป็นหลัก ในงานวิจัยนี้ได้ใช้แม่แบบที่มีความกว้าง 500-3,000 ไมโครเมตร สำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของแม่แบบกับท่อบน  $\mu$ PAD ที่สร้างได้ ขณะทำการทดลอง จะมีการควบคุมอุณหภูมิของเว็ทซ์ที่กำลังหลอมให้อยู่ในช่วง 120-130 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการจุ่ม 1 วินาที เมื่อได้  $\mu$ PAD ที่มีความกว้างของท่อขนาดต่างๆ แล้ว บันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล แล้ววัดความกว้างของท่อบน  $\mu$ PAD ที่สร้างขึ้น โดยใช้โปรแกรม ImageJ นำมาเปรียบเทียบกับความกว้างของแม่แบบหลักที่ใช้ ผลการทดลองพบว่าขนาดท่อที่เล็กที่สุดที่สามารถสร้างได้โดยวิธีการจุ่มเว็ทซ์คือ  $639 \pm 6.7$  ไมโครเมตร ( $n = 3$ ) รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดความกว้างของแม่แบบกับความกว้างของท่อบน  $\mu$ PAD ที่สร้างได้ พบว่าความกว้างของแม่แบบกับขนาดของท่อบนกระดาศที่ได้มีความสัมพันธ์กัน ( $r^2 = 0.998$ ) และมีสมการความสัมพันธ์คือ  $W_C = 1.067 W_M + 121.78$  โดย  $W_C$  คือความกว้างของท่อบนกระดาศ และ  $W_M$  คือความกว้างของแม่แบบหลักที่ใช้ ดังนั้นการใช้วิธีการจุ่มเว็ทซ์ สามารถทำนายความกว้างของท่อของ  $\mu$ PAD ได้จากความกว้างของแม่แบบที่ใช้ โดยใช้สมการดังกล่าว



รูปที่ 7. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดความกว้างของแม่แบบหลักกับความกว้างของท่อบน  $\mu$ PAD ที่สร้างด้วยเทคนิคการจุ่มเว็ทซ์ สมการความสัมพันธ์  $W_C = 1.067 W_M + 121.78$ , ( $r^2 = 0.998$ )

#### 4. Reproducibility ของการสร้าง $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มเว็ทซ์

ทำการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มเว็ทซ์ โดยสร้าง  $\mu$ PADs จำนวน 20 ชิ้น จากแม่แบบที่มี sample zone กว้าง 1 มิลลิเมตร และ detection zone มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จากนั้นบันทึกภาพและวัดความกว้างของท่อบน  $\mu$ PAD โดยใช้โปรแกรม ImageJ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation, CV) ความกว้างของท่อที่สร้างได้จริงจาก  $\mu$ PAD ทั้ง 20 ชิ้น ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 ค่าเฉลี่ยของความกว้างของท่อบริเวณ detection zone และ sample zone คือ  $3.91 \pm 0.06$  และ  $1.04 \pm 0.07$  มิลลิเมตร และมีค่า RSDs 1.48% และ 6.30% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มเว็ทซ์มี reproducibility สูง ในการจุ่มเว็ทซ์เพื่อสร้าง  $\mu$ PAD แต่ละชิ้นได้ขนาดที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ในขั้นตอนการสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มเว็ทซ์นี้ จะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาในการจุ่มเว็ทซ์ให้คงที่ เพื่อให้  $\mu$ PAD แต่ละชิ้นมีบริเวณที่ใช้ทำปฏิกิริยาของสารที่ต้องการตรวจวัดเท่าๆ กัน



รูปที่ 8. แสดง reproducibility ของการสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มเว็ทซ์ (■) ท่อบริเวณ sample zone and (●) ท่อบริเวณ detection zone

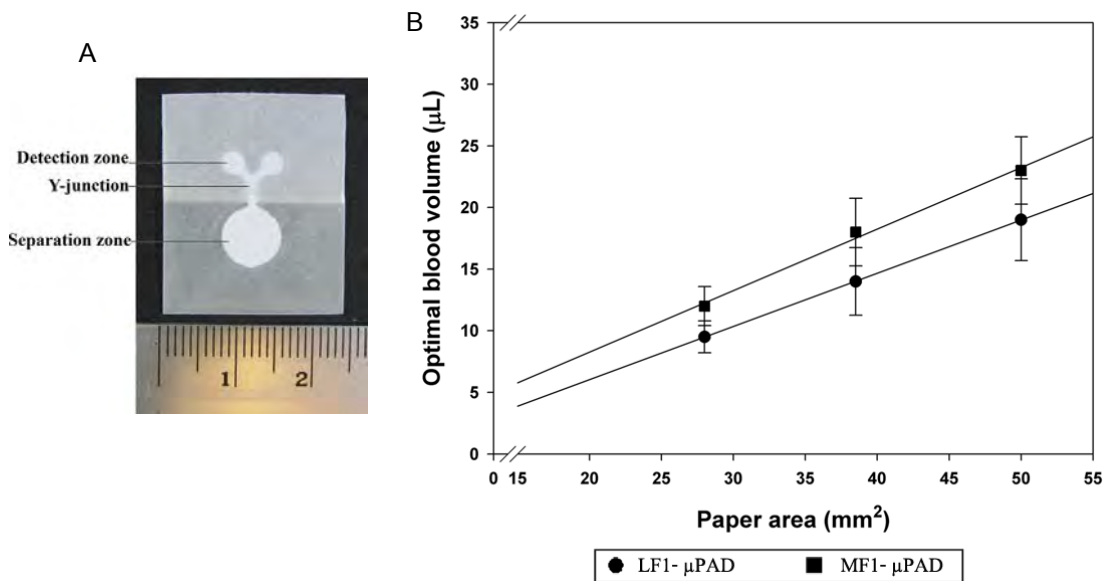
## 5. ชนิดของกระดาษที่เหมาะสมสำหรับการแยกเลือดบน $\mu$ PAD

เนื่องจากกระดาษกรอง Whatman No.1 ไม่สามารถแยกเลือดได้เพราะขนาดรูพรุนของกระดาษกรองมีขนาดใหญ่ งานวิจัยนี้จึงได้ใช้กระดาษชนิดต่างๆ มาสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับการแยกเม็ดเลือดออกจากพลาสมา และทำการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างในพลาสมาในขั้นตอนเดียวบน  $\mu$ PAD โดยกระดาษที่นำมาใช้ในการสร้าง  $\mu$ PAD สำหรับการแยกเลือด ได้แก่ กระดาษ Whatman No.1 และกระดาษแยกเลือดชนิด MF1, LF1, VF1 และ VF2 โดยที่กระดาษกรองชนิด MF1, LF1 และ VF2 เป็นกระดาษชนิด polyvinyl alcohol-bound glass fiber และ VF1 เป็นกระดาษชนิด binder-free glass fiber ซึ่งกระดาษกรองที่นำมาทดสอบนั้นสามารถแยกสารที่มีขนาดใหญ่กว่า 2-3 ไมโครเมตร ออกจากสารน้ำได้ โดยเม็ดเลือดและเกร็ดเลือดจะถูกกักอยู่บนกระดาษกรอง ส่วนพลาสมาจะถูกแยกออกมาและไหลไปยังบริเวณ detection zone และทำปฏิกิริยากับน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด โดยขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับการแยกเลือดนั้น จะนำกระดาษกรอง Whatman No. มาวางซ้อนกับกระดาษแยกเลือด ให้กระดาษเหลื่อมกันประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยให้กระดาษแยกเลือดอยู่ด้านบน แล้วประกบกับแม่แบบที่มีท่อความกว้างขนาด 1 มิลลิเมตร วางบนกระดาษทั้งสองชนิด ทำการจุ่มกระดาษลงไปในเว็ทซ์ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ผลการทดลองพบว่าสามารถสร้างลวดลายบนกระดาษชนิด MF1 และ LF1 ได้ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถสร้างช่องทางเดินระหว่างบริเวณขอบน้ำแยกออกจากบริเวณไม่ขอบน้ำบนกระดาษแยกเลือดชนิด VF1 และ VF2 ได้ เนื่องจากกระดาษแยกเลือดทั้งสองชนิดมีความหนา โดยกระดาษแยกเลือดชนิด VF1 และ VF2 มีความหนา 632 และ 785 ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งทำให้แม่แบบไม่สามารถแนบกับกระดาษ Whatman No.1 ได้สมบูรณ์ ส่งผลให้เว็ทซ์ซึมเข้าสู่กระดาษตลอดแผ่น สามารถผ่านเข้าไปบริเวณที่มีแม่แบบเหล็กประกบอยู่ได้ จึงทำให้ไม่สามารถสร้างลวดลายบริเวณไม่ขอบน้ำบนกระดาษได้ ดังนั้นกระดาษแยกเลือดที่เหมาะสมสำหรับนำมาทำ  $\mu$ PAD โดยวิธีการจุ่มเว็ทซ์คือกระดาษชนิด MF1 และ LF1

## 6. ปริมาตรเลือดที่เหมาะสมสำหรับการแยกเลือดบน $\mu$ PAD

ในการแยกเม็ดเลือดออกจากพลาสมาโดยใช้  $\mu$ PAD ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ ต้องใช้ปริมาตรเลือดที่เหมาะสม เนื่องจากถ้าใช้ตัวอย่างเลือดที่มีปริมาตรมากเกินไป จะทำให้เม็ดเลือดแดงไหลปนมากับพลาสมาในบริเวณ detection zone และอาจรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัด แต่หากปริมาตรเลือดน้อยเกินไป จะทำให้ได้ปริมาตรพลาสมาไม่เพียงพอ และไหลไปไม่ถึงบริเวณ detection zone ทำให้ไม่สามารถวัดปฏิกิริยาได้ ดังนั้นจึงทำการทดสอบปริมาตรเลือดที่เหมาะสมในการแยกเลือดบนกระดาษที่ได้ออกแบบไว้ โดยการสร้าง  $\mu$ PAD โดยใช้แม่แบบที่มีความกว้างของส่วน separation zone แตกต่างกันคือ 5, 6, 7 และ 8 มิลลิเมตร (มีพื้นที่กระดาษสำหรับแยกเลือด 19, 28, 38 และ 50 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ) โดยใช้กระดาษแยกเลือดชนิด MF1 และ LF1 ในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษร่วมกับกระดาษกรอง Whatman No.1 ดังรูปที่ 9a จากนั้นทำการแยกเลือดโดยใช้ปริมาตรเลือดต่างๆ หยดลงบน  $\mu$ PAD แต่ละขนาด ปริมาตรเลือด

ที่ใช้และทำให้พลาสมาสามารถแยกออกมาจาก separation zone จนกระทั่งเต็มส่วน detection zone ได้โดยไม่มีเม็ดเลือดแดงปนมา คือปริมาตรเลือดที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ในการตรวจวัด รูปที่ 9b แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของกระดาษแยกเลือดชนิด MF1 และ LF1 กับปริมาตรเลือดที่เหมาะสมสำหรับการแยกเลือดบนกระดาษ ผลการทดลองพบว่ากระดาษแยกเลือดทั้งสองชนิดสามารถใช้แยกเม็ดเลือดออกจากเลือดครบส่วนได้ โดยที่ปริมาตรเลือดที่ใช้เพิ่มขึ้นตามพื้นที่ของกระดาษแยกเลือด โดยมีสมการความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของกระดาษแยกเลือดกับปริมาตรเลือดที่ใช้คือ  $y = 0.4989x - 1.70$  และ  $y = 0.431x - 2.60$  สำหรับกระดาษแยกเลือดชนิด MF1 และ LF1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พื้นที่กระดาษแยกเลือดน้อยกว่า 19 ตารางมิลลิเมตร ไม่สามารถแยกเลือดได้เนื่องจากพื้นที่ในการแยกเลือดน้อยเกินไปทำให้เม็ดเลือดแดงปนมากับพลาสมาที่แยกได้ ส่วนปริมาตรเลือดที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการแยกเลือดของกระดาษแยกเลือดชนิด LF1 และ MF1 โดยใช้พื้นที่ของกระดาษแยกเลือด 28 ตารางมิลลิเมตร คือ 8 และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากระดาษแยกเลือดชนิด LF1 ใช้ปริมาตรเลือดน้อยกว่ากระดาษแยกเลือดชนิด MF1 เมื่อพื้นที่ของกระดาษแยกเลือดเท่ากัน จึงถูกเลือกใช้ในงานวิจัยนี้ จากผลการทดลองในรูป 7b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงให้เห็นว่าปริมาตรเลือดที่สามารถใช้ได้คือ 8-11  $\mu\text{L}$ , 11-17  $\mu\text{L}$ , และ 15-22  $\mu\text{L}$  เมื่อใช้ LF1- $\mu\text{PAD}$  ที่มีกระดาษแยกเลือดพื้นที่ 28 ตารางมิลลิเมตร, 38 ตารางมิลลิเมตรและ 50 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 9. (A) แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับการแยกเลือด (B) ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของกระดาษแยกเลือดชนิด MF1 และ LF1 กับปริมาตรเลือดที่เหมาะสมสำหรับการแยกเลือดบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (■) กระดาษแยกเลือดชนิด MF1 (●) กระดาษแยกเลือดชนิด LF1

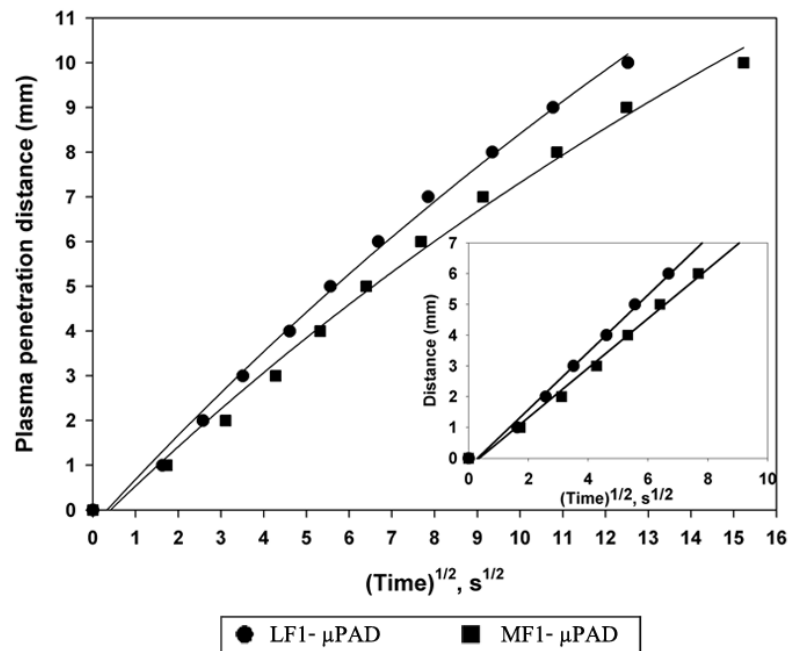
## 7. การไหลของพลาสมาบน $\mu$ PAD

ปกติของเหลวจะเคลื่อนที่ไปบนกระดาษโดยอาศัยแรงคาพิลลารี (capillary force) จึงไม่จำเป็นต้องใช้แรงจากภายนอกในการผลักดันเข้าสู่ระบบการตรวจวัด ในการแยกพลาสมาโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษนั้น ถ้าการไหลของพลาสมาเร็ว ก็จะทำให้สามารถตรวจวัดสิ่งตัวอย่างได้รวดเร็ว ซึ่งอัตราการไหลของพลาสมาขึ้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวอย่างเลือด งานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบความเร็วในการไหลของพลาสมาบน  $\mu$ PAD ที่สร้างขึ้นด้วยกระดาษแยกเลือดชนิด MF1 และ LF1 โดยใช้แม่แบบเหล็กที่มีความกว้างของบริเวณ separation zone เป็น 8 มิลลิเมตร และมีความกว้างของท่อบนกระดาษ Whatman No.1 ขนาด 1 มิลลิเมตร ยาว 10 มิลลิเมตร นำไม้บรรทัดมาวางบนกระดาษในส่วนกระดาษ Whatman No.1 แล้วหยดเลือด (ในการทดลองนี้ ใช้ตัวอย่างเลือดที่มีค่าฮีมาโทคริต 38%) ลงบน  $\mu$ PAD ในส่วน separation zone จากนั้นวัดระยะทางที่พลาสมาเคลื่อนที่ไปบนกระดาษ Whatman No.1 พร้อมกับจับเวลาในการเคลื่อนที่ของพลาสมา นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟ โดยพล็อตระหว่างค่ารากที่สองของเวลากับระยะทางที่พลาสมาเคลื่อนที่ได้ ผลการทดลองพบว่า การไหลของพลาสมาในระยะแรกๆ สอดคล้องกับ Lucas-Washburn model (31, 32) ที่ว่าระยะทางของการไหลพลาสมาจะเป็นสัดส่วนกับรากที่สองของเวลา ความไวของการเคลื่อนที่ของของไหลลดลงตามเวลาเนื่องจากพลาสมาในเลือดครบส่วนถูกแยกออกมามากในระยะแรกแล้ว เมื่อเวลาผ่านไปเหลือปริมาณลดลง และพลาสมาที่แยกได้อิมตัวอยู่ในกระดาษที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ ซึ่งพฤติกรรมของการไหลของพลาสมาที่แยกได้นี้ คล้ายกับการไหลของน้ำบน  $\mu$ PAD ที่สร้างด้วยเทคนิค ink jet printing (23) แต่ในงานวิจัยนี้มีระยะทางการไหลของสารที่สั้นกว่าเนื่องจากพลาสมามีความหนืดมากกว่าน้ำ

ผลการทดลอง ดังรูปที่ 10 พบว่าพลาสมาเคลื่อนที่บน LF1- $\mu$ PAD ได้เร็วกว่าชนิด MF1 แสดงให้เห็นว่ากระดาษแยกเลือดชนิด LF1 สามารถแยกพลาสมาได้มีประสิทธิภาพมากกว่ากระดาษแยกเลือดชนิด MF1 โดยมีค่าความชันของกราฟสำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับ LF1 และ MF1 เท่ากับ 0.990 และ 0.859 ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายได้จากความแตกต่างกันในคุณสมบัติของกระดาษ เช่น ความหนา และ blood wicking rates ตามที่รายงานโดยบริษัทผู้ผลิตกระดาษ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กระดาษแยกเลือดชนิด LF1 มาสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ เนื่องจากใช้สิ่งตัวอย่างปริมาณน้อยและสามารถแยกพลาสมาได้เร็ว

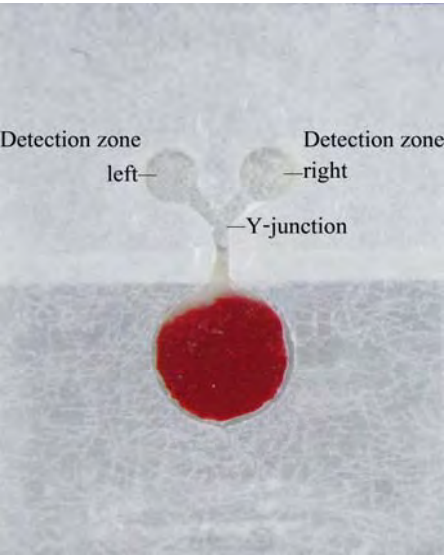
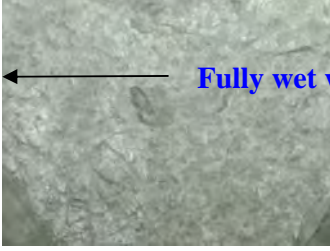
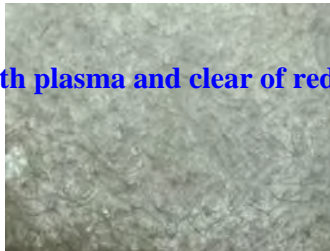
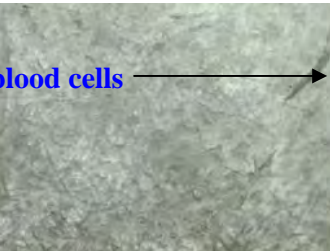
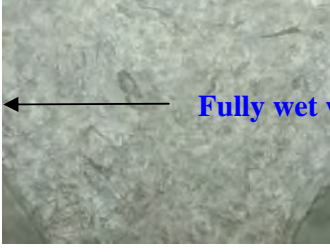
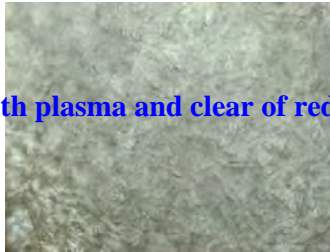
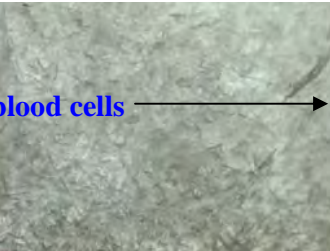
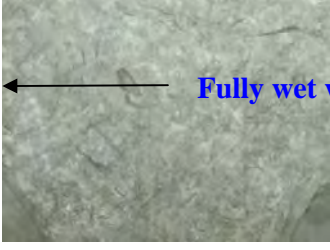
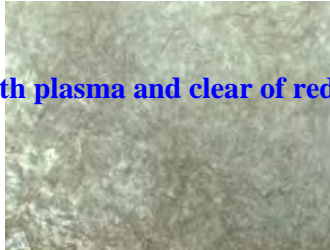
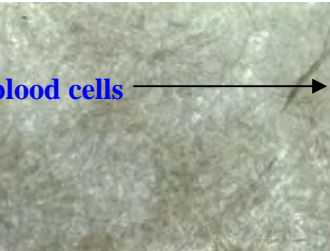
จากการทดลองที่ใช้ LF1- $\mu$ PAD (8 mm diameter) แยกเลือด และติดตามสังเกตดูเม็ดเลือดที่ไหลรั่วออกมาที่เวลา 2 นาที 5 นาที และ 10 นาที เมื่อหยดตัวอย่างเลือดปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยสังเกตที่บริเวณ Y-junction และบริเวณตรวจวัดทั้งสองด้าน พบว่าหลังจากเวลาผ่านไป 10 นาที กระดาษที่มีพลาสมาไหลผ่านแห้ง เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 40 เท่า) พบว่าพลาสมาที่แยกได้ไม่มีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงไหลออกมาเลย แสดงให้เห็นว่ามีการแยกเลือดได้อย่างสมบูรณ์ ในทางตรงข้ามกรณีมีการหยดตัวอย่างเลือดโดยใช้ปริมาตรมากเกินไป ในที่นี้ได้ทดลองใช้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร พบว่าเม็ดเลือดแดงไหลออกมาในช่องทางเดินของไหล และตรวจพบได้ที่ Y-junction โดยเซลล์เม็ดเลือดที่รั่วออกมา

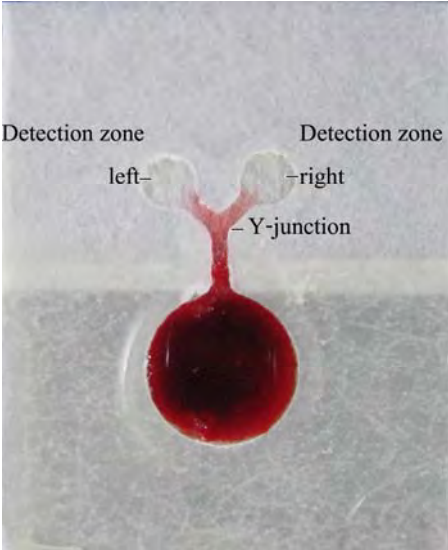
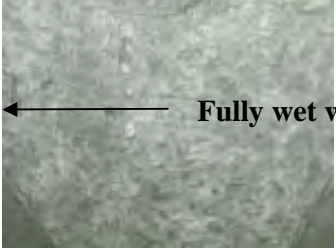
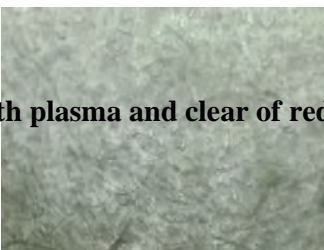
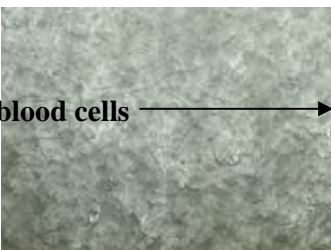

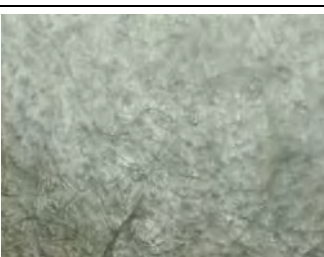
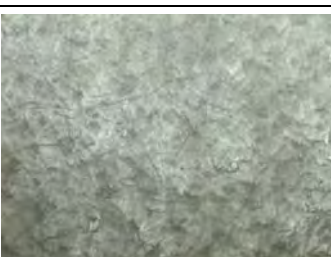



รบกวนการตรวจวัดการเกิดสีได้ (ตารางที่ 2) โดยปกติเม็ดเลือดแดงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 ไมโครเมตร ดังนั้นมันจึงถูกจับไว้บนกระดาษกรองที่สามารถดักจับอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 ไมโครเมตรได้ เปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นพบว่า การแยกพลาสมาโดยใช้แรงดันในระบบของไหลจุลภาค สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ (29) ลักษณะเดียวกัน เม็ดเลือดถูกทำลายได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างสูง และเลือดสามารถถูกอิเลคโตรไลซิสในสภาวะที่มีสนามไฟฟ้าสูง เมื่อพลาสมาถูกแยกออกมาโดยใช้การควบคุมการไหลด้วย electro-osmotic (7) เลือดที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดเชิงแสง เนื่องจากสีของเม็ดเลือดรบกวนปฏิกิริยา Yang และคณะ ได้รายงานว่ามีการใช้ตัวอย่างเลือดที่มีฮีมาโทคริตมากกว่า 30% ทำให้มีเม็ดเลือดบางส่วนรั่วออกมาตามท่อทางไหลจุลภาค (33) อย่างไรก็ตามการแยกพลาสมาด้วยแรงคาพิลลารีไม่ประสบปัญหา



รูปที่ 10. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างรากที่สองของเวลา กับระยะทางที่พลาสมาเคลื่อนที่บน  $\mu$ PAD เมื่อใช้กระดาษแยกเลือดชนิด MF1 (■); กระดาษแยกเลือดชนิด LF1 (●)

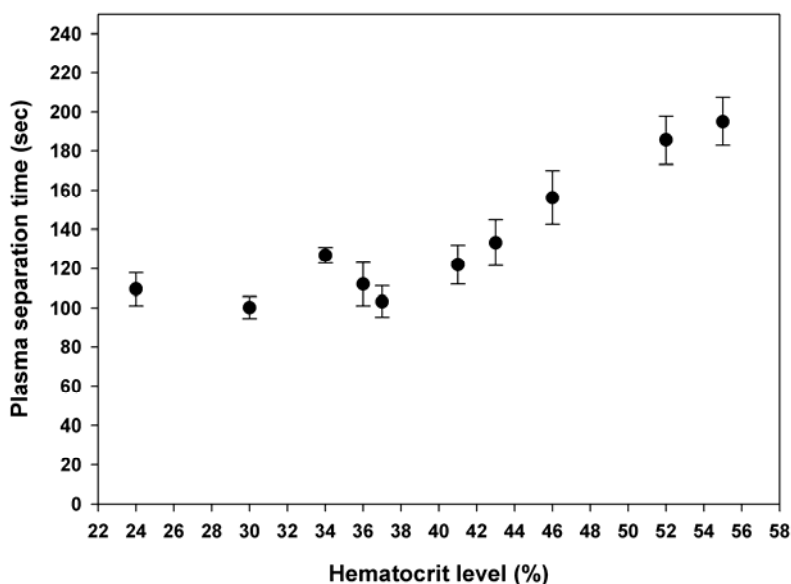
ตารางที่ 2. ภาพถ่ายโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ ณ บริเวณ Y-junction และ detection zone บน  $\mu$ PADs หลังจากมีการหยดตัวอย่างเลือดที่บริเวณ separation zone

Overview of labeled areas on $\mu$ PAD	Time after applying whole blood (min)	Y-junction	Detection zone (left)	Detection zone (right)
 <p>Detection zone left</p> <p>Detection zone right</p> <p>Y-junction</p> <p>Optimal blood volume (15 <math>\mu</math>L)</p>	2			
	5			
	10			

Overview of labeled areas on $\mu$ PAD	Time after applying whole blood (min)	Y-junction	Detection zone (left)	Detection zone (right)
 <p data-bbox="302 1089 527 1154">Excessive blood volume (30 <math>\mu</math>L)</p>	2	 <p data-bbox="1066 480 1709 513">Fully wet with plasma and clear of red blood cells</p>		
	5	 <p data-bbox="915 724 1205 756">Leaked red blood cells</p>		
	10	 <p data-bbox="903 956 1192 989">Leaked red blood cells</p>	 <p data-bbox="1446 984 1736 1016">Red blood cell leakage</p>	 <p data-bbox="1604 984 1736 1016">Red blood cell leakage</p>

## 8. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าฮีมาโทคริตกับความสามารถในการแยกเลือดบน $\mu$ PAD

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของเลือดที่มีค่าฮีมาโทคริตต่างๆ ที่  $\mu$ PAD สำหรับแยกเลือดที่พัฒนาในงานวิจัยนี้สามารถแยกได้ โดยนำเลือดที่มีค่าฮีมาโทคริต ระหว่าง 24-55% ปริมาตร 15 ไมโครลิตร มาหยดลงบน LF1- $\mu$ PAD ที่มีความกว้างของบริเวณ separation zone 8 มิลลิเมตร ผลการทดลองพบว่า  $\mu$ PAD ดังกล่าวสามารถแยกเลือดที่มีระดับฮีมาโทคริตความเข้มข้น 24-55% ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แสดงให้เห็นว่า สามารถนำ LF1- $\mu$ PAD ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือดทั้งจากคนปกติหรือจากผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของปริมาณเม็ดเลือดแดง โดยไม่ต้องมีการเจือจางเลือดก่อน สามารถใช้เลือดครบส่วนได้โดยตรง โดยใช้เวลาในการแยกเลือดประมาณ 2 นาที โดยระยะเวลาที่ใช้แยกเลือดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าฮีมาโทคริตในเลือดที่เพิ่มขึ้น (ดังรูปที่ 11)



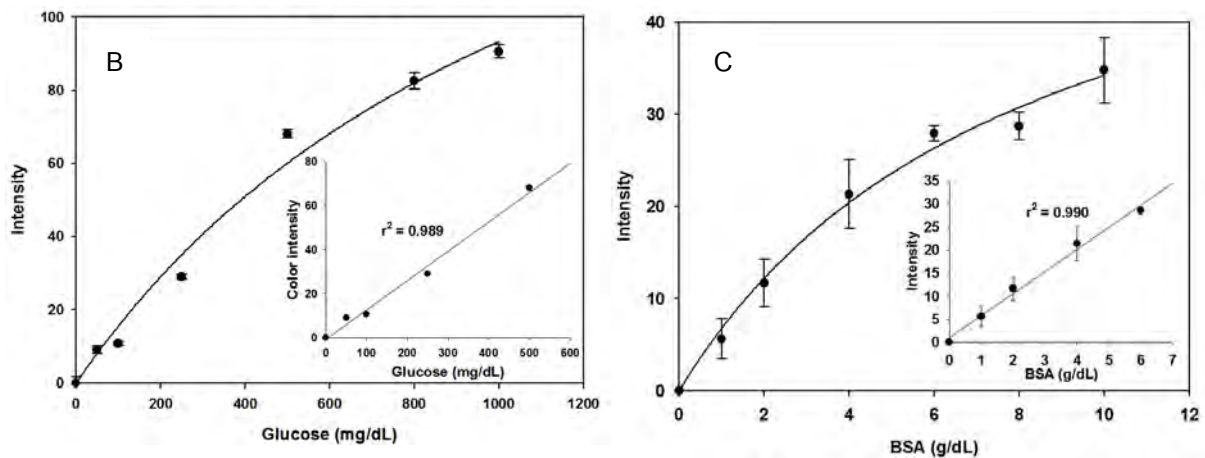
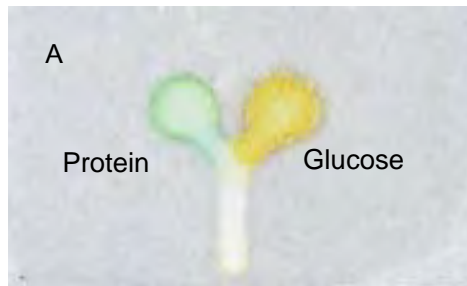
รูปที่ 11. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับฮีมาโทคริตในตัวอย่างเลือด กับระยะเวลาในการแยกเลือดบน LF1- $\mu$ PAD

## 9. การนำ $\mu$ PAD ไปใช้ในการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างทางคลินิก

### 9.1 ผลการทดสอบความใช้ได้ของ $\mu$ PAD ที่สร้างด้วยวิธีจุ่มแก้วซ์

ได้ทดลองนำ  $\mu$ PAD ที่สร้างด้วยวิธีจุ่มแก้วซ์มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสและโปรตีนในพลาสมา โดยใช้หลักการตรวจวัดทางสี (colorimetric assay) โดยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษทำจากกระดาษกรอง Whatman No.1 มีลักษณะเป็นรูปตัววาย มีท่อกว้าง 1 มิลลิเมตร และมีส่วน detection

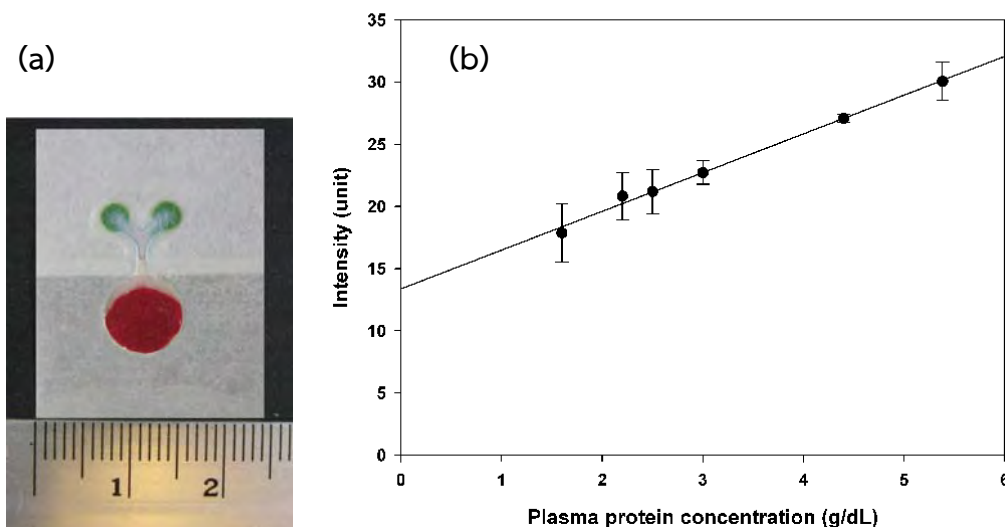
zone เป็นลักษณะวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสและโปรตีนโดยใช้ น้ำยาตรวจวัดกลูโคส (enzymatic assay: 10 mg/mL potassium iodide, 451 U/mL glucose oxidase และ 186 U/mL peroxidase) หรือโปรตีน (bromocresol green (BCG) working reagent) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หยดลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ รอให้แห้ง 10 นาที แล้วจึงจุ่มด้าน sample zone ของอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษลงในพลาสติก เมื่อพลาสติกเคลื่อนที่มาถึงบริเวณ detection zone กลูโคสหรือโปรตีนในพลาสติกจะทำปฏิกิริยากับน้ำยาบนกระดาษ เกิดการเปลี่ยนสีของ น้ำยาเป็นสีเหลืองและน้ำเงินสำหรับการตรวจวัดปริมาณกลูโคสและโปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 12A) จากนั้น บันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล แล้วนำมาวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Photoshop CS2 โดยใช้โหมด gray scale แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณกลูโคสและโปรตีน พบว่าการ ตรวจวัดปริมาณกลูโคสมีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-500 mg/dL ( $r^2 = 0.989$ ) และการตรวจวัดปริมาณ โปรตีนมีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-6 g/dL ( $r^2 = 0.990$ ) ดังแสดงในรูป 12B และ 12C ตามลำดับ



รูปที่ 12. ผลการทดสอบความใช้ได้ของ  $\mu$ PAD ที่สร้างด้วยวิธีจุ่มแก้วซ์: (A) การตรวจวัดปริมาณกลูโคสและโปรตีนบน  $\mu$ PAD ; แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณกลูโคส (B) ; กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณโปรตีน (C)

## 9.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของ $\mu$ PAD สำหรับใช้แยกเลือดครบส่วน

$\mu$ PAD สำหรับตรวจวัดสารบ่งชี้ชีวภาพจากเลือดครบส่วนในงานวิจัยนี้ ได้ออกแบบให้มีบริเวณแยกเม็ดเลือดโดยกักเก็บในกระดาษแยกเลือด และพลาสมาสามารถไหลไปตามท่อที่มีคุณสมบัติชอบน้ำบนกระดาษไปยังบริเวณ detection zone และตรวจวัดโปรตีนอัลบูมินในเลือด โดยใช้หลักการ BCG method โดยสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษโดยใช้กระดาษแยกเลือดชนิด LF1 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ใช้แยกเลือด 8 มิลลิเมตร และกระดาษกรอง Whatman No.1 ซึ่งมีส่วน detection zone ที่มีลักษณะเป็นรูปวงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ทำการหยดเลือดลงบนกระดาษแยกเลือด พลาสมาจะถูกแยกออกมาในส่วน detection zone และทำปฏิกิริยากับน้ำยา BCG เกิดการเปลี่ยนสีของน้ำยาเป็นสีน้ำเงินเข้ม รูปที่ 13a แสดงกราฟมาตรฐานจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเลือดโดยใช้เลือดที่ทราบค่าโปรตีน พบว่ากราฟมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 1.6-5.3 g/dL ( $r^2 = 0.993$ ) (รูปที่ 13b) จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเลือด จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยวิธีการตรวจวัดบนกระดาษ ทำการตรวจวัดซ้ำตัวอย่างละ 4 ครั้ง นำผลการตรวจวัดที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการการแพทย์ ดังตารางที่ 3 โดยใช้สถิติ Pair t-test ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% พบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้แยกเลือดและตรวจวัดปริมาณโปรตีนได้ในขั้นตอนเดียว โดยไม่ต้องทำการปั่นแยกเม็ดเลือดออกจากพลาสมา ก่อนนำมาตรวจวัด



รูปที่ 13. ผลการทดลองการแยกพลาสมาจากเลือดครบส่วนด้วย  $\mu$ PAD ที่พัฒนาขึ้น (a) ภาพปฏิกิริยาการตรวจวัดโปรตีนในเลือดบน  $\mu$ PAD (b) แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเลือดบน  $\mu$ PAD

ตารางที่ 3. แสดงผลการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในพลาสมาที่แยกบน  $\mu$ PAD จากเลือดครบส่วน เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการการแพทย์

Samples (n = 4)	$\mu$ PAD (g/dL)	Conventional method (g/dL)
sample 1	$4.55 \pm 0.47$	$4.55 \pm 0.13$
sample 2	$4.25 \pm 0.28$	$4.13 \pm 0.06$
sample 3	$3.82 \pm 0.37$	$3.67 \pm 0.09$
sample 4	$3.00 \pm 0.35$	$3.27 \pm 0.09$
sample 5	$4.24 \pm 0.16$	$4.06 \pm 0.06$

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยวิธีการจุ่มแก้วซ์เป็นวิธีใหม่ ที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ยุ่งยาก ใช้เพียงอุปกรณ์พื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่นเตาความร้อน (hot plate) หรือสามารถนำอุปกรณ์ให้ความร้อนลักษณะอื่นมาประยุกต์ใช้ร่วมด้วย แต่จำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการสร้าง  $\mu$ PADs เนื่องจากอุณหภูมิขณะจุ่มแก้วซ์มีผลต่อความคมชัดของ  $\mu$ PADs ที่ผลิตได้ สารที่ทำหน้าที่สร้างขอบเขตบริเวณไม่ชอบน้ำบนกระดาษ ใช้สารที่หาได้ง่าย มีราคาถูก คือแก้วซ์เพียงอย่างเดียว ไม่ได้มีการใช้สารเคมี หรือตัวทำละลายอื่นๆ เพิ่มเติม ทำให้เทคนิคนี้สามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมได้ ขั้นตอนการสร้าง  $\mu$ PAD ด้วยเทคนิคที่นำเสนอ ทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้ความเชี่ยวชาญพิเศษ มีเพียงขั้นตอนการจุ่มแม่แบบที่ประกบกับกระดาษและยึดกับแม่เหล็กถาวรลงในแก้วซ์ที่หลอมเหลว ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดใช้เวลาน้อยกว่า 1 นาที และในอนาคตสามารถออกแบบให้มีอุปกรณ์เสริมในขั้นตอนการจุ่มแก้วซ์เพื่อให้สามารถทำได้ครั้งละหลายๆ ชิ้น จะเป็นเพิ่ม throughput การผลิต  $\mu$ PAD ด้วยวิธีนี้มากขึ้น นอกจากนี้  $\mu$ PAD ที่ผลิตได้แต่ละชิ้น มีความคมชัดที่มี reproducibility ที่ดี ความกว้างของท่อของ  $\mu$ PAD แต่ละชิ้นมีความเบี่ยงเบนต่ำ (น้อยกว่า 1.5%) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกรีนแก้วซ์ มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง (ประมาณ 11%)

ด้วยหลักการจุ่มแก้วซ์ ที่ต้องใช้การหลอมแก้วซ์ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยความร้อน หลักการนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่น การเปลี่ยนองค์ประกอบของแก้วซ์ให้มีหลายชนิด เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของเนื้อแก้วซ์ใน  $\mu$ PAD ที่ผลิตได้ เช่น เพิ่มความสามารถในการทนอุณหภูมิที่สูงขึ้น เป็นต้น หรือสามารถใส่สีเพื่อเพิ่มความสวยงาม หรือให้มีความแตกต่างกันใน  $\mu$ PAD แต่ละชนิดได้ เพื่อง่ายต่อการนำไปใช้งาน เป็นต้น และเทคนิคการจุ่มแก้วซ์ สามารถประยุกต์ใช้กับกระดาษหลายชนิดที่เชื่อมต่อกันได้ง่าย โดยไม่จำเป็นต้องใช้การทากาวเชื่อม ทำให้สามารถประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายยิ่งขึ้น โดยในงานวิจัยนี้พบว่ากระดาษแยกเลือดชนิด LF1 เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ เนื่องจากกระดาษไม่หนาจนเกินไป ใช้ปริมาณเลือดน้อย และสามารถแยกพลาสมาได้เร็ว โดยพบว่าสามารถแยกเลือดได้สมบูรณ์โดยใช้เวลาเพียง 2 นาทีเท่านั้น และสามารถใช้ตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นต่างๆ (hematocrit 24-55%) โดยไม่จำเป็นต้องทำการเจือจางสิ่งตัวอย่างก่อนนำมาตรวจวัด วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถลดขั้นตอนและระยะเวลาการตรวจวัดลงได้อย่างมาก นอกจากนี้ยังเหมาะสำหรับนำไปใช้ตรวจวัดในรูปแบบ point-of-care testing อีกด้วย

## เอกสารอ้างอิง

1. Crowley TA, Pizziconi V. Isolation of plasma from whole blood using planar microfilters for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip*. 2005;5(9):922-9.
2. Zhao W, Ali MM, Aguirre SD, Brook MA, Li Y. Paper-Based Bioassays Using Gold Nanoparticle Colorimetric Probes. *Analytical Chemistry*. 2008;80(22):8431-7.
3. Fang Q, Sun M, Huang YZ. Capillary-based microfluidic analysis systems. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 2009 Jan;393(1):63-6.
4. Zhang Q, Xu JJ, Chen HY. Patterning microbeads inside poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels and its application for immobilized microfluidic enzyme reactors. *Electrophoresis*. 2006 Dec;27(24):4943-51.
5. Sia SK, Whitesides GM. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*. 2003 Nov;24(21):3563-76.
6. Zhao DS, Roy B, McCormick MT, Kuhr WG, Brazill SA. Rapid fabrication of a poly(dimethylsiloxane) microfluidic capillary gel electrophoresis system utilizing high precision machining. *Lab on a Chip*. 2003 May;3(2):93-9.
7. Jiang H, Weng X, Chan HC, Wu X, Li D. A microfluidic chip for blood plasma separation using electro-osmotic flow control. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2011;21:85019-26.
8. Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007;46(8):1318-20.
9. Leung W, Chan P, Bosgoed F, Lehmann K, Renneberg I, Lehmann M, et al. One-step quantitative cortisol dipstick with proportional reading. *Journal of Immunological Methods*. 2003;281(1-2):109-18.
10. Kolosova AY, Sibanda L, Dumoulin F, Lewis J, Duveiller E, Van Peteghem C, et al. Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges. *Analytica Chimica Acta*. 2008;616(2):235-44.

11. Bogdanovic J, Koets M, Sander I, Wouters I, Meijster T, Heederik D, et al. Rapid detection of fungal [alpha]-amylase in the work environment with a lateral flow immunoassay. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;118(5):1157-63.
12. Gáspár A, Bácsi I. Forced flow paper chromatography: A simple tool for separations in short time. *Microchemical Journal*. 2009;92(1):83-6.
13. Abdulrazzaq YM, Ibrahim A. Determination of amino acids by ion-exchange chromatography on filter paper spotted blood samples stored at different temperatures and for different periods: comparison with capillary and venous blood. *Clinical Biochemistry*. 2001;34(5):399-406.
14. Kunkel HG, Tiselius A. Electrophoresis of proteins on filter paper. *The Journal of General Physiology*. 1951;35(1):89-118.
15. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*. 2009;82(1):3-10.
16. Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Sindi H, Whitesides GM. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. *Analytical Chemistry*. 2008;80(10):3699-707.
17. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*. 2009;81(14):5821-6.
18. Nie Z, Nijhuis CA, Gong J, Chen X, Kumachev A, Martinez AW, et al. Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*. 2010;10(4):477-83.
19. Ellerbee AK, Phillips ST, Siegel AC, Mirica KA, Martinez AW, Striehl P, et al. Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. *Analytical Chemistry*. 2009;81(20):8447-52.
20. Carrilho E, Phillips ST, Vella SJ, Martinez AW, Whitesides GM. Paper microzone plates. *Analytical Chemistry*. 2009 Aug 1;81(15):5990-8.
21. Bruzewicz DA, Reches M, Whitesides GM. Low-Cost Printing of Poly(dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. *Analytical Chemistry*. 2008;80(9):3387-92.

22. Li X, Tian J, Nguyen T, Shen W. Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma Treatment. *Analytical Chemistry*. 2008;80(23):9131-4.
23. Li X, Tian J, Garnier G, Shen W. Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;76(2):564-70.
24. Abe K, Suzuki K, Citterio D. Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper. *Analytical Chemistry*. 2008;80(18):6928-34.
25. Lu Y, Shi W, Jiang L, Qin J, Lin B. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*. 2009;30(9):1497-500.
26. Lu Y, Shi W, Qin J, Lin B. Fabrication and Characterization of Paper-Based Microfluidics Prepared in Nitrocellulose Membrane By Wax Printing. *Analytical Chemistry*. 2009;82(1):329-35.
27. Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM. Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*. 2009;81(16):7091-5.
28. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst*. 2011;136(1):77-82.
29. VanDelinder V, Groisman A. Separation of Plasma from Whole Human Blood in a Continuous Cross-Flow in a Molded Microfluidic Device. *Analytical Chemistry*. 2006;78(11):3765-71.
30. Yang X, Forouzan O, Brown TP, Shevkoplyas SS. Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. *Lab on a Chip*. 2012;12(2):274-80.
31. Hodgson KT, Berg JC. The effect of surfactants on wicking flow in fiber networks. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1988;121(1):22-31.
32. Fu E, Ramsey S, Kauffman P, Lutz B, Yager P. Transport in two-dimensional paper networks. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2011;10(1):29-35.
33. Yang S, Undar A, Zahn JD. A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation. *Lab on a Chip*. 2006;6(7):871-80.

## Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

### 1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS, Laiwattanapaisal W. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. Lab Chip. 2012 Jul 10. DOI: 10.1039/C2LC21299D IF 2011 = 5.670
2. Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. Talanta. 2011 Oct 15;85(5):2587-93. IF 2011 =3.794

### 2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เจริญสาธารณะ โดยได้มีการสร้างความร่วมมือการวิจัยกับหลายๆ สถาบัน ทั้งในและต่างประเทศ ได้แก่
  - คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
  - คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
  - Department of Chemical Biological Engineering, Colorado State University
- เจริญวิชาการ
  - เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ โดยเป็นงานวิจัยที่ทำร่วมกับนักศึกษาโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.)

### 3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Temsiri Songjaroen, Pukin Poolsawas, Irin Hongwarittorn, Wijitar Dungchai, Orawon Chailapakul, Wanida Laiwattanapaisal. Fabrication of paper based microfluidics device by wax dipping. **Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2012)**, January 11-13, 2012, Chiang Mai, Thailand

## ภาคผนวก



# Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping

Temsiri Songjaroen<sup>a</sup>, Wijitar Dungchai<sup>b</sup>, Orawon Chailapakul<sup>c,d</sup>, Wanida Laiwattanapaisal<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi, 91 Prachautid Road, Thungkru, Bangkok 10140, Thailand

<sup>c</sup> Electrochemical Research Group, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

<sup>d</sup> National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

<sup>e</sup> Department of Clinical Chemistry, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 2 July 2011

Received in revised form 9 August 2011

Accepted 10 August 2011

Available online 17 August 2011

### Keywords:

Lab-on-paper

Paper-based microfluidic devices

Wax dipping method

Glucose

Serum protein

BCG method

## ABSTRACT

Paper-based microfluidic devices are an alternative technology for fabricating simple, low-cost, portable and disposable platforms for clinical diagnosis. Hereby, a novel wax dipping method for fabricating paper-based microfluidic devices ( $\mu$ PADs) is reported. The iron mould for wax dipping was created by a laser cutting technique. The designed pattern was transferred onto paper by dipping an assembly mould into melted wax. The optimal melting temperature and dipping time were investigated. The optimal melting temperature was in the range of 120–130 °C, and the optimal dipping time was 1 s. The whole fabrication process could be finished within 1 min without the use of complicated instruments or organic solvents. The smallest hydrophilic channel that could be created by the wax dipping method was  $639 \pm 7 \mu\text{m}$  in size. The reproducibility of the  $\mu$ PAD fabrication for hydrophilic channel width of the test zone and sample zone was 1.48% and 6.30%, respectively. To verify the performance of the  $\mu$ PAD, multiple colorimetric assays for simultaneous detection of glucose and protein in real samples were performed. An enzymatic assay and the bromocresol green (BCG) method were conducted on the paper device to determine the presence of glucose and protein in a test solution. The results of the assays were not significantly different from those of the conventional methods ( $p > 0.05$ , pair *t*-test and one-way ANOVA method). The wax dipping provides a new alternative method for fabricating lab-on-paper devices for multiple clinical diagnostics and will be very beneficial for developing countries.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Lab-on-a-chip (LOC) devices have been developed to minimise the scale of laboratory tests. These LOC devices only need a small volume of the reagents and samples, therefore providing portable and disposable diagnostic devices [1,2]. However, the fabrication processes of LOC devices are quite complicated, as demonstrated by the need for mechanical components, such as pumps or valves, to control the flow of the solution within the microfluidic device.

Currently, paper tests or strip tests are widely used in clinical laboratories for diagnosing various diseases. The strip tests are utilised in several areas of healthcare, such as screening tests, self-monitoring by patients, treatment monitoring or preventive medicine. Recently, Whitesides's group has developed microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs) [3], also known as a lab-on-paper technology. The concept of a  $\mu$ PAD is to perform an experiment on a small piece of paper. Unlike the conventional strip

test, the lab-on-paper devices can be configured for multiple tests or detection of several analytes simultaneously on one device [4]. Furthermore, quantitative measurement using a  $\mu$ PAD is feasible based on a variety of detection methods. Colorimetric assays on paper [5,6] are widely used to quantify the colour intensity of the test zone because it is easy to actualise and only requires simple equipment such as a digital camera, cell phone or scanner [4,7]. Moreover, a  $\mu$ PAD is able to perform several types of measurements, including electrochemical [8–11], transmittance [12], fluorescence and absorbance measurements [12,13]. According to WHO guidance, lab-on-paper devices are very promising for use as diagnostic tools in developing countries [4].

Currently, lab-on-paper devices have become an attractive technology for a number of research groups, resulting in the development of numerous methods for their fabrication. Various methods for fabrication of the  $\mu$ PAD have been proposed in the literature, including the following: photolithography [3,14], polydimethylsiloxane (PDMS) plotting [15], inkjet printing [16,17], cutting [18], plasma etching [19], wax printing [20–22] and wax screen-printing [23]. Photolithography was the first reported fabrication method, which involved the use of hydrophobic

\* Corresponding author. Tel.: +66 02 218 1081x307; fax: +66 02 218 1082.

E-mail address: [wanida.k@chula.ac.th](mailto:wanida.k@chula.ac.th) (W. Laiwattanapaisal).

SU-8 photoresist and UV light to construct the hydrophobic and hydrophilic barriers on the paper [3]. This method can create a small barrier (200  $\mu\text{m}$  width) and yield sharp resolution between the hydrophilic and the hydrophobic channels. However, the photolithography technique requires several organic solvents, which can damage the flexibility of the paper. In addition, photolithography requires expensive instrumentation and the fabrication process involves many complicated steps. The PDMS plotting method uses a desktop plotter and a hydrophobic polymer, namely PDMS, to create hydrophilic patterns on paper [15]. Although PDMS plotting does not destroy the flexibility of the paper, this method requires special preparation of PDMS diluted in hexanes [15]. The inkjet printing method involves removing a hydrophobic coating from the paper by using a modified inkjet printer to print a solvent onto paper that has been coated with a hydrophobic polymer. The solvent melts the hydrophobic polymer, resulting in the formation of hydrophilic areas on the paper [16,17]. This method can create direct patterning on paper, which is a benefit for high mass production. Plasma etching is a method to remove a hydrophobic coating on paper by using plasma treatment [19]. However, the hydrophilic areas generated by both the inkjet printing and plasma etching methods are still exposed to solvents and polymers during the fabrication processes. In cutting method, a knife plotter is used to cut paper into designed microfluidic channels [18]. Nevertheless, the paper devices have to use tape to help support the paper structures, limiting the ability to produce variety of free-standing hydrophilic patterns [4]. Wax printing has several advantages such as fast and easy to produce, use commercially available printer and hotplate, and preserve native paper chemistry [20,22]. However, it is difficult to produce the exact designed patterns with high resolution due to the spread of the wax. Careful determination of wax spreading must be considered before production of the channels [4,22].

Common obstacles to fabricating lab-on-paper devices for most developing countries are the cost of the instruments used in the fabrication process, such as a spin coater, UV lithography system, and plasma cleaner. Although wax screen-printing, which requires only a hot plate for patterning wax onto paper, is economical and therefore promising for developing countries, it suffers from poor reproducibility [23]. Hence, a simple, rapid and cheap fabrication technique that also provides good resolution and repeatability needs to be developed.

This paper proposes a novel method for the fabrication of paper-based microfluidic devices by wax dipping. Wax is a material generally used worldwide because it is inexpensive and non-toxic. The wax dipping procedure requires only a hot plate for patterning hydrophobic and hydrophilic areas on Whatman No.1 paper. The fabrication of the  $\mu\text{PAD}$  is simple and only involves a single step. Moreover, the wax dipping method can create patterns on paper without using any chemical compounds, so that the hydrophilic area is not exposed to any solvents or polymers. To demonstrate its applicability to real world situations, we also employ the paper device for colorimetric assays for simultaneous detection of glucose and protein in real human samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials and chemicals

Whatman No.1 filter paper was purchased from Whatman International, Ltd. (Maidstone, England). White Beeswax pellets were purchased from a stationary shop in Bangkok, Thailand. Glass slides were obtained from Sail Brand (Jiangsu, China). Iron moulds (1 mm thick) were made-to-order by a laser cutting shop in Bangkok. Permanent magnets were purchased from a local area shop. Other equipment that was purchased included a Canon digital camera (7.1

megapixels, Powershot A570 IS), an IKA<sup>®</sup> hotplate (C-MAG HS7, Wilmington, USA), and an Olympus Microscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan).

D-(+)-Glucose, glucose oxidase (from *Aspergillus niger*-Type II), peroxidase (Type I from horseradish), potassium iodide, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), Brij<sup>™</sup> 35 and bovine serum albumin were purchased from Sigma–Aldrich. Sodium hydroxide and succinic acid were purchased from Merck. Bromocresol green was supplied by BDH Chemicals. Glucose reagent (GLUCOSE liquicolor) and human control serum (Humatrol N and Humatrol P) were obtained from HUMAN (Wiesbaden, Germany). Accu–Chek for blood glucose monitoring was obtained from Roche Diagnostics. All chemicals were prepared in MilliQ water.

### 2.2. Wax dipping fabrication method

To create a mould for wax dipping, a local laser cutting shop cut an iron bar into the desired shape and size using a laser cutting technique. The price for cutting an iron mould was about \$0.35 US per piece. An iron mould can be repeatedly used to produce numerous pieces of  $\mu\text{PAD}$ . In particular, based on our experience so far, more than 1000 pieces of  $\mu\text{PAD}$  have been fabricated from the same iron mould without affecting the resolution. For the wax dipping method, white Beeswax pellets were put in a beaker and heated until they melted using a hotplate. To ensure that the temperature was kept in the range of 120–130 °C, the temperature was monitored throughout the experiment by means of an electronic contact thermometer (IKA<sup>®</sup> ETS-D5). Whatman No.1 paper was cut into a 1.5 cm  $\times$  2.5 cm piece and placed onto a glass slide. Then, the iron mould was put onto the paper, and it was temporarily attached by means of magnetic force using a permanent magnet placed on the backside of the glass slide. Next, the assembly was dipped into a chamber of melted wax for 1 s. After the paper was cooled to room temperature, it was peeled off of the glass slide, and the iron mould was removed from the paper. The wax-dipping fabrication process for the  $\mu\text{PAD}$  is shown in Fig. 1. Then, the hydrophobic and hydrophilic areas of the  $\mu\text{PAD}$  were observed under a microscope (Fig. 2).

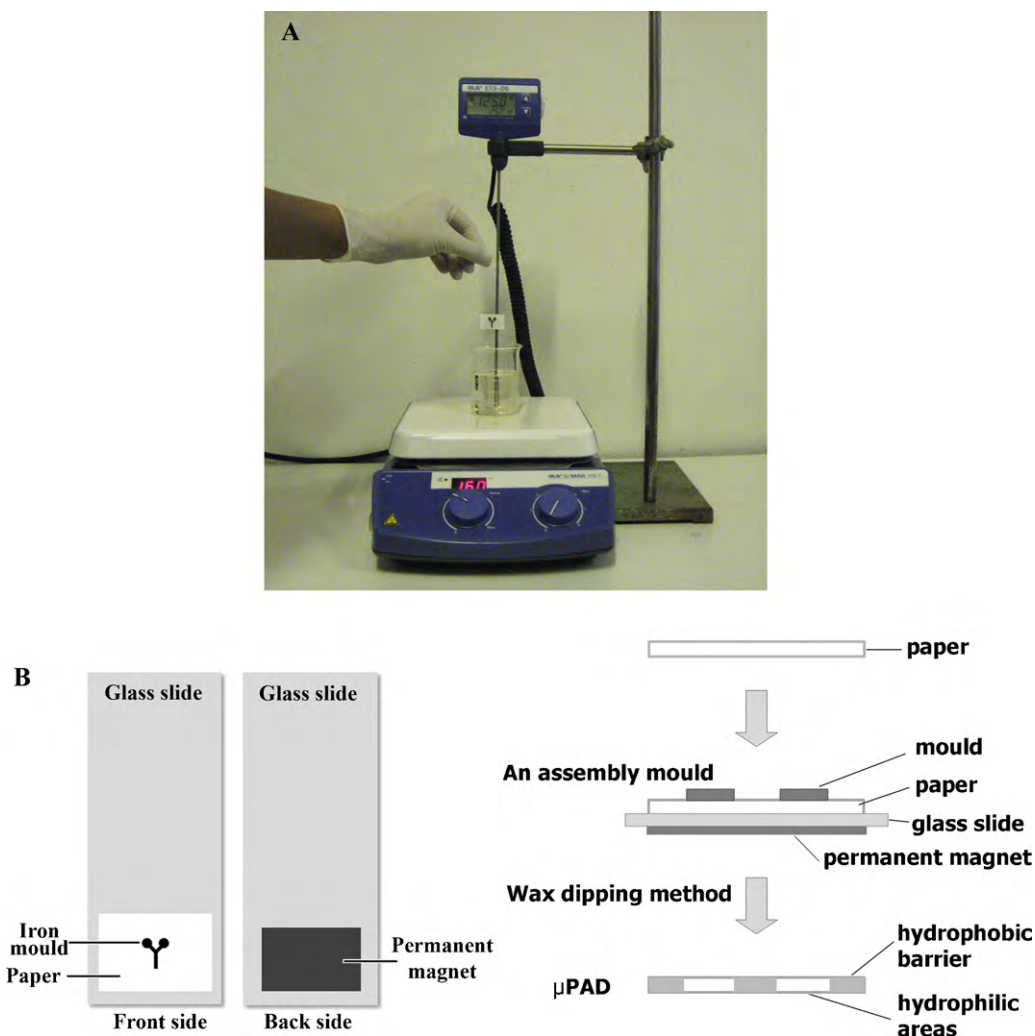
### 2.3. Applicability of the $\mu\text{PAD}$ for clinical analysis

To evaluate the colorimetric assays on the  $\mu\text{PAD}$ , the paper device was designed to be a Y shape, which was composed of two test zones (circular shape, 3 mm width) for the simultaneous detection of glucose and protein. For the glucose assay, the reagent ratio was adopted from Self-Stik reagent strips (Chungdo Pharm. Co., LTD, Korea). A volume of 0.5  $\mu\text{L}$  of a 10 mg mL<sup>-1</sup> potassium iodide solution was spotted onto the paper test zone and allowed to dry for 5 min. Then, a 5  $\mu\text{L}$  mixture of 451 U mL<sup>-1</sup> glucose oxidase and 186 U mL<sup>-1</sup> peroxidase was dropped on the same test zone. For protein detection, 0.5  $\mu\text{L}$  of 10 $\times$  bromocresol green (BCG) working reagent [24] was dropped on the other test zone. Then, the paper was allowed to dry at room temperature. To detect glucose and protein, the bottom side of the paper devices was dipped in sample solutions until colour developed at both test zones and could be observed by the naked eye. The colour of the test zones on the  $\mu\text{PADs}$  were captured by a digital camera, and then, the colour intensities were analysed using Adobe Photoshop CS2.

## 3. Results and discussions

### 3.1. $\mu\text{PAD}$ made with the wax dipping method

The wax dipping method uses melted wax to coat a hydrophobic barrier onto paper while the hydrophilic channel is protected by an



**Fig. 1.** Fabrication process of the  $\mu$ PAD using the wax dipping method: (A) simple wax dipping set-up system and (B) procedure for patterning paper by wax dipping in top view (left) and lateral view (right).

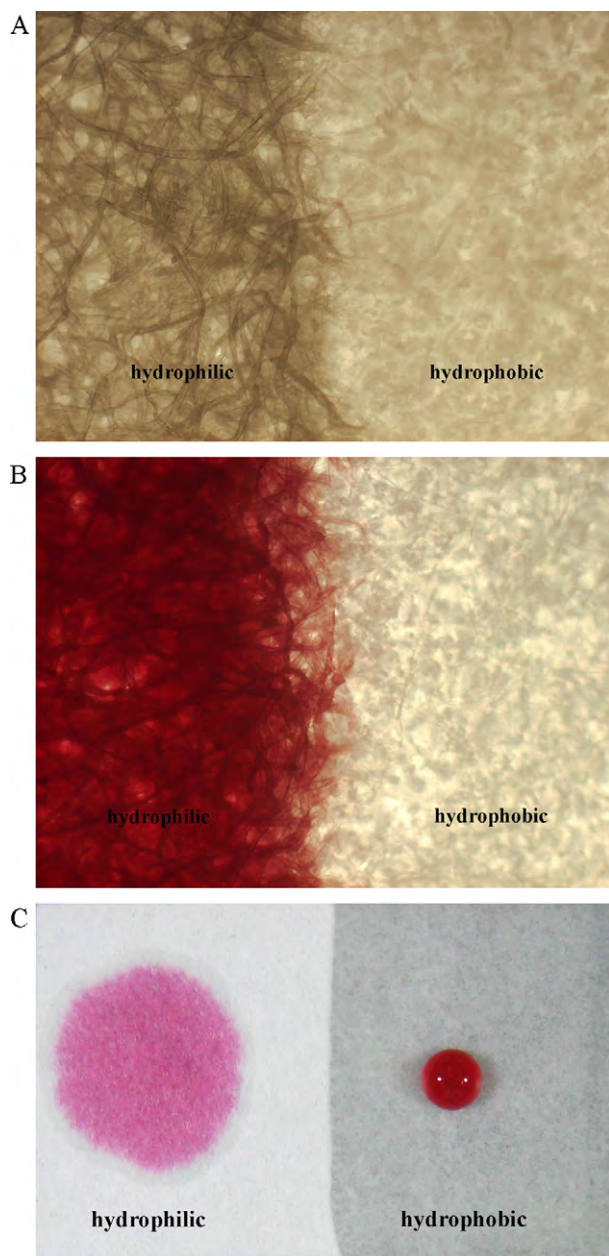
iron mould. When the paper was dipped into the melted wax, the melted wax penetrated into the membrane of the paper whereas the area obscured by the mould did not absorb the melted wax. Therefore, patterns of hydrophobic and hydrophilic areas were generated on paper. The fabricated pattern on the paper was observed by a microscope (Olympus BX50), as shown in Fig. 2A and B. It was clearly observed that the surface of the paper was changed as a result of the wax coating (Fig. 2A). The left side of the paper is the native surface, whereas the right side was coated with wax and completely turned into a hydrophobic surface. Fig. 2B indicates that coloured food dye could not percolate into the hydrophobic area because of the wax coating. The patterned paper fabricated by wax dipping could retain fluid within the hydrophilic channel; therefore, this area could be used for the reaction of a reagent and sample. Fig. 2C shows the hydrophobic property of our  $\mu$ PAD compared to the hydrophilic zone. The droplet of coloured food dye was apparently observed. It was not readily absorbed into the paper due to the hydrophobic surface of the paper.

### 3.2. Optimisation melting temperature and dipping time

The melting temperature and dipping time influenced the penetration of the melted wax into the paper and also affected the resolution between the hydrophobic and the hydrophilic areas. The optimal melting temperature and dipping time were investigated.

The results demonstrated that dipping the paper into the melted wax when the temperature was lower than 120 °C for 1 s did not result in good resolution, in that the hydrophobic and hydrophilic areas were not completely separated. On the other hand, using a melting temperature above 130 °C resulted in excessive wax spreading into the paper. For the optimal dipping time experiment, the paper was dipped into the melted wax for varying amounts of time, from 1 to 20 s. It was determined that the optimal time for dipping the paper in the melted wax was only 1 s (just dipped and immediately lifted out). Dipping times longer than 1 s could not generate the patterns on the paper because of excessive spreading of the wax into the paper. In addition, using a high temperature (>130 °C) and long dipping time (>5 s) can boil the paper, causing it to separate from the glass slide. Therefore, the optimal melting temperature for wax dipping was 120–130 °C, and the optimal dipping time was 1 s (see supplementary data Table S-1). However, the temperature used for wax dipping in all subsequent experiments was at 125 °C.

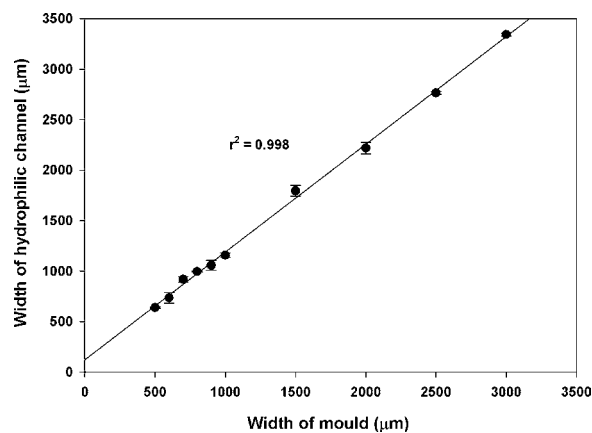
Our wax dipping process is simpler and quicker in comparison to other wax printing methods because it only requires a dipping step, while wax printing needs both printing and heating steps. This wax dipping method takes less than 1 min to complete the whole process, whereas photolithography methods require at least 15 min [13] and wax printing methods use 5–10 min for prototyping the paper [20]. With consecutive dipping, the throughput of this



**Fig. 2.** Pictures of paper fabricated by wax dipping method: (A) hydrophobic and hydrophilic area captured under a microscope (40 $\times$  magnification), (B) the hydrophilic zone soaked with food dye colour and (C) comparison of hydrophilic and hydrophobic area of the paper after applying a drop of coloured food dye.

method can be up to 90 pieces per hour. Moreover, wax printing methods require rather expensive printers and heating equipment, whereas this wax dipping method uses only a common hot plate or similar heating device.

Besides being a simple and rapid process for the fabrication of the  $\mu$ PAD, the proposed wax dipping protocol is also inexpensive and environmentally friendly. Every developing country can set up the wax dipping method for fabrication of  $\mu$ PADs. Beeswax is inexpensive and can be obtained worldwide, and the system set-up requires only a common hot plate, iron mould and permanent magnet. The total cost for a piece of  $\mu$ PAD fabrication by wax dipping is inexpensive at less than \$0.05 US per piece. Some materials are reusable, such as the iron moulds, permanent magnets, and glass slides. From our point of view, the wax dipping method is a novel alternative technique to produce a simple and low-cost



**Fig. 3.** Comparison of the width of the mould and the resulting hydrophilic channel on paper with the linear equation  $W_C = 1.067 W_M + 121.78$  ( $r^2 = 0.998$ ).

lab-on-paper device, which is valuable for point-of-care testing, especially in developing countries.

### 3.3. Width of hydrophilic channel

The actual width of the hydrophilic channel after the fabrication process is dependent on the width of the iron mould. To study the relationship between the widths of the hydrophilic channel and the widths of the initial mould, various sizes of moulds (500–3000  $\mu\text{m}$ ) were used to fabricate paper devices at the optimal melting temperature and dipping time. Unless otherwise stated, the dipping temperature was controlled at 125  $^\circ\text{C}$  and the dipping time was 1 s. The fabricated paper devices were imaged by a digital camera, and the dimensions of the channels were measured using ImageJ. Fig. 3 shows the width of the hydrophilic channel versus the width of the mould. The results show that the narrowest hydrophilic channel that the wax dipping method can generate using a 500  $\mu\text{m}$  width mould was at  $639 \pm 7 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ ). Compared to other methods, the smallest hydrophilic channel that our proposed method can generate is on a similar size scale as the wax printing and wax screen-printing methods, in which the channels can be fabricated at  $561 \pm 45 \mu\text{m}$  [22] and  $650 \pm 71 \mu\text{m}$  [23], respectively. Even though the wax dipping method did not effectively produce hydrophilic channels as small as photolithography can ( $186 \pm 13 \mu\text{m}$ ) [14], the width obtained by wax dipping is acceptable to use in the paper-based microfluidic field. Furthermore, the relative standard deviation of the smallest hydrophilic channel using our proposed method ( $\sim 1\%$ ) was found to be lower than other methods ( $\sim 10\%$ ) [23]. According to the graph shown in Fig. 3, the resulting width of the hydrophilic channel can be calculated by using the linear equation  $W_C = 1.067 W_M + 121.78$  ( $r^2 = 0.998$ ), where  $W_C$  is the width of the hydrophilic channel and  $W_M$  is the width of the mould.

### 3.4. Reproducibility of $\mu$ PAD fabrication

Reproducibility is the variation arising when an experiment is repeated under the same conditions. To evaluate the reproducibility of the fabrication of the hydrophilic channels, 20 pieces of paper ( $n = 20$ ) and a Y-shape mould composed of a 4 mm test zone and a 1 mm sample zone, were dipped in melted wax under the optimal conditions. Pictures of the paper devices were captured and used to measure the widths of the hydrophilic channel by using ImageJ. The relative standard deviation (RSD) of the widths of the obtained hydrophilic channels was calculated from the width measurements. Fig. 4 displays the reproducibility of the wax dipping fabrication for each piece of paper. The average width of

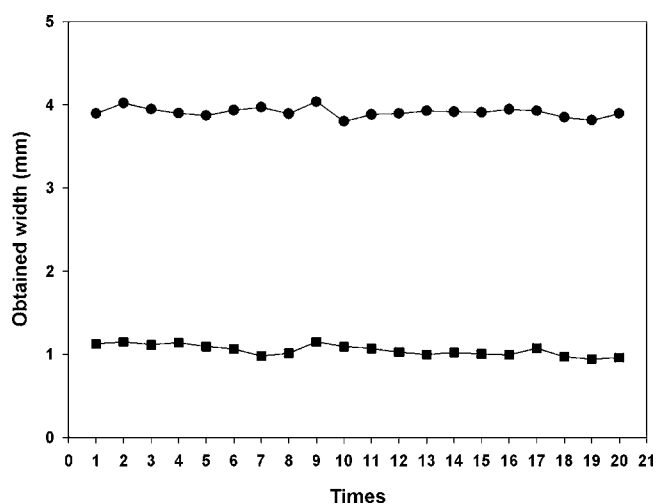


Fig. 4. Repeatability of the width of the hydrophilic channel in (■) the sample zone and (●) the test zone on the same device.

the hydrophilic test zone and sample zone were  $3.91 \pm 0.06$  and  $1.04 \pm 0.07$  mm, respectively. The RSDs for the width of the test zone and sample zone were 1.53 and 6.73%, respectively, which indicates our wax dipping method has good reproducibility. The proposed wax dipping method is more reproducible than the wax screen-printing method, which has a RSD around 11% [23]. The wax screen-printing method suffers from poor reproducibility because it is difficult to control the force applied to the solid wax to push it through the mesh screen. However, in our case, to fabricate the desired  $\mu$ PAD, the melting temperature and dipping time must be perfectly controlled in the optimal range throughout the process, as both factors affect the penetration of the wax into the paper.

### 3.5. Applications

The proposed  $\mu$ PADs fabricated by wax dipping were investigated for their applicability for the detection of glucose and protein in real samples based on colorimetric assays. Detail of the size and shape of an iron mould used in the experiments display in Fig. 5A. A 5  $\mu$ L volume of 10 $\times$  BCG working reagent or glucose reagent was spotted onto the separate detection zones of the  $\mu$ PAD device. After the reagents were allowed to dry for 10 min at room temperature, the bottom end of the  $\mu$ PAD device was dipped for 1 min into either a standard solution of glucose of varying concentration (0–1000 mg dL<sup>-1</sup>), a standard solution of BSA of varying concentration (0–10 g dL<sup>-1</sup>) or a sample solution.

Then, the colour intensity was allowed to develop from colourless to a strong blue or yellow for the protein and glucose reactions, respectively. Images of the colorimetric reaction of protein and glucose are shown in Fig. 5B. To measure the colour intensity, Adobe Photoshop CS2 was used to convert the images from RGB into grey scale format before analysis. A calibration curve was plotted for glucose or protein concentration versus colour intensity. The calibration curves are shown in Fig. 6A and B. The linear range for the glucose assay was 0–500 mg dL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.989$ ) and 0–6 g dL<sup>-1</sup> for the protein assay ( $r^2 = 0.990$ ). The range of glucose concentrations that is linear for the assay in our proposed method is broader than for the conventional method based on the glucose oxidase spectrophotometric method, in which the linear range of GLUCOSE liquicolor is only up to 400 mg dL<sup>-1</sup>. Similarly, the assay range for protein detection in our method is also better than the conventional BCG method, which is only linear up to 5 g dL<sup>-1</sup>. Both results demonstrate that the wax dipping method for  $\mu$ PAD fabrication can be potentially applied for detection of glucose and protein

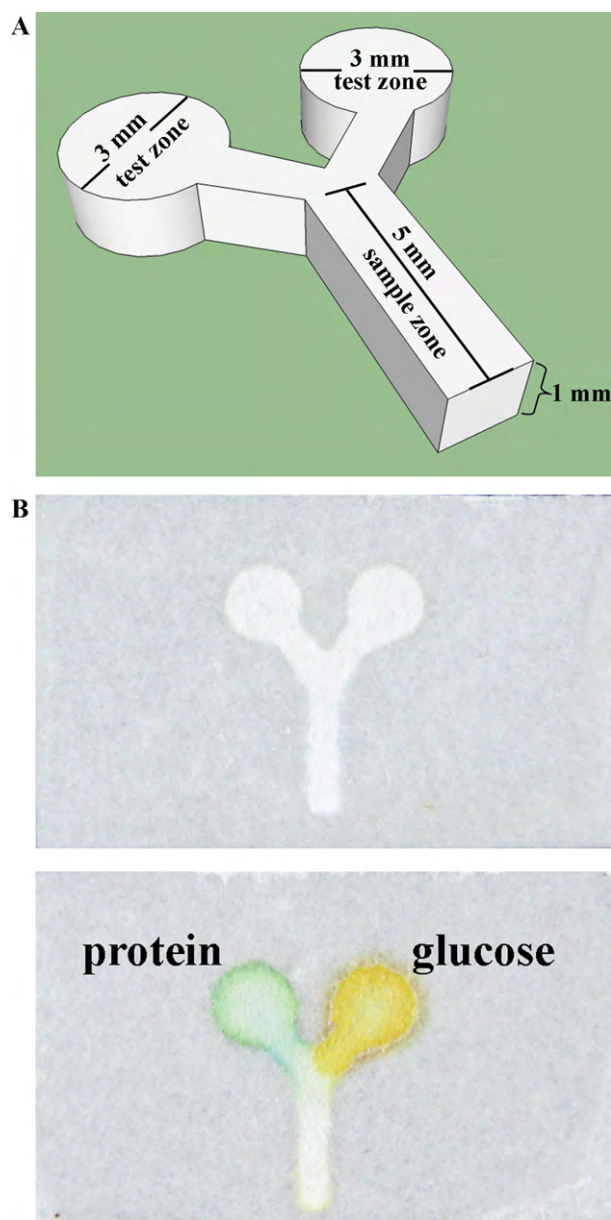


Fig. 5. Paper based microfluidic device fabricated by the wax dipping method used for colorimetric applications: (A) detail of the size and shape of an iron mould and (B) paper device after fabrication by the wax dipping method (top) and after use for the detection of protein and glucose (bottom).

simultaneously at levels that are clinically significant. Subsequently, the  $\mu$ PAD was utilised for quantitative detection of glucose and protein in real samples, and the results were compared to the conventional methods. Two samples of control serum with different levels of protein and glucose were tested by the wax dipped  $\mu$ PAD and conventional methods. The comparison of the results demonstrated that both methods were rather similar. When analysed by a paired *t*-test, no significant difference was found between the two methods at a 95% confidence interval. In addition, the  $\mu$ PAD was also used to measure the glucose level from real plasma samples, and the results were compared with both conventional enzymatic glucose oxidase and Accu-Check point-of-care-testing methods. The analysis of the results using one-way ANOVA demonstrated that the concentration of glucose in the plasma as determined by the three methods was not significantly different ( $p > 0.05$ ) (Table 1). It can therefore be concluded that

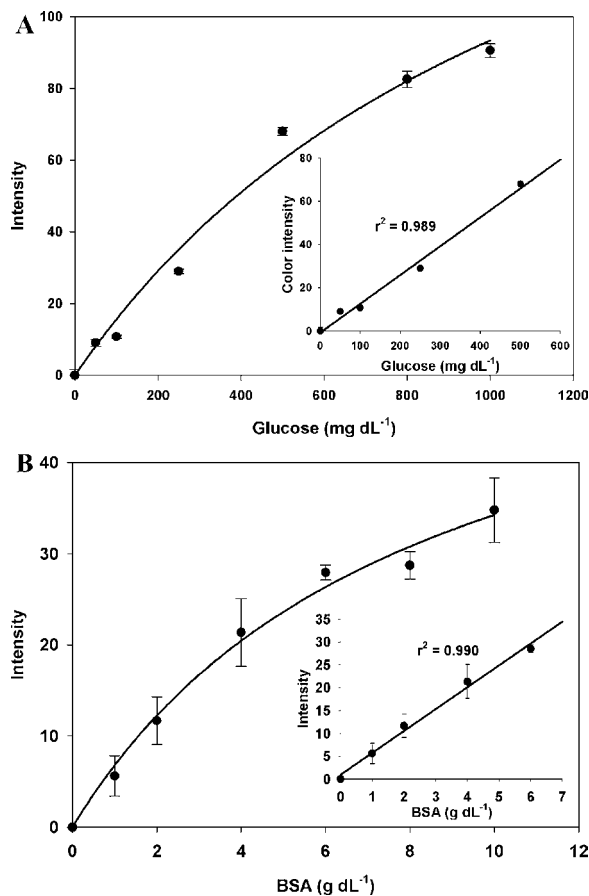
**Table 1**  
Determination of glucose and protein in real samples.

Control serum sample (n=3)	Glucose (mg/dL)			Protein (g/dL)		p-Value
	Wax dipping $\mu$ PAD	Conventional method (glucose oxidase)	Accu-Check	Wax dipping $\mu$ PAD	Conventional BCG method	
Control N	94.4 $\pm$ 7.9	94.7 $\pm$ 1.5	nd	4.08 $\pm$ 0.51	4.10 $\pm$ 0.08	0.956 <sup>a</sup>
Control P	229.7 $\pm$ 5.1	223.3 $\pm$ 11.9	nd	5.31 $\pm$ 0.35	5.81 $\pm$ 0.18	0.209 <sup>a</sup>
Fasting blood glucose	89.7 $\pm$ 3.7	93.6 $\pm$ 0.6	86.5 $\pm$ 0.7	nd	nd	0.132 <sup>b</sup>
1 h postprandial	136.2 $\pm$ 5.8	138.0 $\pm$ 4.6	137.0 $\pm$ 1.4	nd	nd	0.919 <sup>b</sup>

nd = not determined.

<sup>a</sup> Results of paired *t*-test.

<sup>b</sup> Results of one-way ANOVA, *p* < 0.05 significance level.



**Fig. 6.** The  $\mu$ PAD for colorimetric assay (A) standard curve of glucose ( $r^2 = 0.989$ ) and (B) standard curve of protein ( $r^2 = 0.990$ ) by using grey scale mode of Adobe Photoshop program.

the  $\mu$ PAD fabricated by the wax dipping method can be used for quantitative assays in the human samples.

#### 4. Conclusions

The wax dipping method is a simple, rapid, and inexpensive method for fabrication of  $\mu$ PADs. Other advantages of this pioneering method are that there is no requirement for complicated and expensive instruments or organic solvents. Therefore, this technique provides an alternative and inexpensive platform for fabrication of clinical diagnostic devices in developing countries. A single dipping step can create microfluidic channels on paper within 1 min. Good resolution of the hydrophilic channel of the  $\mu$ PAD was obtained (%CV  $\sim$ 2–7%). Additionally, the width of the hydrophilic channel was highly correlated with the width of the

designed mould, so the exact size of the  $\mu$ PAD can be predicted from the initial mould used. The crucial parameters to determine the resolution of the  $\mu$ PAD were the melting temperature of the wax and the dipping time. The smallest hydrophilic channel that can be fabricated using this proposed method measures about  $639 \pm 7 \mu\text{m}$  in width, which is sufficient for fabrication of the microfluidic paper based assay. Multiple colorimetric assays can be simultaneously performed on the  $\mu$ PAD, and the results revealed the ability to analyse glucose and protein in real samples. The wax dipping procedure preserves the native paper surface, therefore this technique does not face the problem of interference from residues remaining in the hydrophilic channel.

#### Acknowledgments

T.S. gratefully acknowledges the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0095/2552). W.L. thanks the financial supports from the Thailand Research Fund, the Commission on Higher Education (MRG5380170) and the Centre for Excellence in Omics-Nano Medical Technology Project Development from Chulalongkorn University.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.talanta.2011.08.024.

#### References

- [1] C. Chin, V. Linder, S. Sia, Lab Chip 7 (2007) 41–57.
- [2] C. Ahn, J. Choi, G. Beaucage, J. Nevin, J. Lee, A. Puntambekar, J. Lee, Proc. IEEE 92 (2005) 154–173.
- [3] A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Angew. Chem., Int. Ed. 46 (2007) 1318–1320.
- [4] A.W. Martinez, S.T. Phillips, G.M. Whitesides, E. Carrilho, Anal. Chem. 82 (2009) 3–10.
- [5] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, Anal. Chim. Acta 674 (2010) 227–233.
- [6] W. Zhao, M.M. Ali, S.D. Aguirre, M.A. Brook, Y. Li, Anal. Chem. 80 (2008) 8431–8437.
- [7] A.W. Martinez, S.T. Phillips, E. Carrilho, S.W. Thomas, H. Sindi, G.M. Whitesides, Anal. Chem. 80 (2008) 3699–3707.
- [8] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, Anal. Chem. 81 (2009) 5821–5826.
- [9] Z. Nie, C.A. Nijhuis, J. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A.W. Martinez, M. Narovlyansky, G.M. Whitesides, Lab Chip 10 (2010) 477–483.
- [10] R.F. Carvalhal, M.S. Kfoury, M.H.O. De Piazzetta, A.L. Gobbi, L.T. Kubota, Anal. Chem. 82 (2010) 1162–1165.
- [11] A. Apilux, W. Dungchai, W. Siangproh, N. Praphairaksit, C.S. Henry, O. Chailapakul, Anal. Chem. 82 (2010) 1727–1732.
- [12] A.K. Ellerbee, S.T. Phillips, A.C. Siegel, K.A. Mirica, A.W. Martinez, P. Striehl, N. Jain, M. Prentiss, G.M. Whitesides, Anal. Chem. 81 (2009) 8447–8452.
- [13] E. Carrilho, S.T. Phillips, S.J. Vella, A.W. Martinez, G.M. Whitesides, Anal. Chem. 81 (2009) 5990–5998.
- [14] A.W. Martinez, S.T. Phillips, B.J. Wiley, M. Gupta, G.M. Whitesides, Lab Chip 8 (2008) 2146–2150.
- [15] D.A. Bruzewicz, M. Reches, G.M. Whitesides, Anal. Chem. 80 (2008) 3387–3392.
- [16] K. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, Anal. Chem. 80 (2008) 6928–6934.

- [17] X. Li, J. Tian, G. Garnier, W. Shen, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 76 (2010) 564–570.
- [18] E.M. Fenton, M.R. Mascarenas, G.P. López, S.S. Sibbett, *ACS Appl. Mater. Interf.* 1 (2008) 124–129.
- [19] X. Li, J. Tian, T. Nguyen, W. Shen, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9131–9134.
- [20] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, B. Lin, *Electrophoresis* 30 (2009) 1497–1500.
- [21] Y. Lu, W. Shi, J. Qin, B. Lin, *Anal. Chem.* 82 (2009) 329–335.
- [22] E. Carrilho, A.W. Martinez, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7091–7095.
- [23] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, *Analyst* 136 (2011) 77–82.
- [24] E.D. Wakefield, P.A. Friedman, *US Patent* 3,873,272 (1975).

Cite this: DOI: 10.1039/c2lc21299d

www.rsc.org/loc

PAPER

## Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices†

Temsiri Songjaroen,<sup>a</sup> Wijitar Dungchai,<sup>b</sup> Orawon Chailapakul,<sup>cd</sup> Charles S. Henry<sup>e</sup> and Wanida Laiwattanapaisal<sup>\*f</sup>

Received 29th December 2011, Accepted 22nd May 2012

DOI: 10.1039/c2lc21299d

A microfluidic paper-based analytical device ( $\mu$ PAD) for the separation of blood plasma from whole blood is described. The device can separate plasma from whole blood and quantify plasma proteins in a single step. The  $\mu$ PAD was fabricated using the wax dipping method, and the final device was composed of a blood separation membrane combined with patterned Whatman No.1 paper. Blood separation membranes, LF1, MF1, VF1 and VF2 were tested for blood separation on the  $\mu$ PAD. The LF1 membrane was found to be the most suitable for blood separations when fabricating the  $\mu$ PAD by wax dipping. For blood separation, the blood cells (both red and white) were trapped on blood separation membrane allowing pure plasma to flow to the detection zone by capillary force. The LF1- $\mu$ PAD was shown to be functional with human whole blood of 24–55% hematocrit without dilution, and effectively separated blood cells from plasma within 2 min when blood volumes of between 15–22  $\mu$ L were added to the device. Microscopy was used to confirm that the device isolated plasma with high purity with no blood cells or cell hemolysis in the detection zone. The efficiency of blood separation on the  $\mu$ PAD was studied by plasma protein detection using the bromocresol green (BCG) colorimetric assay. The results revealed that protein detection on the  $\mu$ PAD was not significantly different from the conventional method ( $p > 0.05$ , pair  $t$ -test). The colorimetric measurement reproducibility on the  $\mu$ PAD was 2.62% ( $n = 10$ ) and 5.84% ( $n = 30$ ) for within-day and between day precision, respectively. Our proposed blood separation on  $\mu$ PAD has the potential for reducing turnaround time, sample volume, sample preparation and detection processes for clinical diagnosis and point-of care testing.

### Introduction

Blood tests are widely used in clinical diagnosis, however, detection of analytes in whole blood is difficult due to the chemical complexity of the matrix. Indeed, most biological samples require steps to remove cells because cells often interfere

with the analytical measurements.<sup>1</sup> As a result, biochemical tests are typically carried out in serum or plasma,<sup>2</sup> necessitating a separation method such as centrifugation or sedimentation. The separation process is typically time-consuming, requiring large blood volumes (mL).<sup>3</sup> Moreover, the conventional clinical diagnostic laboratory requires expensive automated equipment and skilled workers, adding to the overall analysis cost.<sup>1,4</sup> For work at the patient bedside or in remote locations, it is important to design and develop miniaturized diagnostic devices that are capable of all aspects of a clinical assay, including reducing the blood preparation processing and turnaround time.

Microfluidic technology has great potential for use in miniaturized blood analysis devices due to its speed, low volumes, and the ability to reduce cost and turnaround time for point-of-care diagnosis.<sup>1</sup> Numerous techniques have been utilized for blood separation in microfluidic systems including electro-osmotic flow,<sup>3</sup> bifurcation (Zweifach-Fung effect),<sup>5,6</sup> geometric obstructions,<sup>7,8</sup> acoustic standing wave forces,<sup>9</sup> porous filters,<sup>10</sup> membrane filtration<sup>11</sup> and cross-flow filtration.<sup>1,2,12,13</sup> However, a major disadvantage of these devices is the need for an external force such as syringe pump or high voltage power supply to control fluid flow in the microchannels. In addition, the microfluidic chip fabrication is complicated and frequently requires integration of valves and pumps for operation.<sup>3</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok, 10330, Thailand

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi, 91 Prachautid Road, Thungkru, Bangkok, 10140, Thailand

<sup>c</sup>Electrochemistry and Optical Spectroscopy Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok, 10330, Thailand

<sup>d</sup>National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok, 10330, Thailand

<sup>e</sup>Department of Chemistry, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523-1872. E-mail: chuck.henry@colostate.edu; Fax: +1-970-491-1801; Tel: +1-970-491-2852

<sup>f</sup>Department of Clinical Chemistry, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok, 10330, Thailand. E-mail: wanida.k@chula.ac.th; Fax: +66 02 218 1082; Tel: +66 02 218 1081 ext 307

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2lc21299d/

Microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs) made from patterned paper have been utilized for point-of-care diagnosis. Paper plays an important role as a supporting medium for lateral flow immunoassay or dipstick tests,<sup>14–16</sup> chromatography<sup>17,18</sup> and electrophoresis.<sup>19</sup> Furthermore, paper is a common material for colorimetric spot-tests because of its high contrast for most of these assays.<sup>4,20</sup> Recently,  $\mu$ PADs have been used for multiple colorimetric analysis of plasma samples on a small paper device<sup>21</sup> and plasma separation from whole blood.<sup>22</sup> In the first assay, plasma was not separated from whole blood but instead added directly to the  $\mu$ PAD. In the second example, agglutination was used to coagulate the blood cells. As a result, plasma can penetrate through paper by capillary force and thus, can be used without external pumping. While this method was novel and effective, it did require addition of agglutination antibodies that increase the overall cost of the sample preparation method. Our method does not require addition of antibodies to aggregate RBCs.

In this paper, a novel blood separation method based on  $\mu$ PADs has been proposed. The device consisted of two types of paper, blood filter paper and patterned Whatman No.1 filter paper, and was fabricated by wax dipping. Plasma collection from human whole blood and a colorimetric assay for albumin proteins can be performed simultaneously in a single step on the  $\mu$ PAD. In addition, the device does not require external pumping forces to perform the system. Blood separation on the  $\mu$ PAD reduces the sample preparation steps and turnaround time for clinical diagnosis from hours to minutes.<sup>23</sup> The proposed  $\mu$ PAD is simple, rapid, low-cost, portable, disposable, and single step diagnostic platform for real world sample. It is valuable for point-of-care testing, especially in developing countries that lack expensive medical equipment.

## Materials and methods

### 1. Materials and chemicals

Whatman No.1 filter paper and blood separation paper including LF1, MF1, VF1 and VF2 were purchased from Whatman International Ltd. (Maidstone, England). Iron molds were made-to-order by a laser cutting shop in Bangkok. White Beeswax pellets and a magnetic bar were purchased from a local shop in Bangkok, Thailand. The glass slide was supplied from Sail Brand (Jiangsu, China). Hotplate (C-MAG HS 7) was a product of IKA® (Wilmington, USA). The digital camera (7.1 megapixels, Powershot A570 IS) used in these experiments was a product of Canon (California, USA). The microscope (Olympus BX50) was a product of Olympus (Tokyo, Japan). Bovine serum albumin, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) and Brij<sup>TM</sup> 35 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bromocresol green (ACS grade) was obtained from BDH chemicals (Poole, England). Sodium hydroxide and succinic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Human control serum samples (Humatrol N and Humatrol P) were product from HUMAN (Wiesbaden, Germany). All chemicals were prepared in milliQ water.

All 23 blood samples from healthy volunteers were collected in anticoagulant tubes following accepted protocols for working with human subjects. Six samples were collected in heparinized anticoagulant tubes for protein detection experiments, whereas

the others were kept in K<sub>3</sub>EDTA anticoagulant tubes. For each experiment, each blood sample was subject to 4 replicate measurements.

The experiments were approved by The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (COA No.079/2011). The blood was stored at 4 °C and used within 1 week of collection. To measure hematocrit level, each whole blood sample was filled in a capillary tube and sealed with clay before being centrifuged for 5 min at 10 500 rpm using a hematocrit centrifuge (Hawksley, England). The packed cell volume was measured by hematocrit reader (Micro Capillary Reader Cat No. 2201, International Equipment Co, Neckham Heights, MA) and the hematocrit value was recorded as the percentage of the volume of red blood cells in a blood sample.

### 2. $\mu$ PAD fabrication by wax dipping method

The previously reported wax dipping method was utilized for patterning  $\mu$ PADs.<sup>24</sup> Briefly, white bees wax was melted on a hotplate and the temperature was controlled at 125 °C throughout the experiment. Whatman No.1 paper was cut into 1.5 × 2.5 cm and blood separation paper (LF1, MF1, VF1 and VF2) was cut into 1.7 × 2.5 cm in size. For the  $\mu$ PAD fabrication process shown in Fig. 1, Whatman No.1 paper and blood separation paper were overlapped approximately 1 mm on a glass slide. The iron mold which defined the blood separation and test zones was attached to the paper using a permanent magnet on the back of the glass slide. The assembly was then dipped into the melted wax for 1 s. When the wax was cooled to room temperature, the paper was peeled off the glass slide and separated from the iron mold.

### 3. Applicability of the $\mu$ PAD for plasma separation

To evaluate the plasma separation simultaneously with a colorimetric assay, protein determination based on BCG method was performed. First, 0.5  $\mu$ L of 10 × BCG working reagent was dropped on both test zones of the  $\mu$ PAD. Then, the spots were allowed to dry at room temperature for 10 min. After that, whole blood was dropped on the separation paper and the plasma flowed to the test zones. The color was developed after the binding of protein to BCG in the detection zone. Next, images of the detection zones were captured using a digital camera and the color intensity was analyzed using Adobe Photoshop CS2.

## Results and discussion

### 1. $\mu$ PAD fabricated by wax dipping

In this paper, a blood separation membrane was combined with traditional filter paper for the first time to isolate plasma from whole blood in a  $\mu$ PAD. Using the wax dipping method, the  $\mu$ PAD for whole blood separation approach was very simple to fabricate. Different types of blood separation membranes including MF1, LF1, VF1 and VF2 were investigated for the utilization in the  $\mu$ PAD by the wax dipping method. MF1, LF1 and VF2 are polyvinyl alcohol-bound glass fiber filters and VF1 is a binder-free glass fiber filter. These filter membranes are suitable for use with whole blood or serum samples to remove particles greater than 2–3  $\mu$ m including red cells and platelets.

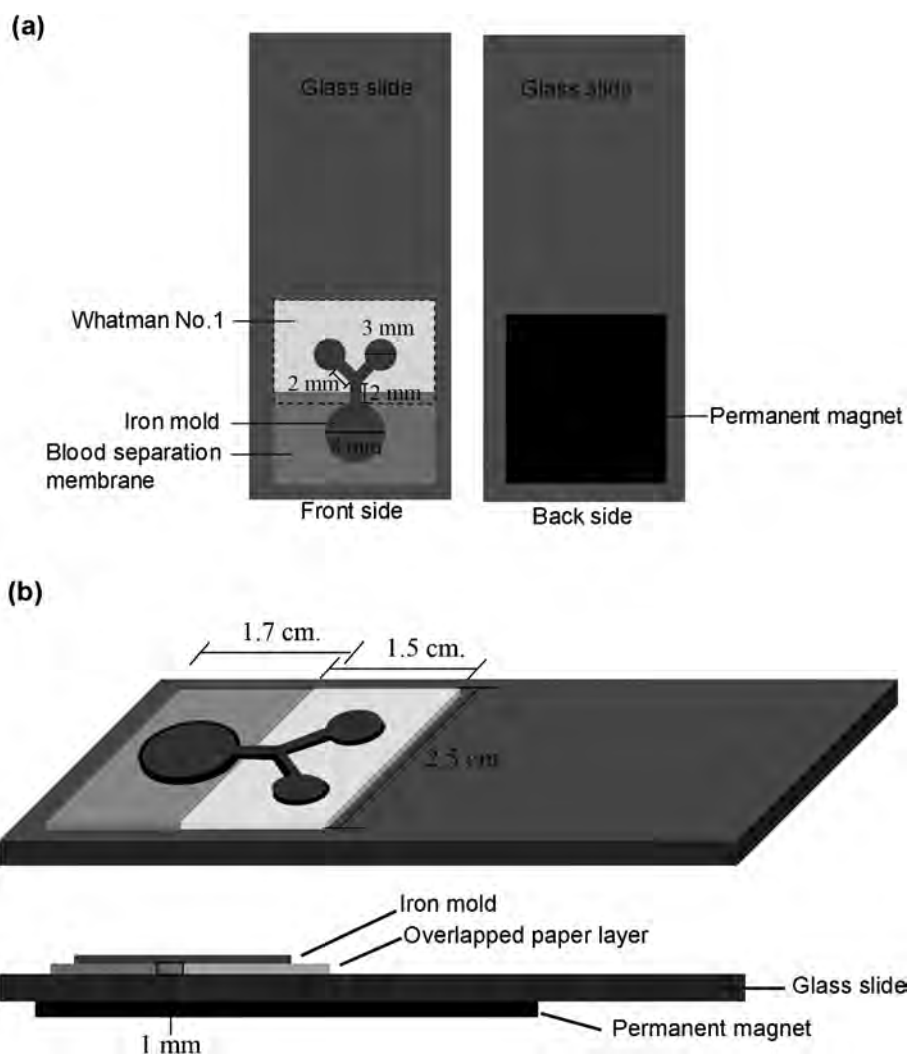


Fig. 1 The assembly of the  $\mu$ PAD for plasma separation from whole blood using wax dipping method (a) top view (b) side view.

Based on using 1-mm width channel of an iron mold, the  $\mu$ PAD pattern could be created from MF1 and LF1 membranes. However, the  $\mu$ PAD pattern was not developed when using VF1 or VF2 membranes because of their thickness. The 632  $\mu$ m and 785  $\mu$ m thickness of VF1 and VF2, respectively results in a large step between the iron mold and the Whatman No.1 paper. Therefore the wax could penetrate into the membranes beneath the iron mold.

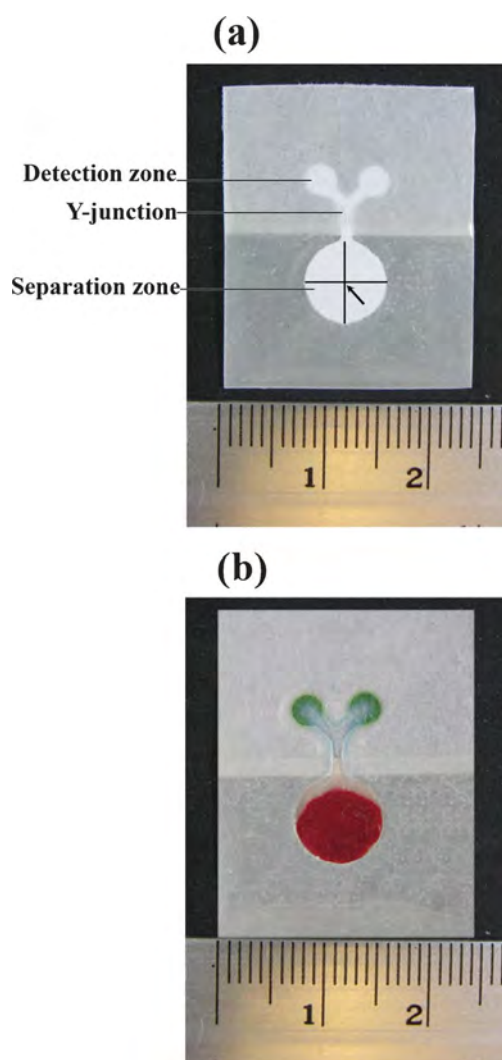
The completed  $\mu$ PAD ready for whole blood separation is shown in Fig. 2a. The device is small, easily used and robust due to the wax adhesion of the overlapping area on the paper. The device is also unique relative to existing blood separation devices made from paper because the assembly is achieved in a single step using the wax dipping method and blood separation is achieved by combining two separate types of paper. In other blood separation devices, blood separation has been achieved either by agglutination<sup>22,25–27</sup> or centrifugal forces.<sup>28</sup> The use of a two-layer device made completely from paper provides a low cost alternative relative to the other methods reported previously as it does not require additional chemicals or antibodies.

The  $\mu$ PADs were kept in a dry place in the presence of silica gel to avoid moisture. In each experiment, the  $\mu$ PADs were

fabricated before use. The bottom part of  $\mu$ PAD is the blood separation membrane that is utilized for receiving the whole blood sample and trapping the blood cells. The top part of the  $\mu$ PAD is made from the Whatman No.1 membrane. The plasma isolated from the whole blood sample moves along the channel and passes into the detection zones *via* the Y-junction (see supplementary data). As shown in Fig. 2b, the device can separate plasma from whole blood followed by colorimetric detection of protein in a single step. Compared to other LOC methods that have been proposed for plasma separation from whole blood sample such as photolithography<sup>1,2</sup> and soft lithography<sup>3,6</sup> methods, the wax dipping method is simpler, quicker, cheaper, and greener.

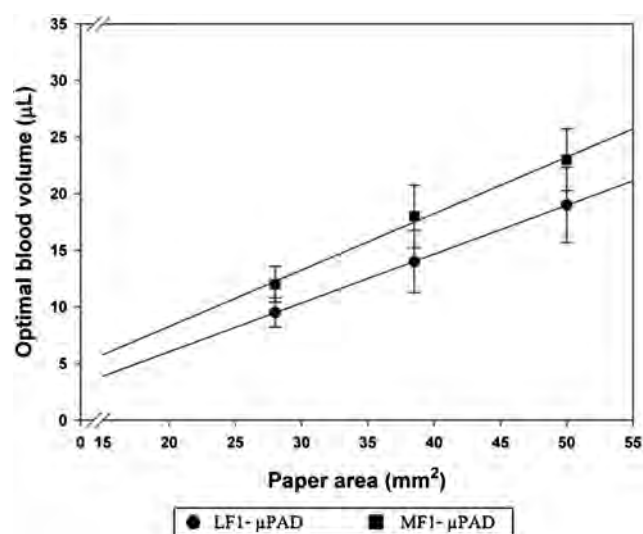
## 2. Paper area and blood volume

With the same paper area, different types of paper can use different sample volumes. For high blood sample volume, blood cells will overflow from separation zone to the detection zone, resulting in contamination of the plasma. On the other hand, applying too little sample may lead to inadequate plasma yield in the detection zone. In order to obtain sufficient pure plasma, the



**Fig. 2** a) The  $\mu$ PAD for whole blood separation composed of separation zone and detection zone, the arrow indicates the position for blood application. (b)  $\mu$ PAD applied with whole blood concurrence with plasma separation and determination of human serum protein.

correlation of paper area of the blood separation membrane and blood sample volume were studied. To optimize sample volume, the MF1- $\mu$ PAD and LF1- $\mu$ PAD were fabricated with separation areas of 19, 28, 38 and 50 mm<sup>2</sup> (lower circle diameter of 5, 6, 7 and 8 mm). All fabricated  $\mu$ PADs had the same detection zone area as shown in Fig. 2. To investigate the optimal blood volume to apply to each  $\mu$ PAD, different size blood samples were dropped onto the separation zone to see if the separated plasma fully wetted the detection zones. The results shown in Fig. 3 demonstrate that both types of blood separation membranes can be used for plasma isolation. As expected, the results demonstrate that when a larger paper area is used, more blood was needed to obtain the sufficient plasma volume. By plotting the blood volume as a function of paper area, linear equations were obtained with values of  $y = 0.4989x - 1.70$  and  $y = 0.431x - 2.60$  for MF1- and LF1- $\mu$ PAD, respectively. This relationship could help to identify the exact whole blood volume needed to apply to the specified blood separation area. However, in practicality, to construct the whole blood- $\mu$ PAD by wax dipping,



**Fig. 3** The correlation between the paper area of blood separation membrane and blood volume.

the paper area of the separation membrane was limited to not less than 28 mm<sup>2</sup>. The lowest blood volume that could be used for LF1- $\mu$ PAD and MF1- $\mu$ PAD were 8 and 10  $\mu$ L, respectively, based on using 28 mm<sup>2</sup> paper areas. Using a blood volume over the upper end of the optimal range caused the plasma in the detection zone to be contaminated with blood cells because blood cells will overflow from the separation zone to the detection zone. Between the MF1 and LF1- $\mu$ PAD, that latter consumed less blood volume, therefore, LF1- $\mu$ PADs were used for subsequent measurements. From the results shown in Fig. 3, the standard deviation represents the range of optimal blood volume that can be applied for the  $\mu$ PAD. For 28 mm<sup>2</sup>, 38 mm<sup>2</sup>, and 50 mm<sup>2</sup> LF1- $\mu$ PAD, the optimal blood volume ranges were 8–11  $\mu$ L, 11–17  $\mu$ L, and 15–22  $\mu$ L, respectively.

### 3. Plasma penetration on the $\mu$ PAD

Generally, flow in paper is controlled by capillary forces, allowing fluid to move passively without external pumping forces. High flow-rates also help improve turnaround time for most clinical analysis. Therefore, the plasma penetration rates for different types of  $\mu$ PADs were studied using 1.0 mm wide hydrophilic channels made of Whatman No.1 paper. A ruler was placed on the paper for measuring the distance of plasma penetration and a stopwatch was used for timing. Using 38% hematocrit blood, the optimal blood volume was calculated by using the equation of separation pad area and applied blood volume. The square root of time *versus* plasma penetration distance is plotted in Fig. 4. The results of initial plasma penetration were found to correlate with the Lucas-Washburn model,<sup>29,30</sup> in which the distance of plasma penetration was proportional to the square root of time. The decrease in speed of penetration rate at longer times is due to depletion of plasma from the whole blood and saturation of plasma onto the hydrophilic membrane. This flow behavior was similar to that of  $\mu$ PADs fabricated by the ink jet printing technique in which water penetration followed the model.<sup>31</sup> The shorter penetration distances shown for our  $\mu$ PADs are due to the higher plasma viscosity.

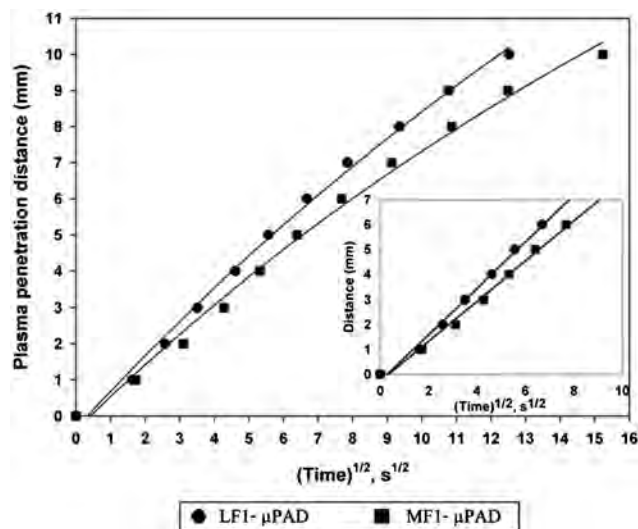


Fig. 4 The plasma penetration rate on  $\mu$ PAD fabricated by wax dipping method as a function of the square root of time *versus* plasma penetration distance.

LF1 separation membrane provided a higher plasma penetration rate than MF1, generating slopes for LF1 and MF1 of 0.990 and 0.859, respectively. This can be explained by the difference in material thickness of separation membrane and blood wicking rates, as reported by the manufacturer. From the results, LF1 membrane is the most suitable for fabrication of  $\mu$ PAD for whole blood separation because LF1 requires less blood sample volume and achieves faster plasma isolation.

Plasma purity was measured using microscopy. Using LF1- $\mu$ PAD, 8 mm separation membrane diameter, 15  $\mu$ L of whole blood sample was dropped onto the separation pad. Blood leakage was measured at 2, 5 and 10 min after blood addition at the Y-junction and both sides of the reaction areas using a stereoscope (40 $\times$  magnification). It was found that after 10 min, paper saturated with plasma was dry. Microscopy of all observed areas appeared clear of red blood cells, indicating complete plasma separation from the whole blood. In contrast, when applying an excessive blood volume (30  $\mu$ L) to the separation zone, blood cells were observed at the Y-junction and also the detection zones, indicating leakage. These cells can interfere with the colorimetric assays (see Table S-1, ESI<sup>†</sup>). Normally, red blood cells are 6–8  $\mu$ m in diameter, therefore they are trapped on the filter membrane that can remove particles greater than 2  $\mu$ m. Compared to other studies, plasma separation based on a pressure driven microfluidic device can damage blood cells, resulting in hemolysis.<sup>2</sup> Similarly, blood cells were destroyed at high pH buffer, and blood could be electrolyzed in a high electric field when plasma was separated by electro-osmotic flow control.<sup>3</sup> The hemolysis blood is not suitable for optical detection due to color interference. Yang *et al.* report that applying a blood sample with a hematocrit level of more than 30% can lead to leakage of a few cells into the microfluidic channels, based on the bifurcation law for plasma separation.<sup>6</sup> The plasma separation by capillary flow shown here does not suffer from these problems.

#### 4. Hematocrit and plasma separation time

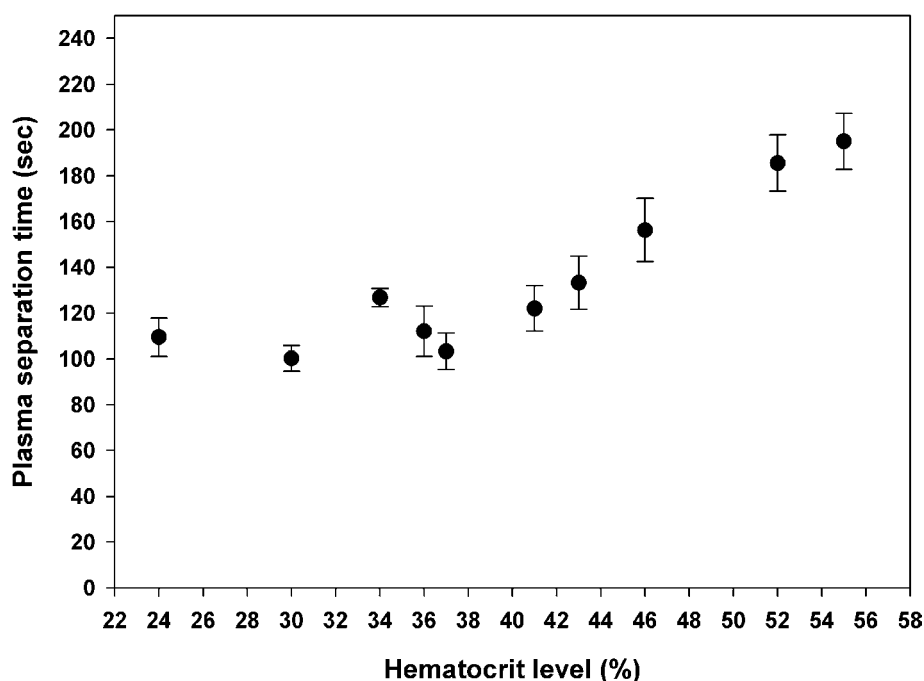
Solution viscosity affects the separation and analysis time for each  $\mu$ PAD. In addition, there are several other factors effecting the separation process including temperature, humidity, channel dimensions and the paper characteristics.<sup>32</sup> However, these parameters were fixed for this experiment. Therefore, only viscosity effects from various hematocrit levels were studied. Whole blood with different hematocrit (24–55%) or packed cell volume (PCV) was tested using the LF1- $\mu$ PAD. 15  $\mu$ L of whole blood was added to the separation pad of the LF1- $\mu$ PADs and the time was measured until the detection zone was completely wetted with plasma. The results (Fig. 5) show that blood samples in the tested hematocrit range of 24–55% could function with LF1- $\mu$ PAD and plasma was completely separated from each sample without hemolysis (see Table S-2, ESI). Plasma can be isolated from blood with a low hematocrit level faster than that with a high hematocrit level due to its lower viscosity, however, the normal reference range of hematocrit in human blood is 40 to 50%,<sup>1</sup> well within our workable range. Our proposed  $\mu$ PAD can be flexibly used for plasma separation with various hematocrit samples when compared to the previous reports which were limited to 19%,<sup>1</sup> 45%,<sup>6</sup> and 48%,<sup>33</sup> respectively. VanDelinder *et al.* created a microfluidic device using a continuous cross-flow filtration platform for separation of plasma from whole human blood. However, the blood samples had to be diluted to 20% hematocrit before analysis otherwise blood cells clogged the flow channel. Moreover, using high flow rate for plasma separation could damage blood cells and cause hemolysis.<sup>2</sup> In another report, Crowley, *et al.* designed passive microfilter devices to separate plasma from bovine blood, but the method was limited to samples with low hematocrit levels. From their study, higher than 40% hematocrit blood caused instabilities in capillary-driven microfluidic flow.<sup>1</sup> In our study, although a high percentage of hematocrit needed longer separation times, the  $\mu$ PAD could still be used with unmodified blood. In addition, plasma separation by this  $\mu$ PAD does not face the instabilities of flow, red blood cell hemolysis or clogging problems because only capillary force action was used to generate flow on the device.

#### 5. Reproducibility

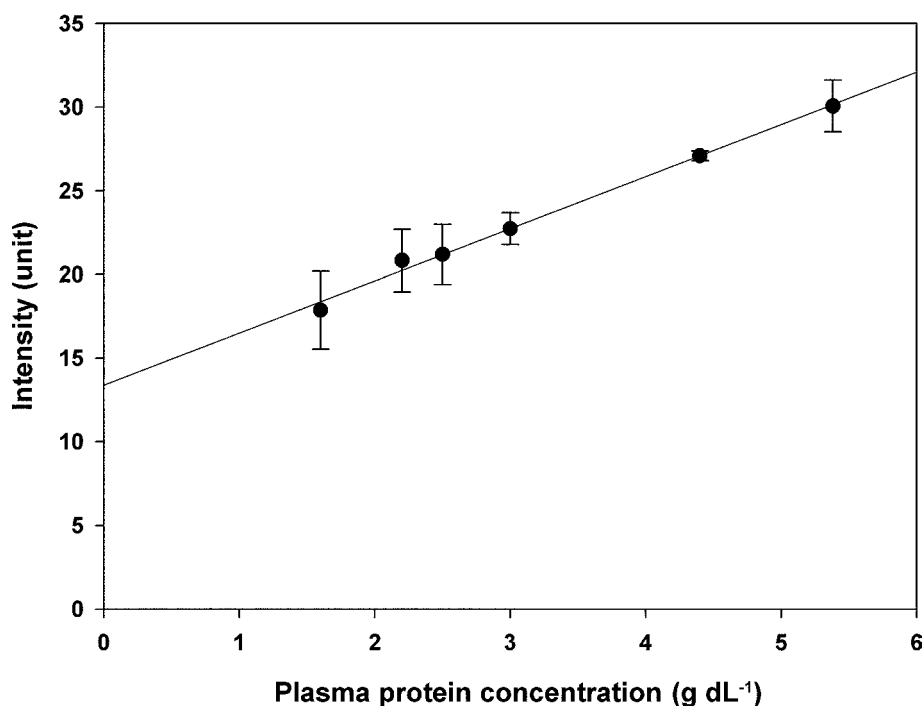
The reproducibility of the colorimetric measurements on the  $\mu$ PAD was studied. The protein content from the same normal whole blood sample for 10 replicate measurements for 3 consecutive days was determined. The within-day precision RSDs and between day precision were obtained at 2.62% ( $n = 10$ ) and 5.84% ( $n = 30$ ), respectively.

#### 6. Protein detection on the whole-blood $\mu$ PAD

The ability of  $\mu$ PAD for separation of plasma from real whole blood samples was demonstrated by detection of human serum protein using the BCG colorimetric assay. In this assay, BCG binds with proteins to cause a dramatic color change. After addition of blood, plasma flowed to the detection zones and the color developed from colorless to deep blue, which was easily observed on the detection zones of the  $\mu$ PAD within 2 min. The color was developed and the  $\mu$ PAD allowed to dry for 10 min. The images of the reaction were then captured using a digital



**Fig. 5** The correlation of hematocrit level of whole blood sample and plasma separation time. The error bars represent the time range for plasma separation ( $n = 4$ ).



**Fig. 6** Standard curve of proteins based on BCG method on  $\mu$ PAD.

camera and the color intensity was determined using Adobe Photoshop CS2 in gray scale mode. The sample intensity was quantified using a calibration curve constructed from the whole blood samples with known protein content. As shown in Fig. 6, the linear range was from 1.6–5.3 g dL<sup>-1</sup> with the regression equation of  $y = 3.12x + 13.38$  ( $r^2 = 0.993$ ). Blood samples were assayed by  $\mu$ PAD and the results compared to the BCG

conventional methods using the conventional spectrophotometric method. Paired sample  $t$ -test analysis revealed that the experimental value of  $|t|$  was 0.437, a significantly lower than the critical  $t$ -value ( $\pm 3.18$ ) so the null hypothesis assumed no differences in means between the results of the two methods at 95% confidence interval (Table 1). As a result, the  $\mu$ PAD for blood separation can be applied for plasma isolation and

**Table 1** Results of protein detection in whole blood samples

Samples ( $n = 4$ )	$\mu$ PAD ( $\text{g dL}^{-1}$ )	Conventional method ( $\text{g dL}^{-1}$ )
sample 1	$4.55 \pm 0.47$	$4.55 \pm 0.13$
sample 2	$4.25 \pm 0.28$	$4.13 \pm 0.06$
sample 3	$3.82 \pm 0.37$	$3.67 \pm 0.09$
sample 4	$3.00 \pm 0.35$	$3.27 \pm 0.09$
sample 5	$4.24 \pm 0.16$	$4.06 \pm 0.06$

quantitative analysis in whole blood samples simultaneously in a single step.

## Conclusions

A simple microfluidic paper-based analytical device for plasma separation from whole blood was designed and tested. By combining a blood separation membrane with a filter membrane and using the wax dipping method, it was possible to isolate high purity plasma as well as measure the total protein content. Importantly, based on the wax dipping method the chemistry surface of the paper was perfectly conserved, therefore the capillary force action of plasma occurred and did not require any external pumping force. On the other hand, this event could not be observed on the  $\mu$ PAD that's paper surface had been exposed to chemicals during fabrication, such as photolithography. Moreover, the passive capillary force of the device eliminates the blood cell damage problems that occur with pressure driven flow. The device can be used to separate plasma from a single drop of whole blood in a wide range of hematocrit (24–55%) within 2 min without the dilution. The correlation between blood volume and separation membrane area can be predicted from the equations for each type of separation membrane. Using a microscope, blood cells were not observed in the detection zones on  $\mu$ PAD, indicating that the plasma is pure. Plasma separation and colorimetric assay for protein detection were performed in a single step, in which good reproducibility of the colorimetric measurements was achieved at 2.62% within-day precision ( $n = 10$ ) and 5.48% between day precision ( $n = 30$ ).

## Acknowledgements

T.S. acknowledges the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee PhD Program (Grant No. PHD/0095/2552). This work was supported by the Thailand Research Fund, the Commission on Higher Education, Faculty of Allied Health Sciences and Chulalongkorn University (MRG5380170).

## References

- 1 T. A. Crowley and V. Pizziconi, *Lab Chip*, 2005, **5**, 922–929.
- 2 V. VanDelinder and A. Groisman, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 3765–3771.
- 3 H. Jiang, X. Weng, H. C. Chan, X. Wu and D. Li, *J. Micromech. Microeng.*, 2011, **21**, 85019–85026.
- 4 W. Zhao, M. M. Ali, S. D. Aguirre, M. A. Brook and Y. Li, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8431–8437.
- 5 S. Yang, A. Undar and J. D. Zahn, *Lab Chip*, 2007, **7**, 588–595.
- 6 S. Yang, A. Undar and J. D. Zahn, *Lab Chip*, 2006, **6**, 871–880.
- 7 S. Choi, S. Song, C. Choi and J.-K. Park, *Lab Chip*, 2007, **7**, 1532–1538.
- 8 J. Shim, A. Browne and C. Ahn, *Biomed. Microdevices*, 2010, **12**, 949–957.
- 9 F. Petersson, A. Nilsson, C. Holm, H. Jonsson and T. Laurell, *Lab Chip*, 2005, **5**, 20–22.
- 10 J. Moorthy and D. J. Beebe, *Lab Chip*, 2003, **3**, 62–66.
- 11 S. Thorslund, O. Klett, F. Nikolajeff, K. Markides and J. Bergquist, *Biomed. Microdevices*, 2006, **8**, 73–79.
- 12 T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi and Y. Baba, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 3194–3198.
- 13 X. Chen, D. F. Cui, C. C. Liu and H. Li, *Sens. Actuators, B*, 2008, **130**, 216–221.
- 14 W. Leung, P. Chan, F. Bosgoed, K. Lehmann, I. Renneberg, M. Lehmann and R. Renneberg, *J. Immunol. Methods*, 2003, **281**, 109–118.
- 15 A. Y. Kolosova, L. Sibanda, F. Dumoulin, J. Lewis, E. Duveiller, C. Van Peteghem and S. De Saeger, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **616**, 235–244.
- 16 J. Bogdanovic, M. Koets, I. Sander, I. Wouters, T. Meijster, D. Heederik, A. van Amerongen and G. Doekes, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, **118**, 1157–1163.
- 17 A. Gáspár and I. Bácsi, *Microchem. J.*, 2009, **92**, 83–86.
- 18 Y. M. Abdulrazzaq and A. Ibrahim, *Clin. Biochem.*, 2001, **34**, 399–406.
- 19 H. G. Kunkel and A. Tiselius, *J. Gen. Physiol.*, 1951, **35**, 89–118.
- 20 E. Carrilho, S. T. Phillips, S. J. Vella, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 5990–5998.
- 21 W. Dungchai, O. Chailapakul and C. S. Henry, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **674**, 227–233.
- 22 X. Yang, O. Forouzan, T. P. Brown and S. S. Shevkoplyas, *Lab Chip*, 2012, **12**, 274–280.
- 23 R. C. Hawkins, *Clin Biochem Rev.*, 2007, **28**, 179–194.
- 24 T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul and W. Laiwattanapaisal, *Talanta*, 2011, **85**, 2587–2593.
- 25 M. Al-Tamimi, W. Shen, R. Zeineddine, H. Tran and G. Garnier, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 1661–1668.
- 26 P. Jarujamrus, J. Tian, X. Li, A. Siripinyanond, J. Shiwatana and W. Shen, *Analyst*, 2012, **137**, 2205–2210.
- 27 M. S. Khan, G. Thouas, W. Shen, G. Whyte and G. Garnier, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 4158–4164.
- 28 N. Godino, E. Comaskey, R. Gorkin and J. Ducree, *Centrifugally enhanced paper microfluidics*, 2012.
- 29 K. T. Hodgson and J. C. Berg, *J. Colloid Interface Sci.*, 1988, **121**, 22–31.
- 30 E. Fu, S. Ramsey, P. Kauffman, B. Lutz and P. Yager, *Microfluid. Nanofluid.*, 2011, **10**, 29–35.
- 31 X. Li, J. Tian, G. Garnier and W. Shen, *Colloids Surf., B*, 2010, **76**, 564–570.
- 32 A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides and E. Carrilho, *Anal. Chem.*, 2009, **82**, 3–10.
- 33 A. Nabatiyan, Z. A. Parpia, R. Elghanian and D. M. Kelso, *J. Virol. Methods*, 2011, **173**, 37–42.