Chulalongkorn Medical Journal

Volume 32
Issue 10 *October 1988*

Article 5

10-1-1988

การประเมินผลคุณสมบัติเทคนิควิเคราห์ฮีโมโกลบิน โดยวิธีแอลคาไลน์ฮีมาติน ซึ่งไม่ใช้สารไซยาไนด์

เทียนชัย ไชยเศรษฐ

แมน ชัยพิพัฒน์

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

ไชยเศรษฐ, เทียนชัย and ชัยพิพัฒน์, แมน (1988) "การประเมินผลคุณสมบัติเทคนิควิเคราห์ฮีโมโกลบิน โดยวิธีแอลคาไลน์ฮีมาติน ซึ่งไม่ใช้สารไซยาไนด์," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 32: Iss. 10, Article 5.
DOI: https://doi.org/10.58837/CHULA.CMJ.32.10.5
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol32/iss10/5

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การประเมินผลคุณสมบัติเทคนิควิเคราห์ฮีโมโกลบิน โดยวิธีแอลคาไลน์ฮีมาติน ซึ่งไม่ใช้สารไซยาไนด์

This article is available in Chulalongkorn Medical Journal: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol32/iss10/5

นิพนธ์ต้นฉบับ

การประเมินผลคุณสมบัติเทคนิควิเคราะห์ฮีโมโกลบิน โดยวิธีแอลคาไลน์ฮีมาติน ซึ่งไม่ใช้สารไซยาไนด์

เทียนชัย ไชยเศรษฐ*
แมน ชัยพิพัฒน์**

Chaiyasest T, Chaipipat M. An evaluation of hemoglobin determination by alkaline hematin with non-cyanide reagent. Chula Med J 1988 Oct; 32(10) : 879 - 883

Performance characteristics of hemoglobin assayed by alkaline hematin with non ionic detergent were studied. The standard calibration graph was linear from 8.10 to 24.3 gHb/dl. The day to day precision dose profile at hemoglobin concentrations of 4.73, 16.02 and 23.66 gHb/dl were 5.23, 1.87 and 1.76 % CV, respectively (n = 20). The average percent recovery was 98.00 %. Results by the proposed method (Y) correlated well with those by the hemiglobincyanide method (X) : r = 0.985; Y = 0.97X + 0.28; n = 294. Moreover by the method comparison study, hemoglobin values estimated by the two methods were not significantly different. Therefore, the performances of this hemoglobin determination, evaluated may be acceptable for routine clinical services.

Reprint request : Chaiyasest T, Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publication. March 4, 1988.

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** นิสิตเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือด วิธีที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุด คือวิธีไซยันเมธิโมโกลบิน (cyanmethemoglobin) หรือเฮมิโกลบินไซยาไนด์ (hemiglobincyanide)[1-2] ซึ่งยังมีข้อเสียบางประการคือ น้ำยาวิเคราะห์มีสารไซยาไนด์ เป็นสารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกายทางปาก หรือเมื่อเทน้ำยาที่ใช้แล้วลงในอ่างน้ำทิ้ง ถ้ามีกรดอยู่ด้วยทำให้เกิดไอของไฮโดรเจนไซยาไนด์ระเหยขึ้น อาจเข้าสู่ร่างกายได้ทางการหายใจ นอกจากนั้นน้ำยาวิเคราะห์มีความไวต่อแสงและปฏิกิริยาทางฟิสิกส์บางอย่าง[3] จึงทำให้คุณสมบัติในการเกิดสีลดลง และการสร้างกราฟมาตรฐานใช้สารละลายไซยันเฮมิโกลบินสำเร็จรูปในการปรับเครื่องเทียบสี[4] จึงกล่าวได้ว่าสารละลายมาตรฐานไม่ได้ทำปฏิกิริยากับน้ำยาวิเคราะห์เช่นเดียวกับเลือดผู้ป่วย อีกประการหนึ่งเวลาที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาของฮีโมโกลบินชนิดต่างอนุพันธ์กัน มีความแตกต่างกัน เพราะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนคาร์บอกซีฮีโมโกลบินเป็นไซยันเฮมิโกลบินอยู่ระหว่าง 95-120 นาที[5, 6] ในปี ค.ศ. 1984 Zander และคณะ[7] เสนอน้ำยาวิเคราะห์ความเข้มข้นฮีโมโกลบินในเลือดโดยวิธีไม่ใช้สารไซยาไนด์เรียกว่า AHD - 575 ซึ่งหมายถึง alkaline hematin with detergent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร แต่เพิ่มสาร non - ionic detergent ลงในน้ำยาวิเคราะห์ ทำให้น้ำยาวิเคราะห์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป คือความไวในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น สีที่เกิดและน้ำยามีความคงทนมากขึ้น และมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 575 นาโนเมตร ผู้รายงานได้ใช้คลอโรเฮมิน (chlorohaemin) ซึ่งยังไม่มีจำหน่ายทั่วไป มาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน[8] จึงเป็นการยากที่ห้องปฏิบัติการทั่วไปจะหามาใช้ได้

การวิจัยครั้งนี้ ได้ประเมินผลคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นฮีโมโกลบินในเลือด วิธี alkaline hematin D - 575 โดยใช้เม็ดเลือดแดงแตกตัว (hemolysate) และเปรียบเทียบค่าฮีโมโกลบินมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กด้วยวิธีใช้สีเฟอร์โรซีน[9] เป็นสารละลายมาตรฐานแทนคลอโรเฮมิน โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะประเมินผลคุณสมบัติด้านการปฏิบัติ เพื่อนำวิธีการนี้มาใช้ประโยชน์ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

วัสดุและวิธีการ

1. การวิเคราะห์ฮีโมโกลบินวิธีเฮมิโกลบินไซยาไนด์ ใช้วิธีของ Kampen และ Zijlstra[2] ซึ่งใช้เป็นวิธีเปรียบเทียบ และวิธี AHD - 575 ใช้วิธีของ Zander และคณะ[7] ซึ่งเป็นวิธีที่จะปรับปรุงและประเมินผล

2. สารเคมีและน้ำยา

2.1 สารเคมีทั่วไปใช้ชนิด Analytical Reagents (AR grade)

2.2 น้ำยาวิเคราะห์ความเข้มข้นฮีโมโกลบินวิธี Hemiglobin cyanide เตรียมตามวิธีของ Kampen และ Zijlstra[2]

2.3 สารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบิน ใช้เม็ดเลือดแดงแตกตัว (hemolysate) ซึ่งหาค่าฮีโมโกลบินโดยการวิเคราะห์เหล็กตามวิธีของ จันทนี ไชยเศรษฐ และ คณะ[9] มีค่าความเข้มข้น 8.10, 12.15, 16.20, 20.25 และ 24.30 g Hb/dL ตามลำดับ

2.4 น้ำยาวิเคราะห์ความเข้มข้นฮีโมโกลบินวิธี AHD - 575[7]

sodium hydroxide	4 g
triton X - 100	25 mL
ละลายในน้ำกลั่นและเจือจางจนครบ	1 ลิตร

3. การวิเคราะห์ความเข้มข้นฮีโมโกลบินในเลือดวิธี AHD - 575 ทำโดยดูดเลือด หรือสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินแต่ละความเข้มข้น (ข้อ 2.3) ปริมาตร 0.02 mL ใส่ในน้ำยาวิเคราะห์ (ข้อ 2.4) ปริมาตร 3 mL ในแต่ละหลอดทดลองที่เตรียมไว้แล้ว และเติมน้ำยาวิเคราะห์ในหลอดเปล่าอีกหลอดหนึ่งเพื่อใช้เป็น blank ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร โดยใช้หลอด blank ปรับศูนย์ นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละหลอด และความเข้มข้นฮีโมโกลบิน ไปสร้างกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละหลอดที่วัดได้ไปอ่านค่าในหน่วย g Hb/dL

4. เครื่องมือ ใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Digispec ของบริษัท Helena Laboratories สหรัฐอเมริกา

5. ใช้เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำ ใส่สารกันเลือดแข็ง EDTA จากผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 294 ตัวอย่าง ใช้สำหรับเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี

6. สถิติวิเคราะห์ ใช้สถิติค่าเฉลี่ย (mean), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), สัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (coefficient of variation, CV%), สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient), ความถดถอยเชิงเส้นตรง (least squares regression analysis), และ student t - test.

ผลและวิจารณ์

ได้ประเมินผลคุณสมบัติด้านการปฏิบัติ (performance characteristics) ของเทคนิควิเคราะห์ความเข้มข้นฮีโมโกลบิน วิธี AHD - 575 ได้ผลดังนี้

1. ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linear range)มีความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ความเข้มข้น 8.10 จนถึง 24.3 gHb/dL

2. ความเที่ยงตรง (precision) โดยการวิเคราะห์เลือดตัวอย่างเดียวกันซ้ำหลายครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 1 การวิเคราะห์ซ้ำในชุดการทดลองเดียวกัน (intra-assay precision) ที่ระดับต่ำ ระดับปกติ และระดับสูงมีค่า % CV เท่ากับ 5.23, 1.87 และ 1.76 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ซ้ำต่างชุดการทดลอง (inter - assay precision) โดยใช้น้ำเลือดที่แช่แข็งไว้ ที่ระดับต่ำ ระดับปกติ และระดับสูง มีค่า % CV เท่ากับ 5.51, 2.25 และ 3.64 ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

Table 1 Precision study of blood hemoglobin by AHD - 575 method

level	n	gHb/dL	S.D.	CV %
within day assay				
low	20	4.73	0.248	5.23
normal	20	16.02	0.299	1.87
high	20	23.66	0.416	1.76
day-to-day assay				
low	10	6.32	0.348	5.51
normal	10	12.65	0.285	2.25
high	10	18.25	0.644	3.64

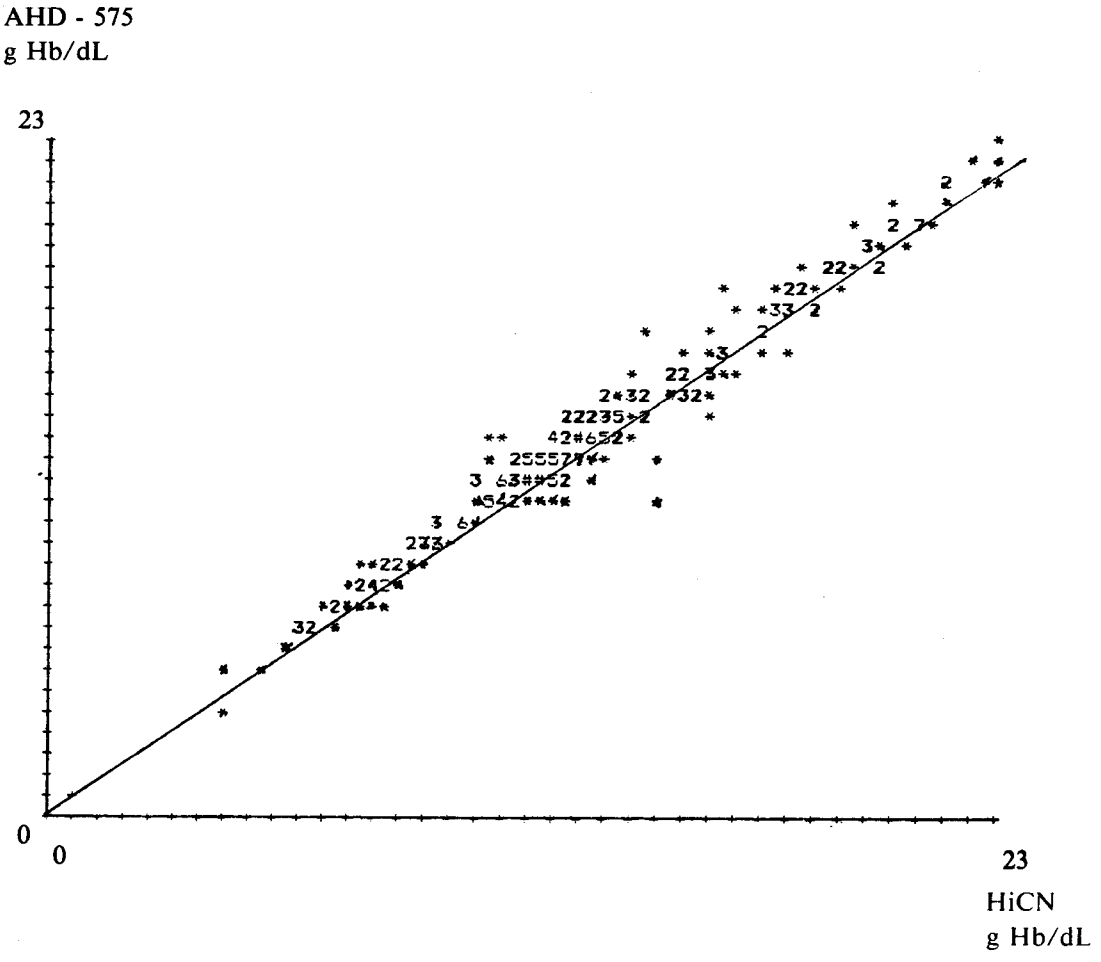
3. ความแม่นยำ (accuracy) ได้ศึกษาความคลาดเคลื่อนโดย

3.1 การศึกษาเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์เลือดตัวอย่างเดียวกัน (method comparison study) โดย 2 วิธี โดยเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์วิธี AHD - 575 กับ วิธี เฮมิโกลบินไซยาไนด์ ซึ่งเป็นวิธีแนะนำหรือวิธีเปรียบเทียบ[2] จำนวน 294 ราย ช่วงค่าที่ศึกษาตั้งแต่ความเข้มข้น 5 ถึง 22 gHb/dL ค่าสมการความถดถอยเชิงเส้นตรง $Y = 0.97 X + 0.28$ ค่า $r = 0.985$, $p < 0.001$ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 จากค่าจุดตัดแกน Y (Y intercept) ที่ศึกษาแสดงว่า มีค่าความคลาดเคลื่อนประเภทที่เกิดขึ้นเป็นประจำ ในเทคนิควิเคราะห์ชนิดค่าคงที่ (constant systematic error) = 0.28 และจากค่าความชัน (slope = 0.985) แสดงว่าวิธีนี้มีความคลาดเคลื่อน ประเภทที่เกิดเป็นประจำในเทคนิควิเคราะห์ชนิดค่าเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้น = 1.5% (proportional systematic error) เมื่อนำค่าฮีโมโกลบินของเลือด 294 ตัวอย่าง ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 5-22 gHb/dL ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทั้งสองเปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าวิธี AHD - 575 ให้ค่าวิเคราะห์แม่นยำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี เฮมิโกลบินไซยาไนด์[10]

3.2 การศึกษาค่าการวิเคราะห์กลับคืน (recovery study) โดยการเพิ่มปริมาตรน้ำเลือด เพื่อให้มีความเข้มข้น 4 ระดับนำมาวิเคราะห์ค่ากลับคืน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 ได้ค่าเฉลี่ย % recovery = 98.00% (range 92 - 102%)[10]

Table 2 Recovery study with proposed method

No.	concentration assayed (gHb/dL)	concentration added (gHb/dL)	concentration recovered	% recovery
1	5.50	baseline	-	-
2	10.56	5.50	5.06	92.00
3	16.50	11.00	11.00	100.00
4	22.30	16.50	16.83	102.00
			average	98.00



r = 0.985, Y = 0.97x + 0.28, Y intercept = 0.28,
slope = 0.97, n = 294

Figure 1 Correlation analysis between AHD - 575 (X) and HiCN (Y)

จากผลการวิจัย เมื่อใช้หลักการประเมินผลคุณสมบัติเทคนิควิเคราะห์ ของการวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน โดยวิธี AHD - 575 จะเห็นว่าเป็นวิธีที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพียงพอที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ดี สามารถเตรียมน้ำยาวิเคราะห์ได้ง่ายเก็บไว้ได้นานมากกว่า 1 ปี และมีราคาถูก โดยมีค่าใช้จ่ายต่อรายประมาณ 0.6 สตางค์แม้จะมีความไม่แม่นยำในการชั่งน้ำหนักหรือตวงวัดปริมาตรของสารเคมีทั้งสองบ้างก็ตาม

การปรับปรุงวิธีการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเปลี่ยนจากการใช้ Chlorohaemin[8] ซึ่งยังไม่มีผลิตขายแพร่หลายทั่วไป และผู้วิจัยจะต้องนำมาตกผลึกใหม่เพื่อทำให้บริสุทธิ์ขึ้นซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก มาใช้สารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินที่เตรียมขึ้นเอง โดยวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กใน hemolysate ที่เสนอโดย จันทนีไชยเศรษฐ และคณะ[9] จึงเป็นวิธีที่ทำให้สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดโดยวิธี AHD-575 มาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

สรุป

การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดโดยวิธี AHD-575 ให้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงถึง 24.3 gHb/dL มีค่า within day assay precision ที่ระดับฮีโมโกลบิน 4.73, 16.02 และ 23.66 gHb/dL เท่ากับ 5.23, 1.87 และ 1.76% CV ตามลำดับ (n = 20) และ day to day precision ที่ระดับ ฮีโมโกลบิน 6.32, 12.65 และ 18.25 gHb/dL เท่ากับ 5.51, 2.25 และ 3.64% CV ตามลำดับ (n = 10) เมื่อเปรียบเทียบวิธีนี้ (Y) กับวิธีเฮมิโกลบินไซยาไนด์ (X) พบว่ามีความสัมพันธ์กันดังนี้ r = 0.985, Y = 0.97X + 0.28, n = 294 ที่ระดับฮีโมโกลบิน 5 - 22 gHb/dL

การศึกษาเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์เลือดตัวอย่างเดียวกัน โดยวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีการนี้ วิเคราะห์ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือดได้ดี โดยไม่ต้องเสี่ยงอันตรายต่อการสัมผัสกับสารพิษไซยาไนด์

อ้างอิง

1. Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies; spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. J Biol Chem 1932 Nov; 98 (11) : 719-733.
2. Kampen EJ van, Zijlstra WG. Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method. Clin Chim Acta 1961 Jul; 6: 538-544
3. Weatherburn MW, Logan JE. The effect of freezing on the potassium ferricyanide-potassium cyanide reagent used in the cyanmethemoglobin procedure for hemoglobin determination. Clin Chim Acta 1964 Jun ; 9 : 581 - 584
4. Vanzetti G., Franzini C. Stable hemoglobin compounds in concentrated solution as reference for hemoglobinometry. Clin Chim Acta 1969 Jun ; 24 : 417 - 421
5. Kampen EJ van, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. Adv Clin Chem 1965; 8 : 141-187
6. Rodkey FL. Kinetic aspects of cyanmethemoglobin formation from carboxyhemoglobin. Clin Chem 1967; Jan 13 (1) : 2-5.
7. Zander R, Lang W, Wolf HV. Alkaline hematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method. Clin Chim Acta 1984 Jan;136(1):83-94
8. Wolf HU, Lang W, Zander R. Alkaline haematin. D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. II. Standardisation of the method using pure chlorohaemin. Clin Chim Acta 1984 Jan ; 136(1) : 95-104
9. จันทนี ไชยเศรษฐ, เทียนชัย ไชยเศรษฐ, บุญชัย วงศ์สถิตวิไลรุ่ง. ประเมินผลคุณสมบัติวิเคราะห์สารเหล็กในฮีโมโกลบินในเลือด โดยปฏิกิริยากับลีเฟอร์โรซีน : แนะนำวิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินขึ้นใช้เองในห้องปฏิบัติการ. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2531 มกราคม ; 32 (1) : 37-42
10. สมพงษ์ จินายน. หลักการประเมินผลคุณสมบัติเทคนิควิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการเคมีคลีนิก. กรุงเทพ : โรงพิมพ์ตีรณสาร, 2529.67-185