

9-1-1988

การหาค่าซีรัมแคลเซียมโดยวิธี โอ-ครีซอลโทลีน คอมเพลกโซน ที่รับขงใหม่ : การประเมินคุณสมบัติของเทคนิค

รัชนา ศานติยานนท์

พรพันธ์ วรธนาหะ

สาจิต แสงมี

สุภัค จายะ เกษตร์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal>



Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

ศานติยานนท์, รัชนา; วรธนาหะ, พรพันธ์; แสงมี, สาจิต; and จายะ เกษตร์, สุภัค (1988) "การหาค่าซีรัมแคลเซียมโดยวิธี โอ-ครีซอลโทลีน คอมเพลกโซน ที่รับขงใหม่ : การประเมินคุณสมบัติของเทคนิค," *Chulalongkorn Medical Journal*. Vol. 32: Iss. 9, Article 3.

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal/vol32/iss9/3>

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.

การหาค่าซีรั่มแคลเซียมโดยวิธี โอ-ครีซอลไทลีน คอมเพลกไซน ที่ปรับปรุงใหม่ : การประเมินคุณสมบัติของเทคนิค

รัชนา ศานติยานนท์*
พรพันธ์ วรรณวาทะ**
สาริต แสงมี***
สุภัค จาปะเกษตร์***

Santiyanont R, Watanawaha P, Satid Saengmee, Jarpakasetr S. Determination of serum total calcium by modified o-cresolphthalein complexone method : Evaluation of performance characteristics. Chula Med J 1988 Sep; 32(9) : 783-792

Determination of serum total calcium by o-cresolphthalein complexone method was modified and its performance characteristics evaluated. Both intra-and inter assay precision were good (CV < 3%). Recovery studies revealed good accuracy at low calcium values (recovery = 102.6%) and the results agreed well with those of the reference method (r = 0.981, p < 0.001; y = 0.98x + 0.05) with no significant difference (p < 0.05). Linearity of the color reaction was up to the calcium concentration of 20 mg/dl with a minimal detection limit of 2.0 g/dl. Developed color was stable for at least 4 hours. Reference range was 7.75-9.65 mg/dl. Hemoglobin (< 0.87 g/dl), bilirubin (< 20.0 mg/dl) and magnesium (< 5.0 mg/dl) did not alter serum total calcium level significantly (interference < 2.5%). Ascorbic acid, salicylate, paracetamol and penicillin G at therapeutic level also did not interfere the determination. However venous stasis had some positive effects on calcium values (p < 0.05). Serum separated from clotted blood left at room temperature for 2, 3 and 4 hours gave comparable calcium values as those of 1 hour. In addition serum could be kept at 4°C and -3°C for 7 and 14 days respectively without significant change in calcium levels (p > 0.05). The method is therefore precise, accurate, sensitive, rapid, easy to perform at low cost, with long shelf-life of reagents.

Reprint request : Santiyanont R, Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.

Received for publication. May 2, 1988.

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** นิสิตภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แคลเซียมเป็น cation ที่มีปริมาณมากที่สุดในร่างกาย โดยปกติจะปรากฏอยู่ในพลาสมาเป็นสามรูปแบบ คือ ในรูปที่ยึดกับโปรตีน และเป็น ionized calcium มีอย่างละเท่ากัน คือ ประมาณ 45% ส่วนที่เหลือจะเป็นแคลเซียมที่รวมอยู่กับ anion บางชนิด เช่น ซีเตรต ไบคาร์บอเนต เป็นต้น⁽¹⁾ การตรวจหาระดับของแคลเซียมในพลาสมาหรือซีรัมสามารถวินิจฉัยความผิดปกติของอวัยวะต่าง ๆ ที่มีหน้าที่ในการรักษาสมดุลของแคลเซียม เช่น ลำไส้เล็ก ไต กล้ามเนื้อ กระดูกและฟัน⁽²⁾

ปัจจุบันมีวิธีตรวจวัดระดับแคลเซียมในพลาสมาหรือซีรัมหลายวิธี เช่น การวัดระดับ ionized calcium โดยใช้ ion selective electrode^(3,4) การตรวจวัดระดับแคลเซียมรวมโดยวิธีใช้ Flame photometer และ Atomic absorption spectrophotometer (AAS)⁽⁵⁾ ซึ่งวิธีหลังนี้เป็นวิธีอ้างอิงสำหรับการตรวจหาแคลเซียมรวม⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ซึ่งห้องปฏิบัติการบางแห่งไม่สามารถจัดหาได้ จึงมีความนิยมหาค่าแคลเซียมรวมโดยการให้แคลเซียมจับกับสี⁽⁷⁾ ที่ใช้กันมาก คือ o-cresolphthalein complexone (CPC) ซึ่งในสภาวะต่างจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง สามารถนำไปวัดค่าการดูดแสงได้ที่ความยาวคลื่น 580nm⁽⁸⁾ แต่วิธีที่ซับซ้อนทั่วไป ตลอดจนน้ำยาสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายใช้ diethanolamine หรือ 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) เป็นส่วนประกอบ^(9,10) ซึ่งมีข้อเสียคือ สารเหล่านี้สามารถติดไฟได้และมีราคาค่อนข้างแพง

ใน พ.ศ. 2527 คณะผู้วิจัยได้ปรับปรุงวิธีการหาค่าแคลเซียมรวม (total calcium) โดยการใช้ glycine ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์แทนสารดังกล่าวข้างต้น⁽¹¹⁾ ซึ่งมีข้อดีเพราะ glycine เป็นสารที่หาได้ง่ายและราคาถูก มีอยู่ในห้องปฏิบัติการแทบทุกแห่ง เมื่อใช้เตรียมน้ำยาแล้ว ทำให้น้ำยามีราคาถูกลง

ในการศึกษานี้จะได้ประเมินคุณสมบัติของวิธีที่ปรับปรุงนี้โดยศึกษาทั้งความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยงตรง (precision), ช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์ได้ (linearity), ช่วงเวลาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ค่าต่ำสุดที่เทคนิคสามารถตรวจสอบได้ ความคงทนของน้ำยาที่เตรียมขึ้น ผลการรบกวนโดยสารต่าง ๆ ตลอดจนช่วงค่าอ้างอิงเพื่อนำผลไปพิจารณาใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการต่อไป

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจทำให้ค่าแคลเซียมที่วัดได้คลาดเคลื่อนไป เช่น ภาวะเลือดคั่งที่เกิดจากการรัดแขนขณะเจาะเลือด ระยะเวลาในการทิ้งให้เลือดแข็งตัวก่อนปั่นแยกซีรัม และระยะเวลาในการเก็บรักษาซีรัมก่อนที่จะนำ

มาตรวจ เป็นต้น ดังนั้นจึงได้ศึกษาอิทธิพลของสารและภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ที่อาจมีผลรบกวนต่อการหาค่าแคลเซียมโดยวิธีที่ปรับปรุงใหม่ด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. **สารเคมี** สารทุกชนิดที่ใช้เป็นชนิด AR grade O-Cresolphthalein complexone (CPC), 8-hydroxyquinoline (8-HQ), dimethylsulfoxide, glycine และ calcium carbonate เป็นผลิตภัณฑ์ของ BDH, Poole, ประเทศอังกฤษ Sodium hydroxide และ lanthanum (III) oxide เป็นผลิตภัณฑ์ของ Merck, Darmstadt, ประเทศเยอรมันนี สำหรับ Standard calcium เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma Diagnostics, St. Louis, ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. **สิ่งส่งตรวจ** เลือกจากผู้บริจาคโลหิตที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 100 ราย และซีรัมที่มีค่าแคลเซียมระดับปกติ ต่ำและสูงจากห้องปฏิบัติการกลาง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 40 ราย

3. **สารควบคุมคุณภาพ** ใช้ Monitrol level I (ระดับปกติ) และ level II (ระดับผิดปกติ) ซึ่งเป็น quality control serum ของ Dade, Miami, ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. **เครื่องมือ** Perkin-Elmer Spectrophotometer Model 35 และ Atomic Absorption Spectrophotometer : Perkin Elmer Model 305 (double beam system)

5. วิธีดำเนินการ

5.1 **การเตรียมซีรัม** เจาะเลือดจากผู้บริจาคโลหิต ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว นำไปปั่นแยกซีรัมโดยใช้ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำซีรัมที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าแคลเซียมภายในวันเดียวกัน

5.2 **การเตรียมน้ำยา** เครื่องแก้วและเครื่องใช้ทุกชนิดต้องทำให้สะอาดปราศจากแคลเซียมโดยแช่ใน 2N HCl ค้างคืน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง และครั้งสุดท้ายล้างด้วย deionized distilled water

Glycine buffer ได้พัฒนาน้ำยานี้มาใช้แทน AMP buffer โดยใช้ glycine 25.5 g และ NaOH 12.0 g ละลายใน deionized distilled water 950 ml ปรับ pH ให้เป็น 10.75 ด้วย 1N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วเติม deionized distilled water ให้ครบ 1 ลิตร

Color reagent ละลาย CPC 0.05 g ใน conc. HCl 5.0 ml เสียก่อน แล้วจึงละลายใน deionized distilled

water 800 ml. เติม 8-hydroxyquinoline 1.0 g, dimethylsulfoxide 100 ml. แล้วเติม deionized distilled water จนครบ 1 ลิตร น้ำยานี้เมื่อผสมรวมกับ glycine buffer ในอัตราส่วน 1:1 จะมี pH สุดท้ายเป็น 10.0

5.3 วิธีตรวจวัดแคลเซียมในซีรัม

ก. วิธีสี CPC ที่ปรับปรุงใหม่ ปรับปรุงจากวิธีของ Connerty et al.⁽⁷⁾ โดยใช้ color reagent 2 ml ผสมกับ glycine buffer 2 ml ในหลอดควีเวตต์ นำไปปรับศูนย์ที่ความยาวคลื่น 580 nm แล้วจึงนำมาเติมซีรัม 0.05 ml ผสมให้เข้ากันดี อ่านค่าการดูดแสงได้ทันที และนำไปคำนวณความเข้มข้นของแคลเซียมได้โดยอ่านค่าจาก calibration curve ซึ่งเตรียมมาจาก standard calcium ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 และ 15 mg/dl

ข. วิธี Atomic absorption spectrophotometry^(5,6) สามารถตรวจหาความเข้มข้นของแคลเซียมในซีรัมได้ โดยฉีดสารละลายระหว่างซีรัมกับ lanthanum (III) oxide ให้เป็นฝอยเข้าไปในเปลวไฟ แคลเซียมที่อยู่ในรูปต่าง ๆ ในซีรัมจะสลายตัวเป็นอะตอมอิสระในสภาวะก๊าซ เมื่อได้รับคลื่นแสงที่มีพลังงานจำเพาะสำหรับแคลเซียม (422.7 nm) จะทำให้อะตอมเหล่านี้รับพลังงานสู่สถานะ excited state ทำให้คลื่นแสงที่ผ่านมามีพลังงานลดลงตามสัดส่วนของความเข้มข้นของแคลเซียมในซีรัม ซึ่งเมื่อเทียบกับค่า standard แล้ว จะทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของแคลเซียมที่ต้องการวัด

5.4 การทดสอบความเที่ยงตรงของเทคนิควิเคราะห์ ทดสอบทั้งวิธี CPC ที่ปรับปรุงใหม่ และวิธี AAS สำหรับ Intra assay precision ทำโดยนำซีรัมที่มีแคลเซียมระดับปกติ ต่ำ และสูงมาหาค่าแคลเซียมซ้ำกัน 25 ครั้ง ภายในวันเดียวกัน ส่วน Inter assay precision จะใช้ Monitrol level I มาทดสอบวันละ 2 ครั้ง จนครบ 10 วัน นำค่าที่ได้จากการทดสอบทั้งสองแบบมาคำนวณหา % coefficient of variation (%CV)

5.5 การทดสอบความแม่นยำของเทคนิควิเคราะห์ (Accuracy)

ก. Recovery study เตรียมซีรัมตัวอย่างที่มีค่าแคลเซียมระดับปกติและวัดค่าเริ่มต้นไว้ ต่อมาเติม standard calcium ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mg/dl ลงในซีรัมตัวอย่าง ความเข้มข้นที่เติมจริง คือ 0.5, 1, และ 1.5 mg/dl แล้วนำไปหาค่าแคลเซียม โดยทดลองแต่ละความเข้มข้นซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) คำนวณ % recovery ได้จากสูตร⁽¹²⁾

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณสารวิเคราะห์กลับคืน}}{\text{ปริมาณสารที่เติม}} \times 100$$

ข. การเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง (AAS)

นำซีรัมที่มีค่าแคลเซียมระดับปกติ ต่ำ และสูง รวม 40 ราย มาหาค่าแคลเซียมโดยวิธี CPC ที่ปรับปรุงใหม่และวิธี AAS ภายในวันเดียวกัน โดยแต่ละวิธีวิเคราะห์ซีรัมตัวอย่างซ้ำอย่างน้อยสองครั้ง (duplicate)

5.6 ช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ (Linearity) นำน้ำยา standard calcium ที่ความเข้มข้น 5, 7, 10, 12, 15 และ 20 mg/dl มาหาค่าแคลเซียม แล้วเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดแสงและความเข้มข้น

5.7 ความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น ทำการตรวจวัด A ที่ 580 nm หลังจากการทำปฏิกิริยาเกิดสีด้วยวิธี CPC ที่ปรับปรุงใหม่ โดยใช้ซีรัมและ standard calcium ความเข้มข้นต่าง ๆ สามระดับ ติดตามวัด A ที่ 580 nm ทุก 30 นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

5.8 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ นำ standard calcium มาเจือจางเป็นความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-5.0 mg/dl ด้วย deionized distilled water แล้วนำมาหาค่าแคลเซียมโดยวิธี CPC ที่ปรับปรุงใหม่

5.9 การศึกษาสารรบกวน สารที่ใช้ศึกษา คือ ฮีโมโกลบิน บิลิรูบิน แมกนีเซียม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และยาที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้รักษา ได้แก่ ascorbic acid (0.5 mg/ml), salicylate (0.4 mg/ml), paracetamol (0.05 mg/ml), penicillin G (300 units/ml) เมื่อเติมสารต่าง ๆ เหล่านี้ลงไป ในซีรัม ถ้าค่าความเข้มข้นของแคลเซียมเปลี่ยนแปลงไปโดยมีเปอร์เซ็นต์ของการรบกวนน้อยกว่า 2CV (CV ที่ใช้ คือ ค่าที่ได้จาก intra assay precision ที่ศึกษาจากระดับความเข้มข้นของแคลเซียมที่ใกล้เคียงกับการทดลอง) แสดงว่าสารนั้นไม่มีผลรบกวน⁽¹³⁾

5.10 การศึกษาผลรบกวนจากภาวะเลือดคั่ง ใช้จำนวนตัวอย่าง 10 ราย เจาะเลือดโดยไม่รัดแขน และรัดแขน จากคน ๆ เดียวกัน โดยกระทำต่อเนื่องกัน แล้วนำไปตรวจหาค่าแคลเซียมทันที ใช้ Student's t-test วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าแคลเซียมที่ได้จากการเจาะเลือดโดยสองเทคนิคนี้

5.11 การศึกษาความคงทนของแคลเซียมเมื่อตั้งเลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ศึกษาจากตัวอย่าง 12 ราย โดยปั่นแยกซีรัมจากเลือดแข็งตัวที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ นำซีรัมมาตรวจหาค่าแคลเซียม คำนวณเปอร์เซ็นต์ความแตก

ต่างของค่าที่ได้ โดยใช้ค่าแคลเซียมที่ตรวจจากซีรัมที่ปั่นแยกภายในเวลาไม่เกินหนึ่งชั่วโมงเป็นค่าเริ่มต้น

5.12 การศึกษาความคงทนของแคลเซียมเมื่อเก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ นำซีรัมสดจำนวน 10 ราย แบ่งเป็นรายละ 10 ส่วน บรรจุในถ้วยเล็กที่มีฝาปิดเก็บไว้ที่สองอุณหภูมิ คือ ในตู้เย็น (4-8°C) และอุณหภูมิแช่แข็งในตู้เย็น (ประมาณ -3 ถึง -4°C) สำหรับซีรัมที่เก็บไว้ที่ 4-8°C จะนำมาตรวจหาค่าแคลเซียมทุกวันจนครบ 7 วัน ส่วนซีรัมแช่แข็งจะนำมาตรวจหาค่าแคลเซียมเมื่อเก็บครบ 7, 10 และ 14 วัน วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าที่ได้ โดยถ้าค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของค่าแคลเซียมที่ตรวจได้ไม่เกิน 2CV แสดงว่าความแปรปรวนนั้นอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

5.13 ช่วงค่าอ้างอิง นำซีรัมที่ไม่ขุน ไม่เหลืองจัด และไม่มีฮีโมลิตซิสจากคนปกติ 100 ราย มาหาค่าแคลเซียมโดยวิธี CPC ที่ปรับปรุงใหม่ ทำการตรวจวัดในวันเดียวกับที่เจาะโลหิต

ผลการทดลอง

1. ความเที่ยงตรง เมื่อใช้ซีรัมที่มีระดับแคลเซียมปกติ ต่ำ และสูง ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 25 ครั้งภายในวันเดียว และใช้ lyophilized control serum ที่มีระดับแคลเซียมปกติ ทำการวิเคราะห์วันละสองราย เป็นเวลา 10 วัน พบว่าทั้ง intra assay และ inter assay precision ของเทคนิควิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ดี คือ มี CV < 3% (ตารางที่ 1)

Table 1 Intra assay and inter assay precision for serum total calcium determination by modified o-cresolphthalein complexone (CPC) method and atomic absorption spectrophotometric (AAS) method.

Method	Intra assay precision			Inter assay precision* (Monitrol level I)
	low	normal (pooled sera)	high	
Modified CPC				
N	25	25	25	20
mean (mg/dl)	6.67	7.88	12.96	8.96
SD (mg/dl)	0.10	0.22	0.27	0.21
CV (%)	1.50	2.79	2.08	2.34
AAS				
N	25	25	25	20
mean (mg/dl)	6.18	7.71	12.35	9.45
SD (mg/dl)	0.09	0.14	0.10	0.13
CV (%)	1.46	1.82	0.81	1.38

*Tested at only normal level because of shortage of specimens with abnormal calcium values.

2. ความแม่นยำ

2.1 การศึกษาการวิเคราะห์หักกลับคืน (Recovery study) เมื่อเติม calcium ปริมาณ 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/dl ได้ค่า % recovery 108.0, 101.0 และ 98.7% ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ย 102.6%

2.2 การเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์กับวิธีอ้างอิง คือ วิธี AAS (Method comparison study) พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี คือ $r = 0.981$ ($p < 0.001$) $y = 0.98x + 0.05$ (รูปที่ 1) และค่าแคลเซียมที่ได้จากทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน ($p > 0.005$) ที่ทุกระดับ จึงแสดงว่าวิธีนี้ให้ค่าวิเคราะห์ที่ไม่มีความคลาดเคลื่อน เมื่อพิจารณาจาก regression analysis

มี proportional systematic error 2% และ constant systematic error 0.05 mg/dl

3. Linear range และ minimal detection limit

พบว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงอย่างน้อยถึงความเข้มข้นแคลเซียม 20 mg/dl และความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ คือ 2.0 mg/dl (รูปที่ 2)

4. ความคงตัวของซีรัมที่เกิดขึ้น เมื่อแคลเซียมในซีรัมทำปฏิกิริยากับน้ำยา CPC ซีรัมที่เกิดขึ้นมีความคงตัวอย่างน้อย 4 ชั่วโมง เมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้นแคลเซียมต่ำปกติ และสูง (รูปที่ 3)

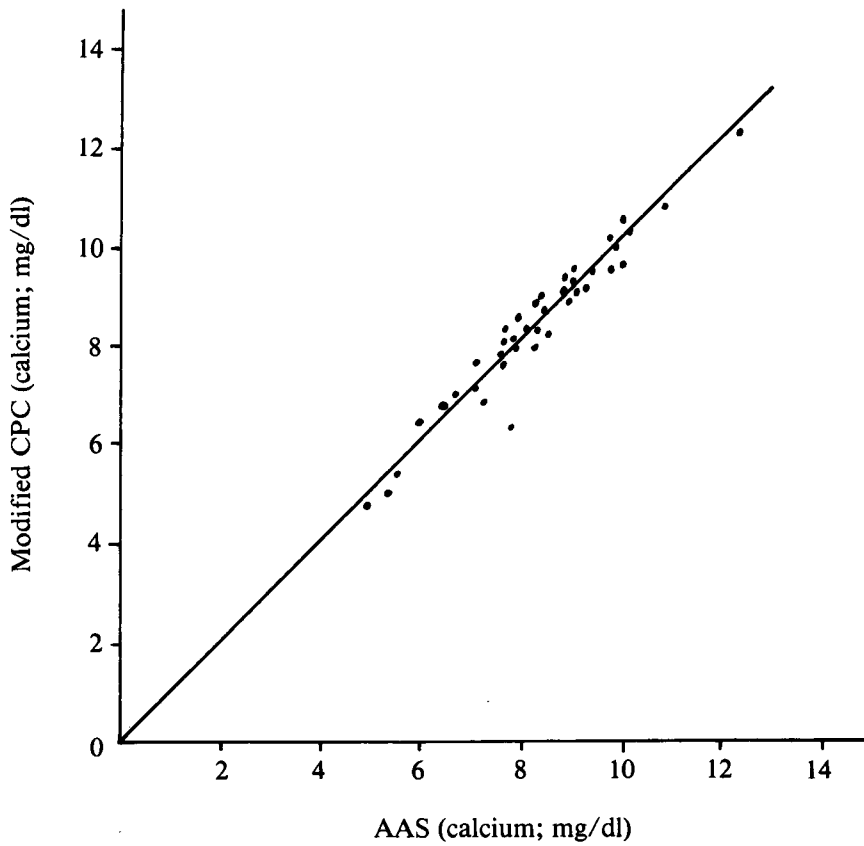


Figure 1 Comparison of serum total calcium concentration determined by modified CPC and atomic absorption spectrophotometric methods (n=40) $y = 0.98x + 0.05$; $r = 0.981$ ($p < 0.001$)

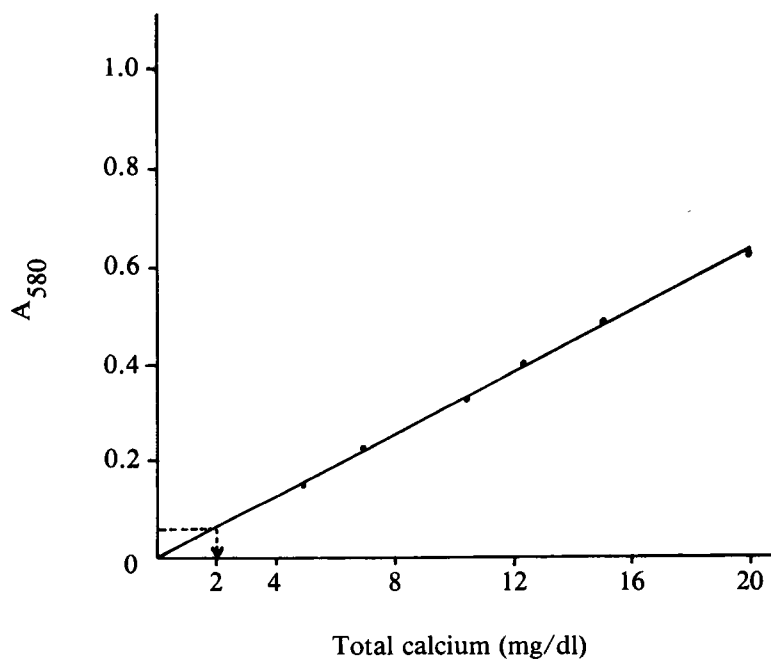


Figure 2 Linear range and minimal detection limit of serum total calcium determination using modified CPC method.

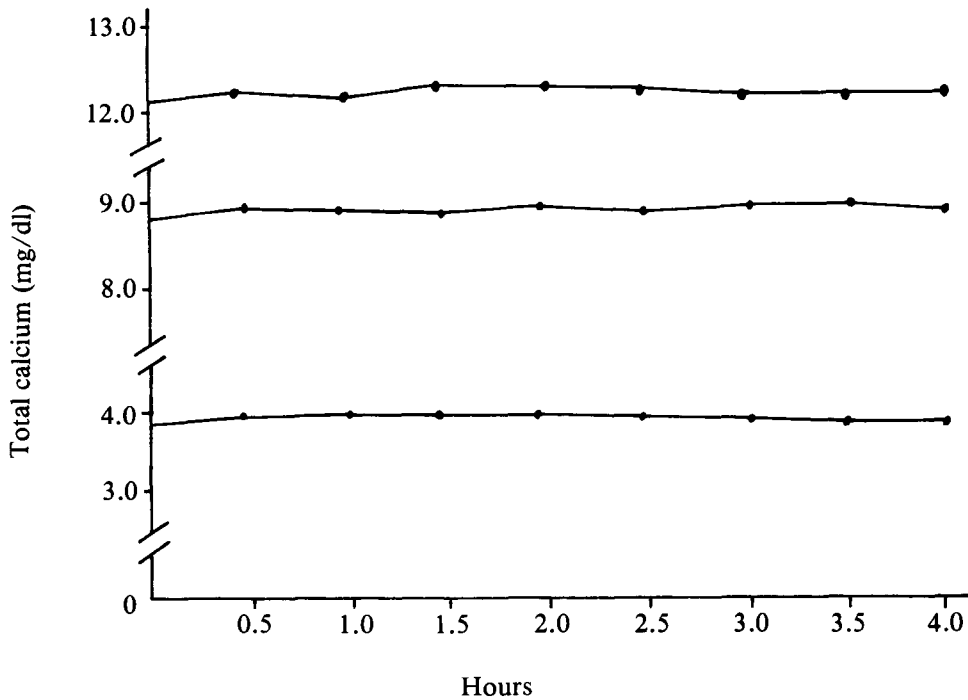


Figure 3 Stability of color produced in the determination of serum total calcium by modified CPC method. Tests were done at low, normal and high calcium concentrations.

5. ผลของสารรบกวนต่าง ๆ ฮีโมโกลบินที่ความเข้มข้น < 0.87 g/dl, บิลิรูบินที่ความเข้มข้น < 20.0 mg/dl, แมกนีเซียมที่ความเข้มข้น < 5 mg/dl ไม่รบกวนการหาค่าแคลเซียม (รูปที่ 4) ส่วน ascorbic acid, salicylate, paracetamol และ penicillin G ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้รักษา ไม่มีผลรบกวนต่อการหาค่าแคลเซียม โดยวิธีที่ปรับปรุงใหม่นี้เช่นกัน (รูปที่ 5)

6. ผลรบกวนจากภาวะเลือดคั่ง การรัดหลอดเลือดดำขณะเจาะเลือด ซึ่งทำให้เลือดคั่ง มีผลรบกวนต่อการตรวจหาค่าแคลเซียมโดยให้ค่าแตกต่างจากเมื่อไม่รัดหลอด

เลือดดำขณะเจาะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2)

7. ความคงทนของแคลเซียมเมื่อตั้งเลือดแข็งตัวไว้ที่อุณหภูมิห้องในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ระดับของแคลเซียมที่วัดจากซีรัมที่ปั่นแยกภายในหนึ่งชั่วโมง และที่ปั่นแยกภายหลังจากที่ตั้งเลือดแข็งตัวไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3)

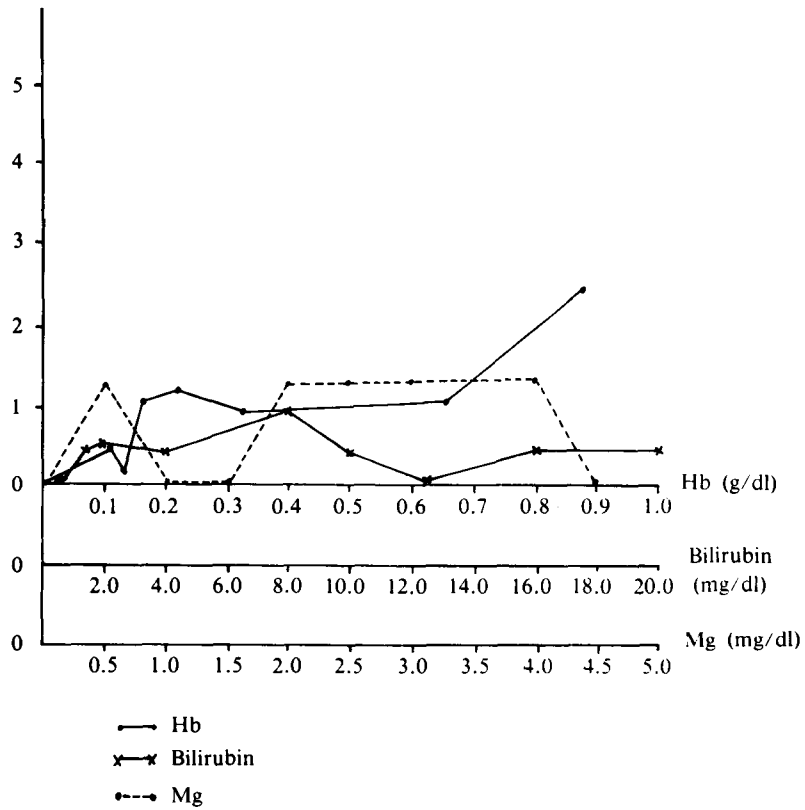


Figure 4 Interference of hemoglobin, bilirubin and magnesium on serum total calcium determination by modified CPC method.

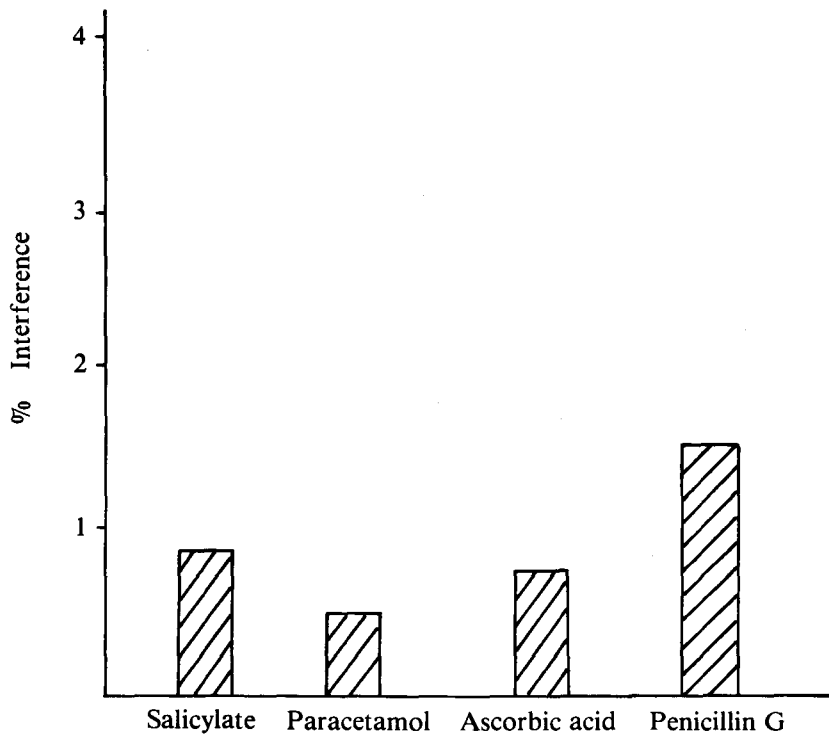


Figure 5 Effects of salicylate, paracetamol, ascorbic acid and penicillin G on the determination of total calcium by modified CPC method.

Table 2 Effect of venous stasis on serum total calcium determination by modified CPC method.

Serum Total calcium* (mg/dl)		
Without venous stasis	With venous stasis	
9.4	9.4	
9.1	9.5	
8.8	8.8	
9.0	9.6	
9.1	9.6	
8.5	9.5	
9.2	9.5	
9.0	9.1	
9.7	9.8	
9.0	9.5	
mean ± SD	9.08 ± 0.32	9.43 ± 0.28

*p < 0.05 (Student's paired t-test)

Table 3 Total calcium level determined from serum separated from clotted blood which was left at room temperature for various times.

Hour No.	Total calcium (mg/dl)			
	1	2*	3*	4*
1	8.7	8.7	8.7	8.7
2	8.2	8.3	8.2	—
3	8.8	8.5	8.5	8.5
4	8.3	8.3	8.1	7.7
5	8.5	8.5	8.5	8.4
6	8.4	8.4	8.5	8.5
7	8.7	8.7	8.6	8.5
8	8.6	8.6	8.4	8.6
9	8.0	8.4	8.4	8.5
10	8.4	8.4	8.5	8.7
11	8.0	8.0	7.9	8.1
12	7.9	7.6	7.9	7.8
mean ± SD	8.38 ± 0.30	8.37 ± 0.31	8.35 ± 0.26	8.36 ± 0.34

*No significant difference when compared with values of 1 hour (p > 0.05, Student's paired t - test)

8. ความคงทนของแคลเซียมเมื่อเก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ระดับแคลเซียมที่ตรวจจากซีรัมที่เก็บที่ 4°C เป็นเวลา 7 วัน และจากซีรัมที่เก็บแช่แข็งนาน 14 วัน ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่าที่ได้จากซีรัมสด เมื่อทดสอบทุกระยะเวลาที่ตรวจ โดยมีค่าการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า 2% (p > 0.05 และ p > 0.005 ตามลำดับ)

9. ช่วงค่าอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ค่าแคลเซียมในซีรัมของคนปกติจำนวน 100 ราย พบว่ามีค่าเฉลี่ย 8.65 mg/dl, ความเบ้ของโค้งการกระจายความถี่ = + 0.138 มีค่าอ้างอิงอยู่ระหว่าง 7.75 - 9.65 mg/dl

10. อายุของน้ำยา เมื่อเก็บน้ำยาทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4°C พบว่าสามารถใช้น้ำยานี้ตรวจวัดแคลเซียมได้โดยค่าไม่เปลี่ยนแปลง ภายในช่วงเวลาอย่างน้อยสามเดือน

วิจารณ์

วิธีตรวจวัดแคลเซียมโดยใช้สี CPC ที่ปรับปรุงใหม่นี้ได้ใช้ glycine เป็นบัฟเฟอร์ซึ่งไม่เคยมีผู้นำมาใช้ในการหาค่าแคลเซียมมาก่อน ผลที่ได้มีความสัมพันธ์ดีกับวิธี CPC เดิม⁽¹¹⁾ วิธีที่ปรับปรุงนี้มีความเที่ยงตรงอยู่ในเกณฑ์ดี มีความแม่นยำดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง สีที่เกิดขึ้นคงที่อยู่นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ทำให้สะดวกในกรณีที่ไม่สามารถทำการวัดได้ทันทีภายหลังการเกิดปฏิกิริยา ในการศึกษานี้ได้ใช้หลอดควิเวตต์ที่มีน้ำยาเป็นตัวปรับศูนย์ก่อนที่จะเติมซีรัมเพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อน ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนแคลเซียม แต่ถ้าหลอดทดลองที่ใช้ทำปฏิกิริยามีความสะอาดปราศจากแคลเซียมอย่างแท้จริงแล้วจะสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาพร้อมกันหลาย ๆ หลอด โดยใช้หลอดน้ำยาเป็น blank แยกต่างหากได้ และสามารถตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ จนกว่าผู้ทำการวิเคราะห์จะมีเวลามาวัดค่าการดูดแสงในภายหลัง

วิธีนี้มีความไวดี เพราะสามารถตรวจวัดค่าแคลเซียมได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 2 mg/dl ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำมาก และหากจำเป็นยังสามารถเพิ่มความไวของเทคนิคให้ตรวจวัดได้ตั้งแต่ 1.2 mg/dl โดยปรับน้ำยาให้มี pH สุดท้ายเป็น 10.55 ซึ่งน้ำยาดังกล่าวนี้มีคุณสมบัติการนำมาใช้ (performance characteristics) ตลอดจนช่วงค่าอ้างอิงเหมือนน้ำยา pH 10.0 (จากประสบการณ์ของคณะผู้วิจัย ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่จะตรวจวัดได้ คือ อย่างน้อยถึง 20 mg/dl ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงมากเกินกว่าที่จะตรวจพบในคนปกติหรือผู้ป่วย

สารต่าง ๆ หลายชนิดที่อาจมีอยู่ในซีรัมที่ส่งตรวจก็ไม่มีผลรบกวนที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบและเมื่อศึกษาต่อไปถึงภาวะต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อการหาค่าแคลเซียมก็พบว่าสามารถตั้งเลือดแข็งตัวไว้ได้นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ก่อนปั่นแยก

ซีรัม โดยไม่ทำให้ค่าที่ตรวจวัดได้เปลี่ยนแปลง ซึ่งเป็นข้อดี เพราะห้องปฏิบัติการส่วนมากมักไม่สามารถปั่นแยกซีรัมได้ทันที ภายหลังการเจาะเลือด นอกจากนี้หากไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาค่าแคลเซียมได้ภายในวันนั้นก็ยังสามารถเก็บซีรัมที่ 4-8°C หรือแช่แข็งไว้ได้นานอย่างน้อย 7 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มากเกินไปสำหรับการเก็บซีรัมเพื่องานตรวจวิเคราะห์ประจำวัน

การรัดแขนที่แน่นหรือนานเกินไปขณะเจาะเลือดจะทำให้เกิด hemoconcentration โปรตีนบริเวณที่เจาะเลือดมีความเข้มข้นมากขึ้น เนื่องจากมีน้ำบางส่วนออกไปจากหลอดเลือด จึงอาจทำให้ค่าของแคลเซียมเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะมาจากส่วนของแคลเซียมที่ยึดกับโปรตีน⁽¹⁴⁾ และผลการศึกษาี้เสนอแนะว่า เมื่อเจาะเลือดเพื่อตรวจหาระดับแคลเซียมไม่ควรเจาะโดยการรัดแขนถึงแม้จะเป็นการรัดแขนที่ไม่แน่นหรือนานเกินไปก็ตาม เพราะจะทำให้ระดับแคลเซียมสูงกว่าปกติ

เนื่องจากค่าอ้างอิงของวิธีนี้ใกล้เคียงกับวิธีทั่ว ๆ ไปที่อ้างอิงไว้ในตำราเคมีคลินิก⁽¹⁵⁾ จึงสามารถนำเทคนิคนี้มาใช้แทนวิธีที่ใช้อยู่เดิมได้เลย และเทคนิคนี้เป็นวิธีที่เตรียมน้ำยาได้ง่าย ใช้ glycine ซึ่งมีราคาถูก ปลอดภัย น้ำยามีอายุการใช้งานนาน ทำการวิเคราะห์ได้ง่ายและให้ผลการวิเคราะห์เที่ยงตรงและแม่นยำดี จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่จะใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ชัยเวช นุชประยูร ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และ ผศ.เอมอร จันทรเวทิน ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างซีรัม และขอขอบคุณคุณสมใจ ตัญศิริ สำหรับงานพิมพ์ต้นฉบับ

อ้างอิง

1. Fraser D, Jones G, Kooh SW, Radde IC. Calcium and phosphate metabolism. In: Tietz NM, ed. Fundamentals of Clinical Chemistry. 3 rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 1987. 705
2. Halsted JA. The Laboratory in Clinical Medicine: Interpretation and Application: Philadelphia: W.B. Saunders, 1980, 714
3. Fuchs C, Dorn D, McIntosh C, Scheler F. Comparative calcium ion determination in

plasma and whole blood with a new calcium ion analyzer. Clin Chim Acta 1976 Feb; 67(1) : 99-102

4. Grima JM, Brand MJD. Activity and interference effects in measurement of ionized calcium with ion-selective electrodes. Clin Chem 1977 Nov; 23(11) : 2048-2054
5. Pybus J, Feldman FI, Bowers GN Jr. Measurement of total calcium by atomic absorption spectrophotometry with use of a strontium

- internal reference. Clin Chem 1970 Dec; 16(12) : 998-1007
6. Cali JP, Bowers GN Jr., Young DS. A reference method for the determination of total calcium in serum. Clin Chem 1973 Sep; 19(9) : 1208-1213
 7. Connerty HV, Briggs AR. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. Am J Clin Pathol 1966 Mar; 45(3) : 290-296
 8. Morin LS. Direct colorimetric determination of serum calcium with o-cresolphthalein complexone. Am J Clin Pathol 1974 Jan; 61(1) : 114-117
 9. Moorehead WR, Biggs HG. 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. Clin Chem 1974 Nov; 20(11) : 1458-1460
 10. West P. Measurement of serum calcium by use of a rapid kit procedure. Clin Chem 1983 Jun; 29(6) : 1315
 11. รัชนา ศานตยานนท์, เอมอร จันทรเวทิน, พรพันธ์ วรรณนวะ. การศึกษาและพัฒนาวิธีการหาระดับแคลเซียมในซีรัม บทคัดย่อ การประชุมสัมมนาวิชาการเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 8 กรุงเทพฯ 2527.
 12. สมพงษ์ จินายน. หลักการประเมินผลคุณสมบัติของเทคนิควิเคราะห์ สำหรับห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ศิริเวชสาร, 2529. 76
 13. Theirs RE, WU GT, Reed AH, Oliver LK. Sample stability: a suggested definition and method of determination. Clin Chem 1976 Feb; 22(2) : 176-183
 14. Woo J, Treuting JJ. Cannon DC. Metabolic intermediates and inorganic ions. In: Henery JB, ed. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia : W.B. Saunders, 1970.290
 15. Clapp JJ. Disorders of calcium and ion metabolism. In: Gornall AG, ed. Applied Biochemistry of Clinical Disorders. Philadelphia : Harper and Row, 1980.308