

การตรวจสังกะสีใน seminal plasma โดยวิธีวัดสีอย่างง่าย

Simple Colorimetric Method for Determination of Zinc Level in Seminal Plasma

ลัทธิทอง พรหมดี¹ วิสุทธิ์ กังวานตระกูล¹ เยาวลักษณ์ ธีระเจตกุล¹ ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์¹
ธนิดา พงษ์ศรีทัศน์² พชรินทร์ สีหาทิพย์³ บุญสนอง ชนะพจน์³

บทคัดย่อ

ได้ทำการตรวจวัดสังกะสีใน seminal plasma โดยวิธีวัดสี (colorimetric method) โดยใช้ 1,2-(pyridylazo)-2-naphthol (PAN) เป็นตัวทำให้เกิดสีในภาวะที่เป็นด่าง การศึกษาให้ผลเป็นที่น่าพอใจโดยพบว่า การตรวจวัดมีความเป็นเส้นตรง (linearity) เท่ากับ 20 มิลลิกรัม% ค่าความไวการตรวจวัด (sensitivity) เท่ากับ 1 มิลลิกรัม% สารประกอบ (color complex) ที่ได้ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และคงตัวอยู่นาน 5-35 นาที หลังการทำปฏิกิริยา การศึกษานี้มีความถูกต้อง (accuracy) เมื่อคิดค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) เท่ากับ 100.9 และผลการศึกษาความแม่นยำ (precision) เมื่อทำการตรวจวัด 20 ค่าพร้อมกันในครั้งเดียว (within-run) และตรวจวัดต่างวันกัน (between-run) 20 วัน พบว่ามีค่า %coefficient of variation เท่ากับ 2.5 และ 2.1 ตามลำดับ ผลการตรวจวัดระดับสังกะสีในตัวอย่าง 80 ราย โดยวิธีวัดสีและวิธี atomic absorption spectrophotometry (AAS) พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.34 และ 13.43 มิลลิกรัม% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจกับวิธี AAS ที่ใช้เป็นวิธีอ้างอิง (reference method) พบว่า ค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์กันดีมากโดยมีค่า $r = 0.986$ และสมการถดถอย $y = -1.8425 + 1.0793x$ ผลการศึกษาแสดงว่า การตรวจวัดสังกะสีใน seminal plasma โดยวิธีวัดสีให้ผลที่ดีและเชื่อถือได้ เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากมีวิธีการตรวจที่ง่ายและรวดเร็วไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ค่าที่ตรวจวัดได้อาจนำไปใช้บอกภาวะการทำงานของต่อมลูกหมากเพื่อช่วยวินิจฉัยการมีบุตรยากในเพศชาย (male infertility)

คำรหัส: สังกะสี • การวัดสี

บทนำ

น้ำอสุจิ (semen) ประกอบด้วยตัวอสุจิ (spermatozoa) และส่วนน้ำของน้ำอสุจิ (seminal plasma) ที่ถูกหลั่งจากต่อมต่างๆ (accessory glands) เช่น ต่อมลูกหมาก (prostate gland) ต่อมเสริมน้ำอสุจิ (seminal vesicle) หลอดเก็บตัวอสุจิ (epididymis) ท่อน้ำอสุจิ (vas deference) เป็นต้น

สังกะสี (zinc; Zn) เป็นโลหะชนิดหนึ่งที่พบมากในน้ำอสุจิ ที่ส่วนใหญ่สร้างได้จากต่อมลูกหมาก และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ (spermatogenesis) ที่เกิดขึ้นที่อัณฑะ เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอร์โมนเทสโตสเตอรอน (testosterone hormone) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต (maturation) และ

¹ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ นักศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



Simple Colorimetric Method for Determination of Zinc Level in Seminal Plasma

Limthong Promdee¹, Wisut Kungwantrakul¹, Yaovaluk Teerajetkul¹, Chuchart Areejittranusorn¹,
Thanida Pongsritat², Patcharin Sihatip³, Boosanong Chanapod³

Abstract

Zinc level in seminal plasma was determined by colorimetric method based on the reaction between zinc and 1,2-(pyridylazo)-2-naphthol (PAN) in an alkaline solution buffer. The study showed satisfactory results with the linearity of 20 mg% and the sensitivity of 1 mg%. The colored complex showed maximum absorption at 550 nm and was stable for 5-35 min. An average recovering percentage of zinc added to seminal plasma was 100.9. Within-run assay for 20 replicates performed on the same day and between-run assay after analysis of 20 replicates on different day revealed %CV of 2.5 and 2.1, respectively. Zinc contents in 80 randomly selected Thai males analyzed by the present colorimetric method and atomic absorption spectrophotometer (AAS), which used as reference method, showed mean value of 14.34 and 13.43 mg%, respectively. The results obtained by colorimetric method correlated well with those of AAS, $r = 0.986$ and regression equation; $y = -1.8425 + 1.0793x$. The present study indicated that zinc determination by colorimetric method was simple, fast, economical, reliable, and suitable to assess prostatic function for investigation of male infertility.

Key words: zinc • seminal plasma • colorimetric method

การทำงานของเชื้ออสุจิ เช่น การเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิ (sperm motility)¹ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนเกี่ยวกับบทบาทของสังกะสีต่อการทำงานของเชื้ออสุจิ แต่มีรายงานว่าระดับสังกะสีในเชื้ออสุจิที่มีการเคลื่อนที่น้อย (asthenozoospermia) ต่ำกว่าเชื้ออสุจิในกลุ่มอื่นๆ² แต่บางรายงานพบว่า ระดับสังกะสีในกลุ่มที่ไม่มีเชื้ออสุจิ (azoospermia) และมีจำนวนเชื้อน้อย (oligozoospermia) มีระดับต่ำกว่ากลุ่มอื่นที่ศึกษา³ ได้มีผู้ศึกษาระดับสังกะสีในเพศชายต่อการมีบุตรพบว่า ระดับสังกะสีในชายที่เป็นหมันไม่ต่างจากชายปกติ⁴ อย่างไรก็ตาม การให้คนไข้ที่มีระดับสังกะสีใน seminal plasma

ต่ำรับประทานสังกะสีมีผลทำให้สังกะสีในส่วนไอของน้ำอสุจิสูงขึ้นและเชื้ออสุจิมีการเคลื่อนที่ดีขึ้น^{5,6} ซึ่งหมายถึงการเพิ่มโอกาสให้มีการปฏิสนธิมากขึ้น การทราบระดับสังกะสีในน้ำอสุจิอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ชายที่มีบุตรยากเนื่องจากระดับสังกะสีในน้ำอสุจิต่ำหรือใช้ประเมินการทำงานของต่อมลูกหมาก

การตรวจวัดสังกะสีสามารถทำได้โดยการวัดสี (colorimetric method)⁷⁻⁹ ไม่ว่าจะเป็นด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automatic analyzer)¹⁰ หรือโดยวิธีใช้มือ (manual method) และการตรวจวัดโดยวิธี atomic absorption spectrophotometry (AAS) ซึ่ง

¹ Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

² Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

³ The 4th student, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

ใช้เป็นวิธีอ้างอิง (reference method) การตรวจวัดโดยวิธีแรกมีข้อดีคือ เป็นการตรวจวัดโดยใช้เครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และขั้นตอนการตรวจวัดไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาน้อย แต่มีข้อเสียคือ การตรวจวัดโดยวิธีนี้มีความจำเพาะต่ำกว่าวิธี AAS เนื่องจากมีสารรบกวนที่สามารถให้เกิดสียอยู่ในน้ำอสุจิ ส่วนการตรวจวัดโดยวิธี AAS นั้นถึงแม้จะมีความจำเพาะและความไวมากกว่าวิธีแรกแต่มีข้อเสียคือต้องการเครื่องมือพิเศษที่มีราคาแพงและการเตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางก่อนทำการตรวจวัดอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดความผิดพลาดจากการเจือจางได้ ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะตรวจวัดระดับสังกะสีโดยวิธีวัดสีเทียบกับวิธี AAS ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการขณะนี้ ผลที่ได้ได้นำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดสังกะสีในงานประจำต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การตรวจวัดสังกะสีโดยวิธี AAS

การตรวจวัดระดับสังกะสีใช้เครื่อง atomic absorption spectrophotometer GBC 908 (AAS GBC 908, Australia) และตั้งค่าตัวชี้วัด (parameters) ตามที่บริษัทแนะนำ¹¹ โดยใช้ lamp current เท่ากับ 5.0 มิลลิแอมป์ วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 213.9 นาโนเมตร และใช้ air:acetylene เป็นก๊าซสำหรับเผาไหม้ สารละลายมาตรฐานสังกะสีใช้ zinc standard solution ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม% (Lot 44887/1, Fluka; Switzerland) โดยนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัม% เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐานในการตรวจวัด สารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้เก็บในขวดแก้วและเตรียมใหม่ทุกเดือน ในการตรวจวัดใช้น้ำปราศจากไอออนปรับศูนย์และตรวจวัดสารละลายมาตรฐานก่อนทำการตรวจวัดและระหว่างการตรวจวัดทุกครั้ง

2. การตรวจวัดสังกะสีโดยวิธีวัดสี

การตรวจวัดวิธีนี้ประยุกต์จากการศึกษาของ Fuentes และคณะ⁷ โดยใช้ seminal plasma ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำยาได้สารประกอบที่มีสี วัดการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV 1201V, Shimadzu, Japan) ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณสังกะสีที่มีในสิ่งส่งตรวจ อ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่สร้างโดยใช้สารละลายมาตรฐานสังกะสีความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัม% โดยใช้น้ำปราศจากไอออนแทนตัวอย่างในหลอด blank และวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้หลอด blank ปรับศูนย์

น้ำยาที่ใช้ (working solution) เกิดจากการรวมกันระหว่าง buffer solution 100 มิลลิลิตร magnesium-masking solution 900 มิลลิลิตร และสารละลาย 1,2-(pyridylazo)-2-naphthol (PAN) 20 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนีย (ammonia) 820 มิลลิโมล/ลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride) 110 มิลลิโมล/ลิตร ฟลูออไรด์ (fluoride) 265 มิลลิโมล/ลิตร โซเดียมลอริลซัลเฟต (sodium lauryl-sulfate) 68 มิลลิโมล/ลิตร เมทานอล (methanol) 483 มิลลิโมล/ลิตร และ PAN 79 มิลลิโมล/ลิตร สารทุกชนิดที่ใช้มีความบริสุทธิ์ระดับ analytical grade การเตรียมสารละลายต่างๆ มีดังนี้

Buffer solution

ละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (Merck) 6 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนีย (BDH) ความเข้มข้น 25% (V/V) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 10.0 และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Dissolving and magnesium masking solution

ละลายโซเดียมลอริลซัลเฟต (APS) 10 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน 500 มิลลิลิตร เติมโซเดียมฟลูออไรด์ (Fluka) 11.76 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้ครบ 900 มิลลิลิตร

PAN solution

ละลาย 1,2-(pyridylazo)-2-naphthol (Sigma) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียม seminal plasma

เตรียม seminal plasma ตามวิธีของ Henkel¹² โดยประยุกต์บางส่วน โดยนำตัวอย่างน้ำอสุจิที่ได้จากเพศชายที่ได้รับการตรวจและรักษาที่คลินิกมีบุตรยาก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยคัดเลือกแบบสุ่มจำนวน 80 ราย หลังจากได้รับตัวอย่างแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้ให้น้ำอสุจิเหลว (liquefied) ก่อนนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Kokuzan H103N, Japan) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังการปั่นแยกส่วนใส (supernatant) ที่เป็น seminal plasma ออกไปและปั่นอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 15 นาที เพื่อกำจัดสารที่อาจปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงแยกส่วนใสใสหลอดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

ก่อนการตรวจวัด นำตัวอย่างมาทำให้ละลายโดยวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการตรวจวัดโดยวิธี AAS ให้เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 200 เท่า และทำการตรวจวัดซ้ำ 2 ครั้ง ทุกตัวอย่าง ส่วนการวัดสีให้ดูดตัวอย่างไปใช้ได้โดยตรง

4. การเตรียม seminal plasma รวม (pooled seminal plasma)

นำ seminal plasma ที่เตรียมได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากทุกตัวอย่างมาผสมรวมกันและแบ่งเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน ตัวอย่างที่เตรียมได้นำไปใช้ศึกษาความถูกต้อง (accuracy study) และความแม่นยำ (precision study) ของการตรวจวัดทั้ง 2 วิธี

5. การศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity)

นำสารละลายมาตรฐานสังกะสีความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัม% มาทำการตรวจวัดด้วยวิธี AAS ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง และใช้สารละลายมาตรฐานสังกะสีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัม% มาทำการตรวจวัดโดยวิธีวัดสีความเข้มข้นละ 2 ครั้ง จากนั้นนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นมาเขียนกราฟโดยให้แกนตั้ง (Y) เป็นค่าการดูดกลืนแสงและแกนนอน (X) เป็นค่าความเข้มข้น เลือกความเข้มข้นสุดท้ายที่ยังให้กราฟเป็นเส้นตรงเป็นค่าความเป็นเส้นตรงการตรวจวัด

6. การศึกษาความคงตัวของสี (color stability) ของวิธีวัดสี

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาความคงตัวของสีหลังทำปฏิกิริยา การศึกษาครั้งนี้จึงได้หาความคงตัวของสีที่เกิดขึ้นโดยนำตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดมาทำปฏิกิริยาและวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังทำปฏิกิริยาเสร็จและทุกๆ 5 นาที จนกระทั่งเห็นค่าการดูดกลืนแสงลดลงหรือเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยใช้น้ำยาที่ไม่ได้เติมตัวอย่างเป็น blank นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างการดูดกลืนแสงและเวลา เพื่อให้เห็นภาพการเปลี่ยนแปลง

7. การหาความยาวคลื่นของวิธีวัดสีที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorption)

เพื่อหาความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง การศึกษาครั้งนี้จึงได้หาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารประกอบ PAN และสังกะสีที่มีในตัวอย่างโดยเทียบกับน้ำยาที่ไม่มีตัวอย่างเป็นค่าพื้นฐาน (baseline) ด้วยโปรแกรม spectrum ของเครื่อง spectrophotometer UV 1201V (Shimadzu, Japan) โดยวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 400-650 นาโนเมตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงทุก 50 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นที่ได้มาเขียนกราฟ เลือกความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา

8. การหาความไว (sensitivity) ของวิธีวัดสี

นำสารละลายมาตรฐานสังกะสีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4 มิลลิกรัม% มาทำการตรวจวัด เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐานสังกะสี และพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดที่อยู่บนแนวเส้นตรงของกราฟให้ถือว่าเป็นความไวของการทดสอบ

9. การศึกษาความถูกต้อง (accuracy study)

วิธี AAS

เตรียมตัวอย่าง A โดยผสม seminal plasma รวมที่เจือจาง 1:300 ด้วยน้ำปราศจากไอออนและมีความเข้มข้นเท่ากับ 43.78 ไมโครกรัม% เตรียมตัวอย่าง B, C, และ D โดยเติมสารละลายมาตรฐานสังกะสีให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 47.11, 50.45, และ 53.78 ไมโครกรัม% ตามลำดับ และนำไปตรวจวัดระดับสังกะสีในตัวอย่างทั้งสี่โดยตรวจวัดซ้ำ 2 ครั้ง นำค่าที่ตรวจวัดได้มาคำนวณค่าความถูกต้องโดยคิดจากค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) จากความสัมพันธ์

$$\frac{\text{สารละลายมาตรฐานสังกะสีที่ตรวจวัดได้}}{\text{สารละลายมาตรฐานสังกะสีที่เติมลงไป}}$$

วิธีวัดสี

เตรียมตัวอย่าง A โดยเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้น 7.0 มิลลิกรัม% เตรียมตัวอย่าง B, C และ D โดยเติมสารละลายมาตรฐานสังกะสีลงในตัวอย่าง A ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10, 12.5, และ 16.1 มิลลิกรัม% ตามลำดับ ตรวจวัดระดับสังกะสีในตัวอย่างทั้งสี่ ตัวอย่างละ 2 ครั้ง คำนวณหาระดับสังกะสีและนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความถูกต้องโดยคิดจากค่าร้อยละการกลับคืนเหมือนวิธีการข้างต้น

10. การศึกษาความแม่นยำ (precision study)

การศึกษาแบบ within-run study

สำหรับวิธี AAS ใช้ seminal plasma รวมที่เจือจาง 3 ค่า คือ ค่าต่ำ ค่ากลางและค่าสูง ที่อ่านจากกราฟมาตรฐาน โดยเจือจาง 1:150, 1:200 และ 1:300

สำหรับวิธีวัดสีใช้ seminal plasma รวม นำตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจวัด 20 ครั้งติดต่อกันในเวลาเดียวกัน

การศึกษาแบบ between-run study

สำหรับวิธี AAS ใช้ seminal plasma รวมที่เจือจาง 3 ค่า คือ ค่าต่ำ ค่ากลางและค่าสูง เมื่ออ่านจากกราฟมาตรฐานโดยเจือจาง 1:150, 1:200 และ 1:300 ส่วนวิธีวัดสีใช้การตรวจวัดจาก seminal plasma รวมที่ไม่เจือจาง โดยนำตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจวัดวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 20 วัน

นำค่าที่ได้จากการตรวจวัดมาหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation; %CV)

11. การกำจัดสารปนเปื้อน

เพื่อกำจัดสารที่อาจปนเปื้อนระหว่างการตรวจวัดเครื่องแก้ว อุปกรณ์พลาสติกทุกชนิดได้นำไปแช่ใน 10% HNO₃ (BDH, England) ซ้ำมคืน ล้างด้วยน้ำกลั่นและน้ำปราศจากไอออนและอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

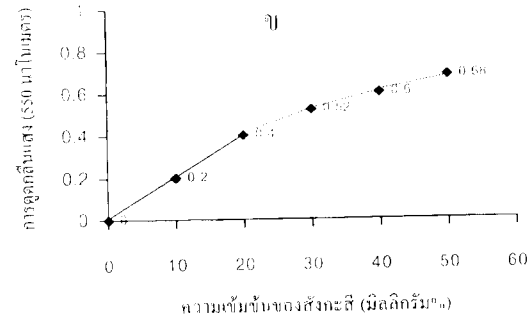
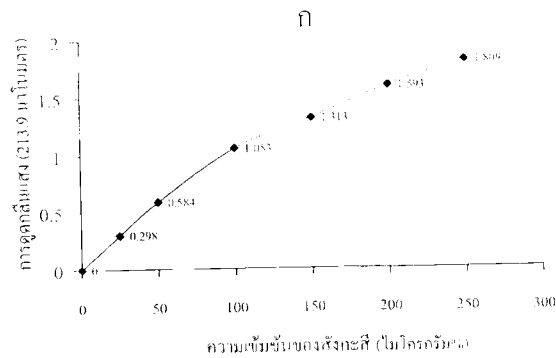
12. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ตรวจวัดได้โดยวิธี AAS และวิธีวัดสี

นำตัวอย่างจำนวน 80 รายไปตรวจวัดโดยวิธี AAS และวิธีวัดสี หาความสัมพันธ์ของการตรวจวัดทั้ง 2 วิธี โดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จาก 2 วิธี โดยใช้สถิติ paired sample t-test ที่คำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0

ผลการศึกษา

ผลการตรวจวัดสังกะสีใน seminal plasma โดยวิธี AAS

ผลการตรวจวัดระดับสังกะสีโดยวิธี AAS พบว่ามีค่าความเป็นเส้นตรง 100 ไมโครกรัม% (รูปที่ 1ก) ผลการศึกษาความถูกต้องโดยการเติมสารละลายมาตรฐาน



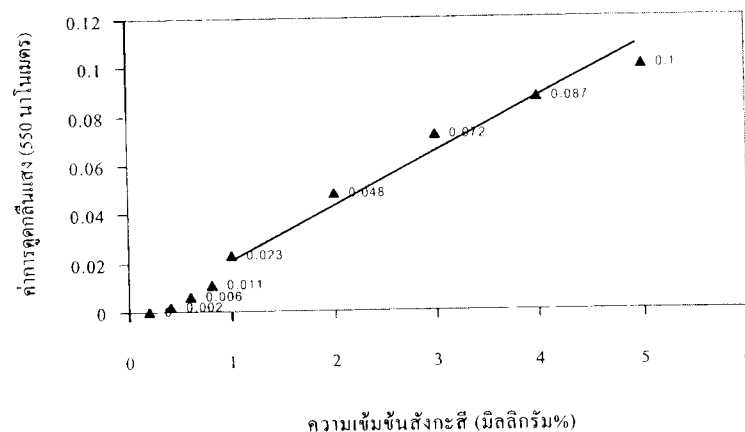
รูปที่ 1 ความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสังกะสี โดยวิธี AAS (ก) และ วิธีวัดสี (ข)

สังกะสีในส่วนไอของน้ำอสุจิ ให้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 109 ± 16.5 (mean $\pm$ SD) ผลการศึกษาความแม่นยำแบบ within-run โดยตรวจวัดระดับสังกะสีที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 90.0, 64.5 และ 42.0 ไมโครกรัม% และตรวจวัดซ้ำกัน 2 ครั้งในแต่ละตัวอย่างพบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 3.14, 3.21 และ 3.46 ตามลำดับ ส่วนผลการศึกษา between-run โดยการตรวจวัดระดับสังกะสีที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 89.1, 66.7 และ 45.9 ไมโครกรัม% ตรวจวัดวันละ 1 ครั้งใน 20 วันให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 2.85, 3.93 และ 5.86 ตามลำดับ

ผลการตรวจวัดสังกะสีใน seminal plasma โดยวิธีวัดสี

ผลการศึกษาคุณสมบัติการตรวจวัดสังกะสีโดยวิธีวัดสีพบว่า มีค่าความเป็นเส้นตรงถึง 20 มิลลิกรัม% (รูปที่

1ข) ที่เป็นไปตามกฎของ Beer Lambert หลังจากนั้นค่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นแต่ไม่อยู่ในแนวเส้นตรง ส่วนผลการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง PAN-Zn พบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 550 นาโนเมตร โดยช่วงการดูดกลืนแสงอยู่ระหว่าง 490-560 นาโนเมตร เมื่อศึกษาความคงตัวของสารประกอบที่เกิดขึ้นพบว่า สีที่เกิดขึ้นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดหลังทำปฏิกิริยาหลังจากนั้นการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อยและคงที่อยู่ในช่วงเวลา 5-35 นาที หลังทำปฏิกิริยาเมื่อศึกษาความไวของการตรวจวัดพบว่า การวัดสีมีความไวเท่ากับ 1 มิลลิกรัม% เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ยังอยู่ในแนวเส้นตรงของกราฟ ความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้แม้จะให้ค่าการดูดกลืนแสงแต่ก็ไม่อยู่ในแนวเส้นตรง (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ความไว (sensitivity) ของการวัดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง PAN-Zn

ผลการศึกษาความถูกต้องด้วยวิธีนี้โดยการเติมสารละลายมาตรฐานสังกะสีในส่วนใสของน้ำอสุจิให้ค่าร้อยละการกลับคืน 101 ± 2.5 (mean $\pm$ SD) (ตารางที่ 1) ส่วนผลการศึกษาความแม่นยำพบว่า การตรวจวัดแบบ within-run และ between-run มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 2.5 และ 2.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ตรวจวัดโดยวิธี AAS และวิธีวัดสี

ผลการศึกษาพบว่า การตรวจวัดทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์กันดีมากโดยให้ค่า $r = 0.986$ สมการถดถอย $y = -1.8425 + 1.0793x$ (รูปที่ 3) และพบว่า การตรวจวัดโดยวิธี AAS และวิธีวัดสีให้ค่าเฉลี่ยจากตรวจวัดตัวอย่าง seminal plasma 80 ราย เท่ากับ 13.63 และ 14.34 มิลลิกรัม% ตามลำดับ โดยมีค่าต่ำสุดและสูงสุดของการตรวจวัดโดยวิธี AAS เท่ากับ 2.14 และ 47.65 มิลลิกรัม% ตามลำดับ และโดยวิธีวัดสีเท่ากับ 2.08 และ 47.56 มิลลิกรัม% ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากทั้ง 2 วิธี โดยใช้ paired

sample t-test พบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ค่าเฉลี่ยการตรวจวัดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

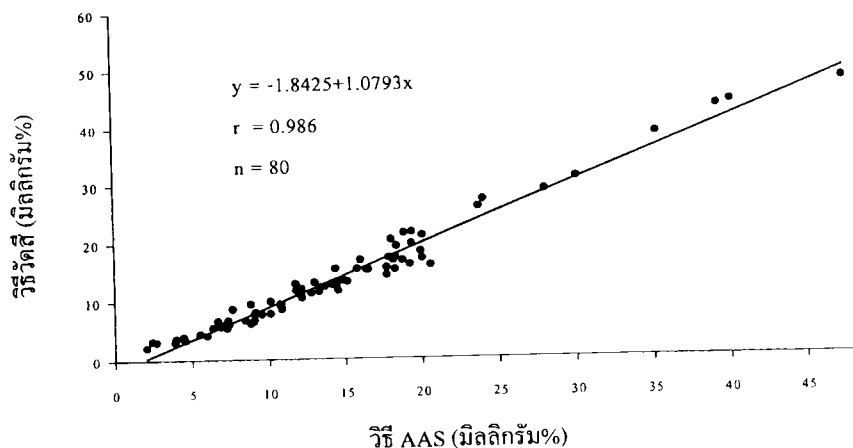
จากผลการศึกษาการตรวจวัดสังกะสีโดยวิธี AAS ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากให้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 100 ไมโครกรัม% และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่า 0.416 ซึ่งครอบคลุมค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจวัดตัวอย่างที่เจือจาง 200 เท่า ค่าที่ได้จากการหาค่าความเป็นเส้นตรงนี้ได้นำไปใช้ในการทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการตรวจวัด โดยควบคุมไม่ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเดียวกันแตกต่างกันมากเกินไปในการตรวจวัดแต่ละครั้ง ส่วนผลการควบคุมการตรวจวัดโดยหาค่าความถูกต้องและรายงานเป็นค่าร้อยละการกลับคืนนั้น ได้เฉลี่ยเท่ากับ 109 ± 6.5 ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจเช่นกัน ส่วนการตรวจวัดแบบ within-run และ between-run ให้ค่า %CV เฉลี่ยเท่ากับ 3.27 และ 4.21 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้อยู่

ตารางที่ 1 การศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดสังกะสีโดยวิธีวัดสี

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม ในตัวอย่าง (มิลลิกรัม%)	ค่าความเข้มข้น เฉลี่ย (มิลลิกรัม%)	ความเข้มข้นที่ได้ กลับคืน (มิลลิกรัม%)	ร้อยละการกลับคืน
A	-	7.0	-	-
B	3	10.1	3.1	103.30
C	6	12.5	5.9	98.30
D	9	16.1	9.1	101.1
Mean $\pm$ SD				101 $\pm$ 2.5

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดสังกะสีโดยวิธีวัดสี

Pooled seminal plasma	ค่าเฉลี่ย (มิลลิกรัม%)	SD	%CV
Within-run study (n=20)	15.23	0.38	2.50
Between-run study (n=20)	11.59	0.48	2.10



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของวิธี AAS (แกน X) และวิธีวัดสี (แกน Y)

ตารางที่ 3 การวัดสังกะสีใน seminal plasma โดยวิธี AAS และวิธีวัดสี

วิธีวัด	จำนวนตัวอย่าง (ราย)	ค่าต่ำสุด-สูงสุด (มิลลิกรัม%)	Mean±SD [#]
วิธี AAS	80	2.14-47.65	13.63±9.23
วิธีวัดสี	80	2.08-47.56	14.34±8.44

*ค่าเฉลี่ยที่ได้จากวิธีวัดสีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าเฉลี่ยที่ได้จากวิธี AAS ($P < 0.05$) โดยใช้สถิติ paired sample t-test

ในช่วงที่ยอมรับได้ และอยู่ในช่วงเดียวกับการตรวจวัดสังกะสีในน้ำไขสันหลังโดยวิธีเดียวกันที่มีค่าระหว่าง 4-12%¹³ ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ใช้สารควบคุมคุณภาพสำเร็จรูป (commercial control) ที่ทราบค่า เนื่องจากไม่มีสารควบคุมคุณภาพของสังกะสีใน seminal plasma ดังนั้น ผู้ศึกษาจึงใช้การตรวจวัดข้างต้นเป็นการควบคุมคุณภาพการตรวจวัดทั้งวิธี AAS และวิธีวัดสี

ส่วนการวัดสีที่ประยุกต์มาจากวิธีการของ Fuentes และคณะ⁷ โดยกำจัดการรบกวนของแมกนีเซียมในตัวอย่างโดยใช้ฟลูออไรด์ไอออนที่แตกตัวจากแอมโมเนียมฟลูออไรด์เป็นตัวจับกับแมกนีเซียมเพื่อป้องกันไม่ให้แมกนีเซียมเข้าจับกับสารที่ทำให้เกิดสีซึ่งในที่นี้คือ PAN แต่เนื่องจากแอมโมเนียมฟลูออไรด์มีราคาแพงในการศึกษานี้จึงใช้โซเดียมฟลูออไรด์แทน การ

ประยุกต์นี้อาจทำให้คุณสมบัติบางอย่างของสารประกอบที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป ผู้ศึกษาจึงได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและพบว่า ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 550 นาโนเมตร โดยช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ระหว่าง 490-560 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับน้ำยาที่ไม่เติมตัวอย่างเป็นค่าการดูดกลืนแสงพื้นฐาน (base line) ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เหมือนกับการศึกษาของ Fuentes และคณะ⁷ ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 550-560 นาโนเมตร และเป็นช่วงความยาวคลื่นเดียวกับการศึกษาของ Gavella¹⁰ ที่ตรวจวัดสังกะสีโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ จากผลการศึกษาที่ได้ผู้ศึกษาจึงเลือกวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แต่ต่างไปจากการศึกษาของ Fuentes และคณะ⁷ ที่วัดการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร

เมื่อศึกษาความคงตัวของสีที่เกิดจากสารประกอบระหว่าง PAN และสังกะสีพบว่า ให้การดูดกลืนแสงสูงสุดหลังทำปฏิกิริยาก่อนที่จะลดลงเล็กน้อยและเพิ่มขึ้นและคงตัวไปจนกระทั่ง 35 นาที หลังทำปฏิกิริยาจากผลที่ได้ผู้ศึกษาจึงเลือกใช้การวัดสีหลังการทำปฏิกิริยา 10 นาที เนื่องจากการวัดความเข้มหลังทำปฏิกิริยา 5 นาที อาจยังอยู่ในช่วงที่การดูดกลืนแสงลดลง ซึ่งการวัดที่เวลานั้นแตกต่างไปจากการศึกษาของ Fuentes และคณะ⁷ ที่วัดการดูดกลืนแสงหลังทำปฏิกิริยา 5 นาที ส่วนการศึกษาความเป็นเส้นตรงนั้นพบว่า การวัดสีให้ค่าความเป็นเส้นตรงถึง 20 มิลลิกรัม% หลังจากนั้นค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นแต่ไม่อยู่ในแนวเส้นตรงซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Fuentes และคณะ⁷ ที่ตรวจวัดให้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 19.6 มิลลิกรัม% แต่ได้ค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Gavella¹⁰ ที่มีค่าความเป็นเส้นตรงถึง 26.12 มิลลิกรัม% จากการศึกษาพบว่า การดูดกลืนแสงสูงสุดที่ได้จากการหาค่าความเป็นเส้นตรงไม่ครอบคลุมทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา สำหรับตัวอย่างที่มีค่าการดูดกลืนแสงนอกช่วงเส้นตรงนี้ ได้เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 เท่าก่อนทำการตรวจวัดซ้ำ ส่วนผลการศึกษาความไวพิจารณาจากความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายมาตรฐานที่ยังให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรงพบว่า ความไวเท่ากับ 1 มิลลิกรัม% ซึ่งจากการตรวจวัดพบว่า ไม่มีตัวอย่างรายใดที่มีค่าการตรวจวัดต่ำกว่าความไวที่ศึกษาได้ โดยค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดด้วยวิธีนี้มีค่าเท่ากับ 2.08 มิลลิกรัม%

ผลการศึกษาความถูกต้องโดยหาค่าร้อยละกลับคืนพบว่า ให้ค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Fuentes และคณะ⁷ แต่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Johnson และ Eliasson⁸ และ Gavella¹⁰ ส่วนความแม่นยำของการตรวจวัดโดยวิธีวัดสีซึ่งพิจารณาจาก %CV แบบ within-run และ between-run มีค่าเท่ากับ 2.5 และ 2.1 ตามลำดับนั้น อยู่ในช่วงเดียวกับการศึกษาที่มีรายงานมาก่อนคือ 2.3-5.8% และ 3.1% ตามลำดับ¹⁰ และใกล้เคียงกับการศึกษาของ Johnson และ Eliasson⁸ ที่มีค่า 2.1-5.7% และ 2.3%

ตามลำดับ เนื่องจาก seminal plasma รวมที่ใช้ควบคุมคุณภาพสำหรับการวัดสีและการวัดโดยวิธี AAS เป็นการเตรียมคนละชุดจึงให้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายแตกต่างกันเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอีกทางหนึ่งผู้ศึกษาได้เก็บสารละลาย PAN ที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บให้พ้นจากแสงและเตรียมใหม่ทุกเดือนเพื่อป้องกันน้ำยาเสื่อมตัว เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลชัดเจนเกี่ยวกับความคงตัวของน้ำยาที่ใช้ตรวจวัด

เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการวัดสีกับวิธีอ้างอิง คือ AAS ในตัวอย่าง 80 ราย ผลการศึกษาพบว่า ทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์กันดีมากโดยมีค่า $r = 0.986$ (สมการถดถอยเท่ากับ $y = -1.8425 + 1.0793x$) ซึ่งค่าที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Fuentes และคณะ⁷ ผลการศึกษาพบว่า วิธีวัดสีและวิธี AAS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.34 และ 13.63 มิลลิกรัม% ตามลำดับ เห็นได้ว่าวิธีวัดสีมีค่าสูงกว่าวิธี AAS เล็กน้อย และเมื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการศึกษานี้ต่างจากการศึกษาของ Johnson และ Eliasson⁸ ที่ได้ค่าการวัดสีต่ำกว่าวิธี AAS ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าใช้สารที่ทำให้เกิดสีต่างจากการศึกษาครั้งนี้คือใช้ 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-3-sulphopropyl-amino)-phenol (5-Br-PAPS) ซึ่งการใช้สารที่ทำให้เกิดสีต่างกันอาจทำให้คุณสมบัติบางอย่าง เช่น molar absorptivity ต่างกัน¹³ และอาจมีผลทำให้ค่าการตรวจวัดต่างกัน

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ค่าเฉลี่ยของสังกะสีใน seminal plasma ที่ได้จากการตรวจวัดทั้ง 2 วิธีมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับการศึกษาที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ เช่น รายงานของ Rosecrans และคณะ¹⁴ ที่ตรวจวัดโดยให้สังกะสีทำปฏิกิริยากับ PAN มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.7 มิลลิกรัม% และใกล้เคียงกับการตรวจวัดโดยวิธี AAS ที่ให้ค่าเท่ากับ 15.67 มิลลิกรัม%¹⁵ แต่ค่าที่ได้จากการตรวจวัดโดยวิธี AAS ในการศึกษาครั้งนี้สูงกว่าค่าที่มีในรายงานของ Vaubourdolle และคณะ¹⁶ และ Rizzo และคณะ¹⁷ ที่ได้ค่าเท่ากับ 10.38 และ 6.53 มิลลิกรัม% ตามลำดับ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การตรวจวัดสังกะสีโดยวิธีวัดสีให้ผลดีและเชื่อถือได้เมื่อเทียบกับวิธีอ้างอิง นอกจากนี้ ยังเป็นการตรวจวัดที่ง่ายเหมาะสำหรับนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เพราะสะดวกและรวดเร็ว ขั้นตอนไม่ซับซ้อน และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณปริญญา ประสงค์ดี นักเทคนิคการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง AAS และขอขอบคุณคุณนิกร ศรีตรงยาง เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาสูติเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยเก็บตัวอย่างจนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Srivastava A, Chowdhury RA, Setty SB. Zinc content of maturing spermatozoa in oestrogen treated rats. *Int J Androl* 1983;6:103-8.
2. Carreras A, Mendoza C. Zinc levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *Andrologia* 1990;22:279-83.
3. Fuse H, Kazama T, Ohta S, Fujiuchi Y. Relationship between zinc concentration in seminal plasma and various sperm parameters. *Int Urol Nephrol* 1999;31:401-8.
4. Wong WY, Flik G, Groenen PM, Swinkles DW, Thomas CM, Copius-Peereboom JH, et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol* 2001;15:131-6.
5. Kynaston GH, Lewis-Jones ID, Lynch VR, Desmond DA. Changes in seminal quality following oral zinc therapy. *Andrologia* 1988;20:21-2.
6. Takihara H, Cosentino JM, Cockett TKA. Effect of low-dose androgen and zinc sulfate on sperm motility and seminal zinc levels in infertile men. *Fertil Steril* 1983;22:160-4.
7. Fuentes J, Miro J, Reira J. Simple colorimetric plasma zinc assay. *Andrologia* 1982;14:322-7.
8. Johnsen O, Eliasson R. Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *Int J Androl* 1987;10:435-40.
9. Lampugnani L, Maccheroni M. Rapid colorimetry of zinc in seminal plasma. *Clin Chem* 1984;30:1366-8.
10. Gavella A. Simple, rapid, determination of zinc and acid phosphatase in seminal plasma with an ABA-100 bichromatic analyzer. *Clin Chem* 1988;34:1605-7.
11. Operation manual atomic absorption spectrophotometer GBC 908, Victoria, Australia, 1990.
12. Henkel R, Bittner J, Weber R, Huter F. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil Steril* 1999;71:1138-43.
13. Homsher R, Zak B. Spectrophotometric investigation of sensitive complexing agents for the determination zinc in serum. *Clin Chem* 1985;31:1310-3.
14. Rosecrans RR, Jeyedrans SR, Pepe-Pelaez M, Kennedy PW. Comparison of biochemical parameters of human blood serum and seminal plasma. *Andrologia* 1987;19:625-8.
15. Kavanagh PJ. Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid. *J Reprod Fert* 1985;75:35-41.
16. Vaubourdol M, Clavel JP, Cynober L, Piton A, Gall A. Acid phosphatase and zinc in semen of subjects with no clinical evidence of prostatic disease. *Clin Chem* 1985;31:878-80.
17. Riffo M, Leiva S, Astudillo J. Effect of Zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *Int J Androl* 1992;15:229-37.