



Journal of the Medical Technologist

Association of Thailand

วารสารเทคนิคการแพทย์

Vol. 52 No. 3 December 2024

ปีที่ 52 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2567

CONTENT

Review Article

- Comparison of General Requirements for the Competence of Proficiency Testing Provider: ISO/IEC 17043:2010 and ISO/IEC 17043:2023 9101
Supawan Piyaratnavarasakul and Sitaphaisith Ekachampaka

- Effects of 7-Octenoic acid and 1-Phenyl-2-pentanol from *Moringa oleifera* Lam. Leaves Extract on the Hepatic Stellate Cells in an *In Vitro* Model of Liver Fibrosis 9166

*Jutathip Chaiprathed
Thanutchaporn Chantamai
Thamonwan Chujorhor
Kanchana Usuwanthim and
Watunyoo Buakaew*

Original Articles

- A Simple and Rapid Ultra-performance Liquid Chromatography Method for Plasma Iohexol Determination 9122
*Pornchai Meemaew
Anchalee Chanthong
Sukanda Yingyodkul, et al.*
- Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, and Wound Healing Property of Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.) Extracts 9148
*Panthip Rattanasinganchan
Piyamaporn Phankoo
Thanaporn Jaturonwanich, et al.*

- Evaluation of Hemolysis, Icterus, and Lipemia Interference Effects in Biochemical Analysis Using an Automated Clinical Chemistry Analyzer 9185

*Somsak Fongsupa
Boonyasirii Phothipatt and
Wanlapa Chaibangyang*

- Performance Evaluation of Automated Fecal Analyzer FA280 9211

*Anuchin Najermploy
Rujanan Kachenchat
Chenchira Charoenchai and
Prasong Khaenam*

- The Application of Geographic Information System (GIS) for Finding the Risk Area of Dengue Virus Infection 9225

Chanon Naijitra

- Efficiency of Rapid Brilliant Cresyl Blue Staining for Detecting Hemoglobin H Inclusion Bodies in Red Blood Cells 9240

*Ekkapong Boriboonwong and
Plubplueng Sansai*

An Official Publication of

The Association of Medical Technologist of Thailand
under the Royal Patronage of HRH Princess Soamsawali

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์

พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ





ecoline
BIOSAFETY CABINET
CLASS II A2

TopAir's Ecoline Biosafety Cabinet protects lab staff, the environment and sensitive work processes in which



M-UNIVERSAL



M-DIAGNOSTIC



M-SCIENCE



Laboratory
Centrifuge

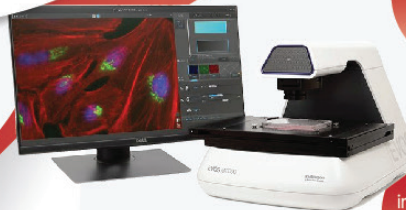
High performance automation and robotic solutions



Attune CytPix
Flow Cytometer

invitrogen

Authorized Distributor



EVOS M7000
Imaging Systems

Easy-to-use interface, designed by biologists

Live-cell analysis capability

Powerful image analysis software options



MagPurix® 12 EVO

Compact and sleek instrumentation that is ideal for clinical diagnosis, used to purify 1 to 12 samples simultaneously per run



3N HOLDING HOUSE, 44/6 Suthisarnvinitchai Rd., Samsennok, Huay Kwang, Bangkok 10310

Tel : (66) 0 2274 8331 | E-mail : info@gibthai.com
Fax : (66) 0 2274 8336, (66) 0 2274 8580



Gibthai Fan



@Gibthai



Gibthaicompany



www.gibthai.com

SCAN ME
GET MORE!





วารสาร

เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 52 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2567

วารสารเทคนิคการแพทย์ ขอเรียนเชิญผู้แต่งส่งบทความมาตีพิมพ์ในวารสารเทคนิคการแพทย์ ซึ่งสามารถส่งบทความได้ทั้งรูปแบบภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยลงทะเบียนเพื่อส่งบทความเข้าสู่ระบบออนไลน์ Thai Journals online (ThaiJo 2) ที่ <https://www.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt/index> และเลือก “สำหรับผู้แต่ง” เพื่อศึกษาการเตรียมต้นฉบับบทความประเภทต่าง ๆ ของวารสารฯ ก่อนเลือก “ส่งบทความ” เข้าสู่ระบบออนไลน์ และขอเชิญชวนผู้แต่งส่งบทความปริทัศน์ (Review article) พร้อมคำถามแบบปรนัย จำนวน 5-10 ข้อ ซึ่งบทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารเทคนิคการแพทย์ จะถูกนำไปใช้ในการเก็บคะแนน CMTE สำหรับนักเทคนิคการแพทย์ต่อไป

สำหรับบทความในวารสารฉบับนี้ ประกอบด้วย บทความปริทัศน์ (Review article) จำนวน 1 เรื่อง คือเรื่อง “การเปรียบเทียบข้อกำหนดทั่วไปสำหรับความสามารถของผู้ให้บริการทดสอบความชำนาญ ISO/IEC 17043:2010 และ ISO/IEC 17043:2023” บทความนิพนธ์ต้นฉบับ (Original article) จำนวน 7 เรื่อง โดยเนื้อหาของบทความ จัดตามกลุ่มวิชาดังนี้ 1) บทความทางด้านการสำรวจพื้นที่ที่ติดเชื้อ จำนวน 1 เรื่อง 2) บทความทางด้านเซลล์ชีววิทยา จำนวน 1 เรื่อง 3) บทความทางด้านจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก จำนวน 1 เรื่อง 4) บทความทางด้านเคมีคลินิก จำนวน 3 เรื่อง และ 5) บทความทางด้านโลหิตวิทยา จำนวน 1 เรื่อง

เอนก ภูทอง

บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 52 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2567

สารบัญ

บทความปริทัศน์

- การเปรียบเทียบข้อกำหนดทั่วไปสำหรับ 9101
ความสามารถของผู้ให้บริการทดสอบ
ความชำนาญ ISO/IEC 17043:2010
และ ISO/IEC 17043:2023
สุภาวีย์ ปิยรัตนวรสกุล และ
สตีฟไพสิฐ เอกะจัมปะกะ

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การตรวจวัดระดับไอโอเฮกซอลในพลาสมา 9122
ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะ
สูงพิเศษอย่างง่ายและรวดเร็ว
พรชัย หมีแห้ว
อัญชลี จันทร์ทอง
สุกานดา ยิ่งยอดกุล และคณะ
- การดำนอนมูลอิสระ ปริมาตรรวมของ 9148
สารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการสमानแผล
ของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่
ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลลชาญ
ปิยมาภรณ์ แผนคุ้ม
ชนากร จาตุรนต์วามิษฐ์ และคณะ

- ผลของสารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid 9166
และ 1-phenyl-2-pentanol จากใบมะรุม
ต่อเซลล์ตับชนิด hepatic stellate cells
ในโมเดลการเกิดพังผืดในตับในหลอดทดลอง
จุฑาทิพย์ ไชยประเทศ
ชนัษพร จันทาใหม่
ชมนวรรณ ชูจอหอ
กาญจนา อุสุวรรณทิพย์ และ
วรัญญา บัวแก้ว
- การประเมินผลกระทบจากการแตกของ 9185
เม็ดเลือดแดง ความเหลือง และความขุ่น
ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีด้วยเครื่องวิเคราะห์
อัตโนมัติทางเคมีคลินิก
สมศักดิ์ ฟองสุภา
บุญญศิริ โพธิ์พัฒน์ และ
วัลลภา ใ้บบางยาง
- การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องอัตโนมัติ 9211
FA280 ในการตรวจจุลภาวะ
อนุทิน นาเจิมพลอย
รุจันันท์ คะเชนทร์ชาติ
เจนจิรา เจริญชัย และ
ประสงค์ แก่นน้ำ
- การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ 9225
(GIS) เพื่อค้นหาพื้นที่เสี่ยงติดเชื้อไวรัสแดงกี
ซานนท์ นัยจิตร
- ประสิทธิภาพของการย้อม Brilliant Cresyl 9240
Blue อย่างรวดเร็ว เพื่อตรวจหาฮีโมโกลบิน
เอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดง
เอกพงศ์ บริบุญวงศ์ และ
พลัฒพลึง แสนใส



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Vol. 52 No. 3 December 2024

CONTENTS

Review Article

- Comparison of General Requirements 9101
for the Competence of Proficiency
Testing Provider: ISO/IEC 17043:2010
and ISO/IEC 17043:2023
*Supawan Piyaratana-varasakul and
Sitaphaisith Ekachampaka*

Original Articles

- A Simple and Rapid Ultra-performance 9122
Liquid Chromatography Method for
Plasma Iohexol Determination
*Pornchai Meemaew
Anchalee Chanthong
Sukanda Yingyodkul, et al.*
- Antioxidant Activity, Total Phenolic 9148
Content, and Wound Healing Property
of Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.)
Merr.) Extracts
*Panthip Rattanasinganchan
Piyamaporn Phankoo
Thanaporn Jaturonwanich, et al.*

- Effects of 7-Octenoic acid and 9166
1-Phenyl-2-pentanol from *Moringa
oleifera* Lam. Leaves Extract on the Hepatic
Stellate Cells in an *In Vitro* Model of
Liver Fibrosis
*Jutathip Chaiprathed
Thanutchaporn Chantamai
Thamonwan Chujorhor
Kanchana Usuwanthim and
Watunyoo Buakaew*
- Evaluation of Hemolysis, Icterus, and 9185
Lipemia Interference Effects in Biochemical
Analysis Using an Automated Clinical
Chemistry Analyzer
*Somsak Fongsupa
Boonyasirii Photthipatt and
Wanlapa Chaibangyang*
- Performance Evaluation of Automated 9211
Fecal Analyzer FA280
*Anuchin Najermploy
Rujanan Kachenchat
Chenchira Charoenchai and
Prasong Khaenam*
- The Application of Geographic 9225
Information System (GIS) for Finding
the Risk Area of Dengue Virus Infection
Chanon Naijittra
- Efficiency of Rapid Brilliant Cresyl Blue 9240
Staining for Detecting Hemoglobin H
Inclusion Bodies in Red Blood Cells
*Ekkapong Boriboonwong and
Plubplueng Sansai*



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

วัตถุประสงค์

1. เป็นสื่อกลางเผยแพร่ความก้าวหน้าทางวิชาการ และผลงานวิจัยด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์สาขาต่างๆ
2. ส่งเสริมการวิจัยจากงานประจำ การค้นคว้าทดลองหาองค์ความรู้ใหม่ และการวิจัยทางการศึกษา เพื่อพัฒนาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์
3. เป็นสื่อเชื่อมโยงแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์ด้านวิชาชีพระหว่างนักเทคนิคการแพทย์กับบุคลากรทางการแพทย์

เจ้าของ

สมาคมเทคนิคการแพทย์
แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์
พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี
กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

สำนักงานวารสาร

เลขที่ 6 ซอยรามอินทรา 52/1
ถนนรามอินทรา
แขวง/เขต คันนายาว
กรุงเทพมหานคร 10230
โทร. 0-2948-5757-9
โทรสาร 0-2948-5758
อีเมล: jmt.amtt2016@gmail.com
เว็บไซต์: www.jmt-amtt.com

กำหนดการออก

ปีละ 3 ฉบับ
ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-เมษายน
ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม
ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน-ธันวาคม

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
99 หมู่ 18 ตำบลคลองหนึ่ง
อำเภอคลองหลวง
จังหวัดปทุมธานี 12121
โทร. 0-2564-3104-6
โทรสาร 0-2564-3119

Objectives

1. To serve as a medium for propagating advanced knowledge and researches in medical technology and other related medical sciences.
2. To promote research from routine, original research and educational research for enhancing the profession of medical technology.
3. To serve as a medium for interactions and exchanges of academic and professional experiences among medical technologists and other medical professions.

Owner

The Association of Medical Technologist
of Thailand under the Royal Patronage
of HRH Princess Soamsawali

The journal office

6 Soi Ramintra 52/1, Ramintra Road,
Khannayao District, Bangkok 10230,
Thailand.
Tel. 66-2948-5757-9
Fax 66-2948-5758
E-mail: jmt.amtt2016@gmail.com
Website: www.jmt-amtt.com

Publication

Three issues per year
No. 1 January-April
No. 2 May-August
No. 3 September-December

Printed at

Printing House of Thammasat
University 99 Moo 18
Klongnueng, Klongluang,
Pathum Thani 12121, Thailand
Tel. 66-2564-3104-6 Fax 66-2564-3119



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

ที่ปรึกษา

รศ. ดร.รัชนา	ศานติยานนท์	ศ. ดร.วันเพ็ญ	ชัยคำภา
ศ. ดร.วิฑูรย์	ไวยนันท์	ศ. นพ.ยง	ภู่วรรณ
ศ. ดร.ประมวญ	เทพชัยศรี	นายสมชัย	เจ็ดเสริมอนันต์
ดร. สลักจิต	ชุตินิชวีเวท	รศ. ดร.พิทักษ์	สันตนิรันดร์
ศ. ดร.วีระพงศ์	ปรัชญาลิทธิกุล	รศ. สมชาย	วิริยะยุทธกร

อดีตนายก

ศ. ดร.พรทิพย์	โล่ห์เลขา	รศ. กุลนารี	สิริสาดี
รศ. ดร.ปราณี	ลิ้นชะชัย	น.ส. ทศนีย์	สกุลดำรงค์พานิช
รศ. ดร.กำพล	รุจิวิชญ์	รศ. สมชาย	วิริยะยุทธกร

บรรณาธิการ

ผศ. ดร.เอนก	ภูทอง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
-------------	-------	-----------------------

รองบรรณาธิการ

รศ. ดร.ไพไลวรรณ	ศิริพฤกษ์พงษ์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
รศ. ดร.นริศ	เก่งตรง บดีรัฐ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.อรุณี	อิงคกุล	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ. ดร.สว่าง	เพชรวิเศษ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะบรรณาธิการ

ศ. ดร.ศรีสินี คุสมิทธิ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.วัชร กสิณฤกษ์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.เพทาย เข็นจิตโสมนัส	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.สมพนธ์ วรรณวิมลรักษ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. พลตรีหญิง ดร.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะบรรณาธิการ

ศ. ดร.วันชัย มาลีวงษ์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร.สาคร พรประเสริฐ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.สุพรรณ ฟุเจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ. ดร.สุดา ดุษศิริโรจนกุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
Assoc. Prof. Chuan-Liang Kao	National Taiwan University
รศ. พรรณี พิเศษ	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. พญ.จิราพร สิทธิถาวร	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
รศ. ดร.จินตนา จิรถาวร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. อิสยา จันทรวินยานุชิต	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
รศ. ดร.กาญจนา สุริยะะพรหม	มหาวิทยาลัยรังสิต
รศ. ดร.เกรียงไกร กิจเจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร.ศิริพร ปรงูวิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร.ปาลนี อัมรานนท์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. พิศิษฐ์ นามจันทรา	มหาวิทยาลัยรังสิต
ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร.วิโรจน์ บุญรัตนกรกิจ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร.กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.ดุจดาว ทรงธรรมวัฒน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.สุดาวดี คงขำ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.ไข่มุกด์ ช่างศรี	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อ. ทศนีย์ สกุดคำรางพานิช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ. ดร.พิริยาภรณ์ จงตระกูล	มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้จัดการ

นางสาวรณพร คำพามา



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

Advisors

Assoc. Prof. Dr. Rachana Santiyanont
Prof. Dr. Vithoon Viyanant
Prof. Dr. Pramuan Tapchaisri
Dr. Salakchit Chutipongvivate
Prof. Dr. Virapong Prachayasittikul

Prof. Dr. Wanpen Chaicumpa
Prof. Dr. Yong Poovorawan
Mr. Somchai Jeadsermanant
Assoc. Prof. Dr. Pitak Santanirand
Assoc. Prof. Somchai Viriyayudhakorn

Former Editors

Prof. Dr. Porntip Lolekha
Assoc. Prof. Dr. Pranee Leechanachai
Assoc. Prof. Dr. Kampol Ruchiwit

Assoc. Prof. Kulnaree Sirisalee
Miss Tasanee Sakuldamrongpanich
Assoc. Prof. Somchai Viriyayudhakorn

Editor

Asst. Prof. Dr. Anek Pootong

Thammasat University

Associate Editor

Assoc. Prof. Dr. Pilaiwan Siripurkpong
Assoc. Prof. Dr. Narisa Kengtrong Bordeerat
Asst. Prof. Dr. Arunee Engkagul
Dr. Sawang Petvises

Thammasat University
Thammasat University
Kasetsart University
Thammasat University

Editorial Board

Prof. Dr. Srisin Khusmith
Prof. Dr. Watchara Kasinrerak
Prof. Dr. Pa-thai Yenchitsomanus
Prof. Dr. Sompon Wanwimolruk
Prof. Dr. Chartchalerms Isarankura Na Ayadhyia
Prof. Maj Gen Dr. Oytip Na Thalang
Prof. Dr. Wanchai Maleewong

Mahidol University
Chiang Mai University
Mahidol University
Mahidol University
Mahidol University
Thammasat University
Khon Kaen University

Editorial Board

Prof. Dr. Sakorn Pornprasert	Chiang Mai University
Prof. Dr. Supan Fucharoen	Khon Kaen University
Prof. Dr. Parvapan Bhattarakosol	Chulalongkorn University
Prof. Dr. Suda Louisirirothanakul	Mahidol University
Assoc. Prof. Chuan-Liang Kao	National Taiwan University
Assoc. Prof. Phannee Pidetcha	Mahidol University
Assoc. Prof. Dr. Jiraporn Sitithavorn	Maharakham University
Assoc. Prof. Dr. Chintana Chirathaworn	Chulalongkorn University
Assoc. Prof. Isaya Janwithayanuchit	Huachiew Chalermprakiet University
Assoc. Prof. Dr. Kanjana Suriyaprom	Rangsit University
Assoc. Prof. Dr. Kriengkrai Kitcharoen	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Siriporn Proungvitaya	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Palanee Ammaranond	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Pisit Namjuntra	Rangsit University
Asst. Prof. Dr. Tewin Tencomnao	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Viroj Boonyaratanakornkit	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Kanyanath Piumngam	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Dujdaw Songthamwat	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Sudawadee Kongkhum	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Khaimuk Changsri	Thammasat University
Lecturer Tasanee Sakuldamrongpanich	Chulalongkorn University
Dr. Piriyaoporn Chongtrakool	Mahidol University

Manager

Miss Ranaporn Kampama

Editorial Statement:

The statements and opinions made in the articles in this journal are the personal views of the authors and are the sole responsibilities of the authors and not of the Editorial Board of the Journal of the Medical Technologist Association of Thailand and the Association of Medical Technologist of Thailand



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

คณะกรรมการบริหารสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย พ.ศ. 2564-2567

EXECUTIVE BOARD OF AMTT 2021-2024

นายกสมาคมฯ	รศ.ดร.ทนพ.พิทักษ์ สันตนิรันดร์	Assoc. Prof. Dr. Pitak Santanirand	President
ที่ปรึกษา	ทนพ.นิเวศน์ ประยูรเชียร	Nivest Prayoonthein	Consultants
ที่ปรึกษา	ทนพ.บัณฑิต คูวิจิตรสุวรรณ	Bundit Khuvichitsuwan	Consultants
ที่ปรึกษา	รศ.ทนพ.สมชาย วิริยะยุทธกร	Assoc. Prof. Somchai Viriyayudhakorn	Consultants
อุปนายกฯ 1 และการเงินบัญชี	ทนพญ.อุมาพร ทรัพย์เจริญ	Umaporn Subcharoen	Vice-president and Finance and Accounting
อุปนายกฯ 2	ทนพญ.นิตยา โคมงาม	Nitaya Chomengam	Vice-president
อุปนายกฯ 3	ทนพญ.มยุรี จันทรีโท	Mayuree Chuntho	Vice-president
อุปนายกฯ 4	ทนพญ.สมจิตร จินากักดี	Somjit Jinapak	Vice-president
เลขาธิการฯ	ทนพ.ชวชล เศรษฐอุดม	Chavachol Setthaudom	Secretary general
เหรัญญิก	ทนพญ.ภัทราภรณ์ บุญจันทร์	Patraporn Boonkant	Treasurer
นายทะเบียน	ผศ.ดร.ทนพ.ประสงค์ แคน้ำ	Asst. Dr. Prasong Khaenam	Registrar
วิชาการ	รศ.ดร.ทนพ.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล	Assoc. Prof. Dr. Panan Rathawongjirakul	Scientific chairman
สวัสดิการ	ทนพ.ชัยฤกษ์ เจริญจิตต์	Dhaiyapruk Chalernjit	Social welfare
วิเทศสัมพันธ์	ผศ.ดร.ทนพ.เทวฤทธิ์ สระชนะ	Asst. Prof. Dr. Tewarit Sarachana	International Affairs
บรรณาธิการ	ผศ.ดร.ทนพ.เอนก ภูทอง	Asst. Prof. Dr. Anek Pootong	Editor
ประชาสัมพันธ์	อ.ดร.ทนพ.ธนาสาร ศิริรัตน์	Dr. Thanasan Sirirat	Public relations
กรรมการกลาง	ทนพญ.ธัญธำรีศ สิริธัญญ์สกุล	Thatharee Sirithansakul	Committee
กรรมการกลาง	ทนพ.ณภัทร ไชยมงคล	Napat Chaimongkol	Committee
กรรมการกลาง	อ.ดร.ทนพ.ปฐมพงษ์ สถาพรพงษ์	Dr. Patompong Satapornpong	Committee
กรรมการกลาง	อ.ทนพ.นทวิชัย ไพรัตน์	Nontawit Pirat	Committee
กรรมการกลาง	อ.ดร.ทนพ.ภาณุพงศ์ สหายสุข	Dr. Panupong Sahaisook	Committee
กรรมการกลาง	ทนพญ.จันทร์เพ็ญ บุญบาศรี	Janpen Boosabasi	Committee
กรรมการกลาง	ผศ.ดร.ทนพ.พอรณันต์ เกื้อไข	Asst. Prof. Dr. Pornanan Kueakhai	Committee

สมาชิกท่านใด ย้ายที่อยู่ หรือไม่ได้รับเอกสาร กรุณาติดต่อ

สำนักงานสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

โทร. 0-2948-5757-9 โทรสาร. 0-2948-5758

Email: ranaporn.pra@gmail.com



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

หนังสือสัญญาลงแจ้งความโฆษณา

วันที่

ข้าพเจ้า (นาย/นาง/นางสาว)

ในนามของ (ห้างหุ้นส่วน/บริษัท)

ตั้งอยู่บ้านเลขที่ ตรอก/ซอย ถนน

ตำบล/แขวง อำเภอ/เขต จังหวัด

โทรศัพท์..... โทรสารโทรศัพท์มือถือ

อีเมล.....

มีความประสงค์จะลงแจ้งความโฆษณาใน “วารสารเทคนิคการแพทย์” เป็นระยะเวลา 1 ปี จำนวน 3 ฉบับ โดยลงแจ้งความโฆษณาประเภท

○ ปกหลังด้านนอกสี	อัตรา	10,000	บาท/ฉบับ	รวม	30,000	บาท/ปี
○ ปกหน้าด้านในสี	อัตรา	10,000	บาท/ฉบับ	รวม	30,000	บาท/ปี
○ ปกหลังด้านในสี	อัตรา	10,000	บาท/ฉบับ	รวม	30,000	บาท/ปี
○ เติมน้ำด้านในสี	อัตรา	10,000	บาท/ฉบับ	รวม	30,000	บาท/ปี

ตั้งแต่ฉบับที่ ปี

รวมทั้งสิ้นเป็นเงิน บาท ตัวอักษร (.....)

e-book : www.amtt.org, tci-thaijo.org

(ลงนาม)

(.....)

(ตำแหน่ง)

หมายเหตุ การชำระค่าโฆษณาให้จ่ายเป็นเช็คในนาม “สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย”

วารสารเทคนิคการแพทย์

ฝ่ายบรรณาธิการ ผศ. ดร.เอนก ภูทอง สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

เลขที่ 6 ซอยรามอินทรา 52/1 ถนนรามอินทรา แขวง/เขตคันนายาว กรุงเทพฯ 10230

โทร. 0-2948-5757 โทรสาร 0-2948-5758 โทรศัพท์มือถือ 08-1919-2312, 06-4895-9516

อีเมล: jmt.amtt2016@gmail.com

Comparison of General Requirements for the Competence of Proficiency Testing Provider: ISO/IEC 17043:2010 and ISO/IEC 17043:2023

Supawan Piyaratana-Varasakul* and Sitaphaisith Ekachampaka

*Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences,
Nonthaburi Province, Thailand*

Abstract

Proficiency testing (PT), the evaluation of laboratory performance against predefined criteria through interlaboratory comparisons, is an essential component of a quality assurance system. PT provider must perform this activity and demonstrate the ability to evaluate performance correctly and appropriately. It is essential to comply with the international standard generally required for the competence of PT providers. The International Organization for Standardization has announced ISO/IEC 17043:2010 as the first standard for PT. The recent revision was ISO/IEC 17043:2023. The updated standard has been harmonized with other ISO/CASCO standards such as ISO/IEC 17025:2017 and ISO 15189:2022, facilitating easier integration with other management systems. To provide a better understanding, terminology definitions have also been updated to conform to ISO 13528:2022. The new requirements have been adjusted from two main points of the first standard, technical and management requirements, to five main points: (1) general, (2) structure, (3) resources, (4) process, and (5) management system. Including applying concepts of evaluation to ensure that the objectives of PT will be achieved, collection and analysis of feedback from participants and stakeholders and a risk and opportunity management process was added to increase the reliability of proficiency test results and deliver valuable services to customers. Moreover, Annex A and B of ISO/IEC 17043:2023 have been revised to improve the standard and Annex C has been removed to focus on key points only. This review article intended to provide an overview of the changes that have been made to

*Corresponding author E-mail address: supawan2510@gmail.com

the standard for PT providers to better understand and be able to apply them to improve service quality. Delivering of accurate result of PT is valuable in reflecting the quality system. These promote laboratory quality assurance system for maximum benefit.

Keywords : ISO/IEC 17043, Proficiency testing, Interlaboratory comparison.

การเปรียบเทียบข้อกำหนดทั่วไปสำหรับความสามารถ ของผู้ให้บริการทดสอบความชำนาญ ISO/IEC 17043:2010 และ ISO/IEC 17043:2023

สุภาวีย์ ปิยรัตนวรสกุล* และ สัตไพลีฐ เอกะจัมปะกะ

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี

บทคัดย่อ

การทดสอบความชำนาญหรือการประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ล่วงหน้า โดยการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการเป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบการประกันคุณภาพที่จะต้องดำเนินงานอย่างมีประสิทธิภาพและสามารถประเมินผลได้อย่างถูกต้องเหมาะสม จึงจำเป็นต้องดำเนินงานให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043:2010 ซึ่งเป็นข้อกำหนดทั่วไปสำหรับการประเมินความสามารถของผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญที่องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐานประกาศใช้ฉบับแรกในปีพุทธศักราช 2553 และต่อมาได้เปลี่ยนเป็นฉบับล่าสุด ISO/IEC 17043:2023 ในปีพุทธศักราช 2566 เพื่อให้สอดคล้องกับ ISO/CASCO standard เช่นเดียวกับระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 และ ISO 15189:2022 เป็นการอำนวยความสะดวกในการบูรณาการเข้ากับระบบการบริหารจัดการอื่น ๆ ได้ง่ายขึ้น รวมทั้งปรับคำนิยามศัพท์เฉพาะให้สอดคล้องกับ ISO 13528:2022 เพื่อความเข้าใจที่ดียิ่งขึ้น มาตรฐาน ISO/IEC 17043:2023 นี้มี 5 ข้อหลัก ได้แก่ (1) ข้อกำหนดทั่วไป (2) โครงสร้าง (3) ทรัพยากร (4) กระบวนการ และ (5) ระบบบริหารจัดการ โดยปรับจากมาตรฐานฉบับแรกซึ่งมี 2 ข้อหลัก ได้แก่ ข้อกำหนดด้านวิชาการและด้านบริหารจัดการ เพิ่มการประเมินเพื่อให้แน่ใจว่าดำเนินการได้บรรลุวัตถุประสงค์ ใช้ข้อมูลที่รวบรวมจากผู้เข้าร่วมและผู้มีส่วนได้ส่วนเสียมาวิเคราะห์เพื่อบริหารความเสี่ยงและโอกาส รวมทั้งได้แก้ไขภาคผนวก A และ B ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น ตัดภาคผนวก C ออกมุ่งเน้นเฉพาะประเด็นสำคัญเท่านั้น การเปรียบเทียบการปรับเปลี่ยนมาตรฐานนี้จะช่วยให้ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญมีความเข้าใจรายละเอียดเนื้อหาได้ดีขึ้น สามารถประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพบริการเพื่อส่งมอบผลการทดสอบความชำนาญที่ถูกต้องแม่นยำ มีคุณค่าในการสะท้อนระบบคุณภาพ อันเป็นการส่งเสริมระบบการประกันคุณภาพทางห้องปฏิบัติการให้เกิดประโยชน์สูงสุด

คำสำคัญ: ISO/IEC 17043 การทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: supawan2510@gmail.com

บทนำ

การทดสอบความชำนาญ (proficiency testing: PT) หรือการประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ล่วงหน้า โดยใช้กระบวนการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบการประกันคุณภาพทางห้องปฏิบัติการทดสอบโดยมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017⁽¹⁾ ซึ่งมีข้อกำหนดด้านกระบวนการในข้อ 7.7 เรื่องของความมั่นใจในความใช้ได้ของผลการวิเคราะห์ และข้อย่อย 7.7.2 ระบุให้ห้องปฏิบัติการต้องมีการเฝ้าระวังประสิทธิผลโดยการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ สำหรับการตรวจตัวอย่างทดสอบจากมนุษย์ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานสากล ISO 15189:2022⁽²⁾ ในข้อกำหนดด้านกระบวนการ ข้อย่อย 7.3.7 การรับรองความถูกต้องของผลการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งระบุไว้ให้ห้องปฏิบัติการต้องมีการเฝ้าระวังผลการตรวจวิเคราะห์ โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการหรือการเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญที่เหมาะสม เพื่อแสดงถึงความสามารถของห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการทดสอบความชำนาญที่ดีและมีมาตรฐานการดำเนินงานนั้นต้องเริ่มตั้งแต่ การวางแผน การจัดหาวัสดุทดสอบความชำนาญที่มีคุณลักษณะคล้ายคลึงกับตัวอย่างทดสอบที่ตรวจวิเคราะห์ในงานประจำ กระบวนการจัดเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญที่ดีมีคุณภาพ การตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของสารทดสอบ การจัดส่งวัสดุทดสอบความชำนาญให้กับห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมเพื่อตรวจวิเคราะห์ และส่งรายงานผลกลับภายในระยะเวลาที่กำหนด การดำเนินการทดสอบความชำนาญจะช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับห้องปฏิบัติการอื่น ที่ตรวจวิเคราะห์วัสดุทดสอบความชำนาญชนิดเดียวกันได้ ผลการเปรียบเทียบ

ดังกล่าวเป็นข้อมูลในการช่วยกระตุ้นและผลักดันการจัดทำระบบคุณภาพให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น อีกทั้งเป็นดัชนีชี้วัดการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่อง และติดตามการธำรงรักษาไว้ซึ่งระบบคุณภาพอย่างยั่งยืนของห้องปฏิบัติการได้

การทดสอบความชำนาญได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นเครื่องมือสำคัญประการหนึ่งในการแสดงให้เห็นถึงความสามารถของห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบความชำนาญเป็นหลักฐานบ่งชี้ถึงปัญหาพื้นฐานหรือปัญหาที่กำลังเกิดขึ้น และมีส่วนช่วยในการสนับสนุนการพัฒนาระบบคุณภาพและการรับรองความสามารถทั้งห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ ดังนั้นเพื่อให้ห้องปฏิบัติการและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องมั่นใจและเชื่อมั่นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญจะต้องแสดงให้เห็นการดำเนินงานที่มีศักยภาพและสามารถประเมินผลการทดสอบความชำนาญของผู้เข้าร่วมได้ถูกต้องเหมาะสม มีการธำรงรักษาระบบคุณภาพตามมาตรฐานสากลอย่างต่อเนื่องและได้รับการรับรองความสามารถเป็นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญจากหน่วยรับรองระบบงาน ซึ่งข้อกำหนดพื้นฐานหลักที่สำคัญในการทดสอบความชำนาญ ได้แก่ มาตรฐานสากล ISO/IEC 17043 ซึ่งองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International Organization for Standardization) ได้ประกาศใช้มาตรฐานสากล ISO/IEC 17043:2010⁽³⁾ ฉบับพิมพ์ครั้งแรก ในปีพุทธศักราช 2553 เป็นข้อกำหนดสำหรับการจัดทำระบบบริหารจัดการให้มีคุณภาพสอดคล้องกับมาตรฐานสากลในประเด็นต่าง ๆ เช่น การกำหนดนโยบายคุณภาพ จัดทำคู่มือคุณภาพ มาตรฐานการปฏิบัติงาน วิธีปฏิบัติและกำหนดวิธีการประเมินและเกณฑ์การยอมรับผลการประเมินการบริหารจัดการข้อมูลเพื่อป้องกันความผิดพลาดจากการคำนวณหรือการสูญหายของข้อมูล ระบบการ

รักษาความลับของลูกค้า ขั้นตอนการแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ โดยข้อมูลที่กล่าวเบื้องต้นต้องมีการบันทึกและจัดเก็บอย่างดีเพื่อให้สามารถทวนสอบความถูกต้องได้ มาตรฐานนี้สามารถนำมาใช้ในการประเมินความสามารถในการปฏิบัติงานด้วยตนเองและใช้สำหรับการตรวจติดตามภายใน รวมทั้งหน่วยรับรองระบบงานก็ใช้มาตรฐานสากล ISO/IEC 17043 เพื่อประเมินให้การรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญได้ ต่อมาในปีพุทธศักราช 2566 องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐานได้ปรับปรุงมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043:2023⁽⁴⁾ เป็นฉบับพิมพ์ครั้งที่สองใช้ทดแทนมาตรฐานฉบับพิมพ์ครั้งแรก จัดเป็นข้อกำหนดทั่วไปสำหรับการทดสอบความชำนาญที่มีความสามารถ เป็นกลาง และมีความสม่ำเสมอในการดำเนินงาน ใช้เป็นพื้นฐานสำหรับผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ หน่วยงานกำกับดูแล หน่วยรับรองระบบงานและอื่น ๆ โดยเพิ่มรายละเอียดที่สำคัญหลายประการเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของมาตรฐานให้มีความสอดคล้องกับมาตรฐานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การปรับข้อกำหนดวิชาการและโครงสร้างให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 และการปรับคำนิยามศัพท์เฉพาะทางสถิติให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล ISO 13528:2022⁽⁵⁾ ส่วนคำนิยามศัพท์ทั่วไปจะยึดตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17000⁽⁶⁾ และ ISO/IEC Guide 99⁽⁷⁾

มาตรฐานฉบับแรกมีข้อกำหนด 2 ข้อหลัก ได้แก่ ข้อกำหนดด้านวิชาการและข้อกำหนดด้านการบริหารจัดการ ได้ปรับเปลี่ยนเป็นมาตรฐานฉบับใหม่มีข้อกำหนด 5 ข้อหลัก ได้แก่ (1) ข้อ 4 ข้อกำหนดทั่วไป (2) ข้อ 5 ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง (3) ข้อ 6 ข้อกำหนดด้านทรัพยากร (4) ข้อ 7 ข้อกำหนดด้านกระบวนการ และ (5) ข้อ 8 ข้อกำหนดด้านระบบบริหารจัดการ

การเปลี่ยนแปลงทั่วไปที่สำคัญ ได้แก่ (1) การใช้แนวทางที่อิงตามความเสี่ยงสำหรับข้อกำหนดทางเทคนิคที่เหมาะสม ให้สามารถใช้ประสบการณ์จากการทดสอบความชำนาญรอบก่อนหน้าในการพิจารณาดำเนินการประเมินโปรแกรมการทดสอบความชำนาญเพื่อให้แน่ใจว่าจะบรรลุวัตถุประสงค์ มีการรวบรวมและการวิเคราะห์ข้อเสนอแนะจากผู้เข้าร่วมและผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย สร้างกระบวนการบริหารความเสี่ยงระบุความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นและใช้มาตรการที่เหมาะสมเพื่อลดความเสี่ยง เป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบความชำนาญและสร้างงานบริการที่มีคุณค่ากับลูกค้า (2) การปรับคำนิยามศัพท์และสัญลักษณ์ทางสถิติให้สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 13528:2022 วิธีการทางสถิติสำหรับการทดสอบความชำนาญ (3) การปรับปรุงบรรณานุกรมและการเปลี่ยนแปลงภาคผนวก A (types of PT schemes) เกี่ยวกับประเภทของการทดสอบความชำนาญ และภาคผนวก B (statistical methods for PT) เกี่ยวกับวิธีการทางสถิติสำหรับการทดสอบความชำนาญโดยการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ ให้สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 13528:2022 และยกเลิกภาคผนวก C (selection and use of proficiency testing) การเลือกและการใช้แผนการทดสอบความชำนาญ เพื่อมุ่งเน้นเฉพาะประเด็นสำคัญเท่านั้น

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้สรุปเปรียบเทียบความสอดคล้องและความแตกต่างของข้อกำหนดมาตรฐานฉบับแรกและมาตรฐานฉบับใหม่ บ่งชี้รายละเอียดที่เพิ่มขึ้นใหม่หรือประเด็นที่ตัดทิ้งไป พร้อมระบุข้อควรระมัดระวังให้ความใส่ใจเป็นพิเศษ เพื่อให้ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางการดำเนินงานได้อย่างครอบคลุมครบถ้วนและสามารถจัดทำเอกสารระบบคุณภาพให้สอดคล้องกับมาตรฐานฉบับใหม่ภายในระยะเวลาที่กำหนด ได้รับการรับรองความสามารถการเป็น

ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญตามเงื่อนไขที่หน่วยรับรองมาตรฐานกำหนด⁽⁸⁾ รวมทั้งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการบริการให้สามารถส่งมอบผลการทดสอบความชำนาญที่ถูกต้องแม่นยำ มีคุณค่าในการสะท้อนระบบคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์และสร้างความน่าเชื่อถือแก่ห้องปฏิบัติการ ลูกค้าและผู้ที่เกี่ยวข้อง อันเป็นการส่งเสริมระบบการประกันคุณภาพทางห้องปฏิบัติการให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การศึกษาครั้งนี้เป็นการทบทวน วิเคราะห์ และอภิปรายมาตรฐาน 2 ฉบับ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010, Conformity assessment-General requirements for proficiency testing และ ISO/IEC 17043:2023, Conformity assessment-General requirements for the competence of proficiency testing providers โดยเรียบเรียงรายละเอียดเนื้อหาตามมาตรฐานข้อกำหนดฉบับใหม่ ISO/IEC 17043:2023 เป็นหลักและนำข้อกำหนดฉบับก่อนหน้ามาเปรียบเทียบกับในแต่ละข้อกำหนดหลักและข้อกำหนดย่อยเรียงตามลำดับ การวิเคราะห์ข้อมูลจัดกลุ่มเป็น 2 กรณี ได้แก่ (1) ความแตกต่างทั่วไป เปรียบเทียบจำนวนข้อกำหนด ขอบข่ายการนำไปใช้งาน นิยามศัพท์และภาคผนวก (2) ความแตกต่างในรายละเอียดของข้อกำหนด ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มที่ 2.1 ข้อกำหนดใหม่และกลุ่มที่ 2.2 ข้อกำหนดก่อนหน้านี้ที่มีการเปลี่ยนหมายเลขข้อกำหนดหรือมีการปรับปรุงเนื้อหารายละเอียดดังนี้

1. ความแตกต่างทั่วไป

การศึกษาพบว่าข้อกำหนด ISO/IEC 17043:2010 ประกอบด้วย (1) ขอบข่าย (2) การอ้างอิง (3) นิยามศัพท์ (4) ข้อกำหนดด้านวิชาการ มี 10 ข้อหลัก (5) ข้อกำหนดด้านบริหารจัดการมี 15 ข้อหลัก และภาคผนวก A, B, C รวมเอกสาร

ทั้งหมด 39 หน้า ในขณะที่มาตรฐานฉบับใหม่ ISO/IEC 17043:2023 มีการจัดกลุ่มและเปลี่ยนหมายเลขข้อกำหนดใหม่ประกอบด้วย (1) ขอบข่าย (2) การอ้างอิง (3) นิยามศัพท์ (4) ข้อกำหนดทั่วไปมี 2 ข้อหลัก (5) ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง (6) ข้อกำหนดด้านทรัพยากรมี 4 ข้อหลัก (7) ข้อกำหนดด้านกระบวนการมี 7 ข้อหลัก (8) ข้อกำหนดด้านบริหารจัดการมี 9 ข้อหลัก และภาคผนวก A, B รวมเอกสารทั้งหมด 37 หน้า

มาตรฐานฉบับแรกระบุเป็นข้อกำหนดทั่วไปสำหรับการทดสอบความชำนาญ แต่มาตรฐานฉบับใหม่ระบุเป็นข้อกำหนดทั่วไปสำหรับความสามารถของผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ ซึ่งทำให้เห็นความชัดเจนในการพัฒนาโดยเพิ่มการให้บริการที่มีความสามารถธำรงรักษาระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่องมีความสม่ำเสมอและมีความเป็นกลาง

ทั้งนี้มาตรฐานฉบับแรกระบุมาตรฐานอ้างอิง ISO/IEC 17000 การประเมินความสอดคล้อง - คำศัพท์และหลักการทั่วไป และ ISO/IEC Guide 99 คำศัพท์สากลของมาตรวิทยา - แนวคิดพื้นฐานทั่วไป และคำศัพท์ที่เกี่ยวข้อง (VIM) ส่วนมาตรฐานฉบับใหม่เพิ่มมาตรฐานอ้างอิง ISO/IEC 17025:2017 ข้อกำหนดทั่วไปสำหรับความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ และ ISO 17034⁽⁹⁾ สำหรับคำนิยามศัพท์มาตรฐานฉบับแรกมี 16 คำ ส่วนมาตรฐานฉบับใหม่ตัดนิยามศัพท์จากฉบับก่อนหน้า 5 คำ ได้แก่ คำว่า coordinator, robust statistical method, subcontractor, metrological traceability และ measurement uncertainty เพิ่มนิยามศัพท์ใหม่ consensus value 1 คำ นอกจากที่กล่าวมาแล้ว มีการปรับนิยามศัพท์ 3.4 interlaboratory comparison หมายถึง การออกแบบการเปรียบเทียบระหว่างประสิทธิภาพห้องปฏิบัติการและการประเมินการวัดหรือการทดสอบ

ในรายการเดียวกันหรือคล้ายกันโดยห้องปฏิบัติการสองแห่งขึ้นไปตามเงื่อนไขที่กำหนดไว้ล่วงหน้า รวมทั้งให้หมายเหตุว่า “ห้องปฏิบัติการ” “การวัดหรือการทดสอบ” และการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการวัดด้วย ทำให้มีความชัดเจนเพิ่มมากขึ้นจากมาตรฐานฉบับแรกที่นิยามศัพท์ 3.4 interlaboratory comparison หมายถึง การเปรียบเทียบ

ประสิทธิภาพและการประเมินผลการวัดหรือการทดสอบรายการเดียวกันหรือคล้ายกันโดยห้องปฏิบัติการสองแห่งขึ้นไปตามเงื่อนไขที่กำหนดไว้ ดังนั้นมาตรฐานฉบับใหม่จึงมีนิยามศัพท์ 12 คำ และมีระบุเฉพาะภาคผนวก A และภาคผนวก B เท่านั้น รายละเอียดดังแสดงใน Table 1

Table 1 Differences in the number of requirements, scope, terms and definitions of ISO/IEC 17043:2023 and ISO/IEC 17043:2010 standards.

Title	ISO/IEC 17043:2023	ISO/IEC 17043:2010
Number of requirements	There are 29 requirements, 90 Sub-requirements and 2 Annexes.	There are 25 requirements, 89 Sub-requirements and 3 Annexes.
Scope	1) General requirements for the competence and impartiality of proficiency testing (PT) providers and consistent operation of all proficiency testing schemes, and they can be used as a basis for specific technical requirements for particular fields of application. 2) Users of proficiency testing schemes, regulatory authorities, organizations and schemes using peer-assessment, accreditation bodies and others can use these requirements in confirming or recognizing the competence of proficiency testing providers.	General requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes and for the development and operation of proficiency testing schemes for all types of proficiency testing schemes, and they can be used as a basis for specific technical requirements for particular fields of application.
Terms and definitions	12 Terms New terms: consensus value (3.2)	16 Terms There are 5 terms that are not specified in the new edition. - Coordinator (3.2) - Robust statistical method (3.12) - Subcontractor (3.14) - Metrological traceability (3.15) - Measurement uncertainty (3.16)
Annex	2 Annexes A: Types of PT schemes B: Statistical methods for PT	3 Annexes A: Types of proficiency testing schemes B: Statistical methods for proficiency testing C: Selection and use of proficiency testing

2. ความแตกต่างในรายละเอียดของข้อกำหนด

ผลการศึกษาเปรียบเทียบรายละเอียดของข้อกำหนดมาตรฐานฉบับแรกกับฉบับใหม่ จัดกลุ่มเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ 2.1 ข้อกำหนดใหม่ และ 2.2

ข้อกำหนดก่อนหน้านี้ที่มีการเปลี่ยนหมายเลขข้อกำหนด หรือมีการปรับปรุงรายละเอียดเนื้อหา สรุปเปรียบเทียบข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2023 และ ISO/IEC 17043:2010 ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Summary and comparison of ISO/IEC 17043:2023 and ISO/IEC 17043:2010 standard requirements.

ISO/IEC 17043:2023	ISO/IEC 17043:2010	Main changes
1. Scope	1. Scope	
2. Normative references	2. Normative references	
3. Terms and definitions	3. Terms and definitions	
4. General requirements		
4.1 Impartiality (4.1.1-4.1.6)	None	New 4.1.1-4.1.6
4.2 Confidentiality (4.2.1-4.2.5)	4.10 Confidentiality (4.10.1-4.10.4)	4.2.2
5. Structural requirements (5.1-5.7)	5.1 Organization (5.1.1-5.1.6)	
6. Resource requirements		
6.1 General (6.1.1-6.1.3)	4.1 General	6.1.2, 6.1.3
6.2 Personnel (6.2.1-6.2.7)	4.2 Personnel (4.2.1-4.2.7)	6.2.2b
6.3 Facilities and environmental conditions (6.3.1-6.3.5)	4.3 Equipment, accommodation and environmental (4.3.1-4.3.6)	
6.4 Externally provided products and services (6.4.1-6.4.6)	5.5 Subcontracting services (5.5.1-5.5.5) 5.6 Purchasing services and supplies (5.6.1-5.6.4)	

Table 2 Summary and comparison of ISO/IEC 17043:2023 and ISO/IEC 17043:2010 standard requirements. (Cont.)

ISO/IEC 17043:2023	ISO/IEC 17043:2010	Main change
7. Process requirements		
7.1 Establishing, contracting and communicating the PT scheme objectives		
7.1.1 Review of requests, tenders and contracts	5.4 Review of requests, tenders and contracts (5.4.1-5.4.5)	
7.1.2 PT scheme communication	4.9 Communication with participants (4.9.1-4.9.5)	7.1.2.1c
7.2 Design and planning of a PT scheme	4.4 Design of proficiency testing scheme	
7.2.1 General	4.4.1 Planning	
7.2.2 Statistical design	4.4.4 Statistical design	7.2.2.3g
7.2.3 Determination of assigned values	4.4.5 Assigned values	
7.3 Production and distribution of PT items	4.4 Design of proficiency testing scheme	
7.3.1 Production of PT items	4.4.2 Preparation of proficiency test items	
7.3.2 Homogeneity and stability assessment of PT items	4.4.3 Homogeneity and stability	
7.3.3 Handling and storage of PT items	4.6.2 Proficiency test items handling and storage	
7.3.4 Packaging, labelling and distribution of PT items	4.6.3 Packaging, labelling and distribution of proficiency test items	
7.3.5 Instructions for participants	4.5 Choice of method or procedure	

Table 2 Summary and comparison of ISO/IEC 17043:2023 and ISO/IEC 17043:2010 standard requirements. (Cont.)

ISO/IEC 17043:2023	ISO/IEC 17043:2010	Main change
7.4 Evaluation and reporting of PT scheme results	4.7 Data analysis and evaluation of proficiency testing scheme results	
7.4.1 Data analysis	4.7.1 Data analysis and records	
7.4.2 Evaluation of performance	4.7.2 Evaluation of performance	
7.4.3 PT reports	4.8 reports (4.8.1-4.8.5)	
7.5 Control of the PT scheme process		
7.5.1 Technical records	5.13.2 Technical records	
7.5.2 Control of data and information management	4.7.1 Data analysis and records	7.5.2.3e, 7.5.2.4, 7.5.2.5
7.5.3 Surveillance of the processes	None	New 7.5.3
7.5.4 Nonconforming work	5.9 Control of nonconforming work (5.9.1-5.9.5) 5.12 Preventive actions (5.12.1-5.12.2)	
7.6 Handling of complaints	5.8 Complaints and appeals	7.6.1-7.6.9
7.7 Handling of appeals	5.8 Complaints and appeals	7.7.1-7.6.7
8. Management system requirements	5. Management requirements	
8.1 General requirements (8.1.1-8.1.4)	5.2 Management system (5.2.1-5.2.8)	
8.2 Management system documentation (8.2.1-8.2.3)	5.2 Management system (5.2.2)	
8.3 Control of management system documents (8.3.1-8.3.2)	5.3 Document control (5.3.1-5.3.3)	8.3.1
8.4 Control of records (8.4.1-8.4.3)	5.13 Control of records (5.13.1-5.13.2)	
8.5 Actions to address risks and opportunities (8.5.1-8.5.3)	None	New 8.5.1-8.5.2

Table 2 Summary and comparison of ISO/IEC 17043:2023 and ISO/IEC 17043:2010 standard requirements. (Cont.)

ISO/IEC 17043:2023	ISO/IEC 17043:2010	Main change
8.6 Improvement (8.6.1-8.6.2)	5.10 Improvement 5.7 Service to the customer (5.7.1-5.7.2)	
8.7 Corrective actions (8.7.1-8.7.3)	5.11 Corrective actions (5.11.1-5.11.5)	
8.8 Internal audits (8.8.1-8.8.2)	5.14 Internal audits (5.14.1-5.14.4)	
8.9 Management reviews (8.9.1-8.9.3)	5.15 Management reviews (5.15.1-5.15.2)	8.9.2m, 8.9.3
Annex A: Types of PT schemes	Annex A: Types of proficiency testing schemes	
Annex B: Statistical methods for PT	Annex B: Statistical methods for proficiency testing	
None	Annex C: Selection and use of proficiency testing	

2.1 ข้อกำหนดใหม่

ข้อ 4.1 ความเป็นกลาง (impartiality)

เป็นข้อกำหนดทั่วไปมี 6 ข้อย่อย ระบุทุกกิจกรรมต้องดำเนินการด้วยความเป็นกลาง มีโครงสร้าง การบริหารจัดการเพื่อรักษาความเป็นกลาง ไม่ให้มีแรงกดดันทางการค้า การเงิน หรือสิ่งอื่นใดเข้ามามีอิทธิพล กรณีมีการระบุภัยคุกคามต่อความเป็นกลางจะต้องกำจัดหรือลดให้เหลือน้อยที่สุด ให้มีการติดตามกิจกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างบุคคล ผู้บริหารระดับสูงต้องแสดงความมุ่งมั่นในเรื่องความเป็นกลาง

ข้อ 7.5.3 การเฝ้าระวังกระบวนการ (surveillance of the processes)

เป็นข้อกำหนดย่อยในข้อกำหนดด้านกระบวนการข้อ 7.5 การควบคุมกระบวนการ ระบุให้มีขั้นตอนเพื่อความต้องการของโปรแกรมทดสอบความชำนาญ โดยมีการจัดทำแผนกิจกรรมการเฝ้าระวังกระบวนการและมีการทบทวน บันทึกข้อมูลผลการเฝ้าระวังนำเข้าสู่กระบวนการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง มีหมายเหตุขยายความกิจกรรมที่ควรเฝ้าระวัง เช่น การประเมินผลิตภัณฑ์และบริการที่จัดหาจากภายนอก การใช้วัสดุอ้างอิงหรือรายการควบคุมอื่น ๆ การถ่ายโอนผลจากผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ เหนือเงื่อนไขทางสถิติเพื่อยืนยันความต้องการของการประเมินคุณภาพของวัสดุทดสอบความชำนาญหรือความสามารถของห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบรายงาน และการเปรียบเทียบกับรอบการทดสอบความชำนาญที่ผ่านมา

ข้อ 8.5 การปฏิบัติการจัดการความเสี่ยงและโอกาส (actions to address risks and opportunities)

เป็นข้อกำหนดใหม่ที่สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จากมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 ระบุเฉพาะข้อกำหนด 5.12 การ

ป้องกันเท่านั้น ส่วนมาตรฐานใหม่มุ่งเน้นการพิจารณาความเสี่ยงที่อาจส่งผลกระทบต่อความสำเร็จหรือทำให้ไม่บรรลุวัตถุประสงค์ แหล่งที่มาของสิ่งที่ทำให้งานไม่เป็นไปตามข้อกำหนด วางแผนการดำเนินการจัดการกับความเสี่ยงและโอกาส ดำเนินการป้องกันหรือลดผลกระทบโดยบูรณาการเข้ากับระบบบริหารจัดการ รวมทั้งประเมินประสิทธิผลและสร้างโอกาสปรับปรุง

การดำเนินการจัดการความเสี่ยงและโอกาสจะต้องเหมาะสมกับสัดส่วนและผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นตามที่ระบุในข้อ 8.5.3 ประเด็นหลักในการพิจารณาจัดการความเสี่ยง 3 ประเด็น ได้แก่ (1) ข้อ 7.2.1.2 การออกแบบและการวางแผน เมื่อตั้งใจจะเปลี่ยนแปลงกิจกรรมที่สำคัญซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความถูกต้องให้มีการระบุและจัดการความเสี่ยงเพื่อให้แน่ใจว่าแผนงานจะยังคงมีความถูกต้อง (2) ข้อ 7.3.2.1 เกณฑ์การตัดสินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวที่เหมาะสมให้มีการระบุและจัดการความเสี่ยงที่เกณฑ์ดังกล่าวอาจส่งผลต่อการประเมินผู้เข้าร่วม และ (3) ข้อ 7.5.4.1 งานที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดจะต้องมีขั้นตอนดำเนินการ กรณีให้หยุดกิจกรรม เปลี่ยนรอบการรายงาน หรือการระงับแผน จะต้องมีการจัดการความเสี่ยงและโอกาสเพื่อกำหนดเกณฑ์ตามระดับความเสี่ยงที่วิเคราะห์ได้

นอกจากนี้มาตรฐานฉบับใหม่ระบุให้ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญสามารถตัดสินใจเลือกความเสี่ยงจากประสบการณ์และใช้ข้อมูลการดำเนินงานที่ผ่านมาเป็นพื้นฐานในการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบการจัดการให้บรรลุวัตถุประสงค์ได้ผลลัพธ์ที่ดียิ่งขึ้นรวมทั้งป้องกันเหตุการณ์เชิงลบ จัดการความเสี่ยงตามระดับความรุนแรงของผลกระทบให้สร้างความมั่นใจแก่ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม ลูกค้า รวมทั้งผู้มีส่วนได้ส่วนเสียอื่น ๆ เช่น หน่วยงานกำกับดูแล หน่วยงานให้การรับรองระบบงาน และองค์กรอื่น ๆ

2.2 ข้อกำหนดก่อนหน้าที่มีการเปลี่ยน หมายเลขข้อกำหนดหรือมีการปรับปรุงรายละเอียด เนื้อหา ดังนี้

ข้อ 4.2 การรักษาความลับ (confidentiality)

เป็นข้อกำหนดทั่วไป ซึ่งมี 5 ข้อย่อยคือ
ข้อ 4.2.1-4.2.5 ปรับปรุงจากข้อกำหนดฉบับ
ก่อนหน้านั้นในด้านวิชาการในข้อ 4.10.3 โดยเพิ่ม
รายละเอียดหลักที่สำคัญ 3 ประเด็น ได้แก่ (1) ความ
รับผิดชอบต่อข้อมูลที่ได้รับจากผู้เข้าร่วมและข้อมูล
จากกิจกรรมการดำเนินงานจะต้องแจ้งให้ลูกค้าทราบ
ล่วงหน้าถึงข้อมูลที่ตั้งใจจะเปิดเผยเป็นสาธารณะโดย
คำนึงถึงกฎหมายที่เกี่ยวข้อง (2) ข้อมูลเกี่ยวกับผู้เข้าร่วม
หรือลูกค้าหรือจากแหล่งอื่น เช่น ผู้ร้องเรียนหรือ
หน่วยงานกำกับดูแล จะต้องเก็บเป็นความลับไม่เปิดเผย
กับผู้เข้าร่วมหรือลูกค้าอื่น เว้นแต่จะได้รับความ
ยินยอมจากแหล่งที่ได้ข้อมูล (3) บุคลากรภายนอก
หน่วยงานที่ดำเนินการในนามของผู้ให้บริการทดสอบ
ความชำนาญจะต้องเก็บข้อมูลทั้งหมดที่ได้รับหรือ
ข้อมูลที่สร้างขึ้นไว้เป็นความลับ

ข้อ 5 ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง (structural requirements)

ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง มี 7 ข้อย่อย
ปรับปรุงจากข้อกำหนดด้านบริหารจัดการ ในข้อ 5.1
องค์กร และข้อ 5.2 ระบบบริหารจัดการ มาตรฐาน
ฉบับใหม่ตัดรายละเอียดจากมาตรฐานฉบับแรก
ที่กำหนดให้มีคู่มือคุณภาพที่เชื่อมโยงอ้างอิงถึงขั้นตอน
การปฏิบัติงานรวมถึงวิธีปฏิบัติทางวิชาการ มีโครงสร้าง
ของเอกสารที่ใช้ในระบบบริหารจัดการ รวมทั้งการระบุ
บทบาทและความรับผิดชอบของผู้จัดการวิชาการและ
ผู้จัดการคุณภาพ โดยมาตรฐานฉบับใหม่ให้มีบุคลากร
รับผิดชอบด้านการบริหารจัดการกิจกรรมทดสอบ
ความชำนาญ มีอำนาจและทรัพยากรที่จำเป็นใน
การปฏิบัติหน้าที่ และมีแผนการทดสอบความชำนาญ
เป็นเอกสารที่สอดคล้องตามข้อกำหนดของมาตรฐาน

ISO 17043

ข้อ 6 ข้อกำหนดด้านทรัพยากร (resource requirements)

ข้อกำหนดด้านทรัพยากร มี 4 ข้อย่อย ปรับปรุง
จากข้อกำหนดฉบับแรกด้านวิชาการ ข้อ 4.1 ทั่วไป
ข้อ 4.2 บุคลากร ข้อ 4.3 เครื่องมือ สิ่งอำนวยความสะดวก
ข้อ 5.5 บริการรับเหมาช่วง และข้อ 5.6 สินค้าและ
บริการที่จัดหาจากภายนอก

มาตรฐานฉบับใหม่ข้อ 6.1 ทั่วไป (General) เพิ่ม
รายละเอียดการวัดหรือการทดสอบที่เกี่ยวกับคุณลักษณะ
วัสดุทดสอบความชำนาญหรือการประเมินความเป็น
เนื้อเดียวกันและความคงตัว จะต้องดำเนินการโดย
ห้องปฏิบัติการที่สามารถปฏิบัติตามข้อกำหนด ISO/
IEC 17025 หรือ ISO 15189 หรือมาตรฐานที่
เกี่ยวข้อง กรณีวัสดุทดสอบความชำนาญเป็นวัสดุ
อ้างอิงจะต้องผลิตภายใต้เงื่อนไขข้อกำหนด ISO
17034

ข้อ 6.2 บุคลากร (Personnel) มาตรฐาน
ฉบับใหม่ตัดคำว่าบุคลากรด้านบริหารจัดการและ
ด้านวิชาการ แต่ระบุเป็นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความ
ชำนาญต้องสามารถเข้าถึงบุคลากรที่มีความสามารถ
ปฏิบัติงานด้วยความเป็นกลาง จำนวนที่เพียงพอใน
การดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ที่จำเป็น

ข้อ 6.3 สิ่งอำนวยความสะดวกและสภาวะ
แวดล้อม (Facilities and environmental
condition) มีรายละเอียดสอดคล้องตามมาตรฐาน
ฉบับแรก

ข้อ 6.4 สินค้าและบริการจากภายนอก
(External provide products and services)
ปรับเปลี่ยนจากมาตรฐานฉบับแรกในข้อกำหนดด้าน
บริหารจัดการข้อ 5.5 บริการรับเหมาช่วงรวมกับ
ข้อ 5.6 สินค้าและบริการที่จัดหาจากภายนอก เพิ่ม
การสื่อสารข้อกำหนดให้ผู้ให้บริการจากภายนอกทราบ

เกี่ยวกับรายละเอียดผลิตภัณฑ์และบริการ เกณฑ์การยอมรับความสามารถรวมถึงคุณสมบัติที่จำเป็นขององค์กรหรือบุคลากรที่เกี่ยวข้องและกิจกรรมที่ตั้งใจที่จะดำเนินการในสถานที่ของผู้ให้บริการจากภายนอก

ข้อ 7 ข้อกำหนดด้านกระบวนการ (process requirements)

ข้อกำหนดด้านกระบวนการประกอบด้วย 7 ข้อย่อย ซึ่งได้ปรับปรุงจากมาตรฐานฉบับแรก ข้อกำหนดด้านวิชาการในข้อ 4.4 การออกแบบ ข้อ 4.5 วิธีการและขั้นตอนการทดสอบ ข้อ 4.6 การดำเนินการ ข้อ 4.7 การวิเคราะห์และประเมินผลข้อมูล ข้อ 4.8 รายงาน ข้อ 4.9 การสื่อสารกับผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ และข้อกำหนดด้านบริหารจัดการ ข้อ 5.4 การทบทวนคำขอ การประเมินผลและสัญญา โดยมาตรฐานฉบับใหม่มีการปรับเปลี่ยนรายละเอียดดังนี้

ข้อ 7.1 การจัดทำสัญญาและการสื่อสารวัตถุประสงค์ (establishing, contracting and communicating the PT scheme objectives)

ข้อกำหนดนี้ครอบคลุม 2 ข้อย่อย ได้แก่ (1) ข้อ 7.1.1 การทบทวนคำขอ การประเมินผลและสัญญา เนื้อหาสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกด้านวิชาการในข้อ 5.4 ระบุให้มีเอกสารขั้นตอนในการทบทวนคำขอ สัญญา ที่ครอบคลุมทุกประเด็น มาตรฐานฉบับใหม่เพิ่มเติมเนื้อหาผลิตภัณฑ์และบริการจากภายนอก และตัดเรื่องนโยบายการทบทวนคำขอ การประเมินผลและสัญญา (2) ข้อ 7.1.2 การสื่อสาร รายละเอียด มีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกด้านวิชาการ ข้อ 4.9 การสื่อสารกับผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ มาตรฐานฉบับใหม่เพิ่มเติมการสื่อสารกับลูกค้าและข้อมูลที่จะต้องสื่อสาร เกี่ยวกับเกณฑ์ในการหาค่ากำหนด การประเมินผล และระยะเวลาการดำเนินงานที่สำคัญ

ข้อ 7.2 การออกแบบและการวางแผน (design and planning of a PT scheme)

มาตรฐานฉบับแรกด้านวิชาการในข้อ 4.4.1 มีรายละเอียดสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับใหม่ในข้อ 7.2 ซึ่งครอบคลุม 3 ข้อย่อย ได้แก่ (1) ข้อ 7.2.1 ทั่วไป มุ่งเน้นการวางแผนก่อนเริ่มโปรแกรม ทดสอบความชำนาญที่ครอบคลุมรายละเอียดสำคัญ 21 ประการ มีการเพิ่มเติมเนื้อหาใหม่ในข้อ 7.2.1.2 การเปลี่ยนแปลงสำคัญที่อาจส่งผลกระทบต่อความถูกต้องให้มีการระบุและจัดการความเสี่ยง รวมทั้งการจัดการกรณีผลการทดสอบที่ได้จากการวัดหรือการทดสอบที่แตกต่างกัน (2) ข้อ 7.2.2 การออกแบบทางสถิติ เน้นเรื่องความจำเป็นในการพัฒนาที่ตรงตามวัตถุประสงค์บนพื้นฐานของประเภทข้อมูล และ (3) ข้อ 7.2.3 การหาค่ากำหนด การวางแผน ส่วนนี้ระบุขั้นตอนการหาค่ากำหนดให้พิจารณาถึงความสามารถ สอดคล้องได้ทางมาตรวิทยา การหาค่าความไม่แน่นอน และนโยบายการเปิดเผยค่ากำหนด

ข้อ 7.3 การผลิตและการจัดส่งวัสดุทดสอบความชำนาญ (production and distribution of PT items)

ข้อกำหนด 7.3 ประกอบด้วย 5 ข้อย่อย ได้แก่ ข้อ 7.3.1 การผลิตวัสดุทดสอบความชำนาญ ข้อ 7.3.2 การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ข้อ 7.3.3 การจัดการและการเก็บรักษา ข้อ 7.3.4 การบรรจุภัณฑ์ ติดฉลากและการจัดส่งวัสดุทดสอบความชำนาญ และข้อ 7.3.5 คำแนะนำสำหรับผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ

ข้อ 7.3.1 การผลิตวัสดุทดสอบความชำนาญ และข้อ 7.3.2 การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว พบว่ามีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกด้านวิชาการในข้อ 4.4.2 และ ข้อ 4.4.3 โดยมาตรฐานฉบับใหม่เพิ่มเติมเรื่องของการกำหนดเกณฑ์สำหรับความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวที่เหมาะสมบนพื้นฐานของการประเมินความเสี่ยงที่อาจส่งผลต่อการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการ

ข้อ 7.3.3 การจัดการและการจัดเก็บวัสดุทดสอบความชำนาญ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงรายละเอียดจากมาตรฐานฉบับแรก แต่บังคับให้มีการทำให้แน่ใจว่าวัสดุทดสอบความชำนาญได้รับการระบุและจัดเก็บอย่างเหมาะสม ป้องกันการปนเปื้อน เกิดความเสียหายหรือการเสื่อมสภาพตลอดกระบวนการตั้งแต่การผลิตจนถึงการจัดส่ง รวมถึงการประเมินวัสดุทดสอบความชำนาญที่จัดเก็บเป็นระยะ มีการจัดการอย่างปลอดภัยโดยเฉพาะการจัดการสิ่งที่อาจเป็นอันตราย

ข้อ 7.3.4 การบรรจุ การติดฉลาก และการจัดส่งวัสดุทดสอบความชำนาญ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญจากมาตรฐานฉบับแรก ข้อนี้ครอบคลุมถึงกระบวนการขนส่งและการรักษาความปลอดภัยให้มีการตรวจสอบและจัดทำเอกสารเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมในระหว่างการขนส่งเพื่อให้แน่ใจว่าวัสดุทดสอบความชำนาญได้รับการบรรจุ ติดฉลากและขนส่งอย่างเหมาะสมโดยคำนึงถึงสถานะสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องด้วย

ข้อ 7.3.5 คำแนะนำสำหรับผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญมีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 7.6.1 คำแนะนำโดยละเอียดแก่ผู้เข้าร่วม เช่น การเก็บรักษาวัสดุทดสอบความชำนาญ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการวัดหรือการทดสอบ การจัดเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญ สภาพแวดล้อม การบันทึกและการรายงานผล รายละเอียดของวิธีวัดหรือทดสอบ การส่งคืนหรือส่งต่อ กำหนดระยะเวลาในการส่งผล และรายละเอียดการติดต่อกับผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ นอกจากนี้มาตรฐานฉบับใหม่ยังเพิ่มรายละเอียดในข้อ 7.3.5.2 ให้ระบุรายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการวัดหรือการทดสอบที่ผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ สามารถเลือกใช้โดยไม่จำเป็นต้องใช้วิธีวัดหรือทดสอบเฉพาะวิธีใดวิธีหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 4.5 การเลือกวิธีการและขั้นตอน

ข้อ 7.4 การประเมินและการรายงานผล (evaluation and reporting of PT scheme results)

มาตรฐานฉบับใหม่แบ่งออกเป็น 3 ข้อย่อยให้เนื้อหาครอบคลุมมากยิ่งขึ้น ได้แก่

ข้อ 7.4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลมีรายละเอียดสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกด้านวิชาการในข้อ 4.7.1 การวิเคราะห์และบันทึกข้อมูล และข้อ 4.5.2 เรื่องการจัดการกับผลจากวิธีการวัดหรือทดสอบที่แตกต่างกัน โดยรายละเอียดเกี่ยวข้องกับการบันทึกและวิเคราะห์ผลที่ได้รับจากผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ โดยใช้วิธีการที่เหมาะสม มีการกำหนดขั้นตอนเพื่อให้มั่นใจในความถูกต้องของการป้อนข้อมูล การถ่ายโอนข้อมูล การวิเคราะห์ทางสถิติ และการรายงาน รวมทั้งการจัดการกับค่าที่ผิดปกติ เช่น การรายงานหน่วยผิด การรายงานผลสลับกัน เป็นต้น โดยมีการจัดการที่เหมาะสม หรือเลือกใช้วิธีการทางสถิติที่เหมาะสม นอกจากนี้ในข้อ 7.4.1 นี้ยังมีขั้นตอนการจัดการที่หลากหลายและกำหนดหลักเกณฑ์ระเบียบปฏิบัติเพื่อจัดการข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์หรือมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อ 7.4.2 การประเมินผล พบว่ามีรายละเอียดสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 4.7.2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในข้อนี้ แต่มีการเพิ่มการอ้างอิงถึง ISO 13528 ที่กำหนดให้ใช้วิธีการประเมินที่ถูกต้องและจัดทำเป็นเอกสารโดยให้มีการเพิ่มความเห็นจากผู้เชี่ยวชาญรวมทั้งข้อเสนอแนะเกี่ยวกับประสิทธิภาพโดยรวม แหล่งที่มาของข้อผิดพลาดที่เป็นไปได้ คำแนะนำและข้อเสนอแนะหรือความคิดเห็นที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ เพื่อช่วยในการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง

ข้อ 7.4.3 รายงาน พบว่ามีรายละเอียดสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 4.8 โดยมีการเพิ่มประเด็นใหม่จำนวน 2 ข้อ ได้แก่ (1) กรณีที่ผู้เข้าร่วมระบุค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด ผู้จัด

โปรแกรมจะต้องนำมาระบุในรายงานผลด้วย และ (2) เรื่องการแก้ไขรายงาน ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญจะต้องวิเคราะห์ผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับผู้เข้าร่วมการทดสอบรายอื่น โดยจะต้องมั่นใจว่าการแก้ไขรายงานนี้ไม่มีผลกระทบกับผลการประเมินรายอื่น ๆ ด้วย

ข้อ 7.5 การควบคุมกระบวนการ (control of the PT scheme process)

ข้อกำหนด 7.5 ประกอบด้วย 3 ข้อย่อย ได้แก่

ข้อ 7.5.1 บันทึกทางวิชาการ พบว่ารายละเอียดมีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อกำหนดด้านบริหารจัดการของข้อ 5.13.2 โดยกำหนดให้มีการตรวจสอบให้แน่ใจว่าบันทึกทางวิชาการ รายงานต่าง ๆ ได้บันทึกในวันที่มีกิจกรรม การระบุตัวตน ผู้รับผิดชอบ ข้อมูลที่ใช้ในการตรวจสอบต้นฉบับและข้อมูลอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้รับการบันทึกและเชื่อมโยงกัน การเปลี่ยนแปลงบันทึกสามารถทวนสอบกลับได้ ระบบการจัดการข้อมูลได้รับการป้องกันการเข้าถึงและการสูญหาย

ข้อ 7.5.2 การควบคุมข้อมูลและการจัดการข้อมูล มีการปรับปรุงจากมาตรฐานฉบับแรกด้านวิชาการในข้อ 4.7.1 การวิเคราะห์ข้อมูลและบันทึกโดยมุ่งเน้นความจำเป็นในการสร้างระบบการจัดการข้อมูลเพื่อการเก็บรวบรวม ประมวลผล บันทึกการรายงาน จัดเก็บ หรือทวนสอบข้อมูล ต้องได้รับการตรวจสอบอย่างเหมาะสมก่อนมีการนำไปใช้งาน ส่วนเรื่องการควบคุมกระบวนการ เป็นข้อกำหนดที่เพิ่มรายละเอียดใหม่จำนวนมากดังนี้ (1) ให้มีการตรวจสอบที่เหมาะสมอย่างเป็นระบบในการคำนวณการจัดการถ่ายโอนข้อมูลอย่างเหมาะสมและเป็นระบบ (2) การดูแลระบบโดยผู้ให้บริการจากภายนอกจะต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดที่บังคับใช้ (3) ระบบการจัดการข้อมูล จะต้องป้องกันการเข้าถึงโดยไม่ได้รับอนุญาต

การปลอมแปลง การสูญหาย มีสภาพแวดล้อมในการจัดเก็บที่สอดคล้องกับข้อกำหนดเฉพาะ มีการบำรุงรักษาและบันทึกความล้มเหลวของระบบและการดำเนินการแก้ไขที่เหมาะสม และ (4) มีคำแนะนำคู่มือ ข้อมูลอ้างอิงที่เกี่ยวกับระบบการจัดการข้อมูลพร้อมสำหรับบุคลากร นอกจากนี้ในหมายเหตุข้อ 7.5.2 ได้ระบุเอกสารระบบการจัดการข้อมูลให้รวมถึงการจัดการข้อมูลที่มีอยู่ในระบบคอมพิวเตอร์และไม่ใช้คอมพิวเตอร์ การใช้ซอฟต์แวร์เชิงพาณิชย์ทั่วไปภายในขอบเขตการใช้งานที่ออกแบบไว้ให้ถือว่าผ่านการตรวจสอบเพียงพอแล้ว

ข้อ 7.5.3 เป็นหนึ่งในข้อกำหนดฉบับใหม่ซึ่งไม่มีในมาตรฐานฉบับแรก โดยเพิ่มความจำเป็นที่จะต้องมีส่วนตอนในการติดตามและตรวจสอบความถูกต้อง กิจกรรมการเฝ้าระวัง ให้ได้รับการวางแผน ทบทวน และบันทึก เพื่อสนับสนุนกระบวนการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง

ข้อ 7.6 การจัดการข้อร้องเรียน (handling of complaints) และข้อ 7.7 การจัดการอุทธรณ์ (handling of appeals)

รายละเอียดมาตรฐานฉบับใหม่พบว่ามีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อกำหนดด้านบริหารจัดการ ข้อ 5.8 การร้องเรียนและการอุทธรณ์ โดยตัดคำว่า “นโยบาย” พร้อมทั้งเพิ่มขั้นตอนการจัดการข้อร้องเรียนจำนวน 9 ข้อย่อย คือข้อ 7.6.1-7.6.9 ให้มีเอกสารขั้นตอนการจัดการ เปิดเผยกระบวนการต่อสาธารณะ การพิจารณาการร้องเรียน ความรับผิดชอบในการรวบรวมข้อมูล การรายงานความก้าวหน้า การสืบสวนและการตัดสินใจที่จะต้องไม่ส่งผลให้เกิดความแตกแยก การแก้ไขข้อร้องเรียน ตรวจสอบและอนุมัติโดยบุคคลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเรื่องร้องเรียน การแจ้งให้ผู้ร้องเรียนทราบอย่างเป็นทางการและความรับผิดชอบต่อการตัดสินใจทั้งหมด

สำหรับการจัดการอูทธรณ์ เพิ่มเติมขั้นตอนการจัดการทั้งหมด 7 ข้อย่อย คือข้อ 7.7.1-7.7.7 ระบุให้มีเอกสารขั้นตอนการจัดการ เปิดเผยกระบวนการต่อสาธารณะ การรับทราบการอูทธรณ์และรายงานความคืบหน้า ความรับผิดชอบในการรวบรวมข้อมูล และการตัดสินใจทั้งหมดในกระบวนการจัดการ การตัดสินใจ การทบทวน อนุมัติโดยบุคคลที่ไม่เกี่ยวข้องกับผู้ประเมินอูทธรณ์ การสืบสวนและการตัดสินใจจะต้องไม่ส่งผลให้เกิดการเลือกปฏิบัติใดๆ

ข้อ 8 ข้อกำหนดการบริหารจัดการ (management requirements)

ข้อกำหนดด้านการบริหารจัดการมาตรฐานฉบับเดิม ISO/IEC 17043:2010 อยู่ในข้อกำหนดที่ 5 มีจำนวน 15 ข้อ โดยข้อกำหนด 6 ข้อถูกปรับเปลี่ยนกลุ่มใหม่ ได้แก่ ข้อ 5.1 องค์กรปรับเปลี่ยนเป็นข้อกำหนดด้านโครงสร้าง ข้อ 5.5 การรับเหมาช่วง และข้อ 5.6 สินค้าและบริการที่จัดหาจากภายนอก ปรับเปลี่ยนเป็นข้อกำหนดด้านทรัพยากร ข้อ 5.9 การควบคุมงานที่ไม่เป็นตามข้อกำหนด ข้อ 5.4 การทบทวนคำขอ การประมูล และสัญญา และข้อ 5.8 การร้องเรียนและการอูทธรณ์ ปรับเปลี่ยนเป็นข้อกำหนดด้านกระบวนการ ดังนั้นข้อกำหนดที่จัดอยู่กลุ่มการบริหารจัดการจึงมีเพียง 9 ข้อ มาตรฐานใหม่มีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกแต่เปลี่ยนหมายเลขข้อกำหนด รายละเอียดที่เพิ่มเติมหรือการเปลี่ยนแปลงหลักที่สำคัญ ดังแสดงใน Table 2 ดังนี้

ข้อ 8.1 ข้อกำหนดทั่วไปเกี่ยวกับระบบการบริหารจัดการ (general requirements)

รายละเอียดในเรื่องนี้ของมาตรฐานฉบับใหม่มีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 5.2 ระบบบริหารจัดการ ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญจะต้องสร้างเอกสาร นำไปใช้และบำรุงรักษาระบบการบริหารจัดการที่ตรงตามข้อกำหนด และ

มีการเพิ่มรายละเอียดในข้อ 8.1.3 ให้สามารถนำระบบคุณภาพอื่น เช่น ISO 9001 มาใช้เป็นระบบการบริหารจัดการคุณภาพได้ ส่วนรายละเอียดข้อ 8.1.4 การแสดงหลักฐานความมุ่งมั่นในการพัฒนาและการนำระบบการจัดการไปใช้เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพอย่างต่อเนื่อง มีความสอดคล้องกับข้อกำหนดฉบับแรกในข้อ 5.10 การปรับปรุง สำหรับเรื่องของนโยบายระบบการบริหารจัดการคุณภาพ และคำแถลงนโยบายคุณภาพ ที่มาตรฐานฉบับแรกกำหนดให้มีในคู่มือคุณภาพนั้น มาตรฐานฉบับใหม่พบว่าไม่ได้มีการระบุไว้เป็นข้อกำหนด

ข้อ 8.2 เอกสารระบบบริหารจัดการ (management system documentation)

เอกสารระบบบริหารจัดการ ในมาตรฐานฉบับใหม่ อยู่ในข้อ 8.2.1 นโยบายและวัตถุประสงค์ ซึ่งระบุถึงความสามารถ ความเป็นกลาง และความสม่ำเสมอเนื่องในการดำเนินงาน โดยสอดคล้องกับข้อกำหนดมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 5.2.3 นโยบายระบบการบริหารจัดการ คำแถลงนโยบายคุณภาพ สำหรับวัตถุประสงค์ได้รับการจัดทำและทบทวนโดยผู้มีอำนาจบริหารระดับสูง มาตรฐานฉบับใหม่ได้เพิ่มอยู่ในข้อ 8.2.2 เอกสารจากกระบวนการ ระบบการบริหารจัดการและบันทึกทั้งหมดเกี่ยวกับการปฏิบัติงาน โดยจะต้องนำเข้าหรืออ้างอิงสู่เอกสารระบบการบริหารจัดการ ซึ่งในมาตรฐานฉบับใหม่ไม่ได้กำหนดให้ต้องมีคู่มือคุณภาพและนโยบายคุณภาพ รวมทั้งการระบุตำแหน่งผู้จัดการคุณภาพหรือผู้จัดการวิชาการ แต่มีระบุในข้อกำหนดด้านโครงสร้างข้อ 5.5c ให้ต้องจัดทำเอกสาร ขั้นตอนในขอบเขตที่จำเป็นเพื่อให้การดำเนินงานสอดคล้องกับมาตรฐานและรักษาไว้ซึ่งความถูกต้องของงาน

เมื่อพิจารณาความสอดคล้องของข้อกำหนดฉบับใหม่พบว่ามีเอกสารจำนวน 12 เรื่อง

ที่ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญสามารถปรับปรุงเอกสารที่ได้จัดทำตามข้อกำหนดฉบับก่อนหน้านั้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนี้

- (1) เอกสารแสดงความสามารถของบุคลากร
 - (2) เอกสารระบุสถานะแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อความถูกต้องของวัสดุทดสอบความชำนาญ การวัดหรือการทดสอบ และให้มีการบันทึก
 - (3) การจัดซื้อหรือการใช้บริการจากภายนอก และให้มีการบันทึกการประเมินความสามารถของผู้ผลิตและบริการจากภายนอก
 - (4) วิธีการตรวจสอบคำขอ การประมูล และสัญญา
 - (5) วิธีการทางสถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล พร้อมทั้งระบุเหตุผลที่เลือกใช้วิธีการทางสถิตินั้น รวมทั้งวิธีการทางเลือกในกรณีที่ข้อมูลไม่ตรงกับเกณฑ์การวิเคราะห์ตามหลักสถิติที่กำหนด
 - (6) วิธีการตรวจสอบสถานะแวดล้อมในการขนส่งวัสดุทดสอบความชำนาญ
 - (7) การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว
 - (8) คำแนะนำสำหรับผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ
 - (9) วิธีการจัดการกับวัสดุทดสอบความชำนาญ
 - (10) หลักเกณฑ์และวิธีการจัดการกับผลการวัดหรือการทดสอบที่ไม่เหมาะสมกับการประเมินทางสถิติ
 - (11) คำแนะนำสำหรับผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ และ
 - (12) การปฏิบัติเมื่อพบสิ่งที่ไม่สอดคล้องกับวิธีปฏิบัติงานหรือข้อกำหนดและให้มีการบันทึก
- ดังนั้นเอกสารที่จะต้องจัดทำเพิ่มตามมาตรฐานฉบับใหม่มีเพียง 3 เรื่อง ได้แก่ (1) การตรวจสอบระบบการจัดการข้อมูลและการบันทึก

(2) การจัดการข้อร้องเรียน และ (3) การจัดการข้ออุทธรณ์ สำหรับเรื่องการจัดทำแผน ในมาตรฐานฉบับแรกได้ระบุให้มีแผนทดสอบความชำนาญ แผนการตรวจติดตามภายใน และแผนการทบทวนระบบบริหารจัดการ ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐานฉบับใหม่จำเป็นต้องจัดทำแผนเพิ่มเติมสำหรับการเฝ้าระวังกระบวนการ และแผนการจัดการกับความเสี่ยงและโอกาส ทั้งนี้บุคลากรทุกคนที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมจะต้องสามารถเข้าถึงเอกสารระบบบริหารจัดการที่เกี่ยวข้องกับงานที่รับผิดชอบได้ตามข้อกำหนด 8.2.3

ข้อ 8.3 การควบคุมเอกสารระบบการบริหารงาน (control of management system documents)

ข้อกำหนด 8.3 ของมาตรฐานฉบับใหม่มีความสอดคล้องกับข้อกำหนดมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 5.3 ที่ระบุให้มีการตรวจสอบให้แน่ใจว่าเอกสารได้รับการอนุมัติใช้ โดยบุคลากรที่ได้รับการมอบหมาย มีการทบทวนเป็นระยะตามความเหมาะสม มีการระบุสถานะการแก้ไขเอกสารและการแจกจ่ายไปยังจุดที่ใช้งาน สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงคือการป้องกันสิ่งที่ไม่ได้ตั้งใจในการใช้เอกสารที่ไม่ทันสมัย แต่มาตรฐานฉบับใหม่นี้พบว่าไม่ได้นิยามรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงเอกสารและการแก้ไขเอกสารด้วยลายมือ ซึ่งมาตรฐานฉบับแรกได้ระบุไว้ในข้อกำหนด 5.3.3

ข้อ 8.4 การควบคุมบันทึก (control of records)

ข้อกำหนด 8.4 ของมาตรฐานฉบับใหม่มีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 5.13 ที่ให้จัดทำบันทึก พร้อมสำหรับการใช้งาน การสำรองข้อมูลให้สามารถเรียกค้นหาข้อมูลได้สะดวก การจัดเก็บรักษาและการกำจัดบันทึกให้กำหนดระยะเวลาที่สอดคล้องกับภาระผูกพันตามสัญญา การเข้าถึงบันทึกจะต้องสอดคล้องกับข้อผูกพันใน

การรักษาความลับ

ข้อ 8.6 การปรับปรุง (improvement)

ข้อกำหนด 8.6 ของมาตรฐานฉบับใหม่มีความสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 5.7 การบริการลูกค้า และข้อ 5.10 การปรับปรุง ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญจะต้องระบุและเลือกโอกาสในการปรับปรุง พร้อมทั้งดำเนินการตามความจำเป็นด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การทบทวนขั้นตอนการดำเนินงาน การใช้นโยบายและวัตถุประสงค์การวิเคราะห์ผลการตรวจติดตามภายใน การดำเนินการแก้ไขตามมติการประชุมทบทวนระบบบริหารจัดการ รวมทั้งข้อเสนอแนะจากบุคลากร การประเมินความเสี่ยง ข้อมูลการประเมินจากองค์กรภายนอก คำติชมจากผู้เข้าร่วมและลูกค้าทั้งเชิงบวกและเชิงลบ สามารถนำมาวิเคราะห์และใช้เพื่อการปรับปรุงได้

ข้อ 8.7 การดำเนินการแก้ไข (corrective actions)

ข้อกำหนด 8.7 ของมาตรฐานฉบับใหม่มีรายละเอียดที่ปรับเปลี่ยนจากมาตรฐานฉบับแรกในข้อ 5.11 เมื่อเกิดความไม่สอดคล้องจะต้องตอบสนอง ดำเนินการควบคุมและแก้ไขให้เหมาะสมกับระดับความเสี่ยง รวมทั้งประเมินความจำเป็นในการกำจัดสาเหตุเพื่อไม่ให้เกิดซ้ำอีกหรือเกิดขึ้นที่กิจกรรมส่วนอื่น ๆ ให้ทบทวนประสิทธิผลของการดำเนินการแก้ไข มีการระบุความเสี่ยงและโอกาสเป็นระยะตามความเหมาะสม

ข้อ 8.8 การตรวจติดตามภายใน (internal audits)

มาตรฐานฉบับแรกในข้อ 5.14 ระบุเป็นความรับผิดชอบของผู้จัดการคุณภาพในการวางแผนและดำเนินการให้มีการตรวจติดตามภายใน ส่วนมาตรฐานฉบับใหม่ไม่ได้ระบุเป็นหน้าที่ของผู้จัดการคุณภาพ แต่ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญจะต้องดำเนินการให้มีการตรวจติดตามภายในตาม

แผนที่กำหนด ด้วยบุคลากรที่มีความรู้ในกิจกรรมและข้อกำหนด ISO 17043 รวมทั้งเป็นอิสระจากกิจกรรมที่ตรวจตามแนวทางมาตรฐานสากล ISO 19011:2018⁽¹⁰⁾ เพื่อประเมินความสอดคล้องและประสิทธิผลของระบบการบริหารจัดการ รวมทั้งเพิ่มการจัดทำเกณฑ์และขอบเขตการตรวจติดตาม และดูแลให้มีการรายงานผลการตรวจติดตามภายในต่อผู้บริหารที่เกี่ยวข้องด้วย

ข้อ 8.9 การทบทวนระบบบริหาร (management reviews)

มาตรฐานฉบับแรกในข้อ 5.15 การทบทวนระบบบริหาร มี 10 ประเด็นและ 4 หมายเหตุ ส่วนมาตรฐานฉบับใหม่ปรับเปลี่ยนเป็น 15 ประเด็น โดยเพิ่มรายละเอียดเนื้อหาที่สำคัญจำนวน 5 ประเด็น คือ (1) การเปลี่ยนแปลงภายในและภายนอกที่เกี่ยวข้อง (2) การจัดการเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ (3) ความเหมาะสมและเพียงพอของทรัพยากร (4) ผลการระบุความเสี่ยง และ (5) ผลลัพธ์ของการเฝ้าระวังกระบวนการ รวมทั้งให้เพิ่มรายละเอียดที่จะต้องบันทึกการประชุมเกี่ยวกับ (1) ความมีประสิทธิภาพของระบบการบริหารจัดการและกระบวนการต่าง ๆ (2) การปรับปรุงกิจกรรม (3) การจัดหาทรัพยากร และ (4) ความต้องการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามมาตรฐานฉบับใหม่พบว่าไม่ได้มีการระบุหมายเหตุ 4 ข้อที่มีในมาตรฐานฉบับแรกที่ระบุไว้เกี่ยวกับ (1) ระยะเวลาในการทบทวนระบบบริหารจัดการทุก 12 เดือน (2) ผลการทบทวนระบบบริหารใช้เป็นข้อมูลนำเข้าสู่ระบบการวางแผน (3) การทบทวนระบบบริหารรวมถึงการพิจารณาหัวข้อที่เกี่ยวข้องในการประชุมฝ่ายบริหารตามปกติ และ (4) กรณีหน่วยงานหรือองค์กรขนาดใหญ่มีหลากหลายกิจกรรมสามารถจัดการประชุมทบทวนระบบบริหารจัดการในแต่ละประเด็นเพื่อให้ครอบคลุมกิจกรรมการทดสอบความชำนาญ

สรุป

มาตรฐานสากล ISO/IEC 17043:2023 มีการจัดโครงสร้างตาม ISO/CASCO standard ประกอบด้วย ข้อกำหนดทั่วไป ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง ข้อกำหนดด้านทรัพยากร ข้อกำหนดด้านกระบวนการ และข้อกำหนดด้านระบบบริหารจัดการ โดยมีการเรียงหมายเลขข้อกำหนดเปลี่ยนใหม่ให้มีความสอดคล้องกับมาตรฐานสากลอื่น เช่น ISO/IEC 17025:2017 และ ISO 15189:2022 เป็นต้น เป็นการอำนวยความสะดวกให้หน่วยงานหรือองค์กรที่มีกิจกรรมและดำเนินงานตามมาตรฐานมากกว่า 1 ระบบงาน สามารถบูรณาการข้อกำหนดของมาตรฐานเพื่อลดความซ้ำซ้อนในการดำเนินการกิจกรรมธำรงรักษาระบบคุณภาพ รวมทั้งการปรับนิยามศัพท์ให้เป็นแนวทางเดียวกับ ISO 13528:2022 เพื่อให้มีความเข้าใจความหมายเป็นไปในทางเดียวกันและมีความชัดเจนมากขึ้น มาตรฐานฉบับใหม่ได้เพิ่มทางเลือกให้ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญสามารถใช้มาตรฐานระบบการบริหารจัดการอื่น ๆ เช่น ISO 9001:2015 แสดงการดำเนินงานในส่วนข้อกำหนดด้านการบริหารจัดการแบบบูรณาการระบบเพื่อให้การทดสอบความชำนาญเป็นไปอย่างเหมาะสมกับข้อกำหนดที่เกี่ยวข้อง

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043:2023 และ ISO/IEC 17043:2010 มีการปรับเปลี่ยนชื่อ มาตรฐานการประเมินความสอดคล้อง ข้อกำหนดทั่วไปสำหรับการทดสอบความชำนาญ เป็นข้อกำหนดทั่วไปสำหรับความสามารถของผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ เป็นการระบุที่ชัดเจนถึงหน้าที่ความรับผิดชอบต่อทุกกระบวนการรวมทั้งการใช้บริการจากภายนอกด้วยรายละเอียดเนื้อหากระชับและครอบคลุมมากขึ้น ตั้งแต่กระบวนการวางแผนดำเนินการทางวิชาการ

และกิจกรรมการปฏิบัติงานต่าง ๆ โดยเฉพาะการเพิ่มข้อกำหนดและแนวคิดใหม่ที่ไม่มีในมาตรฐานฉบับแรกใน 3 ประเด็น ได้แก่

(1) ความเป็นกลาง ผู้บริหารสูงสุดและบุคลากรทั้งหมดต้องมีความมุ่งมั่นปฏิบัติงานด้วยความเป็นกลาง มีโครงสร้าง การบริหารจัดการ มีการติดตามกิจกรรมและความสัมพันธ์ของบุคลากร กรณีมีข้อจำกัดในเรื่องจำนวนบุคลากร จะต้องมีความต้องการสืบสวนและการตัดสินใจที่ดีและระมัดระวังไม่ให้เกิดผลกระทบต่อความเป็นกลางในการจัดการข้อร้องเรียนหรือข้ออุทธรณ์

(2) การเฝ้าระวังกระบวนการ จะต้องมีการเฝ้าระวังกระบวนการที่สำคัญเป็นระยะ ๆ ในเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้มีการปรับปรุงแก้ไขสิ่งที่ไม่สอดคล้องได้ทันเวลา ซึ่งจะช่วยเติมเต็มระบบคุณภาพให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

(3) การจัดการความเสี่ยงและโอกาส มุ่งเน้นการพิจารณาความเสี่ยงที่อาจส่งผลกระทบต่อความสำเร็จหรือทำให้ไม่บรรลุวัตถุประสงค์ ระบุให้มีการวางแผนการดำเนินการเพื่อจัดการความเสี่ยง โดยไม่ระบุข้อกำหนดหรือเอกสารวิธีการจัดการความเสี่ยงหรือกระบวนการจัดการความเสี่ยงอย่างเป็นทางการ ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญมีอิสระในการเลือกประยุกต์ใช้วิธีบริหารความเสี่ยงที่ครอบคลุมจากแนวทางหรือมาตรฐานอื่น ๆ ได้

ทั้งนี้ข้อกำหนดที่มีการเปลี่ยนแปลงสำคัญซึ่งอาจต้องใช้วิธีปฏิบัติใหม่หรือเปลี่ยนแปลงวิธีปฏิบัติที่มีอยู่ ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญจะต้องบ่งชี้สิ่งที่ได้ดำเนินการเปลี่ยนแปลงให้ชัดเจนสำหรับข้อกำหนดส่วนใหญ่ซึ่งมีการเปลี่ยนหมายเลขข้อกำหนดและปรับเปลี่ยนเล็กน้อยแต่เจตนาโดยรวมมีความสอดคล้องกัน ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญสามารถพิจารณาดำเนินการได้ตามความเหมาะสม

โดยมุ่งเน้นให้มีการทำกิจกรรมเพื่อธำรงรักษาระบบคุณภาพอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่อง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของบริการ ส่งมอบผลการทดสอบความชำนาญที่แม่นยำน่าเชื่อถือ มีคุณค่าในการส่งเสริมให้เกิดระบบการประกันคุณภาพที่เข้มแข็งแก่ห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.สุมนมาลย์ อุทัยกุล ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการเขียนบทความ และขอขอบคุณบุคลากรกองทดสอบความชำนาญและสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เป็นกำลังใจและให้โอกาสในการดำเนินการได้สำเร็จตามความมุ่งหมาย

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
2. ISO 15189:2022. Medical laboratories- requirements for quality and competence. Geneva: International Organization for Standardization; 2022.
3. ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment- general requirements for proficiency testing. Geneva: International Organization for Standardization; 2010.
4. ISO/IEC 17043:2023. Conformity assessment- general requirements for the competence of proficiency testing providers. Geneva: International Organization for Standardization; 2023.
5. ISO 13528:2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization; 2022.
6. ISO/IEC 17000:2020. Conformity assessment- Vocabulary and general principles. Geneva: International Organization for Standardization; 2020.
7. ISO/IEC Guide 99:2007. International vocabulary of metrology-Basic and general concepts and associated terms (VIM). Geneva: International Organization for Standardization; 2007.
8. Department of Science Service, Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation. Bangkok. Proficiency testing provider accreditation according to ISO/IEC 17043:2023 [cited 2023 Dec 27]. Available from: http://110.164.87.6/images/pdf/Transition_ISO_IEC_17043-2023_EN-BLA-DSS.pdf
9. ISO 17034:2016, General requirement for the competence of reference material producers. Geneva: International Organization for Standardization; 2016.
10. ISO 19011:2018. Guidelines for auditing management systems. Geneva: International Organization for Standardization; 2018.

การตรวจวัดระดับไอโอเฮกซอลในพลาสมาด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงพิเศษอย่างง่ายและรวดเร็ว

พรชัย หมีเหมว¹ อัญชลี จันทรทอง¹ สุกานดา ยิ่งยอดกุล¹ เสาวนีย์ ไชยสุริยะศิริ¹
โยธิน คงนา² และ ภาวิณี ถิ่นการ^{1*}

¹ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
กรุงเทพมหานคร

²งานเคมีคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันประสาทวิทยา กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การวัดค่าไอโอเฮกซอลในพลาสมาอย่างแม่นยำถือเป็นสิ่งสำคัญในการตรวจวัดค่าอัตราการกรองของไต (GFR) ในการศึกษา เราได้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ใหม่ในการหาปริมาณไอโอเฮกซอลโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษพร้อมการตรวจจับอัลตราไวโอเลต (UPLC-UV) การศึกษานี้เกี่ยวข้องกับการเตรียมตัวอย่างและการแยกทางโครมาโทกราฟีสำหรับไอโอเฮกซอลค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ประกอบด้วยประเภทของคอลัมน์ องค์ประกอบและพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ ได้รับการปรับให้เหมาะสมเพื่อให้ได้การแยกที่เหมาะสมที่สุด สภาวะโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมที่สุดเป็นดังนี้ เฟสเคลื่อนที่คือร้อยละ 3.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อะซิโตนไนโตรสต่อน้ำ โดยไม่ต้องปรับความเป็นกรด-ด่าง คอลัมน์คือ Poroshell 120 EC-C18 โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที วิธีการที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นเส้นตรงที่ดีเยี่ยมในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 640 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 = 0.9999$) การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์แสดงด้วยค่าร้อยละ RSD ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ (<ร้อยละ 2) ทั้งสำหรับการวิเคราะห์ with-in run และ between run การทดสอบความแม่นยำมีค่าการคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 97.70 $\pm$ 2.11 ถึงร้อยละ 102.91 $\pm$ 1.47 วิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจพบ และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.97 และ 3.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยใช้เวลาการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างที่สั้น (6 นาที) โดยรวมแล้วการทดสอบ UPLC-UV ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้วิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และเชื่อถือได้สำหรับการตรวจวัดไอโอเฮกซอลในพลาสมา ทำให้เหมาะสำหรับการใช้งานทางคลินิกในการปฏิบัติงานด้านไตวิทยาและการวิจัยเพื่อการประเมิน GFR โดยการวัดตรง

คำสำคัญ: อัตราการกรองผ่านไต ไอโอเฮกซอล เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพิเศษ การหาค่าที่เหมาะสมของวิธีทดสอบ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: pawinee.thi@mahidol.ac.th

รับบทความ: 10 มกราคม 2567

แก้ไขบทความ: 3 มีนาคม 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 5 เมษายน 2567

A Simple and Rapid Ultra-performance Liquid Chromatography Method for Plasma Iohexol Determination

Pornchai Meemaew¹, Anchalee Chanthong¹, Sukanda Yingyodkul¹,
Saowanee Chaisuriyasiri¹, Yothin Khongna² and Pawinee Thinkar^{1*}

¹*Division of Clinical Chemistry, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University, Bangkok, Thailand*

²*Clinical Chemistry and Immunology Laboratory, Department of Medical Technology,
Neurological Institute of Thailand, Bangkok, Thailand*

Abstract

Accurate measurement of iohexol in plasma is essential for determining glomerular filtration rate (GFR). In this study, we developed and validated a novel method for quantifying iohexol using ultra-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (UPLC-UV). The method involved sample preparation and chromatographic separation for iohexol. Various parameters including the type of stationary phase, mobile phase composition, and pH of mobile phase were optimized to achieve optimal separation. The optimal chromatographic conditions are shown as follow; the mobile phase was 3.5% (v/v) of acetonitrile/water without adjusting pH, a flow rate was set at 0.2 mL/min, the analytical column was Poroshell 120 EC-C18 with a column temperature of 30 °C. The developed method exhibited excellent linearity over a concentration range of 0 to 640 µg/mL ($R^2 = 0.9999$). Precision analyses demonstrated %RSD values within acceptable limits (<2%) for within-run and between-run analyses. Recovery experiments yielded accurate results ranging from $97.70 \pm 2.11\%$ to $102.91 \pm 1.47\%$. The method also achieved low limits of detection and quantitation (0.97 and 3.26 µg/mL, respectively) with a short analysis time per sample (6 minutes). Overall, the developed UPLC-UV assay provides a simple, rapid, and reliable method for iohexol determination in plasma, making it suitable for clinical applications in nephrology practice and research for direct GFR assessment.

Keywords: Glomerular filtration rate, Iohexol, Ultra-high-performance liquid chromatography, Method optimization, Method validation

*Corresponding author E-mail address: pawinee.thi@mahidol.ac.th

Received: 10 January 2024

Revised: 3 March 2024

Accepted: 5 April 2024

Introduction

The glomerular filtration rate (GFR) is the amount of plasma filtered by the renal glomerular capillaries into the Bowman's capsule per unit of time. It plays a key role in the clinical assessment of kidney function, the diagnosis of chronic kidney disease, the evaluation of living kidney donation before nephrectomy, and the assessment of the progression of renal function decrease in kidney disease. Understanding GFR is essential for dosing potentially toxic drugs with a narrow therapeutic index and monitoring treatment's impact on renal function.^(1, 2)

There are two methods for measuring GFR: direct measure GFR (measurement GFR; mGFR), which involves injecting exogenous substances like inulin, iothalamate, ⁵¹Cr-ethylenediaminetetraacetic acid (⁵¹Cr-EDTA), or iohexol that are almost completely excreted through the kidneys^(3, 4), and then calculating the GFR through the excretion rate of that exogenous substance by measuring its level in the blood and urine. Another method involves estimating GFR (estimated GFR; eGFR) by calculating the GFR using an accurate formula after assessing the amounts of endogenous substances produced by the body and cleared in the urine, such as creatinine and cystatin C.⁽⁵⁾ These include the CKD-EPI equation (CKD-epidemiology cooperation), the MDRD equation (modification of diet in renal disease), and the Cockcroft-Gault formula.^(6, 7)

Direct measurement of GFR for obtaining a precise value is required in particular circumstances because it affects the choice of treatment. For instance, when a drug has a narrow therapeutic range and is toxic to the kidneys, or when assessing a potential living kidney donor.⁽⁸⁾ In addition, it is advised to assess GFR using the direct measurement approach in chronic conditions such as liver cirrhosis because GFR estimations based on endogenous substances like creatinine in patients with liver cirrhosis may be invalid under certain conditions, such as reduced muscle mass, malnutrition, or excessive bilirubin.^(9, 10) Moreover, the obese patient is encouraged to employ direct measurement since, in individuals with a BMI >30 kg/m², a variety of body composition variables, like reduced muscle mass, may cause the use of creatinine-based equations to overstate GFR.^(9, 11)

In daily practice, estimating GFR-based equations are most frequently utilized. They have the advantage of being inexpensive and providing results immediately.⁽⁹⁾ Their disadvantage is that they rely on endogenous biomarkers, which can be affected by factors including age, sex, muscle mass, medications, some chronic illnesses, food, and probably many more.⁽¹²⁾ Therefore, in situations where more precise GFR is required, a technique for evaluating exogenous compounds qualified as an ideal marker for measurement of GFR properties was used instead, and iohexol is

another widely used exogenous marker.⁽¹³⁾

Iohexol is a safe and effective nonionic contrast medium, structure as shown in Fig. 1, that has various advantages in clinical practice and could be utilized as a reliable GFR marker in patients with severe renal failure. As a result,

it is becoming a more widely acknowledged marker for determining GFR.⁽¹⁴⁻¹⁷⁾

Iohexol clearance is recommended as a reference method for finding the glomerular filtration rate, which is important in nephrology practice and research.^(17, 18)

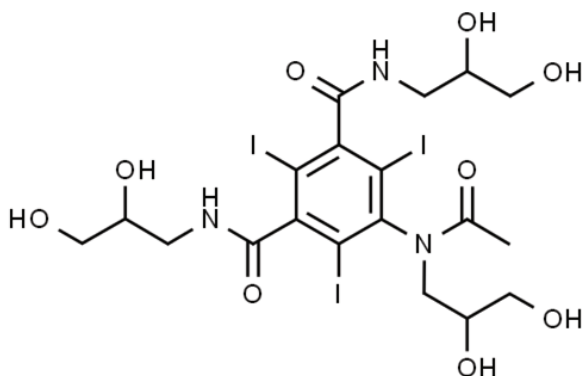


Fig. 1 The chemical structure of iohexol (N,N'-Bis (2,3-dihydroxypropyl)-5-[N-(2,3-dihydroxypropyl) acetamido] triiodoisophthalamide).⁽²⁶⁾

Currently, several studies have published methods for the determination of iohexol using high-performance liquid chromatography (HPLC)^(14, 15, 19) methods, and these methods keep fulfilling the requirements of clinicians and researchers. Using the HPLC-UV method, the two isomers have different retention times.⁽²⁰⁾ Since the endo-isomer is proportionally less than the exo-isomer (ratio about 20:80), most investigators measured only the major compound and generally used this isomer for the calculations of iohexol clearance and consequently GFR determination.^(16, 21)

The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method is another highly accurate and precise method of determining iohexol in plasma.⁽²²⁾ However, because of the analyzer's limitations and high cost, routine laboratories are unable to perform analysis using this method. That is why this method is still not widely used. However, the advantages of ultra-high performance liquid chromatography (UPLC), which include speed, good separation, and sensitivity and could be considered to be a new direction for chromatography method because of the analysis time and

sensitivity in clinical laboratories, are very important. As a result, UPLC is becoming increasingly important. UPLC differs from traditional HPLC in the size of particles of the stationary phase and the liquid handling system can be used to operate at much higher pressure. The knowledge from the Van Deemter equation, the efficiency of the chromatographic technique is proportional to particle size decrease. The small particle diameter can reduce height equivalent to a theoretical plate (HETP) which results in higher efficiency.⁽²³⁾

Due to the superior advantages of the UPLC method in terms of speed, separation, and sensitivity than HPLC, the development of measurement work has increasingly focused on this technique. This study aimed to develop a sensitive, fast, and reliable UPLC-UV method for iohexol determination. Validation results were conducted following the International Conference on Harmonization (ICH) criteria⁽²⁴⁾ and acceptance criteria following the study of Shabir G *et al.*⁽²⁵⁾

Material and method

1. Samples

The 20 left-over EDTA plasma samples from the Division of Clinical Chemistry Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital were collected in June 2020 and kept at -80 °C until use. These samples were used for method development, optimization, and

validation. This study received a proper institutional review and broad approval from the Human Research Ethics Committee, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. The ethics number for this study is COA. MURA2020/915.

2. Materials and reagents

Iohexol standard was purchased from US Pharmacopeia (Rockville, USA). The iohexol-related compound B (5-amino-N, N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-triiodo-1,3-benzenedicarboxamide) was purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). HPLC-grade acetonitrile was purchased from RCI Labscan Limited (Bangkok, Thailand). AR-grade perchloric acid was purchased from Ajax Finechem (Taten Point NSW, Australia). AR-grade orthophosphoric acid was purchased from RCI Labscan Limited (Bangkok, Thailand). Purified water was prepared with a Millipore (Molsheim, France) Milli-direct Q3 water-purification system.

3. UPLC-UV: condition and equipment

The study was carried out using the Agilent 1200 series UPLC system (Santa Clara, USA), consisting of a pump, an online vacuum degasser, an autosampler, a column oven, and a UV/VIS detector. The whole UPLC system was controlled by Agilent ChemStation Software, by which data were

acquired and quantified. The autosampler loop volume was kept at 10 μ L. Detector wavelengths were set at 254 nm. The iohexol-related compound B was used as an internal standard (IS). For the optimized test, we used three analytical columns: Poroshell 120 EC-C18 (50 $\times$ 3.0 mm; 2.7 μ m), Zorbax Eclipse plus C18 (50 $\times$ 2.1 mm; 1.8 μ m), and Zorbax SB-C18 (50 $\times$ 2.1 mm; 1.8 μ m) and the three analytical columns were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, USA).

4. Preparation of standards

The stock solution of iohexol standard (10 mg/mL) was prepared in acetonitrile. Stock solutions were kept at -80 °C. A total of six concentrations of iohexol standards (5, 20, 80, 160, 320, and 640 μ g/mL) were prepared in EDTA plasma and used as calibrators. The iohexol-related compound B at a concentration of 10 μ g/mL was prepared

in 5% (v/v) perchloric acid and used as the protein precipitant solution containing IS.

5. Sample and sample preparation

The previous study by El Assri *et al.*⁽²⁶⁾ was adopted and optimized for the current UPLC-UV study. For sample preparation, the ratio of the volume of sample and protein precipitate solution was tried to determine the optimal ratio based on % extraction recovery, and it was calculated by using a formula as shown below. In short, aliquots of the calibrator, control material, or EDTA plasma samples (50 μ L) were added to 1.5 mL microcentrifuge tubes added with a protein precipitation solvent containing 10 μ g/mL IS in the volume 250 μ L, 500 μ L, 750 μ L, and 1,000 μ L representing the ratio of 1:5, 1:10, 1:15, and 1:20 respectively. Then, mixed well and centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes. The clear supernatant was then taken into the vial for further injection with a UPLC-UV analyzer.

$$\% \text{Extraction recovery} = \frac{\text{peak area of spike standard in plasma sample}}{\text{peak area of neat standard}} \times 100$$

6. Method optimization

The optimization of the UPLC-UV method in this study was experimentally adjusted for several parameters such as the type of column, the composition of the mobile phase, and the pH of the mobile phase. The

resolution (R_s) between endo and exo-iohexol, retention time (RT), asymmetry factor (A_s), and theoretical plate (N) were all calculated using Agilent Technologies' ChemStation software in order to determine whether the optimization was adequate.

6.1 Stationary phase

Initially, we were inspired by the study of Niculescu *et al.* ⁽²⁷⁾, who developed an HPLC method to measure iohexol, so we adopted the same mobile phase composition (3.5% acetonitrile/water, pH 2.5) to select appropriate column in our study. The three candidate columns consisting of Poroshell 120 EC-C18, Zorbax Eclipse plus C18, and Zorbax SB-C18 were enrolled to test for

iohexol separation. The column properties for each candidate column are shown in Table 1. The Poroshell 120 EC-18 was selected because it is a superficial porous silica column that is a new trend of support materials used in the production of columns. The Eclipse plus C18 was selected because it is the endcap bonded phase column, and Zorbax SB-C18 was selected because it is the non-endcap bonded phase column.

Table 1 The specification of three candidate columns for iohexol measurement by UPLC-UV technique.

Specification	Poroshell 120 EC	Zorbax Eclipse Plus	Zorbax SB
Silane phase	C18	C18	C18
Porous silica	Superficial	Total	Total
Column length	3.0 x 50	2.1 x 50	2.1 x 50
Particle size (µm)	2.7	1.8	1.8
Pore size (°A)	120	95	80
Column endcapping	Yes	Yes	No
Max.Pres.	600	600	1200
Carbon load (%)	10	9	10

6.2 Mobile phase

After obtaining an appropriate column for the determination of iohexol from trial 2.6.1, the composition of the mobile phase was studied. For the separation of iohexol, acetonitrile in water was optimized. Iohexol separation was investigated for the four different concentrations of acetonitrile in the mobile phase (2%, 3.5%, 5%, and 7% (v/v)).

6.3 pH of mobile phase

After an appropriate column and the composition of the mobile phase were obtained by trials 2.6.1 and 2.6.2, the impact of the pH of the mobile phase on the determination of iohexol was examined. Orthophosphoric acid was added to the mobile phase to change the pH from no modification to 4 and 2.5 to assess the

impact of pH. The pH values were selected based on previous studies of Niculescu *et al.*⁽²⁷⁾ at pH 2.5 and Nilsson-Ehle *et al.*⁽²⁸⁾ at pH 4. No adjustments were selected because it was easy to prepare.

7. Validation of the method

7.1 Selectivity

Comparing the chromatograms of the six blank EDTA plasma samples with those plasma samples spiked with iohexol and iohexol-related compound B allowed researchers to evaluate the method's selectivity. Selectivity was guaranteed that each blank sample had its interference levels checked. It was acknowledged that no interfering peaks existed.

7.2 Linearity of range

To assess the linearity of the calibration range, stock standard solutions containing 10 mg/mL of iohexol were added to the plasma and made in triplicate at seven different concentrations including a sample blank that covered the analytical range. The calibration curve was constructed by plotting the peak area ratios of the exo-iohexol to the IS (y) against the analyte concentration (expressed as µg/mL). For each concentration, the operation was done three times. The applied criteria for a valid calibration model were the coefficient of determination higher than 0.999 (R^2), and the relative standard deviation (%RSD) to be within 3% for all concentrations of calibrators.

7.3 Precision

Twenty samples per level injected into the UPLC-UV system were used to assess the intra-day precision. Free iohexol human plasma was spiked with standards to create three final concentrations of 40, 150, and 300 µg/mL. On five successive days, the inter-day precision was evaluated similarly. After determining the iohexol concentrations, %RSD was estimated. The acceptable criteria for precision are %RSD lower than 2%.

7.4 Accuracy

By using the recovery approach, the method's accuracy was evaluated. The % recovery was estimated at three nominal concentrations by spiking the fresh plasma with iohexol standards. The final concentrations were comparable to those attained using the previously disclosed precision evaluation approach. The percentage of recovery was calculated using the formula below and the acceptable criteria for accuracy is %recovery range between 90-110%.

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{observed conc.} \times 100}{\text{expected conc.}}$$

7.5 Lower limit of detection and quantitation

The detection and quantitation limits were calculated using the relationship between the standard deviation (SD) of the iohexol response at the lowest point on the calibration curve and the slope of the calibration curves. The quantitation limit was to be 10 SD,

whereas the detection limit was to be a relation of 3 SD.

Results

1. Sample extraction

The extraction of iohexol during sample preparation is essential for accuracy quantification. The data in Table 2 represent the mean of the %recovery and peak area values of endo-iohexol and exo-iohexol obtained by triplicate run, it shows the

percentage recovery of iohexol obtained from the protein precipitation with a ratio of sample to precipitant solution at 1:5, 1:10, 1:15, and 1:20. The extraction efficiency range between 90.53 and 103.36% and 95.13 and 99.55% for endo-iohexol and exo-iohexol, respectively. The ratio of 1:10 shows a satisfied %recovery of $97.82 \pm 1.27\%$ and a high peak area in both isomers (shown in Fig. 5), Moreover, it has been shown to precipitate proteins by several previous studies.

Table 2 Recovery (%) of endo-iohexol and exo-iohexol with various ratios of sample to protein precipitation solution.

The ratio of sample to protein precipitant solution	Endo-iohexol			Exo-iohexol		
	Recovery (%)	Peak area (mAu*s)	SD (mAu*s)	Recovery (%)	Peak area (mAu*s)	SD (mAu*s)
1:5	103.36	367.89	0.85	99.55	1462.83	1.29
1:10	100.50	199.33	0.23	97.82	787.48	1.27
1:15	100.55	139.35	0.16	98.61	545.29	0.79
1:20	90.53	103.56	0.63	95.13	401.57	0.41

In this table, the recovery (%) and peak area (mAu*s) for both endo-iohexol and exo-iohexol are provided at various ratios of sample-to-protein precipitation solution. The standard deviation (SD) of the peak area is also included. This data helps assess the efficiency of protein precipitation and the recovery of the analytes under different conditions.

2. Method optimization

2.1 Stationary phase

Three columns were investigated for iohexol determination by the UPLC-UV system, including Poroshell 120 EC-C18, Zorbax Eclipse plus C18, and Zorbax SB-C18 column. Iohexol could be separated into endo- and exo-iohexol peaks by all three columns, and the IS was the final peak, as seen in Fig. 2. Table 3 displays the results of the column performance evaluation against this iohexol separation, and the result is the mean of the triplicate run. The RT, As, N, peak area, Rs, and isomer ratios mentioned are ordered by using the Poroshell 120 EC-C18, Zorbax Eclipse plus C18, and Zorbax SB-C18 column, respectively. The RT of endo-iohexol were 3.56, 2.19, and 2.17 minutes, and for exo-iohexol were 3.92, 2.51, and 2.48 minutes and for IS were 4.76, 3.11, and

3.09 minutes. The As of endo-iohexol were 0.80, 0.76, and 0.88, and for exo-iohexol were 0.87, 0.76, and 0.90, and for IS were 0.67, 0.58, and 0.73. The N of endo-iohexol were 5,507, 3,009, and 3,710, and for exo-iohexol were 4,543, 2,520, and 2,810, and for IS were 7,357, 4,567, and 5,973. The peak area of endo-iohexol were 606, 624, and 598 mAu*s, and for exo-iohexol were 2,137, 2,192, and 2,140 mAu*s, and for IS were 536, 553 and 558 mAu*s. The Rs between endo-iohexol and exo-iohexol were 1.71, 1.78, and 1.88. The peak area between the isomer of endo-iohexol and exo-iohexol were 0.283, 0.285, and 0.279. The Poroshell 120 EC-C18 column performs that it fulfilled the acceptance criteria with values of Rs between the iohexol isomers with >1.5, asymmetry factor <2, N >2,000, high peak area, and lower back pressure with 65 bar.

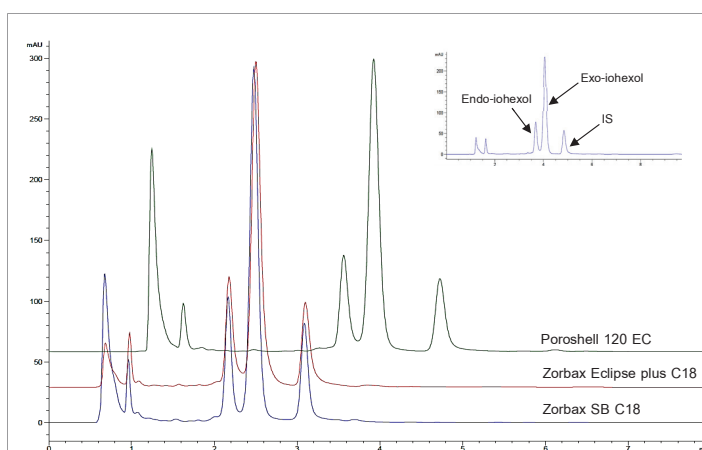


Fig. 2 Chromatograms obtained from plasma sample adding iohexol concentration of 600 $\mu\text{g/mL}$ and internal standard (IS) by using the three columns with the mobile phase composition suggested by Niculescu *et al.*⁽²⁷⁾ (3.5% acetonitrile: water at pH 2.5).

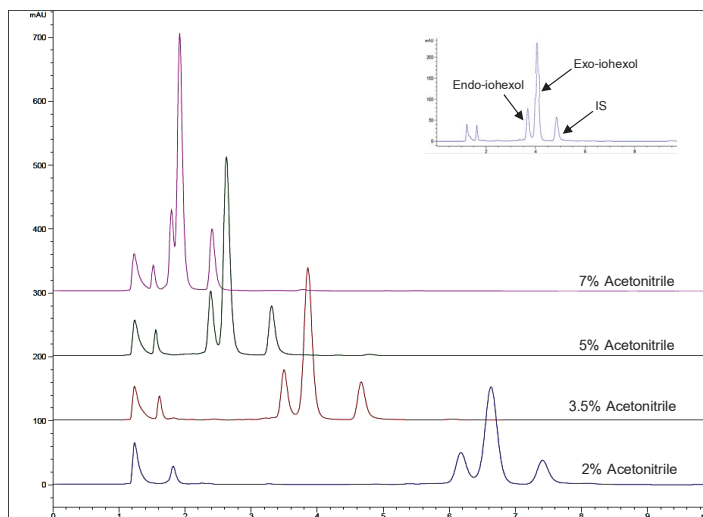


Fig. 3 Chromatograms obtained from plasma sample adding iohexol concentration of 600 $\mu\text{g/mL}$ and internal standard (IS) by using various acetonitrile/water (v/v) in the mobile phases by using the Poroshell EC120 column.

2.2 Mobile phase

The mobile phase composition was investigated to optimize the UPLC-UV assay parameters. Table 4 shows the value of peak parameters including RT, As, N, peak area, Rs, and isomer ratio obtained by usage of various acetonitrile/water as the mobile phase, and the result is the mean of the triplicate run. All studied parameters are ordered by using the mobile phase at concentrations of 2%, 3.5%, 5%, and 7% (v/v) acetonitrile/water, respectively. The RT of endo-iohexol were 6.40, 3.56, 2.39, and 1.80 minutes, and for exo-iohexol were 6.86, 3.92, 2.63, and 1.93 minutes and for IS were 7.60, 4.76, 3.32 and 2.42 minutes. The As of endo-iohexol were 0.92, 0.80, 0.81, and

1.02, and for exo-iohexol were 0.96, 0.87, 0.80, and 0.77, and for IS were 0.81, 0.67, 0.62 and 0.65. The N of endo-iohexol were 6,471, 5,507, 3,964, and 2,638, and for exo-iohexol were 5,911, 4,543, 3,456, and 2,844, and for IS were 8,560, 7,357, 5,794 and 4,321. The peak areas of endo-iohexol were 602, 606, 613, and 551 mAu^*s , and for exo-iohexol were 2,053, 2,137, 2,180, and 2,244 mAu^*s , and for IS were 463, 536, 553 and 542 mAu^*s . The Rs between endo-iohexol and exo-iohexol were 1.34, 1.71, 1.43, and 0.87. The peak area ratio between the isomer of endo-iohexol and exo-iohexol were 0.293, 0.283, 0.281, and 0.246. The typical chromatograms for the iohexol and IS by using different acetonitrile/water as the

mobile phase are given in Fig. 3. The 3.5% acetonitrile/water as mobile phase fulfill the acceptable criteria with good Rs between the iohexol isomer with > 1.5 , asymmetry factor < 2 , $N > 2,000$, high peak area, and a short total run time of 6 minutes.

Table 3 The optimization of the stationary phase by using three columns with the mobile phase composition suggested by Niculescu *et al.* ⁽²⁷⁾ (3.5% acetonitrile: water at pH 2.5).

Column Type	Analytes	RT (min)	As	N	Peak area (mAu*s)	Rs*	Ratio**	Back pressure (bar)
Poroshell EC120	Endo-iohexol	3.56	0.80	5,507	606	1.71	0.283	65
	Exo-iohexol	3.92	0.87	4,543	2,137			
	IS	4.72	0.67	7,357	536			
Zorbax SB	Endo-iohexol	2.19	0.76	3,009	624	1.78	0.285	125
	Exo-iohexol	2.51	0.76	2,520	2,192			
	IS	3.11	0.58	4,567	553			
Eclipse plus	Endo-iohexol	2.17	0.88	3,710	598	1.88	0.279	130
	Exo-iohexol	2.48	0.90	2,810	2,140			
	IS	3.09	0.73	5,973	558			

In this table, the retention time (RT), asymmetric factor (As), theoretical plate number (N), peak area, resolution (Rs), ratio values, and back pressure are provided for each column type (Poroshell EC120, Zorbax SB, and Eclipse Plus) and each analyte (Endo-iohexol, Exo-iohexol, and IS). * The Rs and Ratio values are provided for endo-iohexol and exo-iohexol. The data allows for the evaluation of the performance of different stationary phases under the specified mobile phase conditions, aiding in the selection of the optimal stationary phase for the analysis.

Table 4 The optimization of acetonitrile concentration in the mobile phase using the Poroshell EC120 column.

Acetonitrile/ water	Analytes	RT (min)	As	N	Peak area (mAu*s)	Rs*	Ratio**
2%	Endo-iohexol	6.40	0.92	6,471	602	1.34	0.293
	Exo-iohexol	6.86	0.96	5,911	2,053		
	IS	7.60	0.81	8,560	463		
3.5%	Endo-iohexol	3.56	0.80	5,507	606	1.71	0.283
	Exo-iohexol	3.92	0.87	4,543	2,137		
	IS	4.72	0.67	7,357	536		
5%	Endo-iohexol	2.39	0.81	3,964	613	1.43	0.281
	Exo-iohexol	2.63	0.80	3,456	2,180		
	IS	3.32	0.62	5,794	553		
7%	Endo-iohexol	1.80	1.02	2,638	551	0.87	0.246
	Exo-iohexol	1.93	0.77	2,844	2,244		
	IS	2.42	0.65	4,321	542		

In this table, the retention time (RT), asymmetric factor (As), theoretical plate number (N), peak area, resolution (Rs), and ratio values of endo-iohexol, exo-iohexol, and IS. * The Rs and Ratio values are provided for endo-iohexol and exo-iohexol at different acetonitrile concentrations in the mobile phase. The data allows for the evaluation of the chromatographic performance under varying solvent compositions, aiding in the selection of the optimal acetonitrile concentration for the analysis.

2.3 pH

The pH is a parameter that has been carefully chosen for iohexol measurement. Orthophosphoric acid changes the mobile phase's pH from no adjustment to 4 and 2.5. Table 5 displays the outcomes of a three-variable variation. The RT, As, N, peak area, Rs, and isomer ratios mentioned are ordered by using the mobile phase's pH of no adjustment, 4 and 2.5, respectively. The RT of endo-iohexol were 3.56, 3.67, and 3.69 minutes, and for exo-iohexol were 3.92, 4.04, and 4.06 minutes, and for IS were 4.72, 4.83, and 4.85 minutes. The As of endo-iohexol were 0.80, 0.83, and 0.82, and for exo-iohexol were 0.87, 0.89, and

0.90, and for IS were 0.67, 0.69, and 0.68. The N of endo-iohexol were 5,507, 5,706, and 5,575, and for exo-iohexol were 4,543, 4,710, and 4,611, and for IS were 7,357, 7,479, and 7,215. The peak areas of endo-iohexol were 606, 620, and 619 mAu*s, and for exo-iohexol were 2,137, 2,188, and 2,182 mAu*s, and for IS were 536, 535, and 534 mAu*s. The Rs between endo-iohexol and exo-iohexol were 1.71, 1.71, and 1.71. The peak area between the isomer of endo-iohexol and exo-iohexol were 0.283, 0.283, and 0.284. The mobile phase with no pH adjustment produces a good chromatogram as same as pH of 2.5 and 4, however, it is easy to prepare (Fig. 4).

Table 5 The optimization of the pH of the mobile phase using the Poroshell EC120 column with 3.5% acetonitrile: water as mobile phase.

pH of mobile phase	Analytes	RT (min)	As	N	Peak area	Rs*	Ratio*
Not adjust pH	Endo-iohexol	3.56	0.80	5,507	606	1.71	0.283
	Exo-iohexol	3.92	0.87	4,543	2,137		
	IS	4.72	0.67	7,357	536		
pH 4	Endo-iohexol	3.67	0.83	5,706	620	1.71	0.283
	Exo-iohexol	4.04	0.89	4,710	2,188		
	IS	4.83	0.69	7,479	535		
pH 2.5	Endo-iohexol	3.69	0.82	5,575	619	1.71	0.284
	Exo-iohexol	4.06	0.90	4,611	2,182		
	IS	4.85	0.68	7,215	534		

In this table, the retention time (RT), asymmetric factor (As), theoretical plate number (N), peak area, resolution (Rs), and ratio values of endo-iohexol, exo-iohexol, and IS. * The Rs and Ratio values are provided for endo-iohexol and exo-iohexol at different pH values of the mobile phase. The data indicates the performance of the chromatographic system under various pH conditions, allowing for the selection of the optimal pH for the analysis.

Table 6 The optimized parameters for developing iohexol assay with UPLC.

Parameters	Value
Analyzer	UPLC
Stationary phase	Poroshell EC120 column
Mobile phase	3.5% ACN: water with no pH adjustment
UV Detector wavelength	254 nm
Injection volume	10 μ L
Column oven	30 $^{\circ}$ C
Sample (μ L): Precipitant solvent (μ L)	50:500 (1:10)

3. Method validation

According to method-optimized data, the best chromatographic conditions are 3.5% (v/v) acetonitrile in water as the mobile phase and the Poroshell 120 EC-C18 column as the stationary phase. These conditions were selected for iohexol separation because they provide a clear resolution between endo- and exo-iohexol isomer peaks, have a total run time of less than 6 min per analysis, and have good peak characteristics for all analytes.

3.1 Selectivity

Six different blank plasma samples were extracted to test the selectivity. The method's selectivity was inferred from the

lack of competing peaks at the retention times for iohexol and IS. Fig. 5 displays the chromatogram of a blank plasma sample spiked with iohexol and IS at a concentration of 600 μ g/mL. With a resolution of 1.71 for endo- and exo-iohexol and 4.55 for exo-iohexol and IS, this result showed 3 peaks with retention times of 3.56, 3.92, and 4.72 minutes for endo-iohexol, exo-iohexol, and IS respectively. A blank plasma chromatogram (Fig. 5A) revealed no interference peaks at the iohexol and IS retention times. The outcome demonstrated that none of the endogenous compounds from the six distinct sources' blank plasma interfered.

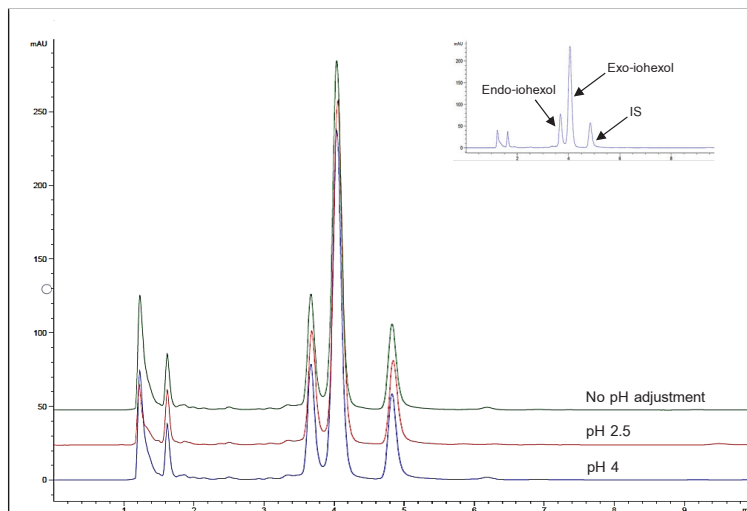


Fig. 4 Chromatograms obtained from plasma sample adding iohexol concentration of 600 $\mu\text{g/mL}$ and internal standard (IS) by using various pH of mobile phases using the Poroshell EC120 column with 3.5% acetonitrile: water as mobile phase.

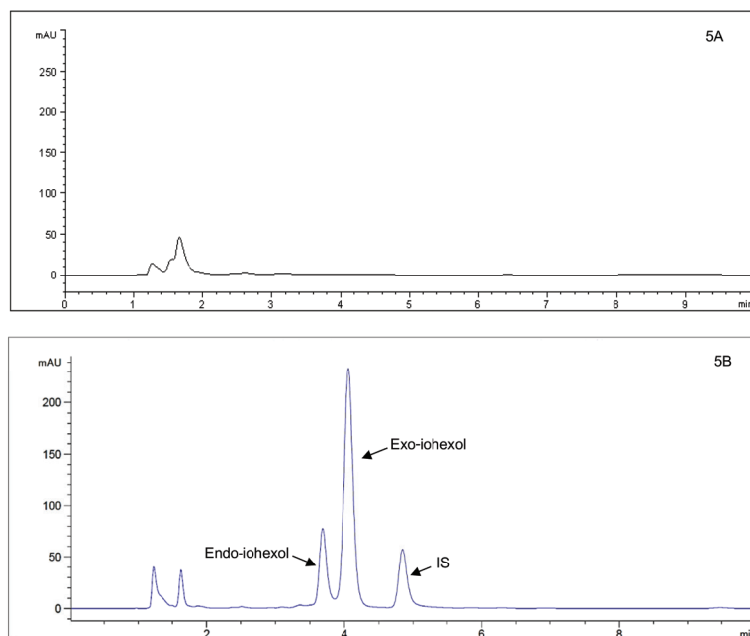


Fig. 5 The chromatogram of blank samples (5A) and blank sample adding iohexol concentration of 600 $\mu\text{g/mL}$ and internal standard (IS) (5B) by using the Poroshell EC120 column with 3.5% acetonitrile: water as mobile phase no pH adjustment.

3.2 Linearity of range

The peak area ratio of exo-iohexol to IS (y) versus the iohexol concentration was used to obtain the calibration curves for iohexol in EDTA plasma, which showed a strong linear relationship over the range of 0-640 µg/mL as shown in Fig. 6. The equation for a typical calibration curve was $y = 0.0119x - 0.0424$ ($R^2 = 0.9999$). The iohexol concentrations fell within the 0-640 µg/mL assayed range. The %RSD at all levels of the calibration was < 3% and that is falling in acceptable criteria in the test range.

3.3 Limit of detection and quantitation

The detection limits and quantitation limits for the developed UPLC technique were 0.97 and 3.26 µg/mL, respectively.

The low detection and quantitation limit values showed that iohexol had appropriate analytical sensitivity.

3.4 Precision and accuracy

As indicated in Table 7, precision and accuracy were determined using the within-run and between-run variation of the spiked sample at three concentrations. Within-run and between-run analyses had precision (%RSD) values of 1.43 to 2.16% and 1.38 to 1.53%, respectively. The recovery (%) range was between 97.70 (2.11) to 102.91 (1.47)%. These results showed that this method fulfilled the acceptance criteria with values of %RSD < 2% for precision and within 90-110% for accuracy.

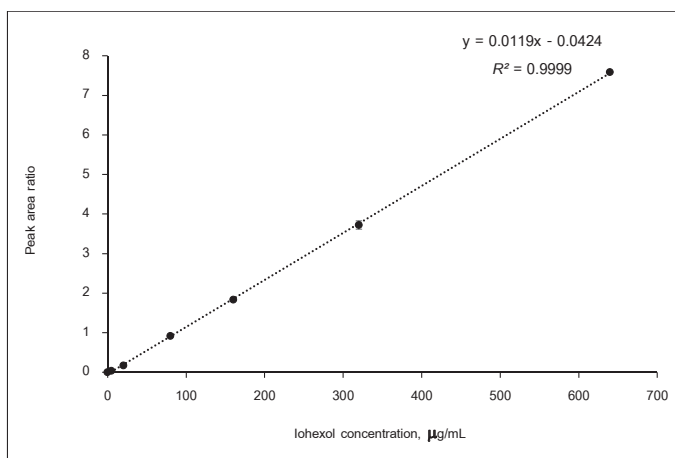


Fig. 6 Linear responses in exo-iohexol/internal standard (IS) peak area ratio versus iohexol concentrations.

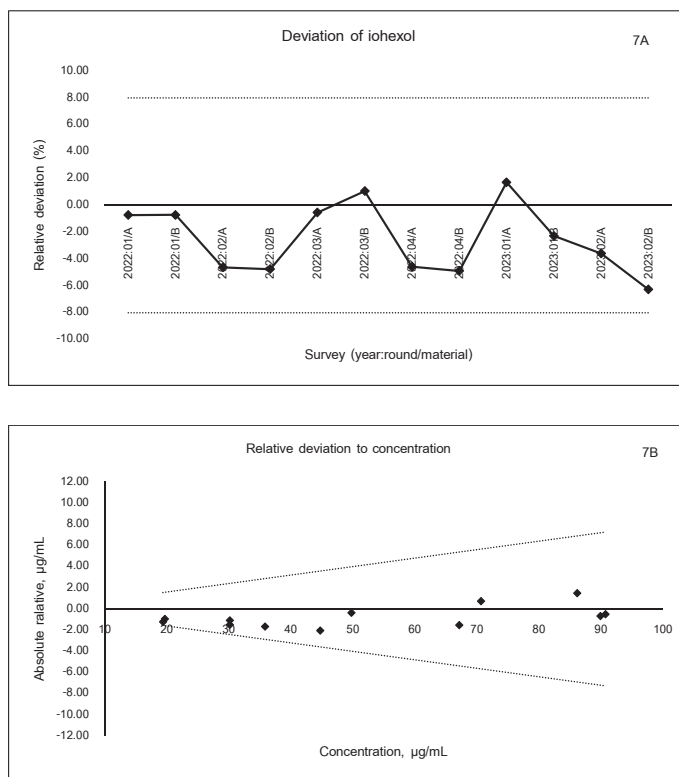


Fig. 7 The performance of the new UPLC-UV method was evaluated by measuring EQA samples (Equalis (Uppsala, Sweden)). The % relative deviation between the new UPLC-UV method and Equalis mean (7A), and the relative deviation to concentration (7B) are determined. The dashed line indicates the maximum acceptable of relative deviation and absolute relative value. This indicates that the new UPLC-UV method staying within the acceptable limits defined by the evaluation criteria.

4. Method application

Following the optimization process detailed in Table 6, the UPLC-UV conditions deemed optimal for iohexol determination were implemented in our laboratory. These conditions were applied to analyze External Quality Assessment (EQA) samples obtained from Equalis (Uppsala, Sweden). In the time period 2022 to 2023, a total of 6 EQA

rounds were conducted, each comprising two samples. Before analysis, the EQA samples were stored at -80°C . The results of the EQA sample analysis are presented in Table 8.

In Table 8, “True concentration” refers to the concentration obtained from the weight standard added to the pooled plasma produced by EQUALIS. “Equalis mean” represents the average concentration determined by

all participating laboratories globally, with more than 50 laboratories involved. “UPLC-UV” denotes the concentration of iohexol determined using the newly developed UPLC-UV method, ranging from 19.4 to 90.8 µg/mL. “Trueness” indicates the percentage closeness of agreement between the values obtained from the new UPLC-UV method and the true values, with a range of 99.40% to 102.07%. The “% relative deviation” represents the difference between the Equalis mean and the values obtained from the new UPLC-UV method, ranging from -5.92% to

1.75%. The deviation to concentration varies from -2.05 to 1.48 µg/mL.

The performance of the new UPLC-UV method is further depicted in Fig. 7. Fig. 7A illustrates the percentage relative deviation of EQA samples over different periods, while Fig. 7B shows the deviation to concentration. All EQA sample results fell within the allowed range specified by the Equalis quality goal, which dictates that the relative deviation for iohexol should be less than 8%.

Table 7 Analytical performance of the developed UPLC-UV method for iohexol determination.

Analytical characteristics		Analytical performance	
LLOD (µg/mL)		0.97	
LLOQ (µg/mL)		3.26	
Precision		within-run	between-run
	Low, 40 µg/mL	2.16	1.53
	Medium, 300 µg/mL	1.43	1.38
	High, 600 µg/mL	1.83	1.49
Accuracy			
	Low, 40 µg/mL, %	97.70 ± 2.11	
	Medium, 300 µg/mL, %	102.91 ± 1.47	
	High, 600 µg/mL, %	101.72 ± 1.86	

LLOD, lower limit of detection; LLOQ, lower limit of quantification

Table 8 The performance of the new UPLC-UV method is assessed by EQA samples.

Survey	True concentration, µg/mL	Equalis mean group value, µg/mL (n)	New UPLC- UV value, µg/mL	Trueness (%)	Relative Dev. (%)*
2022:01/A	90.0	90.65 (53)	90.0	100.00	-0.72
2022:01/B	50.1	50.15 (52)	49.8	99.40	-0.70
2022:02/A	35.4	37.56 (56)	35.9	101.41	-4.42
2022:02/B	19.3	20.64 (56)	19.7	102.07	-4.55
2022:03/A	90.0	91.28 (48)	90.8	100.89	-0.53
2022:03/B	70.7	69.95 (48)	70.7	100.00	1.07
2022:04/A	44.9	46.85 (50)	44.8	99.78	-4.38
2022:04/B	30.1	31.67 (51)	30.2	100.33	-4.64
2023:01/A	86.5	84.72 (56)	86.2	99.65	1.75
2023:01/B	67.3	68.73 (56)	67.2	99.85	-2.23
2023:02/A	302.0	31.28 (52)	30.2	100.00	-3.45
2023:02/B	19.2	20.62 (52)	19.4	101.04	-5.92

In this table, EQA survey, true concentration (µg/mL), Equalis mean group value (µg/mL) with sample size (n), new UPLC-UV value (µg/mL), trueness (%), and relative deviation (%) are provided for each EQA sample. The relative deviation is calculated to assess the accuracy of the new UPLC-UV method, and it's noted that the relative deviation for iohexol is less than 8% for all EAQ samples which is acceptable.

Discussions

Serum clearance of iohexol is a safe and reliable method for GFR determination. It has shown that there is a good correlation between iohexol clearance and inulin clearance, the gold standard method. HPLC-UV technique remains a method of choice for serum iohexol measurement since this method is reliable, precise, and accurate. The HPLC-UV technique is nevertheless less efficient than the UPLC-UV technique in terms of speed, separation, and sensitivity.

Additionally, there is currently no research that provides a method for measuring iohexol utilizing the UPLC-UV method.

In this study, we established a novel method for determining iohexol clearance from serum with UPLC-UV, which is simple, reliable, precise, and accurate and can be used to determine iohexol in clinical settings. Based on the results, the condition of 3.5% acetonitrile with no pH adjustment as the mobile phase, Poroshell 120 EC-C18 column as the stationary phase, UV wavelength set at

254 nm, oven temperature set at 30 °C, and injection volume set at 10 µL was identified as excellent chromatography condition for iohexol determination. We selected the Poroshell 120 EC-C18 because it provides good resolution (>1.5) between the analytes (endo-iohexol and exo-iohexol) and any interfering peaks. This is crucial for accurate quantification, especially in complex sample matrices, the theoretical plate number (N) for the Poroshell EC120 column is higher compared to other columns, indicating better peak shape and separation efficiency, this can result in sharper, better-defined peaks, facilitating accurate quantification. Moreover, the back pressure of the Poroshell EC120 column is lower compared to other columns, this is likely due to its superficially porous silica property, indicating good column performance without excessive pressure buildup in the chromatographic system. Overall, the Poroshell EC120 column appears to offer favorable characteristics for iohexol determination, including high resolution, efficiency, and manageable back pressure, making it a suitable choice for this application.

By this condition, it showed a better peak shape that is easy to integrate, and capable of clearly distinguishing interfering peaks leading to good accuracy and precision. This method provides a high speed, given that it can completely elute iohexol in less than 6 minutes as opposed to other methods'

common elution periods of more than 10 minutes, it offers an advantage over other published HPLC methods that have been described in the past.^(14, 15, 19, 29) The ability to separate endo-/exo-iohexol is another advantage of using this method. Based on the evaluation of resolution between isomers, it was found that this isomer can be clearly separated, and it is better than the HPLC-UV method previously published by Cavalier *et al.*⁽³⁰⁾, Castagnet *et al.*⁽¹⁹⁾, and Slack *et al.*⁽¹⁵⁾, resulting in integration peaks being easy and get a good precision.

An efficient sample preparation method is very important for accurate and reliable bioanalysis by UPLC-UV. A simple and rapid protein precipitation using 5% (v/v) perchloric acid was employed in this work. The previous publications used the volume of plasma sample to precipitation solvent range from 1:5 to 1:15. In trials to find the appropriate amount of precipitant solution, the ratio of 1:10 was chosen since it provided a satisfactory amount of %recovery and a high peak area of iohexol that resulted in a good sensitivity, assuming that the sample was not overly diluted with protein precipitation solution. Based on observations of more than 20 blank samples, this amount can also remove the majority of interfering substances; no interfering peaks were seen at the RT of iohexol and IS.

Method validation results showed a larger linearity range (0-640 $\mu\text{g/mL}$) than the previous study.^(19, 29) In routine practice, after injecting 5 mL of Omnipaque® usually found the concentration of iohexol ranged from 40-600 $\mu\text{g/mL}$ related to the renal function of the patient.⁽³⁰⁾ The advantages of larger linearity are to serve the patients who reduce the dose of iohexol administrated to avoid risk and get accurate results from a small iohexol concentration remaining in the blood circulation at the last of sampling time after administering iohexol to patients 300 min. By the routine analytical work that we have done in Ramathibodi Hospital, at 300 mins of the patient's sample after iohexol administration, the lowest concentration that could be found was 6.59 $\mu\text{g/mL}$. However, our developed method can cover such low concentrations, which is an advantage over the traditional HPLC-UV method. The method has a low within-run and between-run %RSD and high %recovery and no substance coelute was found in any patient samples. Our method was able to measure a minimum value (LLOQ) of 3.23 $\mu\text{g/mL}$, which was significantly better than that of Soman *et al.*⁽¹⁴⁾, Castagnet *et al.*⁽¹⁹⁾, and Slack *et al.*⁽¹⁵⁾, which measured a minimum value of 10, 15, 15 and $\mu\text{g/mL}$ respectively.

The studies by Assri *et al.*⁽²⁶⁾ and Cavalier *et al.*⁽³⁰⁾ both developed HPLC methods for measuring iohexol in plasma

and urine matrices. These studies concluded that the optimal chromatographic conditions were similar to those investigated in our study. Assri *et al.* addressed chromatographic factors affecting iohexol separation and provided satisfactory HPLC conditions for iohexol determination in serum and urine. However, UPLC conditions were not explored in their study, prompting our investigation into UPLC parameters for iohexol analysis to fill this gap. On the other hand, Cavalier *et al.*'s study aimed to fully validate iohexol determination using risk assessment and uncertainty analysis. Their findings confirmed that the chromatography-based method for iohexol measurement is highly accurate and reliable, suggesting its potential as a reference method for direct glomerular filtration rate (GFR) measurement.

A very important issue that affects the results of the analysis of iohexol in plasma is the ratio of isomers (endo-/exo-iohexol). If the ratio is very different between the calibrator used to create the calibration curve and the patient sample it will affect the analysis results, causing errors. According to the researcher's routine work, the difference in this ratio shouldn't be more than 10%; however, if the difference is more than the specified threshold, the extracted samples should stand at room temperature for about 2 hours before being injected into the UPLC-UV system. If it measures, it will

be observed that the ratio returns to being less different (the data are shown in Table 9). This might be a consequence of the two isomers achieving equilibrium. The factors

determining the ratio have not, however, been clearly studied in relation to this topic. Therefore, further research into this topic is necessary.

Table 9 The characteristics of isomerization are expressed by the ratio of exo/endo iohexol.

	Immediate injection			Equilibration at ambient temperature for 2 hours before injection		
	% Area		Ratio	% Area		Ratio
	endo- iohexol	exo- iohexol	exo/endo iohexol	endo- iohexol	exo- iohexol	exo/endo iohexol
Calibrator (n=6)	18.2 ± 0.67	81.8 ± 0.67	4.50	20.7 ± 0.92	79.3 ± 0.92	3.84
Sample (n = 10)	21.0 ± 0.22	79.0 ± 0.22	3.76	20.7 ± 0.23	79.3 ± 0.23	3.82
%difference			-16.53			-0.35

In this table, the percentage area and the ratio of exo/endo iohexol are provided for both calibrator and sample. The immediate injection results are compared to those obtained after allowing the extraction solution to stand at room temperature for 2 hours before injection. The percentage difference between the two conditions is also calculated.

Conclusion

We have developed a simple, rapid, sensitive, and reliable UPLC-UV method for measuring iohexol concentration in plasma. A large number of samples can be taken each day because the sample extraction is very straightforward and just requires one step of protein precipitation using 5% perchloric acid, along with the UPLC run time of 6 minutes which allows a large number of samples for each day. The technique was successfully used to figure out a patient's GFR by calculating

the plasma clearance of iohexol. This is crucial for usage in both clinical practice and research. However, an ongoing challenge with the UPLC-UV method is the variation in the ratios of the two iohexol stereoisomers between calibrators and samples. To address this issue, it is important to establish an appropriate acceptable threshold for these ratios. Further research and optimization may be necessary to refine the method and ensure accurate and reliable results in clinical and research settings.

References

1. Cusumano AM, Tzanno-Martins C, Rosa-Diez GJ. The glomerular filtration rate: from the diagnosis of kidney function to a public health tool. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8: 769335.
2. Kaufman DP, Basit H, Knohl SJ. Physiology, glomerular filtration rate. *StatPearls* [serial on the Internet] 2024 Jan [cited 2024 March 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500032/>.
3. Rahn KH, Heidenreich S, Brückner D. How to assess glomerular function and damage in humans. *J Hypertens* 1999; 17: 309-17.
4. Vilhelmsdotter Allander S, Marké L, Wihlen B, Svensson M, Elinder CG, Larsson A. Regional variation in use of exogenous and endogenous glomerular filtration rate (GFR) markers in Sweden. *Ups J Med Sci* 2012; 117: 273-8.
5. Herget-Rosenthal S, Bökenkamp A, Hofmann W. How to estimate GFR-serum creatinine, serum cystatin C or equations? *Clin Biochem* 2007; 40: 153-61.
6. Levey AS, Titan SM, Powe NR, Coresh J, Inker LA. Kidney disease, race, and GFR estimation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2020; 15: 1203-12.
7. Musso C, Alvarez J, Jauregui J, Macías J. Glomerular filtration rate equations: a comprehensive review. *Int Uro Nephrol* 2016; 48: 1105-10.
8. Lamb EJ, Levey AS, Stevens PE. The kidney disease improving global outcomes (KDIGO) guideline update for chronic kidney disease: evolution not revolution. *Clin Chem* 2013; 59: 462-5.
9. Ebert N, Bevc S, Bökenkamp A, *et al.* Assessment of kidney function: clinical indications for measured GFR. *Clin Kidney J* 2021; 14: 1861-70.
10. Caregaro L, Menon F, Angeli P, *et al.* Limitations of serum creatinine level and creatinine clearance as filtration markers in cirrhosis. *Arch Intern Med* 1994; 154: 201-5.
11. Sriperumbuduri S, Dent R, Malcolm J, *et al.* Accurate GFR in obesity-protocol for a systematic review. *Syst Rev* 2019; 8: 147.
12. Cvan Trobec K, Kerec Kos M, von Haehling S, *et al.* Iohexol clearance is superior to creatinine-based renal function estimating equations in detecting short-term renal function decline in chronic heart failure. *Croat Med J* 2015; 56: 531-41.

13. Levey AS, Coresh J, Tighiouart H, Greene T, Inker LA. Measured and estimated glomerular filtration rate: current status and future directions. *Nat Rev Nephrol* 2020; 16: 51-64.
14. Soman RS, Zahir H, Akhlaghi F. Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *J Chromatogr B* 2005; 816: 339-43.
15. Slack A, Tredger M, Brown N, Corcoran B, Moore K. Application of an isocratic methanol-based HPLC method for the determination of iohexol concentrations and glomerular filtration rate in patients with cirrhosis. *Ann Clin Biochem* 2014; 51: 80-8.
16. Carrara F, Gaspari F. GFR measured by iohexol: the best choice from a laboratory perspective. *J Lab Precis Med* 2018; 3: 77.
17. Delanaye P, Ebert N, Melsom T, *et al.* Iohexol plasma clearance for measuring glomerular filtration rate in clinical practice and research: a review. Part 1: How to measure glomerular filtration rate with iohexol? *Clin Kidney J* 2016; 9: 682-99.
18. Pottel H, Schaeffner E, Ebert N, van der Giet M, Delanaye P. Iohexol plasma clearance for measuring glomerular filtration rate: effect of different ways to calculate the area under the curve. *BMC Nephrol* 2021; 22: 166.
19. Castagnet S, Blasco H, Vourc'h P, *et al.* Routine determination of GFR in renal transplant recipients by HPLC quantification of plasma iohexol concentrations and comparison with estimated GFR. *J Clin Lab Anal* 2012; 26: 376-83.
20. Ng DK, Schwartz GJ, Warady BA, Furth SL, Muñoz A. Relationships of measured iohexol GFR and estimated GFR with CKD-related biomarkers in children and adolescents. *Am J Kid Dis* 2017; 70: 397-405.
21. Schwertner HA, Weld KJ. High-performance liquid-chromatographic analysis of plasma iohexol concentrations. *J Chromatogr Sci* 2015; 53: 1475-80.
22. Holleran JL, Parise RA, Guo J, *et al.* Quantitation of iohexol, a glomerular filtration marker, in human plasma by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2020; 189: 113464.
23. Destefano JJ, Schuster SA, Lawhorn JM, Kirkland JJ. Performance characteristics of new superficially porous particles. *J Chromatogr A* 2012; 1258: 76-83.
24. Branch SK. Guidelines from the international conference on harmonisation (ICH). *J Pharm Biomed Anal* 2005; 38: 798-805.

25. Shabir G. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *J Valid Technol* 2004; 10: 314-24.
26. El Assri S, Sam H, El Assri A, *et al.* Iohexol assay for direct determination of glomerular filtration rate: optimization and development of an HPLC-UV method for measurement in serum and urine. *Clin Chim Acta* 2020; 508: 115-21.
27. Niculescu-Duvaz I, D'Mello L, Maan Z, *et al.* Development of an outpatient finger-prick glomerular filtration rate procedure suitable for epidemiological studies. *Kidney Int* 2006; 69: 1272-5.
28. Nilsson-Ehle P. Iohexol clearance for the determination of glomerular filtration rate: 15 years' experience in clinical practice. *eJIFCC* 2001; 13: 48-52.
29. Farthing D, Sica DA, Fakhry I, *et al.* Simple HPLC—UV method for determination of iohexol, iothalamate, p-aminohippuric acid and n-acetyl-p-aminohippuric acid in human plasma and urine with ERPF, GFR and ERPF/GFR ratio determination using colorimetric analysis. *J Chromatogr B* 2005; 826: 267-72.
30. Cavalier E, Rozet E, Dubois N, *et al.* Performance of iohexol determination in serum and urine by HPLC: Validation, risk and uncertainty assessment. *Clin Chim Acta* 2008; 396: 80-5.

Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, and Wound Healing Property of Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.) Extracts

Panthip Rattanasinganchan¹, Piyamaporn Phankoo¹, Thanaporn Jaturonwanich¹,
Rungrawee Phetset¹, Asamaporn Na Bangchang¹, Kanokporn Kongweha¹,
Titaporn Thidkliang¹ and Kittipat Sopitthummakhun^{2*}

¹Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University,
Samut Prakan Province, Thailand

²Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University,
Samut Prakan Province, Thailand

Abstract

This research investigated the biological properties of different parts of Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.) extract involving antioxidant activity, total phenolic content, and wound healing activity. The extraction process employed the maceration in hexane and methanol, utilizing various parts of pomelo, namely flavedo (FL), albedo (AL), segmented membrane (SM), and juice sac (JS). The results indicated that the methanolic extract of JS demonstrated antioxidant activity with an IC_{50} of 1.021 ± 0.031 mg/mL by DPPH scavenging method, while methanolic extract of AL exhibited an IC_{50} of 0.126 ± 0.004 mg/mL by ABTS scavenging method. The highest total phenolic content was determined in methanolic extract of SM with the value of 3.196 ± 0.022 mg GAE g⁻¹ dry material. Moreover, the cytotoxicity assay conducted on HaCaT cells using MTT revealed that extract from both hexane and methanol did not exhibit cytotoxicity at concentrations of 0.5 and 1 µg/mL respectively. Interestingly, at non-toxic dose, hexane and methanolic extracts of AL and methanolic extract of FL showed a significant reduction in wound area compared with control ($p < 0.05$). In conclusion, extracts from *C. maxima* (Burm.f.) Merr. exhibit both antioxidant and wound-healing activity. This study revealed significant promises for

*Corresponding author E-mail address: ksopittha@gmail.com

Received: 28 December 2023

Revised: 2 March 2024

Accepted: 8 March 2024

advancing research and development in wound healing products for patients dealing with chronic wound issues. Furthermore, it explores an alternative utilization of agricultural waste, presenting potential avenues for its application.

Keywords: Antioxidant, Wound healing assay, Total phenolic content, Khao-Yai Pomelo

การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการสมานแผลของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

ปานทิพย์ รัตนศิลป์¹ ปิยะมากรณ์ แผนธุ์¹ ธนากร จาตุรนต์วานิชย์¹ รุ่งระวี เพชรเศรษฐ์¹ อสมารณ์ ณ บางช้าง¹ กนกพร ก้องเวหา¹ จูฑาภรณ์ ทิศเกลี้ยง¹ และ กิตติพัฒน์ ไสภิตธรรมคุณ^{2*}

¹คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการสมานแผล สารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เตรียมจากเปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง เยื่อหุ้มเนื้อ และเนื้อผล ด้วยการแช่ในเฮกเซน และเมทานอล การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด พบในชั้นเมทานอลในเนื้อผล มีค่า IC_{50} ต่อดอกอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 1.021 ± 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบในส่วนของเปลือกชั้นกลางในชั้นเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.126 ± 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบฟีนอลิกมีปริมาณรวมสูงสุดในชั้นเมทานอลในส่วนเยื่อหุ้มเนื้อผล มีค่าเทียบเท่า 3.196 ± 0.022 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ด้วยวิธี MTT ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ สารสกัดจากเปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง และเนื้อผล ในเฮกเซนและเมทานอล ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์นี้ สารสกัดจากเปลือกชั้นนอกในเมทานอล และสารสกัดจากเปลือกชั้นกลางในเมทานอลและเฮกเซน สามารถลดพื้นที่รอยแผลให้เล็กลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุม ($p < 0.05$) สรุปได้ว่า สารสกัดจากส้มโอมีทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การสมานแผล การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการวิจัย และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อการสมานแผล สำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาเรื่องบาดแผลเรื้อรัง รวมทั้งเป็นการนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาทำให้เกิดประโยชน์อีกทางหนึ่งด้วย

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ การวัดค่าการสมานแผล ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: ksopittha@gmail.com

รับบทความ: 28 ธันวาคม 2566

แก้ไขบทความ: 2 มีนาคม 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 8 มีนาคม 2567

บทนำ

ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ (Khao-Yai Pomelo) จัดอยู่ในกลุ่มไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง กิ่งอ่อนเป็นเหลี่ยมมีขน ใบประกอบ มีใบย่อยใบเดียว รูปไข่ถึงวงรี ปลายใบแหลมมน โคนใบกลมหรือกึ่งรูปหัวใจ ขอบใบเกือบเรียบถึงหยักมน ดอกช่อ กระจะกิ่งเชิงหลั่น อาจพบว่ามีดอกย่อย หรือ ดอกเดี่ยว ถึงหลายดอก ออกดอกที่ซอกใบ กลีบดอกสีขาว มีเกสรตัวผู้ 20-25 อัน ผลส้มโอมีความคล้ายผลส้ม มีลักษณะทรงแป้น ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณกลางผล บริเวณขั้วผลจะแบน สีเปลือกเขียวแกมเหลือง ความมันของผิวปานกลาง มีต่อมน้ำมันเด่นชัด เปลือกหนาประมาณ 2.5 เซนติเมตร เนื้อผลมีสีขาวอมเหลือง มีความฉ่ำน้ำปานกลาง (Fig. 1) ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่จัดอยู่ในวงศ์ “Rutaceae” มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Citrus maxima* (Burm.f.) Merr. เป็นพืชตระกูลส้มขนาดใหญ่ มีรสเปรี้ยวอมหวาน⁽¹⁾ เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับความนิยมในการบริโภค พบได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย แต่นิยมปลูกแถบจังหวัดสมุทรสงคราม โดยถือเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญในภูมิภาค มีรายงานการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกส้มโอ ได้แก่ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคในมนุษย์ มีการใช้ประโยชน์จากส่วนของเนื้อผลที่มีเส้นใยอาหารสูง เพื่อนำไปสกัดเป็นเซลดูลอสบริสุทธิ และเส้นใยโนโนเซลดูลอสที่มีความเสถียรทนความร้อนได้ดี⁽²⁾ ส่วนประกอบของไฟเบอร์ที่พบในเปลือกส้มโอยังสามารถช่วยป้องกันโรคอ้วนและลดระดับไขมันที่ผิดปกติในเลือดจากการศึกษาในหนูทดลอง⁽³⁾ รายงานการศึกษามีส้มโอสายพันธุ์ต่างๆ โดยการเปรียบเทียบปริมาณรวมของสารประกอบใน

กลุ่มฟีนอล และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging ระหว่างส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ทองดี ขาวแตงกวา ขาวน้ำผึ้ง ท่าซอ และทับทิมสยาม พบว่าส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่มีทั้งปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ⁽⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากเปลือกส้มโอ ที่เตรียมด้วยวิธีแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่ามีสมบัติช่วยสมานแผลในหนูทดลองที่มีภาวะแผลเรื้อรังจากการเป็นเบาหวานด้วย⁽⁵⁾

การปลูกส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เพื่อจำหน่าย ผู้บริโภคส่วนใหญ่จะใช้เฉพาะส่วนของเนื้อผลเป็นหลัก โดยมีส่วนต่าง ๆ ของส้มโอที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์และถูกทิ้งเป็นของเสียทางการเกษตร จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้ คือ การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging และการหาปริมาณรวมสารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในพืช คือ สารประกอบฟีนอลิก โดยการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างส่วนเนื้อผล ซึ่งเป็นส่วนที่นำไปบริโภค กับส่วนที่เหลือทิ้งเป็นขยะทางการเกษตร ได้แก่ ส่วนเปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง และเยื่อหุ้มเนื้อ รวมทั้งการศึกษาสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เกี่ยวกับสมบัติการช่วยสมานแผล (wound healing) ในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ HaCaT โดยกลุ่มผู้วิจัยมีความหวังว่า ข้อมูลผลการวิจัยจากการศึกษาครั้งนี้ จะได้มีการนำไปต่อยอด และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับการสมานแผล โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่มีปัญหาเรื่องการเกิดบาดแผลเรื้อรัง อีกทั้งยังเป็นช่องทางการนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกทางหนึ่ง

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

ใช้ตัวอย่างส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่อายุ 8 เดือนจากพื้นที่สวนส้มโอ จังหวัดสมุทรสงคราม (พิกัดอ้างอิงแหล่งเพาะปลูก 13.4268760, 99.9518210) ซึ่งมีข้อมูลขึ้นทะเบียนสายพันธุ์ (geographical indication, GI)⁽⁶⁾ นำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด เช็ดเปลือกด้านนอกด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 จากนั้นแยกส่วนประกอบ ได้แก่ เปลือกชั้นนอก (flavedo, FL) เปลือกชั้นกลาง (albedo, AL) เยื่อหุ้มเนื้อ (segmented membrane, SM) และ เนื้อผล (juice sac, JS) (Fig. 1) ชั่งและบันทึกน้ำหนักสด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 48 ชั่วโมง (ลักษณะทางกายภาพเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างสดกับตัวอย่างอบแห้งของส่วนประกอบต่าง ๆ แสดงใน Fig. 2) ตัวอย่างที่แห้งและผ่านการอบแล้วนำมาชั่งและบันทึกน้ำหนักแห้งอีกครั้ง เพื่อควบคุมสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม) ต่อปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร) โดยใช้สัดส่วน 1:8 ในการสกัดส่วนประกอบของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่แต่ละส่วนในเฮกเซน

ด้วยวิธีแช่ในตัวทำละลาย (maceration) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดเพิ่มเติมด้วยวิธี sonication ใช้เวลาอีก 30 นาที ด้วยเครื่อง Sonicator (Bandelin Sonorex Digitec, Germany) แยกสารสกัดออกจากกากที่ไม่ละลายโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no. 1 ทำซ้ำอีกครั้งโดยเปลี่ยนตัวทำละลายจากเฮกเซนเป็นเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดทั้งในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนและชั้นเมทานอลไประเหยตัวทำละลายส่วนเกินออก โดยใช้วิธีระเหยแห้งภายใต้ความดัน (evaporation) ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator (BUCHI Vacuum Controller V-850, Rotavapor R-210, Switzerland) จากนั้นนำสารสกัดที่แห้งไปชั่งและบันทึกน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่ตำแหน่งเพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอน แล้วแบ่งเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป สำหรับการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติการสมานแผล จะนำสารสกัดส้มโอที่สกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอลไปละลายในตัวทำละลายเฮกเซน หรือเมทานอลตามลำดับ และคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนก่อนนำไปทดสอบ

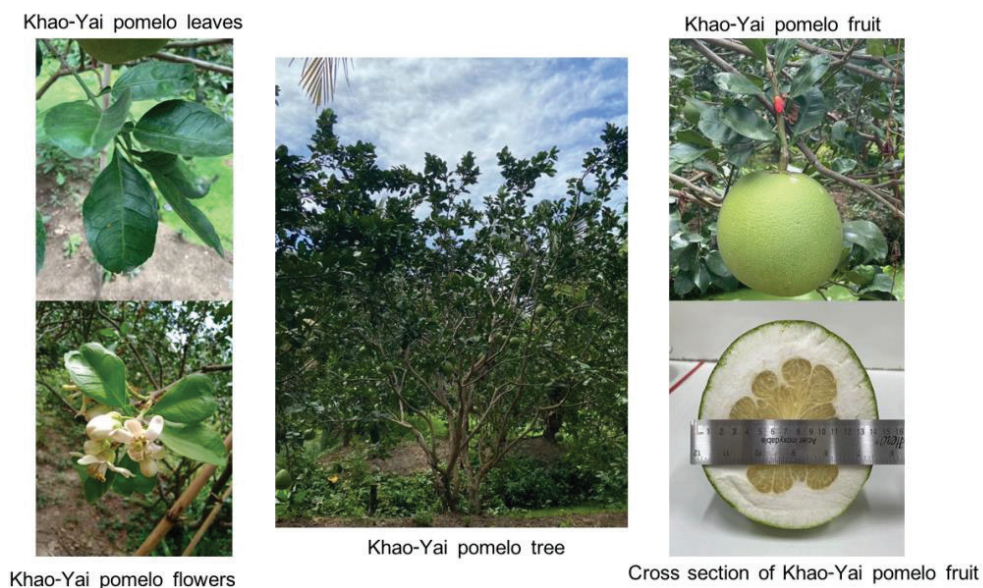


Fig. 1 Khao-Yai Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.) located plant at 13.4268760, 99.9518210 Samut Songkhram, Thailand.

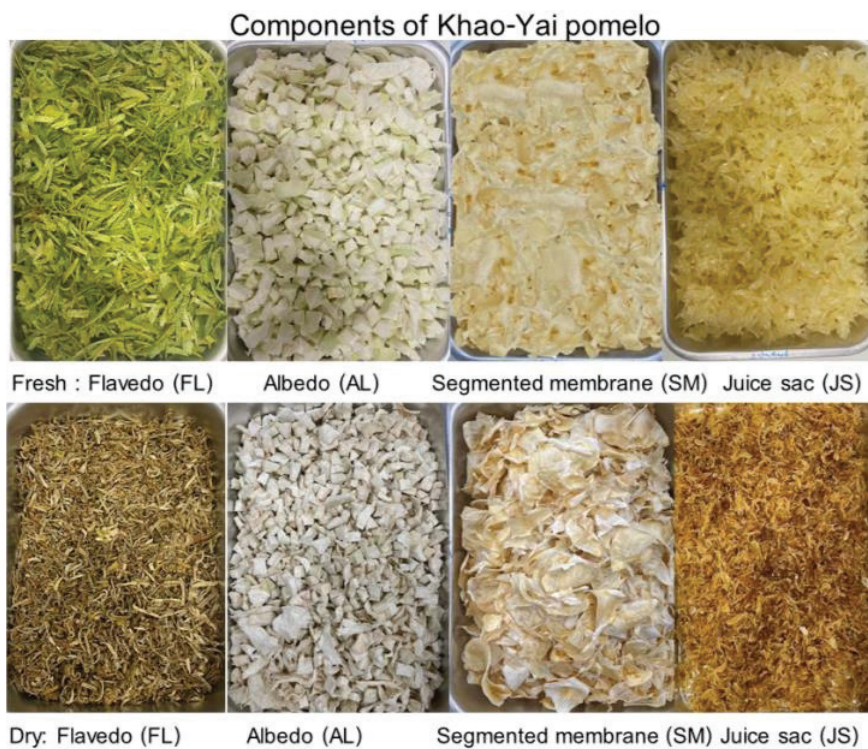


Fig. 2 Fresh and dry components of Khao-Yai pomelo before maceration.

2. การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS scavenging assay

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ใช้หลักการ absorption spectrophotometry วัดการลดลงของอนุมูลอิสระที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{\max}$) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร⁽⁷⁾ ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย ซึ่งประกอบด้วย DPPH 0.1 มิลลิโมลาร์ (ละลายในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 95) ผสมกับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ได้แก่ เปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง เยื่อหุ้มเนื้อ และเนื้อผล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT (butylated hydroxytoluene) กรดแอสคอร์บิก และ Trolox (6 hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ในที่ที่ไม่มีแสงรบกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) ดังสมการที่ 1

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS (2,2'-azino-bis-

(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid) ใช้หลักการ absorption spectrophotometry โดยให้อนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในรูป “cation radical” ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) เตรียมโดยชั่งน้ำหนัก และคำนวณค่าความเข้มข้นของ ABTS ให้เท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ละลายในน้ำกลั่น นำไปผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ในสัดส่วน 1:0.5 (โดยปริมาตร) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่ที่ไม่มีแสง ประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารละลายผสมดังกล่าว ไปหาความเข้มข้นของ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ที่แน่นอน ด้วยการใช้ค่า extinction coefficient ที่ 734 นาโนเมตร⁽⁸⁾ การวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ทำในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย $\text{ABTS}^{\bullet+}$ เท่ากับ 0.066 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ได้แก่ เปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง เยื่อหุ้มเนื้อ และเนื้อผล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT, กรดแอสคอร์บิก และ Trolox โดยบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ในที่ที่ไม่มีแสงรบกวนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดังสมการที่ 1

$$\text{สมการที่ 1} \quad \text{ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (\% inhibition)} = \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{cont.}} - \text{Abs}_{\text{react.}})}{\text{Abs}_{\text{cont.}}} \right\} \times 100$$

กำหนดให้ $\text{Abs}_{\text{cont.}}$ และ $\text{Abs}_{\text{react.}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ DPPH ($\lambda_{\max}$ 515 นาโนเมตร) หรือ อนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($\lambda_{\max}$ 734 นาโนเมตร) ที่ผสมกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (BHT, กรดแอสคอร์บิก หรือ Trolox) หรือ สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้

การคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ที่ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (half maximum inhibitory concentration, IC_{50}) ต่ออนุมูลอิสระแต่ละชนิด ใช้วิธีเขียนกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ใช้ (X-axis) ต่อค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (Y-axis)

ใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดย m คือค่าความชัน (slope) ของกราฟเส้นตรง ซึ่งแสดงในสมการที่ 2 (สมการเส้นตรง) แล้วจึงคำนวณหาค่า IC_{50} ต่อไป

สมการที่ 2 $Y = mX + C$

3. การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก

การวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ดัดแปลงวิธีการที่อ้างอิงจาก Ainsworth EA และ Gillespie KM, พ.ศ. 2550⁽⁹⁾ โดยใช้หลักการวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารวิเคราะห์ ที่มีโครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก กับสารละลาย Folin-Ciocalteu ซึ่งดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร การวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ปฏิบัติการทดสอบประกอบด้วย สารวิเคราะห์ 100 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 10 ไมโครลิตร บ่มสารละลายผสมดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง ในที่ที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ขั้นตอนสุดท้ายเติมเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 1 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของสารสกัดตัวอย่าง

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT อ้างอิงวิธีทดสอบของ Stockert JC และคณะ,

พ.ศ. 2555⁽¹⁰⁾ โดยใช้หลักการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยเอนไซม์ออกซิโดรีดักเทส ซึ่งทำงานได้เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต ออกซิโดรีดักเทสจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ไปเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มazan (MTT formazan crystal) ที่มีสีม่วง โดยมีปริมาณแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วิธีการทดสอบทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหนึ่งหลุม ในจานเพาะเลี้ยงไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทดสอบกับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่เตรียมไว้ โดยใช้ตัวแปรควบคุม (control) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฮกเซน และเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 1 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ตาย (cell cytotoxicity) ไม่ได้เกิดจากผลของการเติมเฮกเซน และเมทานอล นอกจากนี้ยังมีปัญหาของสารสกัดที่ได้จากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอล ซึ่งละลายได้น้อยมากในตัวทำละลายน้ำ และ DMSO (dimethyl sulfoxide) จึงต้องใช้วิธีละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดสาร เพื่อให้สารสกัดละลายได้ดีที่สุดก่อนที่จะนำไปทดสอบต่อไป นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อให้ MTT เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มazanที่มีสีม่วง นำผลิตภัณฑ์ฟอร์มazanที่เกิดขึ้น มาละลายในตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาประเมินเพื่อเลือกใช้ค่าความ

เข้มข้นของสารสกัด โดยใช้ช่วงความเข้มข้นที่เซลล์มีชีวิตรอดเกินกว่าร้อยละ 90 สำหรับการทดสอบสมบัติการสมานแผล

5. การทดสอบความสามารถการสมานแผลในเซลล์ผิวหนัง HaCaT

ทดสอบสมบัติการสมานแผลด้วยวิธี *in vitro* กับเซลล์ผิวหนัง (human keratinocyte) ชนิด HaCaT ด้วยวิธี “scratch assay”⁽¹¹⁾ ใช้หลักการสร้างรอยขีดข่วนบนผิวเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ ให้เกิดพื้นที่ปลอดเซลล์เพื่อวัดค่าความสามารถในการสมานรอยแผลที่แยกออกจากกัน โดยสังเกตจากการเพิ่มของทั้งจำนวนเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ด้วยการบันทึกภาพนิ่งด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) ตามขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้ นำเซลล์ HaCaT จำนวน 2×10^5 เซลล์ ต่อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไปบ่มในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35×10 มิลลิเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จากนั้นสร้างรอยแผลโดยการขีดด้วย sterile pipette tip ขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วยสารละลาย PBS (phosphate buffer saline) พีเอช 7.4 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ เลือกใช้ช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (อ้างอิงผลการทดสอบจาก MTT assay) โดยมีตัวแปรควบคุมในการทดลองนี้ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเฮกเซน หรือเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 1 เนื่องจากสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอล ละลายได้น้อยมากในอาหารเลี้ยงเซลล์ จึงต้องละลายในตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอลก่อน แล้วจึงเจือจางให้มีความเข้มข้นของตัวทำละลายทั้งสองไม่เกินร้อยละ 1 ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์

จากนั้นนำเซลล์ HaCaT ในภาวะต่าง ๆ ไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงวัดหาค่าพื้นที่รอยแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (รุ่น CKX31, OLYMPUS, Japan) และถ่ายภาพโดยใช้กล้อง (Zeiss, Germany) คำนวณหาพื้นที่รอยแผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Zen 3.6 (Blue Edition) วัดพื้นที่เริ่มต้นการทดสอบในวันที่ทำให้เกิดเป็นรอยแผล (day 0) และคำนวณเทียบให้เป็นร้อยละ 100 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่รอยแผลในวันที่ 1 และวันที่ 2 เปรียบเทียบระหว่างสถานะควบคุมกับสถานะที่ใส่สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใช้วิธีการ One-way ANOVA; $p < 0.05$, (SPSS Statistics version 15)

ผลการวิจัย

1. สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS แสดงด้วยค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่มีผลยับยั้งจนทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง นั่นคือค่า “ IC_{50} ” สารสกัดในชั้นเมทานอลที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด คือ สารสกัดจากส่วนเนื้อผล (JS) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.021 ± 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงที่สุดกับค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT (0.011 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS ที่ดีที่สุดก็พบในสารสกัดจากชั้น

เมทานอลเช่นกัน แต่พบในส่วนของเปลือกชั้นนอก (AL) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.126 ± 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (0.012 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทั้งนี้ค่า IC_{50} เมื่อเทียบระหว่างสารสกัดส่วนอื่น ๆ ในตัวทำละลาย เมทานอลด้วยกัน พบว่าส่วนประกอบต่าง ๆ ของ ส้มโอมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2) ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ในชั้นเฮกเซน พบว่ามีปัญหา การละลายสารสกัดในระบบตัวทำละลาย (เมทานอล) ที่ใช้ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยมีการแยกชั้นของสารสกัด จึงทำให้ไม่สามารถ วัดค่าการต้านอนุมูลอิสระได้

2. ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

จากผลการทดลอง พบว่า ค่าการต้าน อนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดจาก ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ไม่สอดคล้องกับปริมาณรวมของ สารประกอบฟีนอลิก (Table 2) โดยสารสกัดจากส้มโอ

พันธุ์ขาวใหญ่ในชั้นเมทานอลที่มีปริมาณรวมของสาร ประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ ส่วนเยื่อหุ้มเนื้อ (SM) มีปริมาณเทียบเท่า 3.196 ± 0.022 มิลลิกรัมสมมูล ของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม รองลงมาคือ ส่วนเปลือกนอก (FL) และเปลือกชั้นกลาง (AL) ซึ่ง พบปริมาณเทียบเท่า 2.947 ± 0.063 และ 1.720 ± 0.021 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมน้อยที่สุดคือส่วนเนื้อผล (JS) ซึ่งมีปริมาณเทียบเท่า 0.083 ± 0.001 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ทั้งนี้ปริมาณรวมของสาร ประกอบฟีนอลิกของแต่ละส่วนของส้มโอในชั้นเมทานอล ที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2) และปริมาณ รวมของสารประกอบฟีนอลิกสามารถหาได้เฉพาะใน สารสกัดจากชั้นเมทานอล เนื่องจากสารสกัดในชั้น เฮกเซนมีปัญหาเรื่องการละลาย พบว่าการแยกชั้น และบางส่วนตกตะกอนไม่เป็นเนื้อเดียวกันกับระบบ ตัวทำละลายที่ใช้ในสารละลาย Folin-Ciocalteu จึงไม่สามารถทดสอบหาปริมาณรวมของสารประกอบ ฟีนอลิกจากสารสกัดในชั้นเฮกเซนได้

Table 1 Summary of fresh and dry weight pertaining to distinct components - flavedo (FL), albedo (AL), segmented membrane (SM) and juice sac (JS), derived from Khao-Yai pomelo.

Pomelo part	Fresh Weight (g)	Dry Weight (g)	% Dry Weight
Flavedo (FL)	834	271	32.51
Albedo (AL)	781	280	35.84
Segmented membrane (SM)	631	250	39.62
Juice sac (JS)	1,314	202	15.38

Table 2 The assessment of antioxidant properties and total phenolic contents extracted through hexane and methanol from each segment of Khao-Yai pomelo.

Khao-Yai pomelo segments	IC ₅₀ (mg/mL)		Total phenolic contents (mg GAE g ⁻¹ DM)
	DPPH	ABTS	
Hexane extracts			
Flavedo (FL)	ND	1.149 ± 0.062	ND
Albedo (AL)	ND	ND	ND
Segmented membrane (SM)	ND	ND	ND
Juice sac (JS)	ND	ND	ND
Methanol extracts			
Flavedo (FL)	1.279 ± 0.048 ^a	0.206 ± 0.007 ^b	2.947 ± 0.063 ^c
Albedo (AL)	2.550 ± 0.076 ^a	0.126 ± 0.004 ^b	1.720 ± 0.021 ^c
Segmented membrane (SM)	1.988 ± 0.056 ^a	0.174 ± 0.008 ^b	3.196 ± 0.022 ^c
Juice sac (JS)	1.021 ± 0.031 ^a	0.544 ± 0.009 ^b	0.083 ± 0.001 ^c
Standard antioxidant agent			
BHT	0.011 ± 0.001	0.006 ± 0.0001	
Ascorbic acid	0.005 ± 0.0001	0.012 ± 0.002	
BHT	0.004 ± 0.0001	0.005 ± 0.0001	

Data is presented as mean ± standard deviation with triplicated values.

Total phenolic content is expressed as mg of Gallic acid equivalent (GAE) g⁻¹ dry material (DM).

^a IC₅₀ in DPPH scavenging assay in methanolic extracts shows a significant difference at $p < 0.05$.

^b IC₅₀ in ABTS scavenging assay in methanolic extracts shows a significant difference at $p < 0.05$.

^c Total phenolic contents in methanolic extracts shows a significant difference at $p < 0.05$.

ND is not determined due to the limitation of solubility in methanol.

3. ค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

การทดสอบค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่มีต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT โดยการทดลองใช้ตัวแปรควบคุมคือเฮกเซน และเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาโดยใช้เกณฑ์อัตราการอยู่รอดของเซลล์จากความเป็นพิษของสารสกัดที่ต้องมากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นไป (อ้างอิงผลการทดลองใน Table 3) พบว่าสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซนจากส่วนต่าง ๆ (เปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง เยื่อหุ้มเนื้อ และเนื้อผล) มีค่าร้อยละการรอดของเซลล์ (% survival) ที่มีค่ามากกว่า

ร้อยละ 90 อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.04-1.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเมทานอลมีค่าร้อยละการรอดของเซลล์ที่มากกว่าร้อยละ 90 ที่แตกต่างกันในแต่ละส่วน คือ ในส่วนของเปลือกชั้นนอก (FL) อยู่ที่ความเข้มข้น 0.64-2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในส่วนที่เหลือ ได้แก่ เปลือกชั้นกลาง (AL) เยื่อหุ้มเนื้อ (SM) และเนื้อผล (JS) มีค่าอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.69-25.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองที่เกี่ยวกับ “สมบัติการสมานแผลของเซลล์ HaCaT โดยสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่” ก็ได้ใช้เกณฑ์สมบัติการละลายของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอลในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เป็นเกณฑ์ที่ใช้เลือกค่าความเข้มข้นในการทดสอบต่อไป

Table 3 Cytotoxicity of pomelo extract compartments on human keratinocytes (HaCaT).

Khao-Yai pomelo segments	MTT assay	
	µg/mL	%survival (>95%)
Hexane extracts		
Flavedo (FL)	0.10 – 1.52	106.2 – 96.2
Albedo (AL)	0.11 – 1.71	107.3 – 95.7
Segmented membrane (SM)	0.10 – 1.60	102.9 – 110.1
Juice sac (JS)	0.04 – 0.61	110.9 – 104.6
Methanol extracts		
Flavedo (FL)	0.64 – 10.19	95.9 – 5.1
Albedo (AL)	0.96 – 15.30	98.0 – 89.1
Segmented membrane (SM)	0.69 – 10.97	114.8 – 123.1
Juice sac (JS)	1.60 – 25.53	117.2 – 117.4

4. สมบัติการสมานแผลของเซลล์ HaCaT ด้วย สารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

การทดสอบสมบัติการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT ได้ใช้เกณฑ์เลือก ความเข้มข้นของสารสกัดโดยพิจารณาปัจจัย 2 ข้อ ข้อแรกคืออัตราการอยู่รอดของเซลล์จากความเป็นพิษ ของสารสกัดต้องมากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นไป (อ้างอิงจาก ผลการวิจัยค่าความเป็นพิษจากสารสกัด) และข้อที่สอง คือ ความเข้มข้นที่มากที่สุดของสารสกัดจากส้มโอ พันธุ์ขาวใหญ่ที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับการทดสอบสมบัติการสมานแผลของเซลล์ HaCaT จะเปรียบเทียบระหว่างวันที่เริ่มการทดลอง (day 0 - ยังไม่ได้ใส่สารสกัด) กับวันที่ 2 ที่ได้รับสารสกัด (day 2) จากการทดลองพบว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลาย เฮกเซนจากเปลือกชั้นกลาง (AL) มีช่วงความเข้มข้น ที่เหมาะสมคือ 0.06-0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยมีค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการออกฤทธิ์สมานแผลที่

0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (Fig. 3A) สารสกัดในชั้น ตัวทำละลายเมทานอลจากเปลือกชั้นนอก (FL) มีช่วง ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.13-1.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิตร โดยมีค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการ ออกฤทธิ์สมานแผลที่ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (Fig. 3B) และสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเมทานอลจาก เปลือกชั้นกลาง (AL) มีช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.13-1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยมี ค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการออกฤทธิ์สมานแผล ที่ 0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (Fig. 3C) ในการ ทดสอบสมบัติการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ชนิด HaCaT พบว่าสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ในส่วนที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถลดพื้นที่รอยแผล ให้เล็กลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ ตัวแปรควบคุม (เมทานอล และเฮกเซน เข้มข้น ร้อยละ 1) ($p < 0.05$, one-way ANOVA, SPSSv.15)

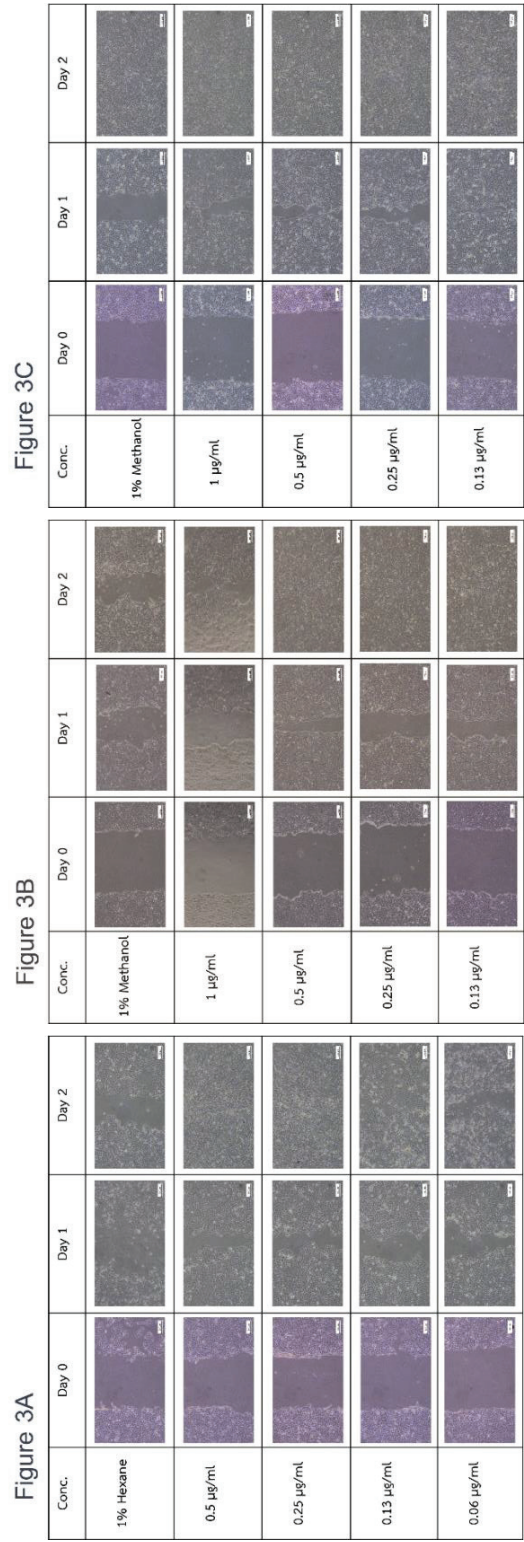


Fig. 3 Wound healing effect in HaCaT using various parts of Khao-Yai pomelo from hexane and methanol extracts and visualized under an inverted microscope (10x). Fig. 3A) hexane extract from albedo (AL); Fig. 3B) methanolic extract from flavedo (FL); and Fig. 3C) methanolic extract from albedo (AL). The analysis of the wound healing effect of various parts of Khao-Yai pomelo revealed that the flavedo (FL) extracted with methanol, has a statistically significant effect to reducing wound area ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

วิจารณ์และสรุป

ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้จากพื้นที่สวนส้มโอ จังหวัดสมุทรสงคราม โดยมีข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์พืช ได้แก่ ลักษณะต้น ใบ ดอก และผล ดังแสดงใน Fig. 1 สำหรับอ้างอิงการเลือกชนิดและสายพันธุ์ หรือลักษณะภายนอกเพื่อการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนประกอบต่าง ๆ ของตัวอย่างส้มโอเตรียมด้วยวิธีแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย (maceration) คือ เฮกเซนและเมทานอล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารที่มีความเข้มข้นต่างกันออกมาตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในส่วนประกอบต่าง ๆ ของผลส้มโอ ผลการทดสอบพบว่าส่วนของเนื้อผลมีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น (Table 1) อาจเป็นเพราะเนื้อผลมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมากกว่าส่วนอื่น และด้วยการใช้ระยะเวลาที่เท่ากันในการอบแห้งทำให้ส่วนอื่น ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ มีสัดส่วนของน้ำหนักแห้งมากกว่า จึงมีความเป็นไปได้ที่สารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และคาร์ทีนอยด์ น่าจะพบได้ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ และละลายได้ดีในไขมัน⁽¹²⁾ ดังนั้นส่วนของเปลือกชั้นนอก (FL) เปลือกชั้นกลาง (AL) และเยื่อหุ้มเนื้อ (SM) จึงน่าจะเป็นส่วนที่น่าสนใจในการสะสมของสารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่มที่ได้กล่าวมาข้างต้น และผลการทดลองพบว่าการสกัดด้วยเมทานอลให้ร้อยละน้ำหนักแห้งของสารสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยเฮกเซน (Table 1) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลที่สกัดด้วยเฮกเซน เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS scavenging เกิดปัญหาการแยกชั้นระหว่างตัวอย่างสารสกัดและระบบตัวทำละลายเมทานอลที่ใช้ในการทดสอบ ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดฤทธิ์การต้าน

อนุมูลอิสระในส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนได้ การวิจัยในครั้งนี้จึงได้เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอเฉพาะที่สกัดด้วยเมทานอลเท่านั้น ผลการทดสอบพบว่า ส่วนของผลส้มโอที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging ได้ดีที่สุดคือส่วนเนื้อผล (JS) ลำดับถัดมา ได้แก่ เปลือกชั้นนอก (FL) เยื่อหุ้มเนื้อ (SM) และเปลือกชั้นกลาง (AL) ตามลำดับ (Table 2) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Sukkaphet K และ Kraiklang R, พ.ศ. 2557⁽¹³⁾ ที่ได้ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระในส้มโอสายพันธุ์ต่าง ๆ และพบว่าส่วนของเนื้อผล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ทั้งนี้ผลการทดสอบมีความแตกต่างจากรายงานของ Pichaiyongvongdee S และคณะ, พ.ศ. 2557⁽¹⁴⁾ ที่พบว่าเปลือกชั้นกลางมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ด้วยวิธี DPPH scavenging สำหรับการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวมในส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่พบว่า มีมากที่สุด ในเยื่อหุ้มเนื้อ (Table 2) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Chang SQ และ Azrina A, พ.ศ. 2560⁽¹⁵⁾ ที่พบว่าเปลือกชั้นกลาง (AL) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความแตกต่างระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ในส่วนต่าง ๆ ของผลส้มโอ อาจเป็นผลจากหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของส้มโอ ช่วงเวลาเก็บเกี่ยว ลักษณะของภูมิประเทศ ตลอดจนพื้นที่เพาะปลูก รวมทั้งยังขึ้นกับวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ สำหรับการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงบ่มในตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอล และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยการใช้วิธี sonication ส่วน Chang SQ และ Azrina A, พ.ศ. 2560⁽¹⁵⁾ เลือกใช้วิธีทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dry) และนำผงที่ได้มาสกัดในเมทานอล 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วจึง

กรองสารสกัดออกมาทดสอบ อย่างไรก็ตาม ทั้งสอง การทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมไม่มีความสอดคล้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ⁽¹⁵⁾ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกซึ่งเป็น สารพฤษเคมี (phytochemical) ที่พบในพืชนั้น นอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วยังอาจมีฤทธิ์ทาง ชีวภาพอื่น ๆ อีก เช่น การต้านการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง (in vitro experiment) ความสามารถในการต้านการอักเสบ การลดน้ำตาล และไขมัน ในเลือด⁽¹⁶⁾

สมบัติการสมานแผลของสารสกัดส้มโอ พันธุ์ขาวใหญ่ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทดสอบ ด้วยวิธี scratch assay โดยใช้เซลล์ผิวหนังมนุษย์ ชนิด HaCaT พบว่า สารสกัดที่มีสมบัติที่ดีในการ ช่วยสมานแผลควรต้องมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ ที่ต้องมากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นไป ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้ จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT และยังคงต้องมีสมบัติละลายได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วย แต่สารสกัดส้มโอที่ได้ในการวิจัยครั้งนี้ละลายใน อาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรงได้ไม่ดีต้องใช้ตัวทำละลาย ช่วย จึงทำให้เกิดข้อจำกัดจากความเป็นพิษของตัว ทำละลายที่มีต่อเซลล์ ซึ่งต้องเจือจางลงให้เหลือเพียง ร้อยละ 1 ทำให้การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล โดยใช้เซลล์ HaCaT ต้องใช้ปริมาณสารสกัดระดับ ไมโครกรัมซึ่งต่างจากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูล อิสระซึ่งไม่ได้ทดสอบต่อเซลล์จึงใช้ปริมาณสารสกัด ได้ในระดับมิลลิกรัม จากผลการวิจัยครั้งนี้พบสารสกัด ที่มีสมบัติละลายน้ำได้ดีและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ ในสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนจากเปลือก ชั้นกลาง (AL) และสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเมทานอล จากเปลือกชั้นนอก (FL) และเปลือกชั้นกลาง (AL) (Fig. 3) โดยสามารถลดพื้นที่แผลลงได้อย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุม

สอดคล้องกับรายงานของ Ahmad AA และคณะ, พ.ศ. 2561⁽⁵⁾ ที่ทดสอบการสมานแผลในหนูที่มีภาวะ เป็นโรคเบาหวาน โดยใช้สารสกัดจากเปลือกส้มโอ (pomelo peel extract; PPE) ซึ่งพบว่าสามารถ สมานแผลในหนูที่เป็นเบาหวาน เมื่อเทียบกับกลุ่ม ควบคุมหนูที่เป็นเบาหวานและกลุ่มควบคุมหนูที่ไม่ได้ เป็นเบาหวาน สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งที่มี ส่วนประกอบของส้มโอ คือ เปลือกชั้นนอก (FL) และ เปลือกชั้นกลาง (AL) ซึ่งมีความสามารถในการสมาน แผลได้ดี ดังนั้นสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่จึงมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการสมานแผล ทั้งใน ส่วนเนื้อและเปลือก⁽⁵⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการ ศึกษาสมบัติการสมานแผลที่ทดสอบในเซลล์ ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT ของสารสกัดที่ได้จากส่วน ของเปลือกและเนื้อผลของ grapefruit (*Citrus × aurantium* f. *aurantium*) ที่มีสมบัติในการสมาน แผลสอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้จากการศึกษาใน ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เช่นกัน⁽¹⁷⁾

ความแตกต่างระหว่างสมบัติทางชีวภาพ ในแต่ละส่วนของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ อาจมีสาเหตุมาจาก ส่วนประกอบสำคัญในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอ มีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่มีโครงสร้าง และมี สมบัติทางชีวภาพที่แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้อาจกล่าว ได้เบื้องต้นจากการวิจัยครั้งนี้ว่าความสามารถในการ ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด อาจไม่มีความสัมพันธ์ กับสมบัติการสมานแผลในแต่ละส่วนประกอบของ ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ และการที่พบว่าส่วนใดของส้มโอ พันธุ์ขาวใหญ่มีสมบัติใดนั้นเป็นขั้นตอนเบื้องต้น งานวิจัยที่ควรดำเนินต่อไปคือการศึกษว่าสารออกฤทธิ์ นั้นคือสารใด โดยแยกส่วนประกอบที่อยู่ในสารสกัด จากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ซึ่งเป็นความท้าทาย ที่จะ นำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ที่สำคัญในทางเภสัชศาสตร์ และทางการแพทย์ในอนาคตต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ฤทัยวรรณ ไช้ทอง มหาวิทยาลัยมหิดล และ ศาสตราจารย์ประณีต โอโณะโสภิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ผิวหนังมนุษย์ ชนิด HaCaT สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Niyomdham C. *Citrus maxima* (Burm.) Merr. Verheij, E.W.M. and Coronel, R.E. (Editors). Plant Resources of South-East Asia No. 2. Edible fruits and nuts. PROSEA Foundation, Bogor, Indonesia. Database record: 1991 [cited 2023 Dec 4]. Available from <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt/information/authors>
2. Yang Z, Chen Q. Enzymatic preparation and characterization of honey pomelo peel cellulose and its cellulose nanofibers. *Ind Crops Prod* 2023; 206: 117655.
3. Ni J, Shangguan Y, Jiang L, He C, Ma Y, Xiong H. Pomelo peel dietary fiber ameliorates alterations in obesity-related features and gut microbiota dysbiosis in mice fed on a high-fat diet. *Food Chem* 2023; 100993: 1-9.
4. Mäkynen K, Jitsaardkul S, Tachasamran P, *et al.* Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. *Food Chem* 2013; 139: 735-43.
5. Ahmad AA, II AI Khalifa, Abudayeh ZH. The role of pomelo peel extract for experimentally induced wound in diabetic rats. *Pharmacogn J* 2018; 10: 885-91.
6. Thai Geographical Indication. [homepage on the Internet] Department of Intellectual Property Thailand [cited 2023 Dec 4]. Available from <https://www.ipthailand.go.th/th/gi.html>
7. Xie J, Schaich KM. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 4251-60.
8. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231-7.
9. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2007; 2: 875-7
10. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* 2012; 114: 785-96.
11. Cappiello F, Casciaro B, Mangoni ML. A novel *In vitro* wound healing assay to evaluate cell migration. *J Vis Exp* 2018; 133: 56825.

12. Shahbaz MU, Arshad M, Mukhtar K, *et al.* Natural plant extracts: an update about novel spraying as an alternative of chemical pesticides to extend the postharvest shelf life of fruits and vegetables. *Molecules* 2022; 27: 5152-71.
13. Sukkhaphet K, Kraiklang R. Contents of total phenolic, total flavonoid, vitamin C and antioxidant activity in Khoa-Hom, Tong-Dee and Manee-E-San Pomelo Strain. *KKUJPHR* 2022; 15: 14-28.
14. Pichaiyongvongdee S, Rattanapun B, Haruenkit R. Total polyphenol content and antioxidant properties in different tissues of seven Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Cultivars. *Kasetsart J (Nat. Sci.)* 2014; 48: 989-96.
15. Chang SQ, Azrina A. Antioxidant content and activity in different parts of pomelo [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] by-products. *Acta Horticulturae* 2017; 1152: 27-34.
16. Alu'datt MH, Rababah T, Alhamad MN, *et al.* Occurrence, types, properties, and interactions of phenolic compounds with other food constituents in oil-bearing plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 58: 3209-18.
17. Savci Y, Kirbas QK, Bozkurt BT, *et al.* Grapefruit-derived extracellular vesicles as a promising cell-free therapeutic tool for wound healing. *Food & Function* 2021; 12: 5144-56.

Effects of 7-Octenoic acid and 1-Phenyl-2-pentanol from *Moringa oleifera* Lam. Leaves Extract on the Hepatic Stellate Cells in an *In Vitro* Model of Liver Fibrosis

Jutathip Chaiprathed¹, Thanutchaporn Chantamai¹, Thamonwan Chujorhor¹,
Kanchana Usuwanthim¹ and Watunyoo Buakaew^{2*}

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University,
Phitsanulok Province, Thailand

²Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand

Abstract

Liver fibrosis is the excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins in the liver. Common causes include fatty liver disease and hepatitis C virus infection. Delayed or inaccurate diagnosis of liver fibrosis may elevate the risk of developing cirrhosis and liver cancer. Currently, there are no definitive pharmacological therapies for the treatment of liver fibrosis. Several studies have shown the anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* Lam. (MO) leaf extracts. In this study, we aimed to investigate the anti-fibrotic effect of two bioactive compounds identified in MO leaf crude extracts: 7-octenoic acid and 1-phenyl-2-pentanol. Hepatic stellate cells (HSCs) were treated with the active compounds, and cytokine levels were measured by using sandwich ELISA. In addition, protein expression in HSCs was analyzed by using proteomic technique. Proteomic analysis showed that 440 and 98 proteins were significantly upregulated and downregulated, respectively, in the 7-octenoic acid and 1-phenyl-2-pentanol-treated cells ($p < 0.05$). Additionally, there were decreases in expression of casein kinase II subunit alpha (*CSNK2A1*), guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (*GNB2*), and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*), which are proteins related to the NF- κ B, PI3K/Akt, and mTOR signaling pathways. TNF- α secretion was also suppressed by treatments with 7-octenoic acid and 1-phenyl-2-pentanol. In conclusion, these active compounds showed potent inhibitory activity on TGF- β 1-induced HSCs and are promising candidates for anti-hepatic fibrosis drug research.

Keywords: Liver fibrosis, *Moringa oleifera* Lam., 7-Octenoic acid, 1-Phenyl-2-pentanol

*Corresponding author E-mail address: watunyoo@g.swu.ac.th

ผลของสารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol จากใบมะรุม ต่อเซลล์ตับชนิด hepatic stellate cells ในโมเดล การเกิดพังผืดในตับในหลอดทดลอง

จุฑาทิพย์ ไชยประเทศ¹ ธนัชร จันทาใหม่¹ ธมนวรรณ ชูจอหอ¹ กาญจนา อุสุวรรณทิม¹
และ วรัญญ บัวแก้ว^{2*}

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ภาวะพังผืดในตับ (liver fibrosis) คือภาวะที่มีการสะสมของ extracellular matrix protein ในตับที่มากเกินไป ซึ่งสาเหตุที่พบบ่อย ได้แก่ ภาวะไขมันพอกตับและโรคไวรัสตับอักเสบซี หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง จะทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะตับแข็งและมะเร็งตับ ปัจจุบันภาวะพังผืดในตับยังไม่มียารักษาที่เป็นมาตรฐาน มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากมะรุมมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในตับได้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการต้านการเกิดพังผืดในตับของสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากใบมะรุม 2 ชนิด ได้แก่ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ในเซลล์ตับชนิด hepatic stellate cells (HSCs) โดยวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี sandwich ELISA และวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ HSCs ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ HSCs ที่ได้รับ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นและลดลงจำนวน 440 และ 98 ชนิด ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งพบการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน casein kinase II subunit alpha (*CSNK2A1*), guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (*GNB2*) และ low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ NF-KB pathway, PI3K/Akt signaling pathway และ mTOR signaling pathway นอกจากนี้ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ยังสามารถลดการหลั่งของ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยผลการศึกษาพบว่า สารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติลดการกระตุ้นสัญญาณ TGF- β 1 ต่อเซลล์ตับชนิด HSCs ได้ ซึ่งมีความน่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นยาต้านการเกิดพังผืดในตับในอนาคต

คำสำคัญ: พังผืดในตับ มะรุม กรดออกทานอิก 1-ฟีนิล-2-เพนทานอล

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: watunyoo@g.swu.ac.th

รับบทความ: 5 กุมภาพันธ์ 2567

แก้ไขบทความ: 3 มิถุนายน 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 16 กรกฎาคม 2567

บทนำ

ภาวะพังผืดในตับ (liver fibrosis) เป็นกระบวนการทางพยาธิวิทยาที่มีการสะสมของ extracellular matrix (ECM) protein เช่น คอลลาเจน ที่มากเกินไปในตับ กระบวนการนี้เกิดขึ้นระหว่างการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือการเกิดการอักเสบของตับ การสะสมของ ECM นี้ทำให้โครงสร้างของตับมีการเปลี่ยนแปลงจนนำไปสู่การเกิดความผิดปกติต่อการทำงานของตับและเพิ่มความต้านทานภายในตับ (intrahepatic resistance) ส่งผลให้เกิดโลหเลียมไปที่ตับไม่เพียงพอและยังทำให้ความดันหลอดเลือดพอร์ทัลตับสูงขึ้น (portal hypertension)^(1, 2)

หากภาวะพังผืดในตับไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่ถูกต้อง จะทำให้เพิ่มโอกาสในการพัฒนาไปเป็นโรคตับแข็ง ปัจจุบันพบประชากรที่มีภาวะพังผืดในตับมีอัตราเพิ่มสูงขึ้น โดยพบภาวะพังผืดในตับในชาวเอเชียร้อยละ 15 ของประชากร และพบมากขึ้นในผู้ป่วยกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable diseases, NCDs) ได้แก่ โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะพังผืดในตับ ได้แก่ ภาวะไขมันพอกตับ (ร้อยละ 66) ภาวะไขมันพอกตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ (ร้อยละ 13) ภาวะไขมันพอกตับที่เกิดจากแอลกอฮอล์ (ร้อยละ 9) โรคไวรัสตับอักเสบบี (ร้อยละ 6) และสาเหตุอื่น ๆ (ร้อยละ 6) ($p < 0.003$)^(3, 4)

กลไกการเกิดภาวะพังผืดในตับเริ่มจากการบาดเจ็บของตับเรื้อรังไปสู่การพัฒนาเป็นภาวะพังผืดในตับ โดยเซลล์ตับที่ได้รับบาดเจ็บจะมีการตายแบบ apoptosis ส่วนแมคโครฟาจและ Kupffer cell จะถูกกระตุ้นให้หลั่งสาร chemokine และไซโตไคน์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6),

transforming growth factor-beta (TGF- β) โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่จะสร้าง TGF- β 1 ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดวิถีสัญญาณภายในเซลล์แบบ canonical และ non-canonical และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น เกิดการสะสมของโปรตีนและเกิดการอักเสบ การอักเสบที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องส่งผลให้มีการกระตุ้นเซลล์ตับ ชนิด hepatic stellate cells (HSCs) ให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (myofibroblast) ซึ่งจะผลิต ECM ออกมาจนเกิดการสะสมในตับในปริมาณสูงและนำไปสู่การเกิดพังผืดในตับได้ ดังนั้นการลดกระบวนการกระตุ้นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์จะทำให้การสะสมของ ECM ลดลงและตับสามารถกลับคืนสู่สภาวะปกติได้⁽⁵⁻⁷⁾

ในปัจจุบัน การรักษาภาวะพังผืดในตับมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งสาเหตุที่ก่อให้เกิดการอักเสบของตับ เช่น การรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วยยาต้านไวรัส การลดน้ำหนัก และการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ในผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันพอกตับ นอกจากนี้ยังมีการใช้ยา pentoxifylline เพื่อยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ตับ แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่าวิธีการรักษาที่เป็นมาตรฐานในการต้านพังผืดในตับโดยตรง อีกทั้งยังมีการรักษาทางเลือกที่มีการใช้แพร่หลายในผู้ป่วยโรคตับเรื้อรัง รวมถึง การใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพร วิตามิน หรืออาหารเสริมอื่น ๆ⁽⁸⁾

มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) อยู่ในวงศ์ของ Moringaceae ซึ่งเป็นไม้ยืนต้น ความสูงประมาณ 3-6 เมตร เปลือกของต้นมะรุมจะมีสีขาว รูปทรงของใบมะรุมเป็นใบรูปไข่ มีการจัดเรียงตัวสลับแบบขนนก 2-3 ชั้น โดยจะมีความยาวประมาณ 20-60 เซนติเมตร ส่วนใบอ่อนของมะรุมจะมีขนสีเทาลักษณะเด่นของช่อดอกมะรุม จะมีรูปร่างเป็นแบบช่อแยกแขนง มีกลีบดอก 5 กลีบ บริเวณฐานด้านนอก ยาวประมาณ 1.4-1.9 เซนติเมตร มีสีขาวอมเหลืองแต้มสีแดง

ลักษณะปลายกลีบดอกจะกว้างกว่าตรงโคนดอก ภายในเกสรตัวผู้ของดอกมะรุมจะมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่แยกจากกันโดยสมบูรณ์ 5 อัน และชนิดที่แยกจากกันแบบไม่สมบูรณ์ 5 อัน โดยผลมะรุมจะมีลักษณะเป็นฝักสามเหลี่ยม ภายในผลมีเมล็ด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร⁽⁹⁾ มีคุณค่าทางเภสัชกรรมสูง โดยเฉพาะใบที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงสุด ซึ่งอุดมด้วยวิตามินซี วิตามินเอ โพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก และโปรตีน อีกทั้งยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น carotenoid, alkaloid และ flavonoid ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ลดความดันโลหิต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และต้านมะเร็ง⁽¹⁰⁾

ผลงานวิจัยของ Wisitpongpun และคณะ ในปี 2020 ซึ่งทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมและสารออกฤทธิ์ 2 ชนิดที่แยกได้จากสารสกัดหยาบใบมะรุม ได้แก่ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol พบว่าทั้งสารสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดสามารถกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB 231 ได้ในหลอดทดลอง⁽¹¹⁾ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติมของสารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol และยังไม่มีการศึกษาการต้านพังผืดในตับของใบมะรุม รวมถึงสารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์ HSCs ชนิด LX-2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์การต้านพังผืดในตับและกลไกการออกฤทธิ์ของสาร 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol จากใบมะรุม เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อค้นหาสารต้านการเกิดพังผืดในตับในอนาคตต่อไป

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการต้านพังผืดในตับของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด ที่แยกได้จากใบมะรุม ได้แก่ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ในเซลล์ตับ HSCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ในหลอดทดลอง โดยอาศัยการวัดปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- α ด้วยเทคนิค sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA) และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

วัสดุและวิธีการ

1. สารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol

สาร 7-octenoic acid (Cat. No. 715751-1G) และ 1-phenyl-2-pentanol (Cat. No. R425753-250MG) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการสั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) โดยมีร้อยละความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์อยู่ที่ร้อยละ 97 และ 99 ตามลำดับ ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดถูกเตรียมให้อยู่ในความเข้มข้นสูงสุด 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในตัวทำละลายชนิด dimethyl sulfoxide (DMSO) ผสมกับ polysorbate 80 (Tween 80) ในอัตราส่วน 1:1 โดยที่ร้อยละของตัวทำละลายคงเหลือในสารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสูงสุด ที่ใช้ในการทดสอบกับเซลล์จะมีค่าไม่เกินร้อยละ 1

2. การเลี้ยงเซลล์ hepatic stellate cells (HSCs) ชนิด LX-2

นำเซลล์ไลน์ชนิด LX-2 ซึ่งเป็นเซลล์ HSCs ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อตับของมนุษย์ (Merck Millipore, USA) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified eagle medium

(D-MEM) (Gibco life technologies, USA) ที่มีส่วนผสมของ fetal bovine serum (FBS) (Biocrom GmbH, Germany) ร้อยละ 2 และ antibiotic-antimycotic (Gibco life technologies, USA) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ CO₂ ร้อยละ 5 โดยงานวิจัยนี้ ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (COA No. 422/2022)

3. การทดสอบความเป็นพิษของสาร 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ต่อเซลล์ LX-2

เป็นการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์จากใบมะรุมต่อเซลล์ LX-2 โดยคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ (Inhibitory concentration, IC) ที่ร้อยละ 5 (IC₅), 10 (IC₁₀) และ 50 (IC₅₀) ตามลำดับด้วยวิธี Resazurin assay ทำการทดสอบใน 96-well cell culture plate โดยใช้เซลล์ LX-2 จำนวน 5×10^4 เซลล์/หลุม จากนั้นนำสารสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์มาเจือจางใน D-MEM แบบ two-fold dilution ที่ความเข้มข้น 0-1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติมน้ำลงใน cell culture plate ที่มีเซลล์ LX-2 อยู่ และบ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติม Resazurin working solution (HiMedia Laboratories Pvt., USA) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 4 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสง fluorescence โดยตั้งค่าความยาวคลื่น excitation/emission ไว้ที่ 560/590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (PerkinElmer, USA)

4. การทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดพังผืดในตับในเซลล์ LX-2

กระตุ้นเซลล์ LX-2 ให้มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ด้วย TGF- β 1 (STEMCELL Technologies, USA) ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ใน 24-well plate เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยอ้างอิงขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์ LX-2 จากการศึกษาท่อน้ำ (12-16) ในการทดสอบใช้เซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์/หลุม แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 1) กลุ่มควบคุม (Control) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว 2) กลุ่มควบคุมแบบลบ (Model) ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 เพียงอย่างเดียว และ 3) กลุ่มทดสอบ (Treatment) ซึ่งจะมีการกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- β 1 พร้อมกับใส่สารสกัดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปทดสอบหาปริมาณไฮโดรไลน และเก็บเซลล์เพื่อการสกัดโปรตีนในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

5. ตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA)

ตรวจวัดระดับไซโตไคน์ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ทำการ coat plate ด้วย capture antibody โดยเติม mouse anti-TNF- α antibody (Sino Biological, USA) ที่เจือจางด้วย phosphate buffered saline (PBS) ลงใน 96-well plate นำไปบ่มข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย wash buffer และ block plate โดยเติม blocking buffer (2% BSA ใน wash buffer) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย wash buffer

จากนั้นเติม supernatant และ TNF- α ที่เจือจาง
ใน dilution buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา
2 ชั่วโมง ล้างด้วย wash buffer เติม rabbit or
goat anti-mouse HRP-conjugated antibody
นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น
ล้างด้วย wash buffer ตามด้วยเติม substrate
solution (Tetramethylbenzidine, TMB) นำไปบ่ม
ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที และเติม stop
solution (2N H₂SO₄) วัดค่าดูดกลืนแสงด้วย
เครื่อง Microplate reader (PerkinElmer, USA)
ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

6. การสกัดโปรตีนเพื่อการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์

นำเซลล์ HSCs ของกลุ่ม Model กลุ่มที่ได้รับ
7-octenoic acid และกลุ่มที่ได้รับ 1-phenyl-2-
pentanol ไปสกัดโปรตีนเพื่อทำการวิเคราะห์ทางโปรตี-
โอมิกส์ โดยหลักการในการเลือกความเข้มข้นของสาร
ทั้งสองชนิด มีดังนี้ 1) 7-octenoic acid ที่ความเข้มข้น
100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยอ้างอิงจากผลในการลด
ระดับของ matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)
จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้⁽¹⁷⁾ และ 2) 1-phenyl-
2-pentanol ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
จากความสามารถในการลดระดับของ TNF- α
ได้ดีที่สุดในการทดลองนี้ ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS
จากนั้นเติม RIPA buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร/
หลุม บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นขูดเซลล์
ด้วย cell scraper และ sonicate นำไปปั่น
เป็นเวลา 10 นาที ที่ 14,000 × g ที่อุณหภูมิ
4 องศาเซลเซียส และเก็บ supernatant ที่ -80
องศาเซลเซียส

7. การเตรียมโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์แบบ label-free proteomic analysis

เตรียมตัวอย่างโปรตีนให้มีความเข้มข้นโดย
ให้มีมวลโมเลกุลที่ cut-off 3 kDa จากนั้นตกตะกอน
โปรตีนด้วย acetone (1:5 v/v) และคืนสภาพตะกอน
โปรตีนด้วย RapidGest SF ร้อยละ 0.3 (Waters Co.)
ในแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต 2.5 mM (Sigma
Aldrich Co., Germany) จากนั้นเติม trypsin เพื่อ
ย่อยโปรตีนทั้งหมด (30 ไมโครกรัม) และทำการลด
พันธะซัลไฟไดรล โดยใช้ 1 mM TECP (Sigma
Aldrich Co., Germany) ในแอมโมเนียมไบ-
คาร์บอเนต 2.5 mM บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น
เวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการ sulfhydryl alkylation
โดยใช้ 5 mM IAA (Sigma Aldrich Co.,
Germany) ในแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต 2.5 mM
บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 50 นาทีในที่มืด จากนั้น
ล้างสารละลายโปรตีนโดยใช้ Zeba Spin Desalting
Column (Thermo Scientific Co., USA) เติม
trypsin เพื่อย่อยสารละลายโปรตีน (Promega
Co., Madison, WI, USA) ในอัตราส่วน 1:40
(เอนไซม์:โปรตีน) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สารละลายโปรตีนที่ย่อยแล้วจะ
ถูกทำให้แห้งด้วยกรดฟอร์มิกร้อยละ 0.1 ก่อนนำไป
ทดสอบด้วยวิธี LC-MS/MS

8. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ข้อมูลสเปกตรัม LC-MS/MS จะถูก
รวบรวมใน positive mode ด้วย HF-X hybrid
Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer ที่
รวมกับระบบ EASY-nLC1000 nano-LC system
ที่ใช้ nano C18 column (Thermo Fisher

Scientific, USA) ซึ่งมี mobile phase A ประกอบด้วยกรดฟอร์มิก ร้อยละ 0.1 ที่ละลายในน้ำ และ mobile phase B ประกอบด้วยอะซิโตนไตรล์ ร้อยละ 90 และกรดฟอร์มิก ร้อยละ 0.1 การแยก LC จะใช้ linear gradient ที่ร้อยละ 3-60 ของ mobile phase B ที่อัตราการไหลคงที่ 300 นาโนลิตร/นาที เป็นเวลา 135 นาที ทำการ regenerate คอลัมน์ ที่ใช้วิเคราะห์ด้วย mobile phase B ร้อยละ 90 เป็นเวลา 10 นาที และปรับสมดุลใหม่ด้วย mobile phase B ร้อยละ 3 เป็นเวลา 35 นาที จากนั้น วิเคราะห์เปปไทด์โดยใช้ data-dependent (TopN15) acquisition

ไฟล์ Raw mass spectra (.raw file) ถูกวิเคราะห์โดยซอฟต์แวร์ Proteome Discoverer™ 2.4 (Thermo Fisher Scientific, USA) เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน UniProt โดยการระบุและการหาปริมาณโปรตีนจะใช้พารามิเตอร์ต่อไปนี้

- MS tolerance: 20 ppm
- MS/MS tolerance: 0.05 Da
- Enzyme: trypsin
- Fixed modification: cysteine carbamidomethylation
- Variable modification: methionine oxidation

ค่า false discovery rate (FDR) ถูกตั้งค่าไว้ที่ร้อยละ 1 สำหรับการระบุโปรตีนและเปปไทด์ จากนั้น normalized โปรตีนสัมพัทธ์ให้ได้เป็นจำนวนเปปไทด์ทั้งหมดสำหรับใช้ทดสอบ LC โดยใช้ normalization algorithm (total intensity count) ของ software และใช้ความเข้มของโปรตีนในการวิเคราะห์ pathway ด้วย PADOG algorithm ใน Reactome version 84

9. การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ

ทำการคัดกรองโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงในกลุ่มที่ได้รับ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ในการวิเคราะห์จะใช้ค่า $\log_2$ fold-change ของโปรตีนในกลุ่มที่ได้รับ 7-octenoic acid หรือ 1-phenyl-2-pentanol เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยโปรตีนที่มีค่า $\log_2$ fold-change ≥ 1.5 ถือว่าเป็น upregulated และ $\log_2$ fold-change ≤ -1.5 จัดเป็น downregulated โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงในกลุ่มที่ได้รับสารออกฤทธิ์ ต้องมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นนำ UniProt ID ของโปรตีนที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ protein-protein interaction ใน STRING database⁽¹⁸⁾ วิเคราะห์ gene ontology ใน Enrichr database⁽¹⁹⁻²¹⁾ และวิเคราะห์ pathway ด้วย Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) mapper⁽²²⁻²⁴⁾

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (mean) ที่ได้จากการทดลองแต่ละกลุ่มจะถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) และ *post hoc* analysis ด้วย Tukey's multiple comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ LX-2

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับชนิด LX-2 ต่อสารสกัดหยาบจากใบมะรุม พบว่าค่า IC_{50} , IC_{10} และค่า IC_5 เท่ากับ 357, 65.86 และ 37.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับสำหรับผลทดสอบในสารออกฤทธิ์ชนิด 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol พบว่าค่า IC_{50} เท่ากับ 324.6 และ 397.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า IC_{10} เท่ากับ 153.42 และ 173.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า IC_5 เท่ากับ 118.91 และ 130.44 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังใน Table 1 ในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์ โดยที่ความเข้มข้นต้องมีค่าน้อยกว่าค่า IC_{10} ของแต่ละสารในการทดสอบฤทธิ์ต้านพังผืดในตับ เพื่อลดผลข้างเคียงจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารแต่ละชนิด แสดงดังใน Fig. 1

2. ผลการวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี sandwich ELISA

เซลล์ LX-2 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- β 1 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีการหลั่ง TNF- α ออกมาปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มของเซลล์ที่ได้รับสาร 7-octenoic acid ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าการลดลงของปริมาณ TNF- α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ ขณะที่ 7-octenoic acid ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการหลั่ง TNF- α ในเซลล์ LX-2 เพิ่มขึ้น ในกลุ่มของสาร 1-phenyl-2-pentanol ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สามารถลดปริมาณของ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ ส่วนสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดปริมาณของ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ ดังแสดงใน Fig. 2

3. ผลการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์

ผลการทดสอบจากการกระตุ้นเซลล์ LX-2 ที่ถูกกระตุ้นเกิดพังผืดด้วย TGF- β 1 ร่วมกับสาร 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ที่ความเข้มข้น 100 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ ที่ได้รับ TGF- β 1 เพียงอย่างเดียว พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับ 7-octenoic acid มีโปรตีนจำนวน 224 ชนิดที่มี downregulation และโปรตีนจำนวน 216 ชนิดที่มี upregulation ในส่วนของกลุ่มที่ได้รับ 1-phenyl-2-pentanol พบว่า มีโปรตีนจำนวน 30 ชนิดที่มี downregulation และมีโปรตีน 68 ชนิดที่มี upregulation

4. ผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ

การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ โดยนำผลการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ มาทำการวิเคราะห์ protein-protein interaction (PPI) ด้วย STRING database พบว่า จำนวนโปรตีนทั้งหมดที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีความเชื่อมโยงเกี่ยวข้องกันทางชีววิทยาอย่างน้อยบางส่วนหรือหลายส่วน ดังแสดงใน Fig. 3 จึงต้องมีการนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

Table 1 The IC₅, IC₁₀ and IC₅₀ values for treatments of LX-2 cells with 7-octenoic acid, 1-phenyl-2-pentanol, and crude extract (MO).

Compound	IC ₅ (µg/mL)	IC ₁₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
7-octenoic acid	118.91	153.42	324.60
1-phenyl-2-pentanol	130.44	173.05	397.40
Crude extract (MO)	37.07	65.86	357.00

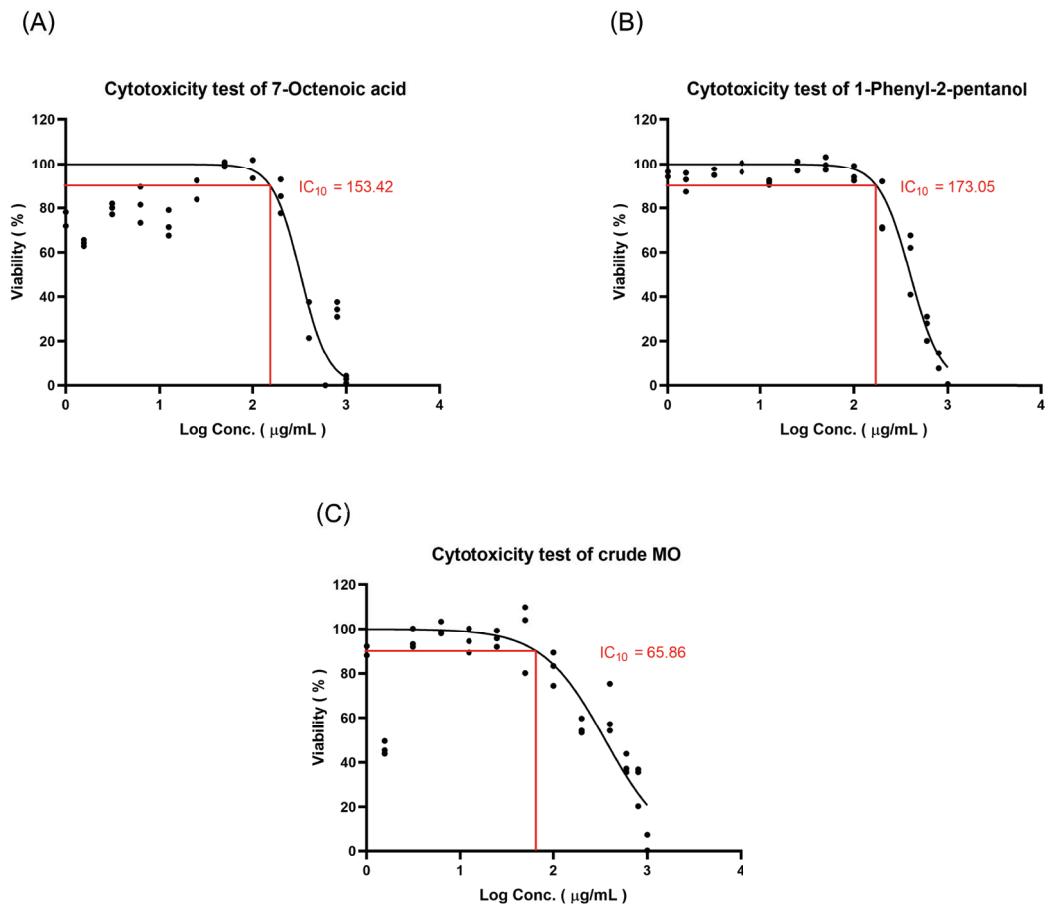


Fig. 1 The dose-response curve and IC₁₀ value for treatment of the LX-2 cells with 7-octenoic acid (A), 1-phenyl-2-pentanol (B), and crude extract (MO) (C).

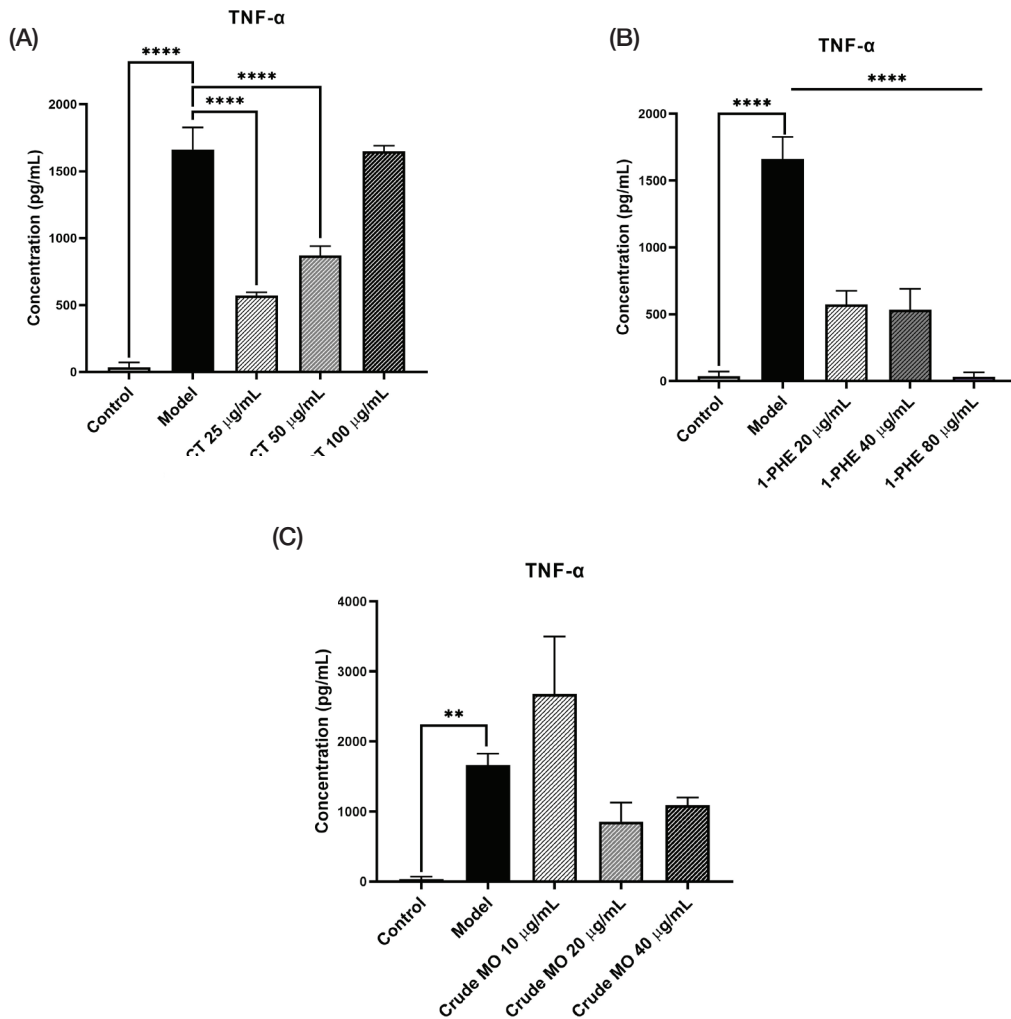


Fig. 2 Effects of 7-octenoic acid (7-OCT), 1-phenyl-2-pentanol (1-PHE), and crude MO extracts on TNF- α levels in the LX-2 cells. Cells were cultured in complete D-MEM medium (Control), stimulated with TGF- β 1 (10 ng/mL; Model), or treated with TGF- β 1 plus 7-OCT, 1-PHE, or crude MO extracts. TNF- α levels were quantified. Data are presented as mean $\pm$ SEM. ** p < 0.0021, **** p < 0.0001 compared to the Model group.

การวิเคราะห์ gene ontology ด้วย Enrichr database ของกลุ่มที่ได้รับสาร 7-octenoic acid พบว่า ผลการวิเคราะห์ด้านกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) โปรตีนส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับ cytoplasmic translation, mRNA processing และ gene expression ในด้านส่วนประกอบของเซลล์ (cellular component) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับ focal adhesion, cell-substrate junction และ intracellular membrane-bounded organelle ส่วนด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (molecular function) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ RNA binding, cadherin binding และ mRNA binding ในส่วนของโปรตีนในเซลล์ LX-2 ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากได้รับสาร 1-phenyl-2-pentanol พบว่า ผลการวิเคราะห์ด้านกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) โปรตีนส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับ gene expression, cytoplasmic translation และ chaperone cofactor-dependent protein refolding ด้านส่วนประกอบของเซลล์ (cellular component) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับ focal adhesion, cell-substrate junction และ ribosome ส่วนด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (molecular function) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ RNA binding, cadherin binding และ mRNA binding

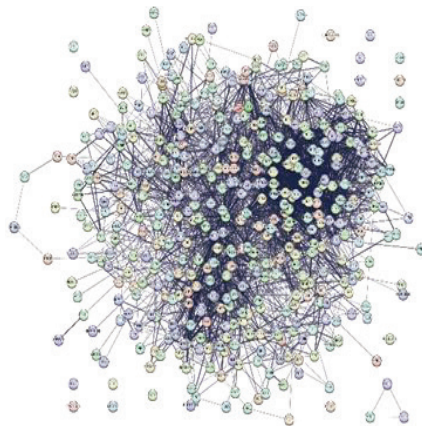
การวิเคราะห์ signaling pathway ด้วย KEGG Mapper คณะผู้วิจัยได้คัดกรองและมุ่งเน้น signaling pathway ที่มีความเกี่ยวข้องกับพังผืดในตับและเป็นโมเลกุลเป้าหมายของ anti-liver fibrosis drugs ได้แก่ PI3K-Akt, NF-KB และ mTOR signaling pathways อีกทั้งคณะผู้วิจัยได้ศึกษาใน pathway เหล่านี้ที่มีความสอดคล้องกับผล

โปรตีนโอมิคส์ร่วมกับผลของระดับ TNF- α ดังนั้นจึงต้องศึกษา signaling pathway ของแต่ละสารออกฤทธิ์ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าในเซลล์ LX-2 ที่ได้รับ 7-octenoic acid มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่มีบทบาทในวิถีสัญญาณภายในเซลล์ทั้งสิ้น 284 signaling pathways โดยมี 2 signaling pathways ที่มีความสำคัญในการเกิดพังผืดในตับหรือการลดลงของ TNF- α ได้แก่ PI3K-Akt signaling pathway ซึ่งพบโปรตีนจำนวน 5 ชนิดสำคัญที่มี downregulation เช่น guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (*GNB2*) และ NF-KB signaling pathway พบโปรตีนจำนวน 1 ชนิดที่สำคัญที่มี downregulation คือ casein kinase II subunit alpha (*CSNK2A1*) ดังแสดงใน Fig. 4 ในส่วนของเซลล์ตับที่ได้รับ 1-phenyl-2-pentanol พบทั้งหมด 183 pathways โดย mTOR signaling pathway ซึ่งพบโปรตีนจำนวน 1 ชนิดที่มี downregulation คือ low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*) ดังแสดงใน Fig. 5 ซึ่งส่งผลต่อการลดลงของระดับ TNF- α ได้

หลังจากได้โปรตีนเป้าหมายที่น่าสนใจแล้วจึงทำการวิเคราะห์ PPI ด้วย STRING database เพื่อตรวจสอบการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนอื่น ๆ อีกครั้ง โดยในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 7-octenoic acid พบว่า *GNB2* ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ *GNAS* (GNAS complex locus) และ *CSNK2A1* ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ *TP53* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ในส่วนของ 1-phenyl-2-pentanol พบว่า *LRP5* ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ *PPP2R5E* (protein phosphatase 2 regulatory subunit B epsilon) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการ ECM deposition จึงสามารถสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์

LX-2 หลังจากได้รับสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ส่งผล กับการเกิดมะเร็งและ ECM deposition ดังแสดง
ให้ลดการแสดงออกของโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง ใน Fig. 6
โปรตีนที่สนใจและโปรตีนอื่น ๆ ซึ่งมีความเกี่ยวข้อง

(A)



(B)

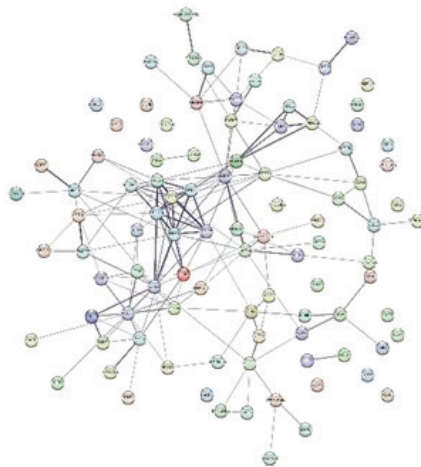
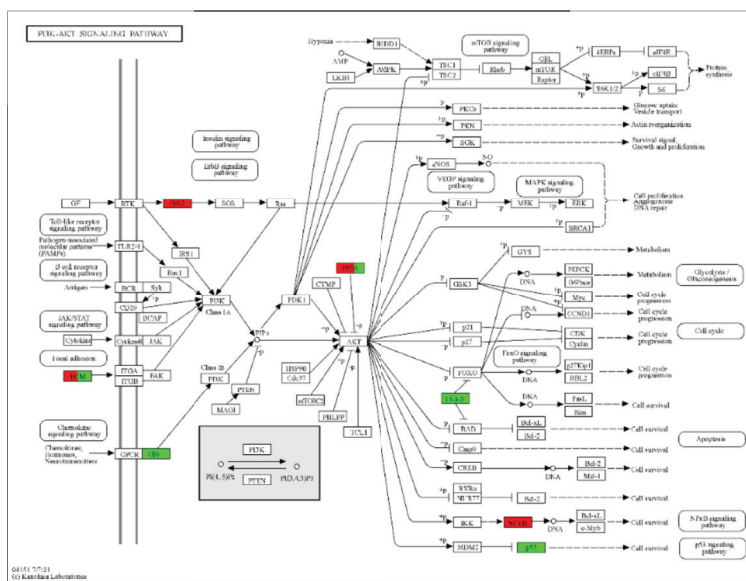


Fig. 3 The protein-protein interaction (PPI) network analysis of the LX-2 cells from both 7-octenoic acid (A) and 1-phenyl-2-pentanol (B) treatment groups by using STRING database.

(A)



(B)

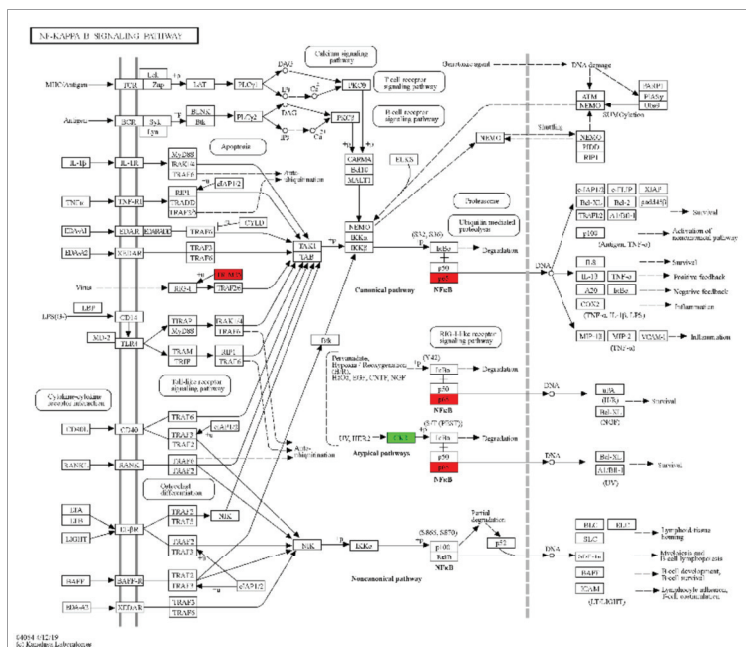


Fig. 4 The signaling pathway analysis of the proteomics profiling in 7-octenoic acid-treated LX-2 cells by using KEGG Mapper tool. The majority of proteins were categorized in PI3K-Akt (A) and NF-KB signaling pathways (B). Proteins exhibiting upregulation are depicted in red, while those exhibiting downregulation are depicted in green. Abbreviations: *TRIM25*, tripartite motif containing 25; *P65*, transcription factor p65; *LAMC3*, laminin subunit gamma 3; *GRB2*, growth factor receptor bound protein 2; *GNB5*, G protein subunit beta 5; *YWHAQ*, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta; *NFKB1*, nuclear factor kappa B subunit 1.

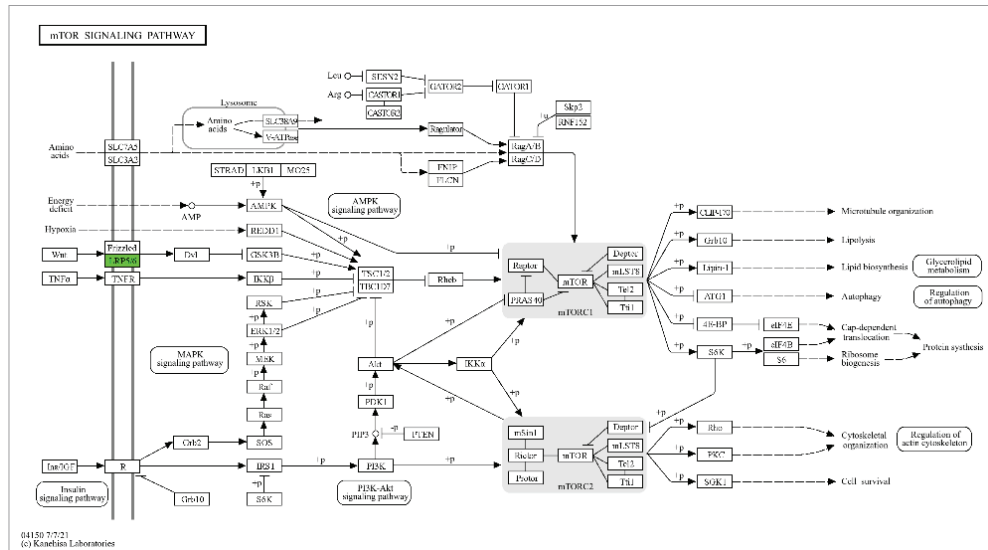


Fig. 5 The signaling pathway analysis of the proteomics profiling in 1-phenyl-2-pentanol treated LX-2 cells by using KEGG Mapper tool. The majority of proteins were categorized mTOR signaling pathway. Abbreviations: *LRP5/6*, low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6.

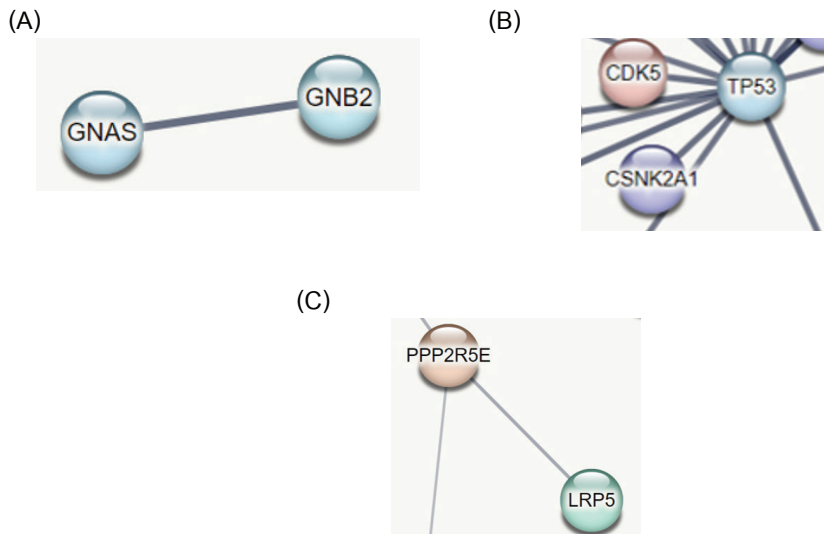


Fig. 6 The PPI network analysis of selected proteins; guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (*GNB2*) (A), casein kinase II subunit alpha (*CSNK2A1*) (B), and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*) (C), by using STRING database. Abbreviations: *GNAS*, neuroendocrine secretory protein 55; *CDK5*, cyclin-dependent kinase 5; *TP53*, cellular tumor antigen p53; *PPP2R5E*, serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform.

วิจารณ์

คณะผู้วิจัยศึกษากลไกการต้านพังผืดในตับด้วยสารออกฤทธิ์จากใบมะรุม ได้แก่ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ต่อเซลล์ LX-2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 โดยวัดระดับการมีชีวิตของเซลล์ วัดระดับการแสดงออกของไซโตไคน์ TNF- α วิเคราะห์ผลโปรตีนอิมมูโนบล็อต และวิเคราะห์ผลทางชีวสารสนเทศ

จากผลการตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดแต่ละชนิดด้วยวิธี Resazurin assay พบว่าช่วงความเข้มข้นที่เลือกใช้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ LX-2 (Fig. 1) แต่อย่างไรก็ตาม จากกราฟพบการตายของเซลล์ LX-2 เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดไปจนถึงระดับหนึ่ง เช่น สารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid จากใบมะรุม พบการตายของเซลล์ LX-2 ที่ค่า IC_{10} คือ 153.42 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบอื่น ๆ ต่อไป

จากการวัดระดับไซโตไคน์ด้วยเทคนิค sandwich ELISA พบว่า สารออกฤทธิ์ 1-phenyl-2-pentanol สามารถลดการหลั่งของ TNF- α ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่กลุ่มของเซลล์ที่ได้รับ 7-octenoic acid ที่ 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีระดับของ TNF- α ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ แต่พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของระดับ TNF- α เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ 7-octenoic acid จนถึง 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลดังกล่าว ทางคณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า น่าจะเกิดจาก biphasic effect⁽²⁵⁾ ของสาร 7-octenoic acid ต่อเซลล์ LX-2 ในสถานะที่มี TGF- β 1 โดยที่ 7-octenoic acid สามารถออกฤทธิ์ทั้งยับยั้งและ

กระตุ้นการสร้าง TNF- α ในเซลล์ LX-2 ผ่านการกระตุ้นหรือยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยฤทธิ์ทางชีวภาพจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสาร อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อมูลของ 7-octenoic acid ต่อการสร้าง TNF- α ยังมีไม่เพียงพอ จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงผล biphasic effect ของสาร 7-octenoic acid ต่อการสร้าง TNF- α ในเซลล์ HSCs ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- β 1 เพื่อพิสูจน์สมมติฐานเพิ่มเติม

สารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถลดการหลั่งของ TNF- α ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Armando และคณะ ในปี ค.ศ. 1992 พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถลดการอักเสบและลด acetylcholine ในลำไส้หนูทดลองได้⁽²⁶⁾ งานวิจัยของ Jimenez และคณะ ในปี ค.ศ. 2017 สามารถลดการอักเสบและยับยั้งการทำงานของ NF-KB pathway⁽²⁷⁾ งานวิจัยของ Sharifudin และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 จากการศึกษาเนื้อเยื่อตับจากหนูที่ได้รับสารสกัดจากใบมะรุม พบว่าความรุนแรงและการเกิดความเสียหายในตับหนูมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²⁸⁾ แต่สามารถกระตุ้นการหลั่งของ TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ pathway ด้วย KEGG Mapper พบว่าในเซลล์ตับที่ได้รับ 7-octenoic acid เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ มี CSNK2A1 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ NF-KB pathway และมี GNB2 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ PI3K-Akt signaling pathway ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mittal และยังคงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang Yang และคณะ ในปี 2023 พบว่าสารสกัดจาก *Macleaya*

cordata สามารถลดการแสดงออกของ *GNB2* ใน NF-KB และ PI3K/Akt signaling pathways ได้ อีกทั้งพบว่าระดับของ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใน C57BL/6 mice⁽²⁹⁾ บ่งชี้การมีฤทธิ์เป็น anti-inflammatory และ anti-liver fibrosis ดังนั้นจึงคาดว่า 7-octenoic acid ที่สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน *GNB2* ได้ จึงมีฤทธิ์เป็น anti-inflammatory และ anti-liver fibrosis นอกจากนี้เนื่องจากยังไม่พบงานวิจัยใดที่รายงานผลการศึกษาของสาร 7-octenoic acid ในใบมะรุมที่สามารถลดการแสดงออกของยีน *CSNK2A1* และส่งผลให้ระดับไซโตไคน์ที่เป็นหนึ่งในสาเหตุของการเกิดพังผืดในตับลดลงได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการค้นพบว่ายีน *CSNK2A1* อาจเป็นเป้าหมายใหม่ของสาร 7-octenoic acid จากใบมะรุมในการต้านพังผืดในตับ และในส่วนของเซลล์ตับที่ได้รับ 1-phenyl-2-pentanol เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ มี LRP5/6 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ mTOR signaling pathway ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ ในปี ค.ศ. 2023 พบว่าสารไซเดียมซาลิโนไมซินลดการแสดงออกของยีน *LRP6* ผ่านการทำงานของ mTOR signaling pathway โดยทำให้ระดับ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน germinal center B-cell (GCB) บ่งชี้การมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง⁽³⁰⁾ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang และคณะ ในปี ค.ศ. 2023 พบว่า *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants สามารถยับยั้งการทำงานของ mTOR signaling pathway ได้ใน SMMC-7721 cell⁽³¹⁾ บ่งชี้การมีฤทธิ์เป็น anti-liver cancer อีกทั้งยัง

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ ในปี ค.ศ. 2019 พบว่าการแสดงออกของยีน *LRP6* ลดลง ส่งผลให้การทำงานของ mTOR signaling pathway ลดลงเช่นเดียวกัน⁽³²⁾ ดังนั้นจึงคาดว่า 1-phenyl-2-pentanol ที่สามารถลดการแสดงออกของยีน *LRP5* จึงมีฤทธิ์เป็น anti-inflammatory และ anti-liver fibrosis ทั้งนี้ควรมีการทดสอบเพื่อยืนยันผลของสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดในเซลล์ LX-2 ต่อการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิคอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น western blot เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาคืบต่อไป

สรุป

จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า 7-octenoic acid จากใบมะรุม อาจสามารถต้านพังผืดในตับ โดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์จากยีน *CSNK2A1* และ *GNB2* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ NF-KB และ PI3K/Akt signaling pathways ขณะที่ 1-phenyl-2-pentanol จากใบมะรุม อาจสามารถต้านพังผืดในตับโดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์จากยีน *LRP5* ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ mTOR signaling pathway โดยทั้ง 3 pathways มีความเกี่ยวข้องกับพังผืดในตับ อีกทั้งยังพบว่า 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol สามารถลดการหลั่งของ TNF- α ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด เป็นสารที่น่าสนใจเพื่อศึกษาต่อในโมเดลการเกิดพังผืดในตับอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น สัตว์ทดลอง เพื่อช่วยในการศึกษาค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ที่อาจพัฒนาไปเป็นยาในการรักษาพังผืดในตับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา อุสุวรรณทิม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำการวิจัยมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงศรัณยภิญ โปธิกานนท์ จากภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ LX-2 ที่ใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงงบประมาณสนับสนุนการทำวิจัยจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-18.
2. Menggensilimu, Yuan H, Zhao C, *et al.* Anti-liver fibrosis effect of total flavonoids from *Scabiosa comosa* Fisch. ex Roem. et Schult. on liver fibrosis in rat models and its proteomics analysis. *Ann Palliat Med* 2020; 9: 272-85.
3. Sarin SK, Kumar M, Eslam M, *et al.* Liver diseases in the Asia-Pacific region: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; 5: 167-228.
4. Poynard T, Lebray P, Ingiliz P, *et al.* Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 1-13.
5. Khanam A, Saleeb PG, Kottiril S. Pathophysiology and treatment options for hepatic fibrosis: can it be completely cured? *Cells* 2021; 10: 1097.
6. Yang YM, Seki E. TNF α in liver fibrosis. *Curr Pathobiol Rep* 2015; 3: 253-61.
7. Zelova H, Hosek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res* 2013; 62: 641-51.
8. Tan Z, Sun H, Xue T, *et al.* Liver fibrosis: therapeutic targets and advances in drug therapy. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 730176.
9. Camellia Seed Oil and Other Plant Oil Product Research and Development Center. (MOR-INGA) Chiang Rai, Thailand: [Available from: <https://www.camelliaoilcenter.com/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B8%A3%E0%B8%B8%E0%B8%A1-moringa/>].
10. Kou X, Li B, Olayanju JB, Drake JM, Chen N. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients* 2018; 10: 343.
11. Wisitpongpan P, Suphrom N, Potup P, *et al.* *In vitro* bioassay-guided identification of anticancer properties from *Moringa oleifera* Lam. leaf against the MDA-MB-231 cell line. *Pharmaceuticals* 2020; 13: 464.

12. Yu J, Hu Y, Gao Y, *et al.* Kindlin-2 regulates hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis. *Cell Death Discovery* 2018; 4: 93.
13. Xu Z, Li T, Li M, *et al.* eRF3b-37 inhibits the TGF- β 1-induced activation of hepatic stellate cells by regulating cell proliferation, G0/G1 arrest, apoptosis and migration. *Int J Mol Med* 2018; 42: 3602-12.
14. Wei S, Wang Q, Zhou H, *et al.* miR-455-3p alleviates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by suppressing HSF1 expression. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 16: 758-69.
15. Wang Y, Wu C, Zhou J, Fang H, Wang J. Overexpression of estrogen receptor β inhibits cellular functions of human hepatic stellate cells and promotes the anti-fibrosis effect of calycosin via inhibiting STAT3 phosphorylation. *BMC Pharmacol Toxicol* 2022; 23: 77.
16. Kang H, Seo E, Oh YS, Jun H-S. TGF- β activates NLRP3 inflammasome by an autocrine production of TGF- β in LX-2 human hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 2022; 477: 1329-38.
17. Buakaew W, Krobthong S, Yingchutrakul Y, *et al.* Investigating the antifibrotic effects of β -Citronellol on a TGF- β 1-stimulated LX-2 hepatic stellate cell Model. *Biomolecules* 2024; 14: 800.
18. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, *et al.* STRING v10: protein—protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: 447-52.
19. Chen EY, Tan CM, Kou Y, *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013; 14: 128.
20. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 90-7.
21. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, *et al.* Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Current Protocols* 2021; 1: 90.
22. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 27-30.
23. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science* 2019; 28: 1947-51.
24. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res* 2023; 51: 587-92.
25. Jodynis-Liebert J, Kujawska M. Biphasic dose-response induced by phytochemicals: experimental evidence. *J Clin Med* 2020; 9: 718.

26. Armando Ciiceresa^a AS, Sofia Rizzoa, Lorena Zabala^a, Edy De Leon^b and Federico Naveb. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. 2 : screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. J Ethnopharmacol 1992; 36: 233-7.
27. Vergara-Jimenez M, Almatrafi MM, Fernandez ML. Bioactive components in *Moringa Oleifera* leaves protect against chronic disease. Antioxidants (Basel). 2017; 6: 91.
28. Sharifudin SA, Fakurazi S, Hidayat MT, *et al*. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* extracts against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Pharm Biol 2013; 51: 279-88.
29. Yang Y, Ding T, Xiao G, *et al*. Anti-Inflammatory Effects of allocryptopine via the target on the CX3CL1-CX3CR1 axis/GNB5/AKT/NF-kappaB/apoptosis in dextran sulfate-induced mice. Biomedicines 2023; 11: 464.
30. Li L, Zeng P, Yu L, *et al*. Salinomycin sodium exerts anti diffuse large B-cell lymphoma activity through inhibition of LRP6-mediated Wnt/ β -catenin and mTORC1 signaling. Leukemia & Lymphoma 2023; 64: 1151-60.
31. Huang J, Hao J, Nie J, *et al*. Possible Mechanism of Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants Seed Extract Suppresses the Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells SMMC-7721. Chem Biodivers 2023; 20: e202200768.
32. Li L, Xue J, Wan J, *et al*. LRP6 Knock-down ameliorates insulin resistance via modulation of autophagy by regulating GSK3beta signaling in human LO2 hepatocytes. Front Endocrinol (Lausanne) 2019; 10: 73.

Evaluation of Hemolysis, Icterus, and Lipemia Interference Effects in Biochemical Analysis Using an Automated Clinical Chemistry Analyzer

Somsak Fongsupa¹, Boonyasirii Phothipatt² and Wanlapa Chaibangyang^{1*}

¹*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand*

²*Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand*

Abstract

Serum or plasma samples exhibiting hemolysis (H), icterus (I), or lipemia (L) are common preanalytical errors that affect the test results in clinical chemistry laboratories. Sample assessment with HIL index by spectrophotometry on an automated clinical chemistry analyzer is a reliable and commonly used method. The aim of this study is to evaluate the hemolysis, icterus, and lipemia effects in biochemical analysis using the Beckman Coulter AU5800 automated analyzer. The data, including semiquantitative and quantitative HIL indices and biochemical values, were collected from June to December 2023. The difference in biochemical values between HIL level (0) and other HIL index levels was compared. The correlation between biochemical values and the quantitative HIL index was determined, and linear regression models were generated to predict the clinically significant interference levels. Based on the HIL index data, the maximum interference level was evaluated in the present study up to level (2+). Clinically significant positive interference from hemolysis was detected for lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) at hemolysis index (HI) (1+), whereas clinically significant negative interference was detected for total bilirubin (TB) at HI (2+). Moreover, AST at lipemia index (LI) (2+) showed clinically significant positive interference from lipemia. No clinically significant interference was detected for alanine aminotransferase (ALT), direct bilirubin (DB), blood urea nitrogen (BUN), and magnesium up to HI (2+); cholesterol up to

*Corresponding author E-mail address: wanlapa.c@allied.tu.ac.th

Received: 5 March 2024

Revised: 22 April 2024

Accepted: 21 May 2024

icterus index (II) (1+); and ALT up to LI (2+). In addition, the LDH linear regression model predicted both the hemolysis interference level and interference cutoff, even at the minimal hemolysis degree, HI level (0). Thus, the proper HIL index cutoff and interference level should be evaluated and established in the clinical laboratories to guide sample and patient's result management for achieving patient safety.

Keywords: Interference, Hemolysis, Icterus, Lipemia, HIL index

การประเมินผลกระทบจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ความเหลือง และความข้น ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมี ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิก

สมศักดิ์ ฟองสุภา¹ ปุญญศิริ โพธิพัฒน์² และ วัลลภา ใช้บางยาง^{1*}

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²บัณฑิตศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

สิ่งส่งตรวจประเภทซีรัมหรือพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis, H) มีความเหลืองจากบิลิรูบิน (icterus, I) หรือมีความข้น (lipemia, L) เป็นปัญหาในขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ซึ่งส่งผลกระทบต่อค่าการตรวจวัด ที่พบเป็นประจำในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ปัจจุบันการประเมิน HIL index ในสิ่งส่งตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิกโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสง เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือและนิยมใช้กันแพร่หลาย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลการรบกวนจาก HIL ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิก Beckman Coulter AU5800 โดยใช้ข้อมูลผลการประเมิน HIL index เชิงกึ่งปริมาณและเชิงปริมาณ โดยเก็บข้อมูลจากผลการวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีของตัวอย่างผู้ป่วยระหว่างเดือนมิถุนายน-ธันวาคม พ.ศ. 2566 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับสารชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปตามระดับของ HIL index และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับสารชีวเคมีกับ HIL index เชิงปริมาณเพื่อทำนายระดับ HIL index ที่มีการรบกวนการวิเคราะห์โดยใช้ตัวแบบถดถอยเชิงเส้น จากผลการวิจัยพบว่าจากข้อมูล HIL index สามารถประเมินผลการรบกวนได้สูงสุดที่ระดับ (2+) โดยพบการรบกวนเชิงบวกจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) อย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกในการวิเคราะห์ lactate dehydrogenase (LDH) และ aspartate aminotransferase (AST) ที่ดัชนีการแตกของเม็ดเลือดแดง (HI) ระดับ (1+) และการรบกวนเชิงลบในการวิเคราะห์ total bilirubin (TB) ที่ HI ระดับ (2+) นอกจากนี้พบการรบกวนเชิงบวกจากความข้น (lipemia) อย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกในการวิเคราะห์ AST ที่ดัชนีความข้น (LI) ระดับ (2+) แต่ไม่พบการรบกวนอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกในการวิเคราะห์ alanine aminotransferase (ALT), direct bilirubin (DB), blood urea nitrogen (BUN), และ magnesium จนถึงระดับ HI (2+) การวิเคราะห์ cholesterol จนถึงดัชนีความเหลืองจากบิลิรูบิน (II) ระดับ (1+) และการวิเคราะห์ ALT จนถึงระดับ LI (2+) ทั้งนี้ผลการทำนายระดับที่พบการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) โดยใช้ตัวแบบถดถอยเชิงเส้นของการวิเคราะห์ LDH ช่วยระบุ cutoff ที่มีการรบกวนตั้งแต่ระดับ HI (0) ได้

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: wanlapa.c@allied.tu.ac.th

รับบทความ: 5 มีนาคม 2567

แก้ไขบทความ: 22 เมษายน 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 21 พฤษภาคม 2567

ดังนั้น ห้องปฏิบัติการควรประเมินและกำหนดระดับค่า cutoff ที่เหมาะสมของ HIL index เพื่อประโยชน์ในการตัดสินใจดำเนินการกับสิ่งส่งตรวจและผลการวิเคราะห์ เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับความปลอดภัยสูงสุดจากผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: การรบกวน การแตกของเม็ดเลือดแดง ความเหลือง ความขุ่น HIL index

บทนำ

สิ่งส่งตรวจประเภทซีรัมหรือพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) มีความเหลืองจากบิลิรูบิน (icterus) หรือมีความขุ่น (lipemia) ซึ่งเกิดจากไลโปโปรตีนชนิด chylomicrons และ very low density lipoprotein (VLDL) เป็นปัญหาคุณภาพสิ่งส่งตรวจที่พบเป็นประจำในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก โดยเฉพาะสิ่งส่งตรวจที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) เป็นความผิดพลาดที่พบมากที่สุดก่อนการวิเคราะห์⁽¹⁾ นอกจากนี้สิ่งส่งตรวจที่มีความขุ่นจากไขมัน (lipemia) เป็นปัญหาที่พบเป็นส่วนใหญ่ในสิ่งส่งตรวจที่มาจากแผนกผู้ป่วยนอก⁽²⁾ โดยสิ่งส่งตรวจจะมีฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และองค์ประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง สารบิลิรูบิน (bilirubin) และไลโปโปรตีน (lipoprotein) ตามลำดับ ซึ่งจัดเป็นสารรบกวนที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยตามธรรมชาติ (endogenous interference) แต่พบในปริมาณที่สูงกว่าปกติและส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์เปลี่ยนแปลงไปจากค่าจริง ทั้งนี้การรบกวนนั้นขึ้นอยู่กับสิ่งส่งตรวจ วิธีวิเคราะห์ และประเภทของปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์⁽³⁾ การรบกวนจากสารรบกวนเกิดขึ้นผ่านกลไกหลัก คือ การรบกวนเชิงสเปกตรัม (spectral interference) โดยสารรบกวนมีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ซ้อนทับกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์สารชีวเคมีนั้น ๆ ส่งผลให้วิธีวิเคราะห์ที่ใช้หลักการวัดสารสี (colorimetric method) ที่ช่วงความยาวคลื่นเดียวกันหรือใกล้เคียงกันจะได้รับผลกระทบ เช่น การรบกวนของฮีโมโกลบินในการวิเคราะห์ lipase, alkaline phosphatase (ALP) และ γ -glutamyl transferase (GGT)⁽⁴⁾ หรือการกระเจิงแสง (light scattering) ที่เกิดจากความขุ่นจากไลโปโปรตีน (lipemia) ซึ่งรบกวนการอ่านค่าในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 300-700 นาโนเมตร

แต่จะส่งผลกระทบอย่างมากในช่วงความยาวคลื่นสั้น เช่น การวิเคราะห์เอนไซม์หลายชนิดที่ใช้วิธีติดตามการเปลี่ยนแปลงของ NAD(P)H ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร⁽⁵⁾ กลไกการรบกวนทางเคมีเกิดจากตัวสารรบกวนหรือเอนไซม์จากเม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) หรือรบกวนการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร เช่น การทำปฏิกิริยาระหว่างบิลิรูบินกับ hydrogen peroxide ซึ่งเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาการวิเคราะห์ cholesterol, triglyceride, uric acid และ creatinine⁽⁵⁾ นอกจากนี้การแตกของเม็ดเลือดแดงยังทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับสารที่มีความเข้มข้นสูงภายในเม็ดเลือดแดง เช่น potassium, lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST) และ magnesium อีกทั้งทำให้เกิดการลดลงของระดับสารซึ่งเป็นผลจากการเจือจางของสารน้ำเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดแดงในสิ่งส่งตรวจได้⁽⁴⁾ กลไกการรบกวนอีกรูปแบบหนึ่ง คือ การทดแทนปริมาตรน้ำจากไขมัน (volume displacement) ซึ่งพบการรบกวนในการวิเคราะห์ด้วยหลักการ indirect ion-selective electrode (ISE) ที่มีการเจือจางสิ่งส่งตรวจก่อนการวิเคราะห์⁽⁶⁾ จะเห็นได้ว่าการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ความเหลืองจากบิลิรูบิน (icterus) หรือความขุ่นจากไลโปโปรตีน (lipemia) ในสิ่งส่งตรวจรบกวนการวิเคราะห์ในหลายรายการทดสอบ ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและกระทบต่อความปลอดภัยของผู้ป่วย

การประเมินคุณภาพสิ่งส่งตรวจ (specimen quality assessment) นับเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญช่วยป้องกันความผิดพลาดที่มีสาเหตุจากขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ (preanalytical error) การแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis, H) ความเหลือง (icterus, I) และความขุ่น (lipemia, L) ในซีรัมหรือพลาสมา รวมเรียกว่า HIL index สามารถประเมินได้จากการ

เปลี่ยนของสีและ/หรือความใสของสิ่งส่งตรวจด้วยตาเปล่า (visual inspection) เปรียบเทียบกับแผนภูมิสี แล้วระบุระดับแบบกึ่งปริมาณ (semiquantitative grade) ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก⁽⁵⁾ แต่พบว่าผลการบ่งชี้ HIL index ด้วยวิธีนี้มีความสอดคล้องต่ำกับระดับความเข้มข้นจริงของสารรบกวน⁽⁷⁾ ขาดความแม่นยำและความน่าเชื่อถือ ด้วยข้อจำกัดจากปัจจัยหลายด้านที่ส่งผลต่อความสามารถในการระบุแยกสีที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล⁽⁸⁾ ปัจจุบันเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิกสมัยใหม่สามารถตรวจวัด HIL index หรืออีกชื่อหนึ่งคือ serum indices ซึ่งโดยส่วนใหญ่ใช้หลักการวัดการดูดกลืนแสงแบบ 2 ความยาวคลื่น (bichromatic absorbance measurement) ซึ่งให้ผลการตรวจวัดที่น่าเชื่อถือมากกว่าวิธีดั้งเดิม^(9, 10) อย่างไรก็ตาม ความยาวคลื่นที่ใช้ รูปแบบการรายงานผล การกำหนด cutoff และเกณฑ์การยอมรับการรบกวนของการทดสอบ serum indices ยังมีความหลากหลายและแตกต่างกันในแต่ละผู้ผลิต⁽¹¹⁾ แม้ในปี ค.ศ. 2012 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ได้แนะนำแนวทางสำหรับการสร้างและประเมิน HIL index ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยการประเมินการเปลี่ยนแปลงของผลการวิเคราะห์หลังการเติมสารรบกวนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในซีรัมหรือพลาสมา ได้แก่ สารละลายเลือด (hemolysate) สารบิลิรูบิน ชนิด unconjugated หรือ conjugated bilirubin และ สารละลายไขมัน (commercial lipid emulsion)⁽¹²⁾ อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ไม่นิยมกำหนดระดับการรบกวนด้วยตนเอง อาจเนื่องด้วยข้อจำกัดทางด้านทรัพยากรและงบประมาณ⁽¹³⁾ จากผลสำรวจพบว่าร้อยละ 95 ของห้องปฏิบัติการใช้ข้อมูลจากผู้ผลิตในการกำหนด HIL index⁽¹⁴⁾ ทั้งนี้ข้อมูลเกี่ยวกับการรบกวนจาก HIL ที่ผู้ผลิตระบุไว้มีค่อนข้างจำกัด

หรือไม่ได้ระบุผลการรบกวนไว้ในบางรายการทดสอบ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ความเหลือง (icterus) และความขุ่น (lipemia) ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิก โดยใช้ข้อมูลผลการประเมิน HIL index และผลการวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีของตัวอย่างที่ส่งมาวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลังแบบภาคตัดขวาง (retrospective cross-sectional study) โดยเก็บข้อมูลผลตรวจวิเคราะห์ของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่มีผลตรวจวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีในเลือดจำนวนทั้งสิ้น 9 การทดสอบ ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter AU5800 ในหน่วยเคมีคลินิกงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน-ธันวาคม พ.ศ. 2566 ทั้งนี้โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ (COE No.031/2566)

2. ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา

ผู้วิจัยพิจารณาเลือกรายการทดสอบที่ทำการศึกษาผลการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ความเหลือง (icterus) และความขุ่น (lipemia) โดยมีเกณฑ์ดังนี้

2.1 เป็นรายการทดสอบที่เปิดบริการบนเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter AU5800 ไม่รวมการวิเคราะห์ด้วยวิธี ISE

2.2 รายการทดสอบมีลักษณะเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่งต่อไปนี้ คือ 1) มีข้อมูลการรบกวน

ของ HIL จากผู้ผลิตโดยแสดงผลการรบกวนที่ระดับ HIL index เหนือถึงปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับ (3+) 2) ไม่มีข้อมูลการรบกวนของ HIL จากผู้ผลิตและมีรายงานผลการรบกวนจากการศึกษาของ Akbas และคณะ⁽¹⁵⁾ ที่ระดับ HIL index เหนือถึงปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับ (3+) 3) มีข้อมูลการรบกวนของ HIL จากผู้ผลิตแต่มีรายงานผลการรบกวนจากการศึกษาของ Akbas และคณะ⁽¹⁵⁾ ที่ระดับ HIL index เหนือถึงปริมาณต่ำกว่าข้อมูลของผู้ผลิต

จากเกณฑ์ดังกล่าว รายการทดสอบที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ประกอบด้วย การศึกษาผลการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ในการวิเคราะห์ alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TB), direct bilirubin (DB), blood urea nitrogen (BUN), lactate dehydrogenase (LDH) และ magnesium การศึกษาผลการรบกวนจากความเหลือง (icterus) ในการวิเคราะห์ cholesterol และ lipase การศึกษาผลการรบกวนจากความขุ่น (lipemia) ในการวิเคราะห์ ALT, AST และ lipase โดยใช้ข้อมูลผลตรวจระดับสารชีวเคมีในเลือดและข้อมูลค่า HIL index เหนือถึงปริมาณและเชิงปริมาณ ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter AU5800

เกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) ได้แก่ ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีในเลือดทุกรายในรายการทดสอบ ALT, AST, TB, DB, BUN, cholesterol, LDH, lipase และ magnesium ตั้งแต่เดือนมิถุนายน-ธันวาคม พ.ศ. 2566

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ได้แก่ ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีที่มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับศูนย์ ผลการตรวจวิเคราะห์

ระดับสารชีวเคมีที่ไม่มีผลการตรวจ HIL index เหนือถึงปริมาณและเชิงปริมาณ ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีที่มีผลการตรวจ HIL index เหนือถึงปริมาณมีค่าเป็นลบ และผลการตรวจวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีที่มีผลการตรวจ HIL index แจ้งเตือนความผิดปกติของการวิเคราะห์ HIL index ในสิ่งส่งตรวจนั้น

3. การวิเคราะห์ HIL index และระดับสารชีวเคมีในเลือด

สิ่งส่งตรวจประเภทซีรัมและพลาสมาจากผู้ป่วยที่มีการส่งตรวจวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมี ในหน่วยเคมีคลินิก งานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter AU5800 จะได้รับการประเมิน HIL index โดยอัตโนมัติทุกตัวอย่าง ซึ่งมีชื่อการทดสอบว่า LIH ในขั้นตอนนี้ตัวอย่างจะถูกเจือจางด้วยน้ำยา LIH ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ 0.9% sodium chloride และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 6 ช่วง ได้แก่ ความยาวคลื่น 410/480 นาโนเมตร และ 600/800 นาโนเมตร สำหรับการประเมินการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ความยาวคลื่น 480/570 นาโนเมตร และ 600/800 นาโนเมตร สำหรับการประเมินความเหลือง (icterus) และความยาวคลื่น 660/800 นาโนเมตร สำหรับการประเมินความขุ่น (lipemia)⁽⁵⁾ เครื่องจะรายงานผล HIL index แยกเป็น hemolysis index (HI), icterus index (II) และ lipemia index (LI) ในรูปแบบเชิงถึงปริมาณแบ่งเป็น 6 ระดับ ตามค่าระดับ HIL index เหนือถึงปริมาณโดยใช้ cutoff ที่ผู้ผลิตกำหนด⁽¹⁶⁾ (Table 1) โดยผล HIL index เหนือถึงปริมาณจะรายงานพร้อมกับผลวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีในสิ่งส่งตรวจนั้น

Table 1 Semiquantitative and quantitative cutoffs for HIL indices and corresponding concentrations of hemoglobin (H index), bilirubin (I index), and Intralipid (L index) on the Beckman Coulter AU5800 analyzer, according to the manufacturer's specifications.

Semiquantitative scale	H index		I index		L index	
	Hemoglobin (mg/dL)	Cutoff	Bilirubin (mg/dL)	Cutoff	Intralipid (mg/dL)	Cutoff
0	< 50	< 0.1700	< 2.5	< 0.1100	< 40	< 0.0150
1+	50 – 99	0.1700 – 0.3499	2.5 – 4.9	0.1100 – 0.2099	40 – 99	0.0150 – 0.0399
2+	100 – 199	0.3500 – 0.6999	5.0 – 9.9	0.2100 – 0.4299	100 – 199	0.0400 – 0.0799
3+	200 – 299	0.7000 – 0.9999	10 – 19.9	0.4300 – 0.8499	200 – 299	0.0800 – 0.1199
4+	300 – 500	1.0000 – 1.6999	20 – 40	0.8500 – 1.6999	300 – 500	0.1200 – 0.1999
5+	> 500	> 1.7000	> 40	> 1.7000	> 500	> 0.2000

การวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีในเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter AU5800 ภายใต้คำแนะนำของผู้ผลิต โดยใช้น้ำยาวิเคราะห์ที่เหมาะสมตามข้อกำหนดของผู้ผลิต ดังนี้ 1) ALT หลักการ enzymatic UV method ปราศจาก pyridoxal phosphate ตามคำแนะนำของ International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) วัดการดูดกลืนแสงที่ 340/660 นาโนเมตร 2) AST หลักการ enzymatic UV method ปราศจาก pyridoxal phosphate ตามคำแนะนำของ IFCC วัดการดูดกลืนแสงที่ 340/660 นาโนเมตร 3) TB หลักการ colorimetric diazo method โดยใช้ 3,5-dichlorophenyl diazonium tetrafluoroborate (DPD) ร่วมกับ caffeine และ surfactant วัดการดูดกลืนแสงที่ 540/660 นาโนเมตร 4) DB หลักการ colorimetric diazo method โดยใช้ 3,5-dichlorophenyl diazonium tetrafluoroborate (DPD) วัดการดูดกลืนแสงที่ 570/660 นาโนเมตร 5) BUN หลักการ enzymatic UV method โดยใช้ urease

และ glutamate dehydrogenase วัดการดูดกลืนแสงที่ 340/660 นาโนเมตร 6) cholesterol หลักการ enzymatic colorimetric method โดยใช้ cholesterol oxidase และ peroxidase วัดการดูดกลืนแสงที่ 540/600 นาโนเมตร 7) LDH หลักการ enzymatic UV method ตามคำแนะนำของ IFCC วัดการดูดกลืนแสงที่ 340/660 นาโนเมตร 8) lipase หลักการ enzymatic colorimetric method โดยใช้ glycerol kinase, glycerol phosphate oxidase และ peroxidase วัดการดูดกลืนแสงที่ 540/800 นาโนเมตร 9) magnesium หลักการ colorimetric method โดยใช้ xylydyl blue วัดการดูดกลืนแสงที่ 520/800 นาโนเมตร

4. วิธีการศึกษา

4.1 การรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ความเหลือง (icterus) และความขุ่น (lipemia) ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมี

จัดกลุ่มข้อมูลผลตรวจระดับสารชีวเคมีตามค่า HIL index เชิงกึ่งปริมาณ กลุ่มที่ 1 HIL index ระดับ (0) กลุ่มที่ 2 HIL index ระดับ (1+) กลุ่มที่ 3 HIL index ระดับ (2+) กลุ่มที่ 4 HIL index ระดับ (3+) และกลุ่มที่ 5 HIL index ระดับตั้งแต่ (4+) ขึ้นไป เนื่องจากข้อมูลระดับสารชีวเคมีในแต่ละกลุ่มมีการแจกแจงไม่ปกติ (non-normal distribution) แปลงข้อมูลด้วยวิธี Box-Cox transformation⁽¹⁷⁾ เพื่อให้ข้อมูลมีการแจกแจงปกติ (normal distribution) แล้วพิจารณา outlier ของข้อมูลที่แปลงแล้วด้วยวิธีของ Tukey⁽¹⁸⁾ ที่เกณฑ์ 1.5 เท่าของ interquartile range (IQR) ร่วมกับการประเมินด้วย box plot ข้อมูลที่เป็น outlier จะถูกนำออกจากข้อมูลดิบ จากนั้นพิจารณา outlier ในชุดข้อมูลดิบอีกครั้งด้วยวิธีเดียวกัน ทำซ้ำจนกว่าจะไม่พบ outlier หากชุดข้อมูลภายหลังการกำจัด outlier แล้วมี $n < 25$ ⁽¹⁹⁾ จะไม่นำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าระดับสารชีวเคมีของแต่ละกลุ่มแสดงด้วยค่ามัธยฐาน (median) ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95% confidence interval) และ IQR ความแตกต่างของระดับสารชีวเคมีแต่ละกลุ่มแสดงด้วยค่าความแตกต่าง (absolute difference, Δ) และค่าร้อยละความแตกต่าง (% difference, % Δ) เทียบกับค่ามัธยฐานของกลุ่มที่มี HIL index (0) ดังสมการ

$$\text{Absolute difference} = \text{Median}_{(N)} - \text{Median}_{(0)}$$

$$\text{Difference (\%)} = [(\text{Median}_{(N)} - \text{Median}_{(0)}) / \text{Median}_{(0)}] \times 100$$

โดยที่ $\text{Median}_{(N)}$ คือ ค่ามัธยฐานของระดับสารชีวเคมีของกลุ่มที่มี HI, II หรือ LI (1+) เป็นต้นไป

$\text{Median}_{(0)}$ คือ ค่ามัธยฐานของระดับสารชีวเคมีของกลุ่มที่มี HI, II หรือ LI (0)

ศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างค่า HIL index เชิงปริมาณกับระดับสารชีวเคมีแบ่งตามกลุ่มของ HIL index เชิงกึ่งปริมาณ โดยใช้แผนภาพการกระจาย (scatter plot) และแสดงเส้นแนวโน้มแยกตามกลุ่ม

4.2 การทำนายการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ความเหลือง (icterus) และความขุ่น (lipemia) ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีโดยใช้ตัวแบบถดถอยเชิงเส้น

รวมข้อมูลระดับสารชีวเคมีภายหลังการกำจัด outlier แล้วทุกกลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มต้องมี $n \geq 25$ ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างค่า HIL index เชิงปริมาณกับระดับสารชีวเคมีด้วยแผนภาพการกระจาย (scatter plot) วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นโดยใช้ Pearson correlation แล้ววิเคราะห์ตัวแบบถดถอยเชิงเส้น (linear regression model) โดยจุดตัดของแกน x ระหว่างจุดบนตัวแบบถดถอยเชิงเส้นกับเกณฑ์การยอมรับ (acceptance limit) แสดงค่า HIL index เชิงปริมาณที่พบการรบกวนอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก

5. เกณฑ์การยอมรับในการประเมินการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ความเหลือง (icterus) และความขุ่น (lipemia)

ผู้วิจัยกำหนดเกณฑ์การยอมรับการรบกวนการวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมี (acceptance limit) โดยใช้ค่า allowable total analytical error (TEa) ที่กว้างที่สุดสำหรับรายการทดสอบนั้นจากแหล่งใดแหล่งหนึ่งต่อไปนี้ (1) Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) 2024 (2) biological variation ที่ระดับ desirable (BVd) จากฐานข้อมูลของ European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Biological Variation Database⁽²⁰⁾ (3)

biological variation ที่ระดับ desirable (BVd) จากข้อมูลของ Ricós และคณะ⁽²¹⁾ กำหนดให้ความแตกต่างที่มากกว่า acceptance limit หรือระดับสารชีวเคมีที่มีค่าเกิน acceptance limit แสดงว่ามีการรบกวนการวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีนั้นอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รวบรวมข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2021 และโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 25 ใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic) แสดงข้อมูลระดับสารชีวเคมีด้วยค่ามัธยฐาน (median) ช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับร้อยละ 95 (95% confidence interval) และ interquartile range (IQR) เปรียบเทียบความแตกต่างของระดับสารชีวเคมีแยกตามกลุ่มของ HIL index กับระดับสารชีวเคมีที่ HIL index (0) โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่า HIL index เชิงปริมาณกับระดับสารชีวเคมีโดยใช้ Pearson correlation และตัวแบบถดถอยเชิงเส้น (linear regression) แสดงช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับร้อยละ 95 โดยคำนวณสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

1. การรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ต่อการวิเคราะห์ ALT, AST, TB, DB, BUN, LDH และ magnesium

ผลการศึกษาการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) โดยการเปรียบเทียบ

ความแตกต่างของระดับสารชีวเคมี แยกตามระดับ hemolysis index (HI) เชิงปริมาณ ดังแสดงใน Table 2 พบว่า ALT, AST, TB, DB, BUN และ magnesium มีข้อมูลที่เพียงพอ ($n \geq 25$) ต่อการวิเคราะห์ผลการรบกวนสูงสุดที่ระดับ HI (2+) ส่วน LDH มีข้อมูลที่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ผลการรบกวนสูงสุดที่ระดับ HI (1+) เท่านั้น โดยพบลักษณะของการรบกวนเชิงบวกในการทดสอบ ALT, AST, LDH และ magnesium และพบลักษณะการรบกวนเชิงลบในการทดสอบ TB และ DB โดยที่ไม่พบการรบกวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดสอบ BUN จนถึงระดับ HI (2+) ทั้งนี้พบความแตกต่างของระดับ ALT, DB และ magnesium ที่ระดับ HI (1+) และ HI (2+) อยู่ในช่วงผลการรบกวนที่ยอมรับได้ (acceptance limit) แต่พบความแตกต่างของระดับ AST และ LDH สูงกว่าเกณฑ์การยอมรับตั้งแต่ระดับ HI (1+) ซึ่งทั้งสองรายการทดสอบไม่มีข้อมูลการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) จากผู้ผลิต ส่วนระดับของ TB ลดลงต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับที่ระดับ HI (2+) นอกจากนี้ผลการศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างค่า HI เชิงปริมาณกับระดับสารชีวเคมีแบ่งตามกลุ่มของ HI เชิงปริมาณแสดงผลสอดคล้องกับระดับที่พบการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ในทุกรายการทดสอบ (Fig. 1) ยกเว้นการทดสอบ LDH ที่พบเส้นแนวโน้มของระดับสารชีวเคมีเพิ่มสูงขึ้นออกนอกขอบเขตการยอมรับตั้งแต่ระดับ HI (0)

Table 2 Hemolysis interference on seven biochemical parameters determined by the Beckman Coulter AU5800 analyzer.

Analyte (unit)	HI	Number of patient results (%)	Number of patient results after outlier removal (%)	Median (95% CI)	IQR	Δ from HI (0) ^b	% Δ from HI (0) ^b	Acceptance criteria	Source of acceptance criteria	HI _{TD} (criteria)
ALT (U/L)	0 1+ 2+ 3+ ≥4+	40,579 (97.66) 755 (1.82) 183 (0.44) 21 (0.05) 11 (0.03)	33,994 (97.93) 583 (1.68) 136 (0.39) ND ND	19.15 (19.01 – 19.30) 21.26 (20.05 – 22.65) ^a 23.06 (20.13 – 25.48) ^a N/A N/A	13.89 14.97 14.66 N/A N/A	0.00 2.11 3.91 N/A N/A	0.0 11.0 18.4 N/A N/A	± 6 U/L	CLIA 2024	4+ (<10% or 6 U/L)
AST (U/L)	0 1+ 2+ 3+ ≥4+	36,516 (97.55) 710 (1.90) 176 (0.47) 19 (0.05) 12 (0.03)	29,056 (98.00) 473 (1.59) 121 (0.41) ND ND	24.99 (24.89 – 25.08) 32.23 (30.89 – 32.95) ^a 36.61 (34.95 – 40.15) ^a N/A N/A	10.00 11.43 15.70 N/A N/A	0.00 7.24 11.62 N/A N/A	0.0 29.0 46.5 N/A N/A	± 6 U/L	CLIA 2024	N/A
Total bilirubin (mg/dL)	0 1+ 2+ 3+ ≥4+	18,130 (97.62) 348 (1.87) 80 (0.43) 14 (0.08) 0 (0.00)	15,083 (98.15) 234 (1.52) 51 (0.33) ND ND	0.60 (0.59 – 0.60) 0.47 (0.43 – 0.50) ^a 0.37 (0.26 – 0.52) ^a N/A N/A	0.30 0.37 0.36 N/A N/A	0.00 -0.13 -0.23 N/A N/A	0.0 -21.7 -38.33 N/A N/A	± 27%	BVd (Ricós)	1+ (<10%)
Direct bilirubin (mg/dL)	0 1+ 2+ 3+ ≥4+	25,727 (97.29) 556 (2.10) 134 (0.51) 15 (0.06) 11 (0.04)	21,023 (97.78) 388 (1.80) 90 (0.42) ND ND	0.12 (0.12 – 0.12) 0.10 (0.10 – 0.11) ^a 0.09 (0.08 – 0.09) ^a N/A N/A	0.09 0.08 0.06 N/A N/A	0.00 -0.02 -0.03 N/A N/A	0.0 -16.7 -25.00 N/A N/A	± 44.5%	BVd (Ricós)	N/A
BUN (mg/dL)	0 1+ 2+ 3+ ≥4+	40,740 (97.51) 796 (1.91) 202 (0.48) 30 (0.07) 11 (0.023)	32,732 (97.79) 572 (1.71) 152 (0.45) 15 (0.05) ND	14.11 (14.04 – 14.19) 14.26 (13.75 – 14.83) 14.17 (12.65 – 15.64) ND N/A	7.09 7.25 8.40 ND N/A	0.00 0.15 0.06 N/A N/A	0.0 1.1 0.4 N/A N/A	± 16.9%	BVd (EFLM)	3+ (<10%)
LDH (U/L)	0 1+ 2+ 3+ ≥4+	1,901 (97.09) 36 (1.84) 15 (0.77) 2 (0.10) 4 (0.20)	1,545 (98.16) 29 (1.84) ND ND ND	207.97 (203.32 – 212.77) 356.83 (279.67 – 550.94) ^a N/A N/A N/A	87.21 292.1 N/A N/A N/A	0.00 148.86 N/A N/A N/A	0.0 71.6 N/A N/A N/A	± 15%	CLIA 2024	N/A
Magne- sium (mg/dL)	0 1+ 2+ 3+ ≥4+	8,842 (96.69) 228 (2.49) 62 (0.68) 8 (0.09) 5 (0.05)	8,334 (96.95) 203 (2.36) 59 (0.69) ND ND	2.00 (1.99 – 2.01) 2.05 (1.98 – 2.13) ^a 2.02 (1.92 – 2.1) N/A N/A	0.37 0.46 0.53 N/A N/A	0.00 0.05 0.02 N/A N/A	0.0 2.5 1.0 N/A N/A	± 15%	CLIA 2024	2+ (<10% or 0.29 mg/dL)

BVd, desirable biological variation; HI, hemolysis index; HI_{TD}, hemolysis index from the manufacturer's technical document; N/A, not applicable; ND, not determined

^a Statistically significant difference in biochemical level compared to hemolysis index (0), $p < 0.05$.

^b Bold values for Δ from HI (0) or % Δ from HI (0) represent detected interference greater than acceptance limit, clinically significant difference.

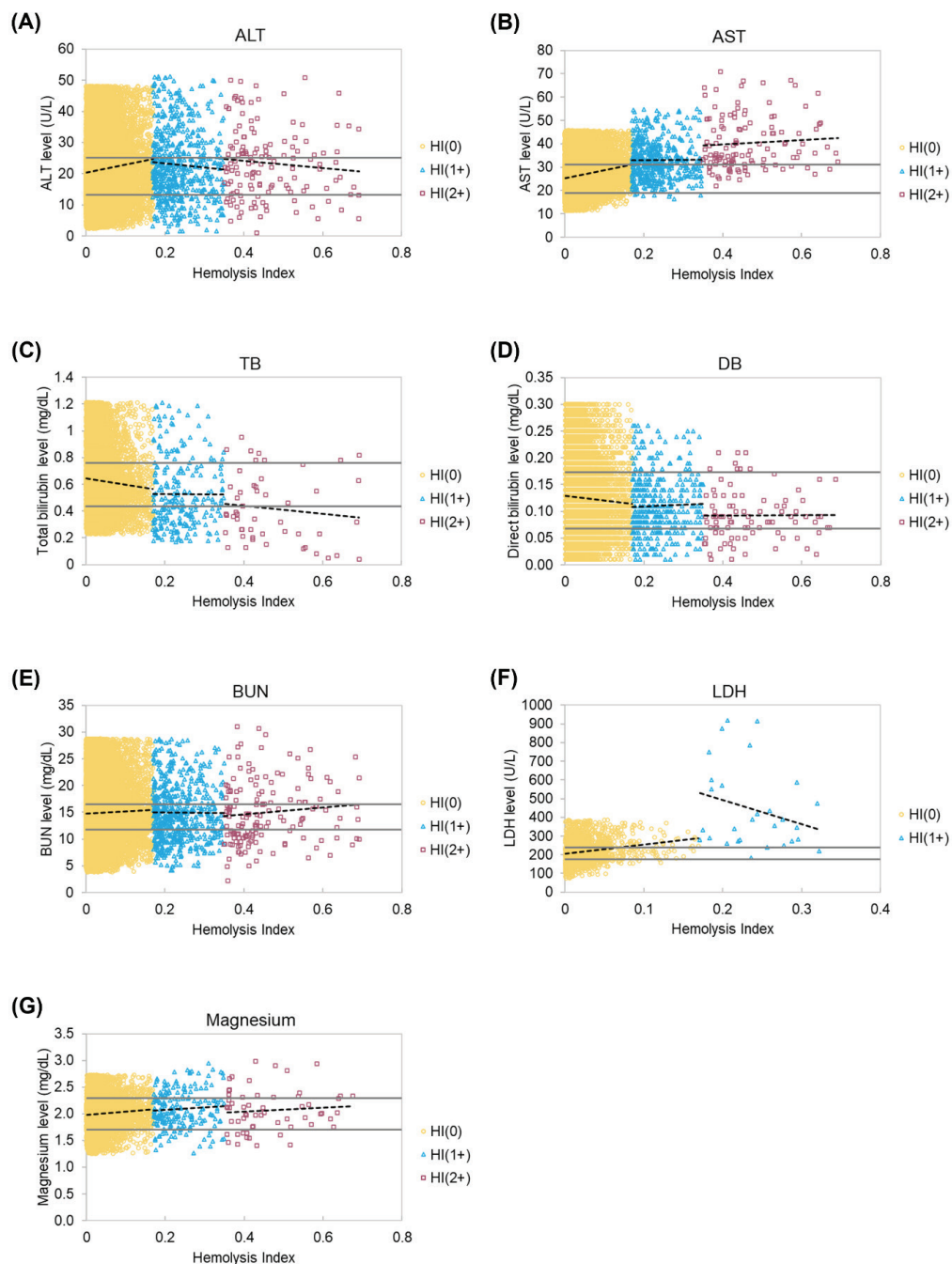


Fig. 1 Scatter plots showing the relationship between the biochemical levels and the quantitative hemolysis index (HI) of ALT (A), AST (B), TB (C), DB (D), BUN (E), LDH (F), and magnesium (G). Acceptance limits were calculated from the median biochemical level in HI (0) based on acceptance criteria. The trend lines of each group of semiquantitative HI shown as black dashed lines and the acceptance limits indicated as solid grey lines.

2. การรบกวนจากความเหลือง (icterus) ต่อการวิเคราะห์ cholesterol และ lipase

ผลการศึกษาการรบกวนจากความเหลือง (icterus) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับสารชีวเคมี แยกตามระดับ icterus index (II) เปรียบปริมาณ ดังแสดงใน Table 3 พบว่า cholesterol และ lipase มีข้อมูลเพียงพอ ($n \geq 25$) ต่อการวิเคราะห์ผลการรบกวนสูงสุดที่ระดับ II (1+) เท่านั้น โดยพบลักษณะของการรบกวนเชิงลบในการทดสอบ cholesterol แต่ไม่พบการรบกวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดสอบ lipase ที่ระดับ II (1+) ทั้งนี้พบความแตกต่างของระดับ cholesterol

ที่ระดับ II (1+) เทียบกับ II (0) อยู่ในช่วงผลการรบกวนที่ยอมรับได้ (acceptance limit) อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างค่า II เปรียบปริมาณกับระดับสารชีวเคมีแบ่งตามกลุ่มของ II เปรียบปริมาณ (Fig. 2) พบว่าระดับของ lipase มีแนวโน้มออกนอกขอบเขตการยอมรับในกลุ่ม II (1+) นอกจากนี้ระดับของ cholesterol มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นออกนอกขอบเขตการยอมรับเมื่อ II เปรียบปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่ม II (0) แต่มีแนวโน้มลดต่ำลงและออกนอกขอบเขตการยอมรับเมื่อ II เปรียบปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่ม II (1+)

Table 3 Icteric interference on two biochemical parameters determined by the Beckman Coulter AU5800 analyzer.

Analyte (unit)	II	Number of patient results (%)	Number of patient results after outlier removal (%)	Median (95% CI)	IQR	Δ from II (0)	% Δ from II (0)	Acceptance criteria	Source of acceptance criteria	II_{TD} (criteria)
Cholesterol (mg/dL)	0	30,024 (99.61)	29,339 (99.68)	176.52 (175.86 – 177.24)	59.53	0.00	0.0	± 10%	CLIA 2024	2+
	1+	95 (0.31)	94 (0.32)	163.94 (146.36 – 177.79) ^a	86.59	-12.6	-7.1			(<10%
	2+	15 (0.05)	ND	ND	N/A	N/A	N/A			or
	3+	6 (0.02)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			25.13
	≥4+	2 (0.01)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			mg/dL)
Lipase (U/L)	0	703 (87.22)	568 (90.45)	20.93 (18.79 – 22.45)	21.33	0.00	0.0	± 37.9%	BVd (Ricos)	3+
	1+	52 (6.45)	36 (5.73)	23.26 (19.39 – 36.26)	25.16	2.33	11.1			(<10%
	2+	28 (3.48)	24 (3.82)	ND	ND	N/A	N/A			or
	3+	18 (2.23)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			5.7 U/L)
	≥4+	5 (0.62)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			

BVd, desirable biological variation; II, icterus index; II_{TD} , icterus index from the manufacturer's technical document; N/A, not applicable; ND, not determined

^a Statistically significant difference in biochemical level compared to icterus index (0), $p < 0.05$.

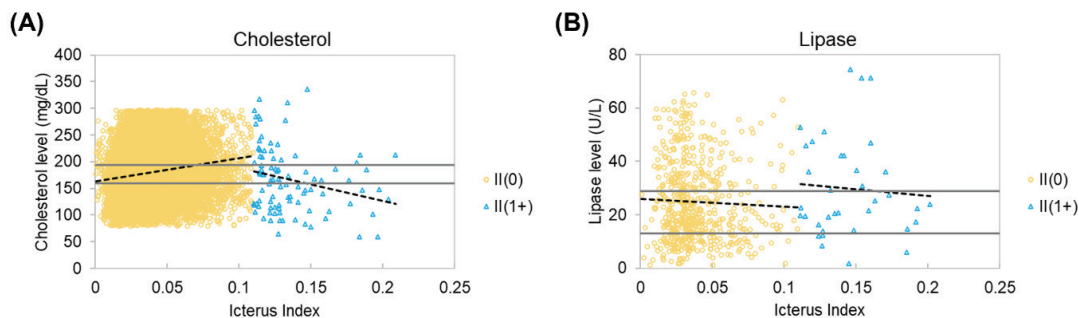


Fig. 2 Scatter plots showing the relationship between the biochemical levels and the quantitative icterus index (II) of cholesterol (A) and lipase (B). Acceptance limits were calculated from the median biochemical level in II (0) based on acceptance criteria. The trend lines of each group of semiquantitative II shown as black dashed lines and the acceptance limits indicated as solid grey lines.

3. การรบกวนจากความขุ่น (lipemia) ต่อการวิเคราะห์ ALT, AST และ lipase

ผลการศึกษาการรบกวนจากความขุ่น (lipemia) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับสารชีวเคมี แยกตามระดับ lipemia index (LI) ซึ่งถึงปริมาณ ดังแสดงใน Table 4 พบว่า ALT และ AST มีข้อมูลเพียงพอ ($n \geq 25$) ต่อการวิเคราะห์ผลการรบกวนสูงสุดที่ระดับ LI (2+) ส่วน lipase มีข้อมูลไม่เพียงพอต่อการศึกษาเปรียบเทียบการรบกวนจากความขุ่น โดยพบลักษณะของการรบกวนเชิงบวกในการทดสอบ ALT และ AST ทั้งนี้พบความแตกต่างของระดับ ALT ที่ระดับ LI (1+) และ LI (2+) อยู่ในช่วงผลการรบกวนที่ยอมรับได้ (acceptance limit) แต่ระดับของ AST ที่ระดับ LI (2+) เพิ่มสูงขึ้นกว่าเกณฑ์การยอมรับ โดยเป็นระดับการรบกวนที่ต่ำกว่าที่ผู้ผลิตระบุไว้ ในขณะที่ผลการศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างค่า LI ซึ่งปริมาณกับระดับสารชีวเคมีแบ่งตามกลุ่มของ LI ซึ่งถึงปริมาณ (Fig. 3) พบว่าระดับของ ALT มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ระดับ LI (1+) และออก

นอกขอบเขตการยอมรับที่ระดับ LI (2+) ส่วนระดับ AST มีแนวโน้มสูงขึ้นนอกขอบเขตการยอมรับตั้งแต่ช่วงกลางของระดับ HI ซึ่งคุณภาพ (1+)

4. การทำนายการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ความเหลือง (icterus) และความขุ่น (lipemia) ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีโดยใช้ตัวแบบลดถอยเชิงเส้น

ค่า HI ซึ่งปริมาณมีความสัมพันธ์เชิงเส้นเชิงบวกกับระดับ ALT, AST, BUN, LDH และ magnesium ($r = 0.015-0.384$, $p < 0.01$) แต่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นเชิงลบกับระดับ TB และ DB ($r = -0.098, -0.057$, $p < 0.001$) (Table 5) ค่า II ซึ่งปริมาณมีความสัมพันธ์เชิงเส้นเชิงบวกกับระดับ cholesterol ($r = 0.133$, $p < 0.001$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า II ซึ่งปริมาณกับระดับ lipase ($p = 0.451$) ค่า LI ซึ่งปริมาณมีความสัมพันธ์เชิงเส้นเชิงบวกกับระดับ ALT และ AST ($r = 0.068, 0.064$, $p < 0.001$)

เมื่อวิเคราะห์ด้วยแบบถดถอยเชิงเส้น (linear regression model) ระหว่างค่า HIL index เชิงปริมาณกับค่าระดับสารชีวเคมีเพื่อทำนายระดับของ HIL index และ cutoff ที่พบการรบกวนอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก (Table 5) พบว่าการทดสอบที่มีความไวต่อการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) มากที่สุด คือ LDH ที่ระดับ HI (0) cutoff 0.0393 (Fig. 4, F) รองลงมา คือ AST ที่ระดับ HI (1+) (Fig. 4, B)

ALT และ TB ที่ระดับ HI (2+) (Fig. 4, A, C) DB และ magnesium ที่ระดับ HI (3+) (Fig. 4, D, G) และ BUN ที่ระดับ HI (4+) (Fig. 4, E) การทดสอบ cholesterol พบการรบกวนจากความเหลือง (icterus) ที่ระดับ II (1+) (Fig. 4, H) การทดสอบ ALT และ AST พบการรบกวนจากความขุ่น (lipemia) ที่ระดับ LI (1+) และ LI (2+) (Fig. 4, I, J)

Table 4 Lipemic interference on three biochemical parameters determined by the Beckman Coulter AU5800 analyzer.

Analyte (unit)	LI	Number of patient results (%)	Number of patient results after outlier removal (%)	Median (95% CI)	IQR	Δ from LI (0) ^b	% Δ from LI (0)	Acceptance criteria	Source of acceptance criteria	LI _{TD} (criteria)
ALT (U/L)	0	44,060 (98.524)	36,991 (98.62)	19.03 (18.89 – 19.16)	13.64	0.00	0.0	± 6 U/L	CLIA 2024	4+
	1+	589 (1.317)	469 (1.25)	21.87 (20.67 – 23.22) ^a	17.05	2.84	14.9			(<3% or
	2+	61 (0.137)	48 (0.13)	24.74 (18.33 – 28.95) ^a	16.75	5.71	26.1			6 U/L)
	3+	9 (0.020)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			
	≥4+	1 (0.002)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			
AST (U/L)	0	39,555 (98.415)	31,557 (98.52)	24.95 (24.86 – 25.04)	9.99	0.00	0.0	± 6 U/L	CLIA 2024	4+
	1+	570 (1.418)	428 (1.34)	26.98 (26.13 – 27.86) ^a	12.27	2.03	8.1			(<5%)
	2+	58 (0.144)	46 (0.14)	33.49 (26.88 – 40.70) ^a	22.77	8.54	34.2			
	3+	8 (0.020)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			
	≥4+	1 (0.003)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			
Lipase (U/L)	0	758 (97.81)	596 (100.00)	20.93 (19.24 – 22.42)	21.54	0.00	0.0	± 37.9%	BVd (Ricos)	4+
	1+	16 (2.06)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			(<10% or
	2+	1 (0.13)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			5.7 U/L)
	3+	0 (0.00)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			
	≥4+	0 (0.00)	ND	N/A	N/A	N/A	N/A			

BVd, desirable biological variation; LI, lipemia index; LI_{TD}, lipemia index from the manufacturer's technical document; N/A, not applicable; ND, not determined

^a Statistically significant difference in biochemical level compared to lipemia index (0), $p < 0.05$.

^b Bold value for Δ from LI (0) represents detected interference greater than acceptance limit, clinically significant difference.

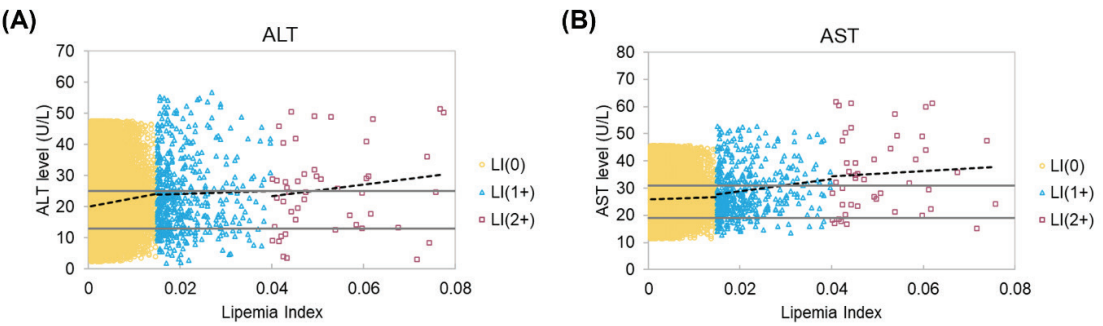


Fig. 3 Scatter plots showing the relationship between the biochemical levels and the quantitative lipemia index (LI) of ALT (A) and AST (B). Acceptance limits were calculated from the median biochemical level in LI (0) based on acceptance criteria. The trend lines of each group of semiquantitative LI shown as black dashed lines and the acceptance limits indicated as solid grey lines.

Table 5 Pearson correlation and linear regression analysis of quantitative HIL index and biochemical level.

Analyte (unit)	Quantitative HIL index	Number of patient results	Pearson correlation coefficient	p value	r ²	Mathematical relationship	HIL index cutoff for clinically significant difference	
							Semi-quantitative	Quantitative
ALT (U/L)	HI	34,713	0.059	<0.001	0.003	12.610x + 20.730	HI (2+)	0.4758
	LI	37,508	0.068	<0.001	0.005	192.566x + 20.350	LI (1+)	0.0312
AST (U/L)	HI	29,650	0.205	<0.001	0.042	32.785x + 25.231	HI (1+)	0.1830
	LI	32,031	0.064	<0.001	0.004	130.787x + 25.731	LI (2+)	0.0459
Total bilirubin (mg/dL)	HI	15,368	-0.098	<0.001	0.010	-0.470x + 0.645	HI (2+)	0.3705

Table 5 Pearson correlation and linear regression analysis of quantitative HIL index and biochemical level. (Cont.)

Analyte (unit)	Quantitative HIL index	Number of patient results	Pearson correlation coefficient	<i>p</i> value	<i>r</i> ²	Mathematical relationship	HIL index cutoff for clinically significant difference	
							Semi-quantitative	Quantitative
Direct bilirubin (mg/dL)	HI	21,501	-0.057	<0.001	0.003	-0.076x + 0.128	HI (3+)	0.7495
BUN (mg/dL)	HI	33,456	0.015	0.006	0.0002	1.603x + 14.834	HI (4+)	1.5639
Cholesterol (mg/dL)	II	29,433	0.133	<0.001	0.018	364.018x + 165.639	II (1+)	0.0455
LDH (U/L)	HI	1,574	0.384	<0.001	0.147	761.399x + 199.602	HI (0)	0.0393
Lipase (U/L)	II	604	0.031	0.451	-	No significant correlation	N/A	N/A
Magnesium (mg/dL)	HI	8,596	0.078	<0.001	0.006	0.391x + 1.984	HI (3+)	0.7611

HI, hemolysis index; II, icterus index; LI, lipemia index; N/A, not applicable

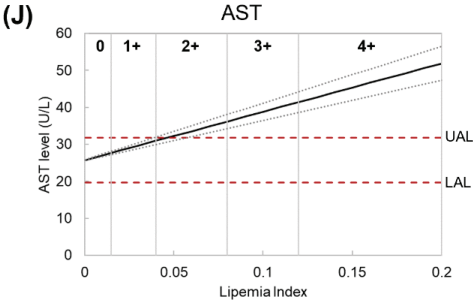
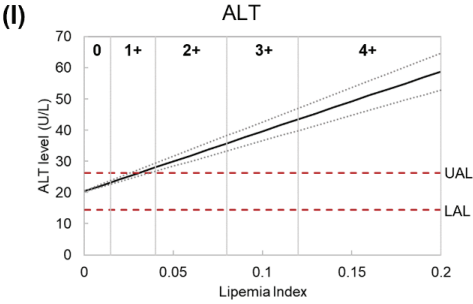
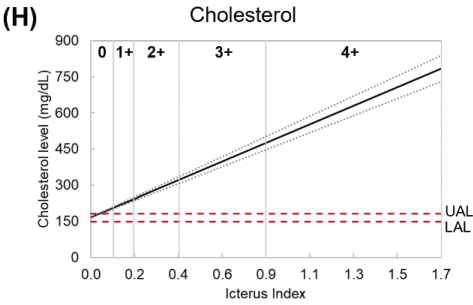
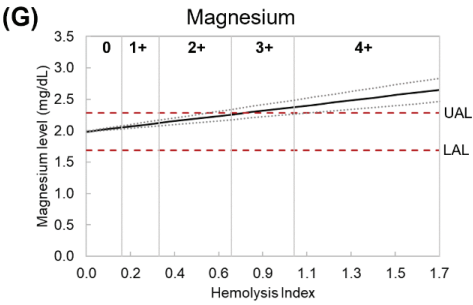
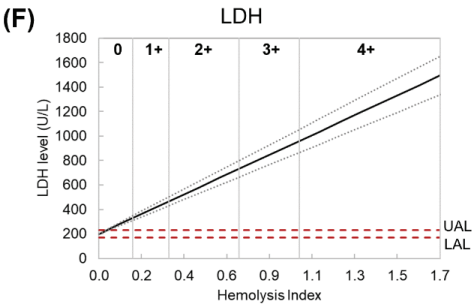
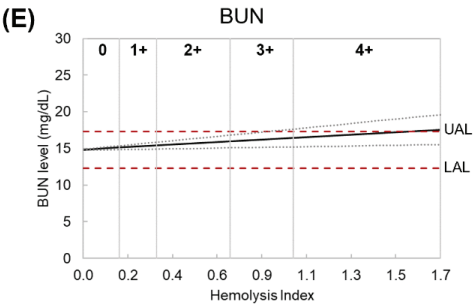
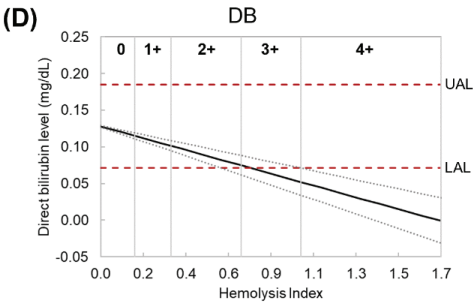
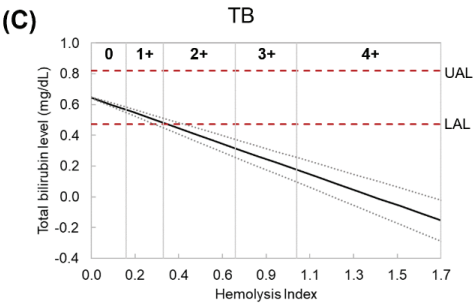
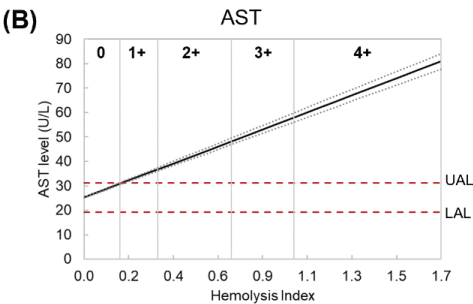
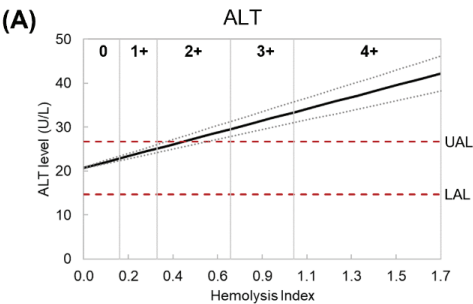


Fig. 4 Linear regression analysis of the biochemical levels and the quantitative serum indices. Hemolysis index (HI); ALT (A), AST (B), TB (C), DB (D), BUN (E), LDH (F), and magnesium (G). Icterus index (II); cholesterol (H). Lipemia index (LI); ALT (I) and AST (J). Solid black lines show linear regression lines with a 95% confidence interval (dashed lines). Acceptance limits were calculated from the constant of the linear regression model based on acceptance criteria. The upper acceptance limit (UAL) and lower acceptance limit (LAL) were indicated as red dashed lines.

Table 6 Hemolysis and lipemic interference thresholds comparing HIL index obtained from the manufacturer and HIL index determined in this study for seven biochemical parameters determined by the Beckman Coulter AU5800 analyzer.

Analyte (unit)	HIL index	HIL index thresholds from manufacturer		HIL index thresholds for clinically significant difference	
		Semi-quantitative	Acceptance	Semi-quantitative	Acceptance
		HIL index	criteria	HIL index	criteria
ALT (U/L)	HI	4+	<10% or 6 U/L	2+ ^b	<6 U/L
	LI	4+	<3% or 6 U/L	1+ ^b	
AST (U/L)	HI	N/A	N/A	1+ ^a	<6 U/L
	LI	4+	<5%	2+ ^a	
Total bilirubin (mg/dL)	HI	1+	<10%	2+ ^a	<27%
Direct bilirubin (mg/dL)	HI	N/A	N/A	3+ ^b	<44.5%
BUN (mg/dL)	HI	3+	<10%	4+ ^b	<16.9%
LDH (U/L)	HI	N/A	N/A	0 ^b	<15%
Magnesium (mg/dL)	HI	2+	<10% or 0.29 mg/dL	3+ ^b	<15%

HI, hemolysis index; II, icterus index; LI, lipemia index; N/A, not applicable

^a Clinically significant difference in biochemical level compared to HIL index (0)

^b Clinically significant difference in biochemical level predicted by the linear regression model

วิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการประเมินผลกระทบจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ความเหลืองและความขุ่น ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด จำนวน 9 รายการทดสอบ ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิก Beckman Coulter AU5800 โดยใช้ฐานข้อมูลจากการประเมิน HIL index และผลตรวจระดับสารชีวเคมีในงานประจำวันเป็นเวลา 7 เดือน พบว่าสิ่งส่งตรวจที่มีระดับ HIL index ตั้งแต่ (3+) ขึ้นไป ได้แก่ hemolysis index (hemoglobin > 200 mg/dL), icterus index (bilirubin > 10 mg/dL) และ lipemia index (Intralipid > 200 mg/dL) มีเพียงร้อยละ 0.3, 2.9 และ 0.02 ตามลำดับ (Table 2-4) ซึ่งไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ทางสถิติ จึงไม่สามารถประเมินผลการรบกวนจาก HIL ที่ระดับมากกว่า (2+) ได้ อย่างไรก็ตามอัตราการพบดังกล่าวสะท้อนถึงการจัดการในขั้นตอนก่อนการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้มาซึ่งสิ่งส่งตรวจที่มีคุณภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง พบโดยเฉลี่ยน้อยกว่าร้อยละ 3 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการประเมินสิ่งส่งตรวจที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยระดับตติยภูมิในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2565 ที่พบร้อยละ 3.84⁽²³⁾

การศึกษานี้นำเสนอรูปแบบการประเมินผลกระทบจาก HIL อีกรูปแบบหนึ่ง นอกเหนือจากแนวทางที่แนะนำโดย CLSI⁽¹²⁾ อย่างไรก็ตามวิธีการเตรียมสารละลายเม็ดเลือดแดง เพื่อใช้ในการประเมินการรบกวนการตรวจวิเคราะห์จากการแตกของเม็ดเลือดแดง มีความหลากหลายและอาจส่งผลต่อระดับการรบกวนการวิเคราะห์สารชีวเคมีที่แตกต่างกันในแต่ละวิธี⁽⁴⁾ จากผลการศึกษาในครั้งนี้

พบว่า การรบกวนที่เกิดจากสารชีวเคมีที่มีความเข้มข้นสูงภายในเม็ดเลือดแดง ได้แก่ LDH และ AST ส่งผลต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีนั้นอย่างมาก เมื่อเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง ในสิ่งส่งตรวจ โดยพบการรบกวนตั้งแต่ระดับ HI (0) ถึง HI (1+) หรือที่ระดับฮีโมโกลบินน้อยกว่า 100 mg/dL ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกันในหลายการศึกษา แม้ว่า จะใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ น้ำยาตรวจวิเคราะห์ และวิธีการประเมิน HIL index ที่แตกต่างกันในแต่ละผู้ผลิตก็ตาม^(15, 22-26) โดยพบว่าการวิเคราะห์ LDH มีความไวต่อการถูกรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง มากที่สุด ที่ระดับ HI (1+) เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับ LDH ที่ระดับ HI (0) แต่หากพิจารณาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของระดับ LDH ที่ระดับ HI (0) ร่วมกับผลการทำนายโดยใช้ตัวแบบถดถอยเชิงเส้น พบว่าการวิเคราะห์ LDH ถูกรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ตั้งแต่ระดับ HI (0) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทดสอบการรบกวนโดยใช้สารละลายเม็ดเลือดแดง ที่ระดับฮีโมโกลบิน 25-27 mg/dL ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter โดยให้ผลการวิเคราะห์ LDH เปลี่ยนแปลงไปร้อยละ 18.3-21.1^(15, 24) ดังนั้นค่า cutoff จากผู้ผลิตที่ 0.1700 สำหรับประเมิน hemolysis index ที่ระดับ HI (1+) อาจมีความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ระบุระดับที่มีการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ในการวิเคราะห์ LDH ซึ่งผลการทำนายการรบกวนโดยใช้ตัวแบบถดถอยเชิงเส้นจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า cutoff ที่พบการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง เกินเกณฑ์การยอมรับในการทดสอบ LDH เท่ากับ 0.0393 (Table 5) นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง

ระดับสารชีวเคมีในการวิเคราะห์ ALT, BUN และ magnesium ไม่พบการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ที่ระดับน้อยกว่าหรือเท่ากับ HI (2+) ซึ่งผลจากการศึกษาอื่น ๆ ได้สนับสนุนการพบการรบกวนที่ระดับสูงกว่า คือ พบการรบกวนการวิเคราะห์ ALT ที่ระดับ HI (3+)^(15, 24) BUN ที่ระดับมากกว่า HI (3+)^(15, 24) และ magnesium ที่ระดับมากกว่า HI (4+)^(15, 23)

การแตกของเม็ดเลือดแดง ที่ระดับ HI (2+) ส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ TB โดยมีค่าระดับสารชีวเคมีลดลงถึงร้อยละ 38 แต่ไม่พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก (> 44.5%) ต่อการวิเคราะห์ DB ที่ระดับเดียวกันนี้ ซึ่งให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาผลของการแตกของเม็ดเลือดแดง ต่อการวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่น AU480 และ AU2700 โดยใช้วิธีเตรียมสารละลายเม็ดเลือดแดงด้วยวิธีเค้นเฉือน (shear stress) โดยการดูดเลือดผ่านเข็มฉีดยาด้วยความเร็ว และวิธีการแช่แข็งและละลายอย่างรวดเร็ว (rapid freeze-thaw) พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ TB ลดลงจากระดับเริ่มต้นมากกว่าร้อยละ 30 ที่ระดับ HI (2+) (ความเข้มข้นฮีโมโกลบิน 100-199 mg/dL)^(23, 24) และพบการเปลี่ยนแปลงของระดับ DB ลดลงจากระดับเริ่มต้นมากกว่าร้อยละ 44.5 ที่ระดับ HI (4+) (ความเข้มข้นฮีโมโกลบิน 300-499 mg/dL)⁽²³⁾ การรบกวนนี้อาจเป็นผลจาก pseudoperoxidase activity ของฮีโมโกลบินที่รบกวนปฏิกิริยา diazotization ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ โดยไปทำลาย azobilirubin ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) จึงทำให้ตรวจวัดบิลิรูบินได้ค่าต่ำลง⁽²⁷⁾ แต่จากผลการศึกษาผลกระทบจากการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยใช้สารละลายฮีโมโกลบินที่เตรียมจากฮีโมโกลบินบริสุทธิ์

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับ TB (เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 10.9) และ DB (เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 18.4) จนถึงระดับ HI (5+)⁽¹³⁾

การรบกวนการวิเคราะห์จากความเหลืองเนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างบิลิรูบินและ hydrogen peroxide ซึ่งเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาการวิเคราะห์สารชีวเคมี เช่น การวิเคราะห์ cholesterol และ lipase โดยจะส่งผลให้ค่าระดับสารชีวเคมีที่วิเคราะห์ได้มีค่าลดลง ดังเช่นผลการศึกษาของ Akbas และคณะ⁽¹⁵⁾ โดยพบระดับของ cholesterol และ lipase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก ที่ระดับ II (3+) และ II (4+) แต่ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ ไม่พบการรบกวนจากความเหลือง ต่อการวิเคราะห์สารดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ II (1+) และยังไม่พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนและสอดคล้องกันเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของ II เจริญปริมาณ ซึ่งอาจเป็นผลจากข้อจำกัดของปริมาณข้อมูลที่สามารถวิเคราะห์ได้มีเพียง 2 ระดับ และระดับที่ II (1+) มีจำนวนตัวอย่างน้อยซึ่งส่งผลต่อความกว้างของ IQR และความแม่นยำในการประเมิน outlier ด้วยวิธีของ Tukey⁽²⁸⁾

การรบกวนการกระเจิงแสง ของความขุ่นจากไลโปโปรตีน (lipemia) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวิเคราะห์ด้วย UV เช่น การวิเคราะห์เอนไซม์ ALT และ AST จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์เพิ่มขึ้นร้อยละ 26.1-34.2 ที่ระดับ LI (2+) เปรียบเทียบกับการศึกษาผลของความขุ่น ต่อการวิเคราะห์ระดับสารชีวเคมีโดยใช้ Intralipid ซึ่งเป็นสารละลายอิมัลชันไขมันสังเคราะห์ และเป็นสารที่ทางผู้ผลิตใช้ทดสอบการรบกวนการวิเคราะห์จากความขุ่น พบว่า

ระดับของเอนไซม์ ALT และ AST เปลี่ยนแปลงไปมากกว่าร้อยละ 24.2-35.6 ที่ระดับ LI (2+) ถึง LI (3+)⁽¹⁵⁾ อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับแนวโน้มความไม่สอดคล้องกันของผลการรบกวนระหว่างการศึกษโดยใช้ไขมันตามธรรมชาติ (endogenous lipid) กับ Intralipid หรือสารละลายอิมัลชันไขมันอื่น เนื่องจากองค์ประกอบที่แตกต่างกันระหว่างสารละลายอิมัลชันไขมันสังเคราะห์กับไขมันตามธรรมชาติที่พบในสิ่งส่งตรวจ ซึ่งประกอบด้วยไลโปโปรตีนหลายชนิดที่มีขนาดแตกต่างกัน รวมถึงยังมีจำนวนที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล จึงแนะนำให้ใช้ไขมันตามธรรมชาติ (endogenous lipid) ในการประเมินผลกระทบจากความขุ่น⁽²⁹⁾ ทั้งนี้การศึกษาในครั้งนี้ประเมินผลการรบกวนการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีโดยใช้ลักษณะตามธรรมชาติของสิ่งส่งตรวจที่มีความขุ่น ด้วยการประเมินจากค่า lipemia index เพียงอย่างเดียว โดยไม่ได้ประเมินระดับของไตรกลีเซอไรด์ร่วมด้วย

การใช้ตัวแบบลดรอยเชิงเส้นเพื่อทำนายระดับที่มีการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดงและความขุ่นนั้น พบว่า รายการทดสอบส่วนใหญ่ให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับสารชีวเคมีในการศึกษาครั้งนี้และการศึกษาก่อนหน้า^(13, 15, 23, 24) ซึ่งศึกษาด้วยวิธีการเติมสารรบกวนตามแนวทางที่ CLSI แนะนำ โดยมีความแตกต่างของระดับ HIL index ไม่เกิน 1 ระดับ ยกเว้นการศึกษาการรบกวนจากความเหลืองต่อการวิเคราะห์ cholesterol เนื่องด้วยเหตุผลด้านข้อจำกัดดังที่ได้กล่าวไปแล้ว ทั้งนี้ระดับที่พบการรบกวนจาก HIL นั้นอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา รวมถึงแตกต่างจากผู้ผลิตระบุไว้ เนื่องจากขั้นตอนและวิธีที่ใช้ในการศึกษา ความเข้มข้นของสารรบกวนที่นำมาทดสอบ และเกณฑ์การยอมรับการรบกวนที่แตกต่างกัน

จากการเปรียบเทียบระดับของ HIL index ที่ส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์และเกณฑ์การยอมรับการรบกวนระหว่างข้อมูลจากผู้ผลิตกับผลการศึกษาในครั้งนี้ (Table 6) พบว่าการแตกของเม็ดเลือดแดงส่งผลต่อค่าการวิเคราะห์ LDH และ AST เจิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกที่ระดับ HI (0) และ HI (1+) ซึ่งเป็นระดับที่พบการแตกของเม็ดเลือดแดงเพียงเล็กน้อย ส่วนการวิเคราะห์ DB ได้รับผลกระทบเชิงลบจากการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ระดับ HI (3+) โดยที่ทั้ง 3 รายการทดสอบไม่มีข้อมูลผลกระทบของการแตกของเม็ดเลือดแดงจากผู้ผลิต นอกจากนี้การแตกของเม็ดเลือดแดงและความขุ่นส่งผลต่อค่าการวิเคราะห์ ALT และ AST ที่ระดับต่ำกว่าที่ผู้ผลิตระบุไว้ 2-3 ระดับ แม้ว่าการศึกษานี้จะใช้เกณฑ์การยอมรับที่กว้างกว่าหรือเท่ากับผู้ผลิตก็ตาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาผลกระทบจากความขุ่น ในการทดสอบ ALT และ AST ซึ่งทางผู้ผลิตรายงานระดับการรบกวนที่ LI (4+) ที่เกณฑ์การยอมรับการรบกวนร้อยละ 3-5 ในขณะที่การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงของระดับสารชีวเคมีร้อยละ 8-14 ที่ระดับ LI (1+) ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเป็นผลจากสารรบกวน Intralipid ที่ผู้ผลิตนำมาใช้ทดสอบผลกระทบจากความขุ่น สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lim และคณะ⁽¹³⁾ ซึ่งใช้สาร Intralipid ในการศึกษาการรบกวนการวิเคราะห์ ALT และ AST ด้วยเครื่องวิเคราะห์รุ่นเดียวกันนี้ โดยพบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ดังกล่าวน้อยกว่าร้อยละ 9.7 และ 6.2 ที่ระดับ HI (5+) สำหรับผลของการแตกของเม็ดเลือดแดง ต่อการวิเคราะห์ TB, BUN และ magnesium พบผลกระทบที่ระดับ HI สูงกว่าที่ผู้ผลิตระบุไว้ ทั้งนี้เนื่องจากเกณฑ์การยอมรับการรบกวนของการศึกษานี้ที่กำหนดโดยใช้ค่า allowable total analytical error (TEa)

ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละสารชีวเคมีและมีเกณฑ์ที่กว้างกว่าของผู้ผลิตซึ่งนิยมใช้เกณฑ์การยอมรับการรบกวนเดียวกันที่ร้อยละ 10

ข้อจำกัดของการศึกษานี้ คือ การศึกษาโดยใช้ฐานข้อมูลของการประเมิน HIL ในสิ่งส่งตรวจในงานประจำวันส่งผลให้ขนาดของตัวอย่างที่มีผล HIL index ตั้งแต่ระดับ (3+) ขึ้นไป มีจำนวนไม่เพียงพอ จึงไม่สามารถศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบ HIL ต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือดได้ครบทุกระดับ รวมถึงยังไม่ครอบคลุมทุกรายการทดสอบในงานประจำวันและเป็นการศึกษาผลกระทบของระดับสารชีวเคมีในระดับปกติ (normal level) เพียงระดับเดียว ทั้งนี้การเพิ่มระยะเวลาการศึกษาอาจช่วยให้มีข้อมูลที่ครอบคลุมหลายระดับมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาผลกระทบของ HIL ต่อระดับสารชีวเคมีที่ระดับผิดปกติ (pathogenic level) ที่เป็นค่าสูงจะได้รับผลกระทบจากการรบกวนที่ระดับ HIL index เดียวกันกับผลกระทบที่พบในระดับสารชีวเคมีปกติ (normal level) หรือในระดับ HIL index ที่สูงกว่า^(13, 23)

สรุป

การประเมิน HIL ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิกเป็นวิธีประเมินสิ่งส่งตรวจที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน การศึกษานี้นำเสนอผลประเมินการรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ความเหลือง และความขุ่นต่อการวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter AU5800 และนำเสนอรูปแบบการประเมินผลกระทบจาก HIL อีกรูปแบบหนึ่ง ซึ่งสามารถนำไปปรับใช้ในการประเมินผลกระทบจาก HIL ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิกอื่น ๆ ในห้องปฏิบัติการได้ อย่างไรก็ตามเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

ทางเคมีคลินิกของแต่ละบริษัทอาจมีความแตกต่างในการวิเคราะห์ HIL index เกณฑ์หรือ cutoff limit รวมถึงการแปลผล ซึ่งผู้ใช้จะต้องศึกษาคู่มือการใช้งานของแต่ละเครื่องประกอบด้วย นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการควรประเมิน และกำหนดระดับค่า cutoff ที่เหมาะสมของ HIL index เพื่อประโยชน์ในการตัดสินใจดำเนินการกับสิ่งส่งตรวจ การปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ หรือการระบุความเห็นไปพร้อมกับผลการวิเคราะห์ เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับความปลอดภัยสูงสุดจากผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่อนุญาตให้ใช้ข้อมูลในการทำวิจัย และขอบพระคุณหัวหน้างานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ และหัวหน้าหน่วยเคมีคลินิก ที่อนุญาตและให้ความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Chawla R, Goswami B, Tayal D, Mallika V. Identification of the types of preanalytical errors in the clinical chemistry laboratory: 1-year study at G.B. Pant Hospital. Lab Med 2010; 41: 89-92.
2. Ryder K, Glick M and Glick S. Incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from outpatients. Lab Med 1991; 22: 415-8.
3. Kroll MH, McCudden CR. Endogenous interferences in clinical laboratory tests: icteric, lipemic and turbid samples. Berlin: De Gruyter; 2012.

4. Marques-Garcia F. Methods for hemolysis interference study in laboratory medicine - a critical review. *eJIFCC* 2020; 31: 85-97.
5. Farrell CJ, Carter AC. Serum indices: managing assay interference. *Ann Clin Biochem*. 2016; 53: 527-38.
6. Dimeski G, Mollee P, Carter A. Effects of hyperlipidemia on plasma sodium, potassium, and chloride measurements by an indirect ion-selective electrode measuring system. *Clin Chem* 2006; 52: 155-6.
7. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, Woods JR. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. *Clin Chem* 1989; 35: 837-9.
8. Lippi G, Cadamuro J. Visual assessment of sample quality: quo usque tandem?. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 513-5.
9. Simundic AM, Nikolac N, Ivankovic V, *et al*. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye?. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1361-5.
10. Getahun T, Alemu A, Mulugeta F, *et al*. Evaluation of visual serum indices measurements and potential false result risks in routine clinical chemistry tests in Addis Ababa, Ethiopia. *eJIFCC* 2019; 30: 276-87.
11. von Meyer A, Cadamuro J, Lippi G, Simundic AM. Call for more transparency in manufacturers declarations on serum indices: On behalf of the Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). *Clin Chim Acta* 2018; 484: 328-32.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Hemolysis, icterus, and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis; approved guideline. C56-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
13. Lim YK, Young JC. Proposal of modified HIL-indices for determining hemolysis, icterus and lipemia interference on the Beckman Coulter AU5800 automated platform. *Lab Med Online* 2017; 7: 66-72.
14. Aslan B, Stemp J, Catomeris P, Allen L, Kerekes R, Gun-Munro J. Clinical chemistry sample interferences reporting patterns in Ontario laboratories (abstract). *Clin Chem* 2012; 58: A23-4.
15. Akbas N, Eppert B, Miller J, Schulten C, Wallace C, Turner T. Effect of hemolysis, icterus and lipemia on chemistry tests and association between the amount of interfering substances and LIH indices. Medpace Reference Laboratories, Cincinnati, OH; 2018 [cited 2024 Feb 5].

- Available from: <https://www.medpace.com/wp-content/uploads/2018/08/White-paper-LIH.pdf>
16. Beckman Coulter Inc. LIH setting sheet (technical document). Brea (CA): Beckman Coulter Inc, 2022 [cited 2024 Feb 5]. Available from: https://www.beckmancoulter.com/download/file/phx-BSOSR6X16604-EN_US/BSOSR6X16604?type=pdf
 17. Box GEP, Cox DR. An analysis of transformations. J R Stat Soc 1964; B26: 211-52.
 18. Horn PS, Feng L, Li Y, Pesce AJ. Effect of outliers and nonhealthy individuals on reference interval estimation. Clin Chem 2001; 47: 2137-45.
 19. Jenkins DG, Quintana-Ascencio PF. A solution to minimum sample size for regressions. PLoS One 2020; 15: e0229345.
 20. Aarsand AK, Fernandez-Calle P, Webster C, *et al.* The EFLM Biological Variation Database [cited 2024 Jan 14]. Available from: <https://biologicalvariation.eu/>
 21. Ricós C, Alvarez V, Cava F, *et al.* Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest. 1999; 59: 491-500 [cited 2024 Feb 5]. Updated database available from: <https://www.westgard.com/clia-a-quality/quality-requirements/238-biodatabase1.html>
 22. Tian G, Wu Y, Jin X, *et al.* The incidence rate and influence factors of hemolysis, lipemia, icterus in fasting serum biochemistry specimens. PLoS One 2022; 17: e0262748.
 23. Perović A, Dolčić M. Influence of hemolysis on clinical chemistry parameters determined with Beckman Coulter tests - detection of clinically significant interference. Scand J Clin Lab Invest 2019; 79: 154-9.
 24. Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. Biochem Med 2011; 21: 79-85.
 25. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 311-6.
 26. Ho CKM, Chen C, Setoh JWS, Yap WWT, Hawkins RCW. Optimization of hemolysis, icterus and lipemia interference thresholds for 35 clinical chemistry assays. Pract Lab Med 2021; 25: e00232.
 27. Shull B, Lees H, Li P. Mechanism of interference by hemoglobin in the determination of total bilirubin. I. Method of Malloy-Evelyn. Clin Chem 1980; 26: 22-5.

28. Dawson R. How significant is a boxplot outlier?. J Stat Educ 2011; 19.
29. Fernández-Prendes C, Castro-Castro MJ, Jiménez-Añón L, Morales-Indiano C, Martínez-Bujidos M. Discrepancies in lipemia interference between endogenous lipemic samples and Smoflipid[®]-supplemented samples. eJIFCC 2023; 34: 27-41.

Performance Evaluation of Automated Fecal Analyzer FA280

Anuchin Najermploy^{1*}, Rujanan Kachenchat¹, Chenchira Charoenchai¹
and Prasong Khaenam^{2*}

¹*Diagnostic Microscopy Unit, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand*

²*Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakhon Pathom Province, Thailand*

Abstract

Automated fecal analyzers have been employed in many laboratories in Thailand due to advances in artificial technology, the advancement of concentration technique, and the need to lean laboratory process while maintaining testing efficiency. However, the laboratory must evaluate the performance of the fecal analyzer before implementation. This study evaluated the effectiveness of automated fecal analyzer ORIENTER FA280 in terms of process reduction of processing steps, and performance for red blood cells, white blood cells, yeast cells, and occult blood test. A total of 300 samples were collected for the comparison between ORIENTER FA280 and normal saline simple smear. For occult blood test, 61 samples were used for comparison with Rapid Fecal Occult Blood Test Card (Boson Biotech). The results demonstrated that the utilization of the ORIENTER FA280 could minimize the specimen processing from 8 to 3 steps. The Cohen's kappa agreement for red blood cells, white blood cells, and yeast cells ranged between 0.37 and 0.45 when compared to normal saline simple smear technique, indicating moderate agreement. This is owing to the enhanced detection intensity of ORIENTER FA280. Nonetheless, the difference was only one level higher, which was acceptable for qualitative detection. The agreement between ORIENTER FA280 and simple smear technique for parasite identification, as well as the agreement between ORIENTER FA280 and Boson Biotech for occult blood test, were almost comparative (Cohen's kappa agreement scores were 0.82 and 0.93, respectively). On the other hand, ORIENTER FA280 provided better performance for larva and protozoa identification. In conclusion, the automated fecal analyzer ORIENTER FA280

*Corresponding author E-mail address: anucna@kku.ac.th, prasong.kha@mahidol.ac.th

demonstrated several advantages both for process reduction as well as fecal sediment examination. Still, to get the most out of this technology, continuous verification should be performed by the laboratory.

Keywords: Stool examination, Fecal analyzer, Performance evaluation, Occult blood test

การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องอัตโนมัติ FA280 ในการตรวจอุจจาระ

อนุชิน นาเจิมพลอย^{1*} รุจน์ันท์ คะเชนทร์ชาติ¹ เจนจิรา เจริญชัย¹ และ ประสงค์ แคน้ำ^{2*}

¹หน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

²คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

บทคัดย่อ

เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติเป็นเครื่องมือที่เริ่มมีการใช้งานในห้องปฏิบัติการในประเทศไทย เนื่องจากการพัฒนาด้านเทคโนโลยีปัญญาประดิษฐ์ การใช้เทคนิคการตรวจแบบเข้มข้นและมีขั้นตอนอัตโนมัติจะช่วยลดการใช้ทรัพยากรบุคคลและเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยได้ ห้องปฏิบัติการจึงควรประเมินประสิทธิภาพของเครื่องก่อนนำมาใช้งาน โดยการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดำเนินการ และความสามารถในการตรวจตะกอนอุจจาระของเครื่อง ORIENTER รุ่น FA280 เทียบกับวิธี normal saline simple smear ในตัวอย่าง 300 ราย ที่เข้ารับบริการที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และตัวอย่าง 61 รายจากกลุ่มนี้ใช้ในการตรวจเลือดแฝงเทียบกับชุดทดสอบของบริษัท Boson Biotech ผลการศึกษาพบว่าเครื่อง ORIENTER รุ่น FA280 สามารถลดขั้นตอนการทดสอบ 2 ขั้นตอนได้จาก 8 ขั้นตอนเหลือ 3 ขั้นตอน โดยเฉพาะขั้นตอนการจัดการตัวอย่าง ส่วนการแยกชนิดสิ่งที่พบในตะกอนอุจจาระพบว่าเครื่อง ORIENTER รุ่น FA280 ให้ความแรงของความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และยีสต์มากกว่าวิธี simple smear เล็กน้อย (Cohen's kappa อยู่ระหว่าง 0.37-0.45) แต่เนื่องจากมีความแตกต่างเพียง 1 ระดับจึงถือว่าเป็นความแตกต่างที่ยอมรับได้ สำหรับการตรวจวินิจฉัยปรสิตและการตรวจหาเลือดแฝงพบว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันสูง (Cohen's kappa = 0.82 และ 0.93 ตามลำดับ) แต่เครื่อง ORIENTER รุ่น FA280 จะมีโอกาสตรวจหาตัวอ่อนของหนอนพยาธิและโปรโตซัวได้ดีกว่า โดยสรุปเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปฏิบัติงานได้ อย่างไรก็ตาม ห้องปฏิบัติการควรทำการประเมินอย่างต่อเนื่องระหว่างการใช้งาน เพื่อให้สามารถใช้งานเครื่องให้ได้ประโยชน์สูงสุด

คำสำคัญ: การตรวจวิเคราะห์อุจจาระ เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ การประเมินประสิทธิภาพ การตรวจเลือดแฝงในอุจจาระ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: anucna@kku.ac.th, prasang.kha@mahidol.ac.th

รับบทความ: 4 มกราคม 2567

แก้ไขบทความ: 21 มีนาคม 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 27 มีนาคม 2567

บทนำ

ปัจจุบันแม้จะมีการพัฒนาทางด้านเศรษฐกิจและสังคมไปค่อนข้างมากแล้ว แต่การติดเชื้อปรสิตยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่มีความสำคัญของไทย โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ^(1, 2) ซึ่งมีลักษณะทางภูมิศาสตร์และวัฒนธรรมที่เอื้อต่อการติดเชื้อปรสิต ซึ่งจากการสำรวจในประชากรจังหวัดสกลนคร พบว่าการติดเชื้อสามารถพบได้ตั้งแต่วัยเด็ก⁽³⁾ นอกจากนี้การติดเชื้อยังอาจมาจากการย้ายถิ่นฐาน เช่น จากแรงงานต่างด้าว⁽⁴⁾ ดังนั้นในงานประจำวันจึงมีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อปรสิตในตัวอย่างอุจจาระตามวัตถุประสงค์ต่าง ๆ ได้แก่ การตรวจสุขภาพประจำปี การตรวจวินิจฉัยในรายที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อปรสิต การวางแผนการรักษาในโรคหรือสภาวะอื่น ๆ เช่น การเตรียมการปลูกถ่ายอวัยวะ เป็นต้น การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐานคือ normal saline simple smear technique เป็นวิธีหลักที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากทำได้ง่าย ประหยัดและมีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลานาน และต้องจัดสรรบุคลากรที่มีทักษะความชำนาญเข้ามาปฏิบัติงาน จึงอาจไม่เหมาะกับโรงพยาบาลขนาดใหญ่ หรือมีการส่งตรวจอุจจาระจำนวนมาก โดยเฉพาะในช่วงเวลาเร่งด่วน ดังนั้นการใช้เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติที่สามารถตรวจตัวอย่างได้ครอบคลุม ตั้งแต่ลักษณะทางกายภาพ เคมี ตลอดจนการวินิจฉัยชนิดของปรสิตในตัวอย่าง ก็จะทำให้ห้องปฏิบัติการลดปัญหาต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นได้

การศึกษาโดย Lee และคณะ⁽⁵⁾ พบว่าเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ Automatic Vision-Based Examination System (AVE-562) เพื่อวินิจฉัยพยาธิ *Clonorchis sinensis* สามารถรายงานผล 5 ตัวอย่างได้ภายใน 27 นาที ในขณะที่เทคนิค formalin-ether concentration technique

(FECT) ใช้เวลาถึง 58 นาที อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยด้วยเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติมีความถูกต้องเพียงร้อยละ 66.7 และมีความไวเพียงร้อยละ 36.4 เมื่อเทียบกับวิธี formalin-ether concentration technique

Intra และคณะ⁽⁶⁾ พบว่า การใช้เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ sediMAX ช่วยเพิ่มความสะดวกในการปฏิบัติงาน มีความไวและความจำเพาะถึงร้อยละ 100 อย่างไรก็ตามในการรายงานผลจะต้องให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทบทวนภาพที่บันทึกได้ และทำการวินิจฉัยชนิดของปรสิตที่ตรวจพบ

ณัฐวิญญ์ ชุมสาย และภานุพงษ์ สหายสุข⁽⁷⁾ ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อปรสิตอย่างง่าย และวิธีตรวจด้วยเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระกึ่งอัตโนมัติรุ่น Sciendox 50 ผลการศึกษาพบปรสิต 18/150 ราย เมื่อตรวจด้วยเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระกึ่งอัตโนมัติ ในขณะที่การตรวจด้วยวิธีอย่างง่ายพบปรสิตเพียง 7/150 ราย อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีตัวอย่างเชื้อปรสิตจำนวนน้อย จึงอาจมีข้อจำกัดในการประเมินประสิทธิภาพ

จากตัวอย่างของการพัฒนาเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติทั้ง 3 รุ่น พบว่ายังมีข้อจำกัดที่ต้องมีนักเทคนิคการแพทย์มาช่วยทบทวนภาพและรายงานผล หากมีการใช้เทคโนโลยี artificial intelligence (AI) มาช่วยในขั้นตอนวินิจฉัยชนิดของเชื้อปรสิต และมีการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น ก็จะทำให้ได้ผลการประเมินความสามารถของเครื่องตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมยิ่งขึ้น เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 ซึ่งใช้หลักการ cuvette-based เช่นเดียวกับเครื่อง sediMAX แต่มีการบันทึกภาพจำนวนมากกว่าคือ 104 ภาพที่กำลังขยาย 10× และ 22 ภาพที่กำลัง

ขยาย 40× โดยมีพารามิเตอร์ที่ทำการประเมิน ได้แก่ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ยีสต์ และปรสิต โดยเป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการตรวจหาปรสิตด้วย AI และวิธี FECT ซึ่งพบว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันสูง⁽⁸⁾

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องวิเคราะห์ตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 ในการตรวจอุจจาระในงานประจำวัน ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่ขั้นตอนการตรวจลักษณะ สี การตรวจเลือดแฝง และการวินิจฉัยปรสิตในตะกอนอุจจาระ ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์กับห้องปฏิบัติการในประเทศไทย เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของการนำเครื่องวิเคราะห์ตะกอนอุจจาระอัตโนมัติมาทดแทนวิธีมาตรฐานที่ใช้เป็นหลักในงานประจำวัน

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เก็บตัวอย่างอุจจาระที่ส่งตรวจที่หน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธี normal saline simple smear technique และเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 จำนวน 300 ตัวอย่างที่ส่งตรวจระหว่างวันที่ 1-31 พฤษภาคม 2565 โดยประเมินจากการศึกษาหน้าของทีมนักวิจัยซึ่งมีการเก็บตัวอย่างประมาณ 300 ตัวอย่าง และพบตัวอย่างที่มีการติดเชื้อปรสิตประมาณร้อยละ 4.6 การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาด้านจริยธรรมในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE651458

2. การตรวจวิเคราะห์อุจจาระด้วยวิธี normal saline simple smear technique

การตรวจอุจจาระด้วยวิธี normal saline simple smear technique ประกอบด้วย การตรวจทางกายภาพ ได้แก่ สี ลักษณะของอุจจาระ การพบมูกเลือด จากนั้นใช้ไม้จิ้มอุจจาระเลือกสุ่มให้ทั่วทั้งภาชนะบรรจุ และเมื่อพบบริเวณที่มีมูกหรือเลือดปนก็จะจิ้มในบริเวณนั้นด้วย นำอุจจาระที่ได้ไปผสมเยียร้อยละ 0.85 (0.85% NSS) ปิดด้วย cover slip ขนาด 22×22 มิลลิเมตร แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นรายงานผลการตรวจพบโปรโตซัว ไข่พยาธิ ตัวอ่อนพยาธิ และรายงานจำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell, RBC) เม็ดเลือดขาว (white blood cell, WBC) และยีสต์ ต่อกำลังขยาย 40× (high power field, HPF)

3. การตรวจตะกอนอุจจาระและเลือดแฝงในอุจจาระ (occult blood) ด้วยเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280

เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 ใช้หลักการถ่ายภาพดิจิทัลจากกล้องจุลทรรศน์ สามารถวิเคราะห์อุจจาระได้จากระบบถ่ายภาพของเครื่อง การตรวจวิเคราะห์เริ่มจากตักอุจจาระด้วยช้อนที่อยู่ใน collection tube โดยใช้อุจจาระประมาณ 0.25 มิลลิกรัม หรือเต็มช้อนพอดี ซึ่งจะทำให้ได้ตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 5 กรัม วาง collection tube ลงใน rack เครื่อง จะทำการตรวจวิเคราะห์โดยถ่ายภาพอุจจาระที่อยู่ในช้อนและรายงานผลการตรวจทางกายภาพ ได้แก่ สี และลักษณะของอุจจาระ จากนั้นเครื่องจึงเติมน้ำยาสำหรับเจือจาง (diluent) ลงประมาณ 5 มิลลิกรัม แล้วคนผสมอุจจาระโดยระบบที่เรียกว่า air mix

ใช้เวลาประมาณ 40 วินาทีและกรองเอากากออกผ่านแผ่นกรอง (filter) จะได้ตะกอนอุจจาระที่ตกลงด้านล่างของหลอดโดยใช้เวลาตกตะกอนประมาณ 1.5-2 นาที เครื่องจะดูดตะกอนอุจจาระเข้าไปสู่ช่องบรรจุตัวอย่าง (chamber) เพื่อถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่อยู่ในตัวเครื่องที่กำลังขยาย 10× (low power field, LPF) จำนวน 104 ภาพและที่กำลังขยาย 40× (HPF) จำนวน 22 ภาพ ซึ่งในจำนวนนี้มี 61 ตัวอย่างที่จะนำไปตรวจหาเลือดแฝงในอุจจาระ (occult blood) โดยเครื่องจะแยกตัวอย่างจากขั้นตอนการตรวจอุจจาระไปหยดใส่ชุดทดสอบที่อยู่ในเครื่อง และจับเวลาการเกิดปฏิกิริยา เมื่อครบเวลาเครื่องจะถ่ายภาพปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นพร้อมแปลผลเป็นบวกหรือลบ นักเทคนิคการแพทย์จะตรวจผลการรายงานผลจากเครื่องโดยทบทวนภาพถ่ายของแต่ละตัวอย่างก่อนสรุปผลการตรวจปรีติและเลือดแฝงในอุจจาระ ก่อนรายงานผลการทดสอบทั้งสองชนิดในแต่ละตัวอย่าง

4. การตรวจเลือดแฝงในอุจจาระด้วยวิธี manual

ใช้ชุดตรวจ Rapid fecal occult blood test card ของ Boson Biotech โดยใช้ชิ้นตัวอย่างอุจจาระใส่ลงในหลอดบัฟเฟอร์ จากนั้นเขย่าผสมตัวอย่างให้เข้ากันกับสารละลายบัฟเฟอร์ ก่อนนำไปหยดลงชุดทดสอบ และรายงานผลการเกิดปฏิกิริยาตามคำแนะนำของชุดทดสอบ

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

คำนวณค่า positive percent agreement (PPA), negative percent agreement (NPA) และ overall agreement โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความสอดคล้อง (Cohen's kappa statistic) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์⁽⁹⁾

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบทางกายภาพของตัวอย่างอุจจาระและภาพถ่ายการทดสอบเลือดแฝงในอุจจาระด้วยเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280

เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 สามารถถ่ายภาพลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างอุจจาระ และทำการทดสอบเลือดแฝงในอุจจาระ และบันทึกผลไว้โดยอัตโนมัติ ทำให้ลดขั้นตอนทั้งสองนี้ได้ เพื่อประเมินความเหมาะสมของการนำเครื่องไปใช้งาน จึงได้ทำการตรวจสอบภาพตัวอย่างทั้งหมด เพื่อประเมินความชัดเจน และรายละเอียดของภาพที่ได้ ผลการตรวจสอบพบว่าภาพลักษณะทางกายภาพ และภาพผลการทดสอบเลือดแฝงในอุจจาระมีความชัดเจน คมชัดเพียงพอ ดังตัวอย่างที่แสดงใน Fig. 1 และเมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนในการทดสอบพบว่าการใช้เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 จะช่วยลดขั้นตอนในการทดสอบจาก 8 ขั้นตอนเหลือเพียง 3 ขั้นตอน ดังแสดงใน Fig. 2

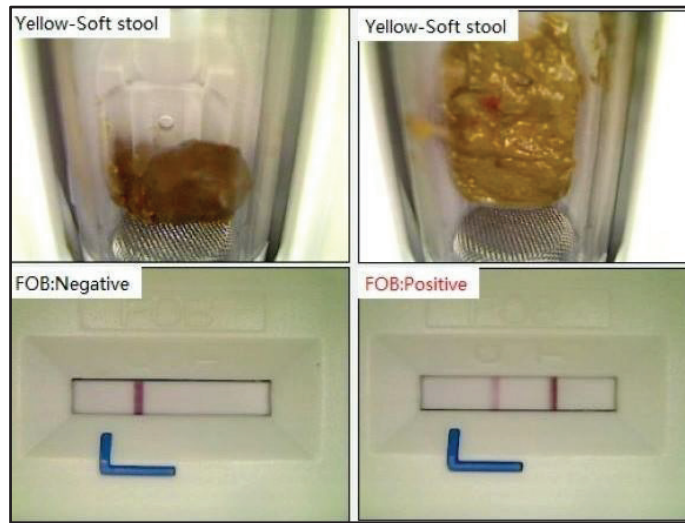
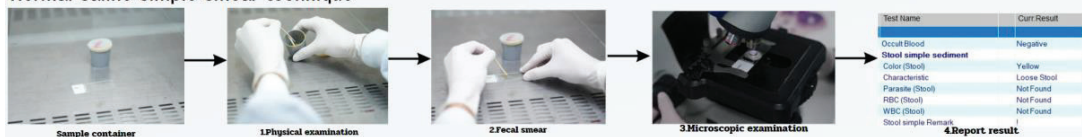


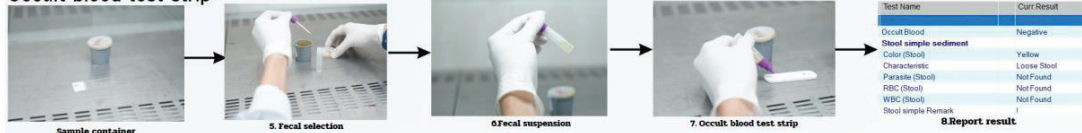
Fig. 1 Photos taken by automated fecal analyzer OREINTER FA280 for physical examination of fecal specimen and occult blood test.

A. Conventional methods

Normal saline simple smear technique



Occult blood test strip



B. ORIENTER FA280

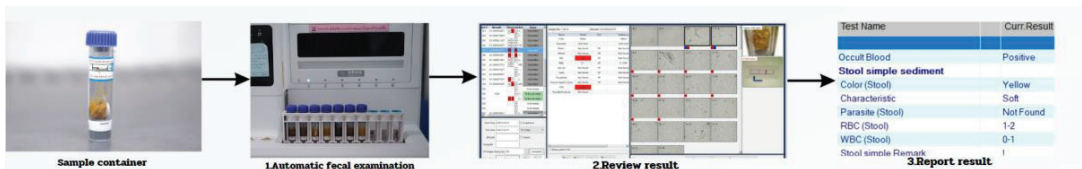


Fig. 2 Workflow of fecal examination process and occult blood testing by conventional method (A), and automated fecal analyzer ORIENTER FA280 (B).

2. การเปรียบเทียบผลการตรวจหาเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ยีสต์ โปรโตซัว ไข่พยาธิ และ หนอนพยาธิในตัวอย่างอุจจาระ ระหว่างวิธี normal saline simple smear technique (NSS) และ เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280

เนื่องจากการพบเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และยีสต์ ในตัวอย่างอุจจาระ สามารถใช้เป็นข้อมูลบ่งชี้ ภาวะติดเชื้อ หรืออักเสบในลำไส้ได้ นอกจากนี้ใน การตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติอาจทำให้การวินิจฉัย คลาดเคลื่อนได้ หากโปรแกรมที่ใช้พัฒนามาอย่างไม่ เหมาะสม ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงได้ทำการเปรียบเทียบ ผลการตรวจหาเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และ ยีสต์ ระหว่างวิธี normal saline simple smear technique (NSS) และเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระ อัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 ผลการศึกษา แสดงดัง Table 1, Table 2 และ Table 3

จากการเปรียบเทียบผลการตรวจหา เม็ดเลือดแดง RBC พบว่า ทั้งสองวิธีมีค่า Kappa = 0.39 แสดงว่ามีความสอดคล้องพอใช้ ซึ่งมาจากการที่เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติตรวจพบ เม็ดเลือดแดงได้มากกว่าวิธี simple smear จำนวน 8 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี simple smear ตรวจ พบเม็ดเลือดแดงได้มากกว่าเครื่องอัตโนมัติจำนวน 1 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเนื่องจากทั้ง 9 ตัวอย่างที่ตรวจ ได้ผลไม่ตรงกัน มีความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง 0-1/HPF ดังนั้นจึงถือว่าเป็นความคลาดเคลื่อนเพียง 1 ระดับ ซึ่งถือว่าเป็นความแตกต่างที่ยอมรับได้ของ การทดสอบเชิงคุณภาพ

ผลการตรวจหาเม็ดเลือดขาว พบว่า ได้ค่า Kappa = 0.45 แสดงว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้อง ของผลการตรวจปานกลาง เนื่องจากเครื่องตรวจ ตะกอนอุจจาระอัตโนมัติตรวจพบเม็ดเลือดขาวได้ มากกว่าวิธี simple smear จำนวน 6 ตัวอย่าง

ในขณะที่วิธี simple smear ตรวจพบเม็ดเลือดขาว ได้มากกว่าเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติจำนวน 1 ตัวอย่าง โดยทั้ง 7 ตัวอย่างที่ตรวจได้ผลไม่ตรงกัน มีความหนาแน่นของเม็ดเลือดขาว 0-1/HPF ดังนั้น จึงถือว่าเป็นความคลาดเคลื่อนเพียง 1 ระดับ ซึ่ง ถือว่าเป็นความแตกต่างที่ยอมรับได้ของการทดสอบ เชิงคุณภาพเช่นเดียวกับผลการเปรียบเทียบการตรวจ หาเม็ดเลือดแดง

ผลการตรวจหายีสต์ พบว่าได้ค่า Kappa = 0.37 แสดงว่ามีความสอดคล้องพอใช้ เนื่องจาก เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติตรวจพบยีสต์ได้ มากกว่าวิธี simple smear จำนวน 46 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่มีความหนาแน่นของยีสต์ต่ำ (few) จึงสรุปได้ว่าการตรวจหายีสต์ด้วยเครื่องตรวจตะกอน อุจจาระอัตโนมัติกับวิธี simple smear มีความ สอดคล้องกันและมีความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ เช่นเดียวกับการตรวจหาเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

การตรวจหาปรสิต พบไข่พยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ *Opisthorchis viverrini* และ minute intestinal fluke พบตัวอ่อนพยาธิ 1 ชนิด ได้แก่ *Strongyloides stercoralis* rhabditiform larva พบ trophozoite ของโปรโตซัว 1 ชนิด ได้แก่ *Trichomonas* spp. พบ vacuolated form ของ โปรโตซัว 1 ชนิด ได้แก่ *Blastocystis hominis* และพบซีสต์ของโปรโตซัว 3 ชนิด ได้แก่ *Giardia lamblia*, *Chilomestix mesnili* และ *Endolimax nana* โดยตรวจพบปรสิตเหมือนกันทั้งสองวิธีจำนวน 17 ตัวอย่าง ตรวจพบปรสิตจากเครื่องอัตโนมัติ อย่างเดียว 6 ตัวอย่าง และตรวจพบปรสิตจากวิธี NSS อย่างเดียว 1 ตัวอย่าง ดังแสดงใน Table 4 และ เปรียบเทียบผลระหว่างวิธี simple smear และเครื่อง ตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER FA280 แสดงดัง Table 5 ผลการเปรียบเทียบได้ค่า Kappa = 0.82 แสดงว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันสูง

อย่างไรก็ตามเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติจะตรวจพบไข่พยาธิและโปรโตซัวมากกว่า ส่วนวิธี NSS จะทำให้ตรวจพบตัวอ่อนพยาธิ ซึ่งมีความสามารถในการเคลื่อนไหวได้

Table 1 The comparison of RBC detected by simple smear technique and ORIENTER FA280.

RBC		NSS		
		Not found	Found	Total
FA280	Not found	288	1	289
	Found	8	3	11
	Total	296	4	300
PPA				75.0%
NPA				97.3%
% overall agreement				97.0%
Kappa				0.39

Table 2 The comparison of WBC, detected by simple smear technique and ORIENTER FA280.

WBC		NSS		
		Not found	Found	Total
FA280	Not found	290	1	291
	Found	6	3	9
	Total	296	4	300
PPA				75.0%
NPA				98.0%
% overall agreement				97.7%
Kappa				0.45

Table 3 The comparison of yeast detected by simple smear technique and ORIENTER FA280.

Yeast		NSS		
		Not found	Found	Total
FA280	Not found	237	0	237
	Found	46	17	63
	Total	283	17	300
PPA				100%
NPA				83.7%
% overall agreement				84.7%
Kappa				0.37

Table 4 Types and frequencies of parasites detected by simple smear technique and ORIENTER FA280.

Parasite	Found both	NSS only	FA280 only	Not found both
<i>Opisthorchis viverrini</i> egg	1		2	
Minute intestinal fluke egg			1	
<i>Strongyloides stercoralis</i> rhabditiform larva		1		
<i>Trichomonas</i> spp. trophozoite	1			
<i>Giardia lamblia</i> cyst	1*			
<i>Endolimax nana</i> cyst	2*			
<i>Blastocystis hominis</i> vacuolated form	14		3	
<i>Chilomestix mesnili</i> cyst	1*			
Not found				276

* A specimen from each of these groups were detected together with *Blastocystis hominis* vacuolated form.

Table 5 The comparison of parasite detected by simple smear technique and ORIENTER FA280.

Parasite		NSS		
		Not found	Found	Total
FA280	Not found	276	1	277
	Found	6	17	23
	Total	282	18	300
PPA				94.4%
NPA				97.9%
% overall agreement				97.7%
Kappa				0.82

3. การเปรียบเทียบผลการตรวจเลือดแฝงในอุจจาระ ระหว่างชุดทดสอบ Boson Biotech และเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280

ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจเลือดแฝงในอุจจาระ ระหว่างชุดทดสอบ Boson Biotech และเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระ

อัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 พบว่าได้ค่า Kappa = 0.93 แสดงว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันมาก โดยมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากชุดทดสอบ Boson Biotech อย่างเดียว 1 ตัวอย่าง และให้ผลบวกจากเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติเพียงอย่างเดียว 1 ตัวอย่าง ดังแสดงใน Table 6

Table 6 The comparison of occult blood tested by Rapid Occult Blood Test Card (Boson Biotech) and ORIENTER FA280.

Occult blood		Boson Biotech		
		Negative	Positive	Total
FA280	Negative	35	1	36
	Positive	1	24	25
	Total	36	25	61
PPA				96.0%
NPA				97.2%
% overall agreement				96.7%
Kappa				0.93

วิจารณ์ผลและสรุปผล

การใช้งานเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยลดขั้นตอนและทรัพยากรบุคคลในการปฏิบัติงานเพื่อให้บุคลากรได้มีโอกาสใช้ความเชี่ยวชาญเพื่อพัฒนางานด้านอื่น ๆ และช่วยให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการปฏิบัติงานให้ได้มากที่สุด ดังนั้นหากพิจารณาประเด็นการลดขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยปรสิตและการตรวจเลือดแฝง จากตัวอย่างอุจจาระ พบว่าสามารถช่วยลดขั้นตอนได้จาก 8 ขั้นตอนเหลือเพียง 3 ขั้นตอน โดยเฉพาะขั้นตอนในการเตรียมและทดสอบตัวอย่าง จึงเห็นได้ว่าหากนำเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 หรือรุ่นอื่น ๆ⁽⁵⁻⁷⁾ มาใช้ก็จะช่วยให้ลดกระบวนการได้ โดยต้องประเมินความเหมาะสมกับหน่วยงาน ทั้งด้านงบประมาณ พื้นที่รวมถึงปริมาณงาน ซึ่งหน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูง โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีปริมาณการส่งตรวจอุจจาระเฉลี่ยเดือนละ 1,500 ตัวอย่าง และตรวจเลือดแฝงในอุจจาระ เฉลี่ยเดือนละ 1,400 ตัวอย่าง ดังนั้นหากนำเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติมาใช้ ก็จะทำให้เกิดประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้วิเคราะห์ turnaround time ของการตรวจ เนื่องจากในการปฏิบัติงานใช้ turnaround time ที่ใช้กับวิธีดั้งเดิม จึงไม่ได้ประเมินประสิทธิภาพด้านนี้ แต่ได้ประเมินในความสามารถของเครื่องในการตรวจหาเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ยีสต์ และปรสิตชนิดต่าง ๆ

ผลการประเมินความสามารถในการตรวจของเครื่อง ORIENTER รุ่น FA280 เมื่อเทียบกับวิธี simple smear พบว่าสามารถตรวจพบเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และยีสต์ ได้ในความแตกต่างที่ยอมรับได้ แต่เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ

จะมีความสามารถในการตรวจพบมากกว่าเล็กน้อย ซึ่งถือว่าการวินิจฉัยและคำนวณความหนาแน่นโดยโปรแกรมของเครื่องมีความถูกต้อง และสามารถช่วยลดปัญหาความแตกต่างในการรายงานผลจากการใช้ความรู้สึกของผู้ปฏิบัติงานได้

สำหรับการตรวจวินิจฉัยชนิดของปรสิต เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 ใช้วิธีการกรองตัวอย่างก่อน จึงเสมือนเป็นวิธีการตรวจแบบเข้มข้น (concentration technique) อีกประเภทหนึ่ง ซึ่งหากเป็นการทดสอบโดยใช้วิธี formalin-ethyl acetate หรือ Kato's thick smear ก็มีความยุ่งยาก การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Aiadsakun และคณะ⁽¹⁰⁾ พบว่าการใช้เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติจะช่วยลดความยุ่งยาก แต่ให้ประสิทธิภาพและความถูกต้องสอดคล้องกับวิธีการตรวจแบบเข้มข้นแบบต่าง ๆ ส่วนในการศึกษานี้พบว่าเครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 สามารถแยกชนิดของปรสิตได้มากกว่าวิธี simple smear เล็กน้อย โดยเฉพาะปรสิตที่มีขนาดใหญ่ อาจเกิดจากความคมชัดของภาพถ่ายที่ได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากพื้นที่ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสูง⁽¹¹⁾ ดังนั้นข้อดีที่ได้จากเครื่องอัตโนมัตินี้ น่าจะมีส่วนช่วยในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับให้ทำได้สะดวกยิ่งขึ้น และบริษัทผู้ผลิตอาจสามารถพัฒนาความละเอียดของภาพถ่ายโปรโตซัวให้มีความคมชัดมากขึ้นและสามารถปรับระดับ (plane) เพื่อศึกษารายละเอียดภายในโปรโตซัวให้ได้มากขึ้น ส่วนปรสิตวิธี simple smear ตรวจได้มากกว่าคือตัวอ่อนของพยาธิ *Strongyloides stercoralis* ซึ่งอาจเป็นเพราะตัวอ่อนมีการเคลื่อนไหวรวดเร็ว ทำให้ยากต่อการจับโฟกัส ดังนั้นในขั้นตอนการตรวจสอบภาพถ่ายผู้ปฏิบัติงานอาจต้องให้ความใส่ใจเป็นพิเศษ

เช่น เมื่อเห็นบางส่วนของตัวอ่อน หรือเห็นลักษณะที่คล้ายตัวอ่อน อาจต้องตรวจสอบภาพถ่ายโดยละเอียดอีก เพื่อเพิ่มโอกาสในการวินิจฉัยให้ถูกต้องยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่เหมาะสมควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มีไข่พยาธิหรือตัวอ่อน หนอนพยาธิต่าง ๆ นอกจากนี้ควรประเมินความไวของเครื่องอัตโนมัติในการตรวจพบไข่หรือพยาธิชนิดต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบกับวิธี formalin ether concentration technique หรือการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ทราบว่าควรมีจำนวนไข่หรือตัวอ่อนหนอนพยาธิอย่างน้อยเพียงใด จึงจะสามารถตรวจพบได้ด้วยเครื่องอัตโนมัติ รวมถึงทราบ clinical performance เช่น ความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), อัตราการตรวจพบ (detection rate) ของการใช้เครื่องอัตโนมัติ

โดยสรุป เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติ ORIENTER รุ่น FA280 สามารถนำมาใช้ทดแทนการตรวจตะกอนอุจจาระด้วยวิธี simple smear ได้ โดยให้ผลการตรวจเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และยีสต์ได้ดีกว่าวิธี simple smear เล็กน้อย ส่วนการตรวจเลือดแฝงในอุจจาระทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน แต่การใช้เครื่องอัตโนมัติจะช่วยลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ได้ เพราะขั้นตอนนี้ผู้ปฏิบัติงานสามารถสั่งการให้เป็นขั้นตอนเพิ่มเติมจากการตรวจตะกอนอุจจาระได้ ส่วนการตรวจหาปรสิต เครื่องตรวจตะกอนอุจจาระอัตโนมัติสามารถตรวจหาโปรโตซัวได้ แต่อาจไม่สามารถเห็นการเคลื่อนไหว ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานอาจต้องพิจารณาทำการตรวจยืนยันโดยนำตะกอนที่เหลือมาตรวจด้วยวิธี simple smear เพื่อให้เกิดความถูกต้องมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การตรวจหาตัวอ่อนพยาธิ *Strongyloides stercoralis* ก็อาจดำเนินการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี simple smear เช่นเดียวกันหากภาพที่ได้ไม่ชัดเจน

เพียงพอที่จะให้การวินิจฉัยได้ ซึ่งห้องปฏิบัติการควรทำการประเมินประสิทธิภาพเพิ่มเติมระหว่างการใช้งาน เพื่อให้สามารถใช้งานเครื่องให้ได้ประโยชน์สูงสุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย และการจัดเก็บข้อมูล บริษัท เฟิร์มเมอร์ จำกัด ที่ได้อนุเคราะห์น้ำยาและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ และทีมงานผู้ผลิตและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากประเทศจีน ที่ให้คำปรึกษาแนะนำการใช้งานเครื่องเพื่อการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Yahom S, Kullawat J, Boonsai D, Chatuphonprasert W, Thanchomnang T, Radomyos P. The prevalence of intestinal parasitic infections in Maha Sarakham and Kalasin Provinces. J Trop Med Parasito 2013; 36: 29-33.
2. Thathaisong U. Important food-borne and water-borne pathogenic parasites in Thailand. Burapha Sci J 2012; 17: 212-20
3. Doi R, Itoh M, Chakhatrakan S, Uga S. Epidemiological investigation of parasitic infection of schoolchildren from six elementary schools in Sakon Nakhon Province, Thailand. Kobe J Med Sci 2016; 62: E120-8

4. Kaewpitoon SJ, Sangwalee W, Kujapun J, *et al.* Active screening of gastrointestinal helminth infection in migrant workers in Thailand. *J Int Med Res* 2018; 46: 4560-8.
5. Lee YJ, Won EJ, Cho YC, Kim SH, Shin MG, Shin JH. Utility of an automatic vision-based examination system (AVE-562) for the detection of *Clonorchis sinensis* eggs in stool. *Ann Lab Med* 2020; 41: 221-4.
6. Intra J, Taverna E, Sala MR, Falbo R, Cappellini F, Brambilla P. Detection of intestinal parasites by use of the cuvette-based automated microscopy analyser sediMAX®. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 279-84.
7. Shunsai N, Sahaisook P. Comparison of Stool Examination Techniques to Diagnose Parasitic Infection Using Semi-Automate Feces Analysis System (Sciendox 50) and Simple Smear Technique. *J Med Tech Assoc Thailand* 2002; 50: 8008-15.
8. Boonyong S, Hunnangkul S, Vijit S, *et al.* High-throughput detection of parasites and ova in stool using the fully automatic digital feces analyzer, orienter model fa280. *Parasit Vectors* 2024; 17: 13.
9. <https://idostatistics.com/cohen-kappa-free-calculator/> [cited 2023 Jul 4]
10. Aiadsakun P, Sriwimol W, Thongbun N, *et al.* Comparison of the complete filtration method using an automated feces analyzer with three manual methods for stool examinations. *J Microbiol Methods* 2022; 192: 106394.
11. Perakanya P, Ungcharoen R, Worrananakorn S, *et al.* Prevalence and risk factors of *Opisthorchis viverrini* infection in Sakon Nakhon Province, Thailand. *Trop Med Infect Dis* 2022; 7: 313.

The Application of Geographic Information System (GIS) for Finding the Risk Area of Dengue Virus Infection

Chanon Naijitra^{*}

*Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital,
Pathum Thani Province, Thailand*

Abstract

Dengue fever (DF) and Dengue hemorrhagic fever (DHF) are the main problems of worldwide public health caused by the Dengue virus (DENV). The most effective way to control the disease is to destroy the Aedes mosquito's habitat by using the DF and DHF data in the community. In Thailand, dengue fever and dengue hemorrhagic fever is a disease that must be reported for monitoring and outbreak control. However, some people are misdiagnosed as DENV infection following the Department of Medical Services guidelines. So, the objectives of this study are to find the land use that poses a risk of being infected by Dengue virus and to analyze the relationship between the type of land use and the DENV infection rate. This study is a retrospective study evaluating the DENV screening test results of Thammasat University Hospital between 2017 and 2022 and Pathum Thani Province land use data year 2021 of the Department of Land Development. The data of people who do not have addresses in Pathum Thani Province were excluded. The geographic information system (GIS) was used to analyze the data. The Pearson correlation tested the correlation between DENV infection rate and land use. The result illustrated that the urban area has the highest number of DENV screenings, and the agricultural area has the highest infection rate, in terms of the correlation, land use that has correlated with infection rate is integrated farm/diversified farm ($r = 0.2584$, $p\text{-value} = 0.0462$), and mine/pit ($r = 0.4495$, $p\text{-value} = 0.0003$), respectively. The study concluded that the GIS and medical laboratory results can be integrated to analyze the high-risk areas of DENV infection outbreaks and used as supporting data for disease control, prevention, and multidisciplinary health management policy.

Keywords: Dengue virus, Geographic information system, Land use, Medical technology

^{*}Corresponding author E-mail address: saetwan@tu.ac.th

การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (GIS) เพื่อค้นหาพื้นที่เสี่ยงติดเชื้อไวรัสเดงกี

ชานนท์ นัยจิตร*

ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

โรคเดงกี และโรคไข้เลือดออกเดงกี เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญของโลกซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี การควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือการกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายพาหะโดยดูจากอัตราการป่วยของประชากร สำหรับประเทศไทย โรคติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นโรคที่ต้องรายงานจำนวนผู้ป่วยให้กระทรวงสาธารณสุขทราบ เพื่อทำการเฝ้าระวังและควบคุมโรค อย่างไรก็ตามมีผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวนหนึ่งที่ไม่ได้ถูกวินิจฉัยว่าเป็นผู้ป่วยตามแนวทางการวินิจฉัยของกรมการแพทย์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาการใช้ประโยชน์ที่ดินที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี และเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ประโยชน์ที่ดินและอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยทำการศึกษาแบบย้อนหลังจากผลการตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสเดงกีของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างปี 2560-2565 ในผู้เข้ารับบริการเขตจังหวัดปทุมธานี ร่วมกับข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินจังหวัดปทุมธานี ปี 2564 ของกรมพัฒนาที่ดิน วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสารสนเทศภูมิศาสตร์และทำการหาความสัมพันธ์ด้วยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ผลการศึกษาพบว่าพื้นที่ที่มีจำนวนการตรวจคัดกรองมากที่สุดคือพื้นที่เขตเมือง พื้นที่ที่มีอัตราผลการทดสอบเป็นบวกสูงที่สุด ได้แก่ พื้นที่การเกษตร การใช้ประโยชน์ที่ดินที่สัมพันธ์กับอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี ได้แก่ การเกษตรแบบผสมผสาน ไนเวสชันผสม ($r = 0.2584$, $p\text{-value} = 0.0462$) และเหมืองแร่ บ่อขุด ($r = 0.4495$, $p\text{-value} = 0.0003$) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ร่วมกับข้อมูลทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์เพื่อค้นหาและประเมินพื้นที่เสี่ยงของการเกิดโรคได้ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมป้องกัน และกำหนดนโยบายสุขภาพร่วมกับสหวิชาชีพอื่น ๆ ต่อไป

คำสำคัญ: ไวรัสเดงกี สารสนเทศภูมิศาสตร์ การใช้ประโยชน์ที่ดิน เทคนิคการแพทย์

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: saetwan@tu.ac.th

รับบทความ: 13 กุมภาพันธ์ 2567

แก้ไขบทความ: 2 กรกฎาคม 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 7 กรกฎาคม 2567

บทนำ

โรคเดงกี และโรคไข้เลือดออกเดงกีเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus: DENV) ซึ่งเป็นไวรัสชนิด single stranded RNA virus จัดอยู่ใน family Flaviviridae มีทั้งหมด 4 serotypes ได้แก่ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 มี antigen ร่วมบางชนิด จึงทำให้มี cross reaction และมี cross protection ได้ในระยะสั้น ๆ กล่าวคือ เมื่อมีการติดเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งแล้วจะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้นอย่างถาวรตลอดชีวิต (permanent immunity) แต่จะมีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกีอีก 3 ชนิดในช่วงระยะสั้น ๆ (partial immunity) ประมาณ 6-12 เดือน⁽¹⁾ โดยมีพาหะนำโรคที่สำคัญในเขตร้อนคือยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* และยุงลายสวน *Aedes albopictus*⁽²⁾ ในปี 2564 ประเทศไทยมีอุบัติการณ์การระบาดของโรคไข้เดงกี (dengue fever: DF), โรคไข้เลือดออกเดงกี (dengue hemorrhagic fever: DHF) และไข้เลือดออกเดงกีที่ช็อก (dengue shock syndrome: DSS) อยู่ที่ 11.75, 4.18 และ 0.11 คน ต่อประชากร 100,000 คน โดยพบมากที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ ตามลำดับ⁽³⁾ แนวทางการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการสำหรับใช้สนับสนุนการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นไข้เดงกีจากแนวปฏิบัติของกรมควบคุมโรค ได้แก่ การตรวจ NS1 antigen, PCR เพื่อดูว่ามีเชื้ออยู่ในกระแสเลือดหรือไม่ หรือการตรวจหา antibody ด้วยวิธี ELISA, rapid immunochromatographic test⁽¹⁾ จากแนวทางดังกล่าวอาจทำให้ผู้ป่วยบางส่วนไม่ได้ถูกวินิจฉัยว่าเป็นไข้เดงกีถึงแม้จะให้ผลบวกกับการทดสอบบางการทดสอบเนื่องจากเป็นเพียงการทดสอบที่ใช้สำหรับสนับสนุนการวินิจฉัยเท่านั้น ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะไม่ถูกรายงานเข้าในระบบการรายงานโรคของกรมควบคุมโรค ประกอบกับปัจจุบันยังไม่มีมาตรฐาน

ไวรัสเดงกีโดยตรงอีกทั้งการให้วัคซีนยังไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากประสิทธิภาพที่ต่ำและความเสี่ยงจากการรับวัคซีน ทำให้มีการใช้ในวงจำกัด⁽⁴⁾ ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อจึงมุ่งเน้นไปที่การจัดการพาหะนำโรคและสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการเพาะพันธุ์ของยุงลายเป็นหลัก⁽⁵⁾ ซึ่งพิจารณาจากพื้นที่ที่มีจำนวนผู้ป่วยในพื้นที่ก่อนเป็นลำดับแรก⁽¹⁾ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความชื้น อุณหภูมิ ลม ความหนาแน่นของประชากร ตลอดจนสภาพนิเวศวิทยาทางสังคม ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญในการระบาดของไวรัสเดงกี⁽⁶⁻⁹⁾

บทบาทของนักเทคนิคการแพทย์ที่ปฏิบัติงานประจำโรงพยาบาล หรือ คลินิกเทคนิคการแพทย์เอกชน คือ เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจจากมนุษย์ ครอบคลุมงานด้านจุลชีววิทยาทางการแพทย์ เคมีคลินิก โลหิตวิทยา ธนาการเลือด ชีวโมเลกุล รวมถึงระบบการจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เพื่อช่วยประสานในการดูแลรักษาผู้ป่วย⁽¹⁰⁾ ด้วยขอบเขตการปฏิบัติงานดังกล่าวข้างต้นทั้งหมดเป็นงานลักษณะตั้งรับ ณ สถานที่ปฏิบัติงานถึงแม้ว่าหลักสูตรการเรียนการสอนเทคนิคการแพทย์ในมหาวิทยาลัยมีการสอนด้านการจัดการข้อมูลสารสนเทศทางการแพทย์⁽¹¹⁾ แต่ในการปฏิบัติงานจริงกรอบกำหนดสมรรถนะประจำตำแหน่งของนักเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติไม่ได้ระบุถึงคุณสมบัติความเชี่ยวชาญในด้านดังกล่าว⁽¹²⁾ ผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์มักถูกใช้โดยบุคลากรทางการแพทย์วิชาชีพอื่น ๆ เพื่อใช้ในการวางแผนการรักษา กำหนดนโยบายด้านสาธารณสุข การดูแลผู้ป่วย การวินิจฉัย ตลอดจนงานด้านสาธารณสุขชุมชน⁽¹⁰⁾

ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (geographic information systems: GIS) คือ กระบวนการจัดการข้อมูลที่เกิดขึ้นที่มีความเกี่ยวข้องกับตำแหน่งหนึ่ง ๆ

ที่สัมพันธ์กับพื้นผิวโลก โดยอาศัยคอมพิวเตอร์เป็นเครื่องมือในการจัดเก็บ วิเคราะห์ ประมวลผล เชื่อมโยง ข้อมูลเชิงพื้นที่ที่อ้างอิงพิกัดจริงบนพื้นผิวโลก พร้อมทั้ง รายละเอียดของวัตถุหรือพื้นที่นั้น ๆ เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดตามที่ต้องการ⁽¹³⁾ สำหรับงานด้าน สาธารณสุข การประยุกต์ใช้ GIS มีส่วนช่วยในการ ให้ข้อมูลสนับสนุนในการวางแผนนโยบายด้านสุขภาพ ทั้งในด้านระบบบริการ ระบบบริหาร และระบบ ควบคุมป้องกันโรค ทำให้ข้อมูลด้านสุขภาพมีความ ชัดเจนมากยิ่งขึ้นผ่านการเชื่อมโยงกับข้อมูลด้าน ภูมิศาสตร์ ซึ่งบทบาทของ GIS ด้านสาธารณสุข ได้กลายเป็นมาตรฐานที่ต้องเรียนรู้สำหรับองค์กร ด้านการแพทย์และการสาธารณสุข ซึ่งจะยิ่งเด่นชัด ขึ้นมากในอนาคต⁽¹⁴⁾

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประยุกต์ใช้ข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินพื้นที่ จังหวัดปทุมธานีของกรมพัฒนาที่ดินร่วมกับข้อมูล การตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีของ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2565 ในการวิเคราะห์หาการใช้ประโยชน์ที่ดิน ที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกีในพื้นที่ให้บริการ และ ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ประโยชน์ที่ดิน และอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบ retrospective study ซึ่งได้รับจริยธรรมการวิจัยใน มนุษย์จากคณะกรรมการการวิจัยในคน โรงพยาบาล ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ รหัสโครงการ TUH-EC-MT-0-017/65 โดยการรวบรวมประวัติผู้เข้ารับ การตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยการตรวจหา NS1 antigen และภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกี ด้วยหลักการ immunochromatography test

และตำแหน่งที่พักอาศัย ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2565 จากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยทำการสืบค้นข้อมูลของผู้ป่วยทั้งหมดจากระบบ สารสนเทศสำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และ ระบบสารสนเทศโรงพยาบาล ซึ่งทำการคัดกรองข้อมูล ผู้ป่วยแบบไม่ซ้ำราย และคำนวณอัตราการติดเชื้อ ไวรัสเดงกีจากผลบวกต่อการทดสอบ NS1 antigen และ/หรือภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกีเพื่อใช้ในการจัดเก็บ ค่าตำแหน่งพิกัดทางภูมิศาสตร์และวิเคราะห์พื้นที่เสี่ยง

2. การประเมินพื้นที่เสี่ยงการติดเชื้อไวรัสเดงกี

การประเมินพื้นที่เสี่ยงการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพื้นที่เพื่อหาพื้นที่เสี่ยงต่อ การระบาดของไข้เลือดออก โดยนำผลการวิเคราะห์ อัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีของผู้ป่วยของโรงพยาบาล ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติในภาพรวมย้อนหลัง 6 ปี ข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินจังหวัดปทุมธานีของ กรมพัฒนาที่ดิน ปี พ.ศ. 2564 และแผนที่จังหวัด ปทุมธานีแบบแยกรายตำบล มาทำการซ้อนทับกับ ข้อมูลปัจจัยเชิงพื้นที่ (overlay analysis) ด้วยระบบ สารสนเทศภูมิศาสตร์ โดยใช้โปรแกรมประมวลผล QGIS version 3.26.3 Buenos Aires

3. การประเมินความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการ ติดเชื้อไวรัสเดงกีกับการใช้ประโยชน์ที่ดิน

การประเมินความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการ ติดเชื้อไวรัสเดงกีและการใช้ประโยชน์ที่ดิน ทำได้ โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างร้อยละของชนิดการใช้ประโยชน์ ที่ดินต่อพื้นที่ทั้งหมดในแต่ละตำบลของจังหวัด ปทุมธานี อ้างอิงข้อมูลจากการใช้ประโยชน์ที่ดิน จังหวัดปทุมธานีของกรมพัฒนาที่ดิน ปี พ.ศ. 2564⁽¹⁵⁾ และอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในแต่ละตำบล ซึ่ง หาได้จากสมการ

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}}$$

โดยกำหนดให้

r คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

x_i คือ ร้อยละการใช้ประโยชน์ที่ดินแต่ละประเภทในแต่ละตำบล

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของร้อยละการใช้ประโยชน์ที่ดินแต่ละประเภท

y คือ อัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในแต่ละตำบล

$\bar{y}$ คือ ค่าเฉลี่ยของอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี

ผลการศึกษา

1. อัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี

การศึกษานี้รวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่เข้ารับ

ตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยการตรวจหา NS1 antigen และภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีด้วยหลักการ immunochromatography test จากระบบสารสนเทศสำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และระบบสารสนเทศโรงพยาบาล ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2565 โดยคัดกรองข้อมูลผู้ป่วยแบบไม่ซ้ำราย และมีที่พักอาศัยในจังหวัดปทุมธานี พบว่ามีผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจคัดกรองสูงสุด ในปี 2561 จำนวน 1,226 ราย รองลงมา ปี 2562 จำนวน 1,140 ราย และ ปี 2563 จำนวน 700 ราย ตามลำดับ ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบ NS1 antigen และ/หรือภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกีสูงสุด ในปี 2561 จำนวน 513 ราย รองลงมา ปี 2562 จำนวน 335 ราย และ ปี 2563 จำนวน 208 ราย ตามลำดับ และมีอัตราการติดเชื้อต่อจำนวนผู้รับการตรวจคัดกรองสูงสุด ในปี 2561 จำนวน 0.42 รองลงมา ปี 2565 จำนวน 0.31 และ ปี 2563 จำนวน 0.30 ราย ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 The number of DENV screening tests in Thammasat University Hospital between 2017 and 2022.

	Year					
	2017	2018	2019	2020	2021	2022
The total number of DENV screening (time)	534	1226	1140	700	200	435
The number of DENV-screened positive	156	513	335	208	46	133
DENV positive rate	0.29	0.42	0.29	0.30	0.23	0.31

2. การประเมินพื้นที่การใช้ประโยชน์ที่ดิน

ผลการประเมินพื้นที่การใช้ประโยชน์ที่ดินของจังหวัดปทุมธานีแบบแยกรายตำบล โดยนำข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินจังหวัดปทุมธานีของกรมพัฒนาที่ดิน ปี พ.ศ. 2564 ประมวลผลร่วมกับแผนที่จังหวัดปทุมธานีแบบแยกรายตำบล ด้วยโปรแกรม QGIS version 3.26.3 Buenos Aires พบว่าพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่สำหรับการทำเกษตรกรรม ร้อยละ 40.99 รองลงมา ได้แก่ พื้นที่เขตเมืองร้อยละ 39.19 แหล่งน้ำร้อยละ 10.46 พื้นที่ชุมชน และพื้นที่เบ็ดเตล็ดร้อยละ 9.36 ซึ่งการเกษตรส่วนใหญ่เป็นการทำนาข้าวคือร้อยละ 70.57 ของพื้นที่ทำการเกษตรทั้งหมด (Fig. 1)

3. การประเมินพื้นที่เสี่ยงการติดเชื้อไวรัสเดงกี

ผลการประเมินพื้นที่เสี่ยงการติดเชื้อไวรัสเดงกีจากการวิเคราะห์อัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในภาพรวมจากผลบวกต่อการทดสอบ NS1 antigen และ/หรือภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกี ณ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2565 ร่วมกับพื้นที่การใช้ประโยชน์ที่ดินและแผนที่จังหวัดปทุมธานี โดยใช้โปรแกรม QGIS version 3.26.3 Buenos Aires พบกลุ่มผู้ได้รับการตรวจคัดกรองสูงสุด (49-1,143 ราย) ทั้งหมดจำนวน

11 จุด กระจายอยู่ในพื้นที่เขตเมือง จำนวน 10 จุด คิดเป็นร้อยละ 90.91 ส่วนกลุ่มผู้ได้รับการตรวจคัดกรองรองลงมา (19.4-49.0 ราย) กระจายอยู่ในทั้งพื้นที่ในเขตเมือง พื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่เบ็ดเตล็ด (Fig. 2) และเมื่อพิจารณาอัตราการติดเชื้อพบว่าพื้นที่ที่มีอัตราการติดเชื้อสูงสุด (0.8-1.0 ราย) และอัตราการติดเชื้อสูง (0.6-0.8 ราย) ทุกจุดอยู่ในพื้นที่เกษตรกรรม ส่วนรองลงมาพื้นที่ที่มีอัตราการติดเชื้อปานกลาง (0.4-0.6 ราย) กระจายอยู่ในทั้งพื้นที่ในเขตเมือง พื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่เบ็ดเตล็ด (Fig. 3)

4. ความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ประโยชน์ที่ดินและอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ประโยชน์ที่ดินในแต่ละหมวดย่อยและอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี พบว่าการใช้ประโยชน์ที่ดินความสัมพันธ์กับอัตราการให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสเดงกี มีเพียงสองประเภทเท่านั้น คือ เหมืองแร่ บ่อขุด และการเกษตรผสมผสาน ไร่นาสวนผสม มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.45 (p -value = 0.0003) และ 0.26 (p -value = 0.0462) ตามลำดับ (Table 2)

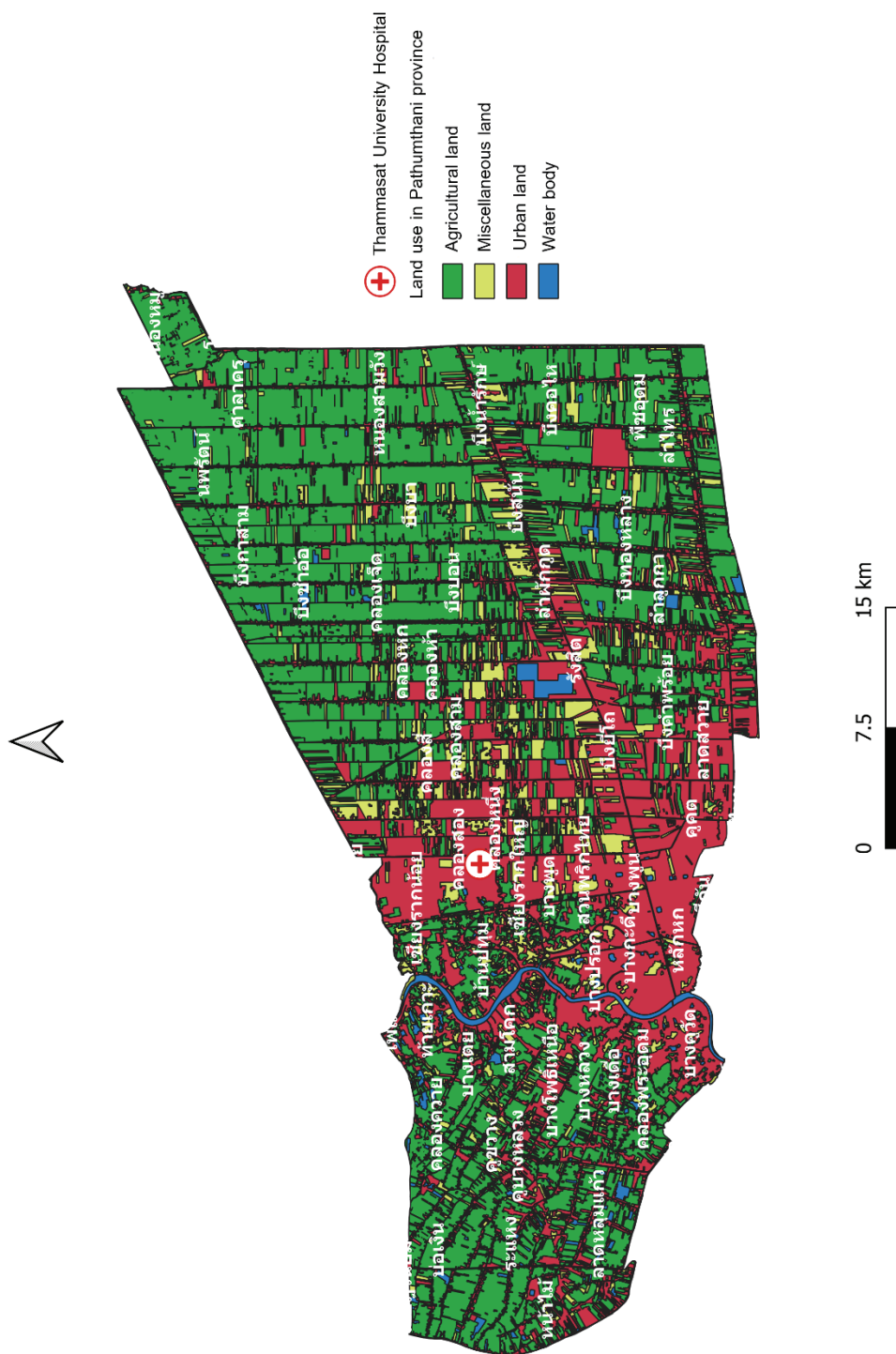


Fig. 1 Land use in Pathum Thani Province is divided by Sub-district.



Fig. 2 The total number of DENV screenings between 2017 and 2022 at Thammasat University Hospital.

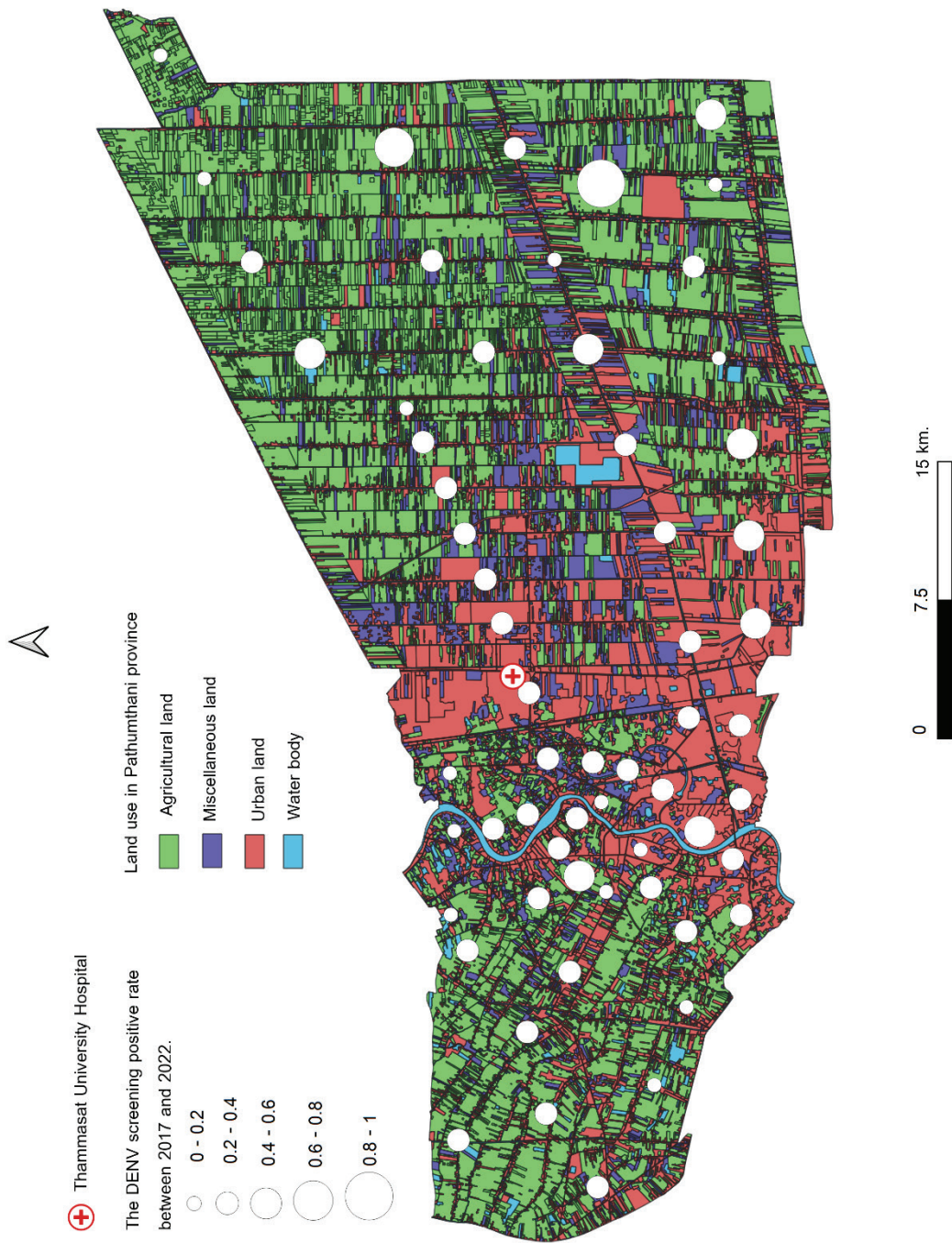


Fig. 3 The DENV screening positive rate and land use between 2017 and 2022 at Thammasat University Hospital.

Table 2 The Pearson correlation coefficient of DENV screening positive rate and land use between 2017 and 2022.

Land Use	<i>r</i>	<i>p</i> -value	Land Use	<i>r</i>	<i>p</i> -value
Integrated farm/diversified farm	0.2584	0.0462	Other miscellaneous land	-0.0955	0.4703
Paddy field	0.0534	0.6820	Institutional land	0.0937	0.4764
Field crop	0.1127	0.3917	Garbage dump	0.0383	0.7714
Perennial crop	-0.1367	0.3001	Aquacultural land	-0.2480	0.0561
Orchard	-0.1758	0.1811	Village	0.1262	0.3366
Horticulture	0.2220	0.0882	Mine, Pit	0.4495	0.0003
Shifting cultivation	0.0371	0.7784	Industrial land	0.0575	0.6626
Pasture and farm house	-0.0369	0.7848	City, town, commercial	0.0740	0.5742
Aquatic plant	-0.0111	0.9335	Golf course	0.1590	0.2250
Other built-up land	0.0614	0.6412	Natural water body	-0.1800	0.1688
Rangeland	-0.0124	0.9275	Artificial water body	0.0366	0.7813
Marsh and swamp	0.0349	0.7912			

วิจารณ์

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ศึกษาหาพื้นที่เสี่ยงติดเชื้อไวรัสเดงกีของจังหวัดปทุมธานี ซึ่งมีพื้นที่ทั้งหมด 1,525.9 ตร.กม. และเขตการปกครองส่วนภูมิภาคแบ่งเป็น 7 อำเภอ 60 ตำบล 529 หมู่บ้าน โดยการศึกษาข้อมูลย้อนหลังผลการตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสเดงกีของผู้เข้ารับบริการโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2565 พบว่าปีที่มีการตรวจคัดกรองสูงสุด ได้แก่ ปี 2561 (1,226 ราย) 2562 (1,140 ราย) และ 2563 (700 ราย) ตามลำดับ และต่ำสุดในปี 2564 (200 ราย) สอดคล้องกับผลการตรวจคัดกรองที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ NS1 antigen และ/หรือภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกีสูงสุดในปี 2561 (513 ราย) 2562 (335 ราย) และ 2563 (208 ราย) ตามลำดับ และต่ำสุดในปี 2564 (46 ราย) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำนวนผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองและผลการตรวจคัดกรองที่ให้ผลบวกมีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามหากพิจารณาอัตราส่วนระหว่างจำนวนผลบวกต่อจำนวนการตรวจคัดกรองพบว่าอัตราทำให้ผลบวกส่วนใหญ่อยู่อะหว่าง 2.9-3.1 ในปี 2560 2562 2563 และ 2565 มีอัตราทำให้ผลบวกสูงสุด 0.42 (2561) และต่ำสุด 0.24 (2564) สอดคล้องกับสถานการณ์ไข้เลือดออกในประเทศที่พบการระบาดสูงขึ้นระหว่างปี 2560 จนถึง 2562⁽¹⁶⁾ และลดลงจากการระบาดของโรคโควิด-19 ที่เริ่มมีรายงานการระบาดในประเทศ⁽¹⁷⁾ ส่งผลให้รัฐบาลออกมาตรการล็อกดาวน์จำกัดการเดินทางออกนอกเคสถานโดยไม่จำเป็นเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของโรค ซึ่งรัฐบาลไทยกำหนดล็อกดาวน์ครั้งแรกตั้งแต่วันที่ 26 มีนาคม 2563 ถึง วันที่ 30 มิถุนายน 2563⁽¹⁸⁾ ประกอบกับความตื่นตระหนกของประชาชนและเจ้าหน้าที่ต่อสถานการณ์การระบาดของโรคทำให้ลดการรับผู้ป่วยรายใหม่ลง^(18, 19)

ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (โปรแกรม QGIS version 3.26.3 Buenos Aires) นำมาใช้ในการประมวลผลข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินจังหวัดปทุมธานีของกรมพัฒนาที่ดิน ปี พ.ศ. 2564 และอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี (ผลบวกต่อการทดสอบ NS1 antigen และ/หรือภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกี) ของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2565 ร่วมกับแผนที่จังหวัดปทุมธานีแบบแยกรายตำบล พบว่าพื้นที่ร้อยละ 40.99 เป็นพื้นที่ทางการเกษตร ซึ่งส่วนมากเป็นพื้นที่ทำนา ร้อยละ 39.19 เป็นพื้นที่เขตเมือง ร้อยละ 10.46 เป็นแหล่งน้ำ และร้อยละ 9.37 เป็นพื้นที่เบ็ดเตล็ด (Fig. 1) ซึ่งกลุ่มผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองสูงสุด (49-1,143 ราย) ส่วนใหญ่กระจายอยู่ในพื้นที่เขตเมือง (ร้อยละ 90.91) ส่วนกลุ่มผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองรองลงมา (19.4-49 ราย) กระจายอยู่ในทั้งพื้นที่ในเขตเมือง พื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่เบ็ดเตล็ด (Fig. 2) ขณะที่ตำแหน่งอัตราการติดเชื้อสูงสุด (0.8-1.0 ราย) และอัตราการติดเชื้อสูง (0.6-0.8 ราย) ทุกจุดอยู่ในพื้นที่เกษตรกรรม ส่วนอัตราการติดเชื้อปานกลาง (0.4-0.6 ราย) กระจายอยู่ในทั้งพื้นที่เขตเมือง พื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่เบ็ดเตล็ด (Fig. 3) ซึ่งเขตพื้นที่เกษตรกรรมส่วนมากอยู่ห่างจากโรงพยาบาลผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองเป็นผู้ป่วยส่งต่อ จึงอาจส่งผลให้พบอัตราการติดเชื้อสูงกว่าเขตเมือง และสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของการใช้ประโยชน์ที่ดินแบบไบนารีสวนผสม (0.45, p -value = 0.0003) และแบบเหมืองแร่ บ่อขุด (0.26, p -value = 0.0462) มีความสัมพันธ์ในทางบวกต่ออัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในแต่ละตำบล ซึ่งไบนารีสวนผสมเป็นการทำกิจกรรมทางการเกษตรตั้งแต่สองกิจกรรมขึ้นไป⁽²⁰⁾ อาจทำให้มีโอกาสเกิดน้ำนิ่งขัง ทั้งในภาชนะอุปกรณ์ทางการเกษตร ตลอดจนพื้นที่การทำเกษตร

เช่นเดียวกับเหมืองแร่ บ่อขุด ซึ่งนำลักษณะดังกล่าวเป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของยุงลาย⁽¹⁾ นอกจากนี้แล้วการเปลี่ยนแปลงของลักษณะการใช้ประโยชน์ที่ดินยังเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้แหล่งที่อยู่ของยุงเพิ่มมากขึ้น⁽²¹⁾ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มจำนวนของยุงลายพาหะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าพื้นที่เกษตรกรรม โดยเฉพาะไร่นาสวนผสม และพื้นที่เหมืองแร่/บ่อขุด เป็นพื้นที่ที่มีอัตราการติดเชื้อสูงที่สุดซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาอื่น ๆ ทั่วโลก เช่น การศึกษาของ Vanwambeke และคณะ ในปี 2554 ที่เมือง Oahu ในรัฐ Hawaii พบว่าพื้นที่ผสมระหว่างสิ่งปลูกสร้างและพืชไร่กลายเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมในการเพาะพันธุ์ของ *Aedes albopictus*⁽²²⁾ เช่นเดียวกับ Adnan และคณะ ที่พบว่าชุมชนที่มีสนามเด็กเล่นและบ้านที่ปลูกพืชยืนต้นไม้ผลเป็นร่มเงาคลุมบ้านใน Kuala Lumpur ประเทศ Malaysia มีประวัติการเป็นโรคไข้เดงกีสูงกว่าชุมชนอื่นในปี 2564⁽⁸⁾ และการศึกษาของ Andrade, A.C. ในปี 2566 พบว่าเทศบาลเมืองที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดินสูงจากพื้นที่ป่าเป็นพื้นที่ทางการเกษตรและอื่น ๆ ของรัฐ Minas Gerais State ประเทศ Brazil มีโอกาสเจ็บป่วยจากโรคไข้เดงกีสูงกว่าเทศบาลที่มีการเปลี่ยนแปลงต่ำ⁽²³⁾ สำหรับการศึกษาในประเทศก่อนหน้านี้ในจังหวัดสุโขทัยของ Nakhapakorn และ Tripathi ในปี 2548 และจังหวัดพิษณุโลกของ Sarfraz และคณะ ในปี 2555 พบว่าพื้นที่ที่พบการระบาดของไวรัสเดงกีเป็นพื้นที่ทางการเกษตร นาข้าว พื้นที่ชุ่มน้ำ และพื้นที่กึ่งเมือง^(24, 25) แต่อย่างไรก็ตาม การติดเชื้อไวรัสเดงกีขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยร่วมด้วย เช่น อุณหภูมิ สภาพอากาศ

ลักษณะบ้านเรือน ที่อยู่อาศัย นโยบายของรัฐ สภาพทางเศรษฐกิจสังคม เป็นต้น^(6-9, 23)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นพื้นที่เสี่ยงติดเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งมีประโยชน์สำหรับการนำไปใช้ในการวางแผนเพื่อควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้เดงกีและไข้เลือดออกเดงกีได้ อย่างไรก็ตาม การเก็บข้อมูลของผู้เข้ารับบริการการตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสเดงกีของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติและมีที่พักอาศัยในพื้นที่จังหวัดปทุมธานีเท่านั้น ซึ่งหากมีการเพิ่มข้อมูลของสถานพยาบาลอื่น ๆ ในจังหวัดปทุมธานี ผลการศึกษาจะฉายจากทัศนพื้นที่เสี่ยงติดเชื้อไวรัสเดงกีได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

สรุป

การศึกษาข้อมูลการตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสเดงกีของผู้เข้ารับบริการโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2565 และการใช้ประโยชน์ที่ดินของจังหวัดปทุมธานี อ้างอิงจากข้อมูลของกรมพัฒนาที่ดินปี พ.ศ. 2564 ประมวลร่วมกับแผนที่จังหวัดปทุมธานีแบบแยกรายตำบล ด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (โปรแกรม QGIS version 3.26.3 Buenos Aires) สามารถแสดงแผนที่จุดตำแหน่งของพื้นที่เสี่ยงติดเชื้อไวรัสเดงกีของจังหวัดปทุมธานีได้ ผลการศึกษาพบว่าพื้นที่เกษตรกรรมแบบเกษตรผสมผสาน ไร่นาสวนผสม และพื้นที่เหมืองแร่ บ่อขุด เป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการพบการระบาดของโรค ซึ่งหน่วยงานทางด้านสาธารณสุขสามารถนำข้อมูลไปพิจารณาวางแผน และจัดสรรทรัพยากรที่จำเป็น เพื่อควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้เดงกี และไข้เลือดออกเดงกี

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติเป็นอย่างสูงที่อนุญาตให้ข้อมูลสำหรับการทำวิจัย ขอคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเพชร จิรขจรกุล สาขาวิชาเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับการสอนใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ออนไลน์ ที่ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการวิเคราะห์ข้อมูลจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Division of Vector borne Diseases. The handbook of dengue fever and dengue hemorrhagic fever in medical and public health. Nonthaburi: Division of Vector Borne Disease, Ministry of Public Health; 2015. (in Thai)
2. Kraemer MUG, Reiner RC Jr, Brady OJ, *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Nat Microbiol 2019; 4: 854-63.
3. Department of Disease Control. National Disease Surveillance (Report 506). (in Thai).
4. Paz-Bailey G, Adams L, Wong JM, *et al.* Dengue vaccine: recommendations of the advisory committee on immunization practices, United States, 2021. MMWR Recomm Rep 2021; 70: 1-16.
5. Saita S, Maeakhian S, Silawan T. Temporal variations and spatial clusters of dengue in Thailand: longitudinal study before and during the coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Trop Med Infect Dis 2022; 7: 171.
6. Kesetyaningsih TW, Andarini S, Sudarto, Pramodyo H. Determination of environmental factors affecting dengue incidence in Sleman district Yogyakarta, Indonesia. Afr J Infect 2018; 12: 13-25.
7. Faruk MO, Jannat SN, Rahman MS. Impact of environmental factors on the spread of dengue fever in Sri Lanka. Int J Environ Sci Technol (Tehran). 2022; 19: 10637-48.
8. Adnan RA, Ramli MF, Othman HF, Asha'ri ZH, Ismail SNS, Samsudin S. The impact of sociological and environmental factors for dengue infection in Kuala Lumpur, Malaysia. Acta Trop 2021; 216: 105834.
9. Li C, Wu X, Sheridan S, *et al.* Interaction of climate and socio-ecological environment drives the dengue outbreak in epidemic region of China. PLoS Negl Trop Dis 2021; 15: e0009761.
10. Uchejeso OM, Maduka MK, Obiora ER. Medical laboratory science; the distortion of nomenclature across the globe. New Zeal J Med Lab Sci 2020; 74: 52.

11. The Medical Technology Council of Thailand. The first step is to become a medical technologist. [Internet]. The Medical Technology Council of Thailand. [cited 31/05/2023]. Available from: <https://mtcouncil.org/intro-to-mt/>.
12. Thammasat University Hospital. The medical technologist [Internet]. Thammasat University Hospital. [cited 31/5/2023]. Available from: <https://www.hospital.tu.ac.th/hrd/upload/addsome/files/2023010410175987.pdf>
13. Saengnil W, Wongbutdee J. The geography information system in medical and public health. [Internet]. College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University. 2007 [cited 27/10/2565]. Available from: http://www.cmp.ubu.ac.th/th/detail_article.php?article=00090&=8334956828a8ec0a5d9e924f6e77d8c9. (in Thai).
14. Davenhall WF, Kinabrew C. GIS in health and human services: Springer Handbook of Geographic Information 2012: 557-78.
15. Land Development Department. Soil service and landuse [Internet]. Land Development Department. 2021 [cited 31/05/2023]. Available from: <https://dinonline.1dd.go.th/Login.aspx?service=3>.
16. Epidemiology and Emergency Operation Unit. The summary case report for denguevirus infectious disease, 2023. [Internet]. Division of vector borne disease, Ministry of Public health. 2023 [cited July 12, 2023]. Available from: <https://lookerstudio.google.com/reporting/dfa7d4e2-b7f5-48ed-b40a-54f1cd4cbdfb/page/cFWgC?s=uJijraAskGk>. (in Thai).
17. Intawong K, Olson D, Chariyalertsak S. Application technology to fight the COVID-19 pandemic: Lessons learned in Thailand. *Biochem Biophys Res Commun* 2021; 534: 830-6.
18. Wongtanarasasin W, Srisawang T, Yothiya W, Phinyo P. Impact of national lockdown towards emergency department visits and admission rates during the COVID-19 pandemic in Thailand: A hospital-based study. *Emerg Med Australas* 2021; 33: 316-23.
19. Apisarnthanarak A, Apisarnthanarak P, Siripraparat C, Saengaram P, Leeprechanon N, Weber DJ. Impact of anxiety and fear for COVID-19 toward infection control practices among Thai healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020; 41: 1093-4.

20. Kamphaeng Phet Provincial Agriculture and Cooperation Extension Office. Diversified farm [Internet]. Kamphaeng Phet Provincial Agriculture and Cooperation Extension Office. [cited 4/1/2024]. Available from: <https://www.opsmoac.go.th/kamphaengphet-manual-files-421591791811>. (in Thai).
21. Vanwambeke SO, Lambin EF, Eichhorn MP, Flasse SP, Harbach RE, Oskam L, *et al*. Impact of land-use change on dengue and malaria in northern Thailand. *Ecohealth* 2007; 4: 37-51.
22. Vanwambeke SO, Bennett SN, Kapan DD. Spatially disaggregated disease transmission risk: land cover, land use and risk of dengue transmission on the island of Oahu. *Trop Med Int Health* 2011; 16: 174-85.
23. Andrade AC, Falcão LAD, Borges MAZ, Leite ME, Santo MMdE. Land use and cover changes and the occurrence of dengue fever in Minas Gerais State, Brazil: Governing Deforestation for Public Health. Preprints: Preprints; 2023.
24. Nakhapakorn K, Tripathi NK. An information value based analysis of physical and climatic factors affecting dengue fever and dengue haemorrhagic fever incidence. *Int J Health Geogr* 2005; 4: 13.
25. Sarfraz MS, Tripathi NK, Tipdecho T, Thongbu T, Kerdthong P, Souris M. Analyzing the spatio-temporal relationship between dengue vector larval density and land-use using factor analysis and spatial ring mapping. *BMC Public Health* 2012; 12: 853.

Efficiency of Rapid Brilliant Cresyl Blue Staining for Detecting Hemoglobin H Inclusion Bodies in Red Blood Cells

Ekkapong Boriboonwong^{1*} and Plubplueng Sansai²

¹*Division of Clinical Hematology and Microscopy, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province, Thailand*

²*Division of Clinical Chemistry and Toxicology, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province, Thailand*

Abstract

Hemoglobin H disease can be diagnosed by the identification of hemoglobin (Hb) H inclusion in red blood cells; however, a long incubation period of the blood-dye mixture is required for the testing procedure. The objective of this study was to investigate the impact of shortening the Brilliant cresyl blue staining duration on the ability to identify HbH inclusion bodies in red blood cells. Blood samples were collected from 28 HbH disease patients and 30 healthy individuals. Hemoglobin typing was conducted by using HPLC. Incubation of the blood with Brilliant cresyl blue at 37°C for 30 and 120 minutes were set up for the detection of HbH inclusion bodies. Paired student's *t*-test were utilized to assess the reliability of the test results and the variances in the number of HbH inclusion bodies. There were no HbH inclusion bodies found in the healthy control bloods. Conversely, the HbH inclusion bodies were detected in all HbH disease samples at the incubation times of 30 and 120 minutes. The quantities of HbH inclusion bodies at 30- and 120-minute incubation times were 43.7 ± 23.6 and 39.9 ± 22.1 , respectively. There was no statistical significance in both incubation times ($p < 0.05$). These reveal significant amounts of HbH inclusion bodies detected following 30 minutes staining. Therefore, the identification of HbH inclusion elements using this 30 minutes staining method could facilitate a better turnaround time.

Keywords: Hemoglobin H inclusion, Red blood cell, HbH disease, Alpha globin gene

*Corresponding author E-mail address: ekaphong.bo@up.ac.th

ประสิทธิภาพของการย้อม Brilliant Cresyl Blue อย่างรวดเร็ว เพื่อตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

เอกพงศ์ บริบุญวงศ์^{1*} และ พลัปปึง แสนใส²

¹แขนงวิชาโลหิตวิทยาและจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

²แขนงวิชาเคมีคลินิกและพิษวิทยา สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

บทคัดย่อ

การตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถช่วยวินิจฉัยโรคฮีโมโกลบินเอชได้ อย่างไรก็ตามขั้นตอนการตรวจจำเป็นต้องอุ่นเลือดกับสีย้อมไว้เป็นเวลานาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการปรับลดระยะเวลาการย้อมด้วย Brilliant cresyl blue ในการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันในเซลล์เม็ดเลือดแดง ตัวอย่างเลือดคนปกติ จำนวน 30 ราย และผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช จำนวน 28 ราย ถูกนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีด้วยการอุ่นส่วนผสมเลือดกับสี Brilliant cresyl blue ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และ 120 นาที วิเคราะห์ความถูกต้องของผลการตรวจโดยใช้ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเป็นมาตรฐาน วิเคราะห์ความสอดคล้องของผลการตรวจ และเปรียบเทียบจำนวนฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีด้วยสถิติ paired student's *t*-test จากการศึกษา ผู้วิจัยตรวจไม่พบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในกลุ่มตัวอย่างคนปกติ ขณะที่ตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในกลุ่มผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชทุกราย และให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 100 ทั้งการย้อมด้วยเวลา 30 และ 120 นาที จำนวนฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีที่ย้อมด้วยเวลา 30 และ 120 นาที เท่ากับ 43.7 ± 23.6 และ 39.9 ± 22.1 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การย้อมเป็นเวลา 30 นาทีมีแนวโน้มที่ตรวจพบจำนวนฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีได้มากกว่า ดังนั้นการย้อม Brilliant cresyl blue เป็นเวลา 30 นาที สามารถตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเม็ดเลือดแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาการตรวจและการรอคอยผลได้

คำสำคัญ: ฮีโมโกลบินเอชอินคลูชัน เซลล์เม็ดเลือดแดง โรคฮีโมโกลบินเอช ยีนแอลฟาโกลบิน

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: ekaphong.bo@up.ac.th

รับบทความ: 20 มีนาคม 2567

แก้ไขบทความ: 20 มิถุนายน 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 27 กรกฎาคม 2567

บทนำ

โรคฮีโมโกลบินเอชเป็นโรคในกลุ่มแอลฟาธาลัสซีเมีย (α -thalassemia) ที่มีสาเหตุจากการขาดหายไปหรือมีความบกพร่องของยีนที่สร้างสาย α -globin มากถึง 3 ยีนจากทั้งหมด 4 ยีน ($--/\alpha$ หรือ $--/\alpha\alpha^T$ หรือ $--/\alpha^T\alpha$) ทำให้สายโปรตีน α -globin ถูกสร้างลดลงอย่างมากและเป็นผลให้สายโปรตีน β -globin อิสระคงเหลืออยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก จนเกิดการเข้าคู่กันเอง 4 สาย (β_4) เรียกฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดนี้ว่า “ฮีโมโกลบินเอช (HbH)” ซึ่งไม่เสถียร สามารถตกตะกอนภายในเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกทำลายของเซลล์ได้ ผู้ที่เป็นโรคนี้จึงมักจะมีภาวะโลหิตจาง⁽¹⁾ โรค HbH มีรายงานพบร้อยละ 0.1-0.5 ในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทะเลเมดิเตอร์เรเนียน⁽²⁾

ด้วยโครงสร้างระดับโมเลกุลของ HbH ไม่เสถียร HbH จึงถูกออกซิไดซ์ได้ด้วยสี Brilliant cresyl blue หรือ methylene blue (redox dye) ได้⁽³⁾ ซึ่งเมื่อย้อมเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยสีดังกล่าวและอุ่นไว้ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง HbH จะถูกออกซิไดซ์และตกตะกอนเป็นเม็ดกลมสีน้ำตาลคล้ายลูกกอล์ฟอยู่ภายในเซลล์ (golf-ball like inclusion) เรียกว่าฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ ซึ่งมองเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดาที่กำลังขยาย 400-1,000 เท่า⁽³⁻⁶⁾ ผลการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยโรค HbH จะตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ได้ร้อยละ 100 โดยพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอินคลูชันดังกล่าวร้อยละ 33-95 ของเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด⁽⁴⁾ หลายการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าของการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ในผู้เป็น α -thalassemia ที่มี

genotype ต่าง ๆ ได้แก่ $-\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/-\alpha$, $--/\alpha\alpha$, $--/-\alpha$ พบว่าการทดสอบอินคลูชันบอดี้ให้ผลบวก (ตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ภายในเซลล์) ได้ในทุก genotype ในผู้ที่มี genotype ชนิด $-\alpha/\alpha\alpha$ ให้ผลบวกต่อการตรวจฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้เพียงร้อยละ 59 เช่นเดียวกับผู้ที่มี genotype $-\alpha/-\alpha$ โดยพบมีอัตราส่วนของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1:1,000-1:10,000 ส่วนในผู้เป็นพาหะ α -thalassemia 1 ($--/\alpha\alpha$) พบมีอัตราการให้ผลบวกสูงถึงร้อยละ 87 (7 รายใน 8 ราย)⁽⁵⁾ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอัตราการตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้จะเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนยีน α -globin ที่ผิดปกติไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Adirojnanon P และคณะ⁽⁴⁾ ที่ทำการศึกษายปริมาณ HbH และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ของผู้ป่วยโรค HbH ชนิด deletion ($--/-\alpha$) และ non-deletion ($--/\alpha^T\alpha$) ซึ่งพบว่าตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยทุกราย (ร้อยละ 100) โดยพบมีปริมาณมากถึงร้อยละ 67 ± 21 ในผู้ป่วยกลุ่ม deletion และร้อยละ 79 ± 18 ในผู้ป่วยกลุ่ม non-deletion

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจคัดกรองความผิดปกติของยีน α -globin ด้วยการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ โดยการย้อมด้วยสี Brilliant cresyl blue⁽⁶⁾ โดยศึกษาในตัวอย่าง 509 ราย จากผู้ที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงตัวเล็กและมีจำนวนมากกว่าค่าปกติ ผลการศึกษาพบว่าผู้เป็นพาหะ α -thalassemia 1 จำนวน 180 ราย ตรวจพบอินคลูชันบอดี้ทุกราย (ร้อยละ 100) โดยอัตราการพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้

0.1-30 ต่อ 1,000 เซลล์เม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นการตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในสภาวะอื่นที่ไม่มีความผิดปกติของยีน α -globin ได้ด้วย (false positive) ซึ่งพบได้สูงถึงร้อยละ 8.2 เช่น พาะ β -thalassemia ภาวะซีดจากการขาดธาตุเหล็ก อย่างไรก็ตาม ผลการตรวจไม่พบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในคนปกติ ดังนั้นการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือที่สามารถช่วยในการคัดกรองพาะ α -thalassemia ได้ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีความชุกของ α -thalassemia สูง⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Chan AY และคณะ⁽⁸⁾ พบว่าการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีมีความไวต่อการคัดกรองผู้เป็นโรค HbH และพาะ α -thalassemia 1 ร้อยละ 100 และ 95 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบผลบวกปลอมได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะขาดธาตุเหล็ก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pan LL และคณะ⁽⁶⁾ การตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดงจึงเป็นการทดสอบที่มีความไวต่อการวินิจฉัยโรค HbH ซึ่งสามารถทำได้ง่ายไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ปัจจุบันจึงมีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในโรงพยาบาลทั่วประเทศ

แม้ว่าการย้อมฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถช่วยวินิจฉัยโรค HbH ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งชนิดที่เป็น deletional HbH (HbH) และ non-deletional HbH (HbH-CS) และโดยเฉพาะในรายที่มีผลการตรวจ Hb typing ไม่พบการปรากฏของ HbH บน electrophoregram หรือ chromatogram⁽⁹⁾ แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัดคือใช้เวลาในการตรวจนาน เนื่องจากต้องอุ่นส่วนผสมเลือดกับสี Brilliant cresyl blue ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน อีกทั้งต้องใช้เวลาในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นเวลานาน รวมทั้งจำเป็นต้องใช้

ผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจด้วย จึงทำให้มีระยะเวลารอคอยผลที่นานในโรงพยาบาลบางแห่งกำหนดการรอคอยผลนานถึง 24-48 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยล่าช้าได้ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจโดยการปรับลดระยะเวลาการอุ่นส่วนผสมเลือดกับสี Brilliant cresyl blue โดยยังให้ผลการตรวจที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการย้อมตามวิธีมาตรฐาน⁽¹⁰⁾ ก็จะช่วยทำให้สามารถตรวจและรายงานผลได้เร็วขึ้น ลดระยะเวลาการรอคอยผล แพทย์สามารถให้การวินิจฉัยและวางแผนการรักษาผู้ป่วยได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการหน่วยจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่ HREC-UP-HSST 1.2/012/67

ตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยา

งานวิจัยนี้ทำการศึกษากับตัวอย่างเลือดที่มี ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็งที่เหลือจากการตรวจในงานประจำวันจากผู้เข้ารับบริการในโรงพยาบาลพะเยา จำนวน 58 ราย จำแนกเป็นคนปกติ (ไม่มีภาวะซีดและค่าพารามิเตอร์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่พบมีค่าต่ำหรือสูงกว่าปกติในทุกพารามิเตอร์ และมีผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินเป็น A_2A และมีปริมาณ HbA_2 อยู่ในช่วงปกติ (ร้อยละ 2.0-3.5)) จำนวน 30 ราย คัดเลือกจากกลุ่มผู้มารับบริการตรวจสุขภาพประจำปี และผู้ป่วยโรค HbH จำนวน 28 ราย (วินิจฉัยจากการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน โดยมีการปรากฏของ HbH บน chromatogram)

การตรวจวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง 8 ค่าประกอบด้วย red blood cell (RBC) count, hemoglobin concentration (Hb),

hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) และ red cell distribution width (RDW) ด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติยี่ห้อ Sysmex รุ่น XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) ตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Premier-Resolution high pressure liquid chromatography (Trinity Biotech, Bray, County Wicklow, Ireland) การตรวจพารามิเตอร์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง และ Hb typing ดำเนินการภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างเลือด

การตรวจหา HbH inclusion bodies

ตัวอย่างเลือดทั้ง 58 ราย ถูกนำมาตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของฮีโมโกลบินและเซลล์เม็ดเลือดแดง ตัวอย่างเลือดทุกรายถูกเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการทดสอบ ตัวอย่างเลือดทั้งหมดถูกแบ่งเลือดออกเป็น 2 ชุด (A และ B) ขั้นตอนการตรวจจะทำการผสมตัวอย่างเลือด 1 ส่วนกับ 1% Brilliant cresyl blue 1 ส่วน ในหลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิเมตร ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส โดยชุด A จะใช้เวลาการอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที⁽¹⁰⁾ และชุด B จะใช้เวลาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำส่วนผสมจำนวน 20 ไมโครลิตร มาหยดลงบนสไลด์แก้วแล้วไลสเมียร์บางจำนวน 3 แผ่น ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 นาที แล้ว

ทำการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้จะพบตะกอนฮีโมโกลบินติดสีน้ำเงิน มีลักษณะกลมคล้ายลูกกอล์ฟ (golf-ball like inclusion) การตรวจและนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ทำโดยนักเทคนิคการแพทย์ที่มีความชำนาญ จำนวน 3 คน โดยแต่ละคนทำการตรวจสเมียร์ทั้งหมดที่ย้อมด้วย 2 สภาวะดังกล่าว เพื่อความเที่ยงตรงของการตรวจ ผู้วิจัยได้ทำการกำหนดเป็นรหัสบับนสไลด์ โดยนักเทคนิคการแพทย์จะไม่ทราบกลุ่มตัวอย่างและสภาวะการย้อม นักเทคนิคการแพทย์ทำการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 1,000-1,500 เซลล์ และคำนวณปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้เป็นร้อยละของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตรวจทั้งหมด

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ที่ตรวจโดยนักเทคนิคการแพทย์ทั้ง 3 คน ในทั้ง 2 สภาวะมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบจำนวนฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ระหว่าง 2 สภาวะด้วยสถิติ paired student's *t*-test และระหว่างชนิดของโรค HbH ด้วย สถิติ independent student's *t*-test วิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (IBM SPSS Inc, USA. Ver. 22) ค่า *p* value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและดัชนีเม็ดเลือดแดง ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินของตัวอย่างกลุ่มคนปกติทั้ง 30 ราย แสดงใน Table 1 โดยผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินพบเป็นชนิด A_2A ทั้งหมด มีลักษณะโครมาโตแกรมดังแสดงใน Fig. 1A มีปริมาณ HbA_2 เท่ากับร้อยละ 2.9 ± 0.27 (ร้อยละ 2.3-3.3) และ HbF เท่ากับ ร้อยละ 0.25 ± 0.42 (ร้อยละ 0.0-1.3) ผลตรวจวิเคราะห์พารามิเตอร์เซลล์เม็ดเลือดแดงพบว่าตัวอย่างทุกรายไม่มีภาวะโลหิตจาง และไม่พบว่ามีเม็ดเลือดแดงชนิด microcyte และ hypochromia มีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ RBC count, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW เท่ากับ $4.43 \pm 0.35 \times 10^6$ /ไมโครลิตร, 13.52 ± 0.97 กรัม/เดซิลิตร, ร้อยละ 39.56 ± 2.45 , 89.52 ± 3.84 เฟมโตลิตร, 30.59 ± 1.60 พิโกกรัม, 34.18 ± 1.06 กรัม/เดซิลิตร, ร้อยละ 13.23 ± 0.99 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรค HbH มีค่าเท่ากับ 4.49 ± 0.87 ($\times 10^6$ /ไมโครลิตร), 8.25 ± 1.17 กรัม/เดซิลิตร, ร้อยละ 27.60 ± 3.62 , 62.48 ± 6.13 เฟมโตลิตร, 18.63 ± 1.63 พิโกกรัม, 29.87 ± 1.42 กรัม/เดซิลิตร, ร้อยละ 24.76 ± 1.99 ตามลำดับ ตัวอย่างทั้งหมดแสดงภาวะโลหิตจางที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงแบบ microcytic hypochromic anemia (Table 2) ผลการตรวจ Hb typing พบเป็นชนิด A_2AH จำนวน 19 ราย มีลักษณะโครมาโตแกรมดังแสดงใน Fig. 1B และ CSA_2AH จำนวน 9 ราย (Fig. 1C) ปริมาณ HbA_2 และ HbH สรุปไว้ใน Table 2

ผลตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีโดยนักเทคนิคการแพทย์ทั้ง 3 คน พบว่าในกลุ่ม

ตัวอย่างคนปกติทั้ง 30 ราย ตรวจไม่พบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี ทั้งที่อุ้มนาน 30 นาที และ 120 นาที ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ย้อมได้แสดงดัง Fig. 2 ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค HbH ทั้ง 28 ราย ตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีทั้ง 2 ระยะเวลาการย้อม ลักษณะของฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีที่พบในเซลล์เม็ดเลือดแดงแสดงไว้ใน Fig. 3 และ 4 โดยให้ผลการตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีสอดคล้องกันจากนักเทคนิคการแพทย์ทั้ง 3 คน ดังแสดงใน Table 3

ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในผู้ป่วยโรค HbH แต่ละราย ทั้งการย้อมที่ใช้เวลา 30 และ 120 นาที สรุปไว้ใน Table 4 การย้อมที่ใช้เวลา 30 นาที ตรวจพบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 43.70 ± 23.55 (5.30-80.16) และ 39.90 ± 22.06 (4.95-75.82) เมื่อใช้เวลาย้อม 120 นาที (Table 5) ซึ่งค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ดังกล่าวทั้ง 2 ระยะเวลาการย้อมนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยดังกล่าวระหว่างการย้อมที่ใช้เวลา 30 และ 120 นาที จำแนกตามชนิดของโรค HbH พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p = 0.002$ ในโรค HbH และ $p = 0.012$ ในโรค HbH-CS การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีระหว่างผู้ป่วยโรค HbH และ HbH-CS พบว่า ผู้ป่วยโรค HbH มีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ดังกล่าวต่ำกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรค HbH-CS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ ของทั้ง 2 ระยะเวลาการย้อม ดังแสดงใน Table 5

Table 1 Hematological parameters, red blood cell indices, Hb typing, and relative amounts of each Hb fraction from 30 healthy individuals.

No.	Hematological parameters							Hb typing			
	RBC (x10 ⁶ /uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Hb type	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
1	4.99	14.40	42.10	84.40	28.90	34.20	13.70	A ₂ A	90.40	3.20	0.00
2	4.61	13.30	39.90	86.60	28.90	33.30	13.00	A ₂ A	89.80	2.30	0.00
3	4.27	12.60	38.00	89.00	29.50	33.20	14.20	A ₂ A	88.00	2.50	0.40
4	4.28	13.90	42.00	98.10	32.50	33.10	12.40	A ₂ A	88.20	3.20	0.00
5	4.05	12.60	36.50	90.10	31.10	34.50	13.40	A ₂ A	90.30	3.20	0.00
6	4.71	13.40	40.40	85.80	28.50	33.20	14.00	A ₂ A	89.30	3.20	0.00
7	4.79	15.20	42.50	88.70	31.70	35.80	11.30	A ₂ A	90.10	3.00	0.00
8	5.15	15.10	44.10	85.60	29.30	34.20	12.00	A ₂ A	88.70	2.70	0.00
9	4.82	13.80	42.10	87.30	28.60	32.80	12.80	A ₂ A	89.00	2.70	0.80
10	4.04	12.90	37.20	92.10	31.90	34.70	12.50	A ₂ A	87.90	3.10	0.80
11	4.58	13.60	39.10	85.40	29.70	34.80	13.80	A ₂ A	88.90	2.60	0.00
12	4.33	13.50	39.30	90.80	31.20	34.40	12.40	A ₂ A	89.70	2.90	0.00
13	4.82	15.50	45.20	93.80	32.20	34.30	12.90	A ₂ A	86.30	2.60	0.00
14	4.72	14.10	40.10	85.00	29.90	35.20	13.70	A ₂ A	88.30	3.10	0.00
15	4.36	13.40	39.50	90.60	30.70	33.90	13.20	A ₂ A	87.50	3.20	0.00
16	4.25	14.50	39.20	92.20	34.10	37.00	13.40	A ₂ A	86.80	3.20	0.00
17	4.56	14.30	41.50	91.00	31.40	34.50	14.90	A ₂ A	82.90	2.40	0.90
18	4.17	12.60	38.10	91.40	30.20	33.10	13.40	A ₂ A	87.80	2.80	0.60

Table 1 Hematological parameters, red blood cell indices, Hb typing, and relative amounts of each Hb fraction from 30 healthy individuals. (Cont.)

No.	Hematological parameters							Hb typing			
	RBC (x10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Hb type	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
19	4.44	13.30	38.60	86.90	30.00	34.50	12.70	A ₂ A	88.80	2.90	0.00
20	4.34	12.60	36.70	84.60	29.00	34.30	13.60	A ₂ A	87.70	3.00	0.70
21	3.87	12.50	36.70	94.80	32.30	34.10	13.50	A ₂ A	87.80	3.00	0.00
22	3.70	12.10	35.70	96.50	32.70	33.90	12.60	A ₂ A	88.50	3.10	0.00
23	4.45	12.10	38.00	85.40	27.20	31.80	13.10	A ₂ A	86.20	2.70	1.10
24	4.35	14.50	40.30	92.60	33.30	36.00	13.20	A ₂ A	87.10	3.00	1.00
25	3.96	12.20	37.30	94.20	30.80	32.70	14.00	A ₂ A	88.90	2.80	0.00
26	4.25	13.70	40.10	94.40	32.20	34.20	11.70	A ₂ A	89.80	2.60	0.00
27	4.87	14.60	42.10	86.40	30.00	34.70	13.40	A ₂ A	89.40	3.30	0.00
28	4.02	12.10	34.90	86.80	30.10	34.70	15.30	A ₂ A	87.30	2.70	1.30
29	4.58	13.50	40.40	88.20	29.50	33.40	15.30	A ₂ A	88.80	3.20	0.00
30	4.50	13.70	39.10	86.90	30.40	35.00	11.40	A ₂ A	89.70	2.80	0.00

RBC: red blood cell; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width

Table 2 Hematological parameters, red blood cell indices, Hb typing and relative amounts of each Hb fraction from 28 HbH disease patients.

No.	Hematological parameters							Hb typing			
	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Hb type	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbH (%)
1	5.17	9.40	30.50	59.00	18.20	30.80	25.30	A ₂ AH	89.30	1.60	2.50
2	3.41	6.90	22.10	64.80	20.20	31.20	24.80	A ₂ AH	88.10	1.40	4.20
3	5.11	8.70	29.90	58.50	17.00	29.10	25.90	A ₂ AH	91.10	1.40	4.70
4	3.93	6.90	22.50	57.30	17.60	30.70	23.80	A ₂ AH	87.20	1.80	3.90
5	3.12	6.10	20.00	64.10	19.60	30.50	25.80	A ₂ AH	84.00	1.50	8.20
6	4.84	8.70	29.00	59.90	18.00	30.00	22.10	A ₂ AH	86.40	1.40	4.00
7	4.20	7.60	25.60	61.00	18.10	29.70	26.20	A ₂ AH	79.80	2.00	3.80
8	3.78	7.00	25.60	67.70	18.50	27.30	24.90	A ₂ AH	85.50	1.10	5.60
9	5.43	9.10	29.10	53.60	16.80	31.30	25.20	A ₂ AH	86.10	1.60	4.00
10	4.96	8.80	29.70	59.90	17.70	29.60	23.50	A ₂ AH	89.40	1.30	2.50
11	4.58	9.10	28.80	62.90	19.90	31.60	30.30	A ₂ AH	89.40	1.00	4.00
12	5.97	9.50	30.90	51.80	15.90	30.70	23.30	A ₂ AH	89.80	1.70	2.00
13	3.86	8.40	26.80	69.40	21.80	31.30	23.00	A ₂ AH	87.60	2.00	2.50
14	5.01	9.60	31.20	62.30	19.20	30.80	25.30	A ₂ AH	91.60	1.30	1.90
15	5.56	9.40	29.60	53.20	16.90	31.80	21.40	A ₂ AH	88.40	1.40	2.80
16	4.01	8.00	26.50	66.10	20.00	30.20	25.30	A ₂ AH	87.20	1.00	4.70
17	4.90	9.90	32.90	67.10	20.20	30.10	23.50	A ₂ AH	88.80	1.20	5.30
18	5.89	9.50	29.70	50.40	16.10	32.00	25.60	A ₂ AH	90.00	1.70	2.50
19	5.45	9.70	31.10	57.10	17.80	31.20	22.90	A ₂ AH	87.80	1.80	4.40

Table 2 Hematological parameters, red blood cell indices, Hb typing and relative amounts of each Hb fraction from 28 HbH disease patients.
(Cont.)

No.	Hematological parameters							Hb typing			
	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Hb type	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbH (%)
20	5.19	8.40	31.00	59.70	16.20	27.10	23.90	CSA ₂ AH	87.40	1.10	5.40
21	4.24	8.20	27.20	64.20	19.30	30.10	23.90	CSA ₂ AH	86.00	1.60	5.10
22	3.44	6.80	23.30	67.70	19.80	29.20	23.30	CSA ₂ AH	80.00	1.60	5.20
23	3.92	7.90	27.80	70.90	20.20	28.40	21.40	CSA ₂ AH	87.60	1.20	4.30
24	2.50	5.50	18.70	74.80	22.00	29.40	26.20	CSA ₂ AH	82.70	2.00	3.20
25	3.44	6.90	24.90	72.40	20.10	27.70	25.60	CSA ₂ AH	82.00	1.20	6.70
26	4.56	8.60	30.00	65.80	18.90	28.70	27.20	CSA ₂ AH	83.70	1.00	8.30
27	4.79	8.40	30.80	64.30	17.50	27.30	28.70	CSA ₂ AH	91.30	0.90	5.20
28	4.35	7.90	27.60	63.40	18.20	28.60	24.90	CSA ₂ AH	88.70	0.90	7.90

RBC: red blood cell; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width

Table 3 The results of HbH inclusion bodies examined in 30 healthy individuals and 28 HbH disease patients by three professional medical technologists.

Sample group (N)		Incubation time (30 mins)		Incubation time (120 mins)	
		Present	Absent	Present	Absent
Normal (30)	MT 1	0	30	0	30
	MT 2	0	30	0	30
	MT 3	0	30	0	30
HbH disease (28)	MT 1	28	0	28	0
	MT 2	28	0	28	0
	MT 3	28	0	28	0

Hb: Hemoglobin; MT: Medical technologist

Table 4 The percentage of red blood cells containing inclusion bodies obtained from 30 mins and 120 mins incubation time of 28 HbH disease patients.

Sample no.	Incubation time (30 mins)			Incubation time (120 mins)		
	Mean	SD	Min – Max	Mean	SD	Min – Max
1	43.76	11.40	33.72 – 56.15	39.29	8.21	32.72 – 48.50
2	39.03	2.72	36.21 – 41.64	40.66	5.34	34.63 – 44.81
3	32.24	10.39	24.49 – 44.05	34.95	8.13	29.44 – 44.29
4	22.43	14.39	10.96 – 38.58	14.51	2.47	12.40 – 17.22
5	32.00	3.60	29.34 – 36.09	28.77	3.73	25.14 – 32.60
6	15.28	6.92	8.13 – 21.95	14.96	6.41	7.78 – 20.11
7	10.57	2.13	8.86 – 12.96	10.26	4.34	5.25 – 12.76
8	53.58	5.83	47.05 – 58.24	42.42	18.31	21.29 – 53.69
9	22.72	3.66	19.35 – 26.61	20.71	1.59	18.96 – 22.08
10	44.14	2.13	41.68 – 45.45	34.77	8.82	25.00 – 42.15
11	71.84	3.12	69.50 – 75.38	66.54	14.79	49.63 – 77.02
12	21.54	2.90	19.18 – 24.78	19.81	1.52	18.05 – 20.69
13	41.07	3.75	36.77 – 43.64	43.36	1.17	42.53 – 44.70
14	37.12	3.95	32.78 – 40.52	30.63	1.24	29.37 – 31.84
15	14.38	1.22	13.21 – 15.65	14.42	0.88	13.41 – 15.00
16	65.88	0.54	65.25 – 66.23	55.98	1.14	55.00 – 57.23
17	36.16	1.60	34.95 – 37.97	28.08	1.27	26.96 – 29.46
18	16.50	3.28	13.50 – 20.00	14.01	1.93	12.40 – 16.15
19	5.30	1.25	4.49 – 6.74	4.95	0.91	4.25 – 5.98
20	80.19	1.88	78.08 – 81.67	72.97	15.36	55.50 – 84.35
21	49.88	6.39	42.63 – 54.71	53.62	4.68	50.45 – 58.99
22	70.04	1.67	68.70 – 71.91	65.32	1.67	63.61 – 66.94
23	74.89	0.89	73.88 – 75.55	70.71	1.47	69.25 – 72.18
24	31.42	1.62	30.19 – 33.25	25.71	2.98	23.48 – 29.09
25	80.01	1.09	78.84 – 81.01	75.82	0.92	74.93 – 76.76
26	60.57	2.23	58.13 – 62.50	57.03	1.17	55.85 – 58.18
27	78.92	1.49	77.20 – 79.83	67.27	2.86	64.04 – 69.49
28	71.99	1.18	70.73 – 73.08	69.62	2.49	67.60 – 72.40

Table 5 Percentage of red blood cells containing inclusion bodies. Data are presented as mean ± SD and min - max.

Group (N)	30 mins	120 mins	p-value
Normal (30)	0	0	-
Total HbH disease (28)	43.70 ± 23.55 (5.30 – 80.19)	39.90 ± 22.06 (4.95 – 75.82)	0.000
HbH (19)	32.92 ± 18.16 (5.30 – 71.84)	29.42 ± 16.26 (4.95 – 66.54)	0.002
HbH-CS (9)	66.44 ± 16.51 (31.42 – 80.19)	62.01 ± 15.40 (25.71 – 75.82)	0.012
p-value	0.000*	0.000*	

*compared HbH with HbH-CS

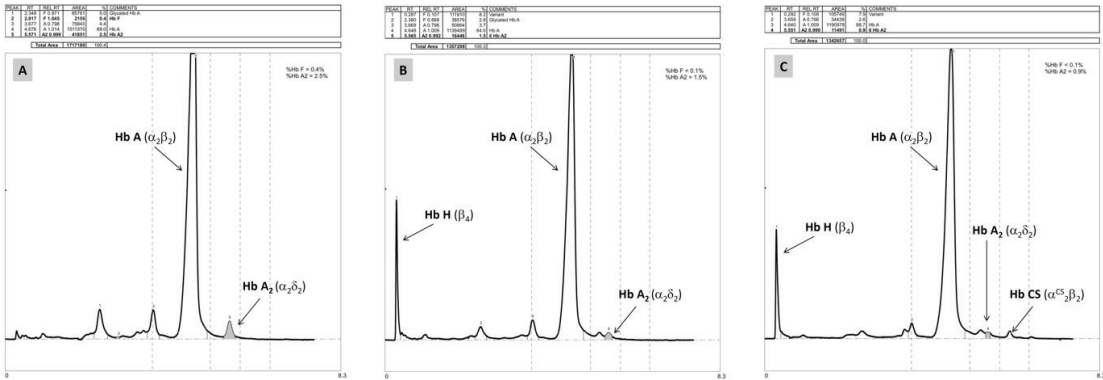


Fig. 1 Representative HPLC-chromatograms of healthy subjects (A), HbH disease (B) and HbH-CS disease (C).

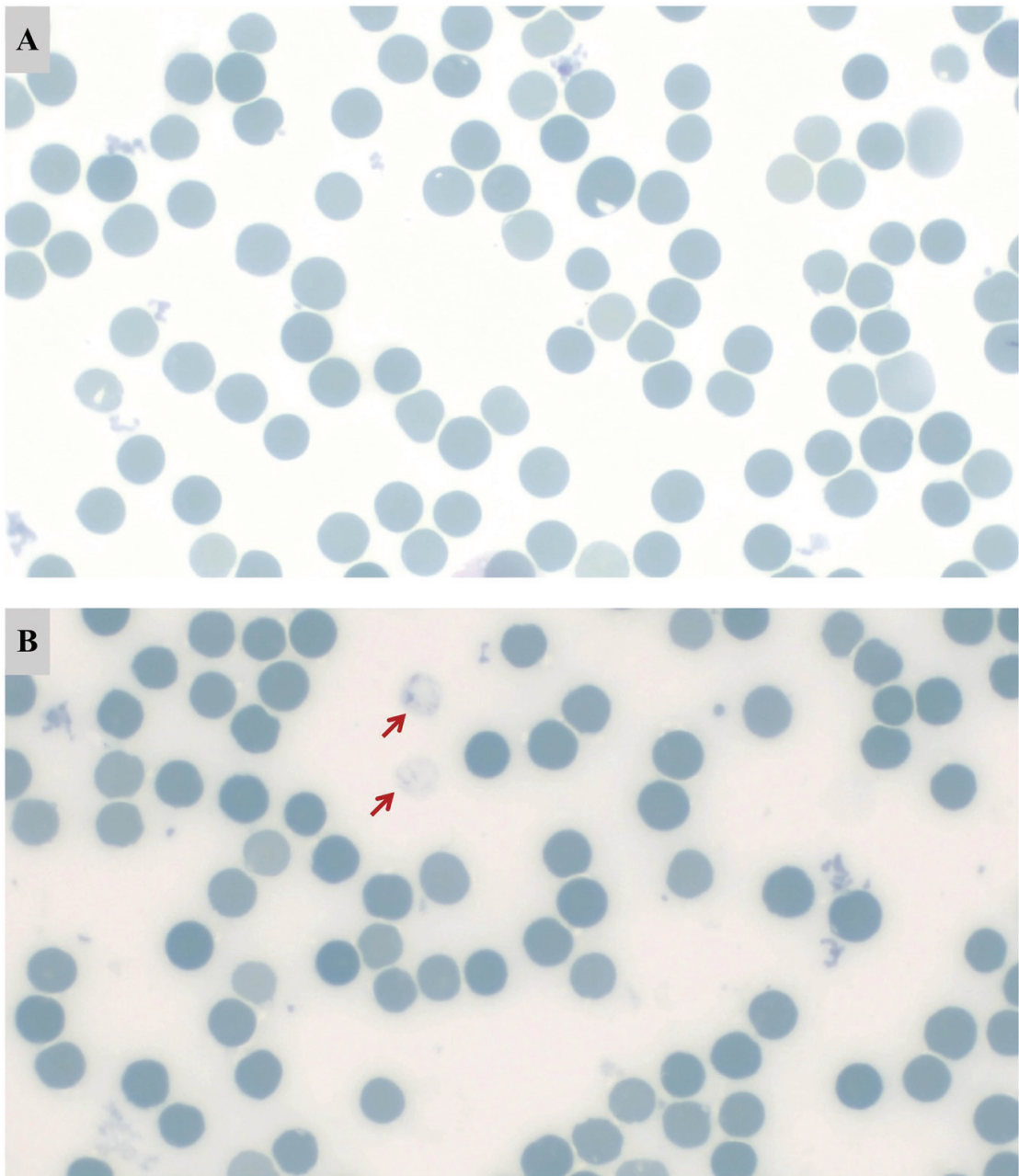


Fig. 2 Peripheral blood stained with 1% Brilliant cresyl blue in healthy subjects. Blood smears prepared after 30 min and 120 min of incubation time were illustrated in A and B, respectively. The red arrow indicates the leakage of hemoglobin, visible as faintly blue-stained erythrocytes.

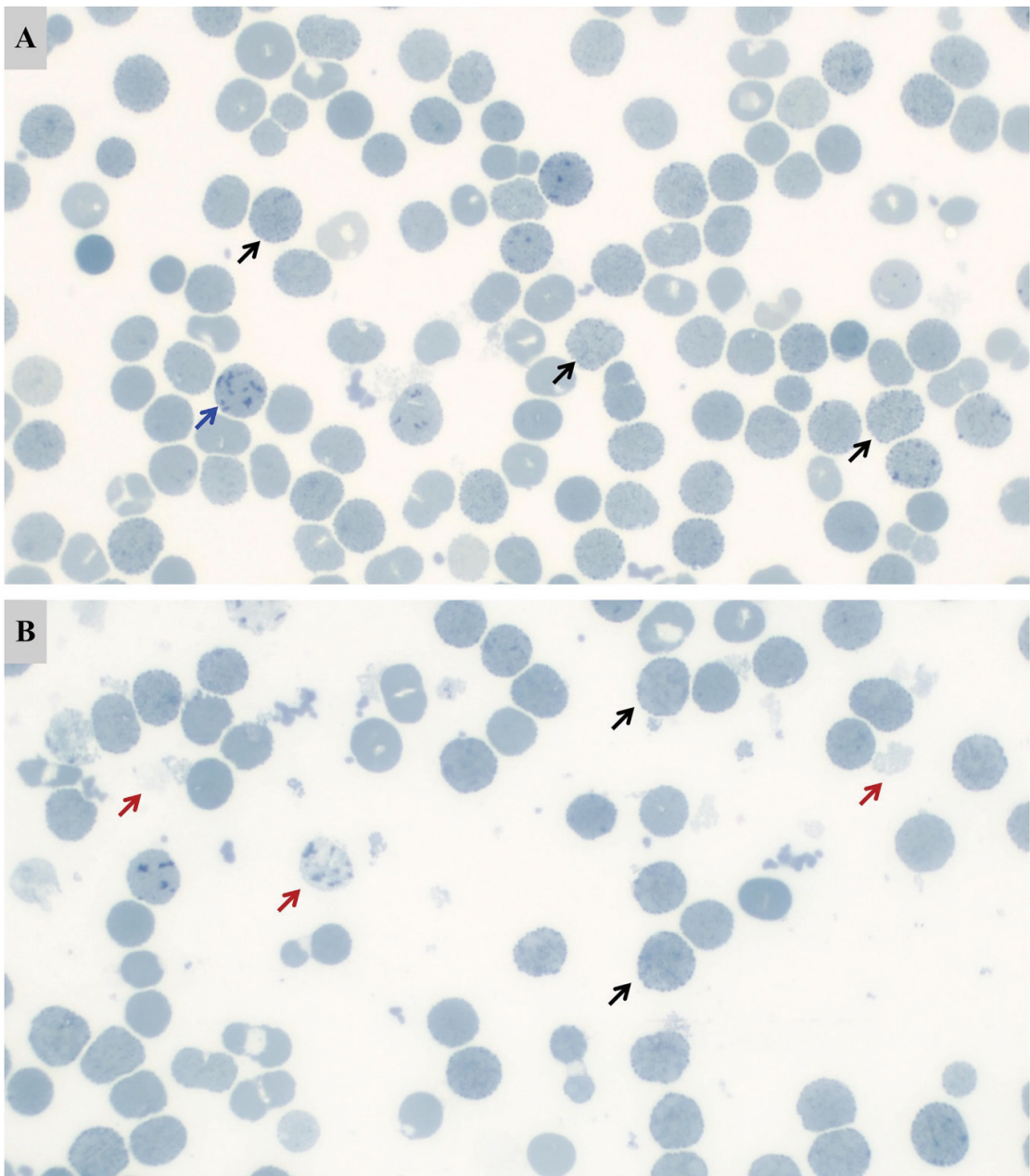


Fig. 3 Peripheral blood stained with 1% Brilliant cresyl blue in HbH disease samples. (A) demonstrated blood smears prepared after 30 min of incubation time. (B) demonstrated blood smears prepared after 120 min of incubation time. The black arrow indicates a 'golf ball'-like RBC containing an HbH inclusion body appearance compared with the surrounding normal red blood cells. The blue arrow indicates reticulocyte containing HbH inclusion body. The red arrow indicates the leakage of hemoglobin, visible as faintly blue-stained erythrocytes.

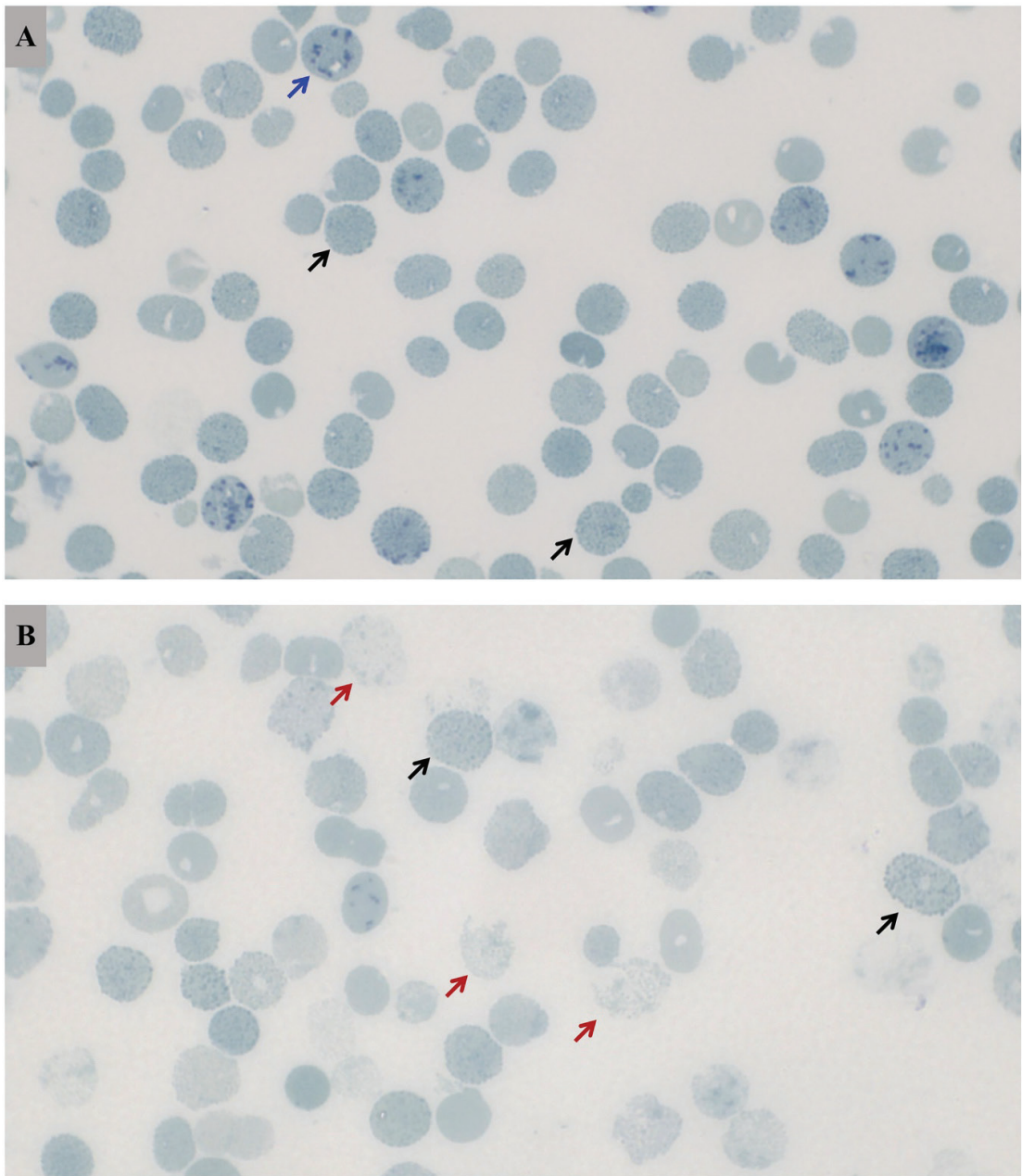


Fig. 4 Peripheral blood stained with 1% Brilliant cresyl blue in HbH-CS disease cases. (A) and (B) demonstrated blood smear prepared after 30 min and 120 min of incubation time, respectively. The black arrow indicates a 'golf ball'-like RBC containing an HbH inclusion. The blue arrow indicates reticulocyte containing HbH inclusion body. The red arrow indicates the leakage of hemoglobin in golf ball-like RBC, visible as faintly blue-stained.

วิจารณ์

การตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี (β₄) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการย้อมด้วย Brilliant cresyl blue จำเป็นต้องอ่านส่วนผสมระหว่างเลือดกับสีย้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใต้เป็นระยะเวลานาน เพื่อให้เกิดกระบวนการออกซิไดซ์ HbH และตกตะกอนเป็นเม็ดกลมสีน้ำเงิน ระยะเวลาการอ่านที่ 1-3 ชั่วโมง ถูกแนะนำให้ใช้มากที่สุด เนื่องจากเพิ่มโอกาสให้ตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีได้มากขึ้น⁽¹⁰⁻¹⁴⁾ การทดสอบหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีด้วยสภาวะดังกล่าว มีประสิทธิภาพต่อการคัดกรองโรค HbH แต่มีความไวลดลงต่อการตรวจคัดกรองกลุ่มพาหะ α-thalassemia โดยเฉพาะพาหะ α-thalassemia 2 และ homozygous α-thalassemia 2⁽⁵⁾ มีหลายการศึกษาที่มีการพัฒนาวิธีการทดสอบให้มีความไวต่อการตรวจคัดกรองพาหะ α-thalassemia 1 และ α-thalassemia 2 ให้สูงขึ้น โดยการปั่นและเก็บส่วนบนสุดของชั้นที่เป็นเซลล์ (buffy coat) ไปทำการทดสอบ และเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อม นอกจากนี้ยังมีการปรับเพิ่มเวลาการย้อมให้นานขึ้น โดยสามารถเพิ่มความไวในการตรวจคัดกรองกลุ่มพาหะ α-thalassemia 1 ได้มากถึงร้อยละ 91-100^(6, 14)

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงผลของการปรับลดระยะเวลาการย้อม Brilliant cresyl blue ที่ 37 องศาเซลเซียส ให้เหลือเพียง 30 นาที ต่อการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดง ผลการศึกษาพบว่า การย้อม Brilliant cresyl blue ที่ 37 องศาเซลเซียส เพียง 30 นาที ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องทุกรายเมื่อเทียบกับผลการตรวจ Hb typing โดยไม่พบผลบวกและผลลบปลอม และสอดคล้องกับผลการย้อมที่ใช้เวลา 120 นาที โดยในกลุ่มตัวอย่างของคนปกติซึ่งมีชนิดฮีโมโกลบินเป็น A₂A ปริมาณ HbA₂

และค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงอยู่ในช่วงของคนปกติ^(15, 16) ตรวจไม่พบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีทุกราย (Table 3) ผลการตรวจสเมียร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตัวอย่างกลุ่มนี้จะพบเพียงเซลล์เม็ดเลือดแดงติดสีน้ำเงินของ Brilliant cresyl blue เนื่องจากสีดังกล่าวสามารถย้อมฮีโมโกลบินปกติได้ด้วยดังแสดงใน Fig. 2A อย่างไรก็ตามลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้จากการย้อมโดยใช้เวลา 120 นาที จะพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะคล้าย ghost cell (ติดสีน้ำเงินจาง) ได้จำนวนเล็กน้อย (Fig. 2B) เนื่องจากระยะเวลาการย้อมที่นานส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ อาจเกิดการรั่วของฮีโมโกลบินออกจากเซลล์ได้ ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยโรค HbH ซึ่งมีการปรากฏของ HbH fraction บนโครมาโตแกรมทุกราย⁽⁹⁾ ตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีทุกราย ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าการย้อม Brilliant cresyl blue ด้วยเวลาเพียง 30 นาที เพียงพอต่อการออกซิไดซ์ HbH ให้เป็นฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีภายในเซลล์ได้ โดยไม่ทำให้เกิดผลลบและผลบวกปลอมต่อการทดสอบ

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีที่ตรวจพบในกลุ่มผู้ป่วยโรค HbH พบว่า โรค HbH-CS ตรวจพบจำนวนที่มากกว่าในกลุ่มโรค HbH อย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก ทั้งการย้อมที่ใช้เวลา 30 และ 120 นาที (Table 5) สอดคล้องกับหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานพบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในโรค HbH (deletional HbH) ร้อยละ 33-85 ในขณะที่พบร้อยละ 52-95 ในโรค HbH-CS^(4, 14) แสดงให้เห็นว่าการย้อมโดยใช้เวลา 30 นาที ยังคงประสิทธิภาพการตรวจได้ไม่ต่างไปจากเดิม นอกจากนี้จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีที่ใช้เวลา 30 นาที ตรวจนับจำนวนได้

มากกว่าการย้อมที่ใช้เวลา 120 นาที เมื่อวิเคราะห์แยกตามชนิดของโรค HbH ก็ยังพบว่าการย้อมที่ใช้เวลา 30 นาที ตรวจนับจำนวนเซลล์ดังกล่าวได้มากกว่าการย้อมที่ใช้เวลา 120 นาที (Table 5) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีเมื่อย้อมเป็นเวลานานได้ เป็นผลทำให้จำนวนเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณลดลง สังเกตได้จากลักษณะของเซลล์บนสเมียร์เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเป็นลักษณะคล้าย ghost cell เป็นจำนวนมาก (Fig. 3B และ 4B) โดยเซลล์ที่ดีสีจางมองเห็นฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีไม่ชัดเจนในบางเซลล์อินคลูชันบอดีมีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดใหญ่ ดิตสีน้ำเงินเข้มกว่าปกติ คล้ายกับการตรวจในเลือดที่เจาะเก็บไว้นานแล้ว (aged specimen) ซึ่งฮีโมโกลบินปกติเกิดการเสื่อมสลายและถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงว่ามีการเสื่อมสลายของเซลล์เกิดขึ้น รวมทั้งมีการเสื่อมสลายของฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีภายในเซลล์ด้วย ลักษณะของเซลล์ดังกล่าวอาจส่งผลให้ผู้ตรวจสเมียร์สังเกตและจำแนกเซลล์เหล่านั้นได้ยากด้วย ดังนั้นการย้อมสี Brilliant cresyl blue ไว้เป็นเวลานาน ถึงแม้จะช่วยให้เกิดการออกซิไดซ์ของ HbH ได้มากขึ้น และมองเห็นเม็ดตะกอนอินคลูชันบอดีภายในเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น (Fig. 3B และ 4B) แต่ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีได้มากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งอาจจะนำไปสู่การเกิดผลลบปลอมได้ในผู้ป่วยที่มีปริมาณเซลล์ดังกล่าวจำนวนน้อย

นอกจากนี้สี Brilliant cresyl blue ยังมีคุณสมบัติย้อมเซลล์ขณะที่มีชีวิต (supravital stain) ได้ ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดแดง reticulocyte จึงถูกย้อมดิตสีน้ำเงินด้วยและไรโบโซม หรือ RNA ที่ยังพบอยู่ในไซโตพลาสซึม ก็จะตกตะกอนसानกันเป็นร่างแหดิตสีน้ำเงินเข้ม (Fig. 3A, blue arrow) ดังนั้น

หาก reticulocyte มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีอยู่ภายในเซลล์ด้วย ก็จะเห็นตะกอนเม็ดกลมสีน้ำเงินร่วมด้วยเช่นกัน ดัง Fig. 3 และ 4 ซึ่ง reticulocyte จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยโรค HbH ด้วย ดังนั้นจะมีโอกาสพบเซลล์ดังกล่าวจำนวนมากในสเมียร์เลือด ผู้ตรวจสเมียร์เลือดจึงจำเป็นต้องมีการสังเกตและพิจารณาอย่างถี่ถ้วนเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำ ดังนั้นการตรวจสเมียร์เลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์จำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการจำแนกเซลล์มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี และ reticulocyte ในขั้นตอนการผสมสีย้อมกับเลือด ควรเขย่าให้เข้ากันทั้งก่อนและหลังการอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เพราะการตั้งหลอดผสมเลือดกับสีไว้เป็นเวลานานจะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอนอยู่ด้านล่างได้ ดังนั้นหากไม่มีการเขย่าให้เข้ากันก่อนเตรียมสเมียร์เลือดจะทำให้มีผลต่อการตรวจนับจำนวนได้

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบ Artificial Intelligent (AI) เข้ามาช่วยในการตรวจหาเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีบนสเมียร์ โดยผลจากการศึกษาพบว่ามีความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเซลล์ดังกล่าวสูงถึงร้อยละ 91 และ 99 ตามลำดับ⁽¹⁶⁾ โดยสามารถตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีได้ถึงแม้ว่ามีจำนวนเซลล์เพียง 1 ใน 100,000 ดังนั้นในอนาคต หากมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดังกล่าว ร่วมกับการปรับลดเวลาย้อมตามการศึกษาค้างนี้ จะช่วยให้การตรวจหาเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีทำได้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถลดระยะเวลาความผิดพลาดในการตรวจและจำแนกเซลล์ รวมถึงกำลังคนได้ด้วย อีกทั้งอาจจะช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะต่อการคัดกรองพาหะ α -thalassemia 1 ได้อีกด้วย

สรุป

การปรับลดเวลาการย้อม Brilliant cresyl blue เป็นเวลา 30 นาที ให้ผลการตรวจสอบคล้อยกับการย้อมที่ใช้เวลา 120 นาที โรค HbH ทุกรายไม่พบผลบวกและผลลบปลอม และตรวจพบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ได้สูงกว่า 120 นาที ดังนั้นการย้อมด้วยเวลาดังกล่าวสามารถตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ในเม็ดเลือดแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาการตรวจและการรอคอยผลได้ ส่งผลให้แพทย์ได้ผลการตรวจที่เร็วขึ้น สามารถให้การวินิจฉัยและวางแผนการรักษาผู้ป่วยได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษานี้ (ทุนวิจัยเลขที่ AHS-RD-66007) ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สิทธิชัย ปัญญาใส อาจารย์ประจำภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้คำปรึกษาในการเก็บและการวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนการเขียนต้นฉบับขอขอบคุณ บริษัท ไบโอเซน จำกัด ที่สนับสนุนเครื่องมือและน้ำยาสำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

เอกสารอ้างอิง

- Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 13.
- Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ* 2008; 86: 480-7.
- Wickramasinghe SN, Hughes M, Higgs DR, *et al.* Ultrastructure of red cells containing haemoglobin H inclusions induced by redox dyes. *Clin Lab Haematol* 1981; 3: 51-60.
- Adirojnanon P, Wasi P. Levels of haemoglobin H and proportions of red cells with inclusion bodies in the two types of haemoglobin H disease. *Br J Haematol* 1980; 46: 507-9.
- Galanello R, Paglietti E, Melis MA, *et al.* Hemoglobin inclusions in heterozygous alpha-thalassemia according to their alpha-globin genotype. *Acta Haematol* 1984; 72: 34-6.
- Pan LL, Eng HL, Kuo CY, *et al.* Usefulness of Brilliant cresyl blue staining as an auxiliary method of screening for alpha-thalassemia. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 94-7.
- Lafferty JD, Barth DS, Sheridan BL, *et al.* A multicenter trial of the effectiveness of zeta-globin enzyme-linked immunosorbent assay and hemoglobin H inclusion body screening for the detection of alpha⁰-thalassaemia trait. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 309-15.
- Chan AY, So CK, Chan LC. Comparison of the HbH inclusion test and a PCR test in routine screening for alpha thalassaemia in Hong Kong. *J Clin Pathol* 1996; 49: 411-3.

9. Turley E, McFarlane A, Halchuk L, *et al.* Hemoglobin H identification by high-performance liquid chromatography in confirmed hemoglobin H disease. *Int J Lab Hematol* 2015; 37: 668-72.
10. Wild BJ, Bain BJ. Investigations of abnormal haemoglobins and thalassemia. In: Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th ed, Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 2011: 301-32.
11. Kuptamethi S, Pravatmuang P, Fucharoen S, *et al.* Modified technique for detecting red cells containing inclusion bodies in alpha-thalassemia trait. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1987; 23: 213-21.
12. Maungsapaya W, Winichagoon P, Fucharoen S, *et al.* Improved technic for detecting intraerythrocytic inclusion bodies in alpha thalassemia trait. *J Med Assoc Thai* 1985; 68: 43-5.
13. Sabath DE, Cross ST, Mamiya LY. An improved method for detecting red cells with hemoglobin H inclusions that does not require glass capillary tubes. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 87-91.
14. Satthakarn S, Panyasai K, Phasit A, *et al.* Reliability of hemoglobin A2 value as measured by the Premier Resolution system for screening of β -thalassemia carriers. *Clin Chem Lab Med* 2023; 62: 453-63.
15. Wongkrajang P, Chinswangwatanakul W, Mookhamakkun C, *et al.* Establishment of new complete blood count reference values for healthy Thai adults. *Int J Lab Hematol* 2018; 40: 478-83.
16. Lee SY, Chen CME, Lim EYP, *et al.* Image analysis using machine learning for automated detection of hemoglobin H inclusions in blood smears - a method for morphologic detection of rare cells. *J Pathol Inform* 2021; 12: 18.



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Suggestion for Authors

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

นโยบายการรับพิจารณาบทความ

วารสารเทคนิคการแพทย์ เป็นวารสารทางวิชาการของสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

มีวัตถุประสงค์เพื่อส่งเสริมการเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ และผลงานวิจัยโดยมีหลักเกณฑ์การพิจารณาบทความดังนี้

1. เป็นบทความด้านเทคนิคการแพทย์ (สาขาเคมีคลินิก สาขาจุลชีววิทยาคลินิก สาขาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก สาขาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก สาขาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ สาขาโลหิตวิทยา สาขาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด) วิทยาศาสตร์การแพทย์ และสาขาวิชาอื่นที่เกี่ยวข้องกับงานทางห้องปฏิบัติการทางคลินิก

2. บทความต้องไม่เคยนำไปเผยแพร่ในวารสารฉบับอื่นมาก่อน และไม่อยู่ระหว่างการพิจารณาลงในวารสารใดๆ

3. บทความจะต้องมีการอ่านตรวจทานต้นฉบับ จากคณะกรรมการหรือผู้ทรงคุณวุฒิเฉพาะสาขาจากภายนอกอย่างน้อย 3 ท่าน ทั้งนี้เพื่อให้วารสารมีคุณภาพในระดับมาตรฐานสากลและนำไปอ้างอิงได้

4. บทความที่ดีพิมพ์ลงในวารสารเทคนิคการแพทย์แล้วถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารเทคนิคการแพทย์ สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

5. ข้อเขียนและข้อคิดเห็นใดๆ ในวารสารนี้เป็นความคิดเห็นส่วนตัว และเป็นความรับผิดชอบของผู้เขียนทั้งสิ้น ไม่ใช้ความเห็นของคณะกรรมการวารสารเทคนิคการแพทย์ และสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

6. การถอนบทความระหว่างขั้นตอนการพิจารณาโดยไม่มีเหตุผลสมควร กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์รับพิจารณาตีพิมพ์บทความครั้งต่อไปเป็นระยะเวลา 2 ปี

7. บทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ รายงานกรณีศึกษา และบทความวิจัยอย่างสั้น ผู้นิพนธ์ต้องแนบหนังสือรับรองที่ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน (Ethic committee)

8. บทความปริทัศน์ที่ดีพิมพ์ในวารสาร ผู้เขียนตั้งคำถามให้ผู้อ่านตอบแบบทดสอบ ลักษณะคำถามเป็นปรนัย มี 4 ตัวเลือก จำนวน 5 ข้อ หรือ 10 ข้อ ตอบบทความแล้วแต่กรณี โดยผู้เขียนและผู้อ่านที่ตอบแบบสอบถามถูกต้องทุกข้อจะได้หน่วยคะแนน ในกิจกรรมประเภทที่ 4 กิจกรรมชนิดที่ 16 การศึกษาด้วยตนเองผ่านสื่อสำเร็จรูป และผู้เขียนจะได้หน่วยคะแนน จากกิจกรรมประเภทที่ 5 กิจกรรมชนิดที่ 25 การตีพิมพ์ผลงานวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ในวารสารวิชาการ จากศูนย์การศึกษาต่อเนื่องเทคนิคการแพทย์ สภาเทคนิคการแพทย์ ดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่เว็บไซต์ www.mtcouncil.org

ค่าธรรมเนียมการเผยแพร่ ไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประเภทของบทความ แบ่งออกเป็น 6 ประเภท คือ

1. **บทความวิชาการ (Editorials)** เป็นบทความซึ่งวิเคราะห์ผลงานทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีความสำคัญในวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ หรือวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง หรืออาจจะเป็นข้อคิดเห็นเพื่อประโยชน์ในด้านการยกระดับวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ให้สูงขึ้น

2. **บทความปริทัศน์ (Review Article)** เป็นบทความเพื่อฟื้นฟูวิชาการซึ่งรวบรวมผลงานเกี่ยวกับเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ที่เคยลงตีพิมพ์ในวารสารอื่นมาแล้วโดยนำเรื่องมาวิเคราะห์ วิจัย และเปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างแก่ผู้อ่านเกี่ยวกับเรื่องนั้น

3. **นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Article)** เป็นรายงานเกี่ยวกับผลการวิจัยทางด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวข้องโดยไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน

4. **รายงานกรณีศึกษา (Case Report)** เป็นรายงานเกี่ยวกับการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยรายที่ น่าสนใจทั้งทางด้านประวัติผลการตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการคลินิกร่วมกัน

5. **บทความวิจัยอย่างสั้น (Short Communication)** เป็นบทความวิจัยฉบับย่อ เป็นรูปแบบการรายงานการศึกษาแบบกระชับ อันเนื่องมาจากข้อจำกัดของการศึกษา แต่มีความสมบูรณ์ในเนื้อหาที่น่าสนใจ รูปแบบที่เขียนเป็นลักษณะคล้ายนิพนธ์ต้นฉบับ แต่จะสั้นและกระชับกว่า

6. **จดหมายถึงบรรณาธิการ (Letter to the Editor)** เป็นบทความซึ่งเสนอข้อคิดเห็นและประสบการณ์ทางด้านวิชาการที่เกี่ยวข้องกับงานในสาขาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์อย่างสั้นๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ

การเตรียมต้นฉบับ

เพื่อให้การตีพิมพ์บทความเป็นไปอย่างถูกต้องและรวดเร็วผู้พิมพ์จะต้องปฏิบัติตามรายละเอียด ดังนี้

1. ภาษา ให้ใช้ได้ 2 ภาษาคือภาษาไทย และ/หรือภาษาอังกฤษ ถ้าต้นฉบับเป็นภาษาไทยควรพยายามใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยมากที่สุด โดยใช้ตามพจนานุกรมศัพท์แพทย์อังกฤษ-ไทย และพจนานุกรมศัพท์วิทยาศาสตร์ฉบับราชบัณฑิตยสถาน สำหรับคำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้วแต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้กำกับภาษาเดิม (อังกฤษ) ในวงเล็บ หรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

2. ต้นฉบับ พิมพ์ด้วยโปรแกรม Word for Windows ด้วยอักษร Cordia New ขนาด 14 และพิมพ์เลขหน้าที่ตรงกลางขอบล่างของทุกหน้าพร้อมเลขบรรทัด โดยไม่ต้องพิมพ์ชื่อสกุลผู้พิมพ์ในต้นฉบับ โดยเนื้อหาต้นฉบับทั้งหมดควรรูปภาพ/ตาราง ไม่ควรเกิน 12 หน้ากระดาษ A4 รูปภาพ/ตารางรวมกันไม่ควรเกิน 5 รูป/ตาราง

ส่งต้นฉบับของบทความหรือบทความต่าง ๆ ทางเว็บไซต์ของวารสารฯ ผ่านระบบจัดการวารสารอิเล็กทรอนิกส์ Thai Journals Online (ThaiJo) <https://heo1.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt>

3. ชื่อเรื่อง ชื่อผู้พิมพ์ ชื่อหน่วยงานและสถาบันให้แยกไฟล์ต่างหาก

3.1 ชื่อเรื่อง มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ ซึ่งควรให้สั้นแต่ได้ใจความ ไม่ควรใช้คำย่อในเรื่อง ยกเว้นคำที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป เช่น NADH ความยาวของชื่อเรื่องควรมีความชัดเจน สามารถบ่งบอกผู้อ่านให้ทราบถึงสาระสำคัญของเนื้อหาและรายละเอียดในตัวบทความ

3.2 ชื่อผู้พิมพ์และผู้ร่วมนิพนธ์ทุกคน ให้เขียนชื่อต้นและนามสกุลตัวเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ต้องระบุปริญญา ตำแหน่งทางวิชาการ หรือ ตำแหน่งทางราชการ ในกรณีที่มีผู้แต่งหลายคนระบุชื่อผู้รับผิดชอบบทความและ E-mail address ที่สามารถติดต่อได้

3.3 ผู้ร่วมนิพนธ์ทุกคนให้ระบุชื่อหน่วยงานและสถาบัน สถานที่ และ E-mail address ที่สามารถติดต่อได้

4. รายละเอียดของนิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้นให้เรียงหัวข้อ ตามลำดับต่อไปนี้

1) บทคัดย่อ (Abstract) มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำ
 2) คำสำคัญ (keywords) มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ จำนวน 3-5 คำ
 3) บทนำ (introduction) ประกอบด้วยเหตุผลและวัตถุประสงค์ ในการวิจัย
 4) วัสดุและวิธีการ (materials and methods) รายละเอียดของเครื่องมือและน้ำยา รวมทั้งขั้นตอนที่สำคัญควรระบุให้ชัดเจน
 5) ผลการวิจัย (results) เขียนใจความสั้นและชัดเจน ตารางหรือภาพคำอธิบายภาพ และตาราง ให้เป็นภาษาอังกฤษ
 6) วิจารณ์ (discussion)
 7) สรุป (conclusion)
 8) กิตติกรรมประกาศ (acknowledgements)
 9) เอกสารอ้างอิง (references) ให้เรียงลำดับเลขตามที่ใช้ปรากฏก่อนหลังในเนื้อเรื่อง

5. ตาราง แผนภูมิ ภาพประกอบ ให้แทรกในเนื้อหาในตำแหน่งที่เหมาะสม สำหรับภาพเป็นระบบอิเล็กทรอนิกส์ให้บันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif สำหรับข้อความและคำอธิบายในตารางและภาพ ใช้เป็นภาษาอังกฤษ

6. การเขียนเอกสารอ้างอิง ให้ใช้ตามระบบ Vancouver ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ถ้ามาจากเอกสารภาษาอังกฤษ ให้ใช้ชื่อผู้พิมพ์เป็นภาษาอังกฤษ เขียนชื่อสกุลตัวเต็ม นำหน้าตามด้วยอักษรย่อของชื่อต้น

2. ถ้ามาจากเอกสารภาษาไทย ให้แปลเป็นภาษาอังกฤษและต่อท้ายด้วย (in Thai)

3. ถ้ามาจากภาษาอื่นให้แปลเป็นภาษาอังกฤษ และให้วงเล็บภาษาเดิมไว้ตอนท้าย

4. ปีที่อ้างอิงเป็นแบบ ค.ศ.

5. การอ้างอิงเอกสารให้ใช้ชื่อย่อของวารสารที่นำมาอ้างอิงตามแบบของ Index Medicus ปีที่ตีพิมพ์ ฉบับที่ (volume) หน้าต้นและหน้าสุดท้าย

6.1 ตัวอย่างการอ้างอิงเอกสาร

6.1.1 ผู้พิมพ์ตั้งแต่ 1 คนถึง 6 คน ใส่ชื่อผู้แต่งทุกคน ถ้ามีผู้พิมพ์มากกว่า 6 คน ให้ใส่ชื่อผู้แต่งเพียง 3 คนแรกตามด้วยคำว่า *et al.*

- Solter NA, Wasserman SI, Austern KF, *et al.* Cold urticaria: release into the circulation of histamine and eosinophilic chemotactic factor of anaphylaxis during cold challenge. *N Engl J Med* 1976; 294: 687-90.

- Manakul S, Inthachang N. Rapid haemocultures report. *J Med Tech Assoc Thailand*. 2012; 40: 4300-10. (in Thai)

6.1.2 ผู้พิมพ์เป็นคณะหรือกลุ่มบุคคล

- The committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology, Recommended method for the determination of gamma-glutamyltransferase in blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1976; 36: 119-25.

6.1.3 ไม่มีชื่อผู้พิมพ์ Anonymous.

- Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J* 1981; 283: 628.

6.1.4 วารสารประเภท supplement

- Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (abstract). *Blood* 1979; 54 (suppl 1): 26a.

6.2 ตัวอย่างการอ้างอิงหนังสือ

6.2.1 ผู้พิมพ์คนเดียว

- Eisen HN. Immunology: an Introduction to molecular and cellular principle of the immune response, 5th ed. New York: Harper and Row; 1974: 406

- Wijarm B. The Management of Knowledge toward Performance. Bangkok: Expernet Company; 2004. (in Thai)

- Chomeya R. Organizational Effectiveness on Health Care Criteria for Performance Excellence Framework in Government Hospitals in Public Health Region 6. [Ph.D. Thesis in Applied Behavioral Science Research]. Bangkok: Faculty of Graduate School, Srinakharinwirot University; 2003. (in Thai)

6.2.2 ผู้นิพนธ์เป็นคณะหรือกลุ่มบุคคล

- American Medical Association Department of Drugs. AMA drug evaluations. 3rd ed. Littleton: Publishing Sciences Group, 1977.

6.2.3 บรรณาธิการ ผู้รวบรวม ประ찬เป็นผู้แต่ง

- Finegold SM, Martin WJ. Diagnostic Microbiology. 6th ed. St.Louis: C.V. Mosby Company, 1982.

6.2.4 บทในหนังสือ

- Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading Microorganisms. In: Sodenman Wa Jr., Sidenman Wa, editors. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: WB Saunders; 1974. p. 457-72.

- Tienboon P. Anthropometric nutritional assessment. In: Chardapisak W, Gosarat C, editors. Ambulatory Pediatrics. Chiang Mai: Sangsilp Publishing; 2007. p. 363-9. (in Thai)

6.2.5 สิ่งตีพิมพ์ขององค์กรต่างๆ

- National Center for Health Statistics. Acute condition: incidence and associated disability, United State July 1968-June 1969. Rockville, MD: National Center for Health Statistics, 1972 (Vital and health statistics, Series 10: Data from the National Health Survey, no 69) (DHEW publication no. (HSM) 72-1036).

6.2.6 หนังสือรายเดือนและรายปักษ์

- Roueche B. Annals of medicine: the Santa Claus culture. The New York 1971 Sep. 4: 66-81.

6.2.7 หนังสือพิมพ์รายวัน

- Shaffer RA. Advances in chemistry are starting to unlock mysteries of the brain : discoveries should help cure alcoholism and insomnia, explain mental illness. How the messangers work. Wall Street Journal 1977 Aug. 12:1 (col 1), 10 (col 1).

6.3 ตัวอย่างการอ้างอิงเอกสารอิเล็กทรอนิกส์

6.3.1 CD-ROM

- Anderson SC, Poulsen KB, Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

6.3.2 บทความวารสารทางอินเทอร์เน็ต (Journal article on the Internet)

- Sanders GD, Bayourni AM, Holodnity M, *et al.* Cost-effectiveness of HIV screening in patients older than 55 year of age. Ann Intern Med [serial on the Internet]. 2008 Jun [cited 2008 Oct 7]; 148 (12). Available from: <http://www.annals.org/cgi/reprint/148/12/889.pdf>

6.3.3 หนังสือทางอินเทอร์เน็ต (Monograph on the Internet)

- Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available form: <http://www.nep.edu/books/0309074029/html/>

6.3.4 โฮมเพจ/เว็บไซต์ (Homepage/Website)

- Cancer-Pain. org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c 2000-01 [cited 2008 Oct 3]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Check list การเตรียมต้นฉบับ วารสารเทคนิคการแพทย์

เอกสารประกอบพิจารณา และความรับผิดชอบของผู้แต่งหรือคณะผู้แต่ง

- ☐ ผู้แต่งหรือคณะผู้แต่งออกหนังสือรับรองว่า กำลังส่งบทความให้วารสารเทคนิคการแพทย์พิจารณาเท่านั้น บทความนี้หรือบางส่วนของบทความไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน ถ้าบทความได้รับการตอบรับจากกองบรรณาธิการ บทความและบางส่วนของบทความนี้ จะตีพิมพ์โดย “วารสารเทคนิคการแพทย์” เพียงแห่งเดียวเท่านั้น
- ☐ การเสนอชื่อผู้ทรงคุณวุฒิเป็น Reviewer โดยผู้ทรงคุณวุฒิเป็นผู้มีผลงานวิชาการอย่างสม่ำเสมอ และต้องเป็นบุคคลจากภายนอกสถาบันของผู้แต่ง 3 ท่าน พร้อมสถานที่ทำงาน โทรศัพท์ และ E-mail address
- ☐ หนังสือรับรองที่ได้รับอนุญาตจากกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Ethic committee) (สำหรับบทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ และรายงานผู้ป่วย)

การพิมพ์ต้นฉบับ

- ☐ พิมพ์ต้นฉบับด้วยโปรแกรม Microsoft Word for Window
- ☐ ตั้งค่ากระดาษ ขนาด A4
- ☐ ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14
- ☐ ตาราง พิมพ์แยกจากเนื้อหาแต่รวมอยู่ในไฟล์เดียวกัน และเขียนคำว่า (Table...) ใน text
- ☐ รูปภาพ มีความคมชัด ความละเอียดไม่ต่ำกว่า 300 pixels/inches และเขียนคำว่า (Fig. ...) ใน text
- ☐ คำย่อ: ใช้เฉพาะที่เป็นสากลเท่านั้น และเขียนคำเต็ม วงเล็บคำย่อครั้งแรกใน Abstract บทคัดย่อหรือ text
- ☐ ชื่อยาหรือสารเคมีใช้ generic name เท่านั้น
- ☐ บทความภาษาไทย: การเขียนคำศัพท์ภาษาอังกฤษ ให้ยึดหลักการเขียนทับศัพท์หรือใช้ศัพท์บัญญัติตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน ยกเว้นคำที่แปลแล้วอาจได้ใจความไม่ชัดเจน ให้ใช้คำศัพท์ภาษาอังกฤษหรือเขียนคำแปลเป็นภาษาไทยแล้ววงเล็บศัพท์ภาษาอังกฤษ ปีให้ใช้เป็นปี พ.ศ. โดยไม่ต้องวงเล็บปี ค.ศ. โดยรวมควรใช้เป็นภาษาไทยให้มากที่สุด

การอ้างอิงเอกสาร: วิทยานิพนธ์ไม่สามารถนำมาเป็นเอกสารอ้างอิงได้

- ☐ ใส่หมายเลขเรียงลำดับที่อ้างอิงถึง
- ☐ พิมพ์ยกระดับเหนือข้อความและมีวงเล็บ
- ☐ อ้างอิงท้ายบทความตามคำแนะนำผู้แต่ง (Suggestion for Authors)

หน้าแรก (title page) เขียนเป็นภาษาไทย และ อังกฤษ

- | | | |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| ☐ ชื่อเรื่อง | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ ชื่อ-สกุล ของผู้แต่งและคณะ | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ สถานที่ทำงานของผู้แต่งและคณะ | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ E-mail address: ของผู้แต่งและคณะ | | |
| ☐ หมายเลขโทรศัพท์ผู้รับผิดชอบบทความ | | |

ประเภทบทความ

- | | | |
|---|---|--|
| ☐ บทบรรณาธิการ | ☐ บทความปริทัศน์ | ☐ นิพนธ์ต้นฉบับ |
| ☐ บทความพิเศษ | ☐ รายงานการประชุมวิชาการ | ☐ รายงานกรณีศึกษา |
| ☐ บทความวิจัยอย่างสั้น | ☐ จดหมายถึงบรรณาธิการ | ☐ ขอวารสาร |

นิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้น ให้ลำดับเนื้อหาดังต่อไปนี้

- | | |
|---|--|
| ☐ บทคัดย่อ ไม่เกิน 300 คำ | ☐ คำสำคัญ (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ Abstract ไม่เกิน 300 คำ | ☐ Keywords (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ เนื้อหา ประกอบด้วย | |
| ☐ บทนำ (Introduction) | |
| ☐ วัสดุและวิธีการ (Materials and methods) | |
| ☐ ผลการศึกษา (Results) | |
| ☐ วิจารณ์ (Discussions) | |
| ☐ สรุป (Conclusion) | |
| ☐ เอกสารอ้างอิง (References) เป็นภาษาอังกฤษ (ตามคำแนะนำ) | |
| ☐ ตาราง และ รูปภาพ เป็นภาษาอังกฤษ (ตามคำแนะนำ) | |

บทความปริทัศน์

อนุโลมตามผู้แต่ง แต่ให้มีขอบข่ายรูปแบบการเขียน ประกอบด้วย บทคัดย่อ บทนำ เนื้อเรื่อง สรุป

- | | |
|--|--|
| ☐ บทคัดย่อ ไม่เกิน 300 คำ | ☐ คำสำคัญ (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ Abstract ไม่เกิน 300 คำ | ☐ Keywords (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |

ลงชื่อ ผู้รับผิดชอบบทความ

(.....)

Clinical Immunology Products

Immunology Analyzer

maccura



I1000

mindray



CL-900i

Clinical Hematology Products

CBC Analyzer

sysmex



XN-1500

Coagulation Analyzer

maccura



H-2600 Coagulation Analyzer

Clinical Chemistry Products

Chemistry Analyzer

FURUNO

CA-800 Automate chemistry Analyzer with rack load



mindray

BS-430



Infectious and Genetic diseases

Genematrix



SIEMENS Healthineers

Fast Track
DIAGNOSTICS



Vitassay



UNI-MEDICA



Allergy Testing

ProteomeTech Inc.

PROTIA Food IgG a
[Food Intolerance]



PROTIA Allergy-Q
96M Panel

Molecular Point of Care Testing (Molecular POCT)

COYOTE

Coyote Sample-to-result
Molecular POCT for
infectious diseases



OPTION 2

VTM

Transfer sample into the cartridge

Mixer

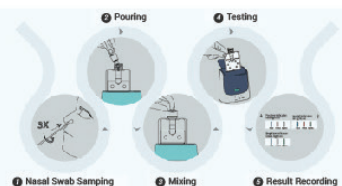
30 mins

200 copies/mL
(SARS-CoV-2)

Thermo Cycler

pluslife

Nucleic Acid testing analyzer:
FAST, ACCURATE and
EASY in 35 mins



AEC Healthcare Co., Ltd. (Head Office)

44/6 ถนนสุทธิสารวินิจฉัย แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ 10310
44/6 Sutthisarnvinitchai Rd., Samsaennok, Huay Kwang, Bangkok 10310, Thailand
Tel : (66) 0 2274 8867-9 | Fax : (66) 0 2274 8870

info@aechealthcare.com

@aechealthcare

AEC Healthcare



SCAN ME

Find us more :
www.aechealthcare.com