

การศึกษาประสิทธิภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเอง สำหรับการวิเคราะห์ระดับทองแดงในซีรัม Study of In-house Internal QCMs Efficiency for Serum Copper Analysis

ธิตาพร ตูทราย¹, เจริญพร จุลชู², พรรณี พิเดช³ และ ันยมัย อินทร^{1*}
Thitaporn Tusai¹, Jareanporn Julchoo¹, Phannee Pidetcha² and Tunyamai Intorn^{1*}

บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล มีการพัฒนาและผลิตสารควบคุมคุณภาพภายในขึ้นใช้เองเพื่อการทดแทนสำหรับการวิเคราะห์ระดับทองแดงในซีรัม เพื่อให้การควบคุมคุณภาพภายในมีประสิทธิภาพ และให้ผู้ปฏิบัติงานมีความมั่นใจในการใช้งานจึงทำการศึกษาคุณภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO GUIDE 80: 2014 โดยศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวเป็นระยะเวลา 7 เดือน และวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ

ผลการศึกษา พบว่าสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง 2 level มีค่า 73 และ 143 µg/dL มีค่าความแปรปรวนต่ำ (%CV = 2.32% และ 1.61% ตามลำดับ) และ %recovery เท่ากับ 104% และ 102% ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติของความเป็นเนื้อเดียวกัน (F test) ได้ค่า F น้อยกว่า $F_{critical}$ และค่า p -value > 0.05 (p -value = 0.215, 0.051 ตามลำดับ) แสดงถึงความเป็นเนื้อเดียวกันของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง 2 level นอกจากนี้ค่าความชันของสมการเชิงเส้นของการศึกษาความคงตัวตลอดระยะเวลา 6 เดือน อยู่ในช่วงความเชื่อมั่น 95% และค่า p -value > 0.05 แสดงถึงสารควบคุมคุณภาพภายในทั้ง 2 level มีความคงตัวได้ถึง 6 เดือน

ผลสรุปถึงประสิทธิภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง 2 level ดังกล่าวผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ISO Guide 80:2014 และมีค่าครอบคลุมช่วงค่าใช้งาน ทั้งนี้ผลการศึกษาอาจใช้เป็นแนวทางสำหรับการศึกษาและพัฒนาสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองสำหรับการวิเคราะห์อื่น ๆ ในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: การควบคุมคุณภาพภายใน, ความคงตัว, ความเป็นเนื้อเดียวกัน, ทองแดง, สารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเอง

^{1*} ศูนย์สุขภาพองค์รวมและเวชศาสตร์ชั้นสูง คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

² ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

³ หน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

^{1*} Holistic Health and Medical Diagnostic Center, Faculty of Medical Technology, Mahidol University

² Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University

³ Health Sciences Service Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University

* Corresponding author : e-mail: tunyamai.int@mahidol.ac.th

Abstract

The Toxicology Laboratory, Faculty of Medical Technology, Mahidol University had been developed and produced In-house Quality Control Materials (QCMs) of serum copper analysis for replacement. In order to ensure the efficiency of in-house QCMs, the researchers aimed to study the characteristic of this in-house QCMs by following ISO Guide 80:2014. Homogeneity and seven-month study of stability were investigated.

The results showed that the concentration of In-house QCMs were 73 and 143 $\mu\text{g/dL}$ (%CV = 2.32, 1.61, respectively) showing relatively low variance and had %recovery 102, 104, respectively. The statistical analysis for homogeneity assessment (F test) showed the value of calculated F less than F_{critical} , and p-value > 0.05 (p-value = 0.215, 0.051, respectively) indicating the homogeneity. The linear regression slope of stability assessment showed 95% CI and p-value > 0.05 indicating the stability up to 6 months of both levels.

These results imply that the in-house QCMs had efficiency required according to ISO Guide 80: 2014 statistics and also had appropriate value for using in routine laboratory. Moreover, the process and statistical analysis method in this study could be applied in other In-house QCMs.

Keywords: Copper, Homogeneity, in-house Quality Control Material, internal quality control (IQC), Stability

หลักการและเหตุผล

ทองแดง (Copper) เป็นแร่ธาตุสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ทำงานเกี่ยวกับโปรตีนของร่างกายมนุษย์มากกว่า 30 ชนิด เป็นพื้นฐานในการพัฒนาและการเจริญเติบโตของร่างกาย (Escott-Stump, 2008; Hordyjewska et al., 2014; Linder, 1991) ปริมาณโดยเฉลี่ยที่เหมาะสมต่อการบริโภคของผู้ใหญ่อยู่ที่ 0.6-1.6 มิลลิกรัมต่อวัน (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015; Tapiero et al., 2003) โดยทองแดงพบได้มากในอาหารประเภท อาหารทะเล ถั่ว เมล็ดข้าว และเมล็ดพืช เป็นต้น (ถวัลย์, อรชума, สุดาวดี และดวงเนตร, 2561) ในร่างกายมนุษย์ส่วนใหญ่จะพบทองแดงได้ในตับ ไต หัวใจ และสมอง (Escott-Stump, 2008) ในภาวะปกติทองแดงมากกว่า 70% จะจับอยู่กับ ceruloplasmin ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่ทำหน้าที่ขนส่งทองแดงไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ภายในร่างกาย (Tapiero et al., 2003) ทองแดงมีบทบาทหน้าที่หลายอย่าง เช่น การสร้างฮีโมโกลบิน ไมอีลิน คอลลาเจน และเมลานิน ช่วยดูดซึมธาตุ

เหล็กจากระบบทางเดินอาหาร ทำหน้าที่ต่อต้านสารอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็ง ทำงานร่วมกับวิตามินซีในการสร้างอีลาสติน อีกทั้งมีส่วนในการสร้างเสริมและบำรุงกระดูกอีกด้วย (Arredondo & Núñez, 2005; Escott-Stump, 2008; Linder, 1991) โอกาสที่ร่างกายจะขาดทองแดงเกิดขึ้นได้น้อยเนื่องจากในอาหารหลายชนิดมีปริมาณทองแดงเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ภาวะร่างกายขาดทองแดงมีสาเหตุมาจากการดูดซึมที่ผิดปกติหรือมีปริมาณสังกะสีสะสมสูงในร่างกาย (Rowin & Lewis, 2005) หรือเกิดจากโรค Menkes disease ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีการดูดซึมทองแดงผิดปกติและนำไปสู่การเสียชีวิต (Hordyjewska et al., 2014; Kodama & Fujisawa, 2009) ภาวะที่ร่างกายขาดทองแดงส่วนใหญ่ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง ปริมาณเม็ดเลือดขาวน้อยกว่าปกติและเกิดอาการ myeloneuropathy (Wazir & Ghobrial, 2017) ส่วนภาวะที่ร่างกายสะสมทองแดงมากเกินไปหรือภาวะทองแดงเป็นพิษเกิดได้จากการบริโภคอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนทองแดง (National Research Council, 2000) การคุมกำเนิดโดยใช้ห่วง

คุมกำเนิด (McArdle et al., 2008) และการได้รับทองแดงจากการทำงาน (Wiwanitkit, 2008) หรือเกิดจากโรคทางพันธุกรรม เช่น Wilson's disease (Hordyjewska et al., 2014) ซึ่งส่วนใหญ่ก่อให้เกิดอาการ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย ปวดศีรษะ และในกรณีร้ายแรงที่มีการทำลายตับและไตอาจอันตรายถึงชีวิต (Hordyjewska et al., 2014; National Research Council, 2000; Stern, 2010) ดังนั้นการตรวจหาปริมาณของทองแดงในเลือดจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยโรคและติดตามการรักษา

ปัจจุบันการวิเคราะห์ระดับทองแดงมีหลายวิธีตามสภาพชนิดตัวอย่างและระดับความเข้มข้นของทองแดงวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ได้แก่ Atomic emission spectrometry (AES) และ Atomic absorption spectrometry (AAS) นอกจากนี้เทคโนโลยีใหม่ๆ ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์อย่างเช่น Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1980 (Houk et al., 1980) การวิเคราะห์ทองแดงด้วยหลักการ AES เป็นการให้ความร้อนกับสารละลายตัวอย่าง ทำให้อะตอมของทองแดงที่ต้องการวิเคราะห์ถูกกระตุ้นให้กลายเป็นอะตอมในสถานะถูกกระตุ้น (excited state) แล้วเกิดการคายพลังงานในรูปการเปล่งแสงเส้นสเปกตรัม (spectral line) กลับมาเป็นอะตอมสถานะพื้น (ground state) ทำให้สามารถวัดระดับความเข้มข้นของทองแดงที่แปรผันตามค่าความเข้มแสงที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับค่าความเข้มแสงที่วัดได้จากสารละลายมาตรฐาน (González & de la Guardia, 2013; Moldovan, 2019) ส่วนการวิเคราะห์ทองแดงด้วยหลักการ AAS เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงด้วยกระบวนการที่ทำให้ทองแดงในตัวอย่างกลายเป็นอะตอมอิสระ (free atom) แล้วให้อะตอมดูดกลืนพลังงานจากแหล่งกำเนิดแสง (Hollow Cathode Lamp; HCL หรือ Electrodeless Discharge Lamp; EDL) ที่มีความยาวคลื่นจำเพาะกับทองแดง ทำให้เปลี่ยนสถานะเป็นอะตอมถูกกระตุ้น และสามารถวัดระดับความเข้มข้นของทองแดงได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งจะสัมพันธ์กันโดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายมาตรฐาน (Amos,

2006; Atomic Spectroscopy, 2013) ทั้งนี้ AAS สามารถแบ่งชนิดได้ตามอุปกรณ์ที่สร้างอะตอมอิสระ เช่น หลักการ Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ความร้อนจากเปลวไฟซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 1 นาทีต่อตัวอย่าง สามารถวัดปริมาณความเข้มข้นได้ในระดับ ppm-ppb และ Graphite Furnace Atomic Absorption spectrometry (GFAAS) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ความร้อนจากการนำไฟฟ้าของแท่ง graphite ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 3-5 นาทีต่อตัวอย่าง สามารถวัดปริมาณได้ในระดับหนึ่งต่อพันล้านส่วนจนถึงหนึ่งต่อล้านล้านส่วน (ppb-ppt) (Amos, 2006; Atomic Spectroscopy, 2013) ส่วนการวิเคราะห์ทองแดงด้วยหลักการ ICP-MS สารละลายตัวอย่างจะถูกส่งผ่านจากระบบ nebulizer และ spray chamber เข้าสู่เปลวไฟ argon plasma ซึ่งให้ความร้อนได้สูงถึง 10,000 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดอะตอมอิสระ (free atom) และไอออน (ion) ของทองแดงตามลำดับ โดยทองแดงไอออนที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกส่งต่อเข้าระบบ mass spectrometry และวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของธาตุในตัวอย่างได้จากปริมาณมวลต่อประจุ (Atomic Spectroscopy, 2013) ทำให้วิธี ICP-MS สามารถวิเคราะห์ปริมาณธาตุได้หลายชนิดในเวลาเดียวกันและสามารถวัดปริมาณความเข้มข้นได้ในระดับ ppb-ppt ในขณะที่วิธี AES และ AAS สามารถวิเคราะห์ปริมาณธาตุได้ครั้งละ 1-2 ธาตุ (Amos, 2006)

การควบคุมคุณภาพทั้งภายในและโดยองค์กรภายนอกในการวิเคราะห์ทองแดงของห้องปฏิบัติการมีความจำเป็นเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำ ถูกต้อง เชื่อถือได้ และเกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้รับบริการ ซึ่งการควบคุมคุณภาพภายในเป็นองค์ประกอบสำคัญในการดำเนินงานควบคุมคุณภาพภายใน สารควบคุมคุณภาพภายในเปรียบเสมือนเป็นตัวแทนของสิ่งส่งตรวจที่ทราบค่าความเข้มข้นช่วยในการบ่งชี้คุณภาพของการวิเคราะห์ในระหว่างการปฏิบัติงาน ดังนั้นคุณภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในที่เหมาะสมต้องมีลักษณะทั้งด้านกายภาพและชีวภาพเหมือนหรือใกล้เคียงกับสิ่งส่งตรวจ เช่น มีค่าความ

เข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงค่าอ้างอิงของห้องปฏิบัติการ มีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัว เป็นต้น

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการพิษวิทยาสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณทองแดงในตัวอย่างซีรัมในระดับ ppm ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณทองแดงในร่างกายมนุษย์ ซึ่งสารควบคุมคุณภาพภายในที่ใช้ในงานในปัจจุบันมีระดับความเข้มข้นไม่ครอบคลุมกับช่วงค่าอ้างอิงของห้องปฏิบัติการ และสารควบคุมคุณภาพภายในดังกล่าวมีตัวเลือกค่อนข้างจำกัดในห้องตลาด อีกทั้งยังมีราคาสูงจึงไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพภายใน ซึ่งห้องปฏิบัติการพิษวิทยา งานบริการสุขภาพชุมชน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล เล็งเห็นความสำคัญนี้จึงมีการพัฒนาและผลิตสารควบคุมคุณภาพภายในขึ้นเอง (In-house quality control material) เพื่อการทดแทน ด้วยวิธีการปรับแต่งค่าความเข้มข้นของทองแดงให้มีความเหมาะสมต่อการใช้งาน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิตขึ้นเองดังกล่าว โดยดูคุณภาพด้านความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวเป็นระยะเวลา 7 เดือน ตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO Guide 80:2014 Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs) (International Organization for Standardization, 2014) เพื่อให้ให้นักเทคนิคการแพทย์ผู้ปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์ระดับทองแดงในซีรัมมีความมั่นใจในการใช้สารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิตขึ้นเองในการปฏิบัติงานและเป็นการเสริมมาตรฐานการควบคุมคุณภาพภายในอีกทาง โดยยกระดับความมั่นคงของระบบการควบคุมคุณภาพภายใน ด้วยการเพิ่มขีดความสามารถพึ่งพาตนเองและอาจช่วยลดต้นทุนในการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการได้

วิธีการศึกษา

1. สารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเอง

สารควบคุมคุณภาพภายในที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกผลิตขึ้นจาก 4% Bovine Serum Albumin (BSA) (Lot No. STBF0746; Sigma-Aldrich, USA) ใน 0.9% NaCl (Lot No. K39486504849; MERCK, Germany)

เป็นเนื้อสารที่ปรับความเข้มข้นด้วยสารมาตรฐานทองแดง 1,000 mg/L (Lot No. 19-133CUX1; PerkinElmer, USA) เตรียมให้มีความเข้มข้นของทองแดง 70 µg/dL และ 140 µg/dL เพื่อให้สอดคล้องกับช่วงค่าอ้างอิงของห้องปฏิบัติการ (70-155 µg/dL) ทำการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของทองแดงในสารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิตขึ้นเองด้วยเครื่อง FAAS ณ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่มีการควบคุมคุณภาพภายในโดยใช้ Seronorm™ Trace Elements Serum Control ทั้ง 2 ระดับ Level 1: Lot No. 1801802 และ Level 2: lot 1309416 (Sero AS, Norway) สารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิตขึ้นเองนี้จะถูกแบ่งใส่ Microcentrifuge tube โดยบรรจุหลอดละประมาณ 1 mL และเก็บในตู้เย็น -18°C จนกว่าจะใช้งาน

2. การศึกษาประสิทธิภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเอง

ศึกษาประสิทธิภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในทั้ง 2 level โดยประเมินค่าความเข้มข้น (Characterization), ความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) และ ความคงตัว (Stability) ตามเกณฑ์ ISO GUIDE 80 :2014 Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs) (International Organization for Standardization, 2014) ประเมินค่าความเข้มข้นสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองด้วยวิธี FAAS โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ Varian SpectrAA-640 ณ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล level ละ 10 หลอด ทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของทองแดงแบบ 2 ซ้ำ ความเป็นเนื้อเดียวกันของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองถูกศึกษาโดยการสุ่มตัวอย่างสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง 2 level ระดับละ 10 หลอด ทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของทองแดงแบบ 2 ซ้ำ ส่วนความคงตัวของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง 2 level จะถูกวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของทองแดงแบบ 2 ซ้ำ ทุกเดือนเป็นระยะเวลา 7 เดือน (ตุลาคม พ.ศ. 2563 - เมษายน พ.ศ. 2564)

3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2019 การประเมินค่าความเข้มข้นโดยคำนวณค่า Overall Mean, Standard Deviation (SD), %CV, %recovery ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันด้วย ANOVA และ F-test โดย $F < F_{critical}$ บ่งชี้ว่าความเป็นเนื้อเดียวกันของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (International Organization for Standardization, 2014) และประเมินค่าความชันของสมการเชิงเส้น (linear regression) ของแต่ละความเข้มข้นเพื่อวิเคราะห์ค่านอกช่วงความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} > 0.05$) บ่งชี้ถึงความคงตัวของสารควบคุมคุณภาพภายในแต่ละ level

ผลการศึกษา

1. ผลการประเมินค่าความเข้มข้นทองแดงในสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเอง

จากการวิเคราะห์ระดับทองแดงในสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง 2 level ด้วยเครื่องวิเคราะห์ Varian SpectrAA-640 พบว่ามีความเข้มข้นของทองแดงที่เตรียมได้เท่ากับ 73 ± 1.7 และ $143 \pm 2.3 \mu\text{g/dL}$ ซึ่งสูงกว่าค่าที่คำนวณคือ 70 และ $140 \mu\text{g/dL}$ ตามลำดับ และทั้ง 2 level มี %recovery มากกว่า 100 คือ 104 และ 102 ที่ระดับความเข้มข้น 70 และ $140 \mu\text{g/dL}$ ตามลำดับ และจากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง 2 level มีค่า %CV เท่ากับ 2.32 และ 1.61 และ SD เท่ากับ 1.7 และ 2.3 ตามลำดับ สารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองของ level 1 จะมี %CV ที่สูงกว่า level 2 ขณะที่ level 1 มีค่า SD น้อยกว่า level 2 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การประเมินค่าความเข้มข้นของทองแดงในสารควบคุมคุณภาพภายในทั้ง 2 level ที่ผลิตขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ระดับทองแดงในซีรัม โดยวิธี FAAS

Cu ($\mu\text{g/dL}$) Cup	Control level 1		Control level 2	
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2
1	75	74	146	144
2	74	72	143	140
3	70	74	142	143
4	72	73	140	140
5	71	70	143	145
6	72	74	147	144
7	72	71	139	140
8	72	74	144	145
9	76	74	142	143
10	73	70	145	140
	Mean	73	Mean	143
	SD	1.7	SD	2.3
	%CV	2.32	%CV	1.61
	%recovery	104	%recovery	102

2. ผลการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเอง

ประสิทธิภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในทั้ง 2 level ที่ผลิตขึ้นถูกทดสอบโดยประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันคำนวณได้จากการนำข้อมูลทั้ง 20 ค่ามาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2019 โดยใช้ ANOVA: single factor เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับทองแดงในแต่ละหลอด พบว่าสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง level 1 และ level 2 มีค่าความแปรปรวนภายในกลุ่ม (The sum of squares within group) เท่ากับ 22.500 และ 27.500 ตามลำดับ น้อยกว่าค่าความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม (The sum of squares between group) ซึ่งมีค่า 34.050 และ 74.250

ตามลำดับ โดยค่าความแปรปรวนรวมของ level 2 มีค่ามากกว่า level 1 จากการคำนวณค่า F และค่า $F_{critical}$ พบว่า level 1 และ level 2 มีค่า F เท่ากับ 1.68 ($p\text{-value} = 0.215$) และ 3.00 ($p\text{-value} = 0.051$) ตามลำดับ โดยค่า F ของสารควบคุมคุณภาพภายในทั้ง 2 level มีค่าน้อยกว่า $F_{critical}$ และค่า $p\text{-value} > 0.05$ (ตารางที่ 2(A) และ 2(B)) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารควบคุมคุณภาพภายในทั้ง 2 level มีความเป็นเนื้อเดียวกันอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยพบว่า level 1 มีความเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่า level 2 เนื่องจากค่าความต่างระหว่างค่า F และค่า $F_{critical}$ ของ level 1 มีค่ามากกว่าค่าความต่างของ level 2 และค่า $p\text{-value}$ ของ level 1 มีค่ามากกว่า $p\text{-value}$ ของ level 2

ตารางที่ 2 การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันของสารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิตขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ระดับทองแดงในซีรัมโดยวิธี FAAS ที่ระดับความเข้มข้นทองแดง (A) Level 1 (73 $\mu\text{g/dL}$) และ (B) Level 2 (143 $\mu\text{g/dL}$)

(A)

Source of Variation	SS	df	MS	F	p-value	F crit
Between Groups	34.050	9	3.783	1.681	0.215	3.020
Within Groups	22.500	10	2.250			
Total	56.550	19				

(B)

Source of Variation	SS	df	MS	F	p-value	F crit
Between Groups	74.250	9	8.250	3.000	0.051	3.020
Within Groups	27.500	10	2.750			
Total	101.750	19				

สารควบคุมคุณภาพภายในควรมีความคงตัวที่ดีและอยู่ได้นานเพื่อให้ครอบคลุมระยะเวลาในการทำงานจากผลการประเมินค่าความคงตัวของสารควบคุมคุณภาพ

ภายในผลิตเองเป็นระยะเวลา 7 เดือน และทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Microsoft Excel โดยใช้ Regression Statistics พบว่าสารควบคุมคุณภาพ

ภายใน level 1 และ level 2 มีค่าความชันของสมการ
 เส้นอยู่ในช่วงความเชื่อมั่น 95% และค่า p -value >
 0.05 (ตารางที่ 3(A) และ 3(B)) เป็นระยะเวลา 7 เดือน
 และ 6 เดือนตามลำดับ บ่งชี้ว่าสารควบคุมคุณภาพภายใน
 ผลิตเอง level 1 และ level 2 มีความคงตัวอยู่ในเกณฑ์ที่

ยอมรับได้ทางสถิติจนถึงเดือนที่ 7 และเดือนที่ 6
 ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 16
 ค่า p -value ของ level 2 มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง
 เมื่อเทียบกับ level 1 ที่มีค่า p -value อยู่ในช่วงค่า
 ใกล้เคียงกัน

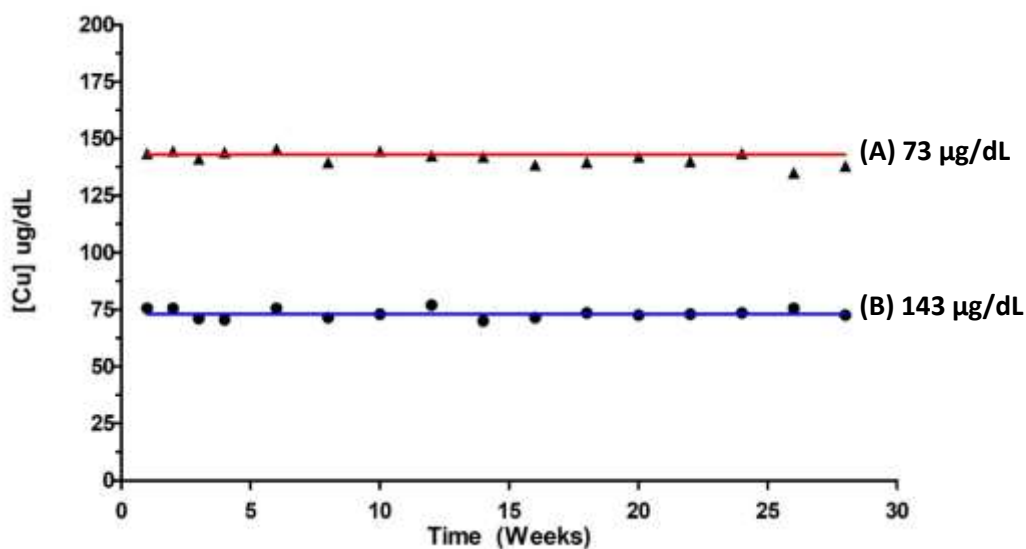
ตารางที่ 3 การประเมินความคงตัวในระยะเวลา 7 เดือนของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองที่ระดับความ
 เข้มข้นทองแดง (A) Level 1 (73 $\mu\text{g/dL}$) และ (B) Level 2 (143 $\mu\text{g/dL}$)

(A)

Week	p -value	Slope	Lower 95%	Upper 95%
4	0.085	-0.430	-1.005	0.145
6	0.804	-0.114	-1.453	1.225
8	0.490	-0.372	-1.734	0.989
10	0.535	-0.413	-2.009	1.182
12	0.709	0.250	-1.315	1.816
14	0.669	-0.291	-1.833	1.251
16	0.471	-0.533	-2.157	1.092
18	0.572	-0.467	-2.268	1.334
20	0.523	-0.577	-2.519	1.365
22	0.372	-0.854	-2.872	1.165
24	0.476	-0.740	-2.933	1.453
26	0.874	-0.171	-2.454	2.112
28	0.785	-0.314	-2.727	2.100

(B)

Week	p -value	Slope	Lower 95%	Upper 95%
4	0.834	-0.138	-2.629	2.354
6	0.493	0.469	-1.449	2.387
8	0.449	-0.442	-1.906	1.022
10	0.850	-0.136	-1.880	1.609
12	0.727	-0.291	-2.232	1.650
14	0.546	-0.559	-2.646	1.527
16	0.142	-1.138	-2.750	0.474
18	0.053	-1.480	-2.984	0.025
20	0.076	-1.529	-3.250	0.192
22	0.060	-1.741	-3.566	0.085
24	0.171	-1.406	-3.510	0.697
26	0.030	-1.679	-3.173	-0.186
28	0.011	-1.948	-3.367	-0.530



ภาพที่ 1 รูปแสดงค่าความเข้มข้นของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองที่ระดับความเข้มข้นทองแดง (A) Level 1 (73 $\mu\text{g/dL}$) และ (B) Level 2 (143 $\mu\text{g/dL}$) จากการประเมินความคงตัวในระยะเวลา 6 เดือน

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาและพัฒนาสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองมีการพัฒนาขึ้นอย่างแพร่หลาย เช่น สารควบคุมคุณภาพภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์ระดับแร่ธาตุปริมาณน้อยในตัวอย่างอาหาร (Chuachuada et al., 2002; Miller-Ihli, 1989) หรือในตัวอย่างปัสสาวะของมนุษย์ (Sorbo et al., 2013) ที่สามารถนำไปใช้ควบคุมคุณภาพภายในได้จริง ปัญหาสำคัญของสารควบคุมคุณภาพภายในที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการพิษวิทยาส่วนใหญ่มีระดับความเข้มข้นไม่เหมาะสมกับช่วงค่าอ้างอิงของห้องปฏิบัติการ ประกอบกับตัวเลือกของสารควบคุมคุณภาพภายในในห้องตลาดมีจำนวนจำกัดเนื่องจากมีผู้ผลิตน้อยรายซึ่งราคาค่อนข้างสูง การพัฒนาสารควบคุมคุณภาพภายในสำหรับการวิเคราะห์ทองแดงในซีรัมที่มีความเข้มข้นเหมาะสมต่อการใช้งานจริงจึงเป็นประโยชน์และมีความจำเป็น

สารควบคุมคุณภาพภายในที่เหมาะสมต้องมีลักษณะเนื้อสารเหมือนหรือใกล้เคียงกับสิ่งส่งตรวจ เช่น ซีรัมมนุษย์ แต่เนื่องจากห้องปฏิบัติการมีข้อจำกัดทางด้านกระบวนการจัดหา รวบรวมตัวอย่างซีรัมมนุษย์และงบประมาณในการตรวจเชื้อโรคติดต่อ (Infectious) ก่อน

การนำไปใช้งาน ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาจึงพัฒนาและผลิตสารควบคุมคุณภาพภายในขึ้นเองเพื่อใช้ควบคุมคุณภาพภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์ระดับทองแดงในซีรัมโดยใช้ BSA เป็นเนื้อสาร เพื่อให้การพัฒนาและผลิตสารควบคุมคุณภาพภายในดังกล่าว มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานกำหนด ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาค่าความเข้มข้น ความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ซึ่งเป็นคุณสมบัติหลักสำคัญของสารควบคุมคุณภาพสำหรับการตรวจวิเคราะห์ระดับทองแดงในซีรัม ผลการประเมินค่าความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองนี้ตามเกณฑ์ ISO GUIDE 80 :2014 พบว่ามีค่าครอบคลุมช่วงค่าอ้างอิงและมีค่าความแปรปรวนความเข้มข้นของทองแดงระหว่างหลอด (%CV) ค่อนข้างต่ำ โดย level 1 มีค่าความแปรปรวน 2.32% ซึ่งมากกว่าใน level 2 (1.61%) สืบเนื่องมาจากสูตรที่ใช้ในการคำนวณ ค่าความเข้มข้นของทองแดงที่เตรียมได้มีค่าสูงกว่าค่าที่คำนวณไว้ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น (%recovery 104 และ 102 ตามลำดับ) แต่ยังมีค่าอยู่ในช่วง 80-110 % ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 2016) โดยความคลาดเคลื่อนและความแปรปรวนของ

ความเข้มข้นอาจมาจากสาเหตุอื่น เช่น ความไม่แน่นอนของวิธีการวิเคราะห์ (uncertainty of measurement), ความไม่แน่นอนของอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ปิเปตต์อัตโนมัติ หรือความไม่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน โดยความคลาดเคลื่อนและความแปรปรวนของค่าความเข้มข้นที่ประเมินได้นี้ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิต ดังสามารถพิจารณาได้จากความสอดคล้องของผลการศึกษาอื่นที่จะอภิปรายต่อไป

จากผลการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการคำนวณทางสถิติพบว่าค่า F ของสารควบคุมคุณภาพภายในทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นมีค่าน้อยกว่า $F_{critical}$ และค่า $p\text{-value} > 0.05$ บ่งชี้ถึงความเป็นเนื้อเดียวกันของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองทั้ง 2 level ที่ผลิตขึ้น โดยค่าความแปรปรวนภายในกลุ่มจะมีค่าน้อยกว่าระหว่างกลุ่มซึ่งบ่งชี้ว่าภายในหลอดเดียวกันมีความเป็นเนื้อเดียวกันค่อนข้างสูง ส่วนค่าความแปรปรวนระหว่างกลุ่มอาจบ่งชี้ถึงขั้นตอนการแบ่งบรรจุ ความแปรปรวนรวมของ level 2 มีค่ามากกว่า level 1 ซึ่งอาจทำให้ค่าความเป็นเนื้อเดียวกันน้อยลงโดยดูได้จากค่าความต่างระหว่างค่า F และค่า $F_{critical}$ ของ level 1 มีค่ามากกว่าค่าความต่างของ level 2 และค่า $p\text{-value}$ ของ level 1 มีค่ามากกว่า $p\text{-value}$ ของ level 2 ผลการศึกษาความคงตัวของสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองตลอดระยะเวลา 7 เดือนพบว่าทั้ง 2 level มีค่าความชันของสมการเชิงเส้นของทั้ง 2 level อยู่ในช่วงความเชื่อมั่น 95% แต่ level 1 เท่านั้นที่มีค่า $p\text{-value} > 0.05$ จนถึงเดือนที่ 7 แสดงว่าสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเอง level 1 และ level 2 มีความคงตัวถึง 7 เดือนและ 6 เดือนตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาคงตัวของอายุการเก็บรักษา (Shelf life) การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษา เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ การเก็บในอุณหภูมิสูงและต่ำสลับกัน (Freeze-Thaw Cycling) ตลอดจนปัจจัยอื่น ๆ เพื่อศึกษาข้อจำกัดของสารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิตขึ้นเอง

การศึกษาสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองในครั้งนี้ พบว่าผลการประเมินประสิทธิภาพผ่านตามเกณฑ์

มาตรฐาน ISO Guide 80: 2014 ซึ่งข้อมูลและวิธีการทางสถิติดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการศึกษาและพัฒนาสารควบคุมคุณภาพภายในสำหรับการวิเคราะห์ธาตุอื่นๆ หรือพัฒนาสารควบคุมคุณภาพภายในด้วยเนื้อสารชนิดอื่นๆ เช่น ปัสสาวะ เลือดครบส่วน เป็นต้น

สรุปผลการวิจัยและประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

จากการศึกษาสารควบคุมคุณภาพภายในผลิตเองในครั้งนี้ช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานมั่นใจในประสิทธิภาพของสารควบคุมคุณภาพภายใน ซึ่งเป็นการยกระดับมาตรฐานการควบคุมคุณภาพภายในทำให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถติดตามและประเมินการเปลี่ยนแปลงของการควบคุมคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลต้นทุนการวิเคราะห์เมื่อนำสารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิตขึ้นเองมาใช้ทดแทนสารควบคุมคุณภาพภายในที่ทราบค่าซึ่งมีค่าใช้จ่ายประมาณ 192 บาทต่อการทำการควบคุมคุณภาพ 1 ครั้ง ในขณะที่ต้นทุนการวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพภายในที่ผลิตขึ้นเองมีค่าใช้จ่ายประมาณ 30 บาทต่อการทำการควบคุมคุณภาพ 1 ครั้ง ซึ่งสามารถลดต้นทุนในกระบวนการควบคุมคุณภาพภายในได้ถึง 6 เท่า นอกจากนี้การพัฒนาสารควบคุมคุณภาพภายในสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการยังช่วยลดต้นทุนการซื้อสารควบคุมคุณภาพภายในจากต่างประเทศ และอาจนำไปสู่การผลิตสารควบคุมคุณภาพภายในเพื่อความยั่งยืนของห้องปฏิบัติการหรือพัฒนาเชิงพาณิชย์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำผลงานเพื่อพัฒนางานประจำสู่งานวิจัยของบุคลากรสายสนับสนุน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล อีกทั้งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณเลอสรุ สุวรรณทล นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ (เกษียณอายุราชการ) ของห้องปฏิบัติการพิษวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ

รองศาสตราจารย์ ดร.สุรวิทย์ พรธาดาวิทย์ และ อาจารย์
ดร.มยุรี ชนะสกุลนิยม ภาควิชาเคมีคลินิก และ อาจารย์
ดร.ประสงค์ แคน้ำ ศูนย์พัฒนามาตรฐานและการประเมิน
ผลิตภัณฑ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่
ให้คำปรึกษาทางสถิติ ข้อคิดเห็นและคำแนะนำในงานวิจัย
อีกทั้งเป็นที่ปรึกษางานวิจัยชิ้นนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ถวัลย์ ฤกษ์งาม, อรชума ล่อใจ, สุดาวดี คงขำ, และ ดวง
เนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์. (2561). การศึกษาระดับ
ทองแดง แมกนีเซียม ซีลีเนียม และสังกะสีใน
ผู้สูงอายุชาวไทยที่มีภาวะเมแทบอลิกซินโดรม
และระดับน้ำตาลในเลือดสูง. *วารสาร
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 44(2), 5564-
5672.

Amos, M. D. (2006). Flame and Vapor Generation
Atomic Absorption Spectrometry. In R. A.
Meyers (Eds.), *Encyclopedia of Analytical
Chemistry*. John Wiley & Sons. doi:
<https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5105>

Arredondo, M., & Núñez, M. T. (2005). Iron and
copper metabolism. *Molecular Aspects
of Medicine*, 26(4), 313-327.

Association of Official Analytical Chemists
International. (2016). *Official Methods of
Analysis, 20th edition. Appendix F, Guidelines
for Standard Method Performance
Requirements*. United States: The Association.
*Atomic Spectroscopy - A Guide to Selecting the
Appropriate Technique and System*.
(2022, September 11) Retrieved from
[https://resources.perkinelmer.com/lab-
solutions/resources/docs/bro_worldlead
er_aaicpmsicpms.pdf](https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/bro_worldleader_aaicpmsicpms.pdf)

Chuachuada, W., Shiowatanab, J., Chukanchanapitukb,
N., Veerasaib, W., Williec, S., & McLarenc,
J. W. (2002). Production and Certification
of In-house Rice Flour Reference Material.
*ScienceAsia: Journal of the Science
Society of Thailand*, 28, 351-358

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and
Allergies. (2015). Scientific Opinion on
Dietary Reference Values for copper.
EFSA Journal, 13(10), 4253.

Escott-Stump, S. (2008). *Nutrition and Diagnosis-
Related Care* (6th ed.). Lippincott
Williams & Wilkins.

González, A., & de la Guardia, M. (2013). Chapter
3 - Mineral Profile. In M. Guardia & A. González
(Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry*
(pp. 51-76). Elsevier.

Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., & Kocot, J. (2014).
The many "faces" of copper in medicine
and treatment. *Biometals*, 27(4), 611 -
621.

Houk, R. S., Fassel, V. A., Flesch, G. D., Svec, H. J.,
Gray, A. L., & Taylor, C. E. (1980).
Inductively coupled argon plasma as an ion
source for mass spectrometric determination
of trace elements. *Analytical Chemistry*,
52(14), 2283-2289.

International Organization for Standardization.
(2014). *ISO GUIDE 80 :2014 Guidance for
the in-house preparation of quality
control materials (QCMs)*. ISO.

Kodama, H., & Fujisawa, C. (2009). Copper
metabolism and inherited coppertransport
disorders: molecular mechanisms, screening,
and treatment. *Metallomics*, 1(1), 42-52.

- Linder, M. C. (1991). *Biochemistry of Copper*. Springer.
- McArdle, H. J., Andersen, H. S., Jones, H., & Gambling, L. (2008). Copper and Iron Transport Across the Placenta: Regulation and Interactions. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(4), 427-431.
- Miller-Ihli, N. J. (1989). In-house biological trace element quality control materials. *Science of The Total Environment*, 89(3), 361-364.
- Moldovan, M. (2019). *Atomic Absorption Spectrometry—Flame*. In P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, & M. Miró (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science* (3rd ed., pp. 144-148). Academic Press.
- National Research Council. (2000). *Copper in Drinking Water*. The National Academies Press.
- Rowin, J., & Lewis, S. L. (2005). Copper deficiency myeloneuropathy and pancytopenia secondary to overuse of zinc supplementation. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(5), 750-751.
- Sorbo, A., Semeraro, A., Pastorelli, A. A., & Patriarca, M. (2013). Control charts in multi-element analysis of human urine. *Accreditation and Quality Assurance*, 18(4), 307-312.
- Stern, B. R. (2010). Essentiality and Toxicity in Copper Health Risk Assessment: Overview, Update and Regulatory Considerations. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 73(2-3), 114-127.
- Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomedicine & pharmacotherapy*, 57(9), 386-398.
- Walsh, A. (1955). The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochimica Acta*, 7, 108-117.
- Wazir, S. M., & Ghobrial, I. (2017). Copper deficiency, a new triad: anemia, leucopenia, and myeloneuropathy. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 7(4), 265-268.
- Wiwanitkit, V. (2008). Minor heavy metal: A review on occupational and environmental intoxication. *Indian journal of occupational and environmental medicine*, 12(3), 116-121.