นิพนธ์ต้นฉบับ

การหาค่าซีรัมแคลเซียมโดยวิธี โอ-ครีซอลไทลีน คอมเพลกโซน ที่ปรับปรุงใหม่ : การประเมินคุณสมบัติของเทคนิค

รัชนา ศานติยานนท์*
พรพันธ์ วรรธนวหะ**
สาธิต แสงมี***
สุภัค จาปะเกษตร์***

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

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

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

Received for publication. May 2, 1988.

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*** นิสิตภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แคลเซียมเป็น cation ที่มีปริมาณมากที่สุดในร่างกาย โดยปกติจะปรากฏอยู่ในพลาสมาเป็นสามรูปแบบ คือ ในรูปที่ยึดกับโปรตีน และเป็น ionized calcium มีอย่างละเท่ากัน คือ ประมาณ 45% ส่วนที่เหลือจะเป็นแคลเซียมที่รวมอยู่กับ anion บางชนิด เช่น ซิเตรด ไบคาร์บอเนต เป็นต้น[1] การตรวจหาระดับของแคลเซียมในพลาสมาหรือซีรัมสามารถวินิจฉัยความผิดปกติของอวัยวะต่าง ๆ ที่มีหน้าที่ในการรักษาสมดุลย์ของแคลเซียม เช่น ลำไส้เล็ก ไต กล้ามเนื้อ กระดูกและฟัน[2]

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

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

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

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจทำให้ค่าแคลเซียมที่วัดได้คลาดเคลื่อนไป เช่น ภาวะเลือดดำคั่งที่เกิดจากการรัดแขนขณะเจาะเลือด ระยะเวลาในการทิ้งให้เลือดแข็งตัวก่อนปั่นแยกซีรัม และระยะเวลาในการเก็บรักษาซีรัมก่อนที่จะนำมาตรวจ เป็นต้น ดังนั้นจึงได้ศึกษาอิทธิพลของสารและภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ที่อาจมีผลรบกวนต่อการหาค่าแคลเซียมโดยวิธีที่ปรับปรุงใหม่ด้วย

วัสดุและวิธีการ

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

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

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

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

5. **วิธีดำเนินการ**

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

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

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

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

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

5.3 วิธีตรวจวัดแคลเซียมในซีรัม

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

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

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

5.5 การทดสอบความแม่นยำของเทคนิควิเคราะห์ (Accuracy)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ต่างของค่าที่ได้ โดยใช้ค่าแคลเซียมที่ตรวจจากซีรัมที่ปั่นแยกภายในเวลาไม่เกินหนึ่งชั่วโมงเป็นค่าเริ่มต้น

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

5.13 **ช่วงค่าอ้างอิง** นำซีรัมที่ไม่ขุ่น ไม่เหลืองจัด และไม่มีฮีโมลัยซิสจากคนปกติ 100 ราย มาหาค่าแคลเซียมโดยวิธี CPC ที่ปรับปรุงใหม่ ทำการตรวจวัดในวันเดียวกับที่เจาะโลหิต

ผลการทดลอง

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

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

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

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

2. **ความแม่นยำ**

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

2.2 การเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์กับวิธีอ้างอิง คือ วิธี AAS (Method comparison study) พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี คือ $r = 0.981$ ($p < 0.001$) $y = 0.98x + 0.05$ (รูปที่ 1) และค่าแคลเซียมที่ได้จากทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน ($p > 0.005$) ที่ทุกระดับ จึงแสดงว่าวิธีนี้ให้ค่าวิเคราะห์ที่ไม่มีความคลาดเคลื่อน เมื่อพิจารณาจาก regression analysis มี proportional systematic error 2% และ constant systematic error 0.05 mg/dl

3. **Linear range และ minimal detection limit** พบว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงอย่างน้อยถึงความเข้มข้นแคลเซียม 20 mg/dl และความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ คือ 2.0 mg/dl (รูปที่ 2)

4. **ความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น** เมื่อแคลเซียมในซีรัมทำปฏิกิริยากับน้ำยา CPC สีที่เกิดขึ้นมีความคงตัวอย่างน้อย 4 ชั่วโมง เมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้นแคลเซียมต่ำปกติ และสูง (รูปที่ 3)

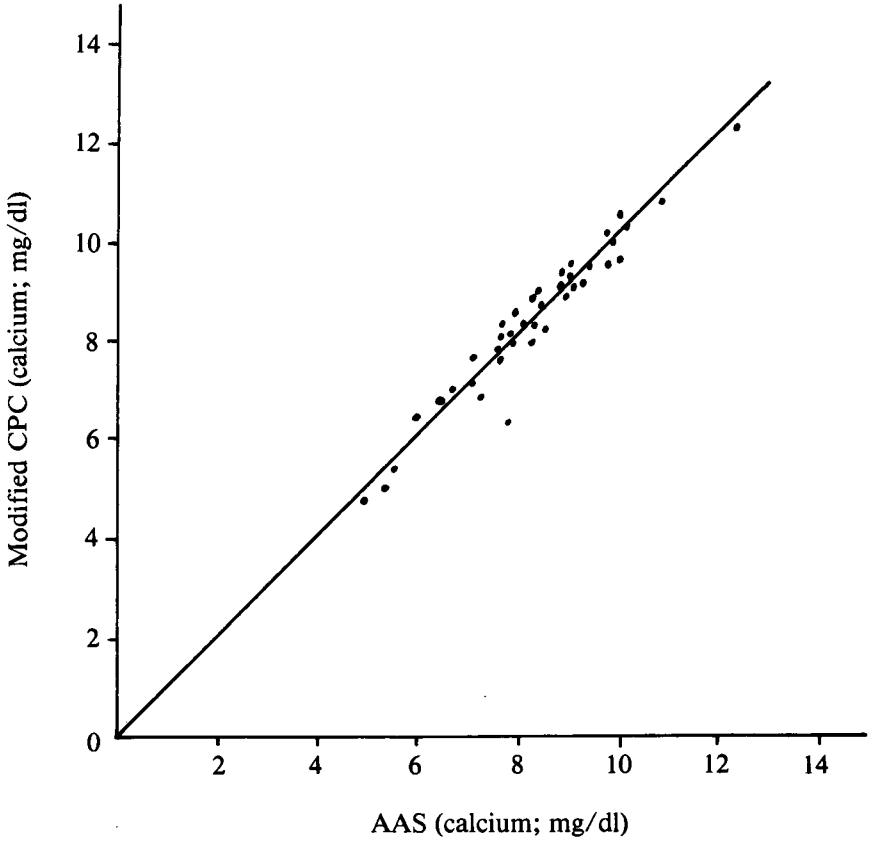

Figure 1 Comparison of serum total calcium concentration determined by modified CPC and atomic absorption spectrophotometric methods (n = 40) y = 0.98x + 0.05; r = 0.981 ($p < 0.001$)

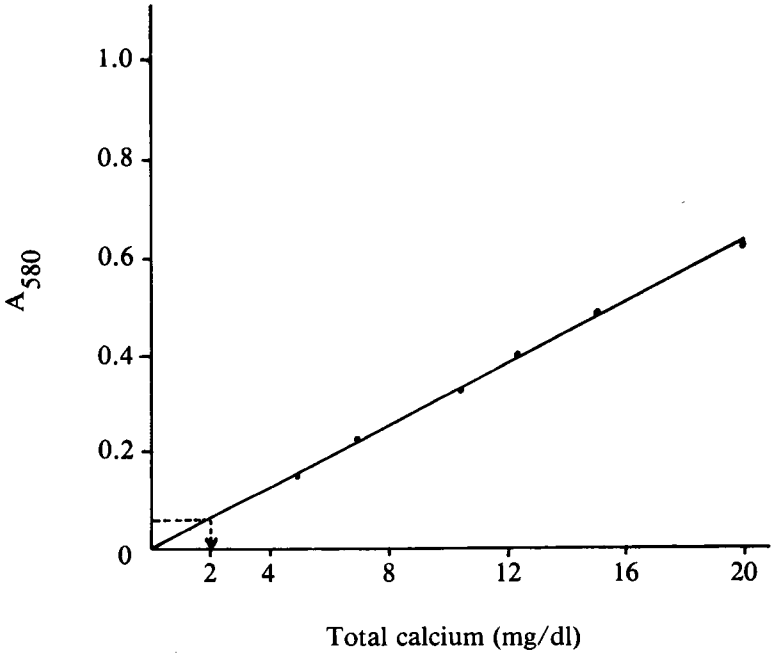

Figure 2 Linear range and minimal detection limit of serum total calcium determination using modified CPC method.

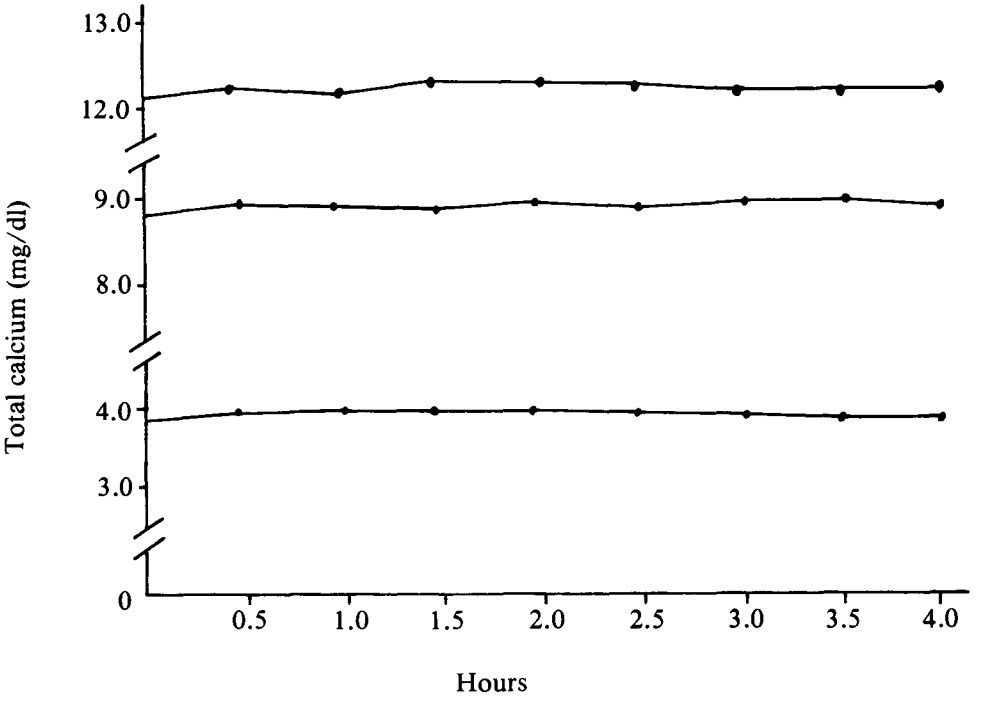

Figure 3 Stability of color produced in the determination of serum total calcium by modified CPC method. Tests were done at low, normal and high calcium concentrations.

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

6. **ผลรบกวนจากภาวะเลือดดำคั่ง** การรัดหลอดเลือดดำขณะเจาะเลือด ซึ่งทำให้เลือดดำคั่ง มีผลรบกวนต่อการตรวจหาค่าแคลเซียมโดยให้ค่าแตกต่างจากเมื่อไม่รัดหลอดเลือดดำขณะเจาะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2)

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

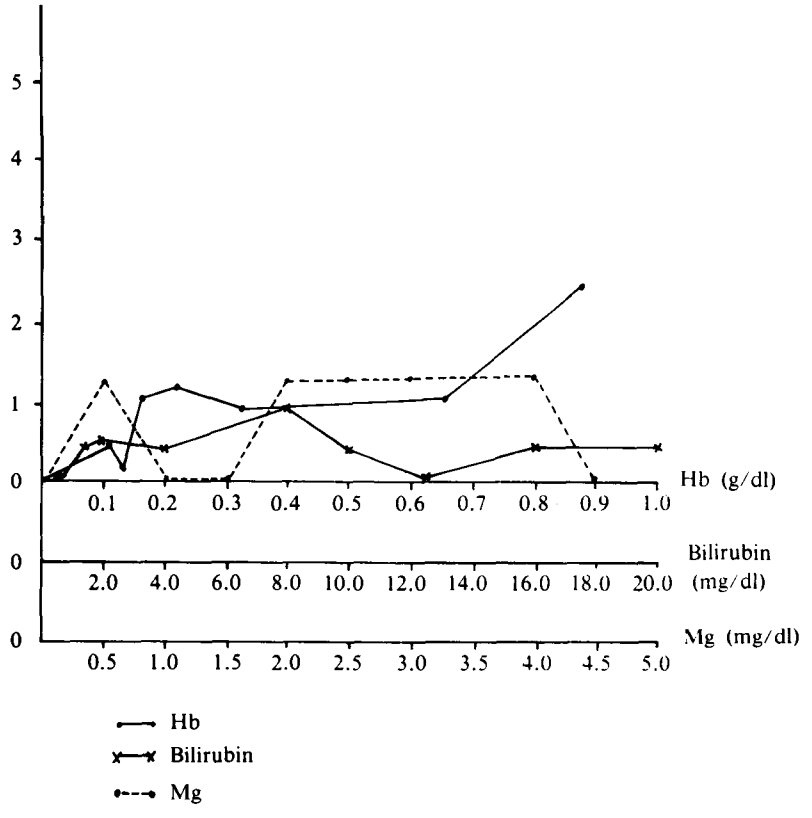

Figure 4 Interference of hemoglobin, bilirubin and magnesium on serum total calcium determination by modified CPC method.

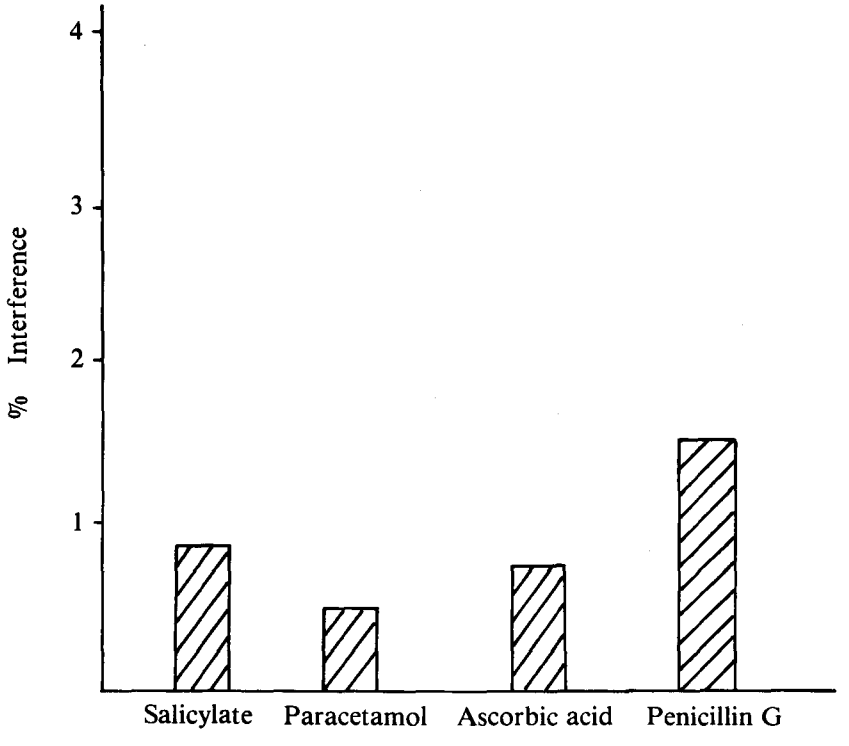

Figure 5 Effects of salicylate, paracetamol, ascorbic acid and penicillin G on the determination of total calcium by modified CPC method.

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

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

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

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

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

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

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

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

10. **อายุของน้ำยา** เมื่อเก็บน้ำยาทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4C พบว่าสามารถใช้น้ำยานี้ตรวจวัดแคลเซียมได้โดยค่าไม่เปลี่ยนแปลง ภายในช่วงเวลาอย่างน้อยสามเดือน

วิจารณ์

วิธีตรวจวัดแคลเซียมโดยใช้สี CPC ที่ปรับปรุงใหม่นี้ได้ใช้ glycine เป็นบัฟเฟอร์ซึ่งไม่เคยมีผู้นำมาใช้ในการหาค่าแคลเซียมมาก่อน ผลที่ได้มีความสัมพันธ์ดีกับวิธี CPC เดิม[11] วิธีที่ปรับปรุงนี้มีความเที่ยงตรงอยู่ในเกณฑ์ดี มีความแม่นยำดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง สีที่เกิดขึ้นคงที่อยู่ได้นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ทำให้สะดวกในกรณีที่ไม่สามารถทำการวัดได้ทันทีภายหลังการเกิดปฏิกิริยา ในการศึกษานี้ได้ใช้หลอดคิวเวตต์ที่มีน้ำยาเป็นตัวปรับศูนย์ก่อนที่จะเติมซีรัม เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อน ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนแคลเซียม แต่ถ้าหลอดทดลองที่ใช้ทำปฏิกิริยามีความสะอาดปราศจากแคลเซียมอย่างแท้จริงแล้วจะสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาพร้อมกันหลาย ๆ หลอด โดยใช้หลอดน้ำยาเป็น blank แยกต่างหากได้ และสามารถตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ จนกว่าผู้ทำการวิเคราะห์จะมีเวลามาวัดค่าการดูดแสงในภายหลัง

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

สารต่าง ๆ หลายชนิดที่อาจมีอยู่ในซีรัมที่ส่งตรวจก็ไม่มีผลรบกวนที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบและเมื่อศึกษาต่อไปถึงภาวะต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อการหาค่าแคลเซียมก็พบว่าสามารถตั้งเลือดแข็งตัวไว้ได้นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ก่อนปั่นแยกซีรัม โดยไม่ทำให้ค่าที่ตรวจวัดได้เปลี่ยนแปลง ซึ่งเป็นข้อดีเพราะห้องปฏิบัติการส่วนมากมักไม่สามารถปั่นแยกซีรัมได้ทันที ภายหลังการเจาะเลือด นอกจากนี้หากไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาค่าแคลเซียมได้ภายในวันนั้นก็สามารถเก็บซีรัมที่ 4-8°C หรือแช่แข็งไว้ได้นานอย่างน้อย 7 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มากเกินพอสำหรับการเก็บซีรัมเพื่องานตรวจวิเคราะห์ประจำวัน

การรัดแขนที่แน่นหรือนานเกินไปขณะเจาะเลือดจะทำให้เกิด hemoconcentration โปรตีนบริเวณที่เจาะเลือดมีความเข้มข้นมากขึ้น เนื่องจากมีน้ำบางส่วนออกไปจากหลอดเลือด จึงอาจทำให้ค่าของแคลเซียมเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะมาจากส่วนของแคลเซียมที่ยึดกับโปรตีน[14] และผลการศึกษานี้เสนอแนะว่า เมื่อเจาะเลือดเพื่อตรวจหาระดับแคลเซียมไม่ควรเจาะโดยการรัดแขนถึงแม้จะเป็นการรัดแขนที่ไม่แน่นหรือนานเกินไปก็ตามเพราะจะทำให้ระดับแคลเซียมสูงกว่าปกติ

เนื่องจากค่าอ้างอิงของวิธีนี้ใกล้เคียงกับวิธีทั่ว ๆ ไปที่อ้างไว้ในตำราเคมีคลินิก[15] จึงสามารถนำเทคนิคนี้มาใช้แทนวิธีที่ใช้อยู่เดิมได้เลย และเทคนิคนี้เป็นวิธีที่เตรียมน้ำยาได้ง่าย ใช้ glycine ซึ่งมีราคาถูก ปลอดภัย น้ำยามีอายุการใช้งานนาน ทำการวิเคราะห์ได้ง่ายและให้ผลการวิเคราะห์เที่ยงตรงและแม่นยำดี จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่จะใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ชัยเวช นุชประยูร ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และ ผศ.เอมอร จันทรเวคิน ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างซีรัม และขอขอบคุณ คุณสมใจ ตัญศิริ สำหรับงานพิมพ์ต้นฉบับ

อ้างอิง

1. Fraser D, Jones G, Kooh SW, Radde IC. Calcium and phosphate metabolism. In: Tietz NM, ed. Fundamentals of Clinical Chemistry. 3 rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 1987. 705
2. Halsted JA. The Laboratory in Clinical Medicine: Interpretation and Application: Philadelphia: W.B. Saunders, 1980, 714
3. Fuchs C, Dorn D, McIntosh C, Scheler F. Comparative calcium ion determination in plasma and whole blood with a new calcium ion analyzer. Clin Chim Acta 1976 Feb; 67(1) : 99-102
4. Grima JM, Brand MJD. Activity and interference effects in measurement of ionized calcium with ion-selective electrodes. Clin Chem 1977 Nov; 23(11) : 2048-2054
5. Pybus J, Feldman FI, Bowers GN Jr. Measurement of total calcium by atomic absorption spectrophotometry with use of a strontium

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