

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารตะกั่วและแคดเมียมในเลือดครบส่วน โดยวิธีเกรฟไฟต์เฟอร์เนสอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี เพื่อการเฝ้าระวังโรคในเขตสุขภาพที่ 1

Validation Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Method to Detect Lead and Cadmium in Whole Blood Sample for Disease Surveillance in Health Region 1

อภิวดี ทองสง วท.ม. (นิติวิทยาศาสตร์)

Apiwadee Tongsong M.Sc. (Forensic science)

เจียรนัย ขันติพงศ์ วท.ม. (พิษวิทยา)

Jiaranai Khantipongse M.Sc. (Toxicology)

รจนา พงศ์สารารักษ์ วท.ม. (ชีวเคมี)

Rodjana Pongsararuk M.Sc. (Biochemistry)

พิชญา ตันตระกูล วท.ม. (จุลชีววิทยา)

Pitchaya Tuntrakul M.Sc. (Microbiology)

สาริณี ศรีเทพ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

Sarinee Srithep B.Sc. (Medical Technology)

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 เชียงใหม่ Office of Disease Prevention and Control, Region 1 Chiangmai

Received: May 30, 2022

Revised: Aug 29, 2022

Accepted: Sep 15, 2022

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการวิเคราะห์ปริมาณสารตะกั่วและแคดเมียมในเลือดครบส่วนด้วยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF-AAS) โดยเครื่องวิเคราะห์รุ่น contrAA800D ทำการศึกษาระหว่างเดือนมกราคมถึงกันยายน 2563 ที่ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านการควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 เชียงใหม่ โดยใช้เลือดแฉะที่ผ่านการตรวจหาสารตะกั่ว และสารแคดเมียม ที่มีค่าการดูดกลืนแสง อยู่ในช่วง 0-0.0050 และช่วง 0-0.0182 ตามลำดับ เป็นเลือดควบคุมผลลบในการทดสอบค่าความถูกต้อง ความแม่นยำ ซิตจำกัดการตรวจพบ และใช้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จำนวน 8 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับห้องปฏิบัติการอื่นอีก 38 แห่ง ผลการศึกษาพบว่า ค่าความเข้มข้นของสารตะกั่ว และสารแคดเมียมที่วัดได้ มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 40-400 ug/L และ 1.0-8.0 ug/L ตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995 ซิตจำกัดการตรวจพบเท่ากับ 1.6 ug/L และ 0.2 ug/L ซิตจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 40 ug/L และ 1.0 ug/L การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 100-105 และ 100-103 ประเมินค่าความแม่นยำในการทวนซ้ำที่ค่าระดับต่ำ กลาง และสูง โดยใช้สมการของ Horwitz's ratio ได้ค่า HORRAT ผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ตัวอย่างทดสอบความชำนาญมีค่าที่ตรวจวัดใกล้เคียงกับค่าที่กำหนด คือ $|z \text{ or } z'| < 2$ จากการตรวจสอบความถูกต้องพบว่าการใช้วิธีดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารตะกั่ว และสารแคดเมียมในเลือดครบส่วนได้ตามมาตรฐาน ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับงานเฝ้าระวังป้องกันควบคุมโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อมต่อไป

คำสำคัญ: สารตะกั่ว, สารแคดเมียม, เลือดครบส่วน, GF-AAS

ABSTRACT

The study aimed to validate Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF-AAS) method using contrAA800D analyze for tracing level determination of lead and cadmium in EDTA whole blood from January to September 2020 in the medical laboratory for diseases control. The blood was blanked from validation; accuracy, precision, and limited of detection of the method using sheep red blood cells, which absorbance values of lead and cadmium were in a range of 0.-0.00050 and 0-0.00182, respectively. In addition, eight external quality assessment blood samples from the Institute of Public Health Sciences were used for proficiency testing and interlaboratory comparison with another 38 laboratories. The results found that the validation for lead and cadmium level determination had a linearity graph in the range of 40-400 ug/l and 1.0-8.0 ug/l, respectively. The correlation coefficient was greater than 0.995. The limit of detection was 1.6 ug/l and 0.2 ug/l, for lead and cadmium respectively. The limit of quantitation was 40 ug/l and 1.0 ug/l. The accuracy test showed that the percent recoveries were 100-105% and 100-103%. The repeatability precision at low, medium and high values using Horwitz's ratio equation found the HORRAT score passed the international standard criteria. Proficiency testing results were in the range of assigned value and compatible with other 38 laboratories, $|z|$ or $|z'| < 2$. Therefore, the result clearly indicated that the developing method reached a standard requirement for the level determination of lead and cadmium. The method is useful for supporting occupational and environmental disease surveillance.

Key words: Lead, Cadmium, Whole blood, GF-AAS

บทนำ

ปัจจุบันการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม มีการนำโลหะหนักมาใช้ในกระบวนการต่างๆ มากขึ้น หรือแม้แต่ภาคเกษตรกรรมมีการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลง ซึ่งใช้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโลหะหนักเป็นส่วนผสม ทำให้สารเคมีและโลหะหนักตกค้างสะสมในดินและน้ำ ส่งผลให้พืชผักที่ปลูกในสิ่งแวดล้อมเหล่านั้นดูดซึมและสะสมโลหะหนักมากขึ้น หรือไอของโลหะต่างๆ ที่ปล่อยออกจากภาคอุตสาหกรรมสู่สิ่งแวดล้อม เมื่อผู้บริโภค มนุษย์ หรือสัตว์ ได้รับสารโลหะหนักที่

สามารถก่อให้เกิดพิษเข้าสู่ร่างกายทางใดทางหนึ่ง ได้แก่ ทางการกินอาหาร น้ำ และการสูดดม ซึ่งโลหะหนักเหล่านี้จะเกิดการสะสมและก่อให้เกิดพิษต่อผู้บริโภคได้ ทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง พิษจากโลหะที่พบมากในไทย คือ พิษตะกั่ว พิษแคดเมียม พิษสารหนู พิษแมงกานีส เป็นต้น พิษจากตะกั่วส่วนใหญ่เป็นแบบเรื้อรังจะทำให้เม็ดเลือดแดงอายุสั้นลงเกิดเป็นโรคโลหิตจาง และเป็นอันตรายต่อระบบประสาท ไต ทางเดินอาหาร ตับ และหัวใจ สำหรับ

แคดเมียมเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะแพร่กระจายไปที่ตับ ม้าม และลำไส้ เมื่อสะสมมากขึ้นจะทำให้เกิดมะเร็ง ไตทำงานผิดปกติ ทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ปวด กระดูกสันหลัง ปวดแขนขา ทำให้เกิดไตพิการได้ (กองโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค, 2558a)

ปี ค.ศ.2016 สถาบันเพื่อการวิจัยและพัฒนา ด้านสุขภาพ ได้คาดการณ์ภาระโรค (Burden Disease) ว่าประชากรโลกเสียชีวิตจากโรคเรื้อรัง 540,000 ราย โดยส่วนใหญ่เป็นประชากรที่มีรายได้ทางเศรษฐกิจต่ำ และปานกลาง ซึ่งมีสาเหตุมาจากการได้สัมผัสสารตะกั่ว (Lead Exposure) ร้อยละ 63.8 จากภาวะที่สมอง ขาดเลือด (Stroke) ร้อยละ 3.1 และจากภาวะหัวใจ ขาดเลือด (Ischemic Heart Disease) ร้อยละ 3 (Tichenor & Sridhar, 2019) ส่วนสถานการณ์ใน ประเทศไทย กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค รายงานผู้ป่วยด้วยโรคพิษโลหะหนักระหว่างปี พ.ศ. 2551-2560 ว่ามีแนวโน้มไม่แน่นอน และข้อมูลปี พ.ศ.2560 จากรายงาน 506, 506/2 และข้อมูล 43 แพ้ม รวม 131 ราย อัตราป่วย 0.2 ต่อประชากรแสนคน ไม่มีรายงานผู้เสียชีวิต ซึ่งตรวจพบชนิดของโลหะหนัก เช่น สังกะสี พรอท ตะกั่ว แคดเมียม ทองแดง ดีบุก เป็นต้น อัตราป่วยสูงในเพศชาย กลุ่มอายุ 25-34 ปี รองลงมา คือ 35-44 ปี อัตราป่วยสูงสุดในภาคเหนือ รองลงมา คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กรณีภาคใต้ โรคพิษตะกั่วจากอู่ต่อเรือ เป็นต้น (กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค, 2561; กองโรคจากการประกอบ อาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค, 2563)

เนื่องจากห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้าน ควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 เชียงใหม่ จะทำการตรวจวิเคราะห์สารตะกั่วและสารแคดเมียม ในเลือด โดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF-AAS) เครื่องวิเคราะห์รุ่น contrAA800D ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูงสามารถตรวจวิเคราะห์

หาปริมาณสารโลหะที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดี (Black *et al.*, 1986) ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบความ ถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของ Eurachem (Magnusson, 2014) แลกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (สุภาณี ดวงธีรปรีชา, 2561) เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติงาน ในห้องปฏิบัติการงานโรคจากการประกอบอาชีพและ สิ่งแวดล้อม โดยใช้มาตรฐานค่าอ้างอิงตามประกาศ กรมควบคุมโรค ข้อเสนอแนะการเฝ้าระวังสุขภาพจาก พิษของสารเคมี กรณีดัชนีชี้วัดการได้รับ/สัมผัสทาง ชีวภาพสำหรับผู้ประกอบอาชีพที่สัมผัสสารเคมี สำหรับประเทศไทย (Thai BEIs: Thailand Biological Exposure Indices) (กองโรคจากการประกอบอาชีพ และสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค, 2558b) เพื่อรองรับ งานเฝ้าระวังป้องกันควบคุมโรคจากการประกอบอาชีพ และสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ และรองรับการขยายตัวของ เศรษฐกิจที่เพิ่มขึ้น

วิธีการศึกษา

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สาร ตะกั่วและแคดเมียมในเลือดครบบส่วน โดยวิธีแกรไฟต์ เฟอร์เนสอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี สำหรับการเฝ้าระวังโรคของงานโรคจากการประกอบ อาชีพและสิ่งแวดล้อม ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการ ทางทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกัน ควบคุมโรคที่ 1 เชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคมถึง กันยายน 2563

เครื่องมือและอุปกรณ์ ประกอบด้วย

- เครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer (GF-AAS), รุ่น contrAA800D
- หลอดกำเนิดแสง (Xenon Arc lamp) สำหรับ ตรวจวิเคราะห์ multielement
- หลอดกราฟไฟท์ (Graphite tube)
- ก๊าซอาร์กอนความบริสุทธิ์ 99.95%

(เครื่องแก้ว ขวดพลาสติก ต้องแช่ในสารละลาย กรดไนตริก 10% ที่ค้างคืนไว้ จากนั้นนำมาล้างออก ด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน)

สารมาตรฐาน

- สารละลายมาตรฐานตะกั่ว (Pb 1000 ppm) เกรด Certipur
- สารละลายมาตรฐานแคดเมียม (Cd 1000 ppm) เกรด Certified Reference Material (CRM)

สารเคมี

- สารละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)
- 65% กรดไนตริกเข้มข้น สารบริสุทธิ์สูง
- ไตรตันเอ็กซ์-100 (Triton x-100)
- น้ำความบริสุทธิ์สูง ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 เมกะโห์ม

ตัวอย่าง

1. ตัวอย่างเลือดแกะจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีสารตะกั่ว สารแคดเมียมปนเปื้อนในปริมาณน้อย ใช้เป็นตัวแทนของเลือดครบ ส่วนของมนุษย์ ผ่านการตรวจหาค่าการดูดกลืนแสง สารตะกั่วมีค่าอยู่ในช่วง 0.0-0.0050 และสารแคดเมียมอยู่ในช่วง 0.0-0.0182 ก่อนนำมาใช้งาน

2. ตัวอย่างทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์โลหะ ในเลือดปี พ.ศ.2563 (Proficiency testing) ของศูนย์พิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ตัวอย่างตรวจวิเคราะห์สารตะกั่วและแคดเมียมจำนวน 8 ตัวอย่าง (รอบ 1/63 และ 3/63 รอบละ 4 ตัวอย่าง)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐานของสารตะกั่ว

ดูดสารละลายมาตรฐานตะกั่ว 1000 กรัม/ลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% กรดไนตริก ให้ได้ความเข้มข้นของตะกั่ว 1000 ไมโครกรัม/ลิตร และเตรียม working standard

ปรับปริมาตรด้วย 0.1% กรดไนตริก เพื่อให้ได้ตะกั่วที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 ไมโครกรัม/ลิตร และสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้อัตราส่วนสารละลายมาตรฐานตะกั่ว : เลือดแกะ: ตัวทำละลาย (0.1% Triton x-100+0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) ในอัตราส่วน 1: 1: 8

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐานของสารแคดเมียม

ดูดสารละลายมาตรฐานแคดเมียม 1000 ไมโครกรัม/ลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1.0% กรดไนตริก ให้ได้ความเข้มข้นของแคดเมียม 100 ไมโครกรัม/ลิตร และเตรียม working standard ปรับปริมาตรด้วย 0.2% กรดไนตริก ให้ได้แคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ไมโครกรัม/ลิตร และสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐานแคดเมียม: เลือดแกะ: ตัวทำละลาย (5% NH_4O_3) ในอัตราส่วน 1: 1: 3 ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนที่สมบูรณ์ ก่อนนำไปปั่นแยกที่ 600 rpm นาน 1 นาที แยกส่วนใสไปทำการทดสอบ

สภาวะการทดสอบ

สารตะกั่ว (Lead) ใช้สารละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นตัวกำจัดสารรบกวน (modifier) ทำให้เกิดการเผาไหม้ตัวอย่าง (pyrolysis) ที่อุณหภูมิ 900 องศาเซลเซียส และทำให้เกิดอะตอมอิสระที่อุณหภูมิ 1700 องศาเซลเซียส ตรวจวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 283.3 นาโนเมตร

สารแคดเมียม (Cadmium) ทำให้เกิดการเผาไหม้ตัวอย่าง (pyrolysis) ที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส และทำให้เกิดอะตอมอิสระที่อุณหภูมิ 1200 องศาเซลเซียส ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 228.8 นาโนเมตร

การทดสอบความเหมาะสมของเครื่อง AAS

ก่อนทำการวิเคราะห์จะต้องปรับเครื่องมือ โดยการตรวจสอบความไวของเครื่อง (Sensitivity check) ให้ได้สัญญาณฟลักที่สมมาตร ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง $0.1 \pm 30\%$ ของค่าที่ผู้ผลิตเครื่องมือกำหนดไว้หรือเท่ากับ 0.07-0.13 จึงเหมาะสมที่จะใช้ทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีเลือดแกะเติมสารมาตรฐานตะกั่วความเข้มข้น 20, 30, 40, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 ไมโครกรัม/ลิตร และเติมสารละลายมาตรฐานแคดเมียมความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ไมโครกรัม/ลิตร ตามสภาวะการทดสอบที่กำหนดไว้ของแต่ละธาตุโดยทดสอบ 3 วัน นำค่าการดูดกลืนแสงของโลหะแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานของแต่ละธาตุแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เพื่อรักษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ซึ่งควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.995

การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำ (Accuracy and Precision)

เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ตะกั่วที่ความเข้มข้น 40, 200 และ 400 ไมโครกรัม/ลิตร และแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัม/ลิตร และในแต่ละระดับมี 10 ตัวอย่าง ทดสอบตัวอย่างละ 1 ครั้ง โดยวิเคราะห์หาปริมาณ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ใช้สถิติ t-test โดย $t_{cal} < t_{cri}$ โดย $t_{cri} = 2.26$ เพื่อทดสอบความถูกต้อง และคำนวณค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบน

มาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation, %RSD) โดยใช้ Horwitz's equation ประเมินด้วย HORRAT (เกณฑ์การยอมรับ คือ < 2) สำหรับทดสอบความแม่นยำ

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

การหาขีดจำกัดของการตรวจ (LOD) โดยทดสอบจากตัวอย่างเลือดที่ไม่มีส่วนผสมของสารตะกั่วและแคดเมียม จำนวน 10 ตัวอย่าง แล้วคำนวณจากสูตร $LOD = 3S.D./S$ โดย S.D. คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณและ S คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ประเมินขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เลือกจุดต่ำสุดของช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟ (linearity range) จากนั้นทำการยืนยันโดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีเติมสารมาตรฐาน (standard addition) ลงในตัวอย่างระดับขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ จำนวน 10 ตัวอย่าง วิเคราะห์ปริมาณ ใช้สถิติ t-test โดย $t_{cal} < t_{cri}$ โดย $t_{cri} = 2.26$ คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับและค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หาค่า HORRAT จาก Horwitz's equation เกณฑ์การยอมรับ คือ < 2

ผลการศึกษา

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานตะกั่วในช่วง 40-400 ไมโครกรัม/ลิตร สารละลายมาตรฐานแคดเมียม ในช่วง 1.0-8.0 ไมโครกรัม/ลิตร พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เฉลี่ย 3 วัน เท่ากับ 0.996, 0.997 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r)

ชื่อโลหะ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของการทดสอบ			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
ตะกั่ว (Pd)	0.997	0.995	0.995	0.996
แคดเมียม (Cd)	0.996	0.996	0.998	0.997

การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy)	ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ
การทดสอบความถูกต้อง โดยการเติมสารละลาย	แคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัม/ลิตร
มาตรฐานในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ	ได้ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 100-103%
10 ซ้ำ คือ ตะกั่วที่ความเข้มข้น 40, 200 และ 400	โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 101.52% ค่า t-test เท่ากับ 0.4,
ไมโครกรัม/ลิตร ได้ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง	1.9 และ 1.1 ตามลำดับ เมื่อเทียบค่า t ที่คำนวณได้
100-105% โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 101.8% ค่า t-test	กับ t_{cr} จากตาราง t ที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่า
เท่ากับ 2.0, 0.2 และ 0.3 ตามลำดับ เมื่อเทียบค่า t	$t_{cal} < 2.26$ แสดงว่าค่าจากการทดสอบกับค่าจริงไม่มี
ที่คำนวณได้กับ t_{cr} จากตาราง t ที่ความเชื่อมั่น 95%	ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 2
พบว่า $t_{cal} < 2.26$ แสดงว่า ค่าจากการทดสอบกับค่าจริง	

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความถูกต้อง และร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียม
ในเลือดครบส่วน

ชนิดโลหะหนัก	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่าเฉลี่ย (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ร้อยละการ คืนกลับ	t-test
ตะกั่ว	40	41.9	0.3	104.7	2.0
(ระดับละ 10	200	200.3	0.4	100.2	0.2
ตัวอย่าง)	400	402.6	2.4	100.7	0.3
แคดเมียม	1.0	1.0	0.1	101.3	0.4
(ระดับละ 10	4.0	4.1	0.2	102.5	1.9
ตัวอย่าง)	8.0	8.1	0.2	100.8	1.1

การทดสอบความแม่นยำ (Precision) ที่ความเข้มข้น 1.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัม/ลิตร ได้ค่าผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของการตรวจวิเคราะห์สารตะกั่วที่ความเข้มข้น 40, 200 และ 400 ไมโครกรัม/ลิตร ได้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 7.2, 2.1 และ 6.1 ค่า HORRAT เท่ากับ 0.4, 0.2 และ 0.5 ตามลำดับ และการวิเคราะห์แคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัม/ลิตร ได้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 10.0, 4.0 และ 2.2 ค่า HORRAT เท่ากับ 0.3, 0.2 และ 0.1 ตามลำดับ ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT < 2 ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์แคดเมียมในเลือดครบบส่วน

ชนิดโลหะหนัก	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ ลิตร)	ค่าเฉลี่ย (ไมโครกรัม/ ลิตร)	ค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน	ร้อยละของค่า เบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์	HORRAT (<2)
ตะกั่ว	40	41.9	0.3	7.2	0.4
(ระดับละ 10 ตัวอย่าง)	200	200.3	0.4	2.1	0.2
	400	402.6	2.4	6.1	0.5
แคดเมียม	1.0	1.0	0.1	10.0	0.3
(ระดับละ 10 ตัวอย่าง)	4.0	4.1	0.2	4.0	0.2
	8.0	8.1	0.2	2.2	0.1

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ สำหรับตะกั่ว แคดเมียม เท่ากับ 1.6 ไมโครกรัม/ลิตร และ 0.2 ไมโครกรัม/ลิตร ตามลำดับ

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณของตะกั่ว เท่ากับ 40 ไมโครกรัม/ลิตร มีร้อยละของการคืนกลับ เท่ากับ 104.7 และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 7.2

ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณของแคดเมียม เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/ลิตร มีร้อยละของการคืนกลับ เท่ากับ 101.3 และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 10.0 ดังตารางที่ 2 และ 3

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว และแคดเมียม ในตัวอย่างเลือดครบบส่วน

วิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม ในตัวอย่างเลือดครบบส่วน โดยวิธีวิเคราะห์ที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จำนวน 8 ตัวอย่าง มีการเปรียบเทียบผลระหว่างหน่วยตรวจวิเคราะห์โลหะต่างๆ จำนวน 39 ห้องปฏิบัติการ ค่าที่ตรวจวัดได้ใกล้เคียงกับค่าที่กำหนด (Assigned value) หรืออยู่ในช่วงของค่าที่กำหนด $\pm$ ค่าความแปรปรวน (S.D.) และเมื่อเทียบกับหน่วยตรวจวิเคราะห์โลหะอื่นๆ ทั่วประเทศ 38 ห้องปฏิบัติการ มีค่า $|z \text{ or } z'| < 2$ แปลว่า ผลการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ (Satisfactory) หรือมีความคลาดเคลื่อนน้อย ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (External quality control, Inter-laboratory comparisons)

รหัส ตัวอย่าง	ตะกั่ว				แคดเมียม			
	Assigned value $\pm$ u	Robust SD	ค่าที่ ตรวจวัดได้	z score	Assigned value $\pm$ u	Robust SD	ค่าที่ ตรวจวัดได้	z score
6301	15.2 $\pm$ 0.6	2.6	14.5	-0.3	6.9 $\pm$ 0.5	1.9	7.8	0.5
6302	28.7 $\pm$ 1.0	4.4	28.0	-0.2	1.3 $\pm$ 0.2	0.6	1.2	-0.2
6303	6.4 $\pm$ 0.3	1.1	6.3	-0.1	8.8 $\pm$ 0.6	2.1	9.9	0.5
6304	21.9 $\pm$ 0.8	3.5	22.3	0.1	3.6 $\pm$ 0.2	0.9	4.0	0.4
6309	14.9 $\pm$ 0.3	1.4	15.7	0.6	6.9 $\pm$ 0.3	1.3	7.2	0.2
6310	40.6 $\pm$ 0.8	3.7	39.3	-0.4	2.3 $\pm$ 0.1	0.5	2.4	0.2
6311	10.0 $\pm$ 0.3	1.5	9.6	-0.3	4.6 $\pm$ 0.2	0.9	4.8	0.2
6312	28.1 $\pm$ 0.6	2.7	29.6	0.6	1.0 $\pm$ 0.1	0.3	0.8	-0.7

*u= uncertainty

อภิปรายผล

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตะกั่วและสารแคดเมียมในเลือดครบส่วน โดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GF-AAS) ต้องมีการเตรียมตัวอย่างเลือดก่อนวิเคราะห์ เนื่องจากในตัวอย่างเลือดมีสารรบกวนที่มีโครงสร้างซับซ้อนและปริมาณสูง จึงจำเป็นต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง และการกำจัดสารรบกวนที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารนั้นๆ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารตะกั่ว จะใช้การเติมสารกำจัดตัวรบกวน คือ สารละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แต่สารแคดเมียมจะไม่สามารถใช้วิธีกำจัดสารรบกวนแบบเดียวกันได้ เนื่องจากสารดังกล่าวจะทำให้เกิดสารประกอบฟอสเฟตซึ่งไปรบกวนการดูดกลืนแสงของสารแคดเมียมได้ จึงต้องใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมคือ การตกตะกอนโปรตีนด้วย 5% กรดไนตริก ซึ่งไปช่วยลดสารรบกวนแทน (Pulido *et al.*, 1996)

จากผลการประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารตะกั่วและสารแคดเมียมในเลือดครบส่วน ตามแนวทางของ Eurachem (Magnusson, 2014) และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (สุภาณี ดวงธีรปรีชา, 2561) พบว่า ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟในการตรวจสอบสารตะกั่วคือ 40-400 ไมโครกรัม/ลิตร และสารแคดเมียมคือ 1.0-8.0 ไมโครกรัม/ลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.996 และ 0.997 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนดคือ 0.995-1.000 (The Association of Official Analytical Chemists: AOAC, 2016; จุไรรัตน์ มหาเทียน, 2011; Miller & Miller, 2018) และช่วงค่านี้กว้างเพียงพอที่จะครอบคลุมค่ามาตรฐานของการตรวจหาปริมาณสารโลหะหนักในเลือดที่มีการกำหนดไว้ในข้อแนะนำของกรมควบคุมโรค เท่ากับ 300 ไมโครกรัม/ลิตร ในเชิงเฝ้าระวังของผู้สัมผัสเท่ากับ 250 ไมโครกรัม/ลิตร (กองโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค, 2558b) หรือมาตรฐานของอุตสาหกรรมภาคีรัฐของอเมริกา กำหนดที่

200 ไมโครกรัม/ลิตร (American Conference of Governmental Industrial Hygienists: ACGIH, 2017) และในเด็กแรกคลอดถึงอายุ 15 ปี กำหนดที่ 50 ไมโครกรัม/ลิตร (กองโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค, 2562) สำหรับค่ามาตรฐานของสารแคดเมียมในเลือดเท่ากับ 5 ไมโครกรัม/ลิตร (กองโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค, 2558b; ACGIH, 2017)

ผลการทดสอบความถูกต้องของสารตะกั่วและสารแคดเมียมที่ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ขั้ว พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของสารตะกั่วมีค่าระหว่าง 100–105% สารแคดเมียมมีค่าระหว่าง 100-103% ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (AOAC, 2016) คือ สารตะกั่วระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ลิตร เท่ากับ 80–110% สารแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ลิตร เท่ากับ 60-115% เมื่อเทียบค่า t ที่คำนวณได้ กับ t_{crit} จากตาราง t ที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่า t_{cal} ไม่เกิน 2.26 แสดงว่า ค่าจากการทดสอบกับค่าจริงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (สุภานี ดวงธีรปรีชา, 2561) ผลการทดสอบความแม่นยำ พบว่า ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารตะกั่วอยู่ระหว่าง 2.1-7.2% มีค่า HORRAT 0.2-0.5 ส่วนสารแคดเมียมอยู่ระหว่าง 2.2-10.0% ค่า HORRAT 0.1-0.3 และพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจะได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่สูง แต่ค่าของทุกระดับความเข้มข้นผ่านเกณฑ์ยอมรับ โดยสารตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ลิตร ค่าไม่ควรเกิน 15% ส่วนสารแคดเมียมระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ลิตร ค่าไม่ควรเกิน 21% (AOAC, 2016; สุภานี ดวงธีรปรีชา, 2561; Thompson *et al.*, 2002) และเกณฑ์ยอมรับ HORRAT มีค่าไม่เกิน 2 (Fajgelj *et al.*, 2000) ดังนั้นจากการตรวจสอบทุกพารามิเตอร์เป็นการยืนยันว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานั้นให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำสามารถนำไปใช้งานได้

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตะกั่ว และสารแคดเมียมในเลือดครบส่วนจากตัวอย่างทดสอบความชำนาญของการวิเคราะห์ของศูนย์พิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ปี 2563 จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่า ค่าที่ตรวจวัดได้ใกล้เคียงกับค่าที่กำหนด และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับห้องปฏิบัติการอื่นอีก 38 แห่ง ที่มีเครื่องตรวจวิเคราะห์แตกต่างกัน แต่ละห้องปฏิบัติการ แต่ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างหรือมีความคลาดเคลื่อนน้อย (ดุขฎิ พลภัทรพิเศษกุล, 2563) ในปัจจุบันการทดสอบนี้ผ่านการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO 15189 ดังนั้นเพื่อรักษามาตรฐานและการควบคุมคุณภาพของผลการทดสอบให้มีความถูกต้อง และมีความน่าเชื่อถือ ทางห้องปฏิบัติการจึงทำการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ต่อไป

จากการประเมินพบว่า วิธีวิเคราะห์ที่ทางกลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรคพัฒนาขึ้นดังกล่าวมีความไวสูง สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารโลหะหนักที่มีความเข้มข้นต่ำๆ มีความจำเพาะต่อสารโลหะหนักแต่ละชนิด เนื่องจากใช้หลักการตรวจวัดการดูดกลืนพลังงานของโลหะช่วงความยาวคลื่นที่จำเพาะต่อสารโลหะนั้นๆ ทุกค่า ที่ทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ตรวจวัดได้ช่วงค่าที่กว้าง ครอบคลุมการใช้งานทั้งเชิงรักษา การเฝ้าระวัง ป้องกันควบคุมโรคที่เกิดจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม ตามประกาศกรมควบคุมโรค เพื่อประเมินการเกิดพิษจากการสะสมในร่างกายของสารตะกั่วและสารแคดเมียม และสามารถรองรับตัวอย่างจากพื้นที่เขตสุขภาพที่ 1 และเขตสุขภาพที่ 2 ซึ่งมีแหล่งของโรงงานอุตสาหกรรมและเหมืองแร่ และรองรับการตรวจเพื่อเฝ้าระวังและป้องกันโรคพิษสารตะกั่วในกลุ่มเด็ก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคลากรกลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์
ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1

เชียงใหม่ และกองโรคจากการประกอบอาชีพและ
สิ่งแวดล้อมที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำในการวิเคราะห์
ข้อมูล และมีส่วนร่วมเสนอแนวทางพัฒนา

เอกสารอ้างอิง

กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. (2561). สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2561 [ออนไลน์]. [สืบค้นเมื่อ 2 มิถุนายน 2565]. แหล่งข้อมูล:

http://164.115.27.97/digital/items/show/17969?advanced%5B0%5D%5Belement_id%5D=40&advanced%5B0%5D%5Btype%5D=is+exactly&advanced%5B0%5D%5Bterms%5D=2561

กองโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค. (2558a). คู่มือให้บริการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้านโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการและพิษวิทยา.

กองโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค. (2558b). ประกาศกรมควบคุมโรค เรื่อง ข้อเสนอแนะการเฝ้าระวังสุขภาพจากพิษสารเคมี กรณีดัชนีชี้วัดการได้รับ/สัมผัสทางชีวภาพสำหรับผู้ประกอบอาชีพที่สัมผัสสารเคมีสำหรับประเทศไทย (Thai Biological Exposure Indices: Thai BEIs) ฉบับที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. ระบุว่า: โอ วิทย์ ประเทศไทย.

กองโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค. (2562). คู่มือการเฝ้าระวังและป้องกันโรคพิษตะกั่วในกลุ่มเด็ก ฉบับที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: สำนักพิมพ์อักษรกราฟิกแอนด์ดีไซน์.

กองโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค. (2563). แนวทางการเฝ้าระวัง ป้องกัน ควบคุมโรคพิษตะกั่วในกลุ่มวัยแรงงาน. ฉบับที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: สำนักพิมพ์อักษรกราฟิกแอนด์ดีไซน์.

จุไรรัตน์ มหาเทียน. (2011). การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation). (เอกสารอัดสำเนา).

ดุชนันท์ พลภัทรพิเศษกุล. (2563). รายงานฉบับสมบูรณ์ แผนทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์โลหะในเลือด 2563. (เอกสารอัดสำเนา).

สุภาณี ดวงธีรปรีชา. (2561). การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation). บทความวิชาการเพื่อการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์ [ออนไลน์]. [สืบค้นเมื่อ 21 ตุลาคม 2563]; แหล่งข้อมูล:

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewif26qkp5H6AhWe7JgGHXEWaj0QFnoECBAQAO&url=https%3A%2F%2Fccpe.pharmacycouncil.org%2Fshowfile.php%3Ffile%3D508&usg=AOvVaw3rXN7f89G8QayAY1B4ijn5>

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). (2017). TLV/BEI

Guidelines [online]. [cited 2022 June 18]; Available from:

<https://www.acgih.org/science/tlv-bei-guidelines/>

- Black, M. M., Fell, G. S., & Ottaway, J. M. (1986). Determination of cadmium in blood plasma by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1(5), 369-372. [cited 2020 February 26]; Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1986/ja/ja9860100369/unauth>
- Fajgelj, A., Ambrus, Á., & Horwitz, W. (2000). Principles and Practices of Method Validation [online]. [cited 2022 June 19]; Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9780854047833-00001/978-1-84755-175-7>
- Magnusson, B. (2014). The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics [online]. [cited 2020 January 17]; Available from: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- Miller J.N. & Miller J.C. (2018). Statistics and chemometrics for analytical chemistry [online]. [cited 2022 June 19]; Available from: <https://bisakimia.com/wp-content/uploads/2017/09/21202653-miller-m-james-statistics-and-chemometrics-for-analytical-chemistry-5th-ed.pdf>
- Pulido, P., Fuwa, K., & Vallee, B. L. (1966). Determination of cadmium in biological materials by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Biochemistry*, 14(3), 393-404. [cited 2022 August 26]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269766902818>
- The Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2016). Appendix F: guidelines for standard method performance requirements [online]. [cited 2022 June 19]; Available from: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf
- Tichenor, M., & Sridhar, D. (2019). Metric partnerships: global burden of disease estimates within the World Bank, the World Health Organization and the Institute for Health Metrics and Evaluation. *Wellcome Open Research*, 4. [cited 2022 May 26]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6406176.2/>
- Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 74(5), 835-855. [cited 2022 June 18]; Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac200274050835/html>