

การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญสำหรับการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดในประเทศไทย

สุดใจ นันตารัตน์¹ และดวงใจ จิปีภพ²

¹สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ อำเภอแมริม เชียงใหม่ 50180

บทคัดย่อ ตัวอย่างทดสอบความชำนาญการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดซึ่งเตรียมจากเลือดวัว เป็นเครื่องมือสำหรับประเมินคุณภาพการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดที่นำผลไปใช้ในทางกฎหมาย ต้องมีคุณลักษณะคล้ายคลึงกับตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ในงานประจำ มีความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวตลอดระยะเวลาที่กำหนด จึงได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดจากเลือดวัวให้เหมาะสมและวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดด้วยเทคนิค Headspace Gas Chromatography ใช้เครื่องตรวจวัดชนิด flame ionization detector จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างทดสอบความชำนาญการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงตัวตามเกณฑ์ยอมรับทางสถิติ (ISO 13528:2015) สามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิ 2-8 °C ได้นาน 30 วันตามช่วงเวลาของการทดสอบความชำนาญการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือด และการขนส่งตัวอย่างให้สมาชิก ต้องเตรียมจากเลือดวัวตัวเดียวกัน มี sodium fluoride และ potassium oxalate ปริมาณ 5 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับเพื่อรักษาสภาพและกันเลือดแข็งตัว ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 ± 2 °C แล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 2-8 °C นาน 7 วัน ก่อนนำไปเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ซึ่งเติมเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ครอบคลุมความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามที่กฎหมายกำหนด

Corresponding author E-mail: sudjai.n@dmsc.mail.go.th

Received: 24 January 2019

Revised: 23 May 2019

Accepted: 5 September 2019

บทนำ

ระดับแอลกอฮอล์ในเลือด หมายถึง ระดับเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล (ethyl alcohol or ethanol) ที่ตรวจพบในร่างกายของคนซึ่งมาจากการดื่มสุราหรือเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ซึ่งจะถูกดูดซึมที่กระเพาะและลำไส้ เข้าสู่หลอดเลือด⁽¹⁾ และพบว่าอุบัติเหตุจากการจราจรทางบกที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มาจากผู้ขับขี่ที่มีการดื่มสุรา หรือของมีเมา ร่วมด้วย ทำให้เกิดการบาดเจ็บ พิการ และสูญเสียชีวิต จึงมีประกาศกฎกระทรวง ฉบับที่ 21 (พ.ศ. 2560) ออกตามความ ในพระราชบัญญัติจราจรทางบก พ.ศ. 2522⁽²⁾ กำหนดระดับแอลกอฮอล์ในเลือดสำหรับผู้ขับขี่ไม่ให้เกิน 50 มิลลิกรัม เปอร์เซ็นต์ (มก.%) ดังนั้นการตรวจวัดระดับแอลกอฮอล์ในเลือดจึงมีความสำคัญทางกฎหมาย ห้องปฏิบัติการ ตรวจวิเคราะห์จึงต้องมีมาตรฐานสากล

การตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดมีหลายวิธี The Society of Forensic Toxicologists and the Toxicology Section of The American Academy of Forensic Sciences (SOFT/AAFS) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้กำหนด ใน The Forensic Toxicology Laboratory Guidelines ให้การตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดนั้นตรวจยืนยันด้วย เทคนิค Gas Chromatography (GC)⁽³⁾ และ The United Kingdom and Ireland Association of Forensic Toxicologists (UKIAFT) ได้กำหนดใน The United Kingdom and Ireland Association of Forensic Toxicologists Forensic toxicology laboratory guidelines ให้การตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดนั้นตรวจยืนยัน ด้วยเทคนิค GC แบบ Headspace⁽⁴⁾ นอกจากนี้ The French Society of Analytical Toxicology (SFTA) ได้กำหนดให้ใช้เทคนิค GC ในการตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดทางด้านนิติเวช⁽⁵⁾ เพื่อให้มั่นใจว่าห้องปฏิบัติการตรวจวัด ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดมีมาตรฐานสากลต้องมีการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) ซึ่งเป็นข้อกำหนดหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017⁽⁶⁾ โดยองค์กรภายนอก (External Quality Assessment: EQA) เป็นการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่าง ห้องปฏิบัติการ และเพื่อการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการในการตรวจวัดระดับแอลกอฮอล์ในเลือดของประเทศ ซึ่งผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency testing provider) ต้องมีระบบ การดำเนินงานที่เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010⁽⁷⁾ เช่นกัน ดังนั้นตัวอย่างที่ใช้ในโปรแกรมทดสอบ ความชำนาญจึงมีความสำคัญ ปัจจัยที่ต้องพิจารณาเกี่ยวกับการจัดเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ได้แก่ องค์ประกอบของตัวอย่าง (Matrix) ช่วงความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบที่จะต้องสอดคล้องกับข้อกำหนด และ ลักษณะของตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการทดสอบอยู่เป็นประจำ มีการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน การทดสอบความคงตัว ต่อสภาวะการเก็บและการขนส่ง การหาค่า assigned และค่า uncertainty โดยใช้สถิติตาม ISO 13528:2015⁽⁸⁾

ตัวอย่างทดสอบความชำนาญซึ่งชนิดตัวอย่างเป็นแอลกอฮอล์ในเลือดนั้นเตรียมได้จากเลือดวัว⁽⁹⁾ หรือ เลือดคน⁽¹⁰⁾ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ เป็นผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญการตรวจระดับ แอลกอฮอล์ในเลือดของประเทศไทย ซึ่งได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 ได้ใช้เลือดวัว ที่มีการเติมแอลกอฮอล์ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ แต่ในปี พ.ศ. 2555 ผลการทดสอบความคงตัวของตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์ทางสถิติ จากการศึกษาทั้งจากการเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 30 วัน และในสภาวะเลียนแบบ การขนส่ง โดยการส่งตัวอย่างทดสอบให้แก่ห้องปฏิบัติการสมาชิก จำนวน 3 แห่ง และให้ส่งตัวอย่างดังกล่าว กลับไปยังผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญทำการตรวจวิเคราะห์หาแอลกอฮอล์ในคราวเดียวกัน พบว่า มีค่าความคงตัวไม่ผ่านเกณฑ์ทางสถิติทั้ง 2 การศึกษา นอกจากนี้ผลการทดสอบระดับแอลกอฮอล์ในเลือดที่สมาชิก รายงานกลับมานั้นมีความแตกต่างกันมาก ทำให้การหาค่าอิงกลุ่มได้ค่าที่ไม่เหมาะสมในการประเมิน และมีค่าส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานกว้าง ดังนั้นจึงได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญให้มีคุณภาพและความคงตัวที่ดี เพื่อใช้ในโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดของประเทศไทย ให้มั่นใจ ได้ว่าผลการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดจากทุกห้องปฏิบัติการมีความถูกต้อง สามารถนำไปใช้ทางกฎหมายได้

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน : เอทานอลมาตรฐาน (NIST, Standard Reference Material 1828b), เอทานอลความเข้มข้น 99.96% (Dr. Ehrenstorfer Lot number G124926)

สารเคมี : isopropanol, sodium fluoride และ potassium oxalate (Merck, AR grade) และ deionized water

วิธีเตรียมสารละลาย sodium fluoride และ potassium oxalate

เตรียม sodium fluoride และ potassium oxalate ด้วย deionized water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (มล.) ให้ความเข้มข้นของ sodium fluoride และ potassium oxalate ประมาณ 5 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มก./มล.) ตามลำดับ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.1 ถึง 0.01 มก. (Mettler Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา) หลอดพลาสติกพร้อมจุกปิดขนาด 4 มล. ตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °ซ magnetic stirrer (IKA® RCT basic ประเทศสหรัฐอเมริกา) และเครื่อง Headspace Gas Chromatography (Thermo รุ่น Trace GC Ultra ประเทศสหรัฐอเมริกา) ประกอบด้วยเครื่องฉีดสารอัตโนมัติ แบบ Headspace และเครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID), Capillary column crossbond phenylmethyl polysiloxane 30 m x 0.53 mm x 2 µm

ตัวอย่าง

เลือดวัวจากวัว 2 ตัว ตัวละ 6 ลิตร จากฟาร์มวัวที่ผลิตเนื้อสัตว์เพื่อการจำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ แยกเก็บในภาชนะพลาสติกขนาด 10 ลิตร มีสาร sodium fluoride และ potassium oxalate มีความเข้มข้น 5 และ 4 มก./มล. ตามลำดับ เพื่อรักษาสภาพ และป้องกันเลือดแข็งตัว เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °ซ

วิธีการ

การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

ปิเปตสารมาตรฐานเอทานอล (NIST) ความเข้มข้น 20, 100, 200 และ 300 มก.% ซึ่งครอบคลุมความเข้มข้น 50 มก.% ที่กฎหมายกำหนด และ 0.25% isopropanol (internal standard) จำนวน 100 ไมโครลิตร (มคล.) ใส่ขวดขนาด 20 มล. แล้วนำเข้าเครื่อง Headspace GC-FID โดยกำหนดสภาวะดังนี้

Column	: crossbond phenylmethyl polysiloxane 30 m x 0.53 mm x 2 µm
อุณหภูมิของ column	: 65 °ซ
อุณหภูมิของ injection	: 210 °ซ
อุณหภูมิของ detector	: 200 °ซ
Carrier gas	: helium gas, use hydrogen and air for make-up gas
Flow rate	: 6 มล./นาที
Injection volume	: 300 มคล. (air volume)

นำค่าที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเอทานอล กับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard ได้ค่า R^2 คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียง 1

Peak area ratio (R) = peak area ของเอทานอล/peak area ของ isopropanol

$$r = \sqrt{R^2}$$

การเตรียมเลือดวัวเพื่อเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

นำเลือดวัวจากวัวตัวที่ 1 และตัวที่ 2 ที่มีการเติมสารรักษาสภาพและสารกันเลือดแข็งตัวมากรองตะกอน หรือ clotted blood ออกด้วยผ้าก๊อชพับซ้อนกัน 8 ชั้น 2 ครั้ง แยกเก็บใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มล. เติมสารมาตรฐานเอทานอล ความเข้มข้น 99.96% ปริมาตร 1.0 มล. ลงในตัวอย่างเลือดวัว เตรียมเป็นตัวอย่าง ทดสอบรวม 5 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างใช้เลือดวัวปริมาตร 1,000 มล. จะได้ความเข้มข้นของเอทานอลในตัวอย่าง ทดสอบประมาณ 100 มก.% ผสมให้เข้ากันนาน 12 ชั่วโมง ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 ± 2 °C เก็บในอุณหภูมิ 2-8 °C นาน 7 วัน แล้วแบ่งบรรจุใส่หลอดปริมาตร 4 มล. จำนวน 100 หลอด ติดฉลากและหมายเลข รายละเอียด ของตัวอย่างทดสอบ 5 ตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่าง S1 : ใช้เลือดวัวตัวที่ 1

ตัวอย่าง S2 : ใช้เลือดวัวตัวที่ 2

ตัวอย่าง S3 : ใช้เลือดวัวตัวที่ 1 ผสมกับเลือดวัวตัวที่ 2

ตัวอย่าง S4 : ใช้เลือดวัวตัวที่ 2 แต่เพิ่มสารกันเลือดแข็งตัว potassium oxalate เป็นความเข้มข้น ในเลือด 8 มก./มล.

ตัวอย่าง S5 : ใช้เลือดวัวตัวที่ 1 บรรจุหลอดทันทีหลังผสมเอทานอล คือไม่มีขั้นตอนการนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น 2-8 °C นาน 7 วัน

ศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างเลือดวัวทั้ง 5 ตัวอย่าง และใช้ผลที่ได้ในการพิจารณา เลือกรวียเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เหมาะสม โดยวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง S1 ถึง S5 ตัวอย่างละ 5 หลอด หลอดละ 2 ข้าง ด้วยเครื่อง Headspace GC-FID ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือเทียบกับ กราฟมาตรฐาน

การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

นำเลือดจากวัว 1 ตัว ซึ่งมีการเติมสารรักษาสภาพ sodium fluoride ความเข้มข้นในเลือด 5 มก./มล. และเติมสารกันเลือดแข็งตัว potassium oxalate ความเข้มข้นในเลือด 4 มก./มล. กรองด้วยผ้าก๊อชพับซ้อนกัน 8 ชั้น 2 ครั้ง เก็บในขวดขนาด 1,000 มล. จำนวน 4 ขวด เติมสารมาตรฐานเอทานอล ความเข้มข้น 99.96% ปริมาตร 0.5, 0.6, 0.7 และ 1.7 มล. ลงในแต่ละขวด ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของเอทานอลในตัวอย่างทดสอบ 50, 60, 70 และ 170 มก.% ตามลำดับ ติดฉลากเป็น PT1 ถึง PT4 ผสมให้เข้ากันนาน 12 ชั่วโมง ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 ± 2 °C และเก็บในอุณหภูมิ 2-8 °C นาน 7 วัน แล้วแบ่งบรรจุใส่หลอดปริมาตร 4 มล. จำนวน 100 หลอด ติดฉลากและ หมายเลขตัวอย่าง

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity check)⁽⁸⁾

สุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เตรียมไว้แบบชั้นภูมิ (stratified random sampling) โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 10 หลอด แล้วสุ่มกลุ่มละ 1 หลอด รวมทั้งหมดเท่ากับ 10 หลอด นำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดหลอดละ 2 ซ้ำ โดยวิธี Headspace GC-FID ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำผลวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างทดสอบความชำนาญมาตรวจสอบทางสถิติ ดังนี้

ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานภายในตัวอย่าง (within-samples standard deviation, S_w) จากสูตร

$$S_w = \sqrt{\frac{1}{10} \sum_{t=1}^{10} w_t^2}$$

$$\text{โดยที่ } w_t^2 = \sum_{k=1}^2 (x_k - \bar{x}_t)^2$$

$$\bar{x}_t = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^2 x_k$$

$\bar{x}_t$ = ค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์แต่ละหลอด ($t = 1, 2, 3, \dots, 10$)

x_k = ผลวิเคราะห์ซ้ำของแต่ละหลอด ($k = 1, 2$)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (between-samples standard deviation) จากสูตร

$$S_s = \sqrt{\frac{1}{9} \sum_{t=1}^{10} (\bar{x}_t - \bar{\bar{x}})^2 - \frac{1}{2} S_w^2}$$

$$\bar{\bar{x}} = \frac{1}{10} \sum_{t=1}^{10} \bar{x}_t$$

กำหนดค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการทดสอบความชำนาญ (standard deviation for proficiency assessment, σ_{pt}) ตาม ISO 13528:2015 ดังนี้

$$\sigma_{pt} = \frac{\text{ค่าผิดพลาดสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permissible error)}}{\text{action limit ในการประเมินผลวิเคราะห์ของสมาชิก}}$$

โดยค่าผิดพลาดสูงสุดที่ยอมรับได้ของการตรวจวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในเลือดมีค่าอยู่ในช่วง $\pm 25\%$ ของค่ากำหนด อ้างอิงค่าจาก CLIA '88 Proficiency Testing Limits, U.S. Federal Register ตาราง Allowable Total Error Limit⁽¹¹⁾ และ action limit ในการประเมินผลวิเคราะห์ของสมาชิกโดยการใช้ค่า Z-score = 3 ดังนั้น

$$\sigma_{pt} = 0.25x / 3.0$$

โดยที่ X คือ ค่ากำหนด (assigned value) ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ได้จากค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดทั้ง 10 หลอด จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

การทดสอบความคงตัว (Stability check)⁽⁸⁾

ทำการทดสอบความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ดังนี้

ทดสอบความคงตัวจากการเก็บรักษาในช่วงเวลาที่กำหนด โดยสุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เตรียมไว้แบบชั้นภูมิ (stratified random sampling) เป็นการสุ่มตัวอย่างแบบจัดออกเป็นชั้นหรือกลุ่มให้มีลักษณะคล้ายกัน โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 14 หลอด แล้วสุ่มมากกลุ่มละ 1 หลอด รวมทั้งหมดเท่ากับ 7 หลอด ตาม ISO 13528:2015 กำหนดให้ใช้ตัวอย่าง 2 g ($g \geq 2$) นำตัวอย่างทดสอบความชำนาญทั้งหมดเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง จำนวน 7 หลอด วิเคราะห์หลอดละ 2 ซ้ำ โดยวิธี Headspace GC-FID และเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน

ทดสอบความคงตัวจากการขนส่ง โดยการสุ่มตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เตรียมไว้ จำนวน 4 หลอด โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C จำนวน 1 หลอด และส่งให้แก่ห้องปฏิบัติการสมาชิก 3 แห่ง แห่งละ 1 หลอด คือห้องปฏิบัติการในจังหวัดชลบุรี ขอนแก่น และสุราษฎร์ธานี แล้วให้ห้องปฏิบัติการส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญดังกล่าวกลับไปยังผู้ดำเนินแผนทดสอบความชำนาญในวันถัดไปโดยไม่แกะหีบห่อ วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างหลอดละ 2 ขั้ว โดยวิธี Headspace GC-FID และเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน

ผลการตรวจสอบความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ดังนี้

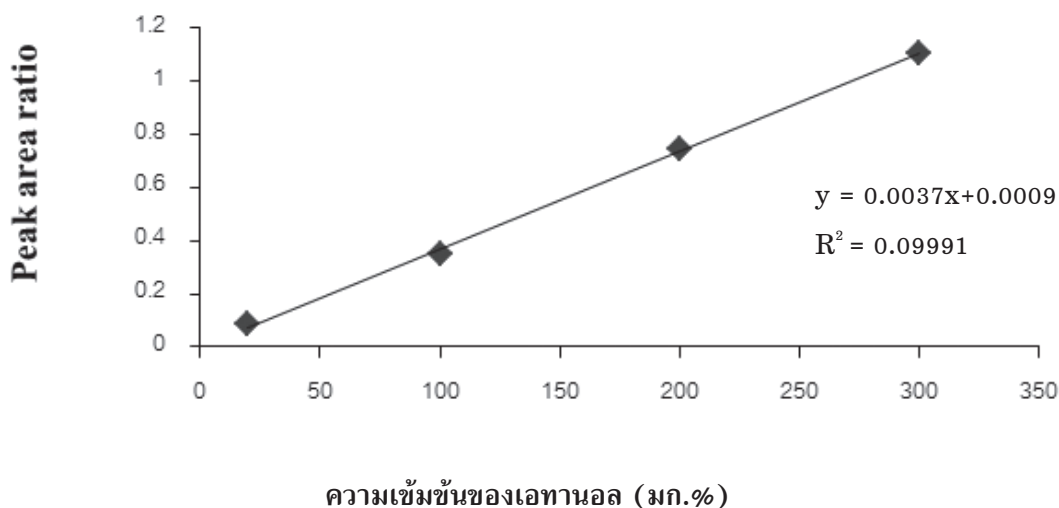
- กรณีตรวจสอบความคงตัวของตัวอย่างภายใต้การเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 30 วัน นำค่าเฉลี่ยจากการตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ($\bar{x}$) เป็นค่าเฉลี่ยของแอลกอฮอล์ในเลือดจำนวน 10 หลอด หลอดละ 2 ขั้ว ($\bar{y}_1$) คำนวณค่าเฉลี่ยของแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง 7 หลอด หลอดละ 2 ขั้ว ($\bar{y}_2$)
- กรณีตรวจสอบความคงตัวของตัวอย่างภายใต้สภาวะการขนส่งตัวอย่าง คำนวณค่าเฉลี่ยของปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง จำนวน 1 หลอด ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการของผู้ดำเนินแผน โดยวิเคราะห์หลอดละ 2 ขั้ว ($\bar{y}_1$) และคำนวณค่าเฉลี่ยของปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างที่ส่งกลับมาจากแต่ละจังหวัด จังหวัดละ 1 หลอด โดยวิเคราะห์หลอดละ 2 ขั้ว รวม 3 จังหวัด ได้ค่าเฉลี่ย 3 ค่า ($\bar{y}_2$)

ตัวอย่างทดสอบความชำนาญจะมีความคงตัวเมื่อ $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq 0.3 \sigma_{pt}$

ผล

กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและ peak area ratio พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับ peak area ratio ได้ค่า $R^2 = 0.9991$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9996 ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเอทานอลกับ peak area ratio ในช่วงความเข้มข้น 20, 100, 200 และ 300 มก.%

การเตรียมเลือดัวเพื่อเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

ตัวอย่างเลือดัวทั้ง 5 ตัวอย่าง คือ S1-S5 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (S_s) น้อยกว่า 0.3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการทดสอบความชำนาญ (σ_{pt}) ดังแสดงในตารางที่ 1 แสดงว่าตัวอย่างทั้งหมดมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 1 ความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ของการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญแบบต่าง ๆ

ค่าสถิติ *	ตัวอย่าง S1	ตัวอย่าง S2	ตัวอย่าง S3	ตัวอย่าง S4	ตัวอย่าง S5
X	113.38	110.98	124.23	103.23	146.48
$\sigma_{pt} = 0.25x / 3.0$	9.449	9.248	10.352	8.603	12.207
$0.3 \sigma_{pt}$	2.835	2.774	3.106	2.581	3.662
S_s	0.255	0.565	0.926	0.792	0.119
$S_s \leq 0.3 \sigma_{pt}$	$0.255 < 2.835$	$0.565 < 2.774$	$0.926 < 3.106$	$0.792 < 2.581$	$0.119 < 3.662$
homogeneity	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน

* หน่วย: มก.%

ส่วนการทดสอบความคงตัวนั้น พบว่าตัวอย่างที่เตรียมจากเลือดัว 1 ตัว คือ ตัวอย่าง S1 และ S2 มีค่าแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างที่ระยะเวลาเริ่มต้นและค่าเฉลี่ยปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างที่เก็บในสภาวะควบคุมเป็นเวลา 30 วัน ไม่เกิน 0.3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการทดสอบความชำนาญ (σ_{pt}) แต่ตัวอย่างที่ได้จากเลือดัว 2 ตัวผสมกัน (S3), ตัวอย่างที่ได้จากเลือดัว 1 ตัว แต่เพิ่มสารกันเลือดแข็งตัวเป็น 8 มก./มล. (S4) และตัวอย่างที่ได้จากเลือดัว 1 ตัว และบรรจุทันทีหลังผสมเอทานอล (S5) นั้นมีค่าความแตกต่างมากกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความคงตัว (stability) ของการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญแบบต่าง ๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C ระยะเวลา 30 วัน

ค่าสถิติ *	ตัวอย่าง S1	ตัวอย่าง S2	ตัวอย่าง S3	ตัวอย่าง S4	ตัวอย่าง S5
X	113.38	110.98	124.23	103.23	146.48
$\sigma_{pt} = 0.25x / 3.0$	9.449	9.248	10.352	8.603	12.207
$0.3 \sigma_{pt}$	2.835	2.774	3.106	2.581	3.662
$\bar{y}_1$	113.38	110.98	124.23	103.23	146.48
$\bar{y}_2$	114.68	108.37	111.75	93.68	141.57
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	1.30	2.61	12.23	9.55	4.91
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 \leq 0.3 \sigma_{pt}$	$1.30 < 2.835$	$2.61 < 2.774$	$12.23 > 3.106$	$9.55 > 2.581$	$4.91 > 3.662$
stability	ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ไม่ผ่าน	ไม่ผ่าน

* หน่วย: มก.%

คุณภาพของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

เมื่อได้วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมแล้ว จึงได้เตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญตามขั้นตอน โดยเติมเอทานอลเข้มข้น 4 ระดับ ในช่วงค่าที่จะใช้งาน ได้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ PT1 ถึง PT4 ให้ครอบคลุมความเข้มข้นประมาณ 50 มก.% ตามที่กฎหมายกำหนด ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าตัวอย่าง PT1 ถึง PT4 มีค่า S_s น้อยกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

ค่าสถิติ *	ตัวอย่าง PT1	ตัวอย่าง PT2	ตัวอย่าง PT3	ตัวอย่าง PT4
X	43.09	58.38	66.13	166.97
$\sigma_{pt} = 0.25x/3.0$	3.591	4.865	5.511	13.914
$0.3 \sigma_{pt}$	1.077	1.459	1.653	4.174
S_s	0.597	0.414	0.186	2.984
$S_s \leq 0.3 \sigma_{pt}$	$0.597 < 1.077$	$0.414 < 1.459$	$0.186 < 1.653$	$2.984 < 4.174$
homogeneity	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน

* หน่วย: มก.%

สำหรับการทดสอบความคงตัวของทั้ง 4 ตัวอย่าง ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °ซ เป็นเวลา 30 วัน และภายใต้สภาวะการขนส่ง 3 ห้องปฏิบัติการ มีค่าแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างที่ระยะเวลาเริ่มต้น ($\bar{y}_1$) และระยะเวลา 30 วัน ($\bar{y}_2$) และค่าแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ($\bar{y}_1$) และค่าเฉลี่ยปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างที่ส่งกลับมาจากแต่ละห้องปฏิบัติการ ($\bar{y}_2$) ไม่เกิน $0.3 \sigma_{pt}$ ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 ความคงตัว (stability) ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เก็บภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 2-8 °ซ ระยะเวลา 30 วัน

ค่าสถิติ *	ตัวอย่าง PT1	ตัวอย่าง PT2	ตัวอย่าง PT3	ตัวอย่าง PT4
X	43.09	58.38	66.13	166.97
$\sigma_{pt} = 0.25x/3.0$	3.591	4.865	5.511	13.914
$0.3 \sigma_{pt}$	1.077	1.459	1.653	4.174
$\bar{y}_1$	43.09	58.38	66.13	166.97
$\bar{y}_2$	42.35	56.94	64.54	163.34
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	0.74	1.44	1.59	3.63
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 \leq 0.3 \sigma_{pt}$	$0.74 < 1.077$	$1.44 < 1.459$	$1.59 < 1.653$	$3.63 < 4.174$
stability	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน

* หน่วย: มก.%

ตารางที่ 5 ความคงตัว (stability) ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญภายใต้สภาวะการขนส่งตัวอย่าง

ค่าสถิติ *	ตัวอย่าง PT1	ตัวอย่าง PT2	ตัวอย่าง PT3	ตัวอย่าง PT4
$\bar{x}$ เชียงใหม่	43.09	58.38	66.13	166.97
$\bar{x}$ ชลบุรี	44.72	56.16	65.06	169.48
$\bar{x}$ ขอนแก่น	41.20	56.30	64.79	170.33
$\bar{x}$ สุราษฎร์ธานี	45.11	58.31	63.97	171.81
X	43.09	58.38	66.13	166.97
$\sigma_{pt} = 0.25x / 3.0$	3.591	4.865	5.511	13.914
$0.3 \sigma_{pt}$	1.077	1.459	1.653	4.174
$\bar{y}_1$	43.09	58.38	66.13	166.97
$\bar{y}_2$	43.67	56.92	64.61	170.54
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	0.58	1.45	1.52	3.57
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 \leq 0.3 \sigma_{pt}$	$0.58 < 1.077$	$1.45 < 1.459$	$1.52 < 1.653$	$3.57 < 4.174$
stability	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน

$$\bar{y}_1 = \bar{x} \text{ เชียงใหม่}$$

$$\bar{y}_2 = \frac{1}{3}(\bar{x} \text{ ชลบุรี} + \bar{x} \text{ ขอนแก่น} + \bar{x} \text{ สุราษฎร์ธานี})$$

* หน่วย: มก.%

วิจารณ์

ผลการทดสอบเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ พบว่าตัวอย่าง S1 และ S2 ที่เตรียมจากเลือดวัวเพียงตัวเดียว มีความคงตัวที่ดี แต่ตัวอย่าง S3, S4 และ S5 ไม่มีความคงตัว โดยที่ตัวอย่าง S3 เป็นการใช้เลือดของวัว 2 ตัวผสมกัน ซึ่งหมู่เลือดของวัวมีมากถึง 11 กลุ่ม ได้แก่ A, B, C, F, J, L, M, R, S, T และ Z เฉพาะในกลุ่ม B มีแอนติเจนต่างกันมากกว่า 60 ชนิด⁽¹²⁾ อาจเป็นไปได้ว่าเลือดวัว 2 ตัวนั้นมีหมู่เลือดต่างกลุ่มต่างแอนติเจนกัน ส่งผลให้เกิดการตกตะกอนหรือการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ จึงต้องใช้กลุ่มเลือดและแอนติเจนชนิดเดียวกันเช่นเดียวกับการศึกษาการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่ใช้เลือดจากคนที่มีหมู่เลือดชนิดเดียวกัน⁽¹³⁾ สำหรับตัวอย่าง S4 เป็นการเพิ่มสารกันเลือดแข็งตัวที่มากจึงมีผลทำให้เม็ดเลือดเสียรูปร่าง⁽¹⁴⁾ ส่วนตัวอย่าง S5 ใช้เลือดจากวัว 1 ตัว หลังจากเติมเอทานอลแล้วบรรจุหลอดทันที อาจไม่มีความคงตัวของแอลกอฮอล์ในเลือดจากวิธีการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม

การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญเพื่อจัดส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกควรเตรียมจากเลือดของวัว 1 ตัว แล้วเติมเอทานอล 4 ระดับ ซึ่งเป็นช่วงค่าตามที่กำหนดในงานทดสอบความชำนาญ มีความคงตัวในการเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 30 วัน และมีความคงตัวดีในสภาวะการขนส่งทางไปรษณีย์ด่วนพิเศษ เหมาะสมที่จะใช้ในโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดของประเทศไทย ซึ่งเป็นคุณภาพที่เพียงพอต่อการกำหนดระยะเวลาดำเนินการของโครงการทดสอบความชำนาญวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือด และสอดคล้องกับการศึกษาของ Kurt M. Dubowski และคณะ ที่ได้ศึกษาความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญแอลกอฮอล์ในเลือดที่เก็บในสภาวะอุณหภูมิ 4 °C มีความคงตัวระยะเวลา 30 วัน เช่นกัน⁽¹³⁾

ด้วยคุณภาพความคงตัวที่ดีของตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เตรียมขึ้นนี้ ทำให้สามารถขนส่งตัวอย่างไปห้องปฏิบัติการสมาชิกได้ในสภาพไม่แช่เย็นในทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งได้จัดส่งตัวอย่างให้สมาชิกในการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการการตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดในรอบถัดมาปีละ 2 รอบ รอบละ 4 ตัวอย่าง มีจำนวนห้องปฏิบัติการสมาชิกที่เข้าร่วมโครงการในประเทศแต่ละปีประมาณ 30-40 แห่ง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556⁽¹⁵⁾ จนถึงปัจจุบันยังไม่พบปัญหาจากคุณภาพของตัวอย่างทดสอบความชำนาญวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือด

สรุป

ตัวอย่างทดสอบความชำนาญสำหรับการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการการตรวจระดับแอลกอฮอล์ในเลือดที่ได้พัฒนาขึ้นโดยใช้เลือดวัว 1 ตัว สำหรับการเตรียมตัวอย่างแต่ละครั้ง มี sodium fluoride 5 มก./มล. และ potassium oxalate 4 มก./มล. เป็นสารรักษาสภาพและสารกันเลือดแข็งตัว เติมเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงค่าการใช้งานที่ครอบคลุมความเข้มข้น 50 มก.% ตามที่กฎหมายกำหนด มีความเหมาะสมทั้งความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวสำหรับการดำเนินการทดสอบความชำนาญได้ในระยะเวลา 30 วัน และเหมาะสมสำหรับการขนส่งทางไปรษณีย์ด่วนพิเศษ เพื่อใช้ประเมินความสามารถและพัฒนาคุณภาพของห้องปฏิบัติการ และนำผลไปใช้ทางกฎหมายได้อย่างยุติธรรมและประชาชนเชื่อมั่นในผลการตรวจ

เอกสารอ้างอิง

1. National Council on Alcohol and Drug Dependence (NCADD). Alcohol and your health. [online]. [cited 2019 Dec 25]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.healthchecksyste.ms.com/alcohol.htm>.
2. กฎกระทรวง ฉบับที่ 21 (พ.ศ. 2560) ออกตามความในพระราชบัญญัติจราจรทางบก พ.ศ. 2522. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนที่ 59 ก (วันที่ 31 พฤษภาคม 2560).
3. SOFT/AAFS forensic toxicology laboratory guidelines. [online]. 2006; [cited 2019 Dec 25]; [24 screens]. Available from: URL: http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf.
4. Cooper GAA, Paterson S, Osselton MD. The United Kingdom and Ireland association of forensic toxicologists forensic toxicology laboratory guidelines (2010). Sci Justice 2010; 50(4): 166-76.
5. Devleeschouwer N, Libeer JC, Martens FK, Neels H, Van Damme M, Verstraete A, et al. Blood alcohol testing: comparison of the performance obtained with the different methods used in the Belgian external quality assessment schemes. Clin Chem Lab Med 2004; 42(1): 57-61.
6. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
7. ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment -- general requirements for proficiency testing. Geneva: International Organization for Standardization; 2010.
8. ISO 13528:2015. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva: International Organization for Standardization; 2015.
9. Flores AL, Moulden JV. The national highway traffic safety administration's blood alcohol proficiency test program. J Anal Toxicol 1977; 1(3): 139-41.

10. Zamengo L, Tedeschi G, Frison G, Griffoni C, Ponzin D, Jones AW. Inter-laboratory proficiency results of blood alcohol determinations at clinical and forensic laboratories in Italy. *Forensic Sci Int* 2019; 295: 213-8.
11. CLIA '88 proficiency testing limits. [online]. 2003; [cited 2019 Dec 25]; [2 screens]. Available from: URL: http://www.auditmicro.com/media/wysiwyg/CLIA_88_Proficiency_Testing_Limits.pdf.
12. Cornell University College of Veterinary Medicine. Blood type. [online]. 2013; [cited 2019 Dec 28]; [4 screens]. Available from: URL: <http://eclinpath.com/hemostasis/transfusion-medicine/blood-types/>.
13. บุญศรี มหาภิตติคุณ. การเจาะเก็บเลือดและการใช้สารกันเลือดแข็ง. [ออนไลน์]. [สืบค้น 29 มิ.ย. 2562]; [8 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.microscopy.ahs.chula.ac.th/newmicros/lecture/bloodcollecting.pdf>.
14. Dubowski KM, Gadsden RH Sr, Poklis A. The Stability of ethanol in human whole blood control: an interlaboratory evaluation. *J Anal Toxicol* 1997; 21(6): 486-91.
15. สุตใจ นันทารัตน์. การประเมินผลการทดสอบความชำนาญการตรวจแอลกอฮอล์ในเลือด. *วารสารพิษวิทยาไทย* 2559; 31(2): 55-69.

Preparation of Blood Alcohol Proficiency Testing Samples in Thailand

Sudjai Nantararat¹ and Duangjai Jipipob²

¹*Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000*

²*Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Amphoe Mae Rim, Chiang Mai 50180, Thailand*

Abstract Blood alcohol proficiency testing (PT) samples as prepared from bovine blood are designed to use as a tool for quality assessment of blood alcohol testing laboratory. PT samples must be similar to the testing samples and homogeneity as well as stability should be evaluated before distributing to participants. The objective of this study was to develop a new PT sample preparation technique to overcome the stability problem. The blood alcohol level was determined using Headspace Gas Chromatography-Flame Ionization Detector. According to ISO 13528:2015, homogeneity and stability results showed that the blood sample should be from the same cow and sodium fluoride (as preservative), and potassium oxalate (as anti-clotting agent) at the concentrations of 5 and 4 mg/ml, respectively, should be added. The mixtures should be mixed for 12 hours at 20 ± 2 °C and kept at 2–8 °C for 7 days. The PT samples were then prepared by adding different contents of alcohol to obtain appropriate concentrations covering the legal limit of 50 mg%.

Keywords: Proficiency testing samples, Blood alcohol, Homogeneity, Stability