นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตซีรัมเหลวราคาถูกเพื่อใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

ขนิษฐ บูรณศิริ*
สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ* พินัย มะโนทัย**
วรรณิการ์ มะโนรมย์*** ทรงศักดิ์ ศรีจินดา***
สายจิตต์ วงศ์ใหญ่*** บุษบา มาตระกูล**

Buranasiri K,Werawatgoompa S, Manothai P, Manorom W, Srijinda S, Wongyai S, Matrakul B. The production of an inexpensive liquid sera for use in clinical chemistry. Chula Med J Feb; 34(2): 183-192

Bovine serum seperated from whole blood taken from a slaughter-house and human serum from blood bank doners were collected in 15% ethylene glycol. Analyses for 16 biochemical substances were performed. Both sera were divided into small quantities and stored at 4°C and at -10°C. They were analysed again every week. It was concluded that most biochemical substances of bovine as well as human serum were stable for 8 months and could be used as quality control serum if kept at 4°C. Only alkaline phosphatase, bilirubin, creatinine, SGPT and uric acid were stable for 5 months. Serum stored at a lower temperature gave similar results.

Reprint request : Buranasiri K, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
Received for publication. December 12, 1989.

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*** ห้องปฏิบัติการชีวเคมี โรงพยาบาลราชวิถี
**** ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าฯ

งานตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการทางเคมีคลินิก จะตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารชีวเคมีในซีรัม ผลการตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้งจำเป็นต้องมีคุณภาพและมาตรฐาน เพื่อแพทย์นำผลการตรวจไปใช้ในการวินิจฉัยโรค หรือการให้การรักษาแก่ผู้เจ็บป่วยได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารชีวเคมีในห้องปฏิบัติการย่อมมีความแปรปรวนซึ่งเกิดได้หลายสาเหตุ เพื่อลดการแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการจึงมีระบบประกันคุณภาพหรือควบคุมคุณภาพที่ดี วิธีหนึ่งที่ปฏิบัติกัน คือการนำซีรัมจากคนมาใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพภายใน ที่นิยมใช้กันได้แก่ ซีรัมแช่แข็งและซีรัมระเหยแห้ง ซึ่งห้องปฏิบัติการอาจจะเตรียมขึ้นใช้เอง หรืออาจจะซื้อจากที่มีขายในท้องตลาด ซีรัมแช่แข็ง ถ้าเก็บไว้นาน จะขุ่น ทำให้ผลการวิเคราะห์สารบางชนิดคลาดเคลื่อนได้ ส่วนซีรัมระเหยแห้งจะต้องละลายก่อนนำมาใช้ อาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้จากการใช้ปริมาตรของตัวทำละลายผิด ซีรัมคนที่นำมาใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพ ถ้าเป็นซีรัมที่ได้จากคนเป็นโรคตับอักเสบ หรือโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS) ก็อาจจะติดต่อมายังผู้วิเคราะห์ได้ ปัจจุบันจึงมีความสนใจการนำซีรัมจากสัตว์มาใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกทดแทนซีรัมคนที่ใช้กันอยู่[1]

จากการนำซีรัมแช่แข็งและซีรัมระเหยแห้งที่เก็บไว้นานมาใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพ พบว่าสารเคมีบางชนิดสลายตัว[2] ปี ค.ศ. 1976 จึงได้มีการนำซีรัมเหลวมาใช้แทนซีรัมแช่แข็งและซีรัมระเหยแห้ง โดยเติม ethylene glycol เพื่อลดจุดเยือกแข็งของซีรัมได้ต่ำกว่า -20ซ นอกจากนี้ ethylene glycol ยังมีคุณสมบัติเป็น antioxidant และทำให้ซีรัมอยู่ในสภาพใสเหมือนเดิม ซึ่งดีกว่าซีรัมแช่แข็งและซีรัมระเหยแห้งที่ละลายน้ำแล้วมักจะขุ่น ได้มีการนำวิธีนี้มาใช้กับซีรัมที่ได้จากคน พบว่าสามารถเก็บซีรัมนี้ได้นานถึง 55 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20[2] เมื่อเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการทำซีรัมเหลว โดยใช้ ethylene glycol (ราคาลิตรละ 300 บาท) เติมลงในซีรัมที่ได้มาโดยไม่ต้องซื้อให้เป็น 15% จะเสียค่าใช้จ่าย 4.5 บาทต่อซีรัมเหลว 100 มล. แต่ถ้าซื้อซีรัมระเหยแห้งขวดละ 120 บาท (ละลายเป็น 10 มล.) จะเสียเงิน 1,200 บาท ต่อซีรัมเหลว 100 มล. ดังนั้นการทำซีรัมเหลวใช้เองจะเสียค่าใช้จ่ายเพียง 1/267 ของราคาซีรัมระเหยแห้ง

Browning และ คณะ[3] รายงานว่าซีรัมที่ได้จากวัว มีสารชีวเคมีหลายชนิดมีปริมาณใกล้เคียงกับซีรัมที่ได้จากคน และสามารถนำมาใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพแทนซีรัมคนได้ การศึกษาดังกล่าวได้ใช้ซีรัมวัวที่เติม ethylene glycol ด้วย พบว่าถ้าเก็บซีรัมเหลวนี้ไว้ที่ -20ซ สามารถเก็บได้นาน 8 เดือน แต่ไม่ได้แสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดว่ามีสารชนิดใดบ้างที่สลายตัว และสลายตัวที่อุณหภูมิใด เนื่องจากปริมาณ ethylene glycol ที่ใช้แตกต่างกัน บางรายงานใช้ 15%[3] บางรายงานก็ใช้ 30%[4] ปริมาณ ethylene glycol ที่ใช้แตกต่างกัน ย่อมมีผลทำให้สภาพของซีรัมที่เก็บไว้ต่างกัน นอกจากนี้ความคงตัวหรือคงสภาพของสารเคมีที่มีอยู่ในซีรัมย่อมต่างกันตามระยะเวลาและอุณหภูมิ ดังนั้น การศึกษานี้จึงต้องการจะศึกษาเปรียบเทียบความคงตัวหรือคงสภาพของสารเคมีต่าง ๆ ที่มีอยู่ในซีรัมคนและวัวที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน เพื่อจะได้เป็นแนวทางที่จะนำมาใช้ในการตัดสินว่าสมควรที่จะนำซีรัมวัวมาใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพแทนซีรัมคนได้ การนำซีรัมวัวซึ่งไม่ต้องซื้อหา มาเติมสารเคมีเพื่อให้คงสภาพเดิมย่อมเป็นการประหยัดงบประมาณอย่างมาก นอกจากนั้นถ้าพบว่าซีรัมเหลวที่เตรียมขึ้นมานี้สามารถเก็บไว้ในตู้เย็น (4ซ) ได้ในช่วงระยะเวลานานพอควรโดยไม่เสื่อมสภาพก็จะมีประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกโดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลที่อยู่ในส่วนภูมิภาค และที่อยู่ในชุมชน ซึ่งมีงบประมาณจำกัด และผู้วิเคราะห์ก็ไม่ต้องกลัวอันตรายจากโรคตับอักเสบหรือโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง และอาจจะนำซีรัมนี้มาใช้ในโครงการการควบคุมคุณภาพภายนอกของประเทศได้อีกด้วย

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมซีรัม

นำเลือดวัวจากโรงฆ่าสัตว์ สหสามัคคีค้าสัตว์ และคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเลือดคนจากศูนย์บริการโลหิต อย่างละ 2 ลิตร ใส่ภาชนะแยกกัน ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1-2 ชม. นำเลือดไปปั่นแยกซีรัมในเครื่องปั่นแยก แยกซีรัมใส่ภาชนะวิเคราะห์หาสารชีวเคมี 16 ชนิด ถ้าพบว่าสารชีวเคมีในซีรัมวัวต่างจากซีรัมคนก็จะปรับให้เท่ากันโดยการเติมสารมาตรฐาน แต่จากการทำทดลองนำร่อง พบว่าสารเคมีในซีรัมวัวไม่ต่างจากซีรัมคนมากนักจึงไม่ได้เติมสารมาตรฐาน ยกเว้น cholesterol ในซีรัมวัวมีค่าต่ำ ซึ่งไม่สามารถเติมได้เพราะ cholesterol ไม่ละลายน้ำ วัดปริมาตรเก็บในตู้แช่แข็ง นำ

ซีรัมแช่แข็งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ซีรัมละลาย ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนซึ่งส่วนมากจะเป็นน้ำออกให้มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ ethylene glycol ที่จะเติมลงไป 15% ของปริมาตรที่วัดไว้ก่อนที่จะนำไปแช่แข็ง เมื่อเติม ethylene glycol แล้วเขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวดละ 5 มล. ส่งไปห้องปฏิบัติการ 3 แห่ง เพื่อทำการวิเคราะห์สารเคมี 16 ชนิด ได้แก่ albumin, alkaline phosphatase, bilirubin, blood urea nitrogen, calcium, chloride, cholesterol, creatinine, glucose, inorganic phosphate, potassium, sodium, SGOT, SGPT, protein และ uric acid

ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง (R,P, และ C) วิเคราะห์ซีรัมที่เก็บไว้ที่ 4ซ สัปดาห์ละครั้งเป็นเวลา 32 สัปดาห์ และที่ -10ซ ถึง -15ซ สัปดาห์ละครั้งเป็นเวลา 44 สัปดาห์

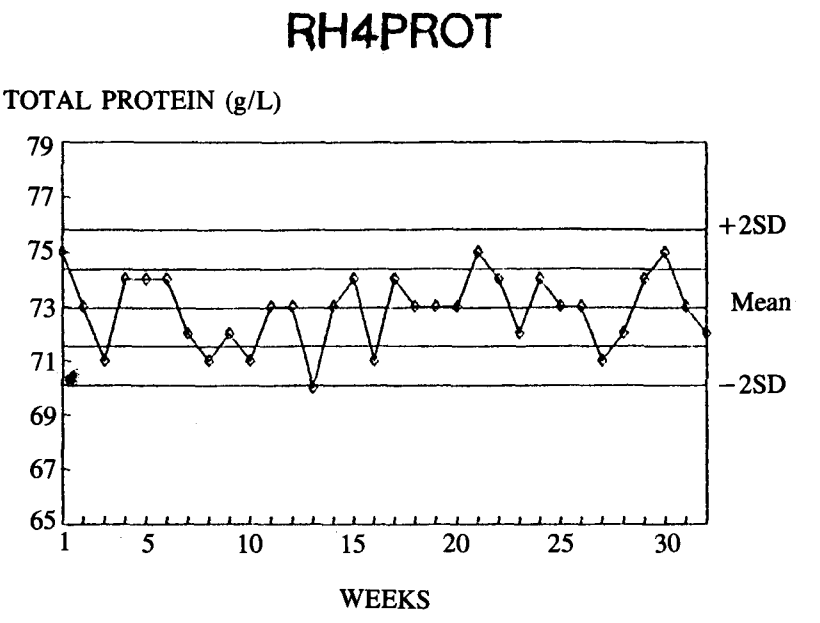
2. วิธีที่ใช้วิเคราะห์สารเคมีของห้องปฏิบัติการ

Analyte	Analytical Methods used		
	Lab R	**Lab P**	**Lab C**
Alb.	BCG	SMA II (BCG)	BCG
Alk.	p-nitrophenyl	SMA II (Bessey Lowry Brock 37°C)	phenolphthalein monophosphate
Bili.	Molloy	SMA II (Jendrassilk Grof)	Diazo
BUN	Diacetylmo noxime	SMA II (Diacetyle monoxime	Urease-GLDH 340nm
Cale.	O-cresolphtha lein complexone	SMA II (o-cresolph-thalein complexone	O-cresolphthalein complexone
Cl-	ISE	Beckman E4A (ISE)	Coulometric
Chol.	Enxymatic	SMA II (enzymatic)	Cholesterol esterase peroxidase
Crea.	Jaffe-kinetic	SMA II (Jaffe's)	Jaffe's-rate
Glu.	Enzyme end point	SMA II (oxidase)	Glucose oxidase peroxidase
Inor. P	Colour end point	SMA II (phosphomolybdate. $SnCl_2$)	Phosphomolybdate
Potas.	ISE	Beckman E4A (ISE)	ISE
Sod.	ISE	Beckman E4A (ISE)	ISE
SGOT	Enzyme-kinetic	SMA II (340 nm)	Enzyme-kinetic 340nm
SGPT	Enzyme-kinetic	SMA II (340 nm)	Enzyme-kinetic 340 nm
Portein	Biuret	SMA II (Biuret)	Biuret
Uric acid	Phosphotung state	SMA II (phosphotungstate-tungstate	Phosphotungstate-bicarbonate

ผลการวิจัย

การหาปริมาณสารเคมี 16 ชนิดในซีรัมคนและซีรัมวัวที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4ซ เป็นเวลา 32 สัปดาห์ ได้ค่าดังแสดงไว้ในตัวอย่างกราฟรูปที่ 1 และ 2 และที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ

-10ซ เป็นเวลา 44 สัปดาห์ ดังแสดงในตัวอย่างกราฟรูปที่ 3 จากกราฟจะแสดงค่าที่ได้จากห้องปฏิบัติการ R, P และ C จะเห็นว่าห้องปฏิบัติการ C มีข้อมูลไม่ครบ ตามเวลาที่กำหนด จึงจะตัดออกไม่นำมาพิจารณา



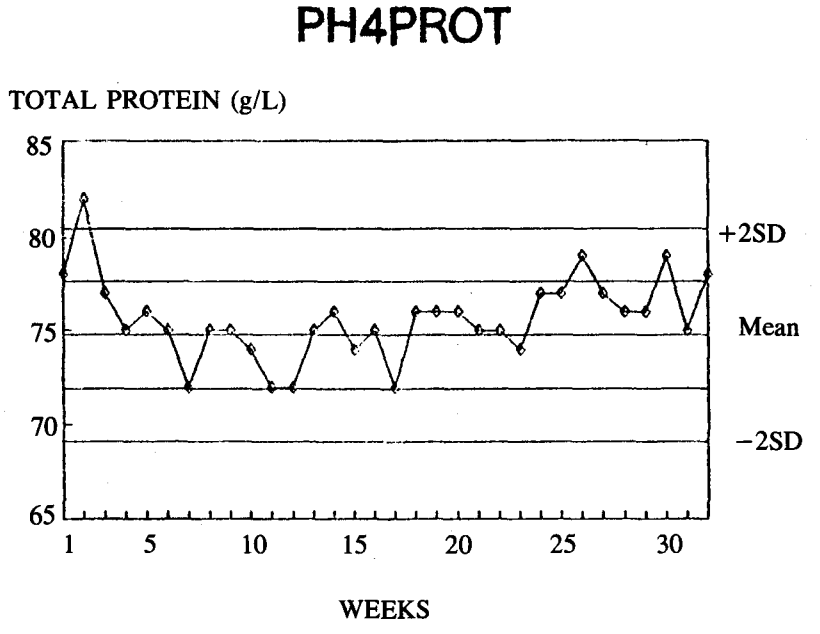


Figure 1. Total protein of human serum stored at 4°C of laboratories R, P and C.

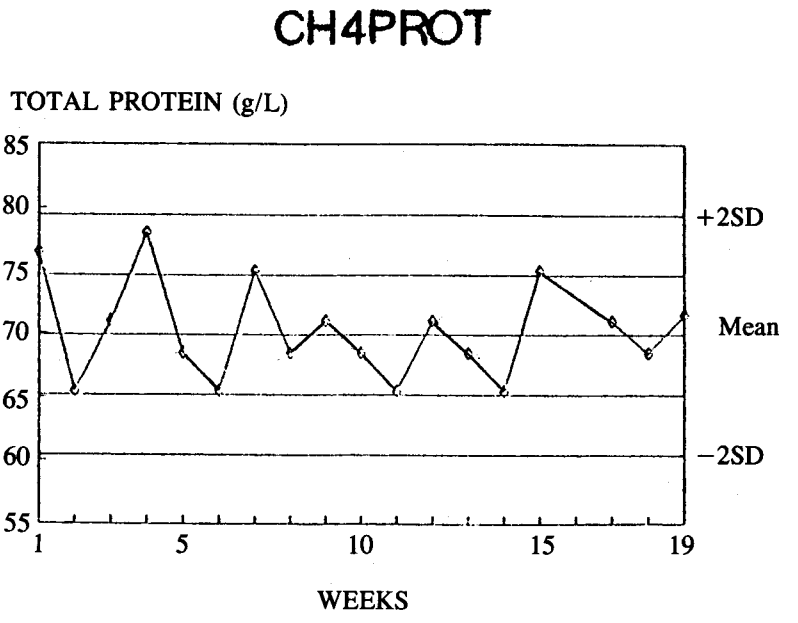


Figure 1. (Cont.)

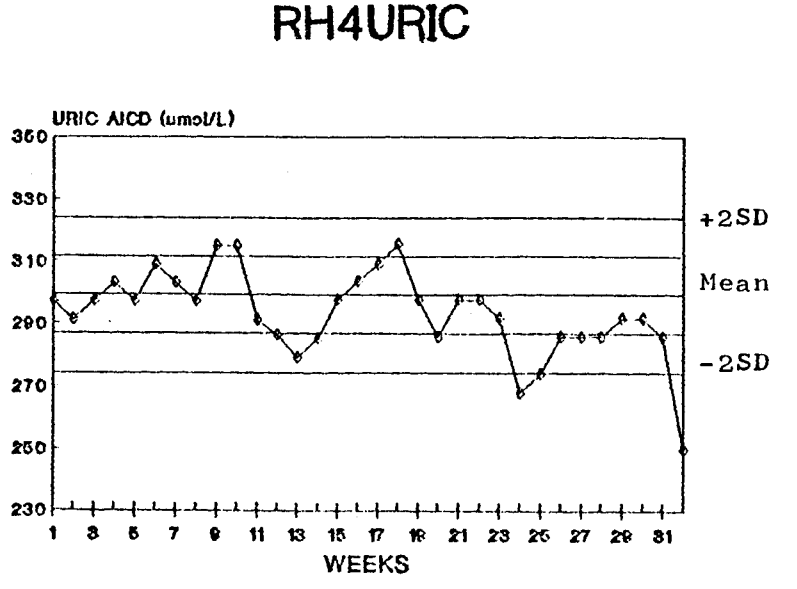
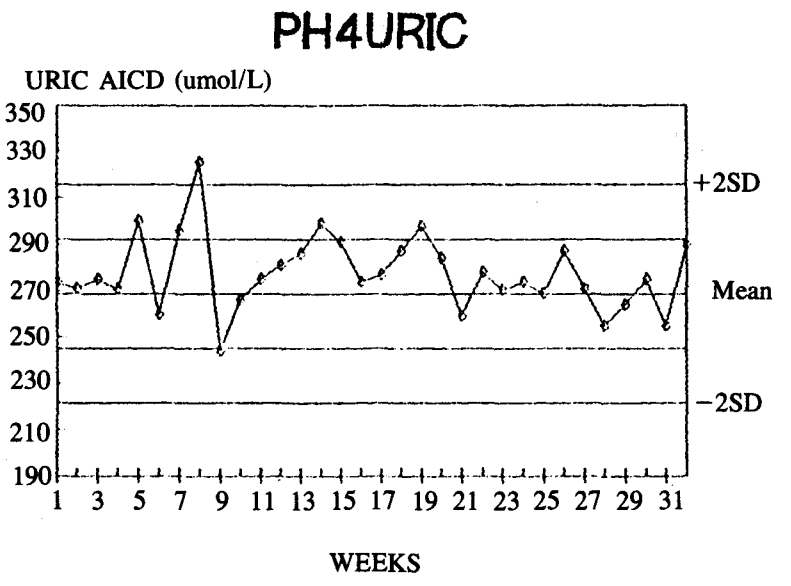


Figure 2. Uric acid of human serum stored at 4°C of laboratories R, P and C



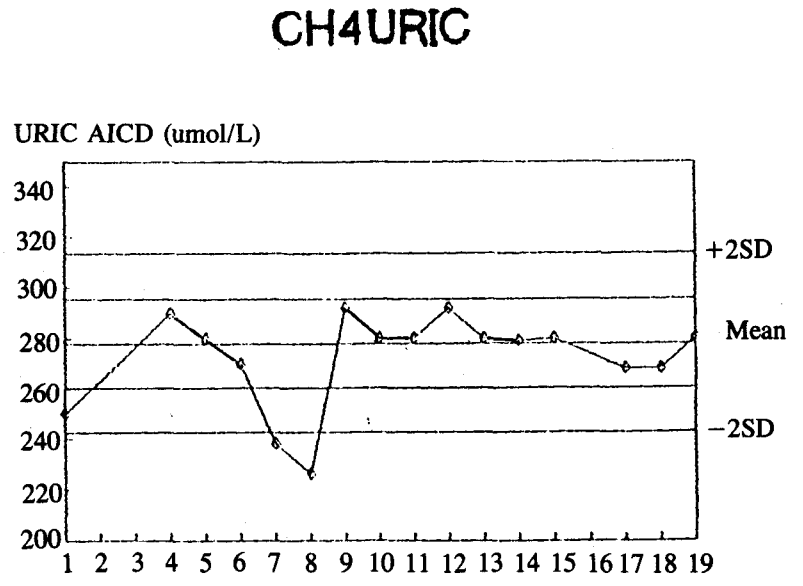


Figure 2. (Cont.)

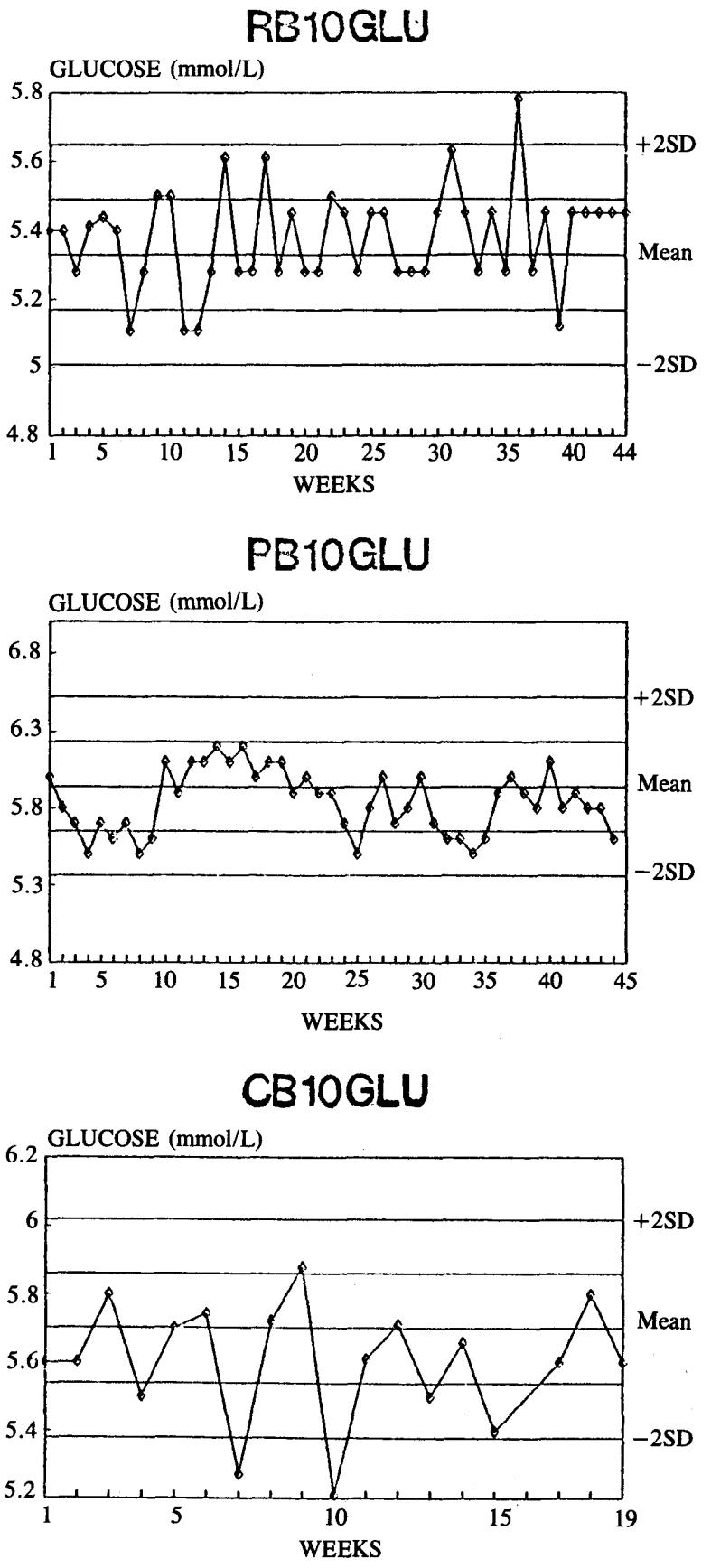


Figure 3. Glucose of bovine serum stored at −10°C of laboratories R, P and C.

จากกราฟทั้งหมดนำมาพิจารณาหาระยะเวลาที่สารเคมีต่าง ๆ อยู่ตัว โดยใช้เกณฑ์ในการตัดสินตัวอย่างเสื่อมสภาพดังนี้ คือ เมื่อค่าของผลการวิเคราะห์จาก 3 ตัวอย่างติดต่อกัน มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยอยู่นอกขอบเขต ค่าเฉลี่ย ± 2SD ผลการพิจารณาปรากฏในตารางที่ 2 และ 3 เมื่อเก็บซีรัมตัวอย่างไว้ที่ 4° และที่ -10° ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารเคมีที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการตัดสินการเสื่อมสภาพของซีรัมตัวอย่าง เป็นการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 30 ครั้ง

Table 1. Statistical parameters (Mean ± S.D) for the determination of serum stability.

Analyte	Mean ± SD (n=30)			
	Human Serum		Bovine Serum	
	Lab R	Lab P	Lab R	Lab P
Albumin (gm/L)	42.85 ± 2.06	45.58 ± 2.63	21.70 ± 0.80	24.11 ± 1.49
Alkaline Phosphatase (U/L)	17.63 ± 1.36	62.37 ± 9.38	14.88 ± 0.83	71.79 ± 5.32
Bilirubin (mmol/L)	10.02 ± 3.65	6.32 ± 1.11	6.93 ± 1.66	2.18 ± 0.64
BUN (mmol/L)	1.92 ± 0.01	6.44 ± 8.85	1.89 ± 0.09	4.23 ± 0.15
Calcium (mmol/L)	2.34 ± 0.10	2.27 ± 0.09	2.02 ± 0.06	1.90 ± 0.11
Chloride (mmol/L)	137.84 ± 9.45	100.12 ± 21.55	125.11 ± 7.91	95.81 ± 2.34
Cholesterol (mmol/L)	4.91 ± 0.15	4.82 ± 0.40	1.38 ± 0.08	1.40 ± 0.22
Creatinine (μmol/L)	70.99 ± 10.75	83.00 ± 5.69	61.42 ± 12.32	56.06 ± 4.14
Glucose (mmol/L)	4.07 ± 0.18	4.53 ± 0.21	5.33 ± 0.16	5.94 ± 0.29
Inorganic Phosphate (mmol/L)	1.07 ± 0.09	1.19 ± 0.13	1.63 ± 0.12	1.58 ± 0.22
Potassium (mmol/L)	4.98 ± 0.82	4.54 ± 0.09	5.72 ± 0.7	5.55 ± 0.11
Sodium (mmol/L)	149.10 ± 15.9	143.85 ± 2.64	141.90 ± 15.66	137.46 ± 2.58
SGOT (U/L)	22.55 ± 2.89	3.40 ± 2.84	70.75 ± 3.42	55.37 ± 6.36
SGPT (U/L)	18.20 ± 2.35	10.95 ± 3.60	19.10 ± 2.73	14.79 ± 3.57
Total Protein (g/L)	72.95 ± 1.43	74.79 ± 2.84	67.75 ± 1.25	71.89 ± 2.56
Uric Acid (μmol/L)	299.05 ± 12.52	268.42 ± 23.55	127.03 ± 12.0	113.47 ± 18.88

สำหรับระยะเวลาที่ uric acid ในซีรัมคนอยู่ตัวที่ 4° จากกราฟ (รูปที่ 2) พบว่า สัปดาห์ 32 ได้ค่าเกิน −2 SD ซึ่งเป็นเพียง 1 ครั้ง และไม่ได้ทดลองต่อไปอีก แต่ผลจากห้องปฏิบัติการอื่นไม่ลดลงตามด้วย จึงน่าจะถือค่า 32 สัปดาห์เป็นระยะที่ uric acid ยังคงอยู่ตัว โดยอาศัยเหตุผลทำนองเดียวกับระยะเวลาที่ SGPT ในซีรัมวัวที่ -10° ก็ควรจะเป็น 44 สัปดาห์

Table 2. Comparison of the stability of analytes between human serum and bovine serum stored at 4°C and −10°C

Analyte	Duration of stability (week)			
	4°C		−10°C	
	Human Serum	Bovine Serum	Human Serum	Bovine Serum
Albumin	32	32	44	44
Alkaline Phosphatase	27	27	29	23
Bilirubin	25	32	44	41
BUN	32	31	44	44
Calcium	32	32	44	44
Chloride	32	32	44	44
Cholesterol	32	32	44	40
Creatinine	32	21	44	40
Glucose	32	32	44	44
Inorganic Phosphate	32	32	44	44
Potassium	32	32	44	38
Sodium	32	32	38	38
SGOT	32	32	44	34
SGPT	27	-	44	44
Total Protein	32	32	44	44
Uric Acid	32	24	44	44

วิจารณ์และผลการทดลอง

ผลการทดลองที่แสดงไว้เป็นกราฟต่าง ๆ มีหลายแห่งที่มีค่าอยู่นอกขอบเขต ±2SD แล้วกลับเข้ามาสู่ขอบเขตที่กำหนด จึงไม่น่าที่จะเป็นการเสื่อมของสารเคมีในซีรัม การที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุจากการเก็บซีรัมตัวอย่างไม่ดีพอ ทำให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ หรือมีสารอนเข้าไปปะปน เช่นขวดที่เก็บซีรัมตัวอย่างไม่ได้รับการฆ่าเชื้อตามสมควร (ติดต่อ Professor Whitehead) เป็นต้น จึงทำให้สารตัวอย่างมีค่าการวิเคราะห์กระโดดขึ้นลง อย่างที่ไม่ควรจะเป็น และการขึ้นลงของค่าที่ได้จากต่างห้องปฏิบัติการไม่คล้อยตามกัน และไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันด้วย อย่างไรก็ตาม ถ้าค่าจากห้องปฏิบัติการห้องหนึ่งห้องใดยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ก็น่าจะยอมรับได้ว่าสารเคมีนั้นยังมีค่าคงที่อยู่ ทั้งนี้เพราะห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งได้มีการควบคุมคุณภาพภายในอย่างดี

จากการทดลองนี้พบว่าได้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Browning และคณะ[3] คือระยะเวลาที่สารเคมี 16 ตัว ในซีรัมวัวอยู่ตัว ได้ 8 เดือน เมื่อเก็บซีรัมตัวอย่างไว้ที่ 4°ซ ยกเว้น alkaline phosphatase, bilirubin, creatinine, SGPT และ uric acid ซึ่งอยู่ได้ประมาณ 5 เดือน แต่ถ้าเก็บไว้ที่ -10°ซ ถึง -15°ซ จะอยู่ได้นานประมาณ 8 เดือน

จะเห็นได้ว่าห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกสามารถนำซีรัมวัวมาใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพได้ดีเท่าซีรัมคน นอกจากนี้ยังประหยัดอีกด้วย แต่ถ้าห้องปฏิบัติการต้องการเก็บซีรัมตัวอย่างให้นานกว่านี้ก็อาจจะทำได้โดยการเพิ่มปริมาณ ethylene glycol เป็น 30% ดังที่เคยมีรายงานของ Frajola และคณะ[4] ที่พบว่าเมื่อเติม ethylene glycol 30% ในซีรัมคน สารเคมีสามารถอยู่ได้นานกว่า 1 ปี แต่ในรายงานนี้ไม่ได้ศึกษาในซีรัมวัว ดังนั้นถ้าห้องปฏิบัติการใดต้องการจะเก็บซีรัมตัวอย่างให้นานกว่า 8 เดือน ก็ควรจะทำการศึกษาโดยเพิ่มปริมาณ ethylene glycol จาก 15% เป็น 30%

จากการศึกษานี้พอสรุปได้ว่าถ้าจะนำซีรัมวัวมา

ใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพทั้งภายในห้องปฏิบัติการและเป็นสารควบคุมคุณภาพภายนอก ควรจะทำการทดลองซ้ำโดยเก็บสารตัวอย่างในภาชนะที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์แทนการใช้ซีรัมคน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนรัชดาภิเษกสมโภชประจำปี 2530 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.นสพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร บริษัทสหสามัคคีค้าสัตว์ และศูนย์บริการโลหิตสภากาชาดไทย ที่ทำให้การวิจัยนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี ผศ.นพ.กำจร ตติยกวี นพ.มนต์ชัย ชาลาประวรรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือการสร้างรูปกราฟโดยใช้คอมพิวเตอร์ และขอขอบคุณ น.ส.กาญจนา เดาวสุต ผู้พิมพ์ต้นฉบับ

อ้างอิง

1. Whitehead TP. Quality Control in Clinical Chemistry TP. New York : John Wiley & Sons, 1977. 106-112
2. Howanit PJ, Howanit JH. Lamberson, HU, Tiersten D, Lansky H. Analytical bases with liquid control material. Am JClin Pathol 1983 Oct; 80 (4) Suppl : 643-7
3. Browning DM, Hill PG, Vazquez DA. Preparation of stabilized liquid quality control serum to be used in clinical chemistry : WHO LAB/864.
4. Frajola WJ, Maurukas J. A stable liquid human reference serum. Health Lab Serv 1976 Jan; 13 (1) : 25-33