นิพนธ์ต้นฉบับ

ประเมินผลคุณสมบัติวิธีวิเคราะห์สารเหล็กในฮีโมโกลบินในเลือด โดยปฏิกิริยากับสีเฟอร์โรซีน : แนะนำวิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินขึ้นใช้เองในห้องปฏิบัติการ

จันทนี ไชยเศรษฐ*
เทียนชัย ไชยเศรษฐ* บุญชัย วงศ์สถิตวิไลรุ่ง**

Chaiyasest C, Chaiyasest T, Wongstitwilairoong B. An evaluation of hemoglobin determination by blood iron assayed with ferrozine chromogen : the local made hemoglobin standard solution. Chula Med J 1988 Jan; 32(1): 37-42

Iron is split from hemoglobin by 2.5% sodium hypochlorite solution, quantitatively assayed by ferrozine reagent and calculated as g Hb/dl. The standard curve of the hemoglobin assayed by iron is linear up to 23.05 g Hb/dl. The day-to-day precision dose profile at hemoglobin concentrations of 9.60, 14.50 and 20.37 g/dl, expressed as % CV, were 2.25, 1.94, and 1.32%, respectively (n = 20). The average of percent recoveries was 98.54%. Results by the proposed method (Y) correlated well with those by the hemiglobincyanide method (X) : r = 0.986 ; Y = 0.99 X − 0.137 ; n = 50. The latter method was standardized by Accuglobin and the hemoglobin concentrations of blood samples were 7 to 17 g/dl. Moreover, in a method comparison study, hemoglobin values estimated by the two techniques were not significantly different; ferrozine chromogen is therefore appropriate for quantitation of iron content in hemoglobin, and a home-made hemoglobin standard can be readily prepared.

Reprint requests : Chaiyasest C, Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand
Received for publication. July 30, 1987.

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** นิสิตเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดเป็นการตรวจที่ใช้เพื่อช่วยวินิจฉัยภาวะโลหิตจาง วิธีที่ใช้กันทั่วไปคือวิธีไซยันเมธิโมโกลบิน (cyanmethemoglobin) หรือเฮมิโกลบินไซยาไนด์ (Hemiglobincyanide)[1-3] ซึ่งใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณเหล็กที่มีอยู่ในฮีโมโกลบินเป็นหลักในการเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินโดยกำหนดให้น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินเท่ากับ 64, 458 ค่า millimolar coefficient extinction เท่ากับ 44.0 และมีเหล็กอยู่ร้อยละ 0.347[4-6] วิธีการวิเคราะห์เหล็กในเลือด (whole blood) มีหลายวิธี[7-11] ขั้นตอนที่สำคัญและยุ่งยากคือขั้นตอนการแยกเหล็กออกจากโมเลกุลของฮีโมโกลบิน และขั้นตอนที่รองลงมาคือการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กให้แม่นยำ ดังนั้นในทางปฏิบัติทั่วไปจึงใช้สารละลายไซยันเมธิโมโกลบินสำเร็จรูปที่บริษัทต่าง ๆ ผลิตขาย มีความเข้มข้นฮีโมโกลบินอยู่ระหว่าง 60-85 mg/100 mL ใช้สร้างกราฟมาตรฐานในการอ่านค่าฮีโมโกลบินจากเลือดตัวอย่างผู้ป่วย[12] และสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 1 ปี แต่น้ำยาสำหรับการตรวจวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบินนั้นจะต้องเตรียมให้ได้มาตรฐานจึงจะได้ค่าที่ถูกต้อง อย่างไรก็ตามน้ำยาสำหรับตรวจวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบินนั้นมีสารเคมีที่อาจเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างที่เก็บไว้ได้เช่น โปแตสเซียมเฟอร์-ไรไซยาไนด์ (potassium ferricyanide) อาจเปลี่ยนเป็นโปแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (potassium ferrocyanide) ทำให้คุณสมบัติในการเกิดสีเปลี่ยนไป[13] ซึ่งในระยะแรกอาจไม่เป็นที่สังเกตุหรือตรวจพบได้ยาก เนื่องจากไม่ได้ใช้สารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินชนิดที่ทำปฏิกิริยากับน้ำยาตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเช่นเดียวกับเลือดของผู้ป่วย จากข้อจำกัดที่กล่าวแล้วนี้ จึงมีผู้พยายามหาวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดโดยวิธีวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก และพบว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์สามารถใช้แยกเหล็กออกจากโมเลกุลของฮีโมโกลบินได้[11] นอกจากนั้นใน ค.ศ. 1970 Stookey[14] ได้นำโครโมเจนชนิดใหม่มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในซีรัม คือเฟอร์โรซีน (Ferrozine) และ International Committee for Standardization in Hematology ได้แนะนำให้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในซีรัมมนุษย์[15] หลังจากนั้นก็มีรายงานการใช้เฟอร์โรซีนอีกมาก[16-18] จนเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีตรวจที่มีความแม่นยำดี และมีความไวสูงในการวัดปริมาณสารเหล็กในซีรัม แต่ยังไม่พบรายงานการใช้เฟอร์โรซีนในการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในเลือด

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการที่จะประเมินผลคุณสมบัติวิธีวิเคราะห์สารเหล็กในโมเลกุลของฮีโมโกลบินในเลือดโดยใช้ปฏิกิริยาเฟอร์โรซีน ซึ่งเป็นเทคนิคที่วัดปริมาณเหล็กในซีรัม ทั้งนี้เพื่อนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการวัดค่าฮีโมโกลบินในสารละลายมาตรฐานที่เตรียมเอง สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารละลายมาตรฐานจากต่างประเทศ และยังได้ผลการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินที่แม่นยำด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. การแยกเหล็กจากโมเลกุลฮีโมโกลบินทำโดยวิธีของ Klein และคณะ[11] การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเหล็กวิธีของ White และ Flashka[16] ส่วนการตรวจวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบินใช้วิธีการของ Kampen และ Zijlstra[2]

2. สารเคมีและน้ำยา

2.1 สารเคมีทั่วไปใช้ชนิด analytical reagents (AR grade)

2.2 น้ำกลั่น ใช้ชนิด deionized water

2.3 น้ำยาตรวจวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบินเตรียมตามวิธีของ Kampen และ Zijlstra[2]

2.4 สารละลาย cyanmethemoglobin สำเร็จรูปใช้ acuglobin ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Ortho Diagnostic System ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.5 sodium hypochlorite ซึ่งมีคลอรีนประมาณ 5% นำมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 2.5% โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 : 1 เติม Triton X-100 จำนวน 0.35 mL เก็บน้ำยาไว้ในตู้เย็น จะคงสภาพนานประมาณ 1 เดือน

2.6 acetate buffer, 2 mol/L pH 4.8

2.7 color reagent

ละลาย ascorbic acid 3.0 g
ferrozine 30 mg
ใน acetate buffer จนครบ 100 mL เติม Triton X-100 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บในตู้เย็น น้ำยานี้คงสภาพนาน 1 เดือน

2.8 Stock iron standard, 2 mg/mL

ละลาย ferric ammonium sulfate
($12\ H_2O$) 1.727 g
ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 50 mL
เติม conc. H_2SO_4 0.2 mL
เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 mL

2.9 Working iron standard

เจือจาง stock iron standard 5, 10, 15 mL ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 mL จะได้สารละลายเหล็กมาตรฐานเข้มข้น 0.2, 0.4 0.6 mg/mL ตามลำดับ

3. เครื่องมือที่ใช้วัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย ใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Digispec ของบริษัท Helena Laboratories สหรัฐอเมริกามี Band width = 8 nm

4. วิธีวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด โดยวิเคราะห์ปริมาณเหล็กดูด working iron standard ทุกความเข้มข้น (ข้อ 2.9) และเลือด ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้แล้วหลอดละ 0.02 mL ตามลำดับเติม 2.5% sodium hypochlorite หลอดละ 2 mL และเติมในหลอดเปล่าอีกหลอดหนึ่ง เพื่อใช้เป็น blank ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติม color reagent ปริมาตร 4 mL ลงในทุกหลอดผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ใช้หลอด blank ปรับ absorbance ให้เป็นศูนย์ที่ 526 nm แล้วอ่านค่า absorbance ของแต่ละหลอดนำค่า absorbance ที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเหล็กไปสร้างกราฟแล้วนำ absorbance ที่วัดได้ของสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินไปอ่านค่าในหน่วย mg iron/mL แล้วเปลี่ยนเป็นค่า g Hb/100 mL blood โดยการคำนวณ[11] ดังนี้

$$\text{g Hb/dL blood} = \frac{\text{mg iron/mL} \times 10}{0.347}$$

5. วิธีสร้างกราฟมาตรฐานฮีโมโกลบิน จากสารละลาย acuglobin เปิดขวด acuglobin ถ่ายใส่ cuvette นำไปวัด absorbance ที่ 540 nm จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำยาวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน 1:2 และ 1:4 แล้วนำไปอ่านค่า absorbance ตามลำดับ นำค่า g Hb/dL blood และ adsorbance ทั้ง 3 ค่าไปสร้างกราฟมาตรฐานการวัดฮีโมโกลบินจากเลือดตัวอย่าง (ใช้น้ำยาวิเคราะห์ฮีโมโกลบินข้อ 2.3)

6. เลือดตัวอย่าง

จากผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 50 ตัวอย่าง ใช้สำหรับศึกษาเปรียบเทียบ (method comparison) วิธีวิเคราะห์ 2 วิธี

7. สถิติวิเคราะห์

ใช้สถิติค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean, SD) สัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (coefficient of variation, CV %) สัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (correlation of coefficient, r) ความถดถอยเชิงเส้นตรง (least-squares regression analysis) และ student t-test

ผลและวิจารณ์

ได้ประเมินผลคุณสมบัติด้านการปฏิบัติ (performance characteristics) ของเทคนิควิเคราะห์ ปริมาณเหล็กของสารละลายฮีโมโกลบิน ได้ผลดังนี้

1. ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linear range) มีความเป็นเส้นตรงจนถึงความเข้มข้นของเหล็กในเลือด 0.8 mg/mL

2. ความเที่ยงตรง (percision) โดยการวิเคราะห์สารละลายฮีโมโกลบินที่เตรียมได้ซ้ำหลายครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 1 ค่า CV% ของการวิเคราะห์ซ้ำในชุดทดลองเดียวกัน (intra-assay precision) ที่ระดับต่ำ ระดับปกติ และ ระดับสูง เท่ากับ 1.97, 1.41 และ 0.97 ตามลำดับ ผลของการวิเคราะห์ซ้ำโดยต่างชุดการทดลอง (inter-assay precision) ที่ระดับต่ำ ระดับปกติ และ ระดับสูง เท่ากับ 2.25, 1.94 และ 1.32 ตามลำดับ

3. ความแม่นยำ (accuracy) ได้ศึกษาความคลาดเคลื่อนโดย

3.1 การศึกษาเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์ เลือดตัวอย่างเดียวกัน (method comparison study) โดย 2 วิธี หาความคลาดเคลื่อน ประเภทที่เกิดขึ้นเป็นประจำในเทคนิควิเคราะห์ (systematic analytical error) โดยเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์ โดยวิธีที่วิเคราะห์ระดับเหล็กในเลือด (test method) กับวิธีที่ใช้ acuglobin สร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะเป็นวิธีเปรียบเทียบ (comparative or reference method) เมื่อวิเคราะห์เลือดตัวอย่างเดียวกันด้วย 2 วิธีจำนวน 50 ตัวอย่างช่วงค่าที่ศึกษาตั้งแต่ 7 ถึง 17 gHb/dL ได้ผลแสดงในตารางที่ 2 สำหรับค่าสมการความถดถอยเชิงเส้นตรง $y = 0.99 \times - 0.137$ ค่า $r = 0.986, p < 0.001$ จากค่าจุดตัดแกน Y (Y intercept) ที่ศึกษามีค่าความคลาดเคลื่อนประเภทที่เกิดเป็นประจำในเทคนิควิเคราะห์ชนิดค่าคงที่ (constant systemic error) = - 0.137 และจากค่าความชัน (slope = 0.99) แสดงว่าวิธีนี้มีความคลาดเคลื่อนประเภทที่เกิดเป็นประจำในเทคนิควิเคราะห์ชนิดค่าเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้น = 1.0 % (proportional systematic error) เมื่อนำค่าฮีโมโกลบินของเลือดตัวอย่างทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทั้งสองเปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางทางสถิติ ซึ่งแสดงว่าวิธีวัดระดับฮีโมโกลบินโดยวิเคราะห์ปริมาณเหล็กที่เสนอแนะให้ค่าวิเคราะห์ที่ถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี hemiglobin cyanide ที่ใช้สารมาตรฐาน accuglobin สร้างกราฟมาตรฐาน

3.2 การศึกษาค่าวิเคราะห์กลับคืน (recovery study) โดยเติมสารละลายมาตรฐานเหล็กที่มีความเข้มข้น 0.09, 0.18, 0.28 และ 0.375 mg/mL ซึ่งเท่ากับค่าฮีโมโกลบิน 2.59, 5.33, 8.21 และ 10.81 g Hb/dL ตามลำดับลงในเลือดตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ค่ากลับคืนได้ผลดัง

Table 1 Precision study of blood hemoglobin by iron assay.

level	n	g Hb/dL	S.D.	CV %
within day assay				
low	20	8.98	0.117	1.97
normal	20	14.26	0.200	1.41
high	20	21.29	0.206	0.97
day to day assay				
low	20	9.60	0.220	2.25
normal	20	14.50	0.280	1.94
high	20	20.37	0.280	1.32

Table 2 Comparison of proposed method with hemiglobincyanide method using Accuglobin standard.

range g Hb/dL	n	hemoglobin determination		P value
		using Accuglobin standard	using iron assay	
7.0-10.9	6	8.9 + 1.08	8.9 + 1.15	NS
11.0-13.9	31	12.9 + 0.78	12.6 + 0.81	NS
14.0-17.0	13	15.5 + 0.72	15.3 + 0.95	NS

Table 3 Recovery study with proposed method.

No.	Concentration assayed (gHb/dL)	concentration added (gHb/dL)	concentration recovered	% recovery
1	7.85	baseline	-	-
2	10.45	2.59	2.60	100.4
3	13.11	5.33	5.26	98.68
4	15.71	8.21	7.76	95.74
5	18.59	10.81	10.74	99.35
			average	98.54

แสดงในตารางที่ 3 ได้ค่าเฉลี่ยของ % recovery = 98.54 การวิจัยครั้งนี้ได้แยกเหล็กออกจากโมเลกุลของฮีโมโกลบินโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์แล้ววัดปริมาณเหล็กด้วยน้ำยาเฟอร์โรซีน ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในซีรัม[16] มาทดลองใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในเลือด จากนั้นคำนวณค่าที่ได้ให้เป็นปริมาณกรัมของฮีโมโกลบินต่อเลือด 100 มิลลิลิตร ทำการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เหล็กโดยวิธีที่เสนอใหม่นี้กับค่าฮีโมโกลบินที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีเฮมิโกลบินไซยาไนด์ เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีที่เสนอมีคุณสมบัติในการวิเคราะห์ดีเท่าเทียมกับวิธีอ้างอิงก็จะสามารถใช้วิธีใหม่นี้วิเคราะห์ ปริมาณฮีโมโกลบินใน hemolysate เข้มข้นที่เตรียมโดยเก็บรักษาด้วยเอธิลีนไกลคอลซึ่งมีรายงานว่าสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 1 ปี[20] แล้วนำมาเจือจางให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมเก็บไว้เป็นสารละลายมาตรฐานได้

จากผลการวิจัยจะเห็นว่าวิธีการสกัดเหล็กออกจากโมเลกุลของฮีโมโกลบินแล้ววิเคราะห์หาปริมาณเหล็ก โดยการทำให้เกิดสีวิธีนี้ เป็นวิธีที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพียงพอที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ดี[19] อีกประการหนึ่งในปัจจุบันห้องปฏิบัติการทั่วไปมีซีรัมควบคุม (control serum) ใช้กันเป็นประจำอยู่แล้ว อาจใช้ตรวจสอบสารละลายมาตรฐานเหล็กที่เตรียมขึ้นเองได้และสามารถวิเคราะห์ค่าเหล็กได้แม่นยำ เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กในเลือดได้อย่างแม่นยำแล้ว ก็สามารถวิเคราะห์และเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินขึ้นเพื่อใช้แทน acuglobin ได้ ดังวิธีการต่อไปนี้ นำเลือดคนปกติที่ผสมกับสารกันเลือดแข็ง EDTA หรือ sodium citrate แล้ว ประมาณ 10 mL ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วประมาณ 3000 รอบ ต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดพลาสมาทิ้ง ส่วนเม็ดเลือดแดง นำมาล้างด้วยน้ำเกลือ 0.9% 5 mL 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายดูดน้ำเกลือทิ้งให้หมด เติม 63% ethylene glycol (v/v) 1 mL ทุก ๆ 1 mL ของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่เตรียมไว้ และเติม toluene 0.4 mL เขย่าโดยแรงประมาณ 5 นาที ปิดจุกให้แน่นนำไปเก็บในตู้เย็น 4C ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมา นำหลอดทดลองนั้นมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบ ต่อ นาที นาน 15 นาที ดูดของเหลวชั้นบนของ toluene ทิ้งกรองของเหลวที่เหลือด้วยกระดาษกรองจนใส แบ่งใส่หลอดเล็ก ๆ ปิดจุกแน่นเก็บไว้ที่ 4C จะคงสภาพนานประมาณ 1 ปี[7, 20] นำไปวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน โดยวิธีวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (ข้อ 4)

สรุป

เหล็กในฮีโมโกลบินจะถูกแยกออกมาโดยสารละลายไฮโปคลอไรท์ 2.5% ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยน้ำยาเฟอร์โรซีน แล้วคำนวณ กรัมฮีโมโกลบิน ต่อ เดซิลิตร สารละลายที่วิเคราะห์ปริมาณแล้วนี้ ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธีไซยันเมธิโมโกลบินได้ กราฟมาตรฐานที่สร้างจากวิธีวิเคราะห์เหล็กมีความเป็นเส้นตรงถึง 23.05 gHb/dL การวิเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยวิธีนี้มีค่า day-to-day precision ที่ระดับฮีโมโกลบิน 9.60, 14.40 และ 20.37 g/dL เท่ากับ 2.25, 1.94 และ 1.32% CV ตามลำดับ (n=20) เมื่อเปรียบเทียบวิธีนี้ (Y) กับวิธี hemiglobincyanide (X) ซึ่งใช้ acuglobin สร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความสัมพันธ์กันดังนี้ r = 0.986 ; Y = 0.99 X - 0.137 ; n = 50 ที่ระดับ Hb 7-17 g/dL การศึกษาเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์เลือดตัวอย่างเดียวกัน โดยวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีการนี้ เตรียมสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินใช้เองได้

อ้างอิง

1. Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies; spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. J Biol Chem 1932 Nov; 98(11): 719-733
2. Kampen EJ van, Zijlstra WG. Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method. Clin Chim Acta 1961 Jul; 6: 538-544
3. Matsubara T, Shibata S. Evaluation of the internationally standardized method for haemoglobinometry. Clin Chim Acta 1969 Mar; 23: 427-430
4. International Committee for Standardization in Hematology. recommendations for haemoglobinometry in human blood. Br J Haematol (Suppl) 1967; 13: 71-75
5. Zijlstra WG, Kampen EG van. Standardization of hemoglobinometry. I. The extinction coefficient of hemiglobincyanide at E^{540}. Clin Chim Acta 1960 Sep; 5: 719-726

6. Eilers RJ. Notification of final adoption of an international method and standard solution for hemoglobinometry: Specifications for preparation of standard solution. Am J Clin Pathol 1967 Feb; 47(2) : 212-214
7. Frankel S, Reitman S, Sonnenwirth AC. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Saint Louis : C.V. Mosby, 1970. 369-422
8. Cornerty HV, Briggs AR. New method for the determination of whole blood iron and hemogbin. Clin Chem 1962 Apr; 8: 151-157
9. Zettner A, Mensch AH. The use of atomic absorption spectroscopy in hemoglobinometry. I. The determination of iron in hemoglobin. Am J Clin Pathol 1967 Aug; 48(2) : 225-228
10. Rice EW. Rapid micro determination of hemoglobin iron in the whole blood and in blood samples stored on paper via improved ferric thiocyanate spectrophotometry. J Lab Clin Med 1968 Feb; 71 (2) : 319-323
11. Klein B, Weber Bk, Lucas L, Foreman JA, Searcy RL. A new procedure for the determination of Hemoglobin. Clin Chim Acta 1969 May: 26: 77-84
12. Vanzetti G. Stable hemoglobin compounds in concentrated solution as reference for hemoglobinometry. Clin Chim Acta 1969 Jan; 24: 417-421
13. Weatherburn MW, Logan JE. The effect of freezing on the potassium ferricyanide-potassium cyanide reagent used in the cyanmethemoglobin procedure for hemoglobin determination. Clin Chim Acta 1964; 9: 581-584
14. Stooky LL. Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron. Anal Chem 1970 Jul; 42(7): 779-781
15. International Committee for Standardization in Hematology. Proposed recommendations for measurement of serum iron in human blood. Am J Clin Pathol 1971 Jun; 56(6): 543-545
16. White JM, Flashka HA. An automated procedure, with of Ferrozine, for assay of serum iron and total iron-binding capacity. Clin Chem 1973 Feb; 19(5): 526-528
17. Ceriotti F, Ceriotti G. Improved direct specific determination of serum iron and total iron-binding capacity. Clin Chem 1980 Apr; 26(2): 327-331
18. Rice EW, Fenner HE. Study of the ICSH proposed reference method for serum iron assay: obtaining optically clear filtrates and substitution of Ferrozine. Clin Chim Acta 1974 Dec; 53: 391-393
19. สมพงษ์ จินายน. หลักการประเมินผลคุณสมบัติของเทคนิควิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก. กรุงเทพ : โรงพิมพ์ตีรณสาร, 2529. 1-281
20. Franzini C. Ethylene glycol-stabilised haemolysates as control material in haemoglobinometry. Ciin Chim Acta 1983 Dec; 135: 175-179