การวิเคราะห์ระดับของฮีโมโกลบิน เพื่อประมาณอายุเด็กทางนิติวิทยาศาสตร์

โดย

นายพีรพงษ์ ตัวงาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การวิเคราะห์ระดับของฮีโมโกลบิน เพื่อประมาณอายุเด็กทางนิติวิทยาศาสตร์

โดย
นายพีรพงษ์ ตัวงาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ANALYSIS OF HEMOGLOBIN LEVELS FOR CHILDREN AGE ESTIMATION IN FORENSIC SCIENCE

By

Peerapong Tua-ngam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Program of Forensic Science

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2011

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การวิเคราะห์ระดับของฮีโมโกลบิน เพื่อประมาณอายุเด็กทางนิติวิทยาศาสตร์ ” เสนอโดย นายพีรพงษ์ ตัวงาม เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

……..
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอก สันติ์ สุขวัจน์)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ พันตำรวจเอก นายแพทย์ อุทัย ตีระวนินทร)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล)
...../...../.....

49312360 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
คำสำคัญ : ฮีโมโกลบิน/ อายุ/ เด็ก/ เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ

พีรพงษ์ ตัวงาม : การวิเคราะห์ระดับของฮีโมโกลบิน เพื่อประมาณอายุเด็กทางนิติวิทยาศาสตร์. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล. 70 หน้า.

การวิเคราะห์หาระดับปริมาณของ Hemoglobin 3 ชนิด คือ Hemoglobin A, Hemoglobin A_2และHemoglobin F ด้วยวิธี Low pressure liquid chromatography (LPLC) ในซีรัมจากเด็กไทย อายุระหว่างแรกเกิดถึงสองปี พบว่าเมื่อวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นที่ไม่เป็นเส้นตรงระหว่างตัวแปรต้นและตัวแปรตามเพื่อหาสมการที่เหมาะสม ระหว่าง ปริมาณ Hemoglobin กับ อายุ หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย Multiple Regression Analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ตัวแปรอิสระ 2 ตัว คือ Hemoglobin A และ Hemoglobin F พบว่า ค่า R = 0.781 คือ Hemoglobin F และ Hemoglobin A กับตัวแปรตาม Age มีความสัมพันธ์กัน และค่า R Square = 0.609 แสดงว่าตัวแปรอิสระทั้งหมด มีอิทธิพลต่อตัวแปรตามที่เป็นอายุถึง 60.9 % ส่วนอีก 39.1 % จะเป็นอิทธิพลจากตัวแปรอื่นที่ไม่ได้อยู่ในตัวแบบ

พิจารณาค่าความน่าจะเป็น Sig. = 0.015 สรุปได้ว่า ตัวแปรอิสระในตัวแบบบางตัวสามารถใช้พยากรณ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ค่าอิทธิพลของตัวแปรอิสระแต่ละตัวที่มีต่อตัวแปรตามของ Hemoglobin F = 1.363 และ Beta ของ Hemoglobin A = 0.587 สรุปได้ว่าปริมาณ Hemoglobin F มีอิทธิพล ต่อ ตัวแปรอายุ มากกว่าปริมาณ Hemoglobin A

วิเคราะห์ Multiple Regression Analysis วิธี Stepwise Regression พบว่า ตัวแบบที่เหมาะสม คือ ตัวแปร Hemoglobin F โดยมีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม อายุ = 56.6 % โดยจะมีความคลาดเคลื่อน = 43.4 % ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าความน่าจะเป็นของ Model = 0.003 ดังนั้น ตัวแปรอิสระ สามารถใช้พยากรณ์ได้

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า Hemoglobin A และ F มีความสัมพันธ์กับช่วงอายุเหมาะสมที่จะนำมาเลือกใช้ในการใช้พยากรณ์อายุเด็กที่ถูกทอดทิ้งหรือไม่ทราบอายุ โดยเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดและรวดเร็ว เพื่อประโยชน์ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และกุมารเวชศาสตร์

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ .....

49312360 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE
KEY WORD : HEMOGLOBIN TYPING/ AGE/CHILDREN/LOW PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY
PEERAPONG TUA-NGAM : ANALYSIS OF HEMOGLOBIN LEVELS FOR CHILDREN AGE ESTIMATION IN FORENSIC SCIENCE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. THONGCHAI TAECHOWISAN Ph.D.. 70 pp.

Analysis of the Hemoglobin typing (Hemoglobin A, Hemoglobin A2 and Hemoglobin F) by Low pressure liquid chromatography (LPLC) in serum of children. Aged birth to two years. By Linear regression analysis. Between variable and dependent variable to the equation for the quantity of Hemoglobin with age was analyzed by a Multiple Regression Analysis for correlation between variables 2 (Hemoglobin A, Hemoglobin F) was found that the value R = 0.781 is the Hemoglobin F and Hemoglobin. A relationship between the variables Age and the R Square = 0.609, indicating that all independent variables. Influencing variables as age, 39.1% to 60.9% and the other is not influenced by other variables in the model.

Consider the probability Sig. = 0.015 concluded that the independent variables in the model, some can be used to predict the significance level 0.05 for the influence of each independent variable on the dependent variable of Hemoglobin F = 1.363 and Beta of Hemoglobin A. Hemoglobin F = 0.587 concluded that the amount of influence over a variable amount of Hemoglobin A.

Analysis Multiple Regression Analysis to Stepwise Regression showed that the model for the variable Hemoglobin F by influencing variables as age = 56.6% with a deviation = 43.4% test at significance level 0.05 showed that the probability of Model = 0.003. The independent variables can be predicted.

Studies show that Hemoglobin A and F are correlated with age. Suitable to be used for forecasting the age of children being abandoned or unknown age. It is a simple way. Cheap and fast. For the purpose of the Forensic Science and Medicine.

Program of Forensic Science Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2011
Student's signature .....
Thesis Advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง “การวิเคราะห์ระดับของฮีโมโกลบินเพื่อประมาณอายุเด็กทางนิติวิทยาศาสตร์” ชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยเกิดจากความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานของข้าพเจ้า ที่ได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆของการวิจัยมาโดยตลอด พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งในความกรุณา และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ขอขอบคุณ พันธนา ภาโส จาก บริษัท พีซีที ลาบอราตอรี่ เซอร์วิส จำกัด และคุณสัญห์ลักษณ์ สำรวย เจ้าหน้าที่แผนกงานชันสูตรสาธารณสุข โรงพยาบาลบางปะกงที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย และให้คำแนะนำในการใช้งานเป็นอย่างดี ขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และเป็นกำลังใจจนส่งผลให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ และคุณแม่ผู้เป็นที่รักผู้ให้กำลังใจ และให้โอกาสการศึกษาอันมีค่ายิ่งผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา 3

สมมติฐานของการศึกษา 4

ขอบเขตการศึกษา 4

ข้อจำกัดของการวิจัย 4

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย 4

กรอบแนวคิดของการวิจัย 5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

Hemoglobin 6

หน้าที่ของ Hemoglobin 6

โครงสร้างโมเลกุลของ Hemoglobin 6

Hemoglobin A และ F ในคนปกติ 9

การสังเคราะห์ Hemoglobin 11

การสร้างเม็ดเลือด 16

Hemoglobin ในเด็ก 17

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ Hemoglobin 18

การตรวจ Hemoglobin แบบต่างๆ 18

หลักการหา Hemoglobin ด้วย HPLC และ LPLC 18

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ Hemoglobinด้วยเครื่อง LPLC. 22

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24

บทที่		หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย	33
	วิธีการทดลอง	33
	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	33
	สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	34
	วิธีการ	34
4	ผลการทดลอง	39
	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	39
	การวิเคราะห์หาปริมาณ Hemoglobin A	40
	การวิเคราะห์หาปริมาณ Hemoglobin F	44
	วิเคราะห์ผลด้วย Multiple Regression Analysis	50
	วิเคราะห์ผลด้วย Multiple Regression Analysis วิธี Stepwise Regression.	53
5	สรุปอภิปราย และข้อเสนอแนะ	56
	สรุปผลการวิจัย	56
	การอภิปรายผล	58
	ข้อเสนอแนะ	59
บรรณานุกรม		60
ภาคผนวก		63
ประวัติผู้วิจัย		70

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายละเอียดจำนวนกรดอะมิโน Polypeptide	8
2	ชนิดของ Hemoglobinในมนุษย์	10
3	ชนิดของ Hemoglobin ในมนุษย์ปกติ	13
4	Hemoglobin ผิดปรกติที่ตรวจพบจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจากโรงพยาบาลในพื้นที่ จังหวัดตรัง กระบี่ และ พัทลุง พ.ศ. 2548	25
5	ค่า retention time ของ Hemoglobin ผิดปรกติที่ตรวจพบจากเครื่อง Hb Gold	26
6	กลุ่มอายุของทารกในแต่ละกลุ่มและค่าเฉลี่ยของแต่ละช่วง กับ hemoglobin F	30
7	ร้อยละของเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์ในทารกแรกเกิดที่มีการรายงานต่างๆ	31
8	ปริมาณ hemoglobin F กับช่วงเวลาแรกเกิด ถึง 5 ปี	32
9	การวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง Hemoglobin A กับ AGE	41
10	ตารางค่าคลาดเคลื่อน ของ Hemoglobin A	42
11	การวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง Hemoglobin F กับ AGE	45
12	ค่าคลาดเคลื่อน ของ Hemoglobin F	46
13	การทดสอบสมการพยากรณ์ที่ได้จากการวิเคราะห์	49
14	แสดงรายชื่อตัวแปรอิสระที่เข้าไปอยู่ในตัวแบบ	50
15	แสดงค่าสถิติที่ใช้ในการพิจารณาความเหมาะสมของสมการถดถอย	50
16	ANOVA ที่ใช้ในการตรวจสอบว่าตัวแปรอิสระที่มีอยู่ในตัวแบบ	51
17	แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย	51
18	แสดงผลสรุปของการคัดเลือกตัวแปรอิสระ	53
19	แสดงค่าทางสถิติ	53
20	การตรวจสอบตัวแปรอิสระ ใน Model	54
21	แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ของตัวแปรอิสระ	54
22	ตารางตรวจสอบตัวแปรอิสระที่ไม่ได้อยู่ในสมการ	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวความคิดในการวิจัย	5
2	โครงสร้างของ Hemoglobin โดยที่ฮีม (heme) และพอร์ฟัยริน (porphyrin) รวมเป็น ferroprotoporphyri IX จะจับกับ polypeptide chain ที่ตำแหน่งเฉพาะ	8
3	โครงสร้างของ Hemoglobin ที่แสดงสายของ polypeptide ที่เหมือนกัน 2 หรือ 4 สาย มารวมกันเป็น tetramer โดยที่มีฮีมฝังอยู่ใน heme pocket ของสาย polypeptide	9
4	กราฟแสดงรายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงระดับ globin ชนิดต่างๆ กับ เวลา	14
5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง globin chain synthesis และ ระยะการเจริญเติบโต	16
6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลา กับอวัยวะที่ใช้สร้างเม็ดเลือด	17
7	หลักการการแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange) ที่ใช้ในเครื่อง LPLC	23
8	เครื่องวิเคราะห์กึ่งอัตโนมัติสำหรับตรวจหา Hemoglobin typing รุ่น Hemoglobin Gold	23
9	กราฟเปรียบเทียบระหว่าง AGA กับ SGA โดยเปรียบเทียบกับ Hemoglobin	27
10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fetal Hemoglobin ของทารก กับช่วงเวลาตั้งแต่ 25 – 44 สัปดาห์ จำนวน 152 ตัวอย่าง	28
11	การศึกษาความเข้มข้นของ Fetal Cell และ ความเข้มข้นของ Hemoglobin F ในกลุ่มเด็กแรกเกิดจนถึงอายุ 8 เดือนที่ไม่มีความผิดปกติทางเลือด	29
12	ภาชนะบรรจุ EDTA tube	34
13	EDTA tube	35
14	รูปแสดงลักษณะ chromatogram ของ Hemoglobin A_2 ที่ตรวจวิเคราะห์จากเครื่องอัตโนมัติ Hemoglobin Gold ในคนปกติ	37
15	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และปริมาณ Hemoglobin A	39
16	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และปริมาณ Hemoglobin A_2	39
17	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และปริมาณ Hemoglobin F	40
18	กราฟแสดงเส้นถดถอยของตัวแบบต่างๆ ระหว่าง Hemoglobin A และ อายุ	41
19	กราฟ Normal Q-Q Plot ของ Cubic model	43
20	กราฟ T- Plot ของ Cubic model	43
21	กราฟแสดงค่าคลาดเคลื่อนเป็นอิสระกันของ Cubic model	44
22	แสดงเส้นถดถอยของตัวแบบต่างๆ ระหว่าง Hemoglobin F และ อายุ	44
23	กราฟ Normal Q-Q Plot ของ Cubic model	45

ภาพที่ หน้า

24 กราฟ T- Plot ของ Cubic model 47
25 กราฟแสดงค่าคลาดเคลื่อนเป็นอิสระกันของ model..... 48
26 กราฟแสดงค่าคลาดเคลื่อนเป็นอิสระกันของ Cubic model 48

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาเด็กถูกทิ้งเป็นปัญหาที่พบทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนา ในประเทศไทย จากการสำรวจของสถานสงเคราะห์เด็กอ่อนพญาไท พบว่าโดยเฉลี่ยแต่ละเดือนจะพบเด็กที่ถูกนำมาทิ้งประมาณ 20-25 คนโดยพบว่า 5 % ของเด็กที่ถูกทิ้งตายระหว่างที่ถูกทิ้งตามสถานที่ต่างๆ โดยสถิติสถานที่ทิ้ง ได้แก่ อันดับ 1 เป็นโรงพยาบาล 28 % อันดับ 2 ทิ้งไว้กับผู้รับเลี้ยงเด็กหรือสถานที่รับเลี้ยงเด็ก 21 % และอันดับ 3 สถานที่สาธารณะ เช่น พุ่มไม้ถังขยะ 18 % ซึ่งส่วนใหญ่ไม่ใช่การลืมแต่เป็นความตั้งใจของพ่อแม่ที่ต้องการจะทิ้งโดยจำนวนเด็กถูกทอดทิ้งมีแนวโน้มสูงขึ้น จากข้อมูลสถานสงเคราะห์เด็กอ่อนพญาไท (อภิเชษฐ ปานจรัตน์ 2554)

พบว่าสถานสงเคราะห์เด็กอ่อนพญาไทได้รับเด็กที่ถูกทอดทิ้งเข้ามาเลี้ยง เฉลี่ยแล้ว 44-45 คนต่อเดือน โดย 80 % ถูกส่งตัวจากโรงพยาบาลในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัดในภาคกลาง อีก 20 % รับตัวมาจากตำรวจหรือกลุ่มที่พ่อแม่ทิ้งไว้กับคนรับจ้าง และสถานที่สาธารณะอื่นๆ ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าพ่อแม่ของเด็กส่วนใหญ่เป็นวัยรุ่นโดยเฉพาะนักเรียนนักศึกษา, ลูกจ้างโรงงานที่ไม่สามารถเลี้ยงได้ และกลุ่มวัยรุ่นที่ติดสารเสพติด ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมานี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อีกทั้งปัจจัยทางสภาวะเศรษฐกิจที่ตกต่ำส่งผลให้มีการทิ้งเด็กเพิ่มมากขึ้น

กฎหมายระบุไว้ว่าผู้ใดที่นำเด็กไปทิ้ง ตามประมวลกฎหมายอาญา มาตรา 306 ผู้ใดทอดทิ้งเด็กอายุไม่เกิน 9 ปี ไว้ ณ ที่ใด เพื่อให้เด็กพ้นไปเสียจากตนโดยการที่ทำให้เด็กนั้นปราศจากผู้ดูแลต้องระวางโทษจำคุกไม่เกิน 3 ปี หรือปรับไม่เกิน 6,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ และมาตรา 307 ผู้ที่มีหน้าที่ตามกฎหมาย เช่น เป็นบิดา มารดาหรือตามสัญญาต้องดูแลผู้ซึ่งพึ่งตนเองไม่ได้เพราะอายุ ความป่วยเจ็บกายพิการ หรือจิตพิการทอดทิ้งผู้พึ่งตนเองไม่ได้นั้นเสียโดยประการที่น่าจะเป็นเหตุให้เกิดอันตรายแก่ชีวิต ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกิน 3 ปี หรือปรับไม่เกิน 6,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับถ้าการกระทำความผิดมาตรา 306 หรือ มาตรา 307 เป็นเหตุให้ผู้ถูกทอดทิ้งถึงแก่ความตายหรือบาดเจ็บสาหัสผู้กระทำต้องระวางโทษ ตามมาตรา 290 จำคุกตั้งแต่ 3-15 ปี (พิชัย นิลทองคำ 2550 : 112-114)

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเทียบ อัตราส่วนระหว่างปี พ.ศ. 2541 กับปี พ.ศ. 2546 มีอัตราเด็กถูกทอดทิ้งเพิ่มขึ้นถึง 30% และพบว่าเด็กส่วนหนึ่งที่ถูกทอดทิ้งมีการป่วยร่วมด้วย ซึ่งเด็กใน

กลุ่มนี้จะมีชีวิตได้ไม่นานและมีรายงานที่ระบุว่าเด็กกลุ่มที่ติดเชื้อเอดส์แล้วถูกทอดทิ้งจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น (ตะโก 2554)

จากรายงานของกระทรวงพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์ ปี 2551 พบว่า ขณะนี้สังคมไทยกำลังเผชิญกับวิกฤตหนัก โดยพบเด็กทารกถูกทิ้งมากขึ้นเฉลี่ยวันละ 20 – 25 คน มีเด็กที่ถูกทอดทิ้งเพิ่มขึ้นจนล้นสถานสงเคราะห์ และร้อยละ 5 ของทารกที่ถูกทิ้ง มักเสียชีวิตก่อนมีคนมาช่วยเหลือสาเหตุเป็นได้ทั้งการติดเชื้อ ถูกยุง มด แมลง หรือสัตว์มีพิษกัดต่อย (กระทรวงพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์ 2551)

สาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาการนำเด็กไปทิ้ง คือ

1. ปัญหาด้านความไม่พร้อมในด้านการเลี้ยงดูบุตรในขณะนั้นเช่น บิดามารดา อยู่ในวัยเรียน

2. มีปัญหาด้านสถานะทางการเงินจนไม่อาจเลี้ยงดูบุตรได้

3. เป็นเด็กที่เกิดขึ้นมาโดยไม่ชอบธรรม เช่นจากการถูกข่มขืน รุมโทรม การลับลอบได้เสียจนเกิดเป็นครรภ์ที่ไม่พึงประสงค์

จากปัญหาที่พบเด็กที่ถูกทิ้งล้าช้า และเด็กส่วนใหญ่ที่ถูกทิ้งเป็นเด็กแรกเกิด ทำให้เด็กถูกมด แมลง สัตว์มีพิษต่อยจนตาย การคลอดที่ไม่สะอาดและผิดวิธีส่งผลให้เด็กได้รับอันตรายจากการติดเชื้อจากสภาพแวดล้อม อีกทั้งเด็กบางคนพิการแต่กำเนิด หรือติดเชื้อจากการที่แม่ทำแท้งเองโดยไม่มีแพทย์ดูแลทำให้เด็กอาจได้รับอันตรายจนถึงแก่ชีวิตได้ ปัญหาตามมาคือ การประมาณอายุของเด็กที่ถูกทิ้งทั้งที่มีชีวิตและเสียชีวิตเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการดำเนินการทางกฎหมายกับบิดามารดา การประมาณอายุเด็กมีวิธีการตรวจหลายวิธี เช่น การตรวจดูทางกายภาพภายนอกโดยให้แพทย์เฉพาะทางตรวจลักษณะกายภาพภายนอกการตรวจด้วยภาพถ่ายรังสีทางทันตกรรม เพื่อดูลำดับการขึ้นของฟันโดยต้องให้ทันตแพทย์เป็นผู้ตรวจ นอกจากการสังเกตจากสภาพภายนอกแล้วยังมีการตรวจได้โดยดูจากระดับการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีภายในร่างกาย

ในการศึกษานี้สนใจที่จะศึกษาระดับของ Hemoglobins ที่พบในเด็กช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดจนถึงสองปีซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงระดับในแต่ละช่วงอายุ ในหลายๆประเทศมีการศึกษาถึงระดับการเปลี่ยนแปลงของ Hemoglobin A, A_2 และ F กับอายุ ในเด็กตั้งแต่แรกเกิด แต่งานวิจัยลักษณะดังกล่าวในประเทศไทยยังไม่มีการเก็บข้อมูล โดยข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างอายุและปริมาณของ Hemoglobin สามารถนำมาสร้างเป็นสมการทางคณิตศาสตร์ เพื่อใช้ในการพยากรณ์อายุของเด็กไทยได้ในการวิจัยนี้วัดปริมาณของ Hemoglobin ด้วยเครื่อง Low pressure liquid chromatography (LPLC) รุ่น Hemoglobin Gold analyzer, Drew Scientific, UK พร้อมชุดน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้หลักการ Cation exchange liquid Chromatography ในการแยกชนิดของ Hemoglobins โดยเกิดแรง ระหว่างไอออนของ

Hemoglobin ที่มีประจุบวกกับหมู่แลกเปลี่ยนไอออนบนซิลิก้าเจลในคอลัมน์ที่มีประจุเป็นลบ และด้วยการอาศัยสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งมี Ionic Strength สูงกว่า Hemoglobin เป็นตัวชะให้ Hemoglobin ชนิดต่างๆ หลุดออกจากผิวของซิลิก้าเจล ผ่านออกจากคอลัมน์ เนื่องจากแต่ละ Hemoglobinมี Ionic Strenght ไม่เท่ากัน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนในการผสมของบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด ทำให้ Hemoglobin แต่ละชนิดแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน Retention Time ที่แน่นอน ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของ Hemoglobin แต่ละชนิด และเลือกการวิเคราะห์แบบ Hemoglobin A_2/Var ซึ่งเหมาะสำหรับตรวจหาชนิดและปริมาณ Hemoglobin A, Hemoglobin F และ Hemoglobin A_2

การวิจัยเริ่มตั้งแต่การศึกษาถึงชนิดและปริมาณของ Hemoglobin ในเด็กไทยที่มีสุภาพดี อายุระหว่างแรกเกิด ถึง 2 ปี ที่ไม่เป็นโรคที่มีความผิดปกติทางเลือด จำนวน 20 คน จากผู้ที่มาขอรับบริการตรวจวิเคราะห์ Hemoglobin typing ที่บริษัท PCL Laboratory และโรงพยาบาลบางปะกง วิเคราะห์ระดับของ Hemoglobin ชนิดต่างๆที่พบ หาความสัมพันธ์ระหว่าง Hemoglobin แต่ละชนิดกับอายุเพื่อจัดเก็บเป็นฐานข้อมูลของเด็กไทยปกติ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ มีความสัมพันธ์กันหรือไม่ และมีความสัมพันธ์กันอย่างไร ตัวแปรอิสระที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม ตัวใดมีความสัมพันธ์สูง ตัวใดมีความสัมพันธ์น้อย หรือไม่มีความสัมพันธ์ และต้องการสร้างแบบจำลองเพื่อใช้ทำนายตัวแปรอายุ โดยรูปแบบจำลองดังกล่าวอยู่ในลักษณะสมการทางคณิตศาสตร์วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Version 11.5 ใช้การวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เป็นเส้นตรง พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เพื่อหาสมการถดถอยที่ดีที่สุด ที่สามารถพยากรณ์ค่าตัวแปรตามได้ใกล้เคียงที่สุด และมีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด กำหนดระดับนัยสำคัญ α=0.05 การวิจัยนี้เน้นที่การศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียวที่คัดเลือกมาแล้ว ว่ามีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามสูงสุด ซึ่งจะทำให้การพยากรณ์มีความถูกต้องมากขึ้น

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ อายุ และตัวแปรตามระดับ Hemoglobin ต่างๆ ที่พบในเด็ก ตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 2 ปี

2. เพื่อศึกษาว่าระดับของ Hemoglobin ชนิดใด ที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด ที่ใช้ในการพยากรณ์อายุ

3. สร้างแบบจำลองเพื่อใช้พยากรณ์ตัวแปรอายุ โดยรูปแบบจำลองดังกล่าวโดยอยู่ในรูปสมการทางคณิตศาสตร์

สมมติฐานของการศึกษา

ระดับของ Hemoglobin (hemoglobin levels) ชนิดต่างๆในเด็กเปลี่ยนแปลงตามช่วงอายุ

ขอบเขตการศึกษา

การวิจัยเริ่มตั้งแต่การศึกษาถึงชนิดและปริมาณของ Hemoglobin ในเด็กไทยที่มีสุภาพดี อายุระหว่างแรกเกิด ถึง 2 ปีที่ไม่เป็นโรคที่มีความผิดปกติทางเลือด จำนวน 20 คนจากผู้ที่มาขอรับบริการตรวจวิเคราะห์ Hemoglobin typing ที่บริษัท PCL Laboratory และโรงพยาบาลบางปะกง วิเคราะห์ระดับของ Hemoglobin แต่ละชนิดที่พบ หาความสัมพันธ์ระหว่าง Hemoglobin แต่ละชนิดที่พบ กับอายุจัดเก็บเป็นฐานข้อมูลของเด็กไทยปกติ สร้างสมการทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการพยากรณ์อายุเด็กที่ถูกทิ้ง

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. จำนวนตัวอย่างที่ใช้ควรมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น เพื่อให้ค่าพยากรณ์ทางคณิตศาสตร์มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น และใช้อ้างอิงในการประมาณอายุเด็กไทยทางนิติวิทยาศาสตร์ได้
2. น้ำหนักและพัฒนาการของเด็กไทยอาจมีผลต่อความคลาดเคลื่อนของการวิจัยนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป
3. อายุครรภ์ ก่อนคลอดอาจมีผลต่อพัฒนาการของเด็กและส่งให้ Level hemoglobin มีการเปลี่ยนแปลง
4. การเลี้ยงดูและสารอาหารที่ได้รับอาจมีผลต่อ Level hemoglobin ในเลือด

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Hemoglobin หมายถึง เป็นสารสีแดงที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเม็ดเลือดแดงซึ่งทำหน้าที่ในการนำออกซิเจนจากปอดไปสู่ส่วนต่างๆของร่างกาย

HemoglobinF หมายถึง Hemoglobinของตัวอ่อนประกอบด้วย Alpha 2 Gamma 2 พบในช่วงที่เด็กยังอยู่ ในครรภ์มารดา

Hemoglobin A หมายถึง Hemoglobinของผู้ใหญ่ มี 2 ชนิดคือ Hemoglobin A ประกอบด้วย Alpha 2 Beta 2 และ HemoglobinA_2 ประกอบด้วย Alpha 2 Delta 2

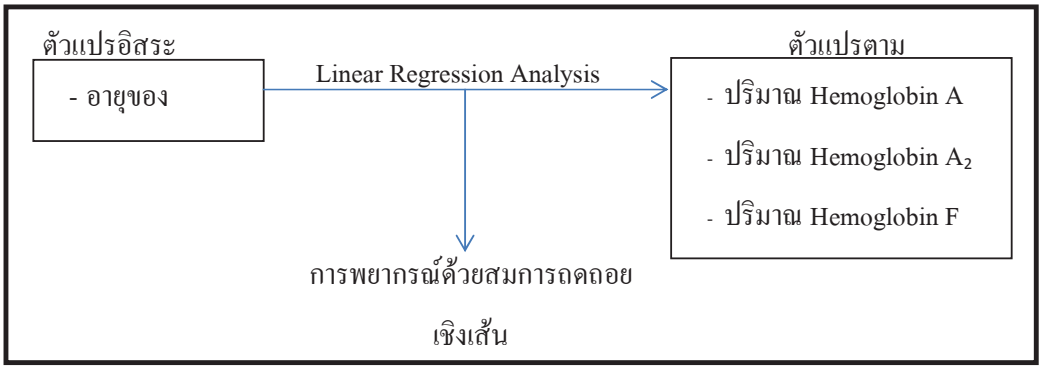
Low pressure liquid chromatography หมายถึง วิธีการแยกสารออกจากกันเป็นสัดส่วนเชิงปริมาณโดยอาศัยหลักการ cation exchanger

G/dL หมายถึง หน่วยวัดขนาด น้ำหนักกรัมต่อปริมาณเลือด 1 เดซิลิตร

Day หมายถึง อายุของเด็กเป็นวัน

กรอบแนวความคิดในการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาในเด็กไทยที่อายุระหว่าง แรกเกิดจนถึง 2 ปีโดยเป็นเด็กที่ไม่มีความผิดปกติทางเลือด จาก โรงพยาบาลบางประกง และบริษัท PCL Laboratory เพื่อศึกษาระดับของ Hemoglobin ชนิดต่างๆที่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงอายุ และนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างสมการทางคณิตศาสตร์ เพื่อใช้ในการพยากรณ์อายุเด็ก และใช้เป็นข้อมูลในการดำเนินการทางกระบวนการยุติธรรม



ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลความความสัมพันธ์ระหว่างอายุของเด็กไทย กับระดับปริมาณของ Hemoglobin ชนิดต่างๆ
2. สร้างสมการทางคณิตศาสตร์จากข้อมูลที่ได้ เพื่อใช้พยากรณ์อายุเด็กไทยที่ถูกทอดทิ้งได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hemoglobin

หน้าที่ของ Hemoglobin

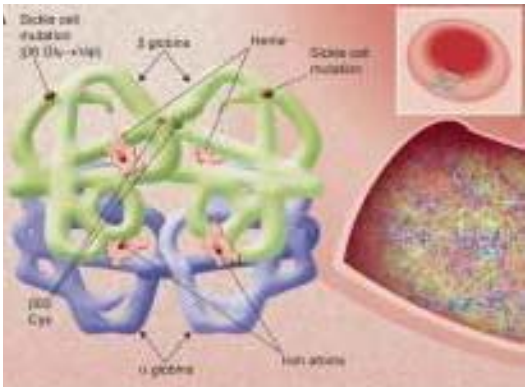
เลือดเป็นของเหลวในร่างกายที่มีความสำคัญเป็นแหล่งรวมของสารชีวเคมีและมีบทบาทในการลำเลียงสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์ต่างๆในร่างกายและลำเลียงของเสียออกจากเซลล์โดย เลือดประกอบไปด้วยเม็ดเลือดหลายชนิด โดยแต่ละชนิดจะมีบทบาทหน้าที่ในการลำเลียงสิ่งที่จำเป็นต่อร่างกายที่แตกต่างกัน เลือดประกอบไปด้วย เม็ดเลือดแดง (Red blood cell), เม็ดเลือดขาว (White blood cell) และเกล็ดเลือด (Platelets)โดยในเม็ดเลือดแดงจะประกอบไปด้วย Hemoglobin มีหน้าที่หลักในการเอาออกซิเจนไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย และรับเอาคาร์บอนไดออกไซด์มาปล่อยที่ปอดเพื่อนำออกสู่ภายนอกร่างกาย การจับ-ปล่อยออกซิเจนนั้นถูกควบคุมโดย Organic phosphate ที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดโดยเม็ดเลือดแดงของคนเป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 – 8 ไมโครเมตร ลักษณะเหมือนจานโดยที่บริเวณตรงกลางจะเป็นร่องลึกลงไปทั้งสองด้าน มีอยู่ทั้งหมดประมาณร้อยละ 40 -50 ของปริมาณเลือดทั้งหมดในร่างกายหรือประมาณ 4 – 5 ล้านเซลล์ต่อเลือดหนึ่งมิลลิลิตร โดยมีอายุประมาณ 120 วัน แต่จะมีการผลิตเม็ดเลือดแดงเพิ่มทุกๆ วัน ประมาณร้อยละ 9 ของจำนวนที่มีอยู่ทั้งหมดในร่างกายโครงสร้างของเม็ดเลือดแดงประกอบไปด้วยโปรตีน สารลิโปโปรตีน (lipoprotein) และมีสารโปรตีนที่จับกับเหล็กเรียกว่า ฮีโมโกลบิน ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจับเอาออกซิเจนที่ได้จากเนื้อเยื่อไปยังส่วนเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย ผ่านทางเส้นเลือดและลำเลียงคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นของเสียออกจากเนื้อเยื่อต่างๆ ไปยังปอดเพื่อนำออกนอกร่างกายต่อไป ในคนปกติ

โครงสร้างโมเลกุลของ Hemoglobin

Hemoglobin ประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ ได้แก่

1. ฮีม (heme) และพอร์ฟีย์ริน (porphyrin) รวมเป็น ferroprotoporphyriIX จะจับกับ polypeptide chain ที่ตำแหน่งเฉพาะ เหล็กในฮีมจะเป็นตัวจับและปล่อยออกซิเจนเพื่อแลกเปลี่ยนกับเนื้อเยื่อ การศึกษาของเพอร์รูซ (Perutz MF. 1963) ได้ศึกษาองค์ประกอบของ Hemoglobin ของมนุษย์ด้วยวิธีการใช้รังสี x – ray ในการสร้างภาพพลังงานและทำการคำนวณสร้างแบบจำลองโครงสร้างลักษณะการจับกันของโมเลกุล Hemoglobin เพื่อศึกษากลไกการแลกเปลี่ยนก๊าซโดยศึกษาก๊าซที่มี

บทบาททางชีวภาพของมนุษย์ ได้แก่ ก๊าซออกซิเจน (O_2), ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2), ก๊าซคาร์บอนมอนออกไซด์ (CO) และ ไนตริกออกไซด์ (NO) โดยจาก ภาพที่ 2 เป็นภาพจำลองที่ได้จากการศึกษาดังกล่าว ถึงตำแหน่งที่จับจำเพาะระหว่างก๊าซกับ Hemoglobin โดยการจับ และปล่อยออกซิเจนจะถูกควบคุมโดย Organic phosphate ที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดง คือ 2, 3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) การปล่อยออกซิเจนโดยการขยายช่องว่างระหว่าง β-chain แล้วปล่อยให้ 2,3-DPG เข้าไปจับ การปล่อยและจับเป็นไปแบบโมเลกุลต่อโมเลกุล (mole-to-mole basis) การจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินนั้นไม่ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงทีเดียว จึงทำให้กราฟมีรูปร่างเป็น sigmoid – shaped ลักษณะของกราฟเช่นนี้มีประโยชน์มากตรงที่แม้ว่า partial pressure ของออกซิเจน (PO_2) ลดลงก็ยังสามารถปล่อยออกซิเจนให้แก่เนื้อเยื่อได้ และศึกษาในกรณีที่ไปจับก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO) จะเกิดเป็น carboxyhemoglobin ถ้ามีมากก็จะเป็นพิษต่อร่างกาย เช่น ทำให้เกิดอาการเขียว (cyanosis), ซีด (anemia) และเสียชีวิตเพราะขาดออกซิเจน โดยระดับ carboxyhemoglobin ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย คือ 5.0 กรัมเปอร์เซ็นต์ตามที่ได้แสดงในภาพที่ 2 โดยเป็นการแสดงลักษณะของโครงสร้างที่ได้จากการศึกษาข้างต้น(พรเทพ เทียนสิวากุล และคณะ 2544 : 100)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Hemoglobin โดยที่ ฮีม (heme) และพอร์ฟิยริน (porphyrin) รวมเป็น ferroprotoporphyri IX จะจับกับ polypeptide chain ที่ตำแหน่งเฉพาะ

ที่มา : Alan N. Schechter, “Hemoglobin research and the origins of molecular medicine,” The American Society of Hematology 112 (2008) : 3927-3938.

2. โกลบิน (โกลบิน) ประกอบด้วยสาย polypeptide ที่เหมือนกัน 2 คู่หรือ 4 สาย มารวมกันเป็น tetramer และมีฮีมฝังอยู่ใน heme pocket ของสาย polypeptide ทุกสาย สาย polypeptide แต่ละสาย

ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนมากจับกันเป็นโครงสร้างโดยเฉพาะ โดยเป็นส่วนโปรตีนของ Hemoglobin ที่มีหน้าที่ขนส่ง CO_2 ในขณะที่ส่วนฮีมช่วยขนส่ง O_2 โกลบินประกอบด้วย polypeptide 4 สาย แต่ละสายจะขดเป็นกระเปาะภายในฮีมเกาะอยู่ทั้ง 4 สายนี้จะยึดติดกันโดย noncovalent force สาย polypeptide ที่พบใน Hemoglobin ของผู้ใหญ่ปกติมีอยู่ 4 ชนิด คือ Alpha (α), beta (β), gamma (γ) และ delta (δ)ในแต่ละสายของโกลบินนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงต่อกันเป็นแถวยาว โดยสายแอลฟามีกรดอะมิโน 141 ตัว ส่วนสายบีต้า แกมม่า และเดลต้านั้นแต่ละสายมีกรดอะมิโน 146 ตัว การสังเคราะห์สาย polypeptide แต่ละชนิด เกิดขึ้นที่ cytoplasmic ribosome ของอวัยวะต่างๆ ในช่วงเวลาที่ต่างกัน

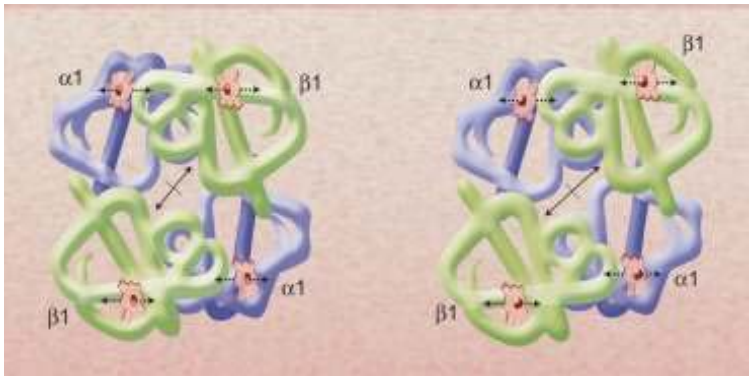
โดยเริ่มต้นจากระยะที่เป็น embryo ซึ่งนับตั้งแต่เมื่อไข่ฝังตัวในผนังมดลูกจนอายุครรภ์ได้ไม่เกิน 8 สัปดาห์ ช่วงนี้ yolk sac จะสร้างสาย polypeptide 2 ชนิด คือ Zeta (ζ) และ epsilon (ε) แต่เมื่อครรภ์แก่ขึ้นสู่ช่วง fetus การสร้างส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ตับและม้าม การสร้างสาย epsilon จะเปลี่ยนเป็นสาย gamma และสาย Zeta จะเปลี่ยนเป็นสายแอลฟาแทน ในทารกก่อนคลอดจะมีการสร้างสาย polypeptide ทั้ง 2 ชนิดหลังนี้เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่สายเดลต้าเริ่มสร้างได้เล็กน้อยก่อนคลอด และมีปริมาณน้อยคงที่มาโดยตลอดส่วนสาย beta แม้จะเริ่มสร้างได้เล็กน้อยในช่วงเวลาใกล้เคียงกับสาย Alpha และ gamma แต่ภายหลังคลอดจะเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว และใกล้เคียงกับปริมาณสาย Alpha ภายในช่วงเวลา 6 เดือน หลังคลอด โดยปริมาณของสาย beta จะผกผันกลับกับปริมาณสาย gamma การสังเคราะห์ Hemoglobin ทุกชนิดภายหลังคลอดจะทำที่ไขกระดูกเพียงแห่งเดียวตามที่ได้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดจำนวนกรดอะมิโน Polypeptide ในร่างกายมนุษย์

Polypeptide	**จำนวนกรดอะมิโน (หน่วย)**
Alpha chain (α)	141
Zeta chain (ζ)	141
beta chain (β)	146
gamma chain (γ)	146
delta chain (δ)	146
epsilon chain (ε)	146

ที่มา : สุทัศน์ ฟู่เจริญ และ ปราณี ฟู่เจริญ, ตำราโลหิตวิทยา การวินิจฉัย และการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย, พิมพ์ครั้งที่ 2 (กรุงเทพมหานคร : ทีพี พริ้นท์, 2537), 3-15.

จากภาพที่ 3แสดงถึงโครงสร้างของ Hemoglobin A แสดงลักษณะ tetramer มีสาย Alpha 2 สาย และสาย beta 2 สาย ในแต่ละสายมีฮีมอยู่ภายใน คู่ที่สองที่เป็นชนิด beta จะเป็น gammadelta ก็ได้ เมื่อรวมกันครบ 4 สายแล้วจะพบชนิดของ Hemoglobin ในผู้ใหญ่ปกติได้ 3 แบบ คือ Hemoglobin A ($\alpha_2\beta_2$) 97%, Hemoglobin A_2 (α_2 δ_2) ไม่เกิน 2.5% และHemoglobin F (α_2 γ_2) น้อยกว่า 1%



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ Hemoglobin ที่แสดงสายของ polypeptide ที่เหมือนกัน 2 หรือ 4 สาย มารวมกันเป็น tetramer โดยที่มีฮีมฝังอยู่ใน heme pocket ของสาย polypeptide

ที่มา : Alan N. Schechter, "Hemoglobin research and the origins of molecular medicine," The American Society of Hematology 112 (2008) : 3927-3938.

ตามปกติจะมียีนควบคุมการสร้าง Polypeptide 6 สาย โดยยีนดังกล่าวจะควบคุมให้มีการสร้างสาย Polypeptide ได้มากน้อยต่างกันตามช่วงอายุทำให้มี Hemoglobin ชนิดต่างๆ เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงตามช่วงอายุ

Hemoglobin A และ F ในคนปกติ

ในผู้ใหญ่ปกติจะมี Hemoglobin A อยู่ 2 ชนิด คือ Hemoglobin A พบได้ประมาณ 97% และ Hemoglobin A_2 ประมาณ 3% โดย Hemoglobin A ประกอบไปด้วย Alpha 2 Beta 2 Hemoglobin A_2 ประกอบด้วย Alpha 2 Delta 2 ส่วน Hemoglobin F ซึ่งพบในเด็กประกอบไปด้วย Alpha 2 Gamma 2 เนื่องจากการสร้างสายโกลบินแต่ละชนิดขึ้นกับระยะของการพัฒนาการเจริญเติบโต ดังนั้น Hemoglobin จึงมีหลายชนิดตามระยะของการพัฒนาการ เช่น ในทารกปกติแรกเกิดจะมี Hemoglobin F 80-90% และ Hemoglobin A 10-20% จากนั้น Hemoglobin F จะมีการสร้างน้อยลง ส่วน Hemoglobin A และ Hemoglobin A_2 จะมีการสร้างเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่ออายุ

ประมาณ 2 ขวบ ซึ่งจะมี Hemoglobin A ประมาณ 97%, Hemoglobin F น้อยกว่า 1% และ Hemoglobin A_2ประมาณ 2.5% แต่ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเลือดจะมีปริมาณหรือชนิดที่แตกต่างกันออกไป เช่น ในผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย จะพบ Hemoglobin ในระยะตัวอ่อน (embryonic Hemoglobin)ได้แก่ Hemoglobin Grower 1, Hemoglobin Grower 2, Hemoglobin Portland โดยมีการศึกษาพบว่าในวัยทารกร่างกายจะผลิต Fetal Hemoglobin และเปลี่ยนแปลงเป็น adult Hemoglobin การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากกลไกที่ Fetal Hemoglobin ซึ่งประกอบด้วย Alpha 2 Gamma 2 ลดการผลิต Gamma และเพิ่มการผลิต Beta แทน สำหรับ Hemoglobin A_2 นั้นมีเพียงเล็กน้อยตั้งแต่ระยะใกล้คลอดจนถึงตลอดไปในวัยผู้ใหญ่ ตามที่ได้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของ Hemoglobin ในมนุษย์

ชนิดของ Hemoglobin	ส่วนประกอบของสาย polypeptide	ผู้ใหญ่ปกติ(%)	ปริมาณเพิ่มขึ้นในภาวะปกติ	ปริมาณลดลงในภาวะ
Hemoglobin A	$\alpha_2\beta_2$	92	-	-
HemoglobinA$_{1a1}$	α_2 (β -N-CHO-P)$_2$	0.2	Diabetes mellitus	Hemolytic anemia
HemoglobinA$_{1a2}$	α_2 (β -N-G6P)$_2$	0.2	Diabetes mellitus	Hemolytic anemia
HemoglobinA$_{1b}$	α_2 (β -N-pyruvate)$_2$	0.5	Diabetes mellitus	Hemolytic anemia
HemoglobinA$_{1c}$	α_2 (β -N-glucose)$_2$	3	Diabetes mellitus	Hemolytic anemia
HemoglobinA$_2$	$\alpha_2\delta_2$	2.5	β-thalassemia	Iron deficiency anemia α-thalassemia
HemoglobinF	$\alpha_2\gamma_2$	< 1	Fetal red cells, β-thalassemia HPFH, Marrow “Stress”	-
HemoglobinF$_1$	α_2 (γ -N-acetyl)$_2$	< 1	Fetal red cells, β-thalassemia HPFH, Marrow “Stress”	-
Hemoglobin Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$	0	-	-
Hemoglobin Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	0	Early embryo	-
Hemoglobin Portland	$\zeta_2\gamma_2$	0	-	-
Hemoglobin H	β_4	0	α-thalassemia	-
Hemoglobin Bart’ s	γ_4	0	α-thalassemia	-

ที่มา : จินตนา ศิรินาวิน และคณะ, ความรู้พื้นฐานธาลัสซีเมียเพื่อการป้องกันและควบคุมโรค (กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน, 2547), 1-13.

การสังเคราะห์ Hemoglobin

การสังเคราะห์ Hemoglobin ปกติจะมีกระบวนการที่เกี่ยวข้อง 3 ขั้นตอน คือ

การขนส่งเหล็ก (Iron delivery and supply)

เหล็กจะถูกนำส่งมายังเซลล์ที่สังเคราะห์ Hemoglobin โดยโปรทีน transferring เมื่อเหล็กเข้าสู่เซลล์ที่สร้าง Hemoglobin ก็จะถูกส่งไปยังไมโตคอนเดรีย เพื่อจะสอดใส่เข้าไปในโมเลกุล protoporphyrin ring ทำให้เกิดโมเลกุลของฮีม แต่เหล็กที่เหลือเกินพอก็จะรวมกันเป็น ferritin โดยสองในสามของเหล็กในร่างกายทั้งหมดจะรวมกันอยู่ที่ฮีม (heme) ในโมเลกุลของ Hemoglobin

การสังเคราะห์ (protoporphyrins)

การสังเคราะห์โปรโตพอไฟรินจะเกิดขึ้นที่ไมโตคอนเดรีย โดยการสังเคราะห์สารชนิดหนึ่งชื่อ delta aminolevulinic acid (DeltaALA) จาก glycine และ succinyl Co A กระบวนการสังเคราะห์สารดังกล่าว โดยอาศัยเอนไซม์ DeltaALAsynthetase นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับฮอร์โมน erythropoietin และวิตามิน B 2 pyridoxal phosphate ใน cytoplasm โดยโมเลกุลของ ALA 2 โมเลกุล จะรวมกันเข้าเป็น pyrrole porphobilinogen (PBG) ด้วยเอนไซม์ DeltaALAdehydrase แล้วต่อมา prophobilinogen 4 โมเลกุล มารวมกันเข้าเป็น Uropophyrinogen (UPG) จะเห็นว่าต้องใช้ 4 โมเลกุล จึงทำให้เกิดรูปแบบของการเรียงตัวกันถึง 4 แบบ (4 isomers) แต่จะมีเพียง 2 แบบเท่านั้น ที่มีความสำคัญคือ UPG I และ UPG III โดย UPG I เป็นตัวที่ทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์การสังเคราะห์ฮีมจะอาศัย UPG III โดยถ้ามีความผิดปกติเกิดขึ้นตรงจุดนี้ จะส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติตั้งแต่เกิดเรียกว่า Congenital erythropoietic porphyria คือ ทำให้มี UPG I สะสมในเม็ดเลือดแดง ไขกระดูก และในปัสสาวะ

ต่อมามีการสังเคราะห์ Coproporphyrinogen (CPG) โดยวิธีการดึงเอา Carboxyl group ออกไป (decarboxylation) จาก UPG III ซึ่งขั้นต่อไปจะเป็นกระบวนการสังเคราะห์ฮีมในไมโตคอนเดรีย คือการสร้าง protoporphyrinogen (PP) จาก CPG III แต่เนื่อง chains 3 แบบ จึงเกิดเป็น isomers ได้ถึง 15 isomers แต่ไมโตคอนเดรียจะสร้างมาเพียง isomers เดียวคือ PP-IX จาก CPG III protoporphyrin IX จะถูกสร้างขึ้นจาก PP-IX และมีเหล็กเข้ามาจับเกิดเป็น Ferroprotoporphyrin IX

การสังเคราะห์โกลบิน

โกลบินนั้นประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโนเป็นสายๆ (globin chain) ซึ่งการกำหนดกรดอะมิโนมาต่อเป็นสายๆ นั้นต้องถูกควบคุมโดยยีน ซึ่ง globin chain แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ในสายกลุ่ม Alpha และ Zeta– globin chain จะประกอบด้วย กรดอะมิโนอย่างละ 141 ตัว ทั้งสองสายนี้จะถูกควบคุมโดยโครโมโซม คู่ที่ 16 ทั้งสองสายนี้จะมีกรดอะมิโนต่างกันเพียง 57 ตัวเท่านั้น ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งคือ Beta,

Delta และ Gamma จะถูกควบคุมโดยโครโมโซมคู่ที่ 11 ทั้ง Beta, Delta และ Gamma จะมีสายกรดอะมิโนสายละ 146 ตัว Beta – chain จะมีกรดอะมิโนต่างจาก Delta – chain อยู่เพียง 10 ตัว และมีกรดอะมิโนต่างจาก Gamma – chain 39 ตัว นอกจากนี้ Gamma – chain มี 2 ชนิด คือ ชนิดมีตำแหน่งของกรดที่ 136 เป็น glocine Gamma – chain ซึ่งเรียกว่า ^{G} Gamma – chain แต่ถ้าเป็น alanine ก็จะเรียกว่า ^{A}Gamma – chain

จะพบว่าการสร้างสายของโกลบินจะถูกควบคุมโดย gene โดย แบ่ง เป็น Alpha – gene ซึ่งจะมีขนาด 25 Kb (kilobase pair) (1 Kb = 1,000 base)โดยเรียงจากปลาย 5’ ของสาย DNA ไปยังปลาย 3’ ซึ่งกลุ่มนี้จะมี Gene องค์ประกอบ คือ 5’ – Psi Xi – Psi Alpha2 - Psi Alpha1 – Alpha2 – Alpha1 – Theta – 3’ โดยมี Alpha gene ควบคุมการสร้าง Alpha – chain และ Zeta – chain ก็จะถูกควบคุมการสร้าง Zeta – chain ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ Hemoglobin ในระยะ embryo แต่ Gene Psi Xi – Psi Alpha2 - Psi Alpha1 ไม่สามารถสร้าง globin chain ได้ จึงเรียกว่า Pseudogene ในกลุ่ม Beta ยีนที่ควบคุม ได้แก่ 5’ – Xi – ^{G}Gamma - ^{A}Gamma – Psi Beta – Delta – Beta – 3’ มีขนาด 50 Kb โดย Xi gene ก็จะควบคุมการสร้าง Xi – chain ซึ่งสร้างในระยะที่ยังเป็น embryo อยู่ ส่วน ^{G}Gamma และ ^{A}Gammagene ก็ควบคุม Gamma chain Xi – gene ก็จะควบคุมการสร้าง Xi - chain ส่วน Psi Beta เป็น pseudogene ที่สร้าง chain ไม่ได้ จากการศึกษาจะพบว่ายีนทั้ง Alpha และ Beta จะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น coding sequence เรียกว่า exon และส่วนที่เป็น noncoding sequence ซึ่งเรียก intron หรือ intervening sequence (IVS) ซึ่งแทรกอยู่ 2 แห่งด้วยกัน คือ IVS I และ IVS II ขั้นตอนของการสร้าง globin chain แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. Transciption เป็นการลอกเลียนแบบมาจากยีนในรูปของ messenger RNA แต่เป็น precursor RNA หรือ heteragene RNA (Hn RNA) จะพบว่าในการลอกเลียนแบบออกมาครั้งแรกก็จะมีส่วนที่เป็น exon และ intron ติดมาด้วย

2. RNA processing เป็นการตัดเอาส่วนที่ใช้ไม่ได้ออกไป มีการเติม CAP structure ด้าน 5’ ตรง GTP และการต่อ adenylic acid (poly A) เข้ากับด้าน 3’ จนได้เป็น mRNA ที่สมบูรณ์ จึงผ่าน nucleus ออกมาสู่ cytoplasm ต่อไป

3. Translation เมื่อ mRNA ผ่านการ processing มาแล้วก็จะผ่านออกมาสู่ cytoplasm ของเซลล์ เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน โดย mRNA จะเป็นต้นแบบในการที่ tRNA จะไปอ่าน แล้วไปจับเอากรดอะมิโนมาร้อยแขวนบน polyribosome จนครบตามจำนวนที่มีอยู่บน mRNA เมื่อ tRNA ไปอ่านรหัสบน mRNA เช่น AAA ก็จะไปจับเอากรดอะมิโน lysine มาต่อสายหรือ CGU ก็จะไปจับเอากรดอะมิโน

arginine มาต่อ เป็นต้น แต่เมื่ออ่านถึง UAA ก็จะหยุดไม่ไปจับกรดอะมิโน ซึ่งถือเป็น termination คือ จบกระบวนการอ่าน ก็จะได้สายของโกลบินครบตามชนิดของ chain ตามที่ยีนกำหนด

เมื่อสังเคราะห์สายโกลบินแล้ว ฮีมกับโกลบินจับเป็น Hemoglobin การจับฮีมกับสายโกลบินนั้นจะอยู่ในตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เฉพาะเจาะจง เช่น บน Alpha – chain ฮีมจะจับเป็น histidine ที่ตำแหน่ง 58 และ 87 ส่วนบน Beta – chain ฮีมจะจับกับ histidine ที่ตำแหน่ง 63 และ 92 เป็นต้น เมื่อมันเกาะกันเป็นโมเลกุลใหญ่ โดนเอา chain ต่างๆ มาเข้าคู่เหมือนกัน 2 คู่ (tetramer) จึงมี Hemoglobin ชนิดต่างๆ ดังนี้

ตารางที่ 3 ชนิดของ Hemoglobin ในมนุษย์

ระยะ	**Hemoglobin ที่พบ**
Embryo	Hemoglobin Gower I, Hemoglobin Gower II, Hemoglobin Portland
Fetus	Hemoglobin F เป็นส่วนใหญ่ Hemoglobin A(Alpha2 Gamma2)เป็นส่วนน้อย
Adult	Hemoglobin A มีอยู่ 92 – 95 %
	Hemoglobin A2 มีอยู่ 2 – 3 %
	Hemoglobin F มีอยู่ 1 – 2 %
	Hemoglobin A1c(B-NH-glucose) 2 มีอยู่ 3 – 5 %

ที่มา : จินตนา ศิรินาวิน และคณะ, ความรู้พื้นฐานธาลัสซีเมียเพื่อการป้องกันและควบคุมโรค (กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน, 2547), 1-13.

ในคนปกติการสร้างสายโกลบินเริ่มจาก α-gene บนโครโมโซม คู่ที่ 16 และ β-gene บนโครโมโซม คู่ที่ 11 โดยจะสังเคราะห์สายโกลบินขึ้นมา แล้วรวมตัวกัน 4 เส้น โดยรวมแบบ Tertiary เกิดเป็น Hemoglobin ชนิดต่างๆ ทั้งนี้อยู่กับชนิดของสาย globin ที่รวมตัวกัน ระหว่างการเจริญและพัฒนาของตัวอ่อน (embryo), ทารกครรภ์ (fetus) และระยะหลังคลอด ยีนโกลบินต่างๆ มีการสับเปลี่ยนการทำหน้าที่กันดังนี้

ยีน α-globin ซึ่งเป็นยีนสำคัญที่สุดในการสร้างสายโกลบิน แสดงออกในตั้งแต่ระยะตัวอ่อน และเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ จนคงที่ ตั้งแต่ระยะทารกในครรภ์จนถึงหลังคลอดจนถึงวัยผู้ใหญ่ สาย α-globin เป็นส่วนประกอบสำคัญของ Hemoglobin ทั้งระยะตัวอ่อน เด็ก และผู้ใหญ่

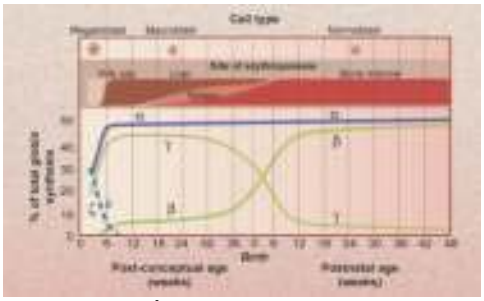
ยีน γ-globin และยีน β-globin มีการแสดงออกสวนทางกัน โดยยีน γ-globin เป็นยีนสำคัญในการสร้างสายโกลบินในระยะตัวอ่อน และจะสร้างลดน้อยลงในระยะใกล้คลอดและลดต่อเนื่องถึงหลังคลอด จนเหลือเพียงเล็กน้อยเมื่อเด็กอายุ 1-2 ปี ตามที่ได้แสดงในภาพที่ 3 ส่วนยีน β-globin ซึ่งแสดงออกน้อยในระยะตัวอ่อน จะสร้างมากขึ้นในระยะใกล้คลอดและหลังคลอด และจัดเป็นยีนสำคัญในการสร้างสายโกลบินในวัยผู้ใหญ่ ส่วนยีน ζ-globin และ ε-globin แสดงออกเพียงระยะสั้นๆ ขณะในระยะตัวอ่อน โดยจะแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ (Bunn et al. 1977)

1. ระยะ embryo (2 เดือนแรก เป็น Hemoglobin Gower I, Hemoglobin Gower 2, Hemoglobin Portland) ระยะแรก เป็น Hemoglobin Gower I ($\zeta_2 \varepsilon_2$) เมื่ออายุประมาณ 8 สัปดาห์ การสร้าง ζ และ εglobulin chainลดลง สร้าง α–globins chain และ γ-globin chain แทน จึงพบ Gower2($\alpha_2 \varepsilon_2$) และ Hemoglobin Portland ($\zeta_2 \gamma_2$)

2. ระยะทารกในครรภ์ 2-6 เดือนจะเป็น Hemoglobin F เป็นส่วนใหญ่ระยะนี้พบเป็น Hemoglobin F ($\alpha_2 \gamma_2$) ร้อยละ 90 พบ Hemoglobin A ($\alpha_2 \beta_2$) ร้อยละ 5-10 จะมีปริมาณคงที่จนถึงอายุ 34 สัปดาห์

3. ระยะทารกในครรภ์ 34 สัปดาห์ถึงทารกแรกเกิด (การสร้าง Hemoglobin F จะลดลงและสร้าง Hemoglobin A เพิ่มขึ้น) ระยะนี้จะพบ Hemoglobin F ร้อยละ 70-90, Hemoglobin A ร้อยละ 10-30 Hemoglobin A ($\alpha_2\delta_2$) ร้อยละ 1-3

4. ระยะหลังเกิด 6 เดือน -1 ปี ขึ้นไปจนถึงวัยผู้ใหญ่ Hemoglobin F จะลดลงเรื่อยๆ Hemoglobin A เพิ่มขึ้นเป็นลำดับภายหลังเกิด ประมาณ 6 เดือนถึง 1 ปีไปจนถึงวัยผู้ใหญ่จะมี Hemoglobin A ร้อยละ 96-98, Hemoglobin A_2 ร้อยละ 1-3, Hemoglobin F ร้อยละ 0-1

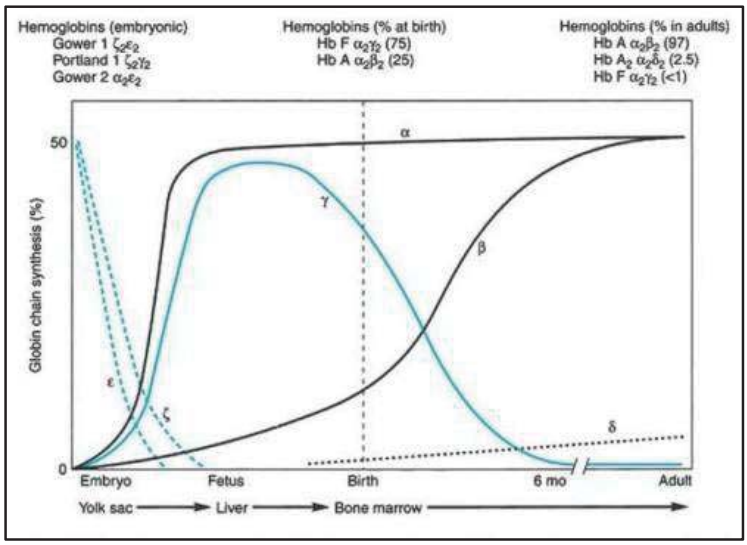


ภาพที่ 4 กราฟแสดงรายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงระดับ Globin ชนิดต่างๆ กับเวลา

ที่มา : Alan N. Schechter, “Hemoglobin research and the origins of molecular medicine,” The American Society of Hematology 112 (2008) : 3927-3938.

จากภาพที่ 4 (Schechter 2008 : 3927-3938) พบว่าระดับ globin ชนิดต่างๆและระยะเวลาจะมีความสัมพันธ์กันโดยพบว่า เด็กในระยะตัวอ่อนและหลังคลอดจะมีการผลิต ζ-globin และ ε-globin ในช่วงเวลาสั้น α-globin, γ-globin และ β-globin จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโดย α-globin จะมีการเพิ่มปริมาณและคงที่ตลอดชีวิต แต่ γ-globin จะมีการสร้างมากขึ้นและคงที่จากนั้นจะลดปริมาณลงจนเหลือประมาณ 1 % โดยระดับ α-globin และ γ-globin จะเพิ่มปริมาณสูงขึ้นในขณะที่ระดับของ β-globin ต่ำ ทำให้เด็กในครรภ์และหลังคลอดใหม่ๆ มี Hemoglobin typing เป็น Hemoglobin F (α_2, γ_2) เป็นส่วนใหญ่ประมาณ 80% และมี Hemoglobin A (α_2, β_2) เป็นส่วนน้อยประมาณ 10 % โดยชนิดและปริมาณของสาย globin ที่สร้างขึ้นนั้นจะขึ้นอยู่กับอายุของตัวอ่อนจนกระทั่งคลอดทำให้ระดับของ Hemoglobin ในเด็กเล็กยังไม่แน่นอนซึ่งเมื่ออายุครรภ์มากขึ้นเป็นระดับของ γ-globin จะลดลงในขณะที่ระดับของ β-globin จะเพิ่มสูงขึ้น และจะขึ้นสูงสุดที่ประมาณ 24 สัปดาห์หลังคลอด ในขณะเดียวกัน δ-globin ก็จะเริ่มสร้างขึ้นหลังคลอดเช่นกัน แต่ในปริมาณไม่มากนักทำให้ตรวจพบ Hemoglobin typing ในคนปกติเป็น A_2A โดยมี % Hemoglobin A (α_2,β_2) ประมาณ 80 – 99% Hemoglobin A_2 ประมาณ 2-3.5% และ Hemoglobin F (α_2, γ_2) < 1.5%

ถ้ายีนควบคุมการสร้างเส้น Polypeptide ผิดปกติไปก็จะทำให้เกิดความผิดปกติในการสร้างสาย α-globin หรือ β-globin จะทำให้เกิดความไม่สมดุลของสายโกลบินทั้งสองทำให้ Hemoglobin ที่เหลือเกิดการรวมตัวกันเป็น Unstuble Hemoglobin ภายในเม็ดเลือดแดงและมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงนั้นจะถูกม้ามทำลายได้ง่ายกว่าปกติ ก่อให้เกิดเป็น Thalassemia ชนิดต่างๆ ขั้นตอนการสังเคราะห์ Hemoglobin เริ่มตั้งแต่ในระยะที่เป็น embryo คือจะมีการสังเคราะห์ embryonic Hemoglobin ขึ้นมาก่อนต่อมาเมื่อเด็กในครรภ์มีอายุประมาณ 8 สัปดาห์ การสร้าง embryonic Hemoglobin จะลดน้อยลงและเริ่มมีการสังเคราะห์ fetal Hemoglobin (type F Hemoglobin) ขึ้นและจะถูกสร้างเพิ่มมากขึ้น จนมีปริมาณถึงร้อยละ 90 ของ Hemoglobin ทั้งหมดใน fetus และมีปริมาณคงที่อยู่เช่นนี้จนถึงระยะใกล้คลอด Hemoglobin A ถูกสร้างขึ้นในปริมาณน้อย ตั้งแต่ fetus อายุประมาณ 6 สัปดาห์ และสังเคราะห์ Hemoglobin F จะลดลง และ Hemoglobin A ถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นพร้อมกับการสังเคราะห์ Hemoglobin A_2 ด้วยภายหลังคลอดประมาณ 6 เดือน (Wimberly 1993: 127–130) พบว่า Hemoglobinส่วนใหญ่ในเม็ดเลือดแดงเป็น Hemoglobin A และ Hemoglobin F มีปริมาณลดลงกว่าร้อยละ 1 ของHemoglobin ตามที่ได้แสดงในภาพที่ 5



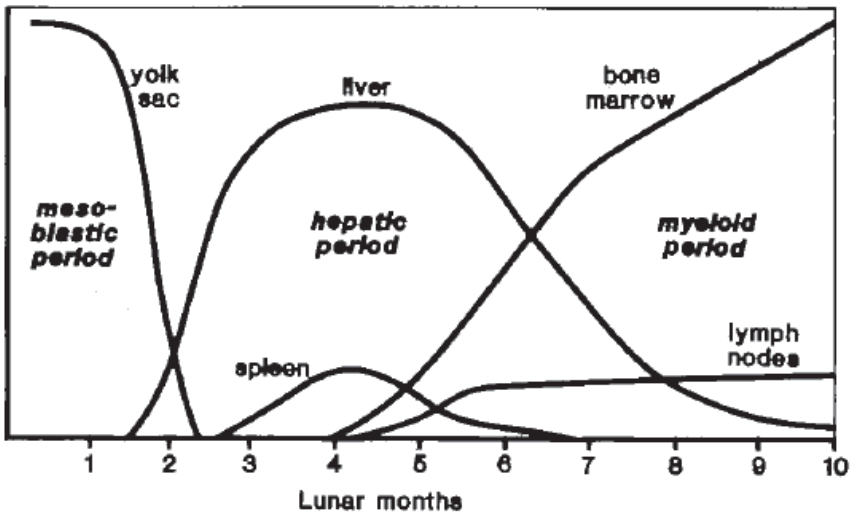
ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Globin chain synthesis และ ระยะการเจริญเติบโต

ที่มา : Nipon Chalaow : Thalassemia Blog [Online], accessed 1 September 2011. Available from http://nchalaow.wordpress.com/my-paper/

การสร้างเม็ดเลือด

ในคนปกติการสร้างเม็ดเลือด มี 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 และ 2 เป็นการสร้างเซลล์เม็ดเลือดนอกไขกระดูก (Extramedullary hematopoiesis) คือ การสร้างเม็ดเลือดเริ่มที่ตรงกลางของ Blood island ของ yolk sac ตั้งแต่ embryo อายุ 14 วัน ถึงประมาณ 2 เดือน ระยะที่ 2 เม็ดเลือดสร้างที่ตับ ตั้งแต่อายุครรภ์ประมาณ 6 สัปดาห์ และจะหยุดสร้างภายหลังคลอด ระยะที่ 3 สร้างในไขกระดูก (Medullary hematopoiesis) เริ่มตั้งแต่อายุครรภ์ประมาณ 5 เดือน และ ภายหลังคลอดในภาวะปกติ เม็ดเลือดจะสร้างในไขกระดูกเพียงแหล่งเดียว ซึ่งในระยะ 2-3 ปีแรก จะมีการสร้างเม็ดเลือดในกระดูกทุกชิ้น ทั้งกระดูกแบน (Flat bone) เช่น กะโหลกศีรษะ กระดูกซี่โครงหน้าอก กระดูกสันหลัง กระดูกส่วนหัวของต้นขาและแขน และกระดูกยาว (Long bone) เช่น กระดูกแขน ขา แต่เมื่ออายุ 5-6 ปี กระดูกยาวจะมีไขมันมาแทนที่ อายุประมาณ 18-20 ปี เม็ดเลือดส่วนใหญ่จะสร้างที่กระดูกแบน แต่ถ้าเมื่อใดร่างกายเกิดโรค หรือเกิดภาวะที่ต้องการสร้างเม็ดเลือดจำนวนมาก อวัยวะต่าง ๆ นอกไขกระดูกที่เคยสร้างเม็ดเลือดและในกระดูกยาว จะกลับมาช่วยสร้างเม็ดเลือดได้อีกครั้ง โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Wintrobe 1981: 35-42) ที่ศึกษาสรุปได้ว่า เมื่อปฏิสนธิได้ 2 อาทิตย์ จะเริ่มสร้างเม็ดเลือดใน Yolk sac และต่อมาจะเปลี่ยนมาสร้างเม็ดเลือดที่ตับและม้าม จนถึง 2 อาทิตย์ หลังคลอด ส่วน bone marrow

จะเป็นแหล่งสร้างเม็ดเลือด ตั้งแต่อยู่ในครรภ์ ช่วงเดือนที่ 4 จนถึงเด็กและวัยผู้ใหญ่ ซึ่ง bone marrow ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะถูกแทนที่ด้วย fat cells เนื่องจากความต้องการเซลล์ใหม่ๆ น้อยลง เมื่อมีอายุมากขึ้นตามที่ได้แสดงในภาพที่ 6 (Wintrobe 1981 : 35-42)



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลา กับอวัยวะที่ใช้สร้างเม็ดเลือดของทารกในครรภ์
ที่มา : Peter D. Wimberley, "Oxygen monitoring in the newborn," Scand J Clin Lab Invest 54 (1993) : 127–130.

Hemoglobin ในเด็ก

การสร้าง Hemoglobin มีวิวัฒนาการตามวัยของมนุษย์เช่น ทารกที่อยู่ในครรภ์ (fetal life) จะมีการสร้าง Hemoglobin F เป็นส่วนใหญ่ fetus หมายถึงตัวอ่อนในครรภ์ดังนั้น Hemoglobin F จึงหมายถึง Fetal Hemoglobin หรือ Hemoglobin ของตัวอ่อนจึงใช้อักษรย่อ F แทน fetus ดังนั้นเมื่อเด็กแรกเกิดจะมีการสร้าง Hemoglobin F บริมาณที่สูงและ Hemoglobin A ปริมาณที่น้อยกว่าโดย Hemoglobin F จะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ ในขวบปีแรกและจะเหลือน้อยกว่า 1 % เมื่ออายุมากกว่า 1 ปีขึ้นไปเช่น เมื่อเรานำเลือดจากสายสะดือของเด็กแรกเกิดส่งตรวจหาชนิดของ Hemoglobin จะพบ Hemoglobin F ประมาณ 70% และพบ Hemoglobin A ประมาณ 30% ซึ่งเป็นค่า hemoglobin ปกติในเด็กแรกเกิด(Cook 1957 : 272-278) ได้ทำการศึกษาปริมาณการเปลี่ยนแปลงของ Hemoglobin F ในทารกปกติ ช่วงอายุ 25 - 44 สัปดาห์จาก The Boston Lying-in Hospital พบว่า ความสัมพันธ์ของ

Hemoglobin F กับช่วงเวลา จะมีการลดลงของปริมาณ Hemoglobin F เมื่อเวลาผ่านไปการศึกษาครั้งนี้สิ้นสุดระยะเวลาที่ 44 สัปดาห์

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ Hemoglobin

การตรวจ Hemoglobin แบบต่างๆ

วิธีการวัดปริมาณของ Hemoglobin อาจทำโดยวิธี electrophoresis บนแผ่น cellulose acetate membrane และตัด band ของ Hemoglobin แต่ละชนิดออกมาใส่ในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นเพื่อชะ (elute) Hemoglobin ออกจาก membrane แล้วจึงอ่านความเข้มของ Hemoglobin แต่ละชนิดด้วยเครื่อง spectrophotometer หรืออาจจะแยก Hemoglobin แต่ละชนิดออกด้วยวิธี chromatography และอ่านความเข้มของ Hemoglobin แต่ละ fraction ด้วยเครื่อง spectrophotometer เช่นเดียวกันในปัจจุบันวิธีการ chromatography อาจทำได้โดยเครื่อง LPLC อัตโนมัติซึ่งเหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มี specimen จำนวนมากๆ วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถแยก Hemoglobin F ออกจาก Hemoglobin A ได้ชัดเจน

หลักการหาHemoglobinด้วย HPLC และ LPLC

วิธีการมาตรฐาน (standard method) สำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดของ Hemoglobin ได้แก่การตรวจวิเคราะห์ชนิดและการวัดปริมาณของ Hemoglobin แต่ละชนิดด้วยการทำ electrophoresis elution หรือการใช้ chromatography เพื่อชะ (elute) เอา Hemoglobin แต่ละชนิดออกมาวัดความเข้มซึ่งอาจทำโดยใช้ microcolumn หรือใช้เครื่อง Low Pressure Liquid Chromatography (LPLC) อัตโนมัติ ซึ่งการทำ Hemoglobin electrophoresis หรือการใช้ High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) อัตโนมัติสามารถบอกชนิดของโรคได้ค่อนข้างแม่นยำ โดยโครมาโตกราฟฟีเป็นเทคนิคที่ใช้แยกและวิเคราะห์สารให้บริสุทธิ์ ก่อนนำไปวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณเพื่อกำจัดสารที่ปนเปื้อนมากับสารละลายตัวอย่าง ปัจจุบันเทคนิคนี้มีความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในสาขาต่างๆ เช่น เคมี ชีวเคมี การเกษตร เภสัชกรรม การแพทย์ วิศวกรรมเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ โครมาโตกราฟี เป็นคำที่เรียกกันมาตั้งแต่ปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 โครมาโตกราฟีเป็นคำที่มาจากภาษากรีกสองคำ คือ Chromato แปลว่า สี และ Graphy แปลว่า เขียนหรือบันทึก โดย ไมเคิล ซวีตต์ (Michael Tswett) นักพฤกษศาสตร์ชาวรัสเซีย เป็นคนแรกที่ใช้เทคนิคทำการศึกษาทางฟิสิกส์และเคมีของคลอโรฟิลล์ โดยใช้สารดูดซับ (absorbent) บรรจุลงในคอลัมน์ แล้วใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวชะ สารคลอโรฟิลล์จะถูกแยกเป็นแถบๆ (band) ซึ่งแถบแต่ละแถบมีสีต่างๆ กัน ปัจจุบันโครมาโตกราฟีได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว และสามารถใช้แยกสารผสมทั้งที่มีสี และไม่มีสีออกจากกัน ไมเคิล ซวีตต์ ได้ให้คำจำกัดความของโครมา

โตกราฟี่ว่า เป็นการแยกองค์ประกอบของผสม บนสารดูดซึมที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ซึ่งอยู่ในระบบที่มีการเคลื่อนที่ ส่วน International Union of Pure and Applied Chemistry ได้ให้คำจำกัดความของโครมาโครกราฟีว่า โครมาโตกราฟีเป็นวิธีการขั้นแรกที่ใช้แยกองค์ประกอบของตัวอย่าง โดยอาศัยการกระจายตัวระหว่าง สองวัฏภาค (phase) วัฏภาคแรกเป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่เคลือบบนของแข็งหรือเจล (gel) ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ หรือกระจายตัวเป็นชั้นบางๆ หรือกระจายตัวเป็นฟิล์ม ส่วนอีกวัฏภาคเป็นวัฏภาคไหล (mobile phase) ซึ่งอาจเป็นก๊าซหรือของเหลว

โครมาโตกราฟีสามารถจำแนกได้ตามพื้นฐานของการแยกหรืออาศัยลักษณะปรากฏทางกายภาพ การจำแนกตามพื้นฐานของการแยก ได้แก่ แอดซอร์บชันโครมาโตกราฟี-นอร์มอลเฟสโครมาโตกราฟี (absorption chromatography-normal phase chromatography), รีเวอร์สเฟสโครมาโตกราฟี (revers-phase chromatography), อิออนแพร์โครมาโตกราฟี (ion-pair chromatography), อิออนเอกซ์เชงโครมาโตกราฟี (ion exchange chromatography) และโครมาโตกราฟีแบบอื่นๆ ส่วนการแยกโดยอาศัยลักษณะปรากฏทางกายภาพ ได้แก่ โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography, CC), โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography, PC), โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (thin layer chromatography, TLC), โครมาโตกราฟีแบบก๊าซ (gas chromatography, GC), โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) และโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะต่ำ (low performance liquid chromatography, LPLC) เป็นต้น (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ 2547 : 1-2)

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะต่ำ หรือ LPLC ใช้แยกสารเคมีภายใต้ความดันของของเหลว เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ทางด้านการแพทย์ สมุนไพร และทางด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณต่ำๆ ได้ในระดับไมโครกรัม ถึงพิโคกรัม เมื่อเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม LPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมแบบใช้แรงดันในการทำให้ตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกันสัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึก เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโตแกรม (chromatogram)

หลักการแยกสาร

ของเหลวที่ถูกความดันจะสร้างแรงพา (impelling force) ดันสารต่างๆ ในสารตัวอย่างผ่านไปบนตัวกลางที่ไม่เคลื่อนที่ หรือเคลื่อนที่ได้น้อยซึ่งเรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งเฟสคงที่จะสร้างแรงหน่วง (retention forec) ต่อสารชนิดต่างๆ ซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง ประจุ ความจำเพาะ (specificity) การดูดซึม (absorbtion) การละลาย (solubility) ดังนั้น ความแตกค่างกันของแรงหน่วงจึงทำให้โมเลกุลของสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ซึ่งบรรจุเฟสคงที่ในเวลาหน่วง (retention time) ที่ต่างกัน

ชนิดของโครมาโตกราฟีของเหลว

โครมาโตกราฟฟีแบบคอลัมน์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสคงที่ (stationary phase) ดังนี้

ของเหลว-ของแข็ง โครมาโตกราฟี (liquid-solid chromatography) ใช้ของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้ของแข็งเป็นเฟสคงที่ ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น 4 ชนิด คือ

1. เจลฟิลเทชันโครมาโตกราฟฟี (gel filtration chromatography) ใช้เฟสคงที่เป็นเม็ดเจลที่มีรูขนาดต่างๆ บรรจุในคอลัมน์ ทำให้โมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็กเคลื่อนที่เข้าไปในโมเลกุลของเจล เป็นผลให้เคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าสารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า

2. โครมาโตกราฟฟีแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography) เป็นการใช้เฟสนิ่งที่มีประจุแลกเปลี่ยน (counter ion) เมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนประจุกับโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีประจุ โมเลกุลของสารตัวอย่างนั้นจะถูกจับไว้ในคอลัมน์ หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนคุณสมบัติของของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ เช่น การเปลี่ยนพีเอส การเพิ่มปริมาณไอออนแลกเปลี่ยน จะทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ในอัตราเร็วที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนประจุ และความแรงของประจุที่จับกับเฟสเคลื่อนที่

3. แอฟฟินิตี้โครมาโตกราฟฟี (affinity chromatography) แยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของความจำเพาะทางชีวภาพ (biological specificity) โดยการสร้างเฟสคงที่ที่มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการแยก เช่น เอนไซม์กับซับสเตรท แอนติเจนกับแอนติบอดี เพื่อเฟสเคลื่อนที่พาโมเลกุลของสารที่ต้องการแยกผ่านมา เฟสคงที่จะจับเฉพาะโมเลกุลที่มีความจำเพาะไว้ หลังจากนั้น จึงเปลี่ยนคุณสมบัติของเฟสเคลื่อนที่ เช่น เพิ่มความเข้มข้นของเกลือ หรือเติมตัวแย่งจับเฟสคงที่ลงไป ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของสารที่ต้องการถูกขับออกมาจากคอลัมน์

4. โครมาโตกราฟีแบบดูดซึม (absorption chromatography) เป็นการแยกสารโดยใช้เฟสคงที่ที่เป็นตัวดูดซับ (absorbent) ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ เช่น แป้ง เซลลูโลส และซิลิกาเจล ซึ่งการดูดซับอาศัยความมีสภาพขั้ว (polarity) และจำนวนหมู่ที่ทำให้เกิดสภาพมีขั้ว (polarity group) ของเฟสคงที่และสารตัวอย่าง ส่วนการไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์อาศัยการเปลี่ยนสภาพมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่ กล่าวคือถ้าเฟสเคลื่อนที่มีสภาพมีขั้วสูง สารที่ละลายน้ำได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า

ของเหลว-ของเหลว โครมาโตกราฟี (liquid-liquid chromatography) หรือพาติชันโครมาโตกราฟี (partition chromatography) เป็นวิธีการแยกสารที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้ของเหลวที่เคลือบอยู่บนของแข็งเป็นเฟสคงที่ ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างช้าๆ แยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างในการละลายของสารตัวอย่างในของเหลวซึ่งเป็นเฟสคงที่ และของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ นิยมใช้สำหรับแยกสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันออกจากกัน เช่น การแยกกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ออกจากกัน

สำหรับของแข็งที่ใช้เป็นตัวค้ำจุน (supporter) นิยมใช้ซิลิกาเจลแต่อาจใช้ แป้ง เซลลูโลส หรือ อลูมินา แทนได้ ส่วนเฟสคงที่ที่เคลือบบนของแข็งอาจเป็นน้ำ บัฟเฟอร์ กรดแก่ ด่างแก่ แอลกอฮอล์ หรือไนโตรมีเทน

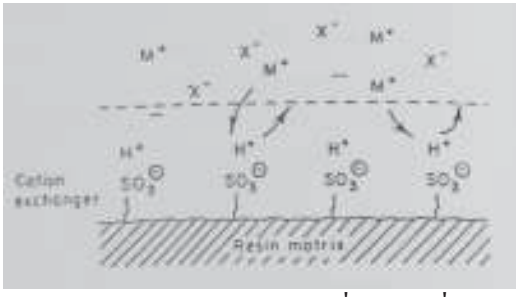
โดยปกติจะใช้เฟสคงที่สภาพมีขั้วสูงเพื่อแยกสารที่มีขั้วสูงออกจากกันและใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วต่ำกว่ามาไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วสูงกว่าจะออกมาทีหลัง เรียกวิธีนี้ว่า โครมาโตกราฟีแบบปกติ (normal phase chromatography) แต่ในบางกรณีจะใช้เฟสคงที่สภาพขั้วต่ำ เช่น สารอินทรีย์ประเภท n-alkyl ซึ่งมีคาร์บอน 8 หรือ 18 อะตอม เพื่อแยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกจากกัน และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพมีขั้วสูงกว่ามาไล่สารที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าออกมาช้ากว่า เรียกว่า โครมาโตกราฟีแบบผันกลับ (reversed phase chromatography)

นอกจากนี้โครมาโตกราฟีทั้งสองชนิดยังอาจใช้วิธีเติมสารที่มีประจุตรงข้ามลงในเฟสเคลื่อนที่ เช่น เติมเตตระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในเฟสเคลื่อนที่เมื่อสารตัวอย่างมีประจุบวก หรือเติมกรดเปอร์คลอริกลงในเฟสเคลื่อนที่เมื่อสารตัวอย่างมีประจุลบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร เรียกวิธีนี้ว่า ion-pair chromatography สำหรับกลไกที่ทำให้สามารถแยกสารได้ดีขึ้น เกิดจากการที่ไอออนที่มีประจุต่างกันรวมกันกลายเป็นสารที่ไม่มีประจุหรือมีประจุลดลง แล้วเคลื่อนตัวเข้าสู่เฟสคงที่หรือเฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วต่ำที่ทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่ได้ช้าลง

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ Hemoglobinด้วย LPLC (Gold Drew)

(Hemoglobin typing & quantitation)

เครื่องวิเคราะห์ Hemoglobin อัตโนมัติเป็นเครื่องหาชนิดและปริมาณของ Hemoglobin ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง รวมทั้งใช้เวลาในการทดสอบน้อย วิธีการง่ายไม่ยุ่งยาก ประหยัดเวลาและบุคลากร การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ Hemoglobin เพื่อวินิจฉัยโรคหรือ Hemoglobin ผิดปกติทางห้องปฏิบัติการนิยมใช้เครื่องมืออัตโนมัติเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ อาทิเช่น ความสะดวกรวดเร็วในการปฏิบัติงานเครื่องสามารถตรวจได้ทั้งชนิดและปริมาณของ Hemoglobin ได้อย่างต่อเนื่องในขั้นตอนเดียวกันจึงไม่ยุ่งยากและไม่ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญสูงอีกทั้งยังมีความถูกต้องแม่นยำและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ปัจจุบันเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ Hemoglobin ที่มีใช้ในประเทศไทยการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ high pressure liquid chromatography (HPLC) และ low pressure liquid chromatography (LPLC) ซึ่งนิยมใช้ทั่วไปในปัจจุบันโดยเฉพาะในโรงพยาบาลศูนย์ และโรงพยาบาลทั่วไปเนื่องจากทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง คือ หลักการโครมาโตกราฟีอัดแรงดันมีทั้งประเภทแรงดันสูง (high pressure liquid chromategraphy: HPLC) และแรงดันต่ำ (low pressure liquidchromatography: LPLC) High or Low Performance Liquid Chromatography (HPLC/LPLC) หลักการ HPLC และ LPLC มีข้อแตกต่างกันคือ HPLC จะสามารถแยก Hemoglobin แต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่สิ้นเปลืองเวลา เนื่องจากใช้แรงดันสูงถึง 28 ปอนด์ต่อตารางเซ็นติเมตร. (6.5 นาทีต่อราย, เครื่อง VARIANT ของบริษัท BioRad) ส่วน LPLC จะใช้แรงดันต่ำกว่าที่ใช้ใน HPLC ประมาณครึ่งหนึ่ง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการอุดตันของฟองอากาศภายในระบบ ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คือ 10 นาทีต่อราย โดยเครื่อง Hemoglobin Gold ของบริษัท Drew ข้อดี คือราคาน้ำยาไม่แพง การดูแลรักษาเครื่องไม่ยุ่งยากมี accuracy และ precission ดีกว่าเทคนิค electrophoresis สำหรับหลักการในการแยก Hemoglobin คือการแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange) (สุทัศน์ ฟู่เจริญ และคณะ 2537: 202-17)



ภาพที่ 7 หลักการการแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange) ที่ใช้ในเครื่อง LPLC
ที่มา : สุทัศน์ ฟู่เจริญ และปราณี ฟู่เจริญ, ตำราโลหิตวิทยา การวินิจฉัย และการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย, พิมพ์ครั้งที่ 2 (กรุงเทพมหานคร : ทีพี พริ้นท์, 2537), 202-17.

โดยโมเลกุลของ Hemoglobin หันด้านที่มีประจุบวกเข้าจับกับ resin ของ column ซึ่งมีประจุลบ จากนั้นจะใช้ buffer ที่มีความแรงของประจุบวก (ionic strength) ต่างๆ ผ่านเข้าไปใน column ทำให้ Hemoglobin แต่ละชนิดถูก elute ออกมาที่ระยะต่างกันวัดคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของ Hemoglobin ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยใช้ photometer ที่อยู่ภายในเครื่องแล้วรายงานออกมาเป็น chromatogram ที่แสดงแผนภาพโดยแสดงชนิด และ ร้อยละของปริมาณ Hemoglobin ชนิดต่างๆ ได้แก่ Hemoglobin F, A, A_2 และ Hemoglobin ผิดปกติ เช่น Hemoglobin C, Hemoglobin S ซึ่งสามารถระบุชนิดของ Hemoglobinได้ โดยดูจากเวลาคงตัวในการ elute สาร (retention time) ที่จะแตกต่างกันใน Hemoglobin แต่ละชนิดเป็นตัวกำหนดส่วนการหาร้อยละของปริมาณของ Hemoglobin แต่ละชนิด คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของ Hemoglobin ชนิดนั้น

ภาพที่ 8 เครื่องวิเคราะห์กึ่งอัตโนมัติสำหรับตรวจหา hemoglobin typing รุ่น Hemoglobin Gold ของบริษัท Drew
ที่มา : บริษัท พีซีแอล โฮลดิ้ง จำกัด, “HbGold Key Operator Training: Thalassemia & Abnormal Hemoglobin,” เอกสารคู่มือการใช้งาน, 2549. (อัดสำเนา)

วิธีการแยกชนิดของ Hemoglobin ออกเป็นสัดส่วนเชิงปริมาณโดยอาศัย cation exchange และอาศัยแรงดันที่ทำให้ buffer เคลื่อนที่ผ่าน column รวดเร็วการรายงานผลอ่านค่าจากพื้นที่ใต้กราฟ โดย Hemoglobin แต่ละชนิดจะปรากฏในลักษณะของ chromatogram ที่ถูกชะล้างออกมาตามลำดับใน retention time (RT) ที่ต่างกันโดยมีหลักการเดียวกัน คือเป็นคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิดบวก (cation exchange column chromatography) ส่วนคอลัมน์บรรจุอนุภาคขนาดเล็ก (spherical silica gel) เคลือบด้วยสารคาร์บอกซิล (carboxyl) ซึ่งมีประจุลบทำหน้าที่เป็น stationaryphase จับกับประจุบวกของ Hemoglobin ที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ทางระบบส่งสารตัวอย่าง (sampleinjector) จากนั้น Hemoglobin แต่ละชนิดจะถูกชะล้าง (elute) ออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ (mobilephase) ที่มีความแรงของประจุ (ionic strength) สูงกว่าความแรงของประจุของ Hemoglobin ที่จับอยู่กับ stationary phase แต่เนื่องจากในตัวอย่างเลือดมี Hemoglobin ปนกันหลายชนิดแต่ละชนิดมี ionicstrength ไม่เท่ากันเครื่องอัตโนมัติเหล่านี้จึงต้องมีโปรแกรมควบคุมการผสมบัฟเฟอร์ 2 ชนิดที่มี ionicstrength ต่างกันเพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงของ ionicstrength ที่เหมาะสมสำหรับ Hemoglobin แต่ละชนิด ระยะเวลาที่ Hemoglobin แต่ละชนิดคงอยู่ในคอลัมน์ เรียกว่า retention time (RT) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละ Hemoglobin จากนั้น Hemoglobin ที่ถูกชะออกมาจะถูกส่งผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer detector) ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมแล้วส่งข้อมูลไปยังส่วนประมวลผลเพื่อวิเคราะห์ Hemoglobin ชนิดต่างๆ อ้างอิงตาม RT ของ Hemoglobin มาตรฐาน และรายงานผลเป็น 2 ลักษณะคือรายงานโครมาโตแกรมแสดงการดูด กลืนแสงของ Hemoglobin ที่ถูกชะล้างผ่านคอลัมน์ออกมาในเวลาต่างๆ (หรือนิยมเรียกกันว่า peak) และรายงานปริมาณ Hemoglobin แต่ละชนิดตามพื้น ที่ใต้กราฟในช่วงเวลาที่กำหนด

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hemoglobin ผิดปกติที่พบในจังหวัดตรัง พัทลุง และกระบี่ ปี 2546 – 2548.

งานวิจัยของ อติเวทย์ เศวตะดุล และคณะ (อติเวทย์ เศวตะดุล และคณะ 2550 : 618-625) มีการศึกษาระดับของ Hemoglobin ผิดปกติที่พบในจังหวัดตรัง พัทลุง และกระบี่ ในปี 2546 – 2548 โดยใช้การวิเคราะห์ด้วย Low Pressure Liquid Chromatography (LPLC) ตรวจหา Hemoglobin F และคำนวณหาความเข้มข้นของ Hemoglobin ออกมาเป็นร้อยละ โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของ Hemoglobin แต่ละชนิด โดยเป็นการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปรกติในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดตรัง พัทลุง และกระบี่ จำนวน 3,368 คน ผลจากการศึกษา

ดังกล่าวทำให้ทราบถึงชนิดของ Hemoglobin ผิดปรกติ ทั้งชนิดที่พบได้บ่อยและ Hemoglobin ที่พบได้ไม่บ่อยในพื้นที่ โดยพบเป็น Hemoglobin E 1,074 ราย หรือร้อยละ 31.8 ของตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมด โดย Hemoglobin ที่ตรวจพบส่วนใหญ่เป็นพาหะของ Hemoglobin E (Hb EA หรือ E-Trait) ส่วนที่เหลือเป็นชนิด EE, EF, EFA, Ea Barts ตามที่ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Hemoglobin ผิดปรกติที่ตรวจพบจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจากโรงพยาบาลในพื้นที่จังหวัดตรัง กระบี่ และพัทลุง พ.ศ. 2548

ชนิดความผิดปรกติของฮีโมโกลบินที่ตรวจพบ	รายละเอียดความผิดปรกติทางยีน	จำนวน
EE	β 26 (B8) : Glu → Lys	96
EA	β 26 (B8) : Glu → Lys	911
EF/ EFA	β 26 (B8) : Glu → Lys	60
EABart's	β 26 (B8) : Glu → Lys	6
Constant spring	α 142 : TAA → CAA	2
Codon19 /HbE	β 19 (B1) : Asn → Ser, → 26 (B8) : Glu → Lys	7
Codon 19/Hb C	β 19 (B1) : Asn → Ser, → 6; (Glu → Lys)	1
J-Bangkok	β 56 (D7); Gly → Asp	1
ES	β 26 (B8) : Glu → Lys, → 6 (Gly → Val)	1
EC	β 26 (B8) : Glu → Lys, → 6; (Glu → Lys)	1
I	α 16; (Lys → Asp)	1
C	β 6; (Glu → Lys)	4
Q-Thailand	α 74 (EF3) : Asp → His	2
41-42/E	β 41-42 (-TTCT); → 26 (B8) : Glu → Lys	1
E/ Constant Spring	β 26 (B8) : Glu → Lys/ → 142 : TAA → CAA	1
Tak	β 146 : Term → Thr	2
19/19	β 19 (B1) : Asn → Ser/ β 19 (B1) : Asn → Ser	1
รวม		1,099

ที่มา : อติเวทย์ เศวตะดุล, เกษร บุญยรักษ์โยธิน และ ยินดี น้ำเพชร, "Hemoglobin ผิดปกติที่พบในจังหวัดตรัง พัทลุง และกระบี่ ปี 2546 – 2548," Journal of Health Science 16 (2550) : 618-625.

นอกจากนี้ยังพบ Hemoglobin E ร่วมกับ Hemoglobin ผิดปรกติชนิดต่างๆ โดยได้แสดงค่า retention time, RT ของ Hemoglobin ผิดปรกติหลายๆ โดยพิจารณาร่วมกับภาพโครมาโตแกรม Hemoglobin ผิดปรกติหลายๆ ชนิดจะแสดงค่า unknown window ที่ค่า RT ในช่วงเวลาที่เฉพาะ เช่น Hb CS, Hb S, Hb C จะปรากฏ unknown window ในช่วงตั้งแต่ 290-340, 230-340, 340-400 ตามลำดับ สำหรับ Hemoglobin ที่เป็นลักษณะเฉพาะ เช่น Hb Tak จะปรากฏ peak ที่ตำแหน่งของ A0 window

และ A2 window และ Hb J-Bangkok มี Peak ที่ตำแหน่งของ A0 window และ unknown window โดยได้แสดงค่า retention timeในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า retention time ของ Hemoglobin ผิดปรกติที่ตรวจพบจากเครื่อง Hb Gold

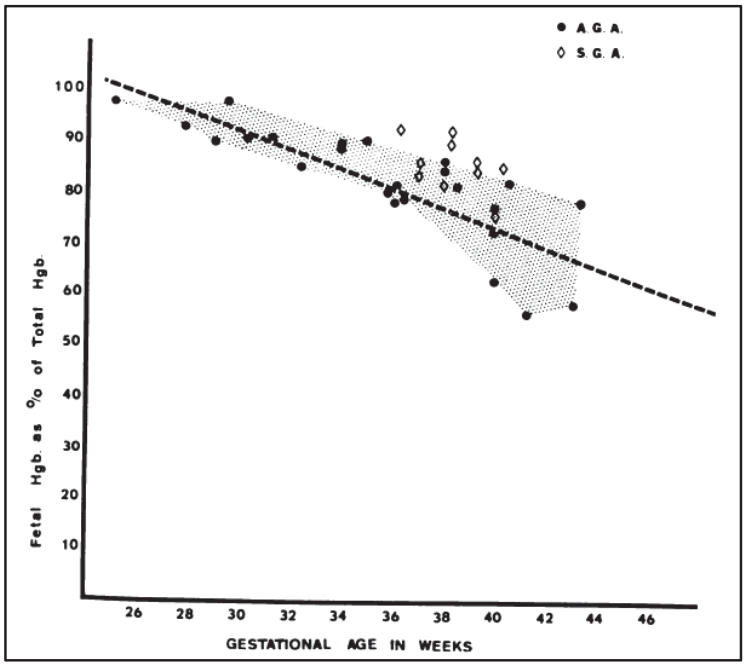
ชนิดของฮีโมโกลบินผิดปรกติ	Window ที่ปรากฏใน chromatogram	ค่า retention time	Hemoglobin (%)
1. Hb Constant Spring	AO window	209	79.8
	Unknown	303	2.0
	Unknown	332	1.3
2. Hb ATak	AO window	206	59.3
	A2 window	291	41.6
3. Hb AJ-Bangkok	Unknown	182	42.9
	AO window	215	47.6
	A2 window	287	2.3
4. Hb AS	AO window	213	63.0
	A2 window	284	2.4
	S window	312	23.3
5. Hb AC	AO window	215	21.1
	A2 window	285	4.3
	C window	371	63.7
6. Codon 19/ Hb E	Unknown	219	27.6
	E window	277	54.1

ที่มา : อติเวทย์ เศวตะดุล, เกษร บุญยรักษ์โยธิน และยินดี น้ำเพชร, “Hemoglobin ผิดปกติที่พบในจังหวัดตรัง พัทลุง และกระบี่ ปี 2546 – 2548,” Journal of Health Science 16 (2550) : 618-625.

TheRelative Rates of synthesis of hemoglobins A and F inimmature red cells of newborn infants.

มีการศึกษาลักษณะเดียวกันโดยได้ดำเนินการศึกษาสัดส่วนการสังเคราะห์ของ hemoglobins A และ F จากเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอย่างเลือดได้จากทารกตั้งแต่ 25 ถึง 43 สัปดาห์ได้ทดลองและเปรียบเทียบระหว่าง Approprirate for gestational age (AGA) คือ เด็กที่คลอดมีน้ำหนักเหมาะสมกับอายุครรภ์ คือ ระหว่าง 10-90 percentile กับ Small forgestational age (SGA) คือ เด็กที่เมื่อคลอดมีน้ำหนักตัวแรกคลอดต่ำกว่า (SGA) 10^{rd} percentile ของเด็กที่มีอายุครรภ์เท่าเทียมกัน Approprirate for gestational age (AGA) พบว่าในเด็กที่มีน้ำหนักตัวปกติ (AGA) จะมีลักษณะ

ความสัมพันธ์ของ Hemoglobin ที่ลดลงเมื่อเวลาเปลี่ยนไป แต่ในกรณีเด็กที่เป็น Small forgestational age (SGA) กราฟจะมีลักษณะที่ไม่มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง ดังที่ได้แสดงในภาพที่ 9

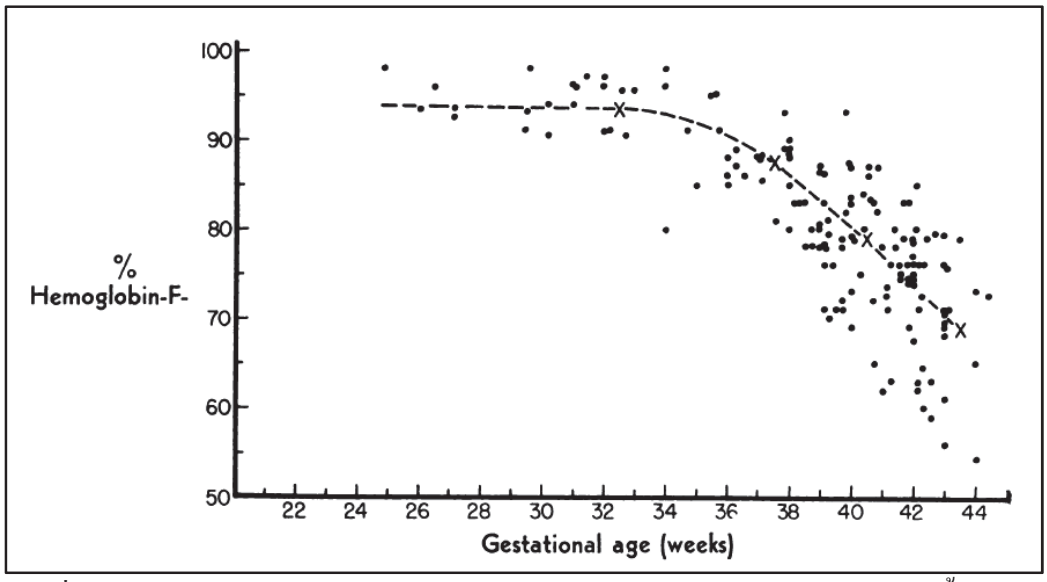


ภาพที่ 9 กราฟเปรียบเทียบระหว่าง AGA กับ SGA โดยเปรียบเทียบกับ Hemoglobin

ที่มา : Harry Bardel et al.,"The Relative Rates of synthesis of hemoglobins A and F inimmature red cells of newborn infants," Pediatrics 45 (1970) : 766-772.

Measurement of fetal hemoglobin in newborn infants: Correlation with Gestational Age and Intrauterine Hypoxia.

Charles D. Cook et al. (1957) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ Hemoglobin F และอายุ พบว่าจะมีการลดลงของ Hemoglobin F และในช่วงสัปดาห์ที่ 34 เป็นต้นไป การลดลงจะประมาณร้อยละ 3-4 ต่อสัปดาห์ โดยศึกษาจากผู้มาขอใช้บริการใน The Boston Lying-in Hospital สรุปความสัมพันธ์ของ Hemoglobin F กับช่วงเวลา ว่าจะมีการลดลงของปริมาณ Hemoglobin F เมื่อเวลาผ่านไปการศึกษาครั้งนี้สิ้นสุดระยะเวลาที่ 44 สัปดาห์ ดังที่ได้แสดงในภาพที่ 10

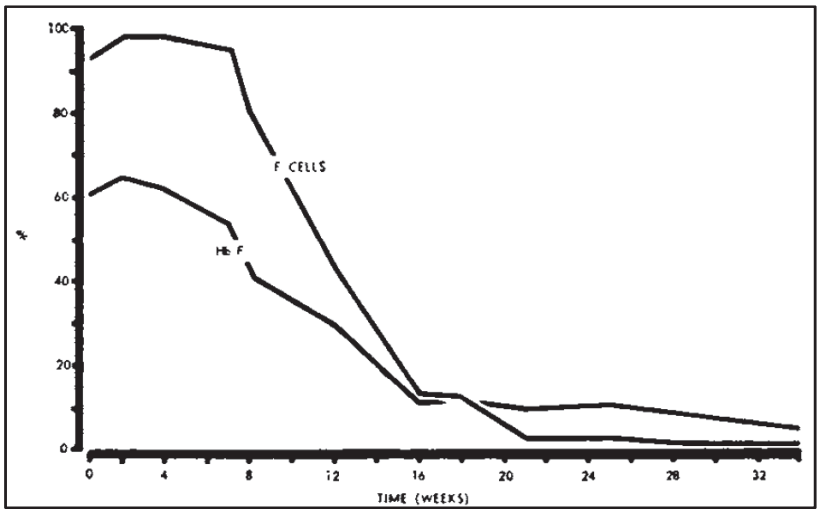


ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fetal Hemoglobin ของทารก กับช่วงเวลาตั้งแต่ 25 – 44 สัปดาห์ จำนวน 152 ตัวอย่าง

ที่มา : Charles D. Cook et al., "Measurement of fetal hemoglobin in newborn infants: Correlation with Gestational Age and Intrauterine Hypoxia," Pediatrics 20 (1957) : 272-278.

The distribution of fetal hemoglobin in the blood of normal children and adults

งานวิจัยของ Alvin Zipursky and other (1962) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการจำแนก Hemoglobin F จากเลือดคนปกติในเด็กและผู้ใหญ่ โดยมีการศึกษาความเข้มข้นของ Fetal Cell และ ความเข้มข้นของ Hemoglobin F ในกลุ่มเด็กแรกเกิดจนถึงอายุ 8 เดือนที่ไม่มีความผิดปกติทางเลือด จากโรงพยาบาลเด็ก Winnipeg โดยเส้นกราฟที่แสดงเป็นกราฟที่ได้ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นกับช่วงอายุ โดยจะพบว่า เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Fetal Cell และ ความเข้มข้นของHemoglobin F มีปริมาณที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปและเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 20 สัปดาห์ตามที่ได้แสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 การศึกษาความเข้มข้นของ Fetal Cell และ ความเข้มข้นของ Hemoglobin F ในกลุ่มเด็กแรกเกิดจนถึงอายุ 8 เดือนที่ไม่มีความผิดปกติทางเลือด

ที่มา : Alvin Zipursky et al., “The distribution of fetal hemoglobin in the blood of normal children and Adults,” Pediatrics 30 (1962) : 262-268.

Alkali resistant haemoglobin F level from birth to 12 years

เป็นการศึกษาระดับของ haemoglobin F ตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 12 ปี ด้วยวิธี Alkali resistant จากตัวอย่างเลือดของเด็กจำนวน 652 คนที่เลือกโดยการสุ่ม จาก The Departments of Obstetricsand Gynaecology and Paediatrics, Medical College Hospital การวิจัยนี้วัดระดับของ hemoglobin F ด้วยวิธีการ denaturation จากการวิเคราะห์สรุปได้ ตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 กลุ่มอายุของทารกในแต่ละกลุ่มและค่าเฉลี่ยของแต่ละช่วง กับ hemoglobin F

Age	No. of cases	Foetal Hb%	
		Average	Range
1st day	210	61.62	40.00–80.30
1st week to 1st month.	15	40.66	24.50–55.55
2nd to 4th month	10	25.40	10.30–45.56
5th to 6th month	20	4.68	8.20–14.64
6th to 12th month	26	1.30	0.00– 4.60
1 –½ years	55	1.45	0.00–4.90
1½–2 years	40	0.20	0.00–2.20
2 –4 years	62	0.15	0.00–2.46
5 –7 years	59	0.08	0.00–1.30
8 –10 years	70	0.01	0.00–1.25
10–12 years	85	0.00	0.00–1.25

ที่มา : V. H. Talib et al., “Alkali resistant haemoglobin F level from birth to 12 years,” Indian journal of pediatrics 41 (1974) : 304-308.

ตั้งแต่ 1951 เมื่อซิงเจอร์และคณะ (1951) ได้นำเสนอเทคนิคการวัดปริมาณ hemoglobin F ด้วยการวัดหาปริมาณ hemoglobin F ให้ได้เป็นตัวเลข โดยการอาศัยหลักการความคงทนของ hemoglobin F ที่มีต่อด่าง ในขณะที่ hemoglobin ชนิดอื่นๆ สามารถถูกทำลาย และตกตะกอนออกไป เหลือแต่ hemoglobin F ซึ่งจะถูกนำไปหา โดยใช้ light absorbance และเปรียบเทียบออกมาเป็นปริมาณเปอร์เซ็นต์ งานวิจัยดังกล่าวเลือกกลุ่มเด็กตัวอย่างที่มีสุขภาพดีเนื่องจาก hemoglobin F จะสูงในกลุ่ม β-thalassemia, δβ-thalassemia, γδβ-thalassemia และ HPFH ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่บางครั้ง พบว่าอาจได้ค่าสูงเกินความเป็นจริง ในกรณี hemoglobin F ต่ำๆ หรือถ้า hemoglobin F สูงมาก อาจได้ค่าต่ำกว่าความจริงวิธีวัดปริมาณ hemoglobin F ดังกล่าวได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย ตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ร้อยละของเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์ในทารกแรกเกิดที่มีการรายงานต่างๆ

Author	Year	Foetal Hb (%)	
		Range	Mean
Chernoff and Singer	1952	50.0–85.0	–
Schulman *et al.*	1954	45.0–89.0	71.0
Walker and Turnbull	1955	61.0–89.0	77.8
Bromberg *et al.*	1956	64.1–95.0	–
Cook *et al.*	1957	65.0–90.0	69.0
Sen *et al.*	1958	37.0–85.0	–
Patel *et al.*	1958	46.5–94.4	75.18
Gerbie	1959	55.0–92.0	73.3
Khanna and Manchanda	1960	42.7–87.5	66.5
Armstrong	1963	63.0–87.0	74.0
Andrews *et al.*	1965	42.0–98.0	80.8
Joshi and Dube	1967	46.0–90.0	70.3
Jain *et al.*	1973	47.0–83.3	62.7
Gupta *et al.*	1973	50.0–96.0	76.0
Present study	1974	40 0–80 30	61.62

ที่มา : V. H. Talib et al., “Alkali resistant haemoglobin F level from birth to 12 years,” Indian journal of pediatrics 41 (1974) : 304-308.

Alkali resistant hemoglobin-F levels during O-5 years of life in normal Indian children

การวัดระดับ hemoglobin-F ระหว่างช่วงอายุ 0-5 ปี ด้วยวิธี Alkali resistant โดยการวิจัยดังกล่าวใช้เทคนิคการอาศัยหลักการความคงทนของ hemoglobin F ที่มีต่อด่าง ในขณะที่ hemoglobin ชนิดอื่นๆ สามารถถูกทำลาย และตกตะกอนออกไปเหลือแต่ hemoglobin F ซึ่งจะถูกนำไปหา โดยใช้ light absorbance และเปรียบเทียบออกมาเป็นปริมาณเปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเติมด่างลงไปในเลือด hemoglobin F จะมีความทนทานต่อด่างมากกว่า hemoglobin ชนิดอื่นๆ ทำให้สามารถตรวจนับ hemoglobin F ภายหลังการชะเอาเศษ hemoglobin ชนิดอื่นๆ ออกไป โดยใช้กลุ่มตัวอย่างจำนวน 528 คน ที่เป็นเด็กทารกที่มีสุขภาพดี จากการวิเคราะห์พบว่า ค่าเฉลี่ยที่ระดับ hemoglobin F ในเด็กปกติระหว่าง 0-5 ปี คือ ค่าเฉลี่ยที่ปี 1-11/2, 11/2-2 ปี และ 2-3 ปี เป็น 5.25 ± 2.60, 5.34 ± 3.10 และ 2.90 ± 3.8 ตามลำดับ โดย จากตารางเป็นตารางแสดง hemoglobinF ของทารกและความเข้มข้นของ

hemoglobin โดย hemoglobin F จะมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไปตามช่วงเวลาที่ต่างวัย สรุปผลการทดลอง จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค denaturation ด้วยด่าง พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณของ hemoglobin F ได้ โดยปริมาณที่พบมีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาและในช่วงหลัง 2 ปี จะพบ hemoglobin F ที่น้อยมากเมื่อเทียบกับแรกเกิด โดยที่พบ hemoglobin F ในปริมาณที่น้อยเนื่องจาก มีการสร้าง hemoglobin A ขึ้นมาทดแทน และลดการสร้าง hemoglobin F ให้ลดน้อยลงตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณ hemoglobin F กับช่วงเวลาแรกเกิด ถึง 5 ปี

Age	No. of subjects	Fetal hemoglobin%			Hemoglobin G.%		
		Range	Mean	S. D. ±	Range	Mean	S. D. ±
Cord blood	53	31.7—89.6	58.14	13.45	15.8—19.2	18.12	1.00
1—8 hours	26	30.9—74.5	51.86	7.07	16.1—18.9	17.58	0.28
8—12 ,,	14	39.0—73.4	49.97	9.70	13.8—18.0	16.05	1.25
12—24 ,,	17	32.5—79.0	45.28	5.25	13.3—18.6	15.64	1.70
24—48 ,,	44	23.0—88.0	50.20	13.37	12.0—18.7	15.36	1.46
2—7 days	53	27.4—93.1	51.48	5.20	12.2—18.2	14.90	1.40
2—3 weeks	37	21.5—86.9	41.85	4.10	10.0—16.8	13.97	1.83
1 month	9	30.6—47·5	39.14	3.97	11.2—14.2	12.73	1.70
2 months	47	18.2—53.2	31.25	9.80	9.5—15.1	12.12	2.00
3 ,,	25	12.3—41.2	22.10	6.00	9.7—16.2	11.28	1.73
4 ,,	23	10.9—37.4	21.69	11.80	9.8—13.8	11.15	1.41
5—6 ,,	18	7.0—44.3	16.36	8.10	9.8—12.8	10.74	1.73
7—8 ,,	15	7.2—16.3	11.22	2.60	8.9—22.0	10.46	1.00
9—10 ,	21	2.6—14.5	8.23	3.10	8.9—13.8	11.41	1.44
11—12 ,,	9	2.0—12.1	6.62	8.2	9.3—11.9	10.85	1.14
1—1½ years	34	1.20—10.9	5.25	2.60	8.8—12.8	11.16	1.73
1½—2 ,,	21	0.0—16.0	5.34	3.10	9.0—12.8	10.78	1.02
2—3 ,,	10	1.5— 7.4	2.90	3.80	9.9—12.8	11.65	1.12
3—4 ,,	22	0.0— 1.9	0.46	0.38	9.2—12.3	11.13	1.80
4—5 ,,	30	0.02—2.1	0.47	0.85	11.76—13.10	12.26	1.20

ที่มา : V. Khurana and K. N. Agarwal. “Alkali resistant hemoglobin-F levels during O-5 years of life in normal Indian children,” Indian journal of pediatrics 36 (1969) : 432-435.

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการทดลอง

เครื่อง Hemoglobin Gold ใช้หลักการ low pressure cation exchange chromatography ในการแยกชนิด Hemoglobin โดยเกิดแรงระหว่างไอออนของ Hemoglobin ที่มีประจุบวกกับหมู่แลกเปลี่ยนไอออนบนซิลิก้าเจลในคอลัมน์ที่มีประจุลบ อาศัยการละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งมี Ionic Strength สูงกว่า Hemoglobin เป็นตัวชะให้ Hemoglobin หลุดออกจากผิวของซิลิก้า และไปผ่านออกจากคอลัมน์ เนื่องจากแต่ละ Hemoglobin มี Ionic Strength ไม่เท่ากัน จึงทำมีให้มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนในการผสมของบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด เพื่อให้เหมาะสมกับการชะ (Elute) ทำให้ Hemoglobin แต่ละชนิดแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ที่แน่นอน (Retention Time) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของ Hemoglobin แต่ละชนิดร่วมกับ gradient elution ในการแยกชนิดของ human hemoglobin และ variants จากเลือด whole blood ที่ทำการ hemolysis การแยก hemoglobin fraction สามารถวัดได้โดยการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตรโครมาโตแกรมที่ได้จะถูกบันทึกและเก็บโดยระบบคอมพิวเตอร์โปรแกรมซอฟท์แวร์จะเป็นตัวทำการวิเคราะห์โครมาโตแกรมและแสดงผลบนจอ CRT และทางพริ้นเตอร์ โดยเครื่องจะแสดง% ของ Hemoglobin ทุกตัวทุกชนิดทั้ง % Hemoglobin A_2 , % Hemoglobin E, % Hemoglobin F และ % Hemoglobin A_0 , % Abnormal Hemoglobin ต่างๆ โดยตัวอย่างตรวจใช้ EDTA blood เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 ºซ ต้องไม่เป็น sample ที่ hemolyze โดยเตรียม Hemolysate ใช้ Deionized water 1 ml EDTA blood 10 µl หรืออาจใช้ส่วนของ RBC 5 µl ผสมให้เข้ากันในถ้วยพลาสติก (Sample vials)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง Hemoglobin Gold and Gold column
2. ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 200 µl
3. Disposable pasteur pipet
4 Deionized water
5. หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ชุดน้ำยา
2. น้ำยา A ปริมาตร 1.5 ลิตร
3. น้ำยา B ปริมาตร 0.8 ลิตร
4. ฮีโมลัยเซอร์ 125 มิลลิลิตร

วิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ตัวอย่างเลือดจากเด็กที่ไม่มีความผิดปกติของเลือด ที่ผู้ปกครองมาขอรับบริการตรวจที่บริษัท PCL Laboratory และ โรงพยาบาลบางปะกง จำนวน 30 คนโดยมีช่วงอายุระหว่าง แรกเกิด –2 ปี

วิธีการเก็บตัวอย่างเลือด

1. ภาชนะบรรจุ EDTA tube (Ethylenediaminetetra-acetate)
2. ปริมาณสิ่งส่งตรวจปริมาณ 2.5 ml.

ภาพที่ 12 ภาชนะบรรจุ EDTA tube

ภาพที่ 13 EDTA tube

3. เจาะจากเส้นเลือดดำ (Vein)

4. ถอดเข็มก่อน ปล่อยเลือดลงตามด้านข้าง Tube เบาๆ

5. ผสมโดยการกลับหัวท้าย Tube เบาๆ ประมาณ 10 ครั้ง

6. เจาะด้วย Medicut เจาะให้ปล่อยเลือด ไหลลง Tube เอง ห้ามใช้ไซริงค์ดูดเพราะจะทำให้เกิด Hemolysis ได้

7. หลังเจาะควรดำเนินการตรวจวิเคราะห์ให้เร็วที่สุด

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

1. ใช้เลือดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง

2. ปิเปตเลือด (whole blood) 10 µlลงใน sample vial

3. เติม 1 ml ของ haemolysing reagent สำหรับการตรวจ Hemoglobin A1C หรือ เติม 1 ml ของน้ำกลั่น สำหรับการตรวจ Hemoglobin A2 และ Variant

4. วาง sample tube ใน Auto sampler

5. ทำการ batch ของ sample

การเตรียม Hemolysate

1. กรณีทำ Typing: ใช้ Deionized water 1 ml EDTA Blood 10 µl หรืออาจใช้ส่วนของ

RBC 5 µl ผสมให้เข้ากันในถ้วยพลาสติก (Sample vials)

2. กรณีทำ Hemoglobin A1c: ใช้ Hemolyzer reagent ที่ให้มากับชุดน้ำยา 1 ml ผสมกับ EDTA Blood 10 µl ผสมให้เข้ากันในถ้วยพลาสติก (Sample vials)

วิธีการทดลองหาปริมาณ Hemoglobin ด้วยเทคนิค LPLC

การ Run sample และการทำ Background & peak tracking

1. จาก Main menu กด Run sample program
2. กด Select sample / IDS เครื่องจะขึ้น mode Hemoglobin A1C พร้อมกับตำแหน่ง 1-99 ให้เลือก ไม่ต้องการกด No
3. เครื่องจะขึ้นว่าต้องการทำ mode A2/VAR หรือไม่ ต้องการการกด Yes
4. เครื่องจะขึ้นว่าต้องการทำ mode Hemoglobintrace หรือไม่ ไม่ต้องกด No
5. เครื่องจะให้เลือกตำแหน่งที่จะวาง Sample เป็นหลุม (well) แรกโดยกดเครื่องหมายลูกศรตามต้องการ และกดเลือกลูกศรไปยังตำแหน่ง well สุดท้ายที่ต้องการทำงานจากนั้นกด select last well หากต้องการทำเพียง sample เดียวให้เลือกตำแหน่งแรก และตำแหน่งสุดท้ายเป็นตำแหน่งเดียวกัน
6. กด Accept sample ID (หากต้องการป้อนชื่อหรือ ID คนไข้ให้กด Enter sample ID แล้วกด Finish) แล้วกด Accept batch
7. เครื่องจะถามว่าต้องการทำ Background และ Peak tracking หรือไม่ต้องการกด Yes ทำเช่นนี้เรื่อยไป หากต้องการออกจากส่วนนี้กด Yes แล้วกดปุ่ม confirm
8. หน้าจอจะปรากฏหน้า Control Wells Screen จากนั้นจึงทำการใส่ background และ peak tracking ลงในตำแหน่งที่แสดงไว้บนหน้าจอ
9. เลือก Proceed เป็นการเลือกเพื่อเริ่มทำงาน

หมายเหตุ

หลังจากที่เครื่องทำงานแล้วหากใน Program สั่งให้ทำ Background และ Peak tracking เครื่องจะทำการ wash ก่อนแล้วจึงทำ Background จากนั้นเครื่องจะถามเราว่าจะ Accept background หรือไม่ หากยอมรับกด Accepted หากไม่ยอมรับกด Reject โดยการกด Accept เมื่อ background เป็นเส้นตรง สำหรับการ Reject background นั้นเกิดจากการที่มี peak แปลกปลอม หรือต้องการหยุดการทำ

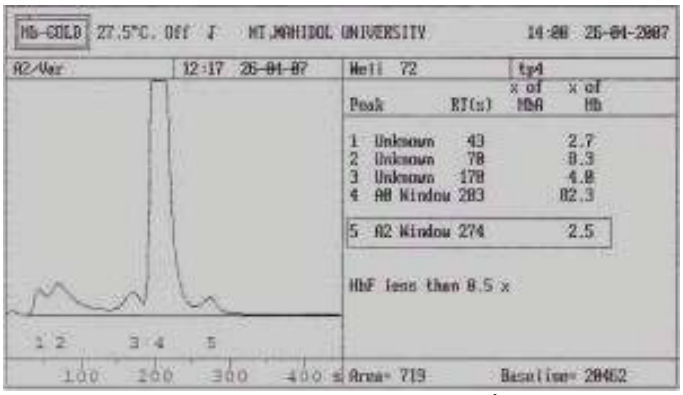
(interrupting a run) หาก Accept เครื่องจะทำ Peak tracking ต่อ แล้วว่าจะ Accept หรือไม่ Accept Peak tracking หลังจากนั้นเครื่องจะเริ่มทำ Sample ที่ได้ program ไว้ทันที

เงื่อนไขการยอมรับ Peak tracking

ทำ PT 2 ครั้งติดกัน RT ห่างกันไม่เกิน 10 sec (ตำแหน่ง peak ไม่เปลี่ยนแล้ว) ค่าโดยประมาณของ RT Ao อยู่ระหว่าง 210-230 Sec (โดยประมาณและการทำ PT หลังเปลี่ยน New column (New reagent) ควรทำอย่างน้อย 2-3 ครั้ง แน่ใจว่า RT ไม่เปลี่ยนแล้วจึง Accept PT

การขอดูผลที่ได้ทำมาแล้ว

1. จาก Main Menu กด more จนพบคำว่า Recalculate
2. กด Recalculate
3. เลือก First well ที่ต้องการดูผล และเลือก Last well ที่ต้องการดูผลโดยกดลูกศรตามต้องการ
4. กด Accept
5. เครื่องจะแสดง Chromatogram และข้อมูลทั้งหมดของตัวอย่างช่วงนั้นๆ หาก printer เปิด ON ทำการ print ผลบนเครื่อง print ให้โดยอัตโนมัติ



ภาพที่ 14 รูปแสดงลักษณะ chromatogram ของ Hemoglobin A_2 ที่ตรวจวิเคราะห์จากเครื่องอัตโนมัติ Hemoglobin Gold ในคนปกติ

ที่มา : บริษัท พีซีแอล โฮลดิ้ง จำกัด, “HbGold Key Operator Training: Thalassemia & Abnormal Hemoglobin,” เอกสารคู่มือการใช้งาน, 2549. (อัดสำเนา)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติSPSS software version 15.0 (SPSS Inc., Chicago III) คำนวณ ดังนี้

1. การวิเคราะห์การถดถอย ดูความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ อายุ และตัวแปรตามระดับ Hemoglobin levels ต่างๆ

2. วิเคราะห์ตัวแปรตามตัวใดที่มีความสัมพันธ์สูง ตัวใดมีความสัมพันธ์น้อยหรือไม่มีความสัมพันธ์

3. สร้างแบบจำลองเพื่อใช้ทำนายตัวแปรตามอายุ โดยรูปแบบจำลองดังกล่าวอยู่ในลักษณะสมการทางคณิตศาสตร์ โดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เป็นเส้นตรง พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เพื่อหาสมการถดถอยที่ดีที่สุด ที่สามารถพยากรณ์ค่าตัวแปรตามได้ใกล้เคียงที่สุด และมีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด

บทที่ 4
ผลการทดลอง

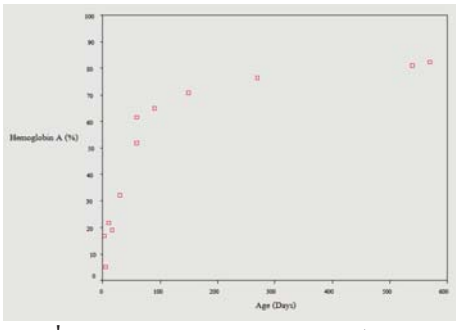
การวิเคราะห์

1. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (อายุ) และตัวแปรตาม (ปริมาณ Hemoglobin ชนิดต่างๆ) ถึงความสัมพันธ์กันหรือไม่ และมีความสัมพันธ์กันอย่างไร ตัวแปรอิสระที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม ตัวใดมีความสัมพันธ์สูง ตัวใดมีความสัมพันธ์น้อย หรือไม่มีความสัมพันธ์

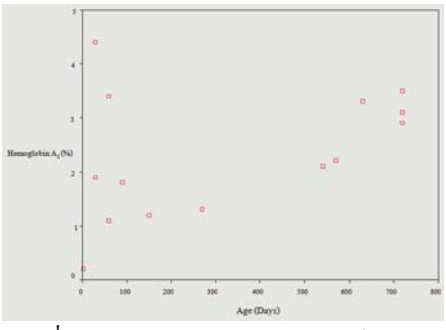
2. ต้องการสร้างแบบจำลองเพื่อใช้ทำนายตัวแปรตาม(อายุ) โดยรูปแบบจำลองดังกล่าวอยู่ในลักษณะสมการทางคณิตศาสตร์ โดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เป็นเส้นตรง พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เพื่อหาสมการถดถอยที่ดีที่สุด ที่สามารถพยากรณ์ค่าตัวแปรตามได้ใกล้เคียงที่สุด และมีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด

การตรวจสอบรูปแบบความสัมพันธ์ของตัวแปรเชิงปริมาณ 2 ตัว

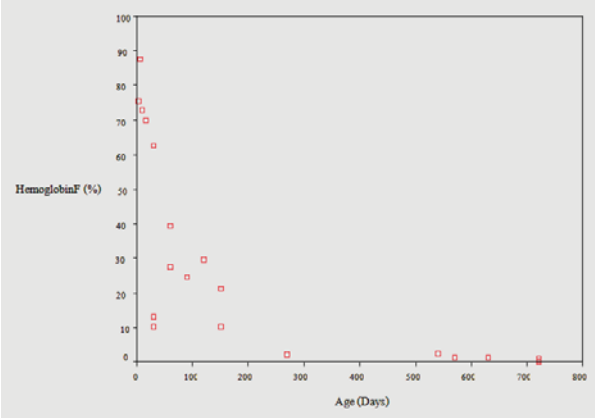
จากภาพกราฟที่ 14 พบความสัมพันธ์ในรูปเชิงเส้น และมีความสัมพันธ์เป็นบวก ระหว่างอายุและปริมาณของ Hemoglobin A คือ เมื่ออายุเพิ่ม ปริมาณของ Hemoglobin A ก็จะมีการเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาในภาพกราฟที่ 15 ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง อายุและปริมาณของ Hemoglobin A_2 กลับพบว่า ตัวแปรทั้งสอง ไม่มีความสัมพันธ์กัน และ ภาพกราฟที่ 16 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุและปริมาณของ Hemoglobin F พบว่า มีความสัมพันธ์ในรูปเชิงเส้น และมีความสัมพันธ์เป็นลบ คือ เมื่ออายุเพิ่ม ปริมาณของ Hemoglobin F จะมีปริมาณที่การลดลง



ภาพที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุและปริมาณ Hemoglobin A



ภาพที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุและปริมาณ Hemoglobin A_2



ภาพที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และปริมาณ Hemoglobin F

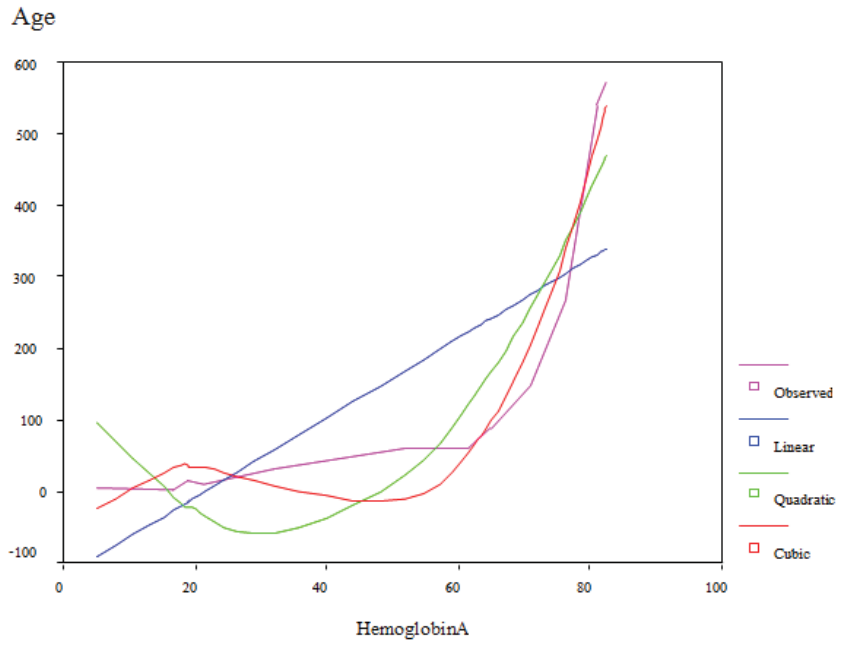
จากกราฟทั้ง 3 เมื่อพิจารณาหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัวแปร ด้วยการพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ ตัวแปรทั้ง 2 แล้วพบว่าอายุและปริมาณของ Hemoglobin A_2 ไม่พบความสัมพันธ์กันแต่ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และปริมาณ Hemoglobin F และความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และปริมาณ Hemoglobin A มีความสัมพันธ์กันโดยพบว่าความสัมพันธ์ไม่อยู่ในรูปเชิงเส้น อาจเป็น Quadratic, Cubic หรือรูปแบบอื่นๆ จึงต้องวิเคราะห์เพื่อหารูปแบบความสัมพันธ์ที่เหมาะสมต่อไป

เลือกตัวแบบที่เหมาะสมโดยใช้คำสั่ง Curve Estimation

การวิจัยนี้เน้นที่การศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียวที่คัดเลือกมาแล้ว ว่ามีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามสูงสุด โดยจะสร้างสมการพยากรณ์ในรูปแบบความสัมพันธ์ที่ไม่ใช่เส้นตรง (Non-Linear) ซึ่งจะทำให้การพยากรณ์มีความถูกต้องมากขึ้นจากการวิเคราะห์ข้างต้นพบว่าปริมาณ Hemoglobin A และ ปริมาณ Hemoglobin F เหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยคำสั่ง Curve Estimation เพื่อหา Model ที่เหมาะสมในการสร้างสมการพยากรณ์ พบว่า

วิเคราะห์ Hemoglobin A

1. วิเคราะห์ด้วยคำสั่ง Curve Estimation ของ Hemoglobin A



ภาพที่ 18 กราฟแสดงเส้นถดถอยของตัวแบบต่างๆ ระหว่าง Hemoglobin A และ อายุ

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง Hemoglobin A กับ AGE

Dependent	**Mth**	**Rsq**	**d.f.**	**F**	**Sigf**	**b0**	**b1**	**b2**	**b3**
AGE	LIN	0.591	10	14.44	0.003	-121.07	5.5835		
AGE	QUA	0.850	9	25.60	0.000	159.839	-13.490	0.2095	
AGE	CUB	0.958	8	60.38	0.000	-85.040	14.5263	-0.5393	0.0055

1.1 พบว่า Model Cubic เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้างสมการพยากรณ์จากตารางวิเคราะห์ทางสถิติ R^2(Rsq) ของ Cubic model คือ

AGE = $\beta_0 + \beta_1$Hemoglobin A + β_2Hemoglobin A^2 + β_3Hemoglobin A^3 มีค่า R^2 เป็น0.958 หรือ 95.8%

1.2 เมื่อพิจารณาจากค่า Sig. จะพบว่าทั้ง 3 Model น่าจะเหมาะสม แต่เมื่อพิจารณาค่า R^2จะพบว่า R^2 ของ Cubic model (0.958) มีค่าสูงกว่าค่า R^2 ของ Linear model (0.591)และ Quadratic model (0.850) เป็นอย่างมาก

1.3 ค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย

AGE = -85.040 + 14.5263 Hemoglobin A+(-0.5393) Hemoglobin A ^{2} + 0.0055 Hemoglobin A ^{3}

2. การตรวจสอบเงื่อนไขของการวิเคราะห์ความถดถอย

ขั้นตอนการตรวจสอบเงื่อนไขเกี่ยวกับค่าคลาดเคลื่อนจะเหมือนกับของการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นคือ

2.1 ค่าคลาดเคลื่อนต้องมีการแจกแจงแบบปกติ ด้วยค่าเฉลี่ยศูนย์ และมีค่าแปรปรวนเป็น σ^2

ตารางที่ 10 ตารางค่าคลาดเคลื่อน ของ Hemoglobin A(Tests of Normality)

	Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Statistic	**df**	**Sig.**
Error for AGE with HEMOGLOBINA from CURVEFIT, MOD_1 LINEAR	.158	12	.200*
Error for AGE with HEMOGLOBINA from CURVEFIT, MOD_1 QUADRATIC	.203	12	.187*
Error for AGE with HEMOGLOBINA from CURVEFIT, MOD_1 CUBIC	.113	12	.200*

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

จากตารางใช้ทดสอบค่าคลาดเคลื่อน (Error for AGE with HEMOGLOBINA) ของ Linear model,Quadratic modelและCubic model

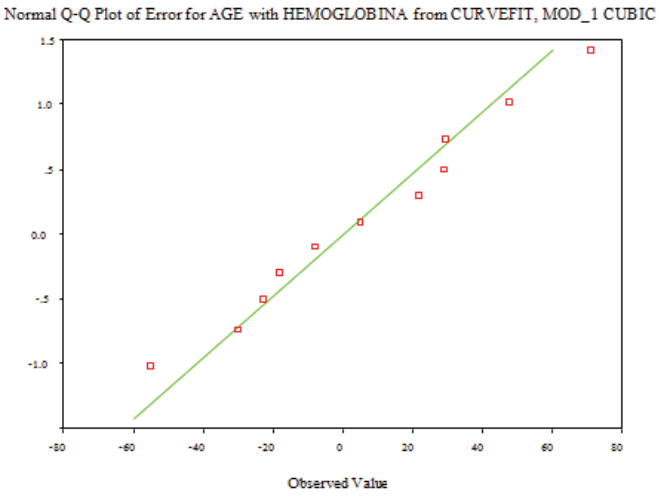
H_0: Err_i มีการแจกแจงแบบปกติ

H_1: Err_i ไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ

i = 1, 2, 3

สรุปจากตารางได้ว่าทั้ง 3 model มีการแจกแจงแบบปกติเนื่องจาก Sig. =0.2, 0.187 และ0.2 ตามลำดับซึ่งมากกว่า 0.05 จึงไม่สามารถปฏิเสธ H_0: Err_i มีการแจกแจงแบบปกติ และสอดคล้องกับ Normal Q-Q Plot ของ Cubic model ซึ่งค่าคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงแบบปกติ ค่าสังเกตุ (จุด) ต่างๆ

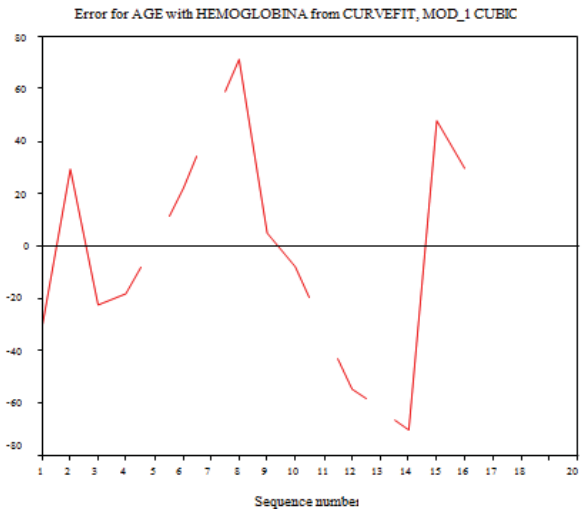
ต้องอยู่บนเส้นตรง จะพบว่า ในรูปด้านล่างจุดต่างๆ อยู่บนเส้นส่วนใหญ่ โดยข้อมูลกระจายตัวอยู่ใกล้เคียงกับเส้นตรง แสดงว่า ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ



ภาพที่ 19 กราฟ Normal Q-Q Plot ของ Cubic mode

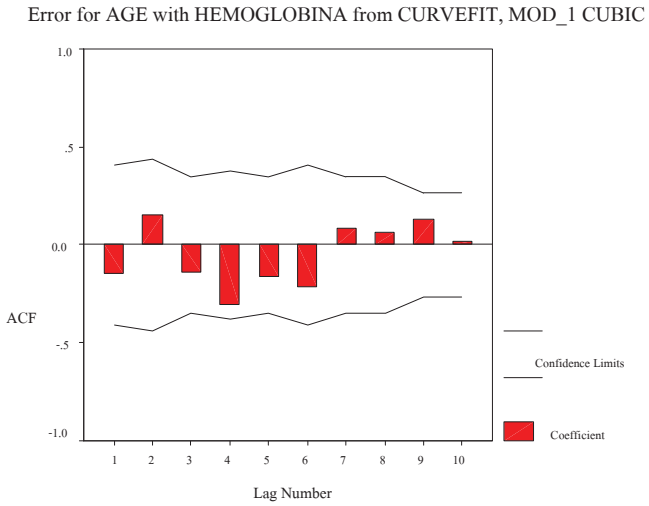
2.2 ค่าแปรปรวนคงที่

ใช้การตรวจสอบด้วยการพล็อตกราฟ จะพบว่า ในรูป ค่าคลาดเคลื่อนกระจายอยู่รอบๆ ค่าศูนย์ และค่าการกระจายไม่ค่อยคงที่คือ จะเปลี่ยนแปลงตามเวลา



ภาพที่ 20 กราฟ T- Plot ของ Cubic model

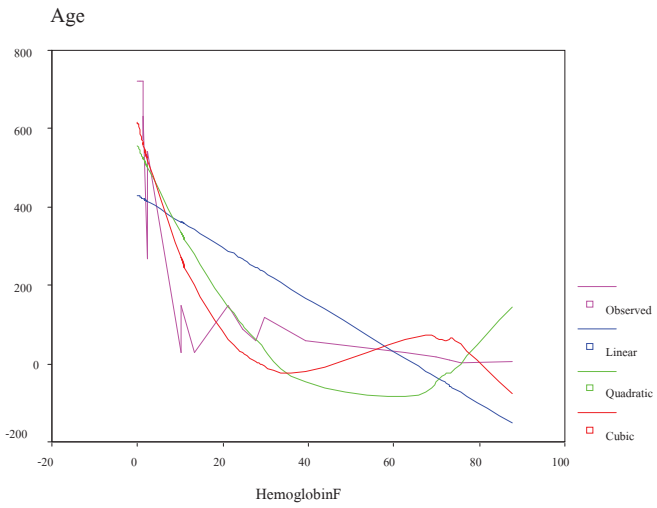
2.3 ค่าคลาดเคลื่อนเป็นอิสระกัน



ภาพที่ 21 กราฟแสดงค่าคลาดเคลื่อนเป็นอิสระกันของ Cubic model

วิเคราะห์ Hemoglobin F

1. วิเคราะห์ด้วยคำสั่ง Curve Estimation ของ HemoglobinF



ภาพที่ 22 แสดงเส้นถดถอยของตัวแบบต่างๆ ระหว่าง Hemoglobin F และ อายุ

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง Hemoglobin F กับ AGE

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1	b2	b3
AGE	LIN	0.494	18	17.59	0.001	430.261	-6.6544		
AGE	QUA	0.729	17	22.90	0.000	556.240	-24.010	0.2204	
AGE	CUB	0.818	16	24.04	0.000	615.795	-42.326	0.8881	-0.0057

1. พบว่า Model Cubic เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้างสมการพยากรณ์จากตารางวิเคราะห์ทางสถิติ R^2 (Rsq) ของ Cubic model คือ

ปริมาณ AGE = $\beta_0 + \beta_1$Hemoglobin F + β_2Hemoglobin F^2 + β_3Hemoglobin F^3 มีค่า R^2 เป็น 0.818หรือ 81.8%

2. เมื่อพิจารณาจากค่า Sig. จะพบว่าCubic model น่าจะเหมาะสมเมื่อพิจารณาค่า R^2 จะพบว่า R^2ของ Cubic model (0.818) มีค่าสูงกว่าค่า R^2 ของ Linear model (0.494)และ Quadraticmodel (0.729)

3. ค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย

AGE = 615.795 + (-42.326)HemoglobinF +(0.8881)Hemoglobin F^2 + (-0.0057)Hemoglobin F^3

2. การตรวจสอบเงื่อนไขของการวิเคราะห์ความถดถอย

ขั้นตอนการตรวจสอบเงื่อนไขเกี่ยวกับค่าคลาดเคลื่อนจะเหมือนกับของการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นคือ

2.1 ค่าคลาดเคลื่อนต้องมีการแจกแจงแบบปกติ ด้วยค่าเฉลี่ยศูนย์ และมีค่าแปรปรวนเป็น σ^2

ตารางที่ 12 ค่าคลาดเคลื่อน ของ Hemoglobin F (Tests of Normality)

	Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Statistic	df	Sig.
Error for AGE with HEMOGLOBINF from CURVEFIT, MOD_1 LINEAR	.156	20	.200*
Error for AGE with HEMOGLOBINF from CURVEFIT, MOD_1 QUADRATIC	.222	20	.011
Error for AGE with HEMOGLOBINF from CURVEFIT, MOD_1 CUBIC	.174	20	.115

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

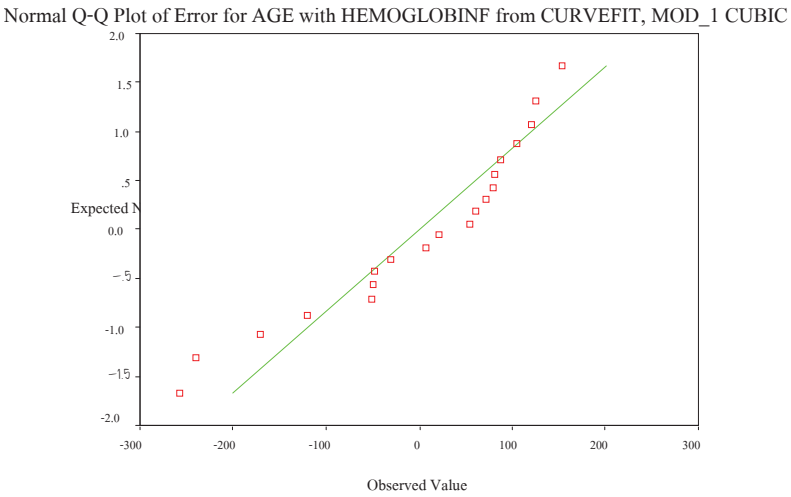
จากตารางใช้ทดสอบค่าคลาดเคลื่อน (Error for AGE with HEMOGLOBINA) ของ Linear model,Quadratic model และ Cubic model

H_0: Err_i มีการแจกแจงแบบปกติ

H_1: Err_i ไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ

i = 1, 2, 3

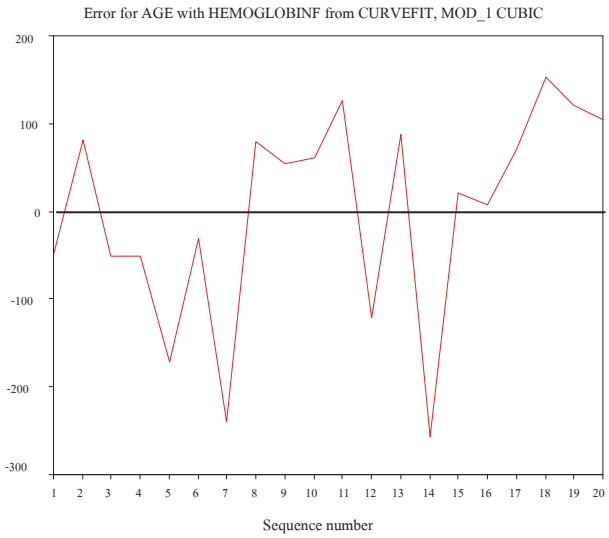
สรุปจากตารางได้ว่า Cubic model มีการแจกแจงแบบปกติเนื่องจาก Sig. = .115 ซึ่งมากกว่า 0.05 จึงไม่สามารถปฏิเสธ H_0: Err_i มีการแจกแจงแบบปกติ และสอดคล้องกับ Normal Q-Q Plot ของ Cubic model ซึ่งค่าคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงแบบปกติ ค่าสังเกตุ (จุด) ต่างๆ ต้องอยู่บนเส้นตรง จะพบว่า ในรูปด้านล่างจุดต่างๆ อยู่บนเส้นส่วนใหญ่โดยข้อมูลกระจายตัวอยู่ใกล้เคียงกับเส้นตรง แสดงว่า ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ



ภาพที่ 23 กราฟ Normal Q-Q Plot ของ Cubicmodel

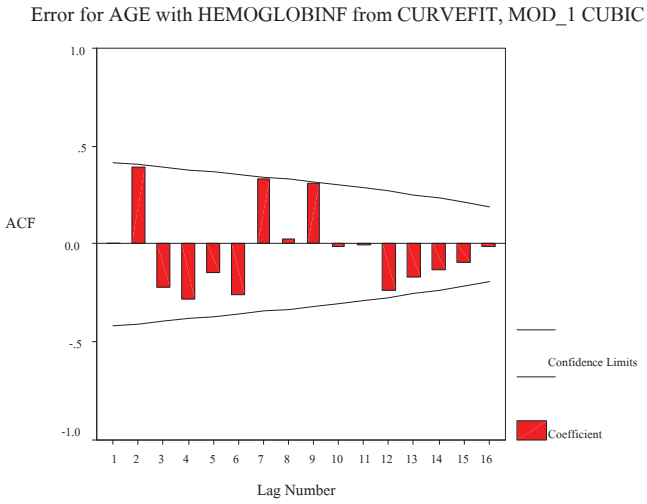
2.2 ค่าแปรปรวนคงที่

ใช้การตรวจสอบด้วยการพล็อตกราฟ จะพบว่า ในรูป ค่าคลาดเคลื่อนกระจายอยู่รอบๆ ค่าศูนย์ และค่าการกระจายไม่ค่อยคงที่คือ จะเปลี่ยนแปลงตามเวลา

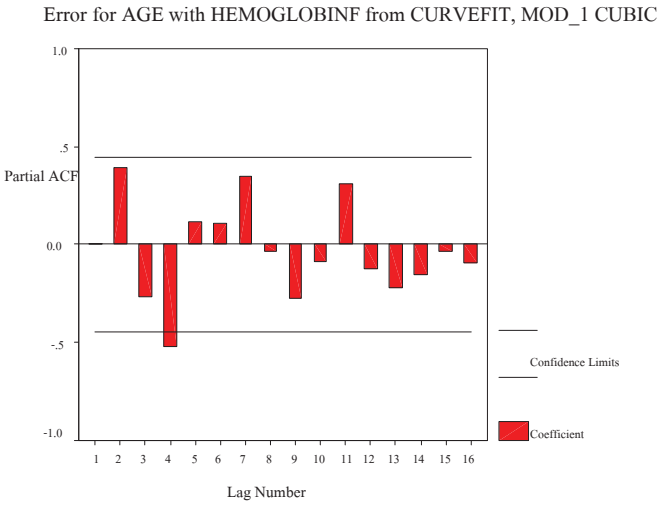


ภาพที่ 24 กราฟ T- Plot ของ Cubic model

2.3 ค่าคลาดเคลื่อนเป็นอิสระกัน



ภาพที่ 25 กราฟแสดงค่าคลาดเคลื่อนเป็นอิสระกันของ Cubic model



ภาพที่ 26 กราฟแสดงค่าคลาดเคลื่อนเป็นอิสระกันของ Cubic model

3. การทดสอบสมการพยากรณ์ที่ได้จากการวิเคราะห์

นำตัวอย่างเลือดของเด็กที่ทราบอายุ และไม่เป็นโรคที่เกี่ยวกับเลือด มาวัดปริมาณ Hemoglobin A และ F และแทนค่าในสมการพยากรณ์ที่ได้ จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น ระหว่างสมการพยากรณ์ที่ใช้กับอายุเด็กที่แท้จริงว่ามีความแตกต่างกันมากเพียงใด

สมการพยากรณ์ของ HemoglobinA คือ

$$AGE = -85.040 + 14.5263\text{Hemoglobin A} + (-0.5393)\text{Hemoglobin A}^2 + 0.0055\text{Hemoglobin A}^3$$

สมการพยากรณ์ของ HemoglobinF คือ

$$AGE = 615.795 + (-42.326)\ \text{HemoglobinF} + (0.8881)\text{Hemoglobin F}^2 + (-0.0057)\text{Hemoglobin F}^3$$

ตารางที่ 13 การทดสอบสมการพยากรณ์ที่ได้จากการวิเคราะห์

ตัวอย่างที่	อายุจริง (วัน)	HemoglobinA		HemoglobinF	
		อายุจากการพยากรณ์(วัน)	ความแตกต่าง (วัน)	อายุจากการพยากรณ์(วัน)	ความแตกต่าง(วัน)
1	3	32.869	29.869	29.4714375	26.4714375
2	5	-24.253	19.253	-108.5581872	103.5581872
3	10	32.540	22.540	42.0284976	32.0284976
4	16	33.994	17.994	49.7401167	33.7401167
5	30	-	-	200.9171223	170.9171223
6	30	7.473	22.527	48.3297159	18.3297159
7	30	-	-	270.4188384	240.4188384
8	60	-15.484	44.516	-21.9364359	38.0635641
9	60	47.906	12.094	4.9134375	55.0865625
10	90	89.657	0.343	28.0651125	61.9348875
11	120	-	-	-7.2320871	112.7679129
12	150	194.121	44.121	270.4188384	120.4188384
13	150	-	-	62.0907861	87.9092139
14	270	326.751	56.751	526.9155104	256.9155104
15	540	476.169	63.831	519.2492592	20.7507408
16	570	523.569	46.431	562.2595661	7.7404339
17	630	-	-	558.2636352	71.7363648
18	720	-	-	566.2728144	153.7271856
19	720	-	-	599.0063312	120.9936688
20	720	-	-	-	-

วิเคราะห์ผลด้วย Multiple Regression Analysis

ตารางที่ 14 แสดงรายชื่อตัวแปรอิสระที่เข้าไปอยู่ในตัวแบบ

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	HemoglobinA, Hemoglobin F[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: Age

จากตารางที่ 14 แสดงรายชื่อตัวแปรอิสระที่เข้าไปอยู่ในตัวแบบ คือ ตัวแปรHemoglobin A และ Hemoglobin F โดยระบุวิธีที่ใช้ในการใส่ตัวแปรเข้าไปในตัวแบบ คือ ENTER เป็นการใส่ตัวแปรเข้าไปพร้อมๆ กัน ทุกตัวแปร

ตารางที่ 15 แสดงค่าสถิติที่ใช้ในการพิจารณาความเหมาะสมของสมการถดถอย

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	0.781[a]	0.609	0.523	140.89101

a. Predictors: (Constant), HemoglobinA, Hemoglobin F

จากตารางที่ 15 แสดงค่าสถิติที่ใช้ในการพิจารณาความเหมาะสมของสมการถดถอยโดยประกอบด้วยค่า R = 0.781 คือค่าที่แสดงถึงระดับของความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวแปรอิสระทั้งหมด คือ Hemoglobin F และHemoglobin A กับตัวแปรตาม Age ซึ่งเรียกว่าค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์พหุคูณ (Multiple Correlation)โดยค่าที่ได้ถ้าเข้าใกล้ 1 มากแสดงว่ามีความสัมพันธ์สูงมาก

ต่อมาพิจารณาค่า R Square คือค่าที่แสดงถึงอิทธิพลของตัวแปรอิสระทั้งหมดที่มีต่อตัวแปรตาม จากค่า R Square = 0.609 แสดงว่าตัวแปรอิสระทั้งหมด (Hemoglobin F และHemoglobin A) มีอิทธิพลต่อตัวแปรตามที่เป็นอายุถึง 60.9 % ส่วนอีก 39.1 % จะเป็นอิทธิพลจากตัวแปรอื่นที่ไม่ได้อยู่ในตัวแบบ หรืออาจกล่าวได้ว่าตัวแปรอิสระทั้งหมดสามารถทำนายอายุได้ถึง 60.9 % จำนวนข้อมูลของแต่ละประเภทที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 16 ANOVA ที่ใช้ในการตรวจสอบว่าตัวแปรอิสระที่มีอยู่ในตัวแบบ

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	278636.168	2	139318.084	7.018	0.015[a]
	Residual	178652.499	9	19850.278		
	Total	457288.667	11			

a. Predictors: (Constant), HemoglobinA, Hemoglobin F

b. Dependent Variable: Age

จากตารางที่ 16 ตารางANOVA ที่ใช้ในการตรวจสอบว่าตัวแปรอิสระที่มีอยู่ในตัวแบบสามารถใช้ได้ทุกตัวแปรหรือไม่ภายใต้สมมติฐานทางสถิติ ดังนี้

H_o : ตัวแปรอิสระทุกตัว ไม่สามารถใช้พยากรณ์ได้

H_1 : ตัวแปรอิสระบางตัว สามารถใช้พยากรณ์ได้

เนื่องจากค่าความน่าจะเป็น Sig. ที่โปรแกรมคำนวณมาให้คือ 0.015 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า ค่า α ที่ผู้ทดสอบกำหนด คือ 0.05 ดังนั้นจึงตัดสินใจ ปฏิเสธสมมติฐาน H_o และสรุปได้ผลว่า ตัวแปรอิสระในตัวแบบบางตัวสามารถใช้พยากรณ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 17 แสดง ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	696.453	1256.387		0.554	0.593
	Hemoglobin F	-8.543	13.099	-1.363	-0.652	0.531
	Hemoglobin A	-4.265	15.178	-0.587	-0.281	0.785

a. Dependent Variable: Age

จากตารางที่ 17 แสดง ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ของตัวแปรอิสระแต่ละตัวที่มีอยู่ในตัวแบบ และค่าสถิติ t ที่ใช้ทดสอบว่าตัวแปรใดบ้างที่สามารถใช้พยากรณ์ได้ โดยการพิจารณาจะพิจารณาค่าต่างๆ ตามลำดับ ต่อไปนี้

ค่าสถิติ t หรือ ค่าความน่าจะเป็น Sig. เพื่อทดสอบว่าตัวแปรอิสระตัวใดบ้างที่ควรอยู่ในตัวแบบนี้ หรือสามารถใช้พยากรณ์ได้ภายใต้สมมติฐานทางสถิติ ดังนี้

H_0 : ตัวแปรอิสระตัวที่ i ไม่สามารถใช้พยากรณ์ได้

H_1 : ตัวแปรอิสระตัวที่ i สามารถใช้พยากรณ์ได้

โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ (α) = 0.05 เนื่องจากค่าความน่าจะเป็น Sig. ที่โปรแกรมคำนวณมาให้สำหรับตัวแปรอิสระ Hemoglobin A และ Hemoglobin F คือ 0.785 และ 0.531 มีค่ามากกว่า ค่า α ที่กำหนดไว้ ดังนั้นจึงตัดสินใจ ปฏิเสธสมมมติฐาน H_0 : ตัวแปรอิสระHemoglobin A และ Hemoglobin F ไม่สามารถใช้พยากรณ์ได้ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าสัมประสิทธิการถดถอยของตัวแปรอิสระแต่ละตัวเพื่อนำมาสร้างสมการพยากรณ์ซึ่งสามารถสร้างได้ 2 รูปแบบจากค่าที่โปรแกรมคำนวณมาให้ดังนี้ คือ

ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระในรูปคะแนนดิบหรือค่าจริง

อายุ = 696.453 - 8.543Hemoglobin F - 4.265Hemoglobin A

ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระในรูปคะแนนมาตรฐาน

อายุ = -0.587Hemoglobin A–1.363Hemoglobin F

ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยในรูปคะแนนมาตรฐาน หรือค่าของ Beta นี้ยังแสดงถึงน้ำหนักของความสำคัญหรืออิทธิพลของตัวแปรอิสระแต่ละตัวที่มีต่อตัวแปรตาม กล่าวคือ ถ้าค่า Beta ของตัวแปรอิสระใดมีค่าสูง (ไม่คิดเครื่องหมาย) แสดงว่าตัวแปรอิสระนั้นจะมีอิทธิพลต่อตัวแปรตามมาก จากค่าที่ได้จากโปรแกรม Beta ของ Hemoglobin F= 1.363 และ Beta ของ Hemoglobin A= 0.587 สรุปได้ว่าปริมาณ Hemoglobin F มีอิทธิพล ต่อ ตัวแปรอายุ มากกว่าปริมาณ Hemoglobin A

วิเคราะห์ผลด้วย Multiple Regression Analysis

วิธี StepwiseRegression

ตารางที่ 18 แสดงผลสรุปของการคัดเลือกตัวแปรอิสระ

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Hemoglobin F	.	Stepwise (Criteria: Probability-of-F-to-enter <= .050, Probability-of-F-to-remove >= .100).

a Dependent Variable: Age

จากตารางที่ 18 แสดงผลสรุปของการคัดเลือกตัวแปรอิสระเข้าไปในตัวแบบของสมการ จากตารางแสดงว่าตัวแบบที่เหมาะสมจะมีตัวแปรอิสระเพียง 1 ตัว คือ ตัวแปร Hemoglobin F การดำเนินการตามวิธีของ StepwiseRegression จะใช้เกณฑ์ระดับนัยสำคัญที่แตกต่างกัน 2 เกณฑ์ ดังนี้คือ

สำหรับการคัดเลือกตัวแปรเข้าไปในตัวแบบจะใช้ระดับนัยสำคัญ 0.05

สำหรับการคัดเลือกตัวแปรออกจากในตัวแบบจะใช้ระดับนัยสำคัญ 0.10

ตารางที่ 19 แสดงค่าทางสถิติ

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.778(a)	.606	.566	134.24611

a Predictors: (Constant), Hemoglobin F

จากตารางที่ 19 ตัวแปรอิสระ Hemoglobin F ถูกคัดเลือกเข้าไปในตัวแบบ สามารถสรุปได้ว่า ตัวแปรอิสระHemoglobin F มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม อายุ ประมาณ 56.6 % โดยจะมีความคลาดเคลื่อนหรือผิดพลาดประมาณ 43.4 %

ตารางที่ 20 การตรวจสอบตัวแปรอิสระ ใน Model

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	277068.486	1	277068.486	15.374	.003(a)
	Residual	180220.180	10	18022.018		
	Total	457288.667	11			

a Predictors: (Constant), Hemoglobin F

b Dependent Variable: Age

เป็นส่วนที่แสดงค่าสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบว่า ตัวแปรอิสระที่อยู่ใน Model สามารถอยู่ใน Model นั้นๆ ได้หรือไม่ด้วยการทดสอบของ F-test โดยพิจารณาจากผลลัพธ์ที่ค่า Sig. ภายใต้สมมติฐานทางสถิติ ดังนี้

H_o : ตัวแปรอิสระใน Model ที่พิจารณาไม่สามารถใช้พยากรณ์ได้

H_1 : ตัวแปรอิสระใน Model ที่พิจารณาสามารถใช้พยากรณ์ได้

ผลการทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าความน่าจะเป็นของ Model คือ 0.003 ดังนั้น ตัวแปรอิสระ สามารถใช้พยากรณ์ได้

ตารางที่ 21 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ของตัวแปรอิสระ

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	343.861	62.753		5.480	.000
	Hemoglobin F	-4.880	1.245	-.778	-3.921	.003

a Dependent Variable: Age

จากตารางที่ 21 เป็นส่วนที่ แสดง ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระที่มีอยู่ในตัวแบบ และค่าสถิติ t พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Sig. ที่ใช้ทดสอบว่าตัวแปรสามารถใช้พยากรณ์ได้โดยจะแสดงใน Model ภายใต้สมมุติฐาน ดังนี้

H_o : ตัวแปรอิสระ Hemoglobin Fไม่สามารถใช้พยากรณ์ใน Model ได้

H_1 : ตัวแปรอิสระ Hemoglobin F สามารถใช้พยากรณ์ใน Model ได้

โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ คือ 0.05 จากตาราง พบว่าค่า Sig. ที่ได้คือ 0.003 สรุป ตัวแปรอิสระ Hemoglobin F สามารถใช้พยากรณ์ใน Model ได้

ตารางที่ 22 ตารางตรวจสอบตัวแปรอิสระที่ไม่ได้อยู่ในสมการ

Model		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics
						Tolerance
1	Hemoglobin A	-0.587(a)	-0.281	0.785	-0.093	0.010

a Predictors in the Model: (Constant), Hemoglobin F

b Dependent Variable: Age

เป็นส่วนที่แสดง ค่าสถิติต่างๆ ที่ใช้สำหรับตรวจสอบตัวแปรอิสระที่ไม่ได้ถูกคัดเลือกเข้าไปในสมการในแต่ละขั้นตอน

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ทำการวัดปริมาณของ Hemoglobin A, Hemoglobin F และ Hemoglobin A_2ด้วยเครื่อง low pressure liquid chromatography (LPLC) โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุของเด็กกับปริมาณของ Hemoglobin พบว่า เพื่อพิจารณาจากกราฟขั้นต้น Hemoglobin A_2ไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ ซึ่งตรงกันข้ามกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ Hemoglobin A และ Hemoglobin F คือHemoglobin A มีความสัมพันธ์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดย Cubic Model เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้างสมการพยากรณ์ โดยมีค่า R^2เท่ากับ 95.8% หรือ 0.958 มีค่าสูงกว่าค่า R^2 ของ Linear model (0.591) และ Quadratic model (0.850) เป็นอย่างมากทำให้เหมาะสมในการนำมาสร้างสมการค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย AGE = -85.040 + 14.5263Hb A +(-0.5393) Hb A^2 + 0.0055Hb A^3 ส่วนในกรณีของ Hemoglobin F นั้น พบว่า Cubic Model เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้างสมการพยากรณ์เช่นเดียวกันโดยจากตารางวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า R^2 (Rsq) ของ Cubic model มีค่าสูงกว่าค่า R^2 ของ Linear model (0.494) และ Quadratic model (0.729) จึงเหมาะสมในการสร้างสมการค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย AGE = 615.795 + (-42.326)Hb F +(0.8881)Hb F^2 + (-0.0057)Hb F^3 โดยลักษณะของกราฟความสัมพันธ์ที่ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของชาล์ล ดี คุ๊ก และคณะ (Cook 1957 : 272-278) ที่ศึกษาปริมาณการเปลี่ยนแปลงของ Hemoglobin F ในทารกปกติ ช่วงอายุ 25 - 44 สัปดาห์ ซึ่งพบว่า ความสัมพันธ์ของ Hemoglobin F กับช่วงเวลา จะมีการลดลงของปริมาณ Hemoglobin F เมื่อเวลาผ่านไปแต่จากการศึกษาดังกล่าวนั้นไม่ได้วิเคราะห์ Hemoglobin A จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับได้ และจากการศึกษายังพบว่าเพื่อเด็กมีอายุมากขึ้นร่างกายจะลดการสร้าง Hemoglobin F จนเหลือ น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผกผัน กับปริมาณ Hemoglobin A ที่เพิ่มปริมาณขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Schechter 2008 : 3927-3938) ที่พบว่าระดับ globin ชนิดต่างๆ และระยะเวลาจะมีความสัมพันธ์กันโดยพบว่า เด็กในระยะตัวอ่อนและหลังคลอดจะมีการผลิต ζ-globin และ ε-globin ในช่วงเวลาสั้น α-globin, γ-globin และ β-globin จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโดย α-globin จะมีการเพิ่มปริมาณและคงที่ตลอดชีวิต แต่ γ-globin จะมีการสร้างมากขึ้นและคงที่จากนั้นจะลดปริมาณลงจนเหลือประมาณ 1 % โดยระดับ α-globin และ γ-globin จะเพิ่มปริมาณสูงขึ้นในขณะที่ระดับของ β-globin ต่ำทำให้เด็กในครรภ์และหลังคลอดใหม่ ๆมี Hb typing เป็น HbF (α_2, γ_2) เป็นส่วนใหญ่ประมาณ 80% และมี Hb A

(α_2, β_2) เป็นส่วนน้อยประมาณ 10 % (Forget BG. 1998 : 38-44) โดยชนิดและปริมาณของสาย globin ที่สร้างขึ้นนั้นจะขึ้นอยู่กับอายุของตัวอ่อนจนกระทั่งคลอด ทำให้ระดับของ Hemoglobin ในเด็กเล็กยังไม่แน่นอน ซึ่งเมื่ออายุครรภ์มากขึ้นเป็นระดับของ γ-globin จะลดลงในขณะที่ระดับของ β-globin จะเพิ่มสูงขึ้น และจะขึ้นสูงสุดที่ประมาณ 24 สัปดาห์หลังคลอด ในขณะเดียวกัน δ-globin ก็จะเริ่มสร้างขึ้นหลังคลอดเช่นกัน แต่ในปริมาณไม่มากนักทำให้ตรวจพบ Hb typing ในคนปกติเป็น A_2A โดยมี % HbA (α_2, β_2) ประมาณ 80 – 99% Hb A_2 ประมาณ 2-3.5% และ HbF (α_2, γ_2) <1.5% (Wimberly 1993 : 127–130)

ในการวิจัยพบว่าช่วงที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการพยากรณ์ คือช่วงอายุแรกเกิดจนถึง 2 ปี เนื่องจาก งานวิจัยของ (V. H. Talib el at. 1974 : 304-308) แสดงให้เห็นว่า ช่วงแรกเกิดจนถึง 12 ปี นั้นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของ Hemoglobin F กับอายุมากที่สุด และหาความสัมพันธ์ได้คือช่วง แรกเกิดจนถึง 2 ปี โดยงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Khurana and Agarwal. 1969 : 432-435) เช่นเดียวกัน โดย Khurana and Agarwal. ศึกษาในช่วงอายุแรกเกิดจนถึง 2 ปี โดย พบว่า ความสัมพันธ์ของ Hemoglobin F กับช่วงเวลา จะมีการลดลงของปริมาณ Hemoglobin F เมื่อเวลาผ่านไป

ในการวิเคราะห์ขั้นต้นเป็นการวิเคราะห์ด้วย วิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นในลักษณะที่ไม่เป็นเส้นตรง ระหว่างตัวแปรต้นและตัวแปรตามเพื่อหาสมการที่เหมาะสม ระหว่าง ปริมาณ Hemoglobin กับ อายุ หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย Multiple Regression Analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ตัวแปรอิสระ 2 ตัวคือ Hemoglobin A และ Hemoglobin F พบว่า ค่า R = 0.781 คือค่าที่แสดงถึงระดับของความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวแปรอิสระทั้งหมด คือ Hemoglobin F และ Hemoglobin A กับตัวแปรตาม Age มีความสัมพันธ์กัน และค่า R Square = 0.609 แสดงว่าตัวแปรอิสระทั้งหมด (Hemoglobin F และ Hemoglobin A) มีอิทธิพลต่อตัวแปรตามที่เป็นอายุถึง 60.9 % ส่วนอีก 39.1 % จะเป็นอิทธิพลจากตัวแปรอื่นที่ไม่ได้อยู่ในตัวแบบ

พิจารณาค่าความน่าจะเป็น Sig. คือ 0.015 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงตัดสินใจปฏิเสธสมมติฐาน H_0 และสรุปได้ผลว่า ตัวแปรอิสระในตัวแบบบางตัวสามารถใช้พยากรณ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ค่าน้ำหนักของความสำคัญหรืออิทธิพลของตัวแปรอิสระแต่ละตัวที่มีต่อตัวแปรตามของ Hemoglobin F = 1.363 และ Beta ของ Hemoglobin A = 0.587 สรุปได้ว่าปริมาณ Hemoglobin F มีอิทธิพล ต่อ ตัวแปรอายุ มากกว่าปริมาณ Hemoglobin A

สุดท้ายวิเคราะห์ผลด้วย Multiple Regression Analysis วิธี Stepwise Regression เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือของการนำ Hemoglobin F มาใช้ในการวิเคราะห์คือ พบว่า ผลสรุปของการคัดเลือกตัว

แปรอิสระเข้าไปในตัวแบบของสมการ จากตารางแสดงว่าตัวแบบที่เหมาะสมจะมีตัวแปรอิสระเพียง 1 ตัว คือ ตัวแปร Hemoglobin F โดย ตัวแปรอิสระ Hemoglobin F ถูกคัดเลือกเข้าไปในตัวมีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม อายุ ประมาณ 56.6 % โดยจะมีความคลาดเคลื่อนหรือผิดพลาดประมาณ 43.4 % และทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าความน่าจะเป็นของ Model คือ 0.003 ดังนั้น ตัวแปรอิสระ สามารถใช้พยากรณ์ได้

การอภิปรายผล

Hemoglobin A มีความสัมพันธ์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แบบ Cubic Modelสมการค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย คือ

$$AGE = -85.040 + 14.5263 \text{ Hemoglobin A} + (-0.5393) \text{ Hemoglobin A}^2 + 0.0055 \text{ Hemoglobin A}^3$$

และ Hemoglobin F นั้น พบว่า Cubic Model เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้างสมการพยากรณ์ค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย คือ

$$AGE = 615.795 + (-42.326) \text{ HemoglobinF} + (0.8881) \text{ Hemoglobin F}^2 + (-0.0057) \text{Hemoglobin F}^3$$

จากสมการที่ได้ขั้นต้น ได้นำมาทดสอบสมการพยากรณ์ด้วยวิธีการแทนค่าลงไปในสมการ พบว่าสมการพยากรณ์ของ HemoglobinA เมื่อเปรียบเทียบกับอายุที่แท้จริงมีความแตกต่าง เท่ากับ 18, 12 และ 1 วันตามลำดับ ส่วนสมการพยากรณ์ของ Hemoglobin F เมื่อเปรียบเทียบกับอายุที่แท้จริงมีความแตกต่าง เท่ากับ 18, 21 และ 8 วันตามลำดับ และวิเคราะห์ผลด้วย Multiple Regression Analysis วิธี Stepwise Regression เพื่อยืนยัน ความน่าเชื่อถือของการนำ Hemoglobin F มาใช้ในการวิเคราะห์คือ พบว่า ตัวแบบที่เหมาะสมจะมีตัวแปรอิสระเพียง 1 ตัว คือ ตัวแปร Hemoglobin F จะพบว่ามีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้น โดยอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้มีน้อยเกินไปทำให้ค่าพยากรณ์มีความน่าเชื่อถือน้อยหรืออาจเป็นน้ำหนักการเลี้ยงดูและสารอาหารที่ได้รับและพัฒนาการของเด็กอาจมีผลต่อความคลาดเคลื่อนของการวิจัยนี้ ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรจะต้องมีการเพิ่มปริมาณของตัวอย่าง เพื่อให้สมการพยากรณ์มีความน่าเชื่อถือและลดความคลาดเคลื่อนที่เกิด รวมไปถึงควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ เพิ่มเติมที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮีโมโกลบินในเลือดของเด็ก ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของสมการพยากรณ์

นอกจากข้อมูลอายุและฮีโมโกลบินจะใช้เพื่อสร้างสมการพยากรณ์อายุเด็กแล้ว ข้อมูลดังกล่าวยังมีประโยชน์ในการเป็นฐานข้อมูลการเจริญเติบโตของเด็กไทย

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กระทรวงพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์. รายงานกระทรวงพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์. [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 24 เมษายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.m-society .go. th/index.php

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและ Hemoglobin ผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร : บริษัทหมัดเด็ดจำกัด, 2553.

จินตนา ศิรินาวิน และคณะ ความรู้พื้นฐานธาลัสซีเมียเพื่อการป้องกันและควบคุมโรค. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน, 2547.

ทัศน์ยานี จันทนยิ่งยง. เลือดและธนาคารเลือดในประเทศไทย สารานุกรมไทยฉบับราชบัณฑิตยสถาน. เล่ม 8. กรุงเทพมหานคร : ราชบัณฑิตยสถาน, 2539.

ธาดา สืบหลินวงศ์ และ นวลทิพย์ กมลวารินทร์. ชีวเคมีทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.

ตะโก. เด็กถูกทอดทิ้ง [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 1 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.oknation.net/ blog/print.php?id=547936)

บริษัท พีซีแอล โฮลดิ้ง จำกัด. “HbGold Key Operator Training: Thalassemia & Abnormal Hemoglobin.” เอกสารคู่มือการใช้งาน, 2549. (อัดสำเนา)

บุญเชียร ปานเสถียรกุล. ธาลัสซีเมียและการให้คำปรึกษาแนะนำ. กรุงเทพมหานคร :โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว, 2546.

พรเทพ เทียนสิวากุล และคณะ. โลหิตวิทยาคลินิก. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.

พิชัย นิลทองคำ. ประมวลกฎหมายแพ่งและพาณิชย์ บรรพ 1-6 อาญา ข้อสัญญาที่ไม่เป็นธรรม. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์อฑตยา มิเล็นเนียม, 2550.

พัฒนา เหล่าไพบูลย์. โครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง : หลักการและการประยุกต์ใช้. ขอนแก่น : ขอนแก่นการพิมพ์, 2547.

ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา, พงษ์ จันทร์ หัตถีรัตน์ และ พิมล เชี่ยวศิลป์. โลหิตวิทยาในเด็ก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์, 2530.

สรรเสริญ ทรัพยโตษก และคณะ. ตำราปฏิบัติการชีวเคมีเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

สุทัศน์ ฟู่เจริญ และ ปราณี ฟู่เจริญ. ตำราโลหิตวิทยา การวินิจฉัย และการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ทีพี พริ้นท์, 2537.

อติเวทย์ เศวตะดุล, เกษร บุญยรักษ์โยธิน และ ยินดี น้ำเพชร. “Hemoglobin ผิดปกติที่พบในจังหวัดตรัง พัทลุง และ กระบี่ ปี 2546 – 2548.” Journal of Health Science 16 (2550) : 618-625.

อภิเชษฐ ปานจรัตน์. เด็กถูกทอดทิ้ง [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 1 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.gotoknow.org/blog/apichet16/277045

ภาษาอังกฤษ

Bard, H et al. “TheRelative Rates of synthesis of hemoglobins A and F inimmature red cells of newborn infants.” Pediatrics 45 (1970) : 766-772.

Bunn, H.F., Bernard G. Forget, and Helen M. Ranney. Human hemoglobins. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1977.

Cook, D., H. R. Brodie, and David W. Allen, Allen, “Measurement of fetal hemoglobin in newborn infants: Correlation with Gestational Age and Intrauterine Hypoxia.” Pediatrics 20 (1957) : 272-278.

Fluckiger, R. “GlycatedHaemoglobins.” J Chromatog 428 (1988) : 279-292.

Forget, BG. “Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin.”Ann NY Acad Sci. 850 (1998) :38-44.

Khurana, V., and Kailash Nath Agarwal, “Alkali resistant hemoglobin-F levels during O-5 years of life innormal Indian children.” Indian journal of pediatrics 36 (1969) : 432-435.

Chalaow, N. Thalassemia Blog [Online]. Accessed 1 September 2011. Available from http://nchalaow.wordpress.com/my-paper/

Perutz, MF. X-Ray Analysis of Haemoglobin. Stockholm: Les Prix Nobel, 1963.

Schechter, N. “Hemoglobin research and the origins of molecular medicine.” The American Society of Hematology 112 (2008) : 3927-3938.

Singer, K. et al. "Studies on abnormal hemoglobins I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation." Blood 6 (1951) : 413-428.

Talib, V. H. et al. "Alkali resistant haemoglobin F level from birth to 12 years." Indian journal of pediatrics 41 (1974) : 304-308.

Wimberly, PD. "Oxygen monitoring in the newborn." Scand J Clin Lab Invest 54 (1993) : 127–130.

Wintrobe, MM. Clinical hematology. 8th ed. Philadelphia : Leaand Febiger, 1981.

Zipursky, A et al. "The distribution of fetal hemoglobin in the blood of normal children and adults." Pediatrics 30 (1962) : 262-268.

ภาคผนวก

ข้อควรระวัง(Operating Precautions)

1. เครื่องHemoglobin Gold analyser ถูกออกแบบมาเพื่อใช้กับไฟบ้านแบบ A.C. สำหรับโปรแกรมซอฟแวร์นั้นจะต้องอยู่ในเครื่องอ่านดิสก์ตลอดเวลาไม่ควรนำแผ่นดิสก์ออกมาเมื่อมีไฟยังสว่างอยู่ เพราะอาจทำให้แผ่นดิสก์เสียหาย

2. การใช้น้ำยาควรใช้เฉพาะน้ำยาของ DREW Scientific ที่ใช้กับเครื่อง Hemoglobin Gold เท่านั้น

3. การเตรียมตัวอย่างควรเตรียมด้วยความระมัดระวังดังที่ได้อธิบายไว้ใน การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

4. ไม่ควรใช้น้ำยาหรือคอลัมน์ที่หมดอายุแล้ว

5. ไม่ควรนำน้ำยาเทรวมกัน

6. ไม่ควรใช้คอลัมน์ที่เกินกว่าจำนวนครั้งที่กำหนด

7. เมื่อทำการเปลี่ยนคอลัมน์ น้ำยาและอื่นๆ ควรปฏิบัติตามข้อความบนจอ

8. โวลต์ที่ใช้สำหรับ RS 232, AS 100 และ พริ้นเตอร์ คือ 7V DC

Hazards

1. ไม่ควรถอดฝาครอบออกจากเครื่อง Hemoglobin Gold analyser

Biohazard warning

1. ตัวอย่างทุกชนิดควรถือเสมือนว่าเป็นตัวอย่างติดเชื้อ

2. สวมถุงมือทุกครั้ง เมื่อหยิบจับตัวอย่าง หรือของเสียจากเครื่อง

3. การทำ Decontaminate ควรทำด้วยความระมัดระวัง

4. หลีกเลี่ยงการมอง detector lamp เพราะแสงที่ออกมาอาจเป็นอันตรายต่อตาได้

5. น้ำยาและฮีโมไลเซอร์ ของHemoglobin Gold analyserมีส่วนผสมของ 0.02 % Sodium azide

6. หลีกเลี่ยงการสัมผัสหรือบริโภค น้ำยาทุกชนิดของเครื่อง Hemoglobin Gold analyser

7. ทำการทิ้งน้ำยาที่ใช้แล้วด้วยความระมัดระวัง

8. ไม่ควรนำน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Sodium azide ถูกกับโลหะหนักเพราะอาจเกิดระเบิดได้

9. ไม่ควรนำน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Sodium azid ถูกกับกรดเพราะอาจเกิดก๊าซพิษ

การเปลี่ยนน้ำยาใหม่

1. เปิดสวิทซ์ด้านหลังเครื่อง Hemoglobin Gold เครื่องจะปรากฏข้อความขึ้นที่หน้า Main Menu (ใช้เวลาประมาณ 1 นาที)
2. กด Run Sample แล้วกด Change kit (เลือก New Gold kit 105 Test)
3. เครื่องจะแจ้งให้เปลี่ยน Column ใหม่จากนั้นกด Confirm step 1
4. เครื่องจะแจ้งเตือนให้ทิ้ง Waste เก่าแล้วกด Confirm step 2
5. เครื่องจะแจ้งให้เปลี่ยน Reagent A และ B ใหม่ จากนั้นกด Confirm step 3
6. เครื่องจะถามต้องการเปลี่ยนเลข Lot No. ใหม่หรือไม่ ถ้าต้องการกด Change Lot No.
7. พิมพ์เลข Lot No. ใหม่เข้าทาง Key Board
8. เมื่อการ program เสร็จสมบูรณ์เครื่องจะขึ้น reagent count 105 test
9. ทำการ run sample 5 test เพื่อให้ column จะอยู่ในสภาวะ stable
10. เครื่องจะทำการ prime reagent ก่อนแล้วจึงทำการ test
11. หลังการ test เครื่องจะอยู่ในสภาวะพร้อมใช้งาน

การดูแลเครื่อง Hemoglobin Gold

1. ในสภาวะปกติเครื่อง Hemoglobin Gold Analyzer เมื่อประกอบเข้าด้วยกันแล้ว จะต้องไม่มีการรั่วซึมของน้ำยาในขณะ Run หรือ Prime น้ำยา ต้องตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีน้ำรั่วซึมออกจากระบบ ที่พบบ่อย ได้แก่

1.1 จาก Syringe ที่ Auto sampling

1.2 จาก Column

1.3 หยดจากตัวถังเครื่อง หากพบการรั่วซึมแม้เพียงเล็กน้อยก็จะทำให้ไม่พบเส้น Chromatogram เกิดขึ้นในจอ (เส้นจะขึ้นแนวแกน X)

2. ลักษณะของ Chromatogram ปกติ

2.1 RT ของ A_o จะอยู่ในช่วง 195 – 235

2.2 จะพบ GlycatedA_o เสมอที่หน้า peak A_o

2.3 Area ใต้กราฟจะต้องอยู่ในช่วง 700 – 900 หาก Area > 1,000 ควร dilute specimen

2.4 หางของ Chromatogram จะต้องสูงกว่าเส้น Base line เสมอ

3. Auto Samplling

3.1 แกน Syringe จะต้องอยู่ที่ Home Station เท่านั้นก่อนที่ Run test หากตอน Run test แกน Syringe ไม่อยู่ที่ Home Station เครื่องจะขึ้น AutoSampling Error

3.2 ให้แน่ใจว่า Auto Sampling สามารถทำความเย็นได้ตามปกติ หากไม่มีความเย็นให้ตรวจสอบว่ามีไฟเข้าเครื่องหรือไม่

3.3 หมั่นเช็ดน้ำที่จับตาม Auto sampling ให้แน่ใจว่าไม่มีน้ำขังในช่องใส่ Viual เลือด

3.4 สังเกตว่าในขณะเครื่องทำงานไม่มีน้ำล้นออกมาจากตัวช่อง Probe ที่ตัว Auto sampling หากมีน้ำล้นออกมาแสดงว่ามีการตันของส่วนน้ำทิ้งให้แก้ไขโดยการถอดสายยางหลัง Auto sampling แล้ว ใช้ Syringe ดูดปล่อยทิ้งน้ำที่ล้นออกจนแน่ใจว่าท่อไม่ตันแล้วจึงต่อสายยางหลังเครื่องเข้ากับตัว Analyzer ตามเดิม

3.5 การตรวจสอบ Probe ตันสามารถทำได้ โดยใช้โปรแกรมตรวจสอบ

4. ลักษณะของน้ำยา Hemoglobin Gold ที่ปกติ

4.1 หลัง Install น้ำยาใหม่ สามารถ Run A_o ให้นิ่งได้ไม่เกิน 4 – 5 Sample และ 2 – 3 Sample ในการทำ PT แต่ละวันและใน Trping A2 หรือ EA

4.2 ต้องการ glycatedAo Peak เสมอ

ปัญหาที่พบบ่อย สาเหตุและการแก้ไข

ปัญหาที่ตัว Analyzer

1. **อาการ :** ไม่มีเส้น Chromatogram ให้เห็น เห็นเป็นเส้นตรงที่แนบไปกับแกน X หรือแกน Y

สาเหตุ/การแก้ไข :

1. Column ที่ใช้ยังใหม่ และยังไม่มีของเหลวภายในต้อง Run ทิ้งไว้ 2 – 3 sample เส้น Chromatogram ก็จะปรากฏขึ้น

2. เกิดการรั่วในระบบ ซึ่งพบปัญหานี้สูงสุด ต้องสำรวจดูว่ามีการรั่วของน้ำยาในส่วนต่างๆ หรือไม่ ที่พบบ่อยๆ ได้แก่

2.1 รั่วที่ Syring Auto sampling มักพบตอนติดตั้งเครื่องครั้งแรกหรือย้ายเครื่องที่มีการถอดสายในจุดนี้ แก้ไขโดย ขันเกลียวที่ Syringe ให้แน่นหากมีน้ำซึมแม้แต่น้อยก็จะเกิดปัญหาข้างตันทันที

2.2 รั่วที่ตัว Column อาจเกิดจากการขัน Column เข้ากับเครื่องไม่แน่น ควรลองขันเกลียว Column ให้แน่นขึ้น ระวังอย่าขันแน่นจนเกินไปอาจทำให้ Column เสียหายได้

2.3 รั่วที่ตัวเครื่อง Analyzer ควรสังเกตุว่ามีน้ำซึมออกมาจากตัวเครื่องหรือไม่ หากมีให้ตามช่างทันที ปัญหานี้ส่วนใหย่เกิดจากการใช้ Column ที่หมดอายุแล้วมาทำงานจะทำให้เครื่องรับแรงดันสูงกว่าปกติ ปั้มและวาล์ว ต่างๆ ในเครื่องอาจรั่วเสียหายได้ อาการนี้หากรั่วไม่มากนักอาจมองเห็นเส้น Chromatogram แต่จะทำให้ Retention time ผิดไปมาก เส้น A_o ปกติอยู่ในช่วง 195 – 235 อาจเปลี่ยนตำแหน่งไปอยู่สูงกว่า 245 ค่าที่ได้จะไม่น่าเชื่อถือ

2. **อาการ :** Auto Sampling Error ที่หน้าจอ Computer และ probe ไม่ทำงาน

สาเหตุ/การแก้ไข : อาจเกิดจากตำแหน่งของ probe ไม่อยู่ที่ Home station ควรตรวจสอบแกนเหล็กที่ยึด Syringe ของ Auto sampling อยู่ที่ Home station แล้วดันก่อนเครื่องทำงาน หากไม่อยู่ที่ตำแหน่ง Home station ควรดันแกนเหล็กจนเข้าที่ โดยระวังว่าปลาย probe อยู่ในตำแหน่งกลางช่องดูดมิฉะนั้นจะทำให้ปลาย probe งอได้

3. **อาการ :** ช่องปลาย probe ที่ Auto Sampling ตัน น้ำล้นออกมาล้น Auto sampling

สาเหตุ/การแก้ไข : ส่วนใหญ่เกิดจากไม่มีการทำความสะอาดในจุดนี้เป็นเวลานาน จึงมีคราบเลือด มาอุดตันได้ การแก้ไขควรทำความสะอาดบริเวณนี้ แล้วถอดสายยางหลังเครื่อง Auto Sampling ในส่วนที่ต่อกับ Analyzer แล้วใช้ Syringe เปล่าดูดอากาศเข้าออกจน แน่ใจว่าน้ำที่ล้นออกมาสามารถไหลผ่านได้โดยสะดวก แล้วจึงประกอบคืนเข้าด้วยกัน

4. **อาการ :** Chromatogram ให้ตำแหน่ง RT ของ A_o และ A_2 สูงหรือต่ำเกินไป แต่ไม่มากนัก (+ 15 Sec) และต้องแน่ใจว่า Column ไม่เสีย พบ peak qlyeatedA_o ชัดเจนให้ปรับอุณหภูมิของ reagent ให้ได้ RT ของ A_o อยู่ในช่วง ที่กำหนด (195 – 235, x=210) โดยใช้เงื่อนไขต่อไปนี้

สาเหตุ/การแก้ไข : หาก RT ของ A_o ต่ำไปให้ลดอุณภูมิลงแต่ถ้าหาก RT ของ A_o สูงไปให้เพิ่มอุณหภูมิของ reagent ซึ่งการเปลี่ยน 1 องศา RT ของ A_o จะเปลี่ยนไปประมาณ 8 วินาที โดยปรับในหน้า Diag ในส่วนของ reagent temperature

5. **อาการ :** Auto Sampling ไม่เย็น

สาเหตุ/การแก้ไข : ปัญหานี้ส่วนใหญ่มักเกิดเนื่องจากไฟไม่เข้าเครื่อง หรือตัวหม้อแปลงไฟฟ้าเสีย ควรตามช่างมาตรวจสอบ

6. **อาการ :** หากเครื่องมือมีอาการต่อไปนี้

1. ทำ test มากกว่า 5 ครั้งแต่ peak A_o ยังไม่นิ่ง
2. ไม่พบ qlycatedA_o ในสภาวะปกติ (A_2, A, EA)
3. Peak A_o และ E หรือ A_2 ไม่แยกอย่างชัดเจน

สาเหตุ/การแก้ไข : เกิดเนื่องจาก Column มีปัญหาควรลองเปลี่ยน Column อันใหม่

7. **อาการ :** Chromatogram ขนาดใหญ่ทั้ง Peck qlycated และ Peck อื่นๆ และ Area มากกว่า 1300

สาเหตุ/การแก้ไข : สาเหตุเป็นเพราะใส่เลือดมากเกินไปทำได้โดย Diluted เลือดให้เจือจางลงก่อนทำ Test ขนาด Peck ที่เหมาะสมจะมี Area ให้ Chromatogram อยู่ในช่วง 600 - 900

8. **อาการ :** ของ Chromatogram ต่ำกว่าเส้น Base Line

สาเหตุ/การแก้ไข : ส่วนใหญ่มักเกิดจากการใช้น้ำกลั่นที่ทำ Peak tracking ทิ้งไว้เป็นเวลานาน หรือสภาพของน้ำกลั่นที่ใช้ทำละลายเลือดแตกต่างจากน้ำที่ทำ peck tracking ควรลองเปลี่ยนน้ำที่ทำ peck tracking ใหม่ แล้วทำ test อีกครั้ง

ข้อจำกัดของเครื่องวิเคราะห์กึ่งอัตโนมัติสำหรับตรวจหา hemoglobin typing

รุ่น Hemoglobin Gold ของบริษัท Drew

1. เครื่องวิเคราะห์ Hemoglobin อัตโนมัติแสดงผลในลักษณะโครมาโตแกรมหรือโซนต่างๆที่ปรากฏร่วมกับปริมาณของ Hemoglobin แต่ละชนิดโดยไม่ได้สรุปผล Hemoglobin typing ให้ผู้ปฏิบัติงานจึงต้องมีความรู้และประสบการณ์สูงในการรายงานผลและแปลผล

2. อนุพันธ์ของ Hemoglobin (Hemoglobinderivatives) เช่น glycosylated Hemoglobin, acetylatedHemoglobin F และ Hemoglobin ที่โมเลกุลสลายบางส่วน (degradation) เนื่องจากเลือดเก่าอาจทำให้เกิดปัญหาการเคลื่อนของค่า retention time และสับสนในการอ่านผลได้

3. ในกรณีที่พบปริมาณ Hemoglobin F สูงกว่าปกติถ้าไม่ใช่เลือดเด็กแรกเกิดควรย้อม F Cell ประกอบการรายงานผลด้วยเนื่องจากมี abnormal Hemoglobin บางชนิดปรากฏในตำแหน่งเดียวกับ Hemoglobin F

4. ในกรณีที่ไม่แน่ใจว่าเป็น Hemoglobin H หรือไม่การย้อม Hemoglobin H inclusion bodies จะช่วยยืนยันการรายงานผลได้

5. ในกรณีที่สงสัยว่ามี Hemoglobin ผิดปกติการตรวจเลือดบุคคลอื่นๆในครอบครัวและการตรวจแยกชนิด Hemoglobin ด้วยระบบอื่นด้วยอาจจะช่วยยืนยันผลในเบื้องต้นได้ว่ามี Hemoglobin ผิดปกติหรือไม่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถรายงานชนิดของ Hemoglobin ผิดปกติได้จนกว่าจะได้ตรวจวิเคราะห์ DNA หรือลำดับกรดอะมิโน

การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์Hemoglobinด้วยเครื่องอัตโนมัติ

1. ควรให้ความสำคัญในการดูแลบำรุงรักษาและสอบเทียบเป็นประจำสม่ำเสมอ

2. ควรมีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (internal quality control) โดยใช้วัสดุควบคุมคุณภาพที่มีมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ

3. ควรเข้าร่วมกิจกรรมควบคุมคุณภาพโดยหน่วยงานภายนอก (external quality assurance หรือ proficiency testing program) เป็นประจำ

4. การรายงานผลแต่ละตัวอย่างควรตรวจสอบความสัมพันธ์กับผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้นที่มีด้วยเสมอ

5. ผู้ปฏิบัติงานควรได้รับการฝึกอบรมและตรวจประเมินประสิทธิภาพด้านองค์ความรู้ในการวิเคราะห์และประมวลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นประจำ

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นายพีรพงษ์ ตัวงาม

ที่อยู่ 469 หมู่6 ตำบลเชียงคาน อำเภอเชียงคาน จังหวัดเลย

ที่ทำงาน งานประยุกต์ผลงานวิจัย สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2548 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากมหาวิทยารามคำแหง กรุงเทพฯ

พ.ศ.2549 ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติการทำงาน

พ.ศ.2547 ผู้ช่วยวิจัยโครงการพัฒนารูปแบบการส่งเสริมทันตสุขภาพของผู้ด้อยโอกาส ในท้องถิ่นทุรกันดาร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

พ.ศ.2551 นักวิทยาศาสตร์ งานประยุกต์ผลงานวิจัย สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Poster presentation

1. **Taw-ngam P**, Dechkunakorn, S and Anowongnukroh, N, stability of fluoride level in M-Dent toothpaste and compare with other toothpaste, The Fifth International Dental Collaboration of the Mekong River Region Congress Hanoi, Vietnam October 14-16, 2009