

## อภิปรายและวิจารณ์ผลการศึกษา

การเตรียมชุดตรวจกรองผู้สูบบุหรี่โดยการตรวจหาสารโคตินีนในปัสสาวะ การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี direct barbituric acid (DBA) method ซึ่งโคตินีนในสิ่งส่งตรวจจะทำปฏิกิริยากับสารละลาย KCN, chloramine-T และ barbituric acid ในสภาวะกรด pH 4.7 จนได้สารประกอบเชิงซ้อนมองเห็นสีของปฏิกิริยาคือสีส้มแดง

### 1. ผลการเปรียบเทียบการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette) และการใช้หลอดหยด (dropper)

จากผลการเปรียบเทียบการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette) และการใช้หลอดหยด (dropper) ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้หลอดหยดแทนปิเปตต์อัตโนมัติในการทดสอบได้ จากการศึกษาของนพพรและพรณิชา (2550) รวมถึงการศึกษาของพีรยาและสุพิมล (2251) ได้ทดสอบซึ่งน้ำหนักน้ำกลั่นของหลอดหยดเปรียบเทียบกับปิเปตต์อัตโนมัติซึ่งได้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นผลการเปรียบเทียบการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติและการใช้หลอดหยดที่ได้ให้ผลสอดคล้องกัน

### 2. ผลการทดสอบน้ำยาตรวจวัดโคตินีนตามวิธี DBA

#### 2.1 ผลการศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดโคตินีน (Precision)

จากผลการทดสอบความแม่นยำแบบ within-run พบว่าในปัสสาวะมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 1.48 ถึง 2.13 สารละลายมาตรฐานโคตินีนมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ช่วง 1.01 ถึง 1.20 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดโคตินีนในปัสสาวะมีความแม่นยำน้อยกว่าการตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน

จากผลการทดสอบความแม่นยำแบบ between-run พบว่าในปัสสาวะมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 5.07 สารละลายมาตรฐานโคตินีนมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 7.35 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าโคตินีนในปัสสาวะมีความแม่นยำมากกว่าการตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน ซึ่งผลการทดลองแบบ within-run และ between-run ให้ผลไม่สอดคล้องกัน

การศึกษาความแม่นยำของสารละลายมาตรฐานที่ผ่านมาของจินดารัตน์และคณะ (2537) พบความแม่นยำแบบ within-run และ between-run โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 3.30% และ 5.65% ตามลำดับ การศึกษาของโอชาและคณะ (2543) พบความแม่นยำแบบ within-run และ between-run โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 2.46% และ 5.49% ตามลำดับ การศึกษาของนพพรและคณะ (2550) พบความแม่นยำแบบ within-run และ between-run โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 6.00% และ 9.29% ตามลำดับ พบว่าการศึกษานี้มีความแม่นยำแบบ within-run ในการตรวจวัดมากกว่าการศึกษาที่ผ่านมา แต่การศึกษาความแม่นยำแบบ between-run มีความแม่นยำน้อยกว่าในการศึกษาที่ผ่านมา

#### 2.2 ผลการศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีน (Accuracy)

จากผลการศึกษาความถูกต้องพบค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) มีค่าต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 97 สูงสุดร้อยละ 102 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 100 ส่วนร้อยละความคาดหวัง (% expectation) มีค่าต่ำสุดร้อยละ

ละ 98 สูงสุดร้อยละ 101 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 100 แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดโคตินีนด้วยวิธี DBA ในการศึกษาครั้งนี้มีความถูกต้องสูงและเชื่อถือได้ว่าการตรวจวัดจะให้ค่าที่ถูกต้อง

### 2.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีน (Detection limit)

จากผลการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดโคตินีน (detection limit) มีค่าเท่ากับ  $0.43 \mu\text{mol/L}$  แสดงว่าการตรวจวัดด้วยวิธี DBA ครั้งนี้สามารถตรวจวัดโคตินีนได้เท่ากับ  $0.43 \mu\text{mol/L}$  ในตัวอย่างที่ไม่มีโคตินีน

### 2.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Sensitivity)

ผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด (sensitivity) ในการตรวจวัดที่มีค่าเท่ากับ  $0.125 \mu\text{mol/L}$  แสดงว่าการตรวจวัดด้วยวิธี DBA ครั้งนี้สามารถตรวจวัดโคตินีนได้อย่างถูกต้องที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ  $0.125 \mu\text{mol/L}$

### 2.5 ผลการศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดโคตินีน (Linearity)

จากผลการศึกษาความเป็นเส้นตรง ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ  $100 \mu\text{mol/L}$  การศึกษาที่ผ่านมาของพีรยาและคณะ (2551) พบว่ามีค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ  $200 \mu\text{mol/L}$  ซึ่งค่าการศึกษาครั้งนี้ให้ค่าต่ำกว่าการศึกษาดังกล่าวซึ่งอาจเนื่องจากน้ำยาและสารมาตรฐานที่ใช้ทดสอบเป็นคนละชุดและผู้ทดสอบเป็นคนละกลุ่ม

### 2.6 ผลการทดสอบความคงตัวของสารมาตรฐานและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด (Stability)

จากผลการทดสอบพบว่าสารมาตรฐานและน้ำยาเก็บที่  $4^{\circ}\text{C}$  มีความคงตัวอย่างน้อย 24 สัปดาห์เมื่อพิจารณาสารมาตรฐานความเข้มข้น 5, 10, 15 และ  $25 \mu\text{mol/L}$  มีการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงน้อยมาก สารมาตรฐานความเข้มข้น  $5 \mu\text{mol/L}$  ในสัปดาห์แรกมีค่าการดูดกลืนแสง 0.088 ส่วนสัปดาห์ที่ 24 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.094 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงต่างกัน 0.01 ส่วนความเข้มข้น 50,  $100 \mu\text{mol/L}$  พบการเปลี่ยนแปลงมาก ซึ่งสารมาตรฐานความเข้มข้น  $100 \mu\text{mol/L}$  ในการทดสอบสัปดาห์แรกมีค่าการดูดกลืนแสง 1.630 ส่วนในสัปดาห์ที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสง 1.820 ซึ่งมีค่าต่างกัน 0.2 และจากการสังเกตพบว่าน้ำยา barbituric acid และ KCN มีตะกอนเกิดขึ้นเมื่อเก็บไว้อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  แต่ในการศึกษาครั้งนี้ดูดูส่วนใสด้านบนมาทดสอบ

### 2.7 ผลการทดสอบความคงตัวของโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะ (Urine stability)

ผลการศึกษาความคงตัวของโคตินีนในปัสสาวะที่อุณหภูมิห้องมีความคงตัวอย่างน้อย 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ มีความคงตัวอย่างน้อย 6 วัน อุณหภูมิ  $-4$  ถึง  $-8^{\circ}\text{C}$  มีความคงตัวอย่างน้อย 12 สัปดาห์ อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  มีความคงตัวอย่างน้อย 16 สัปดาห์ ผลการทดสอบที่ได้ครั้งนี้จะมีประโยชน์ในการเก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะเพื่อนำมาตรวจวัดหาสารโคตินีน

## 3. ผลการทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีน (Color stability)

จากผลการทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาหลังจากเติมน้ำยาตัวสุดท้าย (barbituric acid) พบว่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปแต่พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดมีความแตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น การศึกษาที่ได้ครั้งนี้ทำให้ทราบเวลาที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสงโคตินีน คือช่วงเวลา 10-13 นาที หลังเติมน้ำยาตัวสุดท้าย (barbituric acid) ในการศึกษาครั้งนี้วัดค่าการดูดกลืนแสงในนาทีที่ 10 ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

#### 4. การปรับปรุงวิธีการตรวจวัด

##### 4.5.1 การทดสอบการผสมน้ำยาก่อนการตรวจวัด

การผสมน้ำยา sodium acetate buffer กับ KCN (mixture 1) แล้วทดสอบทันทีที่เกิดปฏิกิริยาแต่เมื่อผสมแล้วทิ้งไว้ 5 วัน ทดสอบอีกครั้งไม่เกิดปฏิกิริยา การผสมน้ำยา barbituric acid กับ chloramine-T (mixture 2) ผสมแล้วทดสอบทันทีไม่เกิดปฏิกิริยา การผสม sodium acetate buffer กับ chloramine-T (mixture 3) ผสมแล้วทดสอบทันทีเกิดปฏิกิริยาแต่เมื่อผสมทิ้งไว้ 3 วัน แล้วทดสอบอีกครั้งพบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลง 2-3 เท่า แสดงว่าน้ำยาผสมไม่มีความคงตัว

การผสม sodium acetate buffer กับ barbituric acid (mixture 4) ซึ่งแบ่งขั้นตอนการเติมน้ำยาเป็น 6 แบบ มีทั้งแบบที่เกิดปฏิกิริยาและไม่เกิดปฏิกิริยาแต่มีขั้นตอนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับการทดสอบของน้ำยาขั้นตอนปกติมากที่สุดคือ ขั้นตอนในข้อ 4.5.1.4.2 หากผสมน้ำยาทั้งสองตัวแล้วทดสอบทันทีจะได้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับขั้นตอนปกติและค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเก็บน้ำยาที่ผสมไว้ (mixture 4) นานมากขึ้น แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงจะพบการเปลี่ยนแปลงมากในช่วงความเข้มข้นสารมาตรฐานโคตินีนสูงคือ ที่ความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{mol/L}$  ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำๆ จะพบการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงน้อย

การผสมน้ำยา 3 ชนิดคือ sodium acetate buffer, chloramine-T และ barbituric acid (mixture 5) ผสมแล้วทดสอบทันที พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา การผสมน้ำยา 4 ชนิด (mixture 6) แล้วทดสอบทันทีเกิดปฏิกิริยาแต่ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าการทดสอบตามขั้นตอนปกติเล็กน้อย แต่เมื่อทิ้งน้ำยาที่ผสมไว้ในเวลา 30 นาทีทดสอบอีกครั้งค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากแสดงว่าการผสมน้ำยา 3 และ 4 ชนิดทำให้น้ำยาไม่มีความคงตัว

จากการสังเกตจะพบว่าน้ำยาโพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) ไม่สามารถผสมรวมตัวกับน้ำยาอื่นก่อนการทดสอบได้เลย

##### 4.5.2 การทดสอบคุณสมบัติของการผสมน้ำยา barbituric acid กับ sodium acetate buffer (mixture 4)

การทดสอบคุณสมบัติของการผสมน้ำยาผสม mixture 4 ใช้การทดสอบตามขั้นตอนในข้อ 4.5.1.4.2 คือ เติมน้ำยาตามลำดับดังนี้ standard + KCN + mixture 4 + chloramine-T

##### 4.5.2.1 การศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Precision)

จากผลการทดสอบความแม่นยำแบบ within-run พบว่าในปีสภาวะมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 10.64 สารละลายมาตรฐานโคตินีนมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ช่วง 6.21 ถึง 8.65 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดโคตินีนในปีสภาวะมีความแม่นยำน้อยกว่าการตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน

จากผลการทดสอบความแม่นยำแบบ between-run พบว่าผลการทดสอบปีสภาวะทำ 25 ครั้งติดต่อกันใน 1 วันมีค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SD) เท่ากับ  $0.094 \pm 0.010$  มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) เท่ากับ 10.64

ผลการทดสอบสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 15 และ 25  $\mu\text{mol/L}$  ทำ 25 ครั้งติดต่อกันใน 1 วัน มีค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SD) ความเข้มข้น 15 และ 25  $\mu\text{mol/L}$  เท่ากับ  $0.208 \pm 0.018$  และ  $0.338 \pm 0.021$  ตามลำดับ มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) ความเข้มข้น 15 และ 25  $\mu\text{mol/L}$  เท่ากับ 8.65 และ 6.21 ตามลำดับ

#### 4.5.2.2 การศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Accuracy)

จากผลการศึกษาความถูกต้องพบค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) มีค่าต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 95 สูงสุดร้อยละ 103 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 100 ส่วนร้อยละความคาดหวัง (% expectation) มีค่าต่ำสุดร้อยละ 97 สูงสุดร้อยละ 103 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 100 แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดโคตินีนด้วยวิธีนี้ ในการศึกษาครั้งนี้มีความถูกต้องสูงและเชื่อถือได้ว่าการตรวจวัดจะให้ค่าที่ถูกต้อง

#### 4.5.2.3 การศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Detection limit)

จากผลการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดโคตินีน (Detection limit) มีค่าเท่ากับ 1.75  $\mu\text{mol/L}$  แสดงว่าการตรวจวัดด้วยวิธี DBA ครั้งนี้สามารถตรวจวัดโคตินีนได้เท่ากับ 1.75  $\mu\text{mol/L}$  ในตัวอย่างที่ไม่มีโคตินีน

#### 4.5.2.4 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของน้ำยาผสม (Sensitivity)

ผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด (Sensitivity) ในการตรวจวัดที่มีค่าเท่ากับ 0.25  $\mu\text{mol/L}$  แสดงว่าการตรวจวัดด้วยวิธี DBA ครั้งนี้สามารถตรวจวัดโคตินีนได้อย่างถูกต้องที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.25  $\mu\text{mol/L}$

#### 4.5.2.5 การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดโคตินีน (Linearity)

จากผลการศึกษาความเป็นเส้นตรง ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 100  $\mu\text{mol/L}$

#### 4.5.2.6 การทดสอบความคงตัวของน้ำยาผสมที่ใช้ในการตรวจวัด (Stability)

จากผลการทดสอบพบว่าสารมาตรฐานและน้ำยาเก็บที่ 4°C มีความคงตัวอย่างน้อย 1 สัปดาห์เมื่อพิจารณาสารมาตรฐานความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 25  $\mu\text{mol/L}$  มีการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงน้อยมาก ส่วนความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{mol/L}$  พบการเปลี่ยนแปลงมาก

#### 4.5.2.7 การทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Color stability)

จากผลการทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาหลังจากเติมน้ำยาตัวสุดท้าย (chloramine-T) พบว่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปแต่พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดมีความแตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น การศึกษาที่ได้ครั้งนี้ทำให้ทราบเวลาที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสงโคตินีน คือช่วงเวลา 19-24 นาที หลังเติมน้ำยาตัวสุดท้าย (chloramine-T) ในการศึกษาครั้งนี้วัดค่าการดูดกลืนแสงในนาที่ที่ 10 ซึ่งอยู่ไม่ในช่วงที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดแต่ครั้งนี้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่นาที่ที่ 10 เพื่อให้การวัดเป็นเช่นเดียวกับวิธีขั้นตอนปกติจึงทำให้เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีนี้จึงทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าขั้นตอนปกติ

ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดโคตินีนด้วยชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีการตรวจวัดที่มีขายในท้องตลาด คือ วิธี COT ที่ใช้หลักการ immunoassay พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวเท่ากับ 100%

และมีความจำเพาะเท่ากับ 98% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการตรวจวัดสอดคล้องเหมือนกับวิธีการที่ใช้หลักการ immunoassay ถึงแม้ว่าจะใช้หลักการตรวจวัดต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามมีตัวอย่าง 1 รายที่ให้ผลลบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น แต่กลับให้ผลบวกกับวิธี COT แต่พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลลบทั้ง 41 ราย เท่ากัน

การตรวจวัดด้วย COT เป็นการตรวจวัดเชิงคุณภาพที่บอกได้ว่ามีหรือไม่มีโคตินินในสิ่งส่งตรวจ แต่การตรวจวัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีข้อดีเนื่องจากการตรวจวัดแบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) ที่นอกจากสามารถบอกได้ว่ามีหรือโคตินินแล้วยังบอกได้ว่ามีปริมาณหรือความเข้มข้นมากน้อยเพียงใด และเนื่องจากการตรวจวัดโคตินินด้วยวิธีวัดสีไม่มีวางขายในท้องตลาด ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติการตรวจวัดของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นและชุดทดสอบที่มีขายในท้องตลาดได้ หากเปรียบเทียบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นกับ COT ที่วางขายในท้องตลาดก็ไม่สามารถเทียบกันได้เช่นกันเพราะหลักการตรวจวัดแตกต่างกัน หากจะเทียบคุณสมบัติบางอย่าง เช่น ความไวในการตรวจวัด (sensitivity) กล่าวคือวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไว 0.25  $\mu\text{mol/L}$  ส่วนวิธี COT มีความไว 200  $\text{ng/mL}$  จะเห็นว่าวิธี COT มีความไวมากกว่า เพราะตรวจวัดด้วยหลักการแอนติเจนแอนติบอดีซึ่งมีความไวมากกว่า

จากการศึกษาทั้งหมดได้สรุปข้อมูลการตรวจวัดโคตินินก่อนและหลังการพัฒนาชุดตรวจวัด ดังตารางข้างล่างนี้

คุณสมบัติ	ก่อนการพัฒนา	หลังการพัฒนาชุดทดสอบ
จำนวนน้ำยา (ชนิด)	4	3
ความคงตัวของน้ำยา	6 เดือน	1 เดือน
ความเป็นเส้นตรง ( $\mu\text{mol/L}$ )	100	100
ความไวของการตรวจวัด (sensitivity) ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.125	0.25
ขีดจำกัดการตรวจวัด ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.43	1.75
ความแม่นยำ (% CV, within-run)	1-2	6-10
ความถูกต้อง (% recovery)	100	100
ความไว (sensitivity) (%)	ND	100
ความจำเพาะ (specificity) (%)	ND	98
ค่าการทำนายผลบวก (positive predictive value) (%)	ND	89
ค่าการทำนายผลลบ (negative predictive value) (%)	ND	100
****ทั้งหมดเทียบกับวิธี immunoassay****		