

นิพนธ์ฉบับ

ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง Conventional spectrophotometers ในการตรวจหาปริมาณของโปรตีนและอัลบูมิน

ณัฐพลิชฐ์ ชัยอนันต์กุล*, กัญชพร วุฒิ*, ณัฐนิช คำพุฒ*, ทิพวรรณ ลังขพงษ์*,
ณัฐธวัช ประमाणพล**, วัชรพล ภูมรา**

บทคัดย่อ

- บทนำ:** เครื่อง spectrophotometer ที่ใช้กันทั่วไปมีขนาดใหญ่ ราคาแพง และไม่สะดวกต่อการใช้งานภาคสนาม คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเครื่อง Mini-spectrophotometer ซึ่งใช้หลอด light emitting diode (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสง และหลุมขนาดเล็ก (microwell) เป็นช่องบรรจุสาร เครื่องต้นแบบนี้มีหลักการทำงานคล้ายกับเครื่องโดยทั่วไป แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีมีการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่อง งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องต้นแบบดังกล่าว
- วิธีการศึกษา:** ประเมินประสิทธิภาพของเครื่องในการวัดปริมาณโปรตีนและอัลบูมิน ด้วยการทดสอบ Within-run, Between-run, %Recovery และทำการเปรียบเทียบกับเครื่อง Shimadzu และ CECIL spectrophotometer
- ผลการศึกษา:** การวัดโปรตีนมีค่า Within-run precision เท่ากับ 2.9 - 10.4%, Between-run precision เท่ากับ 11.6 - 20.5% และ %Recovery เท่ากับ 97.15% สำหรับการวัดอัลบูมินค่า Within-run precision เท่ากับ 2.7 - 8.4%, Between-run precision เท่ากับ 8.3 - 18.1% และ %Recovery เท่ากับ 106.25% เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่อง Shimadzu และ CECIL พบว่าค่าโปรตีนมีความสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์ดี ($r = 0.9069, 0.9098$) และผลต่างระหว่างสองเครื่องอยู่ในช่วง $\text{mean} \pm 1.96 \text{ SD}$ สำหรับค่าอัลบูมินมีความสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์ที่ดีกว่า ($r = 0.9536, 0.9516$)
- สรุปผลการศึกษา:** เครื่อง Mini-spectrophotometer มีความถูกต้องแม่นยำน้อยกว่าเครื่อง conventional spectrophotometers เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ต่ำกว่าเกณฑ์ ถึงแม้ว่าผลต่างระหว่างสองเครื่องยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับ ดังนั้นจึงต้องพัฒนาเครื่องต้นแบบดังกล่าวต่อไปหากจะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างของคนไข้
- คำสำคัญ:** มินิ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์, โปรตีน, อัลบูมิน, LED, หลุมจุลภาค

วันที่รับบทความ: 15 กุมภาพันธ์ 2561 วันที่แก้ไขบทความ: 25 กุมภาพันธ์ 2562 วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: 26 กุมภาพันธ์ 2562

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

** สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ผู้ให้ติดต่อ: ดร.ณัฐพลิชฐ์ ชัยอนันต์กุล ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
อีเมล: natpasitc@nu.ac.th

บทนำ

การตรวจปริมาณของโปรตีนรวม (total protein) และอัลบูมิน (albumin) สามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคต่างๆ เช่น โรคตับ โรคไต ภาวะทุพโภชนาการ และความผิดปกติอื่นๆ ได้¹ ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้จะส่งผลให้ระดับของโปรตีนในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลง โปรตีนในร่างกายทำหน้าที่แตกต่างกันได้แก่ เอนไซม์ ฮอร์โมน ขนส่งสาร immunoglobulins โปรตีนโครงสร้าง แหล่งพลังงาน และรักษา osmotic force ในร่างกาย² การตรวจวัดปริมาณโปรตีนในร่างกายที่นิยมตรวจคือ โปรตีนรวมในซีรัม (serum total protein) และอัลบูมิน ซึ่งนอกจากจะดูปริมาณของโปรตีนแล้วยังใช้ในการคำนวณหาปริมาณของโกลบูลิน (globulin) และอัตราส่วนระหว่างอัลบูมินต่อโกลบูลิน (albumin/globulin ratio) สามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคของไตได้ การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนและอัลบูมินในห้องปฏิบัติการทั่วไป (routine method) สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาของโปรตีนหรืออัลบูมินในตัวอย่างกับน้ำยาตรวจวิเคราะห์ Biuret³⁻⁵ สำหรับการตรวจโปรตีนรวม และน้ำยาตรวจวิเคราะห์ Bromocresol green (BCG) สำหรับการตรวจอัลบูมิน^{6,7} ซึ่งทั้งสองวิธีอาศัยหลักการของการเกิดสี (colorimetric method) และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสี (chromogen) ที่เกิดขึ้นหลังการทำปฏิกิริยา ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของโปรตีนหรืออัลบูมินในสิ่งส่งตรวจ

เครื่อง spectrophotometer ที่ใช้กันโดยทั่วไปมีขนาดใหญ่และใช้งานที่ยุ่งยาก และต้องอาศัยการดูแลรักษาโดยผู้ที่เชี่ยวชาญ จึงไม่เหมาะสำหรับการออกตรวจนอกพื้นที่ นอกจากนี้ตัวเครื่อง อุปกรณ์ และอะไหล่ต่างๆ มักมีราคาแพง เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ส่วนใหญ่ใช้หลอด tungsten หรือ deuterium เป็นแหล่งกำเนิดแสง^{1,8,9} ซึ่งมีอายุการใช้งานที่สั้น และมีราคาแพง ปัจจุบันได้มีการนำเอาหลอด light emitting diode (LED) มาใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสง¹⁰⁻¹² ซึ่งหลอด LED มีความคงทน มีอายุการใช้งานที่ยาวนาน และมีขนาดเล็กกว่าแหล่งกำเนิดแสงชนิดอื่น¹³⁻¹⁵ จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการใช้หลอด LED เป็นแหล่งกำเนิดแสงในเครื่อง spectrophotometer และใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีหลายๆ ชนิด เช่น creatinine, zinc, copper และ iron^{12,15,16} เป็นต้น อย่างไรก็ตามเครื่อง spectrophotometer ดังกล่าวยังคงมีขนาดใหญ่และราคาแพง

สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ได้มีการประดิษฐ์เครื่องต้นแบบเพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณสารด้วยวิธีวัดความเข้มของแสงซึ่งมีหลักการทำงานคล้ายกับเครื่อง spectrophotometer ขึ้นเรียกว่าเครื่อง มินิ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Mini-spectrophotometer) ซึ่งเป็นเครื่องที่มีขนาดเล็กกะทัดรัดและมีราคาถูกกว่าเครื่อง spectrophotometer โดยทั่วไป⁹ เนื่องจากใช้หลอด LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง และมีการใช้หลอดตัวอย่างขนาดเล็ก (microwell) เป็นช่องบรรจุสารละลายแทน cuvette ซึ่ง microwell ดังกล่าวทำมาจากพอลิเมอร์ที่เรียกว่า Polydimethylsiloxane (PDMS)¹⁷⁻¹⁹ มีลักษณะโปร่งใส ไม่ดูดซับน้ำ ไม่ส่งผลเสียต่อเซลล์หรือโปรตีน และมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย²⁰⁻²² เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสารชีวเคมีหลายชนิด เช่น urine creatinine²³, uric acid²⁴ และสารชีวเคมีชนิดอื่นๆ²⁵ อย่างไรก็ตามเครื่อง Mini-spectrophotometer ซึ่งใช้หลอด LED เป็นแหล่งกำเนิดแสงเช่นเดียวกัน ยังไม่ได้มีการทดสอบการใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมี ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องต้นแบบในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน โดยศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ของเครื่อง และทำการศึกษาเปรียบเทียบ (comparison study) ผลการตรวจวิเคราะห์กับเครื่อง Shimadzu และ CECIL spectrophotometer

วิธีการศึกษา

น้ำยา สารเคมี และตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ analytical grade โดย Bovine serum albumin (BSA) (Ajax Finechem, ประเทศออสเตรเลีย) ทำการเตรียม stock BSA solution ความเข้มข้น 12 g/dL โดยละลายใน 0.9% NaCl solution หลังจากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ คือ 2, 4, 6, 8, 10 g/dL สำหรับทำกราฟมาตรฐานของการตรวจวิเคราะห์โปรตีน และความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6 g/dL สำหรับทำกราฟมาตรฐานของการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน

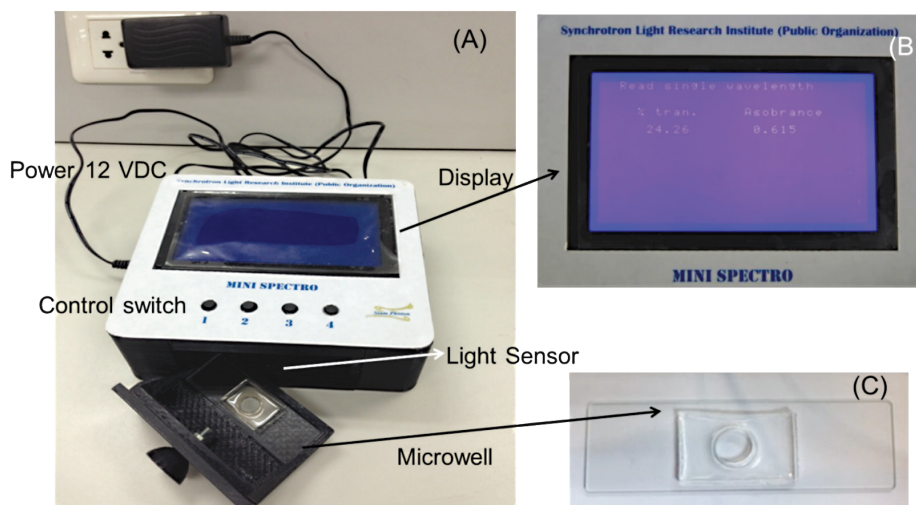
น้ำยาสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ น้ำยา Biuret สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งประกอบด้วย 3.8 M NaOH, 30 mM CuSO₄, 30 mM KI, 100 mM KNaC₄H₄O₆ และ 28 mM Na₂-EDTA และน้ำยา Bromocresol green (BCG) สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ประกอบด้วย 87 mM succinate buffer, 0.2 mM bromocresol green, และ 7.35 mL/L nonionic surfactant brij 35

ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบ (Comparison study) เตรียมจากสารควบคุมคุณภาพ Normal (Control N) และ Pathology Control (Control P) (HUMAN, Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, ประเทศเยอรมนี) โดยทำการเจือจางสารควบคุมคุณภาพดังกล่าวด้วย 0.9% NaCl solution ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.47 - 8.15 g/dL สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน (20 ตัวอย่าง) และความเข้มข้นตั้งแต่ 1 - 3.96 g/dL สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน (20 ตัวอย่าง)

เครื่อง spectrophotometer

เครื่อง Mini-spectrophotometer (ขนาดกว้าง 16 cm x ยาว 15 cm x สูง 6 cm) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกสร้างและพัฒนาโดยสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน), ประเทศไทย โดยมีส่วนประกอบดังนี้ คือ แหล่งกำเนิดแสง หลุมจุลภาค (Microwell) หัววัด ชุดวงจรไฟฟ้า หน้าจอแสดงผล และแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า ดังแสดงในรูปที่ 1 ติดตั้งอยู่ในกล่องทึบแสง โดยมีหลุมจุลภาค (เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 mm x ลึก 2 mm) ใช้เป็นช่องบรรจุสารละลายแทน cuvette ซึ่งทำจาก

พอลิเมอร์ PDMS โดยถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการโฟโตลิโธกราฟี (photolithography process) และนำไปประกอบลงบนฐานของกระจกสไลด์ (ขนาดยาว 75 x กว้าง 25 mm) หลุมจุลภาคบนฐานกระจกนี้ถูกวางไว้ภายใต้อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงซึ่งประกอบด้วยหลอด light emitting diode (LED) ที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน และมี Light sensor (detector) คือ TSL235R light sensor (Texas Instruments ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตรวจวัดความเข้มของแสงที่เปล่งออกมาจากหลอด LED และผ่านหลุมจุลภาคซึ่งมีตัวอย่างบรรจุอยู่ 200 μ L (ปริมาตรสูงสุด 350 μ L) โดยหลอด LED ที่ติดตั้งอยู่ในตัวเครื่องครอบคลุมความยาวคลื่นตั้งแต่ 300 - 1100 nm ซึ่งเครื่อง Mini-spectrophotometer นี้ได้รับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาตามอนุสิทธิบัตรไทยเลขที่ 12727²⁶ โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้หลอด LED สีเขียว ซึ่งให้แสงที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 517 nm (peak wavelength) สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน และหลอด LED สีแดง ซึ่งให้แสงที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 641 nm สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน



รูปที่ 1 ส่วนประกอบของเครื่อง Mini-spectrophotometer: ภาพด้านหน้าของเครื่อง Mini-spectrophotometer (A), หน้าจอแสดงผล แสดงค่า absorbance (B), และหลุมจุลภาค หรือ Microwell (C) ซึ่งสามารถบรรจุตัวอย่างได้สูงสุด 350 μ L

สำหรับเครื่อง conventional spectrophotometer ที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ Shimadzu UV-1601 Spectrophotometer (Shimadzu Corporation, ประเทศญี่ปุ่น) และ CE 1021 UV/Visible Spectrophotometer (CECIL Instruments Limited, สหราชอาณาจักร)

การตรวจวิเคราะห์โปรตีน

สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ standard albumin (BSA) ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 g/dL ทำการตรวจวัดปริมาณด้วยน้ำยา Biuret reagent²⁷ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer แต่ละเครื่อง (Mini-spectrophotometer, Shimadzu และ CECIL spectrophotometer) และค่าความเข้มข้นของ standard โดยทำการผสมน้ำยา Biuret 2.5 mL และ standard albumin (BSA) 50 μ L ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ Reagent blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทน standard ในการ set blank โดยทำซ้ำสองครั้งในแต่ละความเข้มข้นของ standard

การประเมินประสิทธิภาพของเครื่อง Mini-spectrophotometer ในการตรวจวิเคราะห์โปรตีน

การศึกษา Within-run precision ใช้ standard โปรตีน ที่ความเข้มข้น 4, 6 และ 8 g/dL ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูงตามลำดับ ทำการตรวจวัดแต่ละความเข้มข้นซ้ำกันจำนวน 20 ครั้ง ภายในเวลาเดียวกัน แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, %CV) สำหรับการศึกษา Between-run precision ใช้ตัวอย่างความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับดังกล่าว โดยทำการตรวจวัดทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 20 วัน และคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เช่นเดียวกัน

การหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (Recovery test) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์กับผลที่ได้จากการคำนวณ ด้วย Adding method โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน ในการตรวจหาปริมาณโปรตีน ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0, 5, และ 6 g/dL ลงในตัวอย่าง แล้วทำการตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนหลังการเติมสารละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery)

การศึกษาเปรียบเทียบ (Comparison study) ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างจำนวน 20

ตัวอย่าง ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีนตั้งแต่ 2.47 - 8.15 g/dL ด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer, Shimadzu spectrophotometer และ CECIL spectrophotometer ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจวัดโปรตีน ระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง Shimadzu spectrophotometer และระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง CECIL spectrophotometer โดยใช้สถิติ Simple linear regression analysis^{28, 29}, Bland-Altman bias plot³⁰ และ Passing-Bablok regression³¹ ในการวิเคราะห์ผลการศึกษา

การตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน

สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ standard albumin (BSA) ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6 g/dL ทำการตรวจวัดปริมาณด้วยน้ำยา Bromocresol green (BCG)²⁷ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometers แต่ละเครื่อง (Mini-spectrophotometer, Shimadzu และ CECIL spectrophotometer) และค่าความเข้มข้นของอัลบูมิน standard โดยทำการผสมน้ำยา BCG 5 mL และ standard albumin 25 μ L ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ Reagent blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทน standard ในการ set blank โดยทำซ้ำสองครั้งในแต่ละความเข้มข้นของอัลบูมิน standard

การประเมินประสิทธิภาพของเครื่อง Mini-spectrophotometer ในการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน

การศึกษา Within-run precision ใช้ standard อัลบูมิน ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 g/dL ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูงตามลำดับ ทำการตรวจวัดแต่ละความเข้มข้นซ้ำกันจำนวน 20 ครั้ง ภายในเวลาเดียวกัน แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, %CV) สำหรับการศึกษา Between-run precision ใช้ตัวอย่างความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับดังกล่าว โดยทำการตรวจวัดทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 20 วัน และคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เช่นเดียวกัน

การหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (Recovery test) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์กับผลที่ได้จากการคำนวณ ด้วย Adding method โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน ในการตรวจหาอัลบูมิน ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่

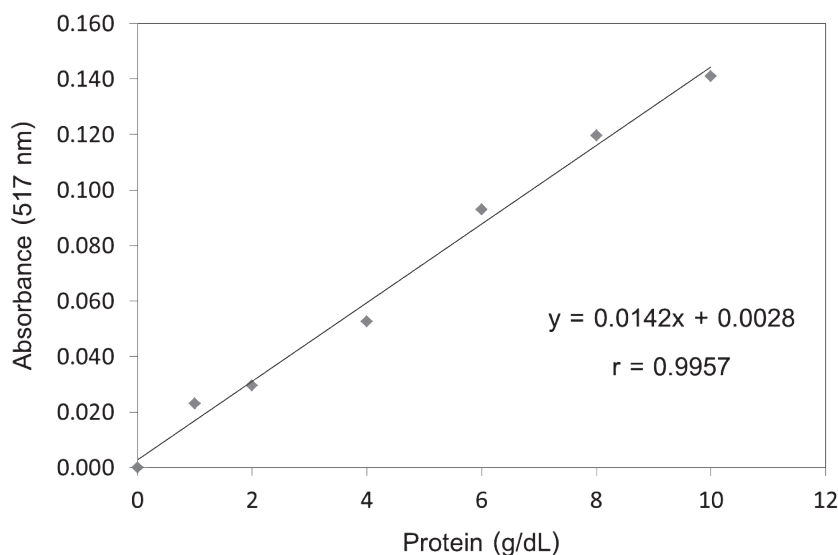
0, 2, และ 4 g/dL ลงในตัวอย่าง ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินหลังการเติมสารละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery)

การศึกษาเปรียบเทียบ (Comparison study) ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินในตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งมีความเข้มข้นของอัลบูมินตั้งแต่ 1.00 - 3.96 g/dL ด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer, Shimadzu spectrophotometer และ CECIL spectrophotometer ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจวัดอัลบูมิน ระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง Shimadzu spectrophotometer และระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง CECIL spectrophotometer โดยใช้สถิติ Simple linear regression analysis, Bland-Altman bias plot และ Passing-Bablok regression ในการวิเคราะห์ผลการศึกษา

ผลการศึกษา

การทำกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมินด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer

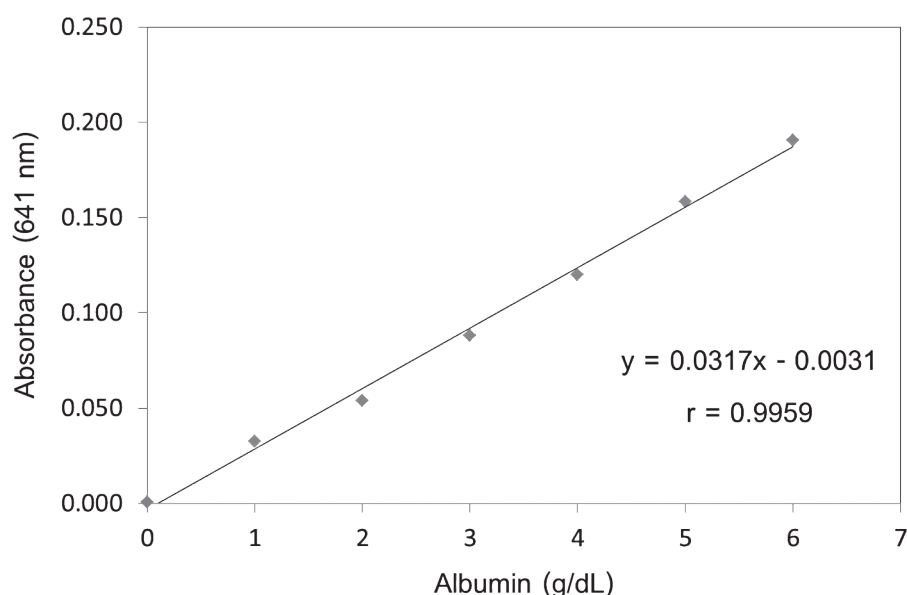
การทำกราฟมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer โดยใช้ protein standard ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 6, 8, และ 10 mg/dL เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (517 nm) ที่วัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer กับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานดังกล่าว พบว่าได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.0142X + 0.0028$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) $r = 0.9957$ กล่าวคือ ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ดังรูปที่ 2 ซึ่งกราฟมาตรฐานนี้ใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer ในการศึกษาค้างนี้



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานที่ได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer และใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยแต่ละจุดบนกราฟเป็นค่าเฉลี่ยจากการตรวจวัดจำนวน 2 ครั้ง กราฟมาตรฐานที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรงครอบคลุมความเข้มข้นของ BSA ตั้งแต่ 1 - 10 g/dL และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9957

การทำกราฟมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer โดยใช้ albumin standard ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 mg/dL เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (641 nm) ที่วัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer กับความเข้มข้นของอัลบูมินมาตรฐานดังกล่าว พบว่าได้สมการ

เส้นตรงคือ $y = 0.0317X - 0.0031$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $r = 0.9959$ กล่าวคือ ค่าความเข้มข้นของอัลบูมินที่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ดังรูปที่ 3 ซึ่งกราฟมาตรฐานนี้ใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของอัลบูมินในการศึกษาค้างนี้



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานที่ได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer และใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของอัลบูมิน โดยแต่ละจุดบนกราฟเป็นค่าเฉลี่ยจากการตรวจวัดจำนวน 2 ครั้ง กราฟมาตรฐานที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรงครอบคลุมความเข้มข้นของ BSA ตั้งแต่ 1 - 6 g/dL และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9959

การทดสอบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (Recovery test)

จากการเติมสารละลายมาตรฐาน ในการตรวจหาโปรตีน ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 3 ระดับ คือ 0, 5 และ 6 g/dL ลงในตัวอย่าง (มีความเข้มข้นของโปรตีน 2.5 g/dL) แล้วทำการตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนหลังการเติมสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer โดยแต่ละความเข้มข้นทำการตรวจวัดซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง (triplicate

assay) และคำนวณความเข้มข้นโดยใช้กราฟมาตรฐานดังกล่าว แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery) ของการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ เท่ากับ 96% และ 98.3% สำหรับความเข้มข้นของโปรตีน 5 และ 6 g/dL ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ เท่ากับ 97.15% ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (Recovery test) ของการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer (ด้วยวิธี Adding method)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้* (g/dL)	ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม (g/dL)	Recovery (g/dL)	%Recovery
1	2.5	-	-	
2	7.3	5.0	4.8	96.0
3	8.4	6.0	5.9	98.3
			เฉลี่ย	97.15

หมายเหตุ: *ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการตรวจวัดซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

สำหรับการหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของการตรวจหาปริมาณอัลบูมิน โดยใช้วิธี adding method ที่ความเข้มข้นของอัลบูมิน 3 ระดับ คือ 0, 2, และ 4 g/dL ลงในตัวอย่าง (มีความเข้มข้นของอัลบูมิน 1 g/dL) แล้วทำการตรวจวัดความเข้มข้นของอัลบูมินหลังการเติมสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer โดยแต่ละความเข้มข้น

ทำการตรวจวัดซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง เช่นเดียวกัน ด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเท่ากับ 120% และ 92.5% สำหรับความเข้มข้นของอัลบูมิน 2 และ 4 g/dL ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเท่ากับ 106.25% ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (Recovery test) ของการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer (ด้วยวิธี Adding method)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้* (g/dL)	ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม (g/dL)	Recovery (g/dL)	% Recovery
1	1.0	-	-	
2	3.4	2.0	2.4	120.0
3	4.7	4.0	3.7	92.5
			เฉลี่ย	106.25

หมายเหตุ: *ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการตรวจวัดซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

การทดสอบความแม่นยำ (Within-run และ Between-run Precision)

เมื่อทำการทดสอบความแม่นยำของเครื่อง Mini-spectrophotometer ในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยการทำ Within-run precision โดยการใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 4, 6, และ 8 g/dL และทำการตรวจวัดแต่ละความเข้มข้นซ้ำกันจำนวน 20 ครั้ง ภายในเวลาเดียวกัน

พบว่ามี %CV เท่ากับ 10.4, 7.5, และ 2.9% สำหรับโปรตีนความเข้มข้น 4, 6 และ 8 g/dL ตามลำดับ ส่วน Between-run precision ซึ่งเป็นการตรวจวัดทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 20 วัน พบว่ามี %CV เท่ากับ 20.5, 17.5 และ 11.6% สำหรับโปรตีนความเข้มข้น 4, 6 และ 8 g/dL ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าความแม่นยำ (Within-run และ Between-run precision) ของการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer

ความเข้มข้นของโปรตีน (g/dL)	Within-run precision*		Between-run precision**	
	SD	%CV	SD	%CV
4 (ต่ำ)	0.7	10.4	0.8	20.5
6 (กลาง)	0.4	7.5	1.1	17.5
8 (สูง)	0.2	2.9	0.9	11.6

หมายเหตุ: * ทำการตรวจวัดแต่ละความเข้มข้นซ้ำกันจำนวน 20 ครั้ง ภายในเวลาเดียวกัน

** ทำการตรวจวัดแต่ละความเข้มข้นทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 20 วัน

SD = Standard deviation, CV = Coefficient of variation

สำหรับการทดสอบความแม่นยำของเครื่อง Mini-spectrophotometer ในการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ด้วยการทำ Within-run precision โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับเช่นเดียวกัน คือ 1, 2 และ 4 g/dL พบว่ามี %CV เท่ากับ 8.4, 5.8 และ 2.7% (n = 20) สำหรับ

อัลบูมินความเข้มข้น 1, 2 และ 4 g/dL ตามลำดับ ส่วน Between-run precision พบว่ามี %CV เท่ากับ 18.1, 13.7 และ 8.3% (n = 20) สำหรับอัลบูมินความเข้มข้น 1, 2 และ 4 g/dL ตามลำดับ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าความแม่นยำ (Within-run และ Between-run precision) ของการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer

ความเข้มข้นของอัลบูมิน (g/dL)	Within-run precision*		Between-run precision**	
	SD	%CV	SD	%CV
1 (ต่ำ)	0.1	8.4	0.2	18.1
2 (กลาง)	0.1	5.8	0.3	13.7
4 (สูง)	0.1	2.7	0.3	8.3

หมายเหตุ: * ทำการตรวจวัดแต่ละความเข้มข้นซ้ำกันจำนวน 20 ครั้ง ภายในเวลาเดียวกัน

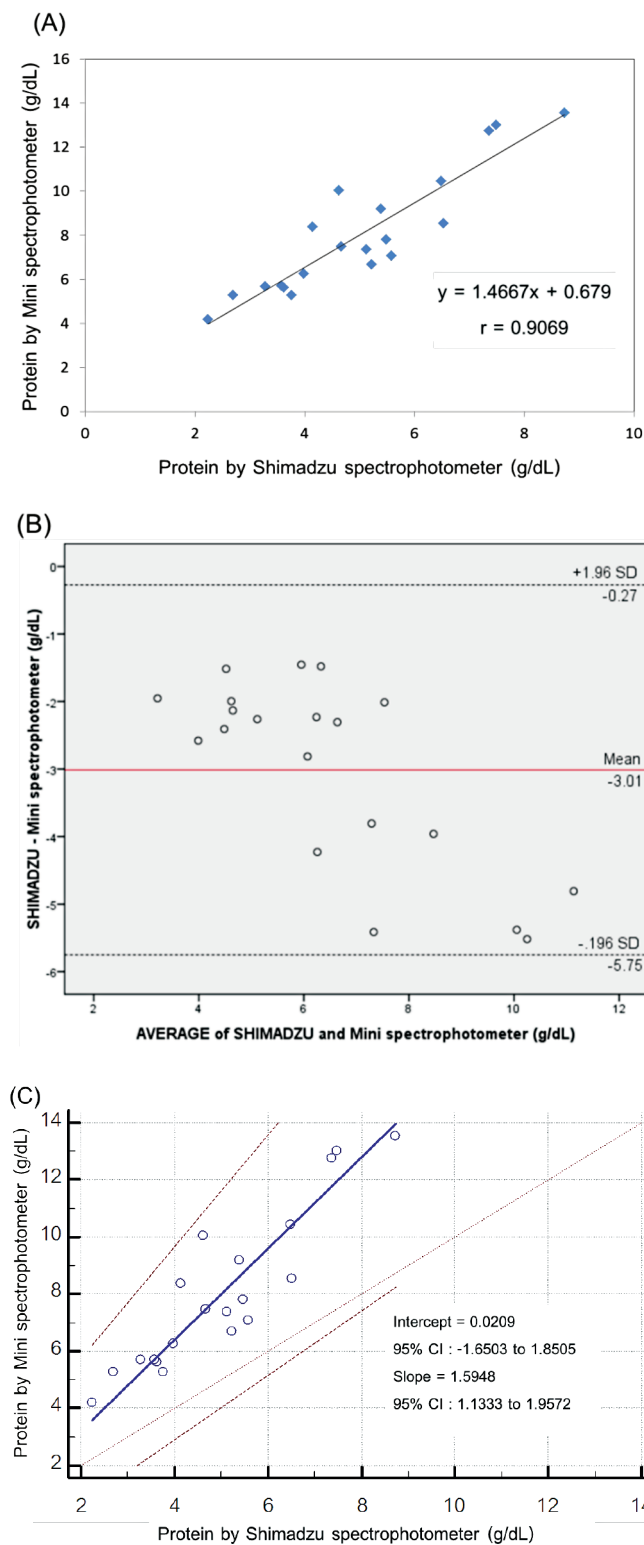
** ทำการตรวจวัดแต่ละความเข้มข้นทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 20 วัน

SD = Standard deviation, CV = Coefficient of variation

อย่างไรก็ตามผลของ Within-run และ Between-run precision ดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากผู้ทำการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบความแม่นยำดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา Within-run precision เพิ่มเติมด้วยเครื่อง Shimadzu spectrophotometer โดยทำการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมินที่มีความเข้มข้นดังกล่าว พบว่า %CV เท่ากับ 2.2, 0.9 และ 0.9% สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ที่ความเข้มข้น 4, 6 และ 8 g/dL ตามลำดับ สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน มี %CV เท่ากับ 2.2, 2.3 และ 1.8% ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 g/dL ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าค่า %CV จากเครื่อง Shimadzu spectrophotometer อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับของ CLIA'88 ดังนั้นแสดงว่าผลของ Within-run และ Between-run precision ที่ได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer มีความน่าเชื่อถือและไม่ได้เป็นผลกระทบจากผู้ทำการตรวจวิเคราะห์ (human error)

การเปรียบเทียบระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับ Shimadzu spectrophotometer

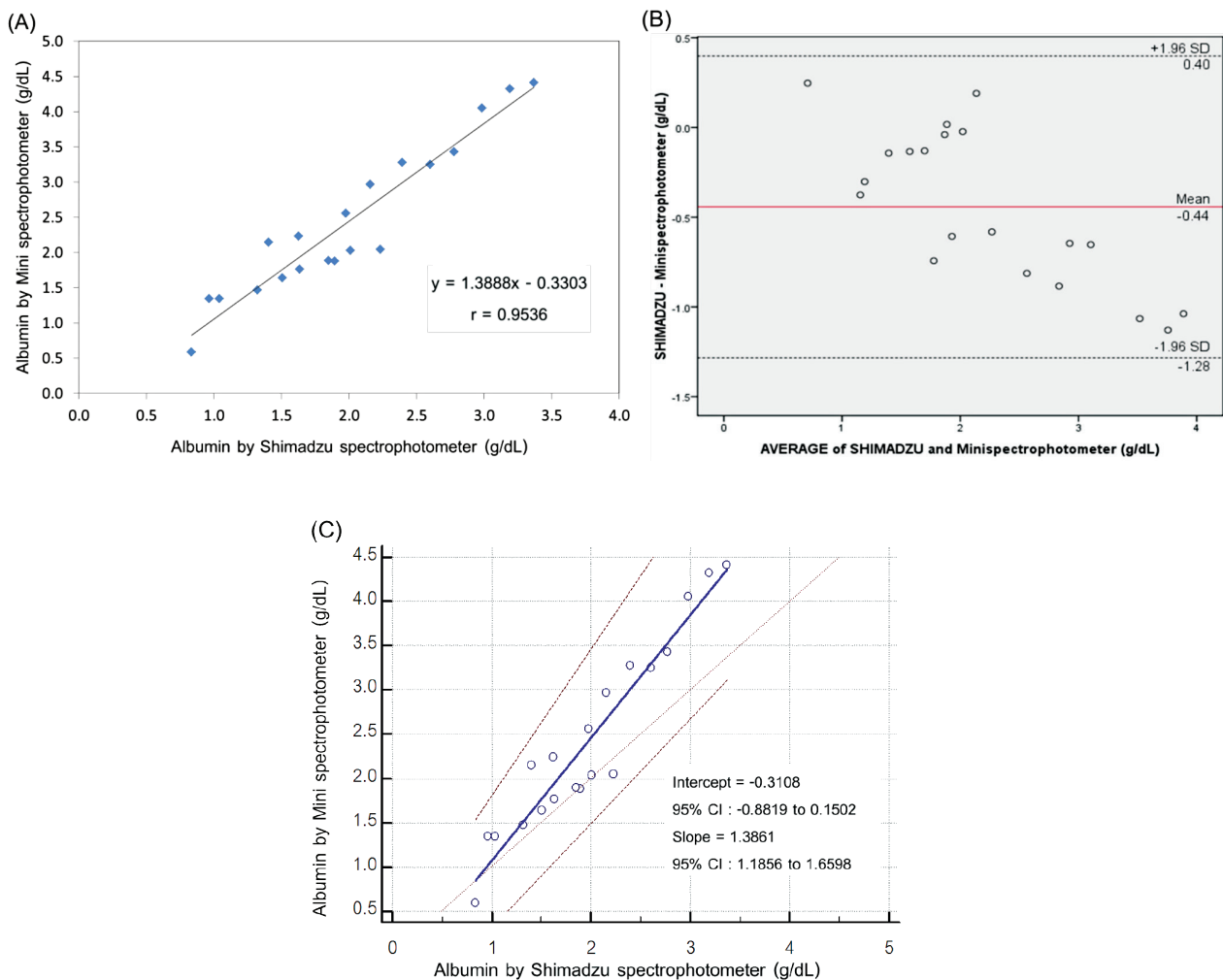
จากการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณของโปรตีน ระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer และ Shimadzu spectrophotometer โดยใช้ตัวอย่างที่ครอบคลุมความเข้มข้นทั้งระดับปกติและผิดปกติ จำนวน 20 ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่ามีความสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์ดี ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Simple linear regression พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9069 ดังรูปที่ 4 (A) โดยค่า r ที่ดีควรมีค่ามากกว่า 0.975³² ซึ่งค่า r ที่ได้นั้นมีค่าที่ต่ำกว่าเกณฑ์ดังกล่าว เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland-Altman bias plot พบว่ามีค่า Mean difference เท่ากับ -3.01 g/dL กล่าวคือ ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer มีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Shimadzu อยู่ 3.01 g/dL แต่อย่างไรก็ตามค่าที่ตรวจวัดได้ในทั้ง 20 ตัวอย่าง ยังอยู่ในช่วง ± 1.96 SD ทั้งหมด (-5.75 ถึง -0.27 g/dL) ดังรูปที่ 4 (B) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing-Bablok regression มีสมการเป็น $y = 1.5948x + 0.0209$ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 4 (C)



รูปที่ 4 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ระหว่างเครื่อง Shimadzu spectrophotometer และ Mini-spectrophotometer โดยใช้สถิติ Simple linear regression (A), Bland-Altman bias plot (B), และ Passing-Bablok regression analysis (C)

การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินระหว่างเครื่อง Shimadzu กับเครื่อง Mini-spectrophotometer โดยใช้สถิติ Simple linear regression พบว่ามีค่า $r = 0.9536$ ดังรูปที่ 5 (A) โดยค่า r ที่นี้ควรมีค่ามากกว่า 0.975 ซึ่งค่า r ที่ได้นั้นมีค่าที่ต่ำกว่าเกณฑ์ดังกล่าว สำหรับการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland-Altman bias plot พบว่ามีค่า Mean difference = -0.44 g/dL กล่าวคือ ค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer มีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Shimadzu อยู่ 0.44 g/dL

อย่างไรก็ตามค่าที่ตรวจวัดได้ทั้ง 20 ตัวอย่าง ยังอยู่ในช่วง ± 1.96 SD ทั้งหมด (-1.28 ถึง 0.40 g/dL) ดังรูปที่ 5 (B) และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing-Bablok regression มีสมการเป็น $y = 1.3861x - 0.3108$ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 5 (C) ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินระหว่างเครื่อง Shimadzu กับเครื่อง Mini-spectrophotometer ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สัมพันธ์กันอยู่ในเกณฑ์ดี และให้ผลการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินดีกว่าการตรวจโปรตีน

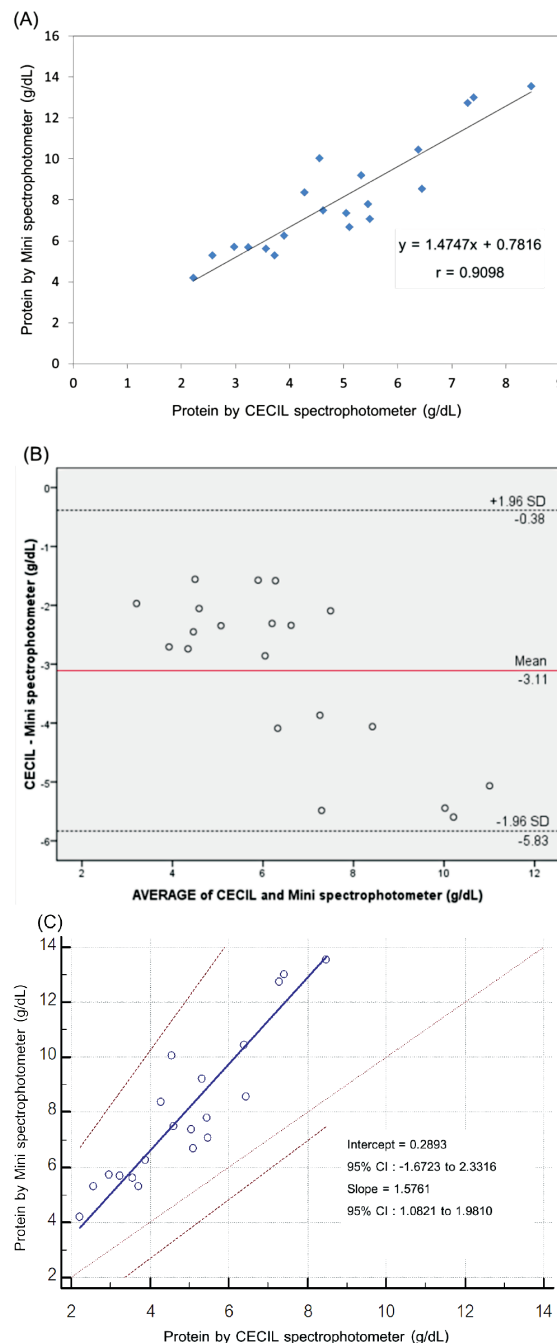


รูปที่ 5 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ระหว่างเครื่อง Shimadzu spectrophotometer และ Mini-spectrophotometer โดยใช้สถิติ Simple linear regression (A), Bland-Altman bias plot (B), และ Passing-Bablok regression analysis (C)

การเปรียบเทียบระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง CECIL spectrophotometer

การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณของโปรตีน ระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer และ CECIL spectrophotometer โดยใช้ตัวอย่างที่ครอบคลุมความเข้มข้นทั้งระดับปกติและผิดปกติ จำนวน 20 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่ามีความสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์ ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Simple linear regression พบว่ามีค่า $r = 0.9098$ ดังรูปที่ 6 (A) โดยค่า r ที่ตีควรมีค่ามากกว่า 0.975 ซึ่งค่า r ที่ได้นั้น

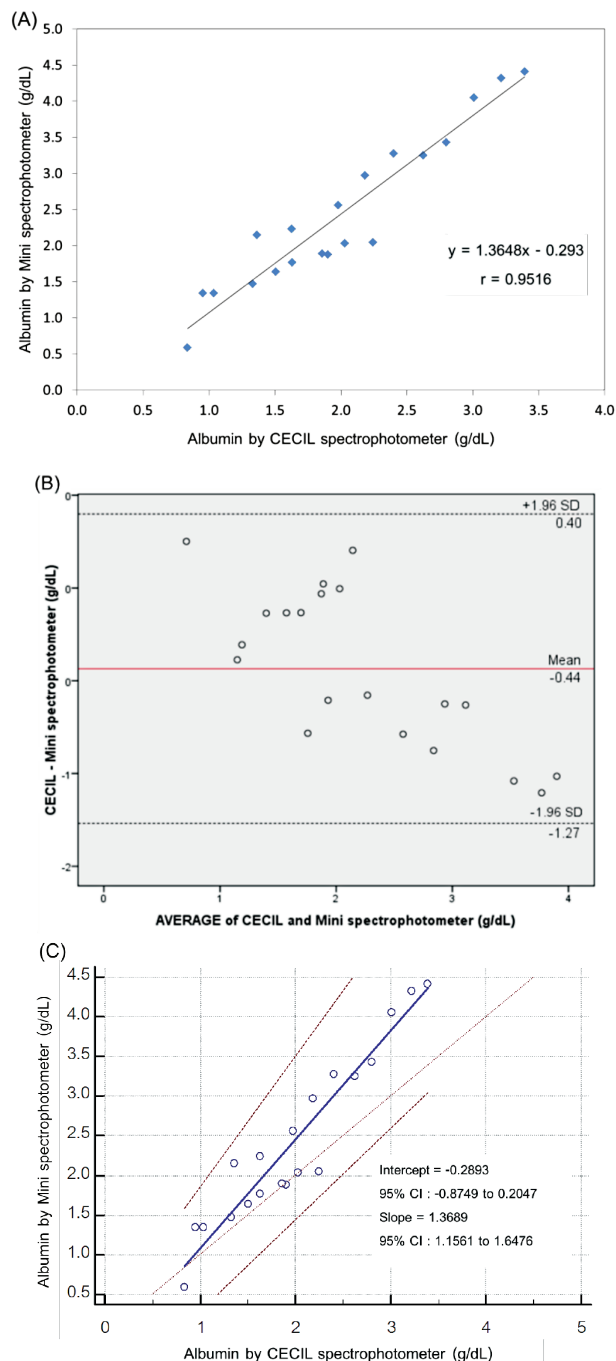
มีค่าที่ต่ำกว่าเกณฑ์ดังกล่าว สำหรับการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland-Altman bias plot พบว่ามีค่า Mean difference = -3.11 g/dL กล่าวคือ ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer มีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง CECIL อยู่ 3.11 g/dL และค่าที่ได้จากการตรวจวัดทั้ง 20 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง ± 1.96 SD ทั้งหมด (-5.83 ถึง -0.38 g/dL) ดังรูปที่ 6 (B) และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing-Bablok regression มีสมการเป็น $y = 1.5761x + 0.2893$ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 6 (C)



รูปที่ 6 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ระหว่างเครื่อง CECIL spectrophotometer และ Mini-spectrophotometer โดยใช้สถิติ Simple linear regression (A), Bland-Altman bias plot (B), และ Passing-Bablok regression analysis (C)

การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินระหว่างเครื่อง CECIL กับเครื่อง Mini-spectrophotometer โดยใช้สถิติ Simple linear regression พบว่ามีค่า $r = 0.9516$ ดังรูปที่ 7 (A) โดยค่า r ที่ีควรมิต่ำกว่า 0.975 ซึ่งค่า r ที่ได้นั้นมีค่าที่ต่ำกว่าเกณฑ์ดังกล่าว สำหรับการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland-Altman bias plot พบว่ามีค่า Mean difference = -0.44 g/dL กล่าวคือ ค่าความเข้มข้นของอัลบูมินที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer มีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง CECIL อยู่ 0.44 g/dL

และค่าที่ได้จากการตรวจวัดทั้ง 20 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง ± 1.96 SD ทั้งหมด (-1.27 ถึง 0.40 g/dL) ดังรูปที่ 7 (B) ซึ่งแสดงว่าค่าการตรวจอัลบูมินจากทั้งสองเครื่องไม่แตกต่างกัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing-Bablok regression มีสมการเป็น $y = 1.3868x - 0.2893$ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 7 (C) ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินระหว่างเครื่อง CECIL กับเครื่อง Mini-spectrophotometer ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สัมพันธ์กันอยู่ในเกณฑ์ดี และให้ผลการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินดีกว่าการตรวจโปรตีน



รูปที่ 7 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ระหว่างเครื่อง CECIL spectrophotometer และ Mini-spectrophotometer โดยใช้สถิติ Simple linear regression (A), Bland-Altman bias plot (B), และ Passing-Bablok regression analysis (C)

วิจารณ์

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่อง Mini-spectrophotometer ในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน โดยทำการศึกษา Within-run และ Between-run precision และ %Recovery ของเครื่อง Mini-spectrophotometer จากผลการทำกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer โดยใช้หลักการ Biuret method กราฟมาตรฐานที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9957 และการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน โดยใช้หลักการ Bromocresol green กราฟมาตรฐานที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9959 โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปร^{33, 34} ในที่นี้คือค่าการดูดกลืนแสงของสารและค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โดยจากค่า r ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะพบว่า ค่าความเข้มข้นของสารละลายที่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นไปตามกฎของ Beer-Lambert^{35 - 37} และสามารถใช้กราฟมาตรฐานดังกล่าวสำหรับการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนหรืออัลบูมินได้อย่างถูกต้อง โดยการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยหลักการ Biuret มีค่าความไว (sensitivity) เท่ากับ 1 g/dL และค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) เท่ากับ 12 g/dL^{3, 4} สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินด้วยหลักการ Bromocresol green มีค่าความไว เท่ากับ 0.3 g/dL และค่าความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 6 g/dL³⁸ ซึ่งการคำนวณความเข้มข้นโดยใช้กราฟมาตรฐานแทนที่จะใช้การคำนวณจากค่าแฟกเตอร์ (Factor) ซึ่งใช้ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐานเพียงค่าเดียวมาคำนวณความเข้มข้นอาจทำให้ค่าที่ได้มีความผิดพลาดได้ง่าย

ในการศึกษาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเป็นการศึกษาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของเครื่อง Mini-spectrophotometer ในการตรวจวัดสารที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้วทดสอบว่าเครื่องสามารถวัดความเข้มข้นของสารได้ดีเพียงใด โดยการทำ Recovery study ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ใช้ด้วยวิธี Adding method คือ การเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงไปนในสารตัวอย่าง จากนั้นทำการหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ หรือ %Recovery^{33, 36, 37} พบว่า ในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน ได้ค่า %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 97.15 และ 106.25% ตามลำดับ จากเกณฑ์การยอมรับของค่า %Recovery ควรอยู่ในช่วง 95 - 105%³⁹ จากผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีนได้ค่า %Recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แสดงว่าการตรวจวิเคราะห์โปรตีนในสารตัวอย่างให้ค่าความเข้มข้นที่

ถูกต้อง แต่สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ที่มีค่า %Recovery ที่เกินช่วงยอมรับนั้นแสดงว่าค่าอัลบูมินที่ตรวจวัดได้มีค่าสูงกว่าความเป็นจริงเล็กน้อย คือ ซึ่งอาจเกิดได้จากขั้นตอนการเตรียมอัลบูมินมาตรฐาน (BSA) ที่นำมาทดสอบ หรือความเข้มข้นของอัลบูมินในตัวอย่างก่อนที่จะเติมสารมาตรฐานลงไปมีค่าสูงกว่าความเป็นจริง (> 1 g/dL) ทำให้ความเข้มข้นที่วัดได้หลังการเติมสารมาตรฐานสูงกว่าที่ควรจะเป็น รวมทั้งอาจมีสารรบกวน (inference) ได้แก่ hemoglobin (> 100 mg/dL) bilirubin (> 20 mg/dL) และ lipid (>1000 mg/dL)^{3, 6} ซึ่งส่งผลต่อการตรวจวัดดังกล่าว

สำหรับในการศึกษาความแม่นยำ (precision) ของเครื่อง Mini-spectrophotometer โดยการทำ Within-run และ Between-run precision คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ต่ำ ปกติ และสูง สำหรับในการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ใช้ความเข้มข้น 4, 6 และ 8 g/dL จากผลการศึกษา ค่า %CV ของ Within-run precision เท่ากับ 10.4, 8.0 และ 4.7% ตามลำดับ และค่า %CV ของ Between-run precision เท่ากับ 23.8, 22.7 และ 15.7% ตามลำดับ จากเกณฑ์การยอมรับค่าความคลาดเคลื่อนของ Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA'88) กำหนดให้ Within-run precision $\leq$ 2.5% และ Between-run precision $\leq$ 3.3%^{39, 40} ดังนั้นค่าความแม่นยำดังกล่าวมีค่าเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน^{1, 2} และ 4 g/dL ได้ค่า %CV ของ Within-run precision เท่ากับ 5.8, 7.2 และ 3.4% ตามลำดับ ค่า %CV ของ Between-run precision เท่ากับ 22.4, 19.6 และ 12.3% ตามลำดับ ซึ่งจากเกณฑ์การยอมรับค่าความคลาดเคลื่อนของ CLIA'88 ดังกล่าว แสดงว่า ค่า %CV สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินจากเครื่อง Mini-spectrophotometer มีค่าเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ เช่นเดียวกัน และจากผลการศึกษา Within-run และ Between-run precision ของเครื่อง Mini-spectrophotometer พบว่า ค่า %CV ที่ได้ลดลง เมื่อระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพิ่มสูงขึ้น กล่าวคือ เครื่อง Mini-spectrophotometer สามารถทำการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีได้ดีที่ความเข้มข้นสูงๆ สาเหตุนี้อาจเกิดจากค่าการดูดกลืนแสงของสารในเครื่อง Mini-spectrophotometer ที่ต่ำกว่าในเครื่อง Shimadzu และ CECIL ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Shimadzu และ

CECIL มีค่าสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer ประมาณ 3 - 5 เท่า จึงทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ระดับต่างๆ มีความคลาดเคลื่อนสูง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงเพียงเล็กน้อยก็จะทำให้ค่าความเข้มข้นของสารมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำสารละลายที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง Shimadzu spectrophotometer ร่วมด้วย โดยทำการหาค่า Within-run precision ซึ่งในการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ให้ค่า %CV เท่ากับ 2.2, 0.9 และ 0.9% ที่ความเข้มข้น 4, 6 และ 8 g/dL ตามลำดับ และการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ให้ค่า %CV เท่ากับ 2.2, 2.3 และ 1.8% ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 g/dL ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าค่าความแม่นยำดังกล่าวผ่านเกณฑ์ที่กำหนดของ CLIA'88 ทั้งหมด จึงสามารถยืนยันได้ว่า การที่มีค่า %CV เกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนดในเครื่อง Mini-spectrophotometer นั้น ไม่ได้เป็นผลกระทบจากผู้ทำการตรวจวิเคราะห์ แต่เป็นผลจากประสิทธิภาพของเครื่อง Mini-spectrophotometer ในการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีดังกล่าว

ในการศึกษาเปรียบเทียบ (Comparison study) ประสิทธิภาพระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง Shimadzu และ CECIL spectrophotometer โดยนำผลจากการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Simple linear regression analysis, Bland-Altman test และ Passing-Bablok regression ซึ่งทั้งสามสถิตินี้ได้มีการนำมาใช้ในการศึกษา Comparison study ในงานวิจัยต่างๆ^{37,41} เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน ระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับ เครื่อง Shimadzu spectrophotometer ด้วยสถิติ Simple linear regression analysis ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9069 และ 0.9536 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินดีกว่าการตรวจวิเคราะห์โปรตีน จากเกณฑ์ค่า r ที่อยู่ในระดับดีควรมีค่า >0.975⁴² จะเห็นได้ว่า ผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีทั้งสองชนิดมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ผลด้วย Bland-Altman test พบว่าการตรวจวิเคราะห์โปรตีนมีความแตกต่างมากกว่าการตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน (mean difference -3.01 vs 0.44 g/dL) จากค่า Mean difference ดังกล่าว แสดงว่าค่าความเข้มข้นของโปรตีนและอัลบูมินที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer

มีค่าสูงกว่า เครื่อง Shimadzu spectrophotometer อยู่ 3.01 และ 0.44 g/dL ตามลำดับ นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing-Bablok regression พบว่าค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน มีสมการเป็น $y = 1.5948x + 0.0209$ และ $y = 1.3861x - 0.3108$ ตามลำดับ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินมีความสัมพันธ์ที่ดีกว่าเนื่องจากค่า Slope มีค่าใกล้เคียง 1 และค่า Intercept มีแตกต่างจาก 0 มากกว่า³¹

สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบ การตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน ระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง CECIL spectrophotometer ก็ให้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่อง Shimadzu spectrophotometer ตามที่ได้กล่าวไปในข้างต้น ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Simple linear regression analysis ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9098 และ 0.9516 สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน ตามลำดับ แสดงว่าผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์โปรตีนอยู่ในเกณฑ์พอใช้ ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์อัลบูมินอยู่ในเกณฑ์ดี และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลด้วย Bland-Altman test ได้ค่า Mean different เท่ากับ -3.11 g/dL และ -0.44 g/dL สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน ตามลำดับ แสดงว่าค่าความเข้มข้นของโปรตีนและอัลบูมินที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง Mini-spectrophotometer มีค่าสูงกว่า เครื่อง CECIL spectrophotometer อยู่ 3.11 และ 0.44 g/dL ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing-Bablok regression พบว่า ค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์โปรตีนและอัลบูมิน มีสมการเป็น $y = 1.5761x + 0.2893$ และ $y = 1.3689x - 0.2893$ ตามลำดับ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินมีความสัมพันธ์ที่ดีกว่า

การตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer ใช้หลอด LED ที่ให้ความยาวคลื่นสูงสุด (peak wavelength) 517 nm โดยความยาวคลื่นที่กำหนดสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วย Biuret method เท่ากับ 540 nm ซึ่งทำให้มีความแตกต่างกันถึง 23 nm จึงอาจส่งผลต่อการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเครื่อง spectrophotometer ทั้งสองเครื่อง ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์อัลบูมิน ใช้หลอด LED ที่ให้ความยาวคลื่นสูงสุด (peak wavelength) 641 nm โดยความยาวคลื่นที่กำหนดสำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินด้วย BCG method เท่ากับ 630 nm ซึ่งทำให้มีความแตกต่าง

กันเพียง 11 nm จึงทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินระหว่างทั้งสองเครื่องมือใกล้เคียงกันมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามการใช้ความยาวคลื่นที่แตกต่างจากที่กำหนดอาจส่งผลทำให้การดูดกลืนแสงของสารชีวเคมีทั้งสองมีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่อง Shimadzu และ CECIL spectrophotometer นอกจากนี้สารแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่นใดความยาวคลื่นหนึ่ง ซึ่งจากกฎของ Beer's ได้อธิบายไว้ว่า แสงที่ปล่อยออกมาจากแหล่งกำเนิด จะต้องเป็นแสงเดี่ยว (Monochromatic radiation) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการใช้แสงเป็นช่วงความยาวคลื่น (Polychromatic radiation) จึงอาจส่งผลให้ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวัดมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่คลาดเคลื่อนไปหรือเกิดจากการเบี่ยงเบนของเครื่องมือ (Instrumental deviation)^{8, 9} ซึ่งสาเหตุดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มตัวขยายสัญญาณ (Amplifier) ในเครื่อง Mini-spectrophotometer เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของการดูดกลืนแสง หรือการใช้หลอด LED ที่มีความยาวคลื่นสูงสุด (peak wavelength) ที่ตรงกับการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีชนิดนั้นๆ ซึ่งจะส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้อง และแม่นยำมากยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่อง Mini-spectrophotometer กับเครื่อง Conventional spectrophotometers ในการตรวจหาปริมาณของโปรตีนและอัลบูมิน โดยประเมินประสิทธิภาพของเครื่องด้วยการทดสอบความแม่นยำ โดยการทำ Within-run และ Between-run การหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery) ผลการตรวจวัดปริมาณโปรตีนและอัลบูมินด้วยเครื่อง Mini-spectrophotometer มีค่า Within-run และค่า Between-run precision มากกว่าเกณฑ์ที่กำหนดสำหรับ %Recovery ของการตรวจวัดโปรตีนอยู่ในเกณฑ์ แต่ %Recovery ของการตรวจวัดอัลบูมินสูงกว่าเกณฑ์

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างเครื่อง Mini-spectrophotometer กับ เครื่อง Shimadzu และ CECIL spectrophotometer พบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น้อยกว่าเครื่อง Conventional spectrophotometers เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ต่ำกว่าเกณฑ์ และค่าที่ตรวจวัดได้สูงกว่า Conventional spectrophotometers เล็กน้อย อย่างไรก็ตามเครื่องต้นแบบที่พัฒนาขึ้นมีข้อดีคือ เครื่องมีขนาดเล็กกะทัดรัด ใช้งานง่าย ซึ่งเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก การตรวจที่ต้องออกพื้นที่ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาเครื่องต้นแบบดังกล่าวต่อไปหากจะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลข R2559C205 และสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) หมายเลข 3.1.3.5.

เอกสารอ้างอิง

1. Sacks DB. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th ed. St. Louis, MO: Saunders; 2008.
2. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical chemistry : techniques, principles, correlations. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
3. Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, Peters T Jr, Schaffer R. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. Clin Chem 1981;27:1642-50.
4. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem 1949;177:751-66.
5. Gregor A, Kostrzewska E, Godorowska W. Determination of serum proteins in the presence of dextran by means of the biuret reaction. Infusionsther Klin Ernahr 1977;4:48-50.
6. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta 1971;31:87-96.
7. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. 1971. Clin Chim Acta 1997;258:21-30.
8. Ojeda CB, Rojas ES. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. Anal Chim Acta 2004;518:1-24.
9. Rojas FS, Ojeda CB. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004-2008. Analytica Chimica Acta 2009;635:22-44.

10. Fantini S, Franceschini MA, Fishkin JB, Barbieri B, Gratton E. Quantitative determination of the absorption spectra of chromophores in strongly scattering media: a light-emitting-diode based technique. *Appl Opt* 1994;33:5204-13.
11. Molinario R, Autilio C, Daloiso PD, et al. Analytical performance of the new analyzer BA 400 Biosystems with LED technology. *Clin Lab* 2014;60:1943-7.
12. Campins Falcó P, Tortajada Genaro LA, Meseger Lloret S, Blasco Gomez F, Sevillano Cabeza A, Molins Legua C. Creatinine determination in urine samples by batchwise kinetic procedure and flow injection analysis using the Jaffé reaction: chemometric study. *Talanta* 2001;55:1079-89.
13. Kim JS, Kim AH, Oh HB, et al. Simple LED spectrophotometer for analysis of color information. *Biomed Mater Eng* 2015;26:S1773-80.
14. Wego A. Accuracy simulation of an LED based spectrophotometer. *Optik* 2013;124:644-9.
15. Fonseca A, Raimundo IM. A multichannel photometer based on an array of light emitting diodes for use in multivariate calibration. *Anal Chim Acta* 2004;522:223-9.
16. Veras G, Silva EC, Lyra WS, Soares SFC, Guerreiro TB, Santos SRB. A portable, inexpensive and microcontrolled spectrophotometer based on white LED as light source and CD media as diffraction grid. *Talanta* 2009;77:1155-9.
17. Liu BF, Ozaki M, Utsumi Y, Hattori T, Terabe S. Chemiluminescence detection for a microchip capillary electrophoresis system fabricated in poly (dimethylsiloxane). *Anal Chem* 2003;75:36-41.
18. Soper SA, Ford SM, Qi S, McCarley RL, Kelly K, Murphy MC. Polymeric microelectromechanical systems. *Anal Chem* 2000;72:642A-651A.
19. Quake SR, Scherer A. From micro- to nanofabrication with soft materials. *Science* 2000;290:1536-40.
20. Ng JM, Gitlin I, Stroock AD, Whitesides GM. Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Electrophoresis* 2002;23:3461-73.
21. Sia SK, Whitesides GM. Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis* 2003;24:3563-76.
22. Qi S, Liu X, Ford S, et al. Microfluidic devices fabricated in poly (methylmethacrylate) using hot-embossing with integrated sampling capillary and fiber optics for fluorescence detection. *Lab Chip* 2002;2:88-95.
23. Songjaroen T, Maturos T, Sappat A, Tuantranont A, Laiwattanapaisal W. Portable microfluidic system for determination of urinary creatinine. *Anal Chim Acta* 2009;647:78-83.
24. Grabowska I, Stadnik D, Chudy M, Dybko A, Brzozka Z. Architecture and method of fabrication PDMS system for uric acid determination. *Sensor Actuat B-Chem* 2007;121:445-51.
25. Verpoorte E. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis* 2002;23:677-712.
26. Pramanpol N, Pummara W, Phimon K, Phatthanakun R. Inventor Mini-spectrophotometer Thailand patent 12727. December, 2015.
27. Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 1972;97:142-5.
28. Woosley JT. Simple method for nonparametric linear regression analysis. *Clin Chem* 1986;32:203.
29. Stöckl D, Dewitte K, Thienpont LM. Validity of linear regression in method comparison studies: is it limited by the statistical model or the quality of the analytical input data? *Clin Chem* 1998;44:2340-6.

30. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999;8:135-60.
31. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
32. Budd JR, Durham AP, Gwise TE, et al. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. 3rd ed. Wayne, PA: CLSI; 2013.
33. Settasatian N. Basic Clinical Chemistry. Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University; 2002.
34. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Eurachem; 1998.
35. Areejitranusorn C. Absorption Spectrophotometer. Khon Kaen: Krungrana Vitthaya Press; 2001.
36. Bonner PLR, Hargreaves AJ. Basic Bioscience Laboratory Techniques: A Pocket Guide: Wiley; 2011.
37. Burtis CA, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics: Elsevier - Health Sciences Division; 2014.
38. Pinnell AE, Northam BE. New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromcresol purple. *Clin Chem* 1978;24:80-6.
39. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, Krouwer JS, Meier K. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline. 2nd ed. Wayne, PA: NCCLS; 2004.
40. Kennedy JW, Carey RN, Coolen RB, et al. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. Wayne, PA: NCCLS; 1999.
41. Ohira S, Kirk AB, Dasgupta PK. Automated measurement of urinary creatinine by multichannel kinetic spectrophotometry. *Anal Biochem* 2009;384:238-44.
42. Krouwer JS, Tholen DW, Garber CC, et al. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. 2nd ed. Wayne, PA: NCCLS; 2002.

Abstract

Comparison of Mini-spectrophotometer and Conventional spectrophotometers Efficiency for Determination of Protein and Albumin

Natpasit Chaianantakul*, Kanchaporn Wutthi*, Nattanit Kamput*, Tippawan Sungkaong*,
Nuttawan Pramanpol**, Watcharapon Pummara**

* Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

** Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima, Thailand

Corresponding author: Dr. Natpasit Chaianantakul, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Mueang, Phitsanulok 65000 E-mail: natpasitc@nu.ac.th

Introduction: Since conventional spectrophotometer is typical large, complex, expensive, and not suitable of infield analysis, therefore a recent portable Mini-spectrophotometer with light emitting diode (LED) light source and microwell has been developed. This prototype has basic principle assay as a conventional spectrophotometer. However, there is no validation study for this prototype. Therefore, the objective of this study is to compare the efficiency of Mini-spectrophotometer and conventional spectrophotometers for detection of protein and albumin.

Method: The efficiency evaluation included Within-run, Between-run, and %Recovery. Comparison study was performed by comparing with Shimadzu and CECIL spectrophotometer.

Result: For protein determination, Within-run precision was 2.9 - 10.4%, Between-run precision was 11.6 - 20.5%, and Recovery was 97.15%. For albumin determination, Within-run precision was 2.7 - 8.4%, Between-run precision was 8.3 - 18.1%, and Recovery was 106.25%. The comparison of protein analysis showed good correlation ($r = 0.9069, 0.9098$) and the differences between the two spectrophotometers are within mean ± 1.96 SD. For albumin analysis, the comparison results showed better correlation ($r = 0.9536, 0.9516$) and no apparent bias for albumin concentration.

Conclusion: Mini-spectrophotometer showed lower accuracy and precision comparing with conventional spectrophotometers. Because the correlation coefficient is lower than 0.975. Even though the mean differences between the two instruments are within mean ± 1.96 SD. Therefore, this prototype needs further development to improve the efficiency for patient sample analysis.

Key words: Mini spectrophotometer, protein, albumin, LED, Microwell