



การประยุกต์วิธีตรวจฟอสฟอรัสโดยไม่ตกตะกอนโปรตีนเพื่อใช้ในการเรียนการสอน Application for phosphorus determination without protein precipitation for use in laboratory teaching

Received: March 13, 2013

Accepted: March 15, 2013

เรียน บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด

การตรวจวัดฟอสฟอรัสในพลาสมาเป็นการตรวจฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ (inorganic phosphorus; Pi) สามารถตรวจได้หลายวิธี แต่ที่นิยม คือ การตรวจวัดฟอสฟอรัสในพลาสมาที่กำจัดการรบกวนจากโปรตีนโดยไม่ตกตะกอนและไม่อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน แต่วัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟอสโฟโมลิบเดต (phosphomolybdate) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสฟอรัสและโมลิบเดตในภาวะกรดที่มีความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร^(1,2) ซึ่งมีใช้ในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทั่วไป⁽³⁾ ในการเรียนการสอนของกลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นักศึกษาตรวจวัดฟอสฟอรัสด้วยวิธี manual ที่กำจัดโปรตีนด้วยการตกตะกอนและวัดความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชัน จึงใช้เวลานานเพราะมีหลายขั้นตอน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะเตรียมน้ำยาตรวจวัดฟอสฟอรัสที่ใช้กับเครื่องวิเคราะห์ขึ้นมาใช้เองและประยุกต์การตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์เป็นการตรวจวัดด้วยวิธี manual

จากการศึกษาพบปัญหาการเตรียมน้ำยาใช้เอง คือ สารกำจัดการรบกวนจากโปรตีนซึ่งบริษัทผู้ผลิตไม่แสดงให้เห็นในส่วนประกอบน้ำยา แต่จากการศึกษาว่า 0.5 % Triton X-100 สามารถกำจัดโปรตีนได้ ส่วนน้ำยาสำหรับตรวจฟอสฟอรัสประกอบด้วยน้ำยาสองชนิด (R1 และ R2) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 0.291 mol/L H₂SO₄, 0.839 mmol/L Ammonium molybdate, 36 mmol/L Sodium chloride, 0.5 % (v/v) Triton X-100 และวิธีการตรวจวัดด้วยวิธี manual แสดงใน ตารางที่ 1 ในขั้นตอนการตรวจวัด ได้กำจัดการรบกวนจากน้ำยาโดยตรวจวัด reagent blank (A_{RB}) และนำค่าการดูดกลืนแสงไปหักจากค่าการดูดกลืนแสงในหลอดตัวอย่าง (A_s) และหลอดสารมาตรฐาน (A_{std}) แต่เนื่องจากการตรวจวัดด้วยวิธีนี้ใช้ตัวอย่างปริมาณมากจึงกำจัดการรบกวนโดยทำ serum blank (A_{SB}) เมื่อตรวจวัดตัวอย่าง ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงหลอดตัวอย่างจึงเท่ากับ $A_s - A_{SB} - A_{RB}$ ส่วนค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน คือ $A_{std} - A_{RB}$

¹ นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ² กลุ่มวิชาเคมีคลินิก, คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น,

³ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

¹ 4th year student, Faculty of Associated Medical Sciences, ² Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, ³ Centre for Research and Development in Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University

* ผู้รับผิดชอบบทความ

* Corresponding author: (e-mail: lpromdee@yahoo.com)

ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบ phosphomolybdate มีค่าการดูดกลืนสูงสุดที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร (รูปที่ 1ก) ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เนื่องจากเป็นความยาวคลื่นที่ไม่มีใช้ในเครื่องวิเคราะห์แบบ photometer ผู้วิจัยจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และพบว่าที่ความยาวคลื่นนี้ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่างกันเมื่อฟอสฟอรัสต่างกันสามระดับ และสารประกอบที่เกิดขึ้นมีความคงตัวอย่างน้อย 120 นาที โดยที่ค่าการดูดกลืนไม่เปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันที่แรกถึงวันที่ 120 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) การตรวจวัดด้วยวิธีนี้มีความเป็นเส้นตรง (linearity) ถึง 40 มก./ดล. (รูปที่ 1 ข) และพบว่าความเข้มข้นตั้งแต่ 50 มก./ดล. ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นประมาณ 4 O.D. ซึ่งไม่อยู่บนเส้นตรงและค่าไม่เปลี่ยนแปลงจนกระทั่งถึง 100 มก./ดล. (รูปที่ 1ข) และกราฟมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0- 10 มก./ดล. มีความสัมพันธ์กันดีกับค่าการดูดกลืนแสง ($r^2 = 0.99$) (รูปที่ 1ค) ผลประเมินความถูกต้องและความแม่นยำพบว่า การตรวจวัดสารควบคุมสองระดับอยู่ในช่วงค่าเป้าหมาย โดยช่วงค่าต่ำได้ค่า 3.6 มก./ดล. (ค่าเป้าหมาย 3.2 – 3.9 มก./ดล.) ช่วงค่าสูงได้ค่า 6.9 มก./ดล. (ค่าเป้าหมาย 3.2 – 3.9 มก./ดล.) % bias เท่ากับ 2.86 และ 1.47 ตามลำดับ ผลการหา imprecision พบว่ามีค่า % CV แบบ within-run และ between-run เท่ากับ 2.2 และ 3.6 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ตามข้อกำหนดของ CLIA⁽⁴⁾

เมื่อนำวิธีการตรวจวัดที่ได้ไปเทียบกับผลตรวจในตัวอย่างผู้ป่วย 155 ราย ที่ได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ตรวจวัดด้วยน้ำยาสำเร็จรูปหลักการเดียวกันแต่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Cobas 501 พบว่าการตรวจวัดทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($r^2 = 0.968$; $P < 0.001$) ค่า mean (SD) ของวิธี manual และเครื่องวิเคราะห์มีค่า 4.0 (1.5) และ 3.9 (1.4) ตามลำดับ และมีค่าไม่แตกต่างกัน ($P = 0.105$) (รูปที่ 1ง) เมื่อนำวิธีดังกล่าวไปตรวจหาระดับฟอสฟอรัสในคนปกติ 94 ราย พบว่า mean $\pm$ 2SD เท่ากับ 2.1 – 4.0 มก./ดล. ผลการศึกษาแสดงว่าน้ำยาเตรียมเองและตรวจวัดด้วยวิธี manual มีความน่าเชื่อถือและให้ผลการตรวจวัดไม่แตกต่างจากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติสามารถนำมาใช้ในการเรียนการสอนต่อไปได้

ขอแสดงความนับถือ

ฤทัยรัตน์ นาดิ¹, ภัทชญา ชัยประเสริฐ¹, วิสุทธิ์ กังวานตระกูล²,
ศิริพร ประงวิทยา^{2,3}, ลิ้มทอง พรหมดี² *

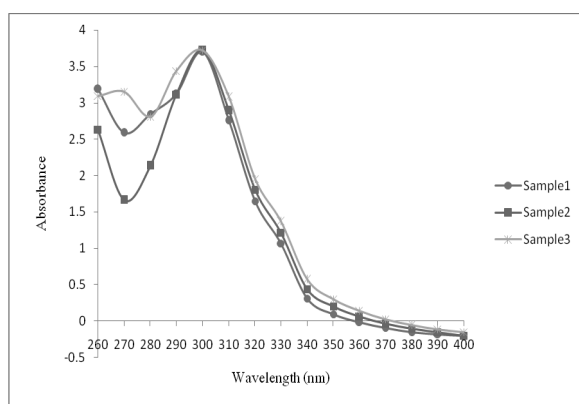
Rutairat Nadee¹, Phatchaya chaiprasert¹, Wisut Kangwantrakul²,
Siriporn Proungvitaya^{2,3}, Limthong Promdee² *

เอกสารอ้างอิง

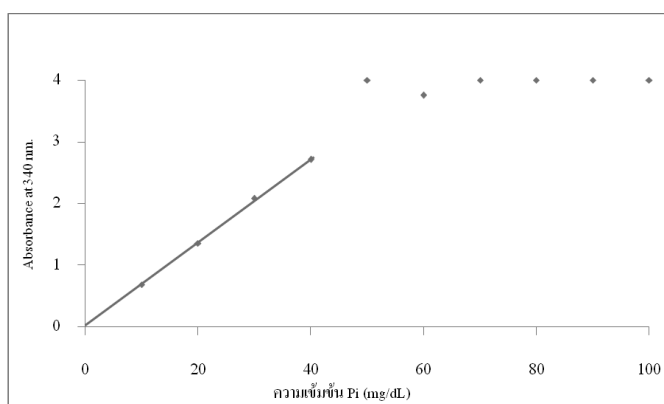
1. Munoz MA, Balon M, Fernandez C. Direct determination of inorganic phosphorus in serum with a single reagent. Clin Chem 1983; 29: 372-4.
2. Kyaw A, Maung K, Toe T. Determination of inorganic phosphate with molybdate and Triton X-100 without reduction. Anal Biochem 1985; 145: 230-4.
3. ใบแทรกการตรวจวัด PHOS2 ของบริษัท Roche ตรวจด้วยเครื่อง Cobas c 501 systems ปี 2006
4. อมรินทร์ ปรีชาวุฒิ. การวิเคราะห์ค่า Inorganic Phosphorus-UV method. [Online]. [2010] [cited 2013 Feb 5]; Available form: URL:<http://www.eqacenter.com/2010/09/inorganic-phosphorus-uv.html>

ตารางที่ 1 น้ำยาตรวจวิเคราะห์ฟอสฟอรัสโดยไม่ตกตะกอนโปรตีนและวิธีการตรวจแบบ manual

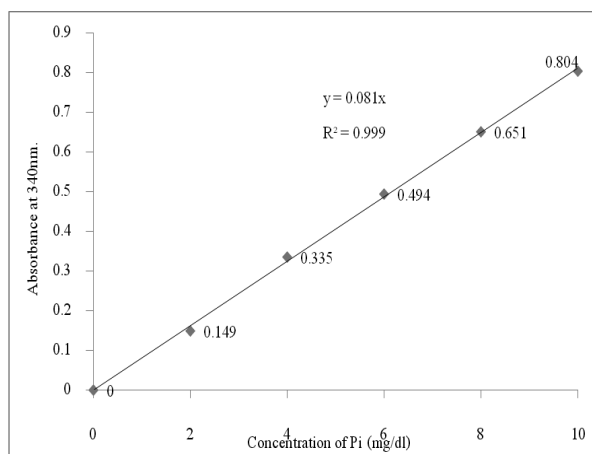
น้ำยาชนิดที่ 1 (R1)	0.36 M H ₂ SO ₄ , 0.62 % (v/v) Triton X-100
น้ำยาชนิดที่ 2 (R2)	3.5 mmol/l Ammonium molybdate, 150 mmol/l Sodium chloride in R1
ขั้นตอนการตรวจวัด	1) เติมน้ำยา R1 ปริมาตร 1,800 ไมโครลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 560 ไมโครลิตร ทุกหลอด 2) เติมน้ำมาตรฐานหรือตัวอย่างซีรัมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ถ้าเป็นซีรัมตัวอย่างให้เพิ่มหลอด sample blank ด้วย ส่วนหลอดที่เป็น reagent blank ให้เติมน้ำกลั่นแทน 3) เติมน้ำยา R2 ปริมาตร 760 ไมโครลิตร ทุกหลอด (ยกเว้นหลอด sample blank ให้เติมน้ำยา R1 แทน) ผสมให้เข้ากันและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที 4) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยใช้ น้ำกลั่นปรับศูนย์



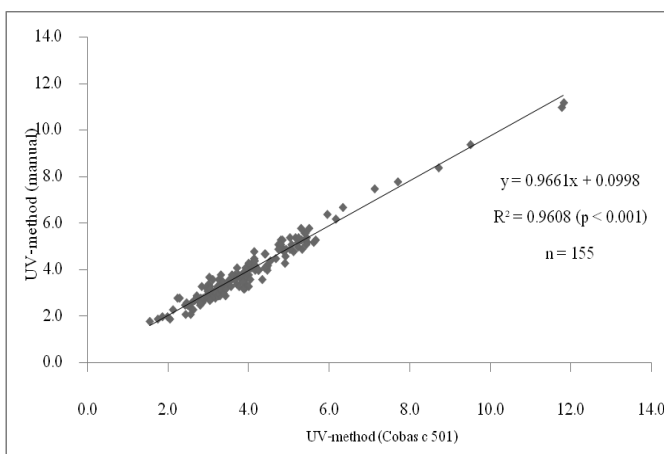
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 1 ผลการตรวจวัดฟอสฟอรัสด้วยวิธีไม่ตกตะกอนและตรวจวัดด้วยวิธี manual (ก) การดูดกลืนแสงของ phosphomolybdate ที่ความยาวคลื่น 240-400 นาโนเมตร (ข) ความเป็นเส้นตรงถึง 40 มก./ดล. (ค) กราฟมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้นถึง 10 มก./ดล. และ (ง) ความสัมพันธ์การตรวจด้วยวิธี manual และเครื่อง Cobas c 501 ในตัวอย่างผู้ป่วย 155 ราย