

นิพนธ์ฉบับ

การศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตรวจหา lactate ในเลือดด้วยเทคนิค HPLC กับ เทคนิค enzymatic assay

เจียรนัย ชันติพงศ์*, วารุณี จิตรอารี**, วิรัช นิรารุทธ*, ทศนา หลิวเสรี*, วีระวรรณ เรืองยุทธการณ***

บทคัดย่อ

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตรวจหาระดับแลคเตทในเลือดด้วยเทคนิค high pressure liquid chromatography (HPLC) แบบ UV detector ที่พัฒนาขึ้นกับ เทคนิค enzymatic assay ที่ใช้เป็นประจำในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำวิธีการตรวจด้วยเครื่อง HPLC ที่พัฒนาได้ตรวจหาระดับแลคเตทในเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้รับยาต้านไวรัสกลุ่ม nucleoside reverse-transcriptase (NRTIs) ที่ใช้กันมากในปัจจุบัน กลุ่มตัวอย่างเป็นเลือดผู้ป่วยทั่วไป วิเคราะห์ปริมาณแลคเตทด้วยวิธี enzymatic assay จำนวน 30 ราย เปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC แบบ UV detector ผลการตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วยทั้ง 30 รายด้วยวิธี HPLC แตกต่างจากการตรวจวัดด้วยวิธี enzymatic assay ($p > 0.05$) และเมื่อดูจากค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.E.M.) ของปริมาณแลคเตทที่วิเคราะห์จากวิธี HPLC และ enzymatic assay = 4.74 ± 0.67 mM และ 4.20 ± 0.38 mM ตามลำดับ เห็นได้ว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับแลคเตทสูงกว่า enzymatic assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการพัฒนาวิธีของเทคนิค HPLC และ Enzymatic assay มีดังนี้ ค่า Intraday – precision มีค่าความแปรปรวน = 4.76%/6.82%, Interday–precision มีความแปรปรวน = 5.67%/6.44%, ค่า accuracy = 99.38%/91.10% สรุปได้ว่าการตรวจด้วยวิธี HPLC ที่พัฒนาได้มีความถูกต้องและความแม่นยำสูงกว่า enzymatic assay โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นทุนน้ำยามีค่าใช้จ่ายน้อยและไม่มีปัญหาการหมดอายุของน้ำยา สามารถใช้เฝ้าระวังกลุ่มผู้ป่วยเอชไอวีที่ได้รับยา NRTIs และการวินิจฉัยของแพทย์ ทำให้ลดกลุ่มผู้ป่วยที่จะพัฒนาเป็น lactic acidosis หรือ ภาวะเป็นกรดในร่างกายได้วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2552; 42: 37-49.

คำรหัส: แลคเตท, lactic acidosis, HPLC, Enzymatic assay, NRTIs

* สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 เชียงใหม่

** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract: The comparative of serum lactate determination by using HPLC and enzymatic assay technique**Jiaranai Khantipongse*, Warunee Jit-Aree**, Wirat Niraroot*, Tasana leusaree*, Werawan Ruangyuttikarn *****

The purposes of this study were to compare the results of determination of lactate concentration in plasma measured by the developed high pressure liquid chromatography method (HPLC) and enzymatic assay, which is a routine method used in a general hospital laboratory. The method developed was used to measure the lactate level in HIV patients being treated with NRTIs. Thirty blood samples from the central laboratory, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were collected for testing the developed HPLC method compared to the enzymatic assay. In this study, the comparative results between both techniques showed correlation with statistical difference (paired t-test, $p > 0.05$). Thirty blood samples measured by the HPLC method, showed lactate concentrations at 4.74 ± 0.67 mM (mean $\pm$ S.E.M), and enzymatic assay at 4.20 ± 0.38 mM. Therefore, the HPLC method could be used to obtain a higher lactate level than that of the enzymatic assay.

The comparative result of precision and accuracy between the developed HPLC method and enzymatic assay demonstrated that intra-day precision had a coefficient variance = 4.76% and 6.82%, respectively. The interday-precision was at 5.67% and 6.44%. In conclusion, this developed HPLC is less expensive for reagents, has longer shelf-life, and can be used with high precision and accuracy for measuring lactate concentrations in HIV infected patients who are being treated with NRTIs. The lactate measurement would be very useful for surveillance in order to help prevent lactic acidosis in HIV infected patients. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2009; 42: 37-49.

Keywords: lactate, lactic acidosis, HPLC, Enzymatic assay, NRTIs,

* Office of Disease Prevention and Control 10, Chiang Mai

** Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University

*** Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

บทนำ

ปัจจุบันการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีมักใช้ยาต้านไวรัสเอดส์สามชนิดพร้อมกันและเป็นสูตรมาตรฐานที่ใช้ในการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้ผลดีที่สุด เรียกว่า

highly active antiretroviral therapy (HAART) ซึ่งในโครงการการเข้าถึงบริการยาต้านไวรัสเอดส์ระดับชาติโดยกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข เริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 และในปี พ.ศ. 2547 กรมควบคุม

โรคกำหนดแนวทางการให้ยาต้านไวรัสเอดส์แก่ผู้ติดเชื้อเอชไอวีในโครงการ คือการใช้ยาสูตรพื้นฐานสำหรับผู้ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งทุกสูตรประกอบด้วยยาในกลุ่ม nucleoside reverse-transcriptase (NRTIs) ได้แก่ ddI (stavudine), AZT (zidovudine) และ 3TC (lamivudine) ยาสูตรพื้นฐานนี้ให้ครอบคลุมผู้ป่วยในโครงการทุกรายทั่วประเทศ ในจังหวัดเชียงใหม่ มีผู้ป่วยที่กินยา 4,012 ราย (รายงานประจำเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2550) แม้ว่า การรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี ด้วยยาต้านไวรัสเอดส์ สูตร potent combination antiretrovirus นี้ จะช่วยลด morbidity และ mortality เป็นการช่วยยืดอายุผู้ป่วย แต่ บางครั้งทำให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงได้

Hyperlactatemia และ lactic acidosis คือผลข้างเคียงที่เกิดจากการรักษาด้วยยาต้านไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม NRTIs รวมทั้ง ยาในสูตร highly active antiretroviral therapy (HAART)

ภาวะ lactic acidosis จากการให้ยาต้านไวรัสกลุ่ม NRTIs เกิดขึ้นจากพิษต่อ mitochondria โดยการยับยั้ง DNA polymerase gamma ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ reverse transcriptase ทำให้ mitochondrial DNA ผิดปกติ ผลคือยับยั้ง oxidative phosphorylation ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของอาการอื่นๆ รวมด้วย mitochondria มีบทบาทสำคัญต่อ cellular metabolism และการสร้างพลังงาน ส่งผลให้การเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรียค่อนข้างกว้าง และรวมไปถึงระบบอวัยวะต่างๆ มากมายเช่น ตับ ตับอ่อน กล้ามเนื้อลาย หัวใจ ระบบประสาท ไชมันไต ผิวหนัง กระดูก และ ไชกระดูก

Lactic acidosis คือภาวะที่ผู้ป่วยมี arterial pH ≤ 7.35 และปริมาณแลคเตทที่เจาะจากเลือดดำ > 5 mmol/L ภาวะที่มีการสะสมของแลคเตทในเลือดสูงขึ้นเรียกว่า hyperlactatemia หรือ lactic acidemia และพัฒนาเป็น lactic acidosis ซึ่ง hyperlactatemia นั้นมี prevalence = 15-35% ในผู้ป่วยที่ได้รับยา NRTIs และอุบัติการณ์ของ ภาวะแลคเตทในเลือดสูงโดยมีอาการร่วมและภาวะเป็นกรดในเลือด (lactic acidosis) พบประมาณ 13 รายต่อ 1,000 รายต่อปีในกลุ่มที่ได้รับยา NRTIs นอกจากนี้พบว่าภาวะแลคเตทในเลือดสูงอย่างรุนแรงมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 57 การรักษา

เฉพาะด้วย cofactors ของกระบวนการหายใจภายใน เซลล์ทำให้อัตราการตายลดลง อย่างไรก็ตามระดับแลคเตทที่สูงมากเกินไป 10 mmol/L มักมีอัตราการตายที่สูงร่วมด้วย

ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลส่วนใหญ่ไม่มีการตรวจวัดระดับแลคเตทในเลือดโดยตรง แต่ใช้ค่า anion gap เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัย กล่าวคือค่าไบคาร์บอเนตในเลือดต่ำ ซึ่งในระดับโรงพยาบาลชุมชนบางแห่งยังไม่สามารถตรวจหาค่า electrolyte ดังกล่าวได้ ดังนั้นในการวินิจฉัยเบื้องต้นจึงพิจารณาจากอาการเป็นสำคัญ ซึ่งเป็นการวินิจฉัยที่ล่าช้าและแพทย์ต้องมีความระมัดระวังในการวินิจฉัยตามอาการ เห็นได้ว่าผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสม ถูกต้อง เป็นสิ่งจำเป็น สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จึงพัฒนาการตรวจหาระดับแลคเตทในเลือดด้วยวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความถูกต้องแม่นยำสูง ช่วยในการวินิจฉัยการเกิดพยาธิสภาพจากภาวะ lactic acidosis จากการให้ยาในกลุ่ม NRTIs ให้กับผู้ติดเชื้อ/ผู้ป่วยเอดส์ในพื้นที่รับผิดชอบ

การศึกษานี้ต้องการพัฒนาวิธีตรวจหาระดับ lactate ในเลือดด้วยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการทั่วไปคือ enzymatic assay เป็นการใช้เครื่อง HPLC ให้เป็นประโยชน์สูงสุด และช่วยเหลือแพทย์ให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้ตั้งแต่เริ่มแรก เพื่อช่วยชะลอความรุนแรงและลดอัตราการตายจากภาวะ lactic acidosis ตลอดจนช่วยให้ผู้ติดเชื้อผู้ป่วยเอดส์มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

โดยวิธี enzymatic assay เลือกใช้วิธีเดียวกับหน่วยปฏิบัติการเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วิธีการวิเคราะห์ใช้ชุดตรวจสำเร็จ (Lactate PAP) Enzymatic determination of lactate (BioMerieux) นำวิธีตรวจหาแลคเตทด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาได้มาตรวจหาปริมาณแลคเตทในเลือด และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับ enzymatic assay จากนั้นนำวิธีการตรวจวัดปริมาณแลคเตทในพลาสมาที่ได้จากการพัฒนานี้ ไปใช้ตรวจวินิจฉัยภาวะ lactic acidosis ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยา NRTIs เพื่อการเฝ้าระวังได้รวมทั้งถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ lactate ในเลือดด้วยเทคนิค HPLC กับ เทคนิค enzymatic assay

ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้เทคโนโลยีใหม่สำหรับการตรวจวัดระดับ lactate ในพลาสมา เพื่อใช้เสริมการวินิจฉัยและรักษาผู้ติดเชื้อ/ผู้ป่วยเอดส์ พร้อมกับถ่ายทอดให้แก่ห้องปฏิบัติการและหน่วยงานสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดสำหรับการศึกษา ใช้พลาสมาที่เหลือจากการตรวจปริมาณแลคเตทจากหน่วยปฏิบัติการเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ส่งตรวจแลคเตทในเลือดซึ่งเก็บในหลอดที่มีฟลูออไรด์ออกซาเลทอยู่แล้ว จำนวนเท่าที่ใช้ตรวจหาปริมาณแลคเตทจริงรวม 2 วิธี คือสำหรับ enzymatic method 500 ul และสำหรับเทคนิค HPLC 100 ul รวมเป็นรายละเอียดประมาณ 1 ml โดยมีลำดับขั้นตอนการทำงานดังนี้

- ส่งเอกสารโครงการวิจัยเพื่อรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย กรมควบคุมโรค
- ทำหนังสือขออนุญาตใช้เลือดและขอคำยินยอมจากผู้ดูแลส่งตรวจจากหน่วยปฏิบัติการเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- กำหนดวิธีการจัดการกับตัวอย่างเลือดคือ

■ การนำส่งสิ่งส่งตรวจ

เก็บในหลอดเลือดที่มีฟลูออไรด์ออกซาเลท ส่งห้องปฏิบัติการและทำการตรวจ ภายใน 24 ชั่วโมง หรือปั่นแยกพลาสมาภายใน 30 นาทีแล้วเก็บพลาสมาไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะทำการตรวจ

■ การทำลายตัวอย่าง

เมื่อสิ่งส่งตรวจมาถึงห้องปฏิบัติการ นำเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทำการตรวจ วัด

หลังจากเสร็จสิ้นการตรวจวัดแล้ว ทำลายตัวอย่างเลือดที่เหลือทั้งหมดโดยการนิ่งมาเชื้อ ภายในวันนั้นทันที ก่อนกำจัดตามวิธีของขยะติดเชื้อ

■ ขนาดตัวอย่างสำหรับงานวิจัย

ทำ pilot study โดยใช้ขนาดตัวอย่างในการทดสอบ 30 คู่

2. การพัฒนาวิธี HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารแลคเตทในพลาสมาและเปรียบเทียบกับวิธีที่ทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการ (enzymatic method)

ผลการศึกษาสภาวะการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ใช้สภาวะการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC กับ UV detector ที่พัฒนาขึ้น การตรวจวัดระดับแลคเตทในเลือดด้วยวิธีนี้ สามารถตรวจหาปริมาณแลคเตทได้ ภายใต้การใช้เครื่องมือและสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

(1) วัสดุอุปกรณ์

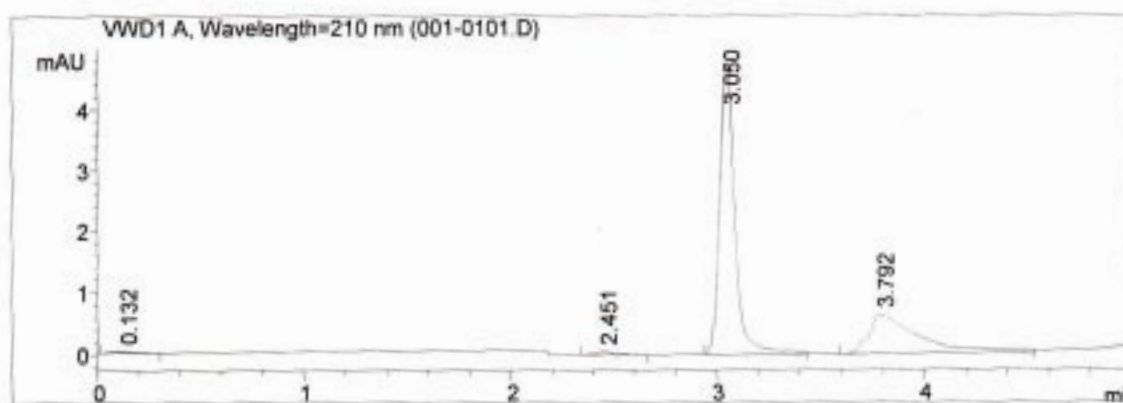
- HPLC reverse phase C18 column stablebond
- เครื่อง HPLC ชนิด UV detector series 1100
- pH meter
- Lactic acid (Lithium L-lactate) Sigma
- Phosphoric acid
- Deionized water
- Acetonitrile (CH₃CN) for HPLC grade, J.T.

Baker

- Sodium dihydrogenphosphate

(2) สภาวะที่เหมาะสม

- Mobile phase isocratic 100% 20 mM sodium dihydrogenphosphate buffer, pH 2.63 Flow rate 0.8 ml/min
- Injection volume 100 ul
- Column Temperature 35 °C
- Wavelength 210 nm



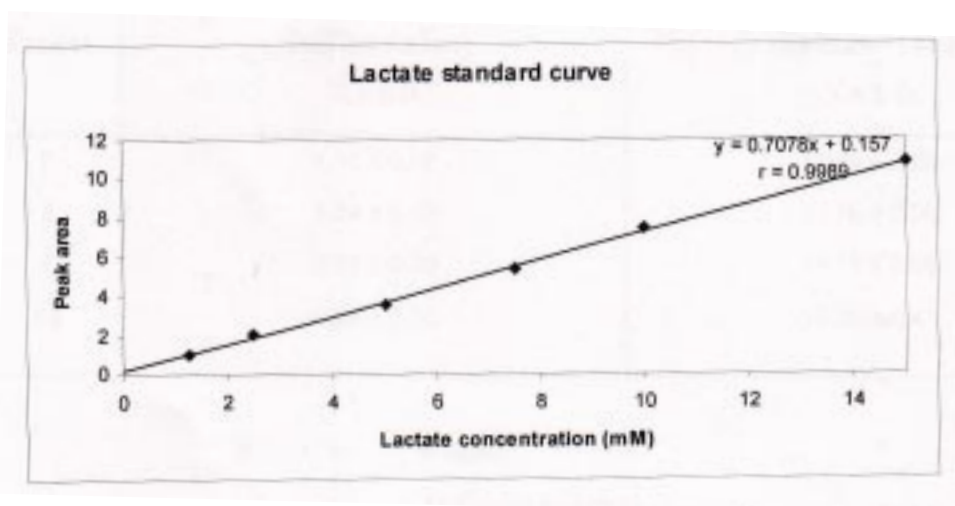
รูปที่ 1 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานแลคเตทความเข้มข้น 20 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ retention time 3.05 นาทีที่แยกด้วยสารละลายที่เหมาะสมที่สุด

ผลการประเมินวิธี HPLC ที่ได้พัฒนาแล้ว

แสดงผล linearity ที่ดีมาก ได้ค่าสัมประสิทธิ์

สหสัมพันธ์ 0.9989 Calibration curve ของสารมาตรฐาน

แลคเตท ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25-15.00 มิลลิโมลต่อลิตร



รูปที่ 2 Calibration curve ของสารมาตรฐานแลคเตท ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25-15.00 มิลลิโมลต่อลิตร วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่มี sodium dihydrogenphosphate buffer 20 มิลลิโมลต่อลิตร pH 2.63 เป็นสารละลายเคลื่อนที่ flow rate 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้คอลัมน์ reversed-phase C18 stable bond อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความยาวคลื่นแสงเครื่องวัด UV-VIS 210 นาโนเมตร

ผลการศึกษาความคงตัวของแลคเตทในพลาสมา
ตัวอย่าง

โดยใช้ pool plasma จำนวน 20 ตัวอย่างจาก
หลอดเลือดเก็บเลือด EDTA tube บั่นแยกพลาสมา
แบ่งใส่หลอดที่มีฟลูออไรด์ออกซาเลท (F/OX) หลอดละ
2 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20°C

Freeze and thaw stability: 3 cycle

การละลายตัวอย่างพลาสมาที่แช่แข็งไว้ 3 ครั้ง
ตั้งแต่วันที่ 0, 3, 7 และ 14 (ตารางที่ 1) พบว่าปริมาณ
แลคเตทมีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อ freeze/thaw หลายครั้ง
แลคเตทที่มีค่าต่ำลดลง 27.6% ในขณะที่แลคเตทที่มีค่า
สูงลดลง 19.6% ภายใน 14 วัน

ตารางที่ 1 ปริมาณแลคเตทจากตัวอย่างที่ทดสอบ Freeze & Thaw Stability วิเคราะห์ด้วย HPLC จำนวน 3 ครั้ง ต่อ 1 การทดลอง

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	ปริมาณแลคเตทจากตัวอย่างที่มีค่าต่ำ (มิลลิโมลต่อลิตร) $\bar{X} \pm \text{S.D.}$	ปริมาณแลคเตทจากตัวอย่างที่มีค่าสูง (มิลลิโมลต่อลิตร) $\bar{X} \pm \text{S.D.}$
0	1.16 ± 0.07	12.69 ± 0.05
3	1.39 ± 0.03	11.76 ± 0.59
7	0.87 ± 0.09	11.13 ± 0.26
14	0.84 ± 0.03	10.20 ± 0.41

$$\begin{aligned}\bar{X} &= \text{ค่าเฉลี่ย} \\ \text{S.D.} &= \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน} \\ n &= 3\end{aligned}$$

Short term temperature stability: 4-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 2 แสดงผลการเก็บตัวอย่างด้วยหลอดที่มีฟลูออไรด์ออกซาเลทเป็นสารกันเลือดแข็ง สามารถ

ช่วยรักษาระดับแลคเตทให้คงที่ โดยแลคเตทที่มีค่าต่ำมีค่าเพิ่มขึ้น 27.6% ส่วนแลคเตทที่มีค่าสูงมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง

เมื่อเก็บพลาสมาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ปริมาณแลคเตทจากตัวอย่างที่ทดสอบ Short-Term Temperature Stability

การทดลอง ครั้งที่	ปริมาณแลคเตทจากตัวอย่างที่มีค่าต่ำ (มิลลิโมลต่อลิตร) $\bar{X} \pm \text{S.D.}$	ปริมาณแลคเตทจากตัวอย่างที่มีค่าสูง (มิลลิโมลต่อลิตร) $\bar{X} \pm \text{S.D.}$
1 (0 hr)	1.16 ± 0.09	12.69 ± 0.05
2 (2 hr)	1.47 ± 0.04	11.63 ± 0.53
3 (6 hr)	1.43 ± 0.07	12.41 ± 1.04
4 (12 hr)	1.37 ± 0.04	13.34 ± 0.69
5 (24 hr)	1.48 ± 0.05	12.69 ± 0.05

$$\begin{aligned}\bar{X} &= \text{ค่าเฉลี่ย} \\ \text{S.D.} &= \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน} \\ n &= 3\end{aligned}$$

Long term stability

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่แช่แข็งรอตรวจวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกับการเก็บตัวอย่างเพื่อรอตรวจทางห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่วันที่ 0, 3, 7 และ 14 ตามลำดับ พบว่าในตัวอย่างพลาสมาที่มีค่าแลคเตท

ปกติ (1.16 ± 0.09 มิลลิโมลต่อลิตร) มีค่าแลคเตทเพิ่มขึ้น 24.1% และมีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายร้อยละ 14.49 ส่วนตัวอย่างเลือดที่มีค่าแลคเตทสูง (12.69 ± 0.05 มิลลิโมลต่อลิตร) มีค่าแลคเตทลดลงเล็กน้อยคือ 5% มีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายร้อยละ 4.70

ตารางที่ 3 ปริมาณเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแลคเตท จากตัวอย่างที่ทดสอบ Long Term Stability ในวันที่เก็บตัวอย่างพลาสมาตั้งแต่วันที่ 0, 3, 7 และ 14 ตามลำดับโดยการ วิเคราะห์ 3 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	ปริมาณแลคเตทจากตัวอย่างที่มีค่าปกติ (มิลลิโมลต่อลิตร) $\bar{X} \pm S.D.$	ปริมาณแลคเตทจากตัวอย่างที่มีค่าสูง (มิลลิโมลต่อลิตร) $\bar{X} \pm S.D.$
0	1.16 ± 0.09	12.69 ± 0.05
3	1.65 ± 0.09	12.29 ± 0.43
7	1.33 ± 0.26	11.34 ± 0.25
14	1.38 ± 0.02	12.04 ± 0.49

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ย
 $S.D.$ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
 n = 3

3. การวิเคราะห์ด้วย HPLC technique

นำตัวอย่างเลือดที่ได้จากผู้ป่วยมาปั่นแยกพลาสมาและตกตะกอนโปรตีนก่อนตรวจวัดแลคเตทในเลือดเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาได้ ทำการตรวจวัดปริมาณของสารแลคเตท ในเลือดผู้ติดเชื้อมีผู้ป่วยเอชไอวีที่ได้รับยาในกลุ่ม NRTIs

การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ HPLC มีหลักการคือเป็นการแยกสารแลคเตทในตัวอย่างพลาสมาที่ตกตะกอนแล้วและฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดย injector และถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยสารละลายเคลื่อนที่ อาศัยความแตกต่างของปฏิสัมพันธ์ของสารแต่ละชนิดที่ละลายอยู่ในตัวอย่าง ระหว่างเฟสคงที่ (stationary phase) กับสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมซึ่งทำให้สารแลคเตทและสารอื่นๆ ถูกจับอยู่ในคอลัมน์

นานมากน้อยต่างกัน สารแต่ละชนิดจะถูกชะ (elute) ออกมาด้วยสารละลายเคลื่อนที่ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ถูกดันผ่านเฟสคงที่ที่มีอนุภาคขนาดเล็กซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่นี้จะพาสารแต่ละชนิดออกจากคอลัมน์ผ่านเครื่องตรวจวัด UV-VIS detector และแสดงผลออกมาในรูปของโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่ประกอบด้วยพีก (peaks) ของสารแลคเตท และสารต่างๆ ที่มีอยู่ในสารผสมนั้น

4. การวิเคราะห์ด้วยวิธี enzymatic method

วิเคราะห์ปริมาณแลคเตทด้วยเครื่อง automate chemistry analyzer โดยใช้พลาสมาที่แยกจากเลือดที่มีฟลูออไรด์ออกซาเลทเป็นสารกันเลือดแข็ง ใส่ในหลอดเฉพาะที่มีเอนไซม์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เครื่อง

จะผสมสารเคมีและตรวจโดยระบบอัตโนมัติ ภายในเครื่องเป็นระบบปิดที่มีอ่างน้ำสำหรับปรับอุณหภูมิ และเครื่องวัดแสงอยู่ภายใน โดยมีหลักการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

ใช้เอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่เปลี่ยนแลคเตทเป็นไพรูเวท โดยมี nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) เป็น coenzyme จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงของ NADH ที่เพิ่มขึ้นและมีปริมาณแปรตามปริมาณแลคเตทโดยตรง ด้วยเครื่องวัดแสงภายในตัวเครื่องอัตโนมัติที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร วิธีนี้สารที่ตรวจวัดจะคงตัวอยู่ประมาณ 1 ชั่วโมง และมีค่าต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร ส่วนค่าสูงสุดคือ 13.3 มิลลิโมลต่อลิตร

ผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เลือดที่เหลือจากตรวจบริการ

เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับวิธี enzymatic assay จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามค่าแลคเตทในเลือดได้แก่

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีค่าแลคเตทในเลือดปกติ (ต่ำกว่า 2 mmol/L) จำนวน 9 ราย กลุ่มที่มีค่าแลคเตทในเลือดปานกลาง (2-5 มิลลิโมลต่อลิตร) จำนวน 12 ราย และกลุ่มที่มีค่าแลคเตทในเลือดสูง (> 5 มิลลิโมลต่อลิตร) จำนวน 9 ราย ดังแสดงในตารางที่ 4-6 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ปริมาณแลคเตทใน pool พลาสมาที่วัดได้ด้วยวิธี HPLC ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยนี้กับ enzymatic assay ในกลุ่มที่มีปริมาณแลคเตทอยู่ในช่วงปกติ (ต่ำกว่า 2 มิลลิโมลต่อลิตร)

	Enzymatic assay (mmol/L)	HPLC (mmol/L)
1	1.17	1.24
2	1.6	1.65
3	1.43	1.33
4	1.77	2.17
5	1.22	1.79
6	1.65	1.31
7	1.6	1.15
8	1.54	1.76
9	1.06	1.31
mean	1.45	1.52

ตารางที่ 5 ปริมาณแลคเตทใน pool พลาสมาที่วัดได้ด้วยวิธี HPLC ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยนี้กับ enzymatic assay ในกลุ่มที่มีปริมาณแลคเตทอยู่ในช่วงปานกลาง (2.0-5.0 มิลลิโมลต่อลิตร)

	Enzymatic assay (mmol/L)	HPLC (mmol/L)
1	4.53	3.47
2	3.44	3.56
3	2.55	2.38
4	2.72	3.49
5	2.53	3.42
6	4.24	5.78
7	2.83	3.27
8	2.45	2.75
9	3.11	3.18
10	3.23	3.54
11	2.18	2.24
12	3.22	3.47
mean	3.08	3.38

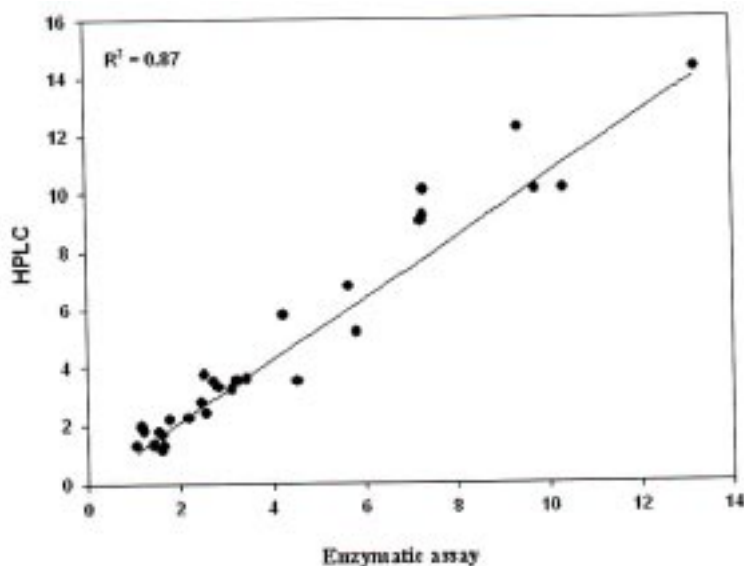
ตารางที่ 6 ปริมาณแลคเตทใน pool พลาสมาที่วัดได้ด้วยวิธี HPLC ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยนี้กับ enzymatic assay ในกลุ่มที่มีปริมาณแลคเตทในเลือดสูง (มากกว่า 5 มิลลิโมลต่อลิตร)

	Enzymatic assay (mmol/L)	HPLC (mmol/L)
1	5.65	6.77
2	5.82	5.16
3	10.36	10.09
4	13.22	14.30
5	9.37	12.21
6	9.73	10.07
7	7.24	9.01
8	7.30	10.07
9	7.29	9.20
mean	8.44	9.65

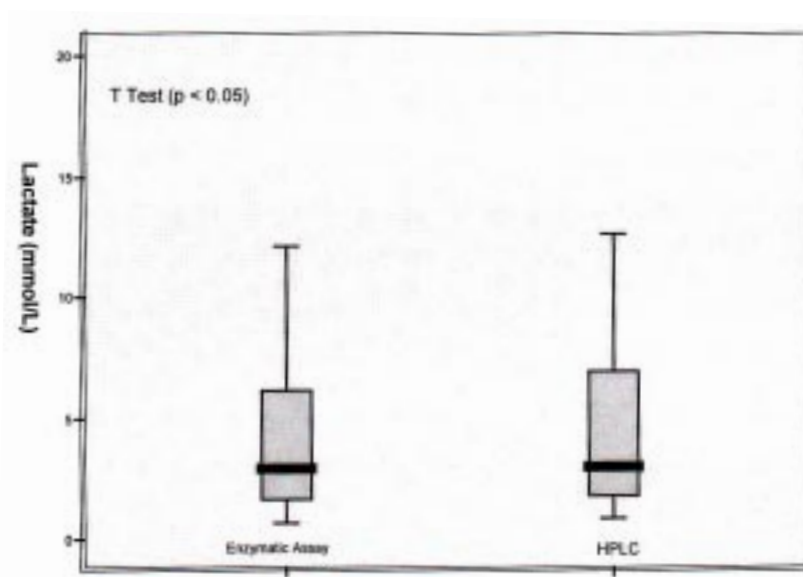
การวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบปริมาณแลคเตทในเลือดที่วิเคราะห์ได้และความสัมพันธ์ของค่าระหว่างวิธี HPLC และ enzymatic assay จำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง

แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีค่า normal 9 ราย กลุ่มที่อยู่ในช่วง moderate hyperlactatemia 12 ราย และกลุ่ม severe hyperlactatemia 9 ราย



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของค่าแลคเตทที่ได้ระหว่างวิธี HPLC และ enzymatic assay ซึ่งมีความสัมพันธ์กันที่ $r^2 = 0.87$, $R = 0.93$



รูปที่ 4 การเปรียบเทียบปริมาณแลคเตทที่วิเคราะห์ได้โดยดูจากปริมาณเฉลี่ย (mean) ของค่าเฉลี่ยของปริมาณแลคเตทในตัวอย่างเลือดระหว่างวิธี HPLC และ enzymatic assay

จากรูปที่ 2 เมื่อนำพลาสมาตัวอย่างจำนวน 30 ราย หาปริมาณแลคเตทโดยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับค่าแลคเตทที่ได้จากวิธี enzymatic method ที่ทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการ แล้วหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ linear regression พบว่าการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแลคเตทในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยด้วยวิธี HPLC แตกต่างจากการตรวจด้วยวิธี enzymatic assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า r เท่ากับ 0.93 ($p > 0.05$)

จากรูปที่ 3 แสดงให้เห็นถึงการเปรียบเทียบปริมาณแลคเตทที่วิเคราะห์ได้ด้วยสถิติ t-test (parametric) โดยดูจากค่าเฉลี่ยของปริมาณแลคเตทในตัวอย่างเลือดระหว่างวิธี HPLC และ enzymatic assay ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยของการตรวจด้วยเครื่อง HPLC สูงกว่าวิธี enzymatic assay อย่างมีนัยสำคัญ (paired t-test, $p < 0.05$) ผลจากการพัฒนาวิธีการตรวจด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับ Enzymatic assay ตามลำดับ พบว่าวิธี HPLC มีความแม่นยำสูงคือ Intraday – precision มีค่าความแปรปรวน = 4.76% กับ 6.82%, Interday – precision มีค่าความแปรปรวน = 5.67% กับ 6.44%, ค่า accuracy = 99.38% กับ 91.10% การตรวจหาระดับแลคเตทในเลือดด้วยเครื่อง HPLC ที่มีความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) โดยเฉพาะต้นท่อน้ำยา มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า ไม่มีปัญหาเรื่องการหมดอายุของน้ำยาเหมือน enzymatic assay สามารถนำมาใช้ในการเฝ้าระวังอาการไม่พึงประสงค์ในผู้ป่วยเชซไอวี ที่ได้รับยากลุ่ม NRTIs ช่วยการวินิจฉัยของแพทย์ และลดกลุ่มผู้ป่วยที่จะพัฒนาไปเป็น lactic acidosis หรือภาวะเป็นกรดในร่างกายได้

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การทดสอบ Freeze & Thaw Stability คือทดสอบความคงตัวของสารแลคเตทหลังการนำพลาสมาแช่แข็งและนำออกมาละลายแล้วนำกลับเข้าแช่แข็งอีก เป็นจำนวน 3 ครั้ง ในวันที่ 3, 7 และ 14 ของการเก็บพลาสมาในตู้แช่แข็งตามลำดับ เทียบกับวันแรกที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็งและละลายพลาสมาพบว่าปริมาณแลคเตทมีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อทำการ freeze/thaw หลายครั้ง

การศึกษาครั้งนี้จึงหลีกเลี่ยงการ freeze/thaw ตัวอย่างโดยการละลายตัวอย่างแช่แข็งเพียงครั้งเดียวก่อนการตรวจวิเคราะห์

การทดสอบ Short Term Temperature Stability โดยแบ่งปริมาณพลาสมาของผู้ป่วยทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นที่แช่แข็งไว้ นำมาทำให้ละลายแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแลคเตท พบว่าในตัวอย่างเลือดที่มีระดับแลคเตทปกติมีปริมาณแลคเตทเพิ่มขึ้น 27.6% และตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณแลคเตทสูงมีค่าเฉลี่ยไม่เปลี่ยนแปลงใน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

การทดสอบ Long Term Stability โดยทดสอบการเก็บตัวอย่างพลาสมาในตู้แช่แข็ง -20°C เป็นเวลาหลายวัน เช่นเดียวกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อเชซไอวี ในการวิเคราะห์ปริมาณแลคเตท เป็นการทดสอบในเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ พบว่าการตรวจวิเคราะห์แลคเตทด้วยวิธี HPLC ที่พัฒนาขึ้นสามารถเก็บพลาสมาไว้ที่ -20°C ได้นานถึง 14 วัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (CV) ร้อยละ 14.49 และร้อยละ 4.70 ในตัวอย่างเลือดที่มีค่าแลคเตทต่ำและสูงตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์แลคเตทในตัวอย่างเลือดที่มีฟลูออไรด์ออกซาเลทในหน่วยปฏิบัติการเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ด้วยวิธี enzymatic assay ใช้เวลาเก็บพลาสมาแช่แข็งที่ -20°C ไม่เกิน 5 วัน ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งเลือกใช้เวลาเก็บตัวอย่างไว้ไม่เกิน 3 วัน

การศึกษาครั้งนี้พบว่าวิธี HPLC ที่พัฒนาขึ้นมีความมีความถูกต้องความแม่นยำสูงกว่าวิธี enzymatic assay และให้ค่าการวิเคราะห์โดยเฉลี่ยสูงกว่าวิธี enzymatic assay อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจะเพิ่มความไวในการตรวจหาภาวะแลคเตทในเลือดที่สูงผิดปกติได้ โดยเฉพาะในช่วง border line

จากการศึกษาของ Hasegawa และคณะ ซึ่งเปรียบเทียบการตรวจหาแลคเตทด้วยวิธี HPLC กับ enzymatic assay ในผู้ป่วยเบาหวานกับคนปกติ พบว่าเทคนิค HPLC ให้ผลที่มีความถูกต้อง ความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวดีกว่าขณะที่ใช้ปริมาณ sample น้อยกว่า

วิธีของ Hasegawa และคณะ เป็นการทำให้ derivatisation จึงได้อนุพันธ์ของสารแลคเตทแยกออกมาจากสารอื่นก่อนทำการวิเคราะห์และ fluorescence detector มีความไวกว่า UV detector ประมาณ 100 เท่า จึงใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย สำหรับการประยุกต์ใช้ UV detector ตรวจวัดสารแลคเตทในพลาสมา โดยตรงในการวิจัยครั้งนี้ ช่วยลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ลดงบประมาณค่าใช้จ่าย และการใช้คอลัมน์ชนิด reversed-phase C18 มีราคาไม่แพง รวมทั้งสารละลายเคลื่อนที่ สามารถเตรียมได้เอง การวิจัยนี้ใช้ปริมาณตัวอย่างมากกว่าวิธีอื่น เนื่องจากปริมาณแลคเตทในเลือดมีน้อย (หน่วยเป็นมิลลิโมลต่อลิตร) แต่ไม่มีผลกระทบต่อการศึกษาเก็บเลือดผู้ป่วย เพราะการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจแลคเตทปัจจุบันใช้หลอดเก็บเลือดที่มีฟลูออไรด์ออกซาเลท ขนาด 2 มิลลิลิตรเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. ดวงสมร ลิ้มปิติ. ทฤษฎี เครื่องมือ และการประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ยา. 2545: 112-5.
2. นันทยา ชนะรัตน์, อุดมศักดิ์ เทวซึ่งเจริญ. วิธีการตรวจแลคเตทที่เหมาะสมสำหรับงานประจำวัน. รายงานวิจัย. 2525:1-3.
3. สัญชัย ขาสมบัติ, ชีวันนัท เลิศพิริยสุวัฒน์. แนวทางปฏิบัติงานโครงการการเข้าถึงบริการยาต้านไวรัสเอ็ดส์ระดับชาติสำหรับผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยเอดส์. สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์. 2549: 41-3.
4. สัญชัย ขาสมบัติ, ชีวันนัท เลิศพิริยสุวัฒน์ และพรทิพย์ ยุกตานนท์. แนวทางการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยโรคเอดส์ เด็กและผู้ใหญ่ในประเทศไทย. สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์. 2547: 161-3.
5. ACTG Laboratory Technologist Committee. AACTG Central Metabolic Laboratory Specimen Processing Guidelines. Version 2.0 2002.
6. Allaouiche B, Dufflo F, Cotte L, Mathon L, Chassard D. Acute pancreatitis with severe lactic acidosis in an HIV-infected patient on didanoside therapy. J Antimicrob Chemother. 1999; 44:137-8.
7. Bonnet F, Bonarek M, Morlat P, Mercie P, Dupon M, Gemen MC, et al. Risk factors for lactic acidosis in HIV-infected patients treated with Nucleoside reverse transcriptase inhibitors: A case-control study. Clinical Infectious Disease. 2004; 36(10): 1324-8.
8. Calza L, Manfredi R, Chiodo F. Hyperlactataemia and lactic acidosis in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. Clinical Nutrition. 2005 Feb; 24(1): 5-15.
9. Chariot P, Drogou I, de Lacroix-Szmania I, Eliezer-Vanerot MC, Chazaud B, Lombes A, Schaeffer A, Zafrani ES. Zidovudine-induced mitochondrial disorder with massive liver steatosis, myopathy, lactic acidosis, and mitochondrial DNA depletion. J Hepatol. 1999; 30: 156-60.
10. Charton-Bain MC, Flamant M, Aubertin JM, Belair MF, Gilquin J, Kazatchkine M, et al. Lactic acidosis and hepatic mitochondrial changes during a treatment with zidovudine [in French]. Gastroenterol Clin Biol. 1997; 21: 979-81.
11. Falco V, Rodriguez D, Ribera E, Martinez E, Miro JM, Domingo P. Severe nucleoside – associated lactic acidosis in human immunodeficiency virus – infected patients. Clin Infect Dis. 2002; 34: 838-46.
12. Fleischer WR. Enzymatic methods for lactic and pyruvic acids. In “Standard Methods of Clinical Chemistry”. New York. Academic. 1970; 5: 245-58.

13. Hasegawa H, Fukushima T, Lee J, Tsukamoto K, Moriya K, Ono Y, Imai K. Determination of serum d-lactic and l-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003.
14. Lui C, Weber K, Robinson E, Hu Z, Jacobsin LP, Gange FJ. Assessing the effect of HAART on change in quality of life among HIV-infected women. *AIDS Research and Therapy*. 2006; 3.
15. Jolliet P, Widmann JJ. Reye's syndrome in adult with AIDS [letter]. *Lancet*. 1989; 335:1457.
16. Medina DJ, Tsai CH, Hsiung GD, Cheng YC. Comparison of mitochondrial morphology, mitochondrial DNA content, and cell viability in cultured cells treated with three anti-human immunodeficiency virus dideoxynucleosides. *Antimicrob Agents. Chemother*. 1994; 38: 1824–8.
17. Sanjeev K, Kishor A, Dandekar, Beth E, Schilling, Rashmi H, et al. Toxicokinetics of 2',3'-Didehydro-3'-Deoxythymidine. *Drug metabolism and disposition*. 1999; 27:1-12
18. Teitz NW. Electrolytes. In "Fundamental of Clinical Chemistry" (Teitz, N.W.ed.) W.B. Saunders, Philadelphia. 1976:936-40.