

รายงานเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวัดการทำงานของ Prostatic Acid Phosphatase ในซีรัมโดยใช้ Sodium Thymolphthalein เป็นสับสเตรท*

สุพัตรา เชื้อวีระชน**

ศิริพร พันธศรี***

สุวีระ รณวิญญ**

บทคัดย่อ

ได้นำ Sodium thymolphthalein monophosphate มาใช้เป็นสับสเตรทเพื่อตรวจวัดการทำงานของ Prostatic acid phosphatase ได้ผลผลิตคือ Thymolphthalein ทำให้ pH เพิ่มขึ้นและเกิดสีรวมทั้งหมด ปฏิกิริยาของเอนไซม์ วัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 590-600 นาโนเมตร วิธีนี้มีช่วงค่าอ้างอิงปกติในซีรัมเท่ากับ 0.02-0.62 U/L ค่าความเที่ยงของวิธีเมื่อทำไปพร้อมกันและเมื่อทำต่างเวลากัน แสดงโดยค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน เท่ากับ 5.2 และ 8.4% ตามลำดับ มีความเป็นเส้นตรงถึงอย่างน้อย 15 U/L วิธีนี้ทำได้ง่าย สะดวกกว่าวิธีเดิมของ Bessy-Lowry-Brock มีความจำเพาะต่อ Acid phosphatase ที่มาจากต่อมลูกหมาก สารมาตรฐานเตรียมได้ง่าย และสารละลายที่ใช้มีความคงตัวนาน

คำรหัส : Prostatic acid phosphatase, sodium thymolphthalein

* เป็นส่วนหนึ่งของภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2540-2541.

** ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** ภาควิชานิติเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Determination of Serum Prostatic Acid Phosphatase Activity Using Sodium Thymolphthalein as Substrate*

Chuaverachon S**, Punsri S***, Ronnavich S**

A substrate, sodium thymolphthalein monophosphate, is used for measuring prostatic acid phosphatase activity in serum. Thymolphthalein is liberated making the increase in pH and produce a blue color while the hydrolysis is stopped. The absorption is measured at 590–600 nm. Normal reference range in serum by this method is 0.02–0.62 U/L. Precision is excellent with within-run and between-run coefficient of variation of 5.2% and 8.4% respectively. Linearity of the reaction is at least 15 U/L. The present method has more advantages than the conventional Bessy-Lowry-Brock method including simplicity, specificity for prostatic acid phosphatase, ease of standard solution preparation and more stability of reagents.

Key words : Prostatic acid phosphatase, sodium thymolphthalein

* Term paper in partial fulfillment of the requirements for the degree of Bachelor of Science in Medical Technology (1997–1998), Chiang Mai University.

** Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

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

บทนำ

Acid phosphatase (ACP) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไลโซโซมของเซลล์หลายชนิด ต่อมลูกหมากเป็นอวัยวะที่มีเอนไซม์ชนิดนี้มากที่สุด ประมาณ 1,000 เท่าของเนื้อเยื่ออื่นๆ รองลงมาคือเม็ดเลือดแดง ตับ ม้าม เกร็ดเลือด ไชกระดูก น้ำนม กล้ามเนื้อลาย และผิวหนัง นอกจากนี้ยังพบได้ในเซลล์มะเร็งของอวัยวะต่างๆ เช่น ต่อมลูกหมาก เต้านม กระเพาะอาหารและลำไส้ ต่อมลูกหมากของเด็กผู้ชายจะมีปริมาณ ACP น้อย แต่เมื่อเจริญเข้าสู่วัยหนุ่มสาวก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและ

มีการขับออกทางน้ำอสุจิ หน้าที่ของ ACP ในร่างกายยังไม่ทราบชัด สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับ การสลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในเซลล์ และรอบๆ เซลล์ ACP จากต่อมลูกหมาก (Prostatic acid phosphatase, P-ACP) มีหน้าที่เกี่ยวกับ เมตาโบลิสมของตัวอสุจิ ทำให้มีการหมุนเวียนของ Androgenic hormone จนถึงปัจจุบัน ยังไม่ทราบ กำเนิดของ ACP ในเลือดที่แน่นอน เพียงแต่มีหลักฐานบ่งชี้ว่า บางส่วนมาจากเกร็ดเลือด เม็ดเลือดแดง และตับ ส่วน ACP ในซีรัมของผู้ชายประมาณ 1–2 ใน 3 มาจากต่อมลูกหมาก

โดยปกติ P-ACP จะพบเฉพาะในน้ำอสุจิเท่านั้น แต่เมื่อมีการทำลายระบบท่อของต่อมลูกหมากจะทำให้ P-ACP ออกมาภายนอกและเข้าสู่กระแสโลหิตทำให้พบค่าสูงขึ้นได้

หลักการตรวจวัดการทำงานของ ACP มีหลายวิธี ได้แก่ Spectrophotometry (End-point, kinetic), Kinetic fluorometry, Radioimmunoassay และ Enzyme immunometric assay เป็นต้น ระดับ ACP ในซีรัมคนปกติจะสูงกว่าในพลาสมา และสัมพันธ์กับอายุ ทารกแรกเกิดจะมีระดับสูงกว่าผู้ใหญ่ประมาณ 2-2.5 เท่า เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ระดับจะลดลงเล็กน้อย จนกระทั่งอายุ 13 ปี จะลดลงอีกจนถึงอายุประมาณ 17 ปี จึงมีระดับเท่ากับผู้ใหญ่ การวัด ACP ในซีรัมมีความสำคัญในการวินิจฉัยและติดตามผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเม็ดเลือดขาว โรคที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงและเกร็ดเลือด และโรค Gaucher

P-ACP จะถูกทำลายหรือยับยั้งปฏิกิริยาได้โดย L-tartrate ส่วน ACP จากเม็ดเลือดแดงถูกยับยั้งได้โดย Formaldehyde จึงสามารถใช้วัดแยกเอนไซม์ทั้งสองได้ ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์นี้ค่อนข้างกว้าง สามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้หลายชนิดด้วยอัตราเร็วต่างๆ กัน สับสเตรทของ ACP เช่น Phenylphosphate, p-nitrophenylphosphate, Thymolphthalein monophosphate, β -glycerophosphate, α -naphthyl phosphate, β -naphthyl phosphate เป็นต้น³ สองชนิดแรกเป็นสับสเตรทที่ดีของ ACP ทุกชนิด แต่มีข้อเสียที่มักให้ผลบวกложได้ถ้าสิ่งส่งตรวจมีเม็ดเลือดแดงแตกปนอยู่ การใช้ β -glycerophosphate มีความจำเพาะสูงแต่มีความไวต่ำสำหรับ P-ACP ส่วน Thymolphthalein monophosphate และ Naphthyl phosphate เป็นสับสเตรทที่ดีของ P-ACP เนื่องจากอัตราการย่อย Thymolphthalein

monophosphate จะเร็วกว่าการย่อยโดย ACP จากเนื้อเยื่ออื่น ดังนั้น จึงมีการเสนอให้ใช้สับสเตรทชนิดนี้ ร่วมกับการใช้ L-tartrate ในการวิเคราะห์การทำงานของ P-ACP โดยให้ความไวในการวิเคราะห์สูงถึง 99%

ในงานประจำวัน การตรวจวัดการทำงานของ ACP ยังเป็นวิธี Spectrophotometry เป็นส่วนใหญ่ สับสเตรทที่ใช้คือ p-nitrophenyl phosphate ตามวิธีของ Bessy-Lowry-Brock (B.L.B)³ และใช้ Tartrate เป็นสารยับยั้ง P-ACP ค่า P-ACP จึงได้จากการหาปริมาณ ACP ทั้งหมดหักออกด้วย ACP ที่ไม่ถูกยับยั้งโดย Tartrate วิธีนี้จึงมีข้อด้อยคือต้องมีการทำตัวอย่างละลายหลอดรวมทั้ง Reagent blank และ Serum blank ผลที่ได้พบค่าติดลบได้บ่อย รายงานนี้จึงได้เสนอวิธีที่ใช้ Sodium thymolphthalein monophosphate เป็นสับสเตรท⁴ ซึ่งทำให้วิธีการสะดวก รวดเร็ว มีความจำเพาะและได้ค่าที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

วิธีการ น้ำยาที่ใช้⁴

1. Brij-35 200 g/L
 2. Citrate buffer (0.1 M, pH 5.95) เตรียมโดย
 - สารละลาย ก : ละลาย Trisodium citrate dihydrate 29.41 กรัมในน้ำกลั่น 950 มล. เติมน้ำ Brij-35 ลงไป 25 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล.
 - สารละลาย ข : ละลาย Citric acid monohydrate 2.1 กรัมในน้ำกลั่น 95 มล. เติมน้ำ Brij-35 ลงไป 2.5 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.
- นำสารละลาย ก. 900 มล. มาปรับ pH ให้เป็น 5.95 ที่ 25 °C ด้วยสารละลาย ข. น้ำยานี้คงตัวที่ 4-8 °C อย่างน้อย 6 เดือน

3. Buffered substrate : ละลาย Sodium thymolphthalein monophosphate 0.185 กรัมใน Citrate buffer 100 มล. pH ของสารละลายจะเป็น 6.0 และคงตัวที่ 4-8 °ซ อย่างน้อย 2 เดือน
4. Color developer : Sodium hydroxide 2 กรัม และ Sodium carbonate, anh. 5.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
5. Stock standard thymolphthalein (22.5 mmol/L) : ละลาย Thymolphthalein 968.7 กรัม และปรับให้เป็น 100 มล. ใน Absolute ethanol
6. Acetate buffer (5 mol/L, pH 5.0 ที่ 37 °ซ) : ละลาย Sodium acetate trihydrate 43.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 5.0 ที่ 37 °ซ ด้วย Glacial acetic acid แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

วิธีทำ

เตรียมหลอดอ่านขนาด 13x100 มม. ทำดังนี้

Reagent	Blank	Unknown
Buffered substrate (มล.) อุ่นที่ 37 °ซ 5 นาที	1.0	1.0
ซีรัม (มล.) อุ่นที่ 37 °ซ 30 นาทีพอดี	-	0.2
Color developer (มล.)	5.0	5.0
ซีรัม (มล.)	0.2	-

ผสมให้เข้ากัน อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 590-600 นาโนเมตร โดยใช้หลอด Blank ปรับศูนย์ อ่านค่า ACP จากกราฟมาตรฐาน

วิธีทำกราฟมาตรฐาน

จากค่าจำกัดความของ International unit (IU)

เท่ากับ “จำนวนเอนไซม์ในซีรัม 1 ลิตร ที่สามารถย่อยสลายสเตรทให้ได้ Thymolphthalein 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที” คำนวณได้ว่า ใน Stock Standard thymolphthalein 22.5 mmol/L จะมีค่าเท่ากับ 15 U/L

เจือจาง Stock standard ด้วย Absolute ethanol ให้มีความเข้มข้น 1.5, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 U/L แล้วทำตามวิธีข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของแต่ละหลอด มาเขียนกราฟเทียบกับความเข้มข้น

ผลการทดลอง

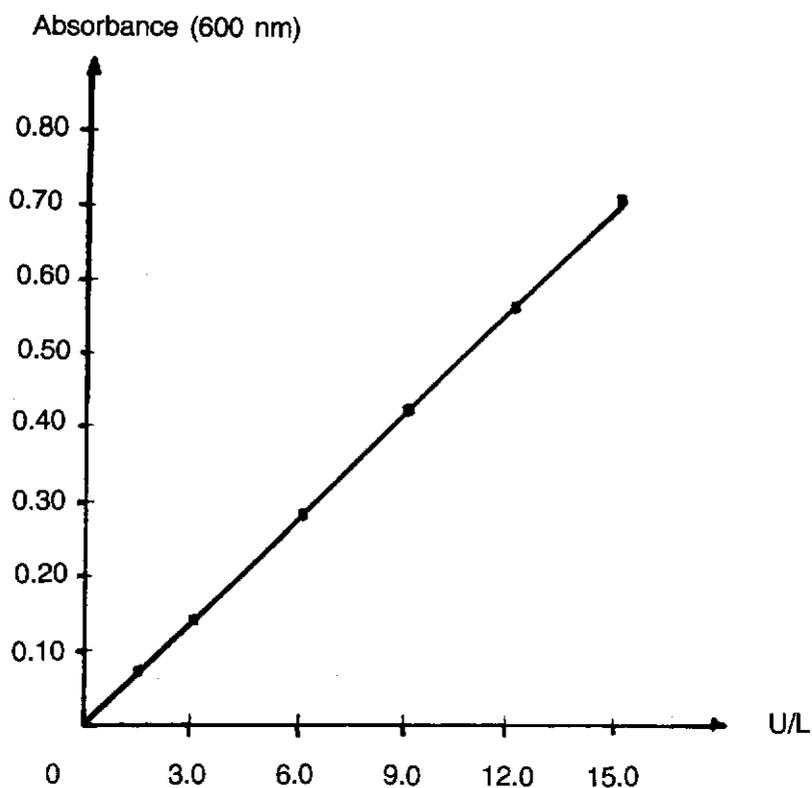
การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ เทียบกับสารละลาย Blank พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 600 นาโนเมตร

สีของ Thymolphthalein ที่เกิดขึ้นมีความคงตัวได้นานอย่างน้อย 90 นาที และปฏิกิริยามีความเป็นเส้นตรง (Linearity) ได้ถึงปริมาณ ACP อย่างน้อย 15 U/L ดังรูปที่ 1

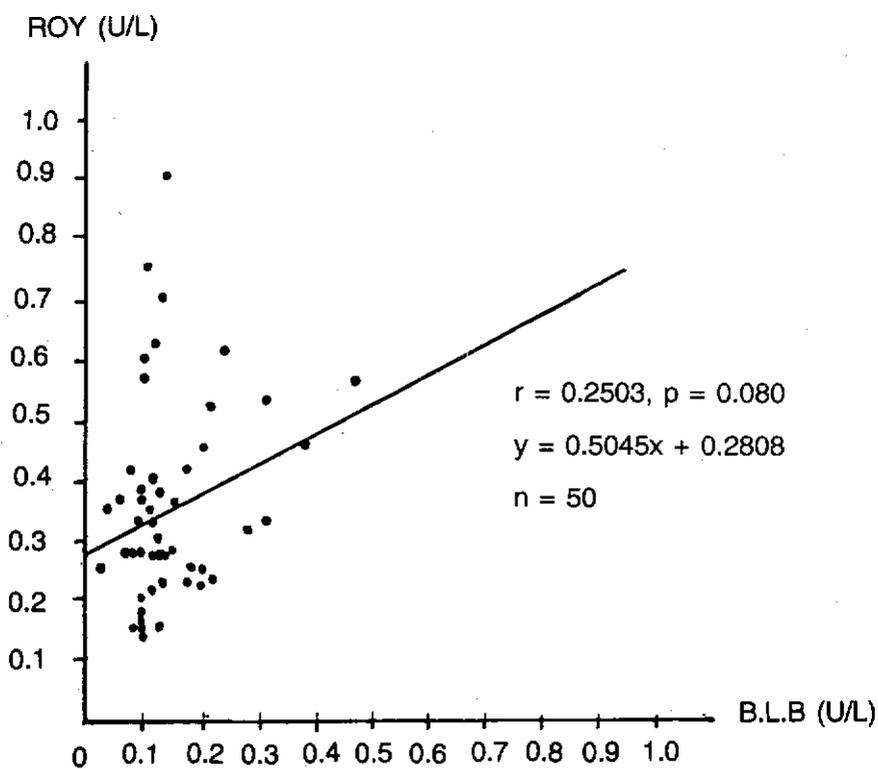
การทดสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีเมื่อทำไปพร้อมๆ กันและต่างเวลากัน พบว่าได้ค่าเฉลี่ย ± ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เท่ากับ 0.84 ± 0.044 U/L, 5.2% (n = 20) และ 0.76 ± 0.064 U/L, 8.4% (n = 29) ตามลำดับ

การศึกษาช่วงค่าอ้างอิงปกติ โดยหาปริมาณ P-ACP ในซีรัมของคนปกติทั้งชายและหญิง จำนวน 105 คน ได้ค่า 0.05-0.62 U/L

การเปรียบเทียบกับวิธี B.L.B โดยหาปริมาณ P-ACP ในซีรัมคนทั่วไปจำนวน 50 ราย โดยวิธี Roy และ B.L.B พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) = 0.2503, p < 0.05 ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Absorbance กับ Prostatic acid phosphatase standard โดยวิธีของ Roy และคณะ



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของการตรวจวัด Prostatic acid phosphatase ระหว่างวิธีของ Roy และคณะ กับวิธีของ B.L.B

วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจวัดการทำงานของ ACP โดยวิธีที่นำเสนอ สีสุดท้ายมีการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 590-600 นาโนเมตร สีที่เกิดขึ้นนี้มีความคงตัวนานอย่างน้อยถึง 1.5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นข้อดีที่สามารถทำการทดสอบคราวละหลายๆ ตัวอย่าง ความเป็นเส้นตรงของวิธีสูงถึง 15.0 U/L ซึ่งดีกว่าวิธีอื่นๆ รวมทั้งการเตรียมสารมาตรฐานก็ทำได้ง่าย ค่าความเที่ยงของวิธีอยู่ในเกณฑ์ดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เมื่อทำไปพร้อมกันและต่างเวลากันเท่ากับ 5.2 และ 8.4% ตามลำดับ

ช่วงค่าอ้างอิงปกติที่ได้จากการตรวจซีรัมของผู้บริจาคโลหิตทั้งชายและหญิงจำนวน 105 ราย เท่ากับ 0.02-0.62 U/L ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Roy และคณะรายงานไว้จากการศึกษาในเพศชายอายุ 26-84 ปี (0.11-0.62 U/L)⁴ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาโดยแบ่งแยกตามเพศ และอายุให้ละเอียดขึ้น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคต่อไป

ผลการเปรียบเทียบค่า ACP ที่ได้จากวิธีที่นำเสนอกับวิธี B.L.B ที่ใช้อยู่เดิม พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เพียง 0.2503 (p = 0.080) และจากการทำ Paired t-test พบว่าค่าที่ได้จากวิธีทั้งสองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ อาจเป็นเนื่องจาก ค่าที่ได้จากวิธี B.L.B บางรายเป็นค่าศูนย์ (ติดลบ)

อย่างไรก็ตาม วิธีที่นำเสนอนี้ มีข้อดีที่สาร

ละลายที่ใช้มีความคงตัว สิ่งที่เราหวังคือ ควรปั่นแยกซีรัมออกจากเลือดโดยเร็ว มิฉะนั้นจะตรวจพบค่า ACP เพิ่มขึ้นจากการซีมออกมาจากเซลล์เม็ดเลือด ทำให้ค่าผิดไปด้วยเช่นเดียวกับวิธีการตรวจอื่นๆ

การตรวจวัด ACP นอกจากจะใช้ช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากได้โดยตรงแล้วยังใช้ช่วยประกอบในรายที่ตรวจพบ Prostatic specific antigen ระดับสูงขึ้นว่าเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากหรือไม่ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Tietz NW : Fundamentals of Clinical Chemistry. 2nd ed, Philadelphia : WB. Saunder, 1976, 601-18.
2. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW : Clinical Chemistry : Principles and Technics, 2nd ed, New York : Harper & Row Publishing, 1974, 934-9.
3. Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry : Theory, Analysis and Correlation. St. Louis : The CV Mosby, 1996, 992-3.
4. Roy AV, Brower EM, Hayden EJ. Sodium thymolphthalein monophosphate : A new acid phosphatase substrate with greater specificity for the prostatic enzyme in serum. Clin Chem 1971; 71: 1093-102.