

บทกวี

The Separation and Quantitation of Hemoglobins by HPLC

ธนศักดิ์ ตาตุ*

การแยกฮีโมโกลบินด้วย HPLC นิยมใช้ weak cation exchange HPLC อาศัยคุณสมบัติของ ฮีโมโกลบินที่เป็น amphoteric กล่าวคือ สามารถเปลี่ยนประจุสุทธิของโมเลกุลได้ตาม pH ของสภาพแวดล้อม ในระบบนี้ ฮีโมโกลบินจะละลายในสารละลายที่เป็นกรด (pH 6.3) ซึ่งจะทำให้ประจุสุทธิเป็นบวก และจำนวนประจุบวกของฮีโมโกลบินต่างชนิดกันจะไม่เท่ากัน ทำให้เกิดแรงจذبระหว่างฮีโมโกลบินแต่ละชนิดกับประจุลบบนเรซินของ HPLC column ไม่เท่ากัน ดังนั้นเมื่อผ่าน cation ตัวใหม่เช่น Na^+ เข้าไปใน column cation ตัวนี้จะไปแทนที่และชะไล่ (elute) ฮีโมโกลบินตัวที่มีแรงจذبน้อยที่สุดให้หลุดออกมาจาก column ก่อน แล้วฮีโมโกลบินตัวอื่นๆจะถูกไล่ออกมาเรียงตามลำดับ ตามความเข้มข้นของ cation ที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้น

ฮีโมโกลบินที่ถูกชะออกจาก column จะผ่านเข้าไปยังส่วนจับวัด (detector) ซึ่งมีหน้าที่วัดการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร (A_{415}) ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะถูกส่งต่อไปยัง personal computer

(PC) ซึ่งมี software สำหรับแปลผลค่า absorbance ที่ติดตั้งไว้เรียบร้อยแล้ว เพื่อคำนวณหาปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้กราฟต่อไป แล้วแสดงผลออกมาในรูปกราฟหรือข้อมูลเป็นตัวเลขตามต้องการ

วัสดุและอุปกรณ์

HPLC apparatus ประกอบด้วย

1 Solvent delivery system มีหน้าที่ปั๊ม buffer, ฉีดส่งสารตัวอย่างให้ผ่านเข้าไปใน column เพื่อให้เกิดการแยกฮีโมโกลบิน ปั๊มเป็นระบบ linear gradient system ซึ่งต้องมี 2 ปั๊ม (เช่น A และ B) มีหน้าที่ทำให้เกิดแรงดันสูงที่จะใช้ผลักดัน fluid phase ไปข้างหน้า มีหน้าที่สำคัญคือปรับอัตราการไหลของ buffer เพื่อให้การเพิ่มขึ้นของ cation ที่จะเป็นตัวแย่งกับฮีโมโกลบินในการจับกับเรซินภายใน column เป็นไปอย่างช้าๆและคงที่ตลอดการปฏิบัติงาน ปั๊มทั้งสองตัวนี้ควบคุมการทำงานโดยผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป (software) ที่ผู้ผลิตเครื่องจัดให้

*ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2 UV-visible detector เป็นตัววัดการดูดกลืนแสงทั้งในช่วง visible light และ ultraviolet ขึ้นกับชนิดของสารที่ต้องการวัดว่า สำหรับ hemoglobin fraction ที่ถูกชะออกจาก column จะใช้ความยาวคลื่นที่ 415 นาโนเมตร

3 HPLC column เป็นส่วนสำคัญที่สุดเพราะการแยกฮีโมโกลบินจะเกิดขึ้นเมื่อไหลผ่านส่วนนี้ไปแล้ว weak cation exchanger column มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป ใช้ได้ทุกยี่ห้อ แต่ควรมีขนาด 50 x 7.8 มม. และควรตรวจสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งาน

4. Personal computer (PC) เป็นส่วนที่จะทำการติดตั้ง (install) โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับควบคุมการทำงานของเครื่อง HPLC และคำนวณปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ จาก A_{415} ที่ส่งไปจากส่วนจับวัด PC ที่ใช้ควรเป็นชนิด IBM compatible และสามารถติดตั้ง Microsoft Windows ตั้งแต่ version 3.0 ขึ้นไปเพราะ software ควบคุม HPLC จะทำงานผ่านระบบ Windows

น้ำยา

1. Stock Bis-Tris, 200 mM

ละลาย Bis-Tris (Sigma) 4.18 กรัม ในน้ำกลั่น (HPLC grade) 100 มล. ปรับ pH ให้ได้ 6.5 ด้วย 2N HCl

2. Working Bis-Tris buffer

2.1 Buffer A (20 mM Bis-Tris, pH 6.3)

เตรียมโดย เจือจาง stock Bis-Tris 20 มล. ให้เป็น 200 มล. ด้วยน้ำกลั่น (HPLC grade) ปรับ pH ให้ได้ 6.3 ด้วย 2N HCl

2.2 Buffer B (20 mM Bis-Tris, 500 mM NaCl, pH 6.3)

เตรียมโดยผสม buffer A 100 มล. กับ NaCl 2.92 กรัม และ ปรับ pH ให้ได้ 6.3 ด้วย 2N HCl

หมายเหตุ Buffer ทั้งสอง ต้องกรองด้วย Millipore filter ขนาด 0.45 μ พร้อมทั้งต้อง degas ก่อนใช้เสมอ

ขั้นตอนการทำ

1. การเตรียม Hemolysate

1.1 EDTA blood 100 μ L ผสมกับ buffer A 400 μ L ในหลอดปั่นขนาด 1.5 มล. เขย่าแรงๆ ให้เม็ดเลือดแดงแตก

1.2 ปั่นด้วยความเร็วสูง (ประมาณ 10,000 rpm) 5 นาที แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนใส ซึ่งเป็นฮีโมโกลบิน นำมาปั่นด้วยความเร็วสูงอีกครั้งเพื่อให้ได้สารละลายสีแดงใส

1.3 กรองสารละลายที่ได้ด้วย Millipore filter ขนาด 0.45 μ จะได้สารละลายฮีโมโกลบิน ที่พร้อมสำหรับนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้

2. การเตรียมเครื่อง HPLC

2.1 เปิดเครื่องทั้ง 3 ส่วน (solvent delivery, detector, PC) รอประมาณ 15 นาที

2.2 ผ่าน column ด้วยน้ำกลั่น (HPLC grade) 10 นาที

2.3 ผ่าน buffer A เพื่อให้สภาพ column สมดุล นาน 10 นาที

2.4 ผ่าน blank และตามด้วย standard AFE หรือ known sample

2.5 ปรับสภาพ column 7 นาที ก่อนฉีด unknown samples

3. Gradient system

การไหลของ buffer A and B จะต้องเป็นแบบ linear gradient เพื่อทำให้ความเข้มข้นของ buffer A ลดลงจาก 100 ถึง 75% ภายใน 15 นาที และในขณะเดียวกันความเข้มข้นของ buffer B จะเพิ่มจาก 0 ถึง 25% ภายใน 15 นาทีเช่นกัน

อัตราการไหลที่ใช้คือ 2.0 มล./นาที ซึ่งจะทำให้มี back pressure 10-25 ก.ก./ตร.ม. ถ้าหาก column สกปรกหรืออุดตัน back pressure จะสูงกว่านี้ จะต้องล้าง column ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ

ตัวอย่างเกรเดียนท์ ที่ผู้ใช้ต้อง set เอง ซึ่งจะเห็นว่าใช้เวลาเพียง 20 นาทีต่อราย

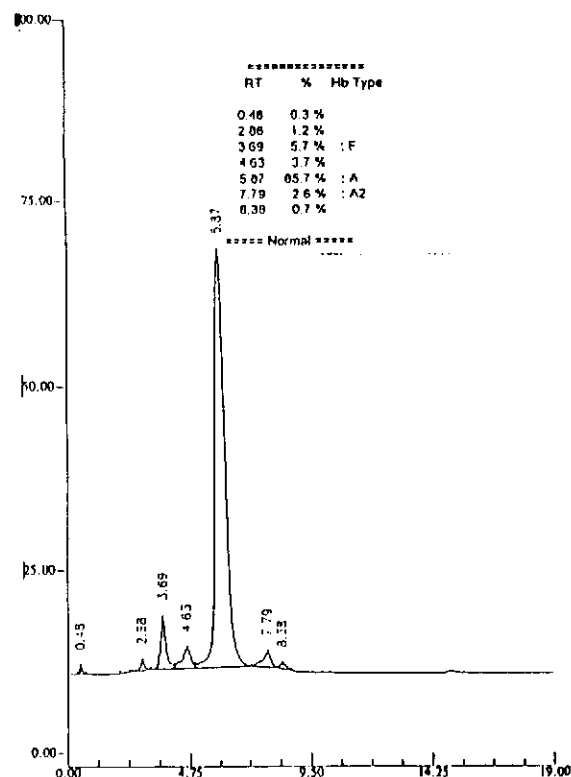
Time (min)	%A	%B
0.00	100	0
1.00	100	0
16.00	0	100
18.00	0	100
18.01	100	0
20.00	100	0

4. การอ่านผลกราฟ

4.1 ต้องตรวจสอบระบบว่าใช้งานได้ถูกต้อง โดยดูจาก standard และ known sample ก่อน ทุกครั้ง

4.2 Hemoglobin pattern ที่ได้คือ Bart's H F A A₂/E เรียงตามลำดับระยะเวลา

ที่ถูกชะออกจาก column หรือ retention time (RT) จากน้อยไปมาก (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดง chromatogram ของการแยกชนิดฮีโมโกลบินจากเลือดของผู้ใหญ่ด้วย HPLC

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาและสังเกตของผู้เขียน พบว่าค่า HbF ที่สูงเกิน 10% และ HbA₂/E ที่ได้จาก HPLC เชื่อถือได้ แต่ถ้า HbF ต่ำกว่า 10% จะไม่น่าเชื่อถือ เพราะได้ค่าสูงกว่าวิธีมาตรฐาน คือ alkaline denaturation test ซึ่งจะต้องศึกษาต่อไปว่าเกิดจากสาเหตุใด

HPLC ที่นำเสนอนี้เป็น ordinary HPLC ที่มีใช้ตามห้องปฏิบัติการทางเคมีทั่วไป การควบคุมการทำงานของระบบ รวมทั้งการเตรียม buffer เป็นหน้าที่ของผู้ใช้งาน ซึ่งบางครั้งผลที่ได้

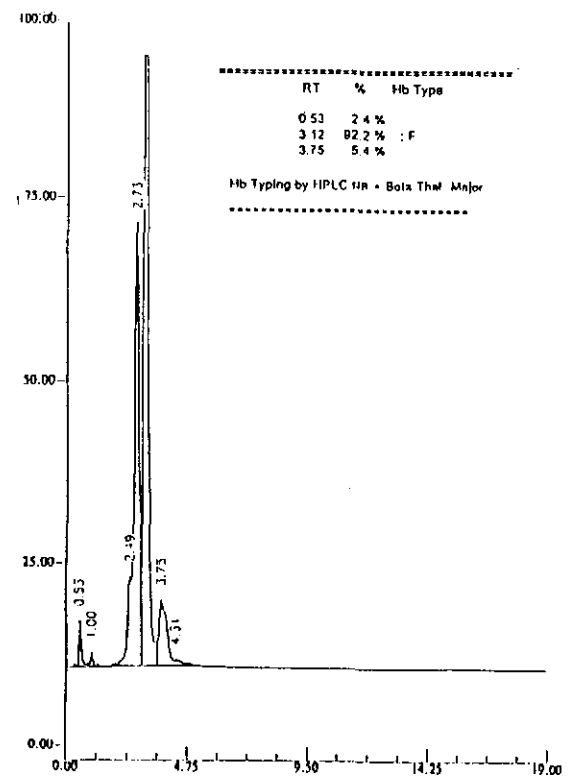
อาจมีความแปรปรวน (variation) และค่าการทวนซ้ำ (reproducibility) ไม่ดี ขึ้นกับคุณภาพของ buffer หรือ column ที่เปลี่ยนใหม่ HPLC แบบนี้มีหลายยี่ห้อ เช่น Waters, Bio-Rad, เป็นต้น

ปัจจุบันมีระบบ HPLC สำเร็จรูปที่ผลิตมาเพื่องานการแยกฮีโมโกลบินโดยเฉพาะ (Ready-made HPLC) โดยที่ทุกอย่างของระบบผู้ผลิตจะเป็นผู้เตรียมให้ทั้งสิ้น ผู้ใช้มีหน้าที่เพียงเรียนรู้วิธีการใช้เครื่องเท่านั้น และแน่นอนที่สุด ราคาของ HPLC แบบนี้ย่อมแพงกว่าแบบแรก การจะเลือกใช้แบบใดขึ้นกับงบประมาณ ความจำเป็น และลักษณะงาน HPLC แบบนี้เท่าที่มีจำหน่ายในปัจจุบันคือ VARIANTTM

ประโยชน์ของการใช้ HPLC เพื่อทำ Hb typing มีประโยชน์ต่อโรคธาลัสซีเมียหลายประการ คือ ทำให้สามารถวินิจฉัยชนิดของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินที่ผิดปกติได้, ใช้ในการตรวจกรองเพื่อหา carrier (heterozygote) ในกลุ่มประชากร และในผู้ที่มีความเสี่ยงก่อนสมรสได้, นอกจากนี้ ยังใช้เพื่อการตรวจทารกตั้งแต่ในครรภ์ เป็นการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis) สำหรับโรคธาลัสซีเมีย

การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดสำหรับโรคธาลัสซีเมีย อาศัยความสามารถของ HPLC ที่มีความไวสูงสามารถตรวจหา HbA ที่มีปริมาณน้อยในทารกที่อยู่ในครรภ์มารดาที่มีอายุครรภ์ 18-20 สัปดาห์ โดยใช้เลือดจากสายสะดือทารกที่อยู่ในครรภ์โดยการแทงเข็มผ่านผนังหน้าท้องของมารดาเข้าไป (cordocentesis) เมื่อได้เลือดมาแล้วอันดับแรกจะต้องตรวจความบริสุทธิ์ (purity)

ของเลือดทารกด้วยการพิจารณาจากการกระจายของขนาดเซลล์ (cell size distribution curve), ค่า MCV, และตรวจยืนยันอีกครั้งด้วยการย้อมดู F-cell เลือดทารกที่บริสุทธิ์จะต้องมีการกระจายของเซลล์เป็น peak เดียว, MCV มีค่าเกิน 100 fL และ F-cell โดยวิธี modified acid elution test เป็น 100% จากนั้นจึงนำเลือดทารกไปทำการแยกตามวิธีข้างต้น ถ้าพบ HbA peak 3-6% แสดงว่าทารกไม่เป็นโรค แต่ถ้าไม่พบ HbA peak แสดงว่าทารกเป็นโรคธาลัสซีเมีย กรณีที่ได้ค่า HbA ก้ำกึ่งไม่แน่ใจอาจจะพิจารณาใช้เทคนิคอื่นช่วยยืนยัน เช่น DNA analysis (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดง chromatogram การแยกชนิดฮีโมโกลบินโดย HPLC เพื่อการวินิจฉัยก่อนคลอดโรคเบต้าธาลัสซีเมีย(อายุครรภ์ 20 สัปดาห์)

การใช้งาน ordinary HPLC ในการแยกฮีโมโกลบินจำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญและความละเอียดลออ ซึ่งต่างจาก ready-made HPLC ไม่ต้องการคุณสมบัติขั้นนี้สักเท่าใดนัก ดังนั้นผู้ที่จะใช้ ordinary HPLC ในการทำ Hb typing ควรได้รับการฝึกฝนที่ดีพอสมควร

เอกสารอ้างอิง

1. ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี. วิธีการตรวจรักษาและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงในเด็ก. ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 1. วัฒนะ. เชียงใหม่. พ.ศ. 2537.
2. วราภรณ์ บำรุง. การศึกษาการแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธี cationic-exchange HPLC. ภาคนิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์). คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2538.
3. วีระวรรณ เรืองยุทธิกการณ. การตรวจวิเคราะห์สารพิษด้วยวิธีโครมาโตกราฟี. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 1995; 28: 22-33.
4. Tatu T, Kaidkaseam P, Hathirat P, Ajjimakorn S, Wisedpanichkij R, Bunyaratvej A. Prenatal diagnosis of β -thalassemia/Hb E disease by high performance liquid chromatography. Rama Med J 1995; 18: 159-63.