

การพัฒนาการตรวจวัดปริมาณกลัยเคทฮีโมโกลบิน โดยวิธี Affinity Chromatography

นันทยา ชะวีรัตน์* สันหัต ขอบุทธานุกาพ โนศรี สุทธิจิตต์**

=====

บทคัดย่อ ระดับ glycated hemoglobin ในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน และคนปกติ ที่ได้รับการวัดโดยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Amino-phenyl boronate sepharose ที่เตรียมขึ้นเองตามวิธีของ Cuatrecasas และ Anfinsen ได้ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของคนปกติ เท่ากับ $2.39 \pm 0.50\%$ ($n = 24$) และผู้ป่วยเบาหวานเท่ากับ $5.34 \pm 1.98\%$ ($n = 64$) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$) และคอลัมน์ที่ใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกอย่างน้อย 5 ครั้ง (คำรหัส : กลัยเคทฮีโมโกลบิน, เบาหวาน, โครมาโตกราฟี) วารสาร เทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม 2534 หน้า 37- 46

Abstract : Development of Affinity Chromatography Column for Glycated Hemoglobin Determination. Chanarat N, Khobudhanuparb S and Suttajit M.

Glycated hemoglobin in diabetics and non-diabetics was studied by an affinity chromatography method. Amino-phenyl boronate sepharose column was homemade developed using the method of Cuatrecasas and Anfinsen. The glycosylated hemoglobin in 64 diabetics was $5.34 \pm 1.98\%$ (Mean $\pm$ SD) which was highly significant different ($p < 0.005$) from 24 non-diabetics, $2.39 \pm 0.50\%$. The column could be reused for at least 5 times. (Keyword : Glycated hemoglobin, Affinity chromatography, Diabetes) Bull Chiang Mai AMS 1991; 24: 37- 46

ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เทคนิคการแพทย์) ของ นายสันหัต ขอบุทธานุกาพ ปีการศึกษา 2533
ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ และ ** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Glycated hemoglobin (gHb) ในคนปกติจะมียุ่ประมาณ 4-7% gHb จะแตกต่างจาก HbA ตรงที่ปลายเปปไทด์ของสายเบต้า (Beta chain) ของโกลบินทั้งสองสายจะมีกลูโคสเกาะอยู่ ซึ่งพบว่าการรวมตัวของกลูโคสกับ HbA_{1c} เกิดจากปฏิกิริยาที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง ผู้ป่วยเบาหวานจะมีระดับ gHb สูงขึ้นเป็น 2-3 เท่าของในคนปกติ คือประมาณ 18-20% ของปริมาณ Hb ทั้งหมด⁽¹⁻³⁾

วิธีการตรวจวัด gHb นั้น มีอยู่หลายวิธี ได้แก่ Affinity Chromatography, Spectrophotometry, Electrophoresis, Isoelectric focusing chromatography, Cation-exchange chromatography และ High performance liquid chromatography (HPLC)^(4,5) ในปัจจุบันวิธีการที่นิยมทำกัน คือวิธี affinity chromatography⁽⁶⁾ ซึ่งวิธีนี้ไม่มีผลกระทบจากอุณหภูมิขณะทำการทดสอบเหมือน Cation exchange chromatography บริษัทต่างๆ ได้ผลิตชุดสำเร็จรูปสำหรับการวัดระดับของ gHb โดยวิธี Affinity chromatography นี้ออกมาจำหน่ายหลายบริษัท แต่ก็มีระดับราคาสูงมากสำหรับการนำมาใช้ในบ้านเรา รายงานนี้ เพื่อพัฒนา Affinity column ขึ้นมาใช้เองในห้องปฏิบัติการ โดยได้ทำการเตรียมส่วนของ m-aminophenyl boronic acid sepharose ขึ้นเอง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

ได้จากการเจาะเลือด จากหลอดเลือดดำของคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวานอย่างละ 1 ราย โดยมี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ปริมาณ 1 มก.ต่อเลือด 1 มล. นำเลือดมาเตรียมเป็นน้ำเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysate) และแบ่งออกเป็นหลายๆ ส่วน เก็บไว้ในหลอดทดลอง

ขนาด 12x75 มม. เก็บในตู้แช่แข็ง เพื่อใช้ในการศึกษาความเที่ยงของการทดลอง

ตัวอย่างการทดสอบ

ได้จากการเจาะหลอดเลือดดำของคนปกติจำนวน 24 ราย โดยมี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ปริมาณ 1 มก. ต่อเลือด 1 มล. และได้จากการเจาะจากปลายนิ้ว ของผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 64 ราย โดยเลือดที่ได้บรรจุใน microhematocrit tube ที่มีเฮปาริน เป็นสารกันเลือดแข็ง นำเลือดที่ได้ มาเตรียมเป็นน้ำเม็ดเลือดแดงแตก เก็บไว้ในตู้แช่แข็งเพื่อหาปริมาณ gHb ต่อไป

วิธีการ

ก. วิธีการเตรียมน้ำเม็ดเลือดแดงแตก

นำตัวอย่างเลือด มาผสมกับน้ำยาทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (0.1% Triron X-100 และ 0.01% NaN₃) ในอัตราส่วน 1:10 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หากไม่ทำการตรวจวัดระดับของ gHb ในวันนั้น ให้เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

ข. วิธีการเตรียม m-Aminophenyl boronate sepharose

หลักการ : m-aminophenyl boronic acid จะรวมตัวกับ sepharose CL-6B ตามวิธีการของ Cuatrecasas and Anfinsen⁽¹⁾

ขั้นตอนในการเตรียม : m-aminophenyl boronate sepharose มีดังนี้

ข.1 ล้าง sepharose CL-6B (Lot 19F0456, Sigma Chemical Co.) ปริมาณ 25 มล. ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น ให้ผสม sepharose ที่ผ่านการล้างแล้ว กับ 0.1 M NaHCO₃ ปริมาณ 10 มล.

ข.2 เติม CNBr (Sigma) จำนวน 7.5 กรัม ใน 0.1 M NaHCO₃ ลงในส่วนผสมของ sepharose

ข.3 กวนสารผสมที่ได้นี้ตลอดเวลา ด้วย

เครื่องกวนแม่เหล็กให้ทั่ว และปรับ pH ให้ได้ 10-11 คงที่เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ด้วย 50% (w/v) NaOH ที่อุณหภูมิ 20-25 °C

ข.4 หยดปฏิกิริยาโดยการกรอง sepharose ผ่าน glass wool และล้างด้วย cold 0.1 M NaHCO₃ ปริมาณ 1,000 มล.

ข.5 เตรียม m-aminophenyl boronic acid hemisulfate (Sigma) ปริมาณ 200 มก. ใน 0.1 M NaHCO₃ ปริมาณ 25 มล. และให้ปรับ pH ของสารละลายนั้นจนได้ 7.5 แล้วเติมลงไปลงใน sepharose ทันทีภายหลังการล้าง

ข.6 นำส่วนผสมที่ได้ขึ้น ไปเก็บที่ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง

ข.7 นำ m-aminophenyl boronate-coupled sepharose ที่ได้ มาทำปฏิกิริยากับ ethanolamine-HCl (Sigma) ปริมาณ 2.1 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น และปรับ pH จนได้ 7.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 °C

ข.8 เมื่อครบเวลา นำเอา sepharose มาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณมาก จากนั้น นำ sepharose นี้มาผสมกับ 0.02% NaN₃ และ เก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อใช้หาปริมาณ gHb ต่อไป

ค. วิธีการเตรียมคอลัมน์

เติม aminophenyl boronate sepharose ลงไปในคอลัมน์ขนาดเล็ก โดยให้มีความสูงของ sepharose ประมาณ 1 ซม.

ง. การวัดระดับของ gHb โดยวิธี Affinity chromatography

หลักการ : gHb จะรวมตัวกับ m-aminophenyl boronate sepharose ในขณะที่ ส่วนของ Hb อื่นๆ จะหลุดออกจากคอลัมน์ จากนั้น ใช้สารละลาย sorbitol ชะลอ gHb ออกมา นำส่วนของ Hb อื่นๆ และ gHb ไปวัดการดูดกลืนแสง (A) ที่ 415

นาโนเมตร น้ำยาที่ใช้

1) Wash buffer (0.25 M ammonium acetate, 0.02% NaN₃, 1.0% Triton X-100) pH 7.8. เตรียมโดย ละลาย ammonium acetate 19.27 กรัม และ NaN₃ 0.2 กรัม ในน้ำ เติม Triton X-100 ลงไป 10 มล. จากนั้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ปรับ pH ให้เป็น 7.8 เก็บไว้ที่ 4 °C

2) Elution buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M Sorbitol, 0.02% NaN₃, 1.0% Triton X-100) เตรียมโดย ละลาย 15.760 กรัมของ Tris-HCl, 18.2 กรัม sorbitol และ 0.2 กรัมของ NaN₃ ในน้ำ กลั่น เติม Triton X-100 ลงไป 10 มล. แล้วปรับปริมาตร จนครบ 1,000 มล.

วิธีทำ

ง.1 การ equilibrate sepharose
เติม wash buffer ลงไปใน คอลัมน์ จำนวน 5 มล. รอจนน้ำเพอร์โฟลผ่าน คอลัมน์หมด เปลี่ยนหลอดที่สามคอลัมน์

ง.2 เติมน้ำเม็ดเลือดแดงแดง ลงไป 50 ไมโครลิตร และเติม wash buffer ตามลงไป 0.5 มล. เมื่อเห็นส่วนของน้ำเม็ดเลือดแดงเข้าไปใน sepharose หมดแล้วจึงเติม wash buffer ลงไปอีก 4.5 มล. จากนั้น ปล่องยี่ห้อ wash buffer นี้ ผ่านคอลัมน์เข้าไปจนหมด จากนั้นเติม wash buffer ลงไปในส่วนที่ผ่าน คอลัมน์ ออกมาอีก 5.0 มล. ผสมน้ำให้เข้ากันดี เก็บไว้เป็นส่วนที่ 1 (Wash fraction)

ง.3 ย้ายคอลัมน์มาสวมในหลอดขนาด 13 x100 มม. เติม eluting buffer ลงไป 3 มล. ปล่องยี่ห้อผ่านคอลัมน์ไปจนหมด และเก็บส่วน น้ำไว้เป็นส่วนที่ 2 (Eluant fraction)

ง.4 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ของทั้ง

สองส่วน ที่ 415 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปรับ
ศูนย์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณหา
%gHb จากสูตร

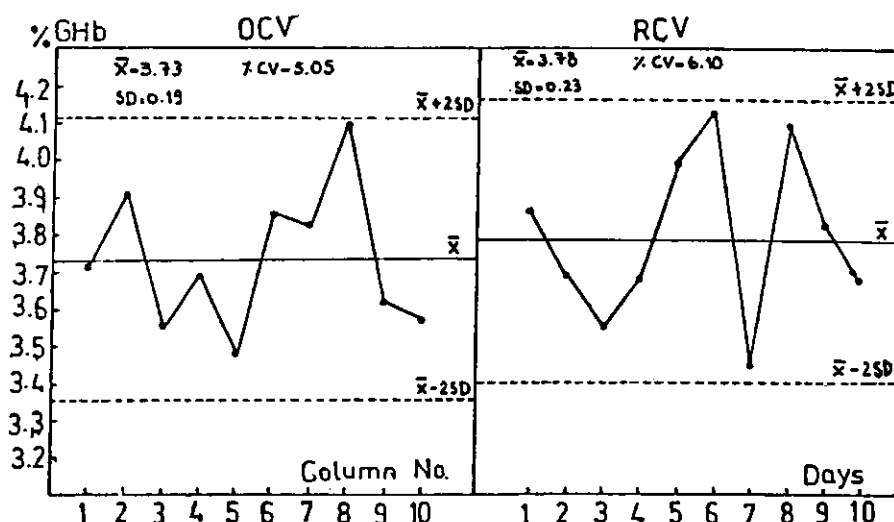
$$\%gHb = \frac{3(A_{eluant})}{10(A_{wash}) + 3(A_{eluant})} \times 100$$

๖.5 คอลัมน์ที่ ๑๕ แล้วนี้ สามารถนำมาใช้
ได้อีก โดยภายหลังจากการล้างแต่ละครั้ง ให้เติม
HCl 0.1N HCl ลงไป 5 มล. แล้วปล่อยทิ้งไว้
จากนั้นเติม 0.001N HCl ลงไปอีก 5 มล.

ปล่อยทิ้งไว้จนเหลือ 2 มล. แล้วปิดคอลัมน์ทั้ง
ส่วนบน และส่วนล่าง นำไปเก็บที่ 4°C

ผลการทดลอง

1. ความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ
พบว่าเมื่อนำน้ำเม็ดเลือดแดงแตก ของคน
ปกติมาหาค่า gHb ไปพร้อมๆ กันจำนวน 10
คอลัมน์ ได้ค่า $\bar{X} = 3.73\%$, $SD = 0.19$ และ
 $\%CV = 5.05$ เมื่อหาปริมาณ gHb ในแต่ละวัน
พบว่าได้ค่า $\bar{X} = 3.78\%$, $SD = 0.23$ และ
 $\%CV = 6.10$ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงค่าความเที่ยงของการวัดระดับ gHb ในคนปกติ

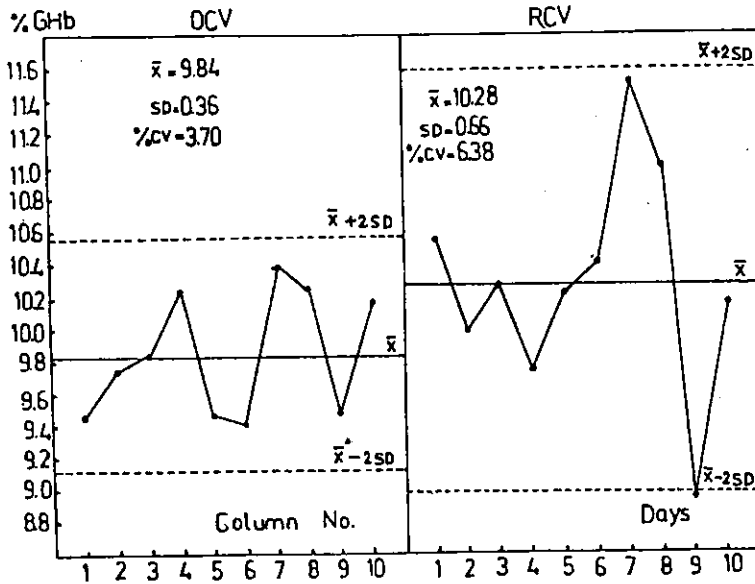
เมื่อนำน้ำเม็ดเลือดแดงแตก ของผู้ป่วย
เบาหวานมาหาค่า gHb ไปพร้อมๆ กันจำนวน
10 คอลัมน์ ได้ค่า $\bar{X} = 9.84\%$, $SD = 0.36$
และ $\%CV = 3.70$ เมื่อหาปริมาณ gHb ในแต่ละ
วัน พบว่าได้ค่า $\bar{X} = 10.28\%$, $SD = 0.66$
และ $\%CV = 6.38$ ดังรูปที่ 2

2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ sorbitol
ใน eluting buffer (ตารางที่ 1)
ความเข้มข้นของ sorbitol เท่ากับ 0.2

M เมื่อทำการวัดระดับ gHb ครั้งแรก ได้ $\bar{X} =$
9.58% และ เมื่อทำการทดลองติดต่อกันเป็นครั้งที่
สอง ได้ค่า $\bar{X} = 6.47\%$

ความเข้มข้นของ sorbitol เท่ากับ 0.1
M เมื่อทำการวัดระดับ gHb ครั้งแรก ได้ $\bar{X} =$
9.11% และ เมื่อทำการทดลองติดต่อกันเป็นครั้งที่
สอง ได้ค่า $\bar{X} = 7.61\%$

3. จำนวนครั้งที่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีกของ
คอลัมน์ (ตารางที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงค่าความเที่ยงของการวัดระดับ gHb ในผู้ป่วยเบาหวาน

ตารางที่ 1 แสดงระดับของ gHb เมื่อใช้ความเข้มข้นของ sorbitol ต่างกันใน eluting buffer

ความเข้มข้นของ sorbitol	%gHb ($\bar{X}$)		% ที่ลดลงของระดับ gHb
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
0.1 M	9.11	7.61	16.5
0.2 M	9.58	6.47	32.5

เมื่อใช้น้ำเม็ดเลือดแดงแตก ของผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 265 มก./ดล. มาหาค่า gHb พร้อมๆ กันจำนวน 10 คอลัมน์ ได้ค่า $\bar{X} = 8.87\%$, $SD = 0.21$ พบว่าเมื่อใช้วิธีการล้างคอลัมน์ ตามวิธีที่กล่าวแล้ว คอลัมน์นั้นสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกจำนวน 5 ครั้ง โดยที่ค่า gHb ที่ได้ไม่แตกต่างกันกับค่าที่ได้ครั้งแรกเกิน $\pm 2SD$

เมื่อใช้น้ำเม็ดเลือดแดงแตก ของคนปกติที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 87 มก./ดล. มาหาค่า

gHb พร้อมๆ กันจำนวน 10 คอลัมน์ ได้ค่า $\bar{X} = 2.36\%$, $SD = 0.12$ พบว่าคอลัมน์นี้สามารถนำกลับมาใช้ได้อีกไม่ต่ำกว่า 5 ครั้ง โดยที่ค่า gHb ที่ได้ไม่แตกต่างกันกับค่าที่ได้ครั้งแรกเกิน $\pm 2SD$

4. ความแตกต่างของระดับ gHb ในคนปกติกับผู้ป่วยเบาหวาน

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า gHb ในกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 84 ราย เท่ากับ $2.39 \pm 0.50\%$ และ

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนครั้งที่สามารถนำกลับมาใช้ได้ของคอลัมน์

ครั้งที่	%gHb ในคนปกติ	%gHb ในผู้ป่วยเบาหวาน
1	2.47	8.47
2	2.58	7.69*
3	1.95*	9.64
4	2.81	9.12
5	2.45	8.65
6	2.09*	10.07*
7	2.38	7.92*
8	2.02	6.01*
9	2.29	8.43*
10	1.45*	5.58*
11	2.17	8.16*
12	1.89*	6.71*
13	1.51*	7.74*
14	2.35	5.72*
15	2.26	5.20*
16	2.07*	6.58*
$\bar{X} \pm 2SD$	2.36 ± 0.24	8.87 ± 0.42

* ค่าที่ได้ เกินช่วง $\pm 2SD$

5.34 $\pm$ 1.98% ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี unpaired t test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$)

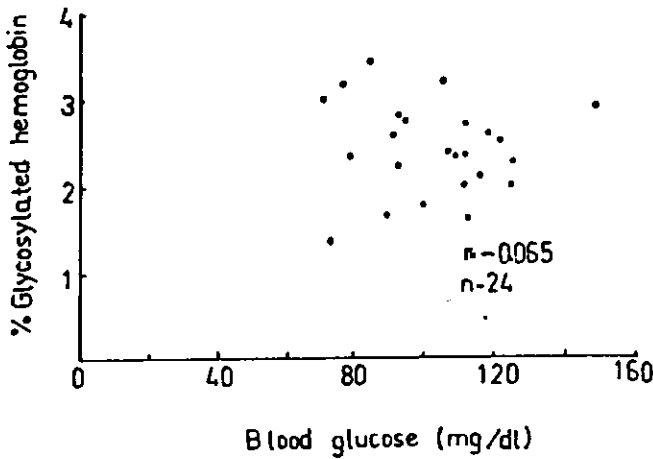
5. ความสัมพันธ์ของระดับน้ำตาลในเลือด กับ gHb

ในคนปกติ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ = 0.065 จากจำนวนตัวอย่าง 24 ราย ดังแสดงในรูปที่ 3

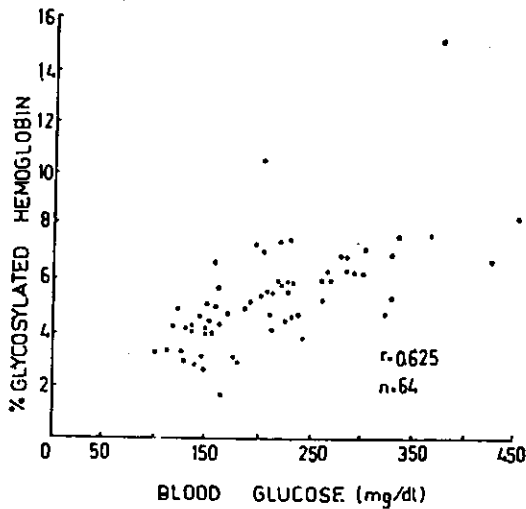
ในผู้ป่วยเบาหวาน ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ = 0.625 จากจำนวนตัวอย่าง 64 ราย ดังแสดงในรูปที่ 4

6. ค่าเฉลี่ยของ gHb ของผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่างๆ กัน

พบว่าค่าเฉลี่ยของ gHb จะเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่มีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงตั้งแต่ 101-150 มก./ดล.ขึ้นไป จะให้ค่า gHb ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับน้ำตาลในเลือดกับ gHb ของคนปกติ



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับน้ำตาลในเลือดกับ gHb ของผู้ป่วยเบาหวาน

คียงทางสถิติกับค่าเฉลี่ยของ gHb ในคนปกติ ($t = 3.4029$, $p < 0.005$) ดังแสดงในรูปที่ 5

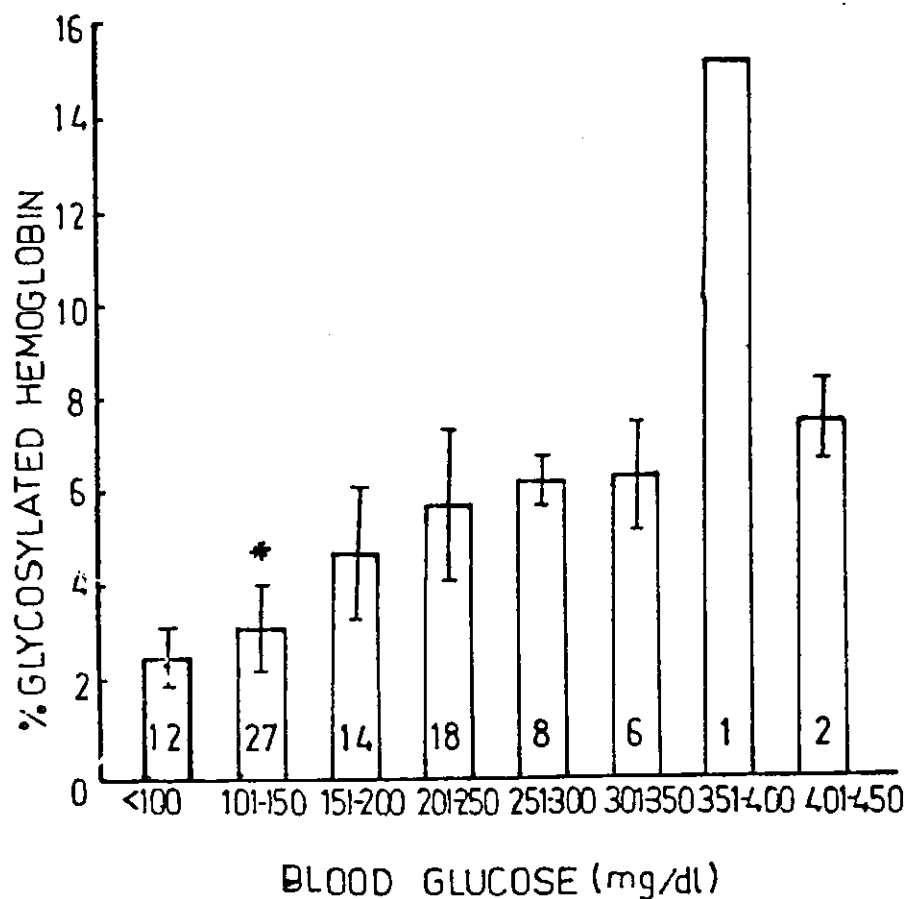
7. ระดับของ gHb ที่ได้จากการเตรียม m-aminophenyl boronate sepharose แต่ละครั้ง

ค่าที่ได้ของ gHb ในการเตรียม m-aminophenyl boronate sepharose แต่ละครั้ง

จะแตกต่างกันเล็กน้อย แต่เมื่อทดสอบทางสถิติโดยการทำ paired t test พบว่า ค่าที่ได้แตกต่างกันนี้ ไม่นัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3

บทวิจารณ์

จากการศึกษาถึงความเที่ยงของการวัดระดับ gHb เมื่อใช้น้ำเมีดเลือดแดงแดงของคนปกติและ



รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยของ gHb ของผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่างๆ กัน (ตัวเลขในกราฟแสดงถึงจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม, * เริ่มมีความแตกต่างจากกลุ่ม <100 มก./ดล. อย่างมีนัยสำคัญ)

ตารางที่ 3 แสดงระดับ gHb ที่ได้จากการเตรียม aminophenyl boronate sepharose ในแต่ละครั้ง

Sample No.	Blood glucose (mg/dl)	%gHb ($\bar{X}$)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	265	12.26	10.89	9.79
2	117	4.06	3.86	4.27
3	87	4.14	3.19	3.96

ผู้ป่วยเบาหวาน พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%CV) ของตัวอย่างทั้งสองระดับนี้ ไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งการทำไปพร้อมๆ กัน ในวันเดียว และการทำคนละวันกัน

จากการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ sorbitol ใน eluting buffer โดยการใช้สีน้ำเงินเกิดสีแดงแดงแดง ของผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 265 มก./ดล. พบว่าความเข้มข้นของ sorbitol เพียง 0.1 M ก็เพียงพอแล้วสำหรับการเข้าแทนที่ gHb ที่รวมตัวกับ m-aminophenyl boronate sepharose ได้ เพราะมีความเข้มข้นมากกว่า gHb ที่มีความเข้มข้นเพียงประมาณ 10 μ M หลายเท่า นอกจากนี้ เมื่อทำการล้างคอลัมน์ภายหลังการใช้แล้ว และนำมาทดสอบวัดระดับของ gHb ในหมักที่พบว่าค่าของ gHb ที่ได้ครั้งหลังนี้ จะลดลงจากเดิม 16.5% เมื่อใช้ sorbitol 0.1 M ในขณะที่เมื่อใช้ sorbitol 0.2 M จะทำให้ระดับ gHb ลดลงถึง 32.5% ผลดังกล่าวนี้ เนื่องมาจากน้ำยาที่ใช้ล้างคอลัมน์เพื่อนำกลับมาใช้ก็ยังไม่สามารถไปแทนที่ sorbitol ออกจาก amino-phenyl boronate sepharose ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ในความสามารถของ sorbitol 0.1 M นี้ การแทนที่ด้วยกรด HCl จะกระทำได้ง่ายกว่า ดังนั้น การใช้ ความเข้มข้นของ sorbitol 0.1 M ในบัฟเฟอร์สำหรับล้างคอลัมน์ จึงมีความเหมาะสมมากกว่าความเข้มข้น 0.2 M ในการนำมาใช้ซึ่งที่กล่าวมา สำหรับการนำกลับมาใช้ใหม่ของคอลัมน์นั้น รายงานของแวนนาว่า ไม่ควรนำมาใช้ทันทีภายหลังการล้างด้วยกรด ควรจะทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนนำมาใช้ เพื่อให้ sorbitol หลุดออกจาก aminophenyl boronate sepharose ได้อย่างสมบูรณ์หรือมากที่สุดเสียก่อน

สำหรับจำนวนครั้งที่สามารถนำกลับมาใช้ได้

อีกของคอลัมน์นั้น ดูได้จากค่า $\bar{X} \pm 2SD$ ของการทำ RCV โดยสำหรับผู้ป่วยเบาหวานนั้น ได้ใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 265 มก./ดล. มาทำ ส่วนคนปกติได้ใช้ตัวอย่างจากคนสุขภาพดี ที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 87 มก./ดล. มาทำ จากนั้น ดูว่า ค่าที่ได้จากการนำกลับมาใช้ในแต่ละครั้งนั้น ค่าที่ได้เกินจากช่วง $\bar{X} \pm 2SD$ หรือไม่ หากพบว่า ค่าที่ได้ในการทดสอบแต่ละครั้ง ไม่อยู่ในช่วง $\bar{X} \pm 2SD$ เป็นจำนวน 2 ครั้งติดต่อกัน แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์นั้นหมดสภาพ ไม่ควรนำกลับมาใช้อีก ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ พบว่าคอลัมน์ที่ใช้กับตัวอย่างจากผู้ป่วยเบาหวานนั้น สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก 5 ครั้ง ส่วนคอลัมน์ที่ใช้กับตัวอย่างจากคนปกติ สามารถนำกลับมาใช้ได้มากกว่า 5 ครั้ง จากการทดลองนี้ ทำให้ทราบว่าคอลัมน์แต่ละอันนั้น สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ซึ่งนับว่ามีประโยชน์มาก เพราะจะเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดระดับ gHb โดยวิธี Affinity chromatography ที่มีราคาแพงลงได้

เมื่อทำการทดลองวัดระดับ gHb ในกลุ่มคนปกติ 24 ราย พบว่าค่า $\bar{X} \pm SD$ ของกลุ่มตัวอย่าง เท่ากับ $2.39 \pm 0.50\%$ และในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานได้ค่า $\bar{X} \pm SD$ เท่ากับ $5.34 \pm 1.98\%$ ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ถึงแม้ว่าจะได้ค่าไม่เท่ากับที่กล่าวไว้ว่าพบหน้า ซึ่งอาจจะเป็นเนื่องจากเป็นกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน แต่ก็พบว่าสามารถชี้แสดงถึงความแตกต่างกันของระดับ gHb ของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองอย่างชัดเจน โดยพบว่าเมื่อทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของระดับ gHb ของทั้งสองกลุ่มโดยวิธี unpaired t test พบว่าค่าทั้งสองนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับน้ำตาลในเลือดกับ gHb นั้น เมื่อทำการศึกษาในกลุ่ม

คนปกติจำนวน 24 ราย พบว่าค่า $r = -0.065$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในกลุ่มตัวอย่างคนปกติ ค่าทั้งสองนั้นไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 64 ราย และกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 88 ราย พบว่าค่า r ที่ได้เท่ากับ 0.625 และ 0.754 ซึ่งค่าที่ได้ทั้งสองค่านี้ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับน้ำตาลในเลือด กับ gHb ในกลุ่มตัวอย่างนี้ว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างดี ดังนั้น เราสามารถพยากรณ์ระดับ gHb นี้เป็นตัวควบคุมและผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อที่จะคาดเดาถึงระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงที่ผ่านมาของผู้ป่วยได้ และเมื่อนำมาเทียบกับการศึกษาค่าเฉลี่ยของ gHb ในผู้ที่ระดับน้ำตาลในเลือดต่างๆ กันแล้ว พบว่าระดับของ gHb จะเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นโดยระดับน้ำตาลในเลือดตั้งแต่ช่วง 101-150 มก./ดล. ขึ้นไป จะให้ค่าของ gHb สูงกว่าระดับ gHb ของกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$) ซึ่งค่าที่ได้จากการศึกษาทั้ง 2 แบบนี้ มีความสอดคล้องกัน

ในการเตรียม aminophenyl boronate sepharose แต่ละครั้งนั้น พบว่า ค่าของ gHb ที่ได้ มีความแตกต่างกันอยู่บ้าง แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ โดยการทำ unpaired t test สาเหตุที่ทำให้ได้ผลดังกล่าวนี้ เนื่องมาจากการเตรียม aminophenyl boronate sepharose แต่ละครั้งนั้น ผู้ทำการทดลองได้เตรียมจนปริมาณที่ไม่เท่ากัน แต่ได้ใช้สถานะต่างๆ ในการเตรียม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง sepharose กับ m-aminophenyl boronic acid เท่ากันทุกครั้ง ซึ่งคาดว่าจากสาเหตุดังกล่าวนี้ เป็นผลทำให้การทำปฏิกิริยาดังกล่าว เกิดไม่สมบูรณ์และทั่วถึงพอจนการเตรียมปริมาณมาก ซึ่งจากสาเหตุนี้ สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารทั้งสองดังกล่าวให้นานขึ้น และควรมีการกวนผสมตลอดเวลาด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. King ME. Glycosylated Hemoglobin. In Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Co, 1987.
2. Koenst MH and Edstrom RD. Determination of glycosylated hemoglobin : A laboratory experiment relevant to diabetes mellitus. Biochem Ed 1985; 13: 7-9.
3. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, et al. Glucose regulation and HbA_{1c} in diabetes. New Engl J Med 1976; 295: 417-420.
4. นันทยา ชนะรัตน์, ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ และ มณี แก้วบั้ง. กลัยเคมิอีโมโกลบิน : วิธีการที่เหมาะสม. วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ 2531; 21: 31-38.
5. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography : comparison with colorimetric and ion exchange methods, and effects of common interference. Clin Chem 1982; 28: 2088-2094.

นันทยา ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)
ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่