

การพัฒนาน้ำยาเพื่อวิเคราะห์หาคกรดยูริกโดยวิธีเอนไซม์

สุรพล คังวารสิทธิชัย*, อรทัย คังวารสิทธิชัย* และ
ทวีสุข กระมลล้วน*

Abstract : Direct Diagnostic Test for
Determination of Uric acid. Tangvarasittichai~ S.*,
Tangvarasitticha O.* and Kanluan T.*

บทคัดย่อ : การพัฒนาน้ำยาเพื่อวิเคราะห์หาคกรดยูริก
โดยวิธีเอนไซม์นี้ ได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจให้ค่า การดูด
กลืนแสงมากที่สุดต่อสีที่เกิดขึ้นภายหลังการทำ
ปฏิกิริยาที่ 512 nm. ให้ค่าความเสถียรภาพ ของสีที่
เกิดขึ้นได้นานกว่า 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว มีความ
สัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์กรดยูริก โดยน้ำยาของ
บริษัทเบอริงเกอร์เมนไฮม์ บริษัทเอมส์ และโดยวิธี
Phosphotungstic acid ด้วยเครื่อง AutoAnalyzer I
โดยมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.994 ($p < 0.001$),
0.998 ($p < 0.001$) และ 0.972 ($p < 0.001$) ตามลำดับ
ให้ค่าความแม่นยำด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน
อยู่ในช่วง 0.90% - 2.76% ให้ค่าความถูกต้อง
(accuracy) ดีเชื่อถือได้ และค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง
(% accuracy) เป็น 101.9%, 101.1% และ 100.3% ให้
ค่าความเป็นเส้นตรงได้ถึง 20.0 มก./ดล. โดยให้ค่า
regression line $r = 0.999$, slope = 1.006 ค่าอ้างอิงอยู่
ในช่วง 3.48 - 7.49 มก./ดล. และไม่มีผลรบกวนการ
วิเคราะห์จากบิลิรูบินที่สูงถึง 20 มก./ดล. และจาก
ความขุ่น (lipidemic) ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ที่สูง
ถึง 500 มก./ดล.

The direct diagnostic test for
determination of uric acid was developed. A
single working reagent is used, the reaction is
completed in 10 min. and maximum absorbance
of red dye formed is at 512 nm. The results from
our direct diagnostic method correlate very well
with the two commercial kits (Boehringer and
Ames) and phosphotungstic acid method by
AutoAnalyzer I [$r = 0.994$ ($p < 0.001$), $r = 0.998$ ($p < 0.001$), and $r = 0.972$ ($p < 0.001$)]. The
coefficient of variation (%CV.) of within-run and
between-run assay by our diagnostic test are 0.90-
2.76%, and good accuracy with percent accuracy
101.9%, 101.1%, 100.3%. The linear ity for uric
acid concentration is at least 20.0 mg/dl., and
regression line $r = 0.999$, slope = 1.006. The
reference range is 3.48-7.49 mg/dl. And no
interfered by bilirubin and lipidemic serum.

คำรหัส :- ยูริก แอซิด, ยูริกเอส, 3,5-ไดคลอโร-2-
ไฮดรอกซีเบนซีน ซัลโฟนิค แอซิด

Keyword : uric acid, uricase, 3,5-dichloro-2-
hydroxybenzene sulfonic acid

* ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์

* Department of Clinical Chemistry. Faculty

มหาวิทยาลัยมหิดล

of Medical Technology. Mahidol University

บทนำ

กรดยูริกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการเผาผลาญพิวรีนนิวคลีโอไทด์(1)(purine nucleotide) ในคนส่วนใหญ่จะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ อัตราการสังเคราะห์กรดยูริกในแต่ละวันมีประมาณ 400 มก. การมีกรดยูริกสูงขึ้นอาจจะเป็นผลจากการเพิ่มการสร้างเริ่มต้นของพิวรีน เช่น ในผู้ป่วย lymphoproliferative disorders ผู้ป่วยโลหิตจางจากการแตกของเม็ดเลือดแดงเรื้อรัง (chronic hemolytic anemia) หรือเกิดจากการขับกรดยูริกออกทางปัสสาวะลดลง เช่น ในคนไข้โรคไตเรื้อรัง (chronic renal disease) หรือ อาจมีความผิดปกติของเอนไซม์ในวิถีของการเผาผลาญพิวรีนนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์หาระดับกรดยูริกในซีรัมจะช่วยในการวินิจฉัย โรคเก๊าท์ (gout) และภาวะที่มีกรดยูริกในเลือดสูง (hyperuricemia) อันเกิดจากสาเหตุต่าง ๆ ได้ วิธีการวิเคราะห์กรดยูริกเดิมใช้ปฏิกิริยาทางเคมี(1) (chemical methods) โดยอาศัยหลักการให้กรดยูริกในน้ำกรองไว้โปรตีนของซีรัมหรือในปัสสาวะรีดิวส์อัลคาไลน์ฟอสเฟตทั้งสแตท (alkaline phosphotungstate) ทำให้เกิดสีน้ำเงิน (tungsten blue) และอ่านความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 650-700 นม. วิธีนี้ได้ดัดแปลงใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติแบบไหลต่อเนื่อง (continuous flow) โดยใช้การไดอะลิซิส (dialysis) แทนการตกตะกอนโปรตีน เพื่อตัดขั้นตอนในการตกตะกอนโปรตีน ซึ่งอาจทำให้ uric acid ตกตะกอนลงไปด้วย และตัดความยุ่งยากของขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาออกไป ได้มีการนำการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์ (enzymatic method) มาใช้วิธีนี้ใช้เอนไซม์ยูริเคส uricase: oxygen

oxidoreductase, EC.1.7.3.3) ในการเร่งปฏิกิริยา Oxidation ของ uric acid ให้เป็น allantoin และ H_2O_2 ผลที่เกิดขึ้นนี้สามารถวัดได้ทั้งวิธี kinetic

(293, 340 nm)(2) หรือทำปฏิกิริยากับสารให้สีต่างๆ เพื่ออ่านสีที่เกิดขึ้นโดยวิธี colorimeter ได้ (3,4,5)

รายงานการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเป็นแนวทางในการเตรียมน้ำยาวิเคราะห์กรดยูริกโดยวิธีเอนไซม์ขึ้นใช้เอง และสามารถเก็บไว้ใช้ได้ในรูปแบบของ lyophilized

วัสดุและวิธีการ

- 1) สิ่งส่งตรวจ :- ซีรัมที่นำมาหาค่าอ้างอิง (referent value) ได้จากบุคลากรภายในโรงพยาบาลศิริราช และคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล และครอบครัว ที่มาตรวจสอบสภาพและไม่พบความผิดปกติของผลการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก จำนวนทั้งสิ้น 105 ราย ส่วนซีรัมและปัสสาวะที่ใช้ในการ วิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์ ได้จากผู้ป่วยภายในโรงพยาบาลศิริราช จำนวนทั้งสิ้น 116 ราย ซีรัมควบคุมคุณภาพ (control serum) ใช้ HUMATOL-P Lot.No. P1010 ของบริษัท HUMAN และของบริษัท CIBA-CORNING Lot. No.036801 และ ซีรัมรวม (pooled serum) ที่เตรียมขึ้นเอง
- 2) เครื่องมือ (Instruments) :- เครื่อง Photometer 4010, เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ HITACHI 705 (discrete analyzer), เครื่อง Autoanalyzer I (contineous flow), เครื่อง Spectrophotometer HITACHI U-3210, เครื่องระเหิดแห้ง

(Lyophilizer) Lyovac GT2.

3) การเตรียมน้ำยา

3.1) Phosphate buffer/Enzymes/4-Aminophenazone reagent ประกอบด้วย Phosphate buffer 200 mmol/l pH 7.0, ascorbate oxidase (*Cucurbita* species) ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.2 KU/L, horseradish peroxidase มากกว่าหรือเท่ากับ 0.2 KU/L, Uricase (*Aspergillus flavus*) มากกว่าหรือเท่ากับ 6 KU/L 4-amino-phenazone 0.33 mmol/l, 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzene sulfonic acid 8 mmol/l ใส่ขวดละ 20 มล. เก็บไว้ในรูป lyophilize

3.2) Reconstituent buffer :- ละลาย potassium ferrocyanide 40 μ mol/l และ Triton X-100 5 กรัม/ลิตร ใน phosphate buffer ใช้เป็นน้ำยาสำหรับละลายน้ำยาในข้อที่ 3.1

3.3) สารมาตรฐานกรดยูริก (1 กรัม/ลิตร) :- ละลายกรดยูริก 100 มก. และลิเทียม คาร์โบเนต 60 มก. ในน้ำกลั่น 100 มล.

4) วิธีที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ HITACHI 705 เป็นเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติแบบคิสคริท โดยใช้รีจัม 5 ไมโครลิตร และน้ำยาวิเคราะห์ 350 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที วัดที่ความยาวคลื่น 505 nm. และ 700 nm. โดยจะใช้ฟารามิเตอร์นี้เหมือนกันทุกอย่าง ทั้งการวิเคราะห์ด้วยน้ำยาที่เตรียมขึ้นเอง น้ำยาของบริษัทเบอร์เกอร์ และบริษัทออสต์

5) วิธีที่วิเคราะห์ด้วยกรดฟอสโฟทังสเตน ซึ่งทำ

การวิเคราะห์โดยเครื่อง AutoAnalyzer I โดยใช้รีจัม 250 ไมโครลิตร ผ่านตัวไดอะไลซ์ (dialyzer) เพื่อแยกโปรตีน จากนั้น ส่วนไฮโดรโปรตีนที่ได้ก็จะผ่านเข้ามาทางขดแกวผสม (mixing coil) พร้อมกับน้ำยาฟอสโฟทังสเตนจำนวน 500 ไมโครลิตร (วิธีนี้ใช้โซเดียมโซยาโนสเป็นตัวปรับสภาวะให้เป็นด่าง) เวลาที่ใช้อุ่นให้เกิดปฏิกิริยานาน 15 นาที ที่ 660 nm.

6) วิธีที่วิเคราะห์ด้วยมือ (Manual) ใช้สารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร และน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมเอง 2.5 มิลลิตร ผสมให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องโฟโตมิเตอร์ 4010 ที่ 546 nm. โดยใช้น้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมเองปรับศูนย์ (reagent blank)

วิธีการทดลอง

- 1) ทดสอบหาช่วงคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนที่ให้ค่าการดูดแสงมากที่สุด คอสีที่เกิดขึ้นภายหลังการทำปฏิกิริยาแล้ว โดยน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมเองทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานกรดยูริกให้เกิดสีแล้วนำไปสแกน (scan) โดยใช้เครื่อง Hitachi U-3210
- 2) ทดสอบความคงสภาพของสีที่เกิดขึ้น โดยนำสารมาตรฐานกรดยูริก 2 ค่า คือ ค่าต่ำ (1) (4.0 มก./คต.) และค่าสูง (2) (20.0 มก./คต.) มาทำปฏิกิริยากับน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้น และติดตามสีที่เกิดขึ้นทุกนาทีและความคงสภาพของสีที่เกิดขึ้นภายหลัง 10 นาที

- 8) ทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กรดยูริกในซีรัมและปัสสาวะจากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศิริราช โดยการตรวจที่ใช้น้ำยาที่เตรียมเองกับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้น้ำยาวิเคราะห์สำเร็จรูปที่มีจำหน่ายทั่วไป 2 บริษัท คือ เบอริงเกอร์แมนไฮม์และเฮมส์ด้วยเครื่อง HITACHI 705 และเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วยสารเคมีกรดฟอสโฟทังสติกซึ่งใช้เครื่อง AutoAnalyzer I
- 9) ทดสอบความแม่นยำ (precision) ของน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเองด้วยเครื่อง HITACHI 705 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยน้ำยาของทั้งสองบริษัทด้วย
- 10) ทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ของน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเอง ด้วยเครื่อง HITACHI 705
- 11) ทดสอบเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์ที่ได้ (% accuracy) ของน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเอง ด้วยเครื่อง HITACHI 705
- 12) ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเอง
- 13) ทดสอบความคงสภาพของน้ำยาสำเร็จที่เตรียมขึ้นเอง ภายหลังจากที่ละลายด้วยบัฟเฟอร์แล้วทำการวิเคราะห์หาค่ากรดยูริกในซีรัมควบคุมคุณภาพประจำวันทุกวัน
- 14) ทดสอบการรบกวน (interfered) จากบิลิรูบินและความขุ่น (lipidemic serum) โดยวิเคราะห์ค่ากรดยูริกในซีรัมที่มีค่าบิลิรูบินสูง ค่าความขุ่นสูงๆ (ไตรกลีเซอไรด์) และซีรัมปกติ ด้วยน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมเองนี้แล้วอาศัยหลักการวิเคราะห์ความถูกต้องตรวจสอบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้

นั้นถูกต้องหรือไม่

- 10) วิเคราะห์หาค่าอ้างอิง ในคนปกติ โดยใช้น้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเอง

ผลการทดลอง

- 1) จากการทดสอบหาช่วงคลื่นที่ให้ค่าการดูดแสงมากที่สุดต่อสีที่เกิดขึ้นภายหลังจากทำปฏิกิริยาแล้ว โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ HITACHI U-3210 โดยทำการวัดสแกน ตั้งแต่ช่วงคลื่น 400-600 นม. ซึ่งเครื่องจะหมุนเปลี่ยนช่วงคลื่นไปตามคำสั่งคอมพิวเตอร์ที่ควบคุมการทำงาน ปรากฏว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 512 นม. (รูปที่ 1)
- 2) ในการทดสอบความคงสภาพของสีที่เกิดขึ้นภายหลังจากทำปฏิกิริยา โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงนาที่แรก นาที่ที่ 5 นาที่ที่ 15 และทุก ๆ นาที่จนถึงนาที่ที่ 20 พบว่าสีจะขึ้นสูงสุดเมื่อนาที่ที่ 10 ซึ่งจะต่างกันน้อยมากระหว่างนาที่ที่ 10 และ 15 ไม่ว่าสีปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นจาก uric acid 4 มก./ค.ล. (รูป 2A) หรือ 20 มก./ค.ล. (รูป 2B) และหลังจากนี้สีก็จะคงสภาพได้นานจนถึงนาที่ที่ 20 ซึ่งเป็นเวลาเพียงพอที่จะใช้ในการวัดได้
- 3) จากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กรดยูริก ในซีรัมของผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราช โดยน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้น กับน้ำยาวิเคราะห์ของบริษัท เบอริงเกอร์แมนไฮม์ บริษัทเฮมส์ และกับวิธีที่วิเคราะห์ด้วยกรดฟอสโฟทังสติก โดย AutoAnalyzer I พบว่าให้ค่าความสัมพันธ์กันดีมาก คือ $r = 0.994$ ($p < 0.001$) ; $r = 0.998$ (p

value<0.001) และ $r = 0.972$ (p-value < 0.001) (รูปที่ 3, 4 และ 5)

- 4) ในการทดสอบความแม่นยำ โดยทำการวิเคราะห์ในซีรัมรวม ที่มีค่าความเข้มข้นของกรดยูริก 2 ระดับด้วยน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมเองนี้ พบว่าให้ค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 2.62 และ 0.90 ในแบบ within-run assay และเป็น 2.762 และ 1.875 ในแบบ between-run assay (ตารางที่ 1)
- 5) ค่าความถูกต้อง โดยทำการวิเคราะห์ในซีรัมควบคุมของบริษัท CIBA-CORNING Lot.No. 036801 และของบริษัท HUMAN HUMATOL-p Lot.No. P 1010) ในการวิเคราะห์พบว่าให้ค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนดที่ให้มา (assigned value) (ตารางที่ 2)
- 6) ค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (% accuracy) ได้ค่าระหว่าง 100.3 ถึง 101.9 (ตารางที่ 3)
- 7) ค่าความเป็นเส้นตรงโดยทำการวิเคราะห์ในสารมาตรฐาน ที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 2-20 มก./ดล. มาทำการวิเคราะห์โดยวิธีวิเคราะห์ด้วยมือ (manual) ด้วยเครื่องโฟโตมิเตอร์ 4010 พบว่าให้เส้นมาตรฐานเป็นเส้นตรงโดยตลอด (รูปที่ 6) และจากการศึกษาโดยวิธีเจือจางซีรัมที่มีระดับกรดยูริกสูงๆ เป็นลำดับลงมา และนำผลการวิเคราะห์มาทดสอบ regression line ให้ค่า $r = 0.999$, slope = 1.006 (รูปที่ 7)
- 8) ความคงสภาพของน้ำยาที่เตรียมเองภายหลังจากละลายด้วยบัฟเฟอร์แล้วจะคงสภาพได้นาน 4 สัปดาห์ โดยผลจากการวิเคราะห์ค่าในซีรัมควบ

คุมประจำวัน ซึ่งให้ค่าอยู่ในเกณฑ์ควบคุมทั้ง 2 ชนิด ($4.57 + 0.56$, $7.0 + 0.36$, $X \pm 2SD$, $n = 20$)

- 9) จากการทดสอบการรบกวนจากบิลิรูบิน และความขุ่น โดยการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องได้ผลดังตารางที่ 4. แสดงว่าผลการวิเคราะห์ในรายที่มีค่าบิลิรูบินสูงถึง 20.5 มก./ดล. และค่าความขุ่นของซีรัม ที่แสดงในรูปของไตรกลีเซอไรด์สูงถึง 500 มก./ดล. ไม่มีผลรบกวนผลการวิเคราะห์
- 10) วิเคราะห์ค่าอ้างอิงโดยทำการวิเคราะห์ในซีรัมตัวอย่างจากผู้ที่มาตรวจร่างกายโดยมีผลการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกประจำวันปกติทุกอย่าง และประวัติไม่มีโรคประจำตัว จำนวนทั้งสิ้น 105 ราย ได้ค่าเฉลี่ย (X) เท่ากับ 5.485 มก./ดล. และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.) เท่ากับ 1.002 มก./ดล. ดังนั้นจึงกำหนดค่าอ้างอิงเป็น 3.48-7.49 มก./ดล.

วิจารณ์

การทดสอบพบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีที่เกิดขึ้นหลังทำปฏิกิริยาแล้วอยู่ที่ 512 นม. แต่ในระบบของการวิเคราะห์จะใช้ที่ 546 นม. ในเครื่องโฟโตมิเตอร์ 4010 และที่ 505 นม. ในเครื่อง HITACHI 705 เนื่องจากเครื่องเหล่านี้ได้กำหนดช่วงคลื่นที่ตายตัว และเป็นช่วงคลื่นที่ใกล้เคียงที่สุด ส่วนการทดสอบความคงสภาพของสีที่เกิดขึ้น พบว่าสีที่เกิดสมบูรณ์เมื่อนาทีที่ 10 และคงที่ไปจนถึงนาทีที่ 20 ซึ่งเพียงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ เมื่อทดสอบโดยใช้

Table 1. Precision of Uric acid determination by the proposed (method) reagent. (n=20)

Concentration (mg/dl)	Within-run assay		Between-run assay	
$\bar{X}$	SD.	%CV	SD.	%CV
3.62	0.095	2.62	0.10	2.762
7.11	0.064	0.90	0.1333	1.875

Table 2. Accuracy of Uric acid determination by the proposed reagent. (n=10)

Control serum	Assigned value		Assayed value	
	$\bar{X}$ (mg/dl)	range	$\bar{X}$ (mg/dl)	range
CIBA-CORNING Lot.No.036801	5.4	4.6-6.2	5.45	5.19-5.71
HUMATOL-P Lot.No.P1010	9.07	7.22-10.9	9.29	9.15-9.43

น้ำยาสำเร็จรูปของทั้งสองบริษัทก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ โดยน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเองกับน้ำยาของบริษัทเบอริงเกอร์, บริษัทเฮมส์ และกับวิธีวิเคราะห์โดยกรดฟอสโฟทัง สติคด้วยเครื่อง AutoAnalyzer I นั้น ให้ค่าความสัมพันธ์กันดีมากโดย $r = 0.994$ ($p < 0.001$); $r = 0.998$ ($p < 0.001$) และ $r = 0.972$ ($p < 0.001$) ตามลำดับ

การทดสอบความแม่นยำ ความถูกต้อง และเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องให้ค่าที่น่าพอใจ และมีค่าความเป็นเส้นตรงได้สูงถึง 20 มก./ค.ล. เป็นอย่างน้อย ปริมาณบิลิรูบินสูงถึง 20 มก./ค.ล. ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ โดยจะมีโปแตสเซียมเฟอโรไซยาไนด์เป็นตัวช่วยขจัดปัญหานี้ และความขุ่นของซีรัม (วิเคราะห์ในรูปของโครกลีเซอไรด์) ปริมาณสูงถึง

Table 3 Percent accuracy of the proposed method by mixing of 2 serum (3.7 and 11.6 mg/dl)

serum1/serum2	Expected values (mg/dl)	Assayed values (mg/dl)	%Accuracy
1 : 1	7.65	7.8	101.9
2 : 1	6.33	6.4	101.1
1 : 2	8.97	9.0	100.3

Table 4 Effect of bilirubin and triglyceride on the proposed method

Ratio of uric acid & bilirubin concentration in serum. bili 0.8 : bili 20.5 mg/dl uric 4.5 : uric 9.8 mg/dl	Expected value (mg/dl)	Assayed value (mg/dl)	%Accuracy
1 : 1	7.15	7.2	100.69
2 : 1	6.27	6.3	100.47
1 : 2	8.03	8.1	100.87
Ratio of uric acid & trigly- ceride concentration in serum TRIG 91 : TRIG 512 mg/dl uric 4.5 : uric 10.8 mg/dl	Expected value (mg/dl)	Assayed value (mg/dl)	%Recovery
1 : 1	7.65	7.7	100.65
2 : 1	6.60	6.6	100
1 : 2	8.70	8.8	101.14

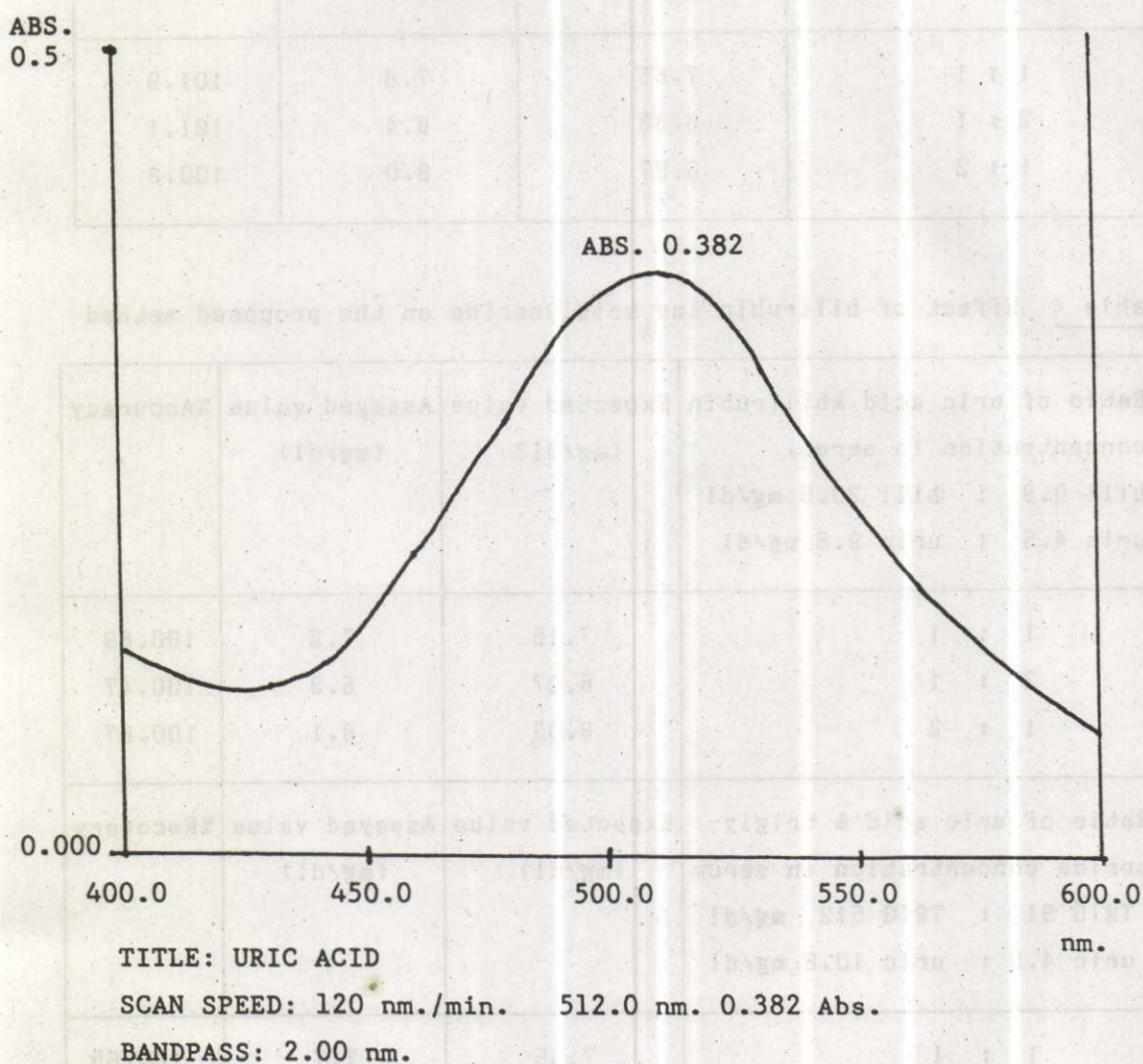


Fig.1 Absorbance curve of the colored product by the proposed method.

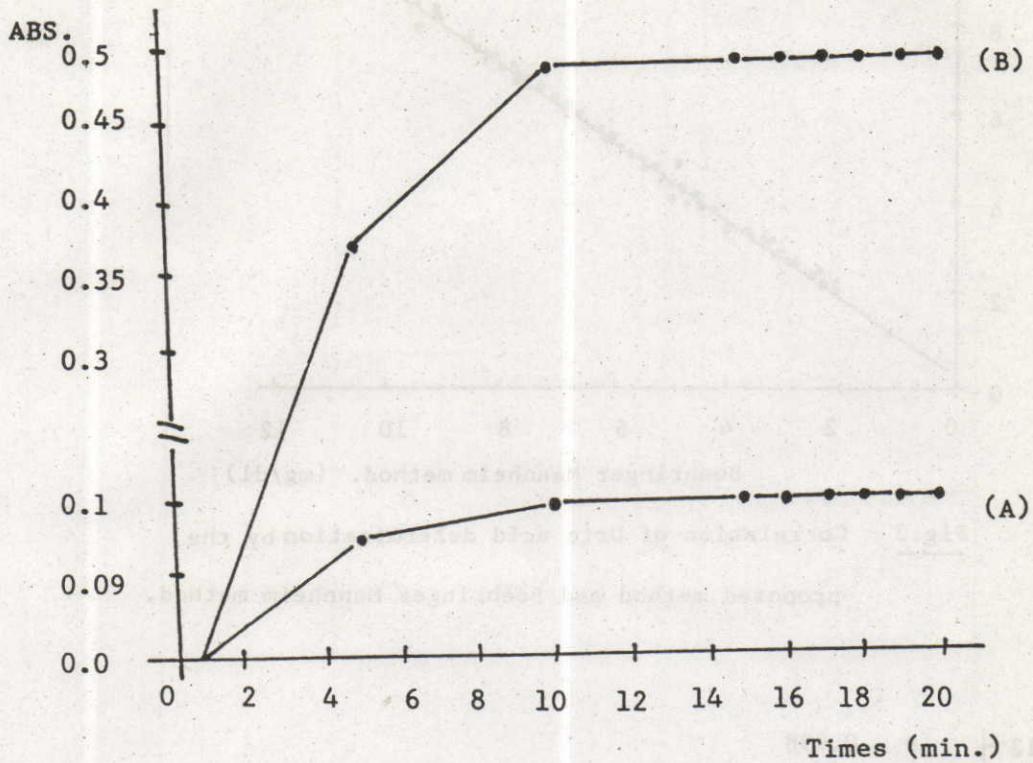


Fig.2 Color Production and Color stability of reaction by the proposed method.

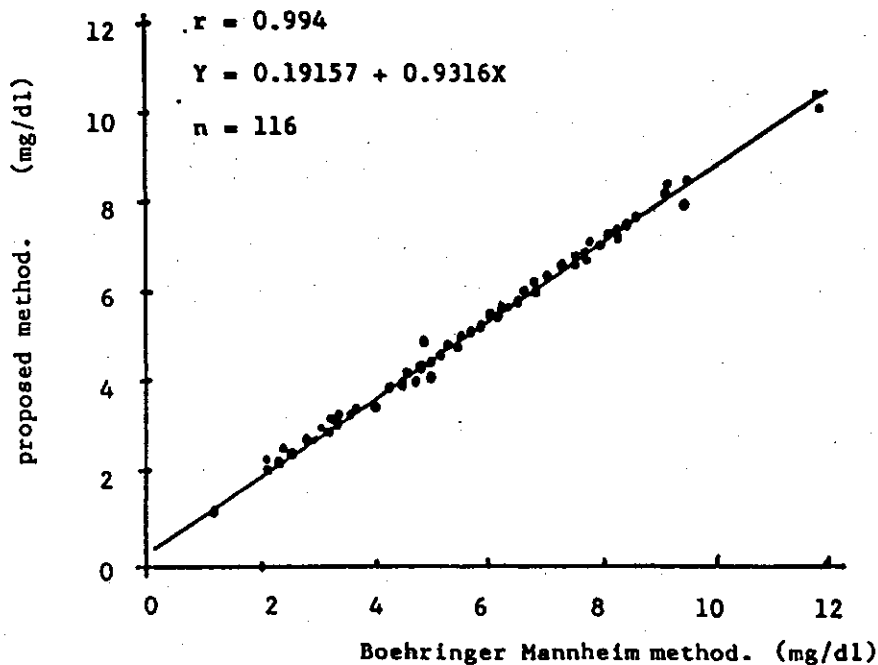


Fig.3 Correlation of Uric acid determination by the proposed method and Boehringer Mannheim method.

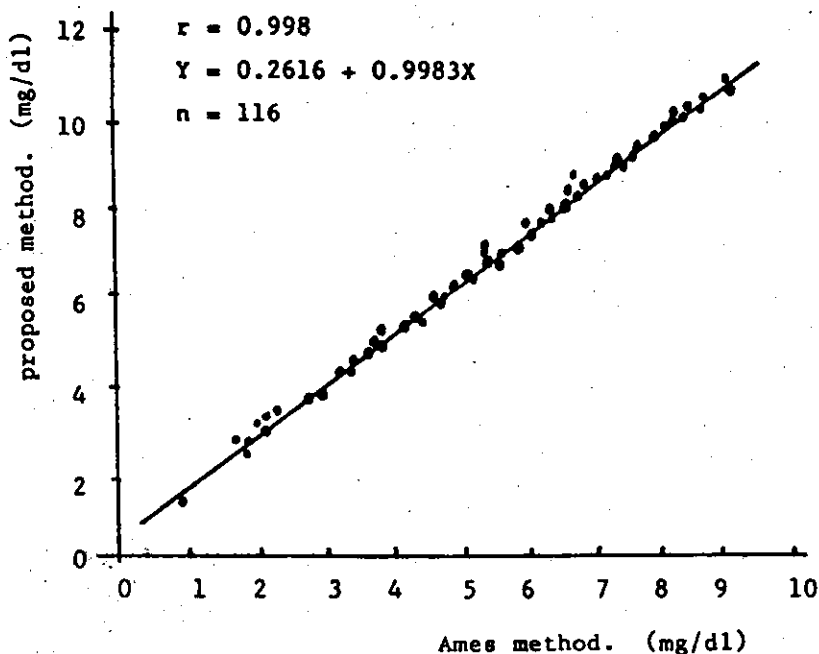


Fig.4 Correlation of Uric acid determination by the proposed method and Ames method.

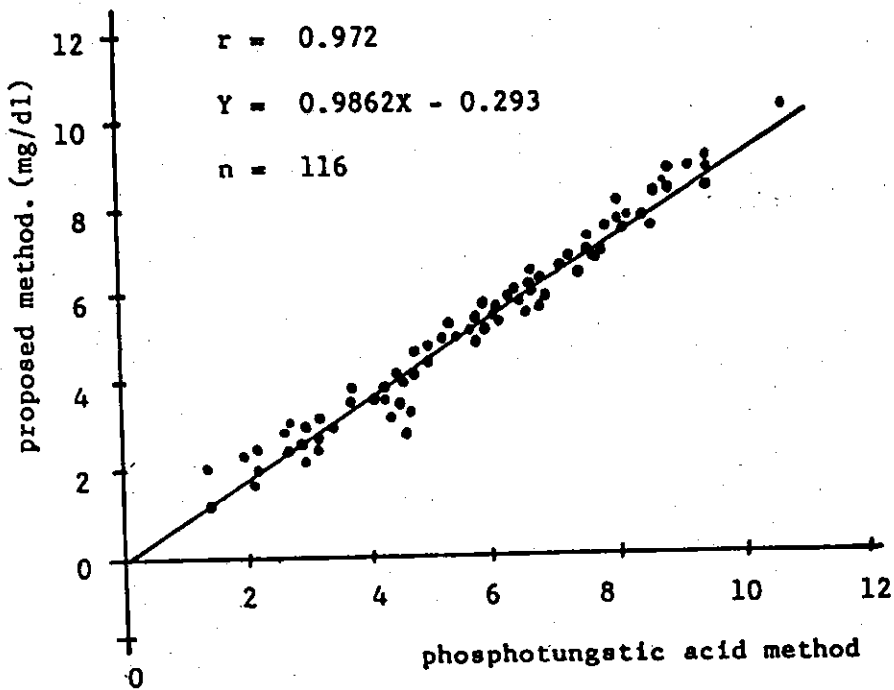


Fig.5 Correlation of Uric acid determination by the proposed method and phosphotungstic acid method by AutoAnalyzer I.

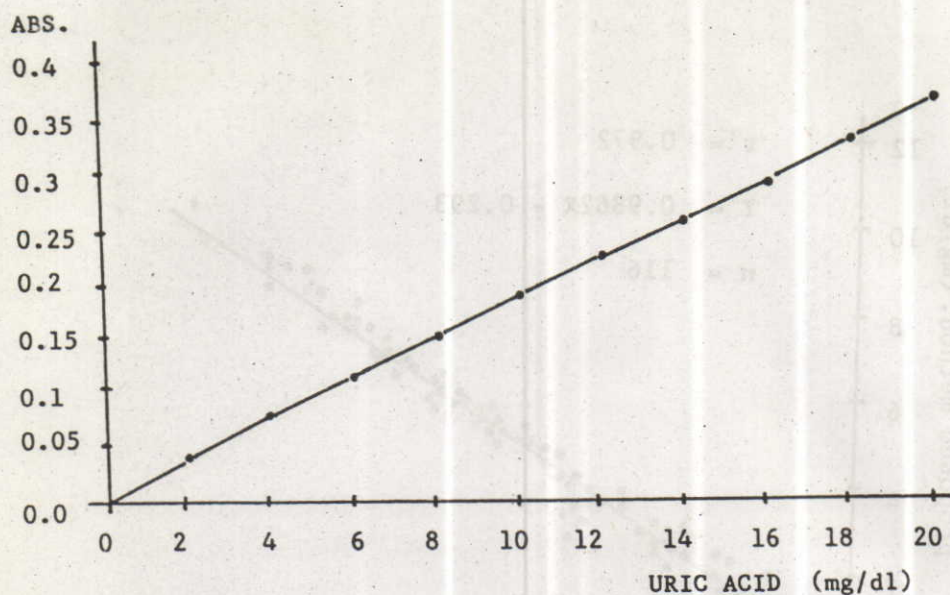


Fig.6 Linearity of the proposed method for standard Uric acid.

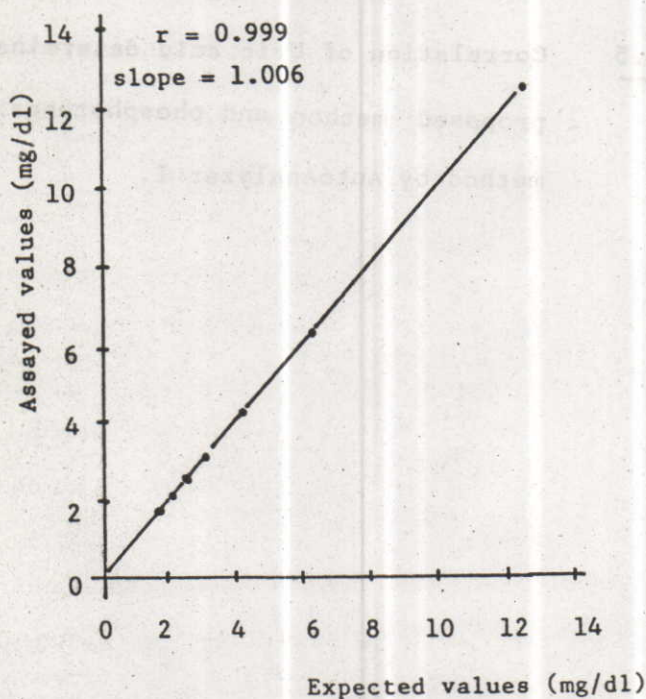


Fig. 7 Correlation of the expected and assayed values by the proposed method for diluted serum.

500 มก./คต. ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์เป็นผล
จากในน้ำยาวิเคราะห์มีตัวช่วยขจัดปัญหานี้ โดย
Titron X-100 ความจริงแล้วอีกสิ่งหนึ่งที่มีส่วนร่วม
ด้วยคือเครื่องที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งหากมีระบบการ
วิเคราะห์ที่ดีก็จะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ลงได้บ้าง

การเตรียมน้ำยาวิเคราะห์สำเร็จรูป มี
ประโยชน์มากต่อวงการวิเคราะห์และต่อการศึกษา
แต่ปัญหาหลักที่เห็นได้ชัดเจนที่สุดคือ เอนไซม์ยัง
ต้องจัดซื้อจากต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างสูง
ทำให้สูญเสียเงินตราและผลประโยชน์ทางด้านวิชา
การไปอีกทั้งต้องใช้เวลาในการขนส่งพอสมควร ซึ่ง
ถ้าเก็บไม่ทันระหว่างนั้นแล้ว อาจทำให้เอนไซม์นั้น
เสื่อมหรือเสียสภาพไป หากเราสามารถที่จะเตรียม
แยก (purified) เอนไซม์ได้และศึกษาพัฒนา
เทคโนโลยีทางด้านนี้เองแล้ว จะเป็นประโยชน์มาก
ต่อทางด้านเศรษฐกิจ การศึกษา และวงการวิเคราะห์
โดยน้ำยาวิเคราะห์ อีกประการที่สำคัญเนื่องจากว่า
น้ำยาวิเคราะห์สำเร็จรูปที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบัน
ราคาไม่แพงมากจนเกินไป จึงทำให้ความพยายามที่
จะพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านนี้ลดลง ทำให้ประเทศ
ต้องสูญเสียเงินตราทางด้านนี้ต่อต่างประเทศเป็น
จำนวนมาก

ปริมาณของเอนไซม์ที่เค็มลงไปในน้ำยา
วิเคราะห์สำเร็จรูปนี้ ควรให้มีปริมาณเกินพอซึ่งไม่มี
ผลเสียต่อปฏิกิริยาแต่อย่างใด แต่จะทำให้เสียค่าใช้จ่าย
ในการซื้อเอนไซม์มาก ดังนั้นหากนำเทคโนโลยี
ด้านการแยกเอนไซม์มาดำเนินการ และทำกันอย่าง
จริงจังแล้ว เชื่อแน่ว่าสำหรับเราจะสามารถผลิตน้ำยา
วิเคราะห์สำเร็จรูปต่าง ๆ เองได้ โดยไม่ต้องเสียเงิน
ตราซื้อจากต่างประเทศ สำหรับจัดซื้อน้ำยาวิเคราะห์

สำเร็จรูปเหล่านี้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยมหิดล ทุนประเภท ก.

เอกสารอ้างอิง

1. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia : WB Saunders Co, 1982.
2. Hackel R. The use of aldehyde dehydrogenase to determine H_2O_2 -producing reactions: 1. The determination of the uric acid concentration. J Clin Chem Clin Biochem 1976; 14 : 101.
3. Kageyama N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. Clin Chim Acta 1971; 31:421.
4. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24.
5. witte DV, Brown LF, Feld RD. Effects of bilirubin on determination of hydrogen peroxide by use of peroxidase. Clin Chem 1978;24:1778.
6. Piero F, Lorenzo P, Giorannik B. Use of 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzene sulfonic acid/4-Aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem 1980 ; 26:227-31.