

ปกิณกะ

 β -Hydroxybutyrate : ความสำคัญทางคลินิก

นันทยา ชนะรัตน์*

บทคัดย่อ β -Hydroxybutyrate (BOH) เป็นสารคีโตนตัวหนึ่งที่พบว่ามีระดับสูงในภาวะคีโตซิส (ketosis) แต่การตรวจวัดระดับ BOH ยังทำกันไม่แพร่หลายในงานประจำวัน รายงานนี้ ได้เสนอวิธีการตรวจวัดระดับ BOH โดยอาศัยหลักการของเอนไซม์ β -hydroxybutyrate dehydrogenase เปลี่ยน BOH ให้เป็น acetoacetate และ NAD ถูกเปลี่ยนเป็น NADH ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของ NADH ได้ที่ 340 นาโนเมตร คนปกติจะมีระดับ BOH 0.05-0.27 มิลลิโมลต่อลิตร แต่ในผู้ป่วยภาวะคีโตซิส ระดับจะเกินกว่า 5 มิลลิโมลต่อลิตร (คำรหัส: β -hydroxybutyrate, ketosis) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 1990; 23: 169-174

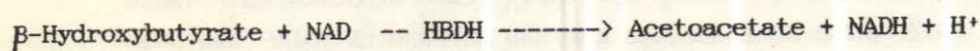
Ketosis เป็นภาวะที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมของ คาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะมักเกิดในผู้ป่วยเบาหวาน และมีภาวะกรดร่วมด้วย เรียกว่า Diabetic ketoacidosis หรือเกิดจากภาวะอดอาหาร (Starvation) ต้มสุราจัด (Acute alcohol abuse) จึงเกิดการออกซิโดซ์แบบไม่สมบูรณ์ของกรดไขมันได้ผลสุดท้ายเป็นสารคีโตน ในคนปกติทั่วไป β -hydroxybutyric acid (BOH) จะเป็นสารคีโตนที่มีปริมาณมากที่สุด คือประมาณ 75% (1-4) และในระหว่างที่เกิดภาวะคีโตซิส BOH ก็จะมีเพิ่มขึ้นในอัตราที่มากกว่าสารคีโตนอีก 2 ตัวคือ Acetoacetate (AcAc) และ อะซิโตน (acetone) ทั้งนี้ ส่วน

หนึ่งเนื่องจาก AcAc เป็นสารที่ไม่คงตัว และเกิด nonenzymatic decarboxylation กลายเป็นอะซิโตนซึ่งเป็นสารระเหยง่าย การวินิจฉัยหรือติดตามผลการรักษาภาวะ ketosis จึงควรจะเป็น การวัดปริมาณสารคีโตนทั้งหมดในซีรัม แต่จากวิธีที่ใช้ทดสอบกันในปัจจุบัน นับตั้งแต่การใช้ Ketostix ซึ่งเป็นแถบน้ำยา หรือ Acetest ซึ่งเป็นเม็ดน้ำยา จะใช้หลักการของ Rothera คือใช้ nitroprusside ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ AcAc และอะซิโตน และเป็นการวัด

*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เพียงกิ่งปริมาณ โดยไม่สามารถวัด BOH ได้ ดังนั้น จึงมีโอกาที่จะพบการตรวจสารคีโตนด้วยวิธีใช้ nitroprusside ให้ผลลบ หรือได้ค่าที่ต่ำกว่าความเป็นจริงในผู้ป่วย ketosis. หรือเบาหวานที่ควบคุมโรคไม่ได้ (5) มีหลายรายงานที่สนับสนุนว่า BOH เป็นดัชนีที่ดีกว่า AcAc และอะซีโตนในการควบคุมรักษาภาวะ diabetic ketoacidosis (4, 6-8) หรือแม้แต่การตรวจภาวะ subclinical ketosis (5) นอกจากนี้ AcAc และอะซีโตน ยังเป็นสารที่ไม่คงตัวเท่า BOH จากเหตุผลต่างๆ ดังกล่าว จึงได้มี



การพัฒนาวิธีการอื่นๆ มีวัตถุประสงค์เพื่อลดปริมาณสารตัวอย่าง ทำให้ราคาการทดสอบต่ำลง หรือใช้เวลาน้ำในการทดสอบน้อยลง เป็นต้น วิธีการต่างๆ ส่วนใหญ่จึงมีหลักการเหมือนกัน แต่ต่างกันที่สภาวะที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ความคงตัวของน้ำยา และค่าปกติที่ตรวจวัดได้ในประจำกร เป็นต้น (3, 4, 9-11) วิธีการต่างๆ ดังกล่าวสามารถนำไปใช้ เป็นการทดสอบแบบฉุกเฉินได้

ค่าปกติที่มรายน คือ 0.02-0.27 มิลลิ
โมลต่อลิตร หรือ 0.2-2.81 มก./ดล. (4)
และในผู้ป่วย ketoacidosis มีค่าเกิน 5 มิลลิ
โมลต่อลิตร หรือ 50 มก./ดล. (12-13)

ตัวอย่างวิธีทดสอบ

1. วิจัยของ Custer และคณะ (14) ใช้เครื่อง Centrifichem 400 Pipettor and Analyzer (Baker Instrument Co.)

หลักการ เป็นการวัด BOH โดยอาศัยเอนไซม์ HBDH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน BOH ไปเป็น AcAc วัดปริมาณ NADH ที่ 340 นาโนเมตร วิธีนี้พบว่ามีกรรบกวนจากกรดแลคติก ซึ่ง

พยายามคิดหาทั้งวิธี Spectrophotometry
หรือ Fluorometry ทั้งการทำด้วยวิธีธรรมดา
และการใช้เครื่องวัดอินทรีย์ เพื่อทำให้สามารถ
ตรวจวัด BOH ได้ ส่วนใหญ่เป็นวิธีแบบ kinetic
มีหลักการคือ ใช้ β -hydroxybutyrate
dehydrogenase (HBDH, EC 1.1.1.30)
เป็นตัวย่อย BOH ที่ pH 8.5 ให้เป็น AcAc
โดยมี coenzyme NAD เปลี่ยนเป็น NADH ซึ่ง
อัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของ NADH ที่ 340
นาโนเมตร จะแปรตามปริมาณ BOH ในสารตัว
อย่าง

แก้ไขได้โดยการทำ blank ซึ่งขี้นายาที่ไม่มี
เอนไซม์เต็มในตัวอย่าง แล้วนำมาหักลบออก
นายาที่ขี้น

- 1) สารละลายเอนไซม์ ประกอบด้วย
0.1M Tris, pH 9.5 11.76 มล., 117 mM
NAD 2.38 มล. และ HBDH (3 kU/g) 25
มก./5 มล.

- 2) Blank reagent เตรียมเหมือน
สารละลายเอนไซม์ แต่ใช้น้ำกลั่นน้ำใส่แทน HBDH

- 3) สารมาตรฐาน ใช้ D,L-3-hydroxybutyrate (Boeringer Mannheim Corp., Cat No. 106569) 2.0 mmol/L.

วิธีทำ ปรับสภาวะของเครื่องไว้ ดังนี้

Sample size	20	μl
Sample and diluent	70	μl
Reagent volume	350	μl
Analyzer run emperature	37	°C
Wavelength	340	nm
Standard concn.	2.0	mmol/L
T ₀ , time interval	10	sec
Abnormal absorbance	0.25	A

Blank Auto
Test mode Term
Printout Conc
No. of prints calibrate 1
Test code 00

วิธีนี้ พบว่า มีความเป็นเส้นตรงถึง 2.5 มิลลิโมลต่อลิตร มีความไว 0.04 มิลลิโมลต่อลิตร ความแปรปรวนระหว่างวัน เมื่อทำเป็นเวลา 20 วันมีค่า 2 standard deviation เท่ากับ ± 0.04 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 0.13 มิลลิโมลต่อลิตร และเท่ากับ ± 0.10 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 2.58 มิลลิโมลต่อลิตร ความคงตัวของ BOH ในตัวอย่างเลือดและซีรัม ที่อุณหภูมิห้อง (22-26 °C) เมื่อเก็บไว้นาน 48 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณลดลง 4.1% และในตัวอย่างเลือดที่ผสมสารกันเลือดแข็งและสารป้องกันการสลายตัวของน้ำตาล (sodium fluoride/oxalate) มีค่าลดลง 5.6% เมื่อเก็บไว้ 7

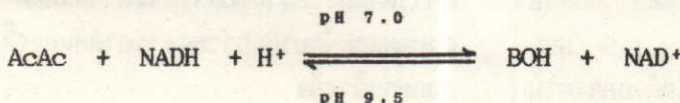
วัน ที่ 4 °C ซีรัมมีค่าเพิ่มขึ้น 5.3% และในพลาสมาที่มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถเก็บไว้ที่ 4 °C ได้อย่างน้อย 14 วัน

ค่าปกติของ BOH มีไม่เกิน 3.0 มิลลิโมลต่อลิตร จากคนทั่วไป 40 คน ที่ทดสอบปัสสาวะด้วย Ketostix ให้ผลลบ ระดับกลูโคสในซีรัมอยู่ในช่วง 66-108 มก./ดล. มีค่า BOH 0.04-0.48 มิลลิโมลต่อลิตร เฉลี่ย เท่ากับ 0.14 ± 0.14 มิลลิโมลต่อลิตร

สารกันเลือดแข็งที่ซี สามารถใช้ NaF/oxalate, heparin, NaF, potassium oxalate ได้ แต่ EDTA มีผลทำให้ระดับ BOH ต่ำกว่าปกติประมาณ 37%

2. วิธีหาอนุสารคีโตนทั้งหมด (Total ketone bodies, TKB)

โดยการรีดิวส์ AcAc ให้เป็น BOH ด้วย NADH ที่เติมลงในปฏิกิริยาให้ มากเกินพอ ที่ pH 7.0⁽¹⁵⁾



น้ำยาที่ใช้

- 1) สารละลาย HBDH 25 ยูนิตในน้ำกลั่น 1250 ไมโครลิตร สามารถเก็บไว้เป็นส่วนเล็ก ๆ ที่ -20 °C ได้นานอย่างน้อย 2 สัปดาห์
- 2) NADH (97% pure) 50 มก. ในน้ำปลอดไอออน 1710 ไมโครลิตร จะให้ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลต่อลิตร แบ่งเก็บไว้เป็นส่วนเล็ก ๆ ที่ -20 °C ได้นานอย่างน้อย 10 วัน
- 3) NAD⁺ ละลาย 20 มก. ในน้ำปลอดไอออน 1850 ไมโครลิตร จะให้ความเข้มข้น 16.2 มิลลิโมลต่อลิตร แบ่งเก็บเป็นส่วนเล็ก ๆ ไว้ที่ -20 °C

- 4) Phosphate buffer, pH 6.98 ผสม Na₂HPO₄ 0.2 มิลลิโมลต่อลิตร (28.4 กรัมต่อลิตร) 60 มล. กับ KH₂PO₄ 0.2 มิลลิโมลต่อลิตร (27.2 กรัมต่อลิตร) 40 มล.

สารละลาย ก. ผสม phosphate buffer 22.5 ไมโครลิตร กับ NADH 22.5 ไมโครลิตร และ HBDH 155 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันก่อนทำการทดสอบ ปริมาณที่ผสมนี้จะเพียงพอสำหรับการตรวจ 9 ตัวอย่าง และสารละลายผสมนี้จะคงตัวได้นาน 48 ชั่วโมง

สารละลาย ข. ผสม Tris buffer 420 ไมโครลิตร, NAD^+ 620 ไมโครลิตร และน้ำปลอดอียอน 560 ไมโครลิตร ก่อนทำการทดสอบ ปริมาณเพียงพอสำหรับการทดสอบ 9 ตัวอย่าง และสารละลายผสมนี้จะคงตัวได้นานอย่างน้อย 6 ชั่วโมง

5) Tris HCl buffer, pH 9.5 ละลาย tris(hydroxymethyl)aminomethane 60.5 กรัมในน้ำปลอดอียอน 800 มล. ปรับ pH ให้ได้ 9.5 แล้วเจือจางให้ครบลิตร

6) สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 200 มิลลิโมล/ลิตร มี AcAc 2.16 กรัม และ DL-BOH 2.52 กรัมในน้ำ 100 มล.

7) สารละลายมาตรฐานใช้งาน เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นให้เป็น 0, 0.5, 1, และ 2 มิลลิโมล/ลิตร ด้วยน้ำปลอดอียอน เติม oxamic acid ลงไปให้มีความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร เก็บแยกเป็นส่วนเล็กๆ ไว้ที่ -20°C ใช้ภายใน 6 เดือน

8) ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ เตรียม pooled serum 18.5 มล. เติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นลงไป 0.5 และ 1.5 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 20 มล. จะได้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่มี AcAc เป็น 5 และ 15 มิลลิโมล/ลิตร เติม oxamic acid ลงไปให้มีความเข้มข้นเป็น 1.5 กรัม/ลิตร เก็บแยกเป็นส่วนเล็กๆ ไว้ที่ -80°C ใช้ภายใน 1 สัปดาห์

วิธีทำ ใช้เครื่อง Multistat III Centrifugal Analyzer with Loader (MCA; Instrumentation Laboratory, Lexington, MA 02173) ทำดังนี้

ใส่ตัวอย่าง 2 ไมโครลิตร น้ำ 8 ไมโครลิตร สารละลาย ข. 20 ไมโครลิตรในหลุมของ Rotor ด้านใน และใส่สารละลาย ก. 160 ไมโครลิตร น้ำ 10 ไมโครลิตร เท่ากับ ± 0.04 มิลลิโมลต่อลิตร 2 standard deviation ใน

cuvette ของ rotor เดียวกัน ก่อน 30 วินาที 10 นาที แล้วเริ่มปั่นให้สารละลายทั้งหมดผสมกัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร เทียบกับน้ำกลั่น 10 วินาที และหลังจากนั้นอีก 2 นาที อ่านค่า BOH จากกราฟมาตรฐานที่เขียนขึ้นระหว่างค่าความเข้มข้นต่างๆ กัน ของ AcAc และค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปเป็น 2 นาทีที่อ่านได้

ข้อเสียดูแล

จะเห็นว่าวิธีต่างๆ ส่วนใหญ่ ใช้การอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ซึ่งไม่สะดวกสำหรับบางห้องปฏิบัติการ ดังนั้น อาจจะใช้วิธีการให้เกิดปฏิกิริยาต่อปฏิกิริยาเกิดสี โดยวิธี diaphorase และ INT system หรือ PMS - NBT system ทำให้เกิดสาร formazan ที่มีสีเกิดขึ้น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสงธรรมดาได้ ซึ่งปัจจุบัน ได้มีผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่ทำให้เกิดสีดังกล่าวมาบ้างแล้ว จึงสมควรที่จะพิจารณานำมาใช้ในการตรวจภาวะคีโตซิสนัมป่วยเบาหวาน หรือโรคอื่น ได้ โดยเฉพาะกรณีที่มีสารคีโตนเพียงระดับต่ำ จะทำขึ้นแพทย์ทำการควบคุมและรักษาอาการของโรคได้ทันที่

เอกสารอ้างอิง

1. Persson B. Determination of plasma acetoacetate and D- β -hydroxybutyrate in newborn infants by an enzymatic fluorometric micro-method. Scand J Clin Lab Invest 1969; 25: 9-18.
2. Wildenhoff KE. Diurnal variations in the concentration of blood acetoacetate, 3-hydroxybutyrate and glucose in normal person. Acta Med Scand 1972; 191: 303-306.

3. Hansen JL, Freier EF. Direct assay of lactate, pyruvate, β -hydroxybutyrate and acetate with a centrifugal analyzer. Clin Chem 1978; 24: 475-479.
4. Koch DD and Feldbruegge H. Optimized kinetic method for automated determination of β -hydroxybutyrate. Clin Chem 1987; 33: 1761-1766.
5. MacGillivray MH, Li PK, Lee JT, et al. Elevated plasma β -hydroxybutyrate concentrations without ketonuria in healthy insulin-dependent diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab 1982; 54: 665-668.
6. Stephens JM, Sulway MJ, Watkins JP. Relationship of blood acetoacetate and 3-hydroxybutyrate in diabetics. Diabetes 1971; 20: 485-489.
7. Alberti KGMM, Hockaday TDR. Rapid blood ketone body estimation in the diagnosis of diabetic ketoacidosis. Br Med J 1972; ii: 565-568.
8. Harano Y, Kosugi K, Hyosu T, Uno S, Ichikawa Y, Shigeta Y. Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies. Clin Chim Acta 1983; 134: 327-336.
9. Cuthbert C, Alberti KGMM. Combined enzymatic assays for 3-hydroxybutyrate and lactate: end-point and kinetic methods. Clin Chim Acta 1978;90:179-186.
10. Moore JJ, Marcus M, Sax SM. Kinetic assay of β -hydroxybutyrate in plasma with a COBAS-BIO centrifugal analyzer. Clin Chem 1982; 28: 702-703.
11. McMurray CH, Blanchflower WJ, Rice DA. Automated kinetic method for D-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. Clin Chem 1984; 30: 421-425.
12. Harano Y, Kosugi K, Hyosu T, et al. Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies. Clin Chim Acta 183; 134: 327-336.
13. Foster DW, McGarry JD. The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. N Engl J Med 1983; 309: 159-169.
14. Custer EM, Myers JL, Poffenberger PL and Schoen I. The storage stability of 3-hydroxybutyrate in serum, plasma and whole blood. Am J Clin Pathol 1983; 80: 375-380.

Chanarat N

15. Nuwayhid NF, Johnson GF and Feld RD. Kinetic measurement of the combined concentrations of acetoacetate and β -hydroxybu-

tyrate in serum. Clin Chem 1988; 34: 1790-1793.

นันทยา ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาบาลวิชาชีพ)

ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่