

การประเมินน้ำยาสำเร็จรูป ที่จำขี้วิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์

ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ เบ็ญชาติ อาจารย์ ตรีศรพัฒน์วงศ์ เภสัชกร สุวรรณาพร อภัย
ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ เบ็ญชาติ และ นักพนัน ภูงาม

บทคัดย่อ จากการประเมินน้ำยาสำเร็จรูปที่จำ
วิเคราะห์ค่าไตรกลีเซอไรด์ทั้ง 4 ชนิดคือ R-I
(Triglyceride Rapid Test) ของ
Roche, R-II (Triglyceride PAP) ของ
Roche R-III (Triglyceride Fast
Color) ของ Ames, R-IV (Triglyceride
PAP 1000) ของ Biomerieux พบว่าทั้ง 4
ชนิดนี้ให้ค่าความแม่นยำใกล้เคียงกันมาก (ค่า r อยู่ในช่วง
0.966-0.9995) และให้ค่าความเที่ยงดี
โดยวิเคราะห์แบบ within-run อยู่ในช่วง
0.682-1.912 %CV และวิเคราะห์แบบ be-
tween-run อยู่ในช่วง 1.546-2.941% CV
จากการศึกษาค่าความเป็นเส้นตรง ของน้ำยาสำ-
เร็จรูป R-I ให้ถึง 400 มก./ดล. ส่วนน้ำยา
สำเร็จรูป R-II, R-III, R-IV ให้ค่าความ
เป็นเส้นตรงถึง 1,000 มก./ดล. ค่าเปอร์
เซ็นต์การวิเคราะห์กลับคืน (% recovery) อยู่
ในช่วง 98.19-104.123% จากการทดสอบความ
ถูกต้องของน้ำยาสำเร็จรูปทั้ง 4 ชนิด ให้ค่าถ
ดองดี และจากการศึกษาจุดให้ค่าการดูดกลืน
แสงมากที่สุดพบว่าถดองทุกชนิด และการศึกษา
ความคงสภาพของสีที่เกิดขึ้นพบว่าน้ำยาสำเร็จรูป
R-II ที่ 15 นาที สีจะคงสภาพอยู่ถึง 99.47%
ส่วนน้ำยาสำเร็จรูป R-III, R-IV สีจะคง
สภาพอยู่ 96.20 และ 93.85% ภายใน 15
นาที ตามลำดับ (คำศัพท์ : ไตรกลีเซอไรด์,
น้ำยาสำเร็จรูป, kinetic, colorimetry)
วารสารแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ปีที่ 22
ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน 2532 หน้า 143-150

Abstract An Evaluation of the Com-
mercial Triglyceride Kits. Tangva-
rasittichai S, Prejavude A, Sabesam-
hanvong J, Suwanton L, Tangvarasit-
tichai O, Pinyosirikul U and Poo-
ngam N.

The commercial Triglyceride kits
were assessed. The results, that
showed the good correlation (range
0.966-0.9995) by used these four
commercial kits. The coefficient of
variation (CV) of within-run assay
range 0.682-1.912% and between-run
assay range 1.546-2.941%. In linea-
rity studies, the R-I commercial kit
has at least 400 mg/dl and R-II,
R-III, R-IV have at least 1,000
mg/dl. While the percent recovery
were 98.19-104.13% and the accura-
cy studies were accepted. The color
stability of the R-II, R-III, R-IV.
were still 99.47, 96.20 and 93.85%
after standed in 37°C 15 minute.
(Keyword : Triglyceride, Commercial
kit, kinetic, colorimetry) Bull
Chiang Mai AMS 1989; 22: 143-150

ภาควิชาเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

การวิเคราะห์ค่าไตรกลีเซอไรด์ทั้ง วิธ
การทางเคมี และเอนไซม์ (2,3) วิธีการทาง
เคมีต้องใช้ตัวทำละลาย (solvent) (4,5) ในการ
สกัด (extraction) ออกจากโปรตีนต่างๆ
ในซีรัมและดูดซับ (adsorbent material)
เอาฟอสโฟลัสติด และสารขัดขวาง (interfe-
ring substances) ต่างๆออกไป สารละลาย
สกัดปกติใช้ isopropanol และ zeolite-
mixture หรือ alumina ไตรกลีเซอไรด์จะถูก
แยกออกมา โดยวิธี saponify ด้วย KOH
หรือ tranesterification ด้วย alkoxides
หลังจากออกซิไดซ์ไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นฟอร์มาล
ดีไฮด์ด้วย sodium periodate แล้วให้ฟอร์
มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับ chromotropic sul-
furic acid mixture (6) จะให้ผลสุดท้าย
เป็นสารสีชมพูไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 570
นาโนเมตร หรือ อาจใช้ acetylacetone
และ ammonium acetate ซึ่งจะให้ 3,5-
Diacetyl-1,4-dihydrolutidine เป็น
สารละลายสีเหลืองเรืองแสง วัดการเรืองแสง
หรือ ความเข้มของสีที่เกิดขึ้น

ในปัจจุบันได้ใช้วิธีวิเคราะห์ชนิดเอนไซม์กัน
อย่างแพร่หลาย ซึ่งทำเป็นเพียงขั้นตอนเดียวได้
วิธีเอนไซม์ที่นำมาใช้ครั้งแรกโดย Eggstein
โดย saponify ไตรกลีเซอไรด์ให้ไตรกลีเซอ
ไรด์ แล้ว phosphorylate ด้วย ATP เกิด
phosphoenol pyruvate แล้วเปลี่ยนเป็น
pyruvate ด้วย pyruvate kinase และ
เมอริดีคัล pyruvate ไปเป็น lactate ด้วย

NADH ค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ที่ลดลง
เมื่อเปลี่ยนเป็น NAD จะแปรตามความเข้มข้น
ของกลีเซอรอล (ไตรกลีเซอไรด์) ได้ เริ่มทำ
เป็นแบบ kinetic ปัจจุบันได้มีการพัฒนามาเป็น
วิธีวัดจุดสุดท้าย การศึกษาเพื่อทำการทดสอบ
และประเมินน่ายาสำเร็จรูปเป็นผลิตภัณฑ์จากต่าง
ประเทศ ซึ่งจะเป็นแนวทางการจัดเลือกซื้อน่ายา
ทั้งหมดภาพและ คุณสมบัติที่ดีเป็นที่เชื่อถือ และ
มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์

วัสดุและวิธีการ

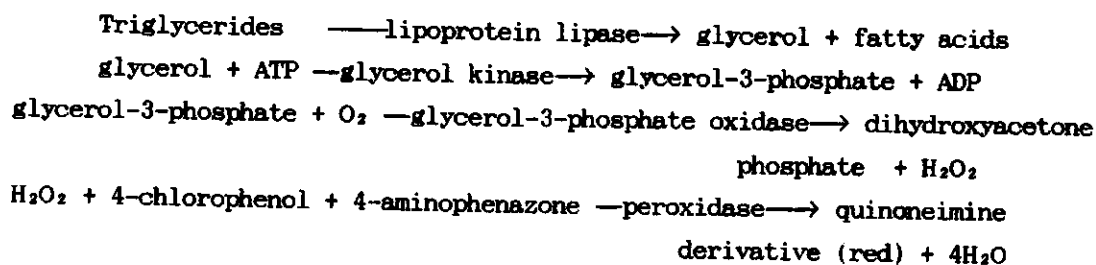
1. ซีรัมผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราช จำนวน 100 ราย
2. ซีรัมแห้ง (serum control) ของบริษัท CIBA-CORNING และ Lyophil ของคณะเทคนิคการแพทย์ ม.มหิดล
3. เครื่องมือ Automatic Analyzer, HITACHI 705 และเครื่อง SHIMADZU UV-160 เป็นเครื่อง scan
4. น่ายาวิเคราะห์ (triglyceride kits) มี 4 ชนิด ดังนี้
ชนิดที่ 1 (R-I) เป็น Triglyceride Rapid Test ของ Roche
ชนิดที่ 2 (R-II) เป็น Triglyceride PAP ของ Roche
ชนิดที่ 3 (R-III) เป็น Triglyceride Fast Color ของ Ames
ชนิดที่ 4 (R-IV) เป็น Triglyceride PAP 1000 ของ Biomerieux
หลักการของแต่ละน่ายามีดังนี้

1) R-I (Triglyceride Rapid Test)

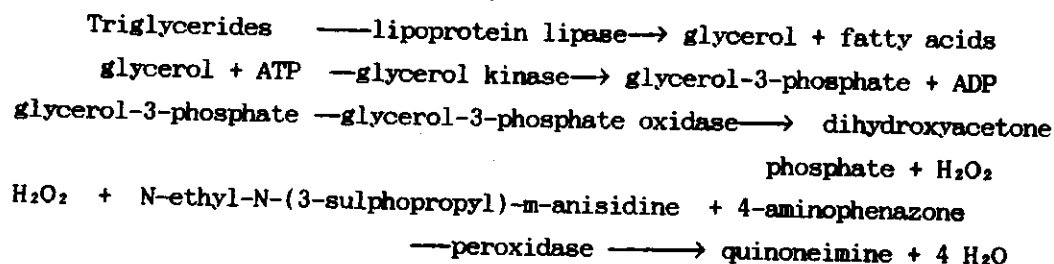
Triglyceride $\xrightarrow{\text{lipase}}$ glycerol + fatty acids
glycerol + ATP $\xrightarrow{\text{glycerol kinase}}$ glycerol-3-phosphate + ADP
ADP + phosphoenolpyruvate $\xrightarrow{\text{pyruvate kinase}}$ ATP + pyruvate
pyruvate + NADH+H⁺ $\xrightarrow{\text{lactate dehydrogenase}}$ lactate + NAD
เป็นปฏิกิริยาการวัดแบบ kinetic ที่ 340 นาโนเมตร เพื่อติดตาม NADH ที่ถูกเปลี่ยนเป็น NAD

Triglycerides, Reagent kit

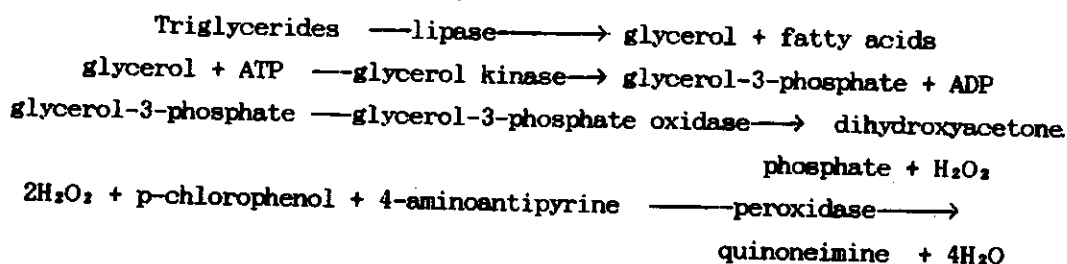
2) R-II (Triglycerides PAP)



3) R-III (Triglyceride Fast color)



4) R-IV (Triglycerides PAP 1000)



วิธีที่ 2-4 เป็น enzymatic colorimetric วัดสีแดงที่เกิดขึ้นที่ 492-550 นาโนเมตร

วิธีการศึกษา

1. หาความสัมพันธ์ของผลการวิเคราะห์โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปทั้ง 4 ชนิดนี้โดยทำการวิเคราะห์ในปริมาณที่น้อยรายเดียวกันทั้ง 4 ชนิดจำนวน 100 ราย โดยทดสอบตามวิธีการตามฉลากที่แนบมาด้วยเครื่อง HITACHI 705
2. ทดสอบความเที่ยง (precision) ทำการวิเคราะห์หาค่าซ้ำที่ค่าของไตรกลีเซอไรด์ 2 ระดับ โดยทำการวิเคราะห์ทั้งแบบทำไปพร้อมกัน

- (within-run assay) และทำต่างวันกัน (between-run assay) งานแต่ละครั้งจะทำการวิเคราะห์ reagent blank และทำการ calibrate ทุกครั้งก่อนเริ่มทำการวิเคราะห์
3. ทดสอบค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยนำตัวอย่างซ้ำที่มีค่าไตรกลีเซอไรด์สูงๆ มาทำการเจือจางที่ระดับต่างๆ แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า
4. ทดสอบ หาเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์กลับคืน

(% recovery)

5. ทดสอบหาค่าความถูกต้อง (accuracy) โดยทำการวิเคราะห์หาค่าโครคลีเซอโรคีนซีรัมแห้ง (control serum) ที่ทราบค่าแล้ว

6. ทดสอบความคงสภาพของสีที่เกิดขึ้นภายหลังจากทำปฏิกิริยาแล้ว (เฉพาะในน้ำยาที่เป็น enzymatic colorimetric) และทดสอบหาจุดที่ดูดกลืนแสงมากที่สุด ของสีที่เกิดขึ้น ภายหลังทำปฏิกิริยา โดยทั้งหมดนี้ทำการศึกษาด้วยเครื่อง SHIMADZU UV 160

ผลการทดลอง

1) ค่าความสัมพันธ์ของน้ำยาสำเร็จรูปทั้ง 4 ชนิดโดยแยกกันเป็นคู่ ๆ พบว่าทั้งหมดค่าความสัมพันธ์กันดีมาก ดังนี้

R-I กับ R-II ให้ค่า $r = 0.969$,

$$Y = 0.9218 X - 8.2639, n = 100$$

R-I กับ R-III ให้ค่า $r = 0.966$,

$$Y = 0.9576 X - 9.1279, n = 100$$

R-I กับ R-IV ให้ค่า $r = 0.967$,

$$Y = 0.9576 X - 1.4923, n = 100$$

R-II กับ R-III ให้ค่า $r = 0.998$,

$$Y = 1.4923 + 0.9569 X, n = 100$$

R-II กับ R-IV ให้ค่า $r = 0.9995$, $Y =$

$$1.1802 X - 9.007, n = 100$$

R-III กับ R-IV ให้ค่า $r = 0.998$, $Y =$

$$1.1306 X - 7.397, n = 100$$

ดังนั้นกราฟแสดงค่าความสัมพันธ์ รูปที่ 1 (a), (b), (c), (d), (e) และ (f).

2) ความเที่ยง พบว่าให้ค่าความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้ทั้ง 4 ชนิดโดยการวิเคราะห์แบบ within-run assay ให้ค่าอยู่ในช่วง 0.682-1.912 %CV และด้วยการวิเคราะห์แบบ between-run assay ให้ค่าอยู่ในช่วง 1.546-2.941% CV แต่ในน้ำยา R-I จะให้ % CV ที่สูงกว่า ดังแสดงในตารางที่ 1

3) ค่าความเป็นเส้นตรง พบว่าน้ำยา R-I ให้ค่าความเป็นเส้นตรงได้สูงที่สุดถึง 400 มก./ดล.

หากค่าที่ได้สูงกว่านั้นไปแล้วปฏิกิริยาที่ได้จะเริ่มเป็นเส้นโค้ง และค่าที่วิเคราะห์ได้นั้นจะไม่ถูกต้องจะต้องทำการเจือจางซีรัมเสียก่อน จึงทำการวิเคราะห์ใหม่ ส่วนน้ำยา R-II, R-III, และ R-IV พบว่าให้ค่าความเป็นเส้นตรงได้ถึง 1,000 มก./ดล. (ในรูปที่ 2 (a), (b), (c) และ (d))

4) ค่าเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์หาคะลิคีน (ตารางที่ 2) ของน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชนิดเป็นดังนี้

R-I ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์หาคะลิคีนเป็น 98.24% และ 102.32%

R-II ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์หาคะลิคีนเป็น 99.07% และ 104.123%

R-III ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์หาคะลิคีนเป็น 99.68% และ 101.09%

R-IV ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์หาคะลิคีนเป็น 98.76% และ 98.19%

5) ค่าความถูกต้อง อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ในซีรัมแห้ง (serum control) จากต่างประเทศ และที่ผลิตในประเทศ (ดังแสดงในตารางที่ 3)

6) ค่าจุดที่ดูดกลืนแสงมากที่สุดของสีที่เกิดขึ้นภายหลังเกิดปฏิกิริยา พบว่าให้จุดที่ดูดกลืนแสงมากที่สุด (maximum absorbance) ของน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชนิด ตรงตามที่กำหนดมาในน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชนิด คือที่ 501, 537 และ 506 นาโนเมตร ตามลำดับ

ความคงสภาพของสีที่เกิดขึ้น ภายหลังจากทำปฏิกิริยาแล้วในน้ำยาสำเร็จรูปที่เป็น enzymatic colorimetric 3 ชนิด โดยการใช้น้ำยา standard 200 มก./ดล. ทำปฏิกิริยากับน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชนิดให้เกิดขึ้นสูงสุด แล้วนำใบวัดในเครื่อง SHIMADZU UV-160 และปล่อยทิ้งไว้เพื่อคอยติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นจนครบ 60 นาที โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 2 นาที ในน้ำยา R-II พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป 0.004 ส่วนในน้ำยาสำเร็จรูป

Triglycerides, Reagent kit

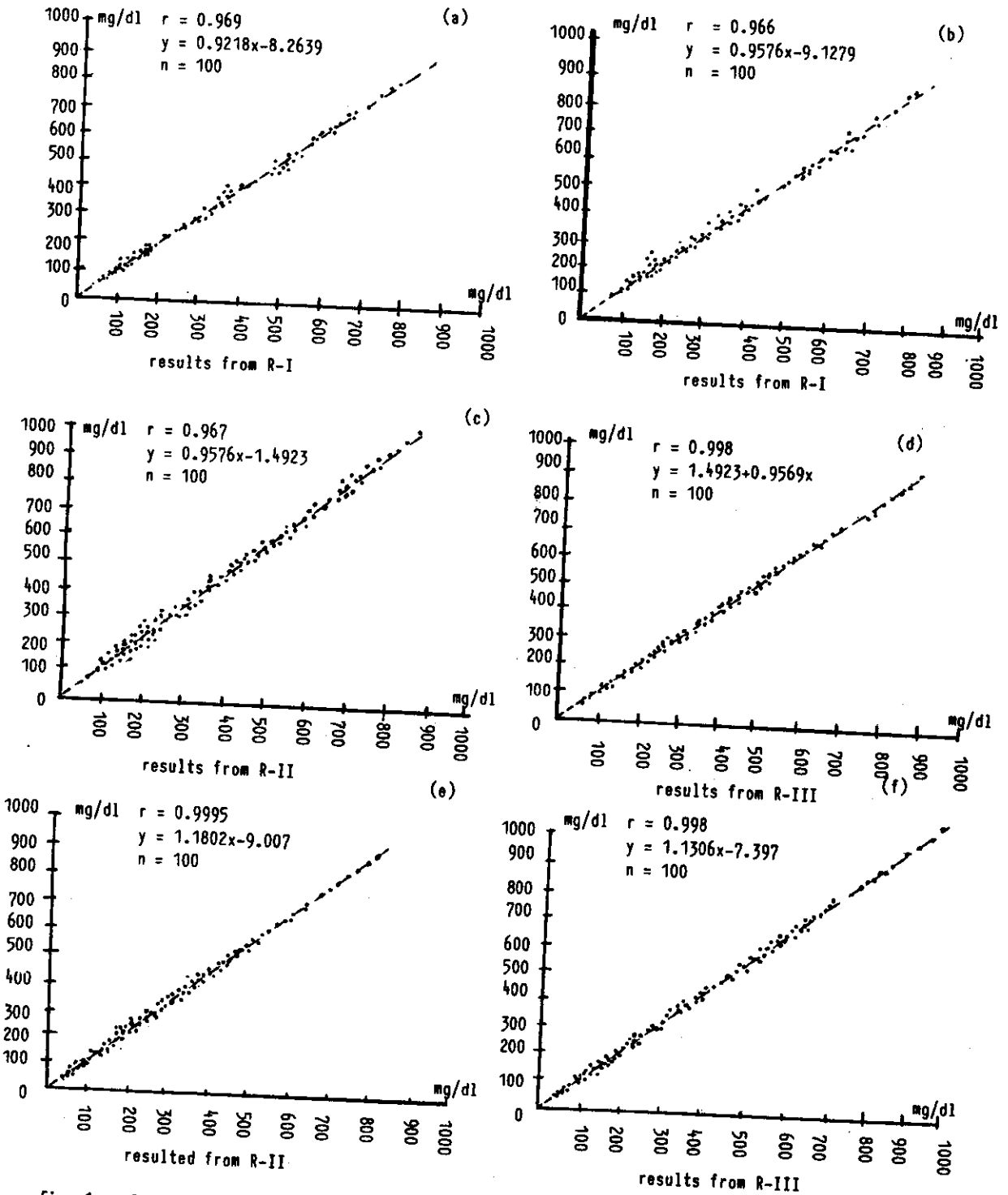


Fig. 1 Shown the correlation of Triglyceride determination from
 (a) R-I(x-axis) and R-II (y-axis) (b) R-I (x-axis) and R-III (y-axis)
 (c) R-I(x-axis) and R-IV (y-axis) (d) R-III(x-axis) and R-II (y-axis)
 (e) R-II(x-axis) and R-IV (y-axis) (f) R-III(x-axis) and R-IV (y-axis).

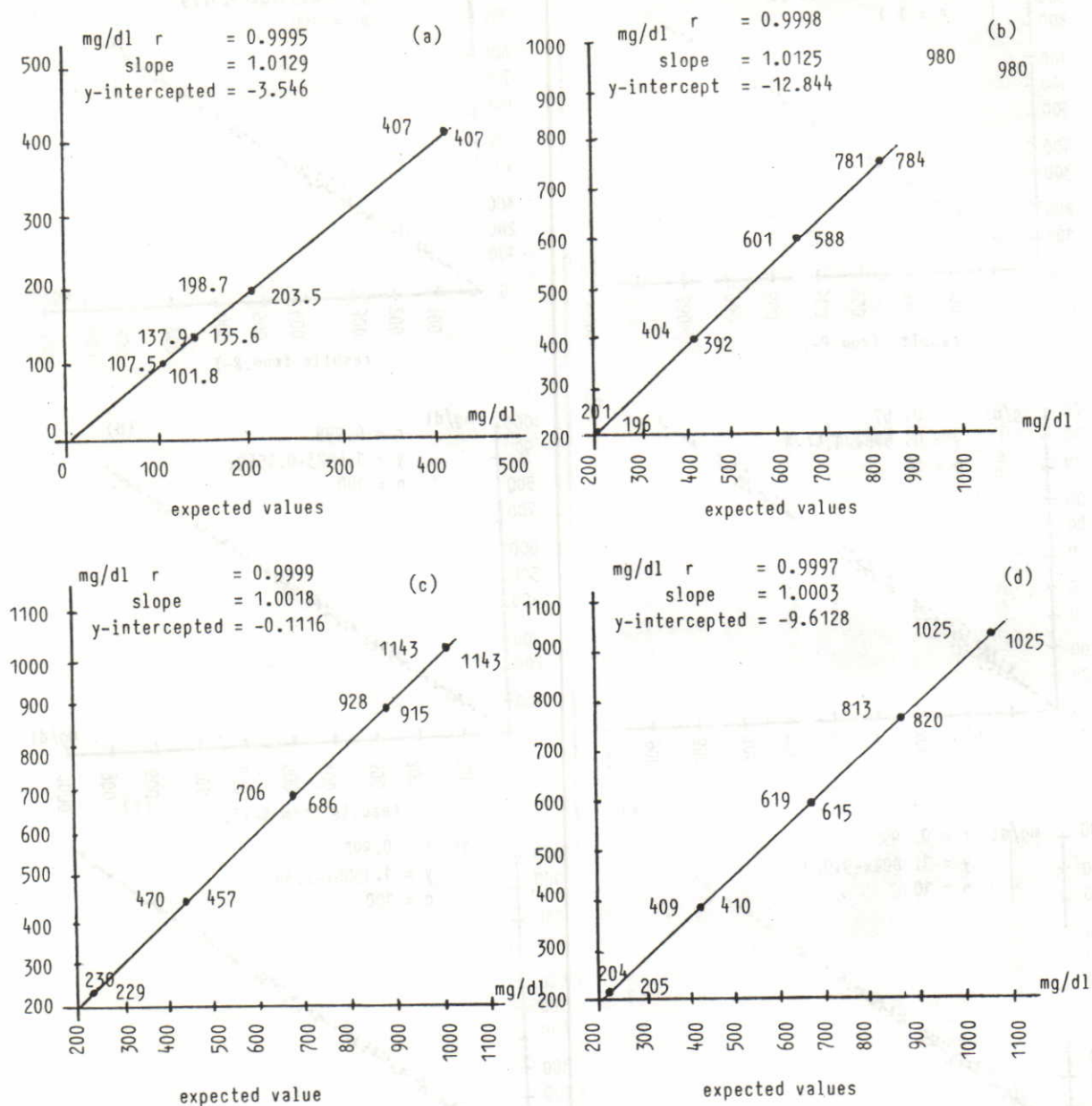


Fig.2 Showed the linearity of Triglyceride determination from

(a) Reagent kit R-I

(b) Reagent kit R-II

(c) Reagent kit R-III

(d) Reagent kit R-IV.

Triglycerides, Reagent kit

Table 1 Precision of the 4 Reagent kits for Triglyceride determination (n = 20).

Test kit	Lower concentration					Higher concentration				
	$\bar{X}$	within-run		between-run		$\bar{X}$	within-run		between-run	
	mg/dl	SD	%CV	SD	%CV	mg/dl	SD	%CV	SD	%CV
R-I	125.0	2.390	1.912	3.460	2.770	310.5	3.360	1.082	9.134	2.941
R-II	109.1	1.586	1.454	1.687	1.546	305.6	2.084	0.682	5.667	1.854
R-III	113.7	1.888	1.660	2.032	1.786	314.2	2.525	0.804	6.234	1.984
R-IV	118.9	2.174	1.828	2.257	1.898	348.5	3.017	0.866	6.941	1.992

Table 2 % Recovery of the 4 Reagent kit methods

Test kit	expected values(mg/dl)		assay values(mg/dl)		% Recovery	
	Lower	Higher	Lower	Higher	Lower	Higher
R-I	190.34	275.6	187	282	98.24	102.32
R-II	174.61	240.1	173	250	99.07	104.12
R-III	180.57	247.3	180	250	99.68	101.09
R-IV	195.41	271.9	193	267	98.76	98.19

Table 3 Accuracy of the 4 Reagent kits methods for Triglyceride determination.(n = 10)

Control serum	Assigned values (mg/dl) $\bar{X} \pm SD$	Assay values (mg/dl)			
		R-I	R-II	R-III	R-IV
CIBA-CORNING					
Lot # 036701	101 $\pm$ 15	106	104.3	107.3	109.3
LYOPHIL					
Lot # 0186005	125 $\pm$ 6.9	124.3	122	128.3	124.3

R-III, R-IV เปลี่ยนไป 0.021 และ 0.033 โดยเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์สภาพภายหลัง 15 นาที เป็น 99.47%, 96.20% และ 93.85% ของน้ำยาสำเร็จรูป R-II, R-III, R-IV ตามลำดับ

วิจารณ์

น้ำยาสำเร็จรูปทั้ง 4 ชนิดที่นำมาศึกษาี้สามารถที่จะใช้ในการวิเคราะห์หาค่าโคโรลีสโตรีนในซีรัมได้ แต่จะขึ้นอยู่กับหลักของวิธีการวิเคราะห์ของแต่ละชนิด ซึ่งจะเป็นข้อจำกัดทางเครื่องมือวิเคราะห์ เช่น วิธีการวิเคราะห์แบบ kinetic จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์แบบ kinetic ได้ด้วย แต่การวิเคราะห์ด้วย enzymatic colorimetric ทั่วๆไปก็สามารถวัดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ทั่วๆไปได้ ค่าความเป็นเส้นตรงของน้ำยาวิเคราะห์ R-I นั้นจะสูงที่สุด 400 มก/ดล. ส่วนน้ำยาวิเคราะห์ R-II, R-III, R-IV นั้นจะสูงที่สุด 1,000 มก/ดล. เมื่อทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง HITACHI 705 จมเรื่องความเป็นเส้นตรงนี้ อีกอย่างที่ต้องคำนึงถึงคือ เครื่องมือที่ทำการวิเคราะห์ด้วยว่า สามารถวัดค่าสูงสุดได้เท่าไร ซึ่งเป็นค่าความเป็นเส้นตรงของเครื่องด้วย เพราะว่าหากเป็นเครื่องเก่าแล้ว ค่าการดูดกลืนแสงในค่าการวิเคราะห์สูงๆจะไม่เป็นเส้นตรง จึงควรคำนึงถึงและนำมาทดสอบด้วย เพราะว่าหากน้ำยาวิเคราะห์หาค่าความเป็นเส้นตรงสูง แต่เครื่องวิเคราะห์หาค่าความเป็นเส้นตรงได้ไม่เท่ากัน ก็จะทำให้ได้ค่าการวิเคราะห์ไม่ถูกต้องจนกระทั่งหาค่าโคโรลีสโตรีนสูงๆ จึงเท่ากับเป็นการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อน้ำยาสำเร็จรูป ที่หาค่าความเป็นเส้นตรงสูง แต่ปัจจุบันนี้ ได้มีการนำเครื่องอัตโนมัติมาใช้เป็นจำนวนมาก ซึ่งเครื่องจะมีระบบวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากขึ้น จึงมีแนวโน้มปัญหานี้ และเครื่องอัตโนมัติเมื่อถึงเวลา ก็จะทำการอ่านค่าผลการวิเคราะห์ออกมาเลยและในการวิเคราะห์

แบบ enzymatic colorimetric ใน R-III และ R-IV นั้นกรณีที่ทำได้ด้วยมือ หากเกิดกรณีต้องตั้งทิ้งไว้ หรือเลยเวลาภายหลังจากการทำปฏิกิริยาแล้ว ก็ควรจะคำนึงถึงความไม่คงสภาพของสีที่ทำการเปลี่ยนแปลงไปด้วย ซึ่งจะทำการผลที่อ่านได้นั้นผิดพลาดไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. WS Saunders Co, Philadelphia 1982 ;1347-1354.
2. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzyme. Clin Chem 1973; 19: 475.
3. Wahlefeld AW. Methods of Enzymatic Analysis. (HU Bergmeyer, ed), Academic Press, New York 1974 p 1831.
4. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J Biol Chem 1957; 266: 497.
5. Calson LA, Wadstrom LB. Determination of glycerides in blood. Clin Chim Acta 1957; 4: 197.
6. Keasler G, Lederer H. Fluorometric measurement of triglyceride. In Automation in Analytical Chemistry. LT Skegges, Jr, et al, Eds. Technicon Symposia 1965. New York, Mediad 1966, p 341.

สรพล ตั้วารสิทธิ์ชัย, วท.บ.(เทคนิคการแพทย์)
ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยมหิดล
กรุงเทพ 10700