

บันทึก

วิธีตรวจวัดปริมาณ HDL-C*

อรุณกร ไกรศรีศิริกุล นันทยา ชนะรัตน์ พัลลารักษ์ พลวัฒน์ และ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์

บทคัดย่อ ได้ตกตะกอน VLDL และ LDL เพื่อ
นำส่วนที่สลายปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธีของ
Jung และคณะ และวิธีซีเอนไซม์ การตกตะ
กอนได้ศึกษา 3 วิธี คือ Phosphotungstate
/MgCl₂, Heparin/MnCl₂, Dextran
SO₄/MgCl₂ พบว่าค่าโคเลสเตอรอลที่ได้จาก
ส่วนที่ตก 3 วิธีมีความสัมพันธ์กันดี ($r =$
0.880-0.920) ค่าโคเลสเตอรอลที่วัดจากวิธี
ของ Jung มีความสัมพันธ์กับวิธีการซีเอนไซม์
ทั้งค่าโคเลสเตอรอลรวม ($r = 0.927$) และ
HDL-C ($r = 0.828$) โคเลสเตอรอลรวมในซี
รัมและส่วนที่เก็บที่ -30°C และ 4°C คงตัว
ได้อย่างน้อย 44 วัน และ 36 วันตามลำดับ ซี
รัมที่เก็บที่ -30°C และ 4°C เมื่อตกตะกอนด้วย
Heparin/MnCl₂ จะให้ค่าโคเลสเตอรอลสูงขึ้น
ตั้งแต่วันที่ 36 แต่การตกตะกอนด้วยวิธีอื่น ยัง
ให้ผลไม่เปลี่ยนแปลงจนถึงวันที่ 44 (คำรหัส :
โคเลสเตอรอล, HDL-C) วารสารเทคนิคการ
แพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 22 ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภา
คม 2532 หน้า 95-103

Abstract HDL-Cholesterol Determi-
nation. Kraisornsirikul U, Chanarat
N, Pholwatana P and Chanarat P.
VLDL, LDL were precipitated out
with either phosphotungstic acid
(PTA)/MgCl₂ or dextran SO₄/MgCl₂ or
heparin/MnCl₂ then the supernate
was determined for cholesterol by
Jung's and enzymatic methods. The
Jung's cholesterol levels from 3
types of supernate were well corre-
lated with r between 0.880 to 0.921.
Both total and HDL-cholesterol from
Jung's method were correlated well
with enzymatic method ($r = 0.927$ and
0.828 respectively). Total chole-
sterol in serum can be stabilized at
 -30°C or 4°C for at least 44 days
while cholesterol in PTA/MgCl₂ fil-
trate was stable for 36 days. Sto-
rage of serum at -30°C and 4°C do
not disturb HDL-C values from PTA/
MgCl₂, dextran SO₄/MgCl₂ within 44
days but the values increased with
heparin/MnCl₂ filtrate after 36 day
of storaction. (Keyword : Cholester-
ol, HDL, Precipitation) Bull Chiang
Mai AMS 1989; 22: 95-103

High density lipoprotein (HDL)
เป็นไลโปโปรตีน ที่มีหน้าที่นำโคเลสเตอรอลจาก
เนื้อเยื่อต่างๆ กลับไปยังตับเพื่อกำจัดออกจากรู
ขงน้ำดี สารสเดียรอยด์ เป็นต้น ผู้ที่มีโคเลสเต-

* ภาคนี้พนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการ
แพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2529

เดอรอลีน HDL (HDL-C) ต่ำจะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจมากขึ้น และตรงกันข้าม การที่มี HDL-C สูง จะมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดโรคนี้ได้ด้วย⁽¹⁾ คนทั่วไปจะมี HDL-C ประมาณ 1 ใน 5 ของโคเลสเตอรอลรวม การตรวจหาปริมาณ HDL-C ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การปั่นด้วยความเร็วสูง (Ultracentrifugation)⁽²⁾, วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา⁽³⁾, Electrophoresis⁽⁴⁾ และวิธีตกตะกอน⁽⁴⁻⁶⁾ งานการศึกษาครั้งนี้ ได้ทดลองเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอนเพื่อกำจัด Very low และ Low density lipoproteins (VLDL และ LDL) ออกไป แล้วนำส่วนสมาหาค่าโคเลสเตอรอลโดยวิธีของ Jung และคณะ เพื่อตัดแปลงให้เข้าใช้งานประจำวันได้

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างซีรัม ได้จากการเก็บซีรัมผู้ป่วยที่เลิกจากการปฏิบัติงานประจำวัน ของหน่วยปฏิบัติการเคมีคลินิก งานปฏิบัติการกลาง โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ส่วนหนึ่งนำมาหาปริมาณโคเลสเตอรอลรวมด้วยวิธีของ Jung และคณะ เทียบกับวิธีการซีเอนไซม์ อีกส่วนหนึ่งนำมาใช้ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอน 3 วิธีคือ การใช้ PTA/MgCl₂, dextran SO₄/MgCl₂ และ heparin/MnCl₂ นำส่วนสมาหาค่าโคเลสเตอรอลด้วยวิธี Jung และวิธีเอนไซม์

วิธีการตกตะกอน

วิธีที่ 1 PTA/MgCl₂ ประกอบด้วย Phosphotungstate reagent (phosphotungstic acid 40 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับ pH ให้ได้ 6.1 ด้วย NaOH) และ 2.5 มิลลิตรของ MgCl₂ (MgCl₂ 508.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

วิธีทำ ซีรัม 250 ไมโครลิตร ผสมกับ phosphotungstate reagent 25 ไมโครลิตร และเติม MgCl₂ 5 ไมโครลิตร เขย่า ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ปั่นด้วยความเร็วสูง 13,000

รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนสมาหาค่าโคเลสเตอรอล คำนวณโดยวิธีสูตร HDL-C = โคเลสเตอรอลที่หาได้ x 1.12

วิธีที่ 2 Dextran SO₄/MgCl₂ ประกอบด้วย Dextran SO₄ (Dextran SO₄ 20 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) และ 2 มิลลิตรของ MgCl₂ (MgCl₂ 406.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ผสมนํ้ายาทั้งสองในอัตราส่วน 1:1

วิธีทำ ซีรัม 250 ไมโครลิตร ผสมกับ dextran SO₄/MgCl₂ 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนสมาหาค่าโคเลสเตอรอล คำนวณค่า HDL-C โดยวิธีสูตร HDL-C = โคเลสเตอรอลที่หาได้ x 1.10

วิธีที่ 3 Heparin/MnCl₂ ประกอบด้วย Heparin Leo (5,000 IU/mL) และ 1 มิลลิตรของ MnCl₂ (MnCl₂ 16.188 มก. ในน้ำกลั่น 100 มล.)

วิธีทำ ซีรัม 500 ไมโครลิตร ผสมกับ heparin 20 ไมโครลิตร และเติม MnCl₂ 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนสมาหาค่าโคเลสเตอรอล คำนวณค่า HDL-C โดยวิธีสูตร HDL-C = โคเลสเตอรอลที่หาได้ x 1.09

วิธีการหาปริมาณโคเลสเตอรอล

วิธีของ Jung และคณะ⁽⁷⁾ ตกตะกอนโปรตีนในซีรัมด้วย ferric acetate/uranyl acetate (FeCl₃.6H₂O 500 มก. ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. เติม NH₄OH เข้มข้นลงไป 3 มล. เขย่าแรงๆ ปั่นแยกตะกอน และล้างตะกอนที่ติดด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง ละลายตะกอนด้วยกรดอะซิติก 1 ลิตร เติม uranyl acetate 100 มก. ลงไปละลายให้เข้ากัน) นำส่วนสที่ได้นำมาทำปฏิกิริยากับ sulfuric acid reagent (FeSO₄ anhydrous 100 มก. ละลาย

ในกรดอะซิดิก เติมกรดซัลฟริกเข้มข้นลงไป 100 มล. เมื่อละลายดีแล้ว ปรับให้ครบลิตร ด้วยกรดอะซิดิก) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐาน (โคเลสเตอรอลในกรดอะซิดิก) ที่ทำแบบเดียวกัน

วิธีเอนไซม์ ใช้ Monotest Cholesterol /High Performance, CHOD-PAP method ของ Boeringer Mannheim GmbH Diagnostica⁽⁸⁾

ผลการทดลอง

ความเที่ยงของวิธีการตกตะกอนทั้ง 3 วิธี จากค่าโคเลสเตอรอลในส่วนน้ำใส ที่เตรียมในวันเดียวกันและต่างวันกัน ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนสำหรับวิธีที่ 1 เท่ากับ 3.66 และ 11.67% วิธีที่ 2 เท่ากับ 9.7 และ 14.06% และวิธีที่ 3 เท่ากับ 4.64 และ 11.36%

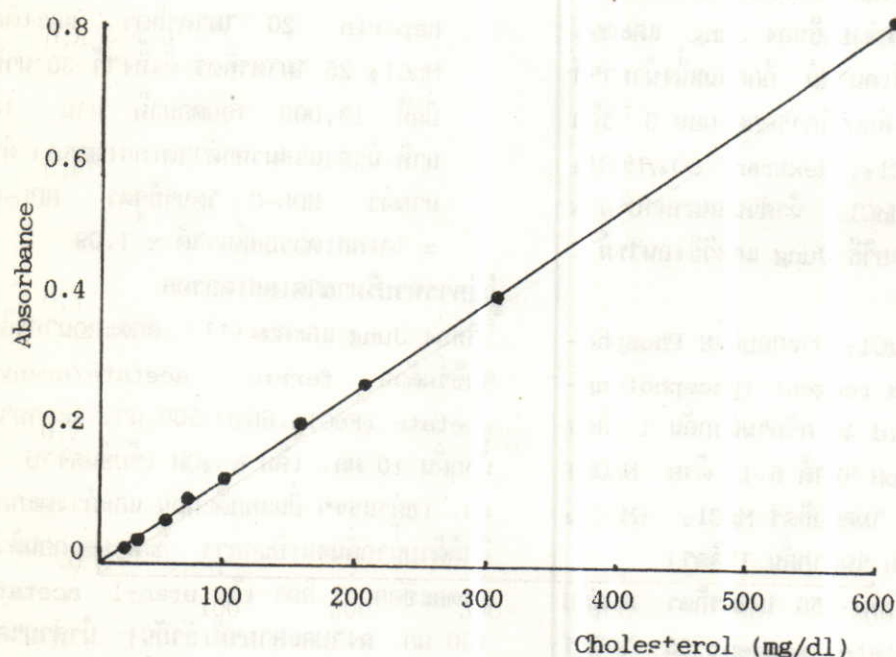
ความเที่ยงของการตรวจวัดโคเลสเตอรอลด้วยวิธีของ Jung และคณะ ในซีรัมปกติ (เฉลี่ย 185 มก./ดล.) เมื่อทำไปพร้อมๆ กันและทำต่าง

วันกัน ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 2.68 และ 3.68% ตามลำดับ และเมื่อเจือจางซีรัมลง 5 เท่า ได้ค่าเท่ากับ 6.35 และ 7.46% ตามลำดับ

การศึกษาความไว และความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดปริมาณโคเลสเตอรอล ด้วยวิธีของ Jung และคณะ พบว่าได้กราฟเป็นเส้นตรง ตั้งแต่ความเข้มข้น 25 ไปจนถึง 600 มก./ดล. (รูปที่ 1)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเลสเตอรอล ในส่วนน้ำใสที่ได้จากการตกตะกอนวิธีที่ 1 กับวิธีที่ 2 มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.880 ระหว่างวิธีที่ 1 กับวิธีที่ 3 เท่ากับ 0.920 และระหว่างวิธีที่ 2 กับวิธีที่ 3 เท่ากับ 0.887 ดังรูปที่ 2 และเมื่อทดสอบด้วย Paired t test พบว่าวิธี Heparin-MnCl₂ ให้ค่าแตกต่างจากวิธี Dextran SO₄/MgCl₂ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

ค่าโคเลสเตอรอลรวม และโคเลสเตอรอล



รูปที่ 1 Linearity of cholesterol determined by Jung's method

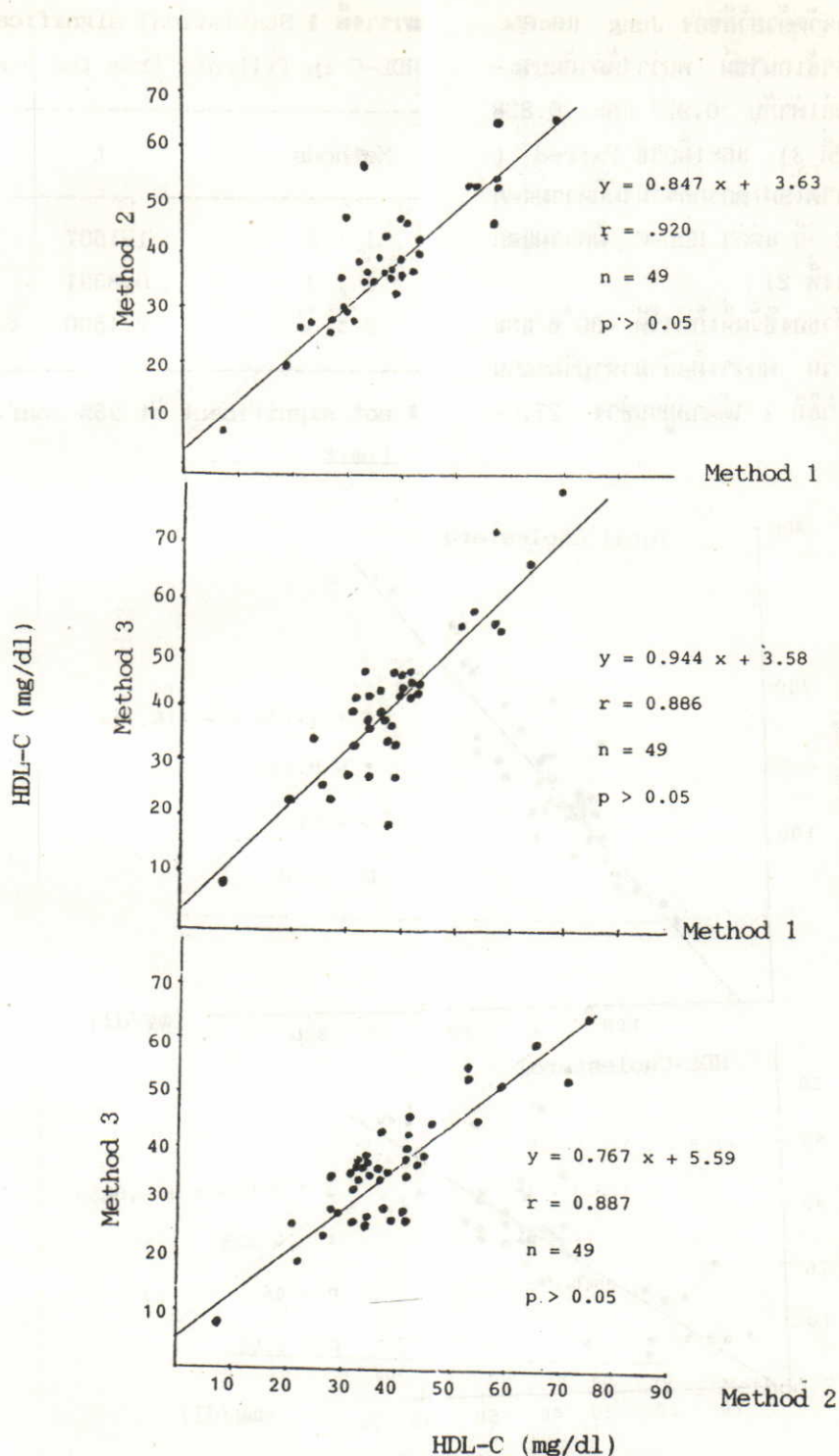


Figure 2 Correlation of HDL-C in filtrate from PTA/MgCl₂ (Method 1), Dextran SO₄/MgCl₂ (Method 2) and Heparin/MnCl₂ (Method 3)

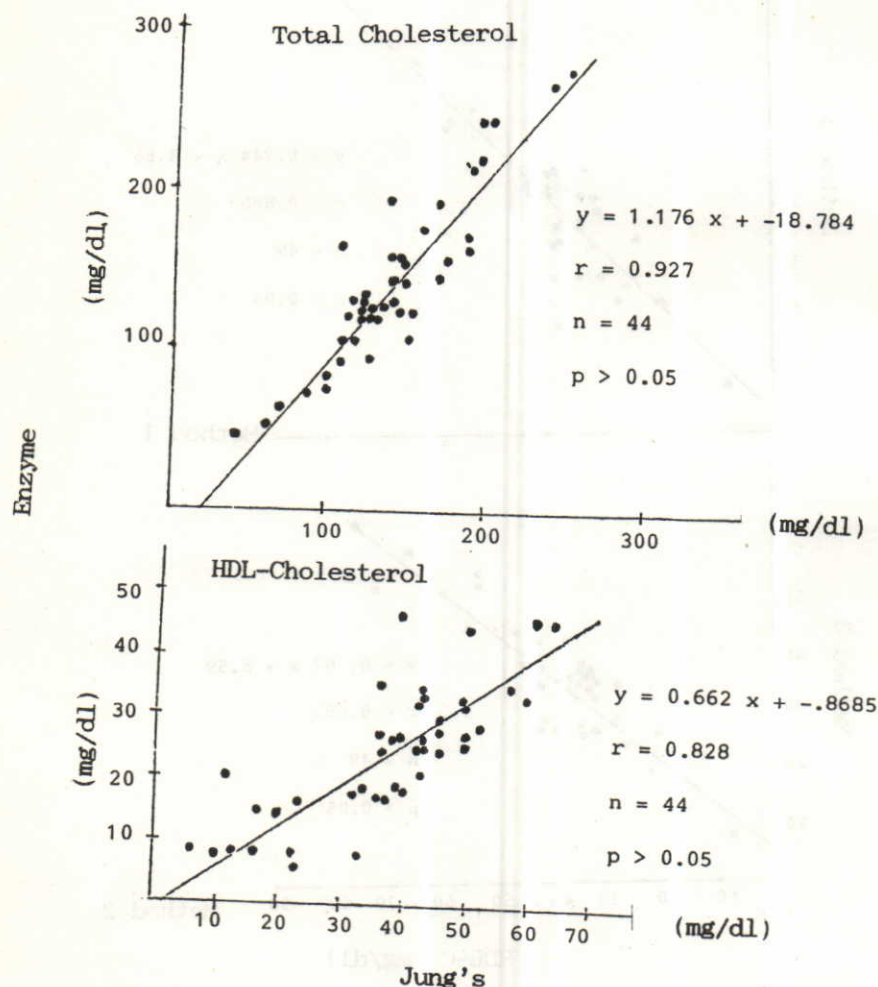
ในส่วนนี้ที่ตรวจวัดด้วยวิธีของ Jung และคณะ เทียบกับวิธีการซีเอนไซม์ พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.927 และ 0.828 ตามลำดับ (รูปที่ 3) และเมื่อใช้ Paired t test พบว่าค่าโคเลสเตอรอลรวมไม่มีความแตกต่างกันโดย 2 วิธี แต่ค่า HDL-C มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ความคงตัวของซีรัมที่เก็บไว้ที่ -30°C และ 4°C ช่วง 44 วัน พบว่าเมื่อนำมาหาปริมาณวันต่างๆ กัน วิธีที่ 1 ได้ค่าอยู่ในช่วง 27.0-

ตารางที่ 1 Statistical significance of HDL-C in filtrate from the 3 methods.

Methods	t	p
1 : 2	1.1507	N.S*
1 : 3	0.8391	N.S
2 : 3	2.1530	< 0.05

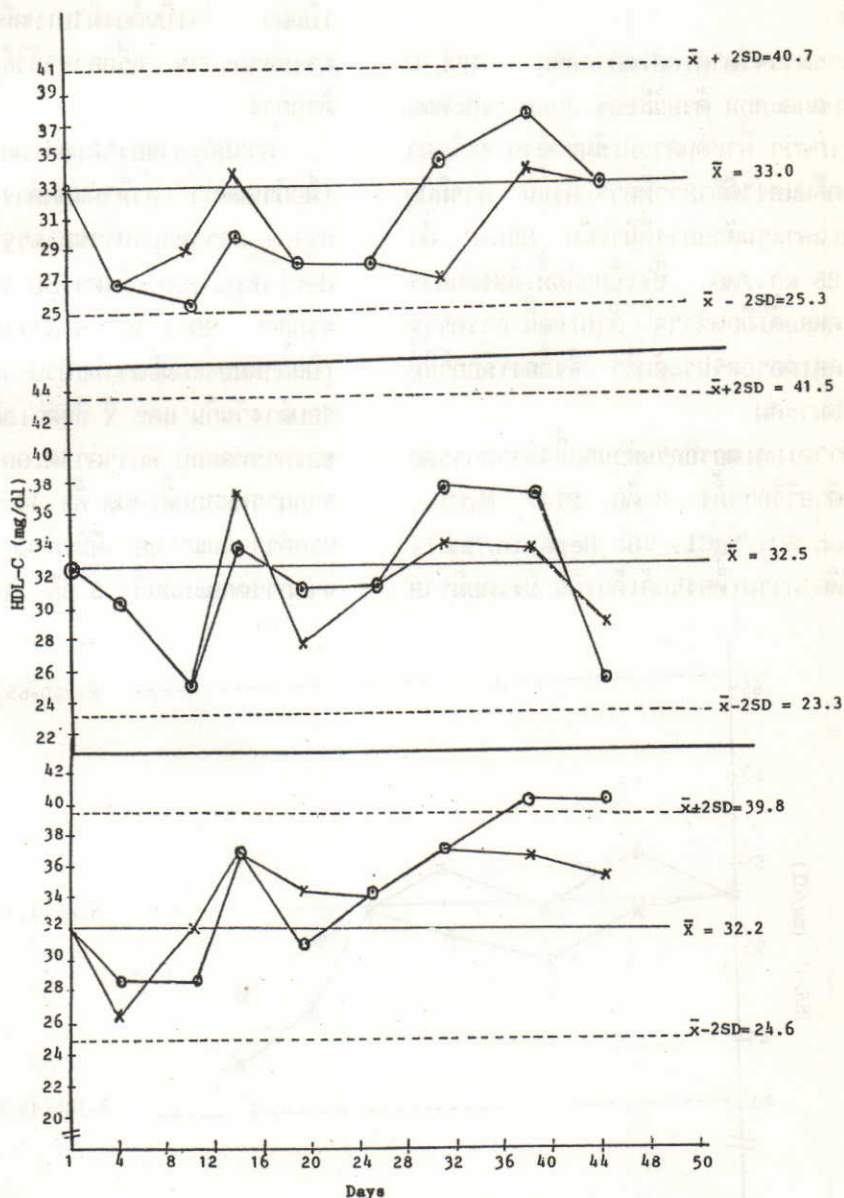
* not significant at 95% confidence limit



รูปที่ 3 Correlation of total cholesterol and HDL-C values determined by Jung's and enzymatic methods

34.2 และ 25.7-37.9 มก./ดล. เทียบกับค่า
ที่ได้ในวันแรก 33.0 มก./ดล., วิธีที่ 2 ได้ค่า
25.2-37.9 มก./ดล. เท่าๆ กัน เทียบกับวัน

แรก 32.5 มก./ดล. และวิธีที่ 3 ได้ค่า
26.3-37.6 และ 28.6-40.6 มก./ดล.
เทียบกับค่าวันแรก 32.2 มก./ดล. (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 Stability of HDL-C in filtrates prepared from serum stored at
4 °C (●—●) and -30 °C (×—×)

ความคงตัวของส่วนไขมัน หลังจากตกตะกอน ด้วย PTA/MgCl₂ ที่ -30 °C และ 4 °C มีค่าโคเลสเตอรอลในระยะเวลา 36 วันอยู่ในช่วง 44.8-56.3 และ 48.5-56.3 มก./ดล. เทียบกับค่าที่ได้ในวันแรก 53.3 มก./ดล. (รูปที่ 5)

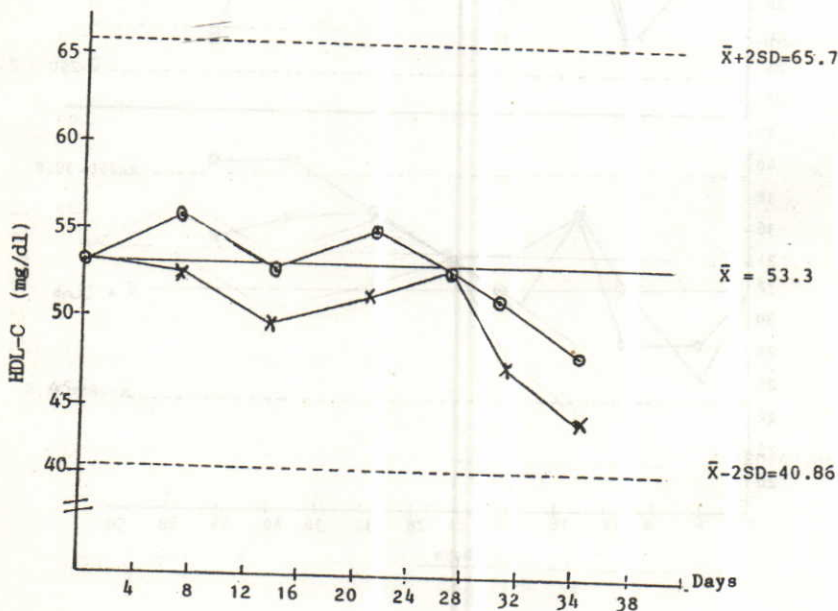
วิจารณ์

การตรวจวัดโคเลสเตอรอลใน HDL-C หลังจากตกตะกอน ด้วยวิธีของ Jung และคณะ มีข้อสังเกตว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ จะวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ต่ำกว่าที่ควร ดังนั้น อาจมีปัญหาโดยเฉพาะในตัวอย่างที่มีระดับ HDL-C ต่ำกว่า 25 มก./ดล. ซึ่งเป็นกลุ่มที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ด้วยเหตุนี้นี้ การตรวจวัดโคเลสเตอรอลในระดับต่ำ จึงต้องเลือกวิธีที่ใช้งานได้เหมาะสม

ค่าโคเลสเตอรอลในส่วนไขมันที่ได้จากการตกตะกอนด้วยวิธีการทั้ง 3 คือ PTA/MgCl₂, Dextran SO₄/MgCl₂ และ Heparin/MnCl₂ พบว่าให้ค่าความเที่ยงใกล้เคียงกัน ซึ่งเคยมีราย

งานการเปรียบเทียบการตกตะกอนด้วยวิธีทั้งสามกับวิธี ultracentrifugation ว่ามีความสัมพันธ์กันดี(๑) สามารถใช้วิธีการใดวิธีหนึ่งแทนกันได้ สิ่งที่ต้องระมัดระวังคือปริมาณของน้ำยาที่ใช้ขึ้นน้อยมาก ได้แก่ MgCl₂ เพียง 5 ไมโครลิตร เป็นต้น จำเป็นต้องมีไปเปิดที่เหมาะสมการวางสารละลาย หรืออาจใช้วิธีเพิ่มปริมาตรสารตัวอย่าง

ความคงตัวของโคเลสเตอรอลในตัวอย่าง เมื่อกำหนดว่า ค่าที่ไม่แตกต่างกัน จะต้องอยู่ในช่วง ± 2 ความแปรปรวนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ซึ่งค่า SD ได้จากการคำนวณจากสูตร $SD = (CV \times \bar{X})/100$ เมื่อ CV เป็นค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เมื่อทำการทดสอบต่างวันกัน และ $\bar{X}$ คือค่าเฉลี่ยที่ได้ในวันแรกของการทดสอบ พบว่าค่าโคเลสเตอรอลรวมที่ได้จากการทดสอบทั้งหมด ทั้ง 44 วัน ไม่แตกต่างจากค่าในวันแรกอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่า HDL-C จากการตกตะกอนทั้ง 3 วิธี ให้ค่าใกล้เคียงกัน



รูปที่ 5 Stability of HDL-C from PTA/MgCl₂ filtrate at 4 °C (●—●) and -30 °C (x—x)

แต่สังเกตพบว่า ค่าที่ได้จากการตกตะกอนด้วย heparin/MnCl₂ จะเริ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่วันที่ 31 โดยเฉพาะเมื่อเก็บซ้ำในวันที่ 4 จะได้ค่าสูงกว่าวันแรกอย่างมีนัยสำคัญ และจากการทดลอง จะเห็นการตกตะกอนที่ไม่สมบูรณ์ คือมีฟlocs ลอยอยู่ด้วยจึงทำให้ค่าโคเลสเตอรอลที่ได้สูงกว่าที่ควร ส่วนการตกตะกอนอีก 2 วิธี ให้ค่าไม่ต่างจากวันแรกอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับที่ Stokes และคณะรายงานว่า HDL-C และโคเลสเตอรอล สามารถคงตัวที่ -15° ซ ได้มากถึง 18 สัปดาห์⁽¹⁰⁾ จากการศึกษาดังกล่าว ผู้ทำการทดลองจึงเลือกวิธีที่สะดวกและให้ผลดีที่สุดคือวิธี PTA/MgCl₂ และได้ศึกษาต่อไปถึงความคงตัวของส่วนที่ตกตะกอนด้วยวิธีนี้ พบว่า ค่าโคเลสเตอรอลที่ได้จากการเก็บส่วนที่ -30° ซ และ 4° ซ เป็นเวลา 35 วัน มีค่าใกล้เคียงกับค่าในวันแรกมาก ดังนั้น ซ้ำหรือส่วนที่สามารถเก็บเพื่อตรวจวัด HDL-C ได้เป็นเวลานานอย่างน้อย 1 เดือนที่ -30° ซ หรือ 4° ซ

เอกสารอ้างอิง

1. วิกุล วีรานวัตร และ กนกนาก ชูปัญญา "เคมีคลินิก" ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2520. หน้า 258.
2. Brewer HB, Schaeffer EJ, Zech La, et al : Human plasma lipoprotein and coronary heart disease. New Aspect in the Diagnostic and therapy of disorder of lipid metabolism, International Symposium, Vienna, May 12-13, 1979.
3. Wanick GR, Cheung MC and Albers JJ. Comparison of current method for high density lipoprotein cholesterol quantitation. Clin Chem 1977; 25: 596-604.
4. Assman G, Schriewer H, Scholpohl B, Frunke IJ, Investigation of the HDL-C test. In Lipoprotein and Coronary Heart Disease. Vienna, Greten H, Lang PD, Schettler G (eds), 1980, p 43-45.
5. Stone P, Ellis S, Colwell JA, et al. Cholesterol determination in high density lipoprotein separated by three different methods. Clin Chem 1977; 23: 882-884.
6. Draeger B, Wahlefeld A. Development of the test for determination of HDL-C by precipitation. In Lipoprotein and Coronary Heart Disease. Vienna, Greten H, Lang PD, Schettler G (eds), 1980, p 38-42.
7. Jung DH, Biggs HG and Moorhead WR. Colorimetry of serum cholesterol with use of ferric acetate/uranyl acetate and ferrous sulfate/sulfuric acid reagents. Clin Chem 1975; 21: 1576.
8. Boehringer Mannheim Monotest Cholesterol CHOD-PAP High Performance Enzymatic Colorimetric Test, Boehringer Mannheim GmbH West Germany.
9. Lopes MF, Stone VP, Ellis S and Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoprotein separated by three different methods. Clin Chem

1977; 22: 882-884.

10. Stokes VM, Salmond CE, Carpenter LM and Welby TJ. Stability of total cholesterol, high

density-lipoprotein cholesterol and triglycerides in frozen sera. Clin Chem 1985; 32: 995-999.

Nantaya Chanarat, M.S.

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Associated Medical

Sciences

Chiang Mai University

Chiang Mai 50002

THAILAND