



การวิเคราะห์หา SERUM AMYLASE

ยุคนธร สุวรรณยอด, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) ป.นิติวิทยาศาสตร์*

นับตั้งแต่ Somogyi - ได้คิดทดลองหาค่าของ enzyme amylase ในน้ำเหลืองได้สำเร็จเลยทำให้ enzyme amylase มีความสำคัญในวงการแพทย์ยิ่งขึ้น ถึงแม้ว่า Somogyi จะไม่ใช่คนแรกที่ค้นพบวิธีหาค่าของ enzyme amylase ก็ตาม เพราะว่ามีผู้ที่คิดค้นกันอยู่ก่อนและหลังอีกมาก แต่ก็ยังเป็นที่ยอมรับว่าวิธีการที่ Somogyi คิดทดลองได้เป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง แต่วิธีของ Somogyi จะเสียอยู่ที่เสียเวลานานเกินไป เช่น ใช้เวลาในการ Incubate 45 นาที และเวลาที่ทำปฏิกิริยาของ Reducing sugar 20 นาที ถ้ารวมวิธีการต่างๆ ด้วยตั้งแต่ต้นจนเสร็จก็เกือบสองชั่วโมง ซึ่งบางครั้งอาจไม่ทันต่อเหตุการณ์ เพราะในรายที่ผู้ป่วยปวดท้องอย่างแรงที่ยังไม่สามารถทราบสาเหตุ แพทย์มักอยากจะทราบผลของ amylase ให้เร็วที่สุดทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของคนไข้เอง

ดังนั้น ถ้ามีวิธีใดที่สามารถหาค่าของ enzyme amylase ได้รวดเร็ววกักนั้นจะเป็นที่

สนใจ เพราะฉะนั้น ผู้เขียนจึงได้พยายามคิดทดลองดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์หาค่าของ amylase ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2507 เรื่อยมา แม้ว่าจะระยะเวลาในการค้นคว้าจะไม่นานพอ แต่วิธีการทดลองที่ผู้เขียนได้คิดค้นมาทดลองนี้ (ดูวิธีทำ) ตามตัวเลขที่แสดงออกมา (ดูจากตารางแสดงผล) ทั้งในคนไข้ และคนปกติก็น่าจะเป็น วิธีการที่ใช้ตรวจสอบได้ จึงหวังว่าจะได้รับการพิจารณาแก้ไขจากผู้รู้เพื่อเป็นแนวทางทดลองต่อไป

วิธีการและการทดสอบ ที่ผู้ทดลองค้นคว้าหลักการ

ใช้หลักเดียวกับ Saccharogenic method โดยให้ enzyme amylase ที่มีใน Serum, Urine, Plasma หรือ Biological fluid อื่นๆ ไปย่อยสลายละลายของ Starch ให้เป็นพวก reducing sugar แล้วเรดักตะกอน Protein ด้วย Sodium tungstate กับ Copper sulfate จำนวนของ reducing sugar ที่ถูกขับออกมาจะนำมาหาได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับ Alkaline

* โรงพยาบาลเลิกลิน กรุงเทพฯ ๕

copper solution และ develope สีด้วย Phosphomolybdic acid พวก Amylolytic (Diasstatic) activity จะบอกถึงจำนวนของ reducing sugar ที่ถูกขับออกมาเป็นมิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

เครื่องมือที่ใช้ทดลอง

Test tube ขนาด 15×150 มม.

Folin-Wu test tube calibrate ขนาด 12.5 มล.

Test tube rack

Pipette

Volumetric flask

Beaker

Water bath

Incubator

น้ำยาที่ใช้

1% Sodium chloride

5% Copper sulfate

7% Copper sulfate

6% Sodium tungstate

10% Sodium tungstate

1.5% Starch solution

0.25% Benzoic acid

Alkaline copper solution

-Phosphomolybdic acid solution

-Standard glucose

วิธีเตรียมน้ำยา

1. Alkaline copper solution

-ชั่ง pure anhydrous Sodium carbonate 20 gm ละลายในน้ำกลั่น 200 ml.

-เติม Tartaric acid 3.75 gm. คนให้เข้ากัน เป็นสารละลาย (ก)

-สารละลาย (ข) ใช้ copper sulfate 2.25 gm ละลายในน้ำร้อน 50 ml. แล้วเติมลงในสารละลาย (ก) ผสมให้เข้ากัน

-เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml. ตั้งทิ้งไว้ 1 อาทิตย์ ก่อนใช้ เพื่อให้ Bicarbonate เปลี่ยนเป็น Carbonate ให้หมด

2. Phosphomolybdic acid

-ชั่ง anhydrous Molybdic acid 6 กรัม ใส่ beaker

-เติม Sodium tungstate 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน

-เติม 10% Sodium hydroxide 40 มล.

-เติมน้ำกลั่น 40 มล. นำไปต้มเดือดนาน 25 นาที เพื่อไล่ ammoniac ที่อยู่ใน Molybdic acid ออกให้หมด

-ทำให้เย็น เติม 85% Phosphoric acid 25 ml.

-เจือจางให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

3. Standard Glucose

ก. Stock standard glucose

-ชั่ง anhydrous Dextrose 1 กรัม ละลายให้ครบ 100 ml. ด้วย Benzoic acid 0.25% ใน Volumetric flask

ข. Working strong standard glucose

-ใช้ Stock standard glucose 2 ml. เจือจางด้วย Benzoic acid 0.25% ครบ 100 ml. ใน Volumetric flask

ค. Working weak standard glucose

-ใช้ stock standard glucose 1 ml. เจือจางด้วย Benzoic acid 0.25% ครบ 100 ml. ใน Volumetric flask

วิธีทำ

1. เตรียม beaker ขนาด 50 ml. 2 ใบ เขียน Unknown และ Control แล้วทำดังนี้.-

	Unk.	Cont.
สิ่งที่ใช้ตรวจ(เลือกหรือน้ำเหลือง)	0.5 ml.	0.5 ml.
1% NaCl	1.0 ml.	1.0 ml.
1.5% Starch solution	2.5 ml.	
Distilled water		2.5 ml.

2. นำ Unknown ไป Incubate ใน Incubator ที่ 37 °C นาน 40 นาที เพื่อให้ enzyme ย่อย starch ส่วน Control นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย 6 % Sodium tungstate 0.5 ml. และ 5% Copper sulfate 0.5

ml. แล้วกรอง

3. ครบ 40 นาที นำ Unknown มาตกตะกอนโปรตีนเช่นกัน

4. ใช้ Filtrate ของ Unknown, Control และ Weak หรือ Strong standard glucose ใส่หลอด Folin-Wu หลอดละ 1ml. เติม Alkaline copper 1 ml. นำไปต้มใน Water bath นาน 7 นาที

5. ทำให้เย็นแล้วเติม Phosphomolybdic acid 1 ml. เจือจางด้วยน้ำกลั่นครบ 12.5 ml. ผสมให้เข้ากัน

6. นำไปวัดหาความเข้มข้นด้วย Colorimeter หรือ Spectrophometer wavelength 540 mu. โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวตั้งที่ 0 O.D. หรือ 100% T

การคำนวณค่า Amylase activity

Amylase activity = mg% of Sugar unknown - mg% of Sugar control

วิธีคิด

-ถ้าการใช้เครื่อง Colorimeter วัด

$$\text{สูตร Amylase activity} = \frac{R_u}{R_s} \times C_s \times 100$$

R_u คือความเข้มข้นของ unknown หรือ control

R_s คือความเข้มข้นของ standard

C_s คือเนื้อของ standard glucose ใน 1ml.

-ถ้าใช้เครื่อง Spectrophometer วัด

$$\text{สูตร Amylase activity} = \frac{\text{O.D.u}}{\text{O.D.s}} \times C_s \times 100$$

O.D.u คือ Optical density of unknown หรือ control

O.D.s คือ Optical density of standard

วิจารณ์ผลและผลการทดสอบ

สรุปข้อผลการวิจัยค้นคว้า

เท่าที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การหาค่า enzyme amylase นั้น มีด้วยกันมากมายหลายวิธี แต่หลักใหญ่แล้วคงยึดหลักที่ว่า ให้ enzyme amylase เป็นตัวไปย่อย Starch ให้ได้ glucose ออกมาแล้วจึงหาค่าในรูปของ glucose นอกเหนือจากนั้นก็จะเป็นนายาที่สดแท้แต่ผู้คิดค้นจะใช้อะไร เป็นตัวประกอบในการตกตะกอน protien หรือเป็นตัว reduce กับ glucose ที่เกิด การที่มีผู้คิดค้นหาวิธีหาค่าของ enzyme Amylase ก็เนื่องจากว่า enzyme นี้มีความสำคัญตัวหนึ่งที่จะช่วยในการวินิจฉัยโรค ซึ่งวงการแพทย์ยอมรับว่าในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอ่อนอักเสบอย่างแรงนั้น amylase จะเป็นตัวสำคัญที่สุดที่จะละเวนเสียมิได้ เพราะว่า amylase activity จะขึ้นตั้งแต่ 6-12 ชั่วโมง ภายหลังที่คนไข้มีอาการและจะคงที่ 2-3 วัน ดังนั้นแพทย์จึงมักนิยมหาค่าของ amylase ควบคู่ไปกับการรักษาเสมอจนกว่าคนไข้จะหาย นอก

จากนั้นในผู้ป่วยที่ปวดท้องอย่างรุนแรง ที่ไม่ทราบสาเหตุหรือ ในราย Impaired Renal Function, Suppuration of Salivary glands, Salivary duct occlusion, Perforation of Peptic ulcer into or near the pancreas ก็มักนิยมหาค่าของ amylase ด้วยเสมอ เพราะสาเหตุดังกล่าวนี้จะทำให้ค่าของ amylase สูงด้วย แม้แต่ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย Codeine หรือ Morphine ก็ทำให้ค่าของ amylase สูงด้วย เพราะว่ามันไป irritate pancreas แต่สาเหตุหลังนี้ไม่เกี่ยวกับการวินิจฉัยโรค

ด้วยเหตุที่ enzyme amylase มีความสำคัญดังกล่าวนี้ มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ทางห้องปฏิบัติการจะต้องหาค่าของ amylase ให้ได้อย่างรวดเร็ว เพื่อให้ทันกับการรักษาคอนไซ์อีกประการหนึ่งเพื่อป้องกันการ loss of activity ถ้าเป็น plasma หรือ Serum เก็บไว้ในห้องทดลองนาน 2-3 ชม. อาจจะทำให้ activity ลดลงได้ถึง 50% เนื่องจากการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ค่าของ pH เปลี่ยนแปลงไปด้วย เราป้องกันได้โดยใช้ Phosphate buffer

เนื่องจากวิธีการต่างๆ ที่ใช้ตรวจนั้น ใช้เวลานานเกินควร ใช้น้ำยาอย่างมากมายและต้องการสิ่งที่จะนำมาตรวจมาก ผู้เขียนจึงได้คิดหาวิธีที่

สะดวก รวดเร็ว และได้ผลดีขึ้นแทน โดยเริ่มค้นคว้าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2507 เรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน แม้ว่าระยะเวลาในการค้นคว้าจะไม่นานพอ แต่ผลที่ออกมาเท่าที่ได้ ก็พอจะเป็นแนวทางสำหรับค้นคว้าต่อไป ผู้ทดลองยังคงยึดหลักของวิธีการต่างๆ เามาประกอบกันดัดแปลง ตั้งแต่การลดจำนวนสิ่งที่ส่งตรวจให้น้อยลง การใช้เวลาให้สั้นลง การใช้ น้ำยาให้น้อยลง และง่ายขึ้น เช่น ใช้ Sodium tungstate กับ Copper sulfate เป็นตัวตกตะกอนโปรตีนแทน Sodium tungstate กับ Sulfuric acid หรือแทน Barium hydroxide กับ Zinc Sulfate เป็นต้น ซึ่งผลจากการทดลอง พอจะทราบว่าในคนปกติจำนวน 386 ราย ได้ค่า amylase ตั้งแต่ 40.00 mg% ถึง 165.00 mg% เฉลี่ย 82 mg% จะเห็นว่าโดยมากจะอยู่ระหว่าง 82^{+23} mg/100 ml. เป็นส่วนใหญ่ดูในตาราง และในโรคตับอ่อนอักเสบอย่างแรงจำนวน 67 ราย ได้ค่าเฉลี่ย 299 mg% จึงเห็นได้ว่าในโรคตับอ่อนอักเสบอย่างแรงค่าของ amylase สูงอย่างเด่นชัด แต่บางครั้งก็ได้ค่าปกติ รวมทั้งโรคต่างๆ ที่น่าจะได้ค่า amylase สูงขึ้น (ดังแสดงในตารางที่ 1) แต่กลับได้ไม่แน่นอน ทั้งนี้เพราะเป็นเพียง Provisional diagnosis เท่านั้น จึงยังไม่สามารถจะบอกลงไปแน่ชัดได้อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการทดลองดังที่ได้

แสดงในตารางนั้น ก็น่าจะเป็นเครื่องยืนยันได้ว่า วิธีการหาค่า amylase ซึ่งผู้ทดลองได้คิดค้นดัดแปลงนี้ ควรจะเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบได้ เพราะเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ เช่น วิธีของ Folin-Wu ให้ค่าปกติ 30-100 mg% เฉลี่ย 60 mg% ของ Somogyi ให้ค่าปกติ 60-180 mg% เฉลี่ย 100 mg% ของผู้ทดลองได้ค่าปกติ 40-165 mg% เฉลี่ย 82 mg% จึงเห็นว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน (ดังตารางที่ 1)

และในการทดลองในคนปกติจำนวน 40 ราย เมื่อใช้วิธีต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบผลกัน (ดังตารางที่ 2) พบว่า

วิธีของ Folin-Wu ให้ค่า amylase activity 70^{+23} mg%

วิธีของ Somogyi ให้ค่า amylase activity 87^{+23} mg%

วิธีของผู้ทดลอง ให้ค่า amylase activity 80^{+22} mg%

ซึ่งจะเห็นว่าวิธีของผู้ทดลองให้ผลที่ใกล้เคียงและไปกันได้กับวิธีมาตรฐานทั้งสองวิธีนั้น

สำหรับการทดสอบตามสถานที่นั้นไม่ได้ทำ คงได้เลือดที่มาทดลองจากคนไข้ที่เข้ามาตรวจในโรงพยาบาลเลิดสิน และบางครั้งได้ขอเลือดจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และศิริราชบ้าง แต่กล่าวโดยทั่วไปแล้วคนไข้ที่มาตรวจในโรงพยาบาลเลิดสิน ก็มาจากสถานที่ต่างๆ กัน ถ้าจะกล่าวไปก็เท่ากับเป็นการสำรวจทั่วไปอยู่แล้ว

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจทดลองปี พ.ศ. 2508 - 2511

การวินิจฉัยโรค	จำนวน (ราย)	ค่า amylase activity เป็น mg%			
		ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าเฉลี่ย	ความเบี่ยงเบน มาตรฐาน
Normal	386	165	40	82	23
Peptic ulcer	52	370	63	170	69
Acute pancreatitis	67	483	100	299	84
Abdominal pain	66	358	50	147	60
Appendicitis	22	336	40	170	60
Cholecystitis	15	197	50	132	43
CA stomach	14	366	40	106	75
Toxic goitre	6	146	100	118	16
Cirrhosis	7	186	100	124	23
Hepatitis	7	180	68	118	42
Renalcalculi	3	266	173	219	-

ตารางที่ 2 ผลการทดลองเปรียบเทียบโดยแต่ละวิธีในคนปกติจำนวน 40 ราย

วิธีการทดลอง	amylase activity เป็น mg%			
	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าเฉลี่ย	ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน
วิธีของ Folin-Wu	126	38	70	23
วิธีของ Somogyi	170	45	87	23
วิธีที่ทดลอง	131	40	80	22

ขอขอบคุณ

ผู้เขียนขอขอบคุณ คุณสุชาติ ศิริกุล ภาค
วิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหา
วิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาช่วยเหลือในการ
เขียนบทความนี้, ขอขอบคุณนายแพทย์ คง
สุวรรณรัตน์ นายแพทย์พิเศษผู้อำนวยการ โรง
พยาบาลเลดสิน ที่สนับสนุนการทดลอง, แพทย์
หญิงมุกดา ปิยะเกตุ, แพทย์หญิงจินดา หาส
ตะนันท์ แพทย์หัวหน้าแผนกการทดลองค้นคว้า
ที่ให้การแนะนำในการทดสอบนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 32:538, 1934.
2. J. Biol. Chem. 125:399, 1938.
3. Arch. Int. Med. 67:665, 1941.

Abstract**Determination of Serum Amylase****Yokonthorn Suwanyod, B.Sc. (Med. Tech.) ***

Because standard method for determining serum amylase including Somogyi, are very time consuming, the author tried to modify these methods to reduce the time necessary to perform the test.

The modification was base on the Somogyi method, and the specimens were treated as follows: after a 40 minutes incubation with starch substrate, the protien was precipitated with sodium tungstate and copper sulfate. The reducing sugar released was then reacted with alkaline copper and color developed with phosphomolybdic acid.

Results were compared with those of Folin-wu&Somogyi methods. In 40 normal persons, the results corresponded well (Medified method: $80^{+22}\text{mg}\%$, Somogyi: $70^{+23}\text{mg}\%$, Folin-Wu: $87^{+23}\text{mg}\%$), but unfortunately, the results did not compare well in test on abnormal specimens. However the results on the abnormal specimens, using the modified method, did correlate well with the clinical diagnosis. Thus this method may be of some value in determining Serum amylase, especially in emergency cases.

* Lerdsin Hopital, Bangkok 5