



การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดโปรตีน : ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์และค่าปกติในคนไทย

นำชัย ทิพชาติโยธิน วท.บ (เทคนิคการแพทย์)
พัทธราภรณ์ ผลวัฒน์ วท.บ (เทคนิคการแพทย์)*

บทคัดย่อ

เราทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการ และค่าปกติในการหาปริมาณโปรตีนโดยศึกษาในคนไทยจำนวน 80 ราย ผลที่ได้จากการศึกษาโดยใช้วิธี Salt Fractionation พบว่าระดับ Total protein มีค่าอยู่ระหว่าง 6.0-7.9 กรัมต่อเดซิลิตร โดยมีค่าเฉลี่ย 6.9 กรัมต่อเดซิลิตร ระดับอัลบูมินมีค่าระหว่าง 3.5-4.5 กรัมต่อเดซิลิตร ค่าเฉลี่ย 3.9 กรัมต่อเดซิลิตร และโดยวิธี Dye-binding method พบว่าระดับ Total protein มีค่าระหว่าง 5.8-7.6 กรัมต่อเดซิลิตร โดยมีค่าเฉลี่ย 6.7 กรัมต่อเดซิลิตร จากการศึกษาเปรียบเทียบทั้งสองวิธีพบว่า Total-protein ของทั้ง 2 วิธีมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนวิธีหาปริมาณอัลบูมินพบว่าวิธี Dye-binding method จะได้ค่าที่ต่ำกว่า ถูกต้องกว่าและมี specificity สูง, ใช้ sample น้อยกว่าและเวลาในการทดสอบก็น้อยกว่าวิธี salt fractionation.

บทนำ

โปรตีนในซีรัม แบ่งออกเป็นหลาย fractions (1,2,6) จะพบ fractions เหล่านี้ได้ อย่างไรขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้วิเคราะห์ และจุดประสงค์ในการวินิจฉัยโรค Total protein ตรวจวัดได้ง่าย ๆ โดยการวัดสีที่เกิดขึ้นเมื่อให้ protein ทำปฏิกิริยากับ biuret reagent การ

แยก fractions ของ proteins ที่ง่ายที่สุด ก็คือการแยกอัลบูมิน และกลีโอบบูลิน ซึ่งแต่เดิมทำได้โดยวิธี salt fractionation method คือให้ซีรัมผสมกับ salt solution ที่นิยมใช้คือ sodium sulfate, sulfate-sulfite mixture เมื่อรวมกับ ether จะทำให้กลีโอบบูลินตกตะกอนออกมาเหลือ อัลบูมินอยู่ใน solution เมื่อแยกกลีโอบบูลินออกไป แล้วหาจำนวนอัลบูมินใน

*ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

solution โดย biuret reaction^(7,9) นำค่า Total protein ที่ได้ลบด้วยจำนวนอัลบูมินที่วัดได้ ก็จะได้ค่าของกลีโอบบูลิน แต่โดยวิธีนี้ก็ไม่สามารถแยกอัลบูมิน และกลีโอบบูลินได้ complete

ในการทดลองครั้งนี้ได้หาปริมาณอัลบูมินในซีรัมโดยวิธีเดิมคือ Salt fractionation และโดยวิธี Dye-binding method ของ Doumas et al⁽⁴⁾ ที่ให้อัลบูมินในซีรัมรวมกับสี Brom-cresol green ใน buffer solution แล้ววัดสีที่เปลี่ยนไป ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนอัลบูมินที่มีอยู่

วัตถุประสงค์และวิธีการ

ตัวอย่างตรวจที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เราเก็บโลหิตจากผู้ที่มาขายโลหิตให้แก่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ ซึ่งเป็นชายไทยที่มีสุขภาพสมบูรณ์อายุประมาณ 19-35 ปี จำนวน 80 คน หลังจากปล่อยให้โลหิตแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง นำมาแยกซีรัมตัวอย่างซีรัมที่เก็บได้ หากมิได้ทำการทดลองในวันนั้น เราจะเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส) จนกว่าจะทำการทดลองครั้งต่อไป ซึ่งจะไม่เกิน 5 วัน

เราได้ทำการหาปริมาณของ Total protein, albumin และ globulin โดยวิธีต่างๆ ดังนี้

วิธีที่ 1 ใช้วิธี Salt fractionation method^(5,7) โดยแยกตะกอน globulin ออกด้วย 27.8% sulfate-sulfite mixture ร่วมกับ ether; albumin จะคงอยู่ใน solution แล้วให้ proteins ทำปฏิกิริยากับ biuret reagent (alkaline copper tartrate) วัดสีของ violet

complexes ที่เกิดขึ้นด้วย spectrophotometer Spectronic 70 (Bausch & Lomb)

วิธีที่ 2

ก. หาปริมาณ Total protein โดยวิธี Direct method⁽³⁾ ให้ protein ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ biuret reagent

ข. หาปริมาณ albumin โดย Dye-binding method^(3,4,8) ให้ albumin ในซีรัมผสมกับสารละลายของ bromocresol green (BCG) ซึ่งละลายใน 0.075 M succinate buffer pH 4.2; albumin จะรวมกับสี BCG ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายสีที่เปลี่ยนไปเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวน albumin ที่มีอยู่ในซีรัม proteins ตัวอื่น ๆ เช่น globulin จะไม่ทำปฏิกิริยานี้วัดสีที่เปลี่ยนไปใน spectronic 70 spectrophotometer ที่ความถี่คลื่น 635 nm.

การควบคุมคุณภาพของผลการทดลอง

ได้ทำการควบคุมคุณภาพของผลการทดลองโดยทำการวิเคราะห์ คอนโทรลซีรัมทุกครั้งที่ทำการทดลอง และผลการทดลองที่ได้มาทั้งหมดนี้ได้มาจากการทดลองที่มีค่า คอนโทรลซีรัมอยู่ในช่วงที่ใช้งานได้ ($\pm 5\%$)

การศึกษา % recovery ของวิธีทางสอง

จากการศึกษาเกี่ยวกับ recovery ของวิธีทางทั้งสองโดยนำ standard protein solution มาผสมกับซีรัมในปริมาณที่เท่า ๆ กัน นำเอาซีรัม และสารละลายผสมระหว่างซีรัมและ standard protein solution ไปตรวจวัดหาปริมาณ Total proteins และ albumin ด้วย

วิธีการทั้งสองแบบนำผลที่ได้มาคำนวณหา % recovery

ผลการทดลอง

ปริมาณของ Total protein, albumin และ globulin ในซีรัมของคนไทยเพศชาย จากการวิเคราะห์ โดยวิธีการทั้งสองได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 สำหรับผลของการศึกษาที่เกี่ยวกับ Linearity ของ standard curve ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1,2 นั้น แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance และความเข้มข้นของจำนวน Total protein, albumin เป็นเส้นตรงจนถึงความเข้มข้น 8 กรัมต่อเดซิลิตร ของ Total protein และ 5 กรัมต่อเดซิลิตร ของ albumin สำหรับผลการศึกษาที่เกี่ยวกับ % recovery แสดงไว้ในตารางที่ 2 ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับ maximum time และ effect ของอุณหภูมิที่มี

ต่อ Color development ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3-4 ส่วนรูปที่ 3-4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง color complexes กับ absorbance

บทวิจารณ์

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเวลาที่จำเป็นสำหรับการเกิดสีที่มีค่า maximum absorption นั้นในกรณีของ Biuret reaction ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ระหว่าง 15-38°C นั้นใช้เวลา 20 นาที ส่วนในกรณีของ Bromocresol green reaction นั้นจะใช้เวลา 15 นาที การที่พบเช่นนี้ เราจึงใช้เป็นหลักในการทำการศึกษาขั้นต่อไป การตรวจหาค่า maximum wavelength นั้นเราแสดงไว้ในรูปที่ 3 และ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเราควรใช้ maximum wavelength 635 nm. สำหรับตรวจวัด albumin-bromocresol green complexes และ 540-

ตารางที่ 1 ค่า Total protein, albumin ไทยวิธี Salt-fractionation และ Dye-binding (กรัมต่อเดซิลิตร)

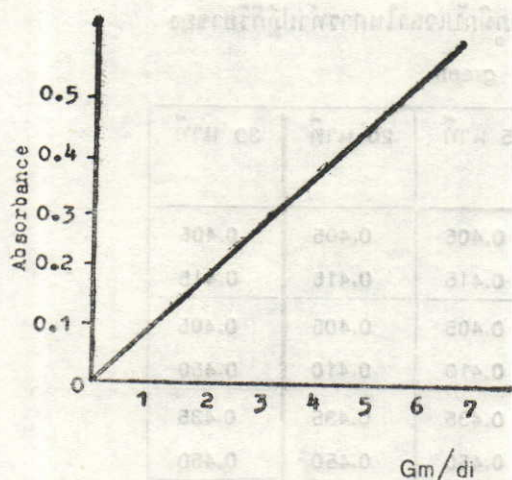
Methods		Number	Mean	Range	SD.
Salt-fractionation	Total protein	80	6.9	6.0-7.9	0.48
	albumin	80	3.9	3.5-4.5	0.25
Dye-binding Method (BCG)	Total protein	80	6.7	5.8-7.6	0.45
	albumin	80	4.5	3.9-5.0	0.28

ตารางที่ 2 แสดง % recovery ของ Total protein, albumin โดย Salt - fractionation และ Dye - binding method

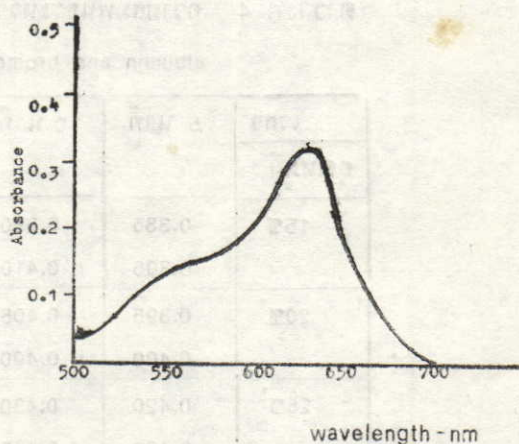
Number	Salt - fractionation method		Dye - binding method	
	Total protein % recovery	albumin % recovery	Total protein % recovery	albumin (BCG) % recovery
1.	88.65	79.10	100.70	120.00
2.	89.60	80.98	96.57	101.20
3.	93.94	79.10	98.30	101.20
4.	88.75	80.98	100.20	99.10
5.	90.25	81.10	96.57	120.00
Mean	90.3	80.2	98.5	101.0

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับเวลาในการทำปฏิกิริยาของ Biuret-protein

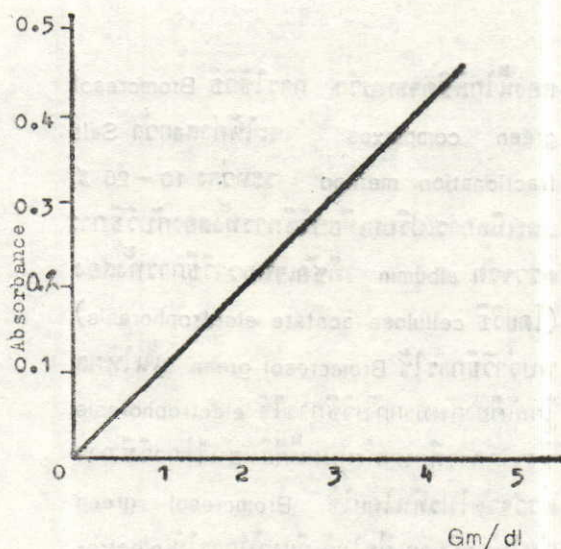
เวลา	5 นาที	10 นาที	15 นาที	20 นาที	25 นาที	30 นาที
อุณหภูมิ						
15 °C	0.315 0.320	0.330 0.330	0.330 0.330	0.340 0.340	0.340 0.340	0.340 0.340
20 °C	0.320 0.320	0.330 0.330	0.330 0.330	0.345 0.350	0.345 0.350	0.350 0.350
25 °C	0.340 0.340	0.350 0.350	0.350 0.350	0.360 0.355	0.355 0.360	0.360 0.360
28 °C	0.345 0.345	0.355 0.360	0.355 0.360	0.360 0.360	0.360 0.360	0.360 0.370
30 °C	0.350 0.360	0.365 0.375	0.365 0.375	0.375 0.385	0.375 0.385	0.365 0.390
34 °C	0.360 0.360	0.370 0.370	0.370 0.380	0.380 0.375	0.380 0.385	0.380 0.385
38 °C	0.380 0.380	0.390 0.390	0.395 0.395	0.395 0.395	0.400 0.400	0.400 0.400



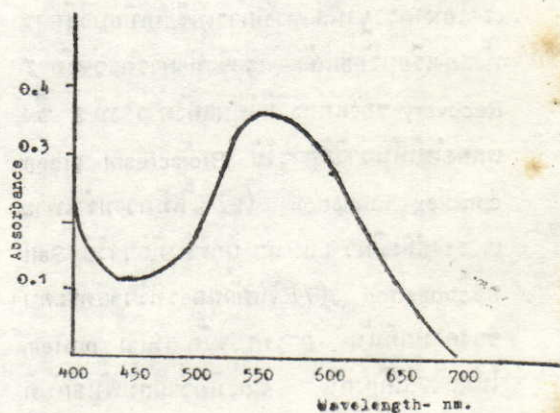
รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance และความเข้มข้นของโปรตีนในวิธี Dye-binding



รูปที่ 3 Absorption curve ของ albumin-BCG complexes



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance และความเข้มข้นของโปรตีนในวิธี Salt fractionation



รูปที่ 4 Absorption curve ของ protein-biuret complexes

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับเวลาในการทำปฏิกิริยาของ
albumin and bromcresol green

เวลา	5 นาที	10 นาที	15 นาที	20 นาที	30 นาที
อุณหภูมิ					
15°	0.385	0.390	0.405	0.405	0.405
	0.395	0.410	0.415	0.415	0.415
20°	0.395	0.405	0.405	0.405	0.405
	0.400	0.400	0.410	0.410	0.450
25°	0.420	0.430	0.435	0.435	0.435
	0.430	0.445	0.450	0.450	0.450
30°	0.440	0.445	0.445	0.450	0.450
	0.440	0.445	0.450	0.450	0.450
35°	0.455	0.465	0.465	0.465	0.465
	0.465	0.475	0.475	0.475	0.475
38°	0.450	0.400	0.460	0.460	0.440
	0.460	0.470	0.475	0.475	0.475

555 nm. สำหรับตรวจวัด total protein เมื่อเราได้มาตรฐานสำหรับการเปรียบเทียบวิธีการทั้งสองเรียบร้อยแล้ว เราจึงทำการตรวจวัด % Recovery ของแต่ละวิธีได้ผลดังตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการใช้ Bromcresol green complex formation (2) นั้นมีความจำเพาะเจาะจงและมีความแม่นยำ ถูกต้องกว่าวิธี Salt fractionation (7) ในด้านการตรวจวัดระดับของค่าปกตินั้น การตรวจวัด Total protein ให้ผลใกล้เคียงกัน และมีความสัมพันธ์กันมาก ($r = 0.77, p < 0.005$) ส่วนค่า albumin นั้นก็ไม่ได้มีความแตกต่างกันมากนักเช่นกัน (ตารางที่ 1) และเมื่อมีการศึกษาเปรียบเทียบกันระหว่างวิธีการหา albumin ทั้ง

สองนี้ใกล้ๆกันจะพบว่า การใช้วิธี Bromcresol green complexes จะให้ค่าสูงกว่า Salt fractionation method ระหว่าง 10–20 % และเมื่อการเปรียบเทียบวิธีการทั้งสองกับวิธีการตรวจวัด albumin ที่ชัดเจนกว่าวิธีการทั้งสอง (โดยวิธี cellulose acetate electrophoresis) พบว่าวิธีการใช้ Bromcresol green นั้นให้ผลใกล้เคียงกันมากกับวิธีการใช้ electrophoresis. ซึ่งจากการศึกษาทั้งหมดนี้ก็ยืนยันได้ว่าวิธีการตรวจวัดโปรตีนโดยใช้ Bromcresol green นั้นให้ผลดีมาก คือใกล้เคียงกับการใช้ electrophoresis ซึ่งราคาแพงกว่าและยุ่งยากทั้งที่เราอาจสรุปได้จากการที่เราพบว่า recovery อยู่ในช่วง 100–102% ดีกว่าวิธี Salt fractiona-

tion ซึ่งมี Recovery เพียง 79-81 % เท่านั้น

วิธีการตรวจหาโปรตีนโดยอาศัย Brom-
cresol green จึงน่าจะเป็นวิธีแนะนำให้ใช้
กันโดยทั่ว ๆ ไป

REFERENCES

1. Arnow, L.E. : Introduction of Physio-
loical and Pathological Chemistry, 9th
edition, the C.U. Mosby Company,
P 291, 1974.
2. Bauer, D.J., Ackermann, G.P., Tiri,
G. : Clinical Laboratory Methods,
8th edition, the C.V. Mosby Company,
401 - 404, 1974,
3. Braken, I.S., Klotz, I.M. : A Simple
method for the rapid determination
of serum albumin. Am. J. Clin Path
23 : 1055, 1953.
4. Doumas, B.T., Watson, W.A., and
Biffs, H.G. : Clin. Chem Acta 23 :
87, 1971.
5. Henry, R.J., Cannon, D.C., and
Winkelman, J.W. : Clinical Chemistry
Principles and Technics, 1974.
6. Harper, H.A. : Review of Physiological
Chemistry, Lange Medical Publication
1976.
7. Reinhold, G.J. : Standard of Clinical
Chemistry by the Academic Press
Inc. N.Y., volume 1, 90-91, 1953.
8. Rodkey, F.L. : Clin. Chem. 11 :
478, 1965.
9. Weichselbaum, T.E. : Am. J. Clin.
Pathol. 7 : 40, 1946.

SUMMARY OF THE PRECEDING ARTICLE

**A COMPARISON OF TWO METHODS FOR PROTEINS
DETERMINATION: SPECIFICITY OF METHODS AND
NORMAL VALUES IN THAI SUBJECTS.**

Namchai Tipchatyothin B.S. (Med. Tech)

Patraporn Polwatana B.S. (Med. Tech.), C (ASCP).*

A comparison of two methods for proteins determinations had been studies. Normal values of various proteins determined in healthy Thai subjects had been reported. These values were 0.6-7.9 g/dl at a mean value of 6.9 g/dl for total protein and 3.5-4.5 g/dl at a mean value of 3.9 g/dl for albumin values using salt fractionation method

(7). By using direct method (2) the results were 5.3-7.6 g/dl at mean of 6.7 g/dl for total protein and 3.9-5.0 g/dl at a mean of 4.5 g/dl for albumin. The albumin determination by the dye-binding method showed a better results and superiority over the salt fractionation method in its specificity, accuracy precision and time.

* Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.