การหาค่าโปรตีนในน้ำไขสันหลังโดยวิธีใช้สีปองโซ เอส เปรียบเทียบกับวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค

วารุณี เกียรติตุริยกุล วท.ม., SC (ASCP)*
พจนีย์ โกมลภิศ พ.บ., ป.ช.ส. (กุมาร)**
กฤษณา จำเรืองศรี B.S., MT (ASCP)*

บทคัดย่อ

การหาโปรตีนในน้ำไขสันหลัง โดยวิธีใช้สีปองโซ เอส(Ponceau S Dye Binding Method) จะให้ค่าสูงกว่า และมีความแตกต่างจากวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค (TCA Turbidimetric method) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อคำนวณโดยให้วิธีไตรคลอโรอะซิติคแอซิค ลบด้วยวิธีใช้สีปองโซ เอส โดยมี mean deviation เท่ากับ 16.56, standard deviation of difference เท่ากับ 36.539, variance ของค่าเฉลี่ยความแตกต่าง เท่ากับ 3.654, ค่า t test เท่ากับ 4.532, ค่าp<0.001 (เมื่อจำนวนการทดสอบเท่ากับ 100) แต่เนื่องจากวิธีใช้สีปองโซ เอส มีความสัมพันธ์กันดีกับวิธี Kjedahl ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค ที่ใช้หาปริมาณโปรตีนในน้ำไขสันหลังอยู่ขณะนี้ เป็นวิธีที่ให้ผลเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ การหาโปรตีนในน้ำไขสันหลังโดยวิธีใช้สีปองโซ เอส ใช้ปริมาณสิ่งส่งตรวจเพียง 0.05 มิลลิลิตร แต่วิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค ใช้ปริมาณสิ่งส่งตรวจ 1.00 มิลลิลิตร ดังนั้นวิธีใช้สีปองโซ เอส จึงเป็นวิธีที่ดีกว่า ใช้ปริมาณสิ่งส่งตรวจน้อยกว่า เหมาะสำหรับการหาปริมาณโปรตีนในน้ำไขสันหลัง

บทนำ

การหาปริมาณโปรตีนรวมในน้ำไขสันหลัง โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีตกตะกอนโปรตีน โดยไตรคลอโรอะซิติค แอซิค หรือซัลโฟซาลิไซลิค แอซิค ซึ่งทั้งสองวิธีนี้จะได้ค่าเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิ[1] เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ความขุ่นจะเพิ่มขึ้น ในวิธีของซัลโฟซาลิไซลิค แอซิค แอลบูมิน จะทำให้ความขุ่นเพิ่มมากกว่ากลอบูลินเมื่อเทียบน้ำหนักเท่ากัน[2] สำหรับวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค กลอบูลินจะทำให้ความขุ่นเพิ่มมากกว่าแอลบูมิน เมื่อเทียบน้ำหนักเท่ากัน[7] นอกจากนี้การหาปริมาณโปรตีนรวมโดยวิธีของ Lowry แม้ว่าจะมีความไวในการหาปริมาณโปรตีนมากกว่าวิธี Biuret

---

* ภาควิชาเคมีคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Bull Chiang Mai AMS
Vol 16, No 2, May 1983.

จ. เติมน้ำยาโซเดียม ไฮดรอกไซด์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วที่มีตะกอนสีแดงทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน

ฉ. อ่านความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 560 นาโนเมตร สีที่เกิดขึ้นนี้จะคงที่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง คำนวณผลที่ได้โดยใช้สมการของแลมเบิร์ท-เบียร์ (Lambert - Beer Equation)

หมายเหตุ

ควรทำการทดสอบซ้ำเมื่อได้ค่าโปรตีนรวมต่ำไปหรือสูงเกินไป ดังนี้ คือ

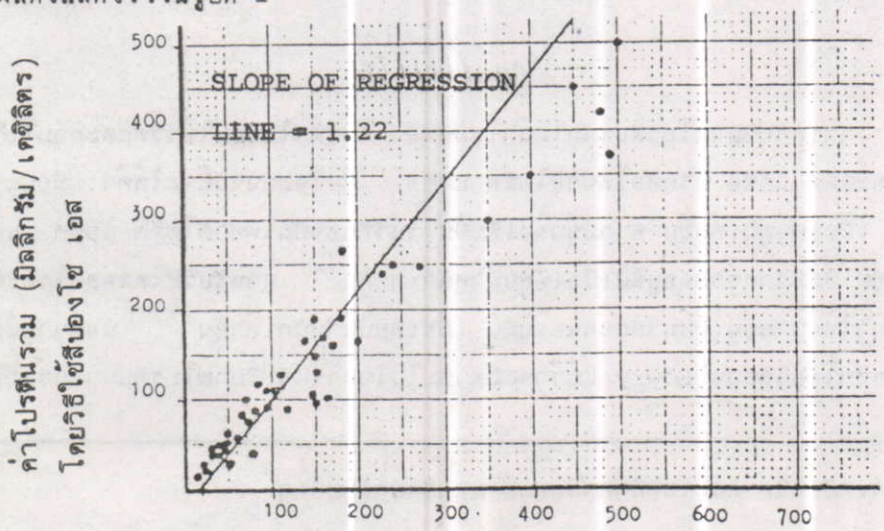
(1) ถ้าสิ่งส่งตรวจมีความเข้มข้นของโปรตีนต่ำกว่า 10 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ให้ทำซ้ำโดยใช้สิ่งส่งตรวจจำนวน 500 ไมโครลิตร เติมน้ำยาไตรคลอโรอะซิติค - ปองโซ เอส ชนิดเข้มข้น จำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วทำต่อจากข้อ ง. ถึงข้อ ฉ.

(2) ถ้าสิ่งส่งตรวจมีความเข้มข้นสูงกว่า 100 มิลลิกรัม/เดซิลิตร แต่ไม่เกิน 300 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ให้ทำซ้ำโดยทำให้เจือจางเป็น 2 เท่า

(3) ถ้าสิ่งส่งตรวจมีความเข้มข้นสูงกว่า 300 มิลลิกรัม/เดซิลิตร แต่ไม่เกิน 1000 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ให้ทำซ้ำโดยทำให้เจือจางเป็น 10 เท่า

ผลการทดลอง

การศึกษาค่าโปรตีนรวมโดยวิธีใช้สีปองโซ เอส เปรียบเทียบกับวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิด ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 1



ค่าโปรตีนรวม (มิลลิกรัม/เดซิลิตร) โดยวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิด

รูปที่ 1 เปรียบเทียบค่าโปรตีนรวมโดยวิธีใช้สีปองโซ เอส กับวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิด จำนวนสิ่งส่งตรวจ เท่ากับ 100 ราย

แต่ไม่จำเพาะ เนื่องจากน้ำไขสันหลังมีสารที่ไม่ใช่โปรตีนซึ่งทำให้เกิดสีได้ (4)

สำหรับการหาโปรตีนรวมในน้ำไขสันหลัง โดยวิธีใช้สีปองโซ เอส ทำโดยตกตะกอนโปรตีน และสีปองโซ เอส ด้วยไตรคลอโรอะซิติค, แอซิค แล้วละลายตะกอนนี้ในน้ำยาต่างอย่างอ่อน วัดสีแดงของปองโซ เอส ที่ 560 นาโนเมตร (3)

วัสดุและวิธีการ

1. น้ำยาสำหรับการหาปริมาณโปรตีนรวมโดยวิธีใช้สีปองโซ เอส

ก. น้ำยาปองโซ เอส ละลายสีปองโซ เอส (Aldrich Chemical Co., Cedar Knoll, N.J.) จำนวน 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ข. น้ำยาไตรคลอโรอะซิติค - ปองโซ เอส ชนิดเข้มข้น : ผสมน้ำยาปองโซ เอส จำนวน 20 มิลลิลิตร กับน้ำยาไตรคลอโรอะซิติค แอซิค ชนิด 300 กรัม/ลิตร จำนวน 980 มิลลิลิตร น้ำยานี้สามารถเก็บไว้ใช้ได้หลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง

ค. น้ำยาไตรคลอโรอะซิติค - ปองโซ เอส ชนิดเจือจาง : ผสมน้ำยาไตรคลอโรอะซิติค - ปองโซ เอส ชนิดเข้มข้น จำนวน 100 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นจำนวน 900 มิลลิลิตร น้ำยานี้สามารถเก็บไว้ใช้ได้หลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง

ง. น้ำยาโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 8.0 กรัม/ลิตร

จ. น้ำยาโปรตีนมาตรฐานชนิดเข้มข้น : ใช้ซีรั่มที่ทราบค่าโปรตีนรวมแน่นอน 7.1 กรัม/เดซิลิตร

ฉ. น้ำยาโปรตีนมาตรฐานชนิดเจือจาง : เตรียมโดยใช้น้ำยาโปรตีนมาตรฐานชนิดเข้มข้น นำมาเจือจางให้ได้ 40, 80, 120, 160 และ 200 มิลลิกรัม/เดซิลิตร

วิธีทำ

ก. เตรียมหลอดแก้วสำหรับโปรตีนมาตรฐาน คือ หลอด S_{40}, S_{80}, S_{120}, S_{160}, S_{200} สิ่งส่งตรวจ คือ หลอด U, ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ คือ หลอด C และ Blank คือ หลอด B

ข. ไปเปตน้ำยาโปรตีนมาตรฐานชนิดเจือจาง สิ่งส่งตรวจ และน้ำกลั่น จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ตามลำดับ

ค. เติมน้ำยาไตรคลอโรอะซิติค - ปองโซ เอส ชนิดเจือจาง จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันดี

ง. นำหลอดทั้งหมดมาปั่นที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดน้ำใสส่วนบนออกโดยใช้ปาสเจอร์ไปเปต ส่วนล่างจะเป็นตะกอนสีแดง

บทวิจารณ์

จากการหาโปรตีนรวมโดยวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค เปรียบเทียบค่าที่ได้กับวิธีใช้สีปองโซ เอส (รูปที่ 1) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติได้ค่าดังนี้

Correlation coefficient = 0.98

Linear regression equation y = -20.05 + 1.22 X

เมื่อนำข้อมูลทั้ง 2 วิธี วิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ[8] โดยให้ค่าโปรตีนรวมโดยวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค ลบด้วยค่าโปรตีนรวมโดยวิธีใช้สีปองโซ เอส ได้ค่าดังนี้

ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของวิธีทั้งสอง (mean deviation) = 16.56

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของวิธีทั้งสอง (Standard deviation of difference) = 36.539

Variance ของค่าเฉลี่ยความแตกต่าง 3.654

t test = 4.532 ดังนั้นการหา Probability โดยใช้ค่า Degree of Freedom = 99 พบว่า t อยู่ต่ำกว่า 0.001 ดังนั้น p = <0.001 ซึ่งแสดงว่าการหาโปรตีนรวมทั้ง 2 วิธี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างนี้ วิธีใช้สีปองโซ เอส จะให้ค่าสูงกว่า และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค แต่มีรายงานว่าการวิเคราะห์หาโปรตีนรวมโดยวิธี ใช้สีปองโซ เอส กับวิธี Kjeldahl มีความสัมพันธ์กันดี[3] ในการหาโปรตีนรวมโดยวิธีใช้สีปองโซ เอส พบว่าถึงแม้จะมีสารที่สามารถจับกับแอลบูมินได้ ก็ไม่รบกวน การที่ปองโซ เอส จะจับกับโปรตีนรวม[3] แต่วิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค, กลอบูลินจะทำให้ความขุ่นเพิ่มมากกว่าแอลบูมินเมื่อเทียบน้ำหนักเท่ากัน[7] และค่าที่ได้จะเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิ[1] สำหรับปริมาณสิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการทดสอบวิธีปองโซ เอส ใช้ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร แต่วิธีไตรคลอโรอะซิติค แอซิค ใช้ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ดังนั้นการหาปริมาณโปรตีนในน้ำไขสันหลังโดยวิธีใช้สีปองโซ เอส จึงเป็นวิธีที่ดีกว่าวิธีไตรคลอโรอะซิติคที่ใช้กันมา

เอกสารอ้างอิง

1. Schriever, H., and Gambine, S.R., Protein turbidity produced by trichloroacetic acid and sulfesalicylic acid at varying temperature and varying ratios of albumin and globulin. Amer. J. Clin. Pathol. 44 : 667, 1965.

2. Meulemans, O., Determination of total protein in spinal fluid with sulfosalicylic acid and trichloroacetic acid, Clin. Chem. Acta 5 : 757, 1960.

3. Pesce, A.M., Strande, S.C., A new micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine, Clin. Chem. 19 (11):1265-1267, 1973.

4. Zondog, H.A., and Van Boetzelaer, G.E., Determination of protein in cerebrospinal fluid-sources of error in the Lowry method. Clin. Chem. Acta. 5 : 155, 1960.

5. Bauer, D.J., Ackermann, G.P., Toro, G. : Clinical Laboratory methods. Ed. 2, Mosby, Saint Louis, p. 606, 1974.

6. Wolf, P.L. : Methods and Techniques in Clinical Chemistry. Wiley - Intersciences, N.Y. p. 296 - 297, 1972.

7. Davidsohn, I., Henry B.J., Clinical Diagnosis, Ed. 15, W.B. Saunders, Philadelphia, p. 1962, 1974.

8. วีกูล วีรานุวัตติ์, กนกนาถ ชูปัญญา, เคมีคลินิค, โครงการตำรา - ศิริราช, หน้า 75-82, 2520.

Bull Chiang Mai AMS

Vol 16, No 2, May 1983.

A B S T R A C T

COMPARISON OF PONCEAU S DYE BINDING METHOD WITH TCA TURBIDIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF PROTEIN IN CEREBROSPINAL FLUID

Varunee Kietduriyakul M.Sc. SC (ASCP)*
Podjanee Komolpij M.D.**
Krisana Chumroengsri B.S., MT (ASCP)*

Statistical analysis of the paired data (TCA turbidimetric method minus Ponceau S dye binding method) gave a mean deviation of 36.539, yielding at value of 4.532 (n = 100) which shows that the bias between methods is statistically significant. Judged from the paired difference analysis, the Ponceau S dye binding method gives values that are higher and statistically difference from the TCA turbidimetric method. But the good correlation of the Ponceau S dye binding method and Kjedhal method has been proved before, Because the inconsistency value of the trichloroacetic acid method which increase when temperature increase, Specimen for Ponceau S dye binding method is 50 µl instead of 1000 µl, using for the TCA turbidimetric method. So, the Panceau S dye binding method is the better method for determination fo protein in cerebrospinal fluid.

---

* Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University.

** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Mahidol University.