

การเปรียบเทียบน้ำยาที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้กับเครื่องมือวิเคราะห์กลูโคส

สุตารัตน์	มโนเชียวพินิจ	Ph.D. *
จำรัส	ทรัพย์สมานวงศ์	วท.ม. *
กุลนารี	สิริสาลิ	วท.ม. *
สมชาย	มหัตถนิรันดร์กุล	วท.บ. *
วิชัย	วลัยพัชรา	วท.บ.

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบน้ำยาสำหรับใช้แทน Certified glucose oxidase reagent ของ Beckman ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยเครื่อง Beckman "Glucose Analyzer" และพบว่าน้ำยาของ Fischl มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยเครื่องดังกล่าว คือ สามารถจะใช้ได้คือน้อยกว่า 62 วัน โดยที่ผลการวัดปริมาณกลูโคส ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างวันแรกและวันที่ 62 ของการทดลอง และมี relative accuracy ระหว่าง 90 - 107 %

บทนำ

โดยทั่วไปการวัดปริมาณกลูโคสด้วยเครื่องมือวิเคราะห์กลูโคส มักจะใช้น้ำยาที่เตรียมไว้สำหรับใช้กับเครื่องนั้น ๆ โดยเฉพาะตัวอย่างเช่น Beckman "Glucose Analyzer" จะมีน้ำยา Certified Glucose Oxidase ซึ่งผลิตโดยบริษัท Beckman จำกัด น้ำยาเหล่านี้โดยมากจะมีราคาค่อนข้างสูงและมีปัญหาเกี่ยวกับการขนส่งจากต่างประเทศ ทำให้ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคที่มีเครื่อง Beckman "Glucose Analyzer" บางแห่งต้องประสบกับปัญหาการขาดน้ำยา ซึ่งอาจจะเนื่องจากต้องรอการขนส่งจากต่างประเทศหรือขาดแคลนงบประมาณในการซื้อน้ำยา จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาออกซิเดส โดยการเตรียมน้ำยาตามวิธีการต่าง ๆ เพื่อที่จะหาวิธีการเตรียมน้ำยาที่เหมาะสมสำหรับการวัดปริมาณกลูโคสด้วย "Glucose Analyzer" นี้

ในปี ค.ศ. 1975 Fischl และคณะ⁽¹⁾ ได้ทดลองเตรียมน้ำยา สำหรับใช้กับ Beckman "Glucose Analyzer" ต่อมา Bajema⁽²⁾ และ Kadish⁽³⁾ ก็ได้เตรียมน้ำยาขึ้นใช้เช่นเดียวกัน ซึ่งน้ำยาแต่ละชนิดมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน จึงต้องการจะศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาทั้ง ชนิดนี้ เพื่อนำเสนอน้ำยาที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานในห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคทั่วไป

* ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ - เครื่องมือวิเคราะห์กลูโคส : Beckman "Glucose Analyzer" model ERA 2002, Beckman Instrument, U.S.A.

- สารตัวอย่าง : ใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพของ America Dade, Ortho Diagnostic และ General Diagnostic รวมทั้งใช้ซีรัมเก็บรวบรวม ที่เตรียมขึ้นเอง

วิธีการ เตรียมน้ำยากลูโคสออกซิเตส ตามวิธีของ Fischl⁽¹⁾, วิธีของ Bajema⁽²⁾ และวิธีของ Kadish⁽³⁾ และทำการหากิจกรรมของกลูโคสออกซิเตส ในน้ำยาดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด พบว่าน้ำยาของ Kadish มีกิจกรรมของกลูโคสออกซิเตสลดลงไปมากกว่า 40 % ภายในเวลา 2 วัน ซึ่งไม่เหมาะสำหรับที่จะนำมาใช้กับเครื่อง Glucose Analyzer จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างน้ำยาของ Fischl และน้ำยาของ Bajema เท่านั้น โดยทำการทดลองดังนี้

1. ทดสอบความถูกต้องของการวัดปริมาณกลูโคส โดยการหา % recovery และ % expectation ซึ่งการหา % recovery ทำโดยการเติมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 50, 100, 200, 300 และ 400 mg/dl ลงในสารตัวอย่าง และทำการวัดหาปริมาณกลูโคส เพื่อนำมาคำนวณหา % recovery ส่วนการหา % expectation ทำทั้งวิธีการผสมสาร กล่าวคือใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของกลูโคสต่าง ๆ กัน 3 ระดับมาผสมกันอย่างอนุกรมในอัตราส่วนที่เท่า ๆ กัน และทำการวัดหาปริมาณกลูโคส เพื่อคำนวณหา % expectation และทำด้วยวิธีการเจือจาง โดยนำสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง มาทำการเจือจางเป็นอนุกรม จากนั้นวัดปริมาณกลูโคส และนำมาคำนวณหา % expectation

2. ทดสอบความแม่นยำภายในการทดลองและระหว่างการทดลอง

3. ทดสอบความคงสภาพของน้ำยาทั้ง 2 ชนิด โดยเก็บน้ำยาที่เตรียมเสร็จแล้วไว้ในตู้เย็น และแบ่งออกมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง โดยทำการหากิจกรรมของกลูโคสออกซิเตสในน้ำยา และใช้น้ำยานั้นในการวัดปริมาณกลูโคสในตัวอย่างที่เตรียมไว้ การวัดปริมาณกลูโคสทุกครั้งจะใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ เป็นวัสดุควบคุมคุณภาพ เพื่อควบคุมคุณภาพผลการทดลองด้วย

ผลการทดลอง

จากการทดสอบความถูกต้อง โดยการหา % recovery และ % expectation พบว่าการวัดปริมาณกลูโคสด้วยเครื่อง Beckman "Glucose Analyzer" มี % recovery

เฉลี่ย 103.8 และมี % expectation ด้วยวิธีการผสมสารของซีรัม เก็บรวบรวมและตัวอย่างควบคุมคุณภาพ โดยเฉลี่ย 110.6 และ 91.4 ตามลำดับ สำหรับ % expectation ด้วยวิธีการเจือจางซีรัมเก็บรวบรวมและตัวอย่างควบคุมคุณภาพ โดยเฉลี่ย 97.1 และ 109.6 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบ accuracy ในการวัดปริมาณ glucose ด้วยเครื่อง Beckman "Glucose Analyzer" โดยใช้ Fischl's reagent

ชนิดการทดสอบ accuracy		n	$\bar{x}$	S.D.	CV %
%recovery		5	103.8	3.1	2.9
%expectation	pooled serum	3	110.6	4.3	3.9
ชนิด					
mixing technique	lyophilized serum	3	91.4	1.0	1.1
%expectation	pooled serum	3	97.1	6.0	6.1
ชนิด					
dilution technique	lyophilized serum	4	109.6	8.4	7.6

ผลการทดสอบความแม่นยำภายในการทดลองและระหว่างการทดลองพบว่าในตัวอย่างที่มีปริมาณกลูโคสต่ำกว่าปกติ, ปกติ และสูงกว่าปกติ มีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนระหว่าง 2.8% - 3.4 % และ 3.2 % - 4.6 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการศึกษาความคงสภาพของน้ำยาของ Fischl และ Bajema จากการศึกษาคุณภาพของน้ำยาทั้งสองชนิดดังกล่าวมาแล้ว พบว่าน้ำยาของ Fischl สามารถใช้งานได้ถึง 62 วัน ส่วนน้ำยาของ Bajema ใช้ได้เพียง 42 วัน ดังแสดงในตารางที่ 3 และตารางที่ 4

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบ precision ในการวัดปริมาณ glucose โดยใช้

Fischl's reagent

การทดสอบ precision	within-run assay			between-run assay		
	A	B	C	A	B	C
n	10	10	10	20	20	20
$\bar{x}$ (mg/dl)	58.3	113.0	392.2	53.9	95.0	385.6
SD (mg/dl)	1.7	3.9	10.9	2.5	3.6	12.5
CV (%)	2.9	3.4	2.8	4.6	3.8	3.2

A = ตัวอย่างที่มี glucose อยู่ในระดับต่ำกว่าปกติ

B = ตัวอย่างที่มี glucose อยู่ในระดับปกติ

C = ตัวอย่างที่มี glucose อยู่ในระดับสูงกว่าปกติ

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ glucose ใน commercial lyophilized serum ของน้ำยา Fischl ตลอดระยะเวลา 62 วัน

Days	Versatol(#)		Ortho (\$)	
	$\bar{x}(\text{mg/dl}) *$	S.D.	$\bar{x}(\text{mg/ml}) *$	S.D.
1	217.0	5.3	92.3	4.5
7	201.2	2.6	85.5	3.8
13	202.8	2.2	87.0	1.2
23	196.8	1.2	84.5	1.7
27	207.3	5.1	88.8	2.2
42	207.5	0.8	87.5	1.6
49	209.3	2.1	88.0	1.4
62	208.8	1.9	89.5	2.3

glucose = 203 mg/dl

\$ glucose = 87+9 mg/dl

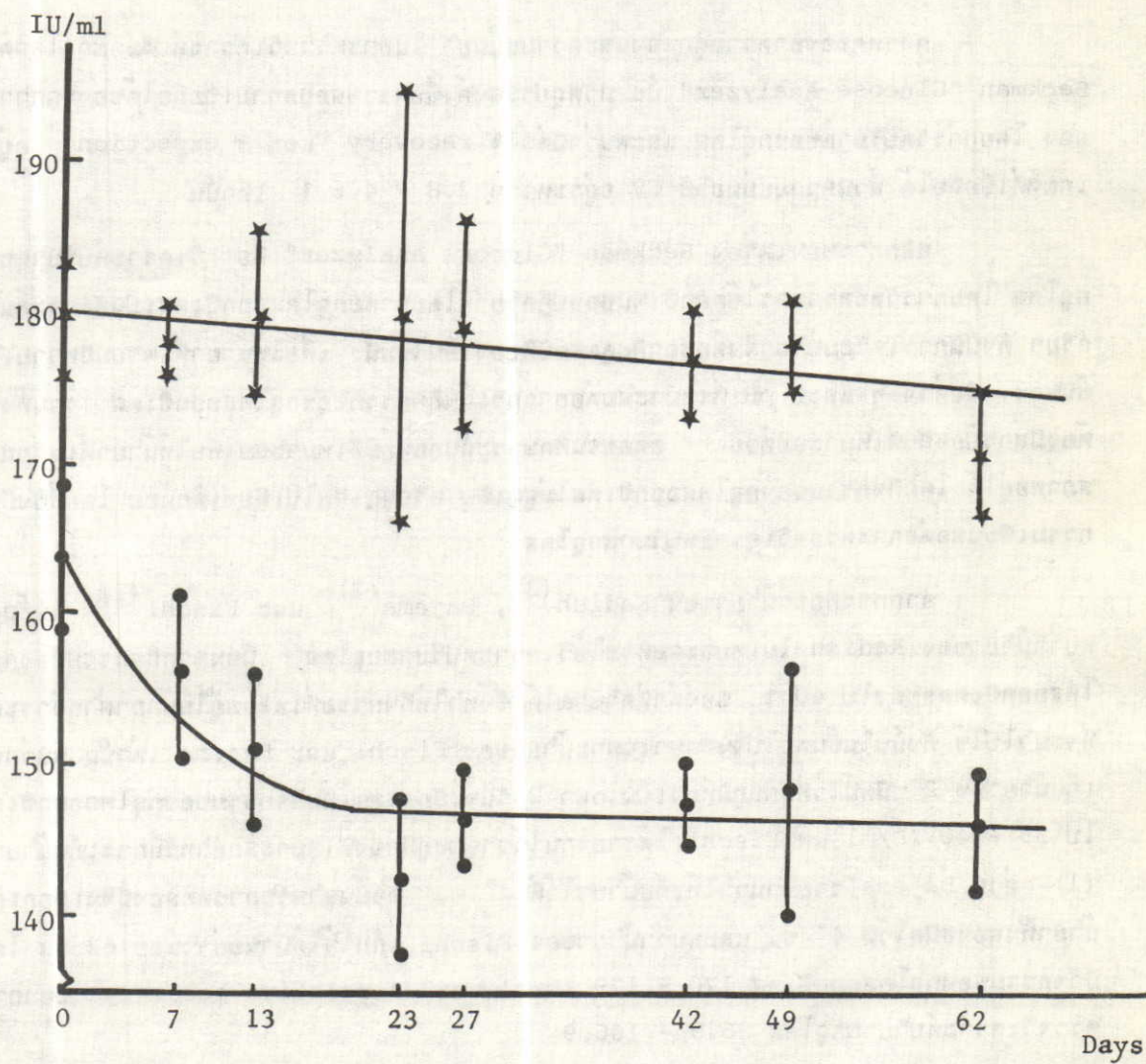
* n = 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ glucose ใน commercial lyophilized serum ของน้ำยา Bajema ตลอดระยะเวลา 42 วัน

Days	Versatol		Ortho	
	$\bar{x}(\text{mg/ml})^*$	S.D.	$\bar{x}(\text{mg/ml})^*$	S.D.
1	209.8	11.1	82.8	1.1
8	202.8	3.7	84.5	3.6
13	194.3	2.0	82.5	1.7
23	-	-	-	-
27	182.8	2.8	78.5	2.4
42	197.0	3.7	84.8	3.3

* n = 4

ผลการศึกษาความคงสภาพของกลูโคสออกซิเดส ในน้ำยาของ Fischl และ Bajema พบว่า กิจกรรมของกลูโคสออกซิเดส ในน้ำยาของ Fischl ลดลงช้า ๆ ด้วยอัตราที่ค่อนข้างคงที่ โดยมีกิจกรรมอยู่ระหว่าง 170 - 179 IU/ml ในขณะที่กิจกรรมของกลูโคสออกซิเดส ในน้ำยาของ Bajema ลดลงอย่างรวดเร็วใน 20 วันแรก หลังจากนั้นจึงลดลงช้า ๆ โดยมีกิจกรรมระหว่าง 146 - 163 IU/ml ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดง activity ของ glucose oxidase ในน้ำยาของ Fischl (*) และ Bajema (●)

วิจารณ์

การทดลองหาความถูกต้องและความแม่นยำ ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วย Beckman "Glucose Analyzer" นั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความเชื่อถือได้ของผลการทดลอง โดยการวัดปริมาณของกลูโคส และพบว่ามีความ % recovery และ % expectation อยู่ในเกณฑ์ที่เชื่อถือได้ ส่วนความแม่นยำมี CV อยู่ระหว่าง 2.8 - 4.6 % เท่านั้น

หลักการของเครื่อง Beckman "Glucose Analyzer" คือ วิเคราะห์ปริมาณของกลูโคส โดยการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของปฏิกิริยา โดยอาศัยกลูโคสออกซิเดสเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา ดังนั้นการเตรียมน้ำยาจึงต้องอาศัยคุณสมบัติของเอ็นไซม์นี้ เพื่อให้ น้ำยาที่เตรียมมีความเข้มข้นของเกลือต่าง ๆ และมี pH ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นกิจกรรมของกลูโคสออกซิเดส รวมทั้งจะต้องมีสารป้องกันที่เหมาะสมด้วย ตลอดจนศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ น้ำยาที่เตรียมคงสภาพอยู่ได้ โดยกิจกรรมของกลูโคสออกซิเดสไม่สูญเสีย หรือสูญเสียไปเพียงเล็กน้อย โดยที่ยังมีกิจกรรมเพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

จากการศึกษาน้ำยาของ Kadish⁽³⁾, Bajema⁽²⁾ และ Fischl⁽¹⁾ ในขั้นต้นพบว่า น้ำยาของ Kadish ไม่เหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์ปริมาณกลูโคส เนื่องจากกิจกรรมของกลูโคสออกซิเดสลดลงไป 40 % ของค่าที่คำนวณได้ ซึ่งทำให้กิจกรรมที่เหลืออยู่ในน้ำยาต่ำกว่าระดับที่จะนำไปใช้ ดังนั้นในขั้นต่อไปจึงศึกษาเฉพาะน้ำยาของ Fischl และ Bajema เท่านั้น พบว่าถ้าเก็บน้ำยาทั้ง 2 ชนิดนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วันจะมีการสูญเสียกิจกรรมของกลูโคสออกซิเดสไป 35 - 40 IU/ml แต่ Fischl ได้รายงานไว้ว่าอุณหภูมิห้องที่เหมาะสมสำหรับการเก็บน้ำยา-

(1) ส่วน Bajema รายงานว่าให้เก็บน้ำยาไว้ที่ 4° ซ. ดังนั้นสำหรับการทดลองนี้จึงเลือกเก็บน้ำยาทั้งสองชนิดไว้ที่ 4° ซ. และพบว่า น้ำยาของ Fischl เก็บไว้ได้นานอย่างน้อย 62 วัน โดยกิจกรรมของกลูโคสออกซิเดส 170 - 179 IU/ml และมี % relative accuracy ของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส 96.9 - 106.9

น้ำยาของ Bajema เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ. พบว่าค่ากิจกรรมของกลูโคสออกซิเดสลดลงค่อนข้างเร็วในช่วง 20 วันแรก แต่ยังมีเหลืออยู่เพียงพอที่จะทำงานได้ คือมีกิจกรรมเหลืออยู่ 146 - 163 IU/ml ซึ่งกิจกรรมที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส โดย Beckman "Glucose Analyzer" คือ 140 - 180 IU/ml⁽⁴⁾ เนื่องจากน้ำยาของ Bajema นั้นมีส่วนผสมของ Brij - 35 ซึ่งมีผลต่อกิจกรรมของกลูโคสออกซิเดส และ Bajema ได้รายงานไว้ว่าสามารถเก็บน้ำยานี้ได้นานอย่างน้อย 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 4° ซ. อย่างไรก็ตามควรจะได้มีการศึกษาถึงสาเหตุของการสูญเสียกิจกรรมของกลูโคสออกซิเดส ก่อนจะนำน้ำยานี้ไปใช้

จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า น้ำยาของ Fischl มีความเหมาะสมที่จะนำมาทดแทนการใช้ Certified glucose oxidase reagent และสามารถเตรียมจำนวนมากๆได้ เพราะสามารถใช้งานได้อย่างน้อย 62 วัน ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนของการตรวจวิเคราะห์ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Fischl, J., Federman, D., and Talmor, N. : Preparation of a modified glucose oxidase reagent for the polarographic determination of glucose with the Beckman "Glucose Analyzer" Clin. Chem. 21 : 760 - 761, 1975.
2. Bajema, L.L., Lee. W., Zebelman, A.M. and Kenny, M.A. : Detergent containing glucose oxidase reagent for use with the Beckman "Glucose Analyzer". Clin. Chem. 25 : 127 - 129, 1979.
3. Kadish, A.H., Litle, L. and Sternberg, J.C. : A new and rapid method for the determination of glucose by measurement of rate of O_2 consumption. Clin. Chem. 14 : 116 - 121, 1968.
4. ----- "Glucose Analyzer : Operating manual"
Beckman Instrument, Inc. Fullerton, California, p. 1-24, 1970.

A B S T R A C T

A COMPARATIVE STUDY OF GLUCOSE ANALYZER'S REAGENTS

Sudarat	Manochiopiniij	PH.D.	*
Chamras	Sapsamarnvong	M.Sc.	*
Kulnaree	Sirisali	M.Sc.	*
Somchai	Mahatnirunkul	B.Sc.	*
Vichai	Walaipachara	B.Sc.	*

Glucose oxidase reagents were prepared according to Fischl's and Bajema's methods. The Fischl reagent was suitable for use in the Beckman "Glucose Analyzer", it was stable for at least 62 days with a relative accuracy of 90 - 107 %. There was no significant difference between the freshly prepared reagent and the stored one. The Bajema's reagent was less stable than the Fischl's.

* Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology,
Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.