การวัดปริมาณกลูโคสในซีรั่มด้วย Modified single Glucose oxidase-Peroxidase (preliminary report)*

ธิดา เศรษฐรัตนพงศ์** วิศาล เยาวพงศ์ศิริ**
เจริญศรี วจนะมฤธุ** วิฑูร ชัยชาญวัฒนากุล***
ศรีจิตรา บุนนาค**

การวัดปริมาณกลูโคสในซีรั่ม ดัดแปลงมาจากวิธีของ Morin และ Prox สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้ทั้งซีรั่มและพลาสม่า โดยใช้ glucose oxidase และ peroxidase ซึ่งสะกัดจาก horseradish เพื่อเร่งปฏิกิริยา วิธีที่เรานำมาใช้นี้ใช้ peroxidase ที่สะกัดจากเปลือกหัวผักกาดขาวหรือเปลือกหัวไชเท้า (Rathanus sativus) ด้วยการบดเปลือกหัวผักกาดขาวให้ละเอียด แยก peroxidase ออกโดยการทำammonium sulfate fractionation และ dialysis ในน้ำ เพื่อขจัดแอมโมเนียมซัลเฟต

วิธีการวัดปริมาณกลูโคสในซีรั่ม 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยาตั้งทิ้งไว้ 2–5 นาที วัด optical density (OD) ที่ 460 nm.

ผลการทดลองพบว่า OD เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 0–500 มก./100 มล. การวัดปริมาณกลูโคสในซีรั่มในระดับความเข้มข้นต่างๆ ช่วงวันเดียวกันหรือต่างวัน มีความคลาดเคลื่อนต่ำกว่า 5% เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกลูโคส โดยวัดจากวิธี glucose oxidase-peroxidase (GOD/POD) กับ Somogyi พบว่าปริมาณกลูโคสทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์อย่างดี ($r = 0.991$) และไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ วิธีนี้มีค่าความถูกต้องอยู่ระหว่าง 96–98%

*บรรยายในการประชุมสัมนาวิชาการและปฏิบัติการครั้งที่ 1 สมาคมเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 7 เมษายน 2520

**หน่วยต่อมไร้ท่อและเมตาบอลิสัม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย และหน่วยวิจัยฮอร์โมน แผนกแพทยศาสตร์ มูลนิธิอานันทมหิดล

***ฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

การวัดปริมาณกลูโคสในเลือดนั้นทำได้หลายวิธีด้วยกัน วิธีหนึ่งที่ใช้ในปัจจุบัน คือ การใช้น้ำยาเอ็นไซม์ เนื่องจากเอ็นไซม์มี substrate specificity และเวลาที่ใช้สั้น เมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ ที่อาศัยคุณสมบัติของการเป็น reducing agent การหากลูโคสโดยใช้ปฏิกิริยาทางเอ็นไซม์ได้มีผู้ทดลองทำโดยใช้เวลา 20[7] – 30 นาที[4,8] Cawley และคณะได้ทำโดยเติมกรดซัลฟูริคเพื่อหยุดปฏิกิริยา ใช้เวลาการทดลอง 10 นาที[2] Morin และคณะ[6]ได้ดัดแปลงเตรียมเป็นน้ำยาชนิดเดียวที่มี pH 5.5 ใช้อัตราส่วนของ GOD/POD ที่พอเหมาะ เวลาการทดลอง 2 นาที โดยไม่ต้องตกตะกอนโปรตีน วิธีของเขามีค่าความถูกต้อง 99% ความคลาดเคลื่อน 3.3% ดังนั้นทางหน่วยต่อมไร้ท่อและเมตาบอลิสัม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย และหน่วยวิจัยฮอร์โมน แผนกแพทยศาสตร์ มูลนิธิอานันทมหิดล จึงได้ดัดแปลงวิธีของ Morin มาใช้ โดยเตรียมเอ็นไซม์ peroxidase จากเปลือกหัวไชเท้าเอง เพื่อประหยัดเงินตราต่างประเทศ เนื่องจากเอ็นไซม์ peroxidase มีราคาสูงมาก ประมาณกรัมละ 4,000.00 บาท

วัสดุและวิธีการ

ผู้ป่วย

ใช้ผู้ป่วย 100 ราย เก็บโดยวิธีสุ่มจากผู้ป่วยคลีนิคเบาหวานในแต่ละอาทิตย์ เพื่อใช้ตรวจหากลูโคสด้วยวิธี GOD/POD เปรียบเทียบกับวิธี Somogyi

วิธีเก็บเลือดจากผู้ป่วยมาตรวจ

เจาะเลือด 3 มล. ถ่ายใส่หลอดแก้วที่แห้งสะอาด ระวังไม่ให้เลือด hemolyse ปั่นแยกเอาซีรั่มมาตรวจ กรณีที่เลือด hemolyse หรือซีรั่มขุ่นขาวจะไม่นำมาใช้ เนื่องจากค่าที่ได้จากการตรวจโดยวิธีนี้จะสูงกว่าความเป็นจริง

วิธีเก็บ pool serum

เก็บซีรั่มผู้ป่วยในคลีนิคเบาหวานแต่ละสัปดาห์ โดยจัดแบ่งไว้เป็น 3 ระดับ

ระดับต่ำ เก็บซีรั่มที่มีปริมาณกลูโคสต่ำกว่า 100 มก./100 มล.

ระดับกลาง เก็บซีรั่มที่มีปริมาณกลูโคสต่ำกว่า 100–190 มก./100 มล.

ระดับสูง เก็บซีรั่มที่มีปริมาณสูงกว่า 190 มก./100 มล.

ผสมซีรั่มให้เข้ากัน ปั่นแยกเอาส่วนของซีรั่มที่ใสมาแบ่งเก็บเป็นหลอดเล็ก ๆ แช่แข็งไว้

การวัดปริมาณกลูโคสในซีรั่มด้วยวิธี GOD/POD ดัดแปลงจากวิธีของ Morin และ Prox[6] มีหลักการ[1,3,5] ดังนี้

กลูโคสทำปฏิกิริยากับน้ำและอ๊อกซิเจนจากอากาศ โดยปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ glucose oxidase ได้ gluconic acid กับ hydrogenperoxide (H_2O_2) H_2O_2 ทำปฏิกิริยาต่อกับสารที่ทำให้เกิดสี chromogen โดยปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ peroxidase ได้น้ำกับ Amber product เป็นสารสีเหลืองปนน้ำตาล สีที่เกิดเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ

PRINCIPLE OF GLUCOSE OXIDASE-PEROXIDASE IN DETERMINATION OF SERUM GLUCOSE

$$GLUCOSE + H_2O + O_2 \xrightarrow{GLUCOSE\ OXIDASE} GLUCONIC\ ACID + H_2O_2$$

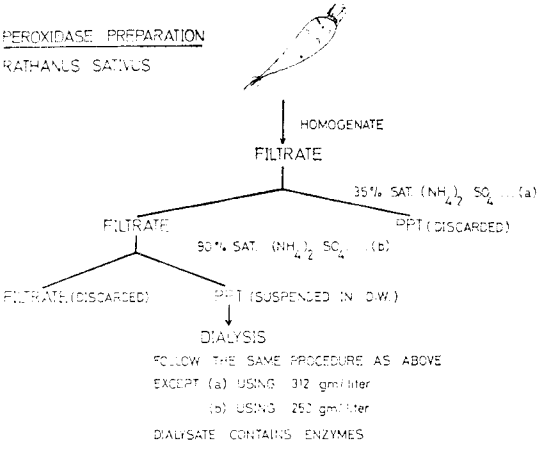
$$H_2O_2 + CHROMOGEN \xrightarrow{PEROXIDASE} AMBER\ PRODUCT + H_2O$$

ภาพที่ 1

ความเข้มข้นของกลูโคสในซีรั่ม ดังแสดงในภาพที่ 1

การเตรียมเอ็นไซม์ peroxidase

นำเปลือกหัวไชเท้ามาบดกับ 0.01 M. dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) คั้นเอาน้ำมาตกตะกอนด้วย 35% saturated ammonium sulfate จะได้ส่วนที่เป็นน้ำและตะกอน เอาตะกอนทิ้ง นำเอาส่วนที่เป็นน้ำมาตกตะกอนอีกครั้งหนึ่งด้วย 90% sat $(NH_4)_2SO_4$ จะได้น้ำและตะกอนอีก นำเอาส่วนที่เป็นตะกอนมาผสมด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย นำไป dialyse ในน้ำไหลเวียน 2–3 วัน เพื่อขจัด $(NH_4)_2SO_4$ แล้วปั่นแยกเอาส่วน filtrate มาทำ ammonium sulfate fractionation อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 312 กรัม/ลิตร ได้ filtrate และตะกอน นำ filtrate มาตกตะกอนครั้งสุดท้ายด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 250 กรัม/ลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนรินน้ำทิ้ง เอาตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย dialyse ในน้ำที่ไหลเวียน 2 วัน dialysate ครั้งหลังสุดจะมีเอ็นไซม์ peroxidase พร้อมที่จะนำไปใช้ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2

การเตรียมน้ำยา ประกอบด้วย

– glucose oxidase 1140 units (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo 63178)

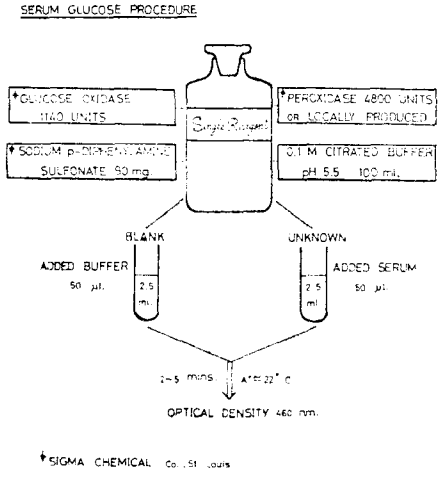
– peroxidase 4800 Purpurogallin units ($RZ^{(3)}$ = 1.6 Sigma Chemical Co) or locally produced peroxidase enzyme

– sodium p diphenylamine sulfonate 90 มก. (ACS grade Sigma Chemical Co)

– 0.1 M citrate buffer pH 5.5 100 มล.

วิธีการทดลอง

เติมน้ำยา 2.5 มล. ในซีรั่ม 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 22°ซ. 2–5 นาที วัด OD ที่ 460 nm โดยใช้ Blank เทียบศูนย์ Tube blank ใช้ 0.1 M Citrate buffer 50 ไมโครลิตรแทนซีรั่ม ดังแสดงในภาพที่ 3



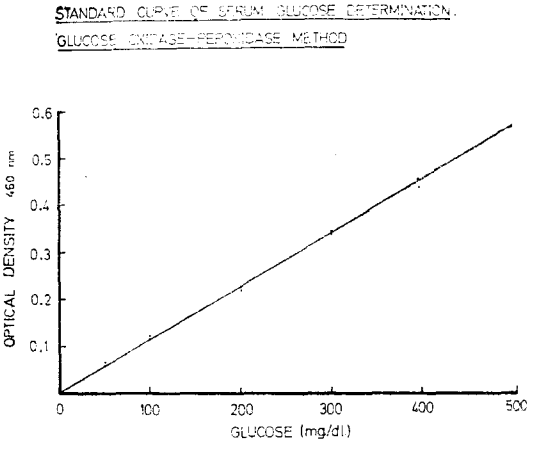
ภาพที่ 3

ได้ทำการทดลองดูความคงที่ของน้ำยา ความแม่นยำของวิธี GOD/POD ความถูกต้องของวิธี GOD/POD ความสัมพันธ์ระหว่างวิธี GOD/POD กับ Somogyi และทดสอบคุณภาพในห้องปฏิบัติการ และระหว่างห้องปฏิบัติการต่าง ๆ โดยใช้ control serum จากต่างประเทศ และ pool serum ที่เตรียมขึ้นเอง 3 ระดับ คือระดับต่ำ จะเก็บซีรั่มที่มีปริมาณกลูโคสต่ำกว่า 100 มก./100 มล. และระดับสูงเก็บซีรั่มที่มีปริมาณกลูโคสสูงกว่า 190 มก./100 มล. ได้ผลดังต่อไปนี้

ผลการทดลอง

standard curve ที่ใช้วัดปริมาณกลูโคลในซีรั่ม โดยวิธี GOD/POD

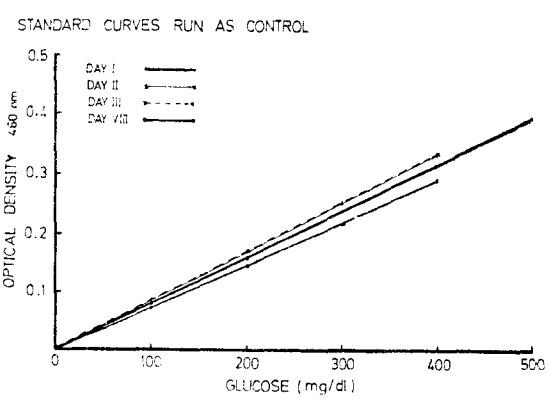
ใช้ standard glucose 100, 200, 300, 400 และ 500 มก./100 มล. เป็นแกนนอน ค่า OD ที่อ่านได้เป็นแกนตั้ง จะพบว่า OD จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 0 ถึง 500 มก./100 มล. ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4

การทดลองเพื่อดูความคงที่ของน้ำยา

น้ำยาที่เตรียมขึ้น นำมาทดลองในช่วงเวลา 8 วัน โดยทดลองตั้งแต่วันแรกของการเตรียมน้ำยา วันที่ 2 วันที่ 3 และวันที่ 8 โดยตรวจสอบทาง standard curve กับ control serum ความเข้มข้น 3 ระดับ ปรากฏว่า standard curve ในวันที่ 1, 2 และ 3 อยู่ใกล้เคียงกันมาก ส่วนวันที่ 8 เริ่มตกลงมาเล็กน้อยดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5

ค่า control serum ความเข้มข้น 3 ระดับ อยู่ภายใน 1 SD ซึ่งกันและกันดังแสดงในภาพที่ 6

การทดลองเพื่อดูความแม่นยำของวิธี GOD/POD

จากการทดลองในแต่ละวันด้วยระดับความเข้มข้นของกลูโคสในซีรั่ม 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ กลาง สูง จะมีความคลาดเคลื่อน (coefficient of variation) ไม่เกิน 4.2 % และเมื่อนำค่ามาคิดเฉลี่ยในทุกวันที่ทำการทดลอง จะมีความคลาดเคลื่อนต่ำกว่า 5.3 % ดังแสดงในภาพที่ 7

การทดลองเพื่อดูความถูกต้องของวิธี GOD/POD

โดยการเติมกลูโคส 100 มก./100 มล. ลงใน control serum สามารถวัดได้ 97.8 มก./100 มล. คิดเป็นค่าความถูกต้อง 97.8 % และเมื่อเติมกลูโคส 300 มก./100 มล. สามารถวัดได้ 287.8 มก./100 มล. คิดเป็นค่าความถูกต้อง 96%

แสดงว่าวิธีนี้สามารถวัดให้ความถูกต้องได้ 96–98 % ดังแสดงในภาพที่ 8

STABILITY OF SINGLE GLUCOSE OXIDASE-PEROXIDASE REAGENT

POOLED SERA RUN AS CONTROL

DATE	CONTROL SERA mg/dl					
	LOW POOL*		MEDIUM POOL*		HIGH POOL*	
	MEAN ± SD	%CV	MEAN ± SD	%CV	MEAN ± SD	%CV
DAY I	76.2 ± 4.8	6.3	149.7 ± 8.6	5.7	-	-
DAY II	76.2 ± 2.5	3.3	148.7 ± 4.8	3.2	298.7 ± 2.5	0.8
DAY III	71.2 ± 4.8	6.7	135.0 ± 7.0	5.2	291.7 ± 10.4	3.6
DAY VIII	72.2 ± 6.4	8.8	142.5 ± 2.9	2.0	314.0 ± 11.2	3.5

* 4 SAMPLES IN EACH TEST

ภาพที่ 6

PRECISION OF SERUM GLUCOSE DETERMINATION; GLUCOSE OXIDASE-PEROXIDASE METHOD

CONTROL SERUM(mg/dl)	Exp. I*		Exp. II*		Exp. III*		Exp.I-III	
	MEAN ± S.D	%CV	MEAN ± S.D	%CV	MEAN ± SD	%CV	MEAN ± SD	%CV
LOW POOL	73.6 ± 3.0	4.2	78.4 ± 3.1	3.9	80.8 ± 2.5	3.1	77.6 ± 4.1	5.3
MEDIUM POOL	160.1 ± 3.5	2.2	158.6 ± 2.9	1.9	164.8 ± 4.1	2.5	161.2 ± 4.4	2.7
HIGH POOL	319.2 ± 10.3	3.2	313.7 ± 10.5	3.4	315.2 ± 9.5	3.0	316.0 ± 10.0	3.2

*10 SAMPLES IN EACH TEST

ภาพที่ 7

ACCURACY OF SERUM GLUCOSE DETERMINATION
GLUCOSE OXIDASE-PEROXIDASE METHOD

AMOUNT OF GLUCOSE ADDED(mg/dl)	OBSERVED*		PERCENTAGE RECOVERY
	MEAN ± SD	%CV	
100	97.8 ± 8.4	8.6	97.8
300	287.8 ± 6.5	2.3	96.0

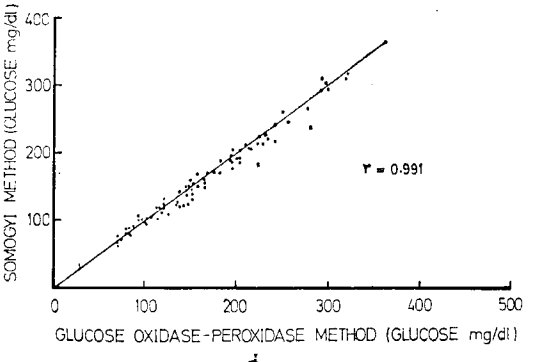
* 2 x (10 SAMPLES IN EACH TEST)

ภาพที่ 8

การทดลองแสดงความสัมพันธ์ของการหาปริมาณกลูโคสในซีรั่มด้วยวิธี GOD/POD กับวิธี Somogyi

จากการตรวจเลือดผู้ป่วย 100 ราย ด้วยวิธี GOD/POD เทียบกับวิธี Somogyi พบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างดี มีค่า r (correlation coefficient) = 0.991 เมื่อนำค่าทั้งสองวิธีมาทำ pair T test พบว่าทั้งสองวิธีไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 9

CORRELATION BETWEEN GLUCOSE OXIDASE-PEROXIDASE METHOD AND SOMOGYI METHOD

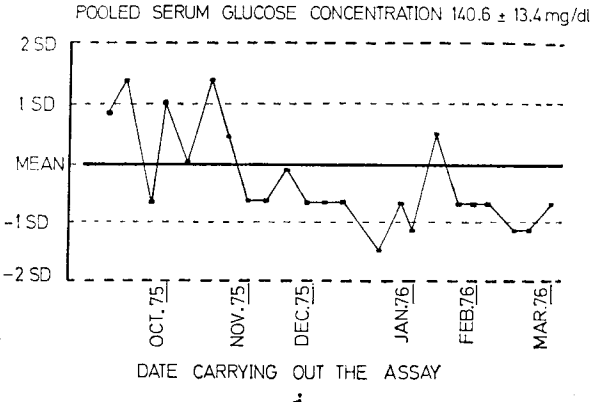


ภาพที่ 9

การทดสอบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

ช่วงระยะเวลา 2 ปี การวัดกลูโคสในซีรั่มด้วยวิธี GOD/POD พบว่าวิธีนี้สามารถควบคุมได้ภายใน 2 SD ดังแสดงในภาพที่ 10 ซึ่งเป็นการทดสอบคุณภาพในระยะ 6 เดือน

QUALITY CONTROL IN LABORATORY ASSAY



ภาพที่ 10

การทดสอบคุณภาพระหว่างห้องปฏิบัติการต่าง ๆ

โดยการใช้ control serum จากต่างประเทศ ซึ่งมีผลรายงานค่า expected range ที่จะต้องควบคุมให้อยู่ในขอบเขตนั้น

จากผลการทดลองใช้ control serum ของ 3 บริษัท คือ Perginorm S Batch No. 408, Q-Pak control serum I No. 3069 L 005 AC และ validate lot 0265024-D ปรากฏว่าสามารถควบคุมค่าให้อยู่ใน expected range ได้ ดังแสดงในภาพที่ 11

QUALITY CONTROL BETWEEN LABORATORY ASSAY

CONTROL SERUM	MEAN VALUE	EXPECTED RANGE	ASSAY VALUE*		
			MEAN ± SD	%CV	RANGE
**PREGINORM S BATCH No. 408	110	99 - 121	105.0 ± 3.5	3.3	102 - 108
***Q-PAK CONTROL SERUM I No.0369 L 005 AC	81	76 - 86	79.0 ± 3.5	4.4	76 - 82
***VALIDATE LOT 0265024-D	63	56 - 69	61.0 ± 3.5	5.7	58 - 64

*4 SAMPLES IN EACH TEST
**GOD/POD, o-DIANISIDINE
***BECKMAN GLUCOSE ANALYZER

ภาพที่ 11

วิจารณ์และสรุป

จากการทดลองวัดปริมาณกลูโคสในซีรั่มผู้ป่วย 100 ราย ด้วยวิธี GOD/POD เทียบกับวิธี Somogyi พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปกติวิธี GOD/POD เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่เอ็นไซม์ peroxidase ที่เตรียมขึ้นเองยังมีความบริสุทธิ์ต่ำ ($RZ < 1$) เมื่อเทียบกับที่เขาผลิตขาย ถึงกระนั้นก็ตาม แม้ว่าเอ็นไซม์ peroxidase ที่เตรียมขึ้นเองนั้นมีความบริสุทธิ์ต่ำและยังเป็น crude enzyme แต่จากการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าความคลาดเคลื่อนในการวัดต่ำกว่า 5.3 % ความถูกต้อง 96-98 % เมื่อเทียบค่า control serum 3 ระดับ ความเข้มข้นกับ control serum ของต่างประเทศจาก 3 บริษัท ค่ากลูโคสอยู่ในขอบเขตที่เขากำหนดให้ แสดงว่าการวัดกลูโคสโดยวิธีนี้ จากเอ็นไซม์ peroxidase ที่เตรียมขึ้นเองสามารถนำไปใช้ได้ดี

ข้อดีและข้อเสียของวิธี GOD/POD

ข้อดี

1. เอ็นไซม์ peroxidase สามารถเตรียมมาใช้ในห้องปฏิบัติการเองได้
2. วิธีการทำง่ายและสะดวก
3. ใช้เวลาไม่เกิน 5 นาที วิธี Somogyi ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 30 นาที
4. ค่าน้ำยาประมาณ 50 สตางค์
5. ด้านเศรษฐกิจ ให้ความประหยัดสะดวกสบายแก่ผู้ป่วย โดยผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องเสียเวลา 2 วันในการตรวจและรักษาจากแพทย์ วิธี GOD/POD ให้ผลรวดเร็ว เหมาะสำหรับใช้ตรวจกลูโคสในผู้ป่วยคลินิคเบาหวาน

ข้อเสีย

1. การเตรียมเอ็นไซม์ peroxidase ยุ่งยากและต้องใช้เวลา
2. คุณภาพของเอ็นไซม์ peroxidase จะลดลงเมื่อเก็บไว้นาน
3. วิธีนี้มีสิ่งรบกวน (interference) จาก bilirubin, hemolysed blood และ hyperlipoproteinemia

ผู้รายงานขอขอบคุณ นางมารศรี เตชะกำพุช และนางสาวละเอียด รุ่งเรือง ที่ช่วยเตรียมรายงาน และคุณประไพ เต็มสุข ในการจัดหาเปลือกหัวไชเท้า

เอกสารอ้างอิง

1. การหาปริมาณน้ำตาลในซีรั่ม โดยใช้กลูโคสอ็อกซิเดซ ข่าวสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย 4 (12) : 38 (มค.) 2518
2. Cawley, LP Spear, FE and Kendall, R : Ultramicro chemical analysis of blood glucose with glucose oxidase. Am J Clin Pathol 32 : 195-200, 59
3. Dol, WR : BUN Strate, Gluco Strate and Albu Strate, Warner-Lambert-Pharmaceutical Company Interdepartment Memorandum February 12, 1970
4. Lloyd, JB, and Whelan WJ : An improved method for enzymatic determination of glucose in the presence of maltose. Ann Biochem 30 : 467-470, 69
5. Maehly, AC "Plant Peroxidase" Methods in Enzymology II. Edited by Colowick, SP and Kaplan, NO New York : Academic Press Inc. 1955. pp 810-813
6. Morin LG, Prox J : Single Glucose Oxidase Peroxidase Reagent for Two-Minute Determination of Serum Glucose. Clin Chem 19 : 959-962, 73
7. Meites S, Saniel-Banrey K : Modified glucose oxidase method for determination of glucose in whole blood. Clin Chem 19 : 308-311, 73
8. Washko ME, Rice EW : Determination of Glucose by an improved enzymatic procedure. Clin Chem 7 : 542-545, 61