สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์

รายงานผลการวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณแผ่นดิน 2530

เรื่อง

การพัฒนาวิธีและเทคนิคต่าง ๆ ในการวิเคราะห์หาไขมันในซีรัม

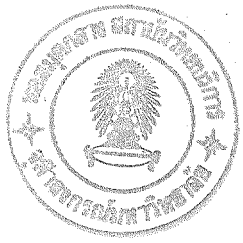
The Development of Techniques in Lipid and Lipoprotein Analysis in Serum

โดย

ไพลิน ศรีสุขโข

จฬ
วพ 15
010587

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์



รายงานผลการวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณแผ่นดิน 2530

เรื่อง

การพัฒนาวิธีและเทคนิคต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ทาไขมันในซีรัม

The Development of Techniques in Lipid and Lipoprotein Analysis in Serum

โดย

ไพลิน ศรีสุชโช

T 014/913 -9 S.A. 2547

สารบัญ

		หน้า
บทนำ		1
วิธีดำเนินการวิจัย		4
ผลการวิจัย		8
วิจารณ์ และ สรุปผล		18
เอกสารอ้างอิง		24
ภาคผนวก		
เอกสารหมายเลข 1	การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอร์ไรด์	28
เอกสารหมายเลข 2	การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล	30
เอกสารหมายเลข 3	การแยก lipoprotein โดยวิธี Ultracentrifuge เทคนิค	33
เอกสารหมายเลข 4	การตกตะกอนอะโปไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง ด้วยฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์	35
เอกสารหมายเลข 5	การตกตะกอนไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (HDL) ด้วยวิธีเฮปารินแมงกานีสคลอไรด์	37
เอกสารหมายเลข 6	การแยก HDL_2 และ HDL_3 โดยใช้ Ultracentrifuge เทคนิค	38
เอกสารหมายเลข 7	การวิเคราะห์ปริมาณอะโปไลโปโปรตีน	39

เลขหมู่ ศส
วพ 15
เลขทะเบียน 010587
วัน.เดือน.ปี 18 มิ.ย. 44

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงฤทัย สกุลแรมรุ่ง ที่กรุณาให้คำแนะนำเทคนิคการทำ Electroimuno assay

หัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์ - นรีเวชวิทยา รพ.จุฬาลงกรณ์ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง Ultracentrifuge ในการวิเคราะห์

อาสาสมัครที่บริจาคเลือด เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทุกท่าน ที่ช่วยในการเก็บเลือดแบ่งเลือด และช่วยในการปฏิบัติการในห้องทดลอง

คุณอัญชลี เปรมมณี และ คุณสมทรง ตั้งกิติเสถียร ผู้พิมพ์

Project Title : The Development of Techniques in Lipid and Lipoprotein Analysis in Serum

Investigator : Pailin Srisookho

Abstract

The purpose of this project is to develop methods and techniques for analysis of lipids and lipoproteins in serum. Enzymatic methods developed for triglyceride and cholesterol measurements had linearity up to 1000 and 600 mg/dl respectively with serum dilution. The ultracentrifugation technique was developed for separating VLDL, LDL and HDL in the same run, which saves a lot of time and costs. The precipitation of HDL-cholesterol by heparin manganese chloride and phosphotungstate magnesium chloride yielded non-significant differences from the ultracentrifugation technique. The rocket electroimmuno assay for analysis of Apo A_1 and Apo B was developed to make it possible to study the lipids metabolic profiles.

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาวิธี และ เทคนิคต่าง ๆ ในการวิเคราะห์หาไขมันในซีรัม

ผู้วิจัย ไพลิน ศรีสุขโข

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีและเทคนิคการวิเคราะห์ไขมัน ในการวิจัยนี้ เพื่อให้ได้วิธีที่ทำง่ายสะดวกและปลอดภัย มีความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปและในการวิจัย ได้พัฒนาการวิเคราะห์ไตรกลีย์เซอไรด์ และโคเลสเตอรอลในซีรัม โดยการใช้เอนไซม์มาแทนการวิเคราะห์ด้วยสารเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแปรปรวนต่ำกว่า และมี linearity ถึง 1000 และ 600 มก./ดล. สามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันได้โดยไม่ต้องเจือจางซีรัมก่อน และได้ทำการปรับปรุงเทคนิคการแยกไลโปโปรตีน โดยวิธีการปั่นแยกด้วย Ultracentrifuge ให้สามารถแยก VLDL LDL และ HDL ออกจากกันได้โดยการปั่นแยกเพียงครั้งเดียว ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่อง Ultracentrifuge ก็สามารถที่จะเลือกใช้วิธีตกตะกอนโดยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ และฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งได้พัฒนาให้ทำการวิเคราะห์ได้ง่าย มีความถูกต้องแม่นยำและให้ผลไม่แตกต่างจากวิธีปั่นแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge รวมทั้งพัฒนาการวิเคราะห์หา Apo A_1 และ Apo B ด้วยวิธี Rocket electroimmuno assay เพื่อใช้ร่วมกับไลปิดตัวอื่น ๆ ในการศึกษาเบตาบอลิสมของไขมัน

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	ค่า OCV หรือ within - run CV ของไตรกลีย์เซอไรด์ (มก./100 มล.) แสดงด้วย range, Mean ± SD และ CV จำนวน 20 ตัวอย่าง	8
ตารางที่ 2	ค่า RCV ของการวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ จาก lyophylised serum จำนวน 20 ตัวอย่าง	9
ตารางที่ 3	แสดงค่า OCV จากการวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอล จาก lyophylised serum	11
ตารางที่ 4	แสดงค่า Mean ± SD และ CV ของการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล ด้วยวิธี Enzymatic และ Liberman-Burchard จาก lyophylised serum ที่มีระดับโคเลสเตอรอลสูง กลาง และต่ำ จำนวน 20 ตัวอย่าง	12
ตารางที่ 5	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย SD และ CV ของโคเลสเตอรอล จาก VLDL LDL HDL และ recovery ของการปั่นแยกจาก pooled serum จำนวน 20 ตัวอย่าง	13
ตารางที่ 6	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย SD และ CV ของปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ VLDL LDL HJDL และ recovery ของการปั่นแยกสองครั้งจาก pooled serum จำนวน 20 ตัวอย่าง	13
ตารางที่ 7	ผลการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลจาก VLDL LDL และ HDL และ recovery จากการปั่นแยกด้วยวิธีปั่นแยกสองครั้งจาก pooled serum 20 ตัวอย่าง	14
ตารางที่ 8	ผลการวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์จาก VLDL LDL และ HDL และ recovery จากการปั่นแยกด้วยวิธีปั่นแยกสองครั้งจาก pooled serum 20 ตัวอย่าง	14
ตารางที่ 9	ผลการวิเคราะห์ HDL-C ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์และวิธี ultracentifuge จำนวน 10 ตัวอย่าง	15
ตารางที่ 10	ผลการวิเคราะห์ HDL-C 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยฟอสฟอทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ (NAPT) ที่ pH ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับวิธี ultracentrifuge	15
ตารางที่ 11	ค่า OCV ของการวิเคราะห์ HDL-C 20 ตัวอย่างด้วยวิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ วิธีตกตะกอนด้วยฟอสฟอทังสเตต และแมกนีเซียมคลอไรด์	16

หน้า

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์เป็นปริมาณ HDL_2- C, HDL_3- C ค่าเฉลี่ย SD, CV ของ HDL_3 จาก pooled serum 20 ตัวอย่าง 16

ตารางที่ 13 ค่า OCV and RCV ของ Apo A_1 และ Apo B วิเคราะห์จาก reference serum จำนวน 20 ตัวอย่าง 17

ตารางที่ 14 ค่าปกติของ Apo A_1 และ Apo B จากอาสาสมัครชายหญิง อายุ 20 - 55 ปี 17

บทนำ

การศึกษาถึงปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคเส้นโลหิตแข็งตีบตัน (Artheriosclerotic Disease) และปัญหาของเส้นเลือดเลี้ยงหัวใจ (Cardiovascular Disease) เมื่อ 40 ปีก่อนนั้น คิดว่าเกิดจากระดับโคเลสเตอรอลสูงในเส้นเลือด จากการศึกษาวิจัยต่อๆ มา พบว่าปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Coronary Heart Disease, CHD) นั้นมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิสมของไขมันอะโปไลโปโปรตีน (lipid and lipoprotein) และ อะโปโปรตีน ชนิดต่างๆ ในเลือด (1-3)

คนไทยมีอุบัติการของการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้น สถิติการเสียชีวิตของประชากรไทย จากข้อมูลของสำนักนโยบายและแผนกระทรวงสาธารณสุข ในปี 2528-2533 พบว่าคนไทยเสียชีวิตจากโรคหัวใจเป็นอันดับสอง ตั้งแต่ปี 2534 เป็นต้นมา สถิติการเสียชีวิตจากโรคหัวใจเพิ่มขึ้นมาเป็นอันดับหนึ่ง อาจเนื่องมาจากคนไทยได้เปลี่ยนวิถีชีวิตจากในอดีตซึ่งเคยบริโภคอาหารที่มีไขมัน และเนื้อสัตว์ปริมาณต่ำ มาเป็นบริโภคอาหารที่มีไขมันเพิ่มมากขึ้น ออกกำลังน้อยลง สตรีไทยใช้ฮอร์โมนคุมกำเนิดในรูปแบบต่างๆ มากขึ้น อันเป็นปัจจัยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับไตรกลีย์เซอไรด์ โคเลสเตอรอล และอะโปไลโปโปรตีน (4-5) ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ความดันโลหิตสูง การแข็งตัวของเลือดผิดปกติ และเบาหวาน

ในผู้สูงอายุทั้งชายและหญิง จะมีระดับไตรกลีย์เซอไรด์รวม และโคเลสเตอรอลสูงขึ้น โดยเฉพาะสตรีวัยหมดประจำเดือน อุบัติการของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มอย่างมากในระยะหลังหมดประจำเดือน (6) เนื่องจากการมีระดับโคเลสเตอรอลเพิ่มสูงขึ้น และระดับโคเลสเตอรอลในอะโปไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงลดลง และจากการศึกษาข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าระดับของโคเลสเตอรอลรวม และไตรกลีย์เซอไรด์ มีความเกี่ยวข้องกับโรคเส้นเลือดอุดตันและอัตราการเสียชีวิตจากโรคหัวใจ และหลอดเลือด (7,8) ปริมาณของโคเลสเตอรอลในไลโปโปรตีนในส่วนต่างๆ (9-11) รวมทั้งปริมาณของอะโปไลโปรตีน A_1 (Apolipoprotein A_1) และอะโปไลโปรตีน B (Apolipoprotein B) มีผลต่อการเกิด myocardial infarction (12-14) และ CHD (15-17) แต่ไลปิด ไลโปโปรตีน และอะโปโปรตีนชนิดต่างๆ ส่วนมากจะขึ้นอยู่กับตัวแปรทั้งภายนอก และภายในร่างกาย เช่น อาหาร อายุ เพศ เชื้อชาติ การออกกำลังกาย การใช้พลังงาน โรคต่างๆ ยา และฮอร์โมนที่ใช้ ประวัติครอบครัว (18-19) การพยากรณ์โรคอย่างเฉพาะเจาะจงโดยใช้ค่าไลปิดตัวใดตัวหนึ่งนั้น จะมีความผันแปรอย่างมาก จึงนิยมใช้ไลปิดหลายตัวรวมกันในการศึกษาวิจัย (20,21)

การวิเคราะห์ไขมันที่ควรศึกษามีปริมาณโคเลสเตอรอลรวม (Total cholesterol, T-cho) โคเลสเตอรอลที่อยู่ในส่วนของไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (HDL cholesterol)และส่วนประกอบย่อยของ HDL คือ HDL_2 และ HDL_3 โคเลสเตอรอลที่อยู่ในส่วนของไลโปโปรตีนที่ความหนาแน่นต่ำ (LDL cholesterol) ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์รวม (Total triglyceride) อะโปไลโปโปรตีน A_1 (Apolipoprotein A_1) และอะโปไลโปโปรตีน B (Apolipoprotein B)

โคเลสเตอรอลเป็นไลปิดที่มีความสำคัญ ซึ่งเป็นไลปิดตัวแรกที่ใช้ในการตรวจคัดกรอง(1) และเป็นการตรวจวิเคราะห์ที่มีการใช้มากที่สุดในการตรวจทาง Lipid Clinic การตรวจวิเคราะห์ หาปริมาณโคเลสเตอรอลแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ การหาค่าโคเลสเตอรอลโดยตรวจจากซีรัม Direct method ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีที่สะดวกและง่าย ได้ค่าดีพอประมาณ และวิธี Indirect method เช่น วิธี ของ Abell (22) เป็นวิธีที่ทำการสกัดแยกเอาโคเลสเตอรอลออกจากสารอื่น โดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ บางวิธีก็ทำการ saponified โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ และสกัดแยกเอาโคเลสเตอรอลออกมาก่อน แล้วจึงนำไปหาปริมาณโคเลสเตอรอล การหาปริมาณของโคเลสเตอรอลส่วนมากจะเป็นปฏิกิริยาที่เกิดสีโดยสารเคมีที่เป็นกรดแรง และสีที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิภาคกับความเข้มข้นของโคเลสเตอรอล

การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ในซีรัมที่ใช้กันอยู่ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปมีอยู่หลายวิธี ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ปฏิกิริยาเคมี และแต่ละวิธีจะมีหลายขั้นตอน (29,34) วิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ทำโดยแยกไตรกลีย์เซอไรด์ออกจากไลปิดตัวอื่นๆ โดยการสกัดด้วย isopropanol และดูดซับฟอสโฟไลปิดด้วย zeolite แล้วจึงนำไตรกลีย์เซอไรด์มา saponified ให้ได้กรดไขมันอิสระ และกลีย์เซอรอล oxidise กลีย์เซอรอลที่ได้ด้วย periodate จะได้ formaldehyde ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถัน จะให้สารที่มีสี สีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับ formaldehyde ตามกฎของเบียร์ ซึ่งนำไปคำนวณหาปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ได้

ไลปิดชนิดต่างๆ เช่น โคเลสเตอรอล ไตรกลีย์เซอไรด์ ฟอสโฟไลปิด ที่มีอยู่ในไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่างกัน จะมีความสำคัญต่อการบอกอัตราความเสี่ยงของการเป็นโรคหัวใจ และหลอดเลือด รวมทั้งการเมตาบอลิสมของระบบไขมันในร่างกาย การแยกไลโปโปรตีนออกเป็นส่วนๆ ตามความหนาแน่น เพื่อนำมาศึกษาไลปิดต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบ จึงมีความสำคัญอย่างมาก การแยกไลโปรตีนตามความหนาแน่น ทำโดยใส่ซีรัมลงไปในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความหนาแน่นต่างกัน เมื่อนำไปปั่นแยกโดยเครื่อง Ultracentrifuge ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าความหนาแน่นของสารละลายจะลอยอยู่ข้างบน และไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงกว่าก็จะตกตะกอนอยู่ข้างล่าง จึงสามารถแยกไลโปโปรตีนที่อยู่ในส่วนข้างบนและล่างไปทำการวิเคราะห์ไลปิดต่างๆตามต้องการได้

การแยกไลโปโปรตีน VLDL, LDL, และ HDL สามชนิดนี้ออกจากกันที่นิยมกันมาก และถือว่าเป็น reference method คือการปั่นแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge (25) โดยทำการปั่นแยกสองครั้ง ทำโดยใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ และซีรัมลงไปให้ผสมกันแล้วมีความหนาแน่น 1.006 กรัม/มล. เป็นเวลา 22 ชม. ส่วนบนจะเป็น VLDL และส่วนล่างเป็น LDL และ HDL รวมกัน และนำสารละลายส่วนล่างมาใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ให้ได้สารละลายที่มีความหนาแน่น 1.063 กรัม/มล. และปั่นแยกอีกครั้งนาน 22 ชม. ส่วนบนจะเป็น LDL และส่วนล่างเป็น HDL เทคนิคนี้ต้องใช้เวลามาก ต้องใช้การปั่นแยกติดต่อกันถึง 2 ครั้ง

การแยกส่วนประกอบของของ HDL เพื่อศึกษาถึงปริมาณโคเลสเตอรอล และอะโปโปรตีนที่อยู่ส่วนล่างของ HDL_2 และ HDL_3มีความสำคัญต่อการศึกษาเมตามอลิสมของไขมันการตรวจ

วินิจฉัยโรคหัวใจและหลอดเลือด ภาวะหัวใจขาดเลือด และเส้นโลหิตอุดตัน (16,26) และการตอบสนองต่อการรักษา ผลของการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน และยาคุมกำเนิดฯลฯ

ไลโปโปรตีนมีความหนาแน่นสูง มีความสำคัญต่อการวินิจฉัยการเกิด CHD และเส้นโลหิตอุดตัน จึงได้มีการหา HDL หลายวิธีเพื่อให้สามารถใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้อย่างกว้างขวาง วิธีที่ใช้กัน คือ

1. Ultracentrifugation เป็นวิธีที่มาตรฐานให้ความเชื่อถือสูง ใช้เครื่องมือพิเศษที่มีราคาแพงคือ ultracentrifuge หลอดทดลองพิเศษสำหรับเครื่อง ultracentrifuge จุกสำหรับปิดหลอด เครื่องปิดจุกหลอดทดลอง เครื่องตัดหลอดทดลอง และหลอดทดลองที่ใช้สำหรับเครื่อง ultracentrifuge และสามารถนำมาตัดได้ เครื่อง ultracentrifuge ที่ใช้ปั่นติดต่อกันครั้งละนานๆ ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาสูง บุคลากรต้องมีความรู้ความชำนาญโดยเฉพาะ

2. Electrophoretic techniques วิธีนี้ให้ผล precision ไม่ดีนัก และในช่วงที่มีไขมันปริมาณน้อยๆ ยังมีความถูกต้องต่ำ แต่เป็นช่วงที่ต้องใช้มากในคลินิก

3. Ion-exchange และ gel-permeation chromatography เป็นวิธีที่มีวิธีทำยุ่งยากหลายขั้นตอน ใช้เวลานาน ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

4. Precipitation Techniques หรือวิธีตกตะกอน วิธีนี้ทำได้โดย ทำให้ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำกว่า 1.063 กรัม/มล. (VLDL และ LDL) ตกตะกอนโดยใช้สารเคมีพวก divalent cations หรือ polysacharides ส่วนไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงจะอยู่ในน้ำใสที่อยู่ข้างบน หลังจากที่ปั่นแยกสารละลายแล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้แทนวิธีปั่นแยกด้วย ultracentrifuge ซึ่งเป็น reference method

สารที่ใช้ตกตะกอนมีอยู่หลายชนิด มีการตกตะกอนด้วยแด็กซแตรนซัลเฟต (MW 50000 หรือ 500000) เฮปารินกับแมงกานิสคลอไรด์ เฮปารินกับแคลเซียมคลอไรด์ โซเดียมฟอสโฟทังสเตต และแมกนีเซียมคลอไรด์ โพลีเอทีลีนไกลคอล 6000

การวิเคราะห์ HDL ด้วยการตกตะกอนเป็นวิธีที่มีขั้นตอนน้อยไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ วิธีตกตะกอนไลโปโปรตีนที่มีความเชื่อถือได้ มีความถูกต้องแม่นยำสูง และเป็นที่นิยมใช้กันมาก คือ วิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ (27) และวิธีตกตะกอนด้วยฟอสโฟทังสเตตและแมกนีเซียมคลอไรด์ (28) วิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ นิยมใช้กันมากในสหรัฐอเมริกา และใช้เป็น Reference Method ในการทำ standardize lipid analysis วิธีตกตะกอนด้วยฟอสโฟทังสเตต และแมกนีเซียมคลอไรด์นิยมใช้กันมากในยุโรป และใช้เป็น standard lipid method ในประเทศอังกฤษ

การวิเคราะห์หาปริมาณของอะโปไลโปโปรตีนมีได้หลายวิธี คือใช้หาโดย molecular sieve chromatograpy, isoelectric focusing และ polyacrylamide gel electrophoresis แต่วิธีเหล่านี้มีขั้นตอนมาก ใช้เวลานาน และมีความแม่นยำน้อย วิธีที่นิยมคือ Immunochemical technique ได้พัฒนาการวิเคราะห์อะโปไลโปโปรตีนโดยวิธี rocket electroimmuno assay

จากวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของไขมัน ไลโปโปรตีน และอะโปไลโปโปรตีนชนิดต่างๆ ดังกล่าว บางวิธีใช้มานานกว่า 30 ปี ซึ่งจะมีหลายขั้นตอน ใช้เวลาในการวิเคราะห์มาก บางวิธี

ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ราคาแพง และผู้ใช้ต้องมีความชำนาญโดยเฉพาะ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะมีวิธีการวิเคราะห์ที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเชื่อถือได้ ใช้ในการตรวจคัดกรอง เพื่อที่จะนำมาใช้พยากรณ์โรค รวมทั้งมีวิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง เพื่อที่จะนำมาใช้ประกอบการรักษา การศึกษาวิจัยและการควบคุมระดับไขมันชนิดต่าง ๆ เพื่อลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมตัวก่อนมาตรวจเลือด

1. อาสาสมัครที่มาตรวจเลือด จะต้องอดอาหาร 12 - 16 ชม. ก่อนมารับการเจาะเลือด (ดื่มได้แต่น้ำ)

2. ไม่ดื่มแอลกอฮอล์ 24 ชม. ก่อนมารับการเจาะเลือด

3. ไม่ออกกำลังกายอย่างมากมาก่อนทำการเจาะเลือด

2. การเจาะเลือดตัวอย่าง

1. ให้ผู้มารับการตรวจเลือด นั่งในท่าพัก ประมาณ 5 นาทีก่อนจะเจาะเลือด

2. เจาะเลือดและถ่ายเลือดใส่หลอดทดลองที่เป็นหลอดแก้ว ทำอย่างระมัดระวังอย่าให้เม็ดเลือดแดงแตก ซึ่งจะรบกวนผลการทดลองได้ เก็บตัวอย่างที่ได้ในกล่องโฟมใส่น้ำแข็ง และส่งมายังห้องปฏิบัติการ

3. การเตรียมเลือดตัวอย่าง

นำเลือดตัวอย่างที่ส่งมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที และไม่เกิน 1 ชม. นำไปปั่นในเครื่องปั่นแยกที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ความเร็ว 2000 x g 10 นาที ใช้ pasture pipette ดูดเอาซีรัมที่อยู่ข้างบนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไขมันทันที แบ่งซีรัมที่จะเก็บไว้ ใส่หลอดเล็ก ๆใช้ได้พอดีกับการวิเคราะห์แต่ละครั้ง

4. การเก็บสารตัวอย่าง

ซีรัมที่จะทำการวิเคราะห์ซีรัมไลปิดภายใน 6 ชม. ให้เก็บซีรัมตัวอย่างนี้ไว้ในตู้เย็นธรรมดาที่อุณหภูมิ 4°C แต่ถ้าจะทำการวิเคราะห์ภายหลัง ให้แบ่งใส่หลอดเล็ก ๆเตรียมไว้พอสำหรับการวิเคราะห์แต่ละครั้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ถึง -50°C

ซีรัมเพื่อวิเคราะห์หาอะโปไลโปโปรตีนชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Ultracentrifuge Technique เก็บไว้ในตู้เย็นธรรมดาได้ไม่เกิน 5 วัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การควบคุมคุณภาพ

5.1 การเก็บ Quality control serum

ซีรัมที่ใช้เพื่อเป็น quality control จะเก็บไว้ในรูปของ lyophylised serum หลังจากนำมาละลายแล้ว แบ่งเก็บไว้ในหลอดเล็กๆ ที่ปิดสนิทใช้ได้เฉพาะครั้งเดียว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ถึง -50°C ตัวอย่างที่นำมาละลายหลังจากแช่แข็งแล้ว ไม่สามารถนำกลับไปแช่แข็ง และนำมาใช้ได้อีกเป็นครั้งที่สอง

กรณีที่ใช้ pooled serum แบ่งเก็บในหลอดเล็ก และแช่ไว้ที่ -20° C ถึง -50° C เช่นเดียวกับ lyophylised serum

5.2 การทดสอบความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์

1. Optimal Conditions Variance (RCV)

ก่อนที่จะนำการวิเคราะห์ใหม่มาใช้ จะต้องทดสอบความคลาดเคลื่อนของวิธีการวิเคราะห์ทำโดยวิเคราะห์ control material หรือ pooled serum ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ค่าเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด โดยควบคุมตัวแปรต่างๆ คือ เครื่องมือ น้ำยา และขั้นตอนต่างๆ อย่างดี เพื่อทดสอบหา accuracy และ precision ซึ่งแสดงด้วยค่า standard deviation (SD) และ coeffcient of variatiom (CV) ซึ่งเรียกว่า OCV

2. Routine Conditions Variance (RCV)

เมื่อใช้ทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ จะต้องตรวจสอบความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ได้ โดยนำผลการวิเคราะห์ control material หรือ pooled serum ที่ทำร่วมไปด้วยทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ซีรัมตัวอย่าง เมื่อได้ 20 ตัวอย่าง นำมาคำนวณหา CV ซึ่งเรียกว่า RCV

6. การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์

ได้นำวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ โดยเอนไซม์มาแทนวิธีการสกัดแยกไตรกลีย์เซอไรด์ saponified และทำปฏิกิริยาเคมีเพื่อให้เกิดสี โดยปรับปรุงจากวิธีวิเคราะห์ไตรกลีย์ เซอไรด์ของ Bucolo (29) ซึ่งใช้วัดปริมาณ NADH ที่ลดลง เปลี่ยนเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีโดยให้ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับ 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonic acid/4 aminophenazone ซึ่งเป็น chromogen ที่ทำให้เกิดสีแล้วได้ absorbance สูงพอเหมาะทำให้ไม่ต้องใช้ซีรัมตัวอย่างมาก ใช้เพียง 20 ไมโครลิตร ในวิธีการสกัดแยกไตรกลีย์เซอไรด์ และทำปฏิกิริยาด้วยสารเคมีจะใช้ซีรัมตัวอย่าง 0.5 มล.-1 มล. ใช้ potassium ferrocyanide ในปฏิกิริยาเพื่อป้องกันการรบกวนจาก bilirubin ใช้ microbial lipase ที่มี activity สูงเพียงตัวเดียวแทนปฏิกิริยาเดิมที่ใช้เอนไซม์ 2 ตัว คือ proteases และ lipase ใส่ Triton X-100 เป็น surfactant เพื่อแก้ซีรัมขุ่น และความขุ่นที่เกิดจากปฏิกิริยา รายละเอียดของการวิเคราะห์อยู่ในเอกสารหมายเลข 1

นำวิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนานี้ (เอกสารหมายเลข 1) มาทำการวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ จาก lyophylised serum เพื่อหา

1. linearity ของการวิเคราะห์

2. accuracy และ precision ของวิธีวิเคราะห์ โดยการทำ optimal condition variance study (OCV) ของ reference serum ที่มีไตรกลีย์เซอไรด์ ค่าสูง กลาง ต่ำ

3. หา recovery โดยการเติมสารละลาย glycerol ที่ 50, 100, 200 มก./100 มล. ลงใน lyophylised serum

4. วิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ จากอาสาสมัครชายหญิง อย่างละ 200 คน

7. การวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอล

ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมโดยวิธีเอนไซม์แทนการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาเคมี ซึ่งมีการสกัดแยกโคเลสเตอรอล และ saponified โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ เป็นการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ขั้นตอนเดียวซึ่งปรับปรุงจากวิธีของ (30) โดยใช้ Triton X-100 เป็น surfactant เพื่อปรับซีรัมที่ขุ่น ทำให้ไม่ต้องใช้การเจือจางซีรัมก่อนการวิเคราะห์ และปรับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (เอกสารหมายเลข 2) มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณของโคเลสเตอรอลโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นจาก lyophylised serum เพื่อหา

1. linearlity ของการวิเคราะห์

2. accuracy และ precision ของวิธี enzymatic method โดยการทำ optimal condition variance study (OCV) ของ reference serum ที่มีโคเลสเตอรอล ค่าสูง กลาง และต่ำ

3. หา recovery โดยเติมสารละลายมาตรฐาน 50, 100 และ 200 มก./100 มล. ลงใน lyophylised serum

4. หาปริมาณโคเลสเตอรอลด้วยวิธี Direct method Lieberman-Berchard เปรียบเทียบกับวิธี Colorimetric Enzymatic method

8. การแยก lipoprotein โดยวิธี Ultracentrifuge เทคนิค

ทำการพัฒนาวิเคราะห์การปั่นแยก VLDL, LDL และ HDL ในซีรัม โดย ultracentrifuge ด้วยการปั่นแยกเพียงครั้งเดียว ได้ปรับปรุงโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์สองความเข้มข้น (เอกสารหมายเลข 3) แทนการปั่นแยกสองครั้ง (25) มาทำการแยกไลโปโปรตีนทั้งสามชนิดจากกันโดยใช้การปั่นแยกด้วย ultracentrifuge เพียงครั้งเดียว และทำการปั่นแยกสองครั้งจาก pooled serum 20 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้โดยการวิเคราะห์หาโคเลสเตอรอล และไตรกลีย์เซอไรด์ในไลโปโปรตีนแต่ละส่วนเพื่อหา

1. accuracy และ precision โดยการหา SD และ CV ของการวิเคราะห์โคเลสเตอรอล และไตรกลีย์เซอไรด์ในไลโปโปรตีนทั้งสามชนิดโดยการปั่นแยกทั้งสองวิธี

2. recovery ของการปั่นแยกไลโปโปรตีนเพียงครั้งเดียว จากการวิเคราะห์ไตรกลีย์เซอไรด์ และโคเลสเตอรอลใน VLDL, LDL และ HDL

3. recovery ของการปั่นแยกไลโปโปรตีนสองครั้ง จากการวิเคราะห์ไตรกลีย์เซอไรด์ และโคเลสเตอรอลใน VLDL, LDL และ HDL

9. การแยก HDL_2 และ HDL_3 โดย ultracentrifuge เทคนิค

ทำการพัฒนาการปั่นแยก HDL_2 และ HDL_3 จากวิธีของ Wallentin และ Fahracuse (31,32) โดยปรับให้ใช้ซีรัมตัวอย่างน้อยลง ใช้ 4 มล. จากของเดิม 6 มล. เปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลาย KBr ลดเวลาการปั่นแยกจาก 24 ชม. เป็น 22 ชม. นำวิธีที่ได้พัฒนา (เอกสารหมายเลข 6) มาทำการวิเคราะห์ปริมาณ HDL_2 และ HDL_3 โดยการปั่นแยก pooled serum 20 ตัวอย่าง ด้วย ultracentrifuge หาค่าเฉลี่ย SD และ CV ของ HDL_2 และ HDL_3

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ HDL_2 และ HDL_3 จากอาสาสมัครชายหญิง อายุ 35-60 ปี อย่างละ 20 ตัวอย่าง

10. การปั่นแยกไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (HDL)

ทำการปรับปรุงการแยก HDL โดยการตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ (27,28) โดยเพิ่มการปั่นแยกซีรัมที่ขุ่นด้วย centrifuge 12000 x g 10 นาที (เอกสารหมายเลข 4) และปรับปรุงการแยก HDL โดยการตกตะกอนด้วยฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ ปรับ pH 7.4 (เอกสารหมายเลข 5)

1. ทำการแยก HDL จาก pooled serum ที่ขุ่นหรือมีไตรกลีย์เซอไรด์สูง จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยการตกตะกอน VLDL และ LDL ด้วย เฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 mol/L (เอกสารหมายเลข 4)

2. ทำการแยก HDL จาก pooled serum 10 ตัวอย่าง (pooled serum ชุดเดียวกัน) โดยการตกตะกอน VLDL และ LDL ด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 mol/L (เอกสารหมายเลข 4)

3. ทำการแยก HDL จาก pooled serum 10 ตัวอย่าง โดยการนำซีรัมที่ขุ่นไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 12000 x g 10 นาที ก่อนนำไปตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ 1 mmol/L (เอกสารหมายเลข 4)

4. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอลจาก HDL ที่แยกออกมาจาก 3 วิธีดังกล่าวเปรียบเพียบกับปริมาณโคเลสเตอรอลใน HDL ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยวิธี ultracentrifuge

5. ทำการแยก HDL โดยวิธีตกตะกอนด้วยฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 อย่างละ 10 ตัวอย่าง นำ HDL ที่แยกออกมาวิเคราะห์หาโคเลสเตอรอล โดนวิธีเอนไซม์เปรียบเทียบกับ HDL-Cที่ได้จากการปั่นแยกโดยวิธี ultracentrifuge

6. ทำการตกตะกอน HDL จาก pooled serum ที่ใสปกติไม่ขุ่น โดยวิธีเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ 1 mmol/L และฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ pH 7.4 (เอกสารหมายเลข 5) เปรียบเทียบกับวิธีปั่นแยกด้วย ultracentrifuge จำนวน 20 ตัวอย่าง

11. การวิเคราะห์ปริมาณอะโปไลโปโปรตีน

ได้ปรับปรุงการวิเคราะห์อะโปไลโปโปรตีนของวิธี Rocket immuno assay (33,34,35) โดยปรับปริมาณของ agarose และปริมาณของ Dextran T10 เวลาที่ใช้ในการแยกกระแสไฟ pH ของ buffer และสีที่ใช้ย้อม (เอกสารหมายเลข 7) มาทำการวิเคราะห์ปริมาณ Apo A_1 และ Apo B จาก lyophylised serum 20 ตัวอย่าง โดยวิธี rocket electroimmuno assay (RIA) ตามเอกสารหมายเลข 7 นำมาคำนวณหา OCV หรือ within-serum cv เพื่อหา accuracy และ precision ของการวิเคราะห์ Apo A_1 และ Apo B

ทำการวิเคราะห์หา RCV เพื่อหาความแปรปรวนในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง โดยการนำ reference serum ที่วิเคราะห์ในแต่ละครั้งเมื่อได้ 20 ตัวอย่าง นำมาคำนวณหา RCV

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ Apo A_1 และ Apo B ในอาสาสมัครชายอายุ 20-50 ปี จำนวน 70 คน และอาสาสมัครหญิงอายุ 20-55 ปี จำนวน 200 คน

ผลการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์

1.1 วิเคราะห์ Optimal conditions variance study (within-run OCV)

ก่อนที่จะนำวิธีการวิเคราะห์มาใช้วิเคราะห์ซีรัมตัวอย่างต้องทดสอบว่าวิธีที่ใช้วิเคราะห์มี precision accuracy specificity และ reproducibility เป็นอย่างไร ทำได้โดยควบคุมการวิเคราะห์ให้ถูกต้องทุกขั้นตอน ซึ่งรวมทั้งการตรวจสอบเครื่องมือ สารเคมี และวิธีการวิเคราะห์ให้มีความถูกต้องที่สุด

ผลการวิเคราะห์ไตรกลีย์เซอไรด์จากซีรัมที่ทราบค่าจากบริษัท Boehringer Mannheim GmbH มีค่าต่างกันสามระดับคือ ค่าสูง ค่าปกติ และค่าต่ำในครั้งเดียวกันอย่างละ 20 ตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า OCV หรือ within-run CV ของไตรกลีย์เซอไรด์ (มก./100 มล.) แสดงด้วย range, mean ± SD และ CV จำนวน 20 ตัวอย่าง

	Range	Mean ± SD	CV
ค่าสูง			
ผลการวิเคราะห์	282 - 298	288 ± 6.5	2.25
Reference Lab*	247 - 341	294	
ค่ากลาง			
ผลการวิเคราะห์	107 - 116	114 ± 2.1	1.84
Reference Lab*	99 - 137	118	
ค่าต่ำ			
ผลการวิเคราะห์ Reference	42 - 45	4.3 ± 0.76	1.7
Lab*	36 - 50	44	

*Reference Laboratories of the Institue for standardization ที่ Boehringer Mannheim GmbH ได้ให้วิเคราะห์และรวบรวมสถิติไว้

1.2 Routine condition Variance (RCV)

ทำการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอร์ไรด์โดยใช้ pooled serum ค่ากลางและค่าต่ำ ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ครั้งละ 20 ตัวอย่างมาคำรวณค่าเฉลี่ย ค่า SD และ CV ผลการทดลองใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า RCV ของการวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอร์ไรด์จาก pooled serum จำนวน 20 ตัวอย่าง

	Mean ± SD (มก/100 มล)	CV
ค่ากลาง ผลการวิเคราะห์ Reference Lab*	105.9 ± 3.1	2.9
ค่าต่ำ ผลการวิเคราะห์ Reference Lab*	75.5 ± 1.9	2.5

1.3 การทำ recovery

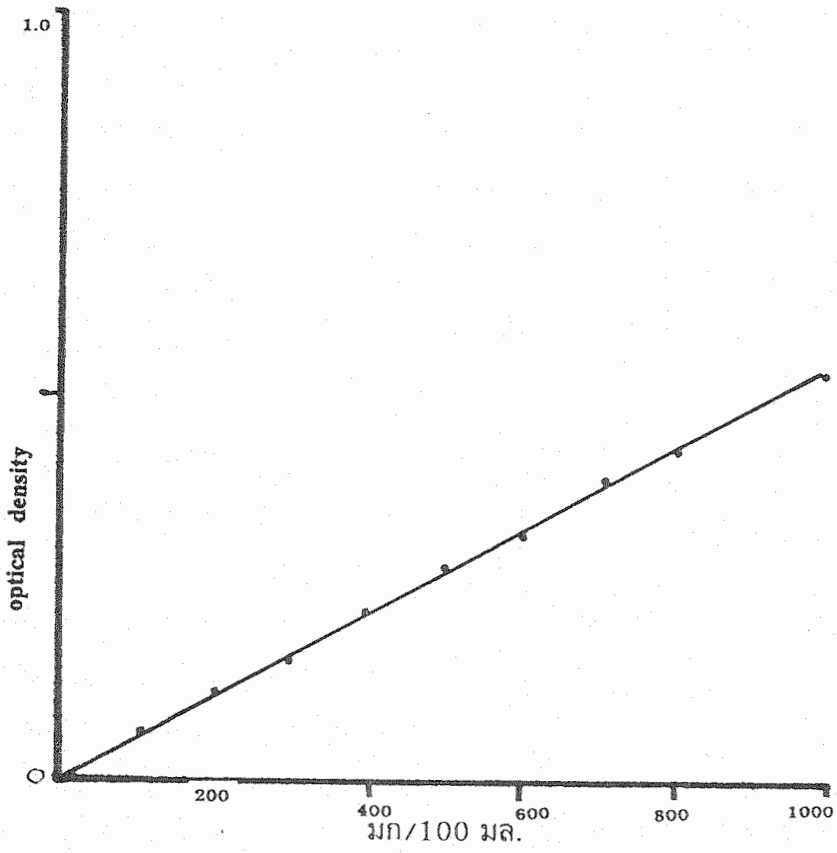
ผลการทำ recovery โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน 50, 100 และ 200 มก./100 มล. ลงใน lyophylised serum ได้ค่า recovery ที่ 99.5, 100.2, และ 100.8% ตามลำดับ

1.4 ค่าปกติของไตรกลีย์เซอไรด์รวม

หาค่าปกติของไตรกลีย์เซอไรด์รวมจากชาย และ หญิง อายุ 20-55 ปี จำนวน 200 คน ได้ค่าเฉลี่ย 125 มก./100 มล.

1.5 Linearity ของการวิเคราะห์ไตรกลีย์เซอไรด์ด้วยวิธีเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ โดยวิธีเอนไซม์ มี linearity ที่ 0-1000 มก./100 มล. (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 เส้นกราฟมาตรฐาน แสดง Lincarity ของการวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอร์ไรด์ โดย Enzymatic Method

2. การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลรวม

2.1 วิเคราะห์ Optimal conditions variance study (OCV หรือ within-run CV)

หา OCV โดยการทำการทดลองหาค่าโคเลสเตอรอลโดยวิธี emzymatic (ในเอกสารหมายเลข 2) ในครั้งเดียวกัน 20 ตัวอย่าง โดยใช้ control serum ค่าสูง กลาง และต่ำ (Precilip ของ Boehringer Mannheim) ผลการทดลองตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า OCV จากการวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอล (มก./100 มล.) จาก lyophylised serum

	Range	Mean ± SD	CV
ค่าสูง			
ผลการทดลอง	381 - 398	388 ± 5.4	1.4
Reference Lab*	338 - 448	393	
ค่ากลาง			
ผลการทดลอง	170 - 175	173 ± 2.1	1.2
Reference Lab*	153 - 195	174	
ค่าต่ำ			
ผลการทดลอง	48 - 52	50 ± 0.87	1.75
Reference Lab*	45 - 55	50	

*Reference Laboratories of the Institue for standardization ที่ Boehringer Mannheim GmbH ได้ให้วิเคราะห์และรวบรวมสถิติไว้

2.2 Routine condition variance

RCV ได้จากการวิเคราะห์ค่าโคเลสเตอรอลที่ได้จากการวิเคราะห์ lyophylised serum ที่ทราบค่าจาก Reference Lab* ที่ทำร่วมไปด้วยทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ซีรัมตัวอย่างครั้งละ 20 ตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ 20 ตัวอย่างมาคำนวณ ได้ค่าเฉลี่ย (ค่ากลาง) 174 มก./100 มล. SD 5.4 CV 3.1 และค่าต่ำได้ค่าเฉลี่ย 51 มก./100 มล. SD 1.4 CV 2.7

2.3 Recovery ของการหาโคเลสเตอรอล

ค่า recovery จากการเติมสารละลายมาตรฐานสามระดับคือ 99.9, 100.6 และ 101.0%

2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลจากอาสาสมัครชายหญิง

ค่าปกติของโคเลสเตอรอลรวม จากชายและหญิงอายุ 20-60 ปี จำนวน 200 คน ค่าปกติเฉลี่ย 240 ± 63.4 มก./100 มล.

2.5 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากวิธี Liberman-Burchard และวิธีเอนไซม์

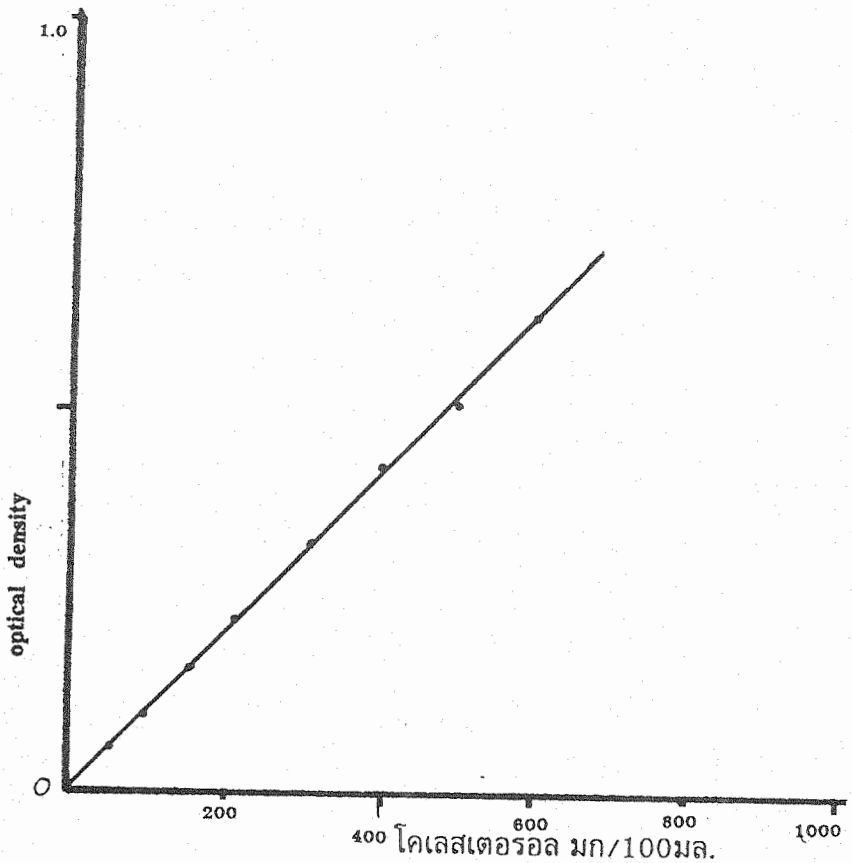
ผลการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล จาก lyophylised serum ค่าสูง กลาง และต่ำ ด้วยวิธี enzymatic method (เอกสารหมายเลข 2) และวิธี Liberman-Burchard จำนวนอย่างละ 20 ตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่า Mean SD และ CV ของการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล ด้วยวิธี Enzymatic และ Liberman-Burchard จาก Lyophylised serum ที่มีระดับโคเลสเตอรอล ค่าสูง กลาง และต่ำ จำนวน 20 ตัวอย่าง

Libeman-Burchard		Enzymatic Method	
Mean ± SD (mg/100 ml)	CV	Mean ± SD (mg/100 ml)	CV
267 ± 9.6	3.6	263 ± 6.2	2.3
170 ± 5.2	3.0	169 ± 3.0	1.7
61 ±1.2	1.9	60 ± 0.95	1.5

2.6 Linerity ของการวิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์

วิธีวิเคราะห์หาโคเลสเตอรอลโดยเอนไซม์นี้ มี linearity 0-600 มก./100 มล. แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2. เส้นกราฟมาตรฐาน แสดง Linearity ของการวิเคราะห์หาปริมาณของโคเลสเตอรอล โดย Enzymatic method

3. การวิเคราะห์ไลโปโปรตีน

3.1 ผลการวิเคราะห์การปั่นแยกไลโปโปรตีน recovery ของการปั่นแยกไลโปโปรตีน

ผลการปั่นแยก pooled serum โดย Ultracentrifugeด้วยการปั่นแยกเพียงครั้งเดียว (เอกสารหมายเลข 3) และสองครั้ง จำนวน 20 ตัวอย่าง นำไลโปโปรตีนที่ได้แต่ละส่วนมาทำการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลรวม และไตรกลีย์เซอไรด์ นำมาคำนวณหา recovery โดยเทียบกับโคเลสเตอรอลรวม และไตรกลีย์เซอไรด์รวมจาก pooled serum ชุดเดียวกัน ผลการวิเคราะห์โคเลสเตอรอล และไตรกลีย์เซอไรด์จากการปั่นแยกครั้งเดียว แสดงไว้ในตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์โคเลสเตอรอล และไตรกลีย์เซอไรด์ จากการปั่นแยกสองครั้ง แสดงไว้ในตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย SD และ CV ของโคเลสเตอรอล (มก./100 มล.) จาก VLDL, LDL, HDL และ recovery ของการปั่นแยกครั้งเดียวจาก pooled serum 20 ตัวอย่าง

Cholesterols	Mean ± SD	CV
VLDL	16.02 ± 0.5	3.1
LDL	116.49 ± 6.9	5.9
HDL	48.09 ± 2.6	5.4
Serum	191.6 ± 3.2	1.7
%Recovery	94.25 ± 5.5	5.8

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย SD และ CV ของปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ (มก./100 มล.) จาก VLDL, LDL, HDL และ recovery ของการปั่นแยกครั้งเดียวจาก pooled serum 20 ตัวอย่าง

Triglycerides	Mean ± SD	CV
VLDL	59.6 ± 3.4	5.7
LDL	28.42 ± 1.5	5.3
HDL	15.3 ± 0.73	4.8
Serum	110.63 ± 0.20	1.8
%Recovery	92.9 ± 4.9	5.3

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล (มก./100 มล.) จาก VLDL, LDL, และ HDL และ recovery ด้วยวิธีปั่นแยกสองครั้งจาก pooled serum 20 ตัวอย่าง

Cholesterols	Mean ± SD	CV
VLDL	14.0 ± 1.5	11.2
LDL	110.9 ± 10.5	9.6
HDL	47.0 ± 3.8	8.0
Serum	191.6 ± 3.2	1.7
%Recovery	86.3 ± 10.4	11.5

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ (มก./100 มล.) จาก VLDL, LDL และ HDL และ recovery ด้วยวิธีปั่นแยกสองครั้งจาก pooled serum 20 ตัวอย่าง

Triglycerides	Mean ± SD	CV
VLDL	58.8 ± 6.3	10.7
LDL	26.0 ± 2.4	9.2
HDL	14.1 ± 1.2	8.2
Serum	110.63 ± 2.0	1.8
%Recovery	84.9 ± 8.6	10.1

3.2 ผลการวิเคราะห์การแยกไลโปโปรตีน โดยการตกตะกอน

1. ผลการแยก HDL-C โดยการตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์

ผลการแยก HDL-C โดยการตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ สองความเข้มข้นเปรียบเทียบกับวิธี ultracentrifuge มีความแตกต่างทางสถิติ P=0.50 การปั่นแยกก่อนการตกตะกอนเปรียบเทียบกับวิธี ultracentrifuge ไม่มีผลแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ HDL-C ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ และวิธี ultracentrifuge จำนวน 10 ตัวอย่าง

วิธีการตกตะกอน	Mean ± SD (มก./100 มล.)	CV
เฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ 0.46 mmol/L	65.9 ± 1.31*	2.0
เฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ 0.46 mmol/L	63.8 ± 1.4*	2.2
ปั่นซีรัมด้วย 12000/g 10นาที	59.3 ± 1.4	2.4
ultracentrifuge	58.7 ± 1.8	3.0

2. ผลการตกตะกอนด้วยฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์

ผลการตกตะกอน HDL-C ด้วยฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ pH 6.0-8.5 เปรียบเทียบกับการปั่นแยก ultracentrifuge แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ HDL-C 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย ฟอสโฟทังสเตตกับแมงกานิสคลอไรด์ (NaPT) ที่ pH ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับวิธี ultracentrifuge

วิธีการตกตะกอน	Mean ± SD (มก./100 มล.)	CV
NaPT pH 6.0	58.0 ± 1.3	2.3
NaPT pH 6.5	58.3 ± 1.2	2.0
NaPT pH 7.0	58.1 ± 1.3	2.4
NaPT pH 7.5	58.3 ± 1.1	1.9
NaPT pH 8.0	113.6 ± 2.4	2.1
NaPT pH 8.5	125.3 ± 2.9	2.3
ultracentrifuge	58.7 ± 1.8	3.0

3. ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ HDL-C โดยการตกตะกอนและการปั่นแยก

ผลการทดสอบการตกตะกอนด้วยวิธี เฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ ความเข้ม 0.46 mmol/L วิธีในเอกสาร (4) และฟอสโฟทังสเตตและแมกนีเซียมคลอไรด์ pH 7.4 (เอกสาร 5) จาก pooled serum แสดงด้วย accuracy และ precision ของการตกตะกอนทั้งสองวิธี และเปรียบเทียบผลการตกตะกอนกับการปั่นแยก (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่า OCV ของการวิเคราะห์ HDL-C 20 ตัวอย่าง ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย เฮปาริน แมงกานิสคลอไรด์ วิธีตกตะกอนด้วย ฟอสโฟทังสเตต และแมกนีเซียมคลอไรด์

วิธี	Mean ± SD (มก./100 มล.)	CV
ตกตะกอน HDL-C โดยใช้วิธีเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์	50.5 ± 1.2	2.4
ตกตะกอน HDL-C โดยใช้วิธีฟอสโฟทังสเตต และแมกนีเซียมคลอไรด์	46.2 ± 4.6	2.1
แยกด้วยวิธี ultracentrifuge เทคนิค	47.1 ± 6.2	3.4

4. การแยก HDL_2 และ HDL_3

4.1 ผลการแยก HDL_2 และ HDL_3

โดยใช้ pooled serumซึ่งเก็บไว้ในที่ 4°C (ในตู้เย็น) ไม่เกิน 5 วัน จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยวิธีการปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge (เอกสารหมายเลข 6) แสดงด้วยค่าเฉลี่ย SD และ CV ในตารางที่ 12

4.2 ผลการวิเคราะห์ HDL_2-C

จากซีรัมตัวอย่างของชาย 20 ตัวอย่าง และหญิง 20 ตัวอย่าง อายุระหว่าง 35-60 ปี ค่า HDL-C ในชาย 45.5 ± 10.4 มก./100 มล. HDL_2-C 10.5 ± 5.9 มก./100 มล. ค่า HDL-C ในหญิง 55.5 ± 10.8 มก./100 มล. และ HDL_2-C 16.6 ± 7.4 มก./100 มล.

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ HDL_2-C , HDL_3-C ค่าเฉลี่ย SD, CV ของ HDL_2 และ HDL_3 จาก pooled serum 20 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	Mean ± SD (มก./100 มล.)	CV
HDL_2-C	11.9 ± 0.46	3.9
HDL_3-C	35.2 ± 1.2	3.4
HDL-C (ultracentrifuge)	47.1 ± 6.2	3.4

5. การวิเคราะห์หาค่า Apo A_1 และ Apo B

5.1 ผลการวิเคราะห์หา OCV หรือ within-run cv. โดยใช้ plate ขนาด 100 มล. และ 200 มม. ใช้ standard 5 ความเข้มข้น (เอกสารหมายเลข 7) จาก Reference serum จำนวน 20 ตัวอย่าง และผลการวิเคราะห์หาค่า RCV ของการวิเคราะห์ Apo A_1 และ Apo B ของ Reference serum ที่ใช้เป็น control serum วิเคราะห์ร่วมไปทุกครั้งที่การวิเคราะห์สารตัวอย่าง (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ค่า OCV, RCV ของ Apo A_1 และ Apo B วิเคราะห์จาก Reference serum จำนวน 20 ตัวอย่าง

	Meand ± SD (กรัม/100 มล.)	CV
Reference Lab	1.21	
OCV Apo A_1	1.28 ± 0.064	5.0
RCV Apo A_1	1.19 ± 0.136	11.4
Reference Lab	1.114	
OCV Apo B	1.11 ± 0.58	5.2
RCV Apo B	1.01 ± 0.113	11.2

5.2 ผลการวิเคราะห์ Apo A_1 และ Apo B

จากการวิเคราะห์หาค่าปกติในชายอายุ 20-50 ปี จำนวน 70 คน และในหญิงอายุ 20-55 ปี จำนวน 200 คน พบว่าค่าปกติของชายต่ำกว่า Apo A_1ของหญิงเล็กน้อย ในและได้ค่าปกติ 1.3 ± 0.30 กรัม/100 มล. และชาย 1.20 ± 0.20 กรัม/100 มล. และค่าปกติของ Apo B ในชาย1.20 ± 0.21 กรัม/100 มล. และ 0.94 ± 0.28 กรัม/100 มล. ในหญิง

ตารางที่ 14 ค่าปกติของ Apo A_1 และ Apo B จากอาสาสมัครชายหญิง อายุ 20-55 ปี

	อายุ	N	Apo A_1 (กรัม/100 มล.)	Apo B (กรัม/100 มล.)
ผู้ชาย	20-50	70	1.20 ± 0.20	1.20 ± 0.21
ผู้หญิง	20-55	200	1.30 ± 0.32	0.94 ± 0.28

วิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ไตรกลีย์เซอไรด์ โดยวิธีเอนไซม์จาก lyophilized serum ค่าระดับสูง กลาง ต่ำ มีค่าเฉลี่ย 288±6.5, 114±2.1 และ 4.3±0.76 มก./100 มล. ตามลำดับ ค่า CV 2.25, 1.84 และ 1.7 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ผลการวิเคราะห์มีค่า CV ต่ำ เชื่อถือได้ดี ตามมาตรฐานของ The Center for Disease control National Heart, Lung and Blood Institute (CDC-NHLBI)(36) ผลที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง และยังมี linearity สูงถึง 1000 มก./100 มล. (รูปที่ 1) ซึ่งวิธีวิเคราะห์โดยใช้ปฏิบัติกิริยาจากสารเคมี มี linearity เพียง 0-100 มก./100 มล. (37) ผลจากการวิเคราะห์ pooled serum ค่า RCV (ตารางที่ 2) มีค่ากลางเฉลี่ย 105.9 ± 3.1 มก./100 มล., CV 2.9 และค่าต่ำมีค่าเฉลี่ย 75.5±1.9 มก./100 มล. CV 25 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับสำหรับการทำ RCV จะเห็นว่าวิธีนี้มีความถูกต้องแม่นยำ และมีความแปรปรวนต่ำสามารถใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

ผลดีของการวิเคราะห์โดยเอนไซม์วิธีนี้คือ ใช้ปริมาณของซีรัมตัวอย่างน้อยมาก และมี linearity สูง สามารถวิเคราะห์ซีรัมที่มีปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์สูงได้โดยไม่ต้องเจือจางซีรัม ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย มีขั้นตอนเดียว (single step) ทำให้มีความถูกต้องแม่นยำสูง และมีความจำเพาะสูง ไม่ทำปฏิกิริยากับ bilirubin และสารที่ทำให้เกิดสีอื่น ๆ ที่มีอยู่ในซีรัม หรือยาบางชนิด (38) ซึ่งสารเหล่านี้ สามารถรบกวนการวิเคราะห์ไตรกลีย์เซอไรด์ โดยใช้ปฏิกริยาจากสารเคมี สามารถวัดซีรัมที่ขุ่นได้ โดยไม่ต้องเจือจาง และไม่ต้องทำซีรัม blank เช่น วิธีเอนไซม์ที่ใช้วัดค่า NADH ที่ลดลง (29)

การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธี Libermann-Burchard เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง แต่ใช้ acetic anhydride ซึ่งมีกลิ่นฉุนและเป็นอันตรายต่อระบบหายใจ และนัยตาสาร acetic anhydride หาซื้อได้ยากเพราะเป็นสารเคมีที่มีการควบคุมพิเศษ และวิธีการต้องใช้ความชำนาญและการควบคุมอุณหภูมิอย่างดี จึงจะได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ได้นำวิธีเอนไซม์มาวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอล ซึ่งจะลดอันตรายจากสารเคมี มีความสะดวกและปลอดภัยในการเตรียมสารละลาย ผลจากการวิเคราะห์โคเลสเตอรอลรวมจาก lyophylised serum ที่ทราบการวิเคราะห์จากห้องทดลองมาตรฐาน สามระดับ สูง กลาง และต่ำ (ตารางที่ 3) ได้ค่าเฉลี่ยที่ยอมรับได้จากห้องทดลองมาตรฐาน ซึ่งมีความแตกต่างน้อยมาก และมี CV ที่ต่ำมากไม่เกิน 2% ทุกระดับ วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ โคเลสเตอรอลรวม และโคเลสเตอรอลในส่วนของไลโปโปรตีนอื่น ๆ ซึ่งมีค่าต่ำได้อย่างดีด้วย

วิธีนี้มี Linearity ถึง 600 มก./100 มล. (รูปที่ 2) เป็นผลดีเมื่อมีค่าโคเลสเตอรอลสูง สามารถทำการวิธีได้ถูกต้องโดยไม่ต้องเจือจางซีรัมก่อนทำการวิเคราะห์ การใช้ Triton X-100 เป็น surfactant จะสามารถวิเคราะห์ซีรัมที่ขุ่นได้ โดยไม่ต้องเจือจางซีรัม

ซีรัมที่มี protein และ bilirlubin สูง ซีรัมที่ haemolyse ซึ่งเกิดขึ้นบ่อยในการปั่นแยกซีรัม มีผลต่อการวิเคราะห์โดยวิธี Liberman Burchard และปฏิกิริยาเคมีที่เกิดสี (39) ทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดไปมาก วิธีเอนไซม์เป็นวิธีที่มี Specificity สูง จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารเหล่านี้ จึงให้ผลที่ถูกต้องกว่า โคเลสเตอรอลในระดับที่ใช้วิเคราะห์มากคือ 50-200 มก./100 มล. ซึ่งค่า SD และ CV ที่ได้จากการวิเคราะห์ทุกครั้งก็มีค่าต่ำ จึงเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ได้ในการตรวจวิเคราะห์ทั่วไป และในงานวิจัย

การแยกไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่าง ๆ ออกจากกัน และนำมาศึกษาองค์ประกอบของไขมันในไลโปโปรตีนแต่ละส่วนนั้น จำเป็นจะต้องได้วิธีที่ปั่นแยกชั้นไลโปโปรตีนออกจากกันได้อย่างชัดเจน เพื่อช่วยในการตัดแยกส่วนต่างๆ ออกจากกัน ผลการปั่นแยกไลโปโปรตีนด้วยการปั่นแยกเพียงครั้งเดียว ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนั้น จะมี recovery ของการแยกไลปิดส่วนต่างๆ โดยใช้โคเลสเตอรอลและไตรกลีย์เซอไรด์เป็นตัววัด ได้ recovery ของโคเลสเตอรอลเฉลี่ย 94.25 ± 5.5 มก./100 มล., CV 5.8 (ตารางที่ 5) recovery เฉลี่ยของไตรกลีย์เซอไรด์ 92.9 ± 4.9 มก./100 มล., CV 5.3 (ตารางที่ 6) ส่วนค่า recovery ของการปั่นแยกสองครั้งของโคเลสเตอรอลเป็น 86.0±10.4 มก./100 มล., CV 11.5 (ตารางที่ 7) และ recovery ของไตรกลีย์เซอไรด์เป็น 84.9 ± 8.6 มก./100 มล., CV 10.1 (ตารางที่ 8) ซึ่งได้ค่า recovery ที่ต่ำกว่าการปั่นแยกเพียงครั้งเดียว อาจเกิดจากการมีขั้นตอนในการแยกสารละลายออกมาหลายครั้งเพื่อทำการปั่นแยกสองครั้ง ทำให้เกิดการสูญเสียไปในขบวนการวิเคราะห์มากกว่าวิธีการปั่นแยกไลโปโปรตีนทั้งสามส่วนเพียงครั้งเดียว การปั่นแยกเพียงครั้งเดียวซึ่งเป็นวิธีที่สั้น ง่าย ประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และได้ค่า recovery ที่ดีกว่าการปั่นแยกสองครั้ง

ผลการวิเคราะห์ค่าโคเลสเตอรอลในไลโปโปรตีนด้วยการปั่นแยกครั้งเดียว (ตารางที่ 5) ค่าเฉลี่ย SD และ CV ของ VLDL 16.03±0.5 มก./100 มล., CV 3.1 ของ LDL 116.49± 6.9 มก./100 มล., CV 5.9 และของ HDL 48.09±2.6 มก./100 มล., CV 5.4 ผลการวิเคราะห์จากการปั่นแยก 2 ครั้ง ใน ตารางที่ 7 มีค่า VLDL 14.0±1.5 CV 11.2 ค่า LDL 110.9±10.5 มก./100 มล., CV 9.6 และค่า HDL 47.0±3.8 มก./100 มล., CV 8.0 ผลจากการปั่นแยกครั้งเดียวจะมีความถูกต้องมากกว่า และมีความแปรปรวนน้อยกว่าการปั่นแยกสองครั้ง

ผลการวิเคราะห์ค่าไตรกลีย์เซอไรด์ จากการปั่นแยกครั้งเดียว (ตารางที่ 6) แสดงค่าเฉลี่ย SD และ CV มีค่า VLDL 59.06±3.4 มก./100 มล., CV 5.7 LDL 28.42±1.5 มก./100 มล., CV 5.3 และ HDL 15.3±0.73 มก./100 มล., CV 4.8 และผลวิเคราะห์จากการปั่นแยกสองครั้ง (ตารางที่ 8) มีค่า VLDL 58.8±6.3 มก./100 มล., CV 10.7, LDL 26.0±2.4 มก./100 มล., CV 9.2, และ HDL 14.1±1.2 ได้ผลเช่นเดียวกับค่าไตรกลีย์เซอไรด์คือ ค่าเฉลี่ยทั้งสองวิธีจะใกล้เคียงกัน แต่ค่า CV จะสูงกว่าเกือบ 2 เท่า เนื่องจากการมีขั้นตอนการวิเคราะห์มาก ควบคุมการแปรปรวนได้ยากกว่า การดัดแปลงเพื่อตัดขั้นตอนการวิเคราะห์ลงให้เป็นการปั่นแยกเพียงครั้งเดียว จึงเป็นวิธีที่เร็วกว่าและได้ผลในการวิเคราะห์ที่ดีกว่าการปั่นแยก 2 ครั้ง

การปั่นแยกไลโปโปรตีนออกเป็นสามส่วนในครั้งเดียวกันจะช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ได้อย่างมาก วิธีปั่นแยกด้วย centrifuge นี้ เป็น reference method เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปเพื่อใช้ในการวิจัยการเปลี่ยนแปลงของไลปิดและไลโปโปรตีนเมตาบอลิสม และการแยกไลโปโปรตีนเพื่อต้องการสารที่บริสุทธ์ แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ไม่เหมาะแก่การใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไป หรือการตรวจคัดกรองที่ต้องการบอกผลผู้มารับบริการในเวลาจำกัด เนื่องจากเป็นวิธีการที่ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์การวิเคราะห์ราคาแพง เสียค่าบำรุงรักษาสูง และยังต้องใช้ผู้ที่มีความรู้ความชำนาญโดยเฉพาะ จึงได้พัฒนาการแยกไลโปโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันโดยการตกตะกอนไลโปโปรตีนด้วยวิธีต่าง ๆ แทนที่การปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge

วิธีตกตะกอนที่ใช้ในการทดลองนี้ ใช้วิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ และการตกตะกอนด้วยฟอสฟอทังสเตต และแมกนีเซียมคลอไรด์ วิธีตกตะกอนด้วยฟอสฟอทังสเตตเป็นวิธีที่ได้ผลใกล้เคียงกับวิธี ultracetrifuge แต่การตกตะกอนไม่ค่อยดี มักจะได้ค่าที่ไม่คงที่ จากผลการทดลองวิเคราะห์ HDL-C โดยการปรับ pH ของฟอสฟอทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ pH 6-8 พบว่าเมื่อใช้สารละลายที่มี pH สูงกว่า 7.5 VLDL และ LDL จะตกตะกอนไม่หมด บางส่วนจะอยู่ใน supernate ซึ่งนำไปวิเคราะห์หา HDL-C จะได้ค่าของ HDL-C สูง (ตารางที่ 10) จึงเลือกใช้สารละลายฟอสฟอทังสเตต pH 7.4 เป็นวิธีตกตะกอนที่จะใช้ต่อไป ในการทำการทดลองวิเคราะห์

วิธีตกตะกอนที่ใช้ในการทดลองนี้ ใช้วิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ และการตกตะกอนด้วยฟอสโฟทังสเตต และแมกนีเซียมคลอไรด์ วิธีตกตะกอนด้วยฟอสโฟทังสเตตเป็นวิธีที่ได้ผลใกล้เคียงกับวิธี ultracentrifuge แต่การตกตะกอนไม่ค่อยดี มักจะได้ค่าที่ไม่คงที่ เนื่องจากการตกตะกอนนั้นขึ้นอยู่กับ pH ของฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งใช้แตกต่างกัน คือ pH 6.2, pH 7.4 (40) pH 7.6 (37) และส่วนมากจะไม่มีการปรับ pH ของสารละลาย (41) จากผลการทดลองวิเคราะห์ HDL-C โดยการปรับ pH ของฟอสโฟทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ pH 6-8 พบว่าเมื่อใช้สารละลายที่มี pH สูงกว่า 7.5 VLDL และ LDL จะตกตะกอนไม่หมด บางส่วนจะอยู่ใน supernate ซึ่งนำไปวิเคราะห์หา HDL-C สูง (ตารางที่ 10) จึงเลือกใช้สารละลายฟอสโฟทังสเตต pH 7.4 ซึ่งอยู่ในช่วงกลางและใกล้เคียงกับ pH ของซีรัม เป็นวิธีตกตะกอนที่จะใช้ต่อไป ในการทำการทดลองวิเคราะห์

การตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิส 46 mmol/L เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ในซีรัมขุ่น หรือมีไตรกลีย์เซอไรด์สูง จะตกตะกอน VLDL และ LDL ได้ไม่หมด ทำให้ไลโปโปรตีนทั้งสองส่วนนี้ปนอยู่ในส่วนที่เป็น supernate ที่มี HDL อยู่ ทำให้วิเคราะห์ค่า HDL ได้สูงเกินไป จึงทำการแก้ไขโดยการเพิ่มความเข้มข้นของเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์เป็น 92 mmol/L การตกตะกอน VLDL และ LDL ดีขึ้น แต่ความข้นของแมงกานิส ไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ ทำให้การวิเคราะห์ค่าของ HDL-C ได้สูงเช่นกัน ในการวิจัยนี้ได้ใช้วิธีปั่นซีรัมที่ขุ่นอีกครั้งด้วย ที่ 12000 x g 10 นาที แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ด้วยการตกตะกอนโดยเฮปารินแมงกานิส 46 mmol/L ผลการทดลองนี้เปรียบเทียบการตกตะกอน ยกับสองวิธีดังกล่าวกับการปั่นแยกด้วย ultracentrifuge ในตารางที่ 9 พบว่าการทดลองปั่นแยกซีรัมที่ 12000 x g 10 นาที ก่อนนำมากตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ 46 mmol/L กับวิธีปั่นแยกด้วย ultracentrifuge ไม่มีผลแตกต่างทางสถิติ การตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ 46 และ 92 mmol/L จะมีความแตกต่างกับวิธีปั่นแยกโดย ultracentrifuge อย่างมีนัยสำคัญ P=0.05

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์การตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ฟอสฟอทังสเตตกับแมกนีเซียมคลอไรด์เปรียบเทียบกับวิธี ultracentrifuge (ตารางที่11) ทั้งสามวิธีจะให้ค่าเฉลี่ย SD และ CV ใกล้เคียงกัน วิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสให้ค่าเฉลี่ยสูงกว่าวิธีปั่นแยกด้วย ultracentrifuge เปรียบเทียบผลการทดลองด้วยวิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินกับวิธี ultracentrifuge วิธีตกตะกอนด้วยฟอสฟอทังสเตตและแมกนีเซียมครอไรด์ กับวิธีปั่นแยกด้วย ultracentrifuge ทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติวิธีตกตะกอนทั้งสองนี้สามารถนำมาใช้แทนการปั่นแยกด้วย ultracentrifuge

การปั่นแยกด้วยวิธีฟอสโฟทังสเตตจะมีผลดีคือ เป็นสารที่หาง่ายในห้องปฏิบัติการทั่วไป ส่วนเฮปารินนั้นแต่ละ batch จะมีผลต่อการตกตะกอน HDL ได้ไม่เท่ากัน ต้องทำการตรวจสอบทุกครั้งที่เมื่อใช้เฮปาริน batch ใหม่ เฮปารินมีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ การใช้เฮปารินความเข้มข้นสูง จะมีผลต่อการหาปริมาณโคเลสเตอรอลด้วยวิธีเอนไซม์ (42)

การพัฒนาการแยก HDL_2 และ HDL_3 โดยใช้ KBr สองความเข้มข้น (เอกสารหมายเลข 6) ในการทดลองนี้จะช่วยให้การแยกชั้นของ HDL_3 ชัดขึ้น ใช้ซีรัมน้อยลงและใช้เวลาในการปั่นแยกน้อยลง

การแยก HDL_2 และ HDL_3 โดยวิธีปั่นแยกด้วย ultracentrifuge จาก pooled serum 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 12) HDL_3 มีค่าเฉลี่ย 35.2±1.2 มก./100 มล., CV 3.4, HDL_2 มีค่าเฉลี่ย 11.9±0.46 มก./100 มล., CV 3.9 ซึ่งมีค่า SD, CV ต่ำ มีความแม่นยำสูง

การแยก HDL_2 และ HDL_3 โดยวิธีปั่นแยกด้วย ultracentrifuge จาก pooled serum 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 12) HDL_3 มีค่าเฉลี่ย 35.2±1.2 มก./100 มล., CV 3.4, HDL_2 มีค่าเฉลี่ย 11.9±0.46 มก./100 มล., CV 3.9 ซึ่งมีค่า SD, CV ต่ำ มีความแม่นยำสูง

การวิเคราะห์ค่า HDL_2 และ HDL_3 นี้มีความสำคัญมาก HDL_2 เป็นส่วนที่จะเพิ่มขึ้นหรือลดลง เมื่อสภาพไลปิดเมตาบอลิสมของร่างกายเปลี่ยนไปจากปัจจัยต่างๆ เช่น อาหาร ยา ฮอร์โมน หรือการสูบบุหรี่ และเป็นค่าที่จะบอกอัตราเสี่ยงการเกิด CHD และ artherioselerosis HDL_2 เป็นไลโปโปรตีนที่มีปริมาณของโคเลสเตอรอลต่ำมาก จึงควรจะมีการทดสอบการแยก HDL_2 และ HDL_3 เนื่องจากการปั่นแยกไลโปโปรตีนไม่สามารถแยกจาก lyophylised ซีรัมที่มีการวิเคราะห์ปริมาณไลโปโปรตีนจาก reference Lab จึงควรทำการวิเคราะห์สารตัวอื่น เช่น Apo A_1 และ Apo A_2 หรือ ฟอสฟอไลปิด ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่มากเป็นลักษณะเฉพาะของ HDL และหา Apo B ซึ่งมีมากใน LDL เพื่อทำการทดสอบการปนเปื้อนของ LDL ที่อาจจะปนเข้ามาในส่วนของ HDL จาก LDL ซึ่งในการทดลองนี้ไม่ได้ทำ

การวิเคราะห์ Apo A_1 และ Apo B. ด้วยวิธี electroimmuno assay (EIA) นี้จะเป็นวิธีที่ทำได้จำนวนมากในแต่ละครั้ง ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกกว่าการวิเคราะห์หา apoprotien โดยวิธี immuno precipitation assay โดยวัด turbity ที่เกิดขึ้นด้วย spectrophotometer วิธีนี้ต้องใช้ antiserum เป็นจำนวนมาก วิธี EIA จะวิเคราะห์ได้มากกว่าถึง 10 เท่า แต่วิธี immuno precipitation assay นี้จะทำได้รวดเร็วกว่าวิธี EIA มาก เหมาะที่จะทำในห้องทดลองที่ต้องการผล

เร็วและมีจำนวนไม่มาก การวิเคราะห์หา Apoprotien ด้วยวิธี EIA นี้ จะต้องทำ standard และ control คู่ไปทุกวัน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ Apo A_1 และ Apo B จาก reference serum จำนวน 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 13) ได้ค่าเฉลี่ย Apo A_1 1.28±0.136 กรัม/100 มล. มีค่า OCV 5.0 การวิเคราะห์ OCV ของ Apo B มีค่าเฉลี่ย 1.11±0.058 กรัม/100 มล OCV 5.2 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ Apo A_1, Apo B จาก reference Lab ซึ่งมีค่า Apo A_1 และ Apo B เฉลี่ย 1.21 และ 1.14 กรัม/100 มล. ตามลำดับ และมีค่า CV ที่อยู่ในเกณฑ์เชื่อถือได้

ส่วนการวิเคราะห์ RCV ค่าเฉลี่ยมีความถูกต้องสูงเช่นเดียวกับการค่าที่ได้จาก OCV แต่ค่าความแปรปรวนสูงกว่ามาก ซึ่งเป็นเพราะการวิเคราะห์หาอะโปโปรตีนโดยวิธี EIA มีตัวแปรหลายอย่าง คือความสูงของ peak ที่เกิดขึ้นในแต่ละ plate จะขึ้นอยู่กับปริมาณของ Apoprotein ที่จะวัดปริมาณของ Antiserum ที่ต่างกันในแต่ละ batch ความคงที่ของกระแสไฟฟ้าขณะการทำการวิเคราะห์แต่ละครั้ง รวมทั้งความเข้มข้นของ buffer ซึ่งใช้อยู่ทุกครั้งว่ามีความเข้มข้นเปลี่ยนไปจากเดิมหรือไม่ ในการวิเคราะห์ Apoprotein ในห้องปฏิบัติการ จึงต้องคำนึงถึงตัวแปรเหล่านี้ และทำการทดสอบความถูกต้องอยู่เสมอ

การหาค่าปกติของไลปิดและอะโปไลโปโปรตีนในการทดลองนี้ ยังไม่เป็นค่าปกติที่แท้จริง จำนวนตัวอย่างมีปริมาณ 200 ตัวอย่าง แต่มีช่วงอายุไม่เท่ากันทั้งชายและหญิง บางช่วงอายุ เช่น ในชายกลางคนถึงสูงอายุไม่ค่อยมาตรวจร่างกายตามปกติเช่นสตรี จึงไม่ค่อยมีอาสาสมัครในช่วงนี้ และในสตรีจะมีมากในช่วง 40-50 ปี และหลังจากหมดประจำเดือน เห็นได้ชัดในปริมาณของ HDL-C ของสตรีสูงกว่าชาย ทำให้ไม่สามารถแบ่งตามช่วงอายุได้และจำนวนประชากรตัวอย่างน้อยเกินไป การหาค่าปกติที่จะเป็นตัวแทนของประชากรทั่วไปจะต้องครอบคลุมประชากรได้ทุกกลุ่มอายุ และมีจำนวนมากพอ

การวิเคราะห์หาปริมาณของไลปิดและไลโปโปรตีนมีวิธีการวิเคราะห์ได้หลายวิธี ซึ่งความผิดพลาดของแต่ละวิธีไม่เท่ากัน จึงควรเลือกการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง (accuracy) และ ความแม่นยำ (precision) สูง แต่มีขั้นตอนการวิเคราะห์หลายขั้นตอน จะควบคุม precision ได้ยากขึ้น นอกจากการควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ serum control และ pooled ซีรัมแล้ว การวิเคราะห์ไลปิดยังเกี่ยวข้องกับการเตรียมตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ คือการเตรียมตัวให้ผู้มาเจาะเลือด อดอาหารตามกำหนดอย่างเคร่งครัด เพราะปริมาณของไลปิดและไลโปโปรตีนใน fraction ต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก อาหาร และเวลาที่อดอาหารก่อนจะมาเจาะเลือดด้วยเป็นอย่างมาก การขนส่งและการเก็บตัวอย่างก็มีผลต่อการวิเคราะห์ โดยเฉพาะงานวิจัยที่ต้องการตีพิมพ์หรือเสนอผลงานในระดับประเทศจะต้องมี Quality control ที่ดีทั้งขบวนการ

สรุปผล

1. การหาไตรกลีย์เซอไรด์และโคเลสเตอรอล โดยวิธีเอนไซม์จะมีความแม่นยำสูง และมีความแปรปรวนน้อยกว่าวิธีที่ต้องผ่านขั้นตอนของการสกัดไขมันออกก่อน และทำได้รวดเร็วกว่า

2. การแยกไลโปโปรตีนโดยการปั่นแยกเพียงครั้งเดียวจะมีความแปรปรวนต่ำกว่าการปั่น

แยกสองครั้ง และ recovery ของการปั่นแยกเพียงครั้งเดียว จะมีค่าสูงกว่าการปั่นแยกสองครั้ง โดยวัดจาก recovery ของไตรกลีย์เซอไรด์และโคเลสเตอรอล

3. ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่อง ultracentrifuge จะหาค่า HDL-C ได้โดยวิธีตกตะกอนด้วยเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ หรือ ฟอสโฟทังสเตต และแมกนีเซียมคลอไรด์

เอกสารอ้างอิง

1. Hulley SB, Rosenman RH, Bausol RD et al. Epidemiology a guide to clinical decisions N Engl J Med. 1980; 302: 1383-9

2. Levy RI. Cholesterol, Lipoproteins, Apoproteins, and Heart Disease: Present Status and Future Prospects Clin Chem, 1981; 27 (5); 653 - 662

3. Kelsey SF, vranizan K, Levy RI. Intermediate Density lipoproteins and progression of coromary artery disease in hypercholesterolemic men. Lancet 1987; 62-66

4. Castelli WP, Mass F. The Triglyceride issue: A View from Framingham. Am heart J. 1986; 112:432

5. Arntzenius AC, Van Bent CM, Van der Voort H, and Stegerhuch CL. Reduced high density lipoprotein in women aged 40-41 using oral contraceptives, Lancet. 1978: I, 1221.

6. Hjortland MC., Menamara PM, and Kannel WB. Some athereogenic concomitants of menopause: The Framingham study. Am J. Epidemiol 1076; 103: 304-31

7. Lipid Researcn Clinics Program. The relationship of reduction in Incidence of coranary heart disease to Cholesterol lowering. J am Med Ass. 1984; 251:365 - 374

8. Carson LA, Bottiger LE. Serum triglycerides to be or not to be a risk factor for ischemic heart disease? Atherosclerosis. 1981; 39: 287 - 291

9. Grandy SM. Pathogenesis of hyperlipoproteinemia J Lipid Res 1984; 25: 1611 -1618

10. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis an update. 1986; 314: 488-500

11. Castelli WP, Doyle J, Hamed CG et al. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart diseases: The cooperative lipoprotein phenotyping study. Circulation. 1977; 55: 767 - 772

12. Fellin R. Baronil, Baiocehi M.R. et al. Selective determination of cholesterol in high density lipoprotein subfractions (HDL_2 and HDL_3) in patients with cerebral and peripheral artheriosclerosis. Clin. Chem Acta 1985; 14:233-238

13. Fahraeus L, Sydsjo A. and Wallentin L. Lipoprotein changes during treatment of pelvic endometriosis with medroxey progesterone acetate. Fertil steril 1986; 45: 503-5096

14. Stampfer MJ, Sack FM, Salvinis, et al. A prospective study of Cholesterol, Apolipoproteins and the risk of Mryocardial Infraction. N ENG J MED. 1991; 325: 378 - 81

15. Wnayne TF, Alaupvic P, Curry MD et al. Plasma apalipoprotien B. and VLDL, LDL and HDL- cholesterol as risk factors in the development of coronary artery disease in male patients examined by angiograpny. Atheriselerosis 1981; 39: 411-424

16. Bisselt JK, Wyeth RP, Matts JP. et al. Plasma lipid concentrations and subsequent coromary occlusion After a first Myocardial Infraction. AM J Med Sci 1993; 305(3): 139-144

17. De Backer G, Rosseneu M. Discrimination value of lipids and apoproteins in coronary heart disease. Atherosclerosis 1982; 42: 197 - 203

18. Kannel WB. High density lipoprotein : Epidemiologic profile and risks of coranary artery disease. 1983 AM. J. Cardiol 52 : 9B -12B

19. Lewis B, Chait A, Sigurdson G et al. Serum lipoproteins in four European community. Fur.J. Clin Invest. 1978; 8:165-173

20. Davis CE, Gordon D, La Rosa J, et al. Correlations of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels with other plasma lipid and lipoprotein concentrations. The lipid research clinics program prevalence study. Circulation 1980; 62, Suppl: 24 - 30

21. Kostnes GM. Apolipoproteins and lipoproteins of human plasma: Significance in health and in disease Lipid Res. 1983; 20:1-43

22. Abell LL, Levy Bb, Porodie BB, et al A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity J Biol chem 1952; 195: 357 - 366

23. Reinhold JG, Joman VL, Gershman ER, et al. Measurement of total esterified fatty acid and triglyceride concentrations in serum. 1963; 4: 85 - 88

24. Flecter MJ. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. Clin Chim Acta 1968; 22: 393 - 397

25. Havel RJ, Eder HA, and Bragdon, JH. The distribution and chemical composition of utracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J. Clin. Invest. 1955; 34: 1345-1353

26. Buring JE, O'connor GT, Goldhaber SZ et al. Decreased HDL_2 and HDL_3 cholesterol, Apo A-I and Apo A-II, and increased risk of Myocardial Infarction. Circulation 1992; 85:22-29

27 Warnick, GR and Albers JJA comprehensive evaluation of the heparin mangarese precipitation for estimating high density lipoprotein cholesterol. J. Lipid Res. 1978; 19;65-76

28 Burstein M, Scholnich HR, and Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. J. Lipid res. 1970; 11: 583 - 595

29 Bucolo G, David H. Quantitatives determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin Chem 1973, 19: 476-482

30. Tietz WN. Fundamentals of clinical chemistry. 2 ed. Philadelphia: W.B. Sauders, 1986. 474-475

31. Wallentin L. and fahraeus L. HDL 2 and HDL3 determination by a combined ulrtacentrifugation and precipitation procedure Clin Chim Acta 1981; 116: 199 - 208

32. Kirstein P. and Carlson K. Determinatin of the cholesterol content of high density lipoprotein subfractions HDL_2 and HDL_3 with out contamination of Lp(a), in human plasma. Clinica. Chimica Acta. 1981; 113 : 123-124

33. Laurell, CB. Electroimmuno assay. Scand J clin. Lab. Invest 1972; 29, suppl 124: 21 - 37

34 Steinberg KK, Cooper GR, Graiser SR, et al Some coneiderations of methodology standardization of Apolipoprotein A limmuno - assays. Clin chem 1983; 29,3: 415 - 429

35 Curry MD, Mcconathy UJ, and Alaupovic P. Quantitative determination of human apolipoprotein by electroimmuno assay and radial immunodiffusion Biochim, biophyo Acta 1977; 491: 232 - 241

36 The centers for disease Control-Nation heart lung, and blood Institute Manual: Criteria for acceptable performance for Lipid Standardization Program. Revised September1984: 5-7

37 Soloni FG. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides- Clin Chem. 1972; 17,6: 529-534.

38. Fossati, P., Prencipe, L., and Berti, G., Use of 3,5-dicholoro-2-hydroxy benzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem. 1980; 26: 227-231

39. Tietz WN. Fundamentals of clinical chemistry. Philadelphia: W.B. Sauders, 1970. 352-355

40. Kostner GM, Avogaro P, Bittolo G, et al. Determination of high density lipoprotiens. Scraning methods compared Clin Chem.1979; 25:939-942

41. Lopes-Virella MF., Stone P., Ellis S., et al. Cholesterol determination in high density lipoproteins seperated by three different methods. Clin Chem. 1977; 23,5: 882-884.

42. Izzo C., Grillo F. and Murador E. Improved method for determination of high density lipoprotein cholesterol : Isolation of high density lipoproteins by use of polyethylene glycol 6000. Clin Chem. 1981;27, 3: 371-374

ภาคผนวก

เอกสารหมายเลข 1

การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์

การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ ทำโดย ไฮโดรไลสไตรกลีย์เซอไรด์ โดยเอนไซม์ lipase จะได้กลีย์เซอรอล และกรดไขมันอิสระ ซึ่งจะทำปฏิกริยากับ glycerol kinase. และ L-α-glycerol-phosphate oxidase ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะทำปฏิกริยากับสารที่ให้สี วัดสีที่เกิดขึ้น โดย Spectrophotometer วัด absorbance ที่ 510 nm.

สารเคมี

Lipase (EC. 3.1.1.3)	Sigma Chemical co.
Glycerol kinase. (EC. 2.7.130)	Sigma Chemical co.
Peroxidase (EC. 1.11.1.7)	Sigma Chemical co.
L-α-glycerol-phosphate oxidase (EC. 1.1.3.21)	Sigma Chemical co.

วิธีทำ

1. Stock buffer เตรียม phosphate buffer 50 mmol/l โดยละลาย $Na_2 HPO_4$ 4.97กรัม และ $NaH_2 PO_4$ 2.04 กรัมด้วยน้ำกลั่นใส่ลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ใส่ potassium ferrocyanide 3 mmol magnesium chaloride 0.6 mmol เขย่าให้เข้ากัน

2. Stock reagent ใส่ stock buffer 500 ml ลงใน volumetric flask ใส่ lipase 75 KU, glycerol kinase 25 U,L-α glycerol-phosphate oxidase 2.5 KU,horseradish perorxidase, 0.25 KU, ATP 0.35 mmol, 4 aninophenazone 0.15 mmol, 3,5 dichloro-2-hydroxy benzenesulfonic acid 0.85 mmol และ Triton x-100 50 mg ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 2-8°C ได้หนึ่งเดือน

3. เตรียม Standard solution Stock glycerol ละลาย glycerol 1.045 g ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยสารละลาย NaCl (8.5 กรัม / ลิตร) จะได้ stock standard ที่เท่ากับ triolein 10 กรัม/ลิตร นำไปเจือจางเพื่อทำ standard curve ที่ 50, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800 และ 1,000 มก/100 มล

วิธีวิเคราะห์

ใส่ working reagent 3 มล ลงในหลอดทดลอง ไปเปตต์ ซีรัม 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายเขย่าให้เข้ากัน incubate ที่ 37 °C 15 นาที สีที่เกิดขึ้นจะคงที่นาน 60 นาที นำไปวัดสีที่

เกิดขึ้นด้วย spectrophotometer ที่ 510 nm. โดยใช้ reagent blank วัด absorbance ที่ได้คำนวณเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

ปริมาณไตรกลีย์เซอไรด์ (มก / 100 มล) = absorbance ของสารตัวอย่าง X ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน / absorbance ของสารมาตรฐาน

ข้อควรระวัง

1. งดอาหารก่อนที่มาเจาะเลือด
2. ถ้าซีรัมตัวอย่างขุ่น ต้องเขย่าให้ดีก่อนไปเปตต์ไปทำการวิเคราะห์
3. ควรทำการวิเคราะห์หาไตรกลีย์เซอไรด์ในวันที่เก็บตัวอย่าง ถ้าทำการวิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้น จะต้องเก็บซีรัมในตู้เย็น หรือกล่องน้ำแข็งที่มีอุณภูมิใกล้ 0 ^{o}C ทันทีที่ปั่นแยกซีรัมออกมาจากเม็ดเลือด ถ้าจะเก็บซีรัมไว้ 3-4 วัน หรือนานกว่านี้จะต้องเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20 ^{o}C ถึง -50 ^{o}C
4. การหาปริมาณของไตรกลีย์เซอร์ไรด์วิธีนี้เป็นวิธีที่วัดปริมาณของกลีย์เซอรอล และ นำมาคำนวณหาปริมาณของไตรกลีย์เซอไรด์ แต่กลีย์เซอรอลเป็นสารที่มีอยู่ใน จุกยางพาราฟิล์ม หรือโลชั่นที่ทามือ กลีย์เซอรอลที่ปนเปื้อนอยู่จะเพิ่มเข้าไปในการวิเคราะห์ได้ จึงต้องล้างเครื่องแก้วให้สะอาด และล้างมือก่อนทำการวิเคราะห์
5. Spectrophotometer ที่ใช้ควรจะต้องตรวจสอบ precision accuracy, linearlity และ stability ความคลาดเคลื่อนในการอ่าน (สารตัวอย่างเดียวกัน) ไม่ควรเกินที่ 100 nm $\pm$ 0.2 nm การเปลี่ยนแปลงของแสงไม่ควรเกิน 1% และควรมีแสงรบกวนไม่เกิน 0.5% คุณภาพของ cuvette ที่ใช้วัดสารตัวอย่างวัดแต่ละด้านที่รับแสงควรจะให้ค่าใกล้เคียง

สารมาตรฐาน และการ calibrate

calibration โดยทำการทดสอบ linearity ของวิธีการวิเคราะห์ และทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือทุก 4 เดือน หรือเมื่อสงสัยว่าประสิทธิภาพในการวัดของเครื่องมือเปลี่ยนแปลง

ทำการควบคุมคุณภาพของวิธีที่ใช้ทำการวิเคราะห์โดยการทำ within-run assay หรือ optimal condition variance โดย reference serum ครั้งละ 30 ตัวอย่าง ก่อนนำวิธีการวิเคราะห์ไปใช้ ทำการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์สารตัวอย่างในการวิจัย หรือการให้บริการ โดยทำ between run assay หรือ routine condition variance โดยใช้ reference serum 3 ตัวอย่างในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง

เอกสารหมายเลข 2

การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล

หลักการวิเคราะห์ ไฮโดรไลส cholesterol ester ในซีรัมด้วยเอนไซม์ cholesterol esterase ได้เป็น cholesterol และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ cholesterol oxidase อีกทีหนึ่ง ได้สาร cholesterone และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

วัดปฏิกริยาที่เกิดขึ้นโดยทำให้เกิดเป็น colour reaction ของ 4-aminoprenazone และ phenol ทำให้ได้สารที่มีสี วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดย spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 500 nm

สารตัวอย่าง

นำมาวิเคราะห์ ถ้าเป็นซีรัม Supernatants ของ HDL-C หรือ LDL-C ที่แช่แข็งไว้นำมาตั้งไว้ให้ละลายที่อุณภูมิห้องประมาณ 30 นาที เขย่าให้เข้ากันโดย vortex mixer และนำมาวิเคราะห์หาโคเลสเตอรอล

เครื่องมือ

เครื่อง Spectrohotometer: spectronic 2000

สารเคมี

Cholesterol ester hydrolase ZEC 3.1.1.13) Sigm Chemical co.

Cholesterol oxidase (EC.1.1.3.6) Sigma Chemical co.

Horseradish peroxiase (EC.1.11.1.7) Sigma Chemical co.

Pipes buffer (1,4-piperazinediethanesulfates) 4-amino antipyrine

Sodium cholate phenol Triton x-100

เตรียมน้ำยา

Pipes buffer 50 mol/L pH 6.9 ละลาย pipe buffer 17.7 กรัม ลงในบีกเกอร์ 1000 มล. ใส่น้ำประมาณครึ่งหนึ่งคนให้สารละลายหมดและใส ถ่ายใส่ volurnetric flask เติมน้ำจนเกือบ 1000 มล. วัด pH เมื่อเย็น ปรับปริมาตร ให้ได้ 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

Stock reagent

ชั่ง 4-amino-antipyrine 0.203 กรัม sodium cholate 1.292 กรัม potassium choloride 7.46 กรัม Triton x-100 1.0 มล. ละลายใน pipes buffer 400 มล. คนจนสารละลายหมด

ถ่ายใส่ volumetric flask ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มล. ด้วย pipes buffer เก็บไว้ที่ 4°C หรือในตู้เย็นได้นาน 1 เดือน

Stock phenol reagent

ชั่ง phenol 3.8 กรัม ใส่ลง volumetric flask 500 มล. ละลายด้วย pipes buffer ปรับปริมาณให้ได้ 500 มล. เก็บในขวดแก้วปิดจุกให้สนิท เก็บไว้ในตู้เย็นหรือที่ 4°C เก็บไว้นาน 1 เดือน

Working reagent

ผสม stock reagent 50 มล. กับ stock phenol reagent 50 มล. ให้เข้ากัน ใส่ cholesterol oxidase 25 U, cholesterol esterase 35 U และ peroxidase 1250 U เขย่าให้เข้ากัน working reagent นี้ควรจะเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนวิเคราะห์ จึงจะได้ผลดีที่สุด (สารละลายนี้เก็บในตู้เย็นหรือ 4°C ได้นาน 1 อาทิตย์)

Calibrators

ใช้สารละลายมาตรฐาน โคเรสเตอรอล และ reference serum ของ Boehringer Mannheim ทำการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ optimal condition variance และ Routine condition variance ใช้สารละลายมาตรฐานของ Boehringer Mannheim มีค่าเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 300, 400 และ 600 มก/100 ml ทดสอบหา linearity

วิธีวิเคราะห์

เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 มม. x 100 มม. สำหรับ blank สารละลายมาตรฐาน reference serum และซีรัมตัวอย่าง

ไปเปตต์ working reagent 2 มล. ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้

ใช้น้ำ เป็น blank

ไปเปตต์น้ำ ซีรัมตัวอย่าง reference serum และ pooled serum 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ที่ใส่ working reagent นำไป incubate ใน water bath 37 °C 20 นาที นำขึ้นจาก water bath วัด absorbance ที่ wave length 500 nm ใช้น้ำเป็น blank ปรับ absorbanceให้เป็น 0 วัดค่า absorbance ของสารละลายมาตรฐาน สารตัวอย่าง และ reference serum นำมาคำนวณหาปริมาณของโคเรสเตอรอล

$$\text{ปริมาณโคเรสเตอรอล มก/100 มล} = \frac{\text{absorbance ของสารตัวอย่าง}}{\text{absorbance ของสารมาตรฐาน}} \times \text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน}$$

ทำการทดสอบ linearity ของวิธีการวิเคราะห์ และทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือทุก 4 เดือน หรือเมื่อสงสัยว่าประสิทธิภาพในการวัดของเครื่องมือเปลี่ยนแปลง

ทำการควบคุมภาพของวิธีที่ใช้ทำการวิเคราะห์โดยการทำ within-run assay หรือ optimal condition variance โดย reference serum ครั้งละ 30 ตัวอย่าง ก่อนนำวิธีการวิเคราะห์ไปใช้ ทำการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์สารตัวอย่างในการวิจัย หรือการให้บริการ โดยทำ between run assay หรือ routine condition variance โดยใช้ reference serum 3 ตัวอย่างในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง

เอกสารหมายเลข 3

การแยก lipoprotein โดยวิธี Ultracentrifuge เทคนิค

หลักการ

การแยกไลโปโปรตีนออกจากกัน โดย ultracentrifuge เป็นวิธีมาตรฐาน เป็นที่ยอมรับว่าถูกต้อง และเชื่อถือได้

ไลโปโปรตีนแต่ละชนิดมีความหนาแน่นไม่เท่ากัน เมื่อใช้เครื่อง ultracentrifuge ปั่นแยกไลโปโปรตีนในสารละลายที่มีความหนาแน่นแล้ว ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นมากกว่าสารละลายก็จะตกตะกอนอยู่ข้างล่าง และไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าก็จะลอยอยู่ในส่วนบนของหลอดทดลอง แยกเอาไลโปโปรตีน ในส่วนต่าง ๆ ออกจากกันโดยการตัดหลอดทดลองด้วยเครื่องมือเฉพาะหรือใช้เข็มดูดออก

วิธีการวิเคราะห์

ไปเปตต์ สารละลาย โซเดียมคลอไรด์ 2 Molar (ความหนาแน่น 1.063) 5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง ไปเปตต์ซีรัม 4 มล. ค่อย ๆ ใส่ลงไปบนสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยใช้ไปเปตต์แตะข้าง ๆ หลอดทดลอง แล้วไปเปตต์สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% (ความหนาแน่น 1.006 กรัม/มล.) 3 มล. ค่อย ๆ ใส่ลงบนชั้นของซีรัม ให้ซีรัมกระทบกระเทือนน้อยที่สุด ถ้าใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงไปอย่างรวดเร็ว จนชั้นของซีรัมปนกับชั้นของสารละลาย จะมีผลต่อการแยกชั้นของไลโปโปรตีน ปิดจุกโดยใช้เครื่องมือพิเศษที่ใช้สำหรับปิดโดยเฉพาะ ใส่ลงใน Beckman rotor 50 Ti ปั่นที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ 40,000 รอบต่อนาที (10500 x g) 22 ชั่วโมง

เมื่อครบ 22 ชม.แล้ว ดึงเอาหลอดทดลองออกจาก rotor ด้วยความระมัดระวัง จะเห็นว่าชั้นบนสุดที่ติดกับจุกมีชั้นไขมันสีขาวจับอยู่ข้างหลอดทดลอง ส่วนบนของหลอดทดลองนี้จะเป็นส่วนของ VLDL ตรงกลางหลอดจะเป็นชั้นสีเหลืองของไขมันในชั้น LDL และก้นหลอดจะเป็นตะกอนใสสีเหลืองส้ม เป็นส่วนของไขมันในชั้น HDL ถ้าดึงหลอดทดลองออกจาก rotor แรงเกินไป ไขมันที่แยกส่วนอยู่ในชั้นของสารละลายตามความหนาแน่นจะกระเทือน ชั้นไลโปโปรตีนอาจแตกออก และมีบางส่วนไปปนกันได้

นำหลอดทดลองใส่ลงในเครื่องตัด (tube slicer) ตัดด้วยใบมีดที่ใช้สำหรับ ตัดหลอดทดลองพลาสติก ตัดครั้งแรกในระยะหนึ่งในสามของหลอดทดลองโดยวัดจากข้างบน เอา syringe เจาะลงไปบนหลอดทดลองดูดเอาสารละลายออกให้หมดแล้วใส่ลงใน volumetric flask 5 ml. ดึงหลอดทดลองที่ตัดแล้วออก ล้างเอาไขมันที่ติดอยู่ข้างหลอดออกให้หมดนำไปใส่รวมกับสารละลายที่ดูดออกมาครั้งแรก ปรับปริมาตรให้ได้ 5 มล. สารละลายส่วนนี้เป็นส่วนของ VLDL เลื่อนหลอดทดลองขึ้นไปอีกหนึ่งในสามของหลอดทดลอง ใช้ใบมีดตัดอีกครั้งหนึ่ง แล้วใช้ syring ดูดสารละลายออกจากหลอดทดลอง ใส่ลงใน volumetric flask 5 ml ล้างไขมันที่ติดหลอด

ทดลองออกให้หมด นำสารละลายที่ล้างนี้ใส่รวมกับที่ดูดออกมาครั้งแรกปรับปริมาตรให้ได้ 5 มล. ส่วนนี้เป็นส่วนของ LDL lipoprotein

ดูดสารละลายที่อยู่ส่วนสุดท้ายออกใส่ใน volumetric flask 5 มล. เช่นกัน ล้างส่วนของไขมันออกใส่รวมใน volumetric flask ปรับปริมาตรให้ได้ 5 มล. ส่วนที่ได้เป็นส่วนของ high density lipeprotein (HDL)

นำ lipo protein ทั้งสามส่วนนี้ไปหา triglycerides, cholesterol, Apo A_1, Apo A_2 และ Apo B ตามต้องการ ถ้ายังไม่ทำการวิเคราะห์ทันที เก็บ lipoprotein fraction ที่ได้ ที่อุณหภูมิ $-20^{o}C$

เอกสารหมายเลข 4

การตกตะกอนไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (HDL) ด้วยวิธีเฮปาริน แมงกานีสคลอไรด์

หลักการ

ทำให้ไลโปโปรตีนที่ความหนาแน่นต่ำ 1.063 กรัม/มล. (VLDL และ LDL) ตกตะกอนโดยเฮปารินแมงกานีสคลอไรด์ ส่วนที่เป็น HDL จะอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำใส

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 12 มล. มีจุกปิด
2. ไมโครไปเปตต์แบบที่ปรับปริมาตรได้ ขนาด 100-200 ไมโครลิตร
3. Volumetric pipet ขนาด 1 มล.
4. Vortex mixer
5. เครื่องปั่นแยกที่ปรับอุณหภูมิได้

การเตรียมน้ำยา

1. เฮปาริน ขนาด 5000 ยูนิต/มล. เฮปารินแต่ละรุ่น และแต่ละบริษัท จะไม่เหมือนกัน ซึ่งมีผลต่อการตกตะกอนของไลโปโปรตีนความหนาแน่นสูง ทุกครั้งที่เปลี่ยนเฮปารินจะต้องทดสอบก่อน

2. สารละลายแมงกานิสคลอไรด์ 1 mol/L

ละลายแมงกานิสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) 197.91 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มล. ใน volumetric flask

วิธีวิเคราะห์

1. ไปเปตต์ซีรัม 1 มล. ลงในหลอดทดลองขนาด 12 มล.

2. ไปเปตต์ เฮปาริน (5000 ยูนิต/มล.) 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ใส่ซีรัม ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer

3. ไปเปตต์สารละลายของแมงกานิสคลอไรด์ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง (จะได้สารละลายเฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ 46 mmol/l) เขย่าให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer จะเห็นตะกอนเกิดขึ้น เก็บไว้ในที่เย็น $4^{\circ}C$ 30 นาที แล้วนำมาปั่นในเครื่องปั่นแยกที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ 1500 g 30 นาที

T 9149193

4. นำออกจากเครื่องปั่นแยก ใช้ปาสเตอร์ไปเปตต์ดูดเอาน้ำใสข้างบน ระวังอย่าให้ตะกอนติดขึ้นมา นำไปหาปริมาณของไขมันต่าง ๆ ได้ตามต้องการ ถ้ายังไม่ทำการวิเคราะห์เลยทันทีต้องเก็บไว้ในตู้เย็น

5. เมื่อจะนำไปหาค่าไขมันต่าง ๆ จะต้องนำผลที่ได้คูณด้วย dilution factor 1.09

6. ในตัวอย่างที่ขุ่นหรือไม่ได้อดอาหารนานตามกำหนด หรือเป็นตัวอย่างที่มีไตรกลีย์เซอไรด์สูง จะใช้แมงกานิสคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 2 mol/L แทนแมงกานิสคลอไรด์ความเข้มข้น 1 mol/L ทำให้ผลการวิเคราะห์ไขมันต่าง ๆ ในชั้นของโปไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงได้ถูกต้องกว่า หรือถ้าไม่ต้องการเตรียมน้ำยาไว้ทั้งสองความเข้มข้น ก็จะใช้สารละลายแมงกานิสคลอไรด์ 1 mol/L เหมือนเดิมทำการตกตะกอนซ้ำอีกครั้งหนึ่งก็ได้ แล้วนำสารละลายใสชั้นบนมาทำการวิเคราะห์หาไขมันต่าง ๆ โดยใช้ dilution factor เป็น 1.19 (1.09 x 1.09) = คำนวนหาปริมาณไขมัน

ถ้าใช้เฮปารินแมงกานิสคลอไรด์ความเข้มข้น 2 mol/l ตกตะกอน การหาปริมาณโคเลสเตอรอลด้วยวิธี Liberman-Burchard

7. ถ้าใช้แยก HDL ในซีรัมขุ่น นำซีรัมมาปั่นแยกด้วย centrifuge ด้วยความเร็ว 12000 x g 10 นาที

เอกสารหมายเลข 5

การตกตะกอนอะโปไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงด้วยฟอสโฟทังสเตต กับแมกนีเซียมคลอไรด์

อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง 12 มล.
2. เครื่อง vortex mixer
3. เครื่องปั่นแยกปรับอุณหภูมิได้

การเตรียมน้ำยา

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (AR) 1 mol/L
2. แมกนีเซียมคลอไรด์ (AR) 2 mol/L
3. เตรียมสารละลายฟอสโฟทังสเตต ละลายกรดฟอสโฟทังสติก 40 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. เติมสารละลาย NaOH 1 mmol/l 70 มล. เขย่าให้เข้ากันเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4

วิธีทำ

1. ไปเปตต์ซีรัม 1 มล. ลงในหลอดทดลอง แล้วไปเปตต์สารละลาย ฟอสโฟทังสเตต 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer ไปเปตต์สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 5.0 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปปั่นแยก 30 นาที ที่ 1500 g $4^{\circ}C$
2. หลังจากปั่นแยกแล้วจะได้น้ำใสอย่างข้างบน แยกส่วนที่เป็นน้ำใสออกจากตะกอนโดยเทส่วนใสข้างบนออกใส่หลอดทดลอง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไขมันต่าง ๆ ได้ โดยใช้คูณด้วย dilution factor 1.125

เอกสารหมายเลข 6

การแยก HDL_2 และ HDL_3 โดยใช้ Ultracentrifuge เทคนิค

ไปเปตต์ ซีรัม 4 มล. ลงในหลอดทดลองที่ใช้กับเครื่อง ultracentrifuge (Ultra clear) ใส่สารละลาย KBr ความหนาแน่น 1.33 กรัม/ลิตร ลงไป 2 มล. และสารละลาย KBr ความหนาแน่น 1.125 กรัม/ลิตร 6 มล. ปิดจุกด้วยเครื่องปิดให้แน่น นำไปใส่ใน Beckman rotor 50 Ti ปั่นที่ $4^{\circ}C$ 40,000 รอบต่อนาที 22 ชม. หลังจากเครื่องหยุดแล้ว ค่อย ๆ ดึงหลอดทดลองออกจาก rotor นำไปตัดด้วยเครื่องตัดหลอดทดลอง (tube slicer) ตัดหลอดทดลองต่ำจากขอบบนของหลอดประมาณ 2.3 มล. ดูดเอาสารละลายออกโดยใช้ syring สารละลายส่วนนี้จะเป็นส่วนประกอบของ VLDL, LDL และ HDL_2 ไลโปโปรตีน ส่วนล่างประกอบด้วย HDL_3 นำสารละลายทั้งสองส่วนไปหาไตรกลีย์เซอไรด์ โคเลสเตอรอล หรือฟอสโฟไลปิด ได้ตามต้องการ

หาค่าไขมันในชั้นของ HDL_2 ได้ โดยนำค่า HDL จากการปั่นแยกในครั้งแรกลบออกจากค่า HDL_3 ที่ได้จากปั่นแยกในครั้งหลัง

$$HDL_2 = HDL - HDL_3$$

เอกสารหมายเลข 7

การวิเคราะห์ปริมาณอะโปไลโปโปรตีน

การวิเคราะห์อะโปไลโปโปรตีนโดยวิธี Rocket Immunoelectrophoresis

Rocket Immunoelectrophoresis

หลักการ Rocket Immunoelectrophoresis เป็นวิธีการหาปริมาณอะโปไลโปโปรตีนแต่ละชนิดที่รวมกันอยู่ในตัวอย่างได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเชื่อถือได้ อะโปไลโปโปรตีนที่ต้องการวัดจะทำปฏิกริยากับ antiserum ของอะโปไลโปโปรตีนชนิดนั้นบน agarose plate เมื่อให้กระแสไฟฟ้าผ่านไปบน agarose plate antigen-antibody complex ของอะโปไลโปโปรตีนที่เกิดขึ้นจะเคลื่อนที่ไปเป็นรูป peak แหลม ๆ คล้ายรูปจรวด (rocket shape) วัดความสูงของ Rocket นำมาคำนวนเปรียบเทียบกับ peak ของ Stardard เพื่อหาปริมาณของอะโปไลโปโปรตีน

อุปกรณ์

1. เครื่อง Electrophoresis (Pharmacia) มี cooling systems ประกอบด้วย
2. พื้นระนาบสำหรับเท agarose plate (Pharmacia) พร้อมลูกน้ำสำหรับจับระดับ
3. แผ่นแก้วขนาด (100 x 100 x 1.5 มม.) สำหรับใช้วิเคราะห์เมื่อมีตัวอย่างจำนวนน้อย และแผ่นแก้วขนาด (200 x 100 x 1.5 มม.) สำหรับใช้วิเคราะห์ เมื่อมีสารตัวอย่างจำนวนมาก

น้ำยา

1. Barbital Buffer (0.1mol/L) pH 8.6

ชั่ง Sodium diethylbarbital 20.6 กรัม diethylbarbituric acid 4 กรัม และ Sodium azide 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มล.

2. Agarose gel 1.5%

ใส่ Agarose gel (BIO RAD Labratory) 1.5 กรัม ใน buffer 100 มล. ใน flask 250 มล. ต้มให้เดือด 20 นาที เติม Dextran T10 5% (W/V) คนให้ละลายหมด เมื่อสารละลาย agarose เย็นลงนำออกมา Incubate ไว้ที่ 50°C ใส่ antiserum ของอะโปไลโปโปรตีนที่ต้องการจะวิเคราะห์

3. Staining Solution

ละลาย Coomassie Blue R250 (Bio Rad Laboratory) 1.5 กรัม ด้วย destaining Solution 300 ml. เขย่า 1 ชม. ให้สีละลาย สารละลายนี้นำมาใช้ได้หลายครั้ง ถ้ามีตะกอนหรือเศษ gel ติด ก็นำมากรองและใส่ขวดเก็บไว้ใช้ได้อีก

4. Destaining Solution

ผสม ethanol 95% 350 มล. กับ Acetic acid 100 มล. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน สารละลายนี้ สามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้ง ถ้าสารละลายมีตะกอนติดก็กรองเอาตะกอนออก ถ้ามีสิ่งสกปรกอยู่มาก ก็นำมาผ่าน Columm ที่ใส่ activated Charcoal เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาใช้ได้อีก

เตรียม agarose gel plate

นำสารละลาย agarose ที่ incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 50-55 c^0 15 มล. สำหรับ plate ขนาด 100 x 100 มม. และ 25-30 มล. สำหรับ plate ขนาด 200 x 100 มล. ปรับพื้นของเครื่องเท plate ให้ได้ระดับ วางแผ่นกระจกลงบนพื้นเครื่องเท plate ผู้ที่ยังไม่ชำนาญในการทำ agarose gel plate ควรจะตวงสารละลาย agarose gel ด้าน cylender ตามปริมาตรที่ต้องการและเทลงบนแผ่นกระจกให้หนาประมาณ 1 มม. พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ หรือจะใช้ลงในแผ่น U-frame ที่มีตัวปรับระดับความหนาของ agarose gel วางไว้ 30 นาที ให้ agarose แข็งตัว เจาะรูบนแผ่น gel ด้วยเครื่องเจาะรูขนาด 4 มม. plate ขนาด 100 x 100 มม. จะเจาะได้ 16 - 18 รู plate ขนาดใหญ่เจาะได้ประมาณ 36-38 รู ไม่ควรเจาะรูใกล้กันเกินไป เว้นขอบข้าง ๆ ละ 1 ซม. นำ plate เก็บไว้ในกล่องที่กรุด้วยกระดาษ และพรมน้ำให้มีความชื้น เพื่อป้องกันแผ่น agarose gel แห้ง เมื่อต้องการเก็บ plate ไว้ใช้

เตรียมสารตัวอย่าง

ซีรัมที่ต้องการหาปริมาณ Apoprotien A1 เจือจางด้วย buffer 1:400

เตรียม Calibrator

เจือจางด้วย buffer 1:10, 1:20, 1:30 และ 1:40 มีความเข้ม 0.154, 0.205, 0.307, 0.410 และ 0.615 ตามลำดับ

วิเคราะห์หาปริมาณ Apoprotien A1

ดูดซีรัมที่เจือจางแล้ว 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในรูที่เจาะไว้แล้วตัวอย่างละ 2 รู และใส่ pooled serum ที่เจือจางแล้วลงในรูที่เจาะไว้ ดูด Standard ที่เจือจางแล้ว ใส่ลงในรู ควรวางตำแหน่งไว้และจดไว้ว่าใส่ซีรัมไว้ที่ตำแหน่งใด เพราะจะเกิดการสับสน ทำให้เกิดการคำนวนผิดพลาดได้ เอาผ้า

สำลี (weck) สำหรับเป็นสื่อให้ กระแสไฟฟ้าไหลผ่าน agarose plate ใส่ลงในช่อง buffer ข้างหนึ่ง อีกข้างหนึ่งวางลงบน agarose plate ใช้กระแสไฟฟ้า 7V/cm. ใช้เวลา $5^{1}/_{2}$ ชม. จากนั้น นำ plate ออก ใช้กระดาษกรองกดไว้ 10 นาที ล้าง agarose gel ด้วยน้ำกลั่น กดให้แห้งด้วยกระดาษกรอง อีกครั้ง ทับไว้ 10 นาที

การย้อมสี

เทสารละลาย coomassie Brilliant blue ที่เตรียมไว้ลงในกล่องพลาสติก หรือถาดแก้ว สำหรับย้อมสี ใส่ agarose plate ลงในอ่าง แช่ไว้ 20 นาที ถ้าแช่ไว้นานเกินไป หรือแผ่น agarose ไม่แห้ง agarose จะหลุดจากแผ่นกระจกได้ นำ plate มาล้างด้วย destaining Solution โดยแช่ในอ่างแก้วจนกระทั่ง เห็น gel ใส นำมากดทับให้แห้ง เก็บไว้ค้างคืน วัดความสูงของ peak ของซีรัมตัวอย่าง pooled ซีรัม และ peak standard นำมาคำนวนหาปริมาณของ Apoprotien A1 ได้