

7-1-1978

การวัดปริมาณกลูโคสในซีรัมด้วย Modified single Glucose oxidase-Peroxidase (preliminary report)

จิตา เศรษฐินพงศ์

เจริญศรี วจนะมฤต

ศรีจิตรา ขุนนาค

วิศาล เขาวงศ์ศิริ

วิฑูร ชัยชาญวัฒนากุล

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal>

 Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

เศรษรัตนพงศ์, จิตา; วจนะมฤต, เจริญศรี; ขุนนาค, ศรีจิตรา; เขาวงศ์ศิริ, วิศาล; and ชัยชาญวัฒนากุล, วิฑูร (1978) "การวัดปริมาณกลูโคสในซีรัมด้วย Modified single Glucose oxidase-Peroxidase (preliminary report)," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 22: Iss. 3, Article 4.

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal/vol22/iss3/4>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

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

ธิดา เศรษฐตันพงศ์**
เจริญศรี วจนะมฤต**
ศรีจิตรา บุณนาค

วิศาล เยาวพงศ์ศิริ**
วิฑูร ชัยชาญวัฒนากุล***

การวัดปริมาณกลูโคสในซีรัม คัดแปลงมาจากวิธีของ Morin และ Prox สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้ทั้งซีรัมและพลาสมา โดยใช้ glucose oxidase และ peroxidase ซึ่งสกัดจาก horseradish เพื่อเร่งปฏิกิริยา วิธีที่เรานำมาใช้นี้ใช้ peroxidase ที่สกัดจากเปลือกหัวผักกาดขาวหรือเปลือกหัวไชเท้า (*Rathanus sativus*) ด้วยการบดเปลือกหัวผักกาดขาวให้ละเอียด แยก peroxidase ออกโดยการทำ ammonium sulfate fractionation และ dialysis ในน้ำ เพื่อขจัดแอมโมเนียมซัลเฟต

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

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

*บรรยายในการประชุมสัมมนาวิชาการและปฏิบัติการครั้งที่ 1 สมาคมเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 7 เมษายน 2520

**หน่วยต่อมไร้ท่อและเมตาบอลิซึม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหน่วยวิจัยฮอร์โมน แผนกแพทยศาสตร์ มูลนิธิอานันทมหิดล

***ฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวัดปริมาณกลูโคสในเลือดนั้นทำได้หลายวิธีด้วยกัน วิธีหนึ่งที่ใช้ในปัจจุบัน คือ การใช้ น้ำยาเอ็นไซม์ เนื่องจากเอ็นไซม์มี substrate specificity และเวลาที่ใช้สั้น เมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ ที่อาศัยคุณสมบัติของการเป็น reducing agent การหากกลูโคสโดยใช้ปฏิกิริยาทางเอ็นไซม์ ได้มีผู้ทดลองทำโดยใช้เวลา $20^7 - 30$ นาที^{4,8} Cawley และคณะได้ทำโดยเติมกรดซัลฟริกเพื่อหยุดปฏิกิริยา ใช้เวลาการทดลอง 10 นาที² Morin และคณะ⁶ ได้ดัดแปลงเตรียมเป็นน้ำยาชนิดเดียวที่มี pH 5.5 ใช้อัตราส่วนของ GOD/POD ที่พอเหมาะ เวลาการทดลอง 2 นาที โดยไม่ต้องตกตะกอนโปรตีน วิธีของเขามีค่าความถูกต้อง 99% ความคลาดเคลื่อน 3.3% ดังนั้นทางหน่วยต่อมไร้ท่อและเมตาบอลิซึม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหน่วยวิจัยฮอร์โมน แผนกแพทยศาสตร์ มูลนิธิอานันท์มหิตล จึงได้ดัดแปลงวิธีของ Morin มาใช้ โดยเตรียมเอ็นไซม์ peroxidase จากเปลือกหัวไชเท้าเอง เพื่อประหยัดเงินตราต่างประเทศ เนื่องจากเอ็นไซม์ peroxidase มีราคาสูงมาก ประมาณกรัมละ 4,000.00 บาท

วัสดุและวิธีการ

ผู้ป่วย

ใช้ผู้ป่วย 100 ราย เก็บโดยวิธีสุ่มจากผู้ป่วยคลินิกเบาหวานในแต่ละอาทิตย์ เพื่อใช้ตรวจหา กลูโคสด้วยวิธี GOD/POD เปรียบเทียบกับวิธี Somogyi

วิธีเก็บเลือดจากผู้ป่วยมาตรวจ

เจาะเลือด 3 มล. ถ่ายใส่หลอดแก้วที่แห้งสะอาด ระวังไม่ให้เลือด hemolyse บั่นแยกเอาซีรัมมาตรวจ กรณีที่เลือด hemolyse หรือซีรัมขุ่นขาวจะไม่นำมาใช้ เนื่องจากค่าที่ได้จากการตรวจโดยวิธีนี้จะสูงกว่าความเป็นจริง

วิธีเก็บ pool serum

เก็บซีรัมผู้ป่วยในคลินิกเบาหวานแต่ละสัปดาห์ โดยจัดแบ่งไว้เป็น 3 ระดับ

ระดับต่ำ เก็บซีรัมที่มีปริมาณกลูโคสต่ำกว่า 100 มก./100 มล.

ระดับกลาง เก็บซีรัมที่มีปริมาณกลูโคสต่ำกว่า 100-190 มก./100 มล.

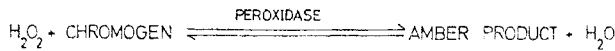
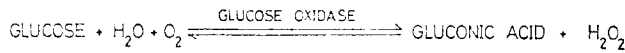
ระดับสูง เก็บซีรัมที่มีปริมาณสูงกว่า 190 มก./100 มล.

ผสมซีรัมให้เข้ากัน บั่นแยกเอาส่วนของซีรัมที่ใสมาแบ่งเก็บเป็นหลอดเล็ก ๆ แช่แข็งไว้

การวัดปริมาณกลูโคสในซีรัมด้วยวิธี GOD/POD ดัดแปลงจากวิธีของ Morin และ Prox⁶ มีหลักการ^{1,3,5} ดังนี้

กลูโคสทำปฏิกิริยากับน้ำและออกซิเจนจากอากาศ 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



ภาพที่ 1

ความเข้มข้นของกลูโคสในซีรัม ดังแสดงในภาพ
ที่ 1

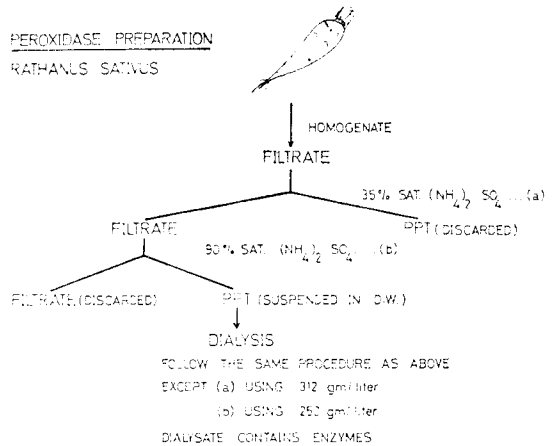
การเตรียมเอ็นไซม์ peroxidase

นำเปลือกหัวไชเท้ามาบดกับ 0.01 M. dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) ขึ้น
เอาน้ำมาตกตะกอนด้วย 35% saturated ammo-
nium sulfate จะได้ส่วนที่เป็นน้ำและตะกอน เอา
ตะกอนทิ้ง นำเอาส่วนที่เป็นน้ำมาตกตะกอนอีก
ครั้งหนึ่งด้วย 90% sat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จะได้น้ำและ
ตะกอนอีก นำเอาส่วนที่เป็นตะกอนมาผสมด้วยน้ำ
กลั่นเล็กน้อย นำไป dialyze ในน้ำไหลเวียน 2-3
วัน เพื่อขจัด $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แล้วปั่นแยกเอาส่วน
filtrate มาทำ ammonium sulfate fractionation
อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 312 กรัม/ลิตร
ได้ filtrate และตะกอน นำ filtrate มาตกตะกอน
ครั้งสุดท้ายด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 กรัม/ลิตร ตั้ง
ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนรินน้ำทิ้ง เอาตะกอนมาละลาย
ด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย dialyze ในน้ำที่ไหลเวียน
2 วัน dialysate ครั้งหลังสุดจะมีเอ็นไซม์ per-
oxidase พร้อมทั้งจะนำไปใช้ ดังแสดงในภาพที่ 2

การเตรียมน้ำยา ประกอบด้วย

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

PEROXIDASE PREPARATION
RATHANUS SATIVUS



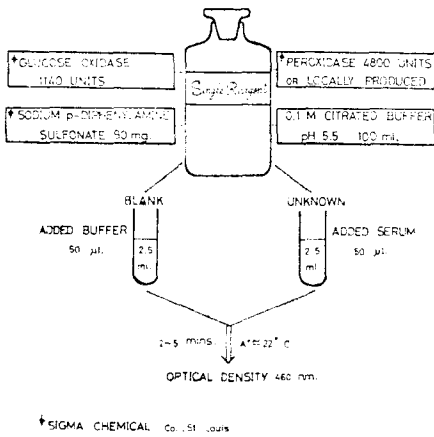
ภาพที่ 2

- peroxidase 4800 Purpurogallin units ($\text{RZ}^{(3)} = 1.6$ 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. ในซีรัม 50 ไมโครลิตร
ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ
22°C. 2-5 นาที วัด OD ที่ 460 nm โดยใช้ Blank เทียบศูนย์ Tube blank ใช้ 0.1 M Citrate buffer 50 ไมโครลิตรแทนซีรัม ดังแสดง
ในภาพที่ 3

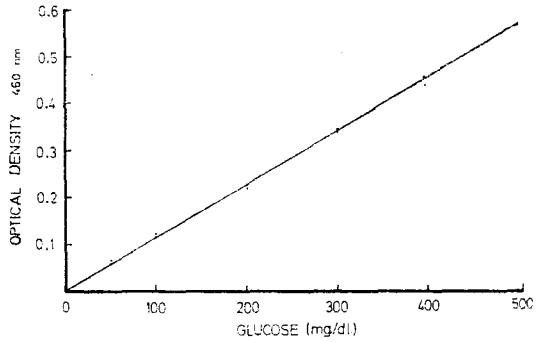
SERUM GLUCOSE PROCEDURE



ภาพที่ 3

โดยตรงกับปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 0 ถึง 500 มก./100 มล. ดังแสดงในภาพที่ 4

STANDARD CURVE OF SERUM GLUCOSE DETERMINATION. GLUCOSE OXIDASE-PEROXIDASE METHOD



ภาพที่ 4

ได้ทำการทดลองดูความคงที่ของน้ำยา ความแม่นยำของวิธี GOD/POD ความถูกต้องของวิธี GOD/POD ความสัมพันธ์ระหว่างวิธี GOD/POD กับ Somogyi และทดสอบคุณภาพในห้องปฏิบัติการ และระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆ โดยใช้ control serum จากต่างประเทศ และ pool serum ที่เตรียมขึ้นเอง 3 ระดับ คือระดับต่ำ จะเก็บซีรัมที่มีปริมาณกลูโคสต่ำกว่า 100 มก./100 มล. และระดับสูงเก็บซีรัมที่มีปริมาณกลูโคสสูงกว่า 190 มก./100 มล. ได้ผลดังต่อไปนี้

ผลการทดลอง

standard curve ที่ใช้วัดปริมาณกลูโคสในซีรัม โดยวิธี GOD/POD

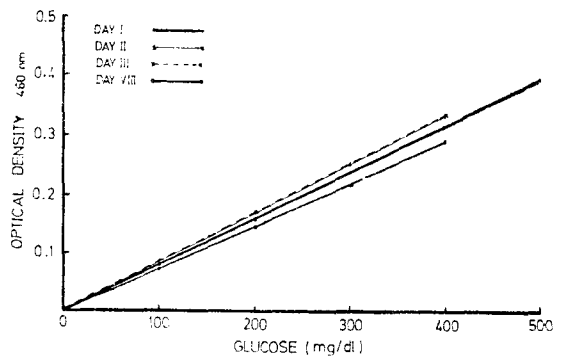
ใช้ standard glucose 100, 200, 300, 400 และ 500 มก./100 มล. เป็นแกนนอน ค่า OD ที่อ่านได้เป็นแกนตั้ง จะพบว่า OD จะเป็นสัดส่วน

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

STABILITY OF SINGLE GLUCOSE OXIDASE-PEROXIDASE REAGENT

STANDARD CURVES RUN AS CONTROL



ภาพที่ 5

ค่า control serum ความเข้มข้น
3 ระดับ อยู่ภายใน 1 SD ซึ่งกัน
และกันดังแสดงในภาพที่ 6

**การทดลองเพื่อดูความแม่นยำ
ของวิธี GOD/POD**

จากการทดลองในแต่ละวันด้วย
ระดับความเข้มข้นของกลูโคสในซีรัม
3 ระดับ คือ ระดับต่ำ กลาง สูง จะ
มีความคลาดเคลื่อน (coefficient of
variation) ไม่เกิน 4.2 % และเมื่อ
นำค่ามาคิดเฉลี่ยในทุกวันที่ทำการ
ทดลอง จะมีความคลาดเคลื่อนต่ำกว่า
5.3 % ดังแสดงในภาพที่ 7

**การทดลองเพื่อดูความถูกต้อง
ของวิธี GOD/POD**

โดยการเติมกลูโคส 100 มก./100
มล. ลงใน control serum สามารถ
วัดได้ 97.8 มก./100 มล. คิดเป็นค่า
ความถูกต้อง 97.8 % และเมื่อเติม
กลูโคส 300 มก./100 มล. สามารถวัด
ได้ 287.8 มก./100 มล. คิดเป็นค่า
ความถูกต้อง 96%

แสดงว่าวิธีนี้สามารถวัดให้ความ
ถูกต้องได้ 96-98 % ดังแสดงในภาพ
ที่ 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 ± SD	%CV	MEAN ± SD	%CV	MEAN ± SD	%CV	MEAN ± SD	%CV
LOW POOL	73.6 ± 3.0	4.2	76.4 ± 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 ± 10.3	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

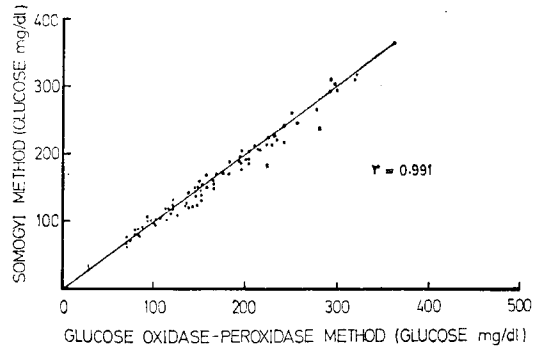
* 2 x (10 SAMPLES IN EACH TEST)

ภาพที่ 8

การทดลองแสดงความสัมพันธ์ของการหาปริมาณกลูโคสในซีรัมด้วยวิธี 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

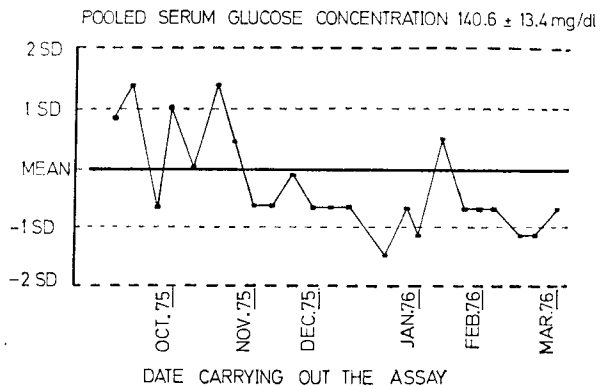


ภาพที่ 9

การทดสอบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

ช่วงระยะเวลา 2 ปี การวัดกลูโคสในซีรัมด้วยวิธี GOD/POD พบว่าวิธีนี้สามารถควบคุมได้ภายใน 2 SD ดังแสดงในภาพที่ 10 ซึ่งเป็น การทดสอบคุณภาพในระยะ 6 เดือน

QUALITY CONTROL IN LABORATORY ASSAY



ภาพที่ 10

การทดสอบคุณภาพระหว่างห้องปฏิบัติการต่าง ๆ

โดยการใช้ control serum จากต่างประเทศ ซึ่งมีผลรายงานค่า expected range ที่จะต้องควบคุมให้อยู่ในขอบเขตนี้

QUALITY CONTROL BETWEEN LABORATORY ASSAY

CONTROL SERUM	MEAN VALUE	EXPECTED RANGE	ASSAY VALUE *		
			MEAN ± SD	% CV	RANGE
**PREGNORM 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

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

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

ภาพที่ 11

วิจารณ์และสรุป

จากการทดลองวัดปริมาณกลูโคสในซีรัม ผู้ป่วย 100 ราย ด้วยวิธี GOD/POD เทียบกับวิธี Somogyi พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปกติวิธี GOD/POD เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่เอ็นไซม์ peroxidase ที่เตรียมขึ้นเองยังมีความบริสุทธิ์ต่ำ ($RZ < 1$) เมื่อเทียบกับที่เขามาผลิตขาย 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 ที่เตรียมขึ้นเองสามารถนำไปใช้ได้

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 เหมาะสำหรับใช้ตรวจกลูโคส

ในผู้ป่วยคลินิกเบาหวาน

ข้อเสีย

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

ผู้รายงานขอขอบคุณ นางมารศรี เตชะกำพูน และนางสาวละเอียด รุ่งเรือง ที่ช่วยเตรียมรายงาน และคุณประไพ เต็มสุข ในการจัดหาเปลือกหัวไชเท้า

เอกสารอ้างอิง

1. การหาปริมาณน้ำตาลในซีรัม โดยใช้กลูโคสออกซิเดส ชาวสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย 4 (12) : 38 (มก.) 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