
วิธีเตรียมแผ่นเอ็นไซม์สำหรับเครื่องมือ ตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส

YSI Glucose Analyzer Model 23 A

เพียงใจ สายเย็น*

การเตรียมแผ่นเอ็นไซม์สำหรับเครื่อง YSI Glucose Analyzer Model 23 A โดยหลักการ immobilize เอ็นไซม์แบบ crosslink method ใช้เวลาเตรียมประมาณ 12 ชั่วโมง ได้แผ่นเอ็นไซม์อย่างน้อยที่สุด 20 แผ่น แต่ละแผ่นสามารถวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ประมาณ 300 ครั้ง ความเที่ยงตรงและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ วัดได้สูงสุด 450 mg/dl เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเอ็นไซม์สำเร็จรูปจากบริษัทผู้ผลิตพบว่า สามารถหาค่าน้ำตาลกลูโคสได้ใกล้เคียงกันที่ $r = 0.9986$ พบว่าในการทดสอบแต่ละครั้งจะลดค่าใช้จ่ายได้ประมาณ 11 เท่า และแผ่นเอ็นไซม์ที่เตรียมนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน 7 เดือน ที่ 4°C

คำนำ

การตรวจหาปริมาณน้ำตาลในเลือดมีหลายวิธี และการตรวจโดยใช้หลักการของเอนไซม์อิเล็กโทรด (enzyme electrode) เป็นวิธีหนึ่งที่มีข้อได้เปรียบในเรื่องความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) ความง่าย (simplicity) สะดวกรวดเร็ว เชื่อถือได้ (reliability) ประหยัด ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยในการทดสอบและใช้น้ำยาบัฟเฟอร์เพียงชนิดเดียว (1-6) และ YSI Glucose Analyzer Model 23A (รูปที่ 1) เป็นเครื่องมือตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้หลักการนี้ ซึ่งสามารถตรวจหาปริมาณน้ำตาลได้ชั่วโมงละ 40 ตัวอย่าง ใช้ปริมาณตัวอย่างเพียง 25 ไมโครลิตร มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) pH 7.3 เป็นน้ำยาเพียงชนิดเดียว ภายในเครื่อง ๆ มี glucose probe เป็นส่วนประกอบสำคัญ ประกอบด้วย H_2O_2 electrode และแผ่นเอนไซม์ที่ใช้ห่าน้ำตาลกลูโคส (glucose oxidase membrane) แผ่นเอนไซม์นี้ประกอบด้วย membrane 2 ชั้น ที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสอยู่ภายใน membrane ชั้นนอกเป็น polycarbonate membrane ทำหน้าที่เป็น dialysis membrane กันสารที่มีโมเลกุลใหญ่ไม่ให้ผ่านเข้าไป แต่จะยอมให้ glucose ผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ glucose oxidase ที่อยู่ภายใน ได้ H_2O_2 ซึ่งสามารถผ่าน membrane ชั้นใน คือ cellulose acetate membrane ออกไปยัง H_2O_2 electrode เกิดปฏิกิริยา redox มีการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอน วัตถุเป็นกระแสไฟฟ้าออกมาเป็นสัญญาณโดยตรงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ดังรูปที่ 2 (7) แผ่นเอนไซม์ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากต่างประเทศ คาดว่าการเตรียมคงใช้หลักการ immobilized enzyme แบบ dialysis membrane electrode ซึ่งเป็นหลักการไม่ยุ่งยากและซับซ้อนมาก น่าจะมีการเตรียมขึ้นใช้เองได้ เพื่อเป็นการศึกษาการผลิตอุปกรณ์ขึ้นใช้เอง และคาดว่าจะช่วยลดค่าใช้จ่ายลงไปได้บ้าง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเตรียมแผ่นเอนไซม์ glucose oxidase membrane สำหรับใช้กับเครื่อง YSI Glucose Analyzer

Model 23A และทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นเอนไซม์ที่เตรียมนี้

วัสดุและวิธีการ

cellulose acetate membrane ซึ่งเป็น membrane ชั้นในที่อยู่ติดกับ H_2O_2 electrode เตรียมได้จาก 1 ส่วน cyclohexanone (BDH, No.27871), 1/24 ส่วน cellulose acetate powder (BDH, No.27654) และ 1/23 ส่วน isopropanol (BDH, No.10224) นำส่วนผสมนี้ไป stir ด้วย magnetic stirrer ประมาณ 10 ชั่วโมง จะได้สารละลายใสไม่มีสี นำไปทำเป็นแผ่นวงกลมที่มีเส้นศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร โดยใช้ส่วนผสม 500 ไมโครลิตร หยดลงในอ่างน้ำที่สะอาดปราศจากฝุ่นละออง จะได้แผ่น cellulose acetate membrane บางใสไม่มีสี (8)

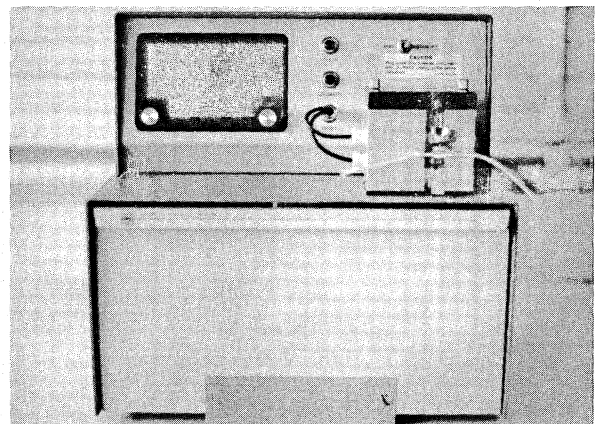


Figure 1A The YSI Glucose Analyzer Model 23A

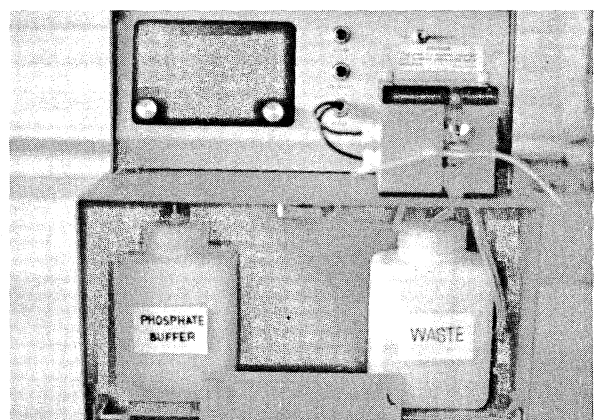


Figure 1B The Reagent Part (Phosphate Buffer) of the YSI Glucose Analyzer Model 23A

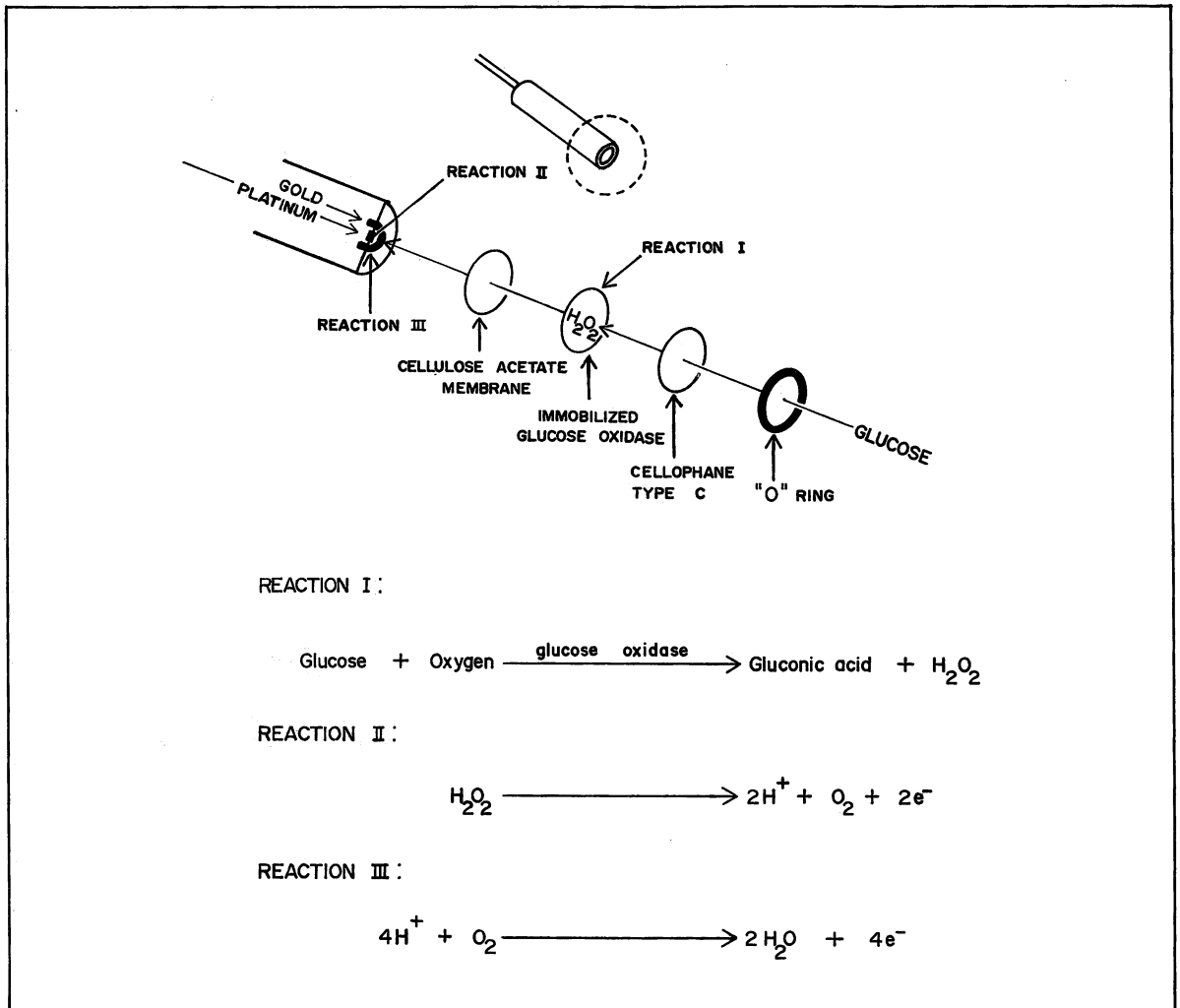


Figure 2 *Diagram of The Glucose Probe and Membranes*

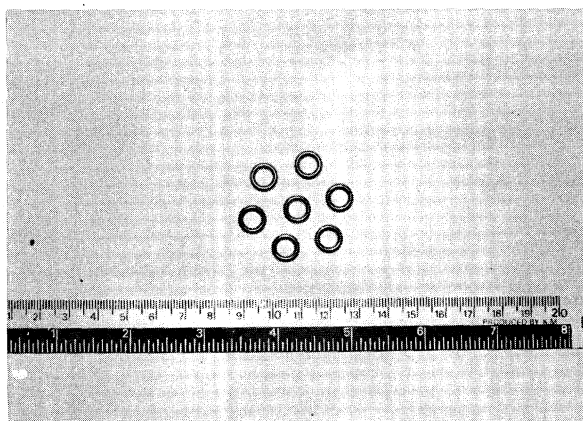


Figure 3 *The Prepared Glucose Oxidase Membranes*

membrane ชั้นนอกที่ทำหน้าที่เป็น dialysis membrane ใช้ cellophane type C (Elkay, No. DM-C-1, 105-1058) และวิธีการ immobilize เอนไซม์ระหว่าง membrane สองชั้นนี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Taylor (8) โดยใช้ glucose oxidase (Sigma, No. G-8135) 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร โดยมี 0.5% glutaraldehyde (BDH, NO.28682) เป็นตัวเชื่อม (cross-link reagent) หลังจาก immobilize เอนไซม์ ภายใน membrane ทั้งสอง แผ่นแล้ว นำยาง Silicone rubber O-ring ขนาด 3/8 นิ้ว มาปิดบนแผ่นเอนไซม์ เพื่อเป็นตัว fix แผ่นเอนไซม์ให้ติดกับ H_2O_2 electrode จะได้ glucose oxidase membrane ดังรูปที่ 3 นำไปเก็บไว้ในที่มืด ไม่มีความชื้น ที่ 4°C

นำแผ่นเอนไซม์ที่เตรียมได้ ไปใช้หาปริมาณน้ำตาล

กลูโคสเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในด้านความเที่ยงตรง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และศึกษาเปรียบเทียบ (comparative study) แผ่นเอ็นไซม์ที่เตรียมนี้กับแผ่นเอ็นไซม์สำเร็จรูปจากบริษัทผู้ผลิต รวมทั้งการทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษา แผ่นเอ็นไซม์ (stability test)

ผลการศึกษา

เมื่อนำแผ่นเอ็นไซม์ที่เตรียมได้ มาทำการทดสอบ ประสิทธิภาพความเที่ยงตรงโดยวิธี Addition และ Dilution พบว่าให้ recovery 99.89% และ 98.43% ตาม ตารางที่ 1, 2 ความแม่นยำโดยวิธี Within-Run และ Day-to-day Run พบว่าให้สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

Table 1 Accuracy of The Proposed Method for Glucose Determination by Addition Technique of Pooled Plasma

Glucose	Original Value	Glucose (mg/dl)		Percentage of Recovery
		Expected Value	Observed Value*	
Low (L)	73			
Medium (M)	152			
High (H)	313			
L + M (1 : 1)		112.5	113	100.44
L + H (1 : 1)		193	191.67	99.31
M + H (1 : 1)		232.5	232.33	99.93
			Average	99.89

* = Mean of 3 determinations

Table 2 Accuracy of The Proposed Method for Glucose Determination by Dilution Technique of Pooled Plasma

Glucose	Original Value	Glucose (mg/dl)		Percentage of Recovery
		Expected Value	Observed Value*	
Low Plasma	128			
Dilution 1 : 2		64	63.67	99.48
Dilution 1 : 4		32	30.83	96.34
Dilution 1 : 8		16	15.5	96.88
Medium Plasma	160			
Dilution 1 : 2		80	79.67	99.59
Dilution 1 : 4		40	39.67	99.18
Dilution 1 : 8		20	19.17	95.85
High Plasma	318			
Dilution 1 : 2		159	159.33	100.21
Dilution 1 : 4		79.5	78.67	98.96
Dilution 1 : 8		39.75	39.5	99.37
			Average	98.43

* = Mean of 3 determinations

Table 3 Precision of The Proposed Method for Glucose Determination

Precision	Level of Plasma Glucose Tests	Number of	Mean $\pm$ S.D. (mg/dl)	Coefficient of Variation (%)
Within-Run	Low	20	93.45 $\pm$ 0.60	0.642
	Medium	20	135.2 $\pm$ 0.52	0.387
	High	20	308.4 $\pm$ 1.93	0.626
	Average			0.552
Day-to-day-Run	Low	20	100.27 $\pm$ 3.25	3.24
	Medium	20	153.70 $\pm$ 3.12	2.03
	High	20	310.94 $\pm$ 2.37	0.76
	Average			2.01

S.D. = Standard Deviation

(coefficient of variation หรือ C.V.) 0.55% และ 2.01% ตามตารางที่ 3 สามารถหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้สูงสุด 450 mg/dl ดังรูปที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเอ็นไซม์ที่เตรียมกับแผ่นเอ็นไซม์สำเร็จรูปจากบริษัทผู้ผลิต พบว่าสามารถวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ใกล้เคียงกันโดยมีค่า r (correlation coefficient) เท่ากับ 0.9986 ดังรูปที่ 5 และพบว่า stability ของแผ่นเอ็นไซม์สามารถเก็บไว้ได้นาน 7 เดือน โดยที่มีค่า C.V. เท่ากับ 1.83% ดังรูปที่ 6 และแผ่นเอ็นไซม์หนึ่งแผ่นสามารถใช้ทดสอบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ประมาณ 300 ครั้ง

วิจารณ์

การตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดย YSI Glucose Analyzer Model 23A อาศัยหลักการของเอ็นไซม์ อิเล็กโทรด โดยเอ็นไซม์ที่ใช้อยู่ในรูปของ immobilized enzyme ทำให้มีข้อได้เปรียบที่นอกจากจะเป็นการตรวจได้จำเพาะ (specific) แล้ว ยังเป็นการประหยัดเอ็นไซม์ด้วย ซึ่งจะช่วยให้ค่าใช้จ่ายลดน้อยลง (9-11) ดังนั้น YSI Glucose Analyzer นี้จึงเหมาะกับการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสทั้งในแบบประจำวัน แบบเร่งด่วน และในคลินิกทั่วไป แต่มีข้อจำกัดที่ว่าแผ่นเอ็นไซม์ ที่เป็นตัวสำคัญในการทำปฏิกิริยานั้น เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากบริษัทผู้ผลิต ถ้าสามารถเตรียมขึ้นใช้ได้เอง ก็จะช่วย

ลดค่าใช้จ่ายลงไปได้อีก ซึ่งจากการทดลองเตรียมแผ่นเอ็นไซม์นี้โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Taylor (8) พบว่าการเตรียมไม่ยุ่งยาก มี 2 ขั้นตอน ตอนแรกเป็นการเตรียม cellulose acetate membrane ใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง และตอนที่สองเป็นการ immobilize เอ็นไซม์ glucose oxidase ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง รวมทั้งสิ้น 12 ชั่วโมง ได้แผ่นเอ็นไซม์อย่างน้อยที่สุด 20 แผ่น เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ปรากฏว่า ความเที่ยงตรง (ตารางที่ 1, 2) มีค่าใกล้เคียงกับการรายงานของ Chua และ Tan (12) ความแม่นยำ (ตารางที่ 3) อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ความเป็นเส้นตรง (รูปที่ 4) มีค่า 450 mg/dl ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานของ Chua และ Tan (12) ซึ่งให้ค่า 460 mg/dl เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเอ็นไซม์จากบริษัทผู้ผลิต พบว่ามีความใกล้เคียงกันโดยมีค่า r สูงถึง 0.9986 และค่าน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $P > 0.15$ (รูปที่ 5) แผ่นเอ็นไซม์ที่เตรียมนี้ 1 แผ่นสามารถหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ประมาณ 300 ครั้ง และเก็บไว้ได้นาน 7 เดือน (รูปที่ 6) ดังนั้นสามารถคำนวณการเตรียมแผ่นเอ็นไซม์ในแต่ละครั้งเพื่อให้เพียงพอกับปริมาณที่ใช้ได้ และจากการคำนวณเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในแต่ละครั้ง พบว่า ถ้าใช้แผ่นเอ็นไซม์ที่เตรียม จะสามารถลดค่าใช้จ่ายได้ประมาณ 11 เท่า

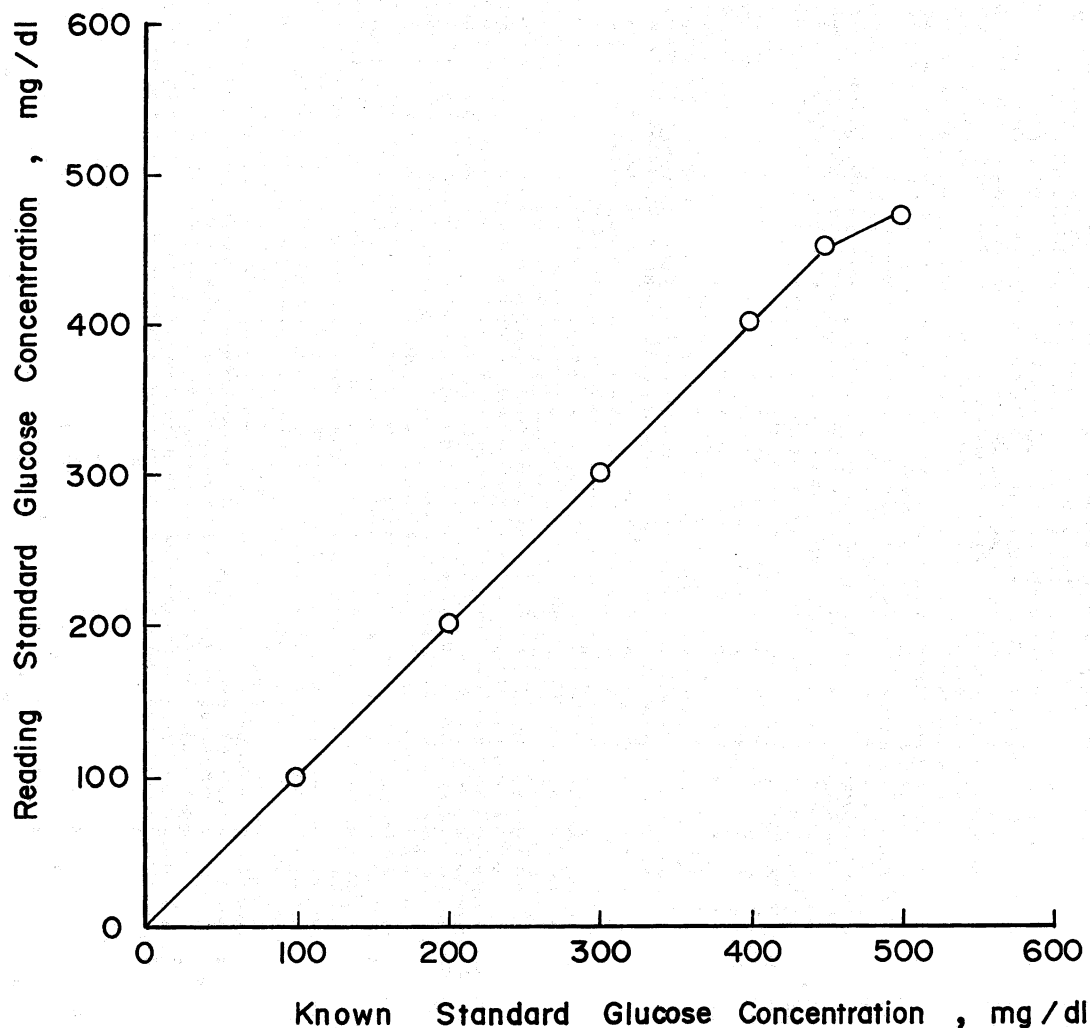


Figure 4 A Typical Calibration Curve for Glucose Determination by Using Prepared Glucose Oxidase Membrane

กล่าวคือ เมื่อใช้แผ่นเอ็นไซม์จากบริษัทผู้ผลิตจะสิ้นค่าใช้จ่ายประมาณ 1 บาท แต่ถ้าใช้แผ่นเอ็นไซม์ที่เตรียมเอง ค่าใช้จ่ายจะลดลงเหลือเพียง 0.09 บาท

การศึกษาครั้งนี้ เป็นเพียงตัวอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่า ในกรณีที่สามารถเตรียมวัสดุหรืออุปกรณ์บางชนิด เพื่อใช้แทนการซื้อสำเร็จรูปจากบริษัทผู้ผลิต ก็จะสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายลงไปได้ และหวังว่าคงจะเป็นแนวทางต่อผู้สนใจที่จะศึกษาค้นคว้าในเรื่องทำนองเดียวกันนี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พิชัย ฐะเรษฐกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามารับดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความรู้ ข้อคิด และคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนการตรวจสอบทุกขั้นตอนจนสำเร็จไปด้วยดี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไปและธนาคารเลือด โรงพยาบาลรามารับดี ที่ช่วยเก็บตัวอย่างเพื่อการทดสอบ และเพื่อนทุกคนที่ให้ความสนใจ และช่วยเหลือในการศึกษาครั้งนี้

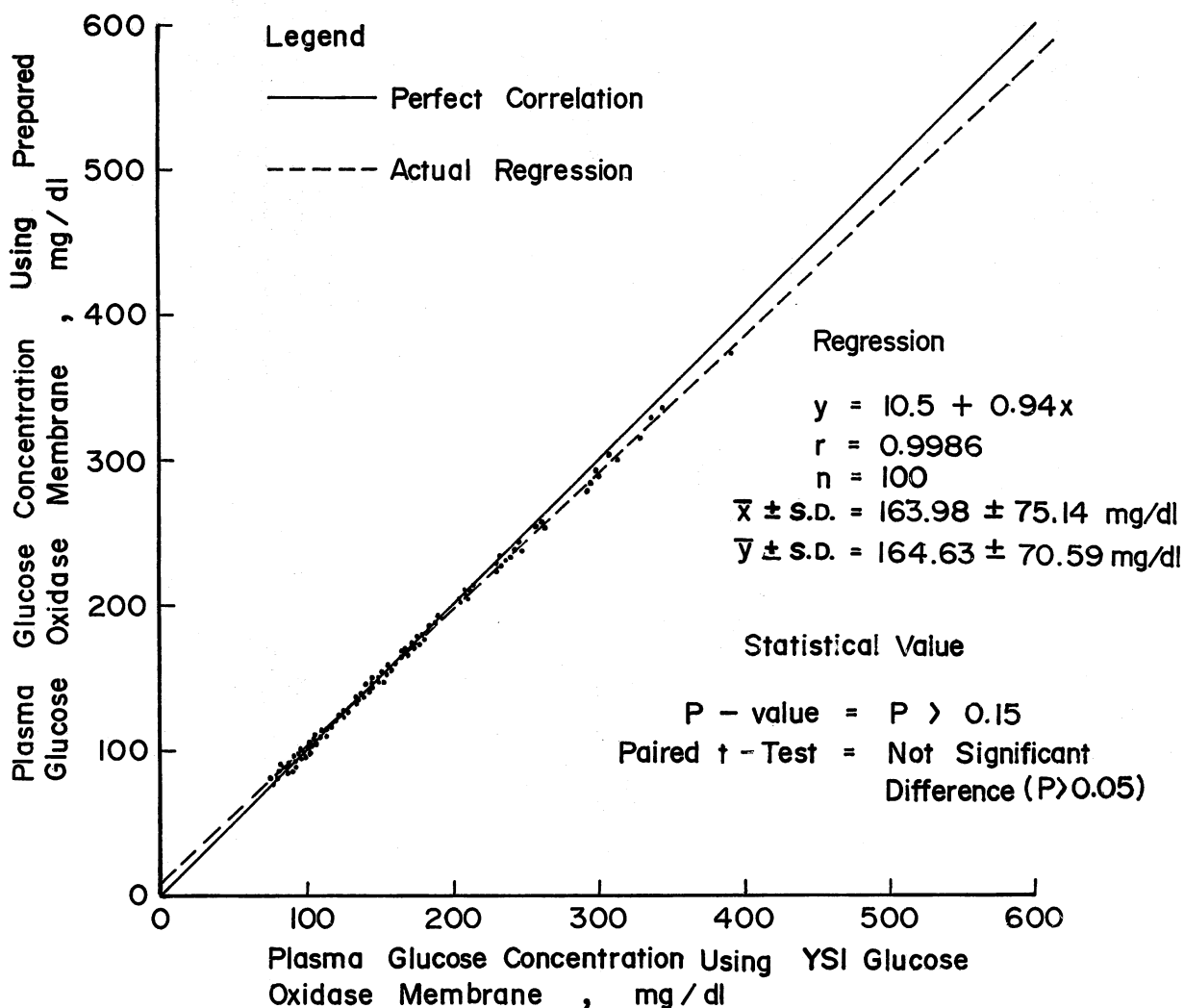
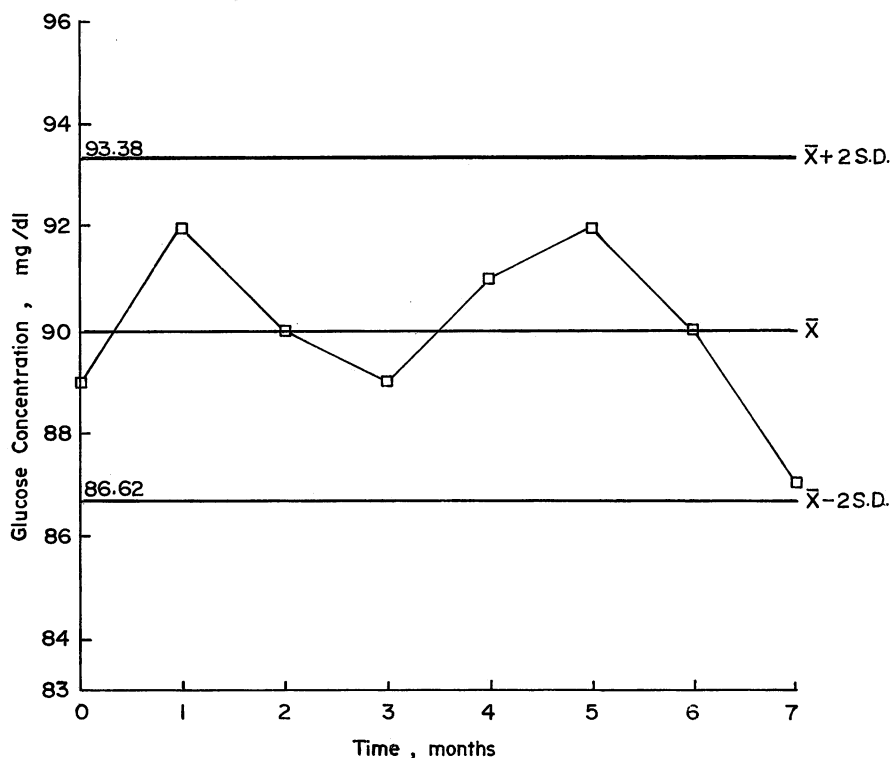


Figure 5 Correlation of Plasma Glucose Concentrations Determined Using Prepared and YSI Glucose Oxidase Membranes

REFERENCE

1. Guibault GG, Lubrano GJ. Enzyme Electrode for Glucose. *Anal Chim Acta* 1972 ; 60 : 254-6.
2. Guibault GG, Lubrano GJ. An Enzyme Electrode for the Amperometric Determination of Glucose. *Anal Chim Acta* 1973 ; 64 : 439-55.
3. Haynes R, Siegelman FL. Measurement of Glucose in Whole Blood by Use of an Oxygen Sensor with Immobilized Glucose Oxidase. *Clin Chem* 1971 ; 17 : 644.
4. Nagy G, Vonstorp LH, Guibault GG. Enzyme Electrode for Glucose Based on an Iodide Membrane Sensor. *Anal chim Acta* 1973 ; 66 : 443.
5. Nilsson H, Akerlund A, Mosbach K. Determination of Glucose, Urea and Penicillin Using Enzyme-pH-Electrodes. *Biochim Biophys Acta* 1973 ; 320 : 529-34.
6. Williams DL, Doig AR, Korosi A. Electrochemical Enzymatic Analysis of Blood Glucose and Lactate. *Anal Chem* 1970 ; 42 : 118-21.



Mean , $\bar{X}$ = 90 mg/dl

Standard Deviation , S.D. = 1.69 mg/dl

Coefficient Variation , C.V. = 1.88 %

Figure 6 The Stability of the Prepared Glucose Oxidase Membrane Using Ortho Control Serum

7. Yellow Spring Glucose Analyzer, Model 23A. Instruction Manual, Yellow Spring Instrument Co, Inc, Yellow Spring, Ohio, 1976.
8. Tayer PJ, Kmetec E, Johnson JM. Design, Construction, and Applications of Galactose Selective Electrode. Anal Chem 1977 ; 49 : 789-94.
9. Mosbach K. Immobilized Enzymes, in Method in Enzymology, Vol 44. New York : Academic Press, 1976.
10. Wingard LB, Katchalski-Katzir E, Goldstein L. Immobilized Enzyme Principle, in Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol 1. New York : Academic Press, 1976 : 23-110.
11. Chibata I. Immobilized Enzymes, Research Development. Halsted Press, 1978.
12. Chua KS, Tan IK. Plasma Glucose Measurement with the Yellow Springs Glucose Analyzer. Chin Chem 1978 ; 24 : 150-52.