# การตรวจวิเคราะห์ระดับ HDL-Cholesterol ในซีรั่มด้วยวิธีเอนไซม์

สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย วท.ม.*
ประวิทย์ เตติวัฒน์ พ.บ.**

**เรื่องย่อ :** HDL-C เป็นตัวสำคัญในการพา cholesterol จากเซลล์หรืออวัยวะต่าง ๆ ไปยังตับ เพื่อเผาผลาญต่อไป ระดับ HDL-C ในซีรั่มมีความสำคัญทางคลินิก โดยมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับความเสี่ยงของการเกิด atherosclerotic disease กล่าวคือระดับ HDL-C ที่สูงขึ้น จะป้องกันการเกิด coronary heart disease ได้ จากการศึกษาวิธีวิเคราะห์ระดับ HDL-C โดยเอนไซม์วิธีใหม่นี้ พบว่าให้ค่าความแม่นยำดี ผลการวิเคราะห์แบบ within-run ได้ค่า CV = 1.188%, แบบ between-run ได้ค่า CV = 2.013% และมีค่าความถูกต้องที่เชื่อถือได้ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์กับวิธีตกตะกอนพบว่ามีค่าความสัมพันธ์ที่ดีคือ r = 0.965, Y = 1.981 + 0.959 X, n = 172 และการศึกษาค่าปกติพบว่าอยู่ในช่วง 36.16 – 86.08 มก./ดล. นั่นคือระดับที่อยู่ในเกณฑ์ปกติควรมากกว่า 35 มก./ดล.

**Abstract :** **Measurement of HDL-Cholesterol in Serum by A New Enzymatic Method**

**Surapon Tangvarasittichai, M.Sc.*, Prawit Taytiwat, M.D.****
**Faculty of Allied Health Science, **Health Science Research Institute, Naresuan University, Amphur Muang, Pitsanulok 65000.*

***Siriraj Hosp Gaz*** 2001; **53:** 414-419.

**High density lipoprotein (HDL) is responsible for the reverse transport of cholesterol from peripheral cells to the liver where cholesterol is metabolised. Monitoring of HDL-C in serum is of clinical importance since an inverse correlation exists between serum HDL-C concentration and the risk of atherosclerotic disease. Elevated HDL-C concentrations are protective against coronary heart disease. In this study, an automated enzymatic method for the direct determination of HDL-C in serum was found to have good precision and accuracy. Reproducibility was determined daily using control Precinorm L® in an internal protocol (n = 20), within-run CV = 1.188% and between-run CV = 2.013%. The comparison of the HDL-C enzymatic assay with HDL-C precipitating assay was good with a correlation coefficient r = 0.965, Y = 1.981+ 0.959X, n = 172. The normal range of HDL-C concentration in serum by this enzymatic method was 36.16 – 86.08 mg/dl. Thus, an HDL-C level of over 35 mg/dl shows that the risk is not high and is protective against coronary heart disease.**

---

**สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์, คณะสหเวชศาสตร์; **สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, อ. เมือง, จ. พิษณุโลก 65000.*

## บทนำ

High density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) เป็นไลโปโปรตีนที่สำคัญตัวหนึ่ง พบว่า HDL-C จะเป็นตัวที่พา cholesterol จากเซลล์หรืออวัยวะต่าง ๆ ไปยังตับ ที่ตับ cholesterol จะถูกเปลี่ยนไปเป็น bile acid ซึ่งต่อมาจะถูกขับออกสู่ลำไส้โดยผ่านทาง biliary tract ดังนั้นการติดตามวัดระดับ HDL-C ในซีรั่ม ซึ่งมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับความเสี่ยงของการเกิด atherosclerotic disease จึงมีความสำคัญทางคลินิกโดยระดับ HDL-C ที่สูงขึ้นจะเป็นตัวป้องกันการเกิด coronary heart disease (CHD) ขณะที่ถ้าระดับ HDL-C ลดลง และระดับไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้นจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจขาดเลือด

มีวิธีการต่าง ๆ มากมายที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ระดับ HDL-C เช่นวิธี ultracentrifugation, electrophoresis,HPLC[4,8] และวิธีที่อาศัยการตกตะกอน (precipitation) แต่วิธีที่สามารถใช้เป็นงานประจำวัน (routine) ได้คือวิธีที่อาศัยการตกตะกอนโดยใช้การรวมกันของสารพวก polyanion และ divalent cation เช่น dextran sulfate/magnesium chloride หรือ phosphotungstate/magnesium chloride[5,10] วิธีการตกตะกอนนี้เป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลายมานาน มีขั้นตอนมากมาย ซึ่งเสียเวลาค่อนข้างมาก และไม่สามารถใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติได้ ซึ่งอาจทำให้ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เกิดความผิดพลาดได้ง่าย ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ระดับ HDL-C โดยตรง[6,7,9] ซึ่งการทดลองนี้ใช้ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Roche Diagnostic (ประเทศไทย)

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ระดับ HDL-C โดยวิธีเอนไซม์เปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีการตกตะกอน

2. เพื่อหาระดับของ HDL-C ในคนปกติในตัวแทนประชาชนอาสาสมัครเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

## วัตถุและวิธีการ

**กลุ่มตัวอย่าง** : เจาะเลือดจากประชาชนในเขตอำเภอเมืองพิษณุโลกที่เข้ารับบริการตรวจสุขภาพเนื่องในงานวันมหิดลของมหาวิทยาลัยนเรศวร โดยผู้เข้ารับการตรวจต้องอดอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เป็นชาย 45 ราย อายุระหว่าง 18-76 ปี อายุเฉลี่ย 34 ปี และหญิง 139 ราย อายุระหว่าง 17-75 ปี อายุเฉลี่ย 38 ปี จำนวนทั้งสิ้น 184 ราย

**น้ำยาวิเคราะห์** : การตรวจวิเคราะห์ HDL-C โดยตรงด้วยวิธีเอนไซม์ ใช้ชุดน้ำยาของบริษัท Roche Diagnostic[1-3] (ประเทศไทย) Cat. no.1930672 โดยน้ำยาขวดที่ 1 เป็น α - cyclodextrin/buffer, 6x29.3 ml และน้ำยาขวดที่ 2 เป็น PEG-enzymes/4-aminophenazone/buffer, 3x20.0 ml โดยอาศัยหลักการของ homogeneous enzymatic colorimetry โดยสารตัวอย่างจะถูกเติมรวมกับน้ำยาขวดที่ 1 เป็น sulfated α - cyclodextrin/buffer ซึ่งเป็น buffer ที่ค่อนข้างเป็นด่าง และ magnesium sulfate ตัว sulfated α - cyclodextrin และ dextran sulfate จะทำให้ LDL, VLDL และ chylomicrons เปลี่ยนเป็นสารเชิงซ้อนที่สามารถละลายน้ำได้ (water-soluble complexes) ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับ PEG-modified enzymes เมื่อเติมน้ำยาตัวที่ 2 ซึ่งเป็น PEG-modified enzymes/4- aminophenazone/buffer ปฏิกิริยาจึงจะเริ่มเกิดขึ้น โดยความเข้มข้นของ cholesterol ใน HDL-C จะถูกวิเคราะห์โดยเอนไซม์ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase ควบคู่กับ PEG ต่อหมู่อะมิโน (ประมาณ 40%)

$$\text{HDL-Cholesterol esters} + H_2O \xrightarrow[\text{estersse}]{\text{PEG- Cholesterol}} \text{Cholesterol} + \text{RCOOH}$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{PEG- Cholesterol}} \Delta^4\text{- Cholestenone} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-aminophenazone} + \text{HSDA}^{\bullet} + H^+ + H_2O \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Purple blue pigment} + 5H_2O$$

$^{\bullet}$HSDA = N(2-hydorxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline

สำหรับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีตกตะกอน ใช้สารพวก polyanion และ divalent cation ได้แก่ phosphotungstate/magnesium chloride และตรวจวิเคราะห์ระดับ HDL-C ในส่วนใส ด้วยเอนไซม์ cholesterol oxidase/peroxidase

Calibrator : ได้จากบริษัท Roche Diagnostic (ประเทศไทย) ได้แก่ HDL/LDL-C plus 1972235 lot/ch.-B. : - 199657 ซึ่งมีค่า HDL-C 58.3 มก./ดล. และ LDL-C 143 มก./ดล.

**สารควบคุมคุณภาพ** (Control) : ได้จากบริษัท Roche Diagnostic (ประเทศไทย) คือ Precinorm L® 781827 Lot./ch.-B. : 198413

**วิธีการ** : ตรวจวิเคราะห์ระดับ glucose, BUN, creatinine, cholesterol, triglyceride, AST, ALT, ALP และ HDL-C (วิธีเอนไซม์), HDL-C (วิธีตกตะกอน) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ HITACHI-902 จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคัดแยกตัวอย่างที่ต้องการ โดยคัดเฉพาะรายที่มีผลการตรวจเป็นปกติทุกอย่าง (รวมถึง ECG และความดันเลือดด้วย) เพื่อนำมาศึกษาระดับปกติของผลการตรวจวิเคราะห์ HDL-C โดยวิธีเอนไซม์ และหาความสัมพันธ์กับวิธีตกตะกอน รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์ด้วย

## ผล

1. จากการศึกษาประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ระดับ HDL-C โดยวิธีเอนไซม์

1.1. ความแม่นยำ (precision) จากการตรวจวิเคราะห์ในสารควบคุมคุณภาพ Precinorm L® Lot./ch.-B. : 198413 โดยวิเคราะห์ทั้งแบบ within-run และ between-run ทั้งสิ้น 20 ครั้ง ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

1.2. ความถูกต้อง (accuracy) จากการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพ Precinorm L® Lot./ch.-B. : 198413 พบว่าให้ความถูกต้องเชื่อถือได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 2

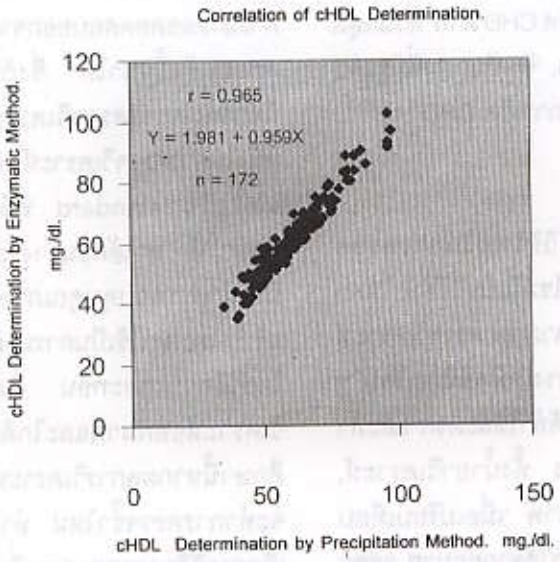
1.3. เมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีตกตะกอน พบว่าให้ค่าความสัมพันธ์ที่ดี มีค่า $r = 0.965$, $Y = 1.981 + 0.959X$, $n = 172$ ดังรูปที่ 1

ตารางที่ 1. แสดงค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์

| | Within-run | | | Between-run | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\bar{X}$ | S.D. | %C.V. | $\bar{X}$ | S.D. | %C.V. |
| Precinorm L® | 42.9 | 0.51 | 1.188 | 43.2 | 0.87 | 2.013 |

ตารางที่ 2. แสดงค่าความถูกต้องในการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์

| | Expected value | | Assayed value | |
|---|---|---|---|---|
| | $\bar{X}$ | S.D. | $\bar{X}$ | S.D. |
| Precinorm L® | 43.2 | 3.5 | 42.9 | 0.51 |




*รูปที่ 1.* แสดงค่าความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ HDL – cholesterol

2. จากการศึกษาระดับปกติของผลการตรวจวิเคราะห์ระดับ HDL-C โดยวิธีเอนไซม์ ซึ่งคัดเลือกผู้เข้ารับบริการที่มีผลการตรวจวิเคราะห์ทุกรายการปกติ จำนวนทั้งสิ้น 184 ราย พบว่าให้ค่าเฉลี่ยเป็น 61.12 มก./ดล. และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็น 12.48 มก.ดล. ดังนั้นระดับปกติอยู่ในช่วง 36.16 - 86.08 มก./ดล. จากความรู้ที่ว่าการมีระดับ HDL-C สูงขึ้นจะเป็นตัวป้องกันการเกิด coronary heart disease ขณะที่ถ้าระดับ HDL-C ลดลง จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจขาดเลือด ดังนั้นคนปกติที่จะลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดจึงควรมีค่ามากกว่า 35 มก./ดล. ซึ่งจะได้ค่าอ้างอิงดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3.** แสดงค่าอ้างอิงของระดับ HDL-C ตามความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจขาดเลือด

| Subjects | No risk | Moderate risk | High risk |
|---|---|---|---|
| Men[12,13] (mg/dl) | >55 | 35 – 55 | <35 |
| Women[12,13] (mg/dl) | >65 | 45 – 65 | <45 |

ผลการศึกษาที่ได้เป็นไปตาม National Cholesterol Education Program (NCEP)[11] กล่าวคือถ้าระดับ HDL-C <35 มก./ดล. จัดเป็นกลุ่มที่มีระดับ HDL-C ต่ำ ซึ่งจะมีความเสี่ยงต่อการเกิด CHD มาก ส่วนกลุ่มที่มีระดับ HDL-C > 60 มก./ดล. จัดเป็นกลุ่มที่มีระดับ HDL-C สูง ซึ่งไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิด CHD

## วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าวิธีใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ระดับ HDL-C โดยเอนไซม์นี้เป็นวิธีที่ดี ให้ค่าความถูกต้องแม่นยำที่ดี และยังสามารถตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิกพร้อม ๆ กับการตรวจวิเคราะห์สารอื่น ๆ ได้ทำให้สะดวก และทำได้รวดเร็ว แต่ราคาค่อนข้างแพง ทั้งน้ำยาวิเคราะห์, calibrator และสารควบคุมคุณภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีตกตะกอนแบบเดิม ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายถูกมาก แต่จะมีสารควบคุมคุณภาพของบางบริษัทที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์โดยวิธีนี้ได้ และค่าที่ได้ก็มีความผิดพลาดมากพอสมควร ซึ่งเกิดจากขั้นตอนการวิเคราะห์ โดยเฉพาะขั้นตอนการดูดส่วนใสเพื่อนำมาวิเคราะห์ และขั้นตอนการนำหลอดทดสอบออกจากเครื่องปั่น ซึ่งมีโอกาสทำให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมาได้ ซึ่งถ้ามีตะกอนแม้เพียงเล็กน้อยก็ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ผิดพลาดได้ อีกประการหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีตกตะกอนนั้น calibrator หรือ standard ที่นำมาใช้เทียบค่าในการตรวจวิเคราะห์ หาได้ค่อนข้างจะยาก ในการศึกษาทดลองนี้ได้นำสารควบคุมคุณภาพในวิธีเอนไซม์ ซึ่งเป็นของบริษัทโรช มาใช้เป็นสารมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีการตกตะกอน ซึ่งพบว่าทำให้ได้ค่าการตรวจวิเคราะห์ออกมาดีและใกล้เคียงกับวิธีเอนไซม์ ในการศึกษานี้หากผลการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี แตกต่างกันมากจะทำการตรวจซ้ำใหม่ ทำให้พบว่าปัญหาที่สำคัญมักเกิดจากวิธีการตกตะกอน ซึ่งขั้นตอนการปั่น และการดูดส่วนใสมาใช้ในการวิเคราะห์มีความสำคัญมากต่อผล

การวิเคราะห์ที่มีโอกาสผิดพลาดสูง และหากมีปริมาณการวิเคราะห์มากหรือทำการวิเคราะห์โดยไม่ระวังก็จะทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ผิดพลาดไปได้

## สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับ HDL-C โดยเอนไซม์วิธีใหม่นี้เป็นวิธีที่ดี ให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ สามารถใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติได้โดยตรง ทำให้สะดวก รวดเร็ว และผลการวิเคราะห์ที่ได้สามารถรายงานออกมาเป็นชุดการตรวจ (profile) ได้ ช่วยให้แพทย์วินิจฉัยโรคได้สะดวกยิ่งขึ้น ส่วนวิธีวิเคราะห์แบบเดิมก็ยังคงใช้ได้ดีอยู่ แต่มีขั้นตอนค่อนข้างมาก ไม่สะดวก แต่ละขั้นตอนสามารถเกิดข้อผิดพลาดได้หากขาดความระมัดระวัง และที่สำคัญ calibrator หรือ standard ที่ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ HDL-C โดยวิธีตกตะกอนจะต้องให้ค่าที่ถูกต้อง จึงจะทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ถูกต้องตามที่ต้องการ

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนน้ำยาวิเคราะห์จากสถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร และขอขอบคุณบริษัท Roche Diagnostic (ประเทศไทย) ที่เอื้อเฟื้อ calibrator และสารควบคุมคุณภาพ (control)

## References

1. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α - cyclodextrin. Clin Chem 1995; **41:** 717-723.
2. Matsuzaki Y, Kawaguchi E, Morita Y, et al. Evaluation of two kinds of reagents for direct determination of HDL-cholesterol. J Anal Bio-Sc 1996; **19:** 419-427.
3. Nauck M, Marz W, Jarausch J, et al Multicenter evaluation of a homogeneous assay for HDL- cholesterol without sample pretreatment. Clin Chem 1997; **43:** 1622-1629.
4. Okazaki M, Shiraishi K, Ohno Y, et al. Heterogeneity of human high density lipoproteins on high performance liquid chromatography. J Biochem 1982; **92:** 517-524.
5. Burstein M, Scholnick HR, Morfix R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. J Lipid Res1970; **11:** 583-595.
6. Musto J, Lawlor JF. HDL- cholesterol : online separation and analysis utilizing an automated chemistry analyzer. Clin Chem 1993; **39:** 1125. ( Abstract)
7. Kakuyama T, Kimura S, Hashiguchi Y. Fully automated determination of HDL- cholesterol from human serum with Hitachi 911. Clin Chem 1994; **40:** 1104. (Abstract)
8. Harris N, Galpchian V, Rifai N. Three routine methods for measuring high-density lipoprotein cholesterol compared with the reference method. Clin Chem 1996; **42:** 738-743.
9. Cohn JS, McNamara JR, Schaefer EJ. Lipoprotein cholesterol concentrations in the plasma of human subjects as measured in the fed and fasted states. Clin Chem 1988; **34:** 2456-2459.
10. Assmann G, Schriewer H, Schmitz G, et al. Quantification of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid / MgCl2. Clin Chem 1983; **29:** 2026-2030.
11. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J Clin Chem Clin Biochem 1983; **21:** 709-720.
12. Second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel II). NIH Publication, No 93-3096; September, 1993.
13. Assmann G, Schriewer H, Schmitz G, et al. Quantification of high- density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl2. Clin Chem 1983; **29:** 2026-2030.