นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบผลการตรวจวัด LDL-cholesterol ด้วยสูตรคำนวณ Friedewald และวิธี Homogeneous enzymatic assay

เพ็ญศิริ ชูส่งแสง[1]
ปนัดดา มุสิกวัณณ์[2]
วรรณี ชยานันต์นุกูล[3]
นุชรัตน์ วรรณพงศ์[2]
อโณทัย โภคาธิกรณ์[4]

Comparison of LDL-cholesterol using the Friedewald calculation and homogeneous enzymatic assay

Choosongsang P, Musigawan P, Chayanannukul W, Wannapong N, Pokathikorn A.
Chemistry Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand

Songkla Med J 2008;26(1):43-52

Abstract:

Low density lipoprotein cholesterol (LDL-c) is associated with the risk of atherosclerosis and coronary heart disease. Currently the clinical chemistry laboratory estimates of LDL-c using the Friedewald calculation requires a fasting sample and triglyceride to be lower than 400 mg/dl. With the kit reagent from Roche Diagnostic, Thailand, we evaluated the determination of direct LDL-c by homogeneous enzymatic assay performed by using the Hitachi 917 automatic analyzer.

---

[1]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) [2]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (ชีวเคมี) [3]วท.ม. (ชีวเคมี) [4]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (ชีวเคมี), Ph.D.
หน่วยเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
รับต้นฉบับวันที่ 25 มกราคม 2550 รับลงตีพิมพ์วันที่ 19 กันยายน 2550

The results from this study showed the direct result of the LDL-c method had a good accuracy and precision with "within run" percentage CV were 0.50 and 0.69 for the low and high values and between run percentage CV of 1.19 and 0.84 in low and high values, respectively. The comparison of LDL-c by Friedewald calculation and homogeneous enzymatic assay, showed a good correlation (r=0.993, y=1.033x+12.715)

The direct LDL-c is a reasonably specific, accurate, precise method which is recommended to replace the Friedewald calculation. However, the method only approximates LDL-c and is subject to well estabished limitations, but request only LDL-c is cheaper than the Friedewald calculation.

Key words: *LDL-c, Friedewald calculation, coronary heart disease, homogeneous enzymatic assay, direct LDL-c method*

บทคัดย่อ:

Low density lipoprotein cholesterol หรือ LDL-c เป็น lipoprotein สำคัญที่มีผลต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary heart disease, CHD) ปัจจุบันห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกใช้ผลการตรวจวิเคราะห์ LDL-c จากสูตรคำนวณของ Friedewald พบว่ามีข้อจำกัดผู้ป่วยต้องอดอาหารอย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง และผลการตรวจวิเคราะห์ triglyceride ต้องน้อยกว่า 400 mg/dl ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงได้นำการตรวจวิเคราะห์ LDL-c ด้วยวิธี homogeneous enzymatic assay ซึ่งเป็นการตรวจวัดโดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีคำนวณด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัทโรช ไดแอกโนสติกส์ ประเทศไทยจำกัด

จากการศึกษาพบว่าการตรวจวิเคราะห์ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรงมีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด และมีความแม่นยำดีทั้งชนิด within-run ในค่าต่ำและค่าสูงมีค่า %CV เท่ากับ 0.50 และ 0.69 ตามลำดับและ between-run ค่าต่ำและค่าสูง มีค่า %CV เท่ากับ 1.19 และ 0.84 ตามลำดับ และจากตัวอย่างอดอาหารจำนวน 148 ราย มีค่า triglyceride น้อยกว่า 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร นำผลการตรวจ LDL-c ด้วยวิธีคำนวณและวิธีวัดโดยตรงมาศึกษาความสัมพันธ์ พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี มีค่า r=0.993 มีสมการถดถอยเชิงเส้นตรง y=1.033x+12.715

ดังนั้นสามารถนำวิธีวัดโดยตรงมาตรวจวิเคราะห์ LDL-c ได้ ซึ่งจะลดข้อจำกัดจากการใช้สูตรคำนวณ อีกทั้งการสั่งตรวจ LDL-c เพียงอย่างเดียวเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีการใช้สูตรคำนวณ

คำสำคัญ: *LDL โคเลสเตอรอล, สูตรคำนวณ Friedewald, โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ, วิธี homogeneous enzymatic assay, วิธี direct LDL-c method*

บทนำ

โรคหัวใจและหลอดเลือดนับเป็นสาเหตุการตายอันดับแรกของคนไทยในทศวรรษที่ผ่านมา[1] โดยหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary heart disease, CHD) เป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญ และปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญคือภาวะไขมันในเลือดสูง[1-2] มีการกำหนดระดับไขมันโดย The National Cholesterol Education Program (NCEP)[2] ไว้ดังตารางที่ 1

ระดับ LDL-c ที่สูงมีความสัมพันธ์และความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ[3-4] โดย LDL-c เป็น lipoprotein ตัวหนึ่งที่สำคัญ เป็นตัวที่ทำให้เกิด altherosclerosis[5-6] โดยที่ LDL-c ได้มาจาก very low density lipoprotein (VLDL) ซึ่งมี triglyceride เป็นจำนวนมาก ต้องอาศัยการย่อยไขมันโดยเอนไซม์ที่ย่อยไขมันให้เปลี่ยนไปเป็น LDL-c[6-7] และ LDL-c ส่วนเกินแทรกตัวเข้าไปใต้ชั้น endothelium ที่ผิดปรกติร่วมกับการเพิ่มจำนวนของ macrophage และ T-lymphocyte เกิดเป็น fatty streak และ fibrous plague ปกคลุมด้วย fibrous cap ร่วมกับมีการขยายจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ส่งผลให้เกิดการตีบแคบของหลอดเลือดแดงบริเวณที่ก่อให้เกิดอันตรายมากที่สุดคือ coronary artery ทำให้เลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจลดลง[2] ดังนั้นการควบคุมระดับ LDL-c จะป้องกันการเกิด altherosclerosis และลดหรือป้องกันการเกิดการอุดตันได้[2, 6] และการควบคุมให้ระดับ LDL-c น้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ถือว่าเป็นระดับที่ดีที่สุด แม้ว่า LDL-c ที่น้อยกว่า 130 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จะเป็นระดับที่ยอมรับก็ตาม[2, 4]

ตารางที่1 เกณฑ์ระดับไขมันในกระแสเลือดที่กำหนดโดย The National Cholesterol Education Program (NCEP)

ชนิดไขมัน	ระดับที่ยอมรับ mg/dl	ระดับก้ำกึ่ง mg/dl	ระดับเสี่ยงสูง mg/dl	หมายเหตุ
Cholesterol	<200	200-239	>240	
LDL-c	<130	130-159	>160	ระดับที่ดี < 100
HDL-c	>60	-	<35	
Triglyceride	<150	150-199	200-499	ระดับเสี่ยงสูงมาก > 500
Tg/HDL-c ratio	<5	5-6	>6	

การตรวจวิเคราะห์ค่า LDL-c มีหลายวิธี วิธีที่ the Centers for Disease Control (CDC) ใช้และได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่ถูกต้อง เป็นวิธีของ lipid research clinic นั่นคือ วิธี beta-quantification (BQ)[2] โดยใช้หลักการของการปั่นแยกด้วยความเร็วสูง (ultra-centrifugation) ร่วมกับการตกตะกอนทางเคมี (chemical precipitation)[8] โดยการนำเลือดไปปั่น เพื่อแยก VLDL และ chylomicron ออก และหาค่า cholesterol และ HDL-c ด้วยวิธีอ้างอิง จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-c จากการนำค่า cholesterol มาลบค่า HDL-c[2] ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เลือดในปริมาณมาก ใช้เวลาค่อนข้างนาน มีขั้นตอนมาก ยุ่งยากซับซ้อน ต้องอาศัยความชำนาญ เครื่องมือราคาแพงจึงมีค่าใช้จ่ายสูง[2-3] นอกจากนี้ก็มีวิธีอื่น ๆ เช่น chromatography, electrophoresis ซึ่งก็เป็นวิธีที่ยุ่งยากซับซ้อน เสียเวลานาน และค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะสมกับการใช้ในงานประจำ สำหรับวิธี precipitation ใช้เวลาและขั้นตอนมาก รวมทั้งอาจเกิด interference ได้จากการมีระดับไขมันสูง[2, 6] จากวิธีการตรวจวัดที่ยุ่งยาก จึงมีการนำสูตรคำนวณมาใช้ในการตรวจวัดระดับ LDL-c อย่างแพร่หลาย[9] โดย Friedewald และคณะ[10] นั่นคือ

LDL-c (mg/dl) = Cholesterol (mg/dl)-HDL-c (mg/dl)-Triglyceride/5 (mg/dl)

ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และราคาถูก[2, 9] แต่ผู้ป่วยต้องมีการอดอาหารอย่างเพียงพอ 10-12 ชั่วโมง อีกทั้งสูตรคำนวณมีความถูกต้องแม่นยำลดลงเมื่อค่า triglyceride มากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และไม่สามารถใช้คำนวณค่า LDL-c ได้เมื่อค่า triglyceride มากกว่าหรือเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร[11] ด้วยข้อจำกัดนี้เองก็มีผู้พยายามปรับปรุงสูตร Modified Friedewald formula โดย DeLong และคณะ[12] นั่นคือ

LDL-c (mg/dl) = Cholesterol (mg/dl)-HDL-c (mg/dl)-0.16 Triglyceride (mg/dl)

และวิธีคำนวณสูตร New Modified Friedewald formula[13] โดยคนไทย Puavilai และ Laoragpongse สามารถใช้กับผู้ป่วยที่มีค่า triglyceride 200-499 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร นั่นคือ

LDL-c (mg/dl) = Cholesterol (mg/dl)-HDL-c (mg/dl)-Triglyceride/6 (mg/dl)

ซึ่งยังคงมีข้อจำกัด และได้มีผู้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์โดยตรงหรือ direct method โดยอาศัยหลักการทางด้านเคมี พบว่าให้ผลการตรวจวัดที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง สามารถทำการตรวจวัดได้ในรายที่มีค่าไขมันสูง[14] โดยบริษัทต่าง ๆ ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจ และผลิตเป็นน้ำยาสำเร็จรูปด้วยหลักการแตกต่างกันไป ค่าที่ได้ก็อาจแตกต่างกันไปด้วย ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก

ปัจจุบันแพทย์ได้ตระหนักและให้ความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ LDL-c เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการสั่งตรวจเฉพาะ LDL-c เพียงรายการเดียว ซึ่งทางห้องปฏิบัติการต้องเสียเวลา และต้องทำการตรวจวิเคราะห์ทั้ง cholesterol, triglyceride และ HDL-c เพื่อนำมาใช้ในการหาค่าคำนวณ อีกทั้งข้อจำกัดต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น นั่นคือสูตรคำนวณไม่สามารถใช้การคำนวณกับผู้ป่วยที่ค่า triglyceride มากกว่า 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรได้ ทำให้ผู้ป่วยเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจโดยที่ไม่สามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้ ผู้ป่วยที่ไม่ได้เตรียมตัวอดอาหารอย่างเพียงพอ คือ อย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง ก็ต้องมาตรวจใหม่ในวันรุ่งขึ้น และจากการศึกษาพบว่าผลการตรวจ triglyceride มากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร[2] ทำให้สูตรคำนวณมีความถูกต้อง และแม่นยำลดลง และมีการแนะนำให้ใช้วิธีวัดโดยตรง

แม้ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีคำนวณและวิธีวัดโดยตรงด้วยน้ำยาสำเร็จรูป LDL-c plus ของบริษัทโรชไดแอกโนสติกส์

ประเทศไทยจำกัด ด้วยเครื่อง Hitachi 917 ของวัฒนา เลี้ยววัฒนาและคณะ[15] พบว่าวิธีทั้งสองมีความสัมพันธ์กันดี แต่ปัจจุบันบริษัทดังกล่าวได้มีการปรับปรุงชุดน้ำยาสำเร็จรูปเป็นรุ่นที่สองหรือ LDL-c plus 2nd generation ซึ่งมีส่วนประกอบในน้ำยาสำเร็จรูป รวมทั้งรายละเอียดหรือพารามิเตอร์ของการทดสอบที่แตกต่างกัน และปัจจุบันราคาต้นทุนของการ ทดสอบ LDL-c ไม่แพงมากนัก พบว่าหากแพทย์สั่งตรวจการทดสอบ LDL-c เพียงรายการเดียว มีราคาต้นทุนที่ถูกกว่า ดังนั้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลการตรวจวิเคราะห์ LDL-c ด้วยน้ำยาสำเร็จรูปรุ่นที่สองเปรียบเทียบกับวิธีคำนวณที่ใช้อยู่เดิมด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 917 ซึ่งใช้ในการทดสอบประจำวันที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่างจากผู้ที่เข้ารับบริการเจาะเลือดที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์โดยที่แพทย์สั่งตรวจ LDL-c ที่มีการอดอาหารอย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง จำนวนทั้งสิ้น 148 ราย เป็นชาย 68 ราย อายุเฉลี่ย 55 ปี และหญิง 80 ราย อายุเฉลี่ย 56 ปี

2. เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 917 ซึ่งประกอบไปด้วยรายละเอียดหรือพารามิเตอร์ของรายการทดสอบต่าง ๆ ของบริษัทและสามารถตั้งโปรแกรมคำนวณจากสูตรคำนวณของ Friedewald[10]

LDL-c (mg/dl) = Cholesterol (mg/dl)-HDL-c (mg/dl)-Tg/5 (mg/dl)

3. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Cholesterol, Triglyceride, HDL-c plus 2nd generation และ LDL-c plus 2nd generation ของบริษัทโรชไดแอกโนสติกส์ประเทศไทยจำกัด ดังนี้

3.1 การตรวจวิเคราะห์ Cholesterol[16]

3.1.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป

- reagent1 ประกอบด้วย PIPES[a] buffer 75 mmol/l, pH 6.8; Mg^{2+} 10 mmol/l, sodiumcholate 0.2 mmol/l, 4-aminophenazone ≥ 0.15 mmol/l, phenol ≥ 4.2 mmol/l, fatty alcohol polyglycol ether: 1%; cholesterol esterase ≥ 0.5 U/ml, cholesterol oxidase ≥ 0.15 U/ml; peroxidase ≥ 0.25 U/ml; stabilizers; preservative a) PIPES = Piperazine-1,4-bis(2-ethane sulfonic acid)

3.1.2 หลักการ Enzymatic colorimetric test สิ่งส่งตรวจเมื่อได้รับการเติมน้ำยา R1 (cholesterol reagent) ปฏิกิริยาเริ่มขึ้นด้วยการใช้เอนไซม์ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase เป็นตัววัด cholesterol

$$\text{cholesterol esters} + H_2O \xrightarrow[\text{esterase}]{\text{cholesterol}} \text{cholesterol} + \text{RCOOH}$$

$$\text{cholesterol} + O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{cholesterol}} \text{cholest-4-en-3-one} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-aminophenazone} + \text{phenol} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{4-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone} + 4\ H_2O$$

3.2 การตรวจวิเคราะห์ Triglyceride[17]

3.2.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป

- reagent 1 ประกอบด้วย PIPES[a] buffer: 50 mmol/l, pH 6.8, $Mg2^{+}$40 mmol/l, sodiumcholate 0.20 mmol/l, ATP ≥ 1.4 mmol/l, 4-aminophenazone ≥ 0.13 mmol/l, 4-chlorophenol 4.7 mmol/l, potassium hexacyanoferrate (II) 1 mol/l, fatty alcohol polyglycol ether: 0.65%, lipoprotein lipase ≥ 5.0 U/ml, glycerokinase ≥ 0.19 U/ml, glycerol phosphate oxidase ≥ 2.5 U/ml peroxidase ≥ 0.10 U/ml; preservative a) PIPES = Piperazine-N,N'bis (2-ethane sulfonic acid)

3.2.2 หลักการ Enzymatic colorimetric test เมื่อสิ่งส่งตรวจเมื่อได้รับการเติมน้ำยา R1 (buffer/4-chlorophenol/enzymes) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังนี้

$$\text{triglycerides} + 3H_2O \xrightarrow{\text{LPL}} \text{glycerol} + 3\text{RCOOH}$$

$$\text{glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{GK}} \text{glycerol-3-phosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{glycerol-3-phosphate} + O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{GPO}} \text{dihydroxyacetone phosphate} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-aminophenazone} + \text{4-chlorophenol} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{4-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone} + 2H_2O + HCl$$

3.3 การตรวจวิเคราะห์ HDL-c[18]

3.3.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป

- reagent 1 ประกอบด้วย MOPS** buffer 19.1 mmol/l, pH 7.0, dextran sulfate 0.5 g/l, magnesium sulfate heptahydrate ≥ 8.11 mmol/l, HSDA: 0.96 mmol/l, ascorbate oxidase ≥ 50 μkat/l, peroxidase ≥ 167 μkat/l; preservative

- reagent 2 ประกอบด้วย PIPES*** buffer: 9.9 mmol/l, pH 7.0; PEG-cholesterol esterase ≥ 3.33 μkat/l, PEG-cholesterol oxidase ≥ 127 μkat/l, peroxidase ≥ 333 μkat/l, 4-amino-antipyrine 2.46 mmol/l; preservative

MOPS** = 3-morpholinopropanesulfonic acid

PIPES*** = piperazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic acid)

3.3.2 หลักการ Enzymatic colorimetric test สิ่งส่งตรวจเมื่อได้รับการเติมน้ำยา R1 โดยที่ magnesium sulfate และ dextran sulphate ทำให้ LDL, VLDL และ chylomicrons เปลี่ยนเป็นสารเชิงซ้อนที่สามารถละลายน้ำได้ และไม่ทำปฏิกิริยากับ PEG-modified enzyme เมื่อเติมน้ำยาตัวที่สอง ซึ่งเป็น PEG-modified enzyme/4-phenazone/buffer ปฏิกิริยาจึงเริ่มเกิดขึ้น โดยความเข้มข้นของ cholesterol ใน HDL-c จะถูกวิเคราะห์โดยเอนไซม์ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase ควบคู่กับ PEG ต่อหมู่อะมิโน (ประมาณร้อยละ 40)

PEG-cholesterol esterase

HDL-cholesterol esters + H_2O ⟶ HDL-cholesterol + RCOOH

PEG-cholesterol oxidase

HDL-cholesterol+ O_2 ⟶ Δ^4-cholestenone + H_2O_2

peroxidase

$2H_2O_2$ + 4-aminophenazone + HSDA* + H^+ + H_2O ⟶ purple-blue pigment + $5H_2O$

HSDA* = Sodium N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline

3.4 การตรวจวิเคราะห์ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง[19]

3.4.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป

- reagent 1 ประกอบด้วย MOPS (3-morpholinopropane sulfonic acid) buffer: 20.1 mmol/l, pH 6.5, HSDA 0.96 mmol/l, ascorbate oxidase ≥ 50 μkat/l, peroxidase: ≥ 167 μkat/l; preservative

- reagent 2 ประกอบด้วย MOPS (3-morpholinopropane sulfonic acid) buffer: 20.1 mmol/l, pH 6.8, MgSO4.7H2O: 8.11mmol/l, 4-aminoantipyrine: 2.46 mmol/l, cholesterol esterase ≥ 50 μkat/l, cholesterol oxidase ≥ 33.3 μkat/l, peroxidase ≥ 333 μkat/l

3.4.2 หลักการ Homogeneous enzymatic colorimetric assay เมื่อสิ่งส่งตรวจได้รับการเติมน้ำยา R1 ปฏิกิริยาเกิดขึ้น ดังนี้

Detergent

LDL-cholesterol esters + H_2O ⟶ Cholesterol + free fatty acid

cholesterol esterase

cholesterol esters จะถูก break down เป็น free cholesterol กับ free fatty acid โดย cholesterol esterase

cholesterol oxidase

LDL-cholesterol+ O_2 ⟶ Δ^4-cholestenone + H_2O_2

ในสภาวะที่มีออกซิเจน คอเลสเตอรอลจะถูกออกซิไดส์โดย cholesterol oxidase ไปเป็น Δ^4-cholestenone กับ H_2O_2

peroxidase

$2H_2O_2$ + 4-aminoantipyrine + HSDA* + H_2O + H^+ ⟶ purple-blue pigment + $5H_2O$

HSDA* = Sodium N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline

ในสภาวะที่มี peroxidase, hydrogen peroxidase ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ 4-aminoantipyrine และ HSDA เกิดสารสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งความเข้มของสีจะขึ้นโดยตรงกับความเข้มข้นของ cholesterol และสามารถวัดได้

4. สารมาตรฐานหรือ calibrator และสารควบคุมคุณภาพ Precinorm และ Precipath ของบริษัทโรชไดแอกโนสติกส์ประเทศไทยจำกัด

ศึกษาความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการตรวจวิเคราะห์ cholesterol, triglyceride, HDL-c และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง แล้วนำผลการตรวจวิเคราะห์ LDL-c ที่ได้จากการใช้สูตรคำนวณของ Friedewald และวิธีวัดโดยตรงมาศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS

ผลการศึกษา

1. การทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ของผลการทดสอบ cholesterol, triglyceride, HDL-c และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง โดยใช้สารมาตรฐานและสารควบคุมคุณภาพของบริษัทโรชไดแอกโนสติกส์ ประเทศไทยจำกัด พบว่าผลการตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วงค่าที่กำหนด (assigned value) ดังตารางที่ 2

2. การทดสอบความแม่นยำ (precision) ของผลการทดสอบ cholesterol, triglyceride, HDL-c LDL-c ด้วยวิธีคำนวณ และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง

2.1 การวิเคราะห์จากตัวอย่างเดียวกันหลายครั้งในวันเดียวกัน (within-run) ทั้งค่าต่ำและค่าสูงของผลการทดสอบ cholesterol, triglyceride, HDL-c และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง รวมทั้ง LDL-c ที่ได้จากการคำนวณจากผลการทดสอบของ cholesterol, triglyceride, HDL-c พบว่ามีความแม่นยำดีมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ต่ำกว่า 5 โดยที่สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ที่ได้จากวิธีคำนวณมีค่าสูงกว่าวิธีวัดโดยตรง ดังตารางที่ 3

2.2 การวิเคราะห์จากตัวอย่างเดียวกันในแต่ละวัน (between-run) ทั้งค่าต่ำและค่าสูงของผลการทดสอบ cholesterol, triglyceride, HDL-c และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง รวมทั้ง LDL-c ที่ได้จากการคำนวณจากผลการทดสอบของ cholesterol, triglyceride, HDL-c พบว่ามีความแม่นยำดีมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ต่ำกว่า 5 โดยที่สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ที่ได้จากวิธีคำนวณมีค่าสูงกว่าวิธีวัดโดยตรง ดังตารางที่ 4

3. ผลการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ LDL-c จากตัวอย่างจำนวน 148 ราย พบว่าวิธีคำนวณมีค่าเฉลี่ย 120 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 62.45 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และค่าต่ำสุดสูงสุดอยู่ระหว่าง 25-324 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในขณะที่การตรวจ LDL-c ด้วยวิธีวัดตรง พบว่า มีค่าเฉลี่ย 136 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 64.95 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และค่าต่ำสุดสูงสุดอยู่ระหว่าง 4-350 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยที่ cholesterol มีค่าเฉลี่ย 199 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 68.59 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และค่าต่ำสุดสูงสุดอยู่ระหว่าง 88-415 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร การทดสอบ triglyceride มีค่าเฉลี่ย 121 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 57.40 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และค่าต่ำสุดสูงสุดอยู่ระหว่าง 36-387 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และการทดสอบ HDL-c มีค่าเฉลี่ย 55.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 16.46 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และค่าต่ำสุดสูงสุดอยู่ระหว่าง 11.8-102.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ดังตารางที่ 5

4. การทดสอบความสัมพันธ์ เมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์ LDL-c ด้วยวิธีคำนวณและวิธีวัดตรงมาทดสอบหาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS พบว่ามีความสัมพันธ์กันดีมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์หรือค่า r=0.993 และสมการถดถอยเชิงเส้นตรง y=1.033x+12.715 ดังรูปที่ 1 เมื่อนำมาทดสอบหาความแตกต่างโดยใช้ paired t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่า LDL-c ที่ได้จากวิธีคำนวณและวิธีวัดโดยตรงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยความแตกต่างของวิธีคำนวณและวิธีวัดโดยตรงเท่ากับ -16.62+8.05 ดังแสดงในรูปที่ 2

วิจารณ์

จากผลการตรวจวิเคราะห์ LDL-c โดยการใช้สูตรคำนวณของ Friedewald นั้น นอกจากผู้ป่วยต้องอดอาหารอย่างเพียงพอ คือ อย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง และมีค่า triglyceride น้อยกว่า 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร พบว่าความถูกต้องแม่นยำและเชื่อถือได้ของ LDL-c ขึ้นอยู่กับความถูกต้องแม่นยำและเชื่อถือได้ของการตรวจวิเคราะห์ cholesterol, triglyceride และ HDL-c อีกด้วย ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า ค่าของการทดสอบ cholesterol, triglyceride และ HDL-c ให้ความถูกต้องอยู่ในช่วงค่าที่กำหนดดังตารางที่ 3 และมีความแม่นยำดี มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่าร้อยละ 5 ทั้งชนิด within-run และ beween-run ดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ และผลการตรวจวิเคราะห์ LDL-c ด้วยวิธีวัดตรงให้ค่าความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดดังตารางที่ 2 และมีความแม่นยำดี มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ต่ำกว่าวิธีคำนวณทั้งชนิด within-run และ between run ดังตารางที่ 3 และ 4 ทั้งนี้การตรวจวิเคราะห์ LDL-c มีความจำเพาะไม่ขึ้นอยู่กับผลการตรวจ cholesterol, triglyceride และ HDL-c ทำให้ลดตัวแปรที่อาจก่อให้เกิด random error ได้มากกว่า

ผลการศึกษาจากผู้รับบริการจำนวน 148 ราย งดอาหารอย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง และมีค่า triglyceride น้อยกว่า 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร พบว่ามีค่าเฉลี่ยของระดับไขมันต่าง ๆ ดังตารางที่ 5 และเมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์ LDL-c ด้วยวิธีคำนวณและวิธีวัดโดยตรงโดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยค่าเฉลี่ยของวิธีคำนวณและวิธีวัดโดยตรงเท่ากับ 120 และ 136 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ และผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีวัดโดยตรงมีค่าสูงกว่า และมีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของทั้งสองวิธีเท่ากับ -16.62+8.05 ดังรูปที่ 2 อย่างไรก็ตามผลการศึกษา LDL-c

ที่ได้จากการคำนวณก็เป็นการประมาณค่าขึ้นมาทดแทนการตรวจวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก ซับซ้อนและราคาแพงในสมัยก่อน แต่ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยตรง ทำให้มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถใช้กับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งการใช้สูตรคำนวณมีความถูกต้องและแม่นยำ ลดลงและมีการแนะนำให้ใช้วิธีตรวจวัดโดยตรง หากค่าไตรกลีเซอร์ไรด์ที่วัดได้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร[2]

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ของผลการทดสอบ cholesterol, triglyceride, HDL-c และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง (N=20)

การทดสอบ	Control	Assigned value (mg/dl)			Assayed value (mg/dl)		
		Mean	SD	range	Mean	SD	range
Cholesterol	Precinorm	85.5	4.3	76.9-94.1	85.7	1.8	82.1-89.3
	Precipath	175	9	157-193	176	2.9	170.2-181.8
Triglyceride	Precinorm	112	6	100-124	109	1.4	106.2-111.8
	Precipath	205	10	185-225	203	2.9	197.2-208.8
HDL-c	precipath HDL/LDL	36.6	2.9	30.8-42.4	37.3	0.55	36.23 - 38.43
LDL-c	precipath HDL/LDL	201	16	169-233	197	6.45	184.1-209.9

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความเที่ยงตรง (precision) ชนิด within-run ของการทดสอบ cholesterol, triglyceride, HDL-c, LDL-c ด้วยวิธีการคำนวณ และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง

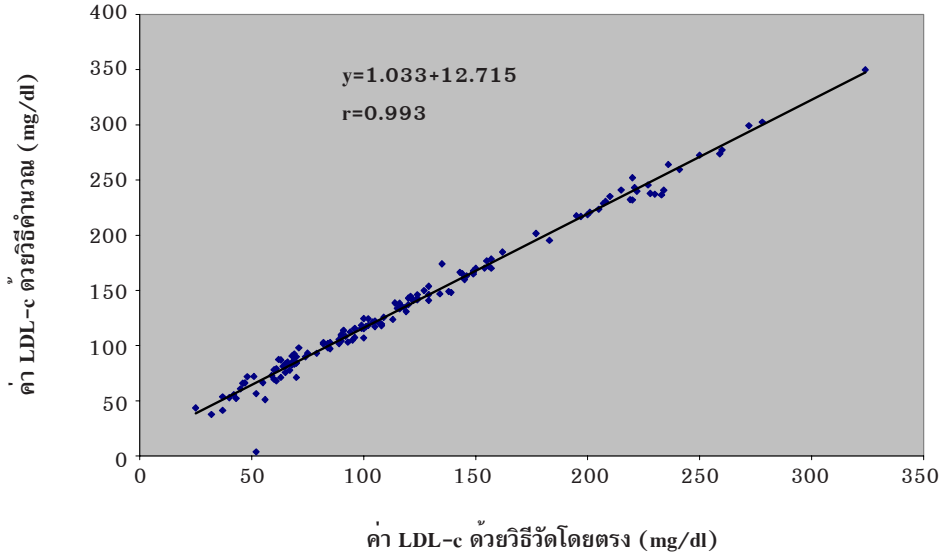
N=20	Cholesterol (mg/dl)		Triglyceride (mg/dl)		HDL-c (mg/dl)		LDL-c (mg/dl) วิธีคำนวณ		LDL-c (mg/dl) วิธีวัดโดยตรง	
	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high
Mean	151	412	121	161	53.5	93.8	66	294	81	305
SD	1.25	2.29	0.93	0.99	0.59	0.67	1.05	2.06	0.41	2.09
%CV	0.83	0.56	0.61	0.77	1.09	0.72	1.61	0.70	0.50	0.69

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความเที่ยงตรง (precision) ชนิด between-run ของการทดสอบ cholesterol, triglyceride, HDL-c, LDL-c ด้วยวิธีการคำนวณ และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง

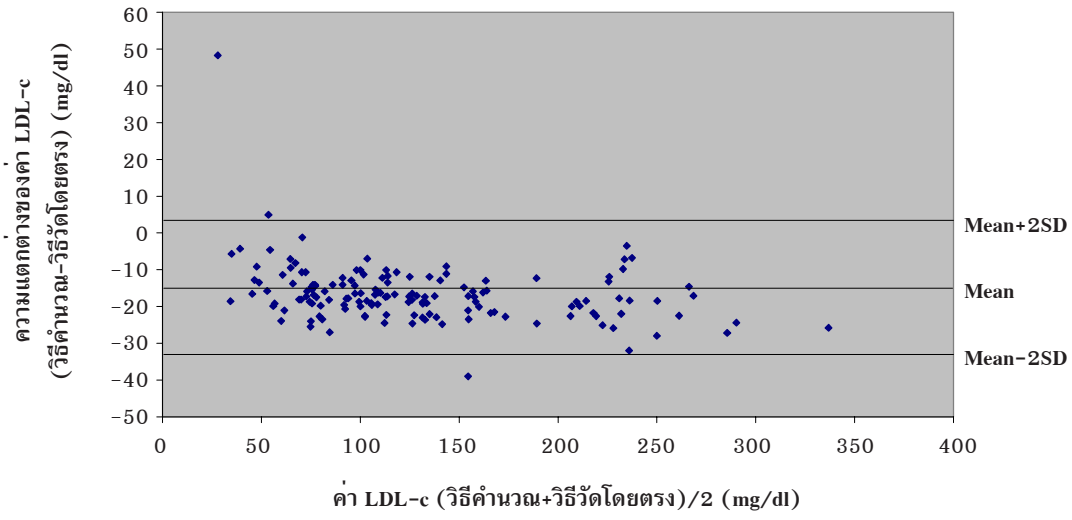
N=20	Cholesterol (mg/dl)		Triglyceride (mg/dl)		HDL-c (mg/dl)		LDL-c (mg/dl) วิธีคำนวณ		LDL-d (mg/dl) วิธีวัดโดยตรง	
	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high
Mean	152	414	120	160	50.8	88.1	69	302	80	307
SD	2.58	4.5	2.1	2.02	1.14	1.72	2.34	4.69	0.95	2.58
%CV	1.70	1.09	1.75	1.26	2.24	1.96	3.39	1.55	1.19	0.84

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าต่ำสุดสูงสุดของการทดสอบ cholesterol, triglyceride, HDL-c และ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง

การทดสอบ	วิธี	N	mean	SD	range
LDL-c (mg/dl)	Friedewald formula	148	120	62.45	25-324
	Homogeneous enzymatic assay	148	136	64.95	4-350
Cholesterol (mg/dl)	Homogeneous enzymatic assay	148	199	68.59	88-415
Triglyceride (mg/dl)	Homogeneous enzymatic assay	148	121	57.40	36-387
HDL-c (mg/dl)	Homogeneous enzymatic assay	148	55.3	16.46	11.8-102.7



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของผลการตรวจวิเคราะห์ระดับ LDL ที่ได้จากวิธีคำนวณและวิธีวัดโดยตรง



รูปที่ 2 แสดงความแตกต่างของค่า LDL-c ที่ได้จากวิธีคำนวณและวิธีวัดโดยตรง

ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธี พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r=0.993 และสมการถดถอยเชิงเส้นตรง y=1.033x+12.715 ซึ่งผลการศึกษาคล้ายคลึงกับผลการศึกษาของวัฒนา เลี้ยววัฒนา และคณะ[7] ในผู้รับบริการจำนวน 422 ราย ในน้ำยา LDL plus โดยเครื่อง H.917 เช่นกัน พบมีความสัมพันธ์กันดี r=0.958 มีสมการถดถอยเชิงเส้นตรง y=17.08+0.85x แม้ส่วนประกอบของน้ำยาและรายละเอียดในพารามิเตอร์ของน้ำยาจะแตกต่างกันก็ตาม

ปัจจุบันพบว่าแพทย์ส่วนใหญ่ตระหนักและให้ความสำคัญกับการตรวจวิเคราะห์ LDL-c มากขึ้น ซึ่งพบว่าบ่อยครั้งที่แพทย์สั่งตรวจเพียงการทดสอบ LDL-c รายการเดียว แต่ทางห้องปฏิบัติการต้องทำการทดสอบ cholesterol, triglyceride และ HDL-c หรือบางครั้งแพทย์สั่งตรวจ LDL-c กับตัวใดตัวหนึ่งในของการทดสอบ cholesterol, triglyceride และ HDL-c ซึ่งทางห้องปฏิบัติการก็ต้องทำการทดสอบทั้งสามการทดสอบเช่นกัน ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย เวลา และจำนวนตัวอย่าง และจากผลการศึกษาราคาต้นทุนของน้ำยา หากแพทย์สั่งตรวจ LDL-c เพียงรายการเดียว พบว่าการใช้วิธีคำนวณมีราคาต้นทุนต่อการทดสอบ 27.32 บาท โดยคิดรวมจากการตรวจวิเคราะห์ cholesterol ซึ่งมีราคา 3.68 บาท การทดสอบ triglyceride ราคา 3.68 บาท และการทดสอบ HDL-c ราคา 19.96 บาท ในขณะที่การทดสอบ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรงมีราคาเพียง 24.38 บาทต่อการทดสอบ ดังนั้นหากแพทย์สั่งตรวจเพียงการทดสอบ LDL-c พบว่าวิธีคำนวณมีราคาต้นทุนแพงกว่าถึง 2.94 บาทต่อการทดสอบ

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ LDL-c ด้วยวิธีวัดโดยตรง ด้วยวิธี homogeneous enzymatic assay มีความจำเพาะ ให้ค่าความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ จึงเป็นวิธีที่มีความสำคัญและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการรักษาและวินิจฉัยความเสี่ยงของโรค CHD สามารถลดข้อจำกัดโดยผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องงดอาหาร[20] ตรวจวัดและรายงานค่า LDL-c ได้แม้ค่า triglyceride มากกว่า 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และค่า LDL-c ที่ได้จากการใช้สูตรคำนวณให้ค่าความถูกต้องและแม่นยำลดลงเมื่อค่า triglyceride มากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร อีกทั้งปัจจุบันการตรวจวัดโดยตรงมีความสะดวกรวดเร็วไม่ยุ่งยาก ราคาก็ไม่แพงมากนัก โดยเฉพาะการสั่งตรวจ LDL-c เพียงรายการเดียวซึ่งมีเพิ่มมากขึ้น พบว่ามีราคาต้นทุนต่อการทดสอบ 24.38 บาท ถูกกว่าการใช้วิธีคำนวณ 2.94 บาทต่อการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

1. รุ่งอรุณ ดีอินทร์. การตรวจกรองหาระดับ cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol และ high-density lipoprotein (HDL) cholesterol ในข้าราชการตำรวจหญิงผู้บริหารระดับกลาง วัยกลางคน. J Med Tech Assoc Thai 2005;33:959-68.
2. นวพรรณ จารุรักษ์. ไขมันในเลือด: ความสำคัญทางคลินิกและการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ. Chula Med J 2006;50:443-58.
3. Maitra A, Hirany SV, Jialal I. Comparison of two assay for measuring LDL cholesterol. Clin Chem 1997;43: 1040-7.
4. Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Method for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assay versus calculation. Clin Chem 2002;48:236-54.
5. ลมุล ชูเกียรติวัฒนา. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาค่า LDL-cholesterol ระหว่างวิธีวิเคราะห์โดยตรง homogeneous enzymatic assay และวิธีคำนวณ Friedewald formular. วชิรเวชสาร 2000;44:253-8.
6. สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย, ประวิทย์ เตติวัฒน์. การตรวจวิเคราะห์ระดับ LDL-cholesterol ในซีรั่ม. สารศิริราช 2544;53: 356-62.
7. Leowattana W, Tobunluepop P, Kiartivich S, Sribhen K. Analytical performance of direct LDL-c assay compared with Friedewald LDL-cholesterol and apoprotein B assay. Siriraj Hosp Gaz 1998;50:65-73.
8. สุนีย์ ธีระศักดิ์ศิลป์, วิโรจน์ ไววานิชกิจ. บทความพิเศษ การแยก lipoprotein-cholesterol ด้วยไฟฟ้าอีกวิธีหนึ่งในการศึกษาเกี่ยวกับไขมัน. Chula Med J 2000;44:155-61.
9. Charuruks N, Milintagas A. Evaluation of calculated low-density lipoprotein against a direct assay. J Med Assoc Thai 2005;88 Suppl 4:S274-9.
10. Friedewald WT, Levy Rl, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972;18:499-02.
11. McNamara JR, Cohn JS, Wilson PWF, Schaefer EJ. Calculated value for low-density lipoprotein in the assessment of lipid abnormalities and coronary diseases risk. Clin Chem 1990;36:36-42.

12. DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low-density and very low density lipoprotein cholesterol. The Lipid research clinics prevalence study. JAMA 1986;256:2372-7.
13. Puavilai W, Laoragpongse D. Is calculated LDL-c by using the new modified Friedewald equation better than the standard Friedewald equation? J Med Assoc Thai 2004;87:589-93.
14. Jaiwang P, Wiwanitkit V. Comparative study of determination methods for low-density lipoprotein by direct assay and modified Friedewald's formula calculation. Chula Med J 2000;44:189-94.
15. Leowattana W, Narkrung S, Pokum S, Kiartivich S. Analytical and clinical performance of two homogeneous assay for measuring of LDL-cholesterol. J Med Assoc Thai 2000;83 Suppl 2:S6-12.
16. National Cholesterol Education Program. Recommendations for improving cholesterol measurement. NIH Publication 90-2964, 1990.
17. Siedel J, Schmuck P, Staepels J, Town MH. Long-term atable liquid ready-to-use monoreagent for the enzymatic assay of serum or plasma triglycerides (GPO PAP method). AACC Meeting Abstract 34. Clin Chem 1993;39:1127.
18. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayabara N, Miyauchi K. Direct measurement of hogh-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α-cyclodextin. Clin Chem 1995;41:717-23.
19. Cholesterol reference method laboratory network. National reference system for cholesterol. LDL cholesterol method certification protocol for menufacturers. 1997.
20. Pisani T, Gebski CP, Leary ET, Warnick GR, Ollington JF. Accurate direct determination of low-density lipoprotein cholesterol using an immunoseparation reagent and enzymatic cholesterol assay. Arch Pathol Lab Med 1995;119:1127-35.