ภาวะเป็นกรดในเลือดจากการมีแลคเตทในเลือดสูง (Lactic acidosis) เป็นอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้ยาต้านไวรัสในผู้ติดเชื้อเอชไอวี มักเกิดจากการใช้ยาต้านไวรัสกลุ่ม nucleoside reverse-transcriptase (NRTIs) รวมทั้งยาในสูตร highly active antiretroviral therapy (HAART) ซึ่งเกิดขึ้นหรือมีความชุกมากถึงร้อยละ 15-35 ในผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่ม NRTIs สำหรับอุบัติการณ์ของภาวะเป็นกรดในเลือดเนื่องจากแลคเตทสูงมีประมาณ 13 รายต่อ 1,000 รายต่อปี และภาวะแลคเตทในเลือดสูงอย่างรุนแรงหรือมีแลคเตทมากกว่า10 มิลลิโมลต่อลิตร มีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 57 งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค high pressure liquid chromatography (HPLC) แบบ UV detector สำหรับตรวจวัดปริมาณแลคเตทในพลาสม่า และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับการตรวจวัดแลคเตทด้วยวิธี enzymatic assay ที่ใช้วัดเป็นประจำในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำวิธี HPLC ที่มีความจำเพาะสูงและแม่นยำกว่า มาใช้ประโยชน์ช่วยตรวจวัดระดับแลคเตทในเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยาต้านไวรัสกลุ่ม NRTIs

กลุ่มตัวอย่างสำหรับการเปรียบเทียบวิธีทั้งสองเป็นเลือดจากงานบริการผู้ป่วย โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จำนวน 50 ราย และเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยา NRTIs จำนวน 10 ราย ส่วนกลุ่มตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดระดับสารแลคเตทในพลาสม่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ใช้ยาต้านไวรัสด้วยวิธี HPLC ที่พัฒนาได้ เป็นผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสารภีและโรงพยาบาลนครพิงค์ จำนวน 100 ราย

ผลการพัฒนาเทคนิค HPLC ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ การใช้ sodium dihydrogenphosphase buffer ที่ pH 2.63 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นสารละลายเคลื่อนที่ มีอัตราการเคลื่อนตัว 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้คอลัมน์ reversed-phase C_{18} stable bond อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้ระบบ isocratic ตั้งเครื่องวัด UV-VIS ที่ความยาวคลื่นแสง 210 นาโนเมตร ใช้ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร สามารถแยกสารแลคเตทมาตรฐาน ได้ค่า absorbance สูงสุดและได้พีคแลคเตทแยกจากสารอื่นได้ชัดเจนที่สุด ที่ retention time 3.18 ± 0.25 นาที

การประเมินวิธี HPLC ที่พัฒนาแล้วได้กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.997 ค่าร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 71.20–106.64 ปริมาณสารมาตรฐานแลคเตทที่น้อยที่สุดที่เครื่อง HPLC สามารถวัดได้คือ 0.312 มิลลิโมลต่อลิตร ทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ได้คือ 0.625 มิลลิโมลต่อลิตร ในขณะที่ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) คือ 1.25 มิลลิโมลต่อลิตร

ผลการเปรียบเทียบความแม่นยำและความถูกต้องของวิธี HPLC และ enzymatic assay ได้ผล intra-day precision ของ quality controled serum ระดับต่ำ (แลคเตท = 1.46 มิลลิโมลต่อลิตร) มีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (CV) ร้อยละ 1.18 สำหรับวิธี HPLC และ 1.33 สำหรับวิธี enzymatic assay ส่วนระดับสูง (แลคเตท = 5.62 มิลลิโมลต่อลิตร) มีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (CV) ร้อยละ 1.36 สำหรับวิธี HPLC และ 6.82 สำหรับวิธี enzymatic assay ค่าความถูกต้อง (intra-day accuracy) ของ quality controled serum ระดับต่ำร้อยละ 92.46 และ 113.01 ระดับสูงร้อยละ 100.53 และ 87.37 สำหรับ 2 วิธีตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ 5 ครั้ง ส่วน inter-day precision ของ quality controled serum ระดับต่ำมีค่า CV ร้อยละ 2.07 และ 2.96 ตามลำดับและระดับสูงมีค่า CV ร้อยละ 6.26 และ 6.44 ตามลำดับ ค่าความถูกต้อง (inter-day accuracy) ของ quality controled serum ระดับต่ำมีค่าร้อยละ 95.89 และ 115.75 และระดับสูงมีค่าร้อยละ 101.96 และ 91.1 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ 10 ครั้ง ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแลคเตทในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยด้วยวิธี HPLC ไม่แตกต่างจากการตรวจวัดด้วยวิธี enzymatic assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแลคเตทในตัวอย่างเลือดผู้ป่วย 60 ราย ด้วยวิธี enzymatic assay มีค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean±S.E.M.) = 4.29 ± 0.47 มิลลิโมลต่อลิตร และวิธี HPLC มีค่า เฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน = 4.73 ± 0.54 มิลลิโมลต่อลิตร จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับแลคเตทสูงกว่า enzymatic assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อนำวิธี HPLC ที่พัฒนาได้มาตรวจวัดหาระดับแลคเตทในเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยาต้านไวรัสกลุ่ม NRTIs เพื่อศึกษาความชุกของการเกิดภาวะเป็นกรดในเลือดจากการมีแลคเตทสูงกับผู้ป่วยของโรงพยาบาลสารภีและโรงพยาบาลนครพิงค์ รวมทั้งสิ้น 100 ราย พบว่ามีผู้ป่วยที่ใช้ยากลุ่ม NRTIs เป็นเวลา 9 เดือนขึ้นไป มีระดับแลคเตทปกติ 67 ราย ผู้ป่วยที่มีระดับแลคเตทสูงโดยไม่มีอาการของภาวะเป็นกรดในเลือด 33 ราย (2.27–4.14 มิลลิโมลต่อลิตร) โดยไม่พบผู้ป่วยที่มีภาวะเป็นกรดในเลือดจากการมีแลคเตทในเลือดสูง

สรุปผลการวิจัยได้ว่าวิธี HPLC ที่พัฒนาได้นี้สามารถนำไปใช้ตรวจวัดหาระดับแลคเตทในเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยาต้านไวรัสกลุ่ม NRTIs ได้ผลที่น่าเชื่อถือมีความแม่นยำ และความถูกต้องสูง มีประโยชน์ต่อการนำไปใช้เฝ้าระวังการเกิดภาวะ lactic acidosis ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้เป็นอย่างดี

205723

Hyperlactatemia is an increased lactate level in blood that could develop into lactic acidosis or low blood pH with a high blood lactate level, and it is an adverse effect in HIV-infected patients being treated with antiviral drugs. Hyperlactatemia frequently occurs with nucleoside-reverse transcriptase (NRTIs) treatment, including highly active antiretroviral therapy (HAART), and its prevalence rate has been reported as 15 to 35% in HIV-infected patients being treated with NRTIs. The incidence rate of lactic acidosis is approximately 13 cases per 1,000 per year. In addition, the severity of a high blood lactate level in people reaches a mortality rate of up to 57%. Therefore, the aim of this study was to develop a high performance liquid chromatography (HPLC) technique with a UV-VIS detector to determine the lactate concentration in plasma and compare the results to those measured by enzymatic assay, which is a routine methodology used in a general hospital laboratory. The method developed will be used to measure the lactate level in HIV patients being treated with NRTIs.

Fifty blood samples from the central laboratory, Maharaj Nakorn Chiangmai Hospital, and 10 blood samples from HIV infected patients being treated with NRTIs were collected for testing the developed HPLC method compared to the enzymatic assay. The HPLC method was

also used as a tool to measure lactate concentrations in 100 blood samples taken from HIV patients in Sarapee and Nakorn Ping Hospitals.

The optimal condition of the developed HPLC method was 20 mmol/L of sodium dihydrogenphosphase buffer, pH 2.63 and a flow rate of mobile phase at 0.8 ml/min. The reversed-phase C_{18} stable bond was used by setting up a column oven temperature at 35°C in an isocratic system. The wavelength UV-VIS detector was set at 210 nm and the injection volume was 100 ul. This condition could detect standard lactate with the best maximal absorbance, and give a good peak of lactate separation from other substances at the retention time of 3.18 ± 0.25 min.

The results from validating the developed HPLC showed high linearity of lactate concentrations versus its absorbance at a correlation coefficient of 0.997. The sensitivity of the method, which could detect the lowest level of lactate, was at a concentration of 0.625 mM. The limit of detection was 0.312 mM, whereas, the limit of quantitation was 1.25 mM of lactate.

The comparative result of precision and accuracy between the developed HPLC method and enzymatic assay demonstrated that intra-day precision of the qualified control (QC) sample at a low level (1.46mM lactate) had a coefficient variance of 1.18% and 1.33% by HPLC and enzymatic assay, respectively, and that of the QC high level (5.62 mM lactate) had a coefficient variance of 1.36% and 6.82% by HPLC and enzymatic assay, respectively. The intra-day accuracy of the QC low level was at 92.46% and 113.01%, while that of the QC high level was at 100.53% and 87.37% from both methods, respectively. The coefficient variance of inter-day precision of the QC low level was 2.07% and 2.96%, and that for the QC high level was 6.26% and 6.44% for both methods, respectively. The inter-day accuracy of the QC low level was 95.89% and 115.75%, and that for the QC high level was 101.96% and 91.1% for both methods, respectively. In this study, the comparative results between developed HPLC and the enzymatic methods showed good correlation with no statistical difference ($r=0.990$, $p<0.05$).

Sixty blood samples, which were measured with enzymatic assay, showed lactate concentrations at 4.29±0.47 mM (mean±S.E.M), and by the HPLC method at 4.73±0.54 mM. Therefore, the HPLC method could be used to obtain a higher lactate level than that measured with the enzymatic assay.

The developed HPLC method was then used to measure the lactate concentration in 100 HIV infected patients, who were being treated with NRTIs. Of them, 67 treated with NRTIs for more than 9 months had a normal lactate level, while 33 had moderate hyperlactatemia with no symptoms of acidosis (lactate concentration of between 2.27-4.14 mM). There were no patients with severe acidosis resulting from a high blood lactate level.

In conclusion, this developed HPLC can be used with high precision and accuracy for measuring lactate concentrations in HIV infected patients who are being treated with the antiviral drugs, NRTIs. The lactate measurement will be very useful for surveillance in order to help prevent lactic acidosis in HIV infected patients.