Thesis Title Effect of Lyophilization on Protein and Lipid Formulated in Two Level Control Sera

Author Ms. Nattakarn Laieddee

M.S. Medical Technology

Examining Committee

Associate Professor Rujapa Nimsung Chairman
Assistant Professor Dr. Audomsark Haesungcharern Member
Assistant Professor Boonpayoa Loahachinda Member
Dr. Sukanya Linpisarn Member

ABSTRACT

Quality control materials are usually used to evaluate the precision and accuracy of analytical performance and to assure the reliability of analyses in clinical chemistry laboratory. The most commonly used control material is the lyophilized serum, of which the preparative process can denature protein and lipoprotein to various degrees. The turbid effect obtained after reconstitution of the product changed the characteristic of serum being used as a control material. This study, therefore, was conducted to investigate the changes and developed the preparative process to overcome the instability barrier occurred during lyophilization. In this study, two level lyophilized bovine control sera were prepared. Four excipients *i.e.* trehalose, mannitol, saccharose or dextran were evaluated for adding in the control sera in order to stabilize protein and lipid components during lyophilized process. It was shown that 8.5% saccharose in the prepared control sera was the best excipient in maintaining the stability of protein, lipoproteins and enzymes in the control sera. In addition, saccharose in this concentration provided the clarified matrix for the lyophilized control sera after reconstitution with distilled water or bicarbonate diluent. The stability effect of saccharose

was confirmed by SDS-PAGE. It was demonstrated that the bands of α-globulin fraction and α or β lipoproteins obtained from control sera before and after lyophilization were nondiscrepancy. The two level control sera containing 8.5% saccharose which dispensed 5 mL in vials were lyophilized for 24 hours in a tray–dried Lioalfa-10 (Telstar, Spain). Longer freezing time was required for this lyophilized process. At the end of lyophilized cycle, vials were tightly stoppered and sealed with aluminium caps to protect moisture from diffusing. The control sera prepared by using 8.5% saccharose as stabilizer reconstituted by bicarbonate diluent demonstrated the clarify matrix which the absorbance at 620 nm measured by a Shimudzu UV-160A UV-Visible Spectrophotometer were average to be 1.02. Assignment of mean values, standard deviation and expected ranges of the mean for each constituent on different levels were established to make an instruction manual for using these lyophilized bovine control products. The materials were evaluated for stability at 4^{O}C, by analyzing in a Beckman CX-5 Autoanalyzer, of eleven analytes which were total protein, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotranferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol (HDL-C and LDL-C), respectively. By accelerated temperature testing, the shelf-life of the products keeping at 4^{O}C and room temperature were calculated to be approximately for at least 1.5 years using 8.5% saccharose as a stabilizer. The moisture of the dry solid cake-liked bovine control sera were not exceed than 2.0%. The average cost of preparations in a vial was 71 baht, for both levels. The lyophilized bovine matrix control products were evaluated by three different external clinical chemistry laboratories using the methods based on manual, Autoanalyzer using reagent and dry chemistry which favorably used in clinical chemistry laboratories.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลกระทบของกระบวนการระเหยแห้งที่มีต่อโปรตีนและไขมันที่กำหนดสูตรในซีรัมควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ

ชื่อผู้เขียน นางสาวนัฐกาญจน์ ละเอียดดี

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. รุจาภา	นิ่มสังข์	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. อุดมศักดิ์	เห่วซึ่งเจริญ	กรรมการ
ผศ. บุญพะเยาว์	เลาหะจินดา	กรรมการ
ดร. สุกัญญา	ลินพิศาล	กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุควบคุมคุณภาพมักนำมาใช้ในการประเมินผลความแม่นยำและความถูกต้องและประกันความน่าเชื่อถือของกระบวนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ชนิดที่นำมาใช้มากที่สุด คือ ซีรัมแห้ง ซึ่งในกระบวนการเตรียมทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนและไลโปโปรตีนในระดับต่างๆกัน ผลของความขุ่นที่เกิดขึ้นหลังคืนสภาพซีรัมแห้งนี้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของซีรัมในการเป็นวัตถุควบคุมคุณภาพได้ ดังนั้น การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อทำการตรวจหาการเปลี่ยนแปลง และพัฒนาวิธีการเตรียมซีรัมแห้งควบคุมคุณภาพเพื่อแก้ไขความไม่เสถียรที่เกิดจากกระบวนการระเหยแห้ง ในการศึกษานี้ได้เตรียมซีรัมวัวแห้งควบคุมคุณภาพ 2 ระดับความเข้มข้นโดยมีการประเมินผล สารรักษาสภาพ (excipient) 4 ชนิด คือ trehalose, mannitol, saccharose และ dextran เพื่อใช้เติมลงในซีรัมควบคุมคุณภาพเพื่อรักษาสภาพโปรตีน และส่วนประกอบของไขมันระหว่างกระบวนการระเหยแห้ง จากการศึกษาพบว่า 8.5% saccharose เป็นสารรักษาสภาพที่ดีที่สุดที่สามารถรักษาความเสถียรของโปรตีน ไลโปโปรตีน และเอนไซม์ในซีรัมควบคุมคุณภาพ นอกจากนี้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

saccharoseในความเข้มข้นดังกล่าวยังสามารถทำให้เนื้อซีรัมที่คืนสภาพด้วยน้ำกลั่นหรือ bicarbonate diluent เป็นของเหลวที่ใสขึ้นได้ ผลของการรักษาสภาพของ saccharose สามารถยืนยันได้โดย SDS-PAGE ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างกันของแถบ α-globulin protein fraction และ α หรือ β- lipoproteins ที่ได้จากการเปรียบเทียบในซีรัมควบคุมคุณภาพก่อนและหลังการระเหยแห้ง ได้นำซีรัมควบคุมคุณภาพ 2 ระดับที่มี saccharose ประกอบอยู่ 8.5% ไปบรรจุลงในขวดในปริมาตร 5 มล. และนำไปประเหยแห้งซึ่งใช้เวลา 24 ชั่วโมง ในเครื่องระเหยแห้งชนิด ถาด, Lioalfa-10 (Telstar, Spain) ซึ่งกระบวนการระเหยแห้งต้องการระยะเวลาทำซีรัมให้แข็งนานกว่าปกติ เมื่อสิ้นสุดเวลาระเหยแห้งเครื่องจะทำการปิดจุก จากนั้นนำมาผนึกด้วยจุกอลูมิเนียมเพื่อป้องกันไม่ให้ความชื้นซึมเข้าไป ซีรัมควบคุมคุณภาพที่มี 8.5% saccharose เป็นสารรักษาสภาพและคืนสภาพด้วย bicarbonate diluent มีความใสซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 620 nm โดยเครื่อง Shimudzu UV-160A, UV-Visible Spectrophotometer ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.02 จากนั้นได้จัดทำค่ากำหนดการใช้งานเป็นค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าช่วงการใช้งานของสารวิเคราะห์ ดังกล่าวนี้ วัตถุควบคุมคุณภาพนี้ได้นำมาประเมินผลความคงตัวของสารวิเคราะห์ 11 ชนิด ซึ่งได้แก่ total protein, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotranferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein และ low- density lipoprotein cholesterol (HDL-C และ LDL-C), ตามลำดับ สำหรับเก็บที่ 4^{o} ซ. โดยวิเคราะห์โดยเครื่อง Beckman CX-5 Autoanalyzer อายุการเก็บไว้ใช้งานทำโดยวิธีการเร่งอุณหภูมิ (accelerated temperature testing) คำนวณได้ประมาณ 1 ปี 6 เดือนโดยมี 8.5% saccharose เป็นสารรักษาสภาพ ความชื้นของซีรัมวัวแห้งควบคุมคุณภาพที่มีลักษณะเหมือนก้อน cake มีค่าไม่เกิน 2.0% ราคาต้นทุนการเตรียมเฉลี่ย 71 บาทต่อขวด ผลิตภัณฑ์ซีรัมวัวควบคุมคุณภาพนี้ได้รับการประเมินผลจากห้องปฏิบัติการภายนอกที่ใช้วิธีวิเคราะห์ที่นิยม 3 วิธี คือ วิธีวิเคราะห์แบบ manaul, วิธีวิเคราะห์อัตโนมัติซึ่งใช้น้ำยาวิเคราะห์ และระบบแห้ง (dry chemistry) ในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก 3 แห่ง