Thesis Title Isolation, Biosynthesis and Identification of Conjugated Bilirubin for Use as Standard and Quality Control Serum

Author Miss Jutharak Yimsabai

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Rujapa Nimsung Chairperson

Asst. Prof. Dr. Werawan Ruangyuttikarn Member

ABSTRACT

Causes of inaccuracy in bilirubin analysis can be attributed to several factors, the most prominent being poor methodology, errors in standardization and inadequate quality control material. In serum, there are two forms of bilirubin, unconjugated bilirubin (Bu) and conjugated bilirubin (Bc). Currently, there is no bilirubin glucuronide production for standardzation of Bc assays in clinical chemistry laboratory, therefore a commercial unconjugated bilirubin has been used to standardize both forms of bilirubin in serum. The objective of this study was to isolate bilirubin glucuronide from fresh gall-bladder bile for use as conjugated bilirubin standard and supplementation in bilirubin quality control serum.

Bc isolated from gall-bladder bile of chicken, bovine and human by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) showed similar peaks of absorption spectra ranged from 410-450 nm. Bc from chicken gall-bladder bile gave highest yield and demonstrated positive azopigment formation in direct diazo reaction based on Malloy and Evelyn method. Biosynthesized Bc in liver homogenates showed peaks of absorption spectra resembled the form of Bc presented in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

its respective bile. Bc in chicken bile was bilirubin glucuronide of which the molar ratio of bilirubin to glucuronic acid was 1:1.13. Overnight degradation rate after exposing to light at room temperature of the reconstituted Bc prepared in 0.1 mol /L Tris-HCl buffer, pH 7.4 and 4 % bovine serum albumin (BSA) were 34.43 and 16.94 %, respectively. The rate of oxidation of Bc in 0.1 mol/L Tris buffer, pH 7.4 and 4 % BSA after overnight exposing to oxygen at room temperature were 28.84 and 12.55 %, respectively. Bc eluate from chicken bile mixed with 0.1 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4 or 4 % BSA in order to prepare lyophilized Bc standard showed molar absorptivity (ε) (Bu equivalent, λ_{max} = 467 nm) after reconstitution with distilled water of 49,735 $\pm$ 3,126.27 and 51,155 $\pm$ 469.11 L. $mol^{-1}.cm^{-1}$, respectively (n = 3 for each). Bilirubin control serum containing isolated Bc enriched with Bu commercial standard was applied to be used as an internal quality control serum. The accuracy determined by % recovery of Bu and Bc added in bilirubin control serum were 78.33-97.53 and 62.30-85.25, respectively. The within-run and between-run coefficients of variation (CV) of Bc quality control serum for total bilirubin determination were 1.30 % ($\overline{X}$ = 16.91, SD = 0.22 mg/dL) and 3.27 % ($\overline{X}$ = 16.23, SD = 0.53 mg/dL) and for direct bilirubin were 6.33 % ($\overline{X}$ = 0.79, SD = 0.05 mg/dL) and 11.43 % ($\overline{X}$ = 0.70, SD = 0.08 mg/dL), respectively.

Bc isolated from chicken gall-bladder bile showed similar chemical properties to that obtained from human bile. Reconstituted Bc prepared in 4 % BSA was less sensitive to photooxidation and oxidation by oxygen than that prepared in 0.1 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4. Molar absorptivity of Bc standard prepared in aqueous or protein matrix was no significant difference. Control serum preparation was accepted for using as internal quality control sample by the criteria of World Health Organization (WHO) and that compared with commercial quality control serum.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยก ชีวสังเคราะห์ และ การพิสูจน์เอกลักษณ์ ของคอนจูเกตบิลิรูบินเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน และซีรัมควบคุมคุณภาพ

ผู้เขียน นางสาว จุฑารัก ยิ้มสบาย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. รุจาภา นิ่มสังข์ ประธานกรรมการ
ผศ.ดร. วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ปัจจัยที่ทำให้ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ bilirubin ในซีรัมไม่ถูกต้องมีหลายประการ ปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ การใช้วิธีวิเคราะห์ และ สารละลายมาตรฐานที่นำมาเทียบค่าไม่เหมาะสม รวมทั้งการใช้สารควบคุมคุณภาพที่มีระดับความเข้มข้นไม่เหมาะสม เป็นต้น เนื่องจากในซีรัมปกติจะมีบิลิรูบิน 2 ชนิด คือ unconjugated bilirubin (Bu) และ conjugated bilirubin (Bc) ในปัจจุบันยังไม่มีการผลิตสารมาตรฐานของ bilirubin glucuronide สำหรับการเทียบค่าการวิเคราะห์ Bc ในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ทำให้ต้องนำสารมาตรฐานของ Bu ที่มีจำหน่ายมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์เทียบค่า bilirubin ทั้ง 2 ชนิด การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยก bilirubin glucuronide จากน้ำดีสำหรับใช้เป็นสารมาตรฐานของ Bc และใช้เติมในซีรัมคนเพื่อเตรียมซีรัมควบคุมคุณภาพของ bilirubin

Bc ที่แยกได้จากน้ำดีของไก่, วัว และ คน โดยวิธี reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) มีจุดยอดของการดูดกลืนแสงคล้ายกัน คือ อยู่ในช่วง 410 ถึง 450 นาโนเมตร โดย Bc ที่แยกได้จากน้ำดีไก่ให้ผลผลิตสูงสุด และ สามารถทำปฏิกิริยาใน direct diazo reaction โดยวิธี Malloy and Evelyn ให้ผลบวก (azopigment) Bc ที่ได้จากวิธีชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) จากตับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่ละชนิด มีจุดยอดของการดูดกลืนแสงคล้ายกับ Bc ที่แยกได้จากน้ำดีชนิดนั้นๆ Bc ที่แยกจากน้ำดีไก่เป็น bilirubin glucuronide และมีอัตราส่วนโมล (molar ratio) ของ bilirubin ต่อ glucuronic acid เป็น 1 ต่อ 1.13 พบว่า Bc ที่เตรียมใน 0.1 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4 และ 4 % bovine serum albumin (BSA) มีอัตราการถูกออกซิไดส์ (oxidation rate)โดยแสง เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องเป็น 34.43 และ 16.94 % ตามลำดับ ขณะที่อัตราการถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนเมื่อทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องเป็น 28.84 และ 12.55 % ตามลำดับ การนำมาเตรียมเป็นสารมาตรฐานสามารถทำโดยนำ Bc ที่แยกได้จากน้ำดีไก่มาผสมกับ 0.1 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4 หรือ 4 % BSA พบว่าหลังจากการคืนตัวด้วยน้ำกลั่น ค่าการดูดกลืนแสงคงที่เฉลี่ย (ε) (เมื่อเทียบกับ Bu อ่านที่ λ_{max} = 467 นาโนเมตร) มีค่าเป็น 49,735 $\pm$ 3,126.27 และ 51,155 $\pm$ 469.11 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร ตามลำดับ (ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตัวทำละลาย) เมื่อนำ Bc ที่แยกได้จากน้ำดีไก่มาเติมในซีรัมคนร่วมกับการเติมสารมาตรฐานของ Bu ที่มีจำหน่าย สามารถเตรียมเป็นซีรัมควบคุมคุณภาพสำหรับใช้เป็นซีรัมควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาพบว่าความถูกต้อง (accuracy) ซึ่งดูได้จาก % recovery ของ Bu และ Bc ที่เติมในซีรัมควบคุมคุณภาพ มีค่าอยู่ในช่วง 78.33 - 97.53 และ 62.30 - 85.25 ตามลำดับ โดยที่ within-run และ between-run ของซีรัมควบคุมคุณภาพของ Bc สำหรับการตรวจวัด total bilirubin มีค่าสัมประสิทธ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) เป็น 1.30 % ($\overline{X}$ = 16.91, SD = 0.22 mg/dL) และ 3.27 % ($\overline{X}$ = 16.23, SD = 0.53 mg/dL) ขณะที่การตรวจวัด direct bilirubin มีค่าเป็น 6.33 % ($\overline{X}$ = 0.79, SD = 0.05 mg/dL) และ 11.43 % ($\overline{X}$ = 0.70, SD = 0.08 mg/dL) ตามลำดับ

Bc ที่แยกได้จากน้ำดีไก่มีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกับที่พบในน้ำดีคน โดย Bc ที่เตรียมใน 4 % BSA มีความไวต่อการ oxidation โดยแสงและออกซิเจนน้อยกว่าที่เตรียมใน 0.1 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4 Bc ที่นำมาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานเมื่ออยู่เป็นสารละลายน้ำ หรือโปรตีนมีค่าการดูดกลืนแสงคงที่ไม่มีความแตกต่างกัน ซีรัมควบคุมคุณภาพที่เตรียมได้โดยวิธีนี้สามารถนำมาใช้เป็นซีรัมควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการได้ตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก (WHO) และเมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมควบคุมคุณภาพที่มีจำหน่าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved