

นิพนธ์ฉบับ

การเตรียมบิลิรูบินรูปละลายน้ำจากน้ำดีธรรมชาติและการศึกษาคุณสมบัติ*

รุจาภา นิมสังข์¹ อรรวรรณ บุญพละ² จารุวรรณ ปฐมนพวงศ์²

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: การตรวจหาปริมาณบิลิรูบินส่วนต่างๆในซีรัมมักใช้วิธีทำปฏิกิริยาให้สีกับ diazo reagent หรือใช้วิธีเอนไซม์ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ต้องประเมินผลระดับความแม่นยำด้วยโดยใช้วิธีควบคุมคุณภาพซึ่งสามารถเตรียมได้ด้วยการเติมสารมาตรฐานของบิลิรูบินลงไปเพื่อยกระดับความเข้มข้นของบิลิรูบินแต่ละรูปแบบให้สูงขึ้น บิลิรูบินรูปไม่ละลายน้ำ (Unconjugated bilirubin) (UCB) สามารถหาซื้อได้จากผู้ผลิต แต่บิลิรูบินรูปละลายน้ำ (conjugated bilirubin) (glucuronide form)(Bc) ไม่เสถียร และไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด

วัตถุประสงค์: เพื่อแยกและตรวจสอบลักษณะของ Bc โดยใช้ น้ำดีของวัวเป็นวัตถุดิบ

วัสดุและวิธีการ: การแยก Bc จากน้ำดีวัวในถุงน้ำดีที่เก็บใหม่ ทำโดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิทยานิพนธ์ของ Lucassen (doctoral thesis, Univer. Utrecht, 1961) การแยกน้ำดีที่ทำซ้ำกัน 5 ครั้ง ให้ผลประมาณ 50% ของน้ำดีที่มีอยู่เดิมในวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ Bc ที่แยกได้มีสีเหลืองน้ำตาล ละลายน้ำได้ ดูดความชื้น ดูดกลืนแสงได้ในช่วง visible light ที่ความยาวคลื่น 445 nm สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ diazo reagent และไวต่อการสลายตัวเมื่อสัมผัสแสงหรืออากาศ

วิจารณ์: ผลิตภัณฑ์นี้เตรียมเพื่อนำมาตรวจคุณสมบัติซึ่งอาจมีประโยชน์นำไปใช้ในงานควบคุมคุณภาพต่อไป ปริมาณผลผลิตของ Bc ที่ได้ ยังไม่น่าพอใจ เนื่องจากความไม่คงตัวที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการแยกและการระเหิด **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2551; 41: 62-71.**

คำรหัส: การเตรียม บิลิรูบินรูปละลายน้ำ น้ำดี คุณสมบัติ

¹ แขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract: Preparation of conjugated bilirubin from native bile and characteristic study*Rujapa Nimsung¹ Orawan Boonpala² Charuwan Prathomthanapongs²

Background: The quantification of serum bilirubin fractions is widely performed with both the diazo colorimetric and enzymatic methods. However, the degree of precision of these methods must be evaluated via bilirubin control serum, which can be prepared by adding bilirubin standard to based serum in order to raise the bilirubin fraction to an abnormal value. Unconjugated bilirubin (UCB) can be obtained commercially, but conjugated bilirubin (glucuronide form)(Bc) is unstable, and thus there are at present no such products on the market.

Objective: To isolate and characterize Bc using bovine bile as the raw material.

Method: Bc was prepared by isolation from fresh bovine gall bladder bile. The isolation method was modified after Lucassen (doctoral thesis, Univer. Utrecht, 1961). Bc isolated from five preparations yielded approximately 50% of the original concentration in raw material. The Bc product exhibited a dark brownish yellow color, water solubility, hygroscopicity, a visible spectrum with peak maximum at 445 nm., diazo reactivity, and instability to air and light.

Discussion: This product was prepared in order to observe any characteristics that may be useful in possible further quality control work. Bc yield was unsatisfactory, which may be the result of instability during isolation and lyophilization. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2008; 41: 62-71.

Key words: preparation, conjugated bilirubin, bile , characteristic

¹ Division of clinical chemistry, Department of Medical Technology Faculty of Associated Medical Sciences. Chiang Mai University

² Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

บทนำ

บิลิรูบินเป็นของเสีย เกิดจากการสลายของเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุโดย Reticuloendothelial system ในซีรัมพบบิลิรูบิน 2 รูปแบบ คือ บิลิรูบินรูปไม่ละลายน้ำ (unconjugated bilirubin)(Bu) และบิลิรูบินรูปละลายน้ำ (Bilirubin glucuronide)(Bc)¹ บิลิรูบินทั้ง 2

รูปแบบที่พบในซีรัมมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคโดยที่การเพิ่มปริมาณของบิลิรูบินในเลือดสูงกว่าระดับปกติทำให้เกิดอาการตัวเหลือง ตาเหลือง ที่เรียกว่า ภาวะดีซ่าน ซึ่งพบได้เมื่อปริมาณบิลิรูบินรวมมีระดับสูงขึ้นประมาณ 2.5 mg/dl ขึ้นไป รูปแบบของบิลิรูบินสูงขึ้นแตกต่างกันตามภาวะดีซ่านดังนี้คือ Prehepatic Jaundice (Hemoly-

tic jaundice) เกิดจากภาวะเม็ดเลือดแดงแตก ทำให้บิลิรูบินสูงเกินกว่าความสามารถที่ตับจะขับออกได้หมด ทำให้ Bu สูงขึ้นในซีรัม พบได้ในโรค Acute และ Chronic hemolytic anemia ในภาวะ Hepatic jaundice (Hepatocellular jaundice) เซลล์ตับถูกทำลายทำให้การสร้าง Bc จาก Bu ช้าลง ทำให้มีบิลิรูบินทั้ง 2 รูปแบบสูงขึ้นในซีรัม โดยที่ Bu สูงกว่า Bc พบได้ในโรค hepatoma, cirrhosis หรือ hepatitis เป็นต้น และในภาวะ Posthepatic jaundice (Obstruction jaundice) เกิดจากการอุดตันที่ท่อน้ำดี ทำให้ระดับ บิลิรูบินทั้ง 2 รูปแบบสูงขึ้น แต่บิลิรูบินรูปละลายน้ำ หรือ Bc สูงกว่า การอุดตันอาจเกิดจาก นิ่ว เนื้องอก และท่อน้ำดีตีบตัน² เป็นต้น

ในการวิเคราะห์หาปริมาณบิลิรูบินในซีรัมมีวิธีการหลายวิธี เช่นวิธีที่ใช้หลักการ diazotization วิธี ที่ใช้เอนไซม์ bilirubin oxidase หรือวิธี direct spectrophotometry³ ในการวิเคราะห์นี้ไม่ว่าจะใช้วิธีใด จำเป็นต้องใช้ซีรัมควบคุมคุณภาพวิเคราะห์พร้อมกันไปกับซีรัมส่งตรวจเพื่อควบคุมความแม่นยำของการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลน่าเชื่อถือและนำไปช่วยแพทย์วินิจฉัยโรคได้⁴ การเตรียมซีรัมควบคุมคุณภาพใช้เอง จำเป็นต้องนำซีรัมรวมของผู้ป่วยโรคตับมาใช้เพื่อให้มีระดับค่าบิลิรูบินรูปไม่ละลายและละลายน้ำในความเข้มข้นที่สูงผิดปกติ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดเชื้อไวรัส บี และทำให้เป็นโรคตับอักเสบได้ สำหรับซีรัมควบคุมคุณภาพที่ผลิตเพื่อจำหน่ายมีราคาแพงมาก และการขนส่งนำเข้ามีปัญหาของความไม่คงตัวต่อแสง และเมื่อทำการผลิตซีรัมควบคุมคุณภาพใช้เอง ก็มีปัญหานี้เนื่องจากสารมาตรฐานของบิลิรูบินชนิด Bc ที่ผลิตจำหน่ายมีราคาแพงมาก (ต้องสั่งผลิตจากแหล่งผลิตโดยตรง) ซึ่งไม่สามารถจัดหามาใช้เพื่อเติมลงในซีรัมที่ใช้เป็นวัตถุดิบได้ ดังนั้นการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดลองผลิตบิลิรูบินรูปละลายน้ำขึ้นมาเพื่อทดสอบคุณสมบัติ ซึ่งจะมีประโยชน์นำไปใช้ในการนำมาผลิตซีรัมควบคุมคุณภาพสำหรับใช้งานในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกต่อไป

วัสดุและวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

วัตถุดิบ: น้ำดี ได้จากการเก็บถุงน้ำดีที่ตัดจากตับของวัวที่ฆ่าในโรงฆ่าสัตว์ เทศบาลนครเชียงใหม่

สารเคมีและสารละลายอินทรีย์ที่สำคัญ:

Sodium thiosulphate pentahydrate, Oxalic acid dihydrate, Sulfanilic acid, Sodium nitrite, Caffeine, Sodium benzoate, Sodium acetate trihydrate, Sodium potassium tartrate, Methanol, Dimethylsulfoxide (DMSO) ได้จาก Sigma Chemical Company (USA)

Chloroform, Diethyl ether ได้จาก Merck, Darmstad, Germany

สารเคมีอื่นๆ เป็นชนิด analytical grade

Commercial control serum, abnormal control เป็นของ Randox (England)

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่สำคัญ :

Shimadzu UV-160 A Spectrophotometer

Lyophilizer (Telstar, Spain)

Nitrogen gas

สารละลายเคมีที่สำคัญ :

1. 100 g/L Oxalic acid

ซึ่ง Oxalic acid 100 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายเคมีสำหรับการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินด้วยหลักการ diazotization และสารละลายมาตรฐานเตรียมตามวิธีของ Jendrassik & Grof⁵

วิธีการทดลอง

1. การตรวจหาปริมาณ Total และ Direct bilirubin ในน้ำดีที่เป็นวัตถุดิบ

นำน้ำดีที่เก็บมาแต่ละครั้งซึ่งมีลักษณะเป็นถุง (intact gall bladder) ติดกับตับ ตัดถุงออก วัดปริมาตรน้ำดี แบ่งออกมาไว้ตรวจปริมาณ Total และ Direct bilirubin ด้วยวิธี Jendrassik & Grof⁵ ตรวจหาค่าเฉลี่ยและคำนวณหาค่า Bc เทียบกับ Total bilirubin (Bt) ที่ตรวจได้

2. วิธีการเตรียมบิลิรูบินรูปละลายน้ำ (Bc)

1. วิธีการแยก Bc จากน้ำดีของวัว (6, ตัดแปลง)
น้ำดีเก็บใหม่ จากถุงน้ำดีของวัวนำมาแช่แข็ง ที่ -30°C ในภาชนะแก้วป้องกันแสงที่ปิดสนิท เก็บรวบรวมไว้จนกว่าจะนำไปใช้งาน

วิธีการแยก นำน้ำดีที่แช่แข็งไว้ มาทำให้ละลาย

ภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง วัดปริมาตร แล้วเจือจาง น้ำดีด้วยน้ำกลั่นที่ใส่ oxygen ออกโดยการ bubble ด้วย ก๊าซ N_2 เป็นเวลา 30 นาทีมาแล้ว การเจือจางทำให้มี ปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 เท่าของปริมาตรเดิมของน้ำดี

นำน้ำดีเจือจาง ใส่ Beaker หุ้มด้วยกระดาษตะกั่ว นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งที่มีท่อไนโตรเจน เสียบติดผ่าน เข้าไปใน beaker เพื่อปรับบรรยากาศภายในให้อยู่ภายใต้ ก๊าซไนโตรเจน จากนั้นค่อยๆ เติม Sodium thiosulfate pentahydrate (solid) ลงไป 4 กรัม / 100 มล. ของ ปริมาตรน้ำดีที่เจือจางแล้ว พร้อมกวนช้าๆ ไปด้วย ปรับ pH ของน้ำดีเจือจางให้ได้ 6.0 ด้วย 100g/L Oxalic acid การเกิดตะกอนของบิลิรูบินเกิดหลังจากการทำ acid-base titration จน pH ของน้ำดีเจือจางอยู่ที่ ประมาณ 7.0 นำ สารละลายตะกอนใส่ลงในหลอดปั่นขนาด 50 mL หลอดละ 25 mL. แล้วปั่น 3500 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใส ข้างบนทิ้งไป

นำตะกอนที่ได้มาล้าง 3 ครั้งด้วย anhydrous ether หลังจากทำตะกอนให้แห้ง แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงตรวจหาชนิดบิลิรูบินที่มีในตะกอนต่อไป จากนั้น นำไปบรรจุขวดละ 2 มล. นำไประเหิดในเครื่อง Lyoalpha -10 ข้ามคืน เก็บ lyophilized product ในภาชนะที่มี desiccant ในที่มืดที่อุณหภูมิ $-20^{\circ}C$ จนกว่าจะนำมา ประเมินผล หรือใช้งานต่อไป

2. การพิสูจน์ลักษณะและคุณสมบัติของ Bc ที่แยกจากน้ำดี⁷ (ดัดแปลง)

2.1 ตรวจหา Absorption spectra

นำ lyophilized Bc ที่เตรียมได้มา 2 vials ซึ่ง lyophilate ที่ได้แต่ละ vial แล้วนำมาละลายในน้ำ เพื่อตรวจดูคุณสมบัติการละลายน้ำได้ของ Bc และใน 4% BSA ขวดละ 2 mL จากนั้นนำ Bc ที่ละลายใน 4% BSA ไป scan ด้วยเครื่อง Shimadzu UV-Visible Spectrophotometer ตั้งแต่ wavelength 380-550 nm. (ใช้ 4% BSA เนื่องจากต่อไปต้องนำ Bc ที่ผลิตได้มาผสมกับ UCB ที่ เจือจางด้วย 4% BSA เพื่อเตรียมซีรัมควบคุมคุณภาพ ผสมที่มี บิลิรูบินทั้ง 2 รูปแบบ) ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่วัด ได้เทียบกับ Bilirubin standard (Sigma B 4126, Sigma Chemical Company, USA) ซึ่ง scan โดยวิธีเดียวกัน

2.2 ตรวจดูการทำปฏิกิริยากับ diazo

reagent

นำสารที่คาดว่าเป็น Bc จากข้อ 2.1 ไปทำปฏิกิริยาตรวจหาสารทั้ง 2 ชนิด โดย วิธี diazotization ทั้งในปฏิกิริยา direct reaction และ Total reaction โดยวิธีของ Jendrassik & Grof⁵ ซึ่งใช้ตรวจหาความ เข้มข้นของบิลิรูบินที่เตรียมขึ้น ค่าความเข้มข้นเทียบกับ สารละลายมาตรฐานของ unconjugated bilirubin ที่ละลาย ใน 4% BSA และใช้วิธี Jendrassik & Grof⁵ เป็นวิธี การหลัก

ผลการทดลอง

1. ปริมาณของบิลิรูบินในน้ำดีที่ใช้เป็น วัตถุตั้งต้น

จากการนำน้ำดี 5 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ บิลิรูบินก่อนนำไปแยกเอาส่วนที่เป็นบิลิรูบินออก ได้ผล แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ Bc ในน้ำดี โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ Bt. มีค่าตั้งแต่ 50 -70.2% โดยมีค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ $62.5 \pm 9.18\%$

2. ผลการเตรียมบิลิรูบินรูปละลายน้ำ (Bc)

การเตรียม Bc จากน้ำดี ซึ่งทำโดยวัดปริมาตรและ วัดปริมาณบิลิรูบินรวม (Bt) และ Bc ที่มีอยู่ในน้ำดี ก่อน เพื่อเก็บไว้คำนวณผลผลิตที่ได้ ผลการแยกได้รับการ พิสูจน์ลักษณะและคุณสมบัติ (identification) ว่าเป็น Bc ซึ่งพบว่าละลายน้ำได้ดี ส่วนคุณลักษณะอื่นๆ ที่ตรวจพบ ตามขั้นตอนต่างๆ แสดงผลการทดลองดังนี้ คือ

2.1 ผลการตรวจ Absorption spectra

การเปรียบเทียบ spectrum ของ Bc จาก bile isolate ละลายใน 4% BSA และ ซีรัม ทำโดยนำ Lyophilized product 1 ขวด ไปชั่งด้วย Analytical balance เพื่อหาน้ำหนักผลผลิตแล้วละลายใน 4% BSA จำนวน 2 mL จากนั้นนำไปหา spectrum โดย scan ตั้งแต่ 350-600 nm. เทียบกับน้ำ ตามแสดงในรูปที่ 1 พบว่าได้ peak ที่มียอดอยู่ระหว่าง 418.5-453.8 nm สูงสุดที่ประมาณ 448 nm สำหรับ 4% BSA ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย Bc lyophilate ไม่พบ peak เมื่อ scan เทียบกับน้ำ

สำหรับการตรวจวัด spectrum ของซีรัมที่มีบิลิรูบิน อยู่ทั้ง 2 รูปแบบ ซึ่งแสดงในรูปที่ 1 เช่นเดียวกัน พบว่าให้

รูปแบบของ spectrum ที่คล้ายคลึงกันกับ Bc isolate แต่มี 2 peaks เนื่องจากในซีรัมมีสารประกอบอื่นนอกเหนือจากบิลิรูบินด้วย แต่มี peak หนึ่งประมาณ 440 อยู่ระหว่าง 420-460 nm. เช่นเดียวกับพบใน Bc lyophilate ที่ละลายใน 4% BSA

2.2 ผลการทำปฏิกิริยากับ diazo reagent

การทำปฏิกิริยากับ diazo reagent ซึ่งจำเพาะกับบิลิรูบิน พบการทำปฏิกิริยาของ Bc ได้ใน direct reaction แสดงผลของการ scan ในรูปที่ 2 ซึ่งให้ผลการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 600 nm และเมื่อให้ bilirubin isolate ทำปฏิกิริยาใน total reaction พบว่าให้ผลการดูดกลืนแสงที่ 600 nm เช่นเดียวกัน (รูปที่ 3) แต่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงกว่า

2.3 คุณสมบัติของ Bc isolate

ตารางที่ 2 ได้สรุปคุณสมบัติของ Bc ที่มีใน apparent yield เปรียบเทียบกับการแยกจากน้ำดีของ

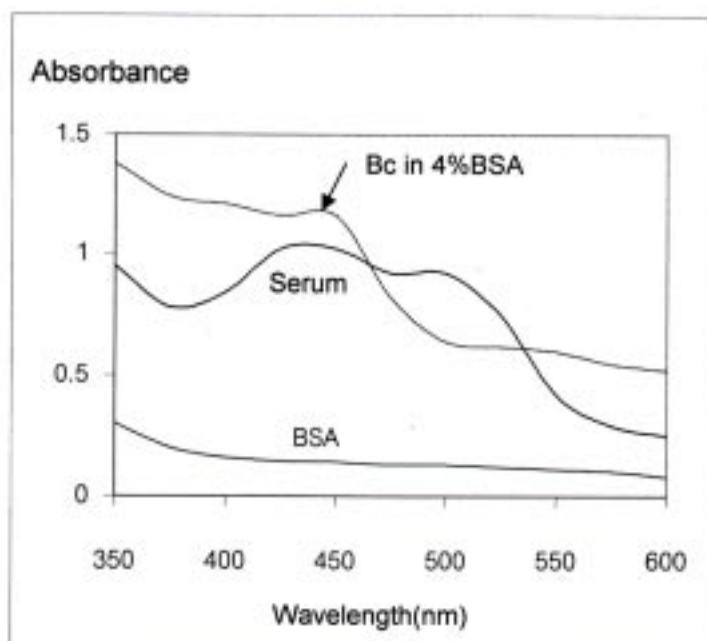
มนุษย์ซึ่งมีผู้ทดลองทำมาแล้ว พบว่าคุณสมบัติทั่วไปของการเป็นบิลิรูบินคล้ายคลึงกัน แต่ได้ peak คมชัดกว่า แต่ได้ผลผลิตต่ำกว่า

2.4 ความเข้มข้นของ Bc isolate

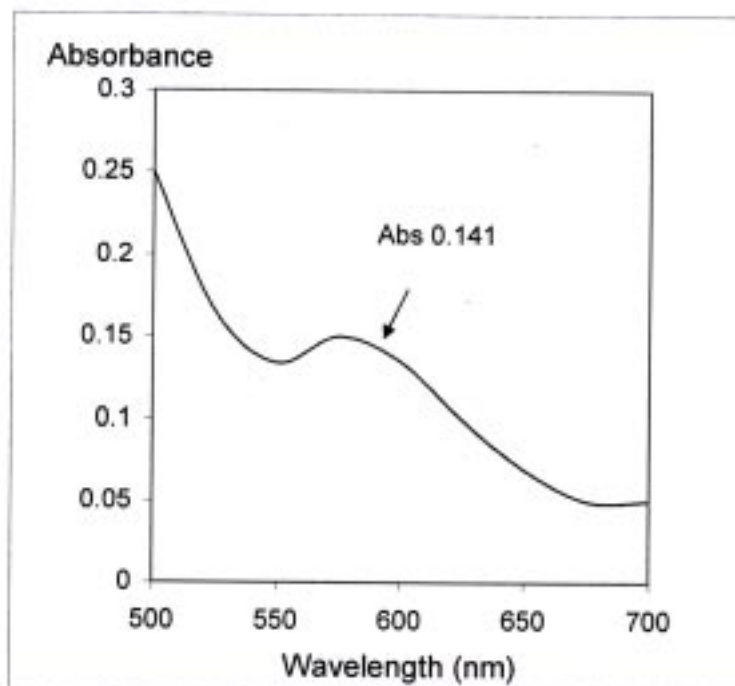
ตัวอย่างการการคำนวณความเข้มข้นของบิลิรูบินละลายใน 4% BSA และทำปฏิกิริยาใน direct reaction ให้ค่าดูดกลืนแสงตามผลการ scan ในรูปที่ 2 เท่ากับ 0.141 และ Total reaction เท่ากับ 0.240 ในรูปที่ 3 ดังนั้นค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ จึงมีค่าเท่ากับ 2.08 และ 3.78 mg/dL ตามลำดับ ผลการคำนวณดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายังมี Bu ปนอยู่ใน Bc แยกจากน้ำดี (bilirubin isolate) สำหรับความเข้มข้นของ Bc isolate ที่ได้จากแต่ละตัวอย่าง ได้สรุปและแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าน้ำหนักรากฏของ ผลผลิตที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.45-1.81 mg/g solid (apparent yield)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของบิลิรูบินในน้ำดีที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการแยกบิลิรูบินเพื่อใช้งาน

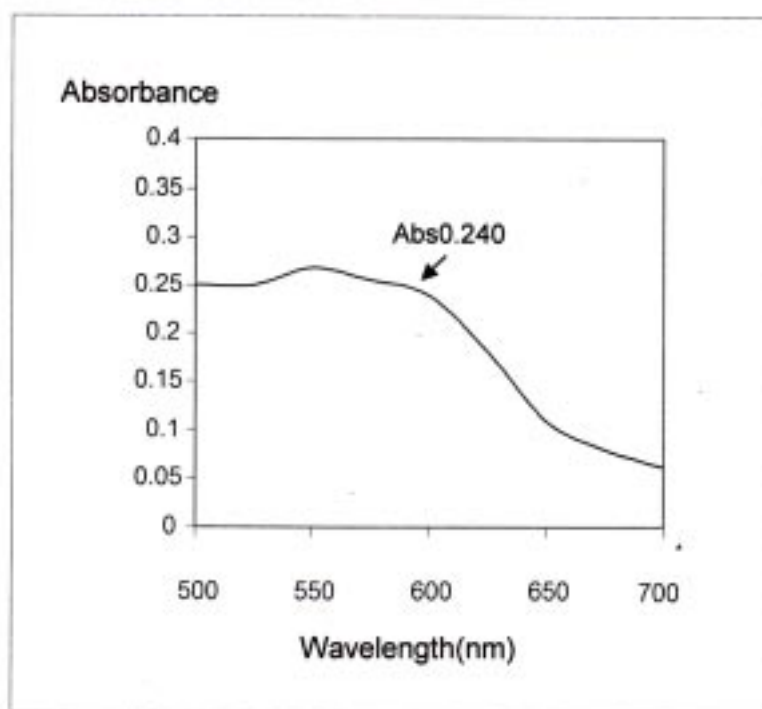
ตัวอย่างที่	ปริมาตร(มล.)	Total bilirubin(Bt) mg/dL	Conjugated,Bc mg/dL	% Bc เทียบกับ Bt ใน ตัวอย่างน้ำดีของวัว
1	72	12.5	8.75	70
2	52	8.4	5.9	40.23
3	81	18.7	10.4	55.61
4	65	7.5	3.75	50.0
5	60	10.8	7.2	66.67
*วิเคราะห์โดยวิธี J-G Method (5)			Mean	62.5
			SD	9.18



รูปที่ 1 Spectrum ของ Bc ใน 4% BSA เปรียบเทียบกับบิลิรูบินในซีรัม และ 4% BSA การ scan สารละลายทั้ง 3 ชนิดทำโดยใช้น้ำอ่านค่าศูนย์ ในเครื่อง Shimudzu UV-160 A



รูปที่ 2 Spectrum ของ Bc ใน 4% BSA ทำปฏิกิริยากับ diazo reagent ใน direct reaction และ scan โดยใช้น้ำ อ่านค่าศูนย์ ในเครื่อง Shimudzu UV-160 A



รูปที่ 3 Spectrum ของ Bc ใน 4% BSA ทำปฏิกิริยากับ diazo reagent ใน Total reaction และ scan โดยใช้หน้าอ่านค่าศูนย์ในเครื่อง Shimadzu UV-160 A

ตารางที่ 2 สรุปผลการแยก Bc จากน้ำดีของวัว เทียบกับการทดลองอื่น

คุณสมบัติทดสอบ	ผลการทดลอง	การทดลองอื่น *
ปริมาณน้ำดีเริ่มต้น	52-81 mL	100 mL
ผลการแยก Bc	1.1-5.2 mg /total bile volumn	5-30 mg/100 mL of total bile volumn
คุณสมบัติทางกายภาพทั่วไป	สีน้ำตาลเหลืองปนเขียว เป็น ผงป่น ดูดความชื้น ละลาย น้ำได้ดี กลายเป็นสีเขียวเมื่อ มีความชื้นหรือโดนแสง	สีน้ำตาลเหลือง เป็นผลึก ดูดความชื้น ละลายน้ำได้ดี กลายเป็นสีเขียวเมื่อมี มีความชื้นหรือโดนแสง
Visible Spectrum	Sharp peak ระหว่าง 325-450 nm มี max.abs ที่ 425 nm	Broad peak ระหว่าง 420- 450 nm มี max Abs.ที่ 420- 425 nm.
Diazo reactivity	ให้สีเหลืองใสขึ้นเมื่อเติม Diazo reagent ให้สีเขียว คล้าย serum ที่มีค่า Bc ต่ำ เมื่อเติม alkaline tartrate ใน Jendrassik&grof reaction	ให้สีชมพูม่วงกับ diazo Reagent ใน direct reaction
ความบริสุทธิ์(purity)	ไม่บริสุทธิ์	15-40% purity

* Lucassen (6)

ตารางที่ 3 ปริมาตรและปริมาณ Bilirubin* ในน้ำดีที่เป็นวัตถุติด และน้ำหนักของผลผลิต (yield) ของ bilirubin lyophilate

ครั้งที่	ปริมาตร ของน้ำดี(มล)	Bt ¹ (mg/dL bile)	Bt ¹ * ¹ (mg/ total bile volumen)	Bc ¹ (mg/dL bile)	Bc ¹ (mg/total bile volumen)	Yield (mg) of Bc lyophilate/total bile volumen ²	Apparent yield (gm) ²	Bc (mg/gm solid)
1	72	12.5	9.0	8.75	6.3	2.1	2.72	0.78
2	52	8.4	4.37	5.9	3.07	1.7	2.68	0.63
3	81	18.7	15.15	10.4	8.42	5.2	2.87	1.81
4	65	7.5	4.88	3.75	2.44	1.1	2.42	0.45
5	60	10.8	6.48	7.2	4.32	3.0	2.55	1.17

*วิเคราะห์โดยวิธี J-G Method , ¹ ความเข้มข้นในวัตถุติด

² น้ำหนักปรากฏ(Apparent yield)

วิจารณ์

การขับถ่ายบิลิรูบินซึ่งเป็นของเสียออกจากร่างกายสามารถทำได้โดยให้บิลิรูบิน conjugate กับน้ำตาล glucuronic acid ที่มีในตับให้เป็น monoglucuronide หรือ diglucuronide แล้วขับออกทางน้ำดี น้ำดีสร้างจากตับ แล้วนำไปเก็บและทำให้เข้มข้นในถุงน้ำดี ก่อนขับออกทางลำไส้เล็กส่วนต้นในขณะที่มีการย่อยไขมัน ดังนั้นในร่างกายนั่นที่มี Bc มากที่สุดคือน้ำดีในถุงน้ำดีนั่นเอง น้ำดีของคนถูกสร้างออกมาประมาณ 400 - 800 มิลลิลิตรต่อวัน และจะถูกทำให้เข้มข้นในถุงน้ำดีประมาณ 5 เท่า ดังนั้นปริมาตรของน้ำดีในถุงน้ำดีของคนจะมีประมาณ 80-160 มิลลิลิตร ซึ่งพอๆ กับน้ำดีในถุงน้ำดีของวัว ส่วน Bilirubin glucuronides ในน้ำดีที่ได้จากถุงน้ำดีคน มีประมาณ 69.4 - 96.5 mg% ของบิลิรูบินรวม (Total bilirubin)⁹ ซึ่งเทียบกับที่ได้จากน้ำดีในถุงน้ำดีของวัว ที่นำมาทดลอง คือ ประมาณ 53.3 -71.7 mg% ของบิลิรูบินรวม (mean $\pm$ SD, ตารางที่ 1) ซึ่งต่ำกว่าเล็กน้อย ดังนั้นการนำน้ำดีจากถุงน้ำดีของวัวมาใช้เป็นวัตถุดิบจึงน่าจะเพียงพอในการนำมาใช้แยก Bc เพื่อนำไปใช้งานแล้วแต่วัตถุประสงค์

การเตรียม Bc ในหลอดทดลองได้มีผู้สนใจทำมานาน เช่น การเตรียม Bc ในรูปของบิลิรูบินเอสเทอร์ (10) ซึ่งพบว่าสามารถสังเคราะห์ในรูป bilirubin ester ของ methyl, ethyl, isopropyl และ benzyl ester ได้ บิลิรูบินเอสเทอร์เหล่านี้ไม่พบในซีรัมและไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ diazo reagent ได้ สำหรับบิลิรูบินเอสเทอร์รูปแบบที่ทำปฏิกิริยากับ diazo reagent ได้ดี ต้องเป็น glucuronide forms ซึ่งพบในน้ำดีและ และในซีรัมคนปกติและผู้ป่วย (11) ดังนั้นบิลิรูบินที่สังเคราะห์ในหลอดทดลองโดยวิธีนี้¹⁰ จึงไม่สามารถนำมาใช้ได้

มีผู้วิจัยอื่นทำการศึกษาเพื่อผลิตและประเมินผล Bc ที่ผลิตขึ้น^{6-7,12-13} โดยวิธีการสังเคราะห์ในหลอดทดลอง เช่น Wu และคณะ⁷ ได้ทำการศึกษาถึงการเตรียม Bc โดยใช้ตับคนเป็นวัตถุดิบนำมาบดเป็น liver homogenate แล้วเติม Bu และ glucuronic acid ลงไปและทำการสังเคราะห์ในหลอดทดลอง ซึ่งเอนไซม์ UDP-glucuronyl transferase ใน liver homogenate จะเร่งปฏิกิริยาการ conjugate ของ Bu กับ glucuronic acid ได้ผลเป็น Bc

ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาใน direct reaction ที่ใช้หลักการ diazotization ได้ นอกจากนี้ Lee¹³ ยังได้สังเคราะห์ ditaurobilirubin (DTB) ซึ่งเป็น conjugated bilirubin ที่เกิดจากการจับกันของ unconjugated bilirubin กับ taurine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนซึ่งมาใช้งาน ซึ่งต่อมา Doumas และคณะ⁷ ได้ประเมินผล Bc สังเคราะห์ชนิดนี้แล้วพบว่า DTB ที่เตรียมขึ้นมีความบริสุทธิ์สูงซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) DTB นี้สามารถทำปฏิกิริยากับ diazo reagent ได้ตามวิธีการตรวจหา direct bilirubin ของ Jendrassik & Grof ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการตรวจหา direct bilirubin ในซีรัมที่นิยมวิธีหนึ่งในปัจจุบัน⁵ อย่างไรก็ตาม DTB ไม่ใช่ Bc ตามธรรมชาติที่พบในกระแสเลือดของมนุษย์ และยังทำปฏิกิริยาซ้ำใน diazo reagent โดยเฉพาะในการตรวจหา direct bilirubin ซึ่งใช้เวลาสั้นในการทำปฏิกิริยาเพียง 1 นาที ถ้าหากนำไปใช้ เติมนลงในซีรัมเพื่อเตรียมซีรัมควบคุม คุณภาพที่มี Bc ความเข้มข้นสูง จะทำให้วิเคราะห์ได้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

ในการศึกษานี้ได้นำวิธีการแยก Bc ของ Lucasen⁶ มาใช้ในการเตรียม Bc โดยมีการดัดแปลงวิธีเพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการ การดัดแปลงทำในขั้นตอนเจือจางน้ำดีและการปรับ pH อย่างช้าๆ ทำให้พบตะกอนที่มีลักษณะเบาฟู (Flocculent precipitate) ที่ pH ประมาณ 7 แต่ผลของการทำปฏิกิริยาของผลผลิตที่ได้กับ diazo reagent สรุปได้ว่าการสกัดนี้ไม่ได้ Bc บริสุทธิ์ การทำ Bc ในผลผลิตให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยการเติม chloroform ผสมกับ buffer (aqueous phase) ลงไปเพื่อแยกเอา Bu และ Bc ออกจากกัน อย่างไรก็ตามขั้นตอนต่อเนื่องนั้นจะทำให้บิลิรูบินสลายตัวมากขึ้น ส่วนการที่ Bc ไม่คงตัวในขณะที่ทำการแยกออกจากน้ำดีนั้นมีรายงานโดย Lucassen⁶ และ Wu⁷ เช่นกัน สำหรับวิธีการเตรียม Bc ที่บริสุทธิ์สามารถทำได้ เช่น จากงานวิจัยของ Spivak & Yuey⁹ ซึ่งใช้วิธี HPLC แยก Bc จากน้ำดีของคน พบว่าในการแยก สามารถแยก Bc ได้บริสุทธิ์และสามารถแยกเก็บได้ในรูป mono และ diglucuronide อีกด้วย อย่างไรก็ตามการเตรียมโดยวิธีนี้จะมีค่าใช้จ่ายสูงมาก

การตรวจสอบคุณสมบัติของสารสกัดว่าเป็น Bc

หรือไม่นั้นสามารถทำให้ถูกต้องได้โดยวิธี Mass spectrophotometry (MS) และ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่ง Wu *et al*⁷ ได้ทดลองแยก Bc จากน้ำดีของคน แล้วย่อยเอา glucuronic acid ออกก่อนนำเข้าตรวจสอบในเครื่อง MS และ NMR พบว่าในสารสกัดจากน้ำดีให้สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น Bc ชนิด bilirubin diglucuronide

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้คือสามารถเตรียม Bc ได้ โดยได้ผลผลิตในระดับหนึ่ง แต่ผลผลิตของ Bc ที่ได้ยังต่ำไปเนื่องจากการมีสารละลายตัวในกระบวนการแยกและการระเหิด ซึ่งพบว่าผลผลิตที่ได้มีสีเขียวน้อยด้วย ซึ่งเป็นสีของบิลิรูบินที่ละลายตัวให้ บิลิเวอดิน แต่เนื่องจากวิธีการเตรียม Bc นี้เป็นวิธีที่ง่าย มีค่าใช้จ่ายต่ำจึงควรจะพัฒนาวิธีการเตรียม โดยเฉพาะในขั้นตอนการป้องกันแสงและออกซิเจนเข้าไปในภาชนะที่ทำการแยกรวมทั้งขั้นตอนในการระเหิด จัดหาเครื่องมือที่เหมาะสมเพื่อให้ Bc ที่แยกออกมาคงตัวสำหรับใช้งานต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Routh JI. Liver function. In "Fundamental of Clinical Chemistry" Tietz NW Ed., WB Saunders, Philadelphia, 1028-62, 1976.
2. Sherwin JE. Liver function in "Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation" Kaplan LA, Pesce AJ Ed., The Mosby Company, St Louis, 420-438, 1984.
3. Doumas BT, Wu TW., The measurement of bilirubin fractions in serum. Clinical Reviews in Clinical Laboratory Science 28 (Issue 5, 6); 1991.
4. Whitehead TP. Quality Control in Clinical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., 1977.
5. Jendrassik L, Grof P. Vereinfachte photometrische Methoden zur Nestimmung des Blutbilirubins. Biochem Z 1938; 297: 81-9.
6. Lucassen J. The diazo reaction of bilirubin and bilirubin diglucuronide. Ph.D Thesis. University of Utrecht 1961.
7. Wu T, Zumbulyadis N, Gross S *et al*. Human Bc isolation, biosynthesis, and direct molecular characterization. Clin Chem 1980; 26; 1323-35.
8. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathophys/digestion/liver/bile.html>
9. Spivak W, Yuey W. Application of rapid and efficient h.p.l.c. method to measure bilirubin and its conjugates from native bile and in model bile systems. Biochem J 1986; 234: 101-9.
10. Hudshison DW, Johnson B, Knell AJ. The synthesis of esters of bilirubin. Biochem J. 1973; 133, 493-98.
11. Compennolle F. Structure revision of disaccharide conjugates of Bilirubin-IX α in human bile and identification of Phenylazo derivatives B4, B5 and B6 as 2-,3- and 4-O- Acylglucuronides. Biochem J ;1978, 175: 1095-1101.
12. Doumas BT, Wu T. The measurement of bilirubin fractions in serum. Clin Chem 1991; 28: 415-45.
13. Lee HA. Ditaurobilirubin (DTB). Lee Scientific, Inc., St.Louis, USA.