

การวิเคราะห์บิลิรูบินรวมในพลาสมาทารกแรกเกิด โดยวิธีการทางเคมี

สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย* ลาวัลย์ อินทร์งาม**

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย* กมล โคติวงษา*

ชูเกียรติ วงศ์สมิง*

บทคัดย่อ : การวิเคราะห์หาค่าบิลิรูบินรวมในพลาสมาของทารกแรกเกิด จำนวน 87 ราย โดยวิธีการทางเคมีนี้พบว่า ให้ค่าความสัมพันธ์กันดีกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER ($r = 0.951$, $y = 0.180 + 0.958x$, $n = 87$) และให้ค่าความเที่ยง (precision) ดีโดยทำการวิเคราะห์แบบ within run assay และแบบ between run assay สำหรับพลาสมาที่มีบิลิรูบินอยู่ในช่วงสูงมาก และสูงปานกลางให้ค่า %CV อยู่ในช่วง 1.85 - 2.81% และ 3.32 - 5.03% ตามลำดับ และให้ค่าความถูกต้อง (accuracy) ที่ดีความเป็นเส้นตรง (linearity) ของการวิเคราะห์ได้อย่างน้อย 18.0 มก./ดล. และความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity) ได้ต่ำถึง 1.7 มก./ดล. รายงานนี้ให้ข้อเสนอแนะว่าสามารถใช้วิธีการทางเคมีทดแทนการใช้เครื่อง MICROBILIRUBINOMETER ได้

คำรหัส : บิลิรูบินรวม, ทารกแรกเกิด, วิธีการทำให้เกิดสี, ไมโครบิลิรูบินโนมิเตอร์

Abstract : An Evaluation of the Determination of Total Bilirubin in Newborns by Chemical Colorimetric Method. Tangvarasittichai S*, In-ngam L*, Tangvarasittichai O*, Kotivongsa K* and Vongsaming C.* Determination of total bilirubin in newborns by a chemical colorimetric methods shows a good correlation with the MICROBILIRUBINOMETER ($r = 0.951$, $Y = 0.180 + 0.958X$, $n = 87$). The coefficient of variation of within-run and between-run assay by this method were 1.85 - 2.81% and 3.32 - 5.03%. The linearity was at least 18.0 mg/dl and sensitivity of this method was 1.7 mg/dl. Bull Chiang Mai AMS 1991; 24(2): 67-72.

Keyword : Total Bilirubin, Newborn, Chemical Colorimetric Method.

* ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยมหิดล

**ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

* Department of Clinical Chemistry
Faculty of Medical Technology,
Mahidol University

**Department of Pediatrics, Faculty
of Siriraj Medicine, Mahidol University

การขับถ่ายบิลิรูบินของเด็กในครรภ์ และเด็กแรกเกิดมีความแตกต่างจากผู้ใหญ่ โดยระหว่างที่เด็กอยู่ในครรภ์ บิลิรูบินที่เกิดจากการทำลายเม็ดเลือดแดงของเด็ก จะถูกส่งมาทางกระแสเลือดผ่านรก เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดของมารดา การขนส่งบิลิรูบินผ่านรกดังกล่าว อาศัยอัลบูมิน ซึ่งมีระดับสูงในร่างกายของแม่ บิลิรูบินบางส่วนจะถูกกำจัดโดยตับของเด็กในครรภ์ และขับออกทางลำไส้เด็ก ในทารกที่คลอดออกมา แล้วบิลิรูบินทั้งหมดจะถูกกำจัดออกโดยตับของเด็กเอง เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าผู้ใหญ่ ดังนั้น ทารกแรกเกิดจะมีบิลิรูบินมากเป็น 2-3 เท่าของ ผู้ใหญ่ โดยปกติระดับเอ็นไซม์ (UDP-glucuronyl transferase) ในตัวเด็กแรกเกิด อายุ 7-10 วัน จะยังมีน้อยจึงมักเกิดภาวะตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดได้ เด็กประมาณ 1 ในจำนวน 5 คนจะมีระดับบิลิรูบินสูงกว่า 7 มก/ดล ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะตัวเหลืองและอาจทำอันตรายต่อเซลล์สมองของเด็ก โดยเฉพาะในเด็กอายุต่ำกว่า 10 วัน เพราะการเจริญของ blood brain barrier ยังไม่สมบูรณ์ บิลิรูบินจึงผ่าน เข้าสมองได้ และเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ประสาทสมอง ซึ่งมีผลถึงตาย หรือทำให้เกิดปัญญาอ่อนได้ การวัดค่าบิลิรูบินรวมในทารกแรกเกิด ส่วนมากยังนิยมใช้เครื่องพิเศษต่างหากที่เรียกว่า MICROBILIRUBINOMETER โดยที่วิธีนี้จะใช้พลาสติกแผ่นบาง โดยการเจาะเลือดใส่ใน heparin hematocrit tube เพียง 3-5 หลอดเท่านั้น ก็สามารถทำการวิเคราะห์ได้ (และยังสามารถอ่านค่า hematocrit ได้อีกด้วย) หลักการของเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER นี้ เป็นการวัดค่าของบิลิรูบินรวมในพลาสติกโดยตรง หลักใหญ่ของเครื่องจะเป็น differential spectrophotometer โดยที่ filter หนึ่งมีความยาว

คลื่นที่ 454 หรือ 461 nm. ซึ่งจะเป็นช่วงคลื่นที่บิลิรูบินดูดกลืนแสงได้สูงสุด ส่วนอีก filter หนึ่งจะมีความยาวคลื่น 540 หรือ 561 nm. เพื่อหักลบสารรบกวน เครื่องนี้จะทำการ standardized กับ secondary standard ที่เป็นพวก multilayer colored glass standard ส่วนการวิเคราะห์ทางเคมีนี้จะใช้หลักการของ Jendrassik & Grof(1) โดยอาศัยหลักการที่บิลิรูบินทำปฏิกิริยากับ diazotized sulfanilic acid ทำให้เกิดสีของสารประกอบ azobilirubin(2) โดยที่ conjugated bilirubin สามารถทำปฏิกิริยากับ diazotized sulfanilic acid ได้โดยตรง ขณะที่ unconjugated bilirubin นั้นต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยา (accelerators) สารที่นิยมใช้เป็นตัวเร่งคือ caffeine, sodium benzoate, methanol, EDTA และ dimethyl sulfoxide ในวิธีที่ทำการศึกษานี้จะใช้ caffeine และ sodium benzoate เป็นตัวเร่ง ซึ่งเป็นวิธีที่ประยุกต์มาจาก Jendrassik & Grof(1) สามารถวิเคราะห์ได้ทั้ง conjugated และ total bilirubin การศึกษานี้ ได้ทำเพื่อนำวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี มาทดแทนวิธีที่ต้องใช้เครื่อง MICRO-BILIRUBINOMETER ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง และใช้วัดค่าบิลิรูบินรวมในทารกได้เพียงอย่างเดียว การใช้วิธีวิเคราะห์ทางเคมีทำให้สามารถประหยัดงบประมาณในการจัดซื้อเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER อีกทั้งสารเคมีที่เตรียมใช้ในการวิเคราะห์นี้ สามารถที่จะวิเคราะห์หาบิลิรูบิน ในซีรัมทั่ว ๆ ไปได้เช่นกัน ทำให้สามารถนำวิธีนี้มาใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วๆ ไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมน้ำยวิเคราะห์ โดยแบ่งออกเป็น

4 ขวด ดังนี้

1. Sulfanilic acid เข้มข้น 29 mmol/l ละลายใน 0.17 N HCl ละลายโดยใช้ความร้อนช่วย
2. Sodium nitrite 25 mmol/l
3. Caffeine solution ประกอบด้วย caffeine 0.26 mol และ sodium benzoate 0.52 mol ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
4. Tartrate solution ประกอบด้วย sodium tartrate 0.93 mol/l ใน 1.9 N NaOH

สารตัวอย่าง

1. พลาสมาจาก heparin hematocrit tube ที่เจาะจากผู้ป่วยทารกของภาควิชากุมารฯ ของโรงพยาบาลศิริราช นำมาตรวจ bilirubin ด้วยเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER และวิธีการทางเคมี
2. ซีรัมแห้ง (control serum) ชนิด Abnormal ซึ่งให้ค่าบิลิรูบินระดับสูงของ CIBA CORNING (Lot No.037802)
3. ซีรัมรวม (pooled serum) ที่มีค่าบิลิรูบินสูงๆ
4. Calibration serum ของ Boeringer Mannheim (Lot No.62498) ใช้กับวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้พลาสมาจาก heparin hematocrit tube ปั่นแล้วหั่นออกเอาเฉพาะส่วนของพลาสมา คัดพลาสมา 50ul ลงในหลอดทดลอง
2. คัด sulfanilic acid 100 ul ผสมให้เข้ากัน
3. เติม sodium nitrite 1 หยด (50 ul) ผสม

4. เติม caffeine solution ลงไป 500 ul ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

5. เติม tartrate solution ลงไป 500 ul ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

6. จากนั้นนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง Photometer 4010 (Boehringer Mannheim West Germany) ที่ 578 nm. โดยใช้น้ำกลั่น ปรับศูนย์ (zero, blank)

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาความสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์บิลิรูบินรวมโดยวิธีการทางเคมี กับวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER (American Optical) โดยทำการวิเคราะห์ในเด็กทารกทั้งสิ้น 87 ราย
2. ทดสอบความเที่ยง (precision) ทำการวิเคราะห์ค่าบิลิรูบินรวมในซีรัม (pooled serum) 2 ระดับ คือ ระดับสูงมาก และระดับปานกลาง โดยทำการวิเคราะห์แบบทำไปพร้อมกัน (within-run assay) และ แบบวันต่อวัน (between-run assay) จำนวน 20 ครั้ง
3. ทดสอบความถูกต้อง (accuracy) โดยทำการวิเคราะห์ในซีรัมแห้ง (serum control) ชนิดค่าผิดปกติ (abnormal) ที่มีค่าบิลิรูบินรวมสูง (CIBA CORNING) จำนวน 10 ครั้ง
4. ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) นำซีรัมที่มีค่าบิลิรูบินรวมสูงๆ มาทำการเจือจางที่ ระดับตั้งแต่ 1.7-17.8 มก/ดล. ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาทดสอบค่า linear regression
5. ทดสอบความไวของวิธีการวิเคราะห์ (sensitivity) โดยทำการทดสอบในตัวอย่างที่มีค่าบิลิรูบินรวมต่ำที่ dilution ที่ต่ำที่สุดที่สามารถ

วิเคราะห์ได้โดยเทียบกับค่าที่ได้จากการคำนวณในการศึกษาจากข้อ 4.

ผลการทดลอง

1. ผลจากการทดสอบความสัมพันธ์ของวิธีการทางเคมี กับวิธีที่วัดด้วยเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER ให้ค่าความสัมพันธ์กันดีมาก $r = 0.951$, $y = 0.180 + 0.958x$, $n = 87$ (รูปที่ 1)

2. ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (precision) ให้ค่าความเที่ยงที่ยอมรับได้ จากการวิเคราะห์แบบทำไปพร้อมกัน (within-run assay) 20 ครั้ง โดยค่าเฉลี่ยที่ 5.94 มก/ดล. ให้ค่า %CV เป็น 2.81 และค่าเฉลี่ยที่ 15.76 มก/ดล. ให้ค่า %CV เป็น 1.85 และวิเคราะห์แบบวันต่อวัน (between-run assay) โดยค่าเฉลี่ยที่ 5.94 มก/ดล. ให้ค่า

%CV เป็น 5.03 และค่าเฉลี่ยที่ 15.76 มก/ดล. ให้ค่า %CV เป็น 3.32 (ตารางที่ 1)

3. ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy) โดยทำการวิเคราะห์ในซีรัมแห้ง ของ CIBA CORNING ซึ่งกำหนดค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.1 มก/ดล. และมีค่าในช่วง 3.8 - 6.4 มก/ดล. จำนวน 10 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.22 มก/ดล. ซึ่งค่าที่ได้จะอยู่ในช่วง 5.0 - 5.4 มก/ดล.

4. ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ให้ค่าความเป็นเส้นตรงได้อย่างน้อยถึง 18.0 มก/ดล. และเมื่อทดสอบ regression line ให้ค่า $r = 0.9998$, slope = 1.0060 (รูปที่ 2)

5. ทดสอบความไวของวิธีการวิเคราะห์ (sensitivity) โดยวิธีการวิเคราะห์นี้ สามารถวิเคราะห์ในค่า dilution ต่ำสุด 1.7 มก/ดล. ได้ถูกต้อง (จากผลการศึกษาใน ข้อ 4)

Table 1. Precision of the chemical colorimetric method for total bilirubin determination

Lower concentration						Higher concentration					
within run			between run			within run			between run		
X	SD	%CV	X	SD	%CV	X	SD	%CV	X	SD	%CV
5.94	0.167	2.811	5.94	0.299	5.03	15.76	0.292	1.85	15.76	0.524	3.32

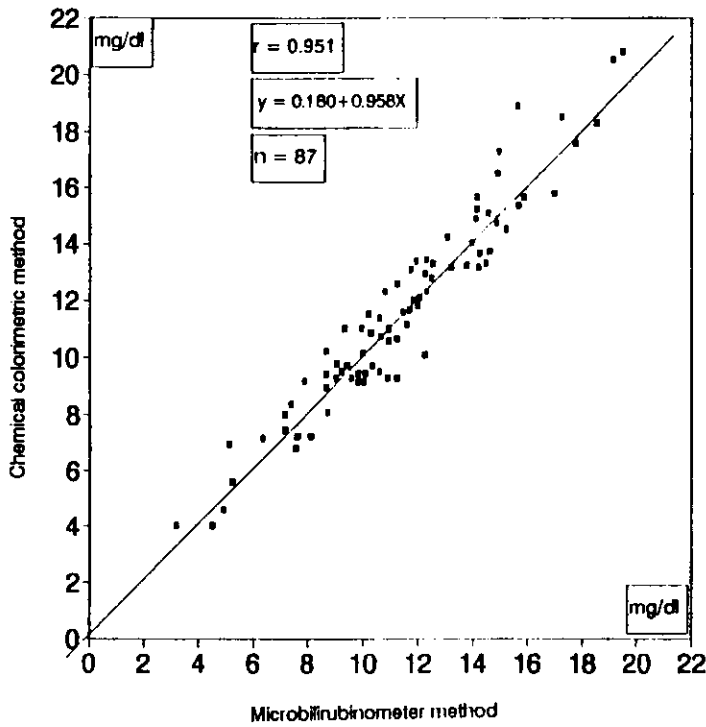


Fig. 1 Correlation of Total bilirubin determination by Microbilirubinometer and Chemical colorimetric method.

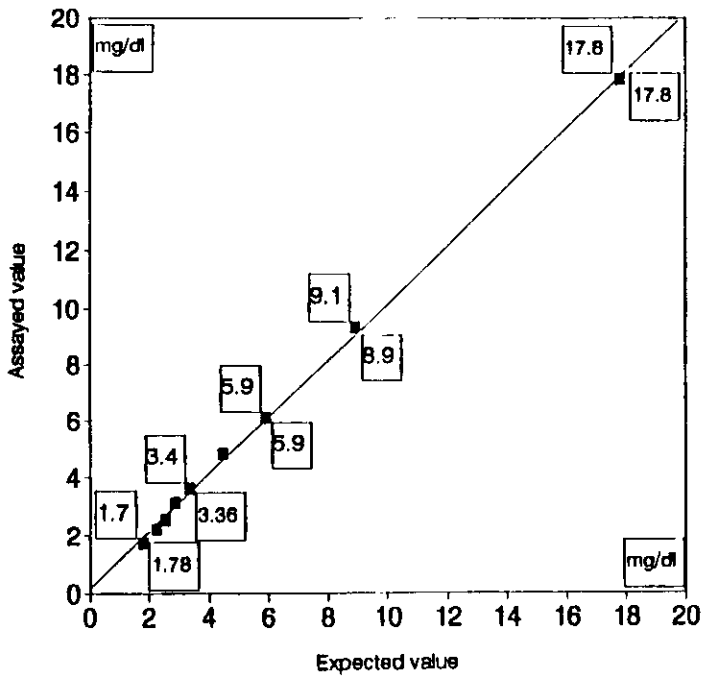


Fig. 2 Linearity of the Chemical colorimetric method of Total bilirubin determination.

วิจารณ์

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่า วิธีการทางเคมีนี้มีความสัมพันธ์กันดีกับ วิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER ความเที่ยง ความถูกต้อง และความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับได้ ทำให้มั่นใจยิ่งขึ้นว่า การวิเคราะห์นี้สามารถที่จะใช้ทดแทนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER ได้ ทำให้ประหยัด ไม่ต้องซื้อเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER ทั้งการใส่สารตัวอย่างก็ใช้จำนวนน้อย เหมือนกับที่ใช้กับเครื่อง MICROBILIRUBINOMETER และเรายังเชื่อว่าวิธีการทางเคมีนี้จะให้ค่าที่ถูกต้องกว่า โดยจากการวิเคราะห์ linearity ในแต่ละ dilution เทียบกับค่าที่ได้จากการคำนวณพบว่าถูกต้องใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งแสดงว่า สีที่เกิดขึ้นนั้นเป็นการทำปฏิกิริยากับตัวบิลิรูบินแล้วเกิดสีขึ้นมาจริง ๆ ไม่เป็นการวัดเทียบสีของพลาสติกโดยตรง อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์หาในรูปของบิลิรูบินรวม หรือรูปของ conjugate/free form ได้อีกด้วย สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในวิธีนี้ คือ Spectrophotometer ที่ใช้นั้น จะต้องมีความไว ความเป็นเส้นตรงของเครื่องสูงพอคือ ต้องมีระบบของ Photometric ที่ดีพอสมควร และถ้าเครื่องที่ใช้เป็นเครื่องรุ่นเก่าควรจะต้องมีการทดสอบให้เสียก่อนว่าสามารถวิเคราะห์โดยวิธีนี้ได้ หรือไม่ และเครื่องสามารถให้ค่าความเป็นเส้นตรงได้ถึงเท่าไร รวมถึงการเลือกใช้สารมาตรฐานหรือ calibrator ที่ง่าย และสะดวก การใช้ calibration serum หรือ serum control ที่ทราบค่าแน่นอน จะสะดวก และถูกต้องกว่าการที่จะมาชั่งสารมาตรฐานบิลิรูบิน ซึ่งจะสิ้นเปลืองมากกว่า และความถูกต้อง น้อยกว่า และจากการ

ศึกษาทดลองใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลแห่งหนึ่ง โดยใช้มาเป็นเวลา 3 ปี พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ และเป็นที่เชื่อถือต่อกุมารแพทย์อย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. Jendrassik L, Grof P. Vereinfachte Photometrische Methoden Zurbestimmung des Blutbilirubins. Biochem/Z 1983;297: 81.
2. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders Co, Philadelphia. 1982: 1368-1371.
3. Doumas BT, Perry BW, Sasse EA, et al. Standardization in bilirubin assays : Evaluation of selected methods and stability of bilirubin solutions. Clin Chem 1973;19:984-993.
4. Lo DH, Wu TW. Assessment of the fundamental accuracy of the Jendrassik-Grof total and direct bilirubin assays. Clin Chem 1983; 9:31-36.
5. Wu TW, Dappen GM, Powers DM, et al. : The Kodak Ektachem Clinical Chemistry Slide for measurement of bilirubin in newborns : Principle and performance. Clin Chem 1982; 28:2366-2372.
6. Gambino SR. Bilirubin (modified Jendrassik and Grof) In : Meites S. Standard Methods of Clinical Chemistry. New York : Academic Press. 1965; 5:55-74.