บทคัดย่อ

บิลิรูบินเกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบินในเซลล์เรติคิวโลเอนโดธีเลียล การเพิ่มขึ้นของบิลิรูบินในซีรัมหรือที่เรียกว่าดีซ่านเกิดจากความผิดปกติที่ตับ หรือท่อน้ำดีหรือ เกิดจากโรคเม็ดเลือดแดงแตกทำลาย มีวิธีตรวจหาปริมาณบิลิรูบินในซีรัมหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมมากซึ่งใช้ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล คือ วิธี diazo reagent สำหรับวิธีที่ใช้เอนไซม์ bilirubin oxidase (BOX) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาหาปริมาณบิลิรูบินและหารูปแบบของบิลิรูบินในซีรัมได้มากกว่า แต่เอนไซม์มีราคาแพงเกินไปที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการประจำวัน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเตรียมเอนไซม์ BOX ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Myrothecium verrucaria* (Mv), สายพันธ์ที่พบในประเทศไทย และนำเอนไซม์มาใช้เตรียมชุดน้ำยาสำหรับตรวจหาปริมาณของบิลิรูบินในซีรัม การตรวจเทียบความเข้มข้นของบิลิรูบินและการตรวจหาความแม่นยำของวิธี ทำโดยใช้สารมาตรฐานและซีรัมควบคุมคุณภาพที่ผลิตขึ้นเอง เอนไซม์ BOX ที่เตรียมจากเชื้อ Mv BCC 112 ให้ผลผลิตสูงกว่าที่พบในสายพันธุ์ Mv BCC 9162 โดยมี specific activity เท่ากับ 53 U/g ได้นำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทำแห้ง และคืนสภาพเพื่อตรวจหา activity ก่อนนำมาใช้งาน เอนไซม์ BOX 0.45 U ในขวดบรรจุ นำมาผสมกับบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมชนิดต่างๆ ใช้ตรวจหาปริมาณ บิลิรูบินรวม direct และ conjugated bilirubin ตามลำดับได้ ในการศึกษานี้ได้เตรียมสารมาตรฐานชนิด conjugated bilirubin จากน้ำดีหมูโดยวิธีทางเคมี หรือวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) แล้วนำมาผสมกับสารมาตรฐานบิลิรูบินที่ผลิตเพื่อจำหน่ายเพื่อใช้เทียบมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์บิลิรูบินในซีรัม ความแม่นยำของวิธีเอนไซม์ที่นำเสนอทำโดยใช้ซีรัมควบคุมคุณภาพที่ผลิตเองเช่นเดียวกัน เอนไซม์แห้งคืนสภาพด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ สามารถเติมออกซิเจนให้บิลิรูบินรวม direct bilirubin และ conjugated bilirubin ในซีรัมได้ดี โดยชุดน้ำยามีความน่าเชื่อถือในการนำมาใช้ในการหาปริมาณบิลิรูบินโดยวิธีในหลอดทดลอง และ วิธีวิเคราะห์อัตโนมัติ และเป็นที่ยอมรับโดยวิธีทางสถิติเมื่อวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการภายนอก

Abstract 173400

Bilirubin is one of the breakdown products of hemoglobin which synthesized in reticuloendothelial cells.The increase of bilirubin in serum called as jaundice was caused by pathological changes in liver, bile duct or by hemolytic diseases. There are several methods used for determination of bilirubin in serum. The favourite method used in hospital laboratories is based on the diazo reagent method. The enzymatic bilirubin oxidase (BOX) is a method of choice that can detect more forms of bilirubin in serum but the enzyme is too expensive to be used in routine laboratory.The aims of this study was to prepare the BOX enzyme produced from *Myrothecium verrucaria* (Mv), the strain that is found in Thailand. The BOX enzyme was then used to prepare the reagent kit for determination of bilirubin in serum. Standardization and precision of method were performed by using bilirubin standard and quality control serum prepared in this study. The enzyme produced from Mv BCC 112 gave higher yield than Mv BCC 9162. Specific activity obtained from that produced from Mv BCC 112 was 53 U/g in a culture media. The enzyme. was lyophilized and after reconstitution activity was determined. The 0.45 U/vial of dried enzyme was mixed with suitable buffers for use in determination of total, direct and conjugated bilirubin respectively. Conjugated bilirubin (Bc) prepared chemically or that isolated from porcine bile by preparative high performance liquid chromatography was mixed with commercial unconjugated bilirubin standard and used to standardize bilirubin in serum. The precision of the proposed enzymatic method was also performd by using quality control serum prepared in this study. Lyophilized enzyme reconstituted with different buffers was able to oxidize total, direct and conjugated bilirubin in serum with good results. Bilirubin oxidase reagent kit was reliable to use in