

| | | |
|----------------------------------|--|------------|
| Thesis Title | Development of Flow-based Systems for Chemical Analysis Involving Biochemical Species | |
| Author | Mr. Kraingkrai Ponghong | |
| Degree | Doctor of Philosophy (Chemistry) | |
| Thesis Advisory Committee | | |
| | Prof. Dr. Kate Grudpan | Advisor |
| | Prof. Dr. Tadao Sakai | Co-advisor |
| | Prof. Dr. Hiroyuki Ukeda | Co-advisor |
| | Assoc. Prof. Dr. Supaporn Kradtap Hartwell | Co-advisor |
| | Asst. Prof. Dr. Somchai Lapanantnoppakhun | Co-advisor |

ABSTRACT

Novel analytical methods involving biochemical species and/or biochemical reactions based on flow based system have been developed. These systems include 1) rapid quantitative analysis of serum bone alkaline phosphatase as a biomarker for bone related diseases, 2) automatic and fast analysis for investigation of inhibitory activity of antioxidant in the lipid peroxidation process and for the determination of lipid hydroperoxide as a parameter of oil quality control, 3) precise and automatic system for study kinetics of an enzyme and for the determination of hydrogen peroxide and 4) simple, automatic and rapid system to detect direct bilirubin and for successive evaluation of direct bilirubin together with creatinine for liver function test.

A rapid automatic flow injection-bead injection (FI-BI) system was introduced for the assay of serum bone alkaline phosphatase (BALP) in different groups of patients to evaluate its effectiveness as a biomarker of bone cancer. The assay was based on specific interaction of BALP with wheat germ coated beads. Activities of BALP in osteosarcoma were compared to those in metastasis and sarcoma groups and also to those previously reported in osteoporosis patients. The FI-BI technique successfully quantitated BALP in human serum in approximately 15 min/sample as compared to 2~3 h using conventional ELISA. Based on statistical calculations, abilities of the FI-BI system and ELISA kit to distinguish normal from osteosarcoma group appeared to be comparable. The average and median of BALP levels found in various sample groups are significantly different and can be placed in the order of high to low as follows; osteosarcoma> sarcoma> metastasis>osteoporosis> normal.

Spectrophotometric sequential injection (SI) system for investigation of inhibition property of antioxidant compounds in lipid peroxidation process was developed with the reduction in analysis time and enhancement in the automation. The linoleic acid was used as a model system which was initially oxidized by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) free radical to obtain lipid hydroperoxide. After that, lipid hydroperoxide was detected by ferric thiocyanate method. Amount of lipid hydroperoxide could be decreased in the present of antioxidants in the lipid peroxidation process, as it is believed to play a role of an inhibitor in oxidation of lipid. Chemical and physical parameters were examined to increase the analytical performance of this system. For selected conditions, the SI system could complete the operation in approximately 10 min/cycle including oxidation/anti-oxidation linoleic acid and detection lipid hydroperoxide steps. This

resulted in shorter analysis time of 10 min per sample instead of 5 h for batch-wise procedure. The results of inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) provided from the developed system were well correlated with those results achieved by batch-wise procedure. Moreover, the developed SI system should be a good alternative for the determination of lipid hydroperoxide which is one of the parameters for oil and fat quality control based on ferric thiocyanate method. Benzoyl peroxide was appropriately used to make the standard calibration graph for the determination of lipid hydroperoxide. Linear range was up to 0.5 mM with a limit of detection (LOD) (3σ) of 0.015 mM of benzoyl peroxide. Relative standard deviation (RSD) of 1.3% was achieved at 0.3 mM for 11 injections and %recoveries were found to be in the range of 97.2-99.5%. The lipid hydroperoxide contents in 8 edible oil samples obtained by this method agreed well with that of batch-wise American Oil Chemists' Society (AOCS) method.

A sequential injection-lab-at-valve (SI-LAV) segmented flow system for kinetic study of an enzyme was developed. Air segments were introduced for separation of enzyme and substrate zones and separation of the stacked zones from the carrier solution. This ensures the measurement of the initial rate and minimizes the dilution/dispersion effect. The open-ended mixing chamber makes it possible to use air segments in the flow system without the need for additional air segment discarding steps. The kinetic parameters for the enzyme horseradish peroxidase (HRP) based on initial rate was used as a model study. The operation of the system is virtually the same as that of the conventional batch-wise process. The kinetic parameters (i.e. K_m and V_{max}) of HRP obtained using the proposed system agree well with those obtained using the batch-wise process. The proposed system offers

additional benefits in volume down scaling, improved rapidity and automatic features that does not require a skillful operator. SI-LAV segmented was successfully applied for quantification of hydrogen peroxide in chemical disinfectants and hair bleaching solution, based on catalytic oxidation of white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase which is an alternative source of low cost plant peroxidase enzyme. A calibration graph could be performed in the range of 0-0.1 mM of H₂O₂ with LOD (3 σ) of 3.8 μ M. This flow system offered fast analysis (20 sample h⁻¹). Coefficient of variation (CV) was less than 2% for 0.03 mM with 11 runs. Therefore, SI-LAV air segmented flow system with white radish peroxidase can be used as a low cost and green chemical analysis alternative method for the detection of hydrogen peroxide for routine quality control.

A novel simultaneous injection effective mixing analysis system (SIEMA) with three channels for determination of direct bilirubin in urine sample was developed. Bilirubin reacts with diazotized sulfanilic acid in the presence of n-octyl- β -D-thioglucoside (OTG) as a solubilizing agent to form OTG-azobilirubin. The flow and chemical variables were investigated. A linear calibration graph for direct bilirubin was obtained over the range of 0–1.0 mg L⁻¹ ($r^2 = 0.994$) with LOD (3 σ) of 4.7 μ g L⁻¹, and RSD being 1.9% of 0.5 mg L⁻¹ of direct bilirubin (n = 11). The results in healthy adults urine obtained by the proposed approach were found in good agreement with those obtained by the batch-wise diazo method. Another configuration with four channels of SIEMA for successive determination of direct bilirubin and creatinine in urinary samples was further developed. Azobilirubin and creatinine-picrate complex were sequentially monitored at 535 nm. The calibration graphs were achieved up to 5.0 mg L⁻¹ for direct bilirubin and 100 mg L⁻¹ for

creatinine. RSDs of direct bilirubin (3 mg L^{-1}) and creatinine (50 mg L^{-1}) for 11 replications were 1.5% and 1.0% respectively. LOD (3σ) was obtained $7 \mu\text{g L}^{-1}$ for direct bilirubin and 0.6 mg L^{-1} for creatinine. The sample throughput for stepwise detection was 33 h^{-1} . The proposed method was successfully applied to the successive determination of direct bilirubin and creatinine in healthy urine samples. The results of direct bilirubin concentrations agreed well with those obtained by vanadate oxidation method. Direct measurement of direct bilirubin and creatinine by this method offered useful information on direct bilirubin/creatinine ratio.

| | | |
|---------------------------------------|---|----------------------|
| ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ | การพัฒนาระบบที่อาศัยการไหลเพื่อการวิเคราะห์ทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับสารทางชีวเคมี | |
| ผู้เขียน | นายเกรียงไกร พลหงษ์ | |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เคมี) | |
| คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | ศาสตราจารย์ ดร. เกตุ กรุดพันธ์ | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| | ศาสตราจารย์ ดร. ทาดาโอะ ซาไก | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | ศาสตราจารย์ ดร. ฮิโรยูกิ อุเคดะ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาภรณ์ รัตน์ทัฬ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชัย ลาภอนันต์นพคุณ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์แนวใหม่ที่เกี่ยวข้องกับสปีชีส์ทางชีวเคมีและ/หรือปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยอาศัยระบบการไหล ระบบที่ได้พัฒนาขึ้นประกอบไปด้วย ๑) การวิเคราะห์เชิงปริมาณอย่างรวดเร็วของซึ่มโบนฟอสฟาเทสอัลคาไลน์ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูก ๒) การวิเคราะห์โดยอัตโนมัติและรวดเร็วเพื่อการศึกษากิจกรรมการยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน และเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพารามิเตอร์หนึ่งของการควบคุมคุณภาพของน้ำมัน ๓) ระบบที่แม่นยำและอัตโนมัติสำหรับการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์และการวิเคราะห์หาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ ๔) ระบบที่ง่ายมีความเป็นอัตโนมัติและรวดเร็วสำหรับการตรวจสอบหาปริมาณเคอโรทีทบิลิรูบินและสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแบบตามลำดับของเคอโรทีทบิลิรูบินพร้อมกับครีตินินเพื่อการทดสอบการทำงานของตับ

ระบบโพลินเจกชัน-บีดอินเจกชันที่รวดเร็วและอัตโนมัติถูกนำมาใช้สำหรับการทดสอบหาปริมาณของซึ่มโบนอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ในกลุ่มของผู้ป่วยที่แตกต่างกันเพื่อประเมินว่าสารนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคมะเร็งกระดูก การวิเคราะห์จะอาศัยปฏิสัมพันธ์ที่เฉพาะเจาะจงของโบนอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสกับสารแลกเปลี่ยนที่ได้จากจุกข้าวสาลีที่เคลือบบีด แอคติวิตีของโบนอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสในผู้ป่วยมะเร็งกระดูกชนิดออสติโอซาร์โคมาถูกนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่มของผู้ป่วยที่อยู่ในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและกลุ่มของผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อน และยังสามารถเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน

เทคนิคโฟลอินเจกชัน-บีคอินเจกชันประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์หาปริมาณโบนอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทสในซีรัมของมนุษย์ใช้เวลาประมาณ ๑๕ นาทีต่อตัวอย่าง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การวิเคราะห์โดยใช้วิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์แบบธรรมดาพบว่าใช้เวลา ๒-๓ ชั่วโมง ระบบโฟลอิน เจกชัน-บีคอินเจกชันและชุดเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์เมื่ออาศัยการคำนวณทางสถิติจะสามารถแยก กลุ่มคนปกติออกจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระดูกชนิดออสติโอซาร์โคมาได้อย่างชัดเจน ค่าเฉลี่ยและค่า กลางของระดับโบนอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสที่พบในหลากหลายกลุ่มตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญ และสามารถเรียงลำดับปริมาณโบนอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสจากสูงไปต่ำได้ดังนี้ กลุ่ม ผู้ป่วยมะเร็งกระดูกชนิดออสติโอซาร์โคมา>กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อน>กลุ่มผู้ป่วยที่อยู่ใน การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง>กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน>กลุ่มคนปกติ

ได้พัฒนาระบบสเปกโทรโฟโตเมตริกซีเควนเชียลอินเจกชันสำหรับการศึกษาคณสมบัติ การยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน เพื่อลดเวลา การวิเคราะห์และเพิ่มประสิทธิภาพให้ระบบมีความเป็นอัตโนมัติ กรดลิโนเลอิกถูกใช้เป็นระบบ ดันแบบสำหรับการศึกษา ซึ่งขั้นแรกจะถูกออกซิไดซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ๒,๒'-เอโซบิส (๒- เมทิลโพรพิโอนาทีดิน) ไคไฮโดรคลอไรด์ ได้ลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้น หลังจากนั้นลิพิด ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ถูกตรวจวัดโดยวิธีเฟริกไซโอไซยานเนต ปริมาณของลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ จะลดลงเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน เนื่องจาก เป็นไปได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของระบบนี้พารามิเตอร์ต่างๆทางเคมีและทางกายภาพได้ถูก ทำการศึกษา ภายใต้สภาวะที่เลือก ระบบซีเควนเชียลอินเจกชันทำงานได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา ประมาณ ๑๐ นาทีต่อรอบ ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนของการ ออกซิเดชัน/แอนไท-ออกซิเดชัน ของกรดลิโนเลอิก และขั้นตอนตรวจวัดลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ผลที่ได้คือใช้เวลาในการ วิเคราะห์ ๑๐ นาทีต่อตัวอย่าง แทนที่จะเป็น ๕ ชั่วโมงสำหรับการทดลองแบบแบทช์ ผลของความ เข้มข้นที่ยับยั้งที่ ๕๐ เปอร์เซ็นต์ และค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานโทรล็อก (ทีอีเอ ซี) ที่ได้จากระบบที่พัฒนาขึ้นมีความสอดคล้องดีกับผลที่ได้ด้วยวิธีแบบแบทช์ นอกจากนี้ระบบ ซีเควนเชียลอินเจกชันที่พัฒนาขึ้นควรเป็นอีกทางเลือกที่ดีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณลิพิด ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นหนึ่งในพารามิเตอร์สำหรับการควบคุมคุณภาพของน้ำมันและไขมัน โดยอาศัยวิธีการเฟริกไซโอไซยานเนตในการวิเคราะห์ เป็น โซอิวเปอร์ออกไซด์มีความเหมาะสมที่จะ ถูกนำมาใช้เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ช่วงความเป็นเส้นตรงสูงถึง ๐.๕ มิลลิโมลาร์ ที่ขีดจำกัดในการตรวจวัด ๐.๐๑๕ มิลลิโมลาร์ของเป็น โซอิวเปอร์ออกไซด์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ ๑.๓ เปอร์เซ็นต์ ที่ ๐.๓ มิลลิโมลาร์

โดยฉีดซ้ำทั้งหมด ๑๑ ครั้ง และร้อยละการได้กลับคืนพบว่าอยู่ในช่วง ๕๗.๒-๕๕.๕ เปอร์เซ็นต์ ปริมาณลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่มีใน ๘ ตัวอย่างน้ำมันพืชที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีการนี้มีความสอดคล้องกันกับผลที่ได้จากการทดลองแบบซ้ำ

ได้พัฒนาระบบซีเควนเชียลอินเจกชันแลบเอควาล์วเซ็กเมนต์โพลสำหรับการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ เซ็กเมนต์อากาศได้ถูกนำมาใช้สำหรับชั้นระหว่างโซนเอนไซม์และโซนสับสเตรท และแยกโซนเอนไซม์สับสเตรทออกจากสารละลาย ซึ่งทำให้แน่ใจในการวัดอัตราเริ่มต้น และลดการเงี้ยว/การกระจายตัวของสาร ช่องผสมแบบปลายเปิดช่วยให้สามารถใช้ส่วนของอากาศในระบบโพลได้โดยไม่ต้องมีขั้นตอนของการกำจัดอากาศทิ้งเพิ่มเติม เอนไซม์ฮอสเตรคิซเปอร์ออกซิเดสถูกใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาเพื่อหาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์โดยอาศัยอัตราเริ่มต้น การทำงานของระบบเป็นเสมือนกระบวนการที่ดำเนินการด้วยแบบเบทซ์ธรรมดา ตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ เช่น ค่าคงที่ของมิเชลิสและอัตราเร็วสูงสุดของฮอสเตรคิซเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการใช้ระบบที่เสนอมีความสอดคล้องกันดีกับค่าที่ได้จากการทดลองแบบเบทซ์ ระบบที่นำเสนอมีประโยชน์เพิ่มเติมอื่นๆ ในแง่ของการลดปริมาณสาร เพิ่มความเป็นอัตโนมัติและความรวดเร็ว อีกทั้งยังไม่ต้องใช้ผู้ทำการทดลองที่มีทักษะความชำนาญมากอีกด้วย ซีเควนเชียลอินเจกชันแลบเอควาล์วเซ็กเมนต์ได้ประสบความสำเร็จในการประยุกต์สำหรับหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำยาฆ่าเชื้อสารเคมีและน้ำยาฟอกสีผมโดยอาศัยการเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวไซเท้าซึ่งเป็นอีกทางเลือกสำหรับแหล่งของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากพืชที่ราคาถูก กราฟมาตรฐานสามารถแสดงในช่วง ๐-๐.๑ มิลลิโมลาร์ ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยขีดจำกัดในการตรวจวัด ๓.๘ ไมโครโมลาร์ ระบบการไหลนี้สามารถให้การวิเคราะห์ที่รวดเร็ว (๒๐ ตัวอย่างต่อชั่วโมง) ค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผันมีค่าน้อยกว่า ๒ เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น ๐.๐๓ มิลลิโมลาร์ โดยการทดลองซ้ำ ๑๑ ครั้ง ดังนั้นซีเควนเชียลอินเจกชันแลบเอควาล์วเซ็กเมนต์โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวไซเท้าสามารถใช้เป็นอีกหนี่งทางเลือกในการวิเคราะห์ที่มีค่าใช้จ่ายต่ำและการวิเคราะห์ทางเคมีสีเขียวสำหรับตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการควบคุมคุณภาพแบบประจำ

ได้พัฒนาระบบการวิเคราะห์แนวใหม่ไซมัลเทเนียสอินเจกชันอีฟกัฟมิกซิงค้อเนลลิซิส (เซียมมา) ที่มีสามช่องสำหรับนำสารเข้าเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของเคือเร็คทบิลิรูบินในตัวอย่างปัสสาวะ บิลิรูบินทำปฏิกิริยากับไดอะโซไซด์ของกรดซัลฟานิลิกที่มี เอน-ออกทิล-เบต้า-ดี-ไอโอกลูโคไซด์ (ไอทีจี) ซึ่งเป็นสารช่วยละลายได้เป็น ไอทีจี-อะโซบิลิรูบิน ตัวแปรการไหลและตัวแปรทางเคมีได้ถูกทำการศึกษา กราฟความเข้มข้นมาตรฐานเชิงเส้นตรงสำหรับเคือเร็คทบิลิรูบินที่ได้อยู่ในช่วง ๐-๑.๐ มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ขีดจำกัดในการตรวจวัด ๔.๗ ไมโครกรัมต่อลิตร และค่า

เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ ๑.๕ เปอร์เซ็นต์ ของ ๐.๕ มิลลิกรัมต่อลิตร ของเชื้อโรคบิลิรูบิน (๑๑ ชั่วโมง) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ปัสสาวะผู้ใหญ่ที่สุขภาพดีด้วยวิธีที่นำเสนอพบว่าได้ผลสอดคล้อง ดีกับผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์แบบเบทซ์ไดอะโซ การออกแบบระบบเชื่อมมาแบบอื่นๆ ที่มีช่องทางในการนำเข้าสู่สารสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแบบตามลำดับขั้นของเชื้อโรคบิลิรูบินและครีตินินในตัวอย่างปัสสาวะได้รับการพัฒนาต่อไป อะโซบิลิรูบินและสารประกอบเชิงซ้อนของครีตินิน-พิเรทถูกตรวจติดตามอย่างเป็นลำดับที่ ๕๑๕ นาโนเมตร กราฟมาตรฐานสำหรับเชื้อโรคบิลิรูบินที่ได้สูงถึง ๕.๐ มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับครีตินินสูงถึง ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของเชื้อโรคบิลิรูบิน (๓ มิลลิกรัมต่อลิตร) และครีตินิน (๕๐ มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด ๑๑ ครั้ง มีค่าเท่ากับ ๑.๕ และ ๑.๐ เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จิตจำกัดในการตรวจวัดที่ได้คือ ๓ มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับเชื้อโรคบิลิรูบิน และ ๐.๖ มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับครีตินิน ปริมาณของตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้แบบเป็นลำดับขั้นคือ ๓๓ ตัวอย่างต่อ ชั่วโมง วิธีที่นำเสนอถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณแบบตามลำดับขั้นของเชื้อโรคบิลิรูบินและครีตินินในตัวอย่างปัสสาวะผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดี ผลที่ได้ของความเข้มข้นเชื้อโรคบิลิรูบิน สอดคล้องเป็นอย่างดีกับผลที่ได้จากวิธีการออกซิเดชันด้วยวานเนเดต การตรวจวัดโดยตรงของเชื้อโรคบิลิรูบินและครีตินินให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการหาอัตราส่วนของเชื้อโรคบิลิรูบินต่อครีตินิน