

การรู้จำแบบและการพัฒนาวิธีการประเมินเชิงคุณภาพและปริมาณของกรดอินทรีย์ขนาดเล็กใน
ของไหลชีวภาพของมนุษย์โดยใช้ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี



นางสาวณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5072591823

PATTERN RECOGNITION AND METHOD DEVELOPMENT FOR QUALITATIVE AND
QUANTITATIVE ASSESSMENT OF SMALL ORGANIC ACIDS IN HUMAN BIOLOGICAL
FLUIDS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Miss Natthida Sriboonvorakul



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Chemistry

Department of Chemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

ณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล : การรู้จำแบบและการพัฒนาวิธีการประเมินเชิงคุณภาพและปริมาณของกรดอินทรีย์ขนาดเล็กในของไหลชีวภาพของมนุษย์โดยใช้ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี. (PATTERN RECOGNITION AND METHOD DEVELOPMENT FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ASSESSMENT OF SMALL ORGANIC ACIDS IN HUMAN BIOLOGICAL FLUIDS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ณัฐชนัน ลิพิพัฒน์ไพบูลย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร.นิโคลัส เจ ไวท์, 85 หน้า.

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทางชีวเคมีวิเคราะห์โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี สำหรับการประเมินเชิงคุณภาพและปริมาณของกรดอินทรีย์ขนาดเล็ก 8 ชนิดพร้อมๆกัน ในน้ำเลือดและปัสสาวะของมนุษย์ กรดอินทรีย์เหล่านี้เป็นกรดชนิดสำคัญที่พบในผู้ป่วยมาลาเรียขั้นรุนแรงและมีภาวะเลือดเป็นกรด โดยใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็งในโหมดแอนไอออนเอ็กเซนจ์ชนิดแรงในรูปแบบ 96 เวลเพลสในการเตรียมตัวอย่าง สำหรับการแยก การตรวจวัดและการหาปริมาณใช้ไฮโดรฟลิคอินเทอร์เฟซลิควิดโครมาโทกราฟีต่อกับแมสสเปกโทรเมตรีในโหมดไอออนลบใช้ตามลำดับ วิเคราะห์กรดอินทรีย์ขนาดเล็ก 8 ชนิดพร้อมๆกันได้แก่ กรดแอลแลกติก, กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก, กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก, กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก, กรดมาโลนิก, กรดเมทิลมาโลนิก, กรดเอทิลมาโลนิก และ กรดแอลฟาเคโตกลูตาริก โดยใช้ซิกนัลคอลลัมด้วยโหมดไอโซคริกอีลูชัน ตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์และแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตามมาตรฐานของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ร่วมกับกระบวนการทดสอบความใช้ได้เพิ่มเติมสำหรับสารเอนโดจีเนียส ค่าความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ของกรดอินทรีย์ทั้ง 8 ชนิดอยู่ระหว่าง 93.1-104.0% และค่าความเที่ยงของการทดลองในเดียวกันและต่างวันมีค่าต่ำกว่า 5.5% ทุกระดับความเข้มข้นของสาร ใช้เทคนิคการรู้จำแบบในการประเมินโปรไฟล์ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่สัมพันธ์กับค่าพารามิเตอร์ทางการแพทย์ในน้ำเลือดใช้เป็นข้อมูลหลักและในปัสสาวะเป็นข้อมูลเพิ่มเติม พบว่าเทคนิคนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์ต่อการเข้าถึงในผู้ป่วยมาลาเรียขั้นรุนแรงและภาวะอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเลือดเป็นกรด

ภาควิชา เคมี
สาขาวิชา เคมี
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต ณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ณัฐชนัน ลิพิพัฒน์ไพบูลย์
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม นิโคลัส เจ ไวท์

5072591823 : MAJOR CHEMISTRY

KEYWORDS: ACIDOSIS / SEVERE MALARIA / LIQUID CHROMATOGRAPHY / MASS SPECTROMETRY / UNIDENTIFIED ACIDS / PATTERN RECOGNITION

NATTHIDA SRIBOONVORAKUL: PATTERN RECOGNITION AND METHOD DEVELOPMENT FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ASSESSMENT OF SMALL ORGANIC ACIDS IN HUMAN BIOLOGICAL FLUIDS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY. ADVISOR: ASST. PROF. NATCHANUN LEEPIPATPIBOON, Dr.rer.nat.,PROF. NICHOLAS J. WHITE, Ph.D., 85 pp.

A simultaneous bio-analytical method for qualitative and quantitative assessment in plasma and urine of eight small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria was developed and validated. High-throughput strong anion exchange solid-phase extraction in a 96-well plate format was used for sample preparation. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to negative mass spectroscopy was utilized for separation, detection and quantification. Eight possible small organic acids; L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (aHBA), β -hydroxybutyric acid (bHBA), p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), malonic acid (MA), methylmalonic acid (MMA), ethylmalonic acid (EMA) and α -ketoglutaric acid (aKGA) were analyzed simultaneously using a ZIC-HILIC column with an isocratic elution containing acetonitrile and ammonium acetate buffer. This method was validated according to U.S. Food and Drug Administration guidelines with additional validation procedures for endogenous substances. Accuracy for all eight acids ranged from 93.1% to 104.0%, and the within-day and between-day precisions (i.e. relative standard deviations) were lower than 5.5% at all tested concentrations. Pattern recognition was applied for evaluation of acid concentration profiles in relation to clinical parameters, in plasma as a main contributor and in urine as additional information. This new approach is a useful tool for the assessment of acidosis in severe malaria patients, and other conditions related to acidosis.

Department: Chemistry
Field of Study: Chemistry
Academic Year: 2013

Student's Signature

Natthida Sriboonvorakul

Advisor's Signature

Natchanun Leepipatpiboon

Co-Advisor's Signature

N. J. White



ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would not have been possible without the help, support and patience of my supervisors: my thesis advisor, Assistant Professor Natchanun Leepipatpiboon, Dr.rer.nat, and my thesis co-advisors, Professor Nicholas J. White, Ph.D. and Associate Professor Niklas Lindegardh, Ph.D., I would like to express my sincere thanks to them for their professional, guidance, encouragement throughout the course of this research and critical proofreading.

Sincere special appreciation is expressed to Professor Arjen M. Dondorp, Ph.D. and Joel Taming, Ph.D. for their invaluable support, advice and constant encouragement. Thank you very much to committee for their very useful advices.

I am very grateful to Wellcome Trust Mahidol University Oxford Tropical Medicine Research Unit for grant, facility and technical support. Special thanks to the Chromatography and Separation Research Unit and the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project for grant support.

I am appreciated to Thomas Pouplin, Ph.D., Daniel Blessborn, Ph.D., Warunee Hanpithakpong, Ph.D. for bio-analytical advice; Trent Herdman, Ph.D. for clinical information; Kanet Wongravee, Ph.D. for pattern recognition analysis advice and Miss Aphiradee Phadeeraj for experimental assistance.

Furthermore, I would like to thank you all members of Pharmacology Laboratory (Mahidol Oxford Research Unit) and all members of Chromatography and Separation Research Unit. Many thanks to Miss Kalayanee Chairat, Miss Praiya Thana, Mr. Palang Chotsiri, Miss Thanaporn Wattanakul, Miss Soparat Yudthavorasit, Mr. Frank Klopogge and Mr. Richard Høglund for their helpfulness and suggestions as well as my friends for their friendship and encouragement.

Finally, I am very grateful to my beloved parents and brother for their love, encouragement and their support for everything in my life. Also thank you to everyone who has contributed to the success of this thesis.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF TABLES	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Background of the Study.....	1
1.2 Literature Reviews	3
1.2.1 Analytical Method	3
1.2.2 Pattern Recognition Method.....	5
1.3 Objectives of The Study.....	7
1.4 Scope of The Study.....	7
CHAPTER II THEORY	9
2.1 Analytical Part.....	9
2.1.1 Solid Phase Extraction (SPE) [23, 24]	9
2.1.2 Liquid Chromatography (LC) [25-27]	10
2.1.2.1 Instrumental Part of LC System.....	11
2.1.2.2 Type of Elution of MP.....	11
2.1.2.3 LC Separation Mode.....	12
2.1.2.3.1 Normal Phase Liquid Chromatography (NPLC).....	12
2.1.2.3.2 Reversed Phase Liquid Chromatography (RPLC).....	12
2.1.2.3.3 Ion Exchange Chromatography (IEC).....	12
2.1.2.3.4 Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC).....	13
2.1.3 Mass Spectrometry (MS) [31-33]	14
2.1.3.1 Instrumental Part of MS System.....	15
2.1.3.2 Electrospray Ionization (ESI) [35, 36].....	15



	Page
2.1.3.3 Quadrupole Ion Trap (QIT) Mass Analyzer [33, 36].....	16
2.1.3.4 Tandem Mass Spectrometry [33, 37].....	17
2.2 Pattern Recognition Part [13, 14].....	18
2.2.1 Data Pre-Processing.....	18
2.2.1.1 Transforming The Elements of The Matrix.....	19
2.2.1.2 Row Scaling.....	20
2.2.1.3 Column Scaling.....	20
2.2.2 Unsupervised Pattern Recognition.....	21
2.2.2.1 Principal Component Analysis (PCA).....	22
2.2.3 Supervised Pattern Recognition.....	23
2.2.3.1 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLSDA).....	23
2.2.3.2 Linear Discriminant Analysis (LDA).....	24
CHAPTER III EXPERIMENTAL.....	26
3.1 Development and Validation of Analytical Method.....	26
3.1.1 Instrument and Apparatus.....	26
3.1.2 Chemical and Materials.....	27
3.1.2.1 Standard Compounds and Stable Isotope-labeled Internal Standard (SIL-IS) Compounds.....	27
3.1.2.2 Other Chemicals.....	28
3.1.3 Preparation of Calibration Standards, Internal Standards and Quality Control...	28
3.1.3.1 Calibration Standards.....	28
3.1.3.2 Internal Standards.....	29
3.1.3.3 Quality Control.....	29
3.1.4 The Optimum Instrumental Analysis Conditions.....	29
3.1.4.1 Optimization MS Parameters.....	29
3.1.4.2 Optimization LC Parameters.....	30
3.1.5 Extraction Method Optimization.....	30



3.1.6 Method Validation for Determination of Endogenous Compounds in Biological Samples	31
3.1.6.1 Selectivity	31
3.1.6.2 Linearity of Calibration Curves and Sensitivity	31
3.1.6.3 Recovery and Matrix Effects	32
3.1.6.4 Precision and Accuracy	32
3.1.6.5 Stability	32
3.2 Clinical Applicability	33
3.2.1 Sample Collection	33
3.2.2 Sample Preparation	33
3.2.3 Sample Analysis	34
3.3 Statistical Data Analysis	35
3.3.1 Clinical Samples in The Study	35
3.3.2 Univariate Analysis	35
3.3.3 Multivariate Analysis	35
3.3.3.1 Data Pre-processing	36
3.3.3.2 Unsupervised Pattern Recognition	36
3.3.3.3 Supervised Pattern Recognition	36
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION	37
4.1 Development and Validation of Analytical Method	37
4.1.1 The Optimization of MS Conditions	37
4.1.2 The Optimization of LC Conditions	38
4.1.2.1 HILIC Condition in The Study	39
4.1.2.2 Type, Concentration and pH of Mobile Phase	39
4.1.2.3 The Wash Step Condition	39
4.1.2.4 Flow Rate and Runtime	40
4.1.3 The Optimization of Extraction Method	43
4.1.4 Method Validation for Determination of Endogenous Compounds in Biological Samples	43



	Page
4.1.4.1 Selectivity.....	43
4.1.4.2 Linearity of Calibration Curves and Sensitivity	44
4.1.4.3 Recovery and Matrix Effects	45
4.1.4.4 Precision and Accuracy.....	45
4.1.4.5 Stability.....	45
4.2 Clinical Applicability and Relevance.....	54
4.3 Statistical Data Analysis	59
4.3.1 Univariate Analysis.....	59
4.3.2 Multivariate Analysis.....	64
4.3.2.1 Data Pre-processing	64
4.3.2.2 Unsupervised Pattern Recognition	66
4.3.2.3 Supervised Pattern Recognition.....	70
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	74
REFERENCES	76
VITA.....	84



2759463732

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 Chemical structures of the eight small organic acids thought to play an important role in the pathophysiology of the metabolic acidosis in severe malaria	2
Figure 2 Four typical steps of SPE.....	10
Figure 3 Schematic diagram of a LC instrument; 1=reservoir; 2=transfer line; 3=pump; 4=sample injection; 5=column (with thermostat); 6=detector; 7=waste; 8=data acquisition [25].....	11
Figure 4 ZIC HILIC phase, SP used in this study which consists of porous silica particles covalently bonded with highly polar sulfobetaine type zwitterionic functional groups [29].....	13
Figure 5 The separation mechanism of HILIC on the ZIC-HILIC column [30].....	14
Figure 6 Mass spectrum of hexanal [34].....	15
Figure 7 Schematic diagram of a MS instrument [32].....	15
Figure 8 Schematic of the components of an ESI source [36].....	16
Figure 9 Schematic of the QIT mass analyzer [36].....	17
Figure 10 Schematic of the QQQ mass spectrometer [37].....	18
Figure 11 Data matrix used for pattern recognition modeling.....	19
Figure 12 Graphical example presents the decomposition of data matrix (X) into a scores matrix (T), a loadings matrix (P') with A principal components [13]....	22
Figure 13 Graphical example illustrates of samples in the original space (left) and the position of samples in PC spaces (right) [13].....	23
Figure 14 Extracted chromatogram of eight acids (at flow rate 0.3 mL/min of	41
Figure 15 Extracted chromatogram of eight acids (at flow rate 0.5 mL/min of mobile phase A under HILIC condition in this study)	42
Figure 16 Extracted chromatogram of injected blank plasma (A) and urine (B) samples during post-column infusion of the 8 acid standards.....	53
Figure 17 Equation of Pyruvate and L-Lactate (LA) equilibrium [50].....	54
Figure 18 Extracted chromatogram of acids found in a plasma sample (A) and in a urine sample (B) from a patient with severe falciparum malaria.....	56



Figure 19 Scatter plots of all 296 plasma samples (3 groups; severe malaria (n=141), uncomplicated malaria (n=87) and healthy control (n=68)) with 4 acids (LA, aHBA, bHBA and pHPLA)	57
Figure 20 Scatter plots of all 288 urine samples (3 groups; severe malaria (n=133), uncomplicated malaria (n=94) and healthy control (n=61)) with 7 acids (LA, aHBA, bHBA, pHPLA, MMA, EMA and aKGA)	58
Figure 21 Two dimension score plots (from PCA technique) of all 3 groups of plasma samples (n=296) with 4 targeted acid variables using different pre-processing methods	65
Figure 22 Two dimension score plot of plasma samples (n=296) with 4 targeted acid variables from three sample groups (A) and Three dimension score plot (B)	67
Figure 23 Bi-plot (2D) of plasma samples (n=296) with 4 targeted acid variables from three sample groups.....	68
Figure 24 Bi-plot (2D) of urine samples (n=288) with 7 targeted acid variables from three sample groups.....	69
Figure 25 Bi-plot (2D) of urine samples (n=288) with 3 targeted acid variables from three sample groups.....	70

LIST OF TABLES

	Page
Table 1 Groups and numbers of plasma and urine samples in this study.....	35
Table 2 Optimized ESI and MS parameters for eight acids.....	38
Table 3 Method specification and calibration range of eight organic acids.....	46
Table 4 Accuracy and precision of quality control samples spiked in human blank plasma and urine (n=5) analyzed at 3 separate occasions	47
Table 5 Process efficiency, recovery and matrix effects in human plasma (n=6) and urine (n=6).....	50
Table 6 Accuracy and precisions of QC samples in water for all eight acids (n=5) analyzed at 3 separate occasions	51
Table 7 Medians with interquartile range of four acid concentrations in plasma from all three sample groups.....	61
Table 8 Medians with interquartile range of seven acid concentrations in urine from all three sample groups.....	62
Table 9 Factor loadings in the two first principal components (PC) of data matrix from plasma samples.....	68
Table 10 Factor loadings in the two first principal components (PC) of data matrix from urine samples	69
Table 11 Summary of PLS-DA classification result	72
Table 12 Summary of LDA classification result.....	73
Table 13 Sensitivity and specificity of LDA in three sample groups.....	73

