DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS PRODUCED BY *PLASMODIUM FALCIPARUM* USING LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY

PARSAKORN TAPAOPONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (TROPICAL MEDICINE) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 2017

Copyright © Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS PRODUCED BY *PLASMODIUM FALCIPARUM* USING LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY

PARSAKORN TAPAOPONG 5837481 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: KESINEE CHOTIVANICH, Ph.D., MARKUS WINTERBERG, Ph.D., BORIMAS HANBOONKUNUPAKARN, Ph.D.

ABSTRACT

Lactic acid (LA) levels are usually measured in patients with acidosis. LA is a major product of the malaria parasite's consumption of glucose to meet its energy requirements. Previous studies have determined other organic acids, in addition to LA, and examined their roles in the pathogenesis of severe malaria patients. This study aimed to determine the source of the organic acids commonly found in patients, focusing on parasite-released products. *P. falciparum* strain TM267 samples were synchronized with 5% D-sorbitol to yield a high percentage of ring-stage samples. Supernatants from malaria culture were collected from 4 stages--ring form, trophozoite, schizont, and post-schizont rupture. Mass spectrometer (MS) tuning was performed to acquire the target mass (*m/z*) of 4 acids and internal standards. Also, Liquid chromatography (LC) conditions were tested to determine the optimum pattern of chromatogram and retention time (t_R). The organic acids detected were quantitated by establishing a calibration curve from standard solutions. Samples were prepared by solid phase extraction (SPE) in order to remove unwanted impurities, which might influence the LC-MS system. LA was found to be a statistically significant ($P < 0.05$) parasite product in every stage. No statistically significant traces of other acids were found with this specific LC-MS method even when using isolated parasites and higher parasitaemia levels. The LC-MS method was shown to be sensitive, reproducible, and appropriate for small sample volumes. However, full validation methods are needed to improve the accuracy of acid quantitation. The use of a culture medium with amino acid depletion is an alternative for further study, to avoid the competition between amino acids and candidate acids at ion exchange sites during the SPE process. Acid fragility and lability are also important topics for further investigation. LA was found to be a *P. falciparum* product at different concentrations in each stage, while p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), α-hydroxybutyric acid (aHBA), and β-hydroxybutyric acid (bHBA) were not detectable at significant levels using this specific LC-MS method. Amino acid depletion of culture medium and acid stability should be further investigated to achieve other aspect for future studies.

KEY WORDS: *P.falciparum*/ ORGANIC ACIDS/ ACIDOSIS/ LC-MS/ MALARIA CULTURE.

Copyright by Mahidol University

76 pages

การตรวจวัดกรดอินทรีย์ที่สร้างจากเชื้อ *พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม* ด้วยวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี
DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS PRODUCED BY PLASMODIUM FALCIPARUM USING LIQUID CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY

ภาสกร ตะเภาพงษ์ 5837481 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: เกศินี โชติวานิช, Ph.D., มาร์คัส วินเทอร์เบิร์ก, Ph.D., บริมาส หาญบุญคุณูปการ, Ph.D.

บทคัดย่อ

กรดแลคติกสามารถตรวจวัดได้ตามปกติในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงที่มีภาวะเลือดเป็นกรด และเป็นที่ทราบว่า กรดชนิดนี้ถูกสร้างจากตัวเชื้อโดยอาศัยการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน จากผลการศึกษาของงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า ยังมีกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากกรดแลคติก มีบทบาททางพยาธิสภาพกับคนไข้ในภาวะดังกล่าว จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์งานวิจัยฉบับนี้ เพื่อต้องการระบุแหล่งที่มาของกรดอินทรีย์เหล่านั้น โดยใช้วิธีการตรวจวัดโดยตรงจากสารคัดหลั่งของเชื้อมาลาเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ถูกเก็บเพื่อนำไปตรวจวัดกรดอินทรีย์ด้วยวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี โดยจำแนกตามระยะต่าง ๆ ได้แก่ ring, trophozoite, schizont, และระยะหลังการแตกตัวของ schizont โดยวิธีการตรวจวัดดังกล่าวเริ่มจากการหาสัดส่วนมวลต่อประจุ (m/z) ของกรดอินทรีย์ที่กำลังศึกษา จากนั้นทำการทดสอบเพื่อหาชนิด อัตราส่วน และสมบัติทางเคมีของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการพากรดอินทรีย์ดังกล่าวมาชะออกและแสดงผลในรูปแบบของโครมาโตแกรมที่ระยะเวลา (retention time) ต่าง ๆ กัน ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ถูกตรวจวัดโดยการสร้างเส้นโค้งสอบเทียบ (calibration curve) จากสารละลายมาตรฐาน (standard solution) โดยสารตัวอย่าง (sample) ทั้งหมดจะถูกเตรียมด้วยกระบวนการ solid phase extraction ก่อนนำมาทดสอบ ผลการวิจัยพบว่าเชื้อ *P. falciparum* สร้างกรดแลคติกออกมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ความเข้มข้นต่างกันในแต่ละระยะ ขณะที่กรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการดังกล่าว แม้ว่าการศึกษานี้ได้ทดสอบโดยตรงกับตัวเชื้อในปริมาณที่สูงกว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งสำหรับการศึกษาในอนาคต เนื่องจากสันนิษฐานว่าอาจมีผลต่อการชะออกของกรดอินทรีย์ ขณะถูกเตรียมด้วยกระบวนการ solid phase extraction นอกจากนี้อาจมีความเกี่ยวข้องในเรื่อง ความเสถียรของกรดอินทรีย์ในสารตัวอย่าง ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาโดยละเอียดต่อไป อย่างไรก็ตามวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี ที่ถูกพัฒนาขึ้นนั้นมีคุณสมบัติแม่นยำและเหมาะสม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้สำหรับการศึกษาครั้งถัดไปที่ต้องการตรวจวัดสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับงานวิจัยฉบับนี้

Copyright by Mahidol University