

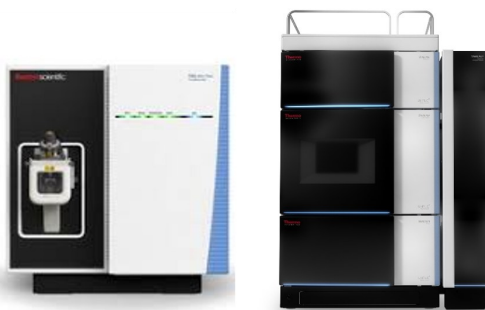
การตรวจวิเคราะห์ TMAO และสารตั้งต้นในปัสสาวะและพลาสมา โดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี

ผู้จัดทำ: ไพบุลย์ พรหมณี, จิรภิญญา เสี่ยมไคร่ต่วน, จิตนภา วรนิติกุล, นิรมล จิตต์สมหมาย, สิริรัตน์ ลิทธิรัตนศิริกุล, สุดิธา รามอร่าม

บทนำ

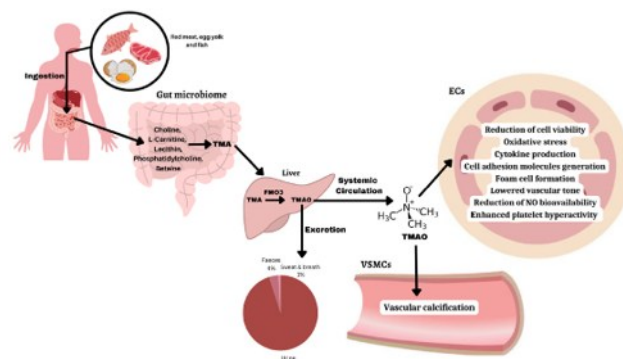
LC-MS/MS เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่อาศัยการแยกสารผสมในสถานะของเหลวและตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุลสาร โดยได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือสูงสุด ในทางการวินิจฉัยทางคลินิกจะมีข้อดีในเรื่องความจำเพาะเมื่อเทียบกับวิธีอื่น เช่น การทดสอบแบบ Immunology เราได้พัฒนาวิธี LC-MS/MS ที่มีขั้นตอนง่ายขึ้น เพื่อวิเคราะห์สารกลุ่ม TMAO, choline, betaine ในพลาสมาและปัสสาวะของมนุษย์ ซึ่งช่วยสนับสนุนการศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคทางคลินิกได้

Trimethylamine N-oxide (TMAO) เป็นเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ งานวิจัยล่าสุดพบว่าระดับ TMAO ในพลาสมาที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดแดง ความดันโลหิตสูง และความผิดปกติในการเผาผลาญ เช่น เบาหวาน และภาวะไขมันในเลือดสูง ซึ่งทั้งหมดนี้นำไปสู่ความผิดปกติของหลอดเลือด เนื่องจาก TMAO ได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับโรคเรื้อรัง ทำให้การตรวจหา TMAO ในพลาสมามีความสำคัญต่อการวินิจฉัยโรคในระยะแรก



รูปที่ 1 เครื่อง LC-MS/MS

ผลิตโดยบริษัท Thermo Fisher Scientific สหรัฐอเมริกา



รูปที่ 2 แสดง Biochemical pathways
ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง TMAO

Desorption, Clean-up and LC Conditions

Analytical Column	Acclaim™ Mixed-Mode HILIC-1 (2.1x150mm) 3μm
Column temperature	40 °C
Mobile phase	A: 10 Mm Ammonium formate B: Methanol
Data acquisition mode	Selected ion monitoring (SRM)

MS Conditions

Ion source type	H-ESI
vaporizer temperature	350 °C
Spray voltage	3500 V
Sheath gas and auxiliary	60 and 10 (arbitrary units),
Collision gas (argon) pressure	1.5 mTorr.

ข้อมูล SRM transition และ Collision Energy

	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE(v)	RF(v)
TMAO	75.9	42.217	38.16	41
Betaine	117.983	42.133	55.77	61
Choline	104.05	44.967	22.19	53
TMAO-D9*	84.983	66.133	21.83	44
TMA-D9*	69.05	49.05	24.69	46

*Internal standard

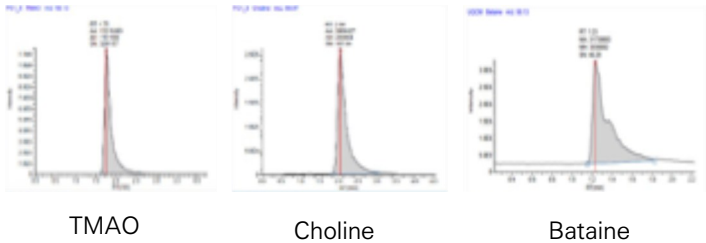
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยการตกตะกอนโปรตีน จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานปริมาตร 200 µL ลงในตัวอย่างมาตรฐานสำหรับการสอบเทียบ (calibration) ตัวควบคุมคุณภาพ (QC) และตัวอย่างที่ไม่ทราบค่า (ปริมาตร 50 µL) ซึ่งได้จากการตกตะกอนโปรตีนจากนั้นดูดเอาส่วนใสปริมาตร 20 µL นำมาผสมกับ ACN:MeOH (75:25) ปริมาตร 100 µL ผสมให้เข้ากันดูดเอาตัวอย่างปริมาตร 5 µL ฉีดเข้าสู่ระบบ LC-MS/MS



ผลการวิเคราะห์

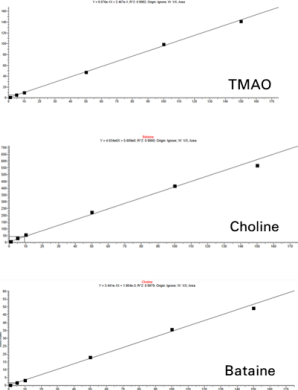
Chromatogram ของ TMAO, Betaine และ Choline จากการวิเคราะห์ดังกล่าว



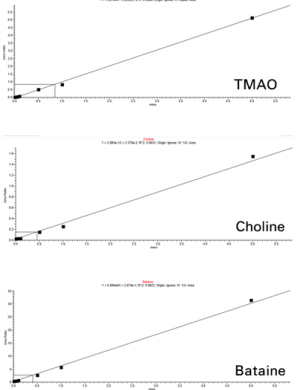
เส้นกราฟสารมาตรฐาน

เส้นกราฟมาตรฐานสำหรับตัวอย่างปัสสาวะ และตัวอย่างพลาสมาเป็นดังรูปด้านล่าง โดยค่าความเป็นเส้นตรงของทั้งสองมีค่ามากกว่า 0.99 ($R^2>0.99$)

สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ



สำหรับตัวอย่างพลาสมา



Signal Response

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.01 ppm โดยมีค่า Signal-to-Noise Ratio ของความเข้มข้นต่ำสุดแสดงในรูปแบบของตารางด้านล่าง

สรุปผลการวิเคราะห์

Compound	Conc(ppm)	S/N
Betaine	0.01	35
Choline	0.01	3.5
TMAO	0.01	54

คณะผู้จัดทำได้มีการพัฒนาวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์สารในกลุ่ม TMAO, Betaine และ Choline ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในพลาสมาและปัสสาวะ รวมถึงกระบวนการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย มีความแม่นยำ และเหมาะสมสำหรับการใช้งานในงานวิจัยหรือทางคลินิกที่ต้องการศึกษาและตรวจหาระดับสารในกลุ่มดังกล่าวแบบง่าย และรวดเร็วซึ่งปัจจุบันวิธีการนี้ถูกนำไปใช้สนับสนุนการวิจัยทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับตัวบ่งชี้โรคในทางการแพทย์

ขอขอบพระคุณอย่างสูง

- Scientific and Technological Research Equipment Centre Chulalongkorn University (STREC)
- Faculty of medicine Chulalongkorn university

เอกสารอ้างอิง

- Shanmugham M., Bellanger S., Leo C.H. Gut-Derived Metabolite, Trimethylamine-N-oxide (TMAO) in Cardio-Metabolic Diseases: Detection, Mechanism, and Potential Therapeutics. Pharmaceuticals 2023, 16, 504.
- Andrew J. Ocquea, Jason R. Stubbsb, Thomas D. Nolina. Development and validation of a simple UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of trimethylamine N-oxide, choline, and betaine in human plasma and urine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 109 (2015) 128–135

ติดตามแอปพลิเคชันอื่น ๆ ได้ที่ <https://www.scispec.co.th>



บริษัท ชายน์ สเปค จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก ซอย 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533



scispec



@scispec

thermo
scientific

Authorized Distributor

ISSUED: