

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19049> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Lindenburg, Petrus Wilhelmus

Title: New electromigration-driven enrichment techniques for peptidomics and metabolomics

Date: 2012-06-05

Nederlandse samenvatting

De verschuiving van reductionisme naar systeemdenken heeft het vakgebied van de analytische chemie gestimuleerd om bioanalytische technieken te ontwikkelen die snel een breed scala aan componenten die in lage concentraties voorkomen kunnen meten.

In dit proefschrift wordt gedemonstreerd dat elektroforetische methoden gebruikt kunnen worden om deze doelen te bereiken. Daartoe werden zorgvuldig gekozen elektrolietensystemen gebruikt, die leiden tot omstandigheden waarin isotachoforese of elektroextractie kan plaatsvinden. In 'een dergelijk elektrolietensysteem kan een flux van analieten gegenereerd worden door een elektrisch veld aan te leggen. Omdat alle peptiden en een groot deel van de metabolieten in geladen toestand kunnen worden gebracht door de pH te variëren, kunnen ze deel uit maken van deze analietenflux. Dankzij deze flux kunnen dus zowel peptiden als metabolieten worden geconcentreerd en, in het geval van isotachoforese, ook gescheiden worden.

In **Hoofdstuk 2** wordt het gebruik van zogeheten 'spacer-moleculen' om capillaire isotachoforese van peptiden aan massaspectrometrie te koppelen verkend. De koppeling van capillaire isotachoforese aan massaspectrometrie combineert de kracht van capillaire elektroforese, namelijk het concentrerende effect, met de kracht van massaspectrometrie, namelijk de selectieve en gevoelige detectie. In principe is deze combinatie om bovengenoemde redenen zeer geschikt voor de analyse van lage concentraties peptiden en metabolieten.

Echter, de directe koppeling van isotachoforese aan massaspectrometrie is momenteel slechts beperkt succesvol. Dit komt omdat, zodra de experimentele omstandigheden die ervoor zorgen dat isotachoforese plaatsvindt verlaten worden, de scheiding en de concentrering die bewerkstelligd waren gedeeltelijk teniet worden gedaan. Hierdoor raken de analieten deels weer met elkaar vermengd. Wanneer de analietzones zeer smal zijn, zoals het geval is wanneer zeer lage concentraties geanalyseerd worden, leidt dit er zelfs toe dat zij weer geheel vermengd raken, terwijl het concentrerende effect van isotachoforese ook grotendeels verloren gaat.

In dit proefschrift wordt getoond dat de toevoeging van spacer-moleculen aan het monster, voordat het geanalyseerd wordt, het vermengen van de analieten (in dit geval peptiden) tijdens het overbrengen naar de massaspectrometer kan voorkomen. Zoals verwacht werden de peptiden fysiek van elkaar gescheiden doordat spacer-moleculen zich tussen de analietzones situeerden tijdens de isotachoforetische focussering. Dit resulteerde in verschillende opeenvolgende massaspectra met steeds één peptide, in plaats van massaspectra waarin alle peptiden tegelijk voorkomen (zoals waargenomen wanneer

geen spacer-moleculen waren toegevoegd). Gedurende deze studie werd opgemerkt dat het gebruikte mengsel spacer-moleculen verbetering behoeft. Het gebruikte mengsel bestond uit amfolieten die normaliter worden gebruikt in experimenten waarin gewerkt wordt met isoëlektrisch focuseren. De exacte samenstelling van dit mengsel is onbekend en het bevat een hoog gehalte vervuilingen die massaspectrometrische detectie negatief beïnvloeden vanwege ionensuppressie. Een mogelijk oplossing voor dit probleem is het opschonen van het spacer-molecuulmengsel voordat het wordt toegevoegd aan het monster. Eleganter zou het zijn om een speciaal voor deze toepassing geschikt mengsel van spacer-moleculen te ontwikkelen. Deze spacer-moleculen moeten over elektroforetische mobiliteiten beschikken die in hetzelfde bereik liggen als de mobiliteiten van de te analyseren componenten. Daarnaast moeten zij geen ionensuppressie veroorzaken bij introductie in de massaspectrometer en ze moeten vluchtig zijn, zodat ze de naald waarmee ze worden verneveld niet verstoppert.

De directe koppeling van capillaire isotachoforese aan massaspectrometrie met gebruik van spacer-moleculen zal resulteren in een weinig bewerkelijke, goedkope, eenvoudig op te zetten analytische methode met verbeterde detectielimieten en een groot dynamisch bereik.

De tweede op elektroforese gebaseerde benadering die in dit proefschrift (**Hoofdstuk 3-5**) werd bestudeerd is elektroextractie. Er werd aangetoond dat elektroextractie een snelle, kwantitatieve techniek is die analieten concentreert. Elektroextractie is toepasbaar op complexe monsters die peptiden en/of metabolieten bevatten, eenvoudig te automatiseren, eenvoudig te koppelen aan vloeistofchromatografie en massaspectrometrie en in staat om grote volumes geïnjecteerd monster te extraheren (10-100 μL , met de mogelijkheid dit verder te vergroten).

Door middel van elektroextractie kunnen analieten snel naar een klein volume worden geëxtraheerd. Hierdoor kan de hoeveelheid analiet die geïnjecteerd wordt in een analytisch scheidingssysteem vergroot worden zonder dat het geïnjecteerde monstervolume vergroot wordt. Het vergroten van het geïnjecteerde monstervolume om lagere detectielimieten te verkrijgen is vaak ongewenst, omdat, samen met de analieten, ook grote hoeveelheden vervuilingen geïnjecteerd worden.

Elektroextractie biedt ook selectiviteit omdat in hetzelfde experiment óf kationen óf anionen worden geëxtraheerd, terwijl neutrale componenten grotendeels achterblijven omdat zij slechts door middel van diffusie naar de acceptorfase migreren.

Om een elektroextractie uit te voeren moeten de analieten opgelost zijn in een (organische) donorfase met lage geleidbaarheid, die niet mengt met een (waterige) acceptorfase met hoge geleidbaarheid. Als een hoog voltage over dit vloeistof-vloeistof systeem wordt aangelegd, zal

er een zeer hoge veldsterkte over de donorfase en een zeer lage veldsterkte over de acceptorfase ontstaan. Het gevolg hiervan is dat ionen die zich in de donorfase bevinden zeer snel naar de acceptorfase zullen migreren. Door de lage elektrische veldsterkte in de acceptorfase zal de migratiesnelheid van de ionen, zodra ze deze fase intreden, zeer sterk dalen. Dit heeft tot gevolg dat deze ionen, zodra ze het grensvlak tussen donor- en acceptorfase gepasseerd zijn, sterk geconcentreerd worden.

In dit proefschrift worden twee succesvolle on-line opstellingen gepresenteerd die elektroextractie koppelen aan vloeistofchromatografie en massaspectrometrie: capillaire elektroextractie (**Hoofdstuk 3**) en groot-volume capillaire elektroextractie (**Hoofdstuk 4 en 5**). De belangrijkste verschillen tussen beide opstellingen liggen in de positionering van de vloeistoffases en het extractievolume.

In capillaire elektroextractie (**Hoofdstuk 3**) bevinden de waterige acceptorfase zich in een capillair en de organische donorfase in een monstervaatje. Het ene uiteinde van het capillair bevindt zich in de organische fase, het andere uiteinde is geaard. Daarnaast bevindt zich ook een elektrode in de organische fase. Zodra een elektrisch veld werd aangelegd, migreerden de ionen vanuit de organische donorfase de waterige acceptorfase in om daar geconcentreerd te worden. Op deze manier konden alle analieten uit ongeveer 10 μL organische fase geëxtraheerd worden. De aldus verzamelde analietenzone werd via een schakelkraan geïnjecteerd in een vloeistofchromatografie-massaspectrometrie systeem. Directe vergelijking met een conventionele injectie in een dergelijk systeem liet zien dat de peptiden ongeveer 100 keer verrijkt konden worden met behulp van elektroextractie en dat dus de belaaubarheid van vloeistofchromatografie met deze factor vergroot was. Experimenten met urinemonsters resulteerden in de constatering dat elektroextractie geschikt is voor de extractie van peptiden uit complexe biologische monsters.

In **Hoofdstuk 4 en 5** werd het systeem verder verbeterd zodat grotere volumes organische donorfase geëxtraheerd konden worden. Door het extractievolume te vergroten van 10 μL naar 100 μL kon meer verrijking en daardoor dus betere detectielimieten bereikt worden. Ook kon de herhaalbaarheid van elektroextractie verbeterd worden. Deze verbeteringen werden bewerkstelligd door de elektroextractie te laten plaatsvinden in een capillair met grote diameter waarin het te extraheren volume organische fase geïnjecteerd werd. In dit capillair vond elektroextractie vanuit een goed gedefinieerd volume donorfase plaats, resulterend in verrijkingfactoren van peptiden van rond de 1000. Met deze opstelling zijn peptiden en metabolietensporen in zowel bloedplasma als urine bepaald.

Groot-volume elektroextractie kan goed worden gecombineerd worden met vaste-stof-extractie. Gewoonlijk wordt het eluens dat de analieten bevat na vaste-stof-extractie gevriesdroogd en heropgelost voordat het in een vloeistofchromatografiesysteem geïnjecteerd kan worden. Zowel het vriesdrogen als het heroplossen zijn bewerkelijke stappen, die bovendien experimentele fouten in de analyse introduceren en verlies van analiet opleveren. In dit proefschrift wordt gedemonstreerd dat deze stappen weg gelaten kunnen worden door het eluens te vermengen met een geschikte donorfase zodat er direct elektroextractie kan worden uitgevoerd. Het valt te voorzien dat een volledig gesloten analytisch systeem ontwikkeld zal worden, waarin vaste-stof-extractie via elektroextractie gekoppeld is aan vloeistofchromatografie met massaspectrometrische detectie. In zo'n systeem zullen experimentele fouten tot een minimum beperkt zijn, evenals het verlies van analiet. Daarnaast zal de gebruiker na het inladen van de monsters geen bemoeienis meer hoeven te hebben met de analyse. Om vaste-stof-extractie direct on-line met elektroextractie te koppelen moet het eluens dat gebruikt wordt om de analieten van de extractiekolom te elueren ook geschikt zijn om te dienen als organische donorfase in elektroextractie te dienen.

In **Hoofdstuk 5** wordt de combinatie van elektroextractie met capillaire zone elektroforese gedemonstreerd veelbelovend te zijn. De on-line koppeling van elektroextractie met capillaire zone elektroforese is aantrekkelijk, omdat elektroextractie een belangrijke beperking van capillaire zone elektroforese, namelijk de lage belaadbaarheid ervan, kan verhelpen. Om elektroextractie on-line te koppelen zou bijvoorbeeld een daartoe speciaal geschikte schakelkraan ontwikkeld kunnen worden.

Samenvattend kan gesteld worden dat we in dit proefschrift, aan de hand van capillaire isotachoforese en elektroextractie, gedemonstreerd hebben dat de toepassing van op elektromigratie gebaseerde monstervoorbewerkingstechnieken in de bioanalyse grote potentie heeft. Het ligt in de lijn der verwachting dat zulke technieken in de nabije toekomst meer toegepast gaan worden in analytische instrumentatie. Van zowel capillaire isotachoforese als van elektroextractie kan verwacht worden dat zij de kennis van de in biologische monsters aanwezige peptiden en metabolieten zal vergroten, wat kan resulteren in de ontdekking van nieuwe biomarkers. Om deze redenen hebben capillaire isotachoforese en elektroextractie grote kans om nieuwe toevoegingen aan het repertoire van de moderne analytisch chemicus te worden.

