



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Gas chromatography mass spectrometry: key technology in metabolomics

Koek, Maud Marijtje

Citation

Koek, M. M. (2009, November 10). *Gas chromatography mass spectrometry: key technology in metabolomics*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14328>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14328>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Het doel van metabolomics is de kwantitatieve en kwalitatieve analyse van de alle metabolieten in cellen, lichaamsvloeistoffen en weefsels. Gas chromatografie gekoppeld met massaspectrometrie (GC-MS) is zeer geschikt voor metabolomics analyse, vanwege de combinatie van een hoge scheidingsefficiëntie met selectieve en gevoelige massa detectie. Dit promotieonderzoek is gewijd aan de ontwikkeling van betrouwbare kwantitatieve GC-MS methoden voor metabolomics analyse. Een algemene inleiding in het onderwerp is beschreven in Hoofdstuk 1.

In Hoofdstuk 2 worden de uitdagingen in metabolomics analyse behandeld en worden aanbevelingen gedaan op het gebied van methode optimalisatie, validatie en kwaliteitscontrole. Tevens is onderzocht welke validatie- en dataverwerkingsmethoden voor GC(-MS) metabolomics analyse zijn omschreven in de huidige vakliteratuur. Bovendien wordt een perspectief gegeven over noodzakelijk onderzoek om betrouwbare kwantitatieve gegevens te verkrijgen uit GC-MS data.

In Hoofdstuk 3 is de ontwikkeling en validatie van een GC-MS methode omschreven. Deze methode bestaat uit een derivatisering met een oximeringsreagens gevolgd door een silylering, waarna een GC-MS analyse wordt uitgevoerd. De methode is opgezet voor microbiële metabolomics, maar is ook met succes toegepast in metabolomics studies met andere monsters, zoals humane of dierlijke studies (bloedplasma en serum, urine en weefsels) en planten studies. Ondanks het generieke karakter van de methode en de complexe microbiële matrices, voldeden de analytische prestatiekenmerken, voor de meeste metabolieten, aan de eisen ten aanzien van targetanalyse in biologische monsters (FDA richtlijnen).

De prestatiekenmerken van de methode voor verschillende metabolieten is afhankelijk van hun fysisch-chemische eigenschappen. Tijdens de ontwikkeling van de GC-MS methode (Hoofdstuk 3) zijn drie prestatieklassen gedefinieerd. In Hoofdstuk 4 zijn de prestatiekenmerken voor de verschillende klassen verder onderzocht, om de meest kritische parameters voor de prestatie van de methode te definiëren. Behalve de fysisch-chemische eigenschappen, zijn de monstersamenstelling en de inertie van het analytische systeem het meest bepalend voor de prestatiekenmerken van de methode. Verschillende aanbevelingen om de herhaalbaarheid van de analyse te verbeteren worden genoemd en gedemonstreerd.

Tweedimensionale gaschromatografie (GC×GC) heeft verscheidene voordelen ten opzichte van eendimensionale gaschromatografie, met name een hogere piekcapaciteit, een groter dynamisch bereik en lagere detectiegrenzen. In Hoofdstuk 5 worden de ontwikkeling en de prestatiekenmerken van een non-target GC×GC-MS methode voor metabolomics analyse omschreven. Bij GC×GC technieken worden gewoonlijk tweede dimensie kolommen met een smalle diameter en dunne stationaire fase laag gebruikt. Bij deze methode is gebruik gemaakt van een tweede dimensie kolom met een bredere

diameter met een dikkere stationaire fase film, om de belaadbaarheid en inertheid van het analytische systeem te verbeteren. Dit maakt de ontwikkelde methode zeer geschikt voor het meten van metabolomics studies, aangezien daar vaak grote concentratieverschillen in of tussen monsters bestaan.

Dataverwerking van GC×GC-MS data is nog steeds een grote uitdaging vanwege de complexiteit van metabolomics monsters, en vooral omdat alle metabolieten van belang zijn en gekwantificeerd moeten worden. In Hoofdstuk 6 zijn de mogelijkheden en beperkingen van commercieel verkrijgbare software voor GC×GC-MS dataverwerking onderzocht. Om de software te testen werd een set van muizenlevers gemeten met GC×GC-MS en met GC-MS en werden de resultaten van beide methoden vergeleken. De monsters waren een onderdeel van een grotere studie naar het ontstaan en de progressie van diabetes type 2. De meerwaarde van GC×GC-MS kon duidelijk worden aangetoond. Ondanks de wat hogere RSDs in GC×GC-MS ten opzichte van GC-MS bleef de biologische informatie in de data behouden. Bovendien werden met GC×GC-MS additionele mogelijke biomarkers voor het ontstaan van diabetes type 2 gevonden. Daarnaast, konden meer dan vier keer zoveel metabolieten worden gekwantificeerd met de GC×GC-MS methode en de hogere piekcapaciteit resulteerde in 'schonere' massa spectra, waardoor de identificatie van metabolieten makkelijker is. De ontwikkelde eendimensionale- (Hoofdstuk 3) en tweedimensionale gaschromatografische methoden (Hoofdstuk 5) zijn beide zeer geschikt voor metabolomics analyse wanneer voldoende materiaal beschikbaar is. Voor de monsteropwerking is ongeveer 50-100 µL celextract of lichaamsvloeistof nodig en 5-10 mg weefsel. Maar in sommige gevallen zijn deze hoeveelheden monster niet beschikbaar. Bijvoorbeeld in studies met kleine proefdieren kunnen de hoeveelheden monster zeer beperkt zijn. Daarnaast groeit de interesse om verschillen in metaboliet concentraties op het niveau van individuele cellen te kunnen meten, wat een enorme uitdaging is voor analytisch chemici. In Hoofdstuk 7 staan de ontwikkeling en prestatiekenmerken van een GC-MS methode omschreven, waarbij gebruik is gemaakt van een derivatisering in de injectieliner. De methode is geschikt voor metabolomics analyse in extreem kleine monstervolumes variërend van 10 nL tot een aantal µL. Met de methode konden de eerste uitgebreide GC-MS metaboliet profielen worden gemeten van gedeeltes van de intracellulaire inhoud van één enkele *Xenopus laevis* cel. In Hoofdstuk 8 staan algemene conclusies en perspectieven voor toekomstig onderzoek beschreven.