



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Miniaturized metabolomics methods for enabling the study of biomass-restricted samples

He, B.

Citation

He, B. (2025, May 1). *Miniaturized metabolomics methods for enabling the study of biomass-restricted samples*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4239100>

Version: 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/1887/4239100>

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

Samenvatting

Massaspectrometrie (MS)-gebaseerde analytische methoden worden veel gebruikt in zowel academisch als farmaceutisch onderzoek en bieden cruciale inzichten in biologische en ziekteprocessen. Ondanks hun hoge gevoeligheid en doorvoersnelheid ondervinden conventionele MS-methoden aanzienlijke uitdagingen bij de analyse van volume/materiaal-gelimiteerde biologische monsters. Het samenvoegen van dergelijke monsters om detectielimieten te bereiken gaat ten koste van de heterogeniteit van de steekproef, een essentiële factor in metabolomics en gepersonaliseerde geneeskunde. Bovendien leveren niet-invasieve bemonsteringstechnieken slechts picoliters tot microliters monstervolume op, wat leidt tot een mismatch tussen de beschikbare monstervolumes en de mogelijkheden van standaard analytische methoden.

Om deze uitdagingen aan te pakken, onderzoekt dit proefschrift geminiaturiseerde analytische technieken die de gevoeligheid en prestaties verbeteren zonder de robuustheid in gevaar te brengen. Door micro-flow vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (micro-LC-MS) en sheathless capillaire elektroforese-massaspectrometrie (CE-MS) te optimaliseren, worden analytische workflows aangepast aan specifieke metabolietklassen op basis van hun fysisch-chemische eigenschappen. Micro-LC-MS wordt gebruikt voor de analyse van lipiden, terwijl sheathless CE-MS wordt toegepast op polaire en geladen metabolieten, zoals aminozuren. Deze methoden worden gevalideerd en toegepast op verschillende materiaal-gelimiteerde biologische monsters, waarmee hun bruikbaarheid voor biologisch en klinisch onderzoek wordt aangetoond.

Hoofdstuk 1 beschrijft de beperkingen van conventionele MS-methoden voor de analyse van materiaal-gelimiteerde monsters en introduceert geminiaturiseerde MS-workflows als oplossing. Daarnaast wordt ingegaan op de opzet en doelstellingen van het proefschrift.

Hoofdstuk 2 biedt een kritische bespreking van microschaal analytische technieken, met de nadruk op hun relevantie voor metabolomics en de analyse van kleine biologische monstervolumes. Recente ontwikkelingen op het gebied van micro-LC-MS, nano-LC-MS en CE-MS worden besproken, waarbij de nadruk ligt op hun gevoeligheid, robuustheid en toepasbaarheid. Hoewel deze geminiaturiseerde methoden veelbelovend zijn, is verdere optimalisatie van bemonstering en monstervoorbereiding noodzakelijk om hun volledige

potentieel te benutten. Ook wordt het belang van systeemcomponenten—zoals low-flow LC en geoptimaliseerde MS-ionisatiebronnen—benadrukt, die speciaal zijn ontworpen voor minimale monstervolumes.

Endocannabinoïden spelen een cruciale rol in hersenfunctie en pathologie, maar hun analyse in biomassa-beperkte monsters, zoals humaan hersenvocht (cerebrospinal fluid, CSF), blijft een uitdaging. Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling van een micro-LC-MS workflow voor de selectieve en gevoelige bepaling van endocannabinoïden en hun analogen in CSF. Een aangepaste micro-elektrospray ionisatie (micro-ESI) spraynaald (Shimadzu Mikros) werd gebruikt om de gevoeligheid en duurzaamheid te verbeteren. De ontwikkelde methode maakte de analyse van 288 CSF-monsters mogelijk en bood waardevolle inzichten in de klinische studie van endocannabinoïde-profielen, terwijl de analytische robuustheid behouden bleef.

Hoofdstuk 4 onderzoekt de toepassing van micro-LC-MS voor de analyse van oxylipinen, een klasse bioactieve lipiden, in humaan plasma. In tegenstelling tot endocannabinoïden vereisen oxylipinen negatieve ionisatiemodus voor optimale analyse, wat vaak wordt beïnvloed door ontladingsproblemen bij de ionisatie. Deze uitdagingen werden aangepakt met behulp van een OptiFlow-ionisatiebron, wat resulteerde in een superieure gevoeligheid en robuustheid voor de analyse van oxylipinen in slechts 5 µL plasma. De ontwikkelde methode werd gevalideerd en vergeleken met conventionele UHPLC-MS, waarbij aanzienlijke verbeteringen in gevoeligheid werden aangetoond. De workflow werd vervolgens toegepast op 40 plasma-monsters uit een studie over gezond ouder worden, waarmee de toepasbaarheid in biomarker en klinisch onderzoek werd aangetoond.

Geminiaturiseerde analytische methoden zijn niet beperkt tot hydrofobe verbindingen die via LC-MS worden geanalyseerd. Hoofdstuk 5 richt zich op de ontwikkeling van een sheathless CE-MS workflow voor polaire en geladen verbindingen, met een specifieke focus op de kwantificering van creatinine in resterende pediatrische plasma-monsters. CE-MS is bijzonder geschikt voor volume-gelimiteerde monsters vanwege het ontbreken van dode volumes en de hoge ionisatie-efficiëntie. De sheathless CE-MS methode toonde een hoge gevoeligheid en betrouwbaarheid aan, waardoor creatinine kon worden gekwantificeerd met slechts 5 µL plasma. Een multi-segment injectiestrategie werd

toegepast, waardoor zeven monsters in één elektroforetische run konden worden geanalyseerd. De resultaten correleerden goed met klinische metingen, en naast creatinine werden ook andere endogene metabolieten geïdentificeerd, wat daarmee de potentie van deze methode aantoonde om bruikbare metabole profielen te genereren in volume-gelimiteerde klinische monsters.

Het laatste hoofdstuk vat de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samen en benadrukt de veelbelovende toekomst van geminiaturiseerde MS-gebaseerde analytische methoden voor het oplossen van complexe biologische en farmaceutische vraagstukken in biomassa-beperkte monsters. Door de integratie van geavanceerde microsamplingsapparaten, efficiënte monsterverwerkingstechnieken en robuuste geminiaturiseerde analytische instrumenten kunnen waardevolle biologische inzichten worden verkregen uit minimale monstervolumes, wat de weg vrijmaakt voor nieuwe vooruitgangen in klinisch en metabolomics onderzoek.