

# In-vivo-Festphasen-Mikroextraktion in der Metabolomik: Möglichkeiten zur direkten Erforschung biologischer Systeme

Dajana Vuckovic, Sanja Risticvic und Janusz Pawliszyn\*

Gaschromatographie · In-vivo-Probennahme ·  
Flüssigkeitschromatographie · Metabolomik

**D**ie Probenpräparation hat einen großen Einfluss auf die Qualität von Metabolomikstudien. Der Einsatz der Festphasen-Mikroextraktion (SPME), besonders in Form ihrer In-vivo-Variante, ermöglicht die Erfassung eines repräsentativeren Metaboloms und bietet die Möglichkeit, seltene, kurzlebige Metaboliten und/oder instabile Substanzen zu detektieren, die von traditionellen Methoden nicht leicht erfasst werden. Diese Technik eignet sich ideal sowohl für zeitliche, räumliche und longitudinale Studien des gleichen lebenden Systems als auch für Multikompartimentstudien desselben Organismus. SPME ist für die Untersuchungen von biologischen Systemen geeignet, die in ihrer Komplexität zwischen Zellen und Säugetiergewebe liegen. Dieser Kurzaufsatz präsentiert ausgewählte Beispiele, um diese neue Technik in den Kontext der konventionellen Probenpräparationsmethoden für die Metabolomik einzuordnen.

## 1. Einführung in die Festphasen-Mikroextraktion

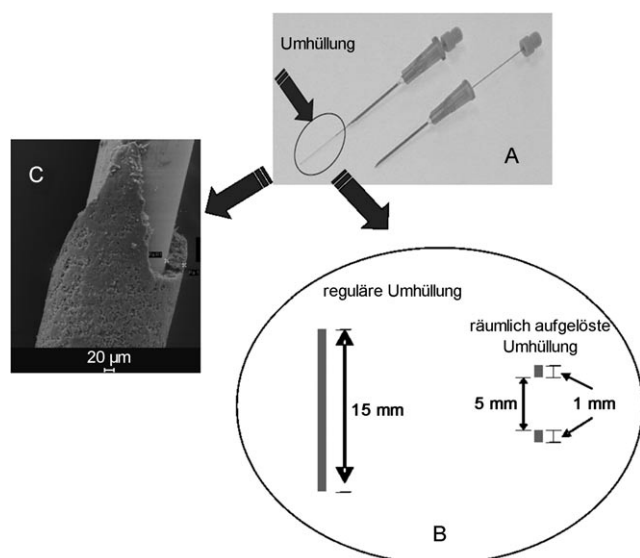
Die Festphasen-Mikroextraktion (SPME) ist ein umweltfreundliches Verfahren zur Probenpräparation, das die Probennahme, die Analytextraktion und das Einbringen der Probe in einem einzigen Schritt kombiniert, während es den Einsatz von Lösungsmitteln minimiert oder vollständig vermeidet.<sup>[1]</sup> SPME ermöglicht eine lösungsmittelfreie Extraktion mithilfe einer Faser aus Quarzglas oder rostfreiem Stahl, die mit einem dünnen Polymerfilm umhüllt ist, der als Sorbens/Lösungsmittel während der Extraktion der Komponenten fungiert (Abbildung 1). Das Verhältnis des Extraktionsphasenvolumens zum Probenvolumen ist sehr klein, sodass üblicherweise kein vollständiges Ablösen des Analyten von der Probe erreicht wird. Beeinflusst wird die Menge des extrahierten Analyten durch den Distributionskoeffizienten des Analyten zwischen SPME-Umhüllung und Probenmatrix, sofern das Gleichgewicht erreicht wird [Gl. (1)], oder durch

die Massentransferrate (definiert durch den Diffusionskoeffizienten und durch die Konvektions-/Bewegungsbedingungen), falls eine kurze Probennahmezeit vorliegt. In Gleichung (1) ist  $n_e$  der Gehalt des beim Gleichgewicht extrahierten Analyten,  $K_{fs}$  die Verteilungskonstante des Analyten zwischen der Faserumhüllung und der Probe,  $V_s$  das Probenvolumen,  $V_f$  das Volumen der Extraktionsphase, die auf der Faser immobilisiert ist, und  $C_0$  ist die Anfangskonzentration des Analyten.

$$n_e = \frac{K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s} C_0 \quad (1)$$

Zwar wurde die SPME zunächst als nachhaltige und einfache Alternative zur Prüfung auf organische Verschmutzungen in wässrigen, gasförmigen und festen Umweltproben entwickelt, allerdings wurde der Einsatzbereich dieser Technik schnell auf viele andere Gebiete ausgeweitet, wie Nahrungsmittel-, pharmazeutische, forensische, toxikologische, biologische und klinische Analysen. Im Ergebnis überstieg die Zahl der Literaturbeiträge über SPME als analytische Methode für verschiedene (sowohl qualitative als auch quantitative) Anwendungen im letzten Jahrzehnt die Zahl von 5000, ein Indiz für eine ausgereifte und gut verstandene Technik. Der Schwerpunkt dieses Kurzaufsatzes besteht darin, die neuen Möglichkeiten für den Einsatz der SPME auf dem Gebiet der Metabolomik<sup>[2]</sup> zu diskutieren und die Fähigkeit dieser Technik aufzuzeigen, nützliche Informationen

[\*] Dr. D. Vuckovic, S. Risticvic, Prof. J. Pawliszyn  
Department of Chemistry, University of Waterloo  
200 University Avenue West, Waterloo, ON, N2L 3G1 (Kanada)  
Fax: (+1) 519-746-0435  
E-Mail: janusz@uwaterloo.ca



**Abbildung 1.** Aufbau eines nadelbasierten SPME-Apparats. A) Photo eines Prototypapparats, gezeigt mit exponierter und zurückgezogener Hülle. B) Schema einer regulären (15 mm Hüllenslänge) und einer räumlich aufgelösten Hülle (zwei Segmente von je 1 mm Länge). C) Rasterelektronenmikroskopiebild einer SPME-Umhüllung, die die Bedeckung des Sorbens mit einer biokompatiblen Beschichtung zeigt.

zu liefern, die durch herkömmliche Methoden nicht einfach zu erhalten sind.

## 2. In-vivo-SPME für die Metabolomik

Die Wahl der Methode zur Probenpräparation spielt eine äußerst wichtige Rolle in Metabolomikstudien, weil sie sowohl den Metabolitgehalt als auch die Datenqualität beeinflusst.<sup>[3–5]</sup> Zum Beispiel zeigten Canelas et al., dass sogar die relative Menge der Metaboliten (Up- oder Down-Regulierung beim Vergleich zweier vorgegebener Bedingungen) wegen der gewählten Probenpräparationsmethode verfälscht werden und so zu irreführenden Ergebnissen führen könnte.<sup>[6]</sup> Eine ideale Probenpräparation für die Metabolomikanalyse biologischer Proben mithilfe von GC-MS oder LC-MS sollte

- 1) einfach und schnell erfolgen, um den Verlust und/oder eine Zersetzung von Metaboliten während der Probenpräparation zu vermeiden und um einen hohen Durchsatz zu ermöglichen,
- 2) einen Metabolismus-Quenching-Schritt enthalten, um die chemische Identität des Metaboliten zu bewahren,
- 3) reproduzierbar sein und eine geeignete Solubilisierung des Metaboliten ermöglichen,
- 4) nicht selektiv sein.

Zuerst diskutieren wir kurz theoretische und experimentelle Ansätze zur Durchführung einer In-vivo-SPME (Abschnitt 2.2 und 2.3), um zu zeigen, dass dieser einfache und schnelle Ansatz Probennahme, Metabolismus-Quenching und Probenpräparation in einem einzigen Schritt vereint und damit die ersten beiden Voraussetzungen einer idealen Metabolomikmethode erfüllt. In Abschnitt 3 diskutieren wir die



Dajana Vuckovic promovierte 2010 in analytischer Chemie an der University of Waterloo (Kanada) bei Prof. Pawliszyn. Ihre Forschungen befassen sich hauptsächlich mit der Entwicklung von In-vivo-SPME für die Metabolomik wie auch mit der Entwicklung von Hochdurchsatzprozessen auf Massenspektrometriebasis für die Erforschung von Biomarkern, die chemische Proteomik und Bioanalysen.



Sanja Ristic ist Doktorandin in Prof. Pawliszyns Arbeitsgruppe an der University of Waterloo, wo sie auf dem Gebiet der Analytik von Nahrungsmitteln und komplexen Proben forscht. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit wendet sie nichtinvasive Probenpräparation in Kombination mit hochauflösender Gaschromatographie auf das metabolische Profiling von pflanzenbasierten Nahrungsmitteln an.



Janusz Pawliszyn ist Professor für analytische Chemie an der University of Waterloo (Kanada). Er hat über 400 wissenschaftliche Artikel geschrieben und erfand die SPME. Zurzeit hat er den Canada Research Chair and NSERC Industrial Research Chair in New Analytical Methods and Technologies inne. Der Schwerpunkt seines Forschungsprogramms ist die Entfernung von organischen Lösungsmitteln aus der Probenpräparation, um eine direkte Verfolgung und In-vivo-Analysen zu ermöglichen.

Erfassung der Metaboliten, die durch In-vivo-SPME erreicht werden kann, und die Auswahl der passenden Hülle, die die Selektivität der SPME-Methode verringert oder erhöht, um den Anforderungen der jeweiligen Anwendung gerecht zu werden. Im Abschnitt 5 diskutieren wir die Reproduzierbarkeit der Technik und zeigen, dass sie zufriedenstellend für Metabolomikstudien ist.

### 2.1. Warum über In-Vivo-Probennahme während der Experimentplanung nachdenken?

Die meiste Forschung über biologische Systeme erfolgt derzeit mit In-vitro-Methoden, man muss dabei aber beachten, dass die Unterschiede in der Probenzusammensetzung groß sein können, wenn man die Proben aus ihrer natürlichen biologischen Umgebung entfernt, wodurch sie Prozessen wie Oxidation und enzymatischer Zersetzung ausgesetzt sind. Beispielsweise ist die Zusammensetzung von flüchtigen Emissionen, die aus abgetrennten oder beschädigten Pflanzenteilen gewonnen werden, signifikant verschieden von den flüchtigen Emissionen, die aus lebenden, unbeschädigten und ungestörten Exemplaren gesammelt werden; daher mögen In-vitro-Anwendungen je nach Zielsetzung einer bestimmten Studie ungeeignet sein.<sup>[7]</sup> Im Zusammenhang mit dem Sam-

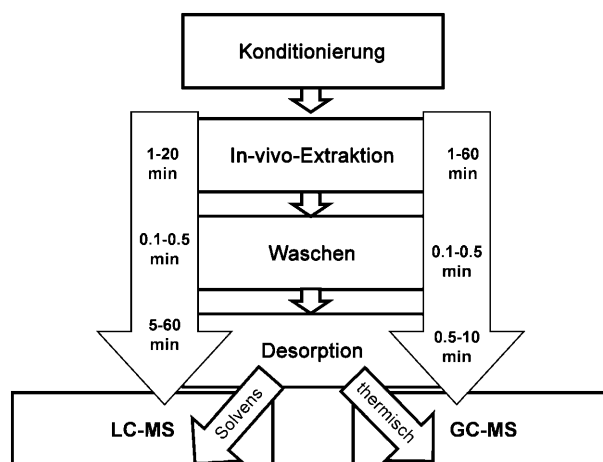
meln repräsentativer Metabolome pflanzlicher Systeme wurde berichtet, dass sogar das Ernten (das Abtrennen des zu untersuchenden Materials von der Ursprungspflanze) sehr schnell erfolgen sollte und von einem augenblicklichen Einfrieren in flüssigem Stickstoff gefolgt sein sollte, um labile Metaboliten zu stabilisieren und um Änderungen im Metabolom zu vermeiden, die durch enzymatische Reaktionen wegen der Handhabung und Verletzung der Pflanzen hervorgerufen werden.<sup>[8]</sup> Die In-vivo-Forschung, mit einer minimalen Störung des Systems während der Studie, ermöglicht außerdem das Aufzeichnen von dynamischen Prozessen, die im selben biologischen System erfolgen, z.B. die Duftentwicklung in einer Blume, die Ausschüttung von Pheromonen oder die Krankheitsentwicklung in einem Tier. Daher kann die Verfügbarkeit von geeigneten In-vivo-Methoden eine wichtige Rolle während der Experimentplanung spielen, um die Sammlung von hochwertigen Informationen für eine darauffolgende biologische Interpretation zu gewährleisten.

## 2.2. Theoretische Grundlage für die In-vivo-Probennahme mit SPME

SPME kann bei der In-vivo-Probennahme angewendet werden, weil der Gehalt an extrahiertem Analyt unter den Bedingungen eines vernachlässigbaren Substanzschwunds unabhängig vom Probenvolumen ist.<sup>[1]</sup> Im Zusammenhang mit Gleichung (1) werden die Bedingungen eines vernachlässigbaren Schwunds erreicht, wenn das Probenvolumen viel größer ist als das Produkt von Verteilungskoeffizient und Faservolumen ( $V_s \gg K_{fs}V_f$ ). Deshalb kann SPME auch für die Probennahme von verschiedenen lebenden Systemen zum Einsatz kommen, ohne die Notwendigkeit, ein definiertes Probenvolumen zu isolieren und zugleich die Fähigkeit zur quantitativen Analyse zu bewahren.

## 2.3. Experimenteller Ansatz

Die wichtigsten Schritte eines In-vivo-SPME-Arbeitsablaufs sind 1) die Extraktion der Analyten aus der Probe in die SPME-Umhüllung und 2) das Entfernen der Analyten vom Gerät durch thermische Desorption bei GC-Anwendungen oder durch Lösungsmitteldesorption bei LC-Anwendungen. Abbildung 2 illustriert den Arbeitsablauf der In-vivo-SPME. Der gesamte Ablauf erfordert kaum Zeit, nur wenige Schritte und minimalen Umgang mit den Proben. Diese Tatsache kann während der Probennahme/-präparation Metabolitverluste effizient minimieren und auch die Entstehung von Artefakten, die von der Probenaufbereitung, -extraktion oder -lagerung herrühren, unterbinden. Zusätzlich kann der Desorptionsschritt direkt mit LC-MS- oder GC-MS-Analysen gekoppelt werden, indem die Probe thermisch im GC-Injektionskanal – oder bei LC-Anwendungen im Fluss der mobilen Phase – von der Faser desorbiert wird. Auf diese Weise kann man während der Probenaufbereitung völlig ohne Glas- oder Plastikgeräte auskommen, und außerdem werden mögliche Kontaminationen und/oder Adsorptionsverluste der Analyten verringert. Der Extraktionsprozess kann entweder im



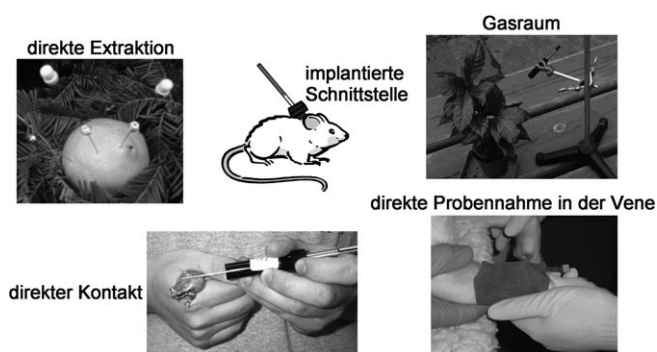
**Abbildung 2.** Gesamter Arbeitsablauf der In-vivo-SPME in Kombination mit LC-MS und GC-MS.

Gasraummodus oder im Modus für direkte Extraktion durchgeführt werden, je nach Flüchtigkeit der Analyten. Die In-vivo-SPME wurde bereits erfolgreich auf verschiedene biologische Systeme angewendet, darunter Mikroorganismen, Pflanzen, Nahrungsmittel auf pflanzlicher Basis, Tiere, Insekten und menschliche Absonderungen (Tabelle 1). Bei-

**Tabelle 1:** Probennahmestrategien in verschiedenen biologischen Systemen unter Verwendung von In-vivo-SPME.

SPME-Methode	lebendes System	biologische Matrix	Lit.
direkte Extraktion	Hunde	Blut	[14–17]
direkte Extraktion	Ratten	Blut	[18]
direkte Extraktion	Mäuse	Blut	[19]
direkte Extraktion	Fische	Muskel, Fettgewebe	[20–22]
direkte Extraktion	Pflanzen	Stamm, Blatt, Blumenzwiebel	[23–25]
Gasraum	Pflanzen	flüchtige Emissionen	[26, 27]
Gasraum	Zellkulturen	flüchtige Emissionen	[28–30]
Gasraum	Mensch	Atemluft	[31]
Gasraum	Insekten	flüchtige Emissionen	[32–34]

spielsweise kann die SPME-Faser direkt im Gasraum einer Zellkultur oder einer Pflanze eingesetzt werden, um flüchtige Emissionen zu untersuchen (Abbildung 3). Zusätzlich können Metabolit-Fingerprinting und -Profiling erreicht werden, indem die SPME-Umhüllung direkt ganzen Früchten ausgesetzt wird; dieser Ansatz könnte eine vielversprechende Alternative auf dem schnell wachsenden Gebiet der Nahrungsmittel-Metabolomik sein.<sup>[9]</sup> Bei Tierstudien kann SPME nicht nur dazu verwendet werden, flüchtige Emissionen einzufangen, sondern auch, um direkt Proben aus zirkulierendem Blut zu entnehmen (in großen Blutadern direkt mithilfe eines Katheters oder in kleinen Blutadern von Mäusen und Ratten mit einem speziell entwickelten Adapter) oder sogar Gewebe von Muskeln, Fett, Gehirn und Leber zu untersuchen. Ein kürzlich erschienener Übersichtsartikel beschreibt im Detail verschiedene Ansätze zur Probennahme und Überlegungen bei der Methodenentwicklung.<sup>[10]</sup>



**Abbildung 3.** Beispiele für experimentelle Ansätze zur Probennahme mit In-vivo-SPME.

Am bedeutendsten für die direkte Extraktion ist die Tatsache, dass der In-vivo-SPME-Apparat speziell dafür entwickelt wurde, Nebenwirkungen in lebenden Systemen zu vermeiden. Dies wird dadurch erreicht, dass eine Schicht eines biokompatiblen Polymers (wie Polyethylenglycol oder Polyacrylnitril) auf das Äußere der Hülle aufgebracht wird. Diese biokompatible Schicht minimiert die Oberflächenadhäsion von Biomolekülen, die die Aufnahme des Analyten in die Beschichtung beeinflussen kann, sowie mögliche toxische Wirkungen oder Nebenreaktionen, wie die Gerinnung auf der Hüllenoberfläche. Abbildung 1 A zeigt eine SPME-Faser mit einer biokompatiblen Beschichtung, die in einer kommerziellen Nadel untergebracht ist, und Abbildung 1 C zeigt das rasterelektronenmikroskopische Bild einer Faser, um die Bedeckung mit dem biokompatiblen Polymer zu illustrieren. Diese Geräte dienen in erster Linie LC-Anwendungen; sie sind kostengünstig, geeignet für einmaligen Gebrauch und sind jetzt kommerziell erhältlich. Im Unterschied zu diesen Geräten sind käufliche Mischpolymer/SPME-Fasern für die GC, die für In-vivo-Probennahmen angewendet werden können, nicht biokompatibel, d.h., dass mehrere direkte Extraktionen innerhalb eines biologischen Systems, bei denen die gleiche Hülle verwendet wird, zu Fäulnis der Extraktionsphase führen können.<sup>[11]</sup> Die Adsorption der störenden, schweren, nichtflüchtigen Makromoleküle an die Oberflächenumhüllung verändert die chemischen Eigenschaften der Extraktionsphase und führt eventuell zu einer Abnahme der Probenreproduzierbarkeit, Extraktionseffizienz und Lebensdauer der Faserumhüllung.<sup>[12]</sup> Möglichkeiten zur Vermeidung des Faulens der Extraktionsphase bei GC-Metabolomikstudien sind, eine Gasbarriere zwischen der Probenmatrix und der Faserumhüllung (Gasraumextraktionsmodus) einzurichten oder die Proben zu verdünnen.<sup>[13]</sup> Da keine dieser Alternativen mit direkter In-vivo-Extraktion der Metaboliten aus biologischen Systemen kompatibel ist, besteht die bis heute praktischste Lösung allerdings aus einem Waschschriff in Wasser sofort nach der Extraktion, woraufhin sich eine thermische Desorption anschließt. Die Einführung eines Waschschriffes mag nicht nur die Fäulnis der Extraktionsphase minimieren, sondern auch die Bildung von Artefakten im Injektionskanal und die Bildung nichtcharakteristischer chromatographischer Profile. Zum Beispiel berichteten Verhoeven et al. im Zuge einer Analyse von flüchtigen und halbflüchtigen Metaboliten intakter Erdbeeren, dass die

Einführung eines Waschschriffes die Entstehung von Artefakten (hauptsächlich Maillard-Produkten aus auf der Oberfläche der Extraktionsphase adsorbierten Kohlenhydraten und Aminosäuren) während der thermischen Desorption signifikant verminderte.<sup>[9]</sup>

Aus Sicht der Metabolomik spielt die SPME-Umhüllung eine andere wichtige Rolle: Niedermolekulare Verbindungen können durch die äußere, biokompatible Schicht diffundieren und in die sorbierenden Poren eindringen, nicht aber große Biomoleküle. Dies bedeutet, dass eine Metabolitfraktion, sobald sie in die Umhüllung eingedrungen ist, vor weiteren enzymatischen Reaktionen geschützt ist, wodurch die Erfassung von kurzlebigen und labilen Spezies sichergestellt ist.

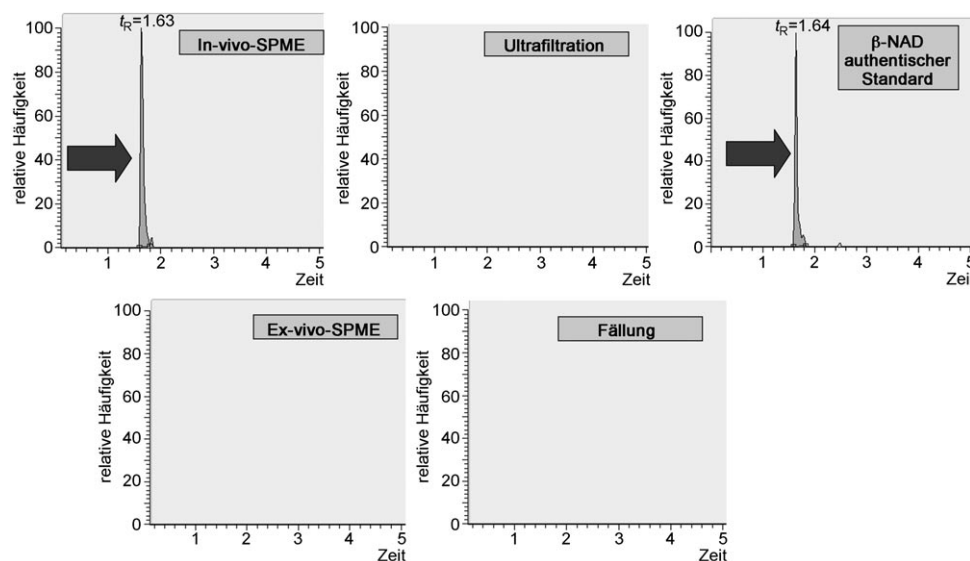
### 3. Erfassung von Metaboliten durch SPME

Bekannte Prozeduren zur Probenaufbereitung für ungerichtete Metabolomikstudien in verschiedenen Matrices wurden in neueren Berichten systematisch beurteilt, aber die oft nicht gestellte Frage ist, wie gut das Metabolom zum Zeitpunkt der Analyse das wirkliche Metabolom zum Zeitpunkt der Probennahme repräsentiert. Bei ungerichteten Metabolomikmethoden, wo das Ziel eine Erfassung möglichst vieler Metaboliten ist, wird es unmöglich zu gewährleisten, dass die Bedingungen bei der Probennahme, -lagerung und -präparation für alle Metaboliten in einer Probe geeignet sind. Letztlich ist es unmöglich, Methoden für Tausende von endogenen/exogenen Metaboliten, deren Identität unbekannt ist und für die keine authentischen Standards verfügbar sind, in einer wirklich quantitativen Weise zu validieren. Deswegen ist momentan keine Möglichkeit vorhanden, um objektiv zu bestimmen, wie repräsentativ ein gesammeltes Metabolom ist. Viele Arbeitsabläufe zielen darauf ab, durch Nutzung von tiefen Temperaturen (Zugabe von kalten Lösungsmitteln, Einfrieren in flüssigem Stickstoff), durch Zugabe von Säure, durch Gefriertrocknung oder schnelle Erwärmung<sup>[35,36]</sup> einen Metabolismus-Quenching-Schritt einzubauen. Da metabolische Prozesse sehr schnell sein können ( $< 1$  s), muss der Quenching-Schritt sehr schnell erfolgen, um wirklich effektiv zu sein. Bei biologischen Proben kann sich dies als schwer machbar erweisen. Weiterhin kann die Einführung von Quenching-Schritten eine versehentliche Zersetzung oder den Verlust von einigen Metaboliten bewirken. Folgerichtig kann keine einzige Metabolismus-Quenching-Methode als optimal angesehen werden.<sup>[35,37]</sup> Beispielsweise wurde in der Pflanzenmetabolomik berichtet, dass die Zugabe von Säure die Zahl der erfassten Metaboliten vermindern kann, während Gefriertrocknung zu irreversibler Adsorption der Metaboliten an Zellwänden und Membranen führen mag.<sup>[38]</sup> Während des darauffolgenden Arbeitens mit der Probe müssen angemessene Schritte unternommen werden, um ein Erwärmen oder Auftauen zu vermeiden, das eine mögliche enzymatische Aktivität auslösen und eine Veränderung der Zusammensetzung des Metabolitenpools zur Folge haben könnte.<sup>[39]</sup> Alternativ könnten gesättigte Salzlösungen zum Pflanzenmaterial zugegeben werden, um die enzymatische Aktivität zu stoppen, nachdem das Material geschädigt wurde.<sup>[39,40]</sup> Ein Quenching-Schritt ist routinemä-

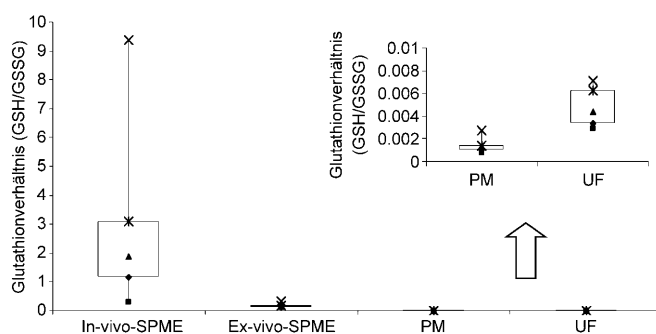


Big Teil der meisten Untersuchungen von Mikroorganismen und Pflanzen, aber Metabolomikstudien von biologischen Flüssigkeiten enthalten typischerweise keine Quenching-Schritte vor der Isolierung des Plasmas, was viel Raum für die Möglichkeit zusätzlicher Veränderungen im Metabolom lässt. Der Einsatz der In-vivo-SPME zur Probennahme aus zirkulierendem Tierblut begegnet diesem Problem, indem der Metabolismus-Quenching-Schritt direkt in den Ablauf der Probennahme eingebaut wird. Tatsächlich fanden wir, dass mit diesem Ansatz 70 (Umkehrphasen-LC-MS mit Elektrosprayionisierung im Positivionen-Modus) und 85 Funde (Umkehrphasen-LC-MS mit Elektrosprayionisierung im Negativionen-Modus) nur mit In-vivo-SPME erhalten wurden, nicht aber, wenn das Blut abgenommen wurde und die daraus resultierende Plasmaprobe einer SPME, Ultrafiltration oder Lösungsmittelfällung unterzogen wurde.<sup>[41]</sup>  $\beta$ -NAD ist ein Beispiel für einen Metaboliten, der mit In-vivo-SPME identifiziert wurde, aber bei Anwendung anderer Methoden unerkannt blieb (Abbildung 4). Derzeit arbeiten wir daran, die übrigen Funde aus der In-vivo-SPME zu charakterisieren; erste Daten (exakte Masse, Polarität, Datenbanksuche und Retentionszeiten) lassen darauf schließen, dass zu den Spezies Carotine, Nukleoside und andere phosphorylierte Komponenten, Thionine und Glucuronide zählen. Wir zeigten zudem, dass die Methoden, die auf einer Blutentnahme basieren, zu einem stark erhöhten Gehalt an oxidierten Glutathionen und falschen Glutathionverhältnissen führen, während wir mit In-vivo-SPME in der Lage waren, die wirklichen Konzentrationen von Glutathionen (sowohl reduzierten als auch oxidierten) zu messen (Abbildung 5).

Gasraum-In-vivo-SPME und/oder In-vivo-SPME mit direktem Kontakt in Kombination mit GC-MS können auch dabei helfen, die Metabolitenerfassung gegenüber derjenigen bei traditionellen Extraktionsansätzen zu verbessern. Gallagher et al. verglichen die Effizienz von In-vivo-SPME mit derjenigen der Hexanextraktion bei der Analyse menschlicher Hautausdünstungen<sup>[42]</sup> und identifizierten zunächst 92



**Abbildung 4.** Beispiel für einen Metaboliten ( $\beta$ -NAD), der in Mäuseblut durch In-vivo-SPME identifiziert wurde, nicht aber nach Blutentnahme mit SPME, Lösungsmittelfällung oder Ultrafiltration.



**Abbildung 5.** Diagramm des Glutathionverhältnisses (reduzierte/oxidierte Form), die mit In-vivo-SPME in zirkulierendem Mäuseblut und nach Blutentnahme durch SPME, Lösungsmittelfällung (PM) oder Ultrafiltration (UF) erhalten wurden.

Komponenten: 58 mit In-vivo-SPME und 49 in Hexanextrakten, was darauf schließen lässt, dass diese beiden Techniken komplementär sind. Komponenten mit höherem Molekulargewicht fanden sich hauptsächlich in Hexanextrakten, während SPME für die Sammlung von Aldehyden und Ketonen mit niedrigerem Molekulargewicht geeigneter war. Auf der Basis von SPME-Ergebnissen schlugen die Autoren Dimethylsulfon, Benzothiazol und Nonanal als Biomarker für Alterungsprozesse vor. In einem anderen Beispiel waren Zimmermann et al. zum ersten Mal in der Lage, Methyl-dodecanoat, Decan-1-ol, Heptan-1-ol, 3-Methylbutan-1-ol, Pentadecan-2-on, Nonan-2-on und Undecan-2-ol in menschlichen Darmzellen zu isolieren; dies weist darauf hin, dass SPME bei globalen Metabolomikstudien sehr nützlich zur Identifizierung zuvor nicht gefundener Metaboliten sein kann.<sup>[28]</sup> Außerdem wurde In-vivo-SPME (sowohl im Gasraum als auch mit direktem Kontakt) umfassend bei Untersuchungen von Insektenausdünstungen wie Boten- oder Abwehrstoffen eingesetzt. Zum Beispiel wurde Undecan als Rekrutierungspheromon aus Ameisen isoliert; es befähigt zu weitreichender Kommunikation zwischen verschiedenen Spezies, wenn ein großer Essensvorrat entdeckt wurde.<sup>[43]</sup>

In einer anderen Studie wurde SPME genutzt, um zum ersten Mal Sexualpheromone (ein Gemisch aus Tetra- und Pentadecanal) in der Gottesanbeterin zu identifizieren.<sup>[44]</sup> Cai et al. nutzten In-vivo-Gasraum-SPME zur Bestimmung von Metaboliten, die möglicherweise die Qualität von Früchten und Erträgen beeinflussen; diese Metaboliten wurden von den Käfern *Harmonia axyridis* freigesetzt, und die Forscher konnten die Gegenwart charakteristischer Gerüche einigen identifizierten Methoxy-pyrazinen zuordnen.<sup>[34]</sup> Djozan et al. verglichen die traditionelle Lö-

sungsmittelextraktion, In-vitro-Gasraum-SPME und In-vivo-Gasraum-SPME bei der Isolierung von Abwehrstoffen, die in der Stinkdrüse der Streifenwanze *Graphosoma lineatum* produziert werden und beobachteten einen bemerkenswerten Anstieg der Empfindlichkeit im In-vivo-Modus.<sup>[33]</sup> Vor der Verfügbarkeit der SPME hatte man die Insekten töten und mit Lösungsmittel extrahieren müssen; dies hatte es unmöglich gemacht, die zeitlichen dynamischen Veränderungen in den Ausdünstungen der Botenstoffe oder Veränderungen der Emissionen bei Interaktion mit anderen Individuen oder bei Kontakt mit Umweltreizen aufzuzeichnen. In-vivo-SPME kann auch dafür angewendet werden, um Beziehungen zwischen Insekten und Pflanzen zu untersuchen, ein äußerst wichtiges Thema für den Pflanzenschutz, die chemische Ökologie und die Entomologie.<sup>[32]</sup>

Einige Apparate wurden kürzlich entwickelt und zur Detektion von flüchtigen und halbflüchtigen Insektenemissionen angewendet, beispielsweise Glas-Teflon-Kammern mit einer Adsorption auf Basis von Tenaxfallen und Windtunneln.<sup>[32]</sup> Es ergaben sich jedoch einige Schwierigkeiten und Nachteile: Das Stressniveau der Organismen war zu hoch, und da die meisten Studien sich auf Insekten-Pflanzen-Systeme als Ganzes konzentrieren, konnte der Beitrag des Insekts an sich nicht isoliert werden. In-vivo-SPME bietet hier einen Fortschritt. Zum Beispiel fanden Fernandes et al. einen signifikanten Unterschied zwischen den Metaboliten, die von Kohl vor und nach einem Insektenangriff emittiert werden, und detektierten auch eine In-vivo-Anreicherung von Limonen und Campher im Insekt, was zum Wissen über die ökologischen Wechselwirkungen dieser beiden Spezies beitrug.<sup>[32]</sup>

#### 4. Untersuchungen der biochemischen Individualität

Die Untersuchung der Variabilität zwischen Tieren oder der biochemischen Individualität kann faszinierende Einblicke in die Biologie einer Reihe von Prozessen geben.<sup>[45]</sup> Beispielsweise untersuchten Coen et al. das Metabolom von verschiedenen Kompartimenten, um die toxische Reaktion von Ratten auf die Verabreichung von Galactosaminen aufzuklären.<sup>[46]</sup> Diese Studie lieferte nicht nur interessante Einblicke in den Mechanismus der Toxizität von Galactosaminen, sondern illustrierte auch das Potenzial von Metabolomikstudien für das Studium der Unterschiede in den individuellen Reaktionen, da 25 % der Ratten nicht reagierten, während 75 % der Ratten verschiedene Stufen von Hepatotoxizität aufwiesen. Wir glauben, dass In-vivo-SPME bei solchen Studien eine wichtige Rolle spielen kann, da es eine wiederholte Probennahme im selben Tier zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Punkten (z. B. Blut und Gewebe) ermöglicht, und es kann auch dazu genutzt werden, die Konzentration von freien (ungebundenen) Metaboliten zu messen.

##### 4.1. Konzentration ungebundener Metaboliten

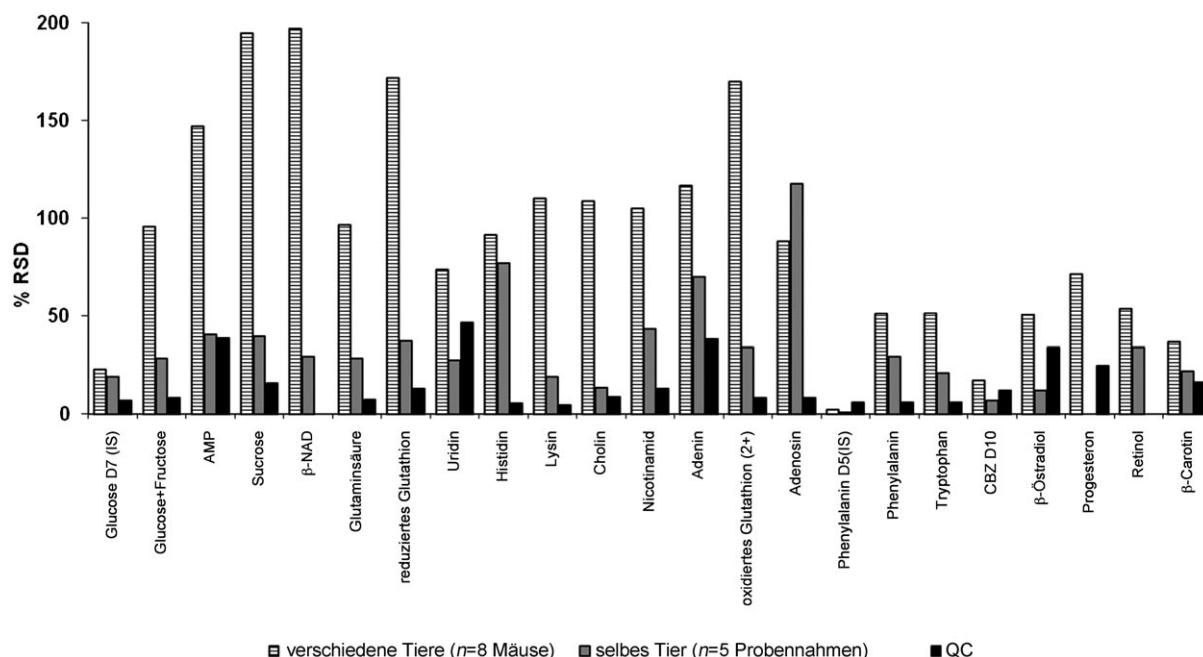
Die Menge an Analyt, die mit SPME extrahiert wird, ist proportional zur Konzentration des freien (ungebundenen)

Metaboliten in der biologischen Probe. Nur ungebundene Metaboliten sind biologisch aktiv, weshalb der Einsatz von SPME als Probennahmemethode in Metabolomikstudien hilfreich sein kann, die auf die Aufklärung biologischer Prozesse abzielen. Zum Beispiel zeigen unsere Befunde bei der In-vivo-SPME-Probennahme von Blut, dass SPME für die Untersuchung der Konzentrationsveränderungen verschiedener Metaboliten genutzt werden kann (sogar höchst instabiler Spezies wie Glutathion, Retinol und Adenosin), um sowohl die zeitliche Variation der Metabolitkonzentration im gleichen Individuum als auch die Unterschiede in verschiedenen Individuen zu untersuchen (Abbildung 6).<sup>[41]</sup> Bei Betrachtung kleiner Tiergruppen war die Verfügbarkeit von Informationen über ungebundene Metaboliten wichtig, um zwischen Kontroll- und Testgruppe zu unterscheiden.<sup>[41]</sup> In unserer Studie konnten wir mit einer Kombination aus In-vivo-SPME (Probennahme von den gleichen vier Tieren vor und nach der Dosierung) und Ultrafiltration (Probennahme von vier Tieren pro Kontroll- und Testgruppe), mögliche Biomarker der Carbamazepin-Dosierung finden. Bei einer Lösungsmittelfällung mit den gleichen Proben war es hingegen nicht möglich, zwischen den beiden Gruppen zu unterscheiden. In einem GC-MS-Beispiel entwickelten Soini et al. eine sehr schnelle Probennahmetechnik (10–12 s für die Probennahme), indem sie unter Verwendung eines käuflichen Polydimethylsiloxan-Twister-Rührstabs Hochdurchsatz-Metabolomikstudien von menschlichen Hautausscheidungen durchführten, um zu untersuchen, ob diese Emissionen als Fingerabdruck dienen könnten.<sup>[47,48]</sup> Eine Langzeitreproduzierbarkeit von 14.3 und 14.7 % relativer Standardabweichung (RSD) wurde für die beiden internen Standards erreicht. Diese Daten wurden aus Analysen von insgesamt 960 In-vivo-Proben über einen Zeitraum von drei Monaten erhalten, wodurch ein zeitabhängiger Vergleich von individuellen Emissionsprofilen ermöglicht wurde.

##### 4.2. Zeitliche und räumliche Auflösung

Zeitliche Auflösung ist die Fähigkeit, die Analytkonzentration unverzüglich genau zu bestimmen und zwei verschiedene Konzentrationen in schneller Folge klar aufzulösen. Die In-vivo-Probennahme geschieht nicht unverzüglich, erfolgt aber über einen kurzen, definierten Zeitraum. Die zeitliche Auflösung, die sich durch In-vivo-SPME erreichen lässt, hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der instrumentellen Genauigkeit der nachfolgenden Analysenmethode und die Menge an Analyt, die mit dem SPME-Assay extrahiert werden kann. Diese Menge ist wiederum abhängig vom Ausmaß der Beschichtung, von der Analytkonzentration in der Probe, vom Distributionskoeffizienten der Analyten, von der Geschwindigkeit der Veränderung der Analytkonzentration während des Beobachtungszeitraums und von den Probenbedingungen (z. B. der Agitationsgeschwindigkeit).

Zur Abschätzung der Mindestzeitspanne der Probennahme bei geeigneter zeitlicher Auflösung in einem gegebenen dynamischen System entwickelten und validierten Zhang et al. kürzlich einen Satz von Gleichungen, der alle diese Faktoren berücksichtigt.<sup>[49]</sup> Mit der erhöhten Empfindlichkeit



**Abbildung 6.** Messung der Veränderlichkeit eines ausgewählten Metaboliten innerhalb eines Tieres ( $n=5$  aufeinanderfolgende Probenahmen über je 2 min) und bei verschiedenen Tieren ( $n=8$  Mäuse) durch In-vivo-SPME-Probenahme in zirkulierendem Mäuseblut. QC = Qualitätskontrolle.

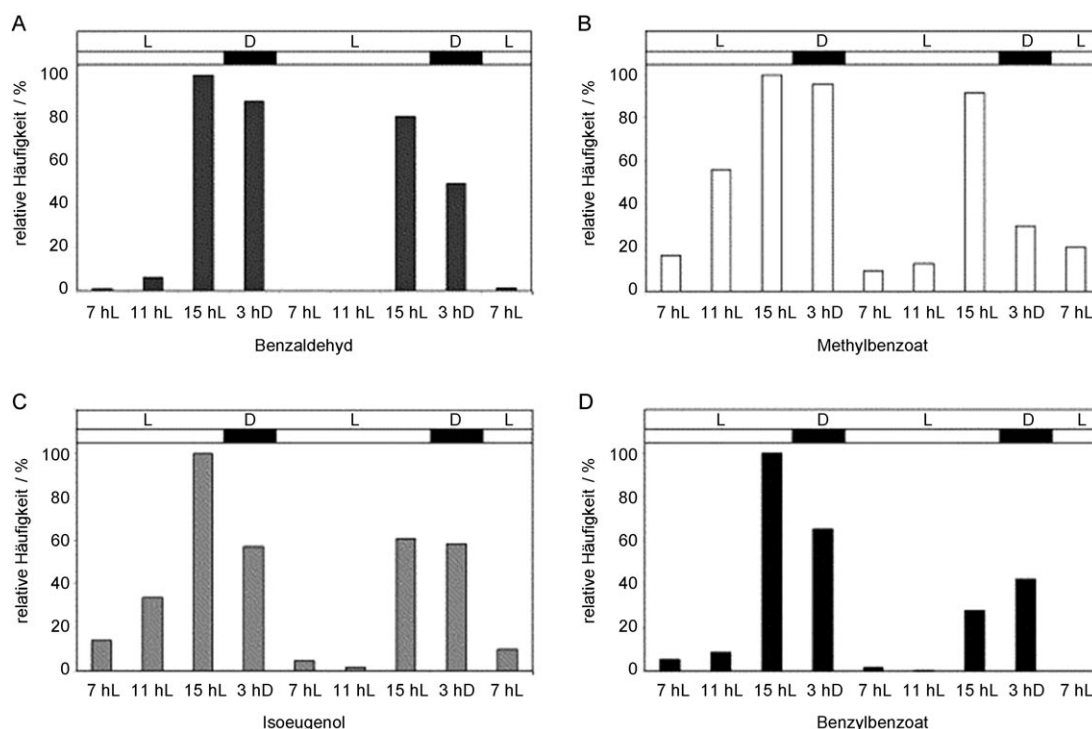
der modernen analytischen Ausstattung (besonders GC-MS und LC-MS) werden oft In-vivo-SPME-Probenahmezeiten von 0.5–5 min angewendet, weil sie zu ausreichenden Extraktionsmengen führen und eine angemessene zeitliche Auflösung vieler Prozesse bieten, wie durch das entwickelte theoretische Modell bestätigt wurde (z.B. bei pharmakokinetischen Untersuchungen von Wirkstoffen und Metaboliten).<sup>[14,15,18,19]</sup> Die Länge dieser Probenahmezeiten bringt es mit sich, dass In-vivo-SPME üblicherweise nicht auf quantitative Studien sehr schneller (binnen Sekunden ablaufender) Prozesse angewendet werden kann und nicht allgemein auf Prozesse mit großen Konzentrationsveränderungen pro Zeiteinheit anwendbar ist.

Noch kürzere Probenahmezeiten sind zwar denkbar, allerdings sind einige wichtige Punkte zu berücksichtigen (z.B. die Konvektion durch das Einbringen der SPME-Probe in das System und die Zeit, die zum Erreichen eines stationären Diffusionszustands benötigt wird), wenn Probenahmezeiten von weniger als einer Minute angestrebt werden.<sup>[49]</sup> Um beurteilen zu können, welche Auswirkungen diese Punkte auf die genaue Bestimmung der tatsächlichen Analytkonzentration haben, werden weitere theoretische Arbeiten benötigt. Dennoch eignet sich eine solch schnelle Methode immer noch für quantitative analytische Anwendungen, z.B. um zu untersuchen, welche Metaboliten zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden sind, oder um Mechanismen durch Erfassung eines kurzlebigen Intermediats zu bestätigen.

Mithilfe zeitabhängiger Analysen wurde die Kinetik der Freisetzung flüchtiger Stoffe und halbflüchtiger Metaboliten während des Verzehrs eines komplex gewürzten Käsemodells untersucht.<sup>[50]</sup> In dieser Studie wurde der SPME-Apparat zu verschiedenen Zeitpunkten während der Käsekauens in ein

Y-Verbindungsstück, das den Eingang der API-MS-Kapillare, den Eingang für die SPME-Faser und die Nase des Probanden verband, eingebracht, um 8 s lang Proben von der ausgeatmeten Luft zu nehmen. Die Autoren konnten das Muster im zeitlichen Freisetzungsprofil von Heptan-2-ol anhand von individuellen Unterschieden erklären, die bekanntermaßen von einer Reihe oraler Parameter abhängen.<sup>[50]</sup> In einer anderen interessanten Studie wurde In-vivo-SPME dafür genutzt, um die Aufnahme von Allelochemikalien in Tomaten zu messen.<sup>[23]</sup> Lösungen von Allelochemikalien wurden exogen in das Erdreich eingetragen, und der Tomatenstamm wurde über mehrere einstündige Extraktionszyklen hinweg (bis zu 72 h nach der Verabreichung) behandelt. Obwohl eine recht lange Extraktionszeit angewendet wurde, konnten die Autoren den zeitlichen Verlauf der Persistenz von 1,8-Cineol in Tomaten aufklären. Damit sollte In-vivo-SPME eine vielversprechende alternative Methode sein, um die Aufnahme von Allelochemikalien in ausgewählten Pflanzen zu messen und anschließend allelopathische Phänomene zu studieren.<sup>[23]</sup> In-vivo-SPME wurde dazu genutzt, die Duftproduktion in Petunien zu untersuchen.<sup>[51]</sup> Der Tagesrhythmus der Emission von wichtigen benzoiden Substanzen ist anhand von Abbildung 7 ersichtlich. In-vivo-Daten belegten während Perioden mit niedriger Emission eine De-novo-Produktion flüchtiger Stoffe statt der Freisetzung von gespeicherten Metaboliten, was durch gezielte Metabolomik wie auch durch genomische Ansätze bestätigt wurde.

Die räumliche Auflösung bezieht sich auf die Fähigkeit der Technik, zwischen verschiedenen Analytkonzentration in einem Raumkontinuum zu unterscheiden. Eine ungleiche räumliche Verteilung der Analyten findet sich besonders oft in biologischen Systemen; Gründe hierfür sind die Spezialisierung der Gewebefunktionen sowie Unterschiede in der



**Abbildung 7.** Rhythmische Emission von vier wichtigen flüchtigen Benzoiden: A) Benzaldehyd, B) Methylbenzoat, C) Isoeugenol und D) Benzylbenzoat. Nach Öffnung der Blüten wurden die flüchtigen Blütenbestandteile mithilfe von In-vivo-Gasraum-SPME über einen Zeitraum von 48 h viermal pro Tag analysiert. Die oberen weißen Balken verdeutlichen Zeiträume mit Beleuchtung (L), die oberen schwarzen Balken stellen dunkle Zeiträume dar (D). Jede Komponente ist als Prozent ihres Maximalwerts aufgetragen. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [51].

Aufnahme, dem Metabolismus, den externen Stimuli und der Speicherung des Analyten. Zum Beispiel basieren die meisten Ansätze auf dem Gebiet der Pflanzenanalytik auf Homogenisierung, um die Freisetzung von Metaboliten während der Extraktion zu steigern.<sup>[52]</sup> Allerdings verhindert die Homogenisierung die Erfassung von Daten, die mit der Verteilung des Metaboliten in der Probe zusammenhängen und nützlich sein könnten, da der Metabolitengehalt sich nicht nur von Organ zu Organ, sondern auch innerhalb des gleichen Organs verändern kann.<sup>[8,39]</sup> Zum Beispiel berichteten Biais et al. über eine Methode für die räumliche Lokalisierung von Metaboliten in Melonen, wo beträchtlicher Aufwand getrieben wurde, um spezifische Pflanzenteile freizulegen, zu homogenisieren und zu analysieren.<sup>[53]</sup> In-vivo-SPME mag nicht besonders geeignet dafür sein, nützliche Informationen über die räumliche Verteilung in kleineren Geweben und in Kompartimenten zu sammeln. Die räumliche Auflösung der Technik ist sowohl durch die Größe der SPME-Probe als auch durch die Zeitdauer der Probennahme bedingt.<sup>[20–22]</sup> SPME-Umhüllungen mit 1–2 mm Länge wurden entwickelt, um die räumliche Auflösung zu verbessern (zum Vergleich: Länge kommerzieller Hüllen: 10–15 mm).<sup>[20–22]</sup> Bei dieser Art von Studie ist eine segmentierte Faser sinnvoll, da sie maßgeschneidert und zur gleichzeitigen Probennahme aus benachbarten Geweben eingesetzt werden kann (Abbildung 1B). Zur Desorption wird das untere Segment zunächst Lösungsmittel ausgesetzt, um die Analyten zu entfernen. Sobald die Desorption des unteren Segments vollständig ist, wird das obere Segment mit einer frischen Charge des Lösungsmittels desorbiert. Loi et al. berichteten von einem alternativen

Ansatz unter Verwendung käuflicher GC-Faseranordnungen in einer räumlich aufgelösten In-vivo-Studie, in der die Autoren 24 h nach exogenem Einbringen der Chemikalie in das Erdreich die Konzentration von 1,8-Cineol abhängig von der Höhe der Probennahme am Tomatenstamm ermittelten.<sup>[23]</sup> Die Autoren fanden eine lineare Abnahme der 1,8-Cineol-Konzentration mit der Höhe der Probennahme.

Darüber hinaus kann die Bestimmung der Blumendüfte und ihrer Muster innerhalb einer einzigen Blüte dabei helfen, die Bestäubungsökologie, Pflanzen-Tier-Beziehungen und pflanzliche Verteidigungsmechanismen besser zu verstehen.<sup>[27]</sup> Zum Beispiel fanden kommerzielle SPME-Faseranordnungen Anwendung für das metabolomische In-vivo-Gasraum-SPME-Profilierung verschiedener pflanzlicher Kompartimente (wie lebende Blumen, Blätter und Tragblätter) aus vier unterschiedlichen *Lamium* (Taubnessel)-Arten und auch für das Profiling der metabolomischen Interkompartiment-Zusammensetzung der Grapefruit in verschiedenen Entwicklungsstadien.<sup>[26,27]</sup> In einer der untersuchten *Lamium*-Arten wurden verschiedene Kompartimente anhand des veränderten Gehalts an Monoterpenen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen) unterschieden. Die Autoren waren in der Lage, die Metaboliten, die für die Unterschiede zwischen den Spezies verantwortlich sind, zu bestimmen.<sup>[26]</sup>

Möglicherweise sind zeitliche und räumliche Auflösung bei der In-vivo-SPME nicht gleichzeitig erreichbar, weshalb je nach Zielsetzung ein passender experimenteller Aufbau gewählt werden sollte. Für eine In-vivo-SPME mit guter räumlicher Auflösung sind miniaturisierte Proben notwendig; dies wiederum erfordert längere Probennahmezeiten, um si-



cherzustellen, dass der Analyt in einer Menge extrahiert wird, die für die Detektion ausreicht. Daher werden hier die Proben üblicherweise über einen Zeitraum von 20–30 min genommen, im Unterschied zu den meist 0.5–5 min bei zeitlich aufgelösten Studien.<sup>[20–22,49]</sup> Allerdings können verlängerte Probennahmezeiten die Effekte der durch Diffusion verursachten Konzentrationsänderungen ausmitteln, wodurch die Vorteile einer verbesserten räumlichen Auflösung durch Faserminiaturisierung verloren gehen. Dementsprechend ist ein sorgfältiges experimentelles Design notwendig, um ein In-vivo-SPME-Experiment mit guter räumlicher Auflösung zu gewährleisten.

## 5. Vergleich zwischen SPME und herkömmlichen Methoden für Studien der globalen Metabolomik

### 5.1. Vergleich der SPME mit Lösungsmittelfällung und Ultrafiltration

Die Effizienz der SPME als Probenpräparationsmethode wurde sowohl bei In-vitro- (menschliches Plasma) als auch bei In-vivo-Experimenten (zirkulierendes Mäuseblut) mit der Effizienz von Ultrafiltration und Lösungsmittelfällung verglichen.<sup>[41,54]</sup> Im Allgemeinen wurden mit SPME weniger Metaboliten erfasst (Tabelle 2), außer wenn die Detektion

**Tabelle 2:** Vergleich von SPME, Ultrafiltration (UF), Plasmaprotein-fällung mit Acetonitril (PP) und Plasmaprotein-fällung mit Methanol/Ethanol (PM) für die Extraktion von menschlichen Plasmamischproben.<sup>[54]</sup>

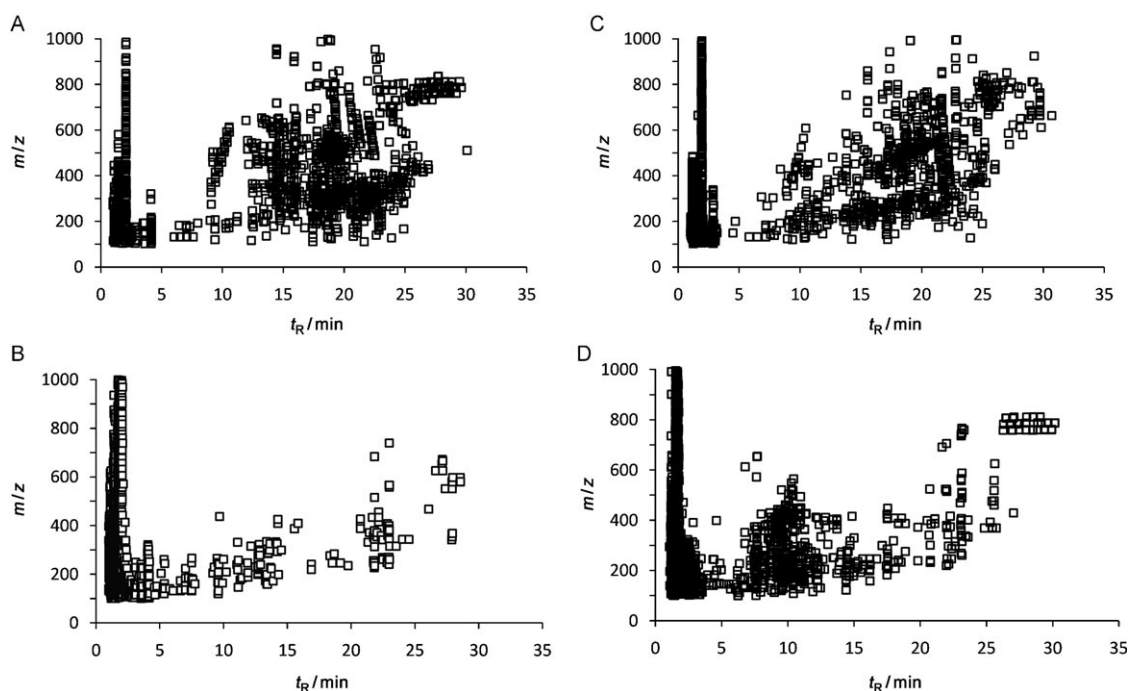
Methode	Zahl der detektierten Merkmale		mittlere Standardabweichung der Peak-Fläche <sup>[b]</sup>	
	Positiv-ionen-ESI	Negativ-ionen-ESI	Positiv-ionen-ESI	Negativ-ionen-ESI
PP	2975	2082	19	12
PM	3245	2252	12	8
UF	2686	2093	20	22
SPME (5 min)	1592	2005	16	18
SPME (ü.N.) <sup>[a]</sup>	1821	3320	11	17

[a] ü.N.: über Nacht. [b]  $n = 7$  Wiederholungen.

durch Negativionen-ESI-MS in Kombination mit Umkehrphasen-LC-MS erfolgte; in diesem Fall verbesserte SPME mit langen Extraktionszeiten den Abdeckungsgrad um 50 %. Bei detaillierterer Betrachtung der Metabolitenabdeckung findet man, dass die SPME eine signifikant bessere Erfassung von hydrophoben Spezies als die Ultrafiltration ermöglicht, was sich an der erhöhten Zahl von Metaboliten mit einer Retentionszeit  $> 10$  min zeigt (Abbildung 8). Die beiden Techniken können als komplementär angesehen werden, wobei die Ultrafiltration idealerweise mit HILIC-MS (HILIC = hydrophilic interaction liquid chromatography) zur Analyse von polaren Metaboliten und SPME idealerweise mit Umkehrphasen-LC-MS zur Analyse von hydrophoberen Analyten gekoppelt wird. Wenn allerdings eine ausgewogene Extraktion von sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Spezies in einer einzigen Probennahme gewünscht ist, bietet In-vivo-SPME eine bessere Alternative.

In ihrer Genauigkeit erwies sich die SPME als vergleichbar mit der Lösungsmittelfällung und der Ultrafiltration, mit einer mittleren Standardabweichung von 11–18 % (Tabelle 2), was einer guten Datenqualität entspricht. Dies ist besonders wichtig, weil die Empfindlichkeit der SPME-Methode deutlich tiefer lag als die der traditionellen Probenpräparationsmethoden, was durch die kleinen Menge an extrahiertem Analyten verursacht war – und die Methodengenauigkeit lässt in LC-MS-Studien normalerweise mit der Abnahme der Signalstärke nach. Die Daten in Tabelle 2 stimmen mit anderen Literaturberichten überein, in denen die Lösungsmittelfällung oder die Ultrafiltration für globale Metabolomikstudien genutzt wird.<sup>[55–57]</sup> Interessanterweise führte eine Festphasenextraktion mit C18-Sorbens zu 1500 charakteristischen Merkmalen, die mit UHPLC-MS (UHPLC = ultrahigh-performance liquid chromatography) aufgezeichnet wurden;<sup>[56]</sup> dies ist in Einklang mit den Befunden, die wir bei Anwendung von SPME in Kombination mit Positivionen-ESI-MS und Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie erhielten. Mit Festphasenextraktion zeigten allerdings nur 48 % der detektierten Peaks eine akzeptable Standardabweichung von  $\leq 30$  % gegenüber 80–92 % der mit SPME detektierten Peaks, was die höhere Effizienz der SPME-Methode demonstriert.

Eines der größten Probleme bei der quantitativen Analyse mit LC-MS ist die Ionensuppression, die auf die Gegenwart von coeluierten Matrixkomponenten zurückzuführen ist. Bei Metabolomikstudien ist die Ionensuppression besonders problematisch, da dort eine unselektive Probenpräparationsmethode gewünscht wird. Wegen der kompetitiven Natur der Ionisierungsprozesse können besonders starke Signale zur Ionensuppression der coeluierten Spezies führen. Dies kann für jede Art von quantitativer Analyse zum Nachteil werden, inklusive relativer Quantifizierung, da die beobachteten Unterschiede zwischen Kontrollgruppen und behandelten Gruppen für einen bestimmten Metaboliten einfach auf verschiedene Probenzusammensetzungen zurückzuführen sein können, die zu einem unterschiedlichen Ausmaß an Ionensuppression führen, anstatt auf wirkliche Unterschiede in den Proben. SPME minimiert erfolgreich die Ionensuppression, da nur kleine Anteile des Metaboliten extrahiert werden. Zusätzlich zeigen in großer Menge auftretende, polare Metaboliten normalerweise eine sehr niedrige Extraktionseffizienz bei der SPME, was die Fähigkeit zur Ionensuppression während der gesamten chromatographischen Analyse weiter vermindert. Eine genaue Untersuchung der absoluten Matrixeffekte wurde für die SPME nach der Extraktion von menschlichem Plasma durchgeführt, um das Ausmaß der Ionensuppression zu bestimmen.<sup>[54]</sup> Dazu wurde menschlicher Plasmaextrakt, der mit SPME erhalten wurde, nach der Extraktion mit einer bekannten Konzentration an ausgewählten Metaboliten versetzt, die bei der Umkehrphasen- wie auch der HILIC-MS-Methode über den gesamten chromatographischen Raum eluierten. Nach Abzug von endogenen Mengen des gleichen Metaboliten in den Plasmaproben wurden die Ergebnisse mit einem Standard verglichen, der die Metaboliten in der gleichen Konzentration enthält. Nur der Elutionsbereich des Gerinnungshemmers Natriumcitrat war nachweislich anfällig gegen Ionensup-



**Abbildung 8.** Ionenkarten (Retentionszeiten gegen  $m/z$ ). Metabolitenerfassung in menschlichem Plasma durch In-vitro-SPME (A) und Ultrafiltration (B) sowie in Mäuseplasma durch In-vivo-SPME in zirkulierendem Mäuseblut (C) und durch Ultrafiltration (D).

pression in der Umkehrphasenmethode, während mit der HILIC-Methode  $<20\%$  der untersuchten Metaboliten signifikante Matrixeffekte aufwiesen.

## 5.2. Vergleich von SPME mit Mikro dialyse

In-vivo-SPME wie auch Mikro dialyse ermöglichen die Beobachtung von Analyten in wachen und/oder sich frei bewegenden Tieren. Bei der zielgerichteten quantitativen Analyse von ausgewählten Pestiziden im Geldbaum wurde gezeigt, dass die Effizienz der In-vivo-SPME jener der Mikro dialyse gleichkam, obwohl ein gewisser Pestizidverlust in den Membranen bei der Mikro dialyse beobachtet wurde.<sup>[24]</sup> Leider gibt es nur begrenzte Daten über die Nutzung der Mikro dialyse in der Metabolomik. Kürzlich demonstrierten Wibom et al. den Nutzen der Technik für die Entnahme von Proben extrazellulärer Flüssigkeit innerhalb des Schädels von Glioblastompatienten.<sup>[58]</sup> Mit diesem Ansatz der stereotaktischen Mikro dialyse konnten die Autoren nach GC-MS-Analyse 151 Metaboliten detektieren und fanden klare metabolische Unterschiede zwischen Tumoren und angrenzenden Gehirnregionen. Bisher gibt es noch keine Berichte über ähnliche Untersuchungen, die Mikro dialyse mit LC-MS kombinieren; ein Grund hierfür könnte die starke Ionensuppression sein, die durch die salzhaltigen Puffer, die üblicherweise in der Mikro dialyse Verwendung finden, verursacht wird. Da die Mikro dialyse eine Membrantechnik ist, ist ihre Effizienz wahrscheinlich analog zu jener der Ultrafiltration, in deren Fall bei ungerichteten Metabolomikstudien mit einem schweren Verlust von hydrophoben Spezies gerechnet werden kann, wie aus unseren Befunden in Abbildung 8<sup>[41,54]</sup>

ersichtlich wird und durch die Mikro dialyseliteratur bestätigt wird.<sup>[59]</sup> Zusätzlich ist die Dialyse schädlicher für das lebende System, weil Mikro dialyseproben viel größer sind als SPME-Faserapparaturen und ein schlechtere räumliche Auflösung bieten als räumlich aufgelöste SPME.<sup>[20,21]</sup> Eine typische Mikro dialyseprobe, die bei Untersuchungen des Gehirns eingesetzt wird, ist z.B. 15 mm lang, mit einem Außendurchmesser von 200–500  $\mu\text{m}$ ,<sup>[60]</sup> während die Fasern für räumlich aufgelöste SPME 1–2 mm lang sind und typische Durchmesser von  $<200\ \mu\text{m}$  aufweisen. Andererseits ist die Mikro dialyse sinnvoll für die kontinuierliche Verfolgung von Metaboliten in angenäherter Echtzeit, besonders wenn sie online an analytische Instrumente gekoppelt ist. Dementsprechend ist die Mikro dialyse besser für kurzfristige Untersuchungen geeignet, die einen hohen Grad an zeitlicher Auflösung benötigen, z.B. um sehr schnelle Prozesse direkt in vivo aufzuzeichnen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In-vivo-SPME ist ein effizientes neues Hilfsmittel für Metabolomikstudien, weil es sich durch einen schnellen Arbeitsablauf mit einem Minimum an Schritten auszeichnet und weil es direkt während der Probennahme einen Metabolismus-Quenching-Schritt enthält. Diese Technik ist ähnlich genau wie traditionelle Methoden und liefert Informationen über biologisch wichtige, ungebundene Metaboliten. Neueste Daten zeigen, dass In-vivo-SPME auf die Probennahme von biologischen Flüssigkeiten in einer ungerichteten Metabolomikprozedur ausgeweitet werden kann, wo diese Technik eine wichtige Rolle bei der Erfassung von Metaboliten mit

hohen Turnover-Geschwindigkeiten und/oder von reaktiven Metaboliten spielen kann. Weitere Forschungen auf diesem Gebiet könnten sich beispielsweise mit dem Abfangen bekannter reaktiver Metaboliten und Intermediate mithilfe von Glutathion- oder Methoxylamin-Abfangstoffen befassen.<sup>[61,62]</sup> Zusätzlich kann dieser Metabolomikansatz auf Probennahmen von Geweben ausgeweitet werden, wo In-vivo-SPME eine wichtige Rolle als weniger invasive Alternative zur Biopsie spielen könnte. Hilfreich kann die In-vivo-SPME im Gasraummodus oder im direkten Modus auch auf anderen Gebieten sein, darunter das Verständnis von Sekundärmetabolismen, die Bewertung der Nahrungsmittelqualität, die Aufklärung unerwünschter Wirkungen von genetisch veränderten Nahrungsmitteln und Pflanzen und von Zusammenhängen zwischen Genotyp und Umwelt sowie die Bestimmung von Faktoren, die für die Variationen im Gehalt an nahrungsrelevanten Metaboliten verantwortlich sind. Eine zusätzliche Miniaturisierung von SPME-Apparaturen kann weiterhin die räumliche Auflösung verbessern, die enorm wichtig für die Untersuchung heterogener Proben ist, und darüber hinaus neue Forschungsgebiete wie Einzelzellstudien erschließen. Wir glauben, dass die In-vivo-SPME dank ihrer Praktikabilität und Vielseitigkeit eine wichtige Rolle bei der Probenpräparation spielen kann, um so die Aufklärung von chemischen Prozessen in lebenden Systemen voranzutreiben.

Eingegangen am 3. November 2010  
Online veröffentlicht am 23. Mai 2011

Übersetzt von Dr. Annette Kraiss, Stockholm

- [1] J. Pawliszyn in *Solid Phase Microextraction, Theory and Practice*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [2] W. J. Griffiths, T. Koal, Y. Wang, M. Kohl, D. P. Enot, H.-P. Deigner, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5554–5575; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5426–5445.
- [3] S. J. Bruce, I. Tavazzi, V. Parisod, S. Rezzi, S. Kochhar, P. A. Guy, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3285–3296.
- [4] S. Moco, J. Vervoort, S. Moco, R. J. Bino, R. C. H. De Vos, R. Bino, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 855–866.
- [5] O. Teahan, S. Gamble, E. Holmes, J. Waxman, J. K. Nicholson, C. Bevan, H. C. Keun, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4307–4318.
- [6] A. B. Canelas, A. Ten Pierick, C. Ras, R. M. Seifar, J. C. Van Dam, W. M. Van Gulik, J. J. Heijnen, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7379–7389.
- [7] F. Augusto, A. Luiz Pires Valente, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 428–438.
- [8] H. K. Kim, R. Verpoorte, *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 4–13.
- [9] H. Verhoeven, T. Beuerle, W. Schwab, *Chromatographia* **1997**, *46*, 63–66.
- [10] D. Vuckovic, X. Zhang, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4041–4060.
- [11] J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2543–2558.
- [12] L. S. De Jager, G. A. Perfetti, G. W. Diachenko, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1192*, 36–40.
- [13] S. Risticvic, D. Vuckovic, J. Pawliszyn in *Biophysico-Chemical Processes of Anthropogenic Organic Compounds in Environmental Systems*, (Hrsg.: B. Xing, N. Senesi, P. M. Huang), Wiley, New York, **2010**, im Druck.
- [14] X. Zhang, A. Es-Haghi, F. M. Musteata, G. Ouyang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4507–4513.
- [15] F. M. Musteata, M. L. Musteata, J. Pawliszyn, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 708–715.
- [16] H. L. Lord, R. P. Grant, M. Walles, B. Incledon, B. Fahie, J. B. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5103–5115.
- [17] A. Es-haghi, X. Zhang, F. M. Musteata, H. Bagheri, J. Pawliszyn, *Analyst* **2007**, *132*, 672–678.
- [18] F. M. Musteata, I. de Lannoy, B. Gien, J. Pawliszyn, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 907–912.
- [19] D. Vuckovic, B. Gien, I. de Lannoy, F. M. Musteata, R. Shirey, L. Sidisky, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3367–3375.
- [20] X. Zhang, K. D. Oakes, S. Cui, L. Bragg, M. R. Servos, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 3417–3422.
- [21] X. Zhang, J. Cai, K. D. Oakes, F. Breton, M. R. Servos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7349–7356.
- [22] S. N. Zhou, K. D. Oakes, M. R. Servos, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 6073–6079.
- [23] R. X. Loi, M. C. Solar, J. D. Weidenhamer, *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 70–75.
- [24] S. N. Zhou, G. Ouyang, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1196–1197*, 46–56.
- [25] H. L. Lord, M. Möder, P. Popp, J. B. Pawliszyn, *Analyst* **2004**, *129*, 107–108.
- [26] G. Flamini, P. L. Cioni, I. Morelli, *Food Chem.* **2005**, *91*, 63–68.
- [27] G. Flamini, P. L. Cioni, *Food Chem.* **2010**, *120*, 984–992.
- [28] D. Zimmermann, M. Hartmann, M. P. Moyer, J. Nolte, J. I. Baumbach, *Metabolomics* **2007**, *3*, 13–17.
- [29] B. Buszewski, A. Ulanowska, T. Ligor, M. Jackowski, E. Kłodzińska, J. Szeliga, *J. Chromatogr. B* **2008**, *868*, 88–94.
- [30] X. Chen, F. Xu, Y. Wang, Y. Pan, D. Lu, P. Wang, K. Ying, E. Chen, W. Zhang, *Cancer* **2007**, *110*, 835–844.
- [31] W. Miekisch, P. Fuchs, S. Kamysek, C. Neumann, J. K. Schubert, *Clin. Chim. Acta* **2008**, *395*, 32–37.
- [32] F. Fernandes, D. M. Pereira, P. Guedes de Pinho, P. Valentão, J. A. Pereira, A. Bento, P. B. Andrade, *Food Chem.* **2010**, *119*, 1681–1693.
- [33] D. Djozan, T. Baheri, R. Farshbaf, S. Azhari, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *554*, 197–201.
- [34] L. Cai, J. A. Koziel, M. E. O'Neal, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1147*, 66–78.
- [35] W. B. Dunn, D. I. Ellis, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 285–294.
- [36] C. J. Bolten, P. Kiefer, F. Letisse, J. Portais, C. Wittmann, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3843–3849.
- [37] J. L. Griffin, R. A. Kauppinen, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 498–505.
- [38] R. t'Kindt, K. Morreel, D. Deforce, W. Boerjan, J. Van Bocxlaer, *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3572–3580.
- [39] A. D. Hegeman, *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **2010**, *9*, 139–148.
- [40] E. Röth, A. Berna, K. Beullens, S. Yarramraju, J. Lammertyn, A. Schenk, B. Nicolai, *Postharvest Biol. Technol.* **2007**, *45*, 11–19.
- [41] D. Vuckovic, I. de Lannoy, B. Gien, R. E. Shirey, L. M. Sidisky, S. Dutta, J. Pawliszyn, *Angew. Chem.* **2011**, DOI: 10.1002/ange.201006715; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, DOI: 10.1002/anie.201006715.
- [42] M. Gallagher, C. J. Wysocki, J. J. Leyden, A. I. Spielman, X. Sun, G. Preti, *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 780–791.
- [43] V. Witte, L. Abrell, A. B. Attygalle, X. Wu, J. Meinwald, *Chemoecology* **2007**, *17*, 63–69.
- [44] L. E. Hurd, F. R. Prete, T. H. Jones, T. B. Singh, J. E. Co, R. T. Portman, *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 155–166.
- [45] M. V. Novotny, H. A. Soini, Y. Mechref, *J. Chromatogr. B* **2008**, *866*, 26–47.
- [46] M. Coen, E. J. Want, T. A. Clayton, C. M. Rhode, S. H. Young, H. C. Keun, G. H. Cantor, A. L. Metz, D. G. Robertson, M. D. Reilly, E. Holmes, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5175–5187.
- [47] H. A. Soini, K. E. Bruce, I. Klouckova, R. G. Brereton, D. J. Penn, M. V. Novotny, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7161–7168.

- [48] Y. Xu, S. J. Dixon, R. G. Brereton, H. A. Soini, M. V. Novotny, K. Trebesius, I. Bergmaier, E. Oberzaucher, K. Grammer, D. J. Penn, *Metabolomics* **2007**, 3, 427–437.
- [49] X. Zhang, K. Oakes, D. Luong, J. Wen, C. Metcalfe, J. Pawliszyn, M. Servos, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 9492–9499.
- [50] E. Pionnier, C. Chabanet, L. Mioche, J. L. Le Quéré, C. Salles, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 557–564.
- [51] J. C. Verdonk, C. H. R. De Vos, H. A. Verhoeven, M. A. Haring, A. J. Van Tunen, R. C. Schuurink, *Phytochemistry* **2003**, 62, 997–1008.
- [52] J. M. Cevallos-Cevallos, J. I. Reyes-De-Corcuera, E. Etcheberria, M. D. Danyluk, G. E. Rodrick, *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, 20, 557–566.
- [53] B. Biais, J. W. Allwood, C. Deborde, Y. Xu, M. Maucourt, B. Beauvoit, W. B. Dunn, D. Jacob, R. Goodacre, D. Rolin, A. Moing, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2884–2894.
- [54] D. Vuckovic, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1944–1954.
- [55] B. Crews, W. R. Wikoff, G. J. Patti, H. Woo, E. Kalisiak, J. Heideker, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 8538–8544.
- [56] F. Michopoulos, L. Lai, H. Gika, G. Theodoridis, I. Wilson, *J. Proteome Res.* **2009**, 8, 2114–2121.
- [57] E. Zelena, W. B. Dunn, D. Broadhurst, S. Francis-McIntyre, K. M. Carroll, P. Begley, S. O'Hagan, J. D. Knowles, A. Halsall, I. D. Wilson, D. B. Kell, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 1357–1364.
- [58] C. Wibom, I. Surowiec, L. Mören, P. Bergström, M. Johansson, H. Antti, A. T. Bergenheim, *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 2909–2919.
- [59] L. Groth, A. Jørgensen, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 355, 75–83.
- [60] P. Nandi, S. M. Lunte in *Handbook of Sample Preparation* (Hrsg.: J. Pawliszyn, H. L. Lord), John Wiley & Sons, Hoboken, **2010**, S. 103–123.
- [61] A. Tolonen, M. Turpeinen, O. Pelkonen, *Drug Discovery Today* **2009**, 14, 120–133.
- [62] S. Ma, S. K. Chowdhury, K. B. Alton, *Curr. Drug Metab.* **2006**, 7, 503–523.