

Ist eine Probenvorbereitung, die „gut genug“ ist, wirklich gut genug?

Lipide und die verborgenen Gefahren einer unzureichenden Matrixentfernung

Einführung

Im Laufe der Jahre haben Sie den Arbeitsablauf in Ihrem Labor immer weiter optimiert, damit er so beherrschbar und effizient wie möglich ist. Die Popularität der Proteinpräzipitation (PPT) für die Vorbereitung biologischer Proben und QuEChERS für Lebensmittelproben zeigt, wie eine komplizierte Probenvorbereitung vereinfacht werden kann. Zur Beschreibung Ihres aktuellen Arbeitsablaufs aufgefordert würden Sie höchstwahrscheinlich sagen, dass er für die Erledigung Ihrer Aufgaben gut genug sei. Aber ist eine Probenvorbereitung, die gut genug ist, wirklich gut genug für Ihr Labor?

Ihr Arbeitsablauf im Labor steht vor vielen Herausforderungen und Sie sind ständig aufgefordert, die Effizienz und die Durchsatzzahlen zu verbessern. Ein typischer Arbeitsablauf besteht aus Probennahme, Probenvorbereitung, Probenzuführung in das Gerät, Analyse, Datenauswertung und das Erstellen von Berichten, wobei seit jeher die Probenvorbereitung als Nadelöhr und geschwindigkeitsbestimmender Schritt gilt. Mit den aktuellen modernen Geräten verfügen Sie über deutlich mehr Möglichkeiten zur Analyse unterschiedlicher Proben in Bezug auf die erforderliche Empfindlichkeit, Selektivität, Zuverlässigkeit und Durchführbarkeit komplexer Probenuntersuchungen. Um Zeitaufwand, Kosten und Komplexität zu senken und universelle Anwendbarkeit zu gewährleisten, wurde der Schritt der Probenvorbereitung so weit reduziert, dass er gerade gut genug ist.

Der wichtigste Arbeitsablauf ist Ihr eigener. Es gibt verschiedene verborgene Gefahren durch eine unzureichende Probenvorbereitung: verlorene Zeit, Probleme durch Gerätewartung/Geräteausfall und Generierung falscher Daten, die Ihren Gesamterfolg aufs Spiel setzen. Diese verborgenen Gefahren werden durch den richtigen Arbeitsablauf der Probenvorbereitung vermieden oder deutlich minimiert. Diese Verbesserungen können umgesetzt werden, ohne dass Sie Ihre Mitarbeiter neu schulen, große Summen investieren oder Ihre Standardarbeitsanweisungen (SOP) neu formulieren müssten.

Dieses Whitepaper beschreibt, mit welchen Störungen in Proben Sie täglich konfrontiert sind, und zeigt einige weniger bekannte verborgene Hindernisse auf, die bestehen, wenn Sie die Matrixentfernung im Arbeitsablauf Ihrer Probenvorbereitung nicht optimieren. Außer auf die bekannten und unbekanntes Folgen dieser Herausforderung geht das Whitepaper auf eine neue Lösung zur Verbesserung der Produktivität, zum effizienten Einsatz von Mitarbeitern und zur Verringerung des Kontaminationsrisikos Ihrer analytischen Geräte ein. Diese Lösung kann die Wiederfindung und Reproduzierbarkeit verbessern, ohne dass die SOP stark verändert, auf Durchsatz verzichtet oder der Arbeitsablauf komplizierter werden muss. Dies sollte die Definition einer Probenvorbereitung sein, die gut genug ist.

Warum wird überhaupt eine Probenaufreinigung durchgeführt?

Die zwei Hauptgründe für die Probenvorbereitung sind:

- Entfernung unerwünschter Matrices
- Aufkonzentrierung der relevanten Analyten

Dieses Whitepaper behandelt die offensichtlichen und weniger offensichtlichen Probleme, die entstehen, wenn die Matrixentfernung nicht so effizient wie möglich erfolgt.

Unerwünschte Komponenten aus der Matrix können den Flussweg kontaminieren, wenn sie überhaupt nicht oder nicht ausreichend entfernt werden. Bei GC-, GC/MS- und GC/MS/MS-Analysen können die nicht flüchtigen mit der Matrix mitextrahierten Stoffe schädliche Auswirkungen auf die Flusskomponenten des



Abbildung 1: Kontamination von GC-Systemkomponenten durch eine Probenvorbereitungsroutine, die „gut genug“ ist.

Gaschromatographen wie den Einlass, die Golddichtung und die Säule haben (Abbildung 1). Bei LC, LC/MS- und LC/MS/MS-Analysen können Matrixpartikel und -salze das Ventil, den Online-Filter und die LC-Säule beschädigen. Mit der Matrix extrahierte Stoffe können zu einer erheblichen Ionensuppression bei der MS-Quelle führen (Abbildung 2) und in der Folge negative Auswirkungen auf die Zuverlässigkeit der Methode haben. Die meisten analytischen Chemiker filtern Ihre Proben, bevor sie ins Flusssystem injiziert werden, um die oben genannten Gefahren zu vermeiden. Die Filtration ist zudem eine geeignete Methode zur Minimierung des Matrixeffekts durch Partikel. Aber was ist mit der unerwünschten gelösten Matrix? Wo landet sie, wenn Sie nur filtern?

Abbildung 2 zeigt, dass durch eine fehlende Entfernung gelöster unerwünschter aus der Matrix extrahierter Stoffe, wie z. B. gelöste Salze, Pigmente,

Proteine, Lipide usw., Ihre analytischen Geräte beschädigt werden können.

Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und Selektivität ist die Massenspektrometrie die bevorzugte analytische Methode für eine breite Palette von Applikationen. Von Matrixkomponenten verursachte Ionensuppression oder Ionenverstärkung hat jedoch negative Auswirkungen auf Präzision, Genauigkeit und Robustheit (was sich durch hohe relative Standardabweichungen zeigt). Post-Column-Infusion ist eine Technik, die durch die Matrix verursachte Ionensuppression oder Ionenverstärkung nachweist. Abbildung 3 zeigt einen typischen Aufbau für ein solches Experiment (siehe Application Note 5991-8007EN³).

Bei einer Vergleichsstudie dieser Art käme eventuell zutage, dass eine Probenvorbereitung, die „gut genug“ ist, nicht so effizient ist wie erforderlich. Mit der Probenvorbereitungslösung von Agilent wird Ihre Probenvorbereitung, die „gut genug“ ist, effizienter und zuverlässiger.

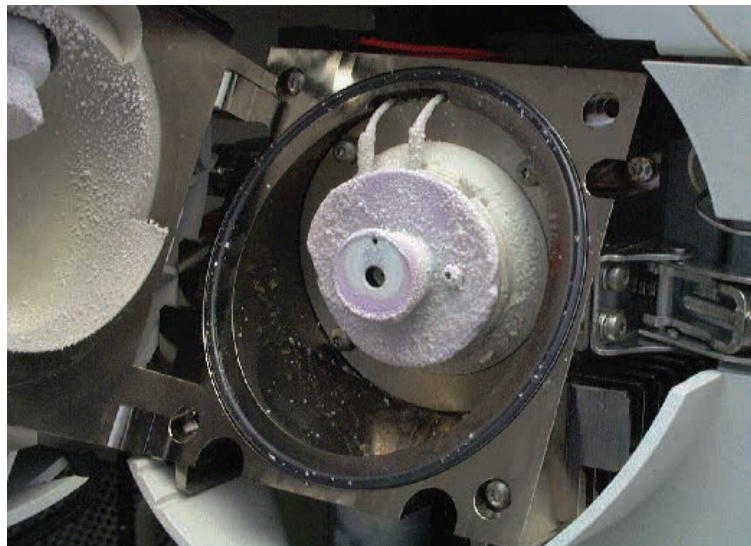


Abbildung 2: Salzablagerungen in einer LC/MS-Ionenquelle von nicht entfernten Salzen bei Verwendung einer Probenvorbereitungsroutine, die „gut genug“ ist.

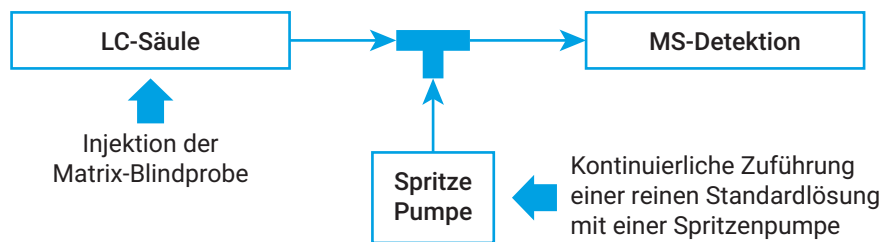


Abbildung 3: Darstellung des Standardaufbaus für Post-Column-Infusion-Experimente zur Bewertung der Matrix-Ionensuppression und für Vergleichsstudien.

Wie stark ist die Beeinträchtigung durch Lipide?

Unter allen aus der Probenmatrix extrahierten Stoffen sind die Lipide vermutlich die Komponenten, die die größte Herausforderung darstellen. Dies wird aber häufig übersehen, weil ihre effiziente Entfernung schwierig ist und ihre Akkumulation nicht sichtbar wird. Mit einem Post-Column-Infusion-Experiment (siehe Abbildung 3) können Matrixeffekte auf das MS-Signal, beispielsweise durch Serum oder Plasma, durch eine kontinuierliche Zuführung der Matrix-Blindprobe bewertet werden. Schwankungen der Signalintensität deuten auf die Anwesenheit von Substanzen aus der Matrix hin, die Ionensuppression oder Ionenverstärkung verursachen.

Die Beispiele (Zonen 2 und 3 in Abbildung 4) zeigen, wie groß die Auswirkungen von Lipiden auf die Qualität Ihrer Daten sein können. Die Proteinpräzipitation, die bei der Entfernung von abundanten Proteinen in biologischen Matrices effizient ist, entfernt jedoch keine Phospholipide, die eine deutliche Ionensuppression verursachen können (siehe Application Note 5991-8007EN³).

Die Konsequenz schlechter Daten stellt eine erhebliche Reduzierung der Laborproduktivität insgesamt dar.

Im Folgenden finden Sie eine Liste mit Effekten, die eine schlechte Matrixentfernung bei Ihren LC/MS/MS- oder GC/MS/MS-Analysen auf Ihre Produktivität haben kann:

Zuverlässigkeit von Methoden und Datenqualität

- Inakzeptable Empfindlichkeit und Selektivität der Methode
- Inakzeptable Linearität der Kalibrierung
- Schlechte Genauigkeit und Präzision der Methode
- Schwierige Peakerkennung und -integration

Anwendbarkeit von Methoden

- Längere Methodenentwicklung und -optimierung
- Mehr Fehlersuchen für die Methode
- Unterschiedliche Detektionsergebnisse je nach Matrix
- Mehr Wiederholungen von Proben

Sauberkeit des Massenspektrometers

- Häufigere Reinigung von MS-Ionenquellen
- Häufigere Reinigung oder Austausch von Kapillaren
- Erreichen oder Aufrechterhalten des Vakuums ist nicht mehr möglich
- Zusätzliche Fehlersuche

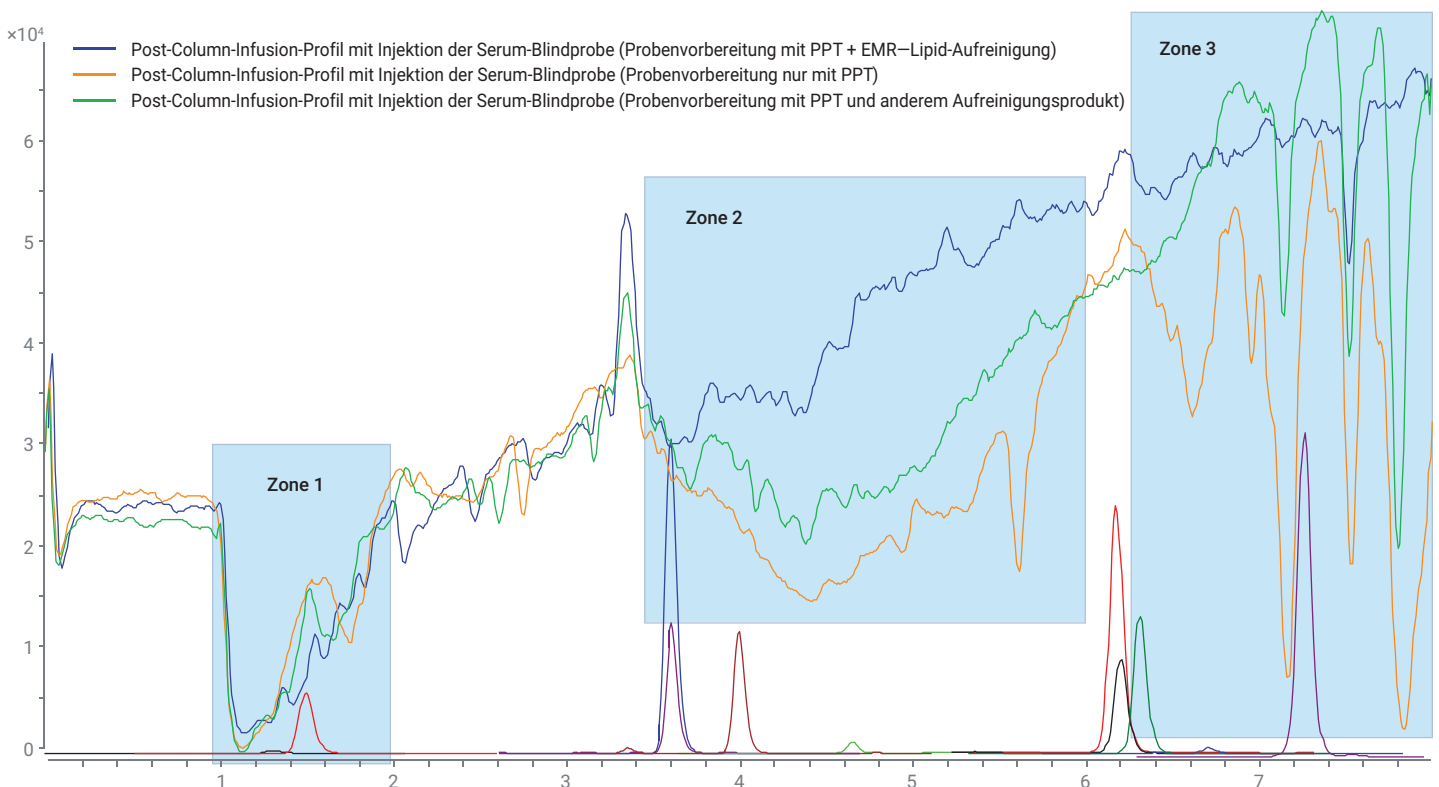


Abbildung 4: Vergleich der Standard-Post-Column-Infusion-Profile und Darstellung des Effekts der Matrix-Ionensuppression auf die Zielanalyten.

Lipidablagerungen auf der Säule

- Verkürzte Lebensdauer der LC- und GC-Säulen für Analysen
- Häufigere Wartung des GC-Einlasses
- Häufigeres Abschneiden der GC-Säule
- Rückdruck der LC-Säule
- Häufigeres Spülen oder Äquilibrieren des Systems
- Längere Analysendauer

Obwohl es Arbeitsabläufe für die Lipidentfernung gibt, bleibt bei den aktuellen Probenaufreinigungsmethoden die Wiederfindung der Analyten oft auf der Strecke, da diese Methoden zusammen mit den Lipiden teilweise auch Zielanalyten entfernen. Viele Anwender haben gelernt, mit dieser Situation umzugehen, indem sie öfter Wartungsmaßnahmen durchführen, Verbrauchsmaterialien austauschen oder umfassendere Probenvorbereitungstechniken einsetzen. Die letztgenannte Möglichkeit verbessert die Datenqualität, erfordert aber höhere Kosten sowie mehr Zeit und Fachwissen und reduziert so wiederum die Produktivität.

Warum ist die Durchführung einer „gut genug“ ist, keine dauerhafte Lösung?

Um eine bessere Datenqualität zu erhalten und die Produktivität deutlich zu verbessern, wäre eine bessere und einfachere Methodik für die Lipidentfernung und generell die Matrixentfernung wünschenswert. Um diese Ziele zu erreichen, hat Agilent Captiva EMR–Lipid entwickelt, ein Produkt, das Proben mit einem einfachen Arbeitsablauf aufreingt. Captiva EMR–Lipid ist einfach und universell zur Reduzierung der Matrixeffekte durch die Anwesenheit von Lipiden einsetzbar und bietet eine gute Wiederfindung der Analyten.

Bei der Bearbeitung komplexer Proben, wie z. B. bei biologischen Matrices oder Lebensmittelproben, müssen Sie entscheiden, welche Probenvorbereitungsmethoden am besten für Ihre Zielanalyten geeignet sind. Viele Methoden sind schwierig, arbeits- oder zeitaufwändig und können unter Umständen trotzdem bei der Wiederfindung von Verbindungen und in Bezug auf Matrixinterferenzen Probleme bereiten. Eine allgemeine Anforderung an die Probenvorbereitung ist ein möglichst einfaches Protokoll mit wenigen Schritten. Die Probenaufreinigung hat die effiziente Entfernung von Matrixinterferenzen und die Minimierung der Auswirkungen auf die Wiederfindung einer Vielzahl unterschiedlicher Analyten zum Ziel.

Tabelle 1: Vergleich einer herkömmlichen PPT (96-Wellplate) durch Zentrifugation mit einer Aufreinigung mit Agilent Captiva EMR–Lipid (96-Wellplate) und PPT durch Filtration.

Herkömmliche PPT (96-Wellplate) (Zentrifugation)			PPT + Aufreinigung mit Captiva EMR–Lipid (96-Wellplate) (Filtration)		
Schritt	Benötigte Zeit (min)	Benötigte Verbrauchsmaterialien	Schritt	Benötigte Zeit (min)	Benötigte Verbrauchsmaterialien
Plattenetikettierung und Probenaliquotierung	30	96 Spitzen (klein) 1 Sammelplatte	Plattenetikettierung und Probenaliquotierung	30	96 Spitzen (klein) 1 Sammelplatte 1 EMR–Lipid-Platte
Zugabe des internen Standards	5	1 Mehrkanalpipettenspitze	Zugabe des internen Standards	5	1 Mehrkanalpipettenspitze
Probenmischung	2	Abdeckung der Platte	Probenmischung	2	Abdeckung der Platte
Zugabe des Fällungslösemittels	5	1 Mehrkanalpipettenspitze	Zugabe des Fällungslösemittels	5	1 Mehrkanalpipettenspitze
Probenmischung	5	Abdeckung der Platte	Probenmischung	5	Abdeckung der Platte nur für aktives Mischen erforderlich
Zentrifugation	10		Filtration	10	
Transfer des Überstands, Etikettierung der Sammelplatte	30	96 Spitzen (mittel) 1 Sammelplatte	Probennachbehandlung	Unterschiedlich	1 Plattenmatte
Probennachbehandlung	Unterschiedlich	1 Plattenmatte			
Benötigte Gesamtzeit für die Probenvorbereitung	87 Minuten vor der Nachbehandlung		Benötigte Gesamtzeit für die Probenvorbereitung	57 Minuten vor der Nachbehandlung (~30 % Zeiteinsparung)	
Laufzeit des Geräts und Lösemittelverbrauch	100 %		Laufzeit des Geräts und Lösemittelverbrauch	<90 % (Einsparung von mindestens 10 % der Zeit und des Lösemittelverbrauchs)	
Matrixentfernung	Nur Proteine		Matrixentfernung	Proteine und Lipide	

Stellen Sie sich vor, Sie müssten Ihre relevanten Verbindungen in einer großen Anzahl von Matrixkomponenten identifizieren, wie im GC-Full-Scan-Chromatogramm eines Avocadoextrakts

ohne Nachbehandlung (schlecht), mit C18-Aufreinigung (nicht gut genug) und mit EMR-Lipid-Aufreinigung (optimal) in Abbildung 5 gezeigt.

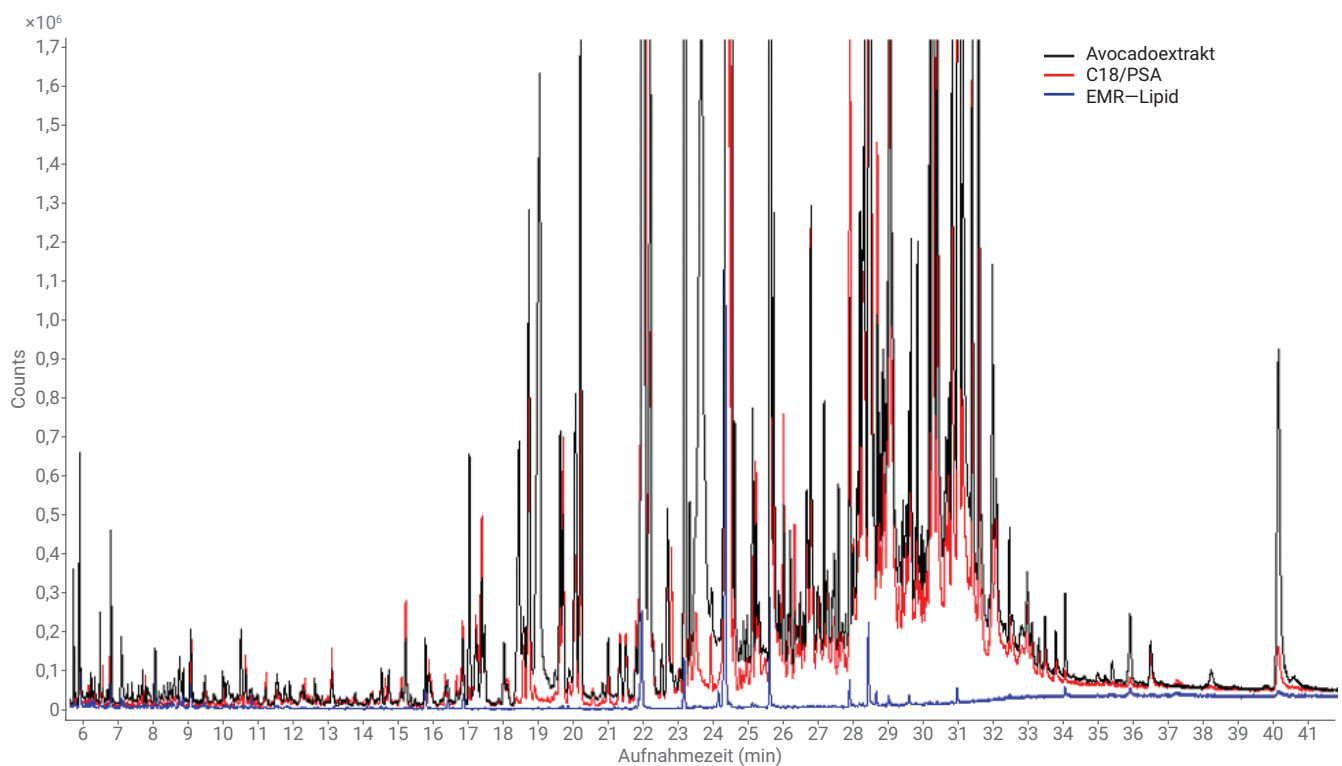


Abbildung 5: GC/MS-Full-Scan-Chromatogramm, überlagerte Darstellung von unbehandeltem QuEChERS-Avocado-Extrakt (schwarz), herkömmlicher C18/PSA-Aufreinigung (rot) und einem mit Agilent EMR-Lipid behandelten Extrakt (blau).

Lipide können eine erhebliche Matrix-Ionensuppression verursachen und zu einer geringeren Nachweisempfindlichkeit und einer schlechten Reproduzierbarkeit der Methode führen. Phospholipide in biologischen Matrices sind aufgrund des erheblichen Matrixeffekts, den sie verursachen, immer heikel. Abbildung 6 zeigt, dass eine Probe mit der Aufreinigung durch Captiva EMR-Lipid bei der Analyse von Vitamin-D-Metaboliten eine deutlich höhere Response der Analyten und bessere relative Standardabweichungen hat als eine Probe, bei der nur eine Proteinpräzipitation durchgeführt wurde.

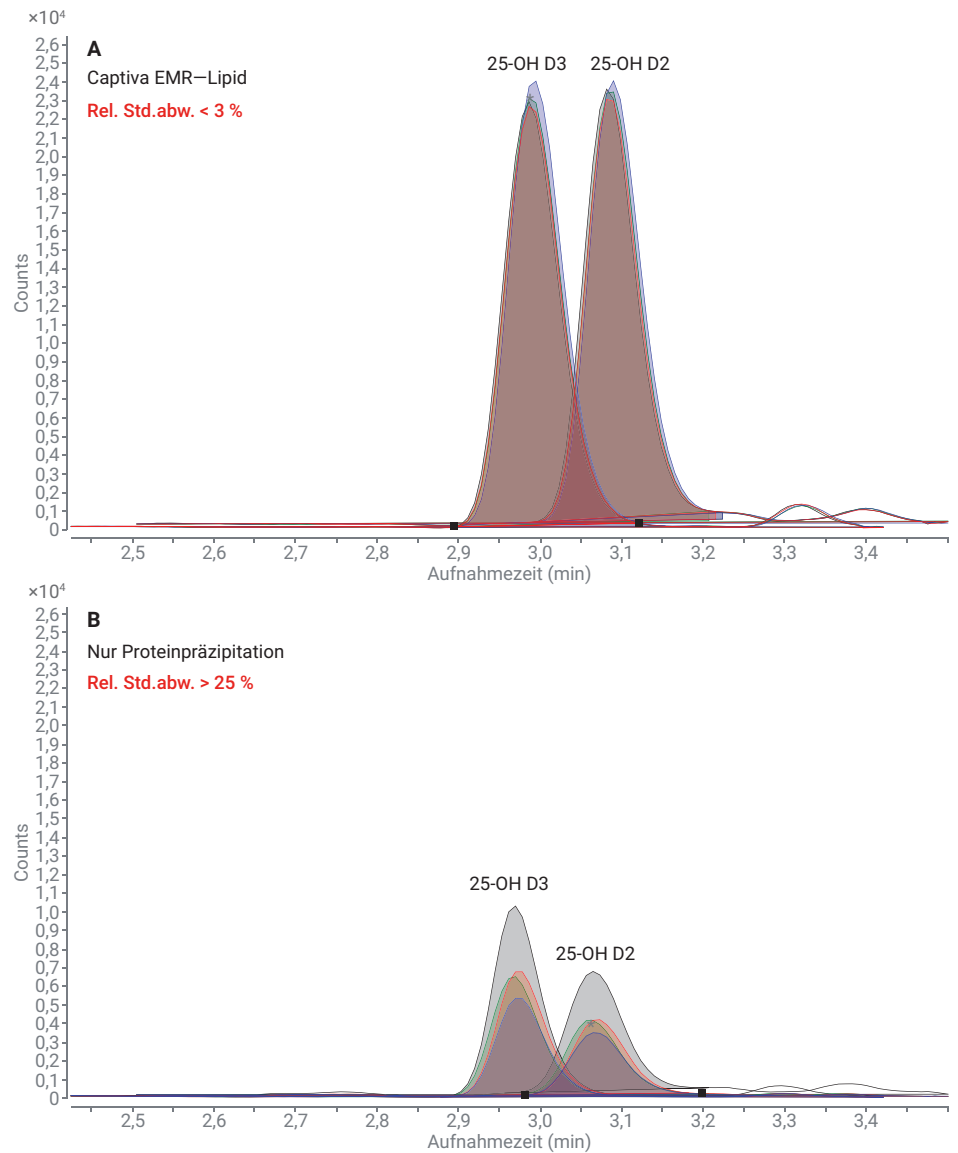


Abbildung 6: Vergleich der Response der Analyten und der Werte für die relative Standardabweichung zwischen der ausschließlichen Durchführung einer PPT und der Matrixentfernung mit EMR-Lipid und PPT.

Da die Lipide nun wirksam entfernt werden, stellt sich die Frage, ob und wie die Analyse beschleunigt werden kann.

Durch den Einsatz von Captiva EMR–Lipid können Sie nicht nur die Zuverlässigkeit der analytischen

Methode und die Datenqualität verbessern, sondern auch die Analysendauer reduzieren und Ihre Laborproduktivität erhöhen. Die Chromatogramme in Abbildung 7 zeigen, dass durch die ausreichende Entfernung der Phospholipide vor der Probenzuführung keine Notwendigkeit mehr besteht, darauf zu warten, dass diese hydrophoben Verbindungen in der Reversed-Phase-Chromatographie eluieren: Das spart wertvolle Gerätezeit.

Dank einer saubereren Probe können Sie Analysen schneller durchführen und das System muss nicht annähernd so häufig gespült werden. Eine sauberere Probe bedeutet auch, dass Sie zwischen den geplanten vorbeugenden Wartungsterminen mehr Proben analysieren können. Das bedeutet einen höheren Probendurchsatz mit der aktuellen Laborkapazität. Und das bedeutet wiederum einen höheren Gesamt-Probendurchsatz und ein besseres wirtschaftliches Ergebnis für Ihr Labor.

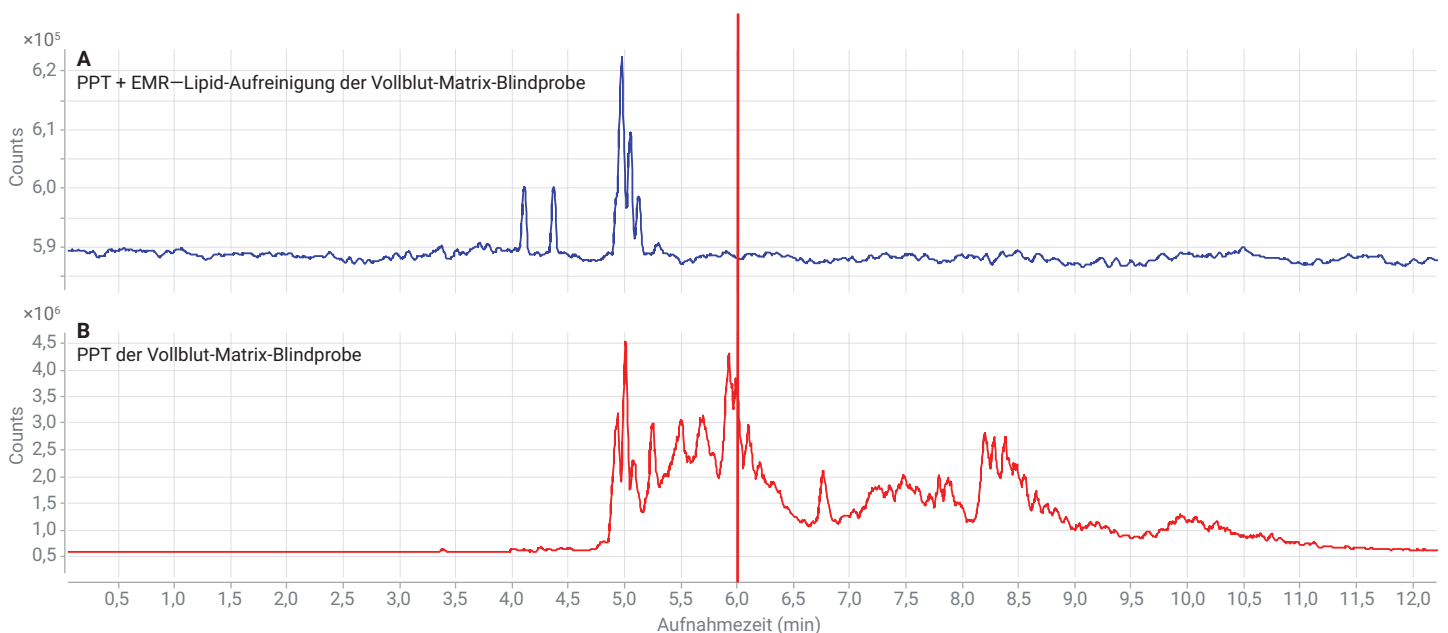


Abbildung 7: Vergleich des Phospholipidprofils in der Matrix-Blindprobe zum Nachweis der Machbarkeit kürzerer Zykluszeiten.

Schlussfolgerungen

Warum ist die Probenaufreinigung so wichtig? Weil komplexe Proben viele problematische Matrixkomponenten, wie z. B. Lipide, Proteine, Salze, Pigmente und so weiter enthalten. Lipide gehören aus verschiedenen Gründen zu den problematischsten Matrixkomponenten.

Die Vorteile eines besseren Arbeitsablaufs für die Probenvorbereitung im Vergleich zu einer Probenvorbereitung, die gut genug ist, liegen darin, dass Sie die Betriebszeit der Geräte steigern, die Arbeitszeit Ihrer Mitarbeiter im Labor verkürzen und gegebenenfalls die Analysendauer der Chromatographie reduzieren, sodass täglich mehr Proben analysiert werden. Die eigentliche Ursache für die Notwendigkeit kurzfristiger Wartungsmaßnahmen liegt in der Matrix-Kontamination begründet. Wenn Sie die Matrix umfassender entfernen,

verlängert sich die Zeit zwischen den Wartungsmaßnahmen. Hierfür muss weder die SOP geändert werden, noch ist mehr Zeit für den Arbeitsablauf erforderlich. Ohne Probenvorbereitung erkennen Sie die relevanten Peaks für eine genaue Quantifizierung möglicherweise nicht deutlich genug. Oder Sie sehen die relevanten Peaks überhaupt nicht. All diese Effekte verlängern die für die Datenauswertung erforderliche Zeit und führen dazu, dass eine größere Anzahl an Proben oder Serien aufgrund schlechter Datenqualität wiederholt werden müssen.

Mehr Infos zu Agilent Captiva EMR–Lipid

www.agilent.com/chem/Captiva-EMR-Lipid



Aufreinigung mit Agilent Captiva EMR–Lipid

Mehr Infos zur Produktivitätssteigerung mit Agilent Probenvorbereitung

www.agilent.com/chem/did-you-know

Empfohlene Application Notes

1. Quantitative Determination of Drugs of Abuse in Human Whole Blood by LC/MS/MS, *Application Note von Agilent Technologies*, Publikationsnummer 5991-9251EN.
2. Protein Precipitation for Biological Fluid Samples Using Captiva EMR–Lipid 96-Well Plates, *Application Note von Agilent Technologies*, Publikationsnummer 5991-9222EN.
3. Quantitative LC/MS/MS Analysis of Drugs in Human Serum with Agilent Captiva EMR–Lipid Cleanup, *Application Note von Agilent Technologies*, Publikationsnummer 5991-8007EN.
4. Vitamin D Metabolite Analysis in Biological Samples Using Agilent Captiva EMR–Lipid, *Application Note von Agilent Technologies*, Publikationsnummer 5991-7956EN.
5. Multiclass Multiresidue Veterinary Drug Analysis in Beef, *Application Note von Agilent Technologies*, Publikationsnummer 5991-8598EN.

Interessiert an der Analyse von Veterinär-Arzneimitteln? Sie finden den Artikel im Journal of Chromatography A.

Multiclass multiresidue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Band 1549, 14-24.

www.agilent.com/chem/sampleprep

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Gedruckt in den USA, 6. August 2018
5994-0110DEE