

La tua “adeguata” preparazione del campione è davvero adeguata?

I lipidi e i pericoli nascosti di una rimozione non ottimale della matrice

Introduzione

Nel corso degli anni hai ridisegnato il flusso di lavoro del tuo laboratorio per ottimizzarne la gestione e l'efficienza. La diffusione dei metodi di precipitazione delle proteine (PPT) per la preparazione di campioni biologici e della tecnica QuEChERS per la preparazione dei campioni alimentari li rende ottimi esempi di come sia possibile effettuare complesse preparazioni del campione con un approccio semplificato. Se ti chiedessero di descrivere il tuo flusso di lavoro oggi, molto probabilmente diresti che è adeguato per i tuoi scopi. Ma queste “adeguate” strategie di preparazione del campione sono davvero adeguate?

Il flusso di lavoro del tuo laboratorio si trova ad affrontare molte situazioni problematiche e ti viene continuamente richiesto di migliorare i valori di efficienza o di produttività. Un tipico flusso di lavoro include le fasi di raccolta del campione, preparazione del campione, inserimento nello strumento, analisi, revisione dei dati e infine reporting, dove la preparazione del campione è da sempre stata ritenuta la fase di strozzatura che limita la velocità di processo. L'attuale strumentazione avanzata migliora notevolmente la tua capacità di analizzare vari campioni, tenendo conto della sensibilità, della selettività, dell'affidabilità e della praticità richieste nelle analisi di campioni complessi. La fase di preparazione del campione è stata pertanto minimizzata per ridurre tempi, costi e complessità e favorirne l'universale applicabilità, il che l'ha ridotta a un livello appena sufficiente.

Il flusso di lavoro più importante è il tuo. Una preparazione del campione non ottimale può nascondere diversi pericoli, quali gli sprechi di tempo, i problemi di manutenzione o i guasti degli strumenti e l'inaccuratezza dei dati, che possono insorgere influenzando la buona riuscita complessiva del tuo lavoro. Questi pericoli nascosti possono essere eliminati o considerevolmente ridotti mediante opportune strategie di preparazione del campione per il tuo flusso di lavoro. Questi miglioramenti possono essere realizzati senza che sia necessario formare nuovamente il tuo personale di laboratorio, effettuare grandi investimenti di capitale o riscrivere le tue procedure operative standard (SOP).

In questo White Paper evidenzieremo alcune note interferenze dei campioni che ti trovi ad affrontare ogni giorno e identificheremo alcuni ostacoli nascosti meno conosciuti che potresti incontrare se non ottimizzi la rimozione della matrice nel tuo flusso di lavoro per la preparazione del campione. Oltre a informarti sulle conseguenze note e non note, ti presenteremo un'innovativa soluzione per migliorare la tua produttività, potenziare l'efficienza tecnica e ridurre il rischio di contaminazione della tua strumentazione analitica. Questa soluzione può migliorare i livelli di recupero e riproducibilità senza modificare drasticamente le tue SOP, sacrificare la produttività o aumentare la complessità del tuo flusso di lavoro. Ed è proprio così che dovrebbe essere la tua definizione di "adeguata" preparazione del campione.

Perché tutti effettuano la purificazione del campione?

I due motivi principali per effettuare la preparazione del campione sono:

- rimuovere la matrice indesiderata;
- concentrare gli analiti di interesse.

In questo White Paper esamineremo gli inconvenienti più o meno evidenti a cui si va incontro se non vengono effettuate le operazioni di rimozione della matrice nel modo più efficiente possibile.

I componenti indesiderati della matrice, se non trattati o adeguatamente rimossi, possono contaminare il tuo percorso di flusso. Per le analisi GC, GC/MS e GC/MS/MS, i co-estratti non volatili della matrice possono avere effetti negativi sui componenti del GC, come iniettore, guarnizione dorata e colonna (Figura 1).



Figura 1. Contaminazione di componenti del sistema GC a seguito di una routine di preparazione del campione "sufficiente".

Per le analisi LC, LC/MS e LC/MS/MS, i particolati e i sali della matrice possono danneggiare la valvola, il filtro in linea e la colonna per LC. I co-estratti della matrice possono comportare una significativa soppressione ionica in sorgente MS (Figura 2) e conseguenti effetti negativi sull'affidabilità del metodo. Anche se la maggior parte dei chimici analitici filtra i propri campioni prima di iniettarli nei sistemi per evitare questo pericolo noto e anche se la filtrazione è un ottimo metodo per minimizzare l'effetto matrice del particolato, rimane il problema della matrice disciolta indesiderata: dove va a finire quest'ultima se ci si limita alla filtrazione?

La Figura 2 mostra che la mancata rimozione dei co-estratti indesiderati disciolti nella matrice, che possono essere sali, pigmenti, proteine, lipidi e così via, può avere effetti negativi sull'hardware analitico.

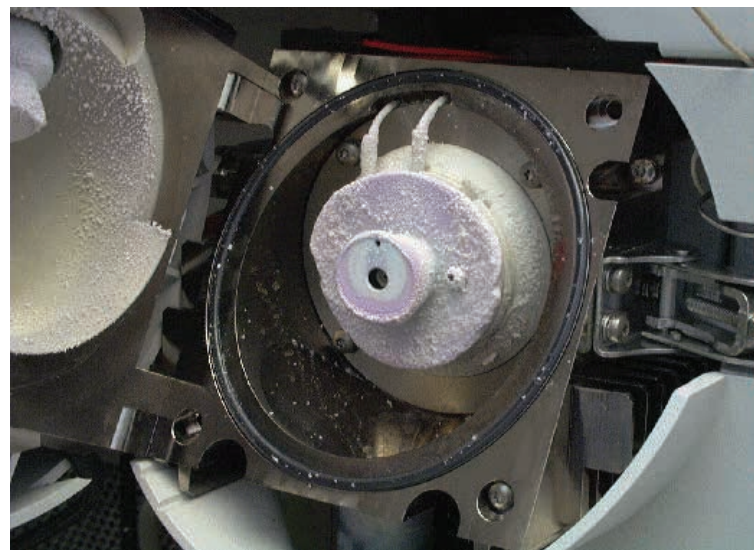


Figura 2. Accumulo di sali in una sorgente ionica per LC/MS dovuto ai sali non rimossi tramite una routine di preparazione del campione "sufficiente".

Grazie alla sua elevata sensibilità e selettività, la spettrometria di massa è il metodo analitico preferenziale per una vasta gamma di applicazioni. Tuttavia, la soppressione ionica o l'incremento ionico causato dai componenti della matrice hanno un effetto negativo sull'accuratezza, la precisione e l'affidabilità (come evidenziato dagli elevati valori di deviazione standard relativa o RSD). L'infusione post-colonna è una tecnica che identifica la soppressione ionica o l'incremento ionico causati dalla matrice e la Figura 3 mostra una tipica configurazione per un esperimento di questo tipo (si veda la Nota applicativa 5991-8007EN³).

Effettuando questo studio comparativo potresti scoprire che la tua "adeguata" preparazione del campione potrebbe non essere abbastanza efficiente. La soluzione Agilent per la preparazione del campione può aiutarti a rendere la tua "adeguata" preparazione del campione più efficiente e affidabile.

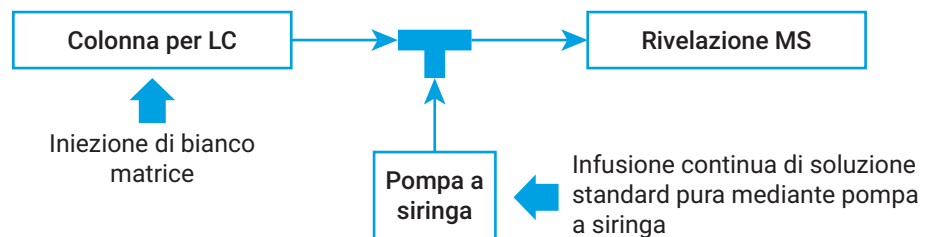


Figura 3. Diagramma della configurazione di un'infusione post-colonna di standard per la valutazione e lo studio comparativo della soppressione ionica.

Quanto è grave l'effetto dei lipidi?

Tra tutti i co-estratti della matrice dei campioni, la componente più problematica ma spesso più controllata potrebbe essere quella lipidica, per via della difficoltà nel rimuoverla in modo efficiente e del fatto che l'accumulo risulta fisicamente invisibile. Effettuando un esperimento di infusione post-colonna (come mostrato in Figura 3) è possibile valutare gli effetti della matrice sul segnale MS, per esempio siero o plasma, mediante infusione continua di bianco matrice. Qualsiasi variazione dell'intensità del segnale può indicare la presenza di sostanze provenienti dalla matrice che provocano soppressione ionica o incremento ionico.

Gli esempi (zone 2 e 3 della Figura 4) mostrano il drastico effetto che i lipidi possono avere sulla qualità dei dati. La

precipitazione delle proteine, benché efficiente nella rimozione abbondante delle proteine nelle matrici biologiche, non rimuove i fosfolipidi, che possono provocare una significativa soppressione ionica. (si veda la Nota applicativa 5991-8007EN³).

La cattiva qualità dei dati ha come conseguenza una significativa riduzione della produttività complessiva del laboratorio.

Di seguito sono elencati alcuni degli effetti che possono impattare la tua produttività, causati da una cattiva rimozione della matrice nelle analisi LC/MS/MS o GC/MS/MS.

Affidabilità dei metodi e qualità dei dati

- Sensibilità e selettività dei metodi inaccettabili
- Linearità della calibrazione inaccettabile
- Scarsa accuratezza e precisione dei metodi
- Difficoltà di identificazione e di integrazione dei picchi

Applicabilità dei metodi

- Incremento del tempo necessario per lo sviluppo e l'ottimizzazione dei metodi
- Maggiori numero di problemi da risolvere sui metodi
- Rivelazione variabile a seconda della matrice
- Maggior numero di ripetizioni di analisi del campione

Pulizia dello spettrometro di massa

- Pulizia della sorgente dello spettrometro di massa più frequente
- Pulizia o sostituzione del capillare più frequenti
- Perdita della capacità di raggiungere o di mantenere i livelli di vuoto
- Problematiche aggiuntive da risolvere

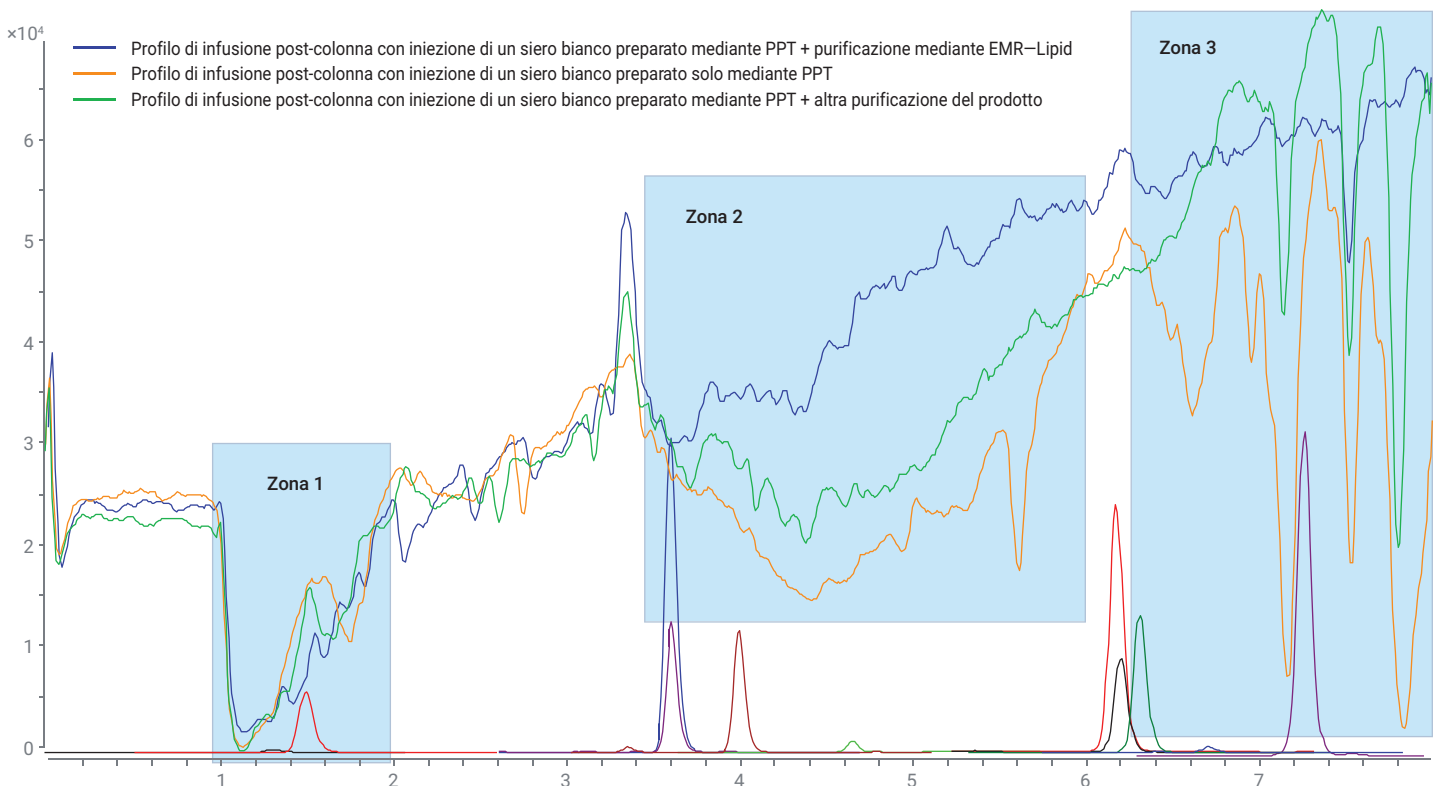


Figura 4. Confronto tra profili di infusione post-colonna di standard e dimostrazione della soppressione ionica sugli analiti target.

Accumulo di lipidi sulla colonna

- Minore durata delle colonne per LC e GC per scopi di analisi
- Manutenzione dell'iniettore del GC più frequente
- Taglio della colonna per GC più frequente
- Contropressione della colonna per LC
- Lavaggio ed equilibratura del sistema più frequenti
- Tempi di analisi più lunghi

Anche se esistono metodi per la rimozione dei lipidi, gli attuali metodi per la purificazione del campione spesso sacrificano il recupero degli analiti, rimuovendo alcuni degli analiti target insieme ai lipidi. Molti analisti hanno imparato a convivere con questa situazione effettuando una maggiore manutenzione, sostituendo i prodotti di consumo con maggiore frequenza o implementando tecniche di preparazione del campione più complete. Quest'ultima soluzione consente di migliorare la qualità dei dati ma incrementa in modo significativo i costi, il tempo e l'esperienza richiesta, con conseguente riduzione della produttività.

Perché effettuare una preparazione del campione semplicemente "sufficiente" non è una soluzione praticabile?

Per generare dati di migliore qualità e migliorare in modo significativo la produttività, è opportuno utilizzare una metodologia migliore e più semplice per la rimozione dei lipidi e della matrice in generale. A questo scopo, Agilent ha sviluppato Captiva EMR–Lipid, che purifica i campioni in modo efficace tramite un flusso di lavoro semplificato. L'approccio di Captiva EMR–Lipid è semplice e universalmente applicabile per la riduzione degli effetti di matrici a base lipidica con un buon recupero degli analiti.

Di fronte a campioni complessi e problematici, come nel caso di matrici alimentari o biologiche, devi decidere quale tecnica di preparazione del campione sarà più efficace per i tuoi analiti target. Molte tecniche sono difficili, laboriose o lunghe e potrebbero comunque presentare problemi per quanto riguarda il recupero dei composti e le interferenze dovute alla matrice. Un requisito comune per i protocolli di preparazione del campione è che siano più semplici e che prevedano meno fasi. La purificazione del campione deve rimuovere efficacemente le interferenze dovute alla matrice e minimizzare gli effetti sui livelli di recupero per una grande varietà di analiti.

Tabella 1. Confronto tra PPT tradizionale su piastra basata su centrifugazione (piastra a 96 pozzetti) e PPT basata su filtrazione con purificazione mediante Agilent Captiva EMR–Lipid (piastra a 96 pozzetti).

PPT tradizionale (piastra a 96 pozzetti) (Centrifugazione)			PPT + purificazione mediante Captiva EMR–Lipid (piastra a 96 pozzetti) (Filtrazione)		
Fase	Tempo necessario (min)	Prodotti di consumo necessari	Fase	Tempo necessario (min)	Prodotti di consumo necessari
Marcatura piastre e aliquotazione campioni	30	96 puntali (misura piccola) 1 piastra di raccolta	Marcatura piastre e aliquotazione campioni	30	96 puntali (misura piccola) 1 piastra di raccolta 1 piastra EMR–Lipid
Aggiunta standard interno	5	1 puntale da ripetitore	Aggiunta standard interno	5	1 puntale da ripetitore
Miscelazione campione	2	Coperchio della piastra	Miscelazione campione	2	Coperchio della piastra
Aggiunta solvente deproteinizzante	5	1 puntale da ripetitore	Aggiunta solvente deproteinizzante	5	1 puntale da ripetitore
Miscelazione campione	5	Coperchio della piastra	Miscelazione campione	5	Coperchio della piastra necessario solo per miscelazione attiva
Centrifugazione	10		Filtrazione	10	
Trasferimento surnatante, marcatura piastra di raccolta	30	96 puntali (misura media) 1 piastra di raccolta		Variabile	1 coperchio a tenuta per piastra
Post trattamento del campione	Variabile	1 coperchio a tenuta per piastra	Post trattamento del campione		
Tempo totale per la preparazione del campione	87 minuti mediante post trattamento		Tempo totale per la preparazione del campione	57 minuti mediante post trattamento (tempo risparmiato ~30 %)	
Tempo utilizzo strumento e uso solvente	100 %		Tempo utilizzo strumento e uso solvente	<90 % (risparmio di almeno 10 % su tempo e uso solvente)	
Rimozione della matrice	Solo proteine		Rimozione della matrice	Proteine e lipidi	

Immagina di voler identificare i tuoi composti di interesse tra una miriade di componenti della matrice, come mostrato in Figura 5 dal cromatogramma GC in full scan di un estratto di avocado

nel caso di nessun post trattamento (qualità scarsa), nel caso di purificazione C18 (qualità non sufficiente) e nel caso di purificazione mediante EMR-Lipid (qualità ottimale).

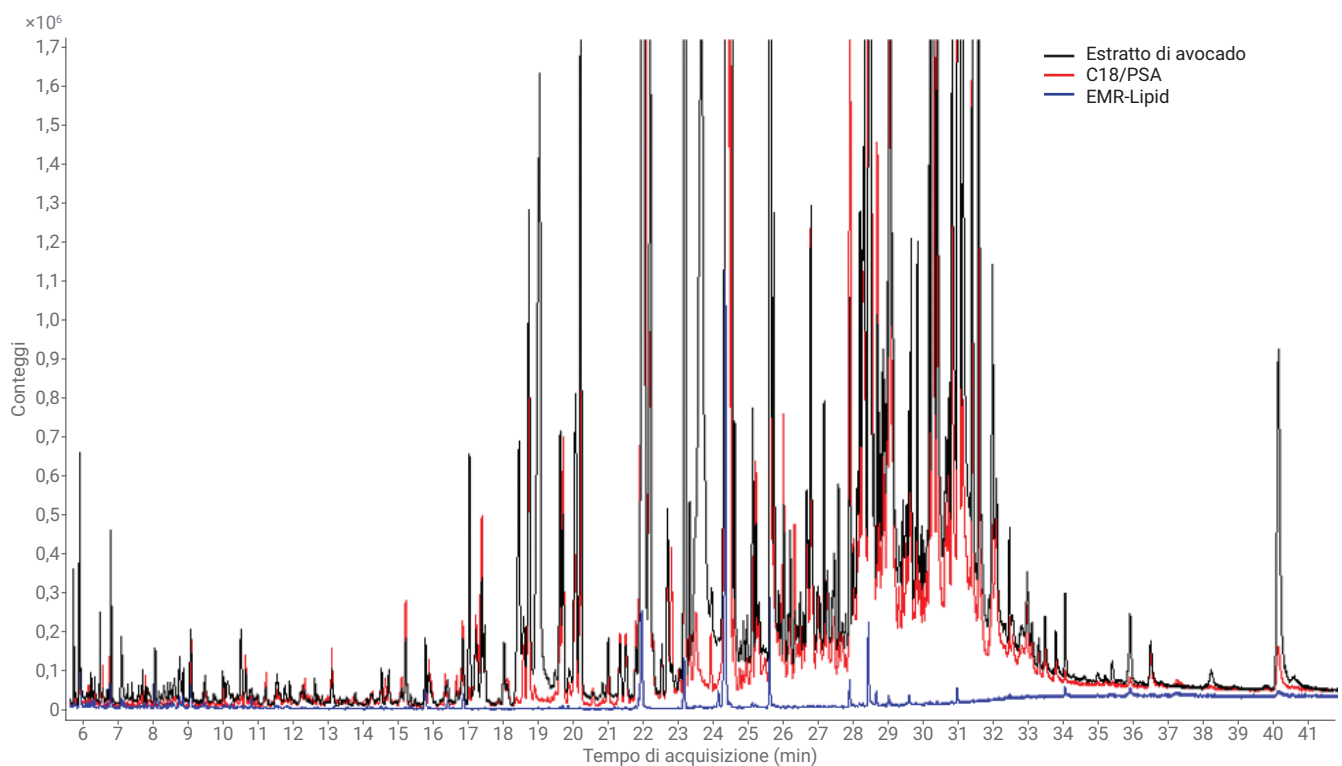


Figura 5. Sovrapposizione di cromatogrammi GC/MS in full scan: confronto tra un estratto QuEChERS di avocado non trattato (nero), trattato con purificazione tradizionale C18/PSA (rosso) e trattato con Agilent EMR-Lipid (blu).

I lipidi possono provocare una significativa soppressione ionica della matrice e comportare una minore sensibilità di rivelazione e una scarsa riproducibilità del metodo. I fosfolipidi nelle matrici biologiche sono sempre problematici a causa del loro forte effetto matrice. La Figura 6 mostra che un campione purificato mediante Captiva EMR-Lipid presenta una risposta degli analiti nettamente superiore e migliori valori di RSD rispetto a un campione sottoposto solo a PPT nell'analisi dei metaboliti della vitamina D.

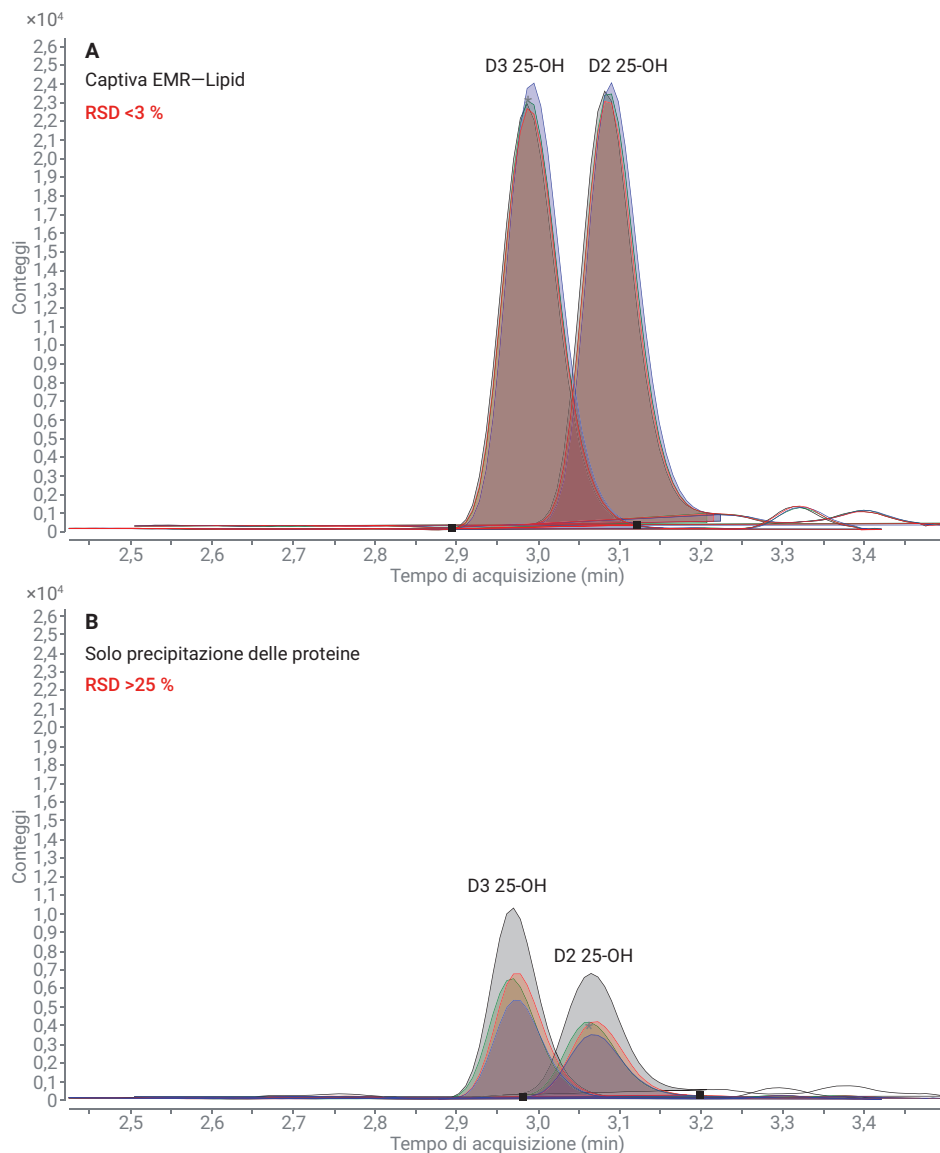


Figura 6. Confronto tra la risposta degli analiti e il valore RSD nel caso di sola PPT e nel caso di PPT con EMR-Lipid.

Ora che siamo in grado di rimuovere efficacemente i lipidi, cosa si può fare per rendere l'analisi più veloce?

Con Captiva EMR—Lipid non solo sarai in grado di migliorare l'affidabilità dei metodi analitici e la qualità dei dati, ma potrai anche ridurre il tempo di analisi e migliorare

la produttività del tuo laboratorio. Il grafico della Figura 7 mostra che, se i fosfolipidi sono stati sufficientemente rimossi prima dell'introduzione del campione, non è necessario attendere l'eluizione di questi composti idrofobici in cromatografia a fase inversa, il che comporta un prezioso risparmio di tempo nell'utilizzo dello strumento.

Grazie alla maggiore purezza del campione, l'analisi può essere più veloce e non sarà necessario effettuare

il lavaggio del sistema con altrettanta frequenza. La maggiore purezza del campione implica inoltre che sarà possibile analizzare più campioni tra un intervento di manutenzione preventiva programmata e il successivo. Ciò significa un maggior numero di campioni analizzati con l'attuale capacità del tuo laboratorio; quindi una maggiore produttività in termini di campioni analizzati e una migliore resa economica del tuo laboratorio.

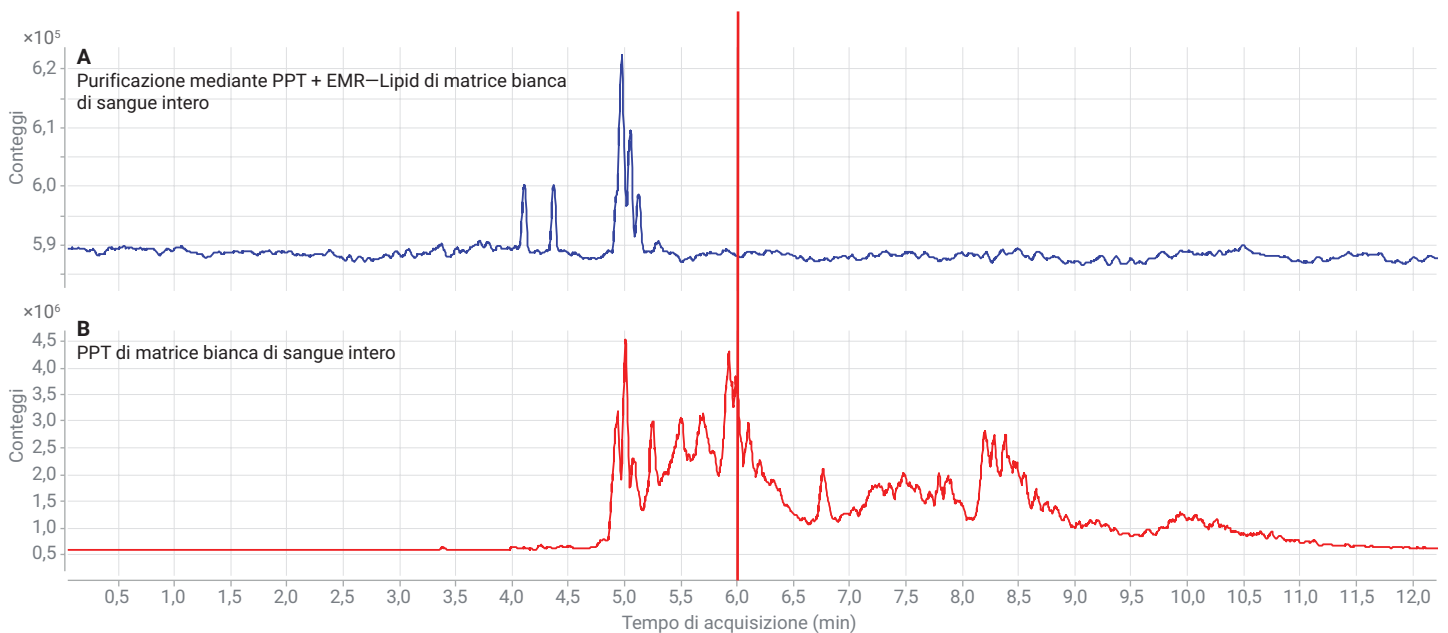


Figura 7. Confronto tra profili di fosfolipidi in matrici bianche per dimostrare la fattibilità di un ciclo più breve.

Conclusioni

Perché la purificazione del campione è così importante? Perché i campioni complessi contengono molti composti problematici in matrice, tra cui lipidi, proteine, sali, pigmenti e così via. I lipidi sono una delle componenti più problematiche della matrice per diversi motivi.

I vantaggi nell'utilizzare un migliore flusso di lavoro per la preparazione del campione anziché uno considerato "sufficiente" consistono in un incremento del tempo di operatività dello strumento, in una riduzione del tempo di lavoro al banco degli analisti nel tuo laboratorio e in una potenziale riduzione del tempo di analisi cromatografica, che consentono di analizzare un maggior numero di campioni ogni giorno. La principale causa che impone di effettuare tempestivamente la manutenzione è la contaminazione della matrice. Rimuovendo una maggiore quantità di matrice si allunga l'intervallo

tra un intervento di manutenzione e il successivo. Ciò è possibile senza bisogno di modificare le tue SOP o di incrementare la durata del tuo flusso di lavoro. Senza la preparazione del campione, potresti non vedere i picchi di interesse in modo sufficientemente chiaro per poterli quantificare accuratamente. Di fatto, potresti addirittura non vedere affatto i picchi di interesse. Tutti questi effetti possono aumentare il tempo necessario per l'elaborazione dei dati e possono comportare un aumento del numero di ripetizioni delle analisi dei campioni o di interi lotti a causa della scarsa qualità dei dati.

Scopri di più su Agilent Captiva EMR—Lipid

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



Purificazione mediante Agilent Captiva EMR—Lipid

Scopri di più sul guadagno di produttività grazie alle tecniche di preparazione del campione di Agilent

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

Note applicative consigliate

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

Sei interessato all'analisi di farmaci veterinari? Puoi consultare anche l'articolo pubblicato in *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*, Volume 1549, 14-24.

www.agilent.com/chem/sampleprep

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabili per procedure diagnostiche.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Stampato negli Stati Uniti, 6 agosto 2018
5994-0110ITE