

Seu preparo de amostras "bom o suficiente" é realmente bom o suficiente?

Lipídios e os perigos ocultos da remoção subótima de matriz

Introdução

Ao longo dos anos, você refinou o fluxo de trabalho do seu laboratório para ser o mais gerenciável e eficiente possível. A popularidade da precipitação de proteínas (PPT) para o preparo de amostras biológicas e QuEChERS para o preparo de amostras alimentares são ótimos exemplos de como o preparo de amostras pode ser complicado quando realizado com uma abordagem simplificada. Se fosse solicitado a descrever o seu fluxo de trabalho atualmente, provavelmente diria que seu fluxo de trabalho é bom o suficiente para realizar o trabalho. Mas essas táticas de preparo de amostras são realmente boas o suficiente?

O fluxo de trabalho de seu laboratório enfrenta muitos desafios e você está constantemente sendo solicitado a melhorar as métricas de eficiência ou rendimento. Um fluxo de trabalho típico compreende coleta de amostras, preparo de amostras, introdução ao instrumento, análise, revisão de dados e, por fim, relatórios de dados, em que o preparo de amostras sempre foi considerado o obstáculo e a etapa mais morosa. A instrumentação avançada atual aumenta consideravelmente sua capacidade de analisar várias amostras, considerando a sensibilidade, seletividade, confiabilidade e viabilidade exigidas dos testes de amostras complexas. Portanto, a etapa de preparo de amostras foi minimizada para reduzir o tempo, o custo e a complexidade, melhorar a aplicabilidade universal e foi reduzida a ser apenas boa o suficiente.

O fluxo de trabalho mais importante é seu. Há vários perigos ocultos no preparo subótimo de amostras, como tempo perdido, problemas de manutenção/falha do instrumento e dados imprecisos, que podem surgir e afetar seu sucesso geral. Esses perigos ocultos podem ser eliminados ou consideravelmente minimizados por estratégias adequadas de fluxo de trabalho de preparo de amostras. Essa melhoria pode ser realizada sem a necessidade de treinar seu cientista novamente, fazer grandes investimentos ou ter de reescrever seus Procedimentos operacionais padronizados (SOPs).

Esta documentação técnica descreve algumas das interferências de amostra conhecidas que você enfrenta diariamente e identifica alguns obstáculos ocultos menos conhecidos que podem ser encontrados caso não otimize a remoção de matrizes no fluxo de trabalho de preparo de amostras. Além disso, ao aprender sobre as consequências conhecidas e desconhecidas, você também será apresentado a uma nova solução de modo a melhorar sua produtividade, aprimorar a eficiência do técnico e diminuir o risco de contaminação de sua instrumentação analítica. Isso pode melhorar a recuperação e reprodutibilidade sem ter de alterar drasticamente seu SOP, sacrificar o rendimento ou adicionar complexidade ao seu fluxo de trabalho. Agora, essa deve ser a sua definição de preparo de amostras bom o suficiente!

Por que realizamos a limpeza de amostras?

As duas principais razões para realizar o preparo de amostras são:

- Remover a matriz indesejada
- Concentrar os analitos de interesse

Esta Documentação técnica analisa as armadilhas óbvias e menos óbvias relacionadas à não execução das tarefas de remoção de matrizes de modo eficaz.

Componentes de matriz não desejados, quando ignorados ou não removidos adequadamente, podem contaminar sua trajetória de fluxo. Para análises de GC, GC/MS e GC/MS/MS, os coextrativos não voláteis da matriz podem ter um impacto prejudicial nos componentes de fluxo de GC, como o injetor, o selo de ouro e a coluna (Figura 1). Para análise



Figura 1. Contaminação de componentes do sistema GC a partir de uma rotina de preparo de amostras "boa o suficiente".

de LC, LC/MS e LC/MS/MS, as partículas e os sais da matriz podem danificar a válvula, o filtro on-line e a coluna de LC. Os coextrativos de matriz podem resultar em uma significativa supressão de íons na fonte de MS (Figura 2), e sequencialmente, impactos negativos na confiabilidade do método. Embora a maioria dos químicos analíticos filtre suas amostras antes de injetar nos sistemas de fluxo a fim evitar o perigo conhecido acima, e a filtração seja uma ótima maneira de minimizar o efeito da matriz particulada, e quanto à matriz indesejada dissolvida? Onde isso acaba se você apenas filtrar?

A Figura 2 mostra que a não remoção dos coextrativos da matriz indesejada dissolvida, que podem ser lipídios, proteínas, pigmentos, sais dissolvidos e assim por diante, pode ter efeitos prejudiciais em seu hardware analítico.

Devido à sua alta sensibilidade e seletividade, a espectrometria de massas é o método analítico preferencial para uma ampla gama de aplicações. No entanto, a supressão de íons ou o aprimoramento de íons causado por componentes da matriz tem um impacto negativo na exatidão, precisão e robustez (conforme indicado por altos Desvios padrões relativos, RSDs). A infusão pós-coluna é uma técnica que identifica a supressão de íons ou o aprimoramento de íons causado pela matriz, e a Figura 3 é uma configuração típica para esse experimento (consulte a Nota de aplicação 5991-8007EN³).

Se você realizar este estudo comparativo, poderá evidenciar que o preparo de amostras "bom o suficiente" pode não ter a eficiência necessária. A solução de preparo de amostras Agilent pode ajudar a tornar seu preparo de amostras "bom o suficiente" mais eficiente e confiável.

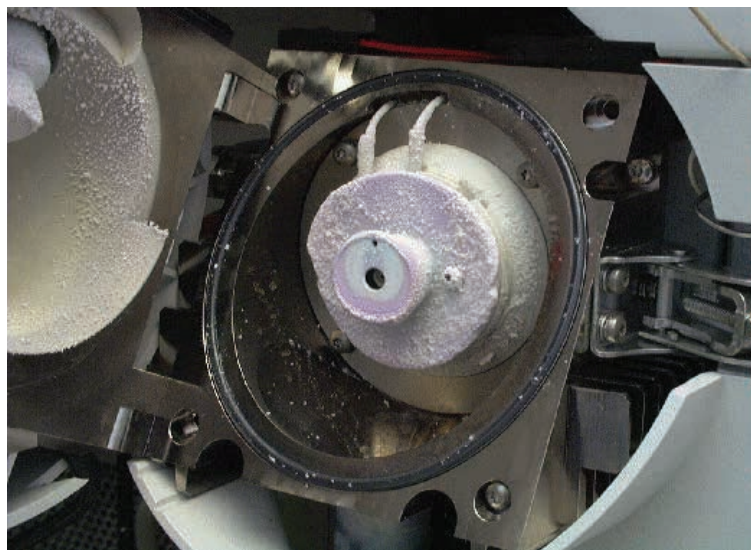


Figura 2. Acúmulo de sal em uma fonte de íons LC/MS devido a não remoção de sais em uma rotina de preparo de amostras "boa o suficiente".

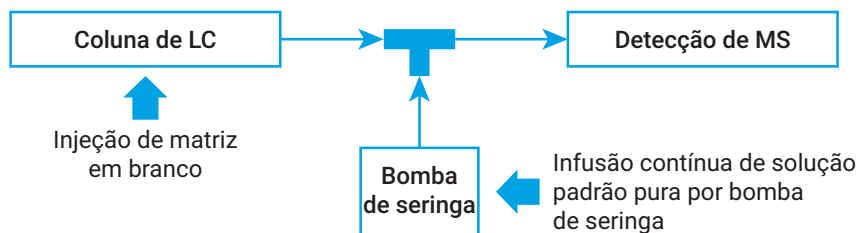


Figura 3. Diagrama de configuração de infusão pós-coluna padrão para o estudo de avaliação e comparação de supressão de íons de uma matriz.

Quão severo é o impacto dos lipídios?

De todos os coextrativos da matriz de amostra, o componente mais desafiador, mas geralmente deixado de lado, pode ser os lipídios, devido à dificuldade em removê-los adequadamente e à invisibilidade física de seu acúmulo.

Ao utilizar um experimento de infusão pós coluna (como mostrado na Figura 3), os efeitos da matriz no sinal MS, por exemplo, soro ou plasma, podem ser avaliados por infusão contínua da matriz em branco. Qualquer variação da intensidade do sinal pode indicar a presença de substâncias da matriz que causam supressão ou aumento de íons.

Os exemplos (zonas 2 e 3 na Figura 4) mostram a dimensão considerável do impacto dos lipídios na qualidade de seus dados. A precipitação de proteínas, embora seja eficiente na remoção

de proteínas abundantes na matriz biológica, não remove os fosfolipídios, o que pode causar uma supressão de íons significativa. (Consulte a Nota de aplicação 5991-8007EN³).

A consequência de dados insatisfatórios é uma redução significativa na produtividade geral do laboratório.

A seguir há uma lista de alguns dos efeitos que a má remoção de matrizes em sua análise de LC/MS/MS ou GC/MS/MS podem ter em sua produtividade:

Confiabilidade do método e qualidade dos dados

- Sensibilidade e seletividade do método inaceitáveis
- Linearidade de calibração inaceitável
- Baixa precisão e exatidão do método
- Identificação e integração de picos complexa

Aplicabilidade do método

- Maior tempo de desenvolvimento e otimização de métodos
- Maior necessidade de solução de problemas de métodos
- Detecção variável dependendo da matriz
- Mais reanálises das amostras

Limpeza do espectrômetro de massas

- Limpeza mais frequente da fonte de íons MS
- Limpeza ou substituição capilar mais frequente
- Perda da capacidade de estabelecer ou manter níveis de vácuo
- Solução de problemas adicionais



Figura 4. Comparação de perfis de infusão pós-coluna padrão e demonstração da supressão de íons da matriz em analitos-alvo.

Acúmulo de lipídios na coluna

- Vida útil de testes da coluna de LC e GC diminuída
- Manutenção do injetor de GC mais frequente
- Corte de coluna de GC mais frequente
- Pressão resultante da coluna de LC
- Lavagem ou equilíbrio mais frequente do sistema
- Tempos de corrida mais longos

Embora existam fluxos de trabalho para a remoção de lipídios, os métodos atuais de limpeza de amostras geralmente sacrificam a recuperação de analitos, removendo alguns dos analitos-alvo juntamente com os lipídios. Muitos analistas aprenderam a conviver com essa situação realizando mais manutenção, trocando os consumíveis com mais frequência ou implementando técnicas mais abrangentes de preparo de amostras. O último consegue melhorar a qualidade dos dados, mas aumenta significativamente o custo, o tempo e a experiência, o que, por sua vez, reduz a produtividade.

Por que apenas realizar um preparo de amostras "bom o suficiente" não é uma solução viável?

Para gerar dados de melhor qualidade e melhorar significativamente a produtividade, é desejável uma metodologia mais adequada e simples para a remoção de matriz lipídica e geral. Para atingir esses objetivos, a Agilent desenvolveu o Captiva EMR—Lipídios, que limpa as amostras de maneira eficaz com um fluxo de trabalho simplificado. A abordagem do Captiva EMR—Lipídios é simples e universalmente aplicável para a redução de efeitos da matriz de base lipídica com uma boa recuperação de analitos.

Quando confrontado com amostras complexas desafiadoras, como matrizes alimentares ou biológicas, você precisa decidir quais técnicas de preparo de amostras funcionarão melhor para seus analitos-alvo. Muitas técnicas são difíceis, trabalhosas ou demoradas e ainda podem apresentar problemas de recuperação de compostos e interferência de matriz. Um requisito comum no preparo de amostras é o uso de protocolos mais fáceis com menos etapas. A limpeza de amostras deve remover efetivamente as interferências da matriz e minimizar o impacto nas recuperações de uma grande diversidade de analitos.

Tabela 1. Comparação de PPT tradicional baseado em centrifugação (well plate de 96 poços) na placa versus PPT baseado em filtração com limpeza com Agilent Captiva EMR—Lipídios (Well plate de 96 poços).

PPT tradicional (well plate de 96 poços) (Centrifugação)			PPT + Limpeza com Captiva EMR—Lipídios (well plate de 96 poços) (Filtração)		
Etapa	Tempo necessário (min)	Consumíveis necessários	Etapa	Tempo necessário (min)	Consumíveis necessários
Rotulagem de placa e alíquota de amostra	30	96 ponteiras (tamanho pequeno) 1 Placa coletora	Rotulagem de placa e alíquota de amostra	30	96 ponteiras (tamanho pequeno) 1 Placa coletora 1 Placa EMR—Lipídios
Adição de padrão interno	5	1 Ponteira repetidora	Adição de padrão interno	5	1 Ponteira repetidora
Mistura de amostra	2	Tampa da placa	Mistura de amostra	2	Tampa da placa
Adição de solvente de precipitação (crashing solvent)	5	1 Ponteira repetidora	Adição de solvente de precipitação (crashing solvent)	5	1 Ponteira repetidora
Mistura de amostra	5	Tampa da placa	Mistura de amostra	5	Tampa da placa necessária apenas para mistura ativa
Centrifugação	10		Filtração	10	
Transferência de sobrenadante, rotulagem da placa coletora	30	96 ponteiras (tamanho médio) 1 Placa coletora		Variado	1 Tela de placa
Pós-tratamento de amostra	Variado	1 Tela de placa	Pós-tratamento de amostra		
Tempo total de prep. da amostra necessário	87 minutos por pós-tratamento		Tempo total de prep. da amostra necessário	57 minutos por pós-tratamento (~30% de economia de tempo)	
Tempo de corrida do instrumento e uso de solventes	100%		Tempo de corrida do instrumento e uso de solventes	<90% (economize pelo menos 10% de tempo e uso de solventes)	
Remoção de matrizes	Apenas proteínas		Remoção de matrizes	Proteínas e lipídios	

Imagine tentar identificar seus compostos de interesse em meio aos inúmeros componentes da matriz, como na Figura 5, na qual é mostrado um cromatograma de varredura completa

para GC do extrato de abacate sem pós-tratamento (ruim), limpeza C18 (não boa o suficiente) e limpeza com EMR-Lipídios (ótimo).

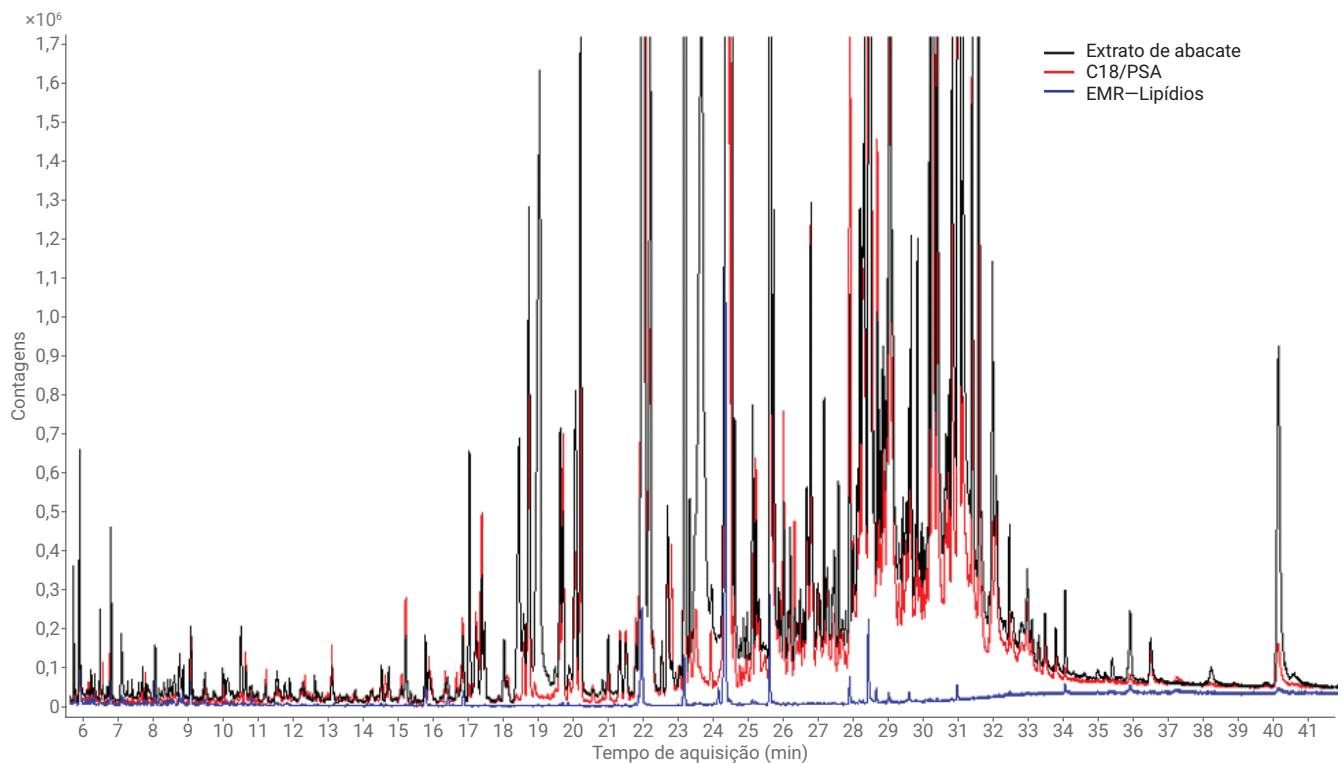


Figura 5. Sobreposição de cromatogramas de varredura completa para GC/MS de um extrato de abacate QuEChERS não tratado (preto), em relação à limpeza C18/PSA tradicional (vermelho) e um extrato tratado com Agilent EMR-Lipídios (azul).

Os lipídios podem causar uma supressão significativa de íons da matriz e resultar em uma menor sensibilidade de detecção e fraca reprodutibilidade do método. Fosfolipídios em matrizes biológicas são sempre problemáticos, devido ao efeito de matriz considerável que eles causam. A Figura 6 mostra que uma amostra com limpeza Captiva EMR—Lipídios tem uma resposta significativamente maior de analitos e melhores RSDs do que uma amostra apenas com PPT na análise de metabólitos de vitamina D.

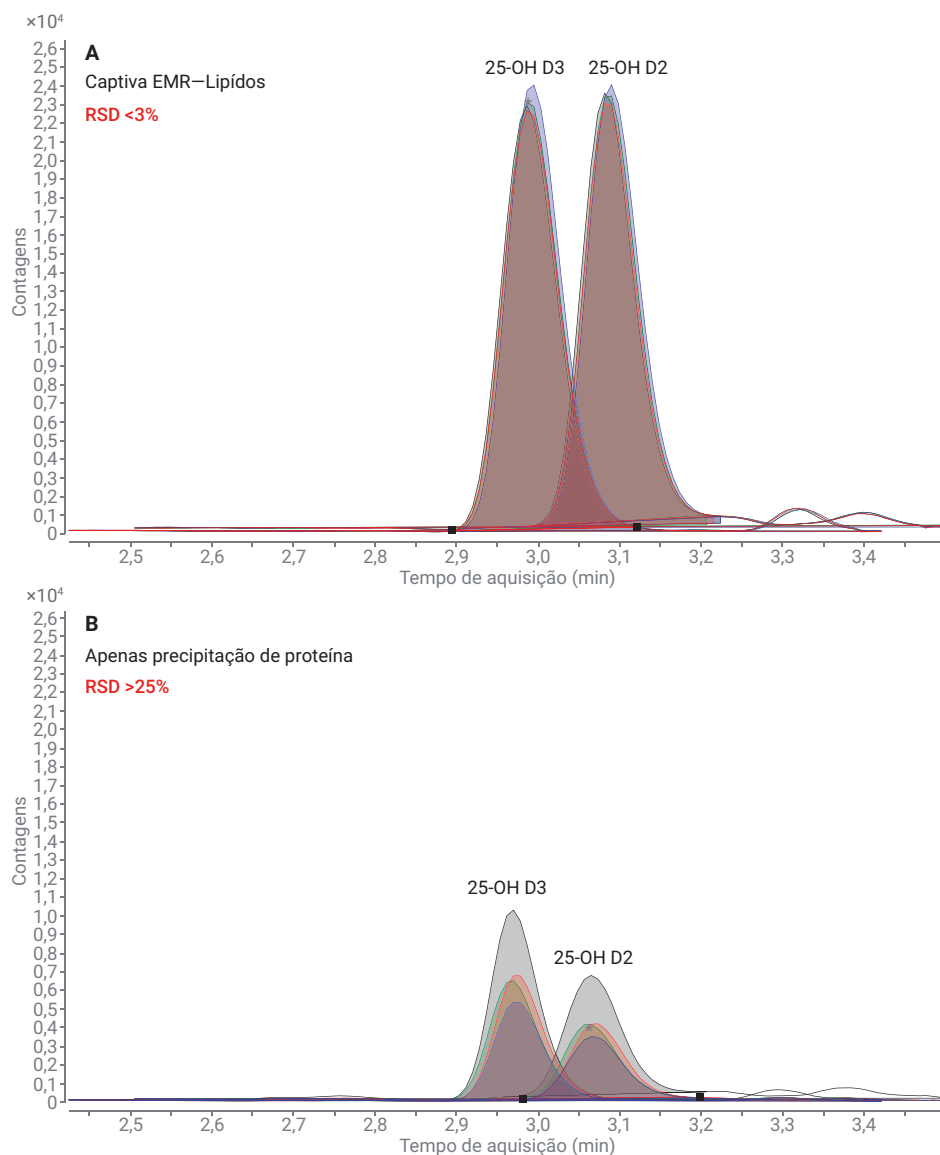


Figura 6. Resposta de analito e comparação do valor de RSD entre PPT isolado e EMR—Lipídios com PPT.

Agora que podemos efetivamente remover os lipídios, o que pode ser feito para acelerar a análise?

Com o Captiva EMR—Lipídios, você não apenas poderá melhorar a confiabilidade do método analítico e a qualidade dos

dados, mas também poderá reduzir o tempo de corrida analítica e melhorar a produtividade do seu laboratório. O gráfico da Figura 7 mostra que, como os fosfolipídios foram removidos adequadamente antes da introdução de amostras, não é necessário esperar pela eluição desses compostos hidrofóbicos na cromatografia de fase reversa, economizando assim o precioso tempo do instrumento.

Graças a uma amostra mais limpa, sua análise pode ser executada mais rapidamente e você não terá de fazer a limpeza do sistema com a mesma frequência. Uma amostra mais limpa também significa mais execuções de amostras entre os tempos de manutenção preventiva programada. Isso significa maior frequência analítica, dada a sua capacidade de laboratório atual. Isso significa maior frequência analítica e um melhor resultado econômico para o seu laboratório.

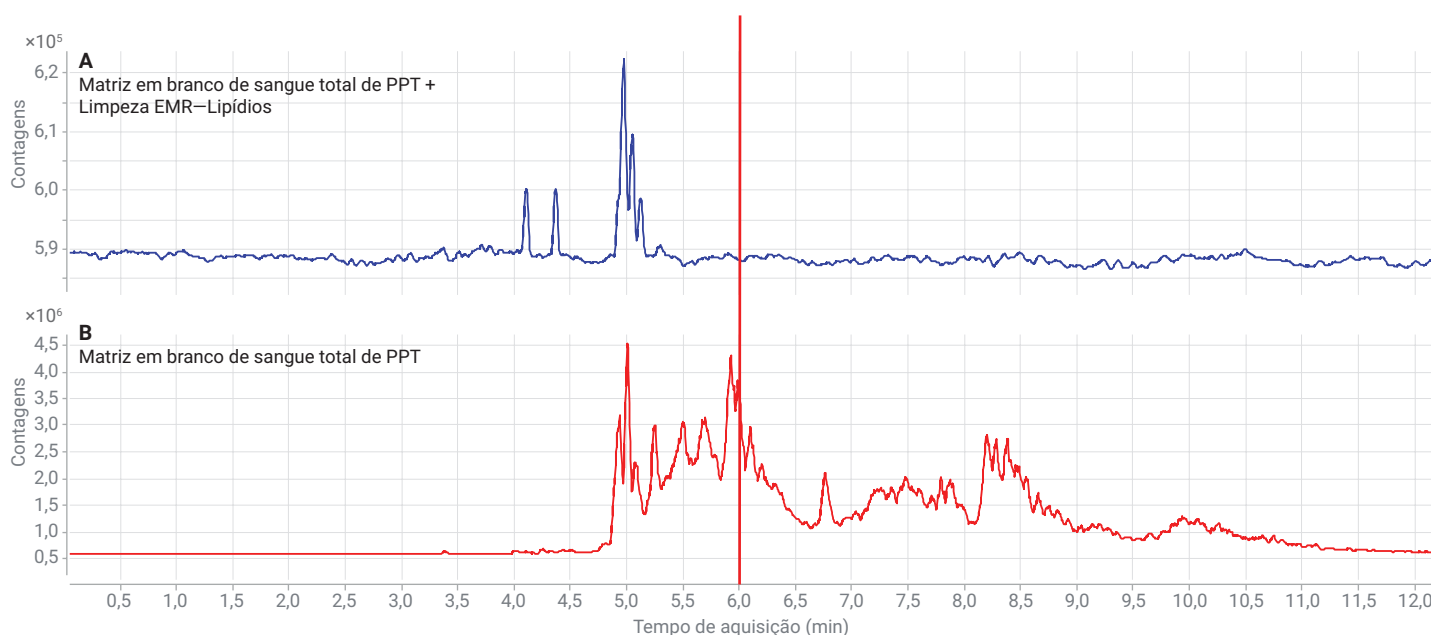


Figura 7. Comparação do perfil de fosfolipídios em matriz em branco para demonstrar a viabilidade de um menor tempo de ciclo.

Conclusões

Por que a limpeza de amostras é tão importante? Porque as amostras complexas contêm muitos componentes de matriz problemáticos, incluindo lipídios, proteínas, sais, pigmentos e outros. Os lipídios são um dos componentes de matriz mais problemáticos por vários motivos.

Os benefícios de utilização de um fluxo de trabalho de preparo de amostras mais adequada em vez de um fluxo de trabalho de preparo de amostras bom o suficiente é que você gerará horas adicionais de tempo de atividade do instrumento, reduzirá o tempo de trabalho em bancada dos analistas no laboratório e reduzirá potencialmente o tempo de corrida cromatográfica, permitindo que mais amostras sejam executadas todos os dias. A causa final de ter de realizar manutenções atempadas é devido à contaminação da matriz. Se você remover mais matrizes, aumentará o tempo entre

as atividades de manutenção. Isso pode ser alcançado sem alterar seu SOP ou adicionar mais tempo ao seu fluxo de trabalho. Sem o preparo de amostras, você pode não ver os picos de interesse com clareza suficiente para quantificá-los com precisão. Na verdade, você pode até nem encontrar os picos de interesse. Todos esses efeitos podem aumentar o tempo necessário para o processamento de dados e podem resultar em um aumento no número de reexecução de amostras e lotes devido à baixa qualidade dos dados.

Saiba mais sobre o Agilent Captiva EMR—Lipídios

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



Limpeza com Agilent Captiva EMR—Lipídios

Saiba mais sobre os ganhos de produtividade com o Preparo de amostras Agilent

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

Notas de aplicação recomendadas

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

Tem interesse em análise de drogas sintéticas? Você também pode consultar o artigo de jornal no *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

Somente para uso em pesquisas. Não deve ser usado em procedimentos de diagnóstico.

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impresso nos EUA, 6 de agosto de 2018
5994-0110PTBR