



Methodenentwicklung für die In-Line Sample Preparation

Die In-Line Sample Preparation (ILSP) bietet die Möglichkeit zur automatisierten Probenaufreinigung, die zeitaufwändige, manuelle Prozesse wie QuEChERS oder SPE ersetzen soll. Wenn eine Restek Revive ILSP-Kartusche in einem für zweidimensionale LC-Anwendungen konfigurierten Gerät installiert ist, hält sie koextrahierte Matrixkomponenten zurück, die anschließend durch Rückspülen der Kartusche mit einem Waschlösemittel entfernt werden. Die Rückspülung erfolgt während der Analyse, so dass die ILSP-Kartusche zur Reinigung einer neuen Probe rechtzeitig vor der nächsten Injektion wieder betriebsbereit ist. So entsteht ein hocheffizienter Arbeitsablauf, der den Probendurchsatz drastisch erhöhen kann. Die Revive ILSP-Aufreinigung ist hocheffizient und lässt sich mit einer einfachen Fest-Flüssig-Extraktion kombinieren, um Zeit und Geld zu sparen. In diesem Artikel wird ein einfaches Verfahren zur Methodenentwicklung für die In-Line Sample Preparation beschrieben, damit Laboratorien die Vorteile dieser leistungsstarken Technik nutzen können.

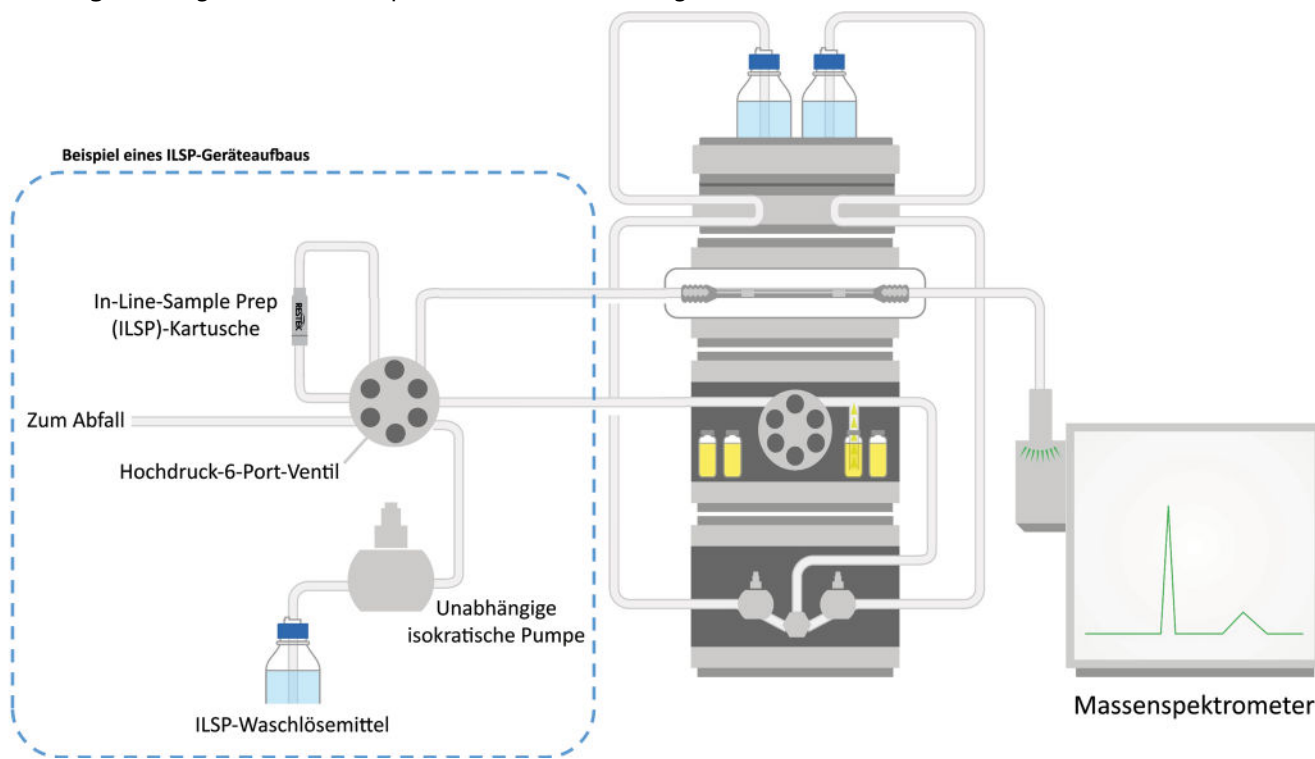
Anforderungen an die Gerätekonfiguration

Die Verwendung der ILSP-Methode erfordert ein HPLC-Gerät, das mit einer binären oder quaternären Pumpe, einem Autosampler mit interner Nadelspülung, einem Säulenfach und einem Detektor ausgestattet ist. Wie in Abbildung 1 dargestellt, muss ein kompatibles Gerät außerdem folgende Komponenten enthalten:

- Eine unabhängige, isokratische Pumpe, die in der Lage ist, Waschlösemittel an die ILSP-Kartusche zu liefern.
- Ein Hochdruck-6-Port-Ventil zur Steuerung des Flusses an die ILSP-Kartusche während der Rückspülung.

Wenn Sie Hilfe bei der Einrichtung Ihres Geräts benötigen, wenden Sie sich bitte an Ihren Gerätehersteller.

Abbildung 1: Konfiguration der Komponenten für ein ILSP-taugliches HPLC



Methodenentwicklung

Wie bei jeder anderen Methode der Probenvorbereitung müssen die ILSP-Bedingungen für jede neue Liste von Zielanalyten bzw. für jede neue Probenmatrix evaluiert werden. Verwenden Sie den nachfolgend beschriebenen „Analyt-Pass-Through“-Ansatz zur Methodenentwicklung für die In-Line Sample Preparation, um die optimalen ILSP-Bedingungen für Ihren spezifischen Assay zu bestimmen.

Beim „Analyt-Pass-Through“-Ansatz wird eine Revive ILSP-Kartusche verwendet, um die Zielanalyten zu eluieren, während störende Matrixkomponenten zurückgehalten werden. Sobald alle Analyten die ILSP-Kartusche zur Trennung auf der analytischen Säule durchlaufen haben, schaltet das Hochdruck-6-Port-Ventil um, und die Matrixkomponenten, die auf der ILSP-Kartusche zurückgehalten wurden, werden mit dem Waschlösemittel von der unabhängigen Pumpe zur Entsorgung in den Abfall gespült. In den folgenden Schritten werden die geeigneten Bedingungen für die Ventilsteuerung und das Waschlösemittel für eine gegebene Methode festgelegt.

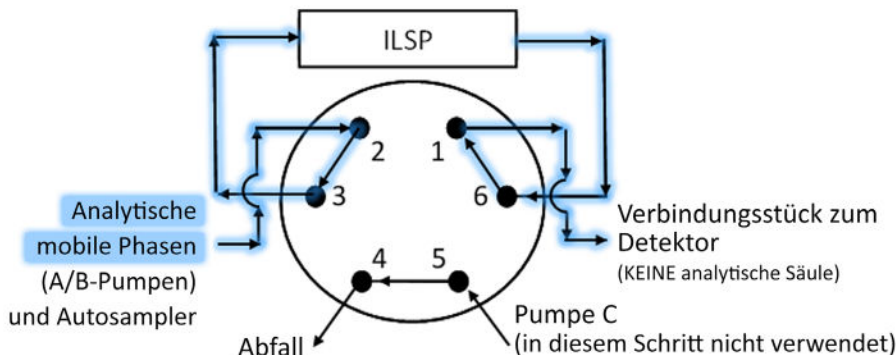
HINWEIS: Nachstehend gehen wir davon aus, dass eine geeignete chromatografische Methode für die Matrix und die Zielanalyten bereits entwickelt wurde. Wenn keine Analyseverfahren vorhanden ist, sollte zunächst die analytische Trennung etabliert werden, bevor Sie fortfahren.

Schritt 1: Beladung der Säule – Bestimmung der Retention der Analyten auf der ILSP-Kartusche

In diesem Schritt soll geprüft werden, wie lange es dauert, bis alle Zielanalyten von der Revive ILSP-Kartusche eluiert sind. Dadurch wird bestimmt, wie lange eine Probe durch die ILSP-Kartusche auf die analytische Säule fließen darf, bevor das Ventil zum ersten Mal umschaltet.

- Konfigurieren Sie das Hochdruck-6-Port-Ventil wie in Abbildung 2 gezeigt, wobei an Stelle der analytischen Säule ein Verbindungsstück verwendet wird.
- Injizieren Sie einen Lösemittelstandard (ohne Matrix) der Zielanalyten auf die ILSP-Kartusche unter Verwendung der bereits vorhandenen mobilen Phase und der Gradientenbedingungen für die chromatografische Analyseverfahren. Denken Sie daran, alle MRM-Fenster nach Bedarf anzupassen.
- Lokalisieren Sie den zuletzt eluierenden Zielanalyten im resultierenden Chromatogramm. Der Zeitpunkt der vollständigen Elution dieses Analyten ist der früheste Punkt, an dem das Ventil programmiert werden kann, von der Beladungsposition der analytischen Säule auf die Waschposition der ILSP-Kartusche umzuschalten (wie in Schritt 2 und Abbildung 3 beschrieben). Um geringen Schwankungen in der Säulenretention zwischen verschiedenen Chargen Rechnung zu tragen, sollten Sie 10-20 Sekunden zur Zeit addieren, die für die vollständige Elution des letzten Zielanalyten ermittelt wurde.

Abbildung 2: Ventilposition und Gerätekonfiguration für Schritt 1



Schritt 2: ILSP-Spülung – Festlegung der Zusammensetzung des Waschlösemittels und der Bedingungen

Der zweite Schritt bei der Methodenentwicklung für die In-Line Sample Preparation besteht darin, die geeignete Zusammensetzung des Spüllösemittels sowie die optimalen Flussbedingungen und die Ventilsteuerung zu bestimmen. Damit soll sichergestellt werden, dass die zurückgehaltenen Matrixkomponenten einer Injektion vor der nächsten Injektion aus der Revive ILSP-Kartusche ausgespült werden.

- Stellen Sie ein anfängliches Waschlösemittel aus 2 mM Ammoniumformiat und 0.1% Ameisensäure in Methanol her. Dieses Lösemittel ist für viele Anwendungen geeignet, aber wie weiter unten erläutert, müssen aufgrund der anfänglichen Ergebnisse möglicherweise weitere Waschlösungen in Betracht gezogen werden.
- Ersetzen Sie einfach die mobile Phase B durch das hergestellte Waschlösemittel (Abbildung 3).
- Injizieren Sie ein Matrix-Blank mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die ILSP-Kartusche.
- Überwachen Sie das Vorliegen der Matrix im Full-Scan-Modus oder, falls spezifische Matrixionen bekannt sind, im SIM-Modus (Selected Ion Monitoring).
- Notieren Sie die Zeit, die ein Gesamtionen-Chromatogramm (TIC) benötigt, um zur Basislinie zurückzukehren, was anzeigt, dass die überwachte Matrix vollständig aus der ILSP-Kartusche ausgespült wurde.
- Dies ist die Zeit, die erforderlich ist, um die eingeschlossenen Matrixkomponenten vollständig aus der ILSP-Kartusche auszuspülen. Diese Zeit sollte mit der Gesamtzeit des Analysezyklus verglichen werden.
 - Wenn die Matrix vor Abschluss des Analyselaufs vollständig aus der ILSP-Kartusche ausgespült wird (Abbildung 4), muss die Waschmethode vermutlich nicht weiter optimiert werden und kann in die Gesamtmethode einprogrammiert werden. Dabei wird eine zweite unabhängige Pumpe verwendet, um den Fluss des Waschlösemittels (Pumpe C) durch die ILSP-Kartusche während einer tatsächlichen Analyse zu steuern.
 - Wenn die Zeit, die benötigt wird, um die Matrix vollständig aus der ILSP-Kartusche auszuspülen, länger ist als gewünscht, sollte die Zusammensetzung des Waschlösemittels und/oder die Flussrate optimiert werden, um die Effizienz zu verbessern.
 - Für eine optimale Leistung wird empfohlen, die Pufferkonzentrationen zwischen 2-10 mM und die Säurekonzentrationen zwischen 0.1-0.5 % zu halten. Es ist darauf zu achten, dass es nicht zu Pufferausfällungen kommt, wenn die ILSP-Kartusche mithilfe der mobilen Phase wieder auf die Anfangsbedingungen eingestellt wird.
- **HINWEIS:** Puffern Sie das Waschlösemittel nicht außerhalb des pH-Bereichs von 2-8.

Abbildung 3: Ventilposition und Gerätekonfiguration für Schritt 2

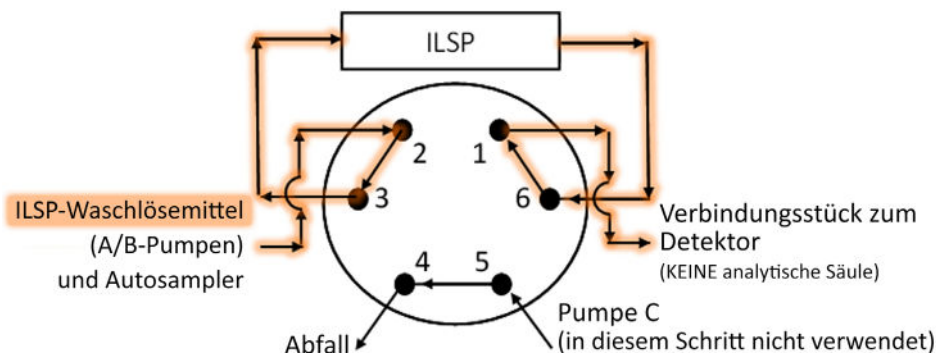
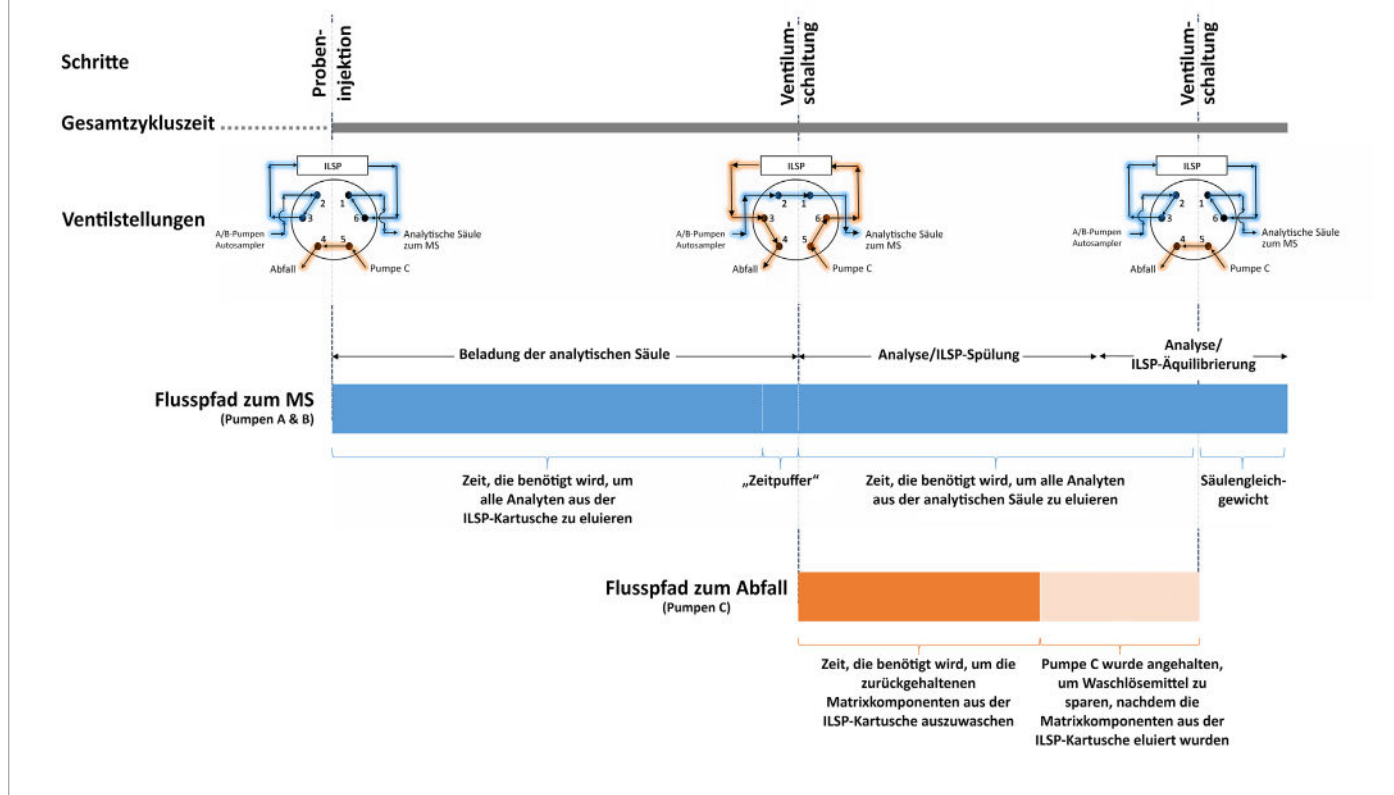


Abbildung 4: Beispiel für die Zeitsteuerung der Schritte bei der Methodenentwicklung für die In-Line Sample Preparation



Schritt 3: Methodenaktualisierung – Hinzufügen von ILSP-Methodenschritten zu einer bestehenden Analysemethode

In diesem letzten Schritt werden die in den Schritten 1 und 2 gesammelten Informationen verwendet, um die entsprechenden zeitgesteuerten Ereignisse in eine bestehende Analysemethode zu integrieren. Abbildung 4 ist ein Beispiel dafür, wo neue Schritte in eine typische HPLC-Gradientenmethode eingefügt werden könnten. Ein Beispiel für den Prozess der Methodenentwicklung für die In-Line Sample Preparation für einen bestehenden Assay auf Pestizide in Lebensmitteln ist in Tabelle I dargestellt.

Tabelle I: Beispiel für den Prozess der Methodenentwicklung für die In-Line Sample Preparation für einen bestehenden Assay auf Pestizide in Lebensmitteln

Tabelle der ursprünglichen Chromatografie-Schritte:		
Zeit (min)	%B Zusammensetzung der mobilen Phase	
0	5	
2	60	
4	75	
6	100	
7	100	
7.01	5	
9	Stopp	
Während der ILSP-Methodenentwicklung bestimmte Werte:		
Schritt 1:		
Zeit, um den letzten Analyten aus der ILSP-Kartusche zu eluieren = 4.6 min		
Hinzufügen eines zusätzlichen „Zeitpuffers“, um den vollständigen Transfer der letzten eluierenden Verbindung zu gewährleisten = 0.3 min		
Zeit, um das Ventil in die ILSP-Spülposition umzuschalten (Summe der obigen Werte) = 4.9 min		
Schritt 2:		
Zusammensetzung des Spüllösemittels = 2 mM Ammoniumformiat und 0.1% Ameisensäure in Methanol		
Spüllösemittel-Flussrate: 1 mL/min		
Zeit, um die letzten überwachten Matrixkomponenten aus der ILSP-Kartusche zu eluieren = 0.6 min		
Hinzufügen eines zusätzlichen „Zeitpuffers“, um Schwankungen in der Retention eingeschlossener Matrixkomponenten Rechnung zu tragen = 0.4 min		
Gesamtzeit zur Spülung der ILSP-Kartusche = 1.0 min		
Hinweis: Keine Änderung der Zusammensetzung des Spüllösemittels oder der Flussrate erforderlich.		
Tabelle der aktualisierten Chromatografie-Schritte:		
Zeit (min)	%B Zusammensetzung der mobilen Phase	Schritt
0	5	
2	60	
4	75	
4.9	-	Ventilumschaltung zur ILSP-Spülposition (siehe Abbildung 4).
4.92	-	Flussrate des ILSP-Spüllösemittels auf 1 mL/min einstellen (Pumpe C).
5.92	-	Fluss des ILSP-Spüllösemittels abstellen, um Lösemittel zu sparen (Pumpe C).
6	100	
7	100	Alle Verbindungen wurden zu diesem Zeitpunkt aus der analytischen Säule eluiert.
7.01	5	Zur Äquilibration der Säule anfängliche Bedingungen für die mobile Phase wiederherstellen.
7.05	-	Ventilumschaltung auf die Position „Beladung der analytischen Säule“, um die Äquilibration der ILSP-Kartusche zu ermöglichen.*
9	Stopp	
*Es wird empfohlen, bis zu diesem Zeitpunkt mit der Ventilumschaltung zu warten, um mögliche Störungen der Basislinie während der analytischen Trennung infolge der Ventilumschaltung zu vermeiden.		

Wartung und Fehlersuche

Die meisten Probleme, die bei der In-Line-Probenvorbereitung auftreten, lassen sich mit grundlegenden Kenntnissen über die Matrix und die Methode vermeiden oder beheben. In einem ersten Schritt sollten matrixspezifische Ionen identifiziert werden, indem die Precursor-Scandaten eines extrahierten Matrix-Blanks und eines extrahierten Extraktionslösemittel-Blanks verglichen werden. Nach der Bestimmung der matrixspezifischen Ionen können diese in die Analysemethode eingegeben und im SIM-Modus überwacht werden. Damit steht ein wertvolles diagnostisches Werkzeug zur Verfügung, das sich bei der Fehlersuche von Leistungsproblemen verwenden lässt, um zu entscheiden, ob ein Problem mit langlebigen Matrixverunreinigungen vorliegt. Lösungen für häufig auftretende Fehlersuchszustände sind in Tabelle II aufgeführt.

Mit diesem Ansatz der Methodenentwicklung für die In-Line Sample Preparation und dem Wissen, wie man mit eventuell auftretenden Problemen umgeht, können Laboratorien ihre bestehenden Methoden mit Zuversicht um ILSP erweitern und ihren Probendurchsatz erheblich steigern.

Tabelle II: Lösungen für die ILSP-Fehlersuche

Symptom	Potenzielle Ursache	Abhilfemaßnahme
Fehlende spät eluierende Peaks	Beladung der analytischen Säule zum falschen Zeitpunkt eingestellt	Zur Säulenbeladung erforderliche Zeit verlängern.
Fehlende Peaks	MRM-Fenster falsch eingestellt	Das Hinzufügen der ILSP-Kartusche kann die Retentionszeit geringfügig verändern, so dass die MRM-Fenster aktualisiert werden müssen.
Breite bzw. verzerrte Peakformen für früh eluierende Analyten	Falsches Lösemittel für die Nadelspülung	Bei Verwendung eines starken Lösemittels für die interne Nadelspülung sicherstellen, dass mit einem schwachen Lösemittel (anfängliche Zusammensetzung der mobilen Phase) nachgespült wird, um Bandenverbreiterung zu vermeiden.
	Falsches Probenlösemittel	Für hauptsächlich in Acetonitril oder Methanol gelöste Proben das Injektionsvolumen reduzieren, um Bandenverbreiterung zu vermeiden.
Peakverzerrung/Basislinienstörung	Interne Nadelspülung kann Basislinienstörungen verursachen, die die Peakform beeinflussen können	Interne Nadelspülung einleiten, sobald alle Analyten aus der analytischen Säule eluiert worden sind.
Schlechte Analytwiederfindung	Matrixverschleppung aus dem Autosampler	Interne Nadelspülung mit einem Lösemittel optimieren, das die Matrix auflöst.
	Unzureichendes Waschen der ILSP-Kartusche	Waschlösemittel optimieren, um die wesentlichen Matrixkomponenten vollständig zu entfernen.
Matrixpeaks in Injektionen mit Lösemittel-Blanks (falls überwacht)	Matrixverschleppung aus dem Autosampler	Interne Nadelspülung mit einem Lösemittel optimieren, das die Matrix auflöst.
	Unzureichendes Waschen der ILSP-Kartusche	Waschlösemittel optimieren, um die wesentlichen Matrixkomponenten vollständig zu entfernen.

Revive In-Line Sample Preparation (ILSP)

- Die automatisierte In-Line-Aufreinigung von Probenextrakten führt zu einer erheblichen Verringerung der Probenvorbereitungszeit.
- Durch gleichzeitige Analyse und Waschen der ILSP-Kartusche werden Stillstandzeiten zwischen einzelnen Proben vermieden.
- Schnelle, einfache Alternative zu QuEChERS oder SPE für die Analyse von Multipestizidrückständen in Lebensmitteln.
- Minimiert die Kosten für Einwegprodukte zur Probenvorbereitung und die damit verbundenen Abfallstoffe.
- Reduziert Fehlerquellen und Schwankungen im Zusammenhang mit der manuellen Reinigung.



Die In-Line Sample Preparation (ILSP) nutzt die Leistungsstärke eines LC-MS/MS, um die Reinigung von Probenextrakten zu rationalisieren und zu automatisieren. Die Revive ILSP-Pestizidkartuschen von Restek sind eine ideale Alternative für die Probenvorbereitung in Laboratorien für Lebensmittelsicherheit, die Proben mit Pestizidrückständen schneller und kostengünstiger analysieren möchten, ohne Leistung einzubüßen. Revive ILSP-Pestizidkartuschen trennen die Analyten von potenziell störenden Matrixkomponenten genauso wie herkömmliche QuEChERS- und SPE-Methoden, ersetzen jedoch zeitaufwändige manuelle Verfahren durch einen schnelleren automatisierten Reinigungsprozess, der gleichzeitig mit der Probenanalyse auf dem Gerät stattfindet.

Mit einer Revive ILSP-Pestizidkartusche, einem Hochdruck-6-Port-Ventil und einer unabhängigen isokratischen Pumpe kann Ihr Gerät zu einem echten Arbeitspferd in Ihrem Labor werden, das die Probenreinigung und Analyse zu einer einzigen, effizienten Methode vereint. Reduzieren Sie den Zeitaufwand für die Probenvorbereitung, senken Sie die Kosten für Einwegprodukte zur Probenvorbereitung und verringern Sie die bei manuellen Verfahren auftretenden Fehler, indem Sie die Revive ILSP in Ihre aktuellen Methoden für die Analyse von Pestizidrückständen in Lebensmitteln integrieren.

Beschreibung	VE	Art.-Nr.
Revive ILSP-Halter für 5-mm-Kartusche	1	27880
Revive ILSP-Pestizidkartusche (5 x 2.1 mm)	1	27881
Revive ILSP-Halter und Revive ILSP-Pestizidkartusche (5 x 2.1 mm)	Kit	27882
Revive ILSP-Pestizidkartuschen (5 x 2.1 mm)	3er Pck.	27883