



Sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea

Con la preparazione del campione in linea (ILSP) è possibile procedere a una purificazione automatizzata del campione, in sostituzione di processi manuali che richiedono molto tempo, come i metodi QuEChERS o SPE. Se installata su uno strumento configurato per applicazioni LC bidimensionali, una cartuccia ILSP Revive di Restek trattiene i componenti della matrice co-estratti, che vengono in seguito rimossi attraverso un controlavaggio della cartuccia con un solvente di lavaggio. Il controlavaggio avviene durante l'analisi: la cartuccia ILSP è così pronta a purificare un nuovo campione prima dell'iniezione successiva, creando un flusso di lavoro altamente efficiente che può aumentare in modo significativo la produzione di campioni. La purificazione eseguita con ILSP Revive è molto efficace e può essere abbinata a una semplice estrazione solido-liquido, con un risparmio in termini di tempo e costi. Nel presente articolo si descrive una semplice procedura per lo sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea, che permette ai laboratori di cogliere i vantaggi di questa tecnica affidabile.

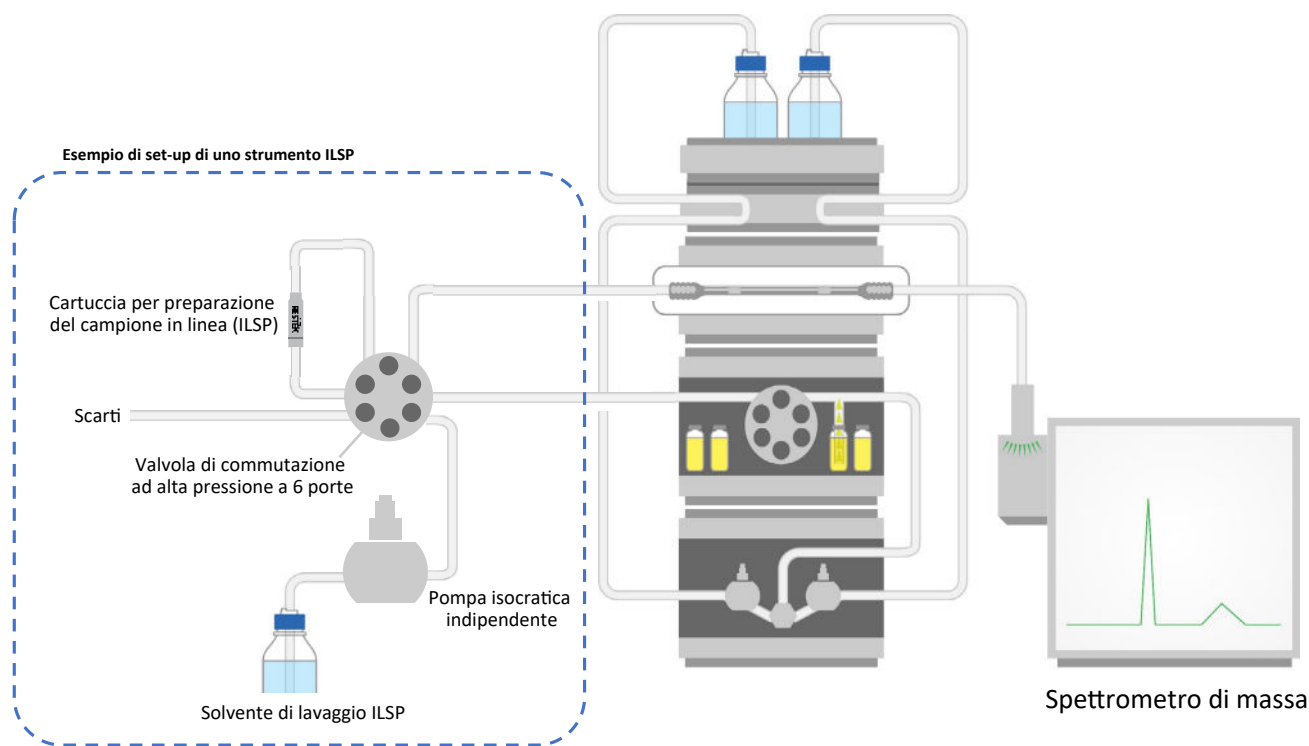
Requisiti per la configurazione dello strumento

Per l'adozione dell'approccio ILSP sarà necessario un sistema HPLC dotato di una pompa binaria o quaternaria, un autocampionatore in grado di effettuare il lavaggio interno dell'ago, un comparto colonne e un detector. Come illustrato in Figura 1, uno strumento compatibile deve prevedere anche:

- Una pompa isocratica indipendente in grado di fornire il solvente di lavaggio alla cartuccia ILSP.
- Una valvola di commutazione ad alta pressione a 6 porte per monitorare il flusso verso la cartuccia ILSP durante la fase di lavaggio.

Per ricevere assistenza nella configurazione dello strumento è necessario consultare il produttore.

Figura 1: Configurazione dei componenti di un sistema HPLC che supporta la ILSP



Sviluppo del metodo

Proprio come qualsiasi altra tecnica di preparazione del campione, è necessario valutare le condizioni ILSP per ciascuna nuova lista di analiti target e/o nuove matrici campione. Per determinare le condizioni ottimali del metodo ILSP per la vostra analisi specifica, utilizzate il seguente approccio di “passaggio dell’analita” per lo sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea.

In questo approccio si utilizza una cartuccia ILSP Revive per eluire gli analiti target, mentre i componenti della matrice interferenti vengono trattenuti. Una volta che tutti gli analiti sono passati attraverso la cartuccia ILSP per la separazione nella colonna analitica, la valvola ad alta pressione a 6 porte cambia posizione e i componenti della matrice precedentemente trattenuti nella cartuccia ILSP vengono eliminati con il risciacquo utilizzando il solvente di lavaggio e la pompa indipendente. Le fasi descritte di seguito indicano la fase della valvola e le condizioni del solvente di lavaggio corretti per un dato metodo.

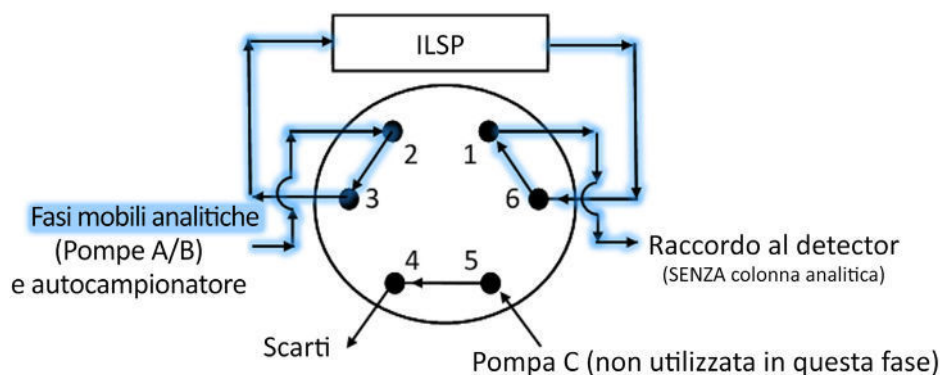
NOTA: Nelle indicazioni che seguono si presuppone che sia già stato sviluppato un metodo cromatografico adeguato per la matrice e gli analiti target. Se non è disponibile un metodo analitico, è necessario definire la separazione analitica prima di procedere.

Fase 1: Caricamento della colonna. Definire la ritenzione degli analiti sulla cartuccia ILSP

Questa fase ha lo scopo di monitorare il tempo impiegato da tutti gli analiti target per eluire dalla cartuccia ILSP Revive, periodo che indicherà per quanto tempo un campione può fluire attraverso la cartuccia ILSP sulla colonna analitica prima del primo evento di commutazione della valvola.

- Configurare la valvola di commutazione a 6 porte come mostrato in Figura 2, con un raccordo che sostituisce la colonna analitica.
- Iniettare uno standard di solvente (senza matrice) di analiti target sulla cartuccia ILSP, usando le condizioni preesistenti di fase mobile e gradiente per il metodo cromatografico analitico. Si ricorda di regolare eventuali finestre MRM a seconda delle necessità.
- Individuare l’ultimo analita target eluito nel cromatogramma ottenuto. Il momento in cui questo analita completa l’eluizione indica il primo punto in cui è possibile programmare il passaggio della valvola dalla posizione di caricamento della colonna analitica alla posizione di lavaggio della ILSP (come descritto nella fase 2 e in Figura 3). Per tenere conto delle lievi variazioni nella ritenzione della colonna tra un lotto e l’altro, aggiungere 10-20 secondi al tempo stabilito per eluire del tutto l’ultimo analita target.

Figura 2: Posizione della valvola e configurazione dello strumento per la fase 1



Fase 2: Lavaggio ILSP. Definire la composizione e le condizioni del solvente di lavaggio

La seconda fase dello sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea è volta a determinare la corretta composizione del solvente di risciacquo, nonché le migliori condizioni di flusso e di saturazione della valvola. Questo permette di garantire che i componenti della matrice trattenuti da un'iniezione vengano risciacquati via dalla cartuccia ILSP Revive prima dell'iniezione successiva.

- Comporre un solvente iniziale di lavaggio che contiene 2 mM di formato di ammonio e lo 0,1% di acido formico in metanolo. Tale solvente potrà essere utilizzato per diverse applicazioni ma, come già illustrato, potrebbe rendersi necessario inserire altri lavaggi, a seconda dei risultati iniziali.
- Per semplicità, sostituire la fase mobile B con il solvente di lavaggio preparato (Figura 3).
- Iniettare un bianco matrice nella cartuccia ILSP con una velocità di flusso di 1 mL/min.
- Monitorare la presenza della matrice in modalità di scansione completa oppure, se gli specifici ioni della matrice sono noti, utilizzare la modalità di monitoraggio ionico selettivo (SIM).
- Prestare attenzione al tempo impiegato da un cromatogramma ionico totale (TIC) per tornare alla linea di base, in quanto questo indica che la matrice in oggetto è stata completamente risciacquata dalla cartuccia ILSP.
- Questo è il tempo necessario per risciacquare dalla cartuccia ILSP tutti i componenti della matrice rimasti bloccati, e dovrebbe essere confrontato con il tempo di ciclo analitico totale.
 - o Se la matrice è stata completamente risciacquata dalla cartuccia ILSP prima del termine della corsa analitica (Figura 4), probabilmente non sarà necessaria alcuna ulteriore ottimizzazione del metodo di lavaggio e quest'ultimo potrà essere inserito nel programma del metodo generale, usando una seconda pompa indipendente per controllare il flusso del solvente di lavaggio (Pompa C) attraverso la cartuccia ILSP durante un'analisi reale.
 - o Se il tempo necessario per risciacquare completamente la matrice dalla cartuccia ILSP è più lungo di quanto desiderato, occorre ottimizzare la composizione del solvente di lavaggio e/o la velocità del flusso per raggiungere una maggiore efficienza.
 - Per ottenere le migliori prestazioni, si consiglia di mantenere le concentrazioni del tampone fra 2-10 mM e le concentrazioni dell'acido tra 0,1-0,5%. È necessario fare attenzione a prevenire la precipitazione del tampone quando si procede all'equilibratura della cartuccia ILSP alle condizioni iniziali con la fase mobile.
- **NOTA:** Non tamponare il solvente di lavaggio al di fuori del range di pH 2-8.

Figura 3: Posizione della valvola e configurazione dello strumento per la fase 2

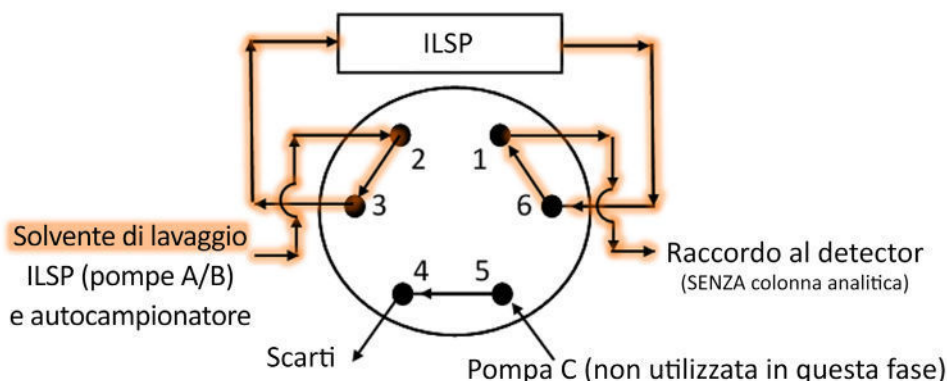
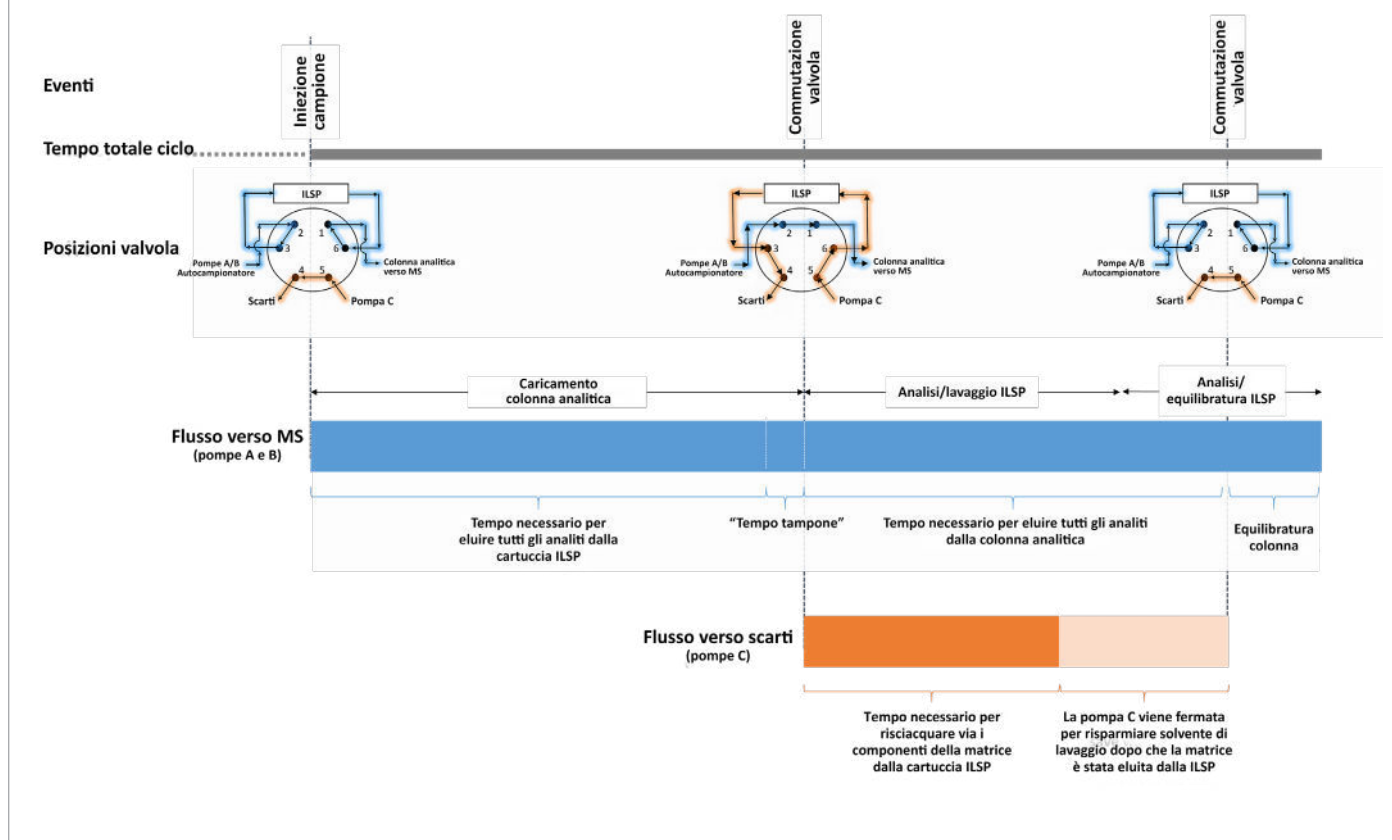


Figura 4: Esempio di tempistiche degli eventi durante lo sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea



Fase 3: Aggiornamenti del metodo. Aggiungere eventi del metodo ILSP a un metodo analitico esistente

Questa fase finale ha l'obiettivo di utilizzare le informazioni raccolte nelle fasi 1 e 2 per introdurre all'interno di un metodo analitico esistente gli opportuni eventi con le relative tempistiche. La Figura 4 mostra un esempio di dove verrebbero inseriti i nuovi eventi in un metodo tipico HPLC a gradiente. Nella Tabella I è illustrato un esempio del processo di sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea per un'analisi esistente dei pesticidi negli alimenti.

Tabella I: Esempio di processo di sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea Revive per un metodo di analisi dei pesticidi negli alimenti

Tabella eventi cromatografici originali:		
Tempo (min)	%B Composizione Fase Mobile	
0	5	
2	60	
4	75	
6	100	
7	100	
7.01	5	
9	Stop	
Valori ottenuti durante lo sviluppo del metodo ILSP:		
Fase 1:		
Tempo di eluizione dell'analita finale da ILSP = 4,6 min		
Tempo tampone aggiunto per garantire il trasferimento completo dell'ultimo composto eluito = 0,3 min		
Tempo per il passaggio della valvola alla posizione di risciacquo ILSP (somma delle voci precedenti) = 4,9 min		
Fase 2:		
Composizione del solvente di risciacquo = 2 mM di formato di ammonio e 0,1% di acido formico in metanolo		
Velocità di flusso del solvente di risciacquo = 1 mL/min		
Tempo di eluizione degli ultimi componenti della matrice osservabili dalla ILSP = 0,6 min		
Tempo tampone aggiunto per tenere conto delle variazioni nella severità per i componenti della matrice bloccati = 0,4 min		
Tempo totale per il risciacquo della cartuccia ILSP = 1,0 min		
Nota: Nessuna modifica necessaria, né alla composizione del solvente di risciacquo né alla velocità di flusso.		
Tabella eventi cromatografici aggiornati:		
Tempo (min)	%B Composizione Fase Mobile	Evento
0	5	
2	60	
4	75	
4.9	-	Passaggio della valvola alla posizione di risciacquo ILSP (vedi Figura 4).
4.92	-	Definire il flusso del solvente di risciacquo ILSP @ 1 mL/min (pompa C).
5.92	-	Fermare il flusso del solvente di risciacquo ILSP per conservare il solvente (pompa C).
6	100	
7	100	A questo punto, tutti i composti sono stati eluiti dalla colonna analitica.
7.01	5	Ritornare alle condizioni iniziali della fase mobile per equilibrare la colonna.
7.05	-	Passaggio della valvola alla posizione di "caricamento della colonna analitica" per consentire l'equilibratura della cartuccia ILSP.*
9	Stop	
*Si consiglia di attendere fino a questo punto per cambiare la posizione della valvola onde evitare eventuali disturbi alla linea di base durante la separazione analitica.		

Manutenzione e risoluzione dei problemi

La maggior parte dei problemi relativi alla preparazione del campione in linea si può evitare o risolvere grazie a una conoscenza base della matrice e del metodo. Come primo passo occorre identificare gli ioni specifici della matrice confrontando i dati di scansione dei precursori di una matrice bianca estratta con un bianco solvente di estrazione. Una volta definiti gli ioni specifici della matrice, è possibile inserirli nel metodo analitico e monitorarli in modalità SIM. Questo procedimento mette a disposizione un prezioso strumento diagnostico da utilizzare quando si cerca di risolvere i problemi legati alle prestazioni, per capire se la causa è la presenza di contaminanti persistenti della matrice. La Tabella II mette in evidenza come risolvere alcuni problemi comuni.

Impiegando questo approccio nello sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea e sapendo come affrontare eventuali problemi, i laboratori possono aggiungere la ILSP ai metodi esistenti in tutta sicurezza e, così, aumentare significativamente la produzione di campioni.

Tabella II: Risoluzione dei problemi ILSP

Sintomo	Probabile causa	Rimedio
Mancanza di picchi a eluizione tardiva	Impostazione errata del tempo dell'evento per il caricamento della colonna	Prolungare il tempo richiesto per il caricamento della colonna.
Mancanza di picchi	Impostazione errata delle finestre MRM	L'aggiunta della cartuccia ILSP potrebbe causare un lieve cambiamento nel tempo di ritenzione, che richiederà l'aggiornamento delle finestre MRM.
Forme del picco ampie/distorte per gli analiti a eluizione rapida	Mancata corrispondenza del solvente di risciacquo dell'ago	Se si utilizza un solvente forte per il risciacquo interno dell'ago, ricordarsi di risciacquare successivamente con un solvente debole (composizione della fase mobile iniziale) per prevenire l'allargamento della banda.
	Mancata corrispondenza del diluente del campione	Ridurre il volume dell'iniezione per i campioni dissolti in primo luogo in acetonitrile o solventi di metanolo per prevenire l'allargamento della banda.
Distorsione del picco/Interferenze della linea di base	Il risciacquo interno dell'ago può causare interferenze della linea di base, che a loro volta possono alterare la forma del picco.	Avviare il risciacquo interno dell'ago dopo che tutti gli analiti sono stati eluiti dalla colonna analitica.
Scarso recupero dell'analita	Carryover della matrice dall'autocampionatore	Ottimizzare il risciacquo interno dell'ago con l'uso di un solvente che renderà solubile la matrice.
	Lavaggio insufficiente della cartuccia ILSP	Ottimizzare il solvente di lavaggio per rimuovere completamente i componenti principali della matrice.
Picchi della matrice nelle iniezioni bianche di solvente (se monitorate)	Carryover della matrice dall'autocampionatore	Ottimizzare il risciacquo interno dell'ago con l'uso di un solvente che renderà solubile la matrice.
	Lavaggio insufficiente della cartuccia ILSP	Ottimizzare il solvente di lavaggio per rimuovere completamente i componenti principali della matrice.

Preparazione del campione in linea (ILSP) Revive

- La purificazione in linea e automatizzata dell'estratto dei campioni riduce drasticamente il tempo di preparazione dei campioni.
- L'analisi simultanea e il lavaggio della cartuccia ILSP eliminano i tempi di inattività fra un campione e l'altro.
- Un'alternativa rapida e semplice ai metodi QuEChERS o SPE per l'analisi multiresiduale di pesticidi negli alimenti.
- Riduce al minimo la spesa per l'acquisto di prodotti monouso per la preparazione del campione e la relativa produzione di rifiuti.
- Riduce le fonti di errore e di variabilità legate alla purificazione manuale.

La preparazione del campione in linea (ILSP) mette a frutto le potenzialità del sistema LC-MS/MS per sveltire e automatizzare la purificazione degli estratti dei campioni. Le cartucce per pesticidi ILSP Revive di Restek rappresentano un'alternativa di preparazione del campione ideale per i laboratori di sicurezza alimentare che cercano di risparmiare tempo e denaro dedicati ai campioni per l'analisi multiresiduale dei pesticidi, senza per questo sacrificare le prestazioni. Le cartucce per pesticidi ILSP Revive separano gli analiti dai componenti della matrice potenzialmente interferenti proprio come accade con i metodi convenzionali QuEChERS e SPE, ma consentono di evitare le lunghe procedure manuali grazie a un processo di purificazione automatizzata più rapido, che avviene all'interno dello strumento contestualmente all'analisi del campione.

La cartuccia ILSP Revive per pesticidi, la valvola a sei porte e la pompa isocratica indipendente sono in grado di trasformare il vostro strumento in un'arma vincente del vostro laboratorio, unendo l'analisi e la purificazione del campione in un unico metodo efficiente. Inserire la ILSP Revive nei vostri attuali metodi per l'analisi multiresiduale di pesticidi negli alimenti vi permetterà di diminuire significativamente il tempo di preparazione dei campioni, ridurre i costi legati all'acquisto di prodotti monouso e limitare gli errori derivanti dalle procedure manuali.



Descrizione	qtà	cat.#
Holder ILSP Revive per cartuccia 5 mm	cad.	27880
Cartuccia ILSP Revive per pesticidi (5 x 2,1 mm)	cad.	27881
Holder ILSP Revive e cartuccia ILSP per pesticidi (5 x 2,1 mm)	kit	27882
Cartuccia Revive ILSP per pesticidi (5 x 2,1 mm)	3 pz.	27883