



Preparazione dei campioni

# Preparazione del campione in linea (ILSP) Revive: Un approccio più rapido per l'analisi multiresiduale dei pesticidi negli alimenti

- La purificazione in linea e automatizzata dell'estratto del campione riduce drasticamente il tempo necessario alla 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.



**Revive**  
IN-LINE SAMPLE PREPARATION

**RESTEK**

Pure Chromatography

[www.restek.com](http://www.restek.com)

# Preparazione del campione in linea (ILSP) Revive: Un approccio più rapido per l'analisi multiresiduale dei pesticidi negli alimenti

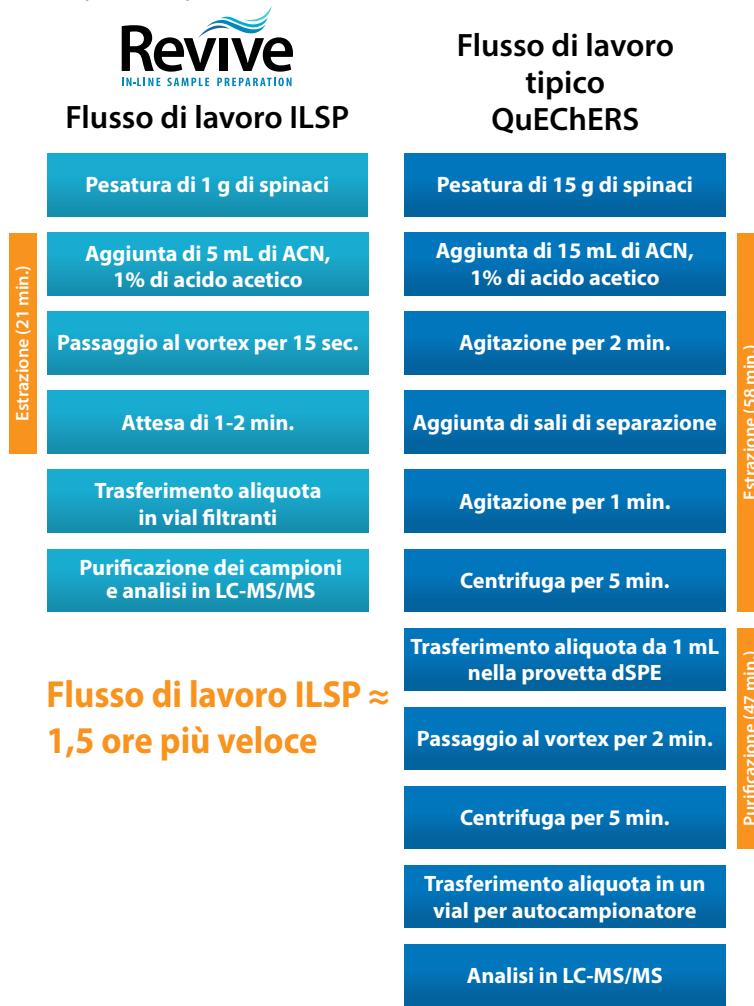


- La purificazione in linea e automatizzata dell'estratto del campione riduce drasticamente il tempo necessario alla preparazione dei campioni.
- L'analisi simultanea e il lavaggio della cartuccia ILSP eliminano i tempi di inattività fra un campione e l'altro.
- Un'alternativa rapida e semplice ai metodi QuEChERS o SPE per l'analisi multiresiduale di pesticidi negli alimenti.

La preparazione del campione in linea (in-line sample preparation, ILSP) è una tecnica di preparazione del campione ideale per i laboratori di sicurezza alimentare che cercano di risparmiare tempo e denaro dedicati a ogni campione LC-MS/MS, senza per questo sacrificare le prestazioni. Una cartuccia per pesticidi ILSP Revive separa gli analiti dai componenti della matrice potenzialmente interferenti proprio come accade con i metodi tradizionali SPE e QuEChERS, ma consente di evitare lunghe procedure manuali grazie a un processo di purificazione automatizzata che avviene nello strumento *in linea* con il flusso del campione analitico. Sfruttando efficaci meccanismi di ritenzione (per esempio, interazioni a fase inversa) e l'efficiente configurazione delle particelle, le cartucce per pesticidi ILSP Revive forniscono una purificazione cromatografica potente e automatizzata di campioni complessi, che avviene sullo strumento contemporaneamente all'analisi dei campioni.

Un esempio dei vantaggi della preparazione del campione in linea è illustrato nella Figura 1, che mostra un confronto tra un flusso di lavoro ILSP Revive per i pesticidi e un flusso di lavoro tipico QuEChERS per l'analisi dei residui di pesticidi negli spinaci. L'approccio ILSP ha reso possibile un risparmio di tempo di un'ora e mezzo, con un numero inferiore di trasferimenti di campioni, offrendo così un aumento significativo della produttività della preparazione dei campioni. Inoltre, il metodo ILSP riduce al minimo il rischio di introdurre errori attraverso fasi manuali e fornisce risultati analitici equivalenti o superiori a quelli del metodo QuEChERS. Uno studio esaustivo sul confronto tra questi due metodi è stato pubblicato da Lupo, et al. [1].

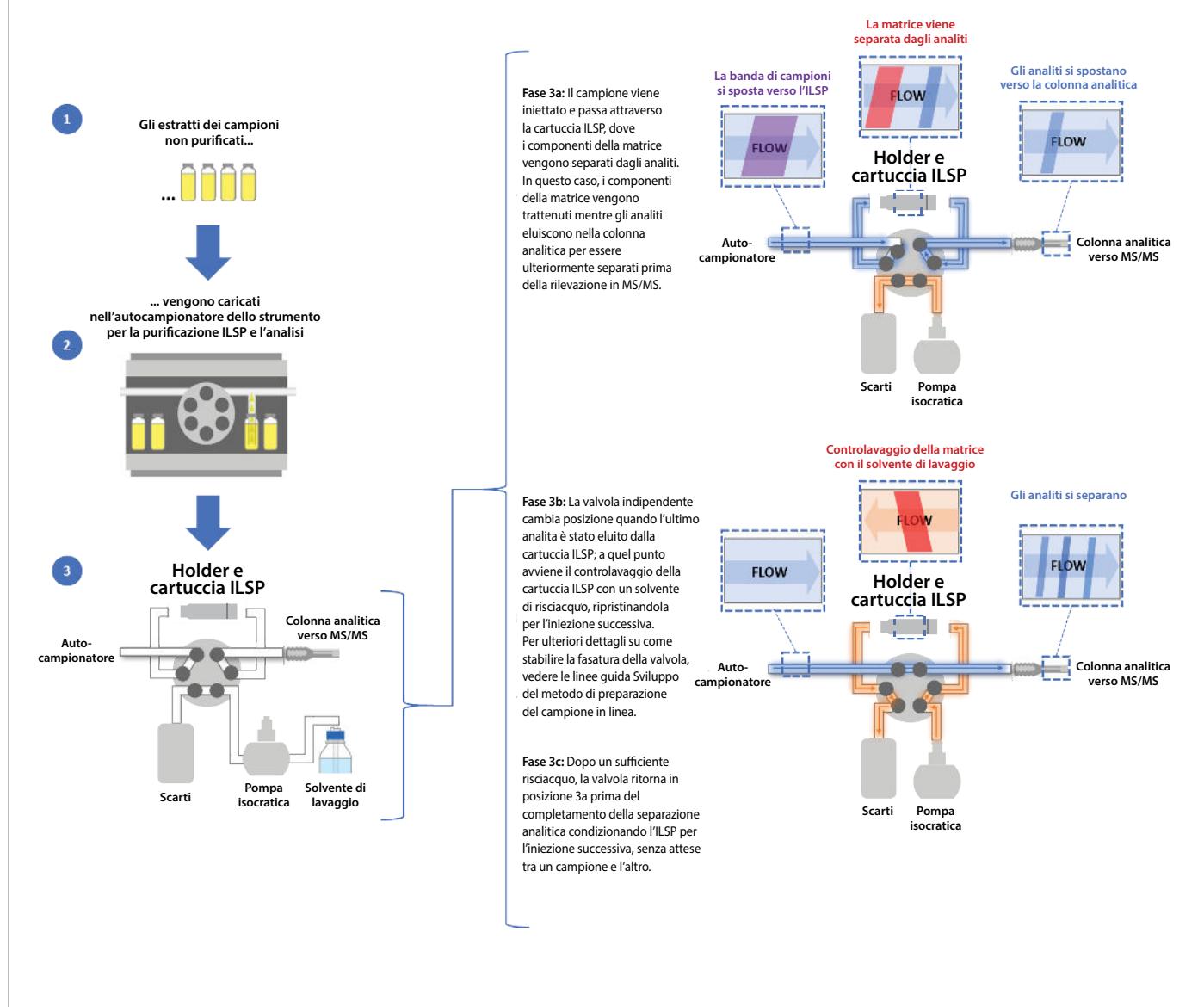
**Figura 1:** La preparazione del campione in linea Revive ha impiegato un'ora e mezzo in meno rispetto a un flusso di lavoro tradizionale QuEChERS per 14 campioni di spinaci.



## Come funziona la Preparazione del campione in linea Revive?

Come illustrato nella Figura 2, ILSP Revive incorpora una cartuccia di purificazione dei campioni direttamente nel flusso di iniezione LC. Una volta che gli analiti raggiungono la colonna analitica, la cartuccia di purificazione ILSP viene sottoposta a controlavaggio, o "rigenerata", per prepararla per la successiva iniezione mentre viene analizzato il primo campione. È possibile effettuare l'analisi e la rigenerazione contemporaneamente grazie a una valvola a sei porte e a una pompa isocratica indipendente standard. Le indicazioni dettagliate per la configurazione dello strumento, l'impostazione dei parametri del metodo (per esempio, fasatura delle valvole e velocità di flusso dei solventi di risciacquo) e l'individuazione di un efficace solvente di risciacquo sono riportate nel documento contenente le linee guida di Restek intitolato "Sviluppo del metodo di preparazione del campione in linea". Il risparmio quotidiano dei costi operativi ripagherà velocemente l'investimento in una pompa e il tempo impiegato per il set-up del metodo, soprattutto in caso di laboratori con un elevato numero di campioni o con risorse limitate per la preparazione dei campioni.

**Figura 2:** Come funziona la preparazione del campione in linea?

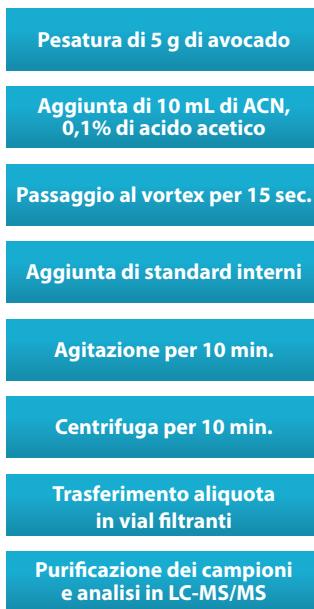


## Risultati costanti ed economicamente vantaggiosi e durata maggiore

Oltre al risparmio di tempo, ILSP offre risultati costanti e un sostanziale contenimento dei costi. Ne è un esempio eccellente un esperimento di lunga durata condotto utilizzando 300 iniezioni di estratti di avocado. L'avocado, un prodotto ad alta percentuale di grassi, è stato fortificato con una gamma esemplificativa di 61 pesticidi con caratteristiche chimiche e tempi di ritenzione diversi. I campioni sono stati poi estratti e analizzati utilizzando il flusso di lavoro ottimizzato rappresentato nella Figura 3. Il metodo di preparazione del campione in linea è stato significativamente più veloce rispetto a un analogo flusso di lavoro QuEChERS per gli avocado, e con una singola cartuccia per pesticidi ILSP Revive si sono ottenuti una purificazione efficace e risultati cromatografici costanti per tutta la durata dell'esperimento.

**Figura 3:** Un esempio del flusso di lavoro di preparazione in linea di campioni di avocado ad alta percentuale di grassi.

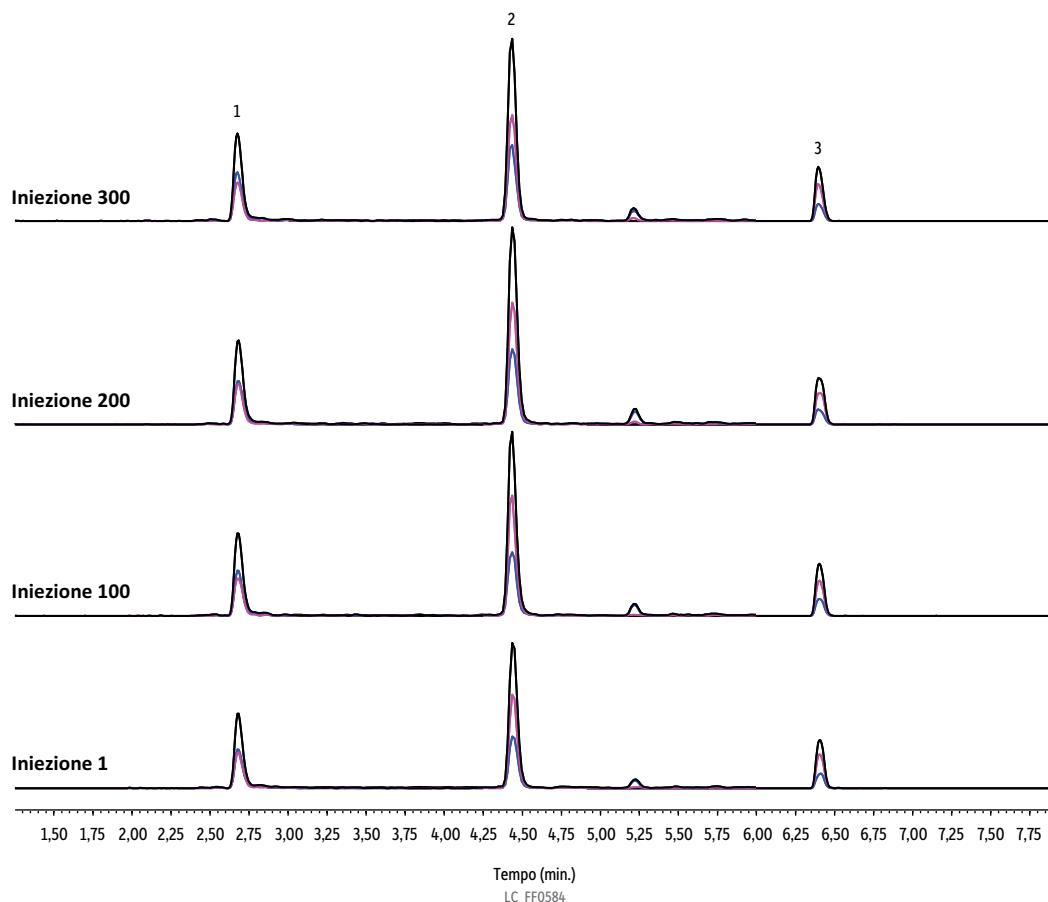
### Flusso di lavoro ILSP



I tre pesticidi evidenziati nella Figura 4 rappresentano composti a eluizione rapida, media e tardiva inclusi nella lista completa degli analiti. Tempi di ritenzione, forme del picco e risposte costanti per centinaia di iniezioni di matrice dimostrano l'efficacia della purificazione effettuata con la cartuccia per pesticidi ILSP Revive. Dei 61 pesticidi monitorati, il 95% soddisfa i criteri stabiliti dalle linee guida SANTE/12682/2019 emanate dai Laboratori di riferimento dell'Unione Europea (recupero 70-120%, %RSD ≤ 20%), se valutati come serie di iniezioni in triplicato di un singolo estratto [2].

Oltre a una maggiore velocità e a prestazioni solide, ILSP offre un significativo risparmio di costi. Per esempio, considerando un costo di 4 dollari per ciascun campione QuEChERS (pacchetto di sali di estrazione e provetta dSPE), i 300 campioni di avocado avrebbero comportato una spesa di 1200 dollari solo in prodotti QuEChERS. Il flusso di lavoro di preparazione del campione in linea Revive usa una semplice estrazione liquido-solido senza estrazione di sali né dSPE, eliminando i relativi costi. Con una singola cartuccia per pesticidi ILSP Revive, che costa circa un quarto del prezzo totale dei prodotti QuEChERS, è stato possibile purificare efficacemente 300 campioni di avocado, e siccome la prestazione non è calata dopo 300 iniezioni non è stato necessario sostituire la cartuccia una volta concluso l'esperimento.

**Figura 4:** Cromatografie stabili anche dopo 300 iniezioni di matrice di avocado su una singola cartuccia ILSP Revive.



Picchi	t <sub>r</sub> (min)	Conc. (ng/g)	Precursore Ione	Prodotto Ione 1	Prodotto Ione 2
1. Imidacloprid	2,678	50	256,1	175,0	209,0
2. Fenhexamid	4,557	50	302,1	55,05	
3. Eprinomectina	6,396	50	914,6	186,1	154,1

**Colonna:** Raptor ARC-18 (cat.# 9314A12)  
**Dimensioni:** 100 mm x 2,1 mm DI  
**Dimensione particelle:** 2,7 µm  
**Porosità:** 90 Å  
**Colonna di guardia:** Cartuccia per precolonna Raptor ARC-18 EXP 5 mm, 2,1 mm ID, 2,7 µm (cat.# 9314A0252)  
**Temp.:** 50 °C  
**Campione:** Acetonitrile, acido acetico 0,1%  
**Diluente:** Vol. iniez.: 3 µL  
**Fase mobile**

A: Acqua, acido formico 0,2%, formato di ammonio 2 mM  
B: Metanolo, acido formico 0,2%, formato di ammonio 2 mM  
C: Metanolo, acido formico 0,2%, formato di ammonio 10 mM

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	%A	%B
0,00	0,4	95	5
2	0,4	40	60
4	0,4	25	75
6	0,4	0	100
8	0,4	0	100
8,01	0,4	95	5
10	0,4	95	5

**Detector** MS/MS  
**Fonte ioni:** Eletrospray  
**Modalità ioni:** ESI+  
**Modalità:** MRM  
**Strumentazione:** UHPLC  
**Note**

**Estrazione e fortificazione dei campioni**  
L'avocado è stato sbucciato e omogeneizzato, poi un campione di 5 g è stato pesato in una provetta in polipropilene da 50 mL. 10 mL di acetonitrile contenente 0,1% di acido acetico sono stati aggiunti al campione e poi vortexati. I campioni sono stati agitati con uno shaker per 10 minuti e poi centrifugati a 4200 rpm per altri 10 minuti. Un'aliquota è stata trasferita in un vial e fortificata con analiti per una concentrazione finale di 50 ng/g. Il campione è stato vortexato e un'aliquota è stata trasferita in un vial filtrante Thomson PTFE da 0,2 µm (cat.# 25893) e filtrata prima dell'iniezione.

#### Preparazione del campione in linea (ILSP)

Il sistema UHPLC è stato dotato di una pompa ausiliaria, una valvola di commutazione ad alta pressione a 6 porte e una cartuccia per pesticidi ILSP Revive 5 x 2,1 mm con holder (cat.# 27882). A 5,5 min, dopo che i composti target sono stati tutti eluiti dalla cartuccia ILSP e sottoposti ad analisi, la valvola di commutazione è stata usata come descritto in seguito per sciaguare la cartuccia ILSP ed eliminare i componenti della matrice rimasti bloccati. A 7,0 min è stata ripristinata la configurazione originale della valvola, dove la cartuccia ILSP è in linea con la colonna analitica, e il sistema è stato riportato in equilibrio prima dell'iniezione successiva.

- 0 min; posizione valvola 0
- 0 min; flusso C = 0 mL/min
- 5,49 min; flusso C = 0 mL/min
- 5,5 min; posizione valvola 1
- 5,5 min; flusso C = 1 mL/min
- 6,9 min; flusso C = 1 mL/min
- 7 min; flusso C = 0 mL/min
- 7 min; posizione valvola 0

## ILSP Revive in azione: analisi multiresiduale dei pesticidi in vari alimenti

L'analisi dei pesticidi nei prodotti alimentari è un'operazione particolarmente complessa a causa della vasta gamma di chimiche degli analiti e di tipi di matrice (ricco di grassi, ricco di zuccheri, altamente pigmentato, povero di acqua, ecc.). Per affrontare questa difficoltà, è stata elaborata una serie di prodotti QuEChERS che garantiscono estrazione e purificazione efficaci in diverse situazioni. Tuttavia, una singola cartuccia per pesticidi ILSP Revive può fornire risultati eccellenti nella stessa vasta gamma di analiti e matrici.

Per dimostrare questa ampia applicabilità è stato condotto uno studio di recupero impiegando i metodi di preparazione del campione in linea sviluppati per sei prodotti appartenenti a cinque gruppi di prodotti contemplati nelle linee guida SANTE/12682/2019 (Tabella I). Questi alimenti sono stati fortificati con 61 pesticidi rappresentativi di una gamma di composti chimici con diversi tempi di eluizione (rapido, medio, tardivo) in un cromatogramma con metodo tipico di screening multiresiduale dei pesticidi (Tabella II).

**Tabella I:** Prodotti utilizzati per sviluppare i metodi ILSP Revive.

Gruppo prodotto	Campione alimento
A elevato contenuto idrico e di pigmento	Spinaci
A elevato contenuto acido e idrico	Arancia intera
A elevato contenuto di lipidi e scarso contenuto idrico	Farina di soia
A elevato contenuto di lipidi e medio contenuto idrico	Avocado
"Prodotti difficili o unici"	Carcadè
	Tè nero

**Tabella II:** Gli esperimenti di recupero con ILSP Revive sono stati condotti utilizzando 61 pesticidi diversi sia per caratteristiche chimiche che per tempo di eluizione (rapido, medio, tardivo) in metodi tipici di screening multiresiduale dei pesticidi.

Lista dei pesticidi monitorati		
Ciromazina	Flutolanil	Benzossimato
Dinotefuran	Mepronil	Trifloxistrobina
Nitenpyram	Miclobutanile	Metaflumizone
Imidacloprid	Metossifenozide	Fluazinam
Acetamiprid	Triadimefone	Tebufenpirad
Oxadixil	Mepanipirim	Piriproxifene
Carbetamide	Fluoxastrobin	Piperonil butossido
Piracarbolido	Fenhexamid	Quinoxifen
Secbumeton	Butafenacil	Amitraz
Prometon	Cyprodinil	Fenpirossimato
Terbumeton	Picossistrobina	Eprinomectina
Ametryn	Rotenone	Abamectina B1a
Metalaxyd	Tebufenozide	Fenazaquin
Clorantraniliprol	Dimossistrobina	Doramectina
Pirimetanil	Carfentrazone-etile +NH4	Ivermectina
Spiroxamina	Kresoxim-metile	Moxidectina
Azoxystrobin	Zoxamide	Enilconazole
Halofenozide	Famoxadone	Pimetrozina
Furalaxyd	Benalaxyd	Fludioxinol
Boscalid	Clofentezine	
Mandipropamide	Prochloraz	

## Estrazione di campioni ILSP

Per l'estrazione ILSP Revive, l'omogeneizzazione dei campioni seguita da un'estrazione liquido-solido ha funzionato bene per tutti i prodotti in esame. I parametri esatti dell'estrazione (solvente, volume, tempo di agitazione, filtrazione, ecc.) sono stati ottimizzati per ogni prodotto, ma la procedura complessiva è stata semplice, veloce ed efficace: omogeneizzazione, aggiunta del solvente, agitazione, seguiti se necessario dalla filtrazione del campione. Inoltre, i metodi di preparazione del campione in linea riducono la perdita di analiti durante la purificazione, in quanto non avviene la fase dispersiva di purificazione tipica dei metodi QuEChERS.

## Il recupero della ILSP nei vari gruppi di prodotto

Quasi tutti i pesticidi in esame sono stati recuperati da tutte le sei diverse matrici entro le linee guida prestazionali SANTE/12682/2019, tramite LC-MS/MS con intervallo di sensibilità medio-basso (Tabella III). Tali risultati dimostrano l'ampia applicabilità della preparazione del campione in linea Revive per il monitoraggio multiresiduale dei pesticidi nei prodotti alimentari per il consumo umano e animale.

Inoltre, nel confronto con metodi analoghi QuEChERS, ILSP Revive ha ottenuto prestazioni affini, quando non superiori, in tutti i casi in esame. Per esempio, qualora i composti non rientrino nell'intervallo di recupero ideale del 70-120%, le linee guida SANTE/12682/2019 dispongono di riportare quei dati se i risultati sono coerenti, come accade con la purificazione riproducibile e automatica ILSP.

**Tabella III:** Prestazioni di recupero totale per i metodi ILSP Revive sviluppata per sei prodotti alimentari differenti.

Prodotto	Percentuale di composti con un recupero di 70-120% e ≤20% RSD (concentrazione)
Spinaci	85,7% (5 ng/g); 95,2% (100 ng/g)
Arancia intera	87% (10 ng/g)
Farina di soia	97% (10 ng/g)
Avocado	95% (10 ng/g)
Carcadè	92% (10 ng/g)
Tè nero	98% (10 ng/g)

## Gli effetti della matrice e la ILSP

Come in qualsiasi analisi di campioni reali, è probabile che alcuni componenti della matrice vengano estratti insieme agli analiti target. Sotto questo aspetto, il metodo ILSP non è diverso da qualsiasi altra tecnica di preparazione dei campioni e il miglior modo per garantire una quantificazione accurata è quello di usare standard di calibrazione accoppiati alla matrice. Ciò vale in particolare per i composti che eluiscono all'inizio della corsa, dove è più probabile che compaiano i componenti della matrice non trattenuti, causando potenziamento o soppressione.

Oltre a influire sulla quantificazione, i componenti della matrice possono contaminare la strumentazione. Utilizzando i metodi di preparazione del campione in linea, si iniettano estratti non purificati, perciò è importante effettuare il lavaggio esterno e interno dell'ago tra un'iniezione e l'altra. In questo modo si evita sia il carryover tra un campione e l'altro sia la formazione di incrostazioni, la cui rimozione potrebbe determinare tempi di inattività dello strumento.

## **Bibliografia**

- [1] S.A. Lupo, R.L. Romesberg, X. Lu, Automated inline pigment removal for the analysis of pesticide residues in spinach by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1629 (2020) 461477. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461477>
- [2] EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, SANTE/2019/12682, Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (2020). [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance\\_SANTE\\_2019\\_12682.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf)

# Preparazione del campione in linea Revive: un approccio più rapido per l'analisi multiresiduale dei pesticidi negli alimenti

La preparazione del campione in linea mette a frutto le potenzialità del vostro LC-MS/MS per sveltire e automatizzare la purificazione degli estratti dei campioni. 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 il tempo di preparazione dei campioni, ridurre i costi dei prodotti monouso e limitare gli errori derivanti dalle procedure manuali.

## Preparazione del campione in linea (ILSP) Revive

- La purificazione in linea e automatizzata dell'estratto del campione riduce drasticamente il tempo necessario alla 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 i 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.



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

Per maggiori informazioni visitate il sito  
[www.restek.com/Revive](http://www.restek.com/Revive)