

应用纪要

使用Andrew+自动化制备方法进行氨基酸分析

Danielle Cullen, Niamh Stafford, Leanne Davey, Norma Breen, Steven Calciano, Ning Zhang

Waters Corporation

您想进一步了解Andrew+移液机器人吗？

申请产品演示

摘要

本应用纪要的目的是证明手动制备AccQ·Tag标记的氨基酸与使用Andrew+液体处理设备以氨基酸标准品试剂盒进行制备的方法相比，二者之间的等效性与稳定性。

简介

氨基酸是构成蛋白质的最基本成分，因此在细胞培养基和食品中必不可少。要确保为细胞提供最佳生长条件，必须即时监测并优化生物反应器培养基的氨基酸成分。此外，还需要确认食品符合规定的要求。因此，氨基酸分析是一项重要而常规的分析。

样品制备和分析过程非常耗时，可能占用分析人员在实验室中的大部分时间。自动化实验室制备系统使分析人员能够灵活安排时间处理其他任务，实现更有效的时间管理。沃特世推出了针对Andrew Alliance Andrew+平台的自动化样品制备方案，该方案与AccQ·Tag Ultra衍生生化自动化试剂盒（部件号：[186009232](#)）（图1）和氨基酸标准品试剂盒结合使用。由于自动化系统对死体积的要求更高，AccQ·Tag Ultra衍生生化自动化试剂盒增加了试剂量，以便用于自动化系统。随附的试剂量可用于制备多达96个样品，采用3×32个样品的形式。



图1. AccQ·Tag Ultra衍生生化自动化试剂盒

沃特世可提供包含21种氨基酸的食品和饲料试剂盒以及包含26种氨基酸的氨基酸细胞培养标准品试剂盒（表1）。Andrew+液体处理设备的方案存储在OneLab，这是一款云端软件，具有直观的图形界面，非常方便用户操作。本应用纪要使用细胞培养氨基酸标准品以及食品和饲料氨基酸标准品展示了手动和自动样品制备方法获得的结果。

氨基酸	细胞培养标准品 试剂盒	食品和饲料标准品 试剂盒	内标
	部件号：186009300	部件号：186009300	部件号：186009300
丙氨酸	X	X	
精氨酸	X	X	
天冬氨酸	X	X	
胱氨酸	X	X	
谷氨酸	X	X	
甘氨酸	X	X	
组氨酸	X	X	
异亮氨酸	X	X	
亮氨酸	X	X	
赖氨酸	X	X	
甲硫氨酸	X	X	
苯丙氨酸	X	X	
脯氨酸	X	X	
丝氨酸	X	X	
苏氨酸	X	X	
酪氨酸	X	X	
缬氨酸	X	X	
牛磺酸	X	X	
羟脯氨酸	X		
天冬酰胺	X		
谷氨酰胺	X		
GABA (γ -氨基丁酸)	X		
色氨酸	X		
鸟氨酸	X		
AABA (α -氨基丁酸)	X	X	
羟基赖氨酸	X		
甲硫氨酸亚砷		X	
磺基丙氨酸		X	
正缬氨酸			X

表7. 细胞培养标准品试剂盒中的氨基酸组成

实验

工作流程为：先进行手动或自动样品制备，然后进行液相色谱分析并利用Empower软件处理数据。



图2.AccQ-Tag工作流程中使用的系统和软件

分析方法条件

LC系统:	配备TUV的ACQUITY UPLC H-Class Bio
样品温度:	20°C
分析柱柱温:	43°C (细胞培养物) , 49°C (食品和饲料)
流速:	700 μ L/min
进样体积:	1 μ L
色谱柱:	AccQ•Tag Ultra, 1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm
UV检测波长:	260 nm
流动相A:	100% AccQ•Tag Ultra洗脱液A
流动相B:	90:10水, AccQ•Tag Ultra洗脱液B
流动相C:	100% HPLC级水
流动相D:	100% AccQ•Tag Ultra洗脱液B

表2.用于细胞培养物/食品和饲料的AccQ•Tag分析方法

设计因子

方案特点

基于AccQ•Tag衍生生化自动化试剂盒，针对Andrew+液体处理设备创建了一组样品制备方案，包含用于32、64和96个样品的三种方案。此外，OneLab中提供了标准曲线和试剂制备方案，这是一款针对互联设备进行方案设计和执行的软件。标准曲线方案能够在500 μ M~0.5 μ M（胱氨酸250 μ M~0.25 μ M）的参比范围内执行标准品稀释。然后使用稀释所得的标准品结合样品制备方案，绘制7点标准曲线。

试剂制备方案可与Pipette+互联电子移液器结合使用，制备用于样品制备和衍生生化方案的试剂和标准品。制备样品时，还可以灵活加入正缬氨酸内标（部件号：[186009301](#)）。

实验器皿

以AccQ•Tag衍生生化试剂盒手动制备氨基酸样品使用的是沃特世全回收样品瓶。为兼容该自动化方案，将全回收

透明玻璃样品瓶替换为96孔Lo Bind PCR板（部件号：[0030129555](#)）。此实验器皿还适合在制备过程中与Shaker+、Peltier+和夹钳配合使用。针对实验器皿更改执行测试以证明更改可行，结果表明更改实验器皿对产品性能无影响。

实验设计

使用手动方法和Andrew+样品制备方法制备食品和饲料以及细胞培养标准品。使用AccQ·Tag Ultra衍生化自动化试剂盒以及至少两个不同批次的色谱柱和AccQ·Tag Ultra流动相洗脱液。对于食品和饲料以及细胞培养物，均创建了涵盖浓度范围（10 μ M、200 μ M和400 μ M）的三个溶剂组(0.1 M HCl)。这些溶剂组包含相关氨基酸以评估制备性能。

结果与讨论

本研究评估了使用Andrew+平台的自动化制备方法，并将该方法与手动制备方法进行比较，以研究稳定性和等效性。在三种浓度水平（10 μ M、200 μ M和400 μ M）下监测性能特征，确定结果的准确度和精密度（保留时间、分析物峰面积和浓度）以及线性。使用AccQ·Tag Ultra 32样品方案，每个浓度制备六份样品，总共评估18种样品。制备一份溶剂组，重复进样两次。计算第一次进样的结果。仅在仪器出现问题时才分析重复进样的结果作为备份。所有实验均使用正缬氨酸作为内标。使用正缬氨酸作为内标可以有效补偿样品水解和氨基酸分析产生的差异性。

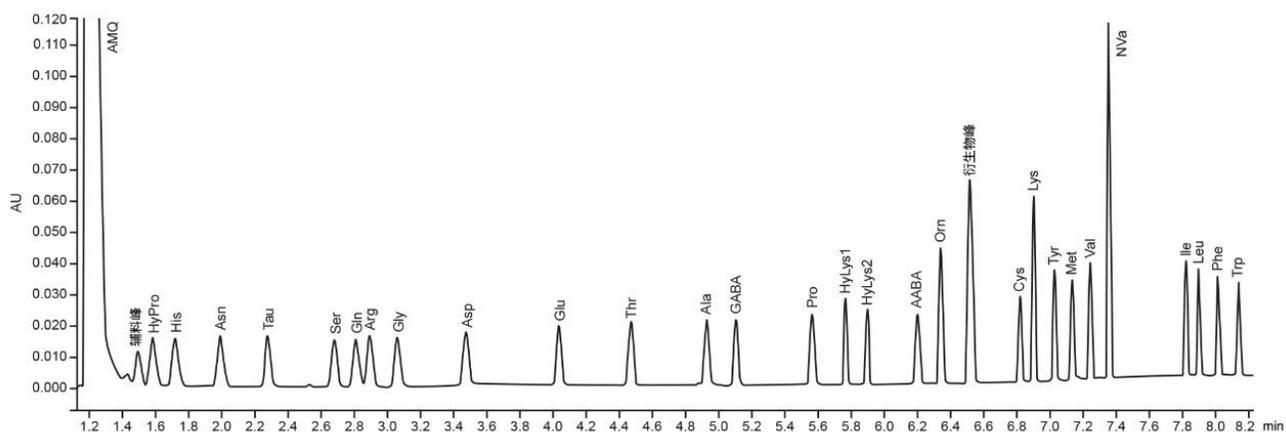


图3.柱上进样加标23.5 pmol Nva的10 pmol细胞培养标准品得到的分离结果

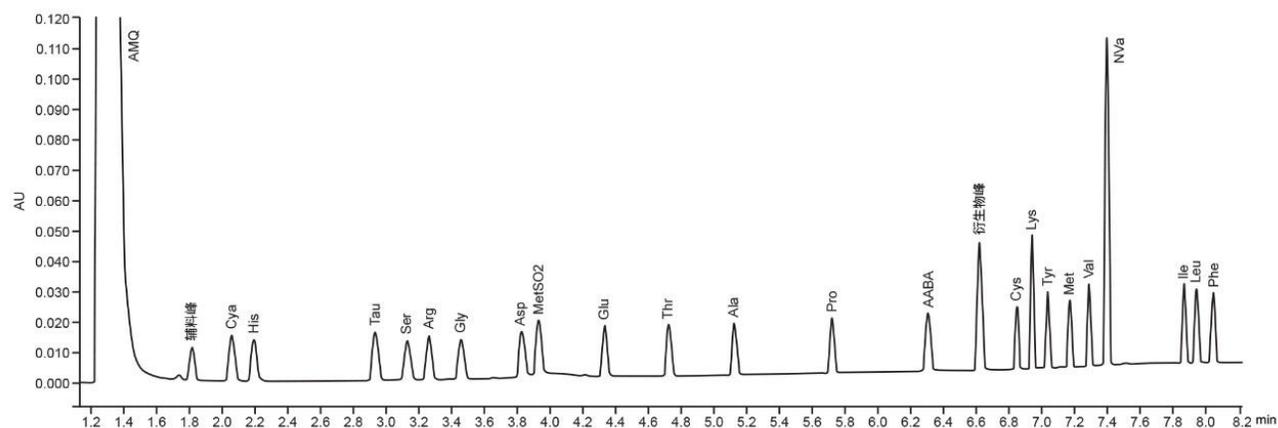


图4.柱上进样加标23.5 pmol Nva的10 pmol食品 and 饲料标准品得到的分离结果

精密度

为证明自动化样品制备方法与手动制备方法的重现性，确定了每个浓度水平下的%CV。对于细胞培养物，Andrew+和手动制备方法的所有氨基酸在所有浓度水平下的平均%CV上限分别为2.0%和2.3%。对于食品和饲料，Andrew+和手动制备方法的所有氨基酸在所有浓度水平下的平均%CV上限分别为1.7%和2.8%。表3和表4的数据表明，Andrew+与手动制备方法的精密度相当。

细胞培养物浓度%CV (n=6)						
分析物	Andrew +			手动		
	10 μ M	200 μ M	400 μ M	10 μ M	200 μ M	400 μ M
HyPro	0.9	1.0	2.4	2.0	1.5	1.9
His	1.1	1.1	2.3	2.4	1.4	1.6
Asn	1.3	1.1	2.2	2.3	2.2	3.1
Tau	1.3	1.1	2.5	2.0	1.5	1.6
Ser	0.9	1.1	1.8	2.4	1.5	1.7
Gln	2.2	1.1	2.1	1.9	1.4	1.4
Arg	1.2	1.1	2.2	2.5	1.9	1.8
Gly	1.3	1.1	2.3	2.7	1.5	1.6
Asp	1.7	1.8	1.8	2.4	1.8	3.3
Glu	1.4	1.6	1.6	2.4	1.7	2.9
Thr	1.5	1.5	2.1	2.4	1.5	1.6
Ala	1.9	1.5	1.5	2.1	1.7	2.5
GABA	2.1*	2.3	2.1	2.4	2.0	4.3
Pro	1.7	1.2	1.6	2.4	1.5	1.8
HyLys1	3.8	1.2	1.7	2.3	1.5	1.7
HyLys2	1.2	1.2	1.7	2.3	1.5	1.7
AABA	1.5	1.3	1.5	2.4	1.6	2.1
Orn	1.5	1.5	1.8	2.3	1.6	2.4
Cys	1.2*	1.1	2.3	2.5	1.5	1.6
Lys	1.8	1.9	2.0	2.3	1.7	3.1
Tyr	1.0	1.1	2.6	2.4	1.5	1.6
Met	1.2	1.0	2.0	2.7	1.6	1.8
Val	1.3	1.2	1.6	2.3	1.5	1.8
Ile	1.3	1.2	1.6	2.1	1.5	1.8
Leu	1.1	1.2	1.6	2.5	1.5	1.8
Phe	1.2	1.2	2.6	2.2	1.5	1.6
Trp	1.1	1.2	2.9	2.3	1.5	1.7

表3.使用Andrew+和手动制备方法得到的10 μ M、200 μ M和400 μ M细胞培养物溶剂组的%CV

*由于积分错误，因此使用第二次进样的结果

食品和饲料浓度%CV (n=6)						
分析物	Andrew +			手动		
	10 μ M	200 μ M	400 μ M	10 μ M	200 μ M	400 μ M
Cya	0.6	0.9	2.3	2.1	2.5	1.6
His	0.2	1.0	2.4	0.4	2.8	1.5
Tau	0.9	1.0	2.5	1.4	2.8	1.5
Ser	0.7	0.8	1.6	2.0	2.8	1.5
Arg	0.5	1.0	2.3	0.6	2.9	1.7
Gly	1.8	1.0	2.1	1.1	2.8	1.6
Asp	0.5	1.2	1.2	1.0	2.7	1.7
MetSO2	0.9	0.8	2.1	1.1	2.9	1.5
Glu	0.3	1.0	0.9	0.6	2.8	1.6
Thr	0.6	0.8	1.5	1.4	2.9	1.5
Ala	0.4	0.9	0.9	0.9	2.8	1.6
Pro	0.5	0.8	1.2	1.3	2.8	1.5
AABA	0.3	0.8	0.9	0.6	2.8	1.5
Cys	0.4	1.0	2.3	0.7	2.8	1.5
Lys	0.4	1.2	1.4	0.7	2.8	1.7
Tyr	0.6	1.0	2.6	0.8	2.9	1.5
Met	0.3	0.9	1.9	0.8	2.8	1.7
Val	1.5	0.8	1.1	2.2	2.9	1.5
Ile	0.3	0.8	1.1	0.9	2.9	1.5
Leu	0.4	0.8	1.2	0.8	2.8	1.6
Phe	0.5	1.0	2.6	0.8	2.8	1.5

表4.使用Andrew+和手动制备方法得到的10 μ M、200 μ M和400 μ M食品和饲料溶剂组的%CV

准确度

在10 μ M、200 μ M和400 μ M浓度下评估准确度，每种浓度制备六份样品。利用六份样品的平均浓度计算与目标值之差，确定回收率%。细胞培养物以及食品和饲料中各氨基酸的回收率%均在目标浓度的10%以内（表5和表6）。这些回收率数据表明，Andrew+非常适合作为氨基酸手动衍生化方法的替代选择，有助于节省时间。

细胞培养物回收率% (n=6)						
分析物	Andrew+			手动		
	10 μ M	200 μ M	400 μ M	10 μ M	200 μ M	400 μ M
HyPro	93.7	94.1	97.2	102.2	105.8	108.6
His	95.5	93.8	95.3	104.7	103.4	102.5
Asn	93.1	94.3	96.7	101.9	108.6	107.0
Tau	90.0	93.1	96.0	103.6	105.8	106.3
Ser	95.9	96.1	95.9	102.1	104.3	102.7
Gln	95.0	92.6	94.8	102.9	105.5	104.5
Arg	94.3	94.3	95.7	102.9	104.6	102.5
Gly	94.1	93.5	95.8	101.2	102.8	102.9
Asp	96.8	97.8	95.8	101.7	107.6	102.6
Glu	97.8	97.8	95.0	104.8	107.0	102.0
Thr	91.2	95.0	95.3	100.3	103.8	102.2
Ala	97.3	97.8	96.6	94.7	106.9	100.2
GABA	100.6	98.4	96.3	111.1	113.6	107.4
Pro	95.8	94.7	95.3	97.8	103.1	102.3
HyLys1	95.3	98.1	99.0	112.1	114.6	114.6
HyLys2	94.7	95.5	96.2	111.7	113.3	113.0
AABA	93.4	95.1	95.9	101.0	107.1	106.9
Orn	100.7	95.7	95.2	105.6	107.8	106.3
Cys	98.6	93.6	95.4	100.9	103.2	102.8
Lys	98.0	96.1	94.2	103.9	105.8	102.0
Tyr	93.4	93.1	95.5	100.6	102.6	102.7
Met	92.2	92.6	90.5	100.4	102.3	99.9
Val	95.0	94.6	95.2	101.9	103.5	102.4
Ile	94.1	94.5	95.6	102.4	103.3	102.8
Leu	99.0	94.4	94.9	102.4	103.3	102.1
Phe	93.0	93.3	95.8	100.6	103.0	102.8
Trp	94.1	93.4	96.0	102.7	107.1	106.6

表5.细胞培养物氨基酸标准品浓度相对于目标值的回收率%

食品和饲料回收率% (n=6)						
分析物	Andrew+			手动		
	10 µM	200 µM	400 µM	10 µM	200 µM	400 µM
Cya	98.4	93.2	96.4	97.1	102.8	100.7
His	98.1	92.0	95.0	100.7	100.3	97.2
Tau	98.7	93.0	96.3	106.9	101.4	98.1
Ser	100.7	94.3	95.6	102.3	101.1	97.7
Arg	98.3	93.1	95.9	102.9	102.5	98.8
Gly	99.3	92.8	96.5	101.7	100.5	97.6
Asp	101.8	96.3	95.2	101.1	102.8	98.6
MetSO2	105.7	93.8	97.8	99.1	102.4	100.3
Glu	102.6	95.6	94.1	102.4	102.6	98.0
Thr	103.4	93.1	94.8	102.0	100.8	97.5
Ala	101.8	94.2	93.9	101.9	101.2	97.3
Pro	100.0	93.3	94.7	100.9	100.5	97.2
AABA	101.2	94.2	94.7	102.5	102.1	98.7
Cys	99.4	92.6	95.7	102.3	101.3	97.9
Lys	101.4	93.9	92.3	101.6	101.3	96.8
Tyr	97.9	92.5	96.2	102.6	100.7	97.6
Met	97.2	91.0	91.1	99.3	99.1	93.1
Val	101.7	93.0	94.1	93.7	100.7	97.2
Ile	99.7	92.8	94.2	101.6	100.5	97.3
Leu	99.5	92.8	94.3	101.0	100.5	97.5
Phe	97.9	92.3	95.9	101.0	100.6	97.5

表6. 食品和饲料氨基酸标准品浓度相对于目标值的回收率%

线性

使用细胞培养标准品为每种氨基酸制备七个浓度水平，浓度范围0.5 µM~500 µM（胱氨酸0.25 µM~250 µM），用于评估线性。对所有分析的线性进行评估，结果均符合 $r^2 > 0.995$ 的标准，且校准品2-7 (2.5 µM~500 µM)的浓度点与预期浓度的偏差不超过15%，校准品1 (0.5 µM)的偏差不超过20%。利用手动制备方法和自动制备方法获得的数据一致，未观察到任何趋势。

细胞培养物样品 R ²		
氨基酸	Andrew+	手动
HyPro	0.9991	0.9990
His	0.9992	0.9997
Asn	0.9991	0.9997
Tau	0.9988	0.9997
Ser	0.9993	0.9997
Gln	0.9993	0.9998
Arg	0.9993	0.9997
Gly	0.9991	0.9997
Asp	0.9988	0.9992
Glu	0.9991	0.9995
Thr	0.9993	0.9998
Ala	0.9993	0.9997
GABA	0.9988	0.9980
Pro	0.9993	0.9997
HyLys1	0.9994	0.9997
HyLys2	0.9994	0.9997
AABA	0.9993	0.9998
Orn	0.9993	0.9998
Cys	0.9993	0.9997
Lys	0.9992	0.9996
Tyr	0.9992	0.9996
Met	0.9993	0.9997
Val	0.9993	0.9997
Ile	0.9993	0.9997
Leu	0.9994	0.9997
Phe	0.9991	0.9997
Trp	0.9992	0.9997

表7.使用沃特世氨基酸细胞培养标准品生成的标准曲线的R²值。所有标准曲线的R²值均大于0.995，通过可接受标

准。

食品和饲料样品 R ²		
氨基酸	Andrew+	手动
Cya	0.9996	0.9997
His	0.9996	0.9990
Tau	0.9997	0.9989
Ser	0.9993	0.9989
Arg	0.9995	0.9980
Gly	0.9997	0.9989
Asp	0.9981	0.9982
MetSO ₂	0.9996	0.9991
Glu	0.9984	0.9984
Thr	0.9995	0.9989
Ala	0.9990	0.9987
Pro	0.9994	0.9990
AABA	0.9992	0.9989
Cys	0.9996	0.9988
Lys	0.9985	0.9985
Tyr	0.9996	0.9990
Met	0.9996	0.9985
Val	0.9994	0.9985
Ile	0.9994	0.9990
Leu	0.9994	0.9990
Phe	0.9996	0.9990

表8.使用沃特世氨基酸食品和饲料标准品生成的标准曲线的R²值。所有标准曲线的R²值均大于0.995，通过可接受

标准。

结论

利用精密度、准确度和线性等性能特征确定Andrew+制备方法与手动制备方法的等效性。结果表明，两种样品制备方法在UPLC氨基酸分析解决方案中表现出优异的可比性，但在进行对比分析时，自动化方法在便捷方面的优势也不容忽视：

- Andrew+机器人可以在1 h内完成校准标样制备和样品制备，在不影响准确性和精密度的情况下提高效率。
- 开发的自动化方案在运行过程中无需手动干预，得益于配置蓝牙功能的移液器实现不同体积切换，以及夹钳设备轻松转移实验器皿，使分析人员有时间执行其他实验室任务。
- OneLab云端软件允许用户利用任何可用的联网计算机或平板电脑监测运行状况。
- 运用自动化方法可以消除分析人员之间的差异性，使实验室和公司能够实现分析方法标准化，并促进方法在多个研究地点之间转移。

致谢

Danielle Cullen, Niamh Stafford, Leanne Davey, Norma Breen（沃特世科技爱尔兰有限公司）；Steven Calciano, Ning Zhang（沃特世公司，美国马萨诸塞州米尔福德）。

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

在LC和LC-MS样品制备工作流程中实现自动化液体处理 <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135070059>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007042ZH, 2020年9月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号