

使用Andrew+移液机器人和Xevo TQ-S micro对血清中的甲基丙二酸进行自动制备和LC-MS/MS分析

Danielle Cullen, Sarah Dunne

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本文介绍了在Andrew+上采用Ostro样品板进行蛋白沉淀和磷脂去除，从血清中自动萃取MMA的方法。MMA Andrew+方案在开发时利用了现有的MMA工作流程和LC-MS分析方法，能够实现高通量样品制备。利用Andrew+进行MMA样品制备可发挥出色的灵活性、重现性，同时节省分析人员的时间。

样品定量分析采用装配ACQUITY UPLC CSH C₁₈, 1.7 μm色谱柱（部件号：[186005297](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005297) <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005297>>）的ACQUITY UPLC I-Class系统，并通过Waters Xevo TQ-S micro串联四极杆质谱仪进行检测。将成熟的LC-MS/MS方法与Andrew+结合使用，可实现准确、稳定的分析物定量。

优势

- 自动化样品制备，使拥有娴熟技能的分析人员能够更好地利用其时间
- 自动化方法转移
- 改善数据，减少错误
- 采用96孔板，大幅提升通量
- 所得结果与手动制备方法相当

简介

甲基丙二酸(MMA)的分析可用于测定维生素B-12的血清含量。MMA是维生素B12的优选指标，因为即使在缺乏的情况下，维生素B-12血清含量也可能正常或偏高¹。通过LC-MS/MS分析研究该生物标志物是实现高通量的理想选择。为进一步优化血清样品分析，之前已经简化的MMA工作流程在Andrew+上实现了自动化²。沃特世甲基丙二酸法利用Ostro蛋白沉淀和磷脂去除96孔板（部件号：[186005518](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005518) <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005518>>），以简化、高通量形式提供了更洁净、可重现的提取物。

即使采用简化的工作流程，开发自动化方法也是一项艰巨的任务。在用户友好的云端OneLab软件中创建了Andrew+ MMA方案，该软件能够为用户提供有用的提示和拖放功能。MMA方案纳入了当前的手动制备步骤，其中包括在Vacuum+装置上进行样品净化之前，在Ostro样品板内进行试剂转移和充分混合。该方案中存在用户提示，允许在工作台外完成蒸发步骤，使用户能够在样品板准备就绪后，继续执行方案中的最终移液步骤。方案组合过程简单，用户得以专注于准确移液和充分混合所需的参数（例如液体处理）。正确调整这些参数对于确保样品制备的准确度和精密度至关重要。在OneLab中，液体处理参数的调整简单直接，为用户省去了复杂的手动移液步骤。调整自动化制备参数的一个示例是使用移液器混合代替涡旋混合。优化混合速度，确保样品充分混合，从而改善精密度和回收率结果。

自动化可以消除可能由高通量样品制备造成的瓶颈。与LC-MS/MS分析结合使用，可以获得一种高效、稳定且节省分析人员时间的解决方案。此外，用户友好的软件和统一的工作台设置使方法的创建和执行更加容易，尤其是从一个实验室转移至另一个实验室时。

实验

自动化制备



- 将100 μL 离心后的样品（在3000 g下离心5 min）加入Ostro磷脂去除板中
- 然后将25 μL 内标加入Ostro样品板中，每次添加后用移液器充分混合
- 将400 μL 含1%甲酸的乙腈溶液加入Ostro样品板中，每次添加后用移液器充分混合

- 使用设置在500 mbar下的Vacuum+在2 min内将样品洗脱到2 mL 96孔收集板中
- 用户通知允许移除2 mL收集板，因此可以使用氮气在50 $^{\circ}\text{C}$ 下将样品蒸干
注：用户通知将暂停Andrew+，直至蒸发完成。

- 然后将2 mL收集板放回Andrew+上，恢复制备方案，将样品复溶于60 μL 含1%甲酸的水溶液中，用移液器充分混合
- 最后，提示用户密封并从Andrew+中取出样品，在3000 g下离心2 min，然后进行分析。

结果与讨论

在开发方案时，对移液器的液体处理参数进行了改进，以确保萃取前在Ostro样品板内平稳且一致地转移样品并充分混合。在有关蒸发步骤的方案中添加一条用户提示，该步骤在工作台外部完成，大约需要50 min。另一条建议是此时可将该方案分为两部分，以便在需要时同时使用Andrew+。该方案所用的工作台配置可参见图1。



图1.Andrew+ MMA工作台配置 - Dominos: 1和2: 吸头盒; 3、4和8: 深孔板; 5: μ Elution提取板Vacuum+ ; 7: 微量离心管

Andrew+将一组八个Recipe MMA 1级质控样品和2级质控样品等分试样转移至2 mL收集板（部件号：[186002482](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002482) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002482>>）的前两行中。手动制备相同的样品用于比较。研究对Andrew+与手动制备得到的每个浓度下8份样品制剂的峰面积计数进行了比较。与手动制备方法相比，采用Andrew+使两种QC浓度的8份制剂获得了更高的精密度，结果分别为 $\leq 3.5\%$ （自动化制备）和 $\leq 5.2\%$ （手动制备）（见图2）。

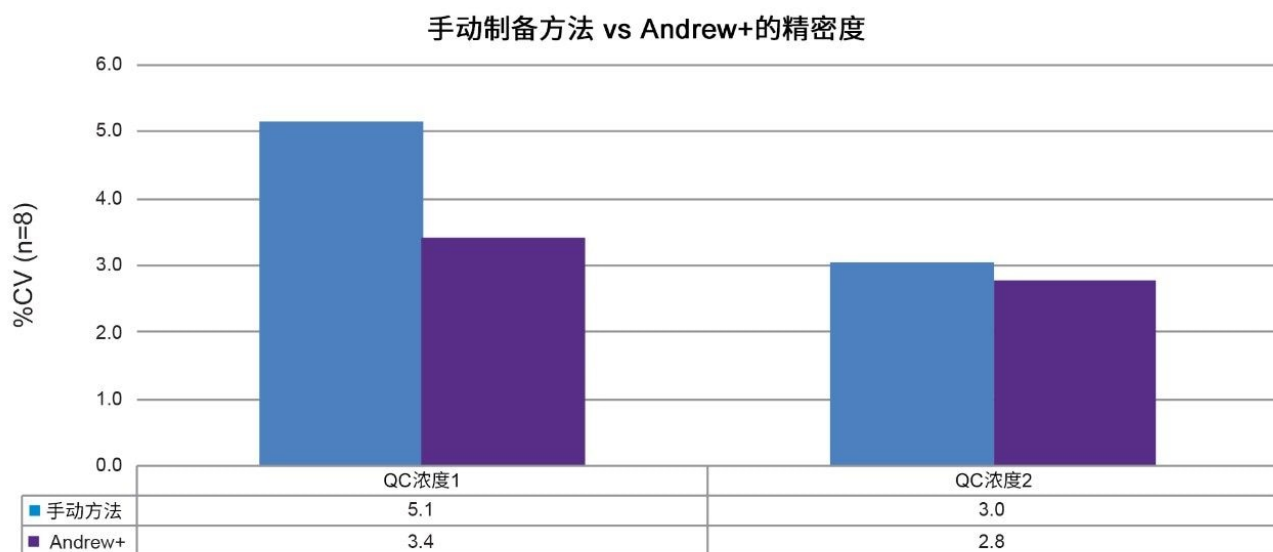


图2.采用手动制备和Andrew+自动化制备得到的质控样品的精密度

还计算了采用Andrew+制备与手动制备得到的峰面积计数的%回收率。在两个QC浓度下，手动制备与自动化制备之间的差异小于4%，证明了Andrew+与手动制备方法的可比性。

手动制备方法 vs Andrew+的回收率(%)		
	QC浓度1	QC浓度2
手动方法	100.0	100.0
Andrew+	96.3	96.2

有关所用MMA UPLC-MS/MS方法和材料的更多信息，可参见沃特世应用纪要720006806 <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/analysis-of-methylmalonic-acid-in-serum-using-the-xevo-tq-s-micro-for-clinical-research.html>>。

结论

使用Andrew+成功开发出一种用于MMA的自动化样品制备方法。整个浓度范围内的QC样品分析表现出优异的精密度和回收率，且结果与手动制备结果一致。

参考资料

1. Vashi, P.; Edwin, P.; Popiel, B.; Lammersfeld, C.; Gupta, D. (2016) Methylmalonic Acid and Homocysteine as Indicators of Vitamin B-12 Deficiency in Cancer. PLoS ONE 11(1): e0147843. doi:10.1371/journal.pone.0147843
2. Foley, D.; Van Hulle, M.; Brown, H. A.; Calton, L. J. Analysis of Methylmalonic Acid in Serum Using the Xevo TQ-S micro for Clinical Research. Waters Application Note, 720006806 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/analysis-of-methylmalonic-acid-in-serum-using-the-xevo-tq-s-micro-for-clinical-research.html>> , 2020.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

ACQUITY UPLC和ACQUITY PREMIER色谱柱 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513206>>

720007187ZH, 2021年3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