

アプリケーションノート

## Andrew+ 自動前処理を用いたアミノ酸分析

---

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

Waters Corporation

Andrew+ ピペッティングロボット  
についてもっと詳しく知りたいで  
すか？

デモのリクエスト

---

### 要約

このアプリケーションノートでは、AccQ●Tag 標識アミノ酸の、手動による前処理と、Andrew+ リキッドハンドリングロボットでアミノ酸標準キットを用いた自動前処理との、同等性と堅牢性を実証します。

---

### はじめに

---

アミノ酸は、タンパク質を形成する上で最も基本となる成分であり、細胞培養培地および食品の重要な成分となっています。バイオリアクターの培地のアミノ酸成分をモニタリングおよび最適化することは、細胞増殖のための最善の状態を確認するために必要です。同様に、食品が要件を満たしていることを確認することが必要です。そのため、アミノ酸の分析は重要なルーチンプロセスとなります。

サンプルの前処理および分析には時間がかかり、科学者がラボで過ごす時間の大半を占める場合もあります。ラボの自動前処理システムにより、科学者が他の作業を行う時間の余裕と柔軟性が得られ、効率の良い時間管理ができるようになります。ウォーターズは、AccQ●Tag Ultra 自動誘導体化キット（製品番号：186009232）（図1）およびアミノ酸標準キットと組み合わせた Andrew Alliance の Andrew+ プラットホームのための自動サンプル前処理プロトコルを作成しました。デッドボリュームの要件が増大したため、AccQ●Tag Ultra 自動誘導体化キットでは、自動化システムでの使用に必要な試薬の量をスケールアップしました。この試薬供給量により、最大 96 サンプルを 3 × 32 のサンプルフォーマットで前処理することができます。



図1. AccQ●Tag Ultra 自動誘導体化キット

食品・飼料キットには、21種のアミノ酸が含まれ、アミノ酸の細胞培地標準試料キットには、26種のアミノ酸が含まれています（表1）。Andrew+ リキッドハンドリングロボットのプロトコルは、直感的で使いやすいグラフィックインターフェースを採用した、クラウドベースのソフトウェアである OneLab に保管されています。このアプリケーションノートでは、細胞培地および食品・飼料アミノ酸標準品を使用して、手動および自動のサンプル前処理で得られた結果を両方示しています。

アミノ酸	細胞培地 標準試料キット	食品・飼料 標準試料キット	内部標準
	製品番号：186009300	製品番号：186009300	製品番号：186009300
アラニン	X	X	
アルギニン	X	X	
アスパラギン酸	X	X	
シスチン	X	X	
グルタミン酸	X	X	
グリシン	X	X	
ヒスチジン	X	X	
イソロイシン	X	X	
ロイシン	X	X	
リジン	X	X	
メチオニン	X	X	
フェニルアラニン	X	X	
プロリン	X	X	
セリン	X	X	
スレオニン	X	X	
チロシン	X	X	
バリン	X	X	
タウリン	X	X	
ヒドロキシプロリン	X		
アスパラギン	X		
グルタミン	X		
GABA (γ-アミノ酪酸)	X		
トリプトファン	X		
オルニチン	X		
AABA (α-アミノ酪酸)	X	X	
ヒドロキシリジン	X		
メチオニンスルホン		X	
システイン酸		X	
ノルバリン			X

表 1. 細胞培地標準試料キットのアミノ酸組成

---

## 実験方法

このワークフローでは、手動または自動のサンプル前処理を行った後で、LC 分析および Empower ソフトウェアによるデータ解析を行いました。



---

図 2. AccQ●Tag ワークフローで使用したシステムおよびソフトウェア

## 分析条件

LC システム :	ACQUITY UPLC H-Class Bio、TUV 搭載
サンプル温度 :	20℃
分析カラム温度 :	43℃ (細胞培地)、49℃ (食品・飼料)
流速 :	700 $\mu$ L/分
注入量 :	1 $\mu$ L
カラム :	AccQ・Tag Ultra、1.7 $\mu$ m、2.1 $\times$ 100 mm
UV 検出 :	260 nm
移動相 A :	100% AccQ・Tag Ultra 溶離液 A
移動相 B :	90:10 水 : AccQ・Tag Ultra 溶離液 B
移動相 C :	100% HPLC グレードの水
移動相 D :	100% AccQ・Tag Ultra 溶離液 B

表 2. 細胞培地/食品・飼料用の AccQ●Tag プロファイリングメソッド

## デザイン要因

### プロトコルの特徴

AccQ●Tag 自動誘導体化キットに基づく Andrew+ リキッドハンドリングロボット用の 3 種類のサンプル前処理プロトコル (32、64、96 サンプル) を作成しました。また、検量線および試薬の前処理プロトコルは、接続しているデバイスのためのプロトコルを設計および実行するソフトウェアである OneLab で利用できます。検量線のプロトコルにより、標準試料を 500  $\mu$ M~0.5  $\mu$ M のレファレンス範囲 (シスチン 250  $\mu$ M~0.25  $\mu$ M) に希釈する機能が得られます。次に、得られた希釈済み標準試料を、サンプル前処理プロトコルで 7 ポイントの検量線として使用できます。

試薬の前処理プロトコルを、コネクテッド電子ピペット Pipette+ と組み合わせて使用して、サンプル前処理および誘導体化プロトコル用の試薬と標準試料が調製できます。また、サンプル前処理の際、ノルバルリン内部標準試料 (製品番号: 186009301) を含めるよう柔軟に選択できます。

### 実験器具

AccQ●Tag 誘導体化キットを使用した手動でのアミノ酸サンプルの前処理は、Waters トータルリカバリーバイアルを使用して実施しました。これを自動化に対応させるため、トータルリカバリーガラスバイアルを 96-ウェル Lo-Bind PCR プレート（製品番号：0030129555）に換えました。この実験器具は、前処理の際、Shaker+、Peltier+、グリッパードバイスとも適切に使用できました。実験器具の変更をサポートするために試験を行いました。製品の性能に及ぼす影響は認められませんでした。

## 実験デザイン

食品・飼料および細胞培地標準試料の前処理において、手動および Andrew+ によるサンプル前処理を行いました。AccQ●Tag Ultra 自動誘導体化キットを、最低 2 つのカラムロットと AccQ●Tag Ultra 移動相溶離液とともに使用しました。食品・飼料および細胞培地用に、濃度範囲（10  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$ ）にわたる濃度の 3 種の溶媒パネル（0.1 M HCl）を作成しました。これらのパネルには、前処理の性能を評価するための関連するアミノ酸が含まれていました。

---

## 結果および考察

Andrew+ プラットホームを使用する自動前処理を評価し、頑健性と同等性について手動前処理と比較しました。3 つの濃度（10  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$ ）で性能の特性をモニターすることにより、実験結果の正確度と精度（保持時間、化合物のピーク面積、濃度）ならびに直線性を判定しました。AccQ●Tag Ultra の 32 サンプル用プロトコルを用い、各レベルにつき 6 つの調製物、合計 18 サンプルを評価しました。パネルの前処理は 1 回、注入は 2 回の繰り返しで行いました。1 回目の注入は、結果の計算に使用しました。2 回目の注入は、装置で問題が発生した場合に備え、バックアップとして分析しました。ノルバリン内部標準試料を全ての実験で使用しました。ノルバリン内部標準試料の使用により、サンプルの加水分解やアミノ酸分析中に生じるばらつきが最も良く補正できます。

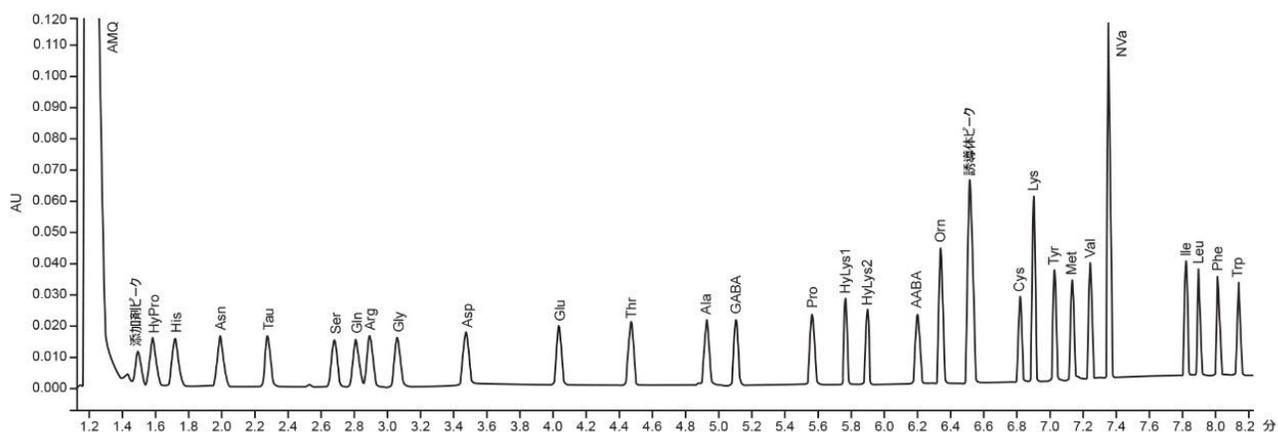


図 3. 23.5 pmol のノルバリンをスパイクしたオンカラムで 10 pmol の細胞培地標準試料の分離

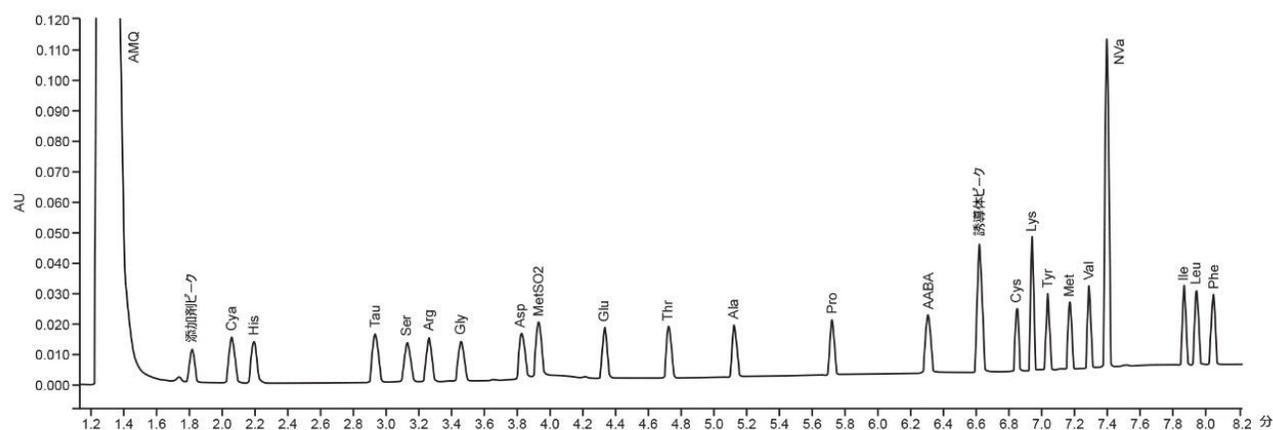


図 4. 23.5 pmol のノルバリンをスパイクしたオンカラムで 10 pmol の食品・飼料標準試料の分離

## 精度

自動サンプル前処理を手動の前処理と比較した場合の再現性を実証するために、各濃度レベルでの %CV を測定しました。細胞培地の Andrew+ および手動の前処理による全アミノ酸および全濃度レベルでの最大平均 %CV は、それぞれ 2.0% および 2.3% でした。食品・飼料の Andrew+ および手動の前処理による全アミノ酸および全濃度レベルでの最大平均 %CV は、それぞれ 1.7% および 2.8% でした。表 3 および表 4 のデータは、Andrew+ および手動の前処理による精度が同等であることを示しています。

細胞培地濃度 %CV (N = 6)						
分析種	Andrew +			手動		
	10 $\mu$ M	200 $\mu$ M	400 $\mu$ M	10 $\mu$ M	200 $\mu$ M	400 $\mu$ 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. 溶媒パネル 10  $\mu$ M、200  $\mu$ M、400  $\mu$ M にわたる Andrew+ および手動で前処理した細胞培地の %CV

\*解析エラーにより、2 回目の注入を使用しました

食品・飼料中濃度 %CV (N = 6)						
分析種	Andrew +			手動		
	10 $\mu$ M	200 $\mu$ M	400 $\mu$ M	10 $\mu$ M	200 $\mu$ M	400 $\mu$ 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. 溶媒パネル 10  $\mu$ M、200  $\mu$ M、400  $\mu$ M にわたる Andrew+ および手動で前処理した食品・飼料の %CV

## 正確度

濃度 10  $\mu$ M、200  $\mu$ M、400  $\mu$ M で、各濃度レベルについて、6 つの調製物を使用して正確度を評価しました。6 つの調製物の平均濃度を使用してターゲット値との差異を計算し、回収率を算出しました。細胞培地および食品・飼料のいずれの場合も、各アミノ酸の回収率はターゲット濃度  $\pm 10\%$  の範囲内でした（表 5、表 6）。回収率のデータから、手動によるアミノ酸誘導体化と比べて大幅な時間の節約ができる代替法として Andrew+ の適合性が実証されました。

細胞培地回収率% (N = 6)						
分析種	Andrew+			手動		
	10 $\mu$ M	200 $\mu$ M	400 $\mu$ M	10 $\mu$ M	200 $\mu$ M	400 $\mu$ 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. ターゲット値からの細胞培地のアミノ酸標準試料の回収率

食品・飼料の回収率% (N = 6)						
分析種	Andrew+			手動		
	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. ターゲット値からの食品・飼料のアミノ酸標準試料の回収率

## 直線性

直線性は、各アミノ酸について、0.5μM~500 μM（シスチン 0.25 μM~250 μM）の範囲にわたる7つの濃度に調製した細胞培地標準試料を使用して評価しました。すべての分析を直線性について評価したところ、すべて  $r^2$  が 0.995 未満という基準を満たしており、キャリブレーション試薬 2~7（2.5μM~500 μM）の予想濃度から 15%、キャリブレーション試薬 1（0.5 μM）の予想濃度から 20% をそれぞれ超えて逸脱した点はありませんでした。手動と自動の前処理法のデータには整合性があり、特定の傾向も観測されませんでした。

細胞培地 R <sup>2</sup>		
アミノ酸	Andrew+	手動
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. Waters アミノ酸細胞培地標準試料を使用して作成した直線の R<sup>2</sup> 値。すべての直線が、R<sup>2</sup> 値が 0.995 を超えると

---

いう許容基準を満たしています。

食品・飼料 R <sup>2</sup>		
アミノ酸	Andrew+	手動
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
MetSO2	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. Waters アミノ酸食品・飼料標準試料を使用して作成した直線の R<sup>2</sup> 値。すべての直線が、R<sup>2</sup> 値が 0.995 を超える

---

という許容基準を満たしています。

---

## 結論

精度、正確度、直線性といった性能特性を用いて、Andrew+ による前処理と手動による前処理とが同等であるかどうかを判定しました。結果によると、UPLC アミノ酸分析ソリューション用の 2 つのサンプル前処理法の間で同等性が優れていることが示されましたが、比較分析を実施したところ、自動前処理には考慮すべき便利なメリットがあります：

- Andrew+ ロボットにより、検量線およびサンプル前処理を 1 時間以内に行うことができ、正確度と精度を犠牲にすることなく、効率を高めることができます。
- 開発された自動化プロトコルは、Bluetooth で設定済みのピペットで容量を切り替えたり、グリッパーデバイスで実験器具を移動するなどの機能を活用して、実験中の手作業の必要がなくなるため、分析者は、他のラボ作業を行うことができるようになります。
- クラウドベースのソフトウェアである OneLab では、手持ちのインターネットに接続したコンピューターまたはタブレットから分析をモニターすることができます。
- 自動化により、実験者ごとのばらつきをなくせるため、ラボや会社が分析法を標準化することができ、複数の拠点間で分析法を移管できるようになります。

## 謝辞

Danielle Cullen, Niamh Stafford, Leanne Davey, Norma Breen (Waters Technologies Ireland Ltd); Steven Calciano, Ning Zhang (Waters Corporation, Milford, MA).

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class Plus Bio システム <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <<https://www.waters.com/514228>>

LC & LC-MS サンプル調製ワークフローのための自動リキッドハンドリング <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135070059>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

720007042JA、2020 年 9 月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)   [プライバシー](#)   [商標](#)   [サイトマップ](#)   [キャリア](#)   [クッキー](#)   [クッキー](#)  
[環境設定](#)