

## 脂質抽出用固相抽出カラム Bond Elut Lipid Extraction による 生体試料からの脂質の添加回収率



### Authors

山下 和之  
澤田 有司

アジレント・テクノロジー  
株式会社

### 要旨

Bond Elut Lipid Extraction は試料中の夾雑物を除去し、高い選択性で脂質を抽出する機能があります。その機能を確認するために、血漿、牛乳といった生体試料に本来存在しない重水素ラベル化した脂質の標準品を添加し、回収率を検証しました。標準品だけの場合、回収率は 73.5~90.9%、生体試料に添加した場合は 68.2~107.6% でした。

Key words : Bond Elut Lipid Extraction、生体試料、脂質、回収率

## はじめに

Bond Elut Lipid Extraction は独自のサイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせた Enhanced Matrix Removal (EMR)-Lipid 充填剤技術を採用した充填剤で、脂質をきわめて選択的かつ効率的に抽出する固相抽出カラムです。試料から脂質を抽出する標準プロトコールが定められており、サンプルロードと脂質溶出の間には洗浄ステップがあり、脂質以外のマトリクス干渉物が除去されます。

本アプリケーションノートでは、血漿、牛乳の生体試料に本来生体試料に存在しない重水素ラベル化脂質を添加し、その回収率を比較することでBond Elut Lipid Extraction の性能を確認しました。

## システム

表1. 装置構成

サンブラ	G7167B 1290 Infinity II マルチサンブラ
ポンプ	G7120A 1290 Infinity II ハイスピードポンプ
カラム恒温槽	G7116B 1290 Infinity II カラムコンパートメント
検出器	G6470B トリプル四重極LC/MSシステム

## 実験方法

### 試料調製

- 脂質標準品は Avanti Polar Lipids 社製 EquiSPLASH LIPIDMIX (P/N330731-1EA) を、メタノールは富士フィルム和光純薬社製 LC/MS 用 (P/N 138-14521) を、アセトニトリルは関東化学社製 LC/MS 用 (P/N 01033-79) を、クロロホルムは関東化学社製 HPLC 用 (P/N 07278-1B) を、ブタノールは関東化学社製 HPLC 用 (P/N04354-1B) を使用しました。血漿はシグマアルドリッチ社製の凍結乾燥品 (ブタ血漿 P2891-2ML, ウシ血漿 P4639-2ML, ヒト血漿 P9523-1ML) を指定量の蒸留水に溶解して使用しました。牛乳は市販のものを使用しました。
- 脂質標準品をメタノールで希釈し、1 µg/mL の溶液を作成して標準品原液とし、この標準品原液 10 µL と生体試料 90 µL を混合して試験用試料としました。試験用試料中の各脂質の濃度は100 ng/mL となり、この濃度を回収率の基準濃度としました。本試料作成時には生体試料のタンパク質変性が生じていないことを目視で確認しました。

## 実験器具と材料

固相抽出カラム	Bond Elut Lipid Extraction 1 mL (P/N 5610-2041)
カラム入口	InfinityLab クイックコネク ト LC フィッティング(P/N 5067-5965)
カラム出口	InfinityLabクイックターン LC フィッティング(P/N 5067-5966)
バイアル、キャップ、バイアルインサート	スクリーバイアル、2 mL、茶色、ラベル付 (P/N 5182-0716) 圧着スクリーキャップ、圧着、青、PTFE/赤シリコンセプタム(P/N 5190-7024) バイアルインサート、250 µL、不活性ガラス、樹脂足付(P/N 5181-8872)
溶媒ボトル、キャップ	Agilent InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1000 mL (P/N 9301-6526) Agilent InfinityLab セーフティキャップ、GL45、3 ポート、1 ベントバルブ (P/N 5043-1219)

### 固相抽出処理

Bond Elut Lipid Extraction には標準プロトコールがあり、それに従って以下のように抽出処理を行いました。手順は図1に示しています。

- 生体試料 90 µL に10 µL の標準品原液 (1 µg/mL)を混合して添加回収率確認用試料としました。
- 氷冷したアセトニトリル/メタノール (99/1) 混合液をタンパク質変性溶媒として添加回収確認用試料に 900 µL 添加しました。
- 氷水中で10 分間超音波処理しました。
- タンパク質変性沈殿物を含む全体をBond Elut Lipid Extraction カラムに負荷しました。
- アセトニトリル/水 (9/1) の洗浄液 1 mL で 2回洗浄後、メタノール/クロロホルム (1/1) の溶出液 1 mL で 2回で溶出、回収しました。
- 窒素吹付で乾固後、100 µL のメタノール/ブタノール (1/1) に再溶解しました。
- ボルテックスミキサーで2分間混合後、10 分間超音波処理し、インサート付バイアルに移して LC/MS 分析を行いました。

脂質標準品を添加しないブランクの生体試料も同様に処理して標準品を後から添加したマトリクススタンダードを作成し、マトリクススタンダードを基準とした回収率を求めました。

### 分析条件

表2の条件でLC/MS/MSで分析しました。

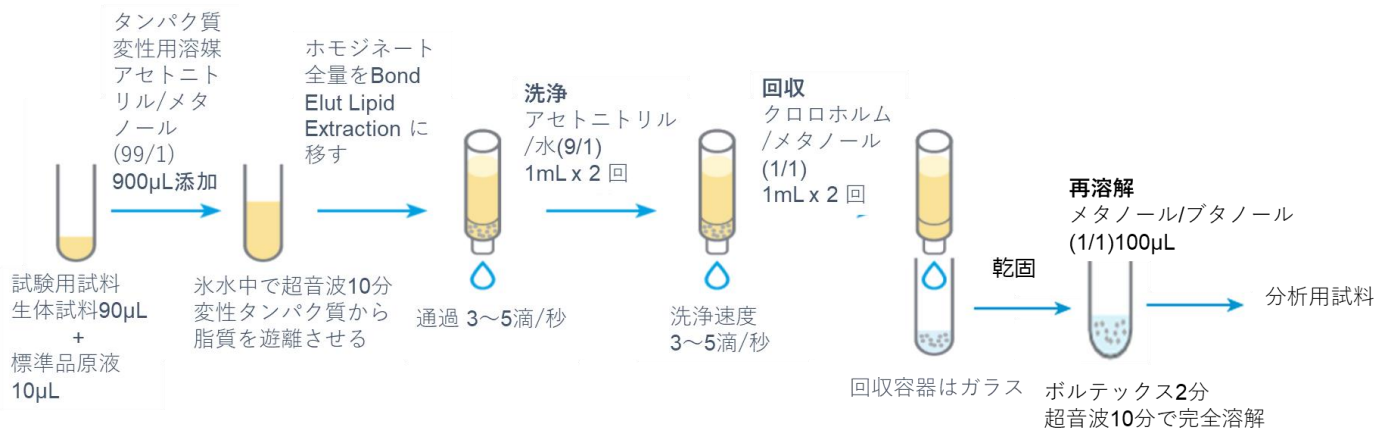


図1 固相抽出の手順

表2 LC-MS/MS条件

パラメーター	値			
乾燥ガス	N <sub>2</sub> , 300 °C, 10 L/min			
シースガス	N <sub>2</sub> , 400 °C, 12 L/min			
極性	ポジティブ・ネガティブ			
イオンソース	AJS (Agilent Jet Stream, ESI)			
キャピラリ電圧	ポジティブ(+), 3000 V; ネガティブ(-), 3500 V			
MRM	化合物名	MRM	F <sup>1</sup>	CE <sup>2</sup>
	15:0-18:1 (d7) PC	(+) 753.6 > 184.3	200	40
	18:1 (d7) LysoPC	(+) 529.4 > 184.3	200	30
	15:0-18:1 (d7) PE	(+) 711.6 > 570.9	100	20
	18:1 (d7) LysoPE	(+) 487.4 > 346.5	200	20
	15:0-18:1 (d7) PI	(-) 828.6 > 241.6	300	40
	15:0-18:1-15:0 (d7) TG	(+) 829.8 > 570.8	200	30
カラム	InfinityLab Poroshell EC C18 (2.1 x 50 mm, 1.9 μm) (p/n 699675-902)			
移動相	A: 0.1% (v/v) ギ酸, 10 mM 酢酸アンモニウム, アセトニトリル:超純水 = 60:40			
	B: 0.1% (v/v) ギ酸, 10 mM 酢酸アンモニウム, アセトニトリル:イソプロパノール:超純水 = 10:85:5			
流速	0.5 mL/min			
グラジエント	時間 (分)	% B:		
	0	15		
	1	30		
	1.5	50		
	5	80		
	5.5	99		
6	99			
カラム温度	50 °C			
注入量	1 μL			

<sup>1</sup>F = Fragmentor voltage (V), <sup>2</sup>CE = Collision energy (V)

## 結果および考察

脂質標準品を LC-MS/MS で分析したMRMクロマトグラムを図2に示します。

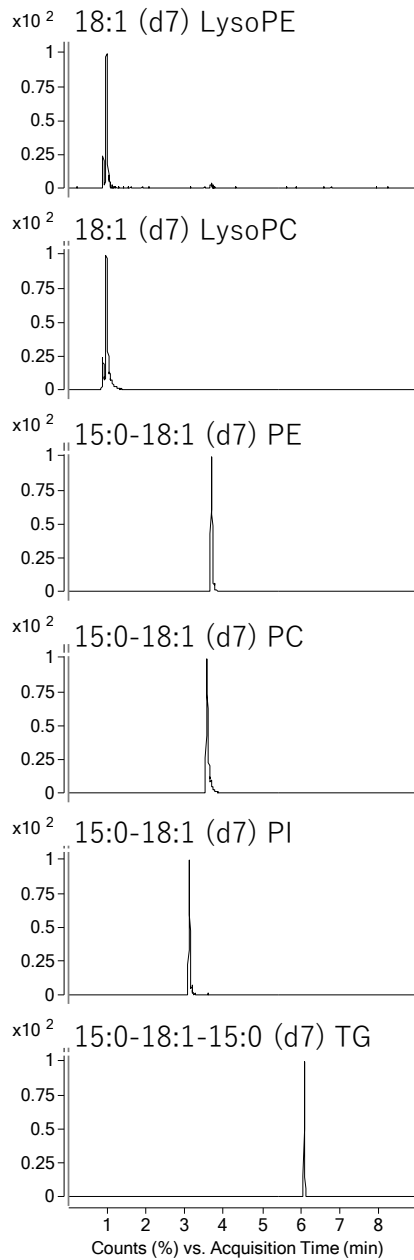


図2. 脂質標準品のMRMクロマトグラム (濃度100 µg/L)

次に、脂質標準品をヒト血漿に添加、処理した試料のクロマトグラムを図3に示します。  
標準品、生体試料に添加した場合、いずれも良好なピークが得られました。

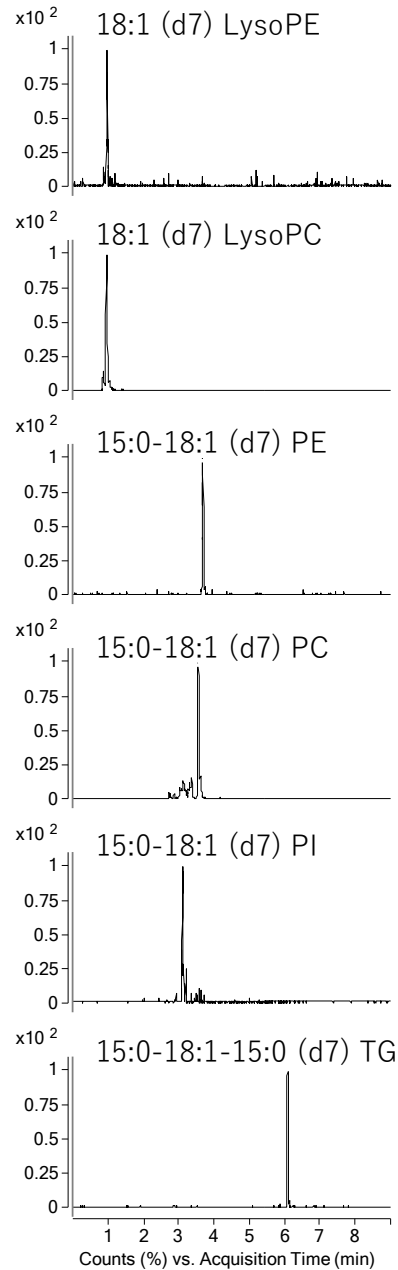


図3. ヒト血漿に脂質標準品を添加、処理した試料のMRMクロマトグラム

表3に各脂質の標準品のLC/MS/MSの面積値の再現性を示します。濃度2段階で良好な再現性が得られました。

表4に各生体試料に脂質標準品を添加、処理した際の回収率を示します。

生体試料に添加しない、標準品のみを処理した場合には、全般的に良好な回収率を示し、Bond Elut Lipid Extraction の充填剤による回収率は良好であると言えます。一方、生体試料に添加した場合はマトリクススタンダードを使用することにより、回収率は概ね70%以上120%以下の良好な範囲の結果となりました。

## まとめ

生体試料に脂質標準品を添加し、Bond Elut Lipid Extraction で処理した際の回収率を確認しました。固相抽出の充填剤本体での回収率は良好でした。生体試料に添加した場合、マトリクススタンダードを使用することで、概ね良好な回収率が得られました。

表3 各脂質の標準品のLC/MS/MS面積値の再現性 CV(%) n=3

	15:0-18:1(d7)PC	18:1Lyso(d7) PC	15:0-18:1(d7)PE	18:1Lyso(d7) PE	15:0-18:1(d7)PI	15:0-18:1-15:0(d7)TG
100 $\mu$ g/mL	2.2	5.1	1.4	2.7	3.1	2.5
1000 $\mu$ g/mL	1.0	0.9	1.5	1.5	0.2	0.9

表4 各試験用試料の回収率 (%)

試験用試料	15:0-18:1(d7)PC	18:1Lyso(d7) PC	15:0-18:1(d7)PE	18:1Lyso (d7)PE	15:0-18:1(d7)PI	15:0-18:1-15:0(d7)TG
ブタ血漿	86.7	80.1	107.6	95.3	75.1	92.1
ウシ血漿	93.4	90.6	96.3	78.0	78.9	98.9
ヒト血漿	70.6	100.8	73.8	97.7	70.8	74.6
牛乳	107.5	103.0	85.3	90.9	68.2	107.6
標準品のみ	73.5	88.2	90.9	88.5	80.9	89.8

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, Oct20, 2021

DE44491.1349768518

LC-MS-202110YSSD-001

