

Bond Elut Lipid Extraction と Agilent 6545 LC/Q-TOF を用いた ヒト血漿のリピドミクス分析

著者

Alex Apffel and Limian Zhao
Agilent Technologies Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent Bond Elut Lipid Extraction の 1 mL のカートリッジを用いたヒト血漿リピドミクスサンプル前処理法の新しい固相抽出 (SPE) メソッドについて説明します。タンパク変性沈殿処理の後、血漿サンプルのホモジネートを自然落下溶出用のカートリッジに注入します。アセトニトリル/水 (90:10) で洗浄した後、脂質をジクロロメタン/メタノール (1:2) 混合液で溶出します。溶出したサンプルは、Agilent 6545 LC/Q-TOF で分析し、Agilent MassHunter Lipid Annotator を用いて脂質のプロファイリングをします。ヒト血漿サンプルより、ポジティブモードメソッドで 13 分類から 347 の脂質化合物、ネガティブモードメソッドで 9 分類から 248 の脂質化合物、合計 595 の脂質化合物が検出、同定されました。メソッドの再現性は非常に高く、異なる試験での 3 回以上の繰り返し分析の RSD は 10 % 未満でした。従来の液液抽出 (LLE) メソッドと比較して、Bond Elut Lipid Extraction の SPE メソッドでは、時間と労力が削減され、溶媒の使用量が減少し、サンプルの移動回数が減少し、再現性が向上し、自動化の実現可能性が高くなりました。

はじめに

リポドミクスは、生物系における脂質分子の大規模な研究を扱う分析生化学の分野です。リポドミクス研究は、生化学系における脂質と脂質、脂質とタンパク質の間の機能的相互作用について新しい知見が得られるため、過去 10 年間で注目度が高まりました。リポドミクスの研究開発は、液体クロマトグラフィー (LC)、質量分析 (MS)、インフォマティクスなどの分析技術の発展により、急速に促進されました。これに対し、新しい研究の動機や分析能力の高度化により、迅速、簡便、正確、精密なハイスループットリポドミクスサンプル前処理法のワークフローの需要が高まっています。実現すれば、生物学的研究での大きな成果が期待されます。

リポドミクス分析に用いられてきた従来のサンプル前処理法のワークフローは、Bligh-Dyer メソッド¹、Folch メソッド²、Matyash メソッド³、BUME メソッド⁴などの液液抽出に基づいていました。これらのメソッドは、リポドミクスサンプル前処理法として広く用いられてきたにもかかわらず、時間がかかり、労力が必要で、自動化が困難であり、再現性が低いという問題点があります。

本研究では、Bond Elut Lipid Extraction SPE カートリッジを用いた新規 SPE メソッドを、ヒト血漿のリポドミクス分析に導入しました。Bond Elut Lipid Extraction の SPE カートリッジとプレートは、EMR Lipid 充填剤の使用を特徴としており、選択的かつ効率的な脂質分子との相互作用を実現します。EMR Lipid 充填剤は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせたメカニズムにより、脂質分子と相互作用します。大半の脂質分子の枝分かれのない長い炭化水素鎖は、EMR Lipid 充填剤の細孔に選択的に保持され、その他の直鎖状のアシル鎖がない分子は溶液中に留まり

ます。EMR Lipid 充填剤の現在のアプリケーションは、マトリックス除去に重点を置いています。EMR Lipid 充填剤との相互作用によりマトリックスの脂質が除去され、その後の処理または分析のためにターゲット化合物が分離されます。

Bond Elut Lipid Extraction の SPE カートリッジにより、EMR Lipid 充填剤をリポドミクス試験のサンプル前処理に使用できるようになります。これにより、脂質が目的の成分としてその他のサンプルマトリックス成分から抽出および単離される、新しいアプリケーション領域の探索ができます。従来の SPE と同様、充填剤の「キャッチアンドリリース」機能がこのアプリケーションに用いられています。脂質化合物は、最初 EMR Lipid 充填剤に保持され、その後有機溶媒とともに溶出されます。本研究では、Bond Elut Lipid Extraction の 1 mL のカートリッジを用いたヒト血漿リポドミクス分析のワークフローを実証します。

実験方法

材料および試薬

LC/MS グレードのアセトニトリル (ACN)、メタノール (MeOH)、クロロホルムを Honeywell Research Chemicals (米国、ミシガン州、マスキーゴン) から購入しました。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) グレードの *n*-ブタノール (*n*-BuOH) および酢酸アンモニウムを Sigma-Aldrich (米国、ミズーリ州、セントルイス) から購入しました。米国国立標準技術研究所 (NIST) が供給している標準物質であるヒト血漿中の代謝物 SRM 1950 を Sigma-Aldrich Chemical Company (米国、ミズーリ州、セントルイス) から入手しました。

溶液および標準試料

アセトニトリル 99 mL とメタノール 1 mL を混合し、変性溶媒 アセトニトリル/メタノール混合溶液 (99:1, v/v) を調製しました。アセトニトリル 90 mL と水 10 mL を混合し、洗浄溶媒 アセトニトリル/水 (9:1, v/v) を調製しました。クロロホルム 50 mL とメタノール 50 mL を混合し、溶出溶媒クロロホルム/メタノール混合溶液 (1:1, v/v) を調製しました。*n*-ブタノール 50 mL とメタノール 50 mL を混合し、再溶解溶媒 *n*-ブタノール/メタノール混合溶液 (1:1, v/v) を調製しました。

実験装置と材料

本研究は、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース付き Agilent 6545 LC/Q-TOF、バイナリポンプから構成される Agilent 1290 Infinity II LC、サーモスタット付きマルチウェルオートサンプラ、サーモスタット付きカラムコンパートメントを用いて実施されました。

サンプル前処理の使用機器は次のとおりです。

- ピペットとリピーター (エッペンドルフ、米国ニューヨーク州)
- Agilent 加圧式マニホールド SPE カートリッジ 48 本用 (PPM-48) (部品番号 5191-4101)
- PPM-48 用 1 mL カートリッジラック (部品番号 5191-4102)
- PPM-48 用廃液ラックおよび廃液ボトル (部品番号 5191-4112)
- Vortexer (VWR 社、米国)
- 超音波洗浄器 (VWR 社、米国)
- Agilent Bond Elut Lipid Extraction カートリッジ、1 mL (部品番号 5610-2041)
- Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18、2.0 × 150 mm、2.7 μm カラム (部品番号 693775-702)
- Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18、3.0 mm カラム、高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) ガードカラム (部品番号 823750-928)

分析条件

LC/Q-TOF 装置の分析条件を表 1 に示します。

抽出された SRM 1950 標準血漿サンプルによる LC/MS/MS データにおいて、MassHunter Lipid Annotator ツールソフトウェアによる MS/MS インシリコスペクトルの照合結果を用いて、特定の脂質に対してアノテーションしました。このソフトウェアは、確率密度、ベイジアンスコアリング、非負の最小二乗法による最適化を組み合わせ、理論的脂質ライブラリを検索するアルゴリズムを用いています。ポジティブイオンモードおよびネガティブイオンモードのデータセットが、データ解析において別々に処理されます。

LC/MS データの個々の形状は、Agilent MassHunter Profinder ソフトウェアのバージョン 10.0 を用いて識別されます。それらは、脂質アノテーターで生成されたパーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) と比較して、パッチターゲットフィーチャー抽出法 (BTFF) モードで識別されますが、質量とリテンションタイム (RT) 両方の基準を必要とします。得られた形状は、脂質の分類および統計解析のために、Mass Profiler Professional バージョン 15.0 にエクスポートされました。図 1 に、脂質化合物の同定および確認のためのデータ取得およびデータ処理の一般的な模式図を示します。

表 1. リピドミクス分析に用いる LC/Q-TOF の分析メソッド条件

パラメータ	設定値												
デュアル Agilent Jet Stream イオン源付き Agilent 6545 LC/Q-TOF													
機器のモード	2 Ghz、拡張ダイナミックレンジ、 m/z 1,700												
極性	ポジティブおよびネガティブ												
ガス温度	250 °C												
ドライガス (窒素)	11 L/min												
ネプライザガス	35 psi												
シースガス	300 °C、12 L/分												
キャピラリ電圧	3,500 V (+)、3,000 V (-)												
ノズル電圧	500 V												
フラグメンタ	160 V												
Oct 1 RF Vpp	750 V												
取り込みスピード	MS のみ : 3 スペクトル/秒 (MS) 自動 MS/MS : 3 スペクトル/秒 (MS)、4 スペクトル/秒 (MS/MS)												
自動 MS/MS パラメータ	選択幅 : Narrow (~1.3 amu) コリジョンエネルギー : 20 eV、35 eV												
基準補正	m/z 121.050873(+) と 922.009798(+) の 2 点 m/z 119.036320(-) と 980.016375(-) の 2 点												
Agilent 1290 Infinity II LC													
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18、2.0 × 150 mm、2.7 μm												
ガードカラム	Agilent Poroshell HPH-C18、3.0 mm、UHPLC ガード												
カラム温度	60 °C												
注入量	1 μL												
オートサンブラ温度	5 °C												
ニードル洗浄	洗浄ポート (1:1 メタノール/イソプロパノール) で 15 秒												
移動相	A) 水/メタノール (9:1, v/v) と 10 mM 酢酸アンモニウムおよび 10 μM メドロン酸 B) アセトニトリル/メタノール/IPA (2:2:6, v/v/v) と 10 mM 酢酸アンモニウム												
流量	0.6 mL/min												
グラジエントプログラム	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>27.0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>28.0</td> <td>55</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% B	0.0	55	5.0	57	25.0	100	27.0	100	28.0	55
時間 (分)	% B												
0.0	55												
5.0	57												
25.0	100												
27.0	100												
28.0	55												
ストップタイム	30 分												
ポストタイム	5 分												
実測カラム圧力	300 ~ 600 bar												

サンプル前処理法

タンパク変性沈殿処理 (PPT) を用いて、その後脂質の抽出、分離、精製のために Bond Elut Lipid Extraction SPE カートリッジで処理し、ヒト血漿を調製しました。図 2 に、リポドミクス研究のためのヒト血漿サンプル前処理法の一般的な手順を示します。

100 μ L の SRM 1950 血漿を 2 mL のポリプロピレンスナップキャップバイアルに移した後、900 μ L の氷冷したアセトニトリル/メタノール混合溶液 (99:1, v/v) を PPT のため添加しました。チューブのキャップを固く閉め、30 秒間ボルテックスで混合し、その後 10 分間氷上で超音波処理しました。氷上で超音波処理することにより、トラップされた脂質が PPT から遊離し、脂質抽出効率が向上します。

Bond Elut Lipid Extraction 1 mL カートリッジをカートリッジの下に廃液リザーバーを備えた PPM-48 の上に配置しました。各サンプルを再び 10 秒間ボルテックスで混合し、ホモジネートをすべて口径が大きいピペットチップを用いてピペットでカートリッジに移しました。サンプルのホモジネートをすべて移すことは、タンパク質沈殿物との一時的な結合による脂質のロスを防ぐために必須です。

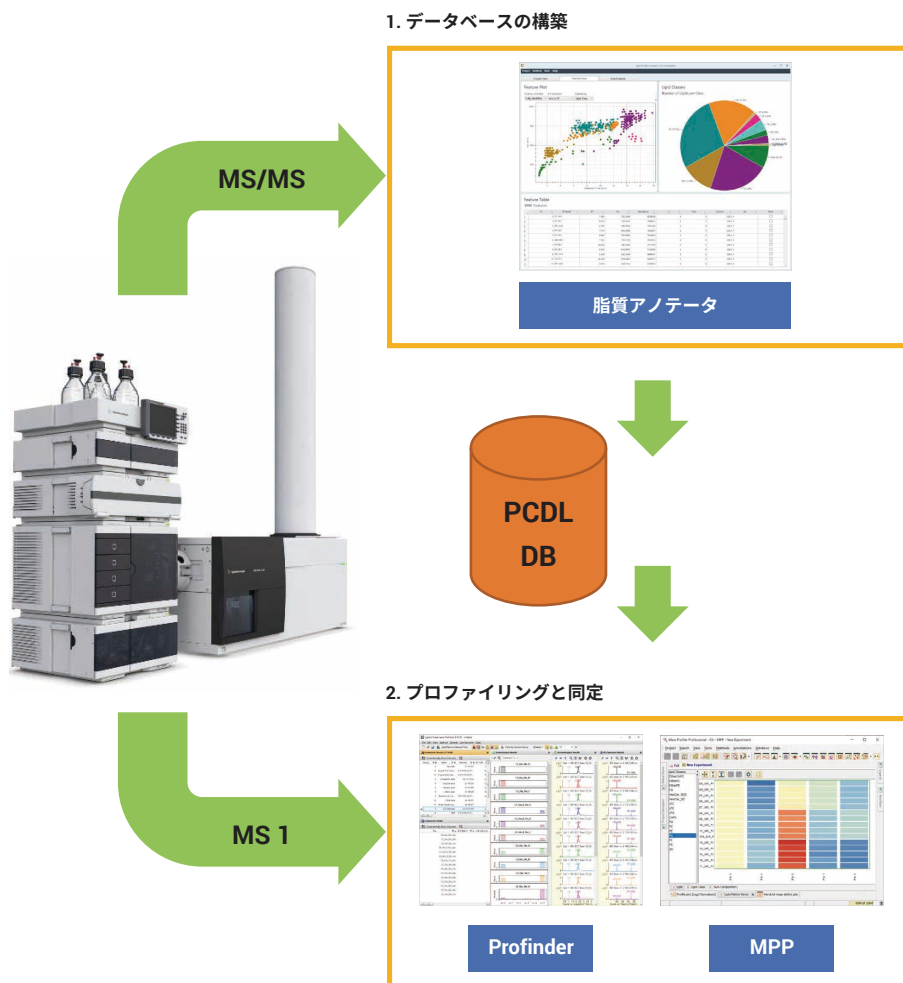


図 1. リポドミクス分析のための Agilent 6450 LC/Q-TOF によるデータ取得およびデータ処理

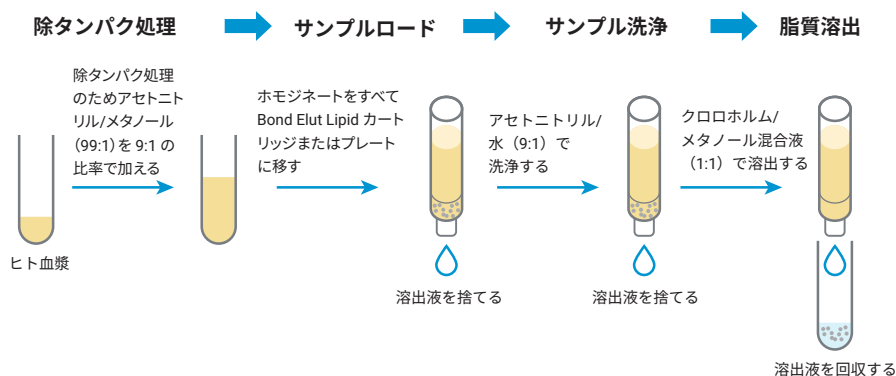


図 2. Agilent Bond Elut Lipid Extraction 1 mL カートリッジを用いたリポドミクス研究のためのヒト血漿サンプル前処理法のワークフロー

その後、自然落下または低圧（2～4 psi）により、3～5 秒/ドロップの流量で徐々にゆっくりと溶出しました。一定の溶出流量により、脂質化合物と充填剤の十分な相互作用の時間ができ、脂質は充填剤に効率よく保持されます。カートリッジ内に液体が残っていないことを確認し、1 mL のアセトニトリル/水（9:1, v/v）を用いて2～4 psi の圧力で2回の洗浄ステップを実施しました（1 mL を2回）。最終的に、高圧（6～9 psi）によりカートリッジを完全に乾燥しました。廃液ラックを除去し、カートリッジの下に、収集ラックにガラス製遠心分離管を立てて置きました。その後、必要に応じて、1 mL のクロロホルム/メタノール混合溶液（1:1, v/v）を用いて自然落下または低圧（1～3 psi）により脂質溶出を2回しました。最終的に、高圧（6～9 psi）により充填剤を完全に乾燥しました。溶出液をすべて30 °CにてN₂で乾燥させました。

乾燥残渣を100 µLの*n*-ブタノール/メタノール（1:1, v/v）に再溶解しました。サンプルは、室温で2分間ボルテックスで混合し、さらに10分間超音波処理しました。上記の再溶解手順は、乾燥脂質残渣を完全かつ均等に再溶解するために重要です。装置に注入するため、ガラスのインサートを取り付けた2 mL サンプルバイアルにサンプルを移しました。また、乾燥させたサンプルを冷凍庫で保存し、後日装置を用いて分析することも可能です。

カートリッジ回収試験における総リン脂質（PL）

総PLの結果を、Agilent LC/MS/MSシステムで表2の方法でモニタリングしました。

PPT後の血漿サンプルを遠心分離し、上澄みを移して、乾燥した後、100 µLの*n*-ブタノール/メタノール（1:1, v/v）に再溶解しました。このサンプルをBond Elut Lipid Extraction処理後のサンプルと比較するコン

トロールとして用いました。総PLピーク面積は、リテンションの全範囲のデータを手動で統合することにより得られました。PPTのみの血漿とPPT後Bond Elut Lipid Extraction SPEで処理をした血漿との間の総PLピーク面積を比較し、迅速なカートリッジでの回収について評価しました。

表2. 総リン脂質の結果の方法パラメータ

LC セクション				
機器	Agilent 1290 Infinity II LC			
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120, HILIC-Z, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm (部品番号 683775-924)			
移動相 A	10 mM 酢酸アンモニウムバッファ + 0.125 % 酢酸			
移動相 B	アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム (95:5) + 0.125 % 酢酸			
グラジエント	時間 (分)	MPA	MPB	流量 (mL/分)
	0	5	95	0.3
	1	5	95	0.3
	12	60	40	0.3
	15	停止	停止	停止
MS セクション				
機器	Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS/MS			
イオン源	Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース			
スキャンセグメント	プロダクトイオン 184 m/z, CE 20 V のポジティブリカーサイオンスキャン			

結果と考察

SPE メソッド開発および考察

Bond Elut Lipid Extraction SPE 手順は、3つの段階から構成されています。それは、充填剤に脂質をリテンションさせる「サンプルロード」、望ましくないマトリックス成分をよりきれいに除去する「洗浄」、トラップされた脂質を回収する「溶出」です。脂質抽出およびタンパク質除去のため、最初にタンパク変性沈殿処理をしました。アセトニトリル/血漿を高比率(9:1) にすることにより、脂質化合物の抽出

効率を改善しました。メタノールを低い割合(1 ~ 5 %) で添加することで、脂質をトラップし、ホモジネートに移す時にピペットチップが詰まる可能性がある大型のタンパク質沈殿物凝固物の生成を防ぎました。ローディングのステップで、塩や直鎖状のアルキル鎖のないその他のマトリックス共溶出など、望ましくないマトリックス共溶出が SPE カートリッジを通過しました。充填剤は選択的に脂質を結合するため、高濃度(最大 90 %) の有機溶媒を含んだ洗浄試薬を使用することによって、より効率的に洗浄しマトリックス干渉を除去することが可能となります。溶出溶媒はメタノール

とクロロホルムまたはジクロロメタンの混合物であり、50 % 以上のメタノールを含んでいることが充填剤から脂質を遊離させるために重要です。プラスチックを溶出する充填剤を使用することによりさまざまなプラスチックの溶出性物質を抽出してしまうのを防ぐために、溶出液の回収にはガラスのチューブを使用することが重要です。

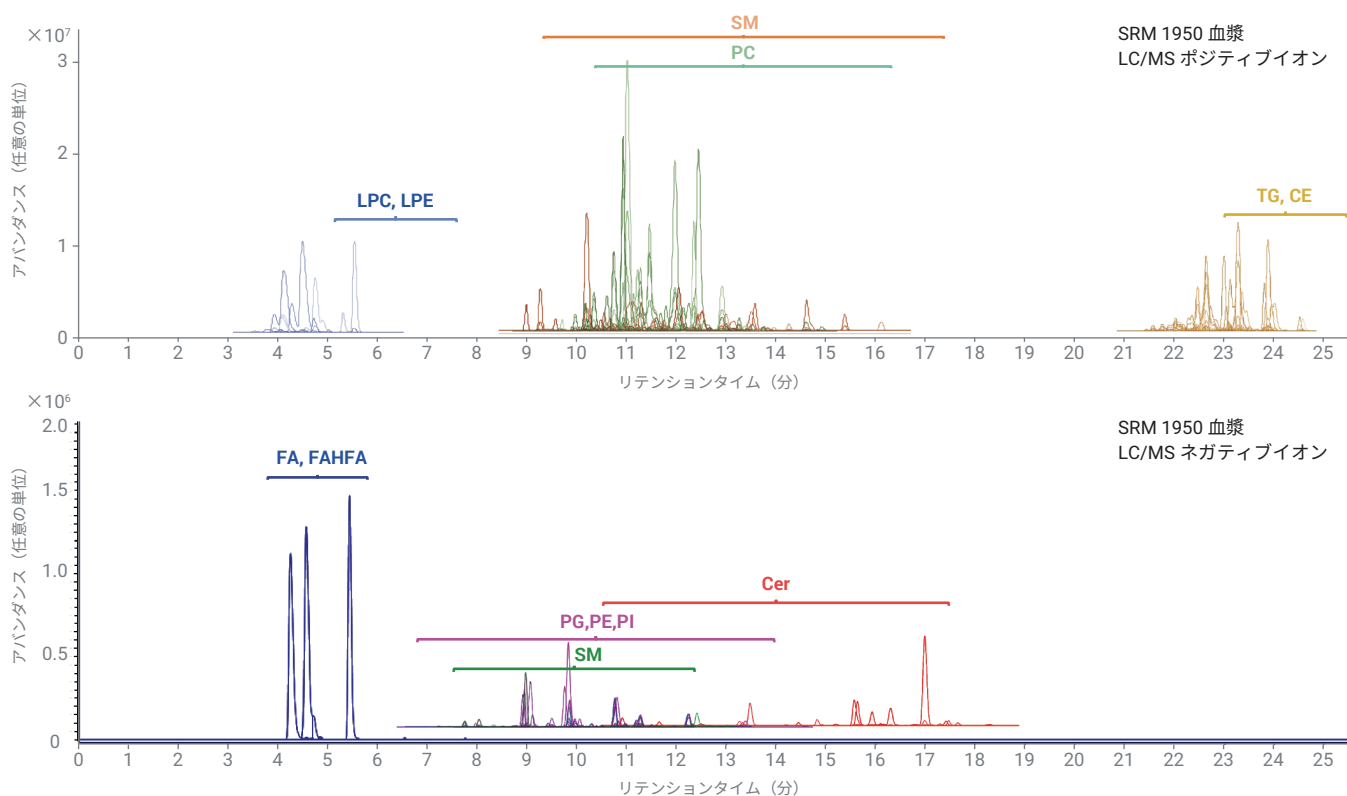


図 3. Agilent Bond Elut Lipid Extraction SPE メソッドによるヒト血漿中の 11 分類の脂質化合物のポジティブおよびネガティブ抽出イオンクロマトグラム

ヒト血漿リポミクス分析

図3に、ヒト血漿中の主要な分類の脂質化合物を同定するポジティブモードおよびネガティブモードでの抽出イオンクロマトグラム（EIC）を示します。図4に、総ピーク強度から同定された脂質化合物の分布を脂質の分類に基づき示します。ポジティブモードおよびネガティブモードの結果は、繰り返し分析のために調製した3サンプルそれぞれについて、LC/MSでの繰り返し分析を3回実施し、同定された脂質化合物の分布に基づいた結果の平均です。同定された脂質化合物には、次のような分類の脂質がありました。

- ・ アシルカルニチン (Acar)
- ・ グリセロホスホコリン (PC)
- ・ グリセロホスホエタノールアミン (PE)
- ・ グリセロホスホイノシトール (PI)
- ・ グリセロホスホセリン (PS)
- ・ グリセロホスホグリシン (PG)
- ・ リゾグリセロホスホコリン (LPC)
- ・ リゾホスホエタノールアミン (LPE)
- ・ スフィンゴミエリン (SM)
- ・ セラミド (Cer)
- ・ コレステロールエステル (CE)
- ・ ジアシルグリセライド (DG)
- ・ トリアシルグリセライド (TG)
- ・ 脂肪酸 (FA)
- ・ ヒドロキシ脂肪酸の脂肪酸エステル (FAHFA)

遊離コレステロールを除き、同定された脂質化合物の分類の分布は、SRM 1950の標準的な分布と同等でした⁵。コレステロールなどの遊離ステロールは、長い直鎖状のアルキル鎖がないため、EMR Lipid 充填剤に効率的に保持されません。

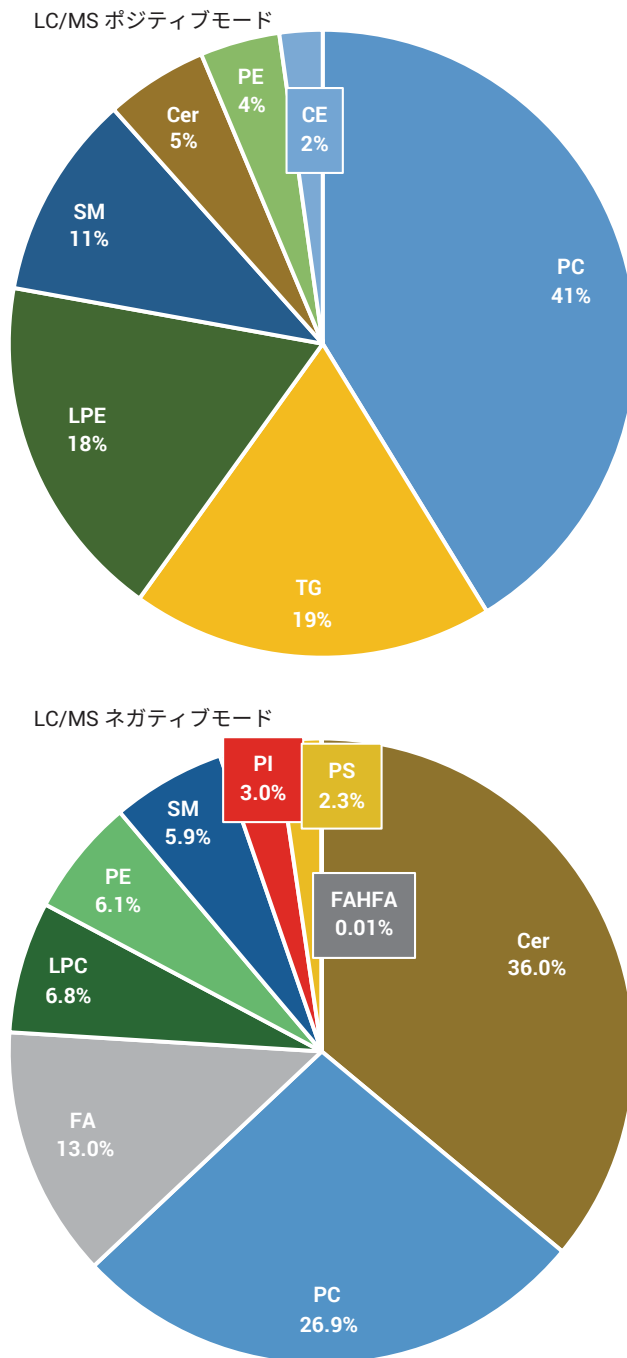


図4. 総ピーク強度に基づいた脂質の分類により同定された脂質化合物の分布の概要

表 3 に、同定された血漿中の脂質化合物の数と、Bond Elut Lipid Extraction SPE メソッドのポジティブモードおよびネガティブモードでの各分類の平均総ピーク面積を示しました。ヒト血漿サンプルより、ポジティブモードで 13 分類から 合計 347 の脂質化合物、ネガティブモードで 9 分類から 248 の脂質化合物が同定されました。総ピーク面積強度は、ポジティブモードで 1.1E+09、ネガティブモードで 4.3E+07 でした。

さらに、装置への 3 回の注入用にそれぞれ調製されたサンプルを用いて 3 回の繰り返し分析を実施することによって、メソッドの再現性を評価しました。同定された脂質化合物の数とピーク面積を評価に用いました。同定されたすべての脂質化合物をフィルタリングし、四分

位間統計検定を用いて少量しか存在しない化合物および異常値を削除しました (<第 1 四分位数 - 1.5 × 四分位範囲、>第 3 四分位数 + 1.5 × 四分位範囲)。同定された残りの脂質化合物の総ピーク強度の %RSD を計算しました。装置に注入する繰り返し分析の RSD% は、装置のメソッドの再現性を示しており、サンプル前処理法の繰り返し分析の RSD% は、ワークフロー全体の再現性を示しています。装置のメソッドの再現性は 6.4 % であり、ワークフロー全体の再現性は 9.4 % でした。この結果により、Bond Elut Lipid Extraction メソッドは、ワークフローの大幅な変動がない、整合性において優れたサンプル前処理法であることが示されました。

表 3. Agilent Bond Elut Lipid Extraction SPE メソッドによるヒト血漿中の同定された脂質化合物とピーク強度の概要

モード	分類	同定された脂質の数	総ピーク面積
ポジティブ	PC	93	4.5E+08
	TG	72	2.1E+08
	LPC	44	2.0E+08
	SM	50	1.2E+08
	Cer	18	5.8E+07
	PE	6	4.5E+07
	CE	19	2.4E+07
	DG	20	1.4E+06
	ACar	17	8.0E+05
	LPE	2	3.2E+05
	PI	3	4.4E+04
	PS	2	2.1E+04
	PG	1	9.9E+03
合計		347	1.1E+09
ネガティブ	Cer	47	1.5E+07
	PC	89	1.2E+07
	FA	5	5.6E+06
	LPC	7	2.9E+06
	PE	52	2.6E+06
	SM	26	2.5E+06
	PI	16	1.3E+06
	PS	5	9.9E+05
FAHFA	1	5.3E+03	
合計		248	4.3E+07

カートリッジでの総リン脂質回収

リン脂質は、血漿など生体のマトリックスにおける重要な脂質のグループの 1 つであり、そのため血漿中の PL はリポドミクスの一部分として重要です。血漿抽出物からの総 PL は、プロダクトイオン 184 のプリカーサイオンズキャンにより簡単にモニタリングすることができます。したがって、本メソッドは、カートリッジでの総リン脂質回収の迅速かつ簡便な評価方法として使用されました。さらに、本試験の目的において PL 分離は重要ではなかったため、短い LC システムグラジエントを用いたカラムでの高速溶出と、カラムでのキャリアオーバーを最小限に抑えるために、HILIC クロマトグラフィを用いました。

図 5 に、PPT および SPE メソッドにより調製されたサンプル中の総 PL のクロマトグラフの結果比較を示しました。全体として、2 つのサンプルクロマトグラムの結果比較においてわずかな違いが認められるものの、高い類似性が示されました。リテンションタイム (RT) 0 ~ 3.5 分の範囲内でのピーク強度では、SPE メソッドは、PPT のみのメソッドと比較して、わずかに下回るアバundanceを示し、カートリッジでのわずかなロスがあることが示されました。この RT の範囲内で統合された総ピーク面積によると、総 PL 回収率は 90 % でした。RT 3.5 ~ 15 分の範囲内でのピーク強度では、SPE メソッドは、PPT のみのメソッドと

比較して、高いアバundanceを示しました。このことは、ホモジネートサンプルをすべて SPE 抽出したことにより、タンパク質沈殿物中にトラップされた特定の脂質が回収されたことを示しています。この RT 範囲内で統合された総ピーク面積によると、総 PL 回収率は 143 % でした。Bond Elut Lipid Extraction SPE メソッドと PPT のみのメソッドの統合した総ピーク面積の比較によると、RT 全範囲での総 PL 回収率は 102 % でした。この迅速な比較により、SPE プロセスにおいてわずかな PL のロスがあること、そして SPE の手順によりタンパク質沈殿物によりトラップされた脂質の一部を回収できることが明らかとなりました。

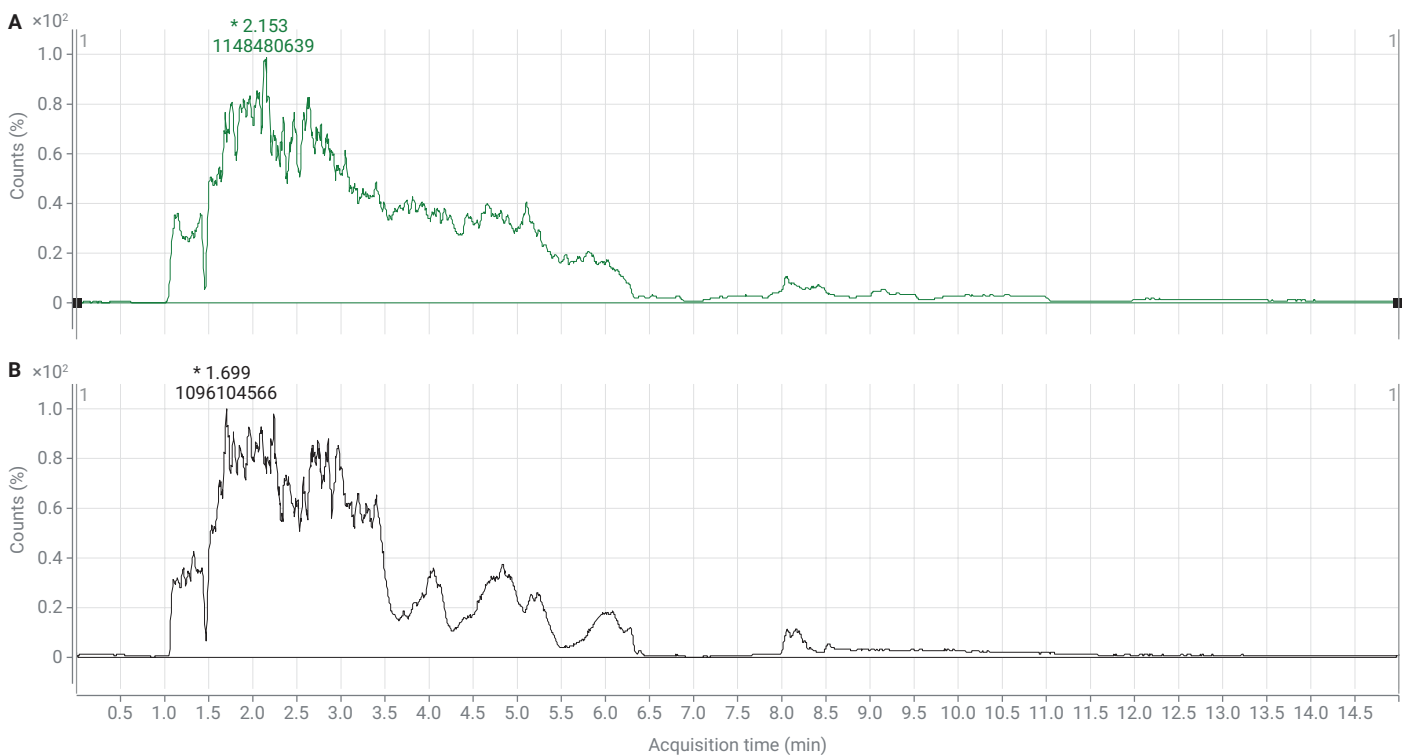
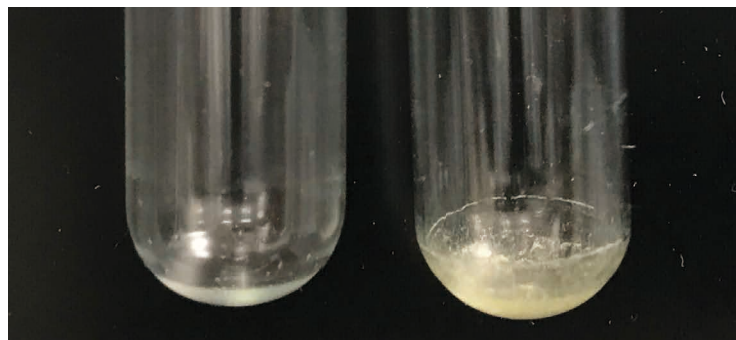


図 5. プロダクトイオン 184 のプリカーサイオンズキャンを用いた総リン脂質の結果比較。(A) PPT により調製され、Bond Elut Lipid Extraction SPE メソッドで処理された血漿サンプル。(B) PPT のみにより調製された血漿サンプル

ワークフローおよびマトリックス クリーンアップの簡素化

リポドミクスサンプル前処理法に用いられる従来の液液抽出メソッドと比較して、Bond Elut Lipid Extraction SPE メソッドは大幅にワークフロー全体を簡素化し、時間および労力を節約できます。液液抽出メソッドでは、脂質抽出効率を改善し、塩などの望ましくないサンプルマトリックス共溶出を除去するため、通常繰り返し抽出します。この手順は、相分離、有機層の移動、サンプルの乾燥などの複数のステップから成り、時間と手間がかかります。また、エラーや成分ロスの可能性が高まります。Bond Elut Lipid Extraction メソッドでは、EMR Lipid 充填剤に脂質化合物との選択的相互作用が生じるため、アセトニトリル/水 (90:10) などの相対的に強い洗浄液を使用することになります。ローディングおよび洗浄のステップにおける、サンプルマトリックスでは特に望ましくない塩や長い脂肪族鎖を持たないその他の夾雑物が効率的かつ簡便に洗浄されます。図 6 に、Bond Elut Lipid Extraction メソッドおよび PPT 抽出のみで調製したサンプルのサンプル乾燥残渣を示します。SPE メソッドは、PPT 抽出後、大幅なマトリックスクリーンアップを可能にすることが示されました。



Bond Elut LE による
抽出後のサンプルの乾燥残渣

PPT のみによる
抽出後のサンプルの乾燥残渣

図 6. Bond Elut Lipid Extraction メソッドおよび PPT 抽出のみで調製されたサンプルのサンプル乾燥残渣の状態

結論

Bond Elut Lipid Extraction カートリッジを用いた簡単、堅牢、かつ信頼性の高い SPE メソッドがヒト血漿リポドミクス分析のために確立されました。SPE メソッドにより、ヒト血漿中のノンターゲットリポドミクス分析のために、同定された脂質化合物の数とピーク強度の両方において驚異的な脂質同定ができることが実証されました。また、総リン脂質回収の迅速な評価により、カートリッジでのわずかなリン脂質のロスがあることが明らかとなりました。従来の液液抽出メソッドと比較して、SPE メソッドにより、大幅な時間と労力の節約ができ、さらに再現性も向上しました。また、本メソッドにより、96 ウェルプレートを用いたハイスループットのサンプル前処理法の開発の可能性が示されました。

参考文献

1. Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917, doi: 10.1139 / o59-099.
2. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
3. Matyash, V.; et al. Lipid Extraction by Methyl-Tert-Butyl Ether for High-Throughput Lipidomics. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1137–1146, doi: 10.1194 /jlr.D700041-JLR200.
4. Löfgren, L. et al. The BUMe Method: a Novel Automated Chloroform-Free 96-Well Total Lipid Extraction Method for Blood Plasma. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1690–1700.
5. Bowden, J. A. et al. Harmonizing Lipidomics: NIST Interlaboratory Comparison Exercise for Lipidomics Using SRM 1950–Metabolites in Frozen Human Plasma. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 2275–2288.

ホームページ

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

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. 2020
Printed in Japan, March 12, 2020
5994-1783JAJP
DE.7036805556