

Agilent Bond Elut Lipid Extraction 96 ウェルプレートを用いた ヒト血漿のリピドミクス分析

液体クロマトグラフィー / 質量分析法

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 96 ウェルプレートを用いた、ハイスループットヒト血漿リピドミクスサンプル前処理の新しい SPE メソッドについて説明します。最初に血漿サンプルをタンパク変性沈殿処理しました。ホモジネートすべてを自然落下溶出用の Bond Elut Lipid Extraction プレートに注入しました。洗浄および溶出ステップ後に、抽出したサンプルを LC/Q-TOF で分析し、Agilent MassHunter Lipid Annotator ソフトウェアを使用して脂質のプロファイリングを実施しました。さらに、同位体脂質内部標準を使用して、LC/TQ により主な脂質クラスの回収率に関する実験を実施しました。定量回収率と定性プロファイリングに関する実験により、96 ウェルプレートでの SPE ハイスループットメソッドと 1 mL カートリッジを用いた以前のメソッドの間で、同等のメソッド性能を実現していることを実証します。96 ウェルプレートでのハイスループット SPE メソッドは、1 mL カートリッジ SPE メソッドと比較して、時間と労力が削減され、サンプル処理の生産性が向上し、自動化対応が改善されます。

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。リポドミクス研究については、液体クロマトグラフィー、質量分析法、インフォマティクスなどの分析技術の進歩により、開発が急速に進みました。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のワークフローの需要が高まっており、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。

リポドミクスワークフローでの主なボトルネックの 1 つはサンプル前処理です。リポドミクス分析の従来一般的なサンプル前処理ワークフローでは、さまざまな抽出溶媒または溶媒混合物を用いた、液液抽出 (LLE) メソッドを使用していました^{1~4}。しかし、これらのメソッドは時間がかかり多大な労力を必要とし、自動化が困難であると同時に再現性が低下します。

Bond Elut Lipid Extraction 製品は EMR-Lipid 充填剤を使用して開発されており、これは従来の LLE メソッドと比較して性能が少し優れているかまたは同等ですが⁵、大幅な時間短縮と労力の削減、使いやすさの改善、再現性の向上が実現しました。ヒト血漿リポドミクス分析での Bond Elut Lipid Extraction 1 mL カートリッジを使用したワークフローについては以前に実証しており⁶、少ないサンプル数の前処理における便利なメソッドです。このアプリケーションノートの実験では、Bond Elut Lipid Extraction 96 ウェルプレートでのハイスループットワークフローについて実証します。

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)、ジクロロメタン (DCM)、およびイソプロパノール (IPA) は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州) から購入しました。HPLC グレードのブタノール (*n*-BuOH)、酢酸アンモニウム、およびメドロン酸は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から購入しました。ヒト血漿標準中の NIST SRM 1950 代謝物は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から入手しました。UltimateSPLASH One および EquiSPLASH 内部標準は Avanti Polar Lipids Inc. (アラバスター、アラバマ州) から購入しました。

溶液および標準試料

アセトニトリル 95 mL とメタノール 5 mL を混合し、タンパク変性沈殿処理 (PPT) 抽出溶媒 アセトニトリル/メタノール混合液 (95:5, v:v) を調製しました。この溶媒は新しく調製して、使用するまで最低 10 ~ 15 分間冷凍庫で保管しました。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。ジクロロメタン 25 mL とメタノール 50 mL を混合し、溶出溶媒ジクロロメタン:メタノール混合液 (1:2, v:v) を調製しました。n-ブタノール 25 mL とメタノール 25 mL を混合し、再溶解溶媒 n-ブタノール:メタノール混合液 (1:1, v:v) を調製しました。

実験装置と材料

脂質のプロファイリング検出の実験には、Agilent Jet Stream イオン化技術を採用した ESI ソース搭載の Agilent 6545 LC/Q-TOF を使用しました。高速バイナリポンプ、サーモスタットマルチサンブラ、およびマルチカラムサーモスタットで構成される Agilent 1290 Infinity II LC で、クロマトグラフィーによる分離を実施しました。

脂質の回収率検出の実験には、Agilent Jet Stream イオン化技術を採用した ESI ソース搭載の Agilent 6490 LC/TQ を使用しました。高速バイナリポンプ、サーモスタットマルチサンブラ、およびマルチカラムサーモスタットで構成される Agilent 1290 Infinity II LC で、クロマトグラフィーによる分離を実施しました。

サンプル前処理の使用機器は次のとおりです。

- Agilent Bond Elut Lipid Extraction 96 ウェルプレート、2 mL (部品番号 5610-2042)
- Agilent スクウェアウェルコレクションプレート、2 mL (部品番号 5133009)
- Agilent スクウェア 96 ウェルプレートシーリングマット (部品番号 5133005)
- Agilent PlateLoc Thermal Microplate Sealer (部品番号 G5402A/G)
- Agilent PlateLoc マイクロプレートヒートシール (部品番号 16985-001)
- ガラスコーティングされた 2 mL コレクションプレートまたはガラスインサート付き 2 mL コレクションプレート
- Agilent 加圧式マニホールド SPE カートリッジ 96 本用 (PPM-96) (部品番号 5191-4116)
- ピペットとリピーター (Eppendorf、米国)
- マルチプローブプレートボルテックスミキサー (VWR、米国)
- 超音波洗浄器 (VWR、米国)
- 96 ウェルプレートエバポレータ
- ViaFlo 96 リキッドハンドラ (Integra Biosciences、米国)

分析条件

LC/Q-TOF のメソッド条件を表 1 に、LC/TQ のメソッド条件を表 2 と付録の表 A1 に示します。

表 1. リピドミクス分析に使用する LC/Q-TOF の分析機器のメソッド条件

パラメータ	設定値																				
デュアル Agilent Jet Stream ESI ソース搭載の Agilent 6545 LC/Q-TOF																					
機器のモード	2 GHz、拡張ダイナミックレンジ、 <i>m/z</i> 1,700																				
極性	ポジティブおよびネガティブ																				
ガス温度	210 °C																				
ドライガス (窒素)	13 L/min																				
ネブライザガス	45 psi																				
シースガス	250 °C、12 L/min																				
キャピラリー電圧	3,500 V (+)、3,000 V (-)																				
ノズル電圧	0 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 : 狭い (~ 1.3 amu) コリジョンエネルギー : 20、35 eV																				
基準補正	<i>m/z</i> 121.050873 (+)、922.009798 (+) の 2 点 <i>m/z</i> 119.036320 (-)、980.016375 (-) の 2 点																				
Agilent 1290 Infinity II LC																					
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 100 mm、1.9 μm、ナローポア LC カラム (部品番号 695675-902)																				
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	洗浄ポートで 15 秒、メタノール:イソプロパノール (1:1、v/v)																				
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:イソプロパノール (3:2:5、v:v:v) と 10 mM 酢酸アンモニウム																				
流量	0.3 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>60</td></tr> <tr><td>0.5</td><td>60</td></tr> <tr><td>3.0</td><td>84</td></tr> <tr><td>9.5</td><td>87</td></tr> <tr><td>10.5</td><td>95</td></tr> <tr><td>14.0</td><td>96</td></tr> <tr><td>14.5</td><td>100</td></tr> <tr><td>20.0</td><td>100</td></tr> <tr><td>20.1</td><td>60</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% B	0.0	60	0.5	60	3.0	84	9.5	87	10.5	95	14.0	96	14.5	100	20.0	100	20.1	60
時間 (分)	% B																				
0.0	60																				
0.5	60																				
3.0	84																				
9.5	87																				
10.5	95																				
14.0	96																				
14.5	100																				
20.0	100																				
20.1	60																				
ストップタイム	22 分																				
ポストタイム	5 分																				

表 2. LC/TQ の分析機器のメソッド条件

パラメータ	設定値																
デュアル Agilent Jet Stream ESI ソース搭載の Agilent 6490 LC/TQ																	
機器のモード	2 GHz、拡張ダイナミックレンジ、 <i>m/z</i> 1,700																
極性	ポジティブ																
ガス温度	210 °C																
ドライガス (窒素)	13 L/min																
ネブライザガス	45 psi																
シースガス	250 °C、12 L/min																
キャピラリー電圧	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																
取り込み条件	ダイナミック MRM																
Agilent 1290 Infinity II LC																	
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 100 mm、1.9 μm、ナローポア LC カラム (部品番号 695675-902)																
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	洗浄ポートで 15 秒、メタノール:イソプロパノール (1:1、v/v)																
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:イソプロパノール (3:2:5、v:v:v) と 10 mM 酢酸アンモニウム																
流量	0.4 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</td><td>62</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>84</td></tr> <tr><td>8.0</td><td>86</td></tr> <tr><td>8.1</td><td>93</td></tr> <tr><td>10.0</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.9</td><td>100</td></tr> <tr><td>13.0</td><td>62</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% B	0	62	2.0	84	8.0	86	8.1	93	10.0	100	12.9	100	13.0	62
時間 (分)	% B																
0	62																
2.0	84																
8.0	86																
8.1	93																
10.0	100																
12.9	100																
13.0	62																
ストップタイム	20 分																
ポストタイム	0 分																

脂質抽出の効率に対する各パラメータの影響を迅速に評価して比較するために、プリカーサイオンスキャンモードで合計リン脂質プロファイルをモニタリングしました。LC/TQ 検出のスキャン範囲 *m/z* 100 ~ 1,300 において、スキャンを *m/z* 184.1 フラグメント (プロトン化ホスホコリン) に設定しました。

サンプル前処理

タンパク変性沈殿処理を用いて、その後脂質の抽出、分離、精製のために Bond Elut Lipid Extraction SPE で処理し、ヒト血漿を前処理しました。96 ウェルプレートでの一般的なワークフローは 1 mL カートリッジの場合と類似していますが、96 ウェルプレートでのバッチ処理に関する特定の操作が異なります。

A) 安定同位体標識化内部標準のスパイク

安定同位体標識化内部標準の回収率の実験では、血漿サンプルに UltimateSPLASH One 内部標準をプレススパイクしました。プレススパイクした血漿サンプルは脂質の種類によって、2.5 ~ 15 µg/mL の濃度で用意しました。100 µL の UltimateSPLASH One 内部標準を乾燥させ、1 mL の SRM 1950 血漿に再溶解させました。この混合物をボルテックスして氷の上で 10 分間超音波処理し、使用するまで -80 °C で保管しました。ポストスパイクサンプルを前処理するために、100 µL の UltimateSPLASH One 内部標準を乾燥させてから、1 mL の n-ブタノール:メタノール (1:1 v:v) に再溶解させました。この溶液をボルテックスして 10 分間超音波処理し、乾燥させたマトリックスブランク血漿サンプルを再溶解させるのに使用しました。

脂質のプロファイリング実験では、Bond Elut Lipid Extraction プレートプロトコルに従ってすべてのヒト血漿サンプルを抽出してから、EquiSPLASH 内部標準を含む n-ブタノール:メタノール (1:1 v:v) 溶液に再溶解させました。再溶解させた溶液を用意するために、100 µL の EquiSPLASH 内部標準を乾燥させてから、1 mL の n-ブタノール:メタノール (1:1 v:v) に再溶解させました。この混合物をボルテックスして氷の上で 10 分間超音波処理しました。

B) Bond Elut Lipid Extraction プレートプロトコル

図 1 に、リビドミクス研究でのヒト血漿前処理の詳細な SPE 手順を示します。いくつかの注意事項を次に示します。

- オフラインでのタンパク変性沈殿処理 (PPT) は、直接 Bond Elut Lipid Extraction プレートで実施するのではなく、別のコレクションプレートで PPT 抽出を実施して使用する必要があります。これにより次に続く処理を簡単にし、脂質抽出の効率を向上させます。
- PPT 抽出後のサンプルのホモジネートをすべて、Bond Elut Lipid Extraction プレートに移す必要があります。これは、タンパク変性沈殿処理で結合した脂質のロスを防止するためです。
- 氷の上の超音波処理によって、脂質抽出の効率を向上させると同時に、超音波処理時に生成される熱によって引き起こされる不安定な脂質分子の分解を防止しました。
- 96 ウェルプレートでのサンプルの混合および移送ステップには、リキッドハンドラを使用しました。ラボで同様の装置が使用できない場合は、96 ウェルプレートでのオプションとしてマルチチャンネルピペットが必要になります。

- サンプル回収に洗浄溶液を加えてウェルを洗浄しました。追加の洗浄によりウェル壁に沈殿物が付着しないようにして、移送が不完全なことによるサンプルの損失を防止しています。
- プラスチックによる汚染が発生しないように、サンプル回収には 2 mL のガラスコーティングされたコレクションプレートまたは 2 mL のガラスインサート付きプレートを使用する必要があります。
- サンプル溶出の途中で、中間乾燥ステップが必要になる場合があります。これにより、大容量の溶出液のオーバーフローまたは飛び跳ねによって引き起こされるサンプルのクロスコンタミネーションを防止します。
- サンプルの汚染を防止するために、ヒートシーリングプレートマットの使用を強く推奨します。

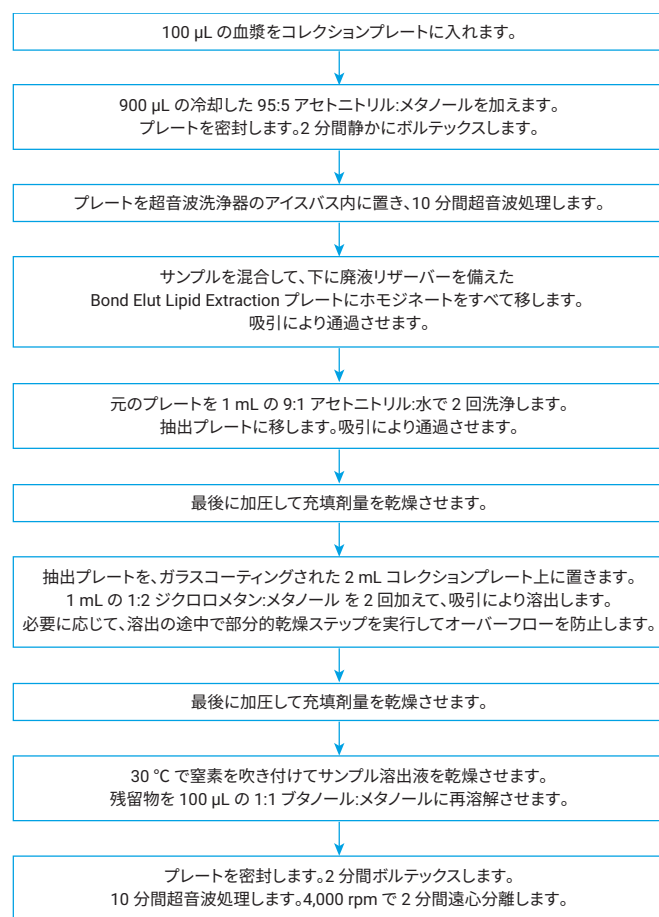


図 1. Bond Elut Lipid Extraction プレートを使用したリビドミクス実験でのヒト血漿の前処理手順

結果と考察

Bond Elut Lipid Extraction を用いた SPE メソッドのバックグラウンドの清浄度

ジクロロメタンのような反応性の高い溶媒を使用するノンターゲットリピドミクス実験では、サンプル前処理時に発生する汚染が問題になります。そのため、サンプル前処理ではプラスチック容器の使用を避ける必要があります。Bond Elut Lipid Extraction 96 ウェルプレート SPE メソッドでは、サンプルがプラスチック表面に触れることが避けられません。しかし、Bond Elut Lipid Extraction のフォーマットと充填剤のパッキングにより、溶出が滑らかで高速になります。したがって、プレート上で溶出溶媒とプラスチック表面が接触する時間が限定されます。ガラスコーティングされたコレクションプレートまたはガラスインサート付きプレートを使用することにより、コレクションプレート上で溶出液がプラスチック表面に触れないようにします。溶出後の高速乾燥も接触時間を短縮します。手順全体を通して試薬ブランクを分析することにより清浄度を検証しています。この結果を図 2 に示します。

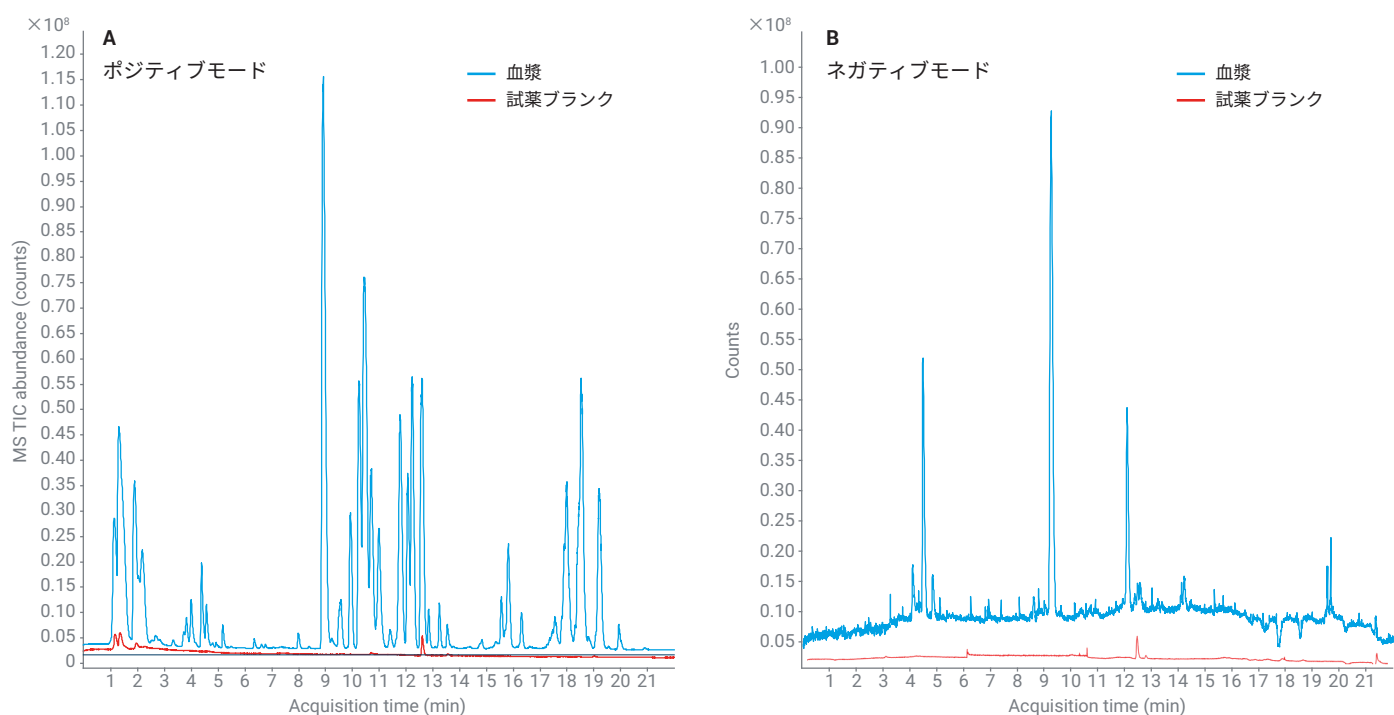


図 2. LC/Q-TOF ポジティブモード (A) とネガティブモード (B) での SPE 血漿抽出 (青) と試薬ブランク (赤) の MS TIC クロマトグラム

96 ウェルプレートと 1 mL カートリッジを使用した Bond Elut Lipid Extraction の性能の比較

以前の実験では、1 mL カートリッジで Bond Elut Lipid Extraction SPE メソッドを使用したヒト血漿リポドミクス研究のメソッド性能について実証し⁶、さらに SPE メソッドと一般的な LLE メソッドを詳細に比較しました。⁵この実験では、96 ウェルプレートと 1 mL カートリッジでの Bond Elut Lipid Extraction メソッドの性能を比較します。SPE メソッドの比較には、次の 3 つの側面があります。つまり、ポジティブモードとネガティブモードの両方を使用した血漿抽出のトータルイオンクロマトグラム (TIC) の比較、安定同位体標識化脂質内部標準の回収率の比較、および脂質プロファイリング結果の比較です。

図 3 に、1 mL カートリッジおよび 96 ウェルプレートで Bond Elut Lipid Extraction メソッドにより抽出したヒト血漿の TIC を示します。TIC を比較して明らかにわかることは、各メソッドで抽出した脂質の一般的なパターンは類似しているが、脂質のアバンダンスにいくつかの顕著な違いが見られるということです。例えば、リテンションタイム (RT) ウィンドウ 17 ~ 20 分のトリアシルグリセロール (TG) のプロファイルは両方のメソッドで類似したパターンを示していますが、96 ウェルプレート SPE メソッド

ではサンプルのアバンダンスが高くなっています。同様に、RT ウィンドウ 8 ~ 14 分では主にホスファチジルコリン (PC) とスフィンゴミエリン (SM) が溶出し、TIC クロマトグラムはここでも類似したパターンを示しており、96 ウェルプレートのサンプルではアバンダンスが高くなっています。RT ウィンドウ 1 ~ 6 分で早く溶出した極性脂質については、2 つの SPE メソッドで前処理したサンプルに対して類似したパターンがここでも観察され、アバンダンスに変動が見られます。

概して、96 ウェルプレート SPE メソッドで脂質のアバンダンスが高くなっていました。変動への影響は次のとおりです。

- Bond Elut Lipid Extraction 96 ウェルプレートでは吸引により制御された流量が改善しているため、1 mL カートリッジと比較して脂質の保持と溶出の効率が改善しています。
- 充填剤量がやや異なるため、脂質の保持と溶出に多少の違いが見られます。1 mL カートリッジには 40 mg の EMR-Lipid 充填剤がパッキングされているのに対し、96 ウェルプレートには 60 mg の充填剤がパッキングされており、スクウェアウェルのフォーマットに対応しています。

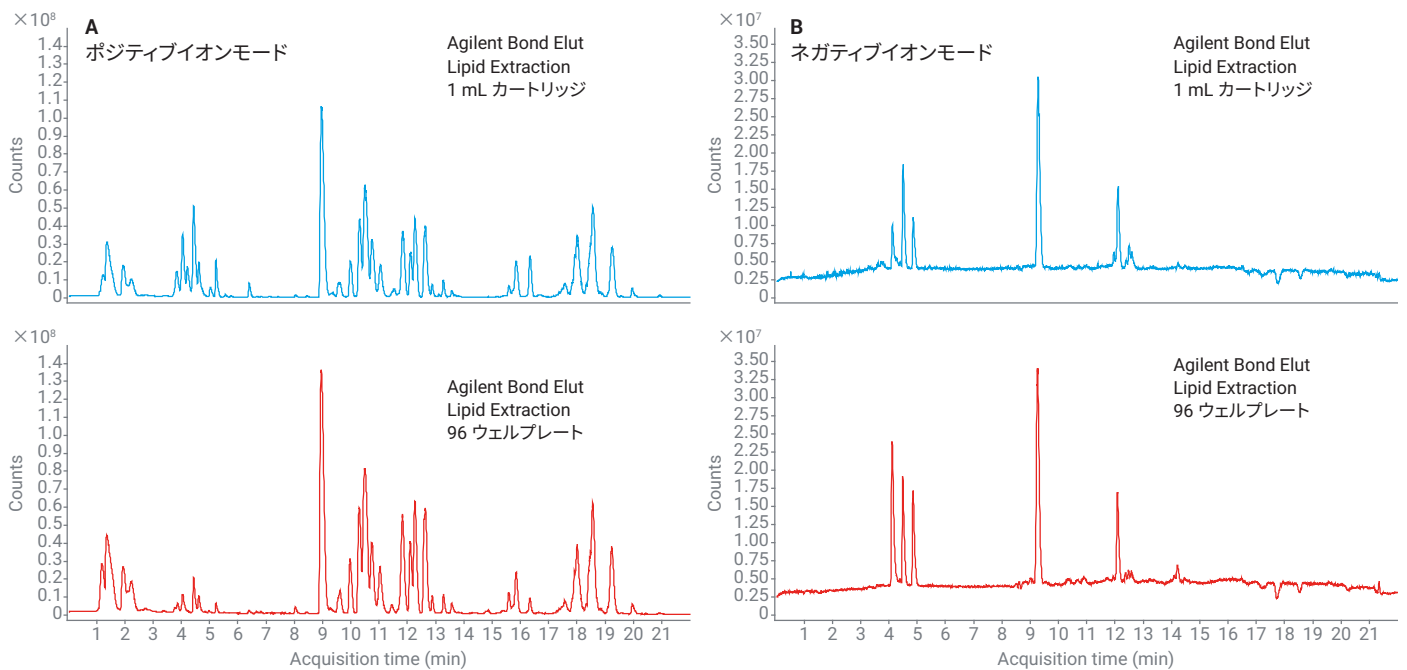


図 3. 1 mL カートリッジ (上) および 96 ウェルプレート (下) で Agilent Bond Elut Lipid Extraction メソッドにより抽出した血漿の MS TIC クロマトグラム。クロマトグラムは、LC/Q-TOF のポジティブモード (A) およびネガティブモード (B) 下で収集しました。

15 クラスの脂質を表す 63 種類の重水素標識化脂質の回収率を、LC/TQ 定量メソッドを使用して評価しました (図 4)。結果は、カートリッジとプレート両方の SPE 抽出で、すべての脂質クラスにおいて回収率が 70 % を超えていることを示しています。両方の SPE メソッドにおいて、一貫性の高い平均回収率が得られています。すべての脂質クラスにおいて 2 つの SPE メソッド間の差は 5 % 未満でしたが、lysophosphoserine (LPS) と PC は例外で、差が 5 ~ 10 % でした。これらの差は、分析メソッドの偏差として許容可能です。

Bond Elut Lipid Extraction 96 ウェルプレート SPE メソッドまたは Bond Elut Lipid Extraction 1 mL カートリッジ SPE メソッドを使用して、同定した異なる脂質クラスの分布を比較したものを図 5 に示します。同定した脂質化合物クラスの割合と濃度から見ると、結果は非常に類似しています。

脂質のプロファイリング実験でも、96 ウェルプレートを使用した Bond Elut Lipid Extraction SPE メソッドのサンプルと 1 mL カートリッジを使用した SPE メソッドのサンプルの結果は同等です。表 3 に、ポジティブモードとネガティブモードで同定した各クラス内の個々の脂質化合物の数と合計濃度を示します。解析に使用したフィルタが厳密なものであったため、各クラス内の個々の脂質の合計数は、正確なリテンションタイムと質量データベースで検出された最大ピーク数未満です。

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

リピドミクスサンプル前処理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 メソッドはワークフロー全体を大幅に簡素化するため、時間および労力を削減できます。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に、繰り返し抽出します。

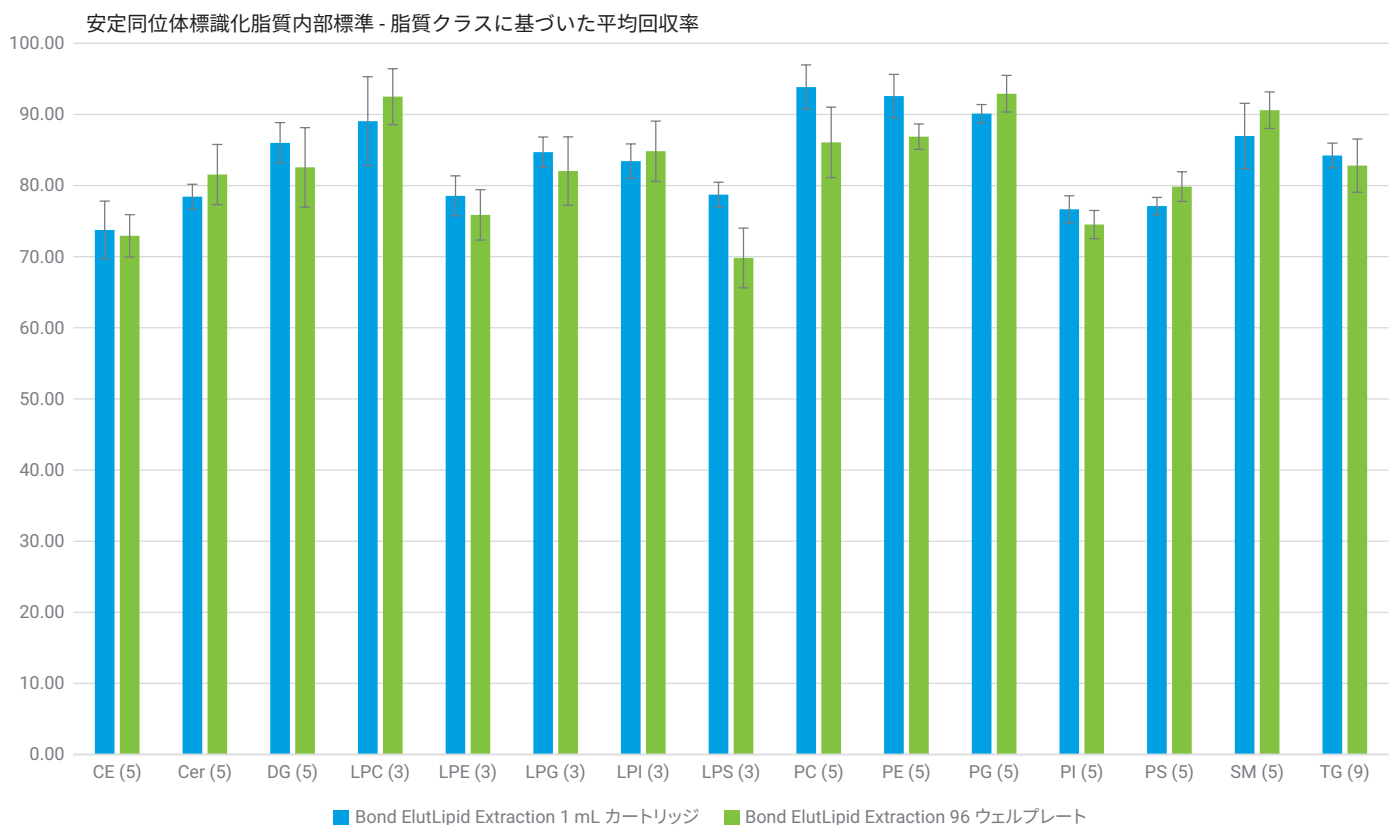


図 4. ターゲット LC/TQ ワークフローに基づいた脂質クラス別の重水素標識化脂質内部標準の平均回収率。各バーは、脂質クラスの (n) 個の脂質の平均を表しています。脂質クラスは次のとおりです。コレステロールエステル (CE)、セラミド (Cer)、ジアシルグリセライド (DG)、リゾホスホコリン (LPC)、リゾホスホエタノールアミン (LPE)、リゾホスホグリセロール (LPG)、リゾホスホイノシトール (LPI)、リゾホスホセリン (LPS)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS)、スフィンゴミエリン (SM)、およびトリアシルグリセロール (TG)。各クラス内の個々の脂質数を括弧内に示しています。

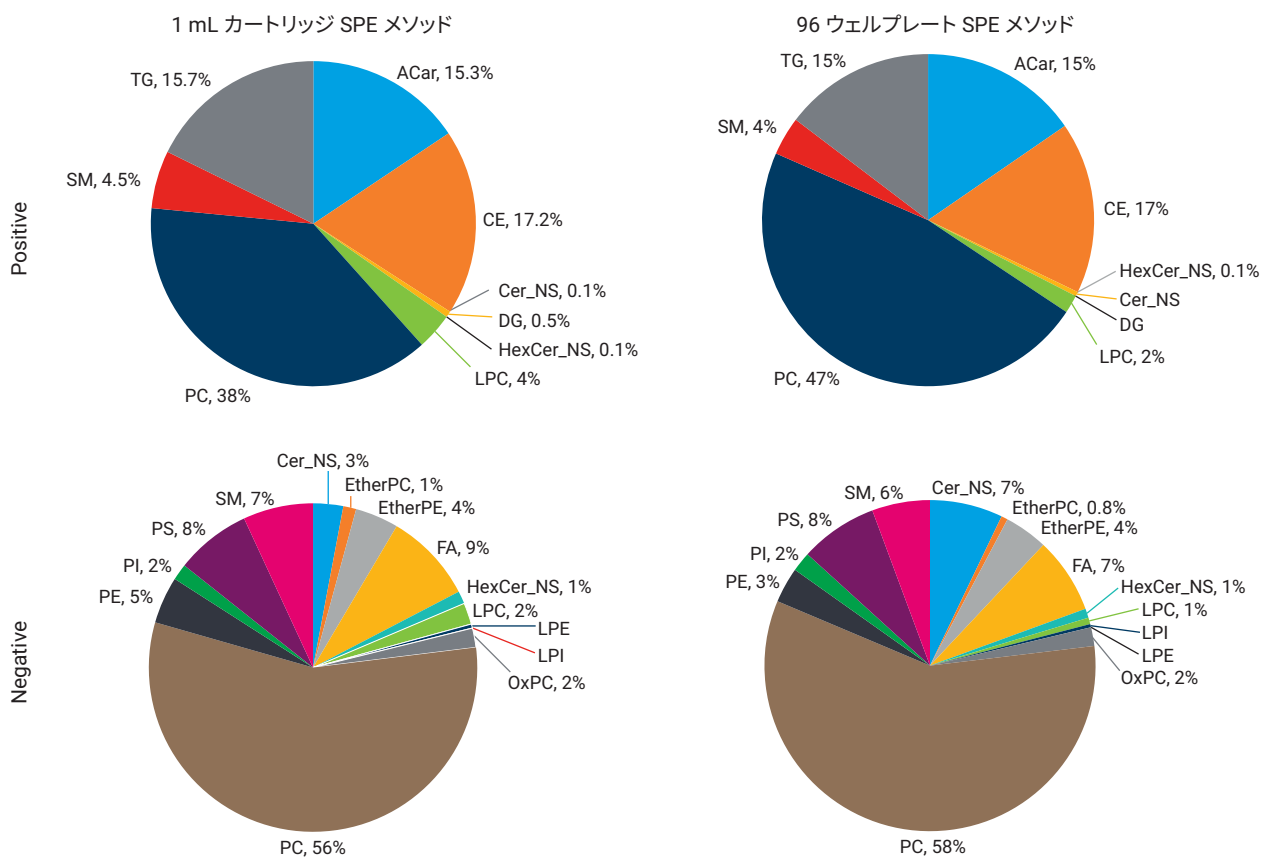


図 5. LC/Q-TOF プロファイリング実験でキャリブレーションしたモル濃度 (nmol/L) に基づいた平均脂質クラス分布。プロファイリング結果は、前処理を 5 回繰り返し、各前処理サンプルを 5 回 MS 繰り返し分析した平均としました。

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構成されているため、時間と労力がかかります。Bond Elut Lipid Extraction メソッドでは、充填剤に脂質化合物との選択的相互作用が生じるため、9:1 アセトニトリル:水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では、サンプルマトリックスで特に望ましくない塩や長い脂肪族鎖を持たない他の夾雑物を効率的かつ簡便に除去できます。

SPE 手順はカートリッジまたはプレートのウェルに溶媒を加えるだけのものであり、高いスキルや専門の手法は必要ありません。そのため、このメソッドはどんなオペレータでも実施することができ、得られる結果は同等です。96 ウェルプレートでのバッチ処理ではワークフローの使いやすさがさらに改善されるため、サンプル前処理の生産性が大幅に向上します。96 ウェルプレート SPE 手順は自動化にも最適です。自動化 SPE 脂質抽出の手順を最適化するために、さらに進んだ実験が進行中です。

結論

Agilent Bond Elut Lipid Extraction 96 ウェルプレートを用いた簡単、堅牢、かつ信頼性の高い SPE メソッドを、リポミクス分析のヒト血漿サンプル前処理において検証しました。96 ウェルプレートを使用した SPE メソッドにより、ヒト血漿中のノンターゲット分析において、同定した脂質数とピーク強度の両方で優れた脂質同定が実施できることが実証されました。安定同位体標識化脂質内部標準を評価することにより、すべての主な脂質クラスにおいて優れた回収率が実現することを実証しました。96 ウェルプレート SPE メソッドは、1 mL カートリッジを使用した SPE メソッドと比較してさらなる時間短縮と労力の削減が可能であるため、サンプル前処理の生産性が向上します。製品のフォーマットとプレートウェルにパッキングされている充填剤が改善され、吸引による流れと溶出が簡素化されたため、96 ウェルプレートは自動化プラットフォームに簡単に対応できます。

表 3. 同定した脂質数と対応する合計濃度

MS モード	脂質のクラス	Bond Elut Lipid Extraction SPE 1 mL カートリッジ		Bond Elut Lipid Extraction SPE 96 ウェルプレート	
		合計濃度 (nmol/mL)	同定された脂質数	合計濃度 (nmol/mL)	同定された脂質数
ポジティブ	ACar	1.12	9	1.61	8
	CE	1.32	9	1.75	9
	Cer_NS	3.34×10^{-5}	5	1.50×10^{-4}	7
	DG	4.35×10^{-2}	8	4.54×10^{-2}	8
	HexCer_NS	5.05×10^{-6}	2	1.86×10^{-5}	2
	LPC	0.26	61	0.19	57
	PC	2.73	75	4.93	80
	SM	0.41	38	0.39	40
	TG	1.27	31	1.53	31
ネガティブ	Cer_NS	2.20×10^{-2}	22	7.56×10^{-2}	25
	EtherPC	9.43×10^{-3}	13	6.76×10^{-3}	10
	EtherPE	3.17×10^{-2}	4	4.51×10^{-2}	3
	FA	6.57×10^{-2}	3	7.88×10^{-2}	4
	HexCer_NS	9.27×10^{-3}	2	9.58×10^{-3}	2
	LPC	1.57×10^{-2}	13	6.75×10^{-3}	11
	LPE	9.27×10^{-3}	2	3.34×10^{-3}	4
	LPI	9.32×10^{-5}	2	2.66×10^{-5}	1
	OxPC	1.41×10^{-2}	3	1.94×10^{-2}	3
	PC	0.42	33	0.62	34
	PE	3.44×10^{-2}	8	3.68×10^{-2}	9
	PI	1.19×10^{-2}	11	2.04×10^{-2}	10
	PS	5.51×10^{-2}	6	8.07×10^{-2}	6
	SM	5.12×10^{-2}	17	6.01×10^{-2}	17
合計	-	377	-	381	

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.
2. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of biological chemistry* **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.
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. Apffel A.; Zhao L.; Sartain M. J. A Novel Solid Phase Extraction Sample Preparation Method for Lipidomic Analysis of Human Plasma Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Metabolites* **2021**, *11*, 294–313.
6. Apffel A.; Zhao L. 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 *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1783JAJ, **2020**.

付録

表 A1. ポジティブモードで LC/TQ 検出を使用した際の安定同位体標識化脂質内部標準 (UltimateSPLASH One) dMRM パラメータ

化合物名	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	CE (V)	リテンションタイム (分)
CE 14-1 d7	619.6	376.4	10	11.274
CE 16-1 d7	647.7	376.4	10	11.628
CE 18-1 d7	675.7	376.4	5	12.066
CE 20-3 d7	699.7	376.4	10	11.722
CE 22-4 d7	725.7	376.4	10	11.778
Cer d18-1_d7_16-1	543.6	525.5	8	5.062
	543.6	271.2	20	
Cer d18-1_d7_18-1	571.6	553.5	8	6.261
	571.6	271.2	28	
Cer d18-1_d7_20-1	599.6	581.5	8	7.755
	599.6	271.2	24	
Cer d18-1_d7_22-1	627.6	609.5	8	9.168
	627.6	271.2	32	
Cer d18-1_d7_24-1	655.7	637.6	12	9.684
	655.7	271.3	28	
DG 17-0_14-1 d5	575.5	540.5	20	6.897
	575.5	332.3	20	
DG 17-0_16-1 d5	603.6	332.2	20	8.61
	603.6	316.2	20	
DG 17-0_18-1 d5	631.6	596.5	20	9.436
	631.6	332.3	20	
DG 17-0_20-3 d5	655.6	620.4	20	9.209
	655.6	332.4	20	
DG 17-0_22-4 d5	664.6	394.2	20	9.327
	664.6	332.3	20	
LPC 15-0 d5	487.4	184	30	1.696
	487.4	104	24	
LPC 17-0 d5	515.4	184	30	2.191
	515.4	104	24	
LPC 19-0 d5	543.4	184	28	2.648
	543.4	104	28	
LPE 15-0 d5	445.3	304.3	12	1.718
	445.3	184	30	
LPE 17-0 d5	473.3	332.3	20	2.215
	473.3	184	30	
LPE 19-0 d5	501.4	483.4	8	2.661
	501.4	360.3	20	
LPG 15-0 d5	476.3	458.2	0	1.757
	476.3	304.4	8	
LPG 17-0 d5	504.3	468.1	8	2.252
	504.3	332	20	
LPG 19-0 d5	532.4	496.3	8	2.692
	532.4	360.3	16	

化合物名	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	CE (V)	リテンションタイム (分)
LPI 15-0 d5	564.3	546.3	5	1.484
	564.3	528.3	10	
LPI 17-0 d5	592.4	574.3	5	1.844
	592.4	556.3	10	
LPI 19-0 d5	620.4	602.4	5	2.287
	620.4	584.4	10	
LPS 15-0 d5	489.3	384.3	6	1.399
	489.3	304.3	16	
LPS 17-0 d5	517.3	412.3	16	1.856
	517.3	332.3	16	
LPS 19-0 d5	545.4	440.4	16	2.31
	545.4	360.4	20	
PC 17-0_14-1 d5	723.6	184	28	4.595
	723.6	125.1	50	
PC 17-0_16-1 d5	751.6	184	28	5.529
	751.6	125.1	50	
PC 17-0_18-1 d5	779.6	184	28	6.8
	779.6	125	48	
PC 17-0_20-3 d5	803.6	184	32	6.216
	803.6	124.9	50	
PC 17-0_22-4 d5	829.7	184	28	6.709
	829.7	124.8	50	
PE 17-0_14-1 d5	681.5	540.5	20	4.718
	681.5	184	20	
PE 17-0_16-1 d5	709.6	568.6	20	5.714
	709.6	184	20	
PE 17-0_18-1 d5	737.6	596.5	20	7.074
	737.6	184	20	
PE 17-0_20-3 d5	761.6	620.6	16	6.45
	761.6	184	20	
PE 17-0_22-4 d5	787.6	646.6	20	6.937
	787.6	184	20	
PG 17-0_14-1 d5	729.5	540.5	10	3.774
	712.5	540.5	10	
PG 17-0_16-1 d5	757.6	568.5	10	4.369
	740.5	568.5	10	
PG 17-0_18-1 d5	785.6	596.6	20	5.213
	768.6	596.6	10	
PG 17-0_20-3 d5	809.6	620.6	10	4.831
	792.6	620.6	10	
PG 17-0_22-4 d5	835.6	646.6	20	5.134
	818.6	646.6	20	
PI 17-0_14-1 d5	817.6	540.5	25	3.636
	800.5	540.5	10	
PI 17-0_16-1 d5	845.6	568.5	20	4.206
	828.6	568.5	15	
PI 17-0_18-1 d5	873.6	596.6	10	4.996
	856.6	596.5	10	
PI 17-0_20-3 d5	897.6	620.6	20	4.657
	880.6	620.6	15	
PI 17-0_22-4 d5	923.6	646.6	15	4.927
	906.6	646.6	15	

化合物名	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	CE (V)	リテンションタイム (分)
PS 17-0_14-1 d5	725.5	540.5	20	3.69
	725.5	296.3	32	
PS 17-0_16-1 d5	753.5	568.5	20	4.291
	753.5	324	32	
PS 17-0_18-1 d5	781.6	596.5	24	5.1
	781.6	352.3	36	
PS 17-0_20-3 d5	805.6	620.4	20	4.776
	805.6	332.4	32	
PS 17-0_22-4 d5	831.6	646.5	16	5.307
	831.6	332.4	40	
SM d18-1_16-1_d7	710.6	193.2	28	4.107
	710.6	125	50	
SM d18-1_18-1_d7	738.7	193.2	28	4.931
	738.7	125	50	
SM d18-1_20-1_d7	766.7	193.2	24	5.92
	766.7	125	50	
SM d18-1_22-1_d7	794.7	193.2	24	7.363
	794.7	125	50	
SM d18-1_24-1_d7	822.7	193.2	28	9.018
	822.7	125	50	
TG 14-0_14-0_13-0 d5	731.7	500.5	15	10.71
	731.7	486.5	19	
TG 14-0_14-0_15-1 d5	757.7	512.5	23	10.727
	757.7	500.4	20	
TG 14-0_14-0_17-1 d5	785.7	540.5	15	10.973
	785.7	500.5	15	
TG 16-0_16-0_15-1 d5	813.8	556.5	23	11.257
	813.8	540.5	27	
TG 16-0_16-0_17-1 d5	841.8	568.5	23	11.542
	841.8	556.5	19	
TG 16-0_16-0_19-2 d5	867.8	594.6	19	11.56
	867.8	556.5	23	
TG 18-1_18-1_17-1 d5	893.8	608.6	23	11.56
	893.8	594.6	19	
TG 18-1_18-1_19-2 d5	919.8	620.6	19	11.597
	919.8	608.6	35	
TG 18-1_18-1_21-2 d5	947.9	648.6	35	11.883
	947.9	608.6	31	

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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. 2021
Printed in Japan, August 30, 2021
5994-3824JAJP
RA44404.7078240741