



Title	超臨界流体技術を基盤とした酸化リン脂質分析技術の開発
Author(s)	内方, 崇人
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27593
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

IP, 6364

博士学位論文

超臨界流体技術を基盤とした
酸化リン脂質分析技術の開発

内方 崇人

2013年1月

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース
生物資源工学領域

博士学位論文

超臨界流体技術を基盤とした
酸化リン脂質分析技術の開発

内方 崇人

2013年1月

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース
生物資源工学領域

目次

略号

第1章：緒論	1
--------	---

第2章：超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた酸化リン脂質分析系の構築

2-1. 緒言	9
2-2. 実験方法	
2-2-1. 試薬	12
2-2-2. 酸化リン脂質標準品の調製	12
2-2-3. マウス肝臓中酸化リン脂質の抽出	13
2-2-4. 装置	13
2-2-5. 質量分析イオン化条件	13
2-3. 結果	
2-3-1. 質量分析を用いた酸化リン脂質のイオン化の確認	15
2-3-2. 酸化条件検討	16
2-3-3. MS/MS 分析条件の最適化	17
2-3-4. SFC における分離条件の検討	19
2-3-5. 酸化 PC 異性体分子種の分離分析結果	21
2-3-6. 酸化 PC 異性体分子種の同定	24
2-3-7. SFC/MS/MS を用いた酸化リン脂質分析系の実サンプル分析への適用	30
2-4. 考察	33

第3章：酸化リン脂質分析に資するオンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析系の構築

3-1. 緒言	36
---------	----

3-2. 実験方法	
3-2-1. 試薬	38
3-2-2. サンプル調製	38
3-2-3. 装置	39
3-2-4. 分析条件	40
3-3. 結果	
3-3-1. カラムの検討	42
3-3-2. マウス血漿中リン脂質抽出条件検討	44
3-3-3. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いた血漿中リン脂質分析	45
3-3-4. 血漿中リン脂質抽出法の比較	48
3-3-5. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いた酸化リン脂質標準品分析	49
3-3-6. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いた血漿中酸化リン脂質分析	50
3-3-7. 血漿中酸化リン脂質抽出法の比較	51
3-4. 考察	54
 第4章:総括	 57
 謝辞	 61
引用文献	62
発表論文	70
学会発表	72

略号

AAPH, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

BHT, dibutylhydroxytoluene

DI, direct infusion

EET, epoxyeicosatrienoic acid

EPI, enhanced product ion scan

ESI, electrospray ionization

GC, gas chromatography

HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid

LC, liquid chromatography

LLE, Liquid-Liquid extraction

LPC, Lysophosphatidylcholine

LPE, Lysophosphatidylethanolamine

MRM, multiple reaction monitoring

MS, mass spectrometry

MS/MS, tandem mass spectrometry

PAPC, 1-palmitoyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

PC, phosphatidylcholine

PC, Phosphatidylcholine

PE, Phosphatidylethanolamine

PLPC, 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

SAPC, 1-stearoyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

SFC, supercritical fluid chromatography

SLPC, 1-stearoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

SM, Sphingomyelin

TBA, 2-thiobarbituric acid

TBARS, Thiobarbituric Acid Reactive Substances

第1章 緒論

細胞を構成する生体膜は、主にコレステロールとリン脂質から構成されている。リン脂質とは、ジアシルグリセロールとリン酸基を基本骨格とし、リン酸基に極性基が結合した脂質の一種である。アシル基としては、グリセロール骨格の *sn*-1 位に飽和脂肪酸残基または、不飽和度 1 の脂肪酸残基が多く、*sn*-2 位には、不飽和度が 2 以上である多価不飽和脂肪酸残基も含まれる (図 1-1)。リン脂質は、極性基の種によって働きが異なり、シグナル伝達にも関わるなど重要な役割を果たしていることや¹、脂肪酸エステルに脂質メディエーターの代表であるプロスタグランジンの前駆体となるアラキドン酸残基などを含むため²、極性基や脂肪酸側鎖解析といった脂質代謝解析が注目されている。リン脂質は、極性基や脂肪酸側鎖の種類の組み合わせの数だけ分子種が存在し、その数は 6000 種以上におよぶため³、これらの分子種の解析にイオンをフラグメント化し、分子種を同定できるタンデム質量分析 (MS/MS) を用いて分析されてきた。例えば、直接試料を質量分析に導入するダイレクトインフュージョン質量分析 (DI/MS)^{4,5} や脂質の局在を解析するマトリックス支援レーザー脱離イオン化法質量分析 (MALDI/MS)^{6,7}、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)⁸⁻¹⁰ といった様々な手法が用いられている。これら多成分のリン脂質を含む脂質の網羅的な解析が脂質メタボロミクスであるリポドミクスとして近年盛んに行われている。

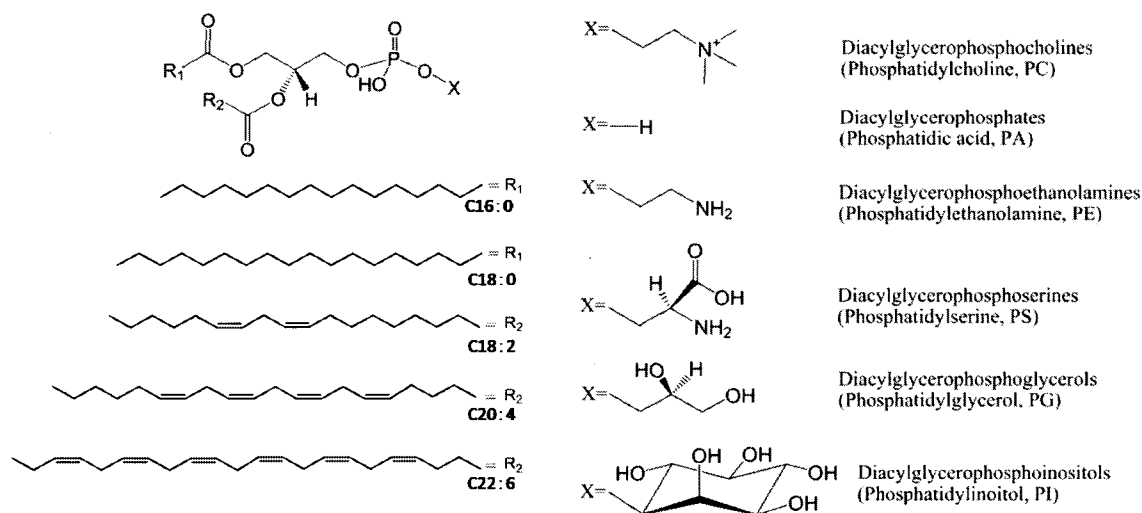


図 1-1. リン脂質の種類と構造

多数の代謝物の量比バランスによって性質の違いを詳細に表現できることがメタボロミックスの最大の利点であることから、メタボロミックスの技術をベースとしたマルチマーカープロファイリングは、見た目には現れない微細な生体内変動の解析、例えば、おいしさなどの複雑な成分の組み合わせにより表現される形質の解析などにその威力を発揮する。アミノ酸や有機酸の解析によって単一マーカールでは判別や表現ができないものが複数の成分を用いたマルチマーカールで表現することが可能となり、これまでにお茶の美味しさやチーズのフレーバーを表現する手法として用いられている^{11,12}。さらに、近年では、GC/MSを用いたマルチマーカープロファイルにより大腸がんのマーカールとして4種の代謝物を発見し、それらの代謝物の量比から大腸がんであるかどうかの診断に利用できるという報告がされた¹³。このことにより病理学的診断への応用に多変量解析を用いることが期待されてきている。また、脂質プロファイルを用いて疾患バイオマーカール探索について報告されており、血漿中リン脂質の分析からアテローム性動脈硬化症のマーカール候補としてスフィンゴミエリンやホスファチジルセリンなどが挙げられている¹⁴。生活習慣病における疾患バイオマーカールとしてリン脂質の網羅的なプロファイリングが重要であり、さらに疾患と関連のあるリン脂質などのプロファイル代謝物の増加によってマルチマーカールプロファイリングの精度の向上が期待されることから分析対象代謝物の拡大が必要となる。

リン脂質の中には、*sn*-2位の脂肪酸側鎖としてリノール酸 (C18:2)、アラキドン酸 (C20:4) などの二重結合を複数持つ多価不飽和脂肪酸を有するものが存在し、これらの脂肪酸は、生体内で生成した活性酸素種やラジカル、酸化酵素のリポキシゲナーゼなどによって酸化される事が知られている¹⁵。脂質の酸化は、脂質中の多価不飽和脂肪酸における共役二重結合中のアリール水素が引き抜かれラジカル化することから始まる。次に、酸素分子が付加した後、ラジカルの転位や酸素が付加することでヒドロキシ基、ヒドロペルオキシ基やエポキシ基など様々な修飾基を持つ酸化リン脂質が生成し、さらに酸化部位の異なる位置異性体が存在すると考えられる (図 1-2)。これまでに、老化¹⁶、アルコール依存症¹⁷、糖尿病¹⁸において血漿中の過酸化 PC の増加することや、肺がん¹⁹や虚血再灌流時における

酸化ストレス²⁰において酸化 PC が増加することが示唆されており、酸化ストレスの亢進や生活習慣病を代表する酸化ストレス性疾患と酸化リン脂質との関連性が注目されている。また、様々な構造を有する酸化リン脂質は生理活性物質の前駆体であり、特にアラキドン酸由来のエポキシドである *epoxyeicosatreinoic acid* (EET) やヒドロキシドである *hydroxyeicosatetraenoic acid* (HETE) は、生理活性脂肪酸として知られており、エポキシ基やヒドロキシ基の位置により生理活性が異なることが明らかとなっている²¹。遊離脂肪酸や生理活性脂肪酸は生体中に極微量にしか存在しないが酸化リン脂質中の脂肪酸はホスホリパーゼ A₂ によって容易に脂肪酸側鎖が乖離するため、生体に影響を与えうるこれらの生理活性を持つ酸化脂肪酸を分子内に有する酸化リン脂質は代謝解析の重要なターゲットである。

さらに酸化リン脂質の代謝産物として、酸素が付加した炭素原子の C-C 結合が開裂することによって、脂肪酸側鎖の短くなった短鎖酸化脂質やアルデヒドが生成することが示唆されており²²、アルデヒドは、DNA やタンパク質中のリジン残基などに結合し障害を与える事が報告されている^{23,24}。さらに、マクロファージが酸化低密度リポタンパク質 (LDL) を取り込む際に、スカベンジャーレセプターCD36に認識される化合物が酸化 LDL 中の酸化開裂した酸化ホスファチジルコリン (PC) であることがわかり²⁵⁻²⁷、アテローム性動脈硬化症において酸化リン脂質がプラーク発生のシグナル伝達を担うことが示された。疾患と関連の深いと考えられる酸化リン脂質は、様々な分子種が存在するため、それぞれの代謝物量の変動を分析することで疾患マーカーとして応用が期待できる。

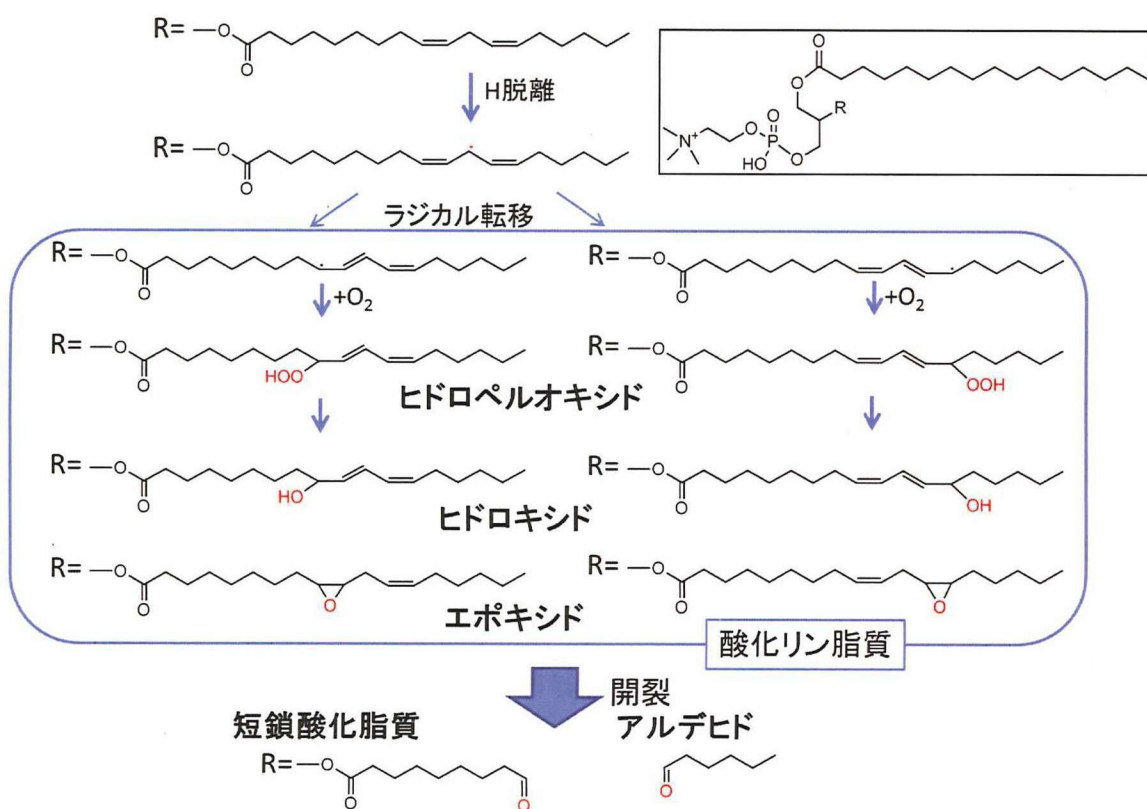


図 1-2. 酸化リン脂質生成機構 (リノール酸の例)

酸化リン脂質の分析手法としてこれまでにチオバルビツール酸法 (TBARS 法)²⁸⁻³⁰ や化学発光法を用いた分析³¹ やリン脂質と同様に DI/MS/MS や LC/MS/MS を用いた解析が試みられている^{32,33}. TBARS 法は、生体中に存在するヒドロペルオキシドなど酸性条件でアルデヒドを生成する化合物からマロンジアルデヒドを発生させチオバルビツール酸 (TBA) と反応させることで、マロンジアルデヒド TBA₂ 付加体を形成させ特異的な吸収波長を検出する手法であり、酸化ストレスの指標の 1 つとして用いられているが、酸化リン脂質に特異的に反応しないことや分子種の同定を行う事ができない。また、化学発光法は、ヒドロペルオキシドとシクロム C により生成するヒドロキシラジカルが反応し、ケトンとヒドロキシドが生成する際に生じる 1 重項酸素がルミノールに作用し生成する光を検出する手法であり、過酸化脂質といった特定分子種を検出することが可能であるが、その他の分子種を解析することができない。質量分析を用いた分析では、酸化リン脂質の様々な分子種を検出することができ、これまで、ヒドロキシドの分析や過酸化物の分析に用いられているが、酸化リン脂質は位置異性

体や酸化修飾基の異性体が多数存在し、質量が同じ化合物は質量分析では分離できないことやマトリックス効果を防ぐため、これらの分子種はクロマトグラフィーを用いて分離する必要がある。しかし、現在用いられているLCの分離分析では、エポキシドを含む酸化リン脂質分子種を幅広く分析する試みがなされておらず、多彩な類似構造を有する分子種を分離分析できていないのが現状である³⁴。

また、抽出方法としては、Folch 法³⁵や Bligh and Dyer 法³⁶といった液液抽出法が一般的に用いられている。液液抽出法では、抽出行程の中で光や外気と接触することを完全に防ぐことができず、抽出操作時にリン脂質中の多価不飽和脂肪酸が自動酸化を起こすことや酸化リン脂質の分解が起こる懸念があり、得られたデータが生体内の状態を正確に反映しているといえない。そこで、酸化リン脂質の解析に適した新たな抽出、分析技術の開発が必要であることから、抽出、分離媒体として超臨界流体に着目した。

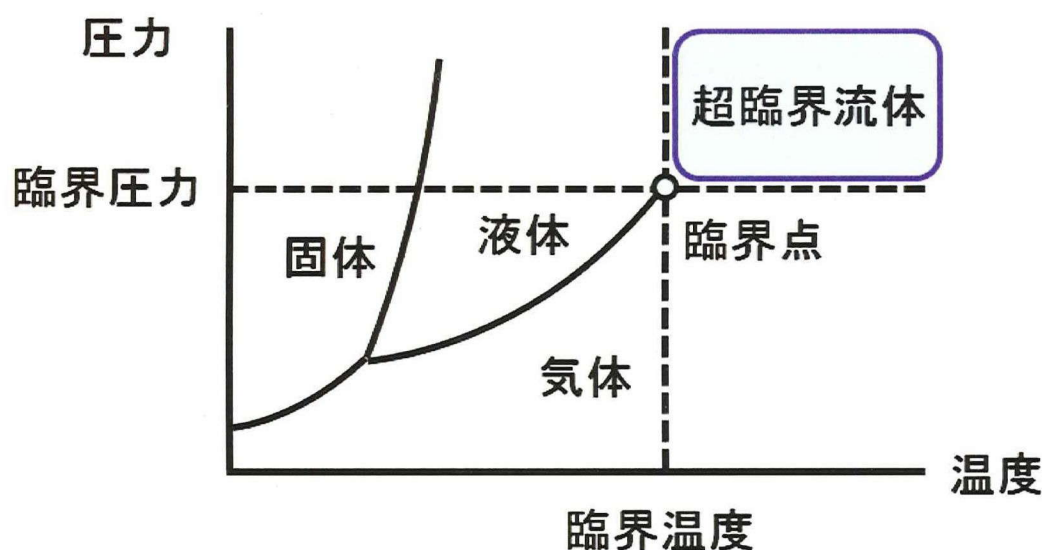


図 1-3. 物質の状態図

表 1-1. 物質の各状態における物理的性質

物性	気体	超臨界流体	液体
密度 [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$]	0.6～2	300～900	700～1600
拡散係数 [$10^{-9}\text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$]	1000～4000	20～700	0.2～2
粘度 [$10^{-5}\text{ Pa}\cdot\text{s}$]	1～3	1～9	200～300

超臨界流体とは、温度、圧力ともに臨界点以上の物質の状態である (図 1-3)。超臨界流体の物理的な性質を表 1-1 に示した。臨界点以上で物質は液体に近い密度と溶媒和力を持ち、さらにその粘度は気体に近く、拡散係数は気体と液体の間である。また、超臨界流体としては、入手が容易かつ化学的に安定であり、臨界温度・圧力がその他の化合物より低く、容易に超臨界状態にできる特徴を有することから一般的に二酸化炭素が広く用いられている。また、超臨界流体二酸化炭素は、極性がヘキサン程度と低いことから疎水性代謝物への応用に適しており、疎水性代謝物の抽出溶媒や分離手法であるクロマトグラフィーの移動相に適した媒体である。

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は、この超臨界二酸化炭素を移動相に用いた分離手法である。従来のクロマトグラフィーとして用いられているガスクロマトグラフィー (GC) は、移動相が気体であることを利用し、カラム長が長いキャピラリーカラムを用いて高分離能を達成しているが、分析できる化合物が揮発性化合物に限られており、誘導体化を施す必要性があることや高温条件を適用するため熱安定性が低い化合物に適していないという制限がある。また、液体クロマトグラフィー (LC) は、移動相が水や有機溶媒といった液体であり、GC と比較して低温での分離分析が可能であり、揮発性の低い化合物に適用できるが、高い分離能を発揮するためには、粒子径が小さい、または、カラム長の長いカラムを用いる必要があり、時間がかかってしまう。一方、SFC は、LC と同様に低温での分析が可能であるだけでなく、移動相が超臨界二酸化炭素であるため低粘性、かつ高拡散性といった特性を活かし高流速においても高解像度を保つことができ、ハイスループットな分析が可能である。また、温度や圧力を制御することで溶解力を変動させ、移動相の溶出力を変動させることができるだけでなく、添加剤であるモディファイヤーとしてメタノールなどの有機溶媒を少量添加

し極性の幅を広げることにも可能であることから、幅広い分離モードを選択することが可能である。これまでに、リン脂質をはじめとして様々な疎水性化合物の分析系に適用されている³⁷⁻⁴⁰。さらに、SFC はその高分離能からキラル化合物の分離によく用いられており^{41,42}、酸素の付加位置などの微細な違いを含む構造類似体の分離に有効であると考えられる。また、移動相に常温常圧下において気体である二酸化炭素を用いていることから分取クロマトグラフィーとして SFC を用いた場合、分取後、常圧に戻った際に移動相が自動的に揮発するため溶媒除去の手間がかかることなく化合物の精製が可能となり、短時間で化合物の精製濃縮が可能であるため有用である。

一方、超臨界流体抽出 (SFE) は SFC と同様に超臨界二酸化炭素を用いた抽出方法である。SFE では、温度や圧力の変化や、他の溶媒を添加することによる極性の変化によって溶解度を変化させることで抽出条件を制御することができる。疎水性代謝物の抽出方法として用いられており^{43,44}、これまでに、カフェインレスコーヒーの製造をはじめ、カモミールからのオイル抽出や食用油として菜種やヒマワリの油の抽出など食品分野において効果的に利用されている^{45,46}。また、無酸素化でマイルドな条件で抽出することができるので、不安定な化合物に適していることから、ポリフェノールや β カロテン、トコフェロールなどの抗酸化物の抽出にも適用されている⁴⁷。さらに、リン脂質の抽出では液液抽出より SFE の方が回収できるリン脂質が多いという報告があり⁴⁸、疎水性の媒体を用いるためタンパク質などの水溶性の高い夾雑物は抽出されないこともあわせて、生体中の脂質の抽出においても好適であると考えられる。

また、さらに超臨界流体を用いた技術として挙げられる手法の1つにオンライン化がある。超臨界流体は抽出効率が高く、抽出媒体とクロマトグラフィーの移動相が同じであることから実質的に抽出とクロマトグラフィーをオンラインで直接接続することが可能である。オンライン SFE-SFC 分析は、抽出から分離分析の間に光や酸素の触れることがないため抽出操作時に酸化や分解するような化合物の分析に適している⁴⁹。よって酸化によって生成、分解する酸化リン脂質の抽出分析に適していると考えられる。しかし、オンライン SFE-SFC を質量分

析に接続した分析系は、発展途上であり、リン脂質や酸化リン脂質の分析への適用は行われておらず、世界初の多成分分析として脂質メタボロミクスであるリピドミクスへの応用が期待できる。

以上のような背景をふまえ、本研究では、超臨界流体技術を用いた酸化リン脂質分析系の構築を目的とした。第 2 章では、既存の技術では分離が困難であった酸化リン脂質構造類似体の分離分析に SFC を適用し、異性体などを含む酸化リン脂質分離における SFC の有用性について検討した。また、第 3 章では、暗黒無酸素条件で抽出分離分析が可能であるオンライン SFE-SFC/MS/MS システムの構築を行い、酸化リン脂質の抽出分析への適用を試みることで、SFE が抽出時における酸化や分解を防ぎ、効率的に抽出分析できる手法であるかどうか検証した。

第2章 超臨界流体クロマトグラフィーを用いた酸化リン脂質分析系の構築

2-1. 緒言

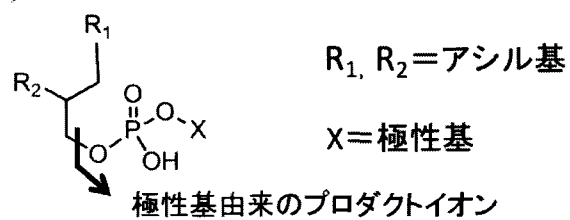
酸化ストレスの原因となる活性酸素種や酸化酵素であるリポキシゲナーゼによって生体膜を構成するリン脂質中の多価不飽和脂肪酸が酸化される¹⁵。非酵素的酸化(ラジカル酸化)の場合、酸素分子が付加したペルオキシドが生成し、還元や2つのペルオキシドから、ヒドロキシドやエポキシドといった酸素原子が1つ付加した分子種が生成すると考えられている^{50,51}。酵素的酸化の場合、リポキシゲナーゼによってヒドロペルオキシドが生成し、ヒドロキシドが生成する事がわかっている他、シトクロム P450 によってヒドロキシドやエポキシドが生成する事がわかっている。また、酵素特異的な酸化では酸化位置の異なる位置異性体が生成することや酸化される部位によって生理活性の異なる脂肪酸が存在することから、その構造の解析が重要となる。また、酸化脂肪酸は CoA を介してリゾリン脂質に結合し酸化リン脂質に合成されること⁵²や酸化リン脂質中の脂肪酸がホスホリパーゼによって遊離するため、酸化リン脂質の分析が重要であると考えられる。

近年、質量分析がリン脂質や酸化リン脂質の分析に用いられている。リン脂質を含む脂質の網羅的な解析が脂質メタボロミクスであるリポドミクスとしてダイレクトインフュージョン質量分析 (DI/MS) や液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) を用いて行われている⁸⁻¹⁰。リン脂質はポジティブイオンモードの MS/MS 分析において極性基に依存したプロダクトイオンが生成する。例えば、ホスファチジルコリン (PC) であれば、極性基であるホスホリルコリンがプロダクトイオンとして検出され、ホスファチジルエタノールアミン (PE) であれば、極性基であるホスホエタノールアミンが脱離したプロダクトイオンが検出される (図 2-1-A)。よってリン脂質の MS/MS 分析では、それぞれの極性基においてプロダクトイオンが異なるためそれぞれのリン脂質を解析することができる。また、ネガティブイオンモードを用いることで脂肪酸側鎖由来のプロダクトイオンが検出されるためリン脂質の脂肪酸側鎖を分析することができる (図 2-1-B)。これらのことから MS/MS 分析を用いることでそれぞれの分子種の同定解析が可能である。一方、リン脂質の脂肪酸側鎖が酸化修飾された酸化リン脂質は、LC を用い

て分離分取した後に、脂肪酸側鎖を加水分解し、酸化脂肪酸をLC/MSを用いて分析を行うことや⁵³、リン脂質と同様にDI/MSやLC/MSを用いることで極性基由来のプロダクトイオンだけではなく、酸化修飾された脂肪酸側鎖由来のプロダクトイオンの情報から構造推定が行われてきた^{32,33}。また、ヒドロキンドやヒドロペルオキンドといった酸化脂肪酸側鎖を有する酸化リン脂質の構造をフラグメント情報から推定している^{34,54-56}。しかし、エポキンドを側鎖に有する酸化リン脂質においてはポジティブイオンでプロダクトイオンが検出できないため解析ができていない³²。これらの分子種は、構造が類似であるため共溶出した場合、MS/MSフラグメントも似ていることから解析が困難であるため分離が必要である。また、酸化リン脂質の分析としてヒドロキンドやヒドロペルオキンド、エポキンドといった多成分を同時に測定できることでマルチマーカーとして生体内の酸化分子種の量比を解析し、疾患のマーカーとして利用できる可能性があるためこれらの分子種の分離分析が重要である。

前章で述べたように超臨界流体を移動相に用いたSFCはキラル分子などの構造類似体の分離分析に頻用されていることから、これらの酸化リン脂質の分離分析に有用であると考えられる。そこで、本章では、酸化リン脂質の分析に資する手法として超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析(SFC/MS)の適用を試みた。SFCの条件を検討することで酸化修飾基の異なる類似構造を有する酸化リン脂質の分離を行い、また、MS/MS分析のコリジョンによって検出される酸化部位特異的なプロダクトイオン情報から酸化リン脂質の酸化部位の解析と検出するプロダクトイオンを選択し、S/N比を向上させることで高感度分析が可能なMultiple reaction monitoring (MRM)を適用することで、酸化リン脂質の検出と同定を行い、SFC/MS/MSが酸化リン脂質分析に有用であるかどうか検証した。

(A) ポジティブイオンモード



(B) ネガティブイオンモード

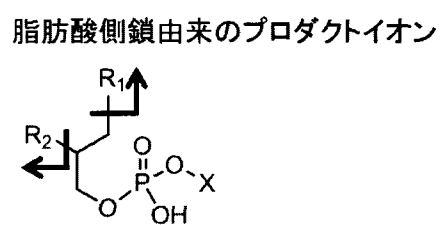


図 2-1. リン脂質の MS/MS 分析によるプロダクトイオン

2-2 実験方法

2-2-1. 試薬

メタノール (HPLC grade, 99.8%) とクロロホルム (HPLC grade, 99%) はキシダ化学 (Osaka, Japan) から購入し, 蒸留水 (HPLC grade, 99%) と 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩 (AAPH) は和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した. リン脂質標準品としてホスファチジルコリン (PC) である 1,2-ジアシルグリセロ-3-ホスホコリン 4 種 (16:0/18:2 PC (PLPC), 18:0/18:2 PC (SLPC), 16:0/20:4 PC (PAPC) and 18:0/20:4 PC (PAPC)) (純度 99%) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した. SFC の移動相として用いた二酸化炭素 (純度 99.5%) は, ネリキガス (Hyogo, Japan) から購入した. 添加剤として使用した蟻酸アンモニウム (純度 99.0%) は, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した.

2-2-2. 酸化リン脂質標準品の調製

酸化リン脂質の標準品は販売されておらず手に入れる事が困難なためリン脂質標準品をインビトロ酸化により調製した. パルミチン酸やステアリン酸といった飽和脂肪酸は酸化されず, 多価不飽和脂肪酸の二重結合部位が酸化されることが知られていることから, 酸化リン脂質標準品の基質として, 1 位に飽和脂肪酸であるパルミチン酸またはステアリン酸が結合しており, 2 位に多価不飽和脂肪酸であるリノール酸またはアラキドン酸が結合している PC を用いた. 酸化方法としては, 一般に酸化酵素であるリポキシゲナーゼや過酸化水素を用いた酸化方法が用いられているが^{20,34,56}, 本研究では, 様々な酸化物を生成可能なラジカル酸化法として AAPH を用いた酸化方法⁵¹を適用した.

0.5 μmol の PC を窒素ガスで乾燥し, 蒸留水を 450 μL 加え, ボルテックスミキサーにより攪拌を行い, ラジカル発生剤である AAPH (400 mmol/L) を 50 μL 加えた. PC の終濃度 1 mmol/L とし, 37°C で反応させ, 酸化リン脂質溶液を得た.

次に, 下記手順から酸化リン脂質の抽出を行った. 酸化リン脂質溶液 250 μL に, メタノー

ル 500 μL , クロロホルム 250 μL を加えてボルテックスミキサーにより攪拌し 10 min 静置した. さらにクロロホルムを 250 μL 加えて, ボルテックスミキサーにより攪拌後に遠心分離 (3 min, 4°C, 1600g) を行った. 次に, 下層を移し, 窒素ガスで乾燥させた. 得られた酸化リン脂質をメタノール+0.1%(w/v) 蟻酸アンモニウムに溶解し, 質量分析および, SFC/MS/MS 分析に供した.

2-2-3. マウス肝臓中酸化リン脂質の抽出

生体サンプルとして神戸大学医学研究科より提供いただいた 7 週齢のオスのマウス (C57BL/6J) の肝臓を凍結乾燥後ボールミルによりホモジナイズを行い, 10 mg 計量し, 抗酸化剤として BHT 0.01%を加えたメタノール 100 μL を添加後, 10 分間氷上で静置した後, 遠心分離 (5 min, 4°C, 1600 $\times$ g) を行い, 上清 5 μL を SFC/MS/MS に供した.

2-2-4. 装置

SFC 装置として分析用 SFC である Analytical SFC Method Station (Waters, Co.) を使用し, 質量分析装置としては Multiple reaction monitoring (MRM) 分析や Precursor ion scan, Neutral loss scan といった MS/MS スキャンモードが使用出来る三連四重極型質量分析である QTRAP5500 (AB sciex Inc.) を使用した.

2-2-5. 質量分析イオン化条件

PC 標準品を SFC/MS を用いてカラムを使用しないフローインジェクション分析により超臨界流体と添加剤であるモディファイヤーマトリックス中での PC の MS のイオン化条件として脱溶媒ガス量やイオン化室温度の条件を検討し, PC のイオン化強度が最大になる条件を設定した. 最適化を行った SFC/MS/MS の分析条件として表 2-1 のパラメータを使用した.

表 2-1. SFC/MS/MS の分析条件

SFC condition	
Instrument	Analytical SFC Method Station
Sample injection volume	5 μ L
Oven temperature	35°C
Flow rate	3 ml/min
Mobile phase	Carbon dioxide
Modifier	Methanol with 0.1% (w/v) ammonium formate
Back pressure	10 MPa
Mass spectrometry condition	
Instrument	QTRAP5500
Polarity	positive
Curtain gas	40
Collision gas	12
Ionspray voltage	5500 V
Temperature	500 °C
Ion source gas1	80 psi
Ion source gas2	80 psi

2-3.結果

2-3-1. 質量分析を用いた酸化リン脂質のイオン化の確認

リノール酸, アラキドン酸を有する PC から AAPH によるラジカル酸化により酸化 PC を調製し, 酸化リン脂質標準品として用いた. 上記で調製した PC の標準品酸化物を用いて質量分析計でのイオン化の確認を行った. イオン化法として ESI 法を適用しイオン化剤としてギ酸アンモニウムを使用したところ, PC と同様に酸素原子が 1 つ付加した PC, 2 つ付加した PC とともにプロトンアダクトを形成し検出する事ができた (図 2-2).

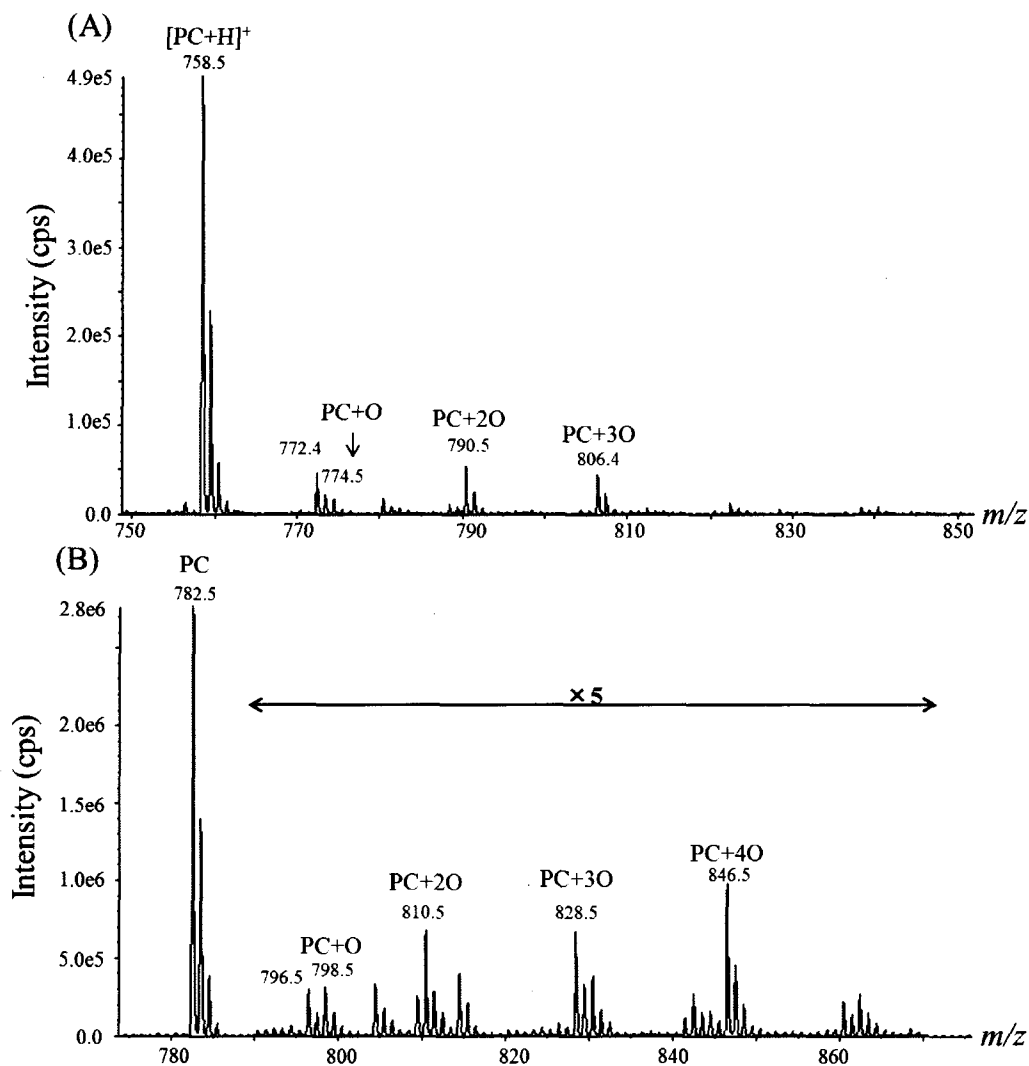


図 2-2. 酸化リン脂質 マススペクトル (A) 酸化 PLPC, (B) 酸化 PAPC

また、リノール酸を有するリン脂質では、酸素が 3 つ、アラキドン酸を有するリン脂質では酸素が 4 つ付加した酸化リン脂質も生成していることが分かり、複数酸化が起こっている分子種も存在している事が示された。

2-3-2. 酸化条件検討

AAPH を用いて酸化リン脂質標準品を調製のための条件の検討を行った。検出する m/z は、2-3-1 で確認した+O, +2O の酸化物をターゲットとした。酸化前のリン脂質量を $1\mu\text{mol}$ として酸化を行った場合、+O の酸化物が生成するために 12 時間要したため、初期リン脂質量を $0.5\mu\text{mol}$ として酸化時間の検討を行った。酸化リン脂質として PC に酸素が付加した (+O または+2O) m/z の代謝物量の変動を酸化物 (リン脂質+O) と過酸化物 (リン脂質+2O) として 1~4 時間反応させそれぞれの酸化 PC の分析を行ったところ、酸化 PC, 過酸化 PC は共に時間経過に伴い増加から減少することが示された (図 2-3-A)。また、酸化リン脂質の解析を行うため、MS/MS 分析によって水脱離プロダクトイオンと過酸化水素脱離プロダクトイオンが検出される酸化物を分析したところ、酸化 PC は時間経過に伴い減少し、過酸化 PC は時間経過に伴い増加から減少することが示された (図 2-3-B)。

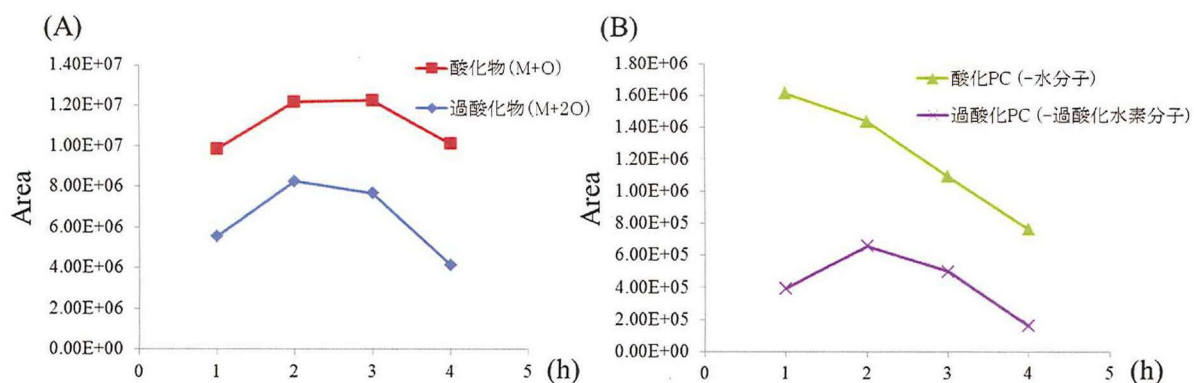


図 2-3. 酸化 PC の酸化時間における変動

(A):プリカーサーイオンの変動, (B):酸化リン脂質, 過酸化リン脂質の変動

2-3-3. MS/MS 分析条件の最適化

酸化リン脂質の検出方法としては、酸化 PC の生成物量が少ないため、高選択かつ高感度の分析が可能である MRM 分析を用いた。PC は、MS/MS 分析を行うことで、極性基であるホスホリルコリンがフラグメント化しプロダクトイオンである m/z 184 が検出できる。また、酸化リン脂質であるヒドロキシドやエポキシドからは水分子が脱離したフラグメント (-18 Da) が生成しプロダクトイオンとして検出でき、さらに過酸化物であるヒドロペルオキシドからは、過酸化水素が脱離したフラグメント (-34 Da) が生成しプロダクトイオンとして検出できる⁵⁷ (図 2-4)。これらのプロダクトイオンを Q3 のターゲットとした MRM を構築し、シリンジを用いた直接注入分析を行い、検出できるプロダクトイオンの強度が最大になるようにコリジョンエネルギーの最適化を行った。構築した MRM 分析の条件を表 2-2 に示す。これらの酸化物や過酸化物のフラグメントのトランジションとコリン特有フラグメントである m/z 184 をターゲットにしたトランジションのクロマトグラムから同一保持時間にピークが検出されている場合、その保持時間にそれぞれ酸化 PC、過酸化 PC が溶出していると考えられる。

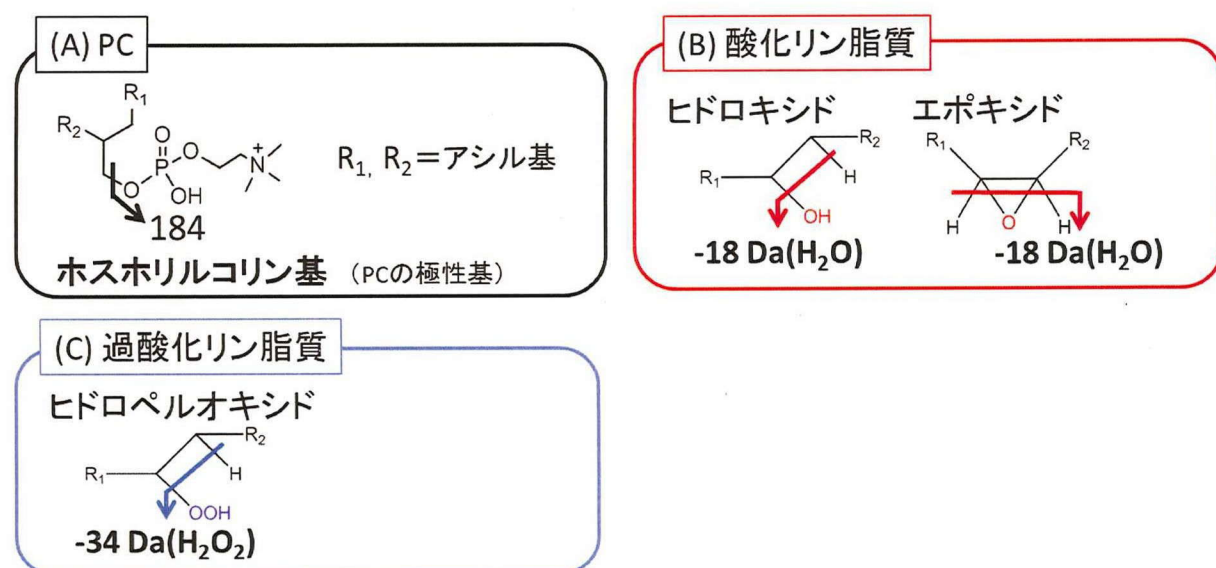


図 2-4. MS/MS フラグメント概略図(A) PC, (B) 酸化リン脂質, (C) 過酸化リン脂質

表 2-2. 酸化 PC の MRM 条件 (ポジティブイオンモード)

Oxidized PC species	Polarity	Q1 ^a (<i>m/z</i>)	Q3 ^b (<i>m/z</i>)	Target fragment	DP ^c (V)	EP ^d (V)	CE ^e (V)	CXP ^f (V)
PLPC (C16:0/C18:2) +O	positive	774.6	184.1	polar head (184.1 Da)	120	10	40	10
Hydroxide and epoxide			756.6	loss of water (-H ₂ O)	120	10	10	17
PLPC (C16:0/C18:2) +2O	positive	790.6	184.1	polar head (184.1 Da)	120	10	38	14
Hydroperoxide			756.6	loss of hydrogen peroxide (-H ₂ O ₂)	120	10	23	24
			772.5	loss of water (-H ₂ O)	120	10	21	28
SLPC (C18:0/C18:2) +O	positive	802.6	184.1	polar head (184.1 Da)	120	10	41	16
Hydroxide and epoxide			780.6	loss of water (-H ₂ O)	120	10	23	22
SLPC (C18:0/C18:2) +2O	positive	818.6	184.1	polar head (184 Da)	120	10	40	15
Hydroperoxide			780.6	loss of hydrogen peroxide (-H ₂ O ₂)	120	10	25	27
			796.5	loss of water (-H ₂ O)	120	10	18	27
PAPC (C16:0/C20:4) +O	positive	798.6	184.1	polar head (184.1 Da)	120	10	38	9
Hydroxide and epoxide			784.4	loss of water (-H ₂ O)	120	10	22	18
PAPC (C16:0/C20:4) +2O	positive	814.6	184.1	polar head (184.1 Da)	120	10	35	20
Hydroperoxide			784.6	loss of hydrogen peroxide (-H ₂ O ₂)	120	10	24	13
			800.6	loss of water (-H ₂ O)	120	10	17	13
SAPC (C18:0/C20:4) +O	positive	826.6	184.1	polar head (184.1 Da)	120	10	41	15
Hydroxide and epoxide			808.6	loss of water (-H ₂ O)	120	10	24	23
SAPC (C18:0/C20:4) +2O	positive	842.6	184.1	polar head (184.1 Da)	120	10	38	11
Hydroperoxide			808.4	loss of hydrogen peroxide (-H ₂ O ₂)	120	10	22	23
			824.4	loss of water (-H ₂ O)	120	10	19	25

^a First quadrupole., ^b Third quadrupole., ^c Declustering potential., ^d Entrance potential., ^e Collision energy., ^f Collision cell exit potential.

2-3-4. SFC における分離条件の検討

次に、酸化リン脂質の分離分析の系の構築を行った。分離系の検討としてカラム検討と移動相グラジエントの検討を行った。逆相系のカラムとして ODS 系のカラム ProC18 (YMC) を、順相系のカラムとして polaris3 NH₂ (Varian, 250×4.6 mm I.D., 粒子径 5 μm,), cyano (YMC, 250×4.6 mm I.D., 粒子径 5 μm,), Pyridine amide (Princeton, 250×4.6 mm I.D., 粒子径 5 μm,), 2-Ethylpyridine カラム (Princeton, 2 本, 250×4.6 mm I.D., 粒子径 5 μm,) を検討した。カラム検討による分離条件の最適化を行ったところ、逆相系の ODS カラムでは、酸化物の異性体が分離できなかった (図 2-5-A)。また、シリカにアミンが修飾された polaris3 NH₂ においても酸化物の異性体を分離することができなかった (図 2-5-B)。cyano (YMC)カラムや Pyridine amide (Princeton)カラムを用いた場合、酸化物の異性体を分離することができたが、過酸化物の分離をすることができなかった (図 2-5-C, D)。2-Ethylpyridine カラムを用いた場合、PC 酸化物の異性体を分離することができ、過酸化物も分離することができた。

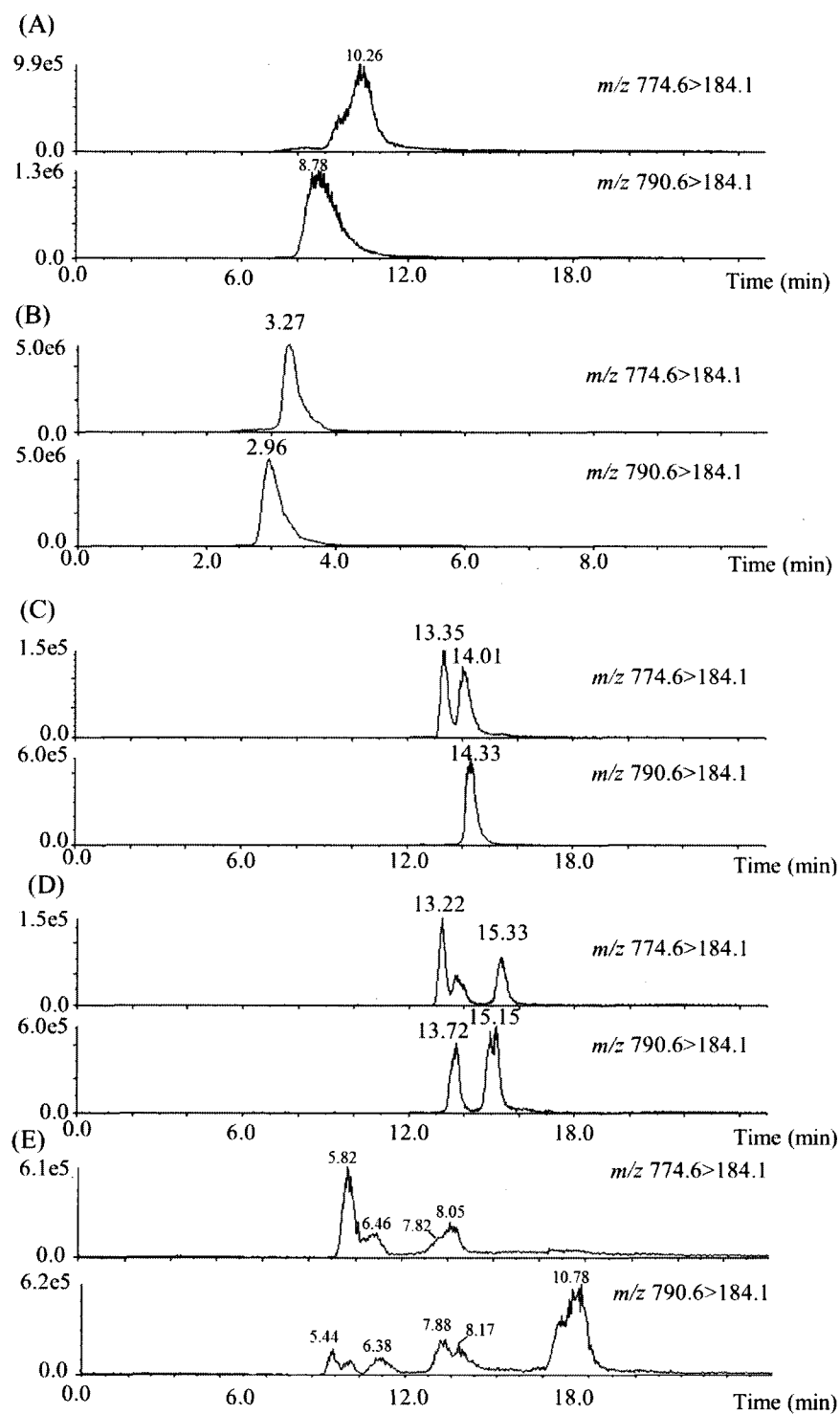
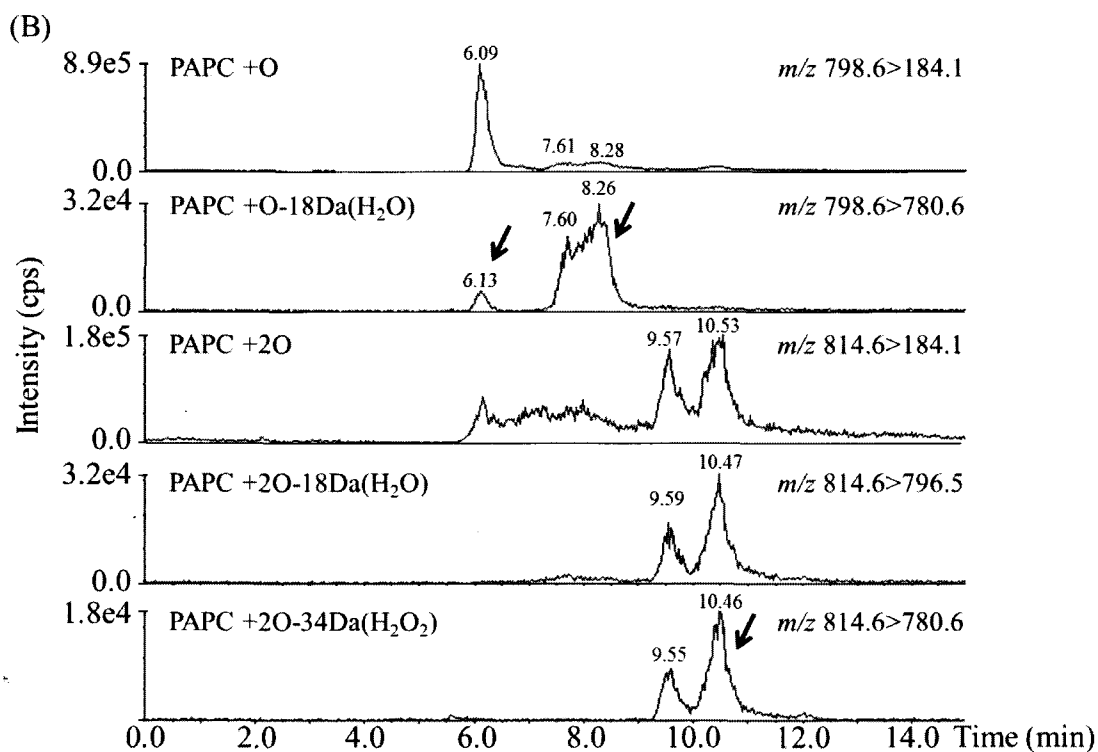
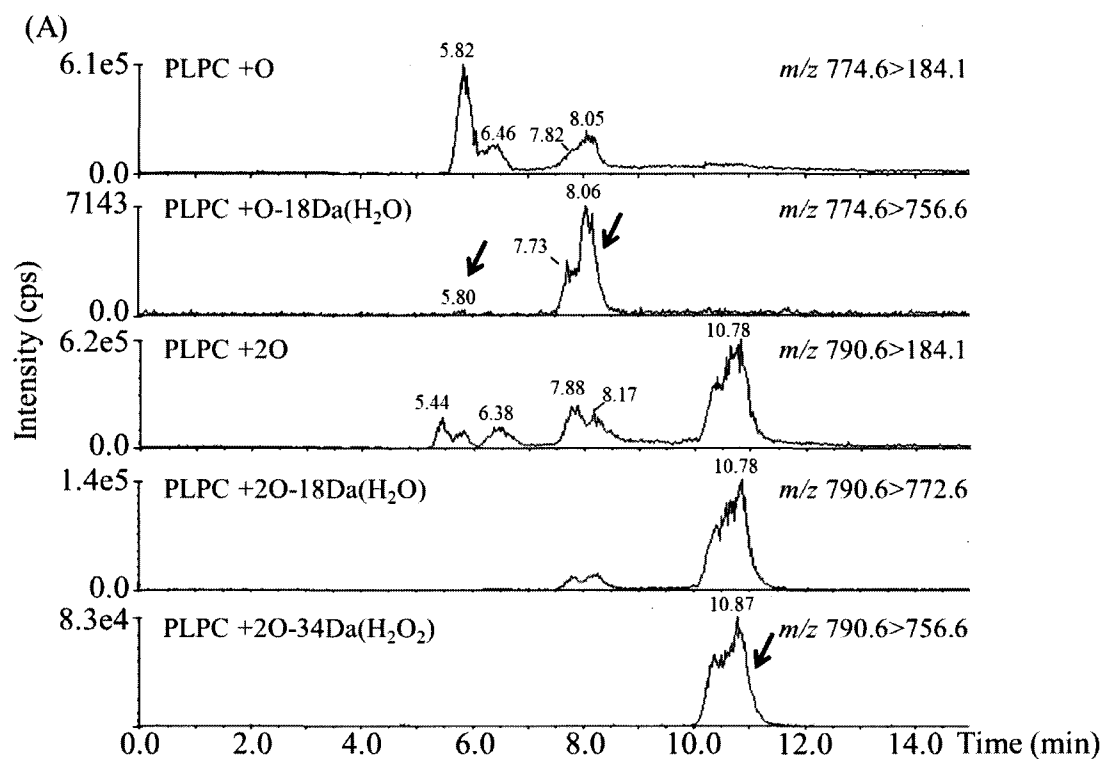


図 2-5. 酸化 PLPC 分析 MRM クロマトグラム

(A):ProC18 (YMC), modifier 10%-30% 20 min, (B):polaris3 NH₂ (Varian), modifier 10%,
 (C):cyano (YMC), modifier 10%-30% 20 min, (D):Pyridine amide (Princeton), modifier 10%-30% 20
 min, (E):2-Ethylpyridine (Princeton), modifier 15%

2-3-5. 2-Ethylpyridine カラムを用いた酸化 PC 異性体分子種の分離分析結果

2-Ethylpyridine カラムを用いてそれぞれの PC の酸化物を分析した結果、酸化 PLPC は、保持時間 5.82 min, 7.82 min, 8.05 min に酸化リン脂質が、10.78 min に過酸化物が溶出することが示された (図 2-6-A)。酸化 SLPC は、保持時間 5.84 min, 7.95min, 8.12 min に酸化リン脂質が、10.88 min に過酸化物が溶出することが示された (図 2-6-B)。また、アラキドン酸付加の酸化 PAPC は、保持時間 6.09 min, 7.70 min, 8.26 min に酸化リン脂質が、9.57 min, 10.46 min に過酸化物が溶出することが示された (図 2-6-C)。同様に酸化 SAPC は、保持時間 6.18 min, 7.65 min, 8.34 min に酸化リン脂質が、9.67 min, 10.57 min に過酸化物が溶出することが示された (図 2-6-D)。SFC/MS/MS を用いることで酸化リン脂質と過酸化物分離することができた。



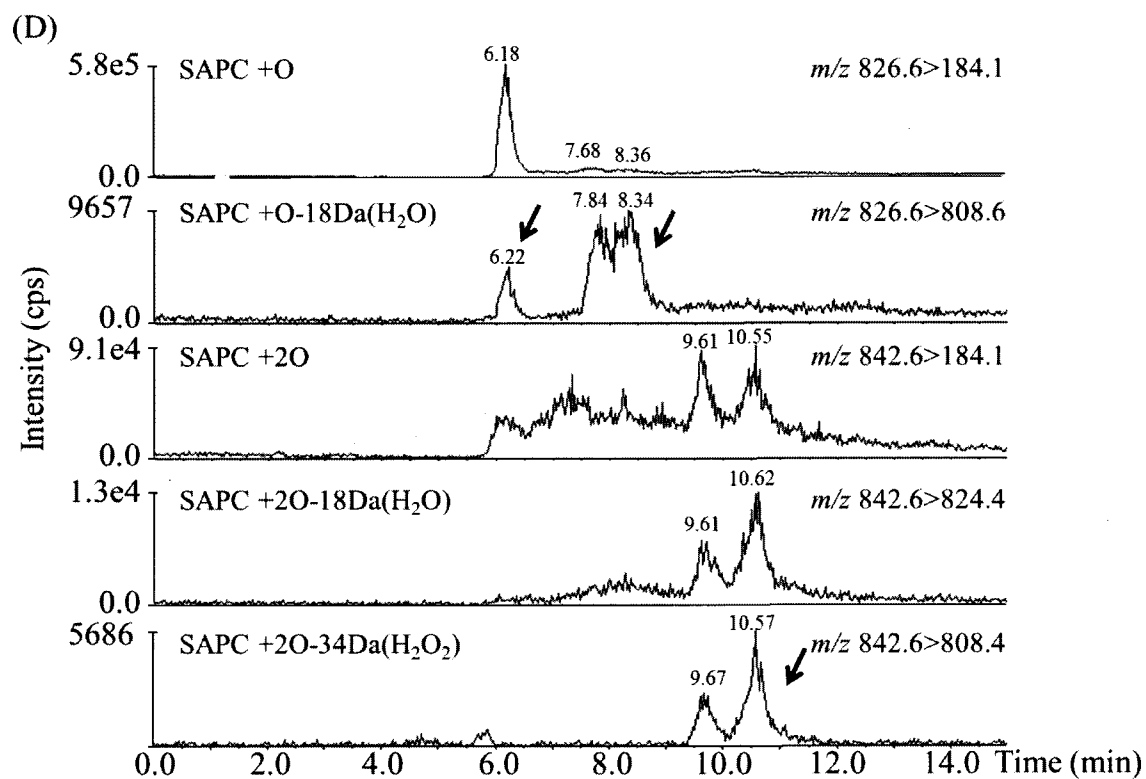
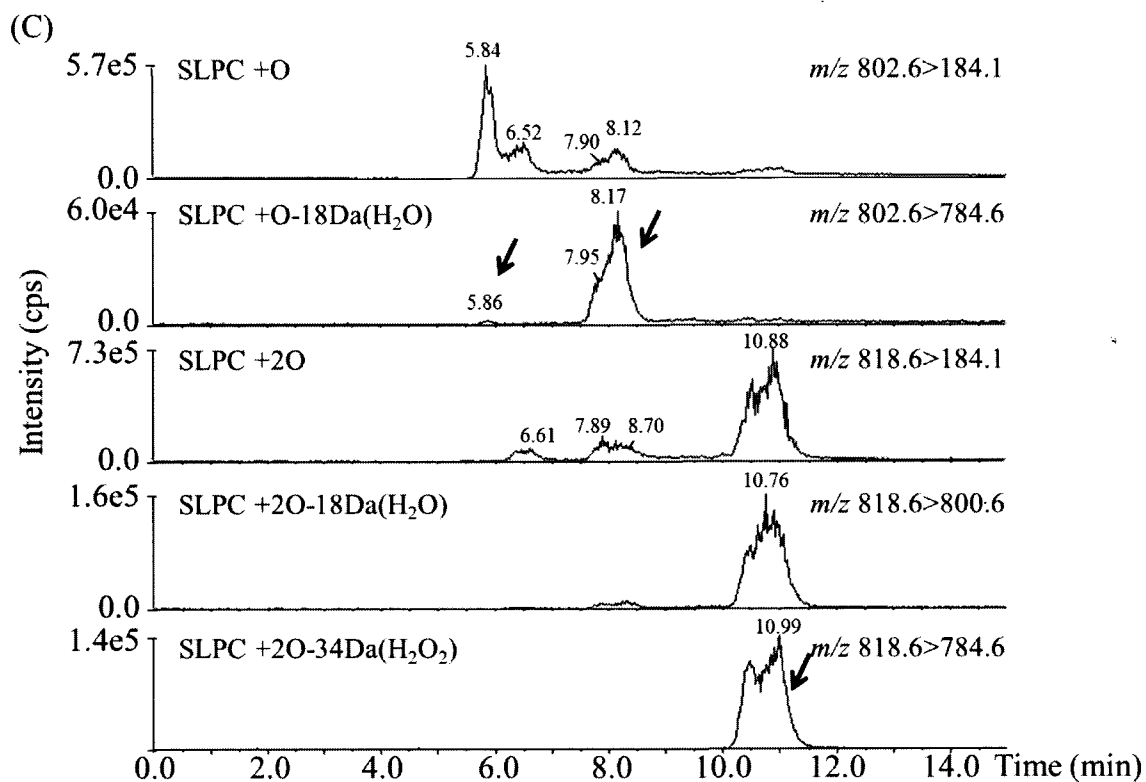
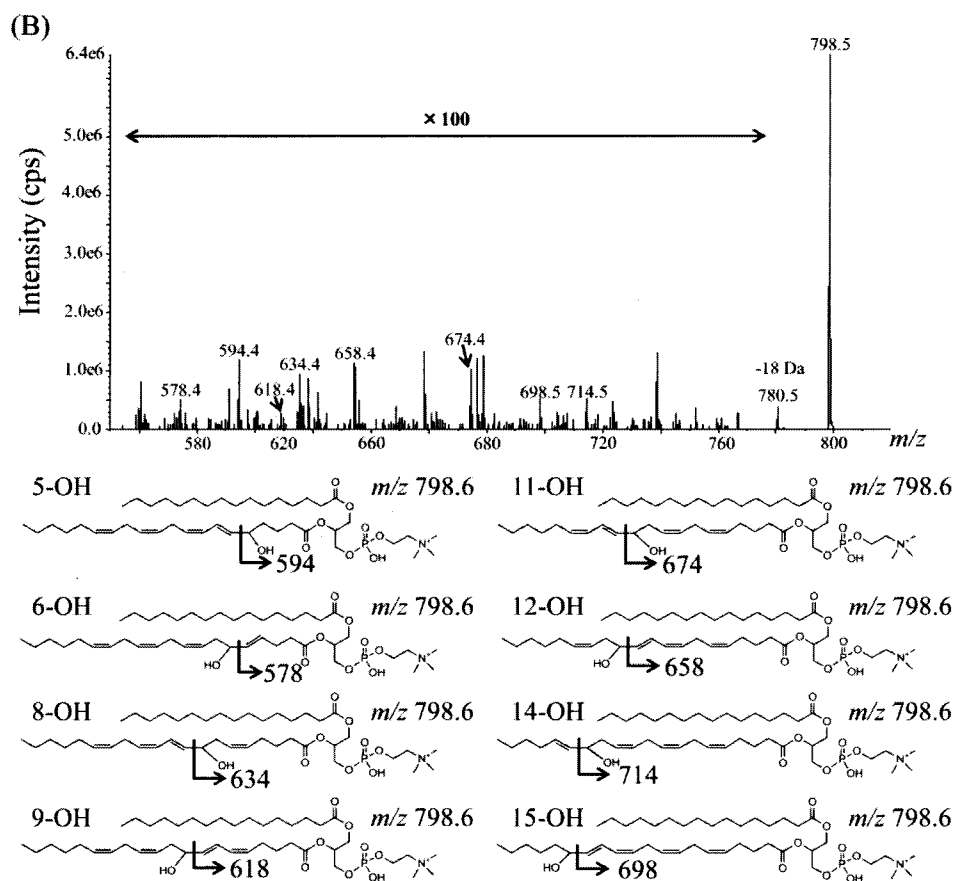
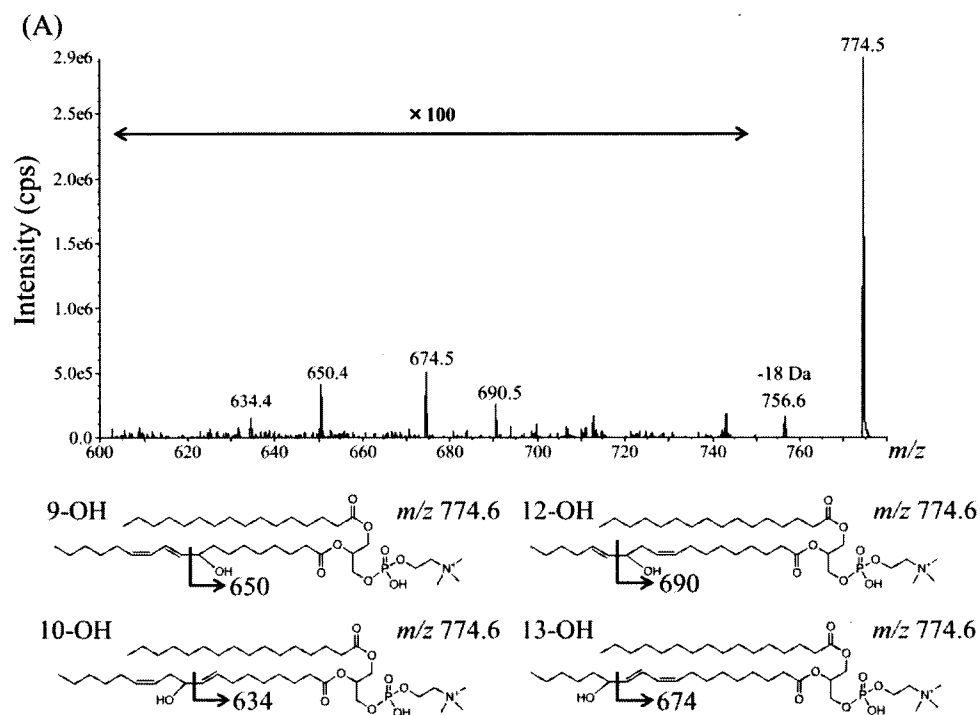


図 2-6. 酸化 PC 分析 MRM クロマトグラム

(A) 酸化 PLPC, (B) 酸化 PAPC, (C) 酸化 SLPC, (D) 酸化 SAPC

2-3-6. 酸化 PC 異性体分子種の同定

PC 酸化物の構造の推定を行うためにプロダクトイオンをイオントラップに貯めることで高感度のプロダクトイオンスキャンが可能である Enhanced プロダクトイオンスキャン (EPI) を用いて構造特異的なフラグメントの解析を行った. MS/MS 分析を用いて酸化物を分析した場合, ヒドロキシドでは, ヒドロキシ基が付加した炭素の C-C 結合がフラグメント化を起こしやすい³⁴. よって MS/MS 分析のプロダクトイオンの情報から酸化リン脂質の構造を推測することができる. ポジティブイオンモードでは, 酸化 PLPC の MS/MS 分析において保持時間 5.60 min においてヒドロキシドと考えられるフラグメント m/z 650, m/z 634, m/z 690, m/z 674 が検出された. それぞれ, 9 位, 10 位, 12 位, 13 位にヒドロキシル基が付加した構造であると推測できた (図 2-7-A). 同様に, 酸化 SLPC, 酸化 PAPC, 酸化 SAPC それぞれ保持時間 5.66, 5.86, 5.96 min に構造特異的なフラグメントピークが検出されたことからヒドロキシドであることが推測できた (図 2-7-B,C,D).



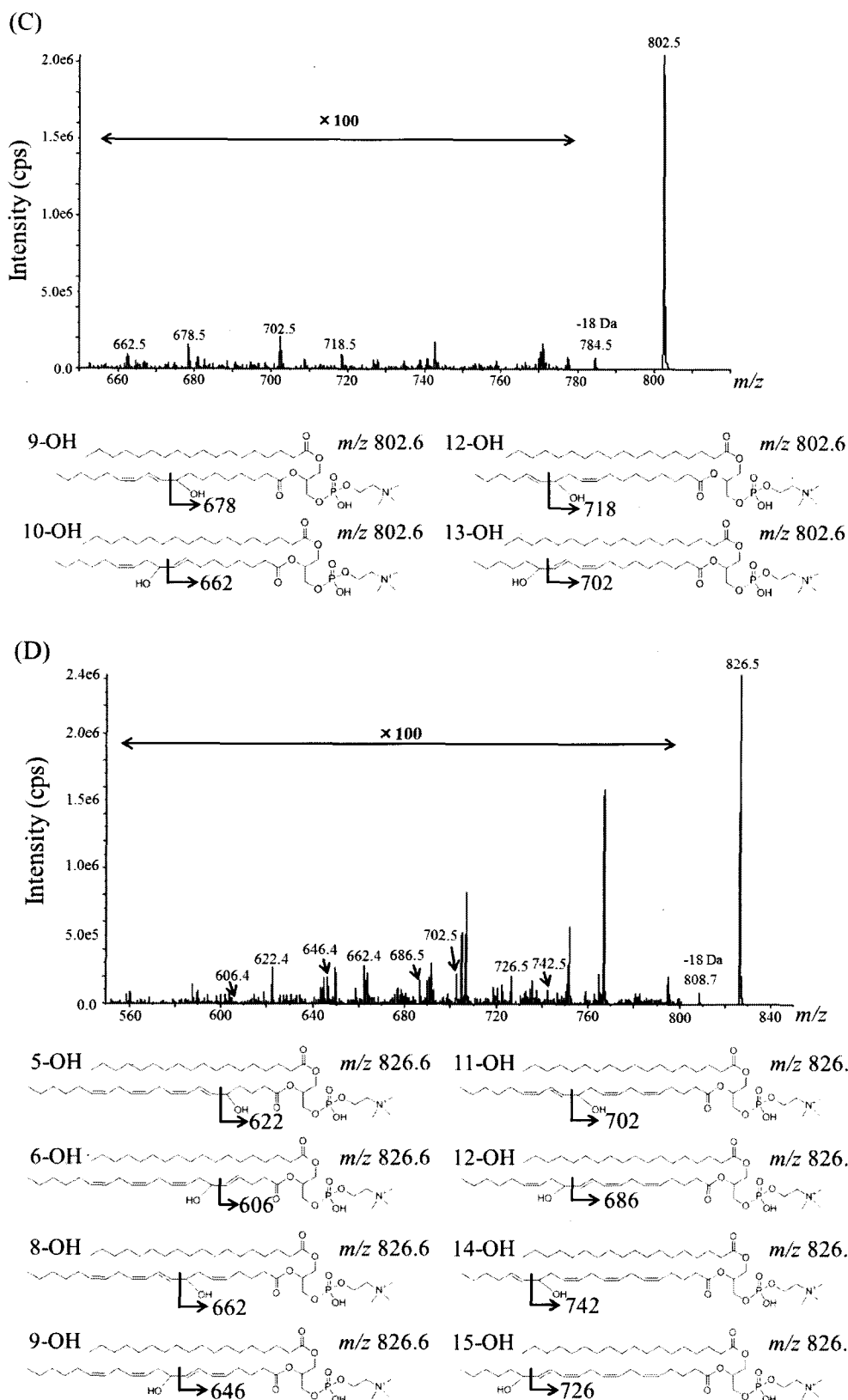


図 2-7. 酸化 PC 分析 MS/MS スペクトラム

(A) 酸化 PLPC, (B) 酸化 PAPC, (C) 酸化 SLPC, (D) 酸化 SPC

図 2-6 に示すヒドロキシドより遅い保持時間 (7.0 min~8.5 min) に溶出した酸化物のピークについて EPI 分析を行なったが、各種酸化物に特異的なシグナルを検出することができなかった (data not shown). ポジティブイオンモードで構造特異的なフラグメントが生成しにくいことからこれらのピークがエポキシドであると推察した. そこで、ネガティブイオンモードを用いた MS/MS 分析で脂肪酸エポキシドのフラグメントを得られたという報告があったことから⁵³, ネガティブイオンモードの MS/MS 分析を利用してエポキシドの構造解析を試みた. ネガティブイオンモードにおける EPI 分析を行ったが、夾雑イオンのフラグメントが多く、十分な感度が得られずシグナルが観測されなかった. そこで、ネガティブイオンモードの MS/MS 分析では、酸化 PC の酸化位置による特有のフラグメントを予測し MRM トランジションを構築しそれぞれの酸化物の分析を行った. ネガティブイオンモードの MS/MS 分析では、脂肪酸側鎖のエステル結合とエポキシ基においてフラグメント化しやすいため、MS/MS 分析によって生じるフラグメントを予測し Q3 として MRM トランジションを構築した. 構築した MRM 分析条件を表 2-3 に示す.

表 2-3. 酸化 PC の MRM 条件 (ネガティブイオンモード)

Oxidized PC species	Polarity	Q1 ^a (<i>m/z</i>)	Q3 ^b (<i>m/z</i>)	Target fragment	DP ^c (V)	EP ^d (V)	CE ^e (V)	CXP ^f (V)
PLPC (C16:0/C18:2) +O	negative	818.6	183.1	9,10-epoxide	-60	-10	-61	-11
			195.1	12,13-epoxide	-60	-10	-55	-7
SLPC (C18:0/C18:2) +O	negative	846.6	183.1	9,10-epoxide	-60	-10	-60	-13
			195.1	12,13-epoxide	-60	-10	-70	-13
PAPC (C16:0/C20:4) +O	negative	842.6	115.1	5,6-epoxide	-60	-10	-50	-13
			155.1	8,9-epoxide	-60	-10	-60	-13
			195.1	11,12-epoxide	-60	-10	-50	-13
			219.1	14,15-epoxide	-60	-10	-50	-13
SAPC (C18:0/C20:4) +O	negative	870.6	115.1	5,6-epoxide	-60	-10	-80	-13
			155.1	8,9-epoxide	-60	-10	-70	-13
			195.1	11,12-epoxide	-60	-10	-50	-13
			219.1	14,15-epoxide	-60	-10	-50	-13

MRM 分析を行った結果, リノール酸を有する酸化 PLPC 分析では, エポキシドとして検出されると考えられるフラグメント *m/z* 183, 195 が検出され, それぞれ 9 位, 10 位がエポキシドとなった酸化 PLPC, 12 位, 13 位がエポキシドとなった酸化 PLPC であることが推測できた (図 2-8-A). 同様にアラキドン酸を有する酸化 PAPC では, *m/z* 115, 155, 219 の構造特異的なフラグメントが検出されたことから 5,6-epoxide, 8,9-epoxide, 14,15-epoxide であると推測できた (図 2-8-B). また, *sn*-1 ポジションの脂肪酸がステアリン酸である SLPC や SAPC においても同じくそれぞれ構造特異的なプロダクトイオンをターゲットにした MRM 分析によってピークが検出されたことから 9,10-epoxide, 12,13-epoxide や 5,6-epoxide, 8,9-epoxide, 14,15-epoxide であることが推定できた (図 2-8-C,D). エポキシドの位置異性体として 11,12-epoxide もラジカル酸化物によって生成されることが報告されているがそのピークを検出することができなかった. 原因としては, 構造特異的なフラグメントが生成しにくいことや夾雑ピークに紛れてしまいイオン化サプレッションの影響により検出出来なかったことが考えら

れる。

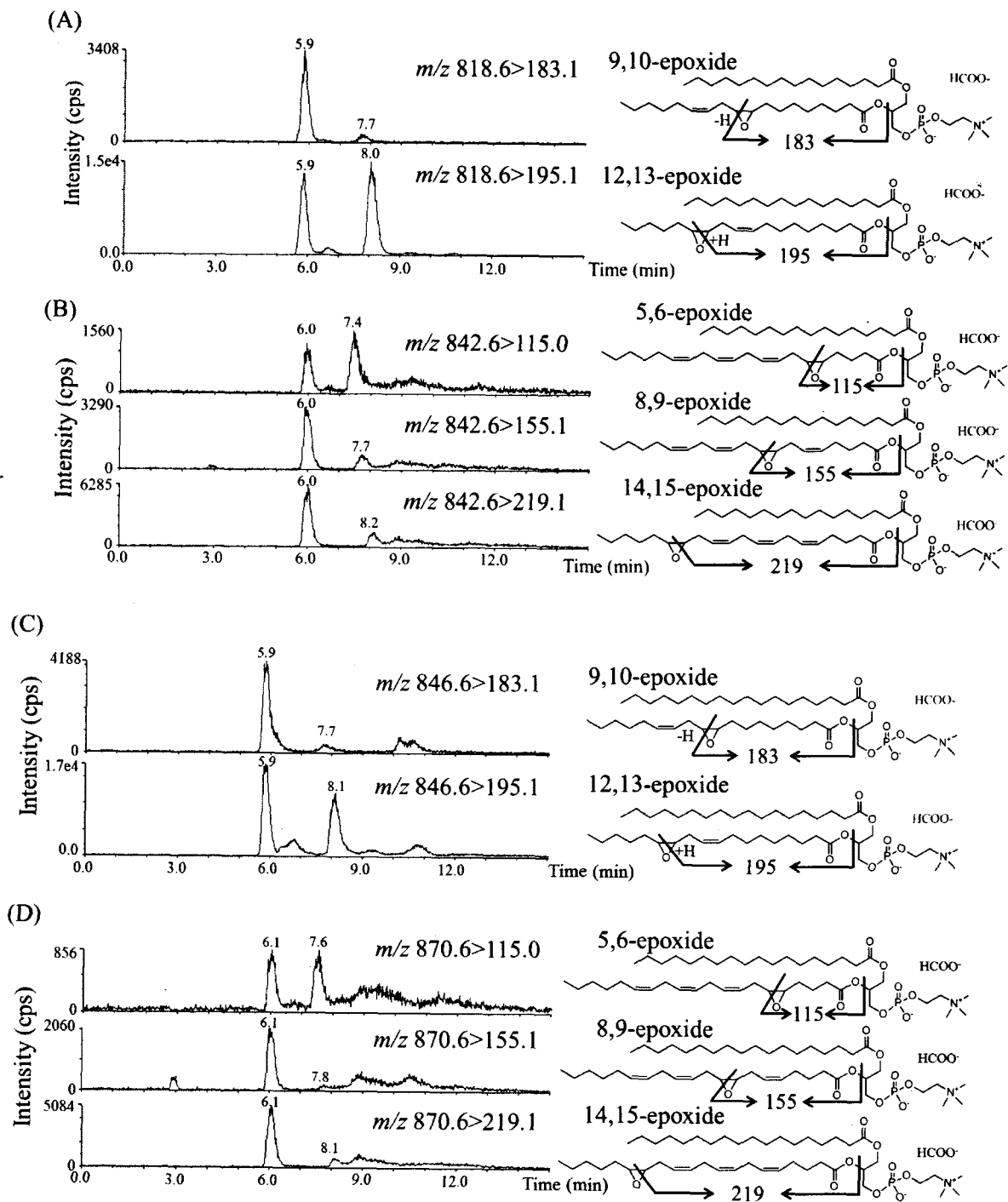


図 2-8. 酸化 PC 分析 MS/MS クロマトグラム

(A) 酸化 PLPC, (B) 酸化 PAPC, (C) 酸化 SLPC, (D) 酸化 SAPC

上記のとおり、多価不飽和脂肪酸を有する PC の酸化物としてヒドロキシドとエポキシドを MS/MS 分析によるプロダクトイオンの情報により構造の推定を行うことができた。本分析系ではヒドロキシドとエポキシド、ヒドロペルオキシドといった酸化修飾基における分離でき、さらにエポキシドは位置異性体を時間分離することができた (図 2-9)。

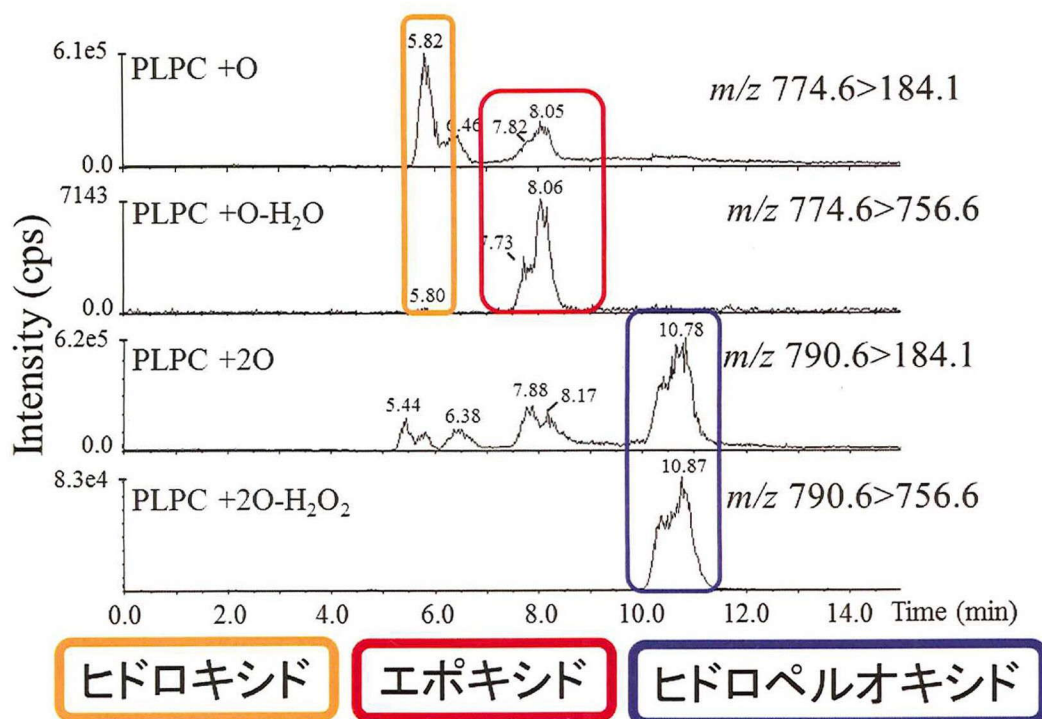


図 2-9. SFC/MS/MS を用いた酸化 PC 分析結果

2-3-7. SFC/MS/MS を用いた酸化リン脂質分析系の実サンプル分析への適用

上記で構築した酸化リン脂質分析系を用いて実サンプルとしてモデル生物であるマウスの肝臓中酸化リン脂質の分析を行い、実サンプルの分析に応用可能かどうか検証を行った。マウスの肝臓中の脂質を抽出し SFC/MS/MS を用いて分析を行った。抽出方法は、2-2-3 に示した通りである。まず、上記で構築した構造特異的なプロダクトイオンをターゲットとした MRM を用いて分析を試みた所、ネガティブイオンモードの MS/MS 分析において個々のエポキシドのシグナルを検出することができ、さらにアラキドン酸含有 PC 酸化物では、酸化物標準品で検出できた 5,6-epoxide, 8,9-epoxide, 14,15-epoxide だけでなく、酸化物標準品で

検出できなかった保持時間にピークが検出された。ポジティブイオンモードにおいて PC 特有フラグメントである m/z 184 フラグメントと脱水フラグメントである m/z 756 のフラグメントをターゲットにした MRM 分析においてピークが検出されたことや、ネガティブイオンモードの MRM 分析において Q3 のターゲットとして 195.1 のピークが検出できたことから、11,12-epoxide であることが示唆された。また、ポジティブイオンモードの MS/MS 分析において個々のヒドロキシドのシグナルは検出することができなかった。生体サンプルに存在するヒドロキシドが極微量であり構造特異的なフラグメント MRM では検出に十分な感度がなかったことや夾雑物イオンによるマトリックス効果による感度の低下が考えられた。そこで、ヒドロキシドを検出するため構造特異的なフラグメントより生成しやすい酸化脂質共通に生成する H_2O 脱離フラグメントに基づく MRM 分析によって、保持時間によりヒドロキシドの総量を検出できるかどうか検証した。さらに過酸化物においては過酸化水素脱離フラグメントに基づく MRM を用いてヒドロペルオキシドを検出できるか検証を行った。

結果を表 2-4 に示す。ヒドロキシドは PLPC ヒドロキシド、SLPC ヒドロキシド、PAPC ヒドロキシド、SAPC ヒドロキシドとしてそれぞれ検出され再現性良く検出された。側鎖による比較ではリノール酸ヒドロキシドを含む PC では 1 位がステアリン酸である PC の方が多いが、アラキドン酸ヒドロキシドを含む PC では 1 位がパルミチン酸である PC の方が多い結果となった。

一方、過酸化物分析では、ヒドロキシドと同様にどの分子種においても過酸化物を検出することができた。アラキドン酸過酸化物よりリノール酸過酸化物の方が多かった結果となった。

これらの結果から SFC/MS/MS を用いることでマウス肝臓中のヒドロキシド、エポキシド、ヒドロペルオキシドを有する酸化リン脂質の分析ができることが示された。エポキシドを有する酸化リン脂質を生体サンプルから初めて検出することができた。

表 2-4. マウス肝臓中の酸化 PC 分析結果

Compounds		Peak area	RT ^a (min)	RSD ^b (n=5) (%)	
				Peak area	RT
PLPC	9,10-epoxide	5.99E+04	7.4	8.2	0.9
PLPC	12,13-epoxide	7.83E+05	7.6	12.1	1.0
SLPC	9,10-epoxide	2.28E+04	7.5	7.6	1.1
SLPC	12,13-epoxide	3.84E+05	7.7	15.3	0.9
PAPC	5,6-epoxide	7.83E+03	7.2	26.1	1.4
PAPC	8,9-epoxide	6.98E+03	7.6	22.6	0.8
PAPC	14,15-epoxide	6.65E+03	9.1	8.4	1.6
PAPC	11,12-epoxide	3.45E+04	7.9	7.3	1.0
SAPC	5,6-epoxide	2.63E+03	7.2	29.0	1.1
SAPC	8,9-epoxide	1.99E+04	7.5	9.4	0.9
SAPC	14,15-epoxide	3.05E+04	8.4	9.5	1.2
SAPC	11,12-epoxide	9.06E+04	7.8	5.1	1.0
PLPC	hydroxide	1.10E+04	5.6	7.4	2.6
SLPC	hydroxide	9.35E+04	6.0	11.6	2.6
PAPC	hydroxide	9.98E+04	6.0	10.5	2.5
SAPC	hydroxide	3.59E+04	6.1	7.0	2.5
PLPC	hydroperoxide	1.42E+08	10.4	10.0	2.6
SLPC	hydroperoxide	5.36E+07	10.6	9.4	2.5
PAPC	hydroperoxide	1.85E+07	10.2	12.5	2.6
SAPC	hydroperoxide	4.93E+06	10.3	14.1	2.7

^a retention time (RT) , ^b relative standard deviation (RSD).

2.4. 考察

本章では SFC/MS/MS を用いた酸化リン脂質分析系を構築し、MS/MS 分析による構造推定を行い、マウス肝臓中の酸化リン脂質分析に適用することで、生体サンプルに応用できるかどうか検証を行った。

SFC において 2-Ethylpyridine カラムを使用することで、リノール酸エステル、アラキドン酸エステルを有する PC のヒドロキシドやエポキシドといった酸化物異性体や過酸化物であるヒドロペルオキシドを分離することができ、酸化修飾基の異なる分子種を一斉に分析が可能な分離系を構築できた。これは、カラムの検討としてシリカを担体として修飾基の異なるカラムを検討した結果より、シリカの担体に修飾されている Ethylpyridine が正の電化を持っており、酸化修飾基によって酸素の電子密度が異なるのでカラム修飾基との相互作用がそれぞれ異なるために酸化修飾基ごとに分離ができたと考えられる。また、MS/MS 分析による化合物のフラグメント情報からヒドロキシド、エポキシドの構造を推定することができた。酸化 PC であるエポキシドについて分離を行い、構造推定を行った初めての報告であり、酸化リン脂質分析において位置異性体などの構造類似体が存在する酸化物の分離に SFC が有用である事が示された。

さらに、生体サンプルからヒドロキシドやエポキシド、過酸化物が検出できた。側鎖による比較ではリノール酸ヒドロキシドを含む PC では *sn*-1 位がステアリン酸である PC の方が多いが、アラキドン酸ヒドロキシドを含む PC では *sn*-1 位がパルミチン酸である PC の方が多い結果となった。一般的なリン脂質の組成では、*sn*-1 位がパルミチン酸である PC の方が多いため、*sn*-1 位がパルミチン酸であるリノール酸ヒドロキシドは、酵素特異的に分解され減少したことや、または *sn*-1 位がステアリン酸であるリノール酸 PC が酵素特異的に酸化されてヒドロキシドが増加したと考えられる。また、ラジカル酸化反応では、一般的にリノール酸より二重結合が多いアラキドン酸の方が酸化されやすいが、生体サンプル中の酸化リン脂質ではリノール酸酸化物の方が多く結果となった。これは、酸化 PC の生成に *sn*-1 位の脂肪酸が関わっていることや、リノール酸を特異的に酸化するリポキシゲナーゼなどの酵素が作用している

可能性が考えられる。また、個々のヒドロキシドが検出できなかったことに関しては、酸化物に対して膨大な量存在するリン脂質が共溶出している可能性があげられる。共溶出を防ぐためには、より高分離能を有する分析系が必要となり、より粒子径の小さいカラムまたは、カラム連結などにより長くしたカラムを用いることで解決できる可能性がある。

生体中の酸化リン脂質を分析できたことから、本 SFC/MS/MS を用いた酸化 PC 分析システムは様々な生体サンプルに適用できる可能性があり、酸化リン脂質と疾患の関係を明らかにするツールとして応用できる。さらに SFC を用いることによる分離能の向上によって酸化リン脂質の分析可能な分子種を増やすことができ、マルチマーカープロファイリングに資するシステムの構築を行うことができた。

本章で構築した酸化リン脂質の分離分析系では、ヒドロキシドやヒドロペルオキシドにおいて個々の位置異性体の分子種のクロマトグラフィーによる分離ができていない。しかし、低粘性という特徴を有する超臨界流体を移動相に用いた SFC は、カラムにかかる圧力が小さいためカラムの連結を行う事が可能であり、より高分離能な分析系を構築することが可能である。そのため、複数のカラムを接続することが可能であり、2 本以上のカラムの接続も可能となる。カラムを連結し、長いカラムを適用することでカラムの分離能が向上し、個々のヒドロキシドやヒドロペルオキシドを分離できる可能性があり、より多くの分子種の解析に応用できることが期待される。また、カラムを連結することに伴いスループットの低下や化合物が拡散することが考えられるが流速を増大させることでその問題は解決できる。ただ、カラムにかかる圧力が増大してしまうため、現状 3 本までの接続が限界であり、より高圧力で安定的に送液できるポンプが必要となるため、新規 SFC 装置の開発が今後期待される。

また、その他の極性基を持つリン脂質も酸化リン脂質として存在しうるため、本研究と同様に研究を行うことで、様々なリン脂質における酸化物分析を行える事が期待できる。さらに異性体の多い酸素が複数付加した分子種においても分離性能のよい SFC/MS/MS を適用することによって構造や分子種の種類といった詳細が解析できることが期待できる。SFC は、移動相に常温常圧下で気体である二酸化炭素を用いており、溶媒除去が簡便であることから

分取クロマトグラフィーといった分取のシステムとして頻用されている。これまで分離できていなかった酸化リン脂質を分離することできるようになったため、酸化リン脂質を分取し生理学的研究に応用することが期待できる。

第3章 酸化リン脂質分析に資するオンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析系の構築

3-1. 緒言

血液は、採取が容易であり、臨床診断のために用いられているサンプルであり、リン脂質をターゲットとしたリポドミクスを用いたバイオマーカー探索のサンプルとしても頻用されている¹⁴。血液中に存在するリン脂質は、ホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) が主成分であり⁵⁸、生体内の脂質代謝の重要な化合物である。また、スフィンゴミエリンがアテローム性動脈硬化症のマーカー候補である可能性もあることや¹⁴、酸化リン脂質がプラーク発生のシグナル伝達を担うことが示されたことから²⁷、血漿中のリン脂質や酸化リン脂質が酸化ストレス疾患のマーカーの候補となる可能性があり、バイオマーカー探索などにおいてリン脂質、酸化リン脂質の分析が重要である。一般的に生体中の総脂質の抽出方法として用いられる Bligh & Dyer 法³⁶は、クロロホルムとメタノール混合液で抽出し、液液分配によって脂溶性各分を取得する手法である。脂溶性各分は、クロロホルム層であり分析系に供する前に溶媒を除去した後に移動相溶媒などで再溶解する必要がある。これらの試料調製の中で光によるリン脂質の酸化や酸化リン脂質の分解が起こる可能性があり、生体中の酸化物を正確にプロファイルするためには、暗黒無酸素条件下でマイルドに抽出し分析する必要がある。

超臨界流体抽出 (SFE) は超臨界二酸化炭素を用いた抽出方法で、超臨界二酸化炭素が疎水性であるため疎水性代謝物の抽出方法として用いられてきた。また、移動相が超臨界二酸化炭素である SFC とオンラインで直接接続することが可能であり、抽出から分離分析まで一度に行うことができ、外気にふれることなく抽出分離が可能であり、マイルドな条件で抽出することができるため試料調製段階における酸化や分解を回避できる。これまでも抽出精製技術としてオンライン SFE-SFC がトコフェロールやカプサイシンを対象に用いられている^{59,60}。さらに、検出装置として質量分析に接続したオンライン SFE-SFC/MS/MS は抽出

から分離検出まで暗黒無酸素下で行うことができ、不安定な化合物の抽出分析に適している。

オンライン SFE-SFC/MS/MS は、暗黒無酸素の条件で抽出できる有用なシステムであるが、オンライン化には問題点が存在する。一般的に SFE は、移動相に添加する溶媒量を増加することによって抽出される量が増加し、SFC では、LC と同様に添加溶媒の比率を上昇させることで溶出力が増加し、化合物の分離を行う。そのため、分離条件において溶出力を上昇させると溶媒添加量が増加し溶出力だけでなく抽出力も上がってしまう結果となり、抽出セルと分析カラムをつないだまま抽出と分離を行った場合、目的とする化合物以外にも様々な化合物が抽出されてしまい抽出から分析を行う事が困難となる。そのため、これまでに単一の成分の分析が主に行われてきたが、多数の成分を一斉にオンライン SFE-SFC/MS/MS で抽出から分析まで行う例は報告されていない。目的の化合物の抽出を行い、分離分析を行うためには抽出、分離の条件の最適化が必要となる。

そこで、本章では、血漿中リン脂質、酸化リン脂質分析を行うためのオンライン SFE-SFC システムを構築することを目的とした。SFE-SFC のオンライン化は、同一の移動相を用いて抽出と分離を同時に行うため、抽出物がそのまま分離系に入ってしまうことから条件の検討が必須である。まず、システムの検証として生体サンプルから抽出、分離分析が可能であるかどうかを確認するため血漿中のリン脂質をターゲットとして、サンプルの抽出と分析を切りかえるシステムを適用し、分離条件や抽出条件の最適化を行うことで、オンライン SFE-SFC/MS/MS 分析条件の検討を試みた。また、ヘキサン程度の極性を有する超臨界二酸化炭素は、水と混ざらないことから、生体サンプルにおいて水分を多く含む血漿を用いることで実用的に分析できるかどうか検証を試みた。次に酸化リン脂質の標準品を用いてオンライン SFE-SFC/MS/MS 分析の検証と生体サンプルとして血漿中酸化リン脂質分析への適用を試みた。

3-2.実験方法

3-2-1. 試薬

メタノール (HPLC grade, 99.8%) とクロロホルム (HPLC grade, 99%) はキシダ化学 (Osaka, Japan) から購入し, 蒸留水 (HPLC grade, 99%) と 2,2'-アゾビス (2-メチルプロピオンアミジン) 二塩酸塩 (AAPH) は和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した. 1,2-ジアシルグリセロ-3-ホスホコリン (純度 99%) (16:0/18:2 PC (PLPC), 18:0/18:2 PC (SLPC), 16:0/20:4 PC (PAPC) and 18:0/20:4 PC (PAPC)) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入し, ホスファチジルコリンの標準品とした. 二酸化炭素 (純度 99.5%) は, ネリキガス (Hyogo, Japan) から購入した. 添加剤として使用した蟻酸アンモニウム (純度 99.0%) は, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. リン脂質標準品である Phospholipid kit (純度 98%)(Lysophosphatidylcholine (LPC), Phosphatidylcholine (PC), Sphingomyelin, Lysophosphatidylethanolamine (LPE), Phosphatidylethanolamine (PE)) は Doosan Serdary Research Laboratories (Toronto, Canada)から購入した. マウス血漿は, CLEA Japan, Inc. (Fuji, Shizuoka, Japan)から購入し, サンプルをアプライし SFE-SFC/MS/MS に供するろ紙として, 乾燥ろ紙血サンプルを作成するためのろ紙である Bond Elut Dried Matrix Spotting (DMS) card は, Agilent Technologies, Inc. (Loveland, CO, USA) から購入した.

3-2-2. サンプル調製

SFE と液液抽出を比較するために液液抽出方法として脂質抽出に一般的に用いられている Bligh and Dyer 法³⁶で血漿中のリン脂質を抽出した. 21 μ L 血漿にメタノール 42 μ L, クロロホルム 21 μ L を順に加え, 2 分間ボルテックスし, 10 分間室温で静置した. さらに, クロロホルム 21 μ L を加え, 30 秒間激しく振とうし, さらに水を 21 μ L 加え同様に振とうする. 遠心分離後 (3000 rpm, 5min) , 下層のクロロホルム層を回収し, 上清にさらにクロロホルムを 42 μ L 加え, 振とう, 遠心分離後下層のクロロホルム層を回収し, クロロホルム層をあわせて窒素ガスを用いて乾燥させ, 35 μ L のクロロホルム:メタノール溶液=1:2 溶液に再溶解し 5 μ L を

SFC/MS に供した. SFE との比較のためにインジェクション量が 3 μ L の血漿量に相当するよう
に調製した.

酸化リン脂質標準品は, 2-2-2 と同様に調製した.

オンライン SFE-SFC においては, 血漿サンプルは 3 μ L, リン脂質標準品は 5 μ L を直径 3
mm に切り取った DMS カードに染み込ませて, 抽出用空カラム (10 $\times$ 4 mm ID, filter:2
 μ m;GL science) の中に装填し, オンライン SFE-SFC/MS/MS システムに取り付けた.

3-2-3. 装置

オンライン SFE-SFC は, 分析用 SFC 装置である Analytical SFC Method Station (Waters,
Co.) を使用し, カラムオープン内のカラムチェンジャーを抽出セルの切り替え装置として用
いた.

目的化合物の抽出を行った後に, 不要なものが抽出しないようにするためにサンプル導
入用と分析用の 2 種類の配管をカラムオープン内のバルブの間に交互に組み込み, バルブ
の後に分析用カラムを接続することで抽出工程と分離工程を分けることが可能なオンライン
SFE-SFC/MS/MS システムを適用した (図 3-1). 抽出を行う際は, 図 3-1 に示したように抽出
セルに移動相が通り, 抽出が終わり, 化合物を分析カラムで分離を行うために溶媒添加量を
増加する際にバルブを切り替えることで抽出セルを流路から切り離すことが可能である. 本
システムは, 移動相が低粘性かつ高拡散性という特徴をもつ超臨界流体であるため流路の
変更を行った際に圧力の変動がほとんどなく抽出力の変動などシステムに影響を与えること
なく分離分析を行う事ができる.

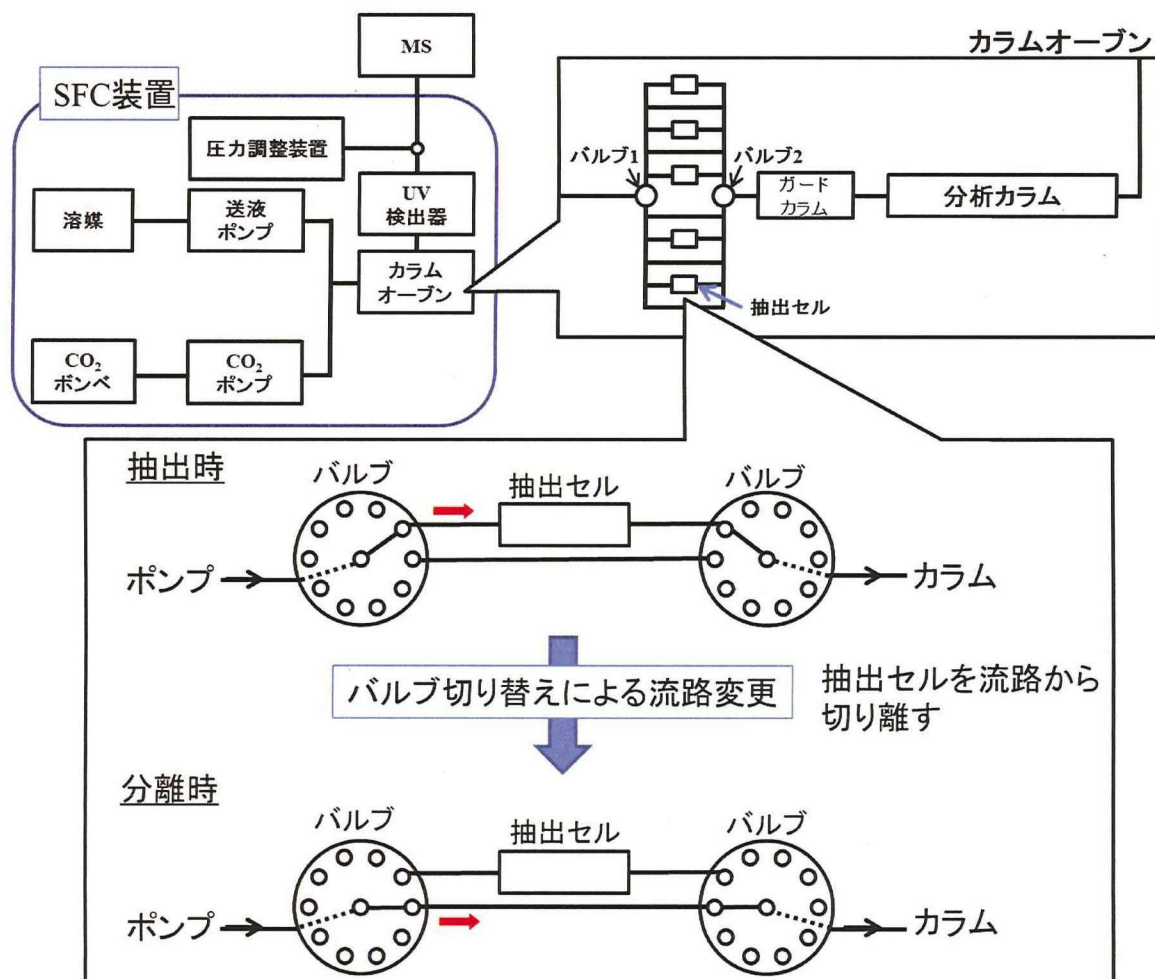


図 3-1. オンライン SFE-SFC/MS/MS システム概略図

質量分析装置としては第 2 章と同様に Multiple reaction monitoring (MRM) 分析や Precursor ion scan, Neutral loss scan といった MS/MS スキャンモードが使用出来る三連四重極型質量分析である QTRAP5500 (AB sciex Inc.) を使用した。

3-2-4. 分析条件

オンライン SFE-SFC/MS/MS システムの検証を行うため、生体中に豊富に存在するリン脂質を用いてシステムの検証を行った。SFC や MS (イオン化条件) の分析条件は、2 章と同様に表 2-1 を用いた。

生体サンプル中に含まれるリン脂質は、化合物によって存在量が異なるので、分析系の

検出できる幅であるダイナミックレンジが重要である。そこで、血漿サンプル中での存在量が多いPCやSMを含む m/z 領域のコリジョンエネルギーを高くすることで、サチュレーションを起こることを防ぎ、ダイナミックレンジの広い分析系の構築を行った。構築した質量分析の条件を表 3-1 に示す。カラム検討には、低エネルギーのコリジョンエネルギーのプリカーサーイオンスキャンを用いた。また、酸化リン脂質分析には表 2-2 の分析条件のポジティブイオンモードの MRM 分析を用いた。

表 3-1. 質量分析条件

Head group	Scan range (m/z)	Scan mode	Target ion (m/z)	Collision Energy (V)
PC, LPC, SM	450-710	Precursor ion scan	184.1	50
PC, LPC, SM	610-950	Precursor ion scan	184.1	110 ^a
PE, LPE	400-900	Neutral loss scan	141.1	25

3-3.結果

3-3-1. カラムの検討

標準品であるリン脂質混合物を用いてカラム検討による分離の確認を行った。検出方法としては、PC, LPC, SM 分析には MS/MS 分析において極性基である共通のホスホリルコリン由来のフラグメントイオン (m/z 184.1) が検出されることからプリカーサーイオンスキャンを用いた。また、PE, LPE 分析には、ホスホエタノールアミン由来の共通の中性イオンが脱離したフラグメント (loss of 141.1 Da) が検出されることからニュートラルロススキャンを用いて分析を行った (表 3-1)。成分の同定は、プリカーサーイオンスキャンによって PC, LPC や SM を判別し、ニュートラルロススキャンによって PE や LPE の判別し、さらに、検出できたプリカーサーイオンの m/z 値と理論値を比較することによって炭素数や不飽和度の計算を行い同定した。

本システムのオンライン SFE-SFC を用いた場合、抽出と分析を同時に行うことから抽出条件で分析対象化合物を保持し、分離条件で化合物が溶出するクロマトグラフィーの条件が必要となる。逆相系カラムの代表である ODS カラム (ODS-3; 250×4.6 mm ID; GL science) は、リン脂質の保持が弱くモディファイヤー濃度が低い条件 (10%) でリン脂質が溶出してしまった。よって、リン脂質の保持が逆相系カラムより強い順相系カラムの検討を行った。まず、順相系カラムとしてシリカベースに Ethylpyridine を修飾した 2-Ethylpyridine カラム (Princeton, 250×4.6 mm I.D., 粒子径 5 μm ,) を用いた。2-Ethylpyridine カラムは、リン脂質の保持はするものの SM と LPC のピークが重なり、分離ができないことから本分析系には不適であった (図 3-2-A)。そこで分析用カラムとしてリン脂質分子種の保持が強くモディファイヤー量を増加することでリン脂質が溶出する PC HILIC カラム (SHISEIDO, 250×4.6 mm I.D., 粒子径 5 μm ,) の適用を試みた。PC HILIC カラムは親水性相互作用クロマトグラフィーが可能なカラムで、シリカ基材表面をホスホリルコリンで修飾した単体を使用したカラムである。分析の結果、同じプロダクトイオンを生成する PC, LPC, SM をベースラインで分離することができた (図 3-2-B-a)。また、共通のイオンをロスする LPE, PE も分離することができ

た (図 3-2-B-b). これは, PC HILIC カラムがコリン基の正電荷, リン酸基の負電荷を有するカラムであり, リン脂質のリン酸基の負電荷やコリン, エタノールアミンといった窒素含有極性基の正電荷的作用との電氣的相互作用によって高分離が実現できたと考えられる.

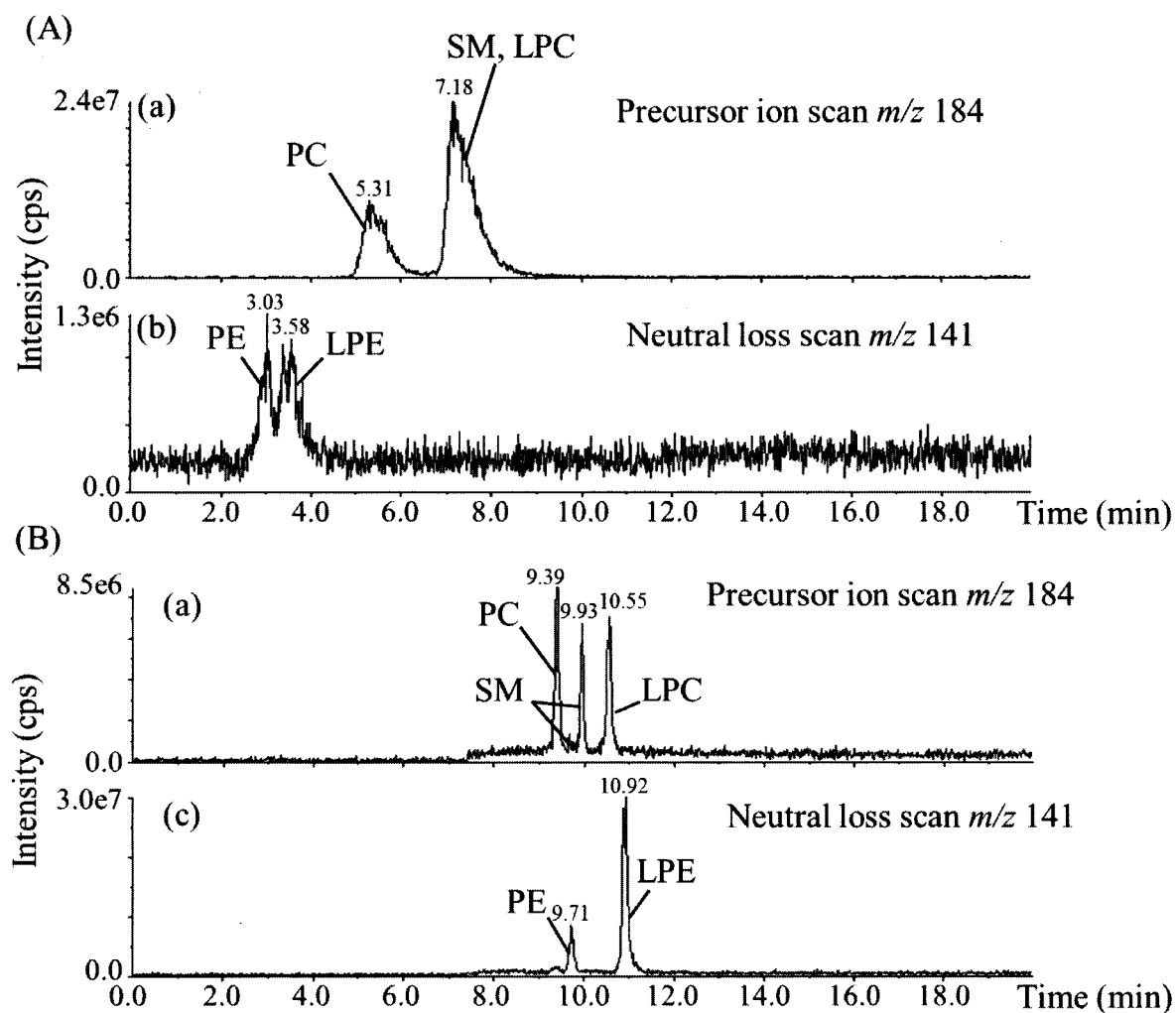


図 3-2. リン脂質標準品分析結果のトータルイオンクロマトグラム

(A):2-Ethylpyridine カラムを使用 (モディファイヤー10%-30% 20 min)

(B):PC HILIC カラムを使用 (モディファイヤー5% 5 min, 30% 15 min)

(a):プリカーサーイオンスキャン, (b):ニュートラルロススキャン

3-3-2. マウス血漿中リン脂質抽出条件検討

マウス血漿のサンプルを用いて抽出条件の検討を行った。まず抽出時の移動相の溶媒添加量(モディファイヤー量)の検討を行った。モディファイヤーとしては 0.1%のギ酸アンモニウムを含むメタノールを使用し、分離条件でモディファイヤー量を 30%として抽出条件の検討を行った。

モディファイヤー量を 5%とした場合、検出されたエリア値が小さく抽出されるリン脂質が少ないという結果となった (図 3-3-A)。これは、溶媒量がすくないため抽出効率が低いためだと考えられる。また、添加量を15%にした場合、抽出力の上昇と共に保持力が下がってしまうため、ピーク形状が悪くなり、これに伴い分離能の低下が見られた (図 3-3-C)。よって抽出時の溶媒添加量はリン脂質の抽出がよく、リン脂質の分離も可能である 10%とした (図 3-3-B)。

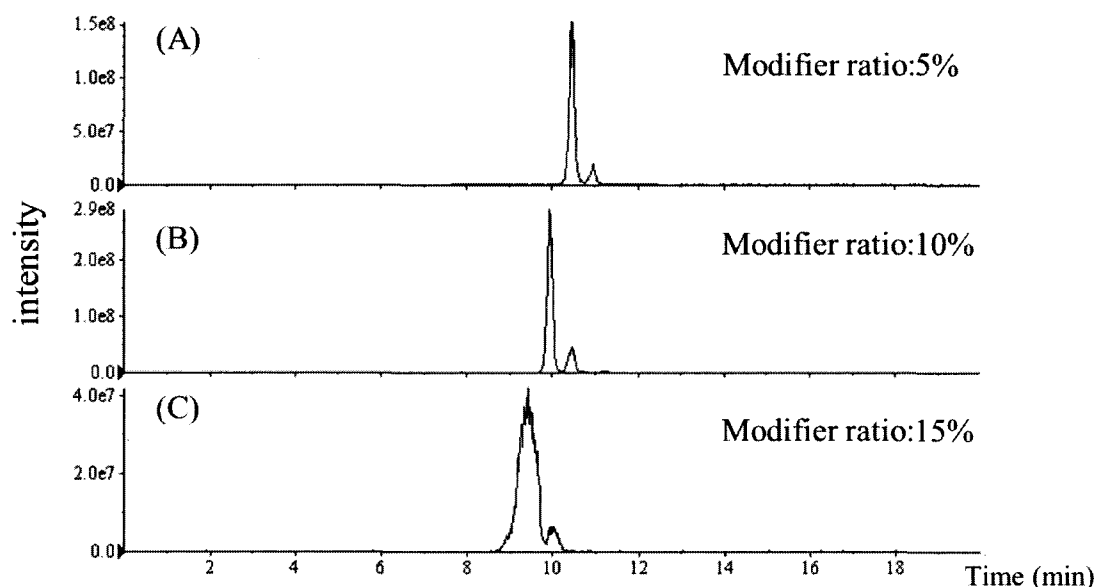


図 3-3. 抽出条件 (モディファイヤー添加量) の検討

次に抽出時間の検討を行った。抽出時間として 2 分, 5 分の検討を行い、一度の抽出で抽出される割合を確認するために同一サンプルで 3 回抽出を行い検出できた 3 回分のエリア値の総和を 100%とした。その結果 2 分間では 40%, 5 分間では 85%以上抽出されている

ことがわかり, 再現性も 5 分間ではエリア値の相対標準偏差 (RSD) が 20%程度だったため抽出時間を 5 分間に設定した (表 3-1). また, 水分を多く含む血漿を用いても再現性よく抽出分析できたことから血漿サンプルを実用的に分析できる事が示された.

表 3-2. 抽出時間検討結果

compound	<i>m/z</i>	2 min		5 min	
		抽出量 (%)	(RSD)	抽出量 (%)	(RSD)
LPC (C18:0)	524	40.6	86.9	86.8	13.9
LPC (C16:0)	496	38.0	105.8	85.4	19.2
PC (C34:1)	760	44.1	43.9	92.4	20.8
PC (C34:2)	758	44.3	44.7	90.9	16.3

3-3-3. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いた血漿中リン脂質分析

オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いた血漿中リン脂質の分析を行った. 抽出条件として CO₂ に添加剤であるモディファイヤーとして 0.1%ギ酸アンモニウムを含むメタノール 10%を加えた条件で 5 min 抽出を行った. その後, 分析用流路に切り替え移動相をモディファイヤー30%に設定し分析を行った. その結果, PC, LPC, SM, PE, LPE が抽出, 分析カラムによる分離分析を行うことができた (図 3-4).

生体サンプル中に含まれるリン脂質は, 化合物によって存在量が異なるので, 分析系の検出できる幅であるダイナミックレンジが重要である. そこで, 血漿サンプル中での存在量が多い PC や SM を含む *m/z* 領域のコリジョンエネルギーを高くすることで, サチュレーションを起こることを防ぎ, ダイナミックレンジの広い分析が可能となる. コリジョンエネルギーが低いプリカーサーイオンスキャン分析では, 保持時間 9.3 min に PC が, 保持時間 9.6, 9.8 min に SM が, 保持時間 10.3 min に LPC が検出された. コリジョンエネルギーが高いプリカーサーイオンスキャン分析では, 9.3 min に PC, 9.8 min に SM が検出された. また, ニュートラルロススキャン分析では, 保持時間 9.6 min に PE が, 保持時間 11.0 min に LPE が検出された. 検出できた分子種をプリカーサーイオンの *m/z* から同定したところ, 全部で 134 種のリン脂

質(26のLPC, 1種のLPE, 75のPC, 10のPE, 22のSM)を検出することができた(表3-3).
血漿中のリン脂質を前処理することなく, 抽出行程を含めて 20 分以内に分析が可能なハイ
スループットな分析系を構築できた.

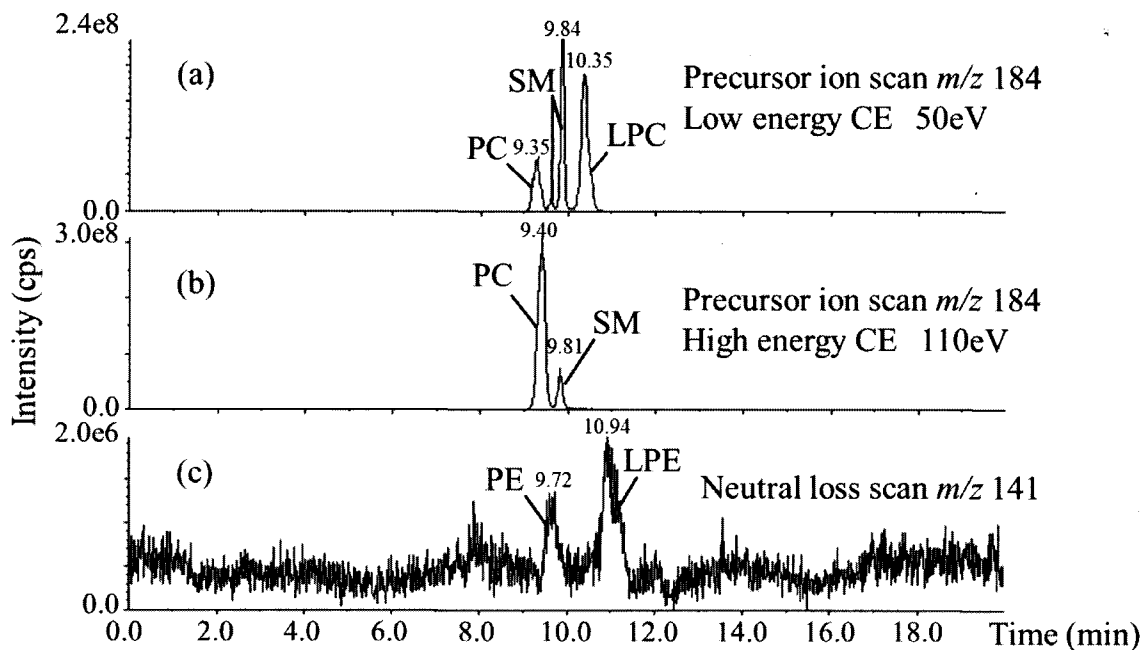


図 3-4. 血漿中リン脂質分析結果のトータルイオンクロマトグラム

(a) 低エネルギーCE のプリカーサーイオンスキャン ; (b) 高エネルギーCE のプリカーサー
イオンスキャン; (c) ニュートラルロススキャン

表 3-3. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いて検出できたマウス血漿中リン脂質分子種

Low collision energy Precursor ion scan						High collision energy Precursor ion scan						Neutral loss scan		
PLs ^a	<i>m/z</i>	RT ^b (min)	PLs	<i>m/z</i>	RT (min)	PLs	<i>m/z</i>	RT (min)	PLs	<i>m/z</i>	RT (min)	PLs	<i>m/z</i>	RT (min)
LPC 16:1e ^c	480.3	10.3	PC 34:2e	744.5	9.3	LPC 32:0	720.6	10.5	PC 40:3e	826.7	9.3	LPE 18:0	482.4	10.8
LPC 15:0	482.3	10.2	PC 33:1	746.5	9.2	PC 31:2	716.5	9.2	PC 40:9	828.5	9.3	PE 33:2	702.6	9.6
LPC 16:1	494.4	10.5	PC 34:0e	748.6	9.3	PC 31:1	718.5	9.3	PC 40:1e	830.6	9.2	PE 36:5e	724.5	9.6
LPC 16:0	496.4	10.4	DISM ^d 16:0	705.6	9.6	PC 31:0	720.6	9.2	PC 40:7	832.5	9.5	PE 36:3e	728.5	9.7
LPC 18:2e	506.3	10.4	DISM 16:1	703.5	9.6	PC 32:6	722.5	9.2	PC 40:6	834.6	9.5	PE 36:2e	730.5	9.6
LPC 17:1	508.4	10.3	DISM 18:0	733.6	9.6	PC 32:1	732.6	9.4	PC 40:5	836.6	9.5	PE 38:6e	750.6	9.7
LPC 17:0	510.3	10.4	SM 14:0	675.5	9.9	PC 32:0	734.5	9.3	PC 40:4	838.6	9.4	PE 37:5	752.5	9.7
LPC 18:3	518.3	10.6	SM 16:0	703.5	9.9	PC 34:6e	736.5	9.3	PC 40:3	840.7	9.4	PE 37:4	754.5	9.6
LPC 18:2	520.4	10.5	SM 16:1	701.5	9.9	PC 34:3e	742.6	9.3	PC 40:2	842.6	9.3	PE 38:2e	758.7	9.6
LPC 18:1	522.4	10.4	SM 18:0	731.7	9.8	PC 34:2e	744.5	9.3	PC 40:1	844.7	9.4	PE 38:1e	760.7	9.5
LPC 19:1	536.4	10.2	SM 18:1	729.5	9.8	PC 34:1	746.5	9.2	PC 41:7	846.6	9.4	PE 39:6	778.5	9.7
LPC 20:5	542.3	10.6	SM 18:2	727.5	9.8	PC 34:0e	748.6	9.3	PC 41:6	848.7	9.5			
LPC 20:4	544.4	10.6				PC 34:2	758.5	9.4	PC 42:5e	850.7	9.3			
LPC 20:3	546.4	10.5				PC 34:1	760.6	9.3	PC 41:4	852.7	9.3			
LPC 20:2	548.4	10.5				PC 34:0	762.6	9.3	PC 41:3	854.7	9.3			
LPC 20:1	550.4	10.4				PC 36:5e	766.5	9.4	PC 41:2	856.7	9.3			
LPC 22:6	568.4	10.7				PC 36:4e	768.6	9.3	PC 41:1	858.7	9.2			
LPC 22:5	570.4	10.6				PC 35:3	770.5	9.3	PC 42:7	860.6	9.5			
LPC 22:4	572.4	10.5				PC 35:2	772.5	9.4	PC 42:6	862.6	9.5			
LPC 22:0	580.4	10.3				PC 36:1e	774.6	9.3	PC 42:5	864.6	9.5			
LPC 24:0	608.5	10.2				PC 36:0e	776.6	9.3	PC 42:4	866.7	9.4			
LPC 26:1	634.5	10.2				PC 36:5	780.6	9.3	PC 45:2	912.7	9.5			
LPC 30:0	692.5	10.5				PC 36:4	782.6	9.5	DISM 16:0	705.6	9.6			
LPC 30:1	690.5	10.3				PC 36:3	784.6	9.4	DISM 18:0	733.6	9.6			
LPC 32:0	720.6	10.5				PC 36:2	786.6	9.4	DISM 24:1	815.7	9.6			
LPC 32:1	718.6	10.6				PC 36:1	788.7	9.3	DISM 24:6	805.6	9.5			
PC 30:2	702.5	9.3				PC 36:0	790.6	9.3	SM 14:0	675.5	9.9			
PC 30:1	704.5	9.3				PC 38:6e	792.5	9.4	SM 16:0	703.5	9.9			
PC 30:0	706.6	9.3				PC 38:5e	794.6	9.4	SM 16:1	701.5	9.9			
PC 28:1	676.5	9.3				PC 38:4e	796.7	9.3	SM 18:0	731.7	9.8			
PC 29:1	690.5	9.2				PC 38:3e	798.6	9.3	SM 18:1	729.5	9.9			
PC 31:3	714.5	9.3				PC 38:2e	800.7	9.4	SM 18:2	727.5	9.9			
PC 31:2	716.5	9.2				PC 38:1e	802.7	9.3	SM 20:0	759.7	9.8			
PC 31:1	718.5	9.3				PC 38:7	804.5	9.3	SM 20:1	757.7	9.8			
PC 31:0	720.6	9.2				PC 38:6	806.5	9.5	SM 22:0	787.7	9.8			
PC 32:6	722.5	9.2				PC 38:5	808.6	9.5	SM 22:1	785.7	9.8			
PC 32:3	728.5	9.3				PC 38:4	810.6	9.4	SM 22:2	783.7	9.9			
PC 32:2	730.5	9.3				PC 38:3	812.7	9.4	SM 22:6	775.6	9.8			
PC 32:1	732.6	9.4				PC 38:2	814.7	9.4	SM 24:0	815.7	9.8			
PC 32:0	734.5	9.3				PC 39:8	816.6	9.3	SM 24:1	813.6	9.8			
PC 34:6e	736.5	9.3				PC 38:0	818.7	9.4	SM 24:2	811.7	9.9			
PC 34:5e	738.5	9.3				PC 40:6e	820.7	9.5	SM 24:6	803.7	9.8			
PC 34:4e	740.5	9.3				PC 40:5e	822.6	9.3	SM 24:7	801.6	9.8			
PC 34:3e	742.6	9.4				PC 39:4	824.7	9.3						

^a phospholipids.

^b retention time.

^c ether phospholipids contain plasmalogen and alkyl ether phospholipid.

^d dihydro sphingomyelin.

3-3-4. 血漿中リン脂質の抽出法の比較

また、従来の液液抽出法 (LLE) と比較するために、Bligh and Dyer 法³⁶を用いて血漿からリン脂質を抽出し SFC/MS/MS で分析し、血漿中に多く存在する PC, SM, LPC のエリア値を用いて抽出量の比較を行った。その結果、LLE より SFE で抽出を行った方が検出されたリン脂質のエリア値が大きかった (図 3-5)。また、リン脂質の抽出効率、LLE は SFE の 60% 程度であることがわかり、再現性に関しては、RSD が両抽出条件ともに 20% 以下であるが、リノール酸含有 PC では、LLE の方が再現性は高い結果となり、アラキドン酸含有 PC では SFE の方が再現性が高い結果となった (表 3-4)。超臨界流体抽出は、抽出媒体が疎水性である超臨界二酸化炭素であることから疎水性化合物に適しており、血漿中のリン脂質の抽出においても LLE より SFE の方がより抽出効率が高いことが示された。

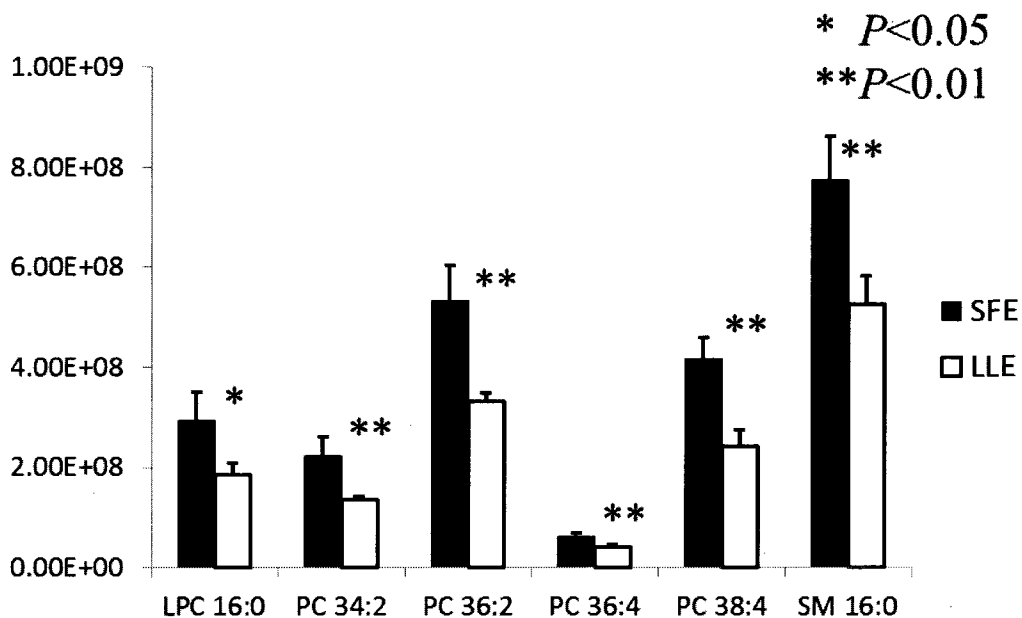


図 3-5. 抽出法(SFE(黒)とLLE(白))によるピーク面積の比較,

表 3-4. 血漿中リン脂質分析の抽出法検討結果

リン脂質	SFE		LLE		<i>P</i>	LLE/SFE (%)
	Area	RSD (%)	Area	RSD (%)		
LPC 16:0	2.94E+08	19.2	1.85E+08	13.0	0.037	62.9
PC 34:2	2.24E+08	16.1	1.36E+08	5.5	0.015	60.8
PC 36:2	5.33E+08	13.1	3.31E+08	5.2	0.008	62.1
PC 36:4	6.13E+07	12.4	3.95E+07	14.8	0.017	64.5
PC 38:4	4.16E+08	10.6	2.42E+08	13.8	0.006	58.3
SM 16:0	7.73E+08	11.5	5.25E+08	10.9	0.015	68.0

3-3-5. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いた酸化リン脂質標準品分析

次に、オンライン SFE-SFC/MS/MS システムを酸化リン脂質分析へ適用を試みた。PC HILIC カラムを用いてオンライン SFE-SFC/MS/MS システムで酸化リン脂質が抽出・分離できるかどうか検証を試みた。

2-2-2 と同様に調製を行った酸化リン脂質 5 μ L を DMC カードに染み込ませオンライン SFE-SFC/MS/MS に供した。PC や LPC の抽出分離が可能だったためリン脂質と同様の抽出分離条件を適用した。PC 極性基由来のフラグメントである m/z 184.1 をターゲットにしたトランジションと酸化物由来の水脱離フラグメントをターゲットにしたトランジション、過酸化物由来の過酸化水素脱離フラグメントをターゲットにしたトランジションを用いた MRM 分析を行った所、極性基由来のフラグメントのピークと同じ保持時間に酸化物、過酸化物由来のトランジションにおいてピークが検出できたことから、酸化 PC を検出することができた。また、酸化物、過酸化物をそれぞれ分離する事ができ、酸化 PLPC においては、保持時間 14.6, 17.5 分に酸化物が、保持時間 19.3 分に過酸化物が溶出した (図 3-6)。また、MS/MS 分析を行い酸化物の同定を行った所、14.6 分がヒドロキンド、17.5 分がエポキンドである事が明らかとなり、酸化修飾基による分離が確認できた。

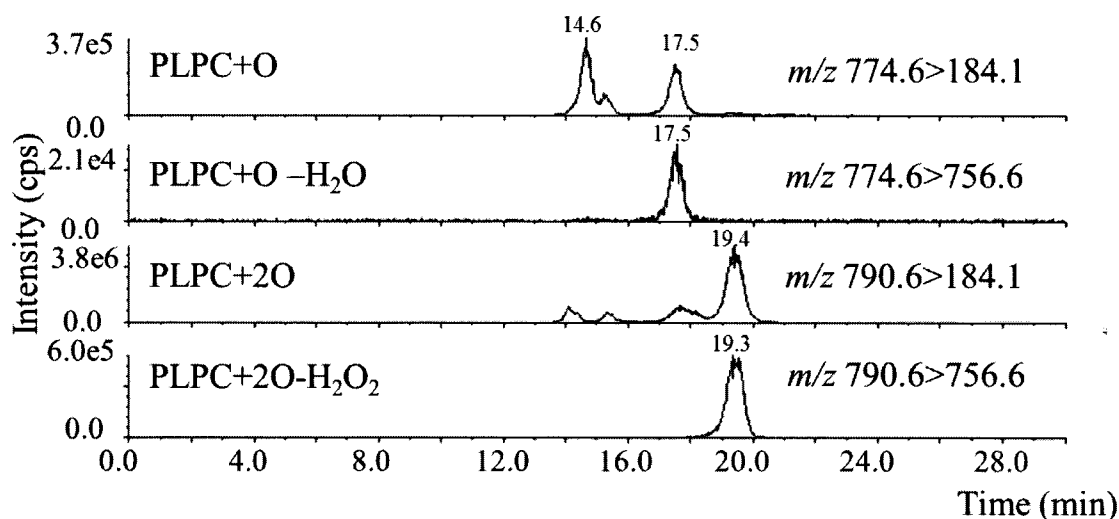


図 3-6. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いて酸化 PC 分析 MRM クロマトグラム

3-3-6. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いた血漿中酸化リン脂質分析

次に血漿中の酸化物が分析できるか検証を行った。血漿 10 μL をオンライン SFE-SFC/MS/MS システムに供し、分析を行った。酸化リン脂質標準品を分析した条件と同様に分析、解析した所、ヒドロキシド由来の水分子脱離フラグメントを検出することができなかったが、リン脂質由来の酸化物であるエポキシドと過酸化物を検出することが可能であった (図 3-7)。このことから血漿中から酸化リン脂質を抽出し、分離分析可能である事がわかり、生体サンプルの酸化リン脂質分析へオンライン SFE-SFC/MS/MS システムが適用可能である事が示された。

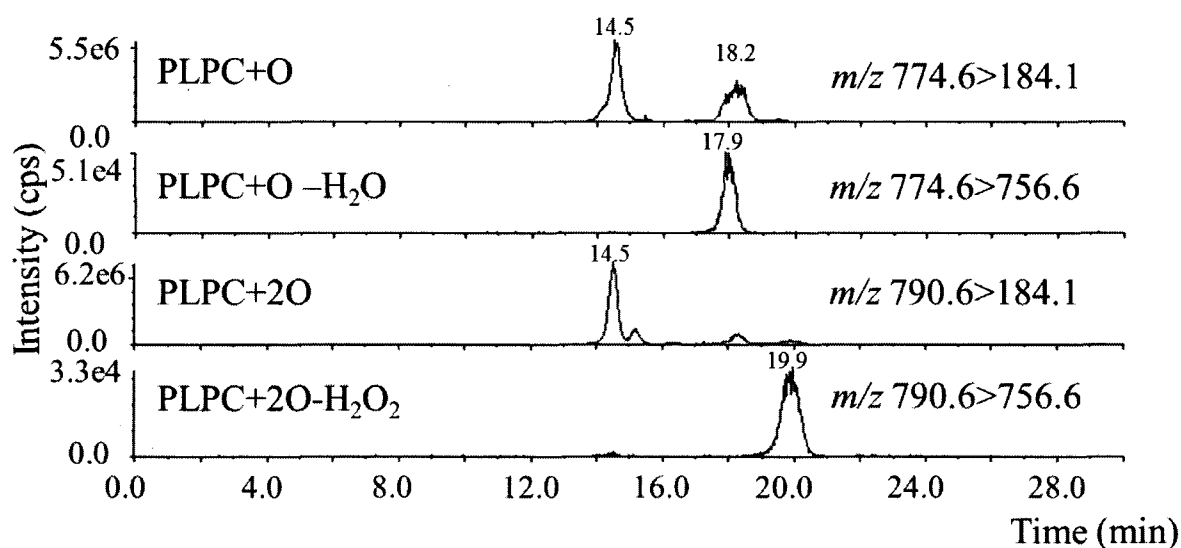


図 3-7. オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いた血漿中酸化 PC 分析 MRM クロマトグラム

3-3-7. 血漿中酸化リン脂質抽出法の比較

酸化リン脂質の抽出において、オンライン SFE と LLE を比較するために血漿中のリン脂質を液液抽出し、SFC/MS/MS に供し、抽出方法による違いを検証した。得られた酸化リン脂質の MRM クロマトグラムのピーク面積の比較を行った所、SFE の方が有意にピーク面積が大きいという結果となった (図 3-8)。リン脂質分析では、SFE の方が抽出効率がよく極性の比較的高いリゾリン脂質も抽出効率が高いという 3-3-3 の結果と同様に酸化リン脂質の抽出効率もよいことが考えられる。

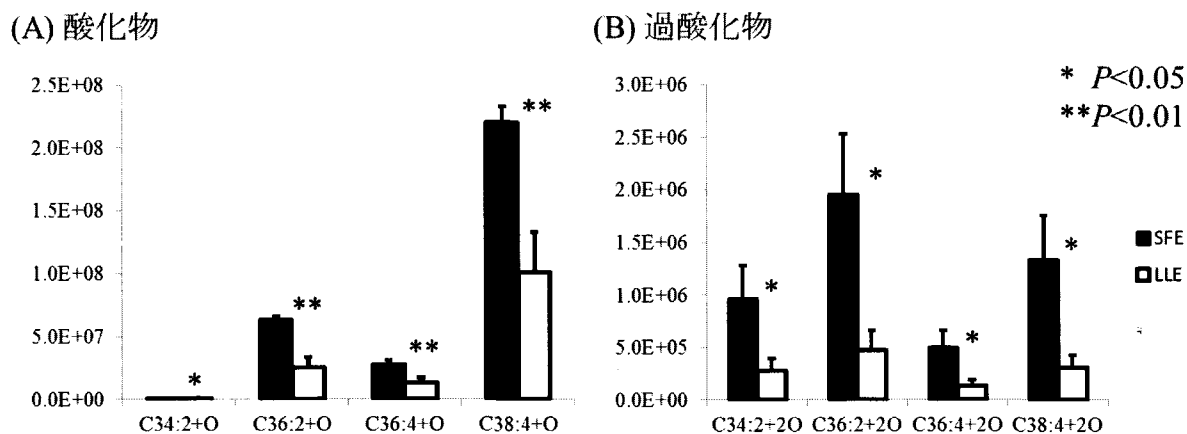


図 3-8. 血漿中酸化リン脂質抽出方法の比較

(A):酸化物, (B):過酸化物

また、酸化リン脂質の抽出の再現性は、酸化リン脂質分析のピーク面積の RSD が、SFE では 20%、LLE では 30%、過酸化リン脂質分析のピーク面積の RSD が、SFE では、30%程度 LLE では 40%程度となり、ともに SFE の方酸化リン脂質の抽出分析の再現性が高いという結果となった (表 3-5)。また、LLE を用いた場合、検出できたピーク面積の割合が SFE の 50%から 30%程度であり、リン脂質の抽出 (表 3-3) に比べて割合が減少していることから、液液抽出は、抽出効率が悪いだけでなく、酸化リン脂質が液液抽出の際に分解している可能性も示唆された。

表 3-5. 酸化リン脂質抽出法比較結果

酸化 PC	SFE		LLE		T test	Ratio
	Area	RSD (%)	Area	RSD (%)	<i>P</i>	LLE/SFE (%)
C34:2+O	1.03E+06	18.0	5.22E+05	34.4	0.027	50.8
C36:2+O	6.39E+07	4.3	2.53E+07	32.5	0.002	39.6
C36:4+O	2.75E+07	11.7	1.30E+07	32.9	0.009	47.3
C38:4+O	2.20E+08	5.9	1.02E+08	31.0	0.004	46.2
C34:2+2O	9.65E+05	32.9	2.78E+05	41.8	0.024	28.8
C36:2+2O	1.96E+06	29.2	4.71E+05	40.8	0.013	24.1
C36:4+2O	5.02E+05	33.1	1.35E+05	42.6	0.022	26.8
C38:4+2O	1.34E+06	31.2	3.12E+05	37.8	0.015	23.2

3-4. 考察

本章では、抽出セルを分離条件時に切り離すことやカラムの最適化、抽出条件の検討を行うことで、オンライン SFE-SFC/MS/MS 分析システムを構築し、リン脂質を用いたシステム検証と酸化リン脂質分析への適用を行った。また、生体サンプルにおいて水分を多く含む血漿を用いることで実用的に分析できるかどうか検証を試みた。

PC HILIC カラムを用いることで、血漿中のリン脂質をクラスごとに分離することができた。これまで、シリカカラムを用いた LC/MS⁶¹ やシアノカラムを用いた SFC/MS^{37,62} の分析系が報告されており、順相系のカラムを用いることでリン脂質のクラスごとの分離が可能であること示されているため、同様に順相系カラムである PC HILIC カラムを用いた場合でもリン脂質のクラスごとに分離できたと考えられる。シアノカラムを用いた SFC/MS では、モディファイヤー 20%ですべてのリン脂質が溶出していることから、オンライン SFE-SFC システムには用いることができないと考えられる。PC の極性基であるホスホリルコリンを修飾基とした PC HILIC が正電荷を有するためリン酸基を持つリン脂質の保持が強く、分離能が向上したと考えられる。

生体サンプル中のリン脂質分析に疎水性代謝物の抽出・分離分析に適したオンライン SFE-SFC/MS/MS を適用した所、マウス血漿 3 μ L からリン脂質を直接 5 min で抽出し、前処理を必要とせず抽出行程を含めて 20 分以内にリン脂質の分析が可能なハイスループットな分析系を構築した。超臨界流体は、浸透力の高い媒体であることから、抽出時において試料中化合物を短時間で抽出することができ、抽出分析の時間の短縮ができたと考えられる。また、水分を多く含む血漿を用いて再現性よく抽出分析でき、実的に分析できることが示された。超臨界流体二酸化炭素は、極性がヘキサン程度であり水と混ざらないが、極性溶媒であるメタノールを 10%添加していることによる移動相の極性の増加や流速が 3 mL/min であり、少量の水分を含んでいてもサンプルに対して大量の移動相を用いているため抽出量に影響がなかったと考えられる。

また、液液抽出法と比較して SFE を用いた方がリン脂質の抽出効率が高い事が示された。

SFE は、試料を超臨界流体中において抽出する Static 抽出と超臨界流体を試料に流し続ける Dynamic 抽出があり、Dynamic 抽出では、常に新しい抽出媒体が試料を流れている状態となるため、抽出された化合物が飽和することなく抽出を行うことができる。これまでに Dynamic 抽出を用いて単位時間おきに分取を行化合物の抽出効率の確認が行われている⁶³。本章で構築したオンライン SFE-SFC/MS/MS システムは Dynamic 抽出を用いており、抽出時に移動相の超臨界二酸化炭素が流れ続けるためサンプルから抽出された成分は飽和することなく抽出される。さらに抽出された成分は化合物の保持が強い分析カラムを用いることでカラム上にて濃縮される。そのためリン脂質の抽出において SFE の方が LLE より抽出効率が高いと考えられる。

本分析システムはオンライン SFE-SFC で抽出と分離を行い、共通の極性基を持つリン脂質の分離が可能となり、MS/MS スキャンを組み合わせることで、リン脂質を網羅的にかつ精密に解析することができることから、リン脂質プロファイリングに適した分析系であると考えられる。また、本システムは、生体サンプルとしてろ紙にアプライした血漿中のリン脂質分析が可能であったことから、近年、血液中のアシルカルニチンなどを分析することで新生児の疾患スクリーニング⁶⁴ のサンプリング方法として注目されている乾燥ろ紙血へ適用することで、新規バイオマーカー探索に応用できることが期待できる。

酸化リン脂質をオンライン SFE-SFC/MS/MS 分析で分析した所、酸化物、過酸化物を抽出、分離検出することができ、酸化リン脂質の分析に適用できることを示した。PC HILIC カラムは、正電荷を有するホスホリルコリン基を持つことから、酸化修飾基の違いを認識して分離ができたと考えられる。また、2 章で用いた 2-Ethylpyridine カラムもカラム単体の修飾基に正電荷を帯びた化合物を修飾していたことから、酸化リン脂質の分離分析には正電荷を有するカラムが有用であると考えられる。さらに、SFC を用いた分析ではカラムを連結することが可能であり、修飾基の異なるカラムを用いて酸化リン脂質の位置異性体の抽出分離に有効な分析系を構築できる可能性があると考えられる。

さらに、生体サンプルである血漿中の酸化リン脂質の分析を試みた所、酸化物、過酸化

物共に検出することができ、生体中酸化物を直接抽出分析する事が可能である事が示された。しかし、ヒドロキシドを検出することができなかった。この原因として PC との共溶出が考えられる。この問題点を解決するために、カラムの連結や粒子径の小さいカラムを使用することで、分離能を向上させることが考えられる。ただ、2 章でも述べたようにカラム圧力の増大が考えられるため、高圧で安定に送液が可能なポンプが必要となる。

また、抽出方法の比較においては、液液抽出と SFE を比較した結果、SFE を用いた方が酸化物をより多く検出できた。リン脂質の抽出効率が SFE の方が高いという結果から酸化リン脂質も抽出効率が低いことが考えられる。また、リン脂質抽出時と比較して再現性や抽出できる割合が低下していることから、液液抽出時に酸化リン脂質が分解している可能性が考えられた。

オンライン SFE-SFC/MS/MS システムは、リン脂質、酸化リン脂質分析において有効である事が示され、生体サンプルとして血液などの脂溶性代謝物を含む液体サンプルをハイスクルーブットに分析できることから、マルチマーカープロファイリングを用いた臨床診断や、特定疾患のバイオマーカー探索などに応用できる事が期待される。

第4章:総括

本論文では、超臨界流体技術として分離技術である SFC や抽出技術である SFE が酸化リン脂質分析に有効な技術である事を示した。

第 2 章では、SFC が酸化リン脂質分子種の分離に有効な技術であることを示した。

SFC はキラル化合物などの類似構造を有する化合物分離に用いられており、SFC を用いることでリノール酸、アラキドン酸を有する PC のヒドロキシドやエポキシドといった酸化物異性体や過酸化物といった構造類似体を一斉に分析が可能となった。また、MS/MS 分析により検出できた MS/MS フラグメント情報から酸化リン脂質の構造を推定することができた。エポキシドの位置異性体のクロマトグラフィーにおける分離が可能となり、様々な極性基や位置異性体を持つ酸化リン脂質をプロファイルできる分析系を構築することができたことから酸化に伴う酸化リン脂質変動をモニターするマルチマーカープロファイリングが可能となり、SFC の分離分析の有用性を示すことができた。

第 3 章では、抽出操作が不要であり、生体サンプルから直接抽出から分析まで行うことで試料調製における酸化や分解を回避できるオンライン SFE-SFC/MS/MS システムを構築し、生体中酸化リン脂質分析に有用であることを示した。システムの構築にあたり血漿中のリン脂質をターゲットに分析システムの検証を行った。抽出と分離の条件をカラムに合わせて設定することで、血漿中のリン脂質を効率よく抽出し、カラムの先端で濃縮することで感度よく分離分析が可能なハイスループット分析系を構築することができた。さらに、酸化リン脂質分析にオンライン SFE-SFC/MS/MS システムを適用した所、酸化リン脂質、過酸化リン脂質の抽出から分離分析が可能であり、生体中の酸化リン脂質を正確に分析可能な分析系の構築を行う事ができた。

低粘性という特徴を有する超臨界流体を移動相に用いた SFC は、LC と比べて、カラムにかかる圧力が小さいためカラムを複数接続する事が可能である。同一のカラムを接続しカラム長を長くすることによって分離能の向上することができるだけでなく、異なる修飾基を持つカラムを接続することで異なる分離モード接続することが可能であり、同時に分離できなかつ

たヒドロキンドやヒドロペルオキシンドの位置異性体といった酸化リン脂質の高解像度分離分析に適用できる可能性がある。ただ、装置の送液できる圧力も現状限界があるため、充填型カラム(4.6×250 mm, I.D.5 μm)を使用した場合、3本が上限となる。送液ポンプ自身の開発が必要になる。

リポキシゲナーゼは多価不飽和脂肪酸を酸化する酵素であり、様々な種が存在し、それぞれ酸化する部位に偏りがあり、起源、組織によって活性、基質特異性、安定性などが異なっている。また、動脈硬化症やがんなどの疾患と関連がある事がわかっているが、どのような分子種が関わっているかほとんどわかっていない。本研究で構築した酸化リン脂質の分析系を適用することでリポキシゲナーゼの反応によってどのような分子種が生成しているかわかり、その結果疾患と関係のある代謝物の同定に貢献できる可能性がある。

また、酸化リン脂質は不飽和脂肪酸が酸化されることで生成するため生体内に存在する多価不飽和脂肪酸エステルを有する化合物はどの分子種も酸化される可能性があり、本研究で示したホスファチジルコリンの酸化物だけでなく、その他の極性基を有するリン脂質(ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロールやホスファチジリンイノシトール)の酸化物が存在すると考えられる。これらの分子種に対して本研究と同様の分離分析を検討することで、SFC の分離能の高さを有効に使いその他の酸化リン脂質へ応用し、より網羅性の高い酸化リン脂質分析へ発展できることが期待できる。

超臨界流体技術は抽出効率や分離能の高さを活かした化合物の抽出、分離だけでなく、移動相が化学的に不活性な二酸化炭素であり、さらに常温常圧で気体であることから分取精製にも適した手法である。既存の技術で分離できなかった酸化リン脂質の分離、精製に応用できることが期待でき、個々の化合物の NMR 分析による構造解析やスケールアップすることで酸化リン脂質の単品を精製し、その生理活性を調べることで生理学的研究に応用できると考えられる。また、分取のシステムとしてオンライン SFE-SFC システムを用いることで、暗黒無酸素条件で抽出分離ができるため酸化や分解を受けやすい化合物の抽出・分離・精

製に応用できると考えられる。

その他にも、これまでオンライン SFE を用いた揮発性成分の分析が行われてきたことから⁶⁵⁻⁶⁷、オンライン SFE-SFC は、暗黒無酸素で酸化や分解など不安定な化合物の分析が可能であるだけでなく、揮発性化合物の分析にも適用できることが期待できる。これまで、酸化ストレスによって生成する酸化脂質関連代謝物として 4-ヒドロキシ-2-ノネナールや 4-ヒドロキシ-2-ヘキセナールといったアルデヒド類が酸化ストレスマーカーとして注目されていることや、アルデヒドであるためタンパク質中のアミノ酸(システインのチオール基、ヒスチジンのイミダゾール基、リジンのアミノ基)⁶⁸、DNA(グアニン、アデニン、シトシン)⁶⁹ やリン脂質(PE のアミン基、PS のセリン基)^{70,71} に反応する事がわかっている。アルデヒド類は、揮発性であるため分析に SPME などの吸着担体を用いる必要があり定量性、再現性に課題があるが、オンライン SFE-SFC/MS/MS を用いることで抽出から分析まで 1 工程で行うことでその問題を解決できる可能性があり、さらに、酸化ストレスのマーカー分析やこれまで発見できていない不安定な揮発性酸化関連代謝物の分析が期待できる。

ただ、オンライン SFE-SFC システムは、サンプルを一度に 5 つまでしかセットできない実用化に向けては、より多くのサンプルを分析する技術が必要となる。そのためにサンプルの交換が可能であることや抽出条件となる温度の管理が可能なオートサンプラーの装置が必要となる。このように装置開発としては、まだ、発展途上であるため今後の分析装置の発展に期待できる。

さらに、SFC の応用例として GC や LC を用いて別々に分析される水溶性から疎水性といった極性の異なる様々な農薬を SFC で一度に分析が可能である事が示されたことから⁷²、SFC の応用技術開発が進んでいる事がわかる。さらに、本研究で構築したオンライン SFE-SFC のシステムと組み合わせることで農薬をサンプルから直接抽出分離分析が可能となる可能性があり、農薬分析のスループットの向上に貢献できる事が期待できる。

酸化リン脂質の分析系を構築できたことや血漿といった臨床診断に用いられているサンプルに適応できたことから、動脈硬化症やがん、糖尿病などといった酸化ストレスを伴う生活

習慣病のバイオマーカー探索に利用できる可能性があり、動脈硬化症などの進行に伴う代謝物変動を解析することでマルチマーカープロファイリングを用いた疾患の診断へ血液サンプルの実用的応用が期待できる。

今後、本研究で検討した技術は抽出や分離の分野において酸化リン脂質分析が発展していくための重要な基盤技術であり、酸化リン脂質分析を通して生体中の酸化物の代謝物量を分析しバイオマーカー探索や酸化メカニズムの解明に役立つことが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科、福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文作成にあたり有益なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科、渡邊肇教授、村中俊哉教授に心から厚く感謝申し上げます。

また、博士前期過程からの 5 年間、懇切なるご指導を賜り、日頃から貴重なご助言と叱咤激励の言葉を頂きました大阪大学工学研究科、馬場健史准教授に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、日頃より貴重なご助言を頂きました大阪大学大学院工学研究科、小野比佐好助教に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、有益なご助言を頂きました神戸大学医学研究科、和泉自泰助教、松原惇起研究員に深く感謝致します。

本研究で使用したマウス肝臓サンプルの提供と有益なご助言を頂きました神戸大学医学研究科、吉田優准教授、西海信研究員に深い感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、多大なる協力を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物資源工学領域、超臨界流体グループ、李載元修士、角田省二修士、石橋愛実学士、三田穂高学士、山田貴之学士および生物資源工学領域、諸先輩方、研究員方、学生諸氏、事務の方々に心から感謝の意を表します。

最後にこれまで常に支え続けてくれた家族、友人無くして本研究は成し得なかったことを付記致します。

引用文献

1. Albi, E. & Viola Magni, M. P. "The role of intranuclear lipids." *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **96**, 657–67, (2004)
2. Funk, C. D. "Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology." *Science* **294**, 1871–1875, (2001)
3. Yang, K., Cheng, H., Gross, R. W. & Han, X. "Automated lipid identification and quantification by multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics." *Analytical chemistry* **81**, 4356–68, (2009)
4. Han, X., Yang, K. & Gross, R. W. "Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses." *Mass spectrometry reviews* **31**, 134–78, (2012)
5. Han, X. & Gross, R. W. "Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples." *Mass spectrometry reviews* **24**, 367–412, (2005)
6. Sparvero, L. J. et al. "Mass-spectrometry based oxidative lipidomics and lipid imaging: applications in traumatic brain injury." *Journal of neurochemistry* **115**, 1322–36, (2010)
7. Schiller, J. et al. "MALDI-TOF MS in lipidomics." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **12**, 2568–79, (2007)
8. Sandra, K., Pereira, A. D. S., Vanhoenacker, G., David, F. & Sandra, P. "Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Journal of chromatography. A* **1217**, 4087–99, (2010)
9. Taguchi, R. et al. "Focused lipidomics by tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* **823**, 26–36, (2005)
10. Xia, Y.-Q. & Jemal, M. "Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution

and the association of phos.” *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **23**, 2125–38, (2009)

11. Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T. & Fukusaki, E. “Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling.” *Journal of bioscience and bioengineering* **113**, 751–8, (2012)
12. Pongsuwan, W. et al. “Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting.” *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 231–6, (2007)
13. Nishiumi, S. et al. “A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer.” *PloS one* **7**, e40459, (2012)
14. Thomas, A. et al. “High-throughput phospholipidic fingerprinting by online desorption of dried spots and quadrupole-linear ion trap mass spectrometry: evaluation of atherosclerosis biomarkers in mouse plasma.” *Analytical chemistry* **82**, 6687–94, (2010)
15. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. & Noguchi, N. “Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects.” *Biochemical and biophysical research communications* **338**, 668–76, (2005)
16. Miyazawa, T., Suzuki, T., Fujimoto, K. & Kinoshita, M. “Age-related change of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide levels in normal human red blood cells.” *Mechanisms of ageing and development* **86**, 145–50, (1996)
17. Adachi, J. et al. “Plasma phosphatidylcholine hydroperoxide as a new marker of oxidative stress in alcoholic patients.” *Journal of lipid research* **45**, 967–71, (2004)
18. Nagashima, T. et al. “Increase of serum phosphatidylcholine hydroperoxide dependent on glycemic control in type 2 diabetic patients.” *Diabetes research and clinical practice* **56**, 19–25, (2002)
19. Hammad, L. A. et al. “Elevated levels of hydroxylated phosphocholine lipids in the blood serum of breast cancer patients.” *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **23**, 863–76, (2009)

20. Nakanishi, H., Iida, Y., Shimizu, T. & Taguchi, R. "Analysis of oxidized phosphatidylcholines as markers for oxidative stress, using multiple reaction monitoring with theoretically expanded data sets with reversed-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry." *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **877**, 1366–74, (2009)
21. Spector, A. a, Fang, X., Snyder, G. D. & Weintraub, N. L. "Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function." *Progress in Lipid Research* **43**, 55–90, (2004)
22. Reis, A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J. V. & Domingues, M. R. M. "Fragmentation study of short-chain products derived from oxidation of diacylphosphatidylcholines by electrospray tandem mass spectrometry: identification of novel short-chain products." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 2849–2858, (2004)
23. Ji, J. A., Zhang, B., Cheng, W. & Wang, Y. J. "Methionine, tryptophan, and histidine oxidation in a model protein, PTH: Mechanisms and stabilization." *Journal of Pharmaceutical Sciences* **98**, 4485–4500, (2009)
24. Rindgen, D., Nakajima, M., Wehrli, S., Xu, K. & Blair, I. A. "Covalent Modifications to 2'-Deoxyguanosine by 4-Oxo-2-nonenal, a Novel Product of Lipid Peroxidation." *Chemical Research in Toxicology* **12**, 1195–1204, (1999)
25. Podrez, E. a et al. "Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype." *Nature medicine* **13**, 1086–95, (2007)
26. Podrez, E. A. et al. "A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions." *The Journal of biological chemistry* **277**, 38517–23, (2002)
27. Podrez, E. a et al. "Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36." *The Journal of biological chemistry* **277**, 38503–16, (2002)
28. Kikugawa, K., Kojima, T., Yamaki, S. & Kosugi, H. "Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid." *Analytical biochemistry* **202**, 249–55, (1992)

29. Colas, R. et al. "Increased lipid peroxidation in LDL from type-2 diabetic patients." *Lipids* **45**, 723–31, (2010)
30. Do, G.-M. et al. "Long-term adaptation of global transcription and metabolism in the liver of high-fat diet-fed C57BL/6J mice." *Molecular nutrition & food research* **55 Suppl 2**, S173–85, (2011)
31. Miyazawa, T., Saeki, R. & Inaba, H. "Detection of chemiluminescence in lipid peroxidation of biological systems and its application to HPLC." *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* **4**, 475–8, (1989)
32. O'Donnell, V. B. "Mass spectrometry analysis of oxidized phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine." *Biochimica et biophysica acta* **1811**, 818–26, (2011)
33. Reis, A., Domingues, M. R. M. & Domingues, P. "Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids." *Chemistry and Physics of Lipids* **156**, 1–12, (2008)
34. Reis, A., Domingues, M. R. M., Amado, F. M. L., Ferrer-Correia, A. J. & Domingues, P. "Radical peroxidation of palmitoyl-linoleoyl-glycerophosphocholine liposomes: Identification of long-chain oxidised products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **855**, 186–99, (2007)
35. FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. H. "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *The Journal of biological chemistry* **226**, 497–509, (1957)
36. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. "A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911–17, (1959)
37. Bamba, T. et al. "High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics." *Journal of bioscience and bioengineering* **105**, 460–9, (2008)
38. Lee, J. W. et al. "Development of a polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry." *Journal of separation science* **34**, 3553–60, (2011)

39. Wada, Y. et al. "Metabolic profiling of β -cryptoxanthin and its fatty acid esters by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry." *Journal of separation science* **34**, 3546–52, (2011)
40. Matsubara, A., Bamba, T., Ishida, H., Fukusaki, E. & Hirata, K. "Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry." *Journal of separation science* **32**, 1459–64, (2009)
41. Maftouh, M. et al. "Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals." *Journal of Chromatography A* **1088**, 67–81, (2005)
42. Mangelings, D. & Heyden, Y. Vander "Chiral separations in sub- and supercritical fluid chromatography." *Journal of Separation Science* **31**, 1252–1273, (2008)
43. Ríos, A., Zougagh, M. & De Andrés, F. "Bioanalytical applications using supercritical fluid techniques." *Bioanalysis* **2**, 9–25, (2010)
44. Pourmortazavi, S. M. & Hajimirsadeghi, S. S. "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis." *Journal of chromatography. A* **1163**, 2–24, (2007)
45. Rahimi, E., Prado, J. M., Zahedi, G. & Meireles, M. a. a. "Chamomile extraction with supercritical carbon dioxide: Mathematical modeling and optimization." *The Journal of Supercritical Fluids* **56**, 80–88, (2011)
46. Boutin, O. et al. "Experimental and modelling of supercritical oil extraction from rapeseeds and sunflower seeds." *Chemical Engineering Research and Design* **89**, 2477–2484, (2011)
47. Mendiola, J. a, Herrero, M., Cifuentes, A. & Ibañez, E. "Use of compressed fluids for sample preparation: food applications." *Journal of chromatography. A* **1152**, 234–46, (2007)
48. Spence, A. J., Jimenez-Flores, R., Qian, M. & Goddik, L. "Phospholipid enrichment in sweet and whey cream buttermilk powders using supercritical fluid extraction." *Journal of dairy science* **92**, 2373–81, (2009)
49. Matsubara, A., Harada, K., Hirata, K., Fukusaki, E. & Bamba, T. "High-accuracy analysis system for the redox status of coenzyme Q10 by online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry." *Journal of chromatography. A* **1250**, 76–9, (2012)

50. Iwahashi, H., Hirai, T. & Kumamoto, K. "High performance liquid chromatography/electron spin resonance/mass spectrometry analyses of radicals formed in an anaerobic reaction of 9- (or 13-) hydroperoxide octadecadienoic acids with ferrous ions." *Journal of chromatography. A* **1132**, 67–75, (2006)
51. Khaselev, N. & Murphy, R. C. "Structural characterization of oxidized phospholipid products derived from arachidonate-containing plasmenyl glycerophosphocholine." *Journal of lipid research* **41**, 564–72, (2000)
52. Karara, a, Dishman, E., Falck, J. R. & Capdevila, J. H. "Endogenous epoxyeicosatrienoyl-phospholipids. A novel class of cellular glycerolipids containing epoxidized arachidonate moieties." *The Journal of biological chemistry* **266**, 7561–9, (1991)
53. Nakamura, T., Bratton, D. L. & Murphy, R. C. "Analysis of epoxyeicosatrienoic and monohydroxyeicosatetraenoic acids esterified to phospholipids in human red blood cells by electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of mass spectrometry : JMS* **32**, 888–96, (1997)
54. Adachi, J. et al. "Determination of phosphatidylcholine monohydroperoxides using quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **806**, 41–6, (2004)
55. Domingues, M. R. M., Simões, C., Da Costa, J. P., Reis, A. & Domingues, P. "Identification of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylethanolamine modifications under oxidative stress conditions by LC-MS/MS." *Biomedical chromatography : BMC* **23**, 588–601, (2009)
56. Morgan, A. H. et al. "Quantitative assays for esterified oxylipins generated by immune cells." *Nature protocols* **5**, 1919–31, (2010)
57. Giuffrida, F., Destailats, F., Skibsted, L. H. & Dionisi, F. "Structural analysis of hydroperoxy- and epoxy-triacylglycerols by liquid chromatography mass spectrometry." *Chemistry and physics of lipids* **131**, 41–9, (2004)
58. Quehenberger, O. et al. "Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma." *Journal of lipid research* **51**, 3299–305, (2010)

59. Sato, K. et al. "Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapid quantitative method for capsaicinoids in placentas of *Capsicum*." *Journal of agricultural and food chemistry* **47**, 4665–8, (1999)
60. Ibanez, E., Palacios, J. & Reglero, G. "Analysis of tocopherols by on-line coupling supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography." *Journal of Microcolumn Separations* **11**, 605–611, (1999)
61. Schwalbe-Herrmann, M., Willmann, J. & Leibfritz, D. "Separation of phospholipid classes by hydrophilic interaction chromatography detected by electrospray ionization mass spectrometry." *Journal of chromatography. A* **1217**, 5179–83, (2010)
62. Yip, H. S. H., Ashraf-Khorassani, M. & Taylor, L. T. "Feasibility of Phospholipids Separation by Packed Column SFC with Mass Spectrometric and Light Scattering Detection." *Chromatographia* **65**, 655–665, (2007)
63. Abd El-Aty, a M. et al. "Approaches for application of sub and supercritical fluid extraction for quantification of orbifloxacin from plasma and milk: application to disposition kinetics." *Analytica chimica acta* **631**, 108–15, (2009)
64. Chace, D. H. "Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns." *Clinical Chemistry* **49**, 1797–1817, (2003)
65. Snyder, J. M. & King, J. W. "Oilseed Volatile Analysis by Supercritical Desorption Methods Fluid and Therma I." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **71**, 261–265, (1994)
66. Leunissen, M., Davidson, V. J. & Kakuda, Y. "Analysis of Volatile Flavor Components in Roasted Peanuts Using Supercritical Fluid Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 2694–2699, (1996)
67. Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. "Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications." *Journal of chromatography. A* **1217**, 2495–511, (2010)
68. Uchida, K. "4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress." *Progress in Lipid Research* **42**, 318–343, (2003)

69. West, J. D. & Marnett, L. J. "Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death." *Chemical research in toxicology* **19**, 173–94, (2006)
70. Guo, L., Chen, Z., Amarnath, V. & Davies, S. S. "Identification of novel bioactive aldehyde-modified phosphatidylethanolamines formed by lipid peroxidation." *Free radical biology & medicine* **53**, 1226–38, (2012)
71. Esterbauer, H., Koller, E., Snee, R. G. & Koster, J. F. "Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids." *The Biochemical journal* **239**, 405–9, (1986)
72. Ishibashi, M. et al. "High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1266**, 143–148, (2012)

発表論文

本学位論文に関与する論文

- 1) Uchikata, T., Matsubara, A., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E., Bamba, T.,
“Development of oxidized phosphatidylcholine isomer profiling method using
supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry.” *Journal of
chromatography A* **1250**, 205-11 (2012)
- 2) Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E., Bamba, T., “High-throughput phospholi
pid profiling system based on supercritical fluid extraction-supercritical fluid chro
matography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis.” *Journal of chromat
ography A* **1250**, 69-75 (2012)

その他の原著論文

- 1) Hori, K., Matsubara, A., Uchikata, T., Tsumura, K., Fukusaki, E., Bamba, T.,
“High-throughput and sensitive analysis of 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acid
esters in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry”
Journal of chromatography A **1250**, 99-104 (2012)
- 2) Ishibashi, M., Ando, T., Sakai, M., Matsubara, A., Uchikata, T., Fukusaki, E., Bamba, T.,
“High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid
chromatography/tandem mass spectrometry” *Journal of chromatography A* **1266**, 143-8
(2012)
- 3) Matsubara, A., Uchikata, T., Shinohara, M., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E.,
Bamba, T., “Highly sensitive and rapid profiling method for carotenoids and their
epoxidized products using supercritical fluid chromatography coupled with electrospray

ionization- triple quadrupole mass spectrometry”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **113**,2-787 (2012)

- 4) Lee, J.W., Uchikata, T., Matsubara, A., Nakamura, T., Fukusaki, E., Bamba, T., “Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to lipid profiling of soybean”, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **113**, 262-8 (2011)
- 5) Lee, J.W., Yamamoto, T., Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E., Bamba, T., “Development of a polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry”, *Journal of Separation Science* **34**, 3553-60 (2011)
- 6) Wada, Y., Matsubara, A., Uchikata, T., Iwasaki, Y., Morimoto, S., Kan, K., Okura, T., Fukusaki, E., Bamba, T., “Metabolic profiling of b-cryptoxanthin and its fatty acid esters by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry”, *Journal of Separation Science* **34**, 3546-52 (2011)

総説等

- 1) 内方崇人, 松原惇起, 福崎英一郎, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いたメタボリックプロファイリングの食品科学への応用, *生物工学会誌*, **89**, 602-5 (2011)

学会発表

(国際会議)

- 1) Yamada, T., Uchikata, T., Sakamoto, S., Yokoi, Y, Fukusaki, E., ○Bamba, T.,
“Development of a high-throughput lipid profiling method by using a quadrupole orbitrap mass spectrometer and an automated lipid identification software”, *SFC2012*, Oct 2012
- 2) ○Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E., Bamba, T., “High-throughput lipid profiling system for dried plasma spots by using online-supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry” *The 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2012)*, Kyoto, Sep 2012
- 3) ○Yamada, T., Uchikata, T., Sakamoto, S., Yokoi, Y, Fukusaki, E., Bamba, T.,
"Development of a high-throughput lipid profiling method by using a quadrupole orbitrap mass spectrometer and an automated lipid identification software" *The 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2012)*, Kyoto, Sep 2012
- 4) Yamada, T., Uchikata, T., Sakamoto, S., Yokoi, Y, Fukusaki, E., ○Bamba, T.,
"Higher-efficiency lipid profiling system using a quadrupole orbitrap mass spectrometer and an automated search engine Lipid Search", *60th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, May 2012
- 5) ○Bamba, T., Lee, J.W., Takashi Yamamoto, Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E.,
"Development of polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry", *SFC2011*, Jul, 2011

本発表は SFC2011 Best Poster Award を受賞した

- 6) ○Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Masakazu Shinohara, Masaru Yoshida, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba "Construction of Metabolic Profiling Method for Carotenoid Oxidation Products using Supercritical Fluid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry", *SFC2011*, Jul, 2011,
- 7) ○Yusuke Wada, Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Yugo Iwasaki, Satoshi Morimoto, Katsuta Kan, Tetsuya Ookura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, "Metabolic profiling of b-cryptoxanthin and its fatty acid esters by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry", *Metabolomics 2011, 7th International Conference of the Metabolomics Society*, June 2011,
- 8) ○Takeshi Bamba Takashi Yamamoto, Jae Won Lee, Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki, "Development of polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry", *59th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, June 2011
- 9) ○Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Masakazu Shinohara, Masaru Yoshida, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, "Development of metabolic profiling method for carotenoid oxidation products using supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry", *59th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, June 2011
- 10) ○Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Shin Nishiumi, Masakazushinohara, Masaru Yoshida, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, "Development of oxidized phosphatidylcholines profiling method by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry", *59th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, June 2011

- 11) ○Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Takuji Nakamura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, “Lipid Profiling of Soybean by Using Supercritical Fluid Chromatography/mass spectrometry.”, *4th Korea-Japan Workshop on Combinatorial Bioengineering*, Seoul, Korea, Nov 2008

(国内学会)

- 1) ○内方 崇人, 松原 惇起, 西海 信, 吉田 優, 福崎 英一郎, 馬場 健史
“超流体クロマトグラフィー / 質量分析を用いた酸化リン脂質異性体分析系の構築”
第64 会生物工学会, 神戸, 2012 年 10 月
- 2) ○三田 穂高, 内方 崇人, 西海 信, 吉田 優, 福崎 英一郎, 馬場 健史
“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた赤血球脂質プロファイリング”
第64 会生物工学会, 神戸, 2012 年 10 月
- 3) ○石橋 愛実, 安藤 孝, 酒井 美穂, 松原 惇起, 内方 崇人, 福崎 英一郎,
“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた残留農薬迅速一斉分析方法の開発”
第64 会生物工学会, 神戸, 2012 年 10 月
- 4) ○山田 貴之, 内方 崇人, 横井 靖人, 福崎 英一郎, 馬場 健史
“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いたハイスループット脂質メタボロミクスシステムの開発”
第64 会生物工学会, 神戸, 2012 年 10 月
- 5) ○山田 貴之, 内方 崇人, 横井 靖人, 福崎 英一郎, 馬場 健史

“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いたハイスループット脂質メタボロミクスシステムの開発”

第7回メタボロームシンポジウム, 鶴岡, 2012年10月

- 6) ○石橋 愛実, 松原 惇起, 内方 崇人, 酒井 美穂, 安藤 孝, 福崎 英一郎, 馬場 健史
”超臨界流体クロマトグラフィータンデム質量分析を用いた単一観測システムによる残留農薬迅速一斉分析方法の開発”

日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都, 2012 年 3 月

- 7) ○松原惇起, 内方崇人, 篠原正和, 安田知行, 石田達郎, 西海信, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史

“超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析による カロテノイド酸化生成物プロファイリングシステムの構築”

第6回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2011年10月

- 8) ○内方崇人, 松原惇起, 西海信, 篠原正和, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史

“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた 酸化ホスファチジルコリン異性体の解析”

第6回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2011年10月

- 9) ○Lee Jae Won, 山本 隆士, 内方 崇人, 松原 惇起, 福崎 英一郎, 馬場 健史

“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた極性脂質プロファイリング法の開発”

第6回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2011年10月

- 10) ○和田雄介, 松原敦起, 内方崇人, 岩崎雄吾, 森本聡, 菅剋太, 大倉哲也, 福崎英一郎, 馬場健史

“超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析を用いた β -クリプトキサンチン脂肪酸エステル分析技術の開発”

第6回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2011年10月

- 11) ○松原惇起, 内方崇人, 篠原正和, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史

“超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析によるカロテノイド誘導体プロファイリングシステムの開発”

第59回質量分析総合討論会, 大阪, 2011年9月

- 12) ○内方崇人, 松原惇起, 西海信, 篠原正和, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史

“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた酸化ホスファチジルコリン異性体分析系の構築”

第59回質量分析総合討論会, 大阪, 2011年9月

- 13) ○Lee Jae Won, Yamamoto, T., Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E., Bamba, T.,

“Development of a polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry”

第59回質量分析総合討論会, 大阪, 2011年9月

- 14) ○馬場 健史, Lee Jae Won, 内方 崇人, 松原 惇起, 中村 卓司, 福崎 英一郎

“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析による脂質プロファイリング”

日本農芸化学会2010年度大会, 東京, 2010年3月

- 15) ○Lee Jae Won, Uchikata, T., Matsubara, A., Nakamura, T., Fukusaki, E., Bamba, T.,

“Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry (SFC/MS) to lipid

profiling of soybean"

第61回日本生物工学会大会, 名古屋, 2009年9月

16) ○内方崇人, 松原惇起, 中村卓司, 福崎英一郎, 馬場 健史

“超臨界クロマトグラフィー/質量分析を用いた大豆の脂質プロファイリング”

日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡, 2009 年 3 月

17) ○馬場健史, 李載元, 内方崇人, 松原惇起, 中村卓司, 福崎英一郎

“超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析による脂質プロファイリング”

日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡, 2009 年 3 月

