

エイコサペンタエン酸(EPA)代謝物の分取LCによる分離 Separation of EPA metabolites using preparative LC system

EPAは魚類や植物など天然に豊富に存在している脂肪酸であり、薬理活性が高いことが知られています。また、EPAの代謝物も様々な機能を有しており、それぞれの代謝物を正確に測定することは重要です。今回は構造の類似したレゾルビンE₄(RvE₄)及びロイコトリエンB₅(LTB₅)を分離する分析メソッドを検討し、分取LCスケールでの目的物の単離を目指しました。

Key words : エイコサペンタエン酸、EPA、分取精製、レゾルビン、ロイコトリエン
Column : USP category: L1

[Analytical conditions]

Column : L-column2 ODS (C18, 5 μm, 12 nm); 4.6 mm I.D. × 250 mm L.; Cat. No. 722080
Eluent : A: Acetonitrile or Methanol or IPA※/Acetonitrile (50/50, v/v) ; B: 0.1% Formic acid solution
Flow rate : 1 mL/min
Detection : 281 nm
Injection volume : 2 μL
System : Agilent 1260 Infinity II LC
Sample : EPA metabolites fraction (RvE₄, LTB₅)

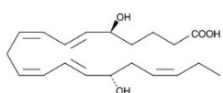
※IPA : Isopropyl alcohol

■ 試料

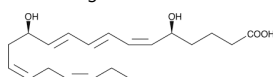
試料はEPAを肥満細胞に添加後、24時間培養し、培養液上清を溶媒抽出して粗精製したものを使用しました。

代表成分

RvE₄ Mw : 334.456

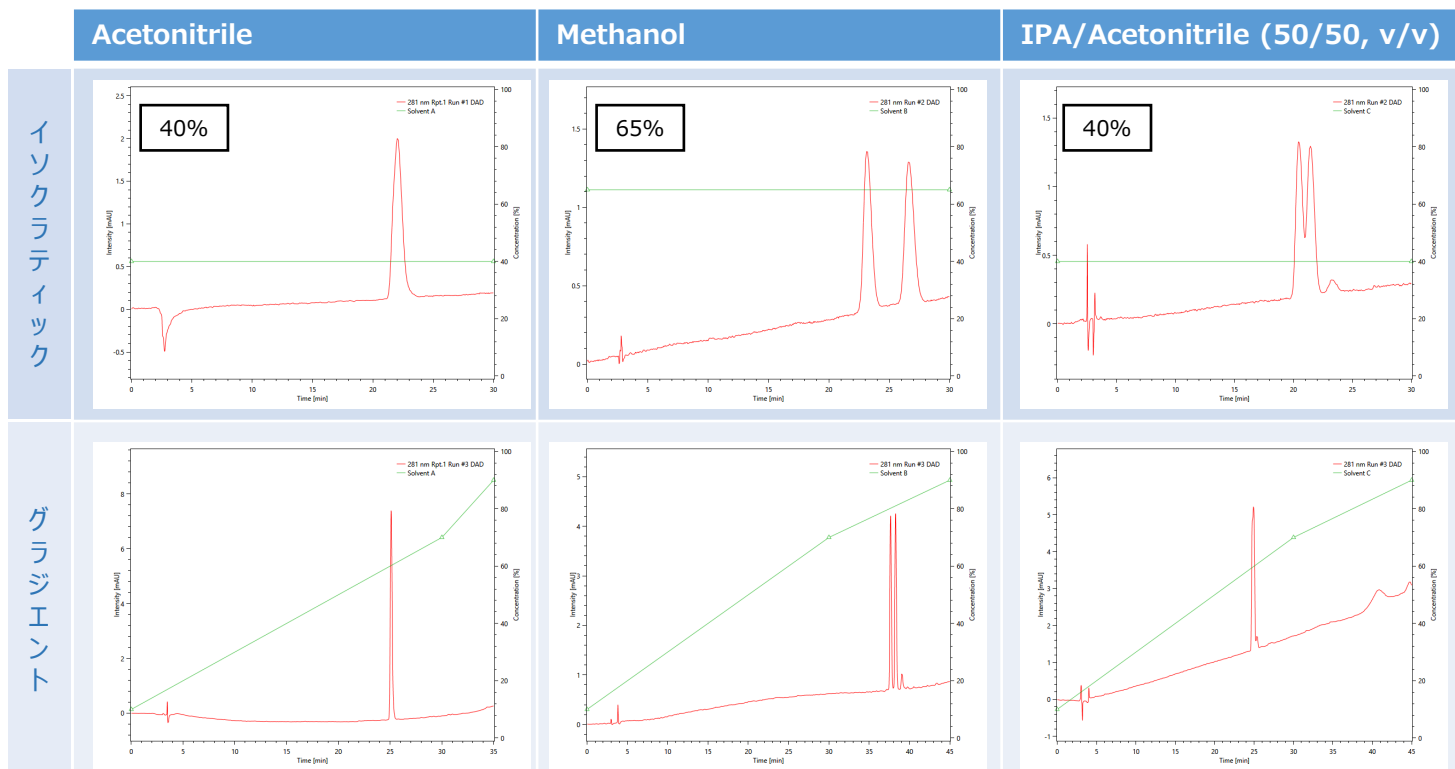


LTB₅ Mw : 334.456



■ メソッドスクーティング

水系溶離液とカラムを固定し有機溶媒と溶離条件を網羅的に検討しました。その結果メタノールで最も分離が良好でした。



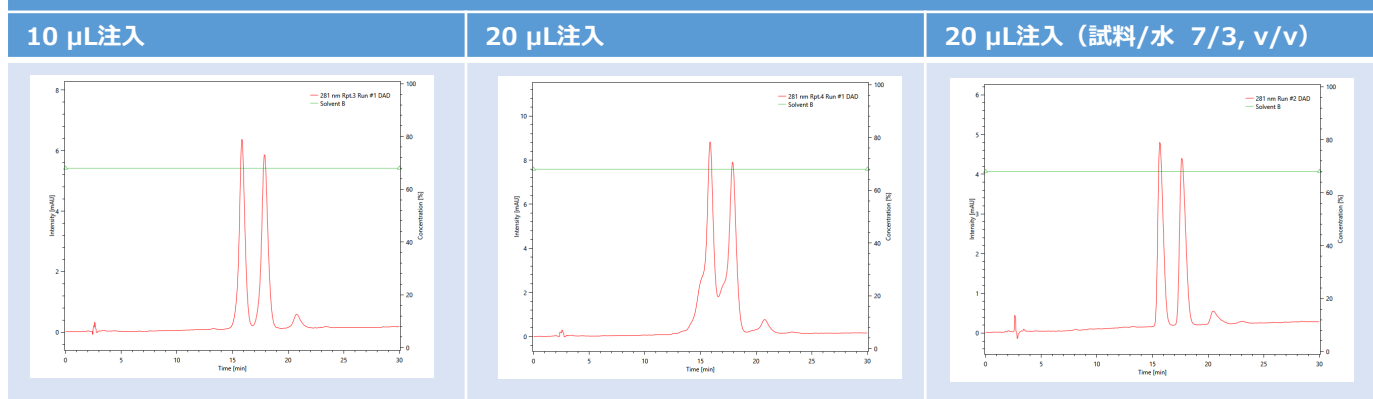
■ 分析条件の最適化及びスケールアップの検討

スカウティングの結果より、メタノールのイソクラティック溶離により分析条件の最適化を行いました。この条件から注入量を20 μ Lに増加しスケールアップの確認をしたところ、ピーク形状が崩れてしまいました。これは、試料溶媒が溶離液として作用するため試料の一部が試料溶媒と一緒に溶出してリーディングしたものと考えられます。析出のない範囲で水を加えるとピーク形状が改善します。

[Analytical conditions]

Column : L-column2 ODS (C18, 5 μ m, 12 nm); 4.6 mm I.D. \times 250 mm L.; Cat. No. 722080
 Eluent : A: Methanol; B:0.1% Formic acid solution
 A/B: 68/32
 Flow rate : 1 mL/min
 Detection : 281 nm
 Injection volume : 10 μ L, 20 μ L
 System : Agilent 1260 Infinity II LC
 Sample : EPA metabolites fraction (RvE₄, LTB₅)

最適化メソッド

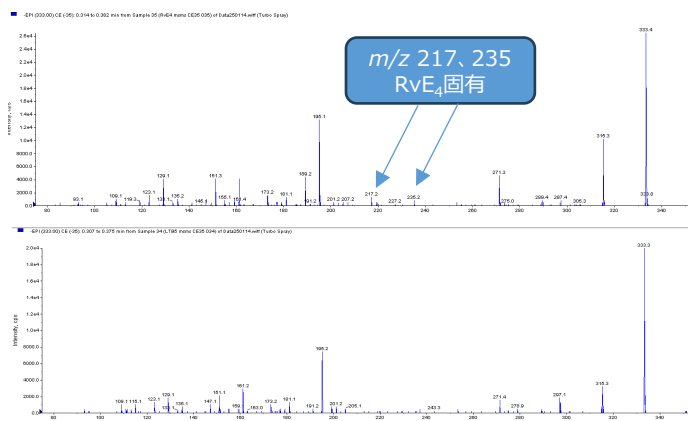
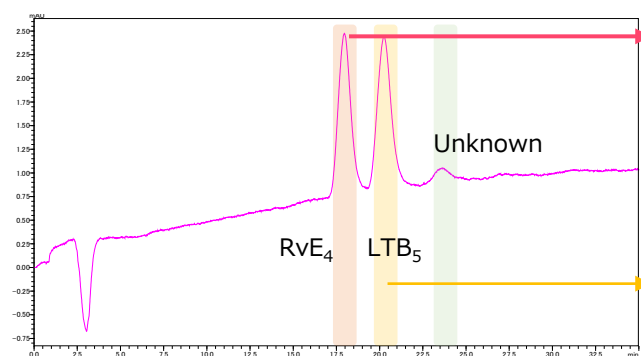


■ 分取LC条件とフラクションの確認

検討結果を参考に分取LCへスケールアップし、以下の区間を分画しました。LTB₅及びRvE₄は異性体であり同じプリカーサーイオンが検出されます。ここではFIA-MS/MSでフラクションのMS/MSスペクトルを確認し、目的成分を分取できていることを確認しました。

[Analytical conditions]

Column : L-column2 ODS (C18, 5 μ m, 12 nm); 20 mm I.D. \times 250 mm L.; Cat. No. 742120
 Eluent : A: Methanol; B:0.1% Formic acid solution
 A/B: 68/32
 Flow rate : 18 mL/min
 Detection : 281 nm
 Injection volume : 2000 μ L
 System : Nexera Prep.
 Sample : EPA metabolites fraction /Water (7/3, v/v)



● HPLC分析メソッド開発支援：長年の分析経験に基づいた高い技術で、HPLC分析メソッドを開発及び改善します。

● HPLCによる分取・精製：高精度な分離条件に基づく分取・精製を行います。

その他、精製品に対する構造推定(Q-ToF-MS、NMR、FT-IR)、推定構造による毒性評価、作成したHPLCメソッドによるGLP試験など、お気軽にご相談ください。

2025.03 OGT