

プロピレングリコール水溶液を移動相とした

Green HPLC におけるステロイドの保持挙動

日大生産工(院) ○小澤 優里 日大生産工 中釜 達朗

1 まえがき

逆相液体クロマトグラフィー (HPLC) は、移動相-固定相の相互作用によって混合物の分離分析を行う方法である。その中でも近年、環境に優しいHPLC (Green HPLC) への関心が高まっている¹⁻³⁾。通常の逆相HPLCでは溶出調整溶媒としてメタノールやアセトニトリルが汎用されている。しかし、これらの有機溶媒は劇物に指定されており、保管や管理などが煩雑であるだけではなく、環境や人体に対して優しい溶媒とは言い難い。そこで、本研究では毒性が比較的低く、食品添加物や医薬品の溶解補助剤などに用いられているプロピレングリコール (PG) を溶出調整溶媒として使用する可能性を検討している。今回の発表では、オクチル基結合シリカゲル (C8) 充填カラムを用い、生体関連物質であり、医薬品としても使用されているステロイドの分離特性について検討した結果を報告する。

2 実験方法および測定方法

HPLC装置はHPLC用ポンプ、インジェクター (試料注入量20 μ L)、C8充填カラム (内径4.6 mm、長さ100 mm)、カラム恒温槽および紫外可視分光検出器で構成した。移動相には超純水に対し、PG、メタノールあるいはアセトニトリルを体積比1:1で混合した溶液をそれぞれ用いた。測定対象物質は水-オクタノール間の分配係数 ($\log P$) および分子構造の類似性などを考慮して、コルチゾン (C)、ヒドロコルチゾン (HC)、コルチコステロン (CC)、プレドニゾン (P)、コルテキソロン (CX)、テストステロン (TS) とした。これらの物質をそれぞれ移動相に溶解し、1 mMの濃度として試料溶液とした。また、各試料溶液を2 mLずつ採取して混合溶液とした。測定条件は、移動相流量0.30 mL/min、検出波長254 nmとした。

ホールドアップ時間測定用物質にはウラシルを用いた。

3 実験結果および検討

カラム温度38 $^{\circ}$ Cにおける3種類の移動相 (PG含有移動相、メタノール含有移動相、アセトニトリル含有移動相) におけるステロイド混合試料のクロマトグラムをFig.1に示す。

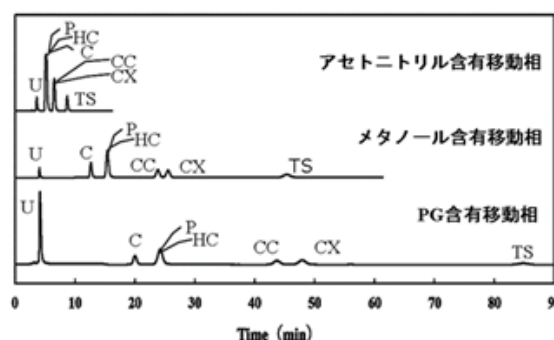


Fig.1 ステロイド混合試料のクロマトグラム

3種類の移動相において、同一体積比ではPG含有移動相を移動相に用いた場合に一番強い保持を示した。また、ステロイドの溶出順序については、メタノール含有移動相およびPG含有移動相を用いた場合はどちらもC, P $\approx$ HC, CC, CX, TSの順に溶出した。一方、アセトニトリル含有移動相を用いた場合はP, HC, C, CC, CX, TSの順であった。

また、疎水性の指標である $\log P$ 値と保持係数の対数 ($\log k$) との相関を検討した。カラム温度38 $^{\circ}$ Cにおける3種類の移動相 (PG含有移動相、メタノール含有移動相、アセトニトリル含有移動相) におけるステロイドの $\log P$ - $\log k$ プロットをFig.2に示す。概ね、正の相関が認められたが、PG含有移動相とメタノール含有移動相ではプロットの形状が類似していた。

Retention behavior of steroids using propylene glycol aqueous solution as a mobile phase in green HPLC

Yuuri OZAWA, Tatsuro NAKAGAMA

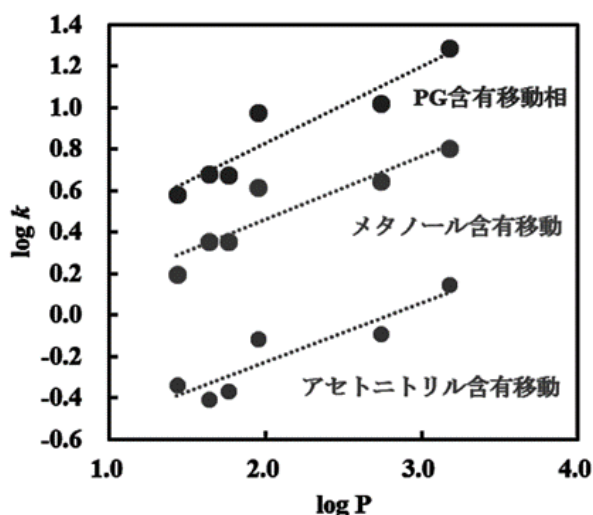


Fig.2 各移動相におけるlog P-log kプロット

温度による保持の変化については、それぞれの移動相ごとにファントホッフプロットを作成して検討した。一例として、PG含有移動相におけるファントホッフプロットをFig.3に示す。

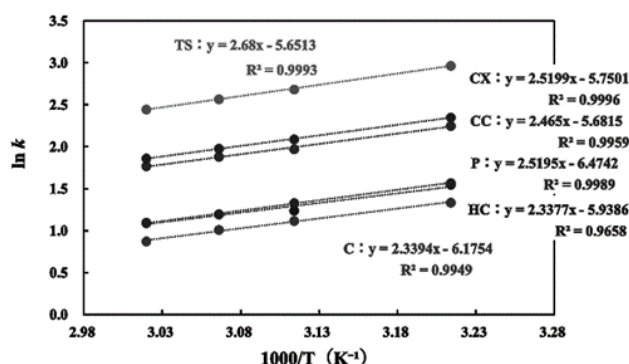


Fig.3 PG含有移動相 (38 °C) におけるファントホッフプロット

検討の結果、すべての移動相についてファントホッフプロットに直線性が見られた。PG含有移動相を用いた場合の傾きや切片はメタノール含有移動相を用いた場合と類似していたのに対し、アセトニトリル含有移動相を用いた場合ではカラム温度変化に対して保持の変化がほとんど見られなかった。したがって、PG含有移動相は溶出順序や保持の温度応答性についてもメタノール含有移動相と類似した特性を示すことがわかった。アセトニトリル含有移動相との違いの要因は、移動相と溶質であるステロイドの水素結合性に起因していると考えられる。

さらに、本研究ではステロイドと固定相との相互作用に及ぼす移動相の影響を考察するために、ステロイドの相互作用パラメータと保持係数との重回帰分析を行った。カラム温度の変

化に対する相互作用寄与の変化を検討した結果、PG含有移動相とメタノール含有移動相では類似性が見られたが、アセトニトリル含有移動相は大きく異なっていた。

以上のことから、PG含有移動相はメタノール含有移動相と類似した分離挙動と相互作用を発現することが推察され、メタノールの代替溶媒として使用出来る可能性が示唆された。

5 まとめ

本研究において、PG含有移動相とメタノール含有移動相使用時にはステロイドの溶出順序が同じであり、保持傾向も類似していた。また、ファントホッフプロットにおいてはPG含有移動相とメタノール含有移動相使用時の傾きが類似していたのに対し、アセトニトリル含有移動相使用時は大きく異なり温度変化があまり見られなかった。重回帰分析においてはPG含有移動相とメタノール含有移動相使用時には結果に類似性が見られたが、アセトニトリル含有移動相使用時は著しく異なっていた。以上のことからPGはメタノールの代替溶媒としてHPLC分析において使用できる可能性が示唆された。これは、環境や実験者の安全に配慮したGreen HPLC分析の実施が可能となり、メタノールなどの毒性の高い有機溶媒を用いることに不安のある実験者でも安全に実験を行うことが出来るようになる。さらに、毒劇物取締法においてPGは非該当であるためメタノールやアセトニトリルに比べて管理がし易いという利点もある。今後は、測定対象物質に非ステロイド抗炎症剤と類似性物質を用いて更なる検討を行う予定である。

「参考文献」

- 1) J. Sang, Q. Ma and C-Q Li, Anal. Methods, 9, 2535–2545 (2017)
- 2) R. N. El-Shaheny, N. M. El-Enany and F. F. Belal, Anal. Methods, 6, 1001–1010 (2014)
- 3) N. Varsha, V. Pratibha, M. Soni, B. Ashok, and B. Suvarna, J. Liq. Chromatogr. & Relat. Tech. 37, 1094–1103 (2014)