



Agilent Poroshell 120 カラムを用いた HPLC によるステロイドの高速スクリーニングメソッド

アプリケーションノート

製薬、生物薬剤、臨床

著者

William Long
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

ステロイドは、コレステロールから派生する脂質の一種です。ステロイドの主構造は、図 1 に示すように、縮合環の 3 つのシクロヘキサンと 1 つのシクロペンタンです。付加される官能基はさまざまです。すべての脂質と同じく、主構造は多数の炭素-水素結合からなり、そのためステロイドは非極性になっています [1]。ステロイドには、性腺ステロイド、経口避妊薬、コルチゾン、タンパク同化ステロイドなどのよく知られている化合物が含まれます。

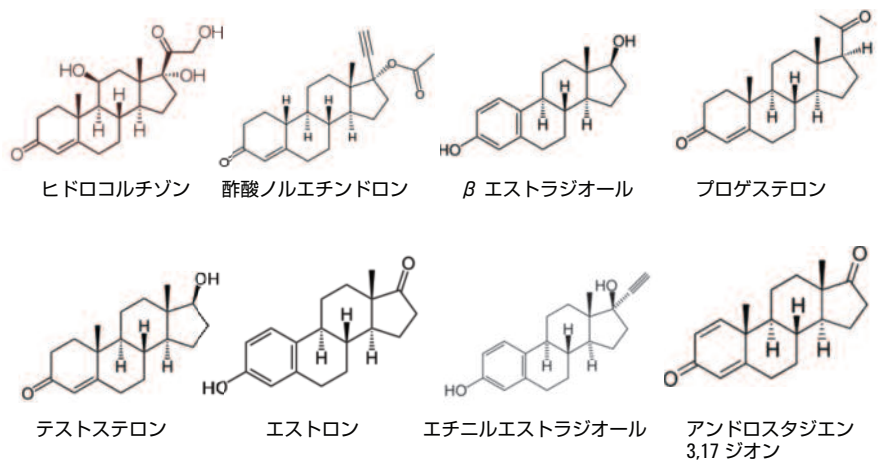


図 1. 各種ステロイドの構造



Agilent Technologies

性腺ステロイドは、脊椎動物のアンドロゲンまたはエストロゲン受容体に作用するステロイドホルモンです。性ステロイドとも呼ばれる性腺ステロイドは、性差を生み出したり生殖を維持したりする性ホルモンの一部です。合成性ステロイドも数多く存在します。

おもな性ステロイド種はアンドロゲンとエストロゲンの2つで、なかでも人体において重要な派生物がテストステロンとエストラジオールです。第3の性ステロイド種は黄体ホルモンです。自然に存在するヒトの黄体ホルモンでもっとも重要なものが、プロゲステロンです。一般に、タンパク同化ステロイドなどのアンドロゲン(アンドロステンジオン、デヒドロエピアンドロステロン、ジヒドロテストステロン、テストステロン)は、男性化効果があることから、男性ホルモンと見なされています。エストラジオール、エストリオール、エストロン、黄体ホルモンなどのエストロゲンは、おもに妊娠の維持に用いられ、女性ホルモンと考えられています。ヒドロコルチゾン、コルチゾン、コルチコステロン、17-アルファヒドロキシプロゲステロン、プロゲステロンは、黄体ホルモン種に属するステロイドホルモンですが、どの種類も男性と女性の両方に存在します。ただし、男女で濃度は異なります [2,3]。

選択性を利用したステロイド分離の向上

分離能を向上させる最善策を考える際には、分離方程式が役立ちます。分離方程式は、効率、選択性、保持力の関係を表すものです。

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)$$

高い分離能を得るには、3つの項を最大化する必要があります。カラムを長くしてN(理論段数)を大きくすれば、リテンションタイムとバンド幅が増大します。これは望ましくありません。その代わりに、段数を大きくするためには、固定相粒子の大きさを小さくすることで、理論段に相当する高さを減少させる方法もあります。Agilent Poroshell 120などの表面多孔性粒子では、圧力を大幅に低く抑えながら、1.8 μm粒子の90%の効率を得ることができます。

選択性因数αを操作することでも、分離能を高めることが可能です。選択性の変化は、分離にもっとも大きな影響を与えうる変数です。選択性は、以下の方法により高めることができます。

- 移動相組成の変更
- カラム温度の変更
- 固定相組成の変更

選択性は、HPLCの分離を最適化するためのもっとも強力なツールです。このパラメータは、C18、C8、極性基内包型、フェニル結合相などの異なる結合相の使用や、移動相の変更により変化します。この研究では、Poroshell 120カラムとAgilent 1200 InfinityシリーズHPLCを用いて、ステロイド分析におけるメソッド開発の各選択肢を迅速に評価しました。短いカラムと高い効率により、分析時間が短縮され、平衡化がスピードアップすることで、選択性を迅速に評価することができました。

実験手法

Agilent 1200 Infinity シリーズ LC マルチメソッドソリューションを使用しました。システム構成は以下のとおりです。

- 1260 Infinity バイナリポンプ (G1312B)
- 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- 1260 Infinity 高性能オートサンブラ (G1367E)
- 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)、10 mm MaxiLight カートリッジフローセル搭載
- G6140 シングル四重極質量分析計

Agilent 1200 Infinity シリーズ LC マルチメソッドソリューションは、最大4つ(100 mm)のカラムに対応できる柔軟性の極めて高いシステムです。また、Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードでは、メソッドやシーケンスの設定を自動化し、使用可能なカラム、溶媒、定義済みグラジエント、温度の組み合わせをスクリーニングできます。この研究では、以下の4つのAgilent Poroshell 120カラムを使用しました。

- Agilent Poroshell 120 StableBond SB-C18、2.1 x 100 mm、2.7 μm (p/n 685775-902)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 100 mm、2.7 μm (p/n 695775-902)
- Agilent Poroshell 120 Bonus-RP、2.1 x 100 mm、2.7 μm (p/n 685775-901)
- Agilent Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、2.1 x 100 mm、2.7 μm (p/n 695775-912)

TCC に 6 ポジション/6 ポートカラム選択バルブを取り付けました。スライド式ルールに取り付けるこの新しい Quick Change バルブにより、配管とメンテナンスが簡単になります。ポート 1 を SB-C18 カラム、ポート 2 を EC-C18 カラムに接続しました。ポート 3 を Bonus-RP カラム、ポート 4 を Phenyl-Hexyl カラム、ポート 6 をバイパス接続キャピラリーに接続しました。

4 つの低分散熱交換器のうちの 1 つを用いて、カラムに流す溶媒を加熱しました。G1160 12 溶媒選択バルブを、G1312B のバルブ ポジション A1 に接続しました。Binary SL ポンプ内部の溶媒選択バルブと合わせると、このシステムで最大 15 の溶媒をスクリーニングできます。移動相には、0.1 % ギ酸を含むメタノールまたはアセトニトリルと 0.1 % ギ酸を含む水を使用しました。アセトニトリル/水の混合液 (50 %/50 % v/v) を用いて、カラムから修飾剤を洗浄し、カラムを適切に保管しました。機器のコントロールとデータ処理には Agilent ChemStation バージョン B.04.02 を使用しました。

分析した化合物は、ヒドロコルチゾン、酢酸ノルエチンドロン、エストラジオール、プロゲステロン、テストステロン、エストロン、エチルエストラジオール、ボルジオンで、すべて Sigma Aldrich から購入しました。構造と詳細を図 1 と表 1 に示しています。サンプルはすべて、アセトニトリル中 10 mg/mL の濃度で作成し、最終濃度が 0.1 mg/mL になるように水で希釈しました。

選択性を高めるカラムの選択

分離の選択性を高めるカラムを選択しました。選択したカラムは、メソッド開発の最初の選択肢として推奨されている高エンドキャップカラム (Poroshell 120 EC-C18) と、シラノール基との相互作用により中～低 pH 移動相で別の C18 選択性が得られる非エンドキャップ C18 (Poroshell 120 SB-C18) です。極性基内包型カラム (Poroshell 120 Bonus-RP) とフェニルヘキシルカラム (Poroshell 120 Phenyl-Hexyl) も使用しました。フェニル結合相は、芳香族化合物の選択性を高めることで知られています。

表 1. ステロイドの名称と分子特性

一般名	IUPC 名	分子式	分子量
ヒドロコルチゾン	コルチゾール	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.460
酢酸ノルエチンドロン	(17a)-17-エチニル-3-オキシestra-4-エン-17-イルアセテート	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	340.456
β エストラジオール	(17b)-estra-1,3,5(10)-トリエン-3,17-ジオール	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38
プロゲステロン	pregnen-4-エン-3,20-ジオン	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46
テストステロン	(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-17-ヒドロキシ-10,13-ジメチル-1,2,6,7,8,9,11,1	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.42
エチルエストラジオール	19-Nor-17a-pregna-1,3,5(10)-トリエン-20-イン-3,17-ジオール	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.403
アンドロスタジエン 3,17 ジオン (ボルジオン)	8R,9S,10R,13S,14S)-10,13-ジメチル-7,8,9,11,12,14,15,16-オクタヒドロ-6H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3,17-ジオン	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	284.39
エストロン	3-ヒドロキシ-13-メチル-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-デカヒドロシクロペンタ[a]フェナントレン-17-オン	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.366

全多孔性 Poroshell 120 の Bonus-RP 相では、疎水性 C14 アルキル鎖に埋め込まれた極性基により、極性サンプルとシラノールの相互作用が最小限に抑えられ、幅広いアプリケーションで左右対称のピークが得られます。この相は、アミンがイオン化したシラノールと強い相互作用を起こすことのある中性 pH で特に効果があります。極性埋め込み基は、疎水性鎖を湿らせ、水性度の高い移動相での相の崩壊を防ぐのにも役立ちます。

Poroshell 120 Bonus-RP は、C18 カラムと同じ分離の多くに使用できますが、水性度の高い移動相での湿潤性の低さなど、C18 のいくつかの欠点を回避することができます。また、疎水性相互作用やアミド基との H 結合による作用を受ける分子の保持力が高くなります。Bonus-RP では、極性基 (H 結合アクセプター) とフェノールや酸などの H 結合ドナーとの強い H 結合により、アルキルのみの相と比べてフェノール、有機酸、その他の極性溶質の保持力と選択性が高まります。Bonus-RP では C18 よりも保持力がわずかに低くなり、移動相条件を変更せずにカラムを簡単に比較することができます。Bonus-RP 相は極性化合物の選択性が C18 と異なります。また、100 % 水に対応できます。

Phenyl-Hexyl 相は、特に極性芳香族化合物や複素環化合物で独自の逆相選択性を備えています。この選択性は、結合相の芳香環と分析対象物との相互作用と、非局在電子から生まれるものです。Poroshell 120 Phenyl-Hexyl は、C18 および Bonus-RP 相に対して直交的に機能します。フッ素やニトロ基など、芳香族電子求引性基をもつ化合物では、一般に保持力と選択性が高くなります [4,5,6]。

Poroshell 120 Phenyl-Hexyl カラムは、芳香基をもつ化合物で独自の選択性を示し、そうしたサンプルで優れた分離能が得られます。また、一般的なアルキル相 (C18 および C8) では適切に分離できない中程度の極性の化合物でも、最適な分離が得られます。アセトニトリルでは、芳香族化合物および分極性化合物とフェニルヘキシル固定相との $\pi-\pi$ 相互作用が低下する傾向がありますが、メタノールではその相互作用が高まるため、保持力と選択性の変化の幅が大きくなります [7]。これは必ずしも、フェニル結合相でアセトニトリルを使えないということでも、アセトニトリルでは適切な分離が得られないということでもありませんが、メタノールを使用したほうが、フェニル相に求められる独自の選択性を得られる可能性が高くなります。

結果と考察

図 2 に示すように、使用したすべてのカラムで、8 種類すべての化合物の分離を試みました。Poroshell 120 EC-C18 および Poroshell 120 Phenyl Hexyl カラムでは、よく似たプロファイルが得られていますが、Phenyl Hexyl カラムのほうが溶出が早くなりました。このことは、Phenyl Hexyl カラムの $\pi-\pi$ 相互作用がアセトニトリルにより減じたことを示している可能性があります。エストラジオールとアンドロスタジエンのオーバーラップは、Phenyl Hexyl カラムではそれほど深刻ではありませんでした。Poroshell 120 SB-

C18 カラムではきわめて異なる分離が得られ、エストラジオールは分離されましたが、エチニルエストラジオールとエストロンの分離は弱まりました。これは、SB-C18 相のシラノールの曝露か、SB-C18 相のジイソブチル側鎖に起因するなんらかの形状選択性が原因と考えられます。これを解明するには、さらなる分析が必要です。Poroshell 120 Bonus RP 相は、8 種類ほぼすべての化合物を分離できました。アセトニトリルを使用する場合は、このカラムが、さらなる開発を進めるためのメソッド開発における最良の選択肢といえます。

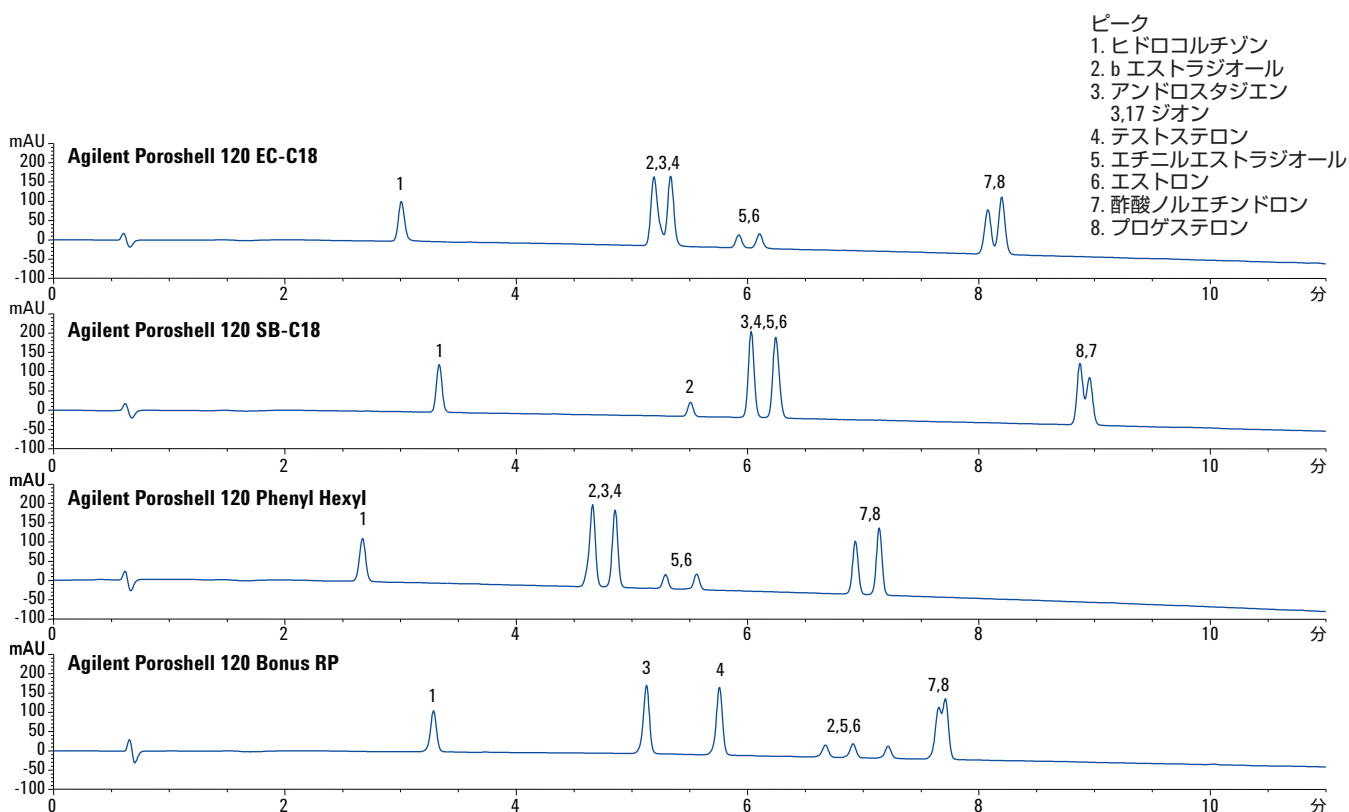


図 2. Agilent Poroshell 120 カラムとアセトニトリルを用いたステロイドの分離

条件

カラム: Agilent Poroshell 120、2.1 x 100 mm
 流速: 0.4 mL/min
 グラジエント: 40~80 % MeOH/14 分 (0.1 % ギ酸を含む水および MeOH)
 温度: 40 °C
 検出: DAD 260、80 ref = オフ

図3では、やや高い温度(40 °C)でメタノールを使用した場合の分離結果を示しています。このケースでは、2つのC18相(Poroshell 120 EC-C18とPoroshell 120 SB-C18)でほぼ同じクロマトグラムが得られました。SB-C18相では、シラノール相互作用により、若干の保持力増加が見られました。Poroshell 120 Bonus-RPのクロマトグラムでは、3つのピーク対がオーバーラップしており、この点はメタノールでのさらなるメソッド開発を困難にする可能性があります。しかし、Poroshell 120 Phenyl Hexyl相では、8つの化合物がベースラインで分離されました。

- ピーク
1. ヒドロコルチゾン
 2. b エストラジオール
 3. アンドロスタジエン 3,17 ジオン
 4. テストステロン
 5. エチニルエストラジオール
 6. エストロン
 7. 酢酸ノルエチンドロン
 8. プログステロン

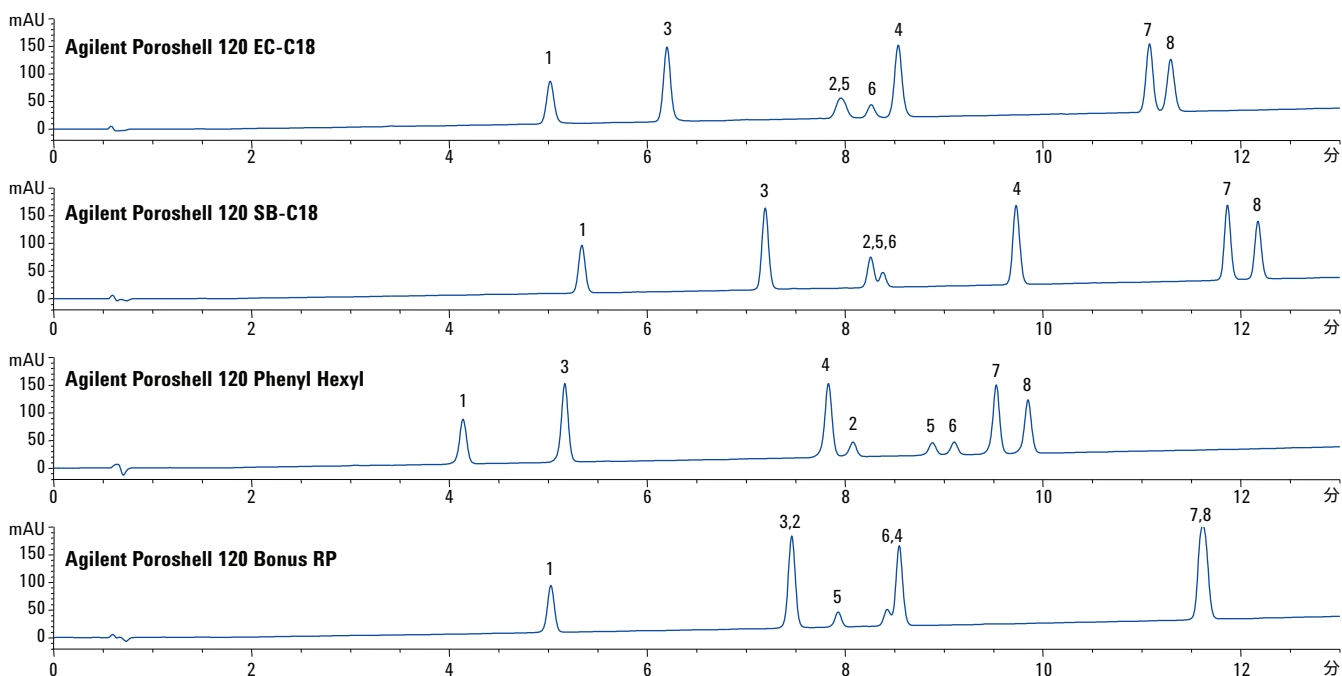


図3. Agilent Poroshell 120 カラムとメタノールを用いたステロイドの分離

条件

カラム: Agilent Poroshell 120、2.1 x 100 mm
 流速: 0.4 mL/min
 グラジエント: 25~80 % MeCN/10 分 (0.1 % ギ酸を含む水と MeCN)
 温度: 25 °C
 検出: DAD 260、80 ref = オフ

結論

メソッド開発スキームの一部として、一般的なグラジエントを用いた調査メソッドを採り入れれば、分析上の問題を迅速に解決することができます。この研究では、ステロイドを例に、各種の相やアセトニトリルとメタノールなどの有機修飾剤により異なる選択性を開発すれば、分離を最適化できることが示されています。この例の場合、Poroshell 120 EC-C18 および SB-C18 カラムなどで広く使用されている C18 相では、最適な分離が得られませんでした。アセトニトリルと組み合わせた Poroshell 120 Bonus-RP、または Poroshell 120 Phenyl Hexyl のほうが良好な結果が得られ、数千のサンプルに使用できました。

参考文献

1. G. P. Moss. *Pure & Appl. Chem.* 61, 1783 (1989).
2. G. Guerriero. *Ann. NY Acad. Sci.* 1163, 154 (2009).
3. M. K. Thakur, V. Paramanik. *Horm. Res.* 71, 194 (2009).
4. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch. *Practical HPLC Method Development*. Wiley-Blackwell, New York (1997).
5. C. Markopoulou, T. Tweedie, D. Watson, G. Skellern, H. Reda, P. Petersson, H. Bradstock, M. Euerby. *Chromatographia*. 70, 705 (2009).
6. G. P. O'Sullivan, N. M. Scully, J. D. Glennon. *Anal. Lett.* 43, 10 (2010).
7. N. S. Wilson, J. Gilroy, J. W. Dolan, L. R. Snyder. *J. Chromatogr. A*. 1026, 91 (2004).

詳細情報

本書に記載のデータは代表的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

June 15, 2012

5991-0451JAJP



Agilent Technologies