

## コルチゾン(分析メソッド開発とスケールアップ) Cortisone (Development of analytical method and scale-up)

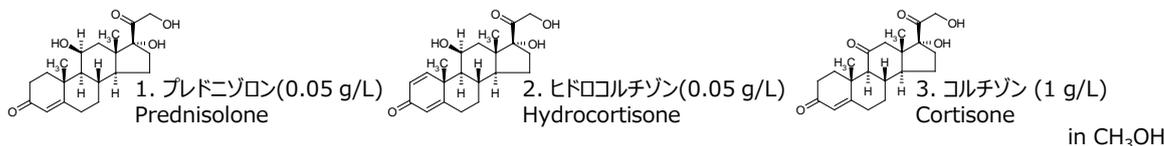
効率よく分析条件を構築するにはメソッドスカウティングが重要になります。ここで得られた情報は最終的な分析条件の構築に役立つだけでなく、他の分析にも応用可能な知見を得ることができます。

今回は構造の似た成分の不純物分離を、分析メソッド開発支援ソフトウェアを用いて行いました。モデル化合物として主成分にコルチゾン、不純物としてヒドロコルチゾン、プレドニゾロンを選択しました。また開発したメソッドについてスケールアップしました。

Key words : コルチゾン ステロイド 糖質コルチコイド 分取 分取精製  
Column : USP category: L1

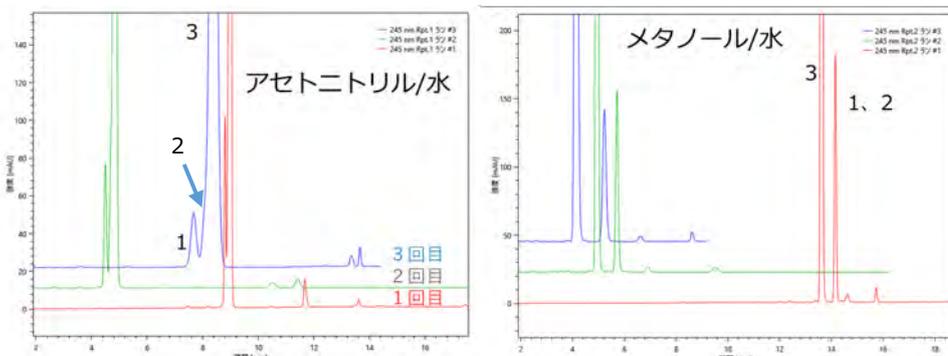
### [ Analytical conditions ]

Column : L-column2 ODS (C18, 3 μm, 12 nm); 4.6 mm I.D. × 50 mm L.; Cat. No. 721150  
Eluent : A: H<sub>2</sub>O, B: CH<sub>3</sub>CN or CH<sub>3</sub>OH, Gradient elution  
Flow rate : 1.5 mL/min  
Temperature : 40°C  
Detection : UV 245 nm  
Injection volume : 5 μL  
System : Agilent 1260 Infinity II Prime LC

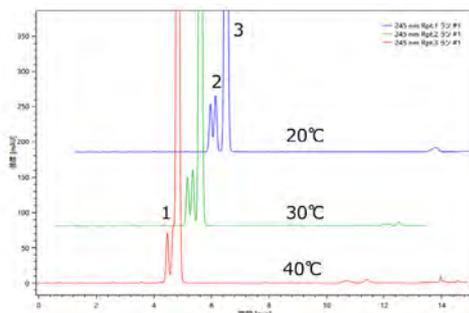


### ◆メソッドスカウティング

HPLCにより有機溶媒の検討を実施しました。分析メソッド開発支援ソフトウェアを用いてそれぞれ3回の試行で分離を目指しました。メタノール/水ではコルチゾンの分離は良好ですが、プレドニゾロンとヒドロコルチゾンの分離はできませんでした。アセトニトリル/水の3回目の試行においてプレドニゾロンは分離し、コルチゾンのピークの前方にヒドロコルチゾンと思われるショルダーピークが確認できました。



今回の成分は温度の影響を大きく受けます。温度を低くするとコルチゾンと不純物の分離度が増加し、温度が高いと不純物同士の分離度が増加します。



### [ Analytical conditions ]

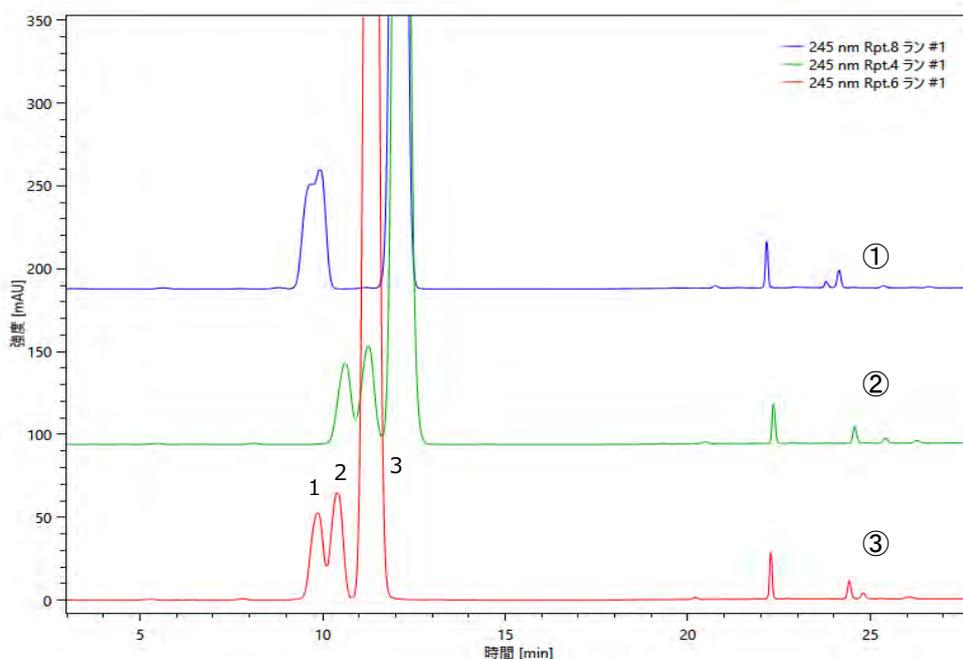
Column : L-column2 ODS (C18, 3 μm, 12 nm);  
4.6 mm I.D. × 50 mm L.; Cat. No. 721150  
Eluent : A: H<sub>2</sub>O, B: CH<sub>3</sub>CN  
A/B, 77/23-65/35-10/90-10/90 (0-12-13-15 min)  
Flow rate : 1 mL/min  
Temperature : 20°C, 30°C, 40°C  
Detection : UV 245 nm  
Injection volume : 5 μL

2024.06 OGT

不純物測定では感度を得るために注入量を増やすケースがあります。ここでは注入量を増やした状態でカラムの種類を検討しました。カラムは長さを150 mmに変更し、溶離液条件はシミュレーションソフトを用いて最適化しました。

## [ Analytical conditions ]

Column : ① L-column2 C6-Phenyl (Phenyl-Hexyl, 5  $\mu$ m, 12 nm); 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.; Cat. No. 722076  
 ② L-column2 ODS (C18, 5  $\mu$ m, 12 nm); 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.; Cat. No. 722070  
 ③ L-column3 C18 (C18, 5  $\mu$ m, 12 nm); 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.; Cat. No. 822070  
 Eluent : A: H<sub>2</sub>O, B: CH<sub>3</sub>CN; A/B, 75/25-75/25-50/50-40/60 (0-15-20-30 min)  
 Flow rate : 1 mL/min  
 Temperature : 30°C  
 Detection : UV 245 nm  
 Injection volume : 20  $\mu$ L



1. プレドニゾロン(0.05 g/L)
2. ヒドロコルチゾン(0.05 g/L)
3. コルチゾン (1 g/L)

in CH<sub>3</sub>OH

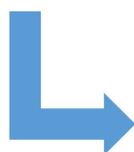
L-column3 C18は高負荷量においても主成分と不純物の分離が良い結果となりました。

～スカウティングのまとめ～

- ・ アセトニトリル/水で不純物が分離
- ・ 30°Cですべての分離が良好
- ・ L-column3は高負荷量でも分離が良好

## [ Final Analytical conditions ]

Column : L-column3 C18 (C18, 5  $\mu$ m, 12 nm); 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.; Cat. No. 822070  
 Eluent : A: H<sub>2</sub>O, B: CH<sub>3</sub>CN; A/B, 75/25-75/25-50/50-40/60 (0-15-20-30 min)  
 Flow rate : 1 mL/min  
 Temperature : 30°C  
 Detection : UV 245 nm  
 Injection volume : 10  $\mu$ L



分取スケールへスケールアップ

内径	断面積
4.6 mm	16.6
20 mm	314.2



約20倍

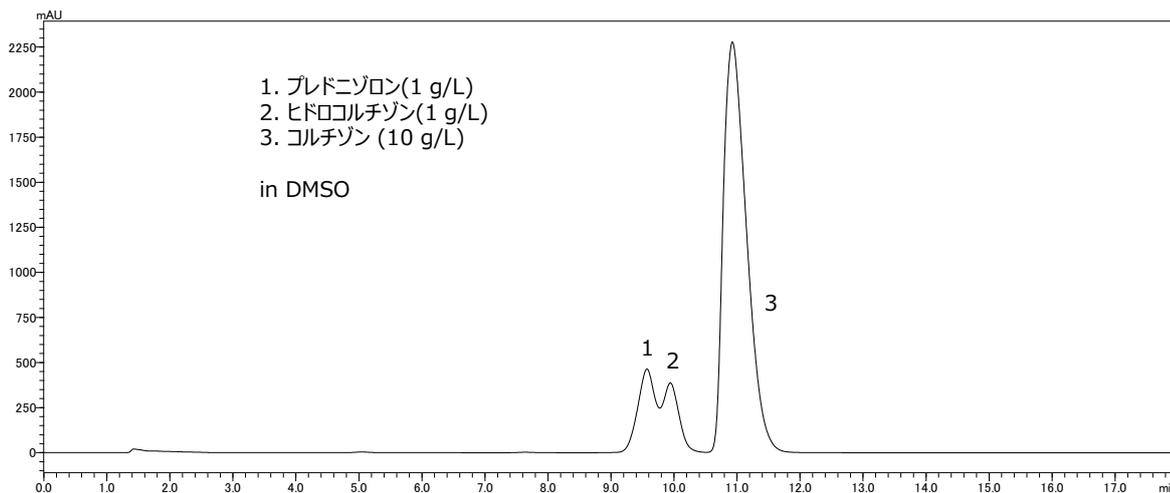
2024.06 OGT

## ◆スケールアップ

最終メソッドをもとにスケールアップを行いました。分取LCは流量が大きく溶離液が温まりきらず、温度差による影響が生じやすいため室温で行いました。負荷量10 mgではコルチゾンと不純物の分離度が1.55となり、完全分離を達成しました。また、それぞれの不純物はピークトップの分離を達成しました。

## [ Analytical conditions ]

Column : L-column3 C18 (C18, 5  $\mu$ m, 12 nm); 20 mm I.D.  $\times$  150 mm L.; Cat. No. 842520  
 Eluent : A: H<sub>2</sub>O, B: CH<sub>3</sub>CN; A/B, 75/25  
 Flow rate : 20 mL/min  
 Temperature : Room temperature  
 Detection : UV 245 nm  
 Injection volume : 1000  $\mu$ L  
 System : Shimadzu Nexera Prep



分取効率を上げるには、なるべく濃い試料を大量に注入することが必要です。ここでは分離度が1.2以上、15分以内で注入量を増やして分析しました。

溶離液: 水/アセトニトリル 75/25 注入量: 2000 $\mu$ L 試料溶媒: DMSO	溶離液: 水/アセトニトリル 75/25 注入量: 3000 $\mu$ L 試料溶媒: DMSO	溶離液: 水/アセトニトリル 75/25 注入量: 3000 $\mu$ L 試料溶媒: 水/DMSO 3/1	溶離液: 水/アセトニトリル 90/10-55/45 (0-15 min) 注入量 3000 $\mu$ L 試料溶媒: DMSO
$R_{2,3}: 1.31$	$R_{2,3}: 0.56$	$R_{2,3}: 1.25$	$R_{2,3}: 1.22$

DMSO(Dimethyl sulfoxide)に溶解した試料の注入量を上げていくと分離度( $R_{2,3}$ )が低下します。これは試料溶媒が溶離液としてはたらくため、溶離液と試料溶媒の溶出力が異なれば、注入直後の試料は拡散し、ピーク形状が悪化します。試料溶媒に水を加えて、溶離液の溶出力と同じ若しくは溶離液の溶出力より弱くするとピーク形状は改善します。

また、グラジエント溶離ではイソクラティック溶離に比べピーク形状がシャープになり、分離度も改善します。そのため、高濃度のフラクションが得られます。しかしながら、連続で分取を行う場合は初期の溶離液組成に戻す必要があり、時間や有機溶媒の使用量が増加します。

2024.06 OGT