

コアシェル型逆相HPLCカラムを用いたコルチコステロイド類の 迅速一斉分離での選択性改善と外用剤の定量法開発

西 博行¹⁾, 川畑 公平¹⁾, 稲垣 昌宣¹⁾, 内田 佳那²⁾, 永田 智沙³⁾

Fast Simultaneous Separation of Corticosteroids
by Reversed-phase HPLC with Core-shell Type Columns
—Improvement of Selectivity and Application to Assay of Formulations—

Hiroyuki NISHI¹⁾, Kohei KAWABATA¹⁾, Masanori INAGAKI¹⁾,
Kana UCHIDA²⁾, and Chisa NAGATA³⁾

¹⁾ 薬学科, 薬学部,

安田女子大学

²⁾ 株式会社エスマイル

³⁾ 株式会社クリエイトエス・ディー

Abstract

This paper describes separation of eight corticosteroids by the reversed-phase HPLC with core-shell type columns, which have a core part and a superficial porous silica part, leading to high performance (high theoretical plate number) and relatively low column pressure drops. First typical C18 and C28 columns having 2.6 μm particle size and a linear carbon chain structure were employed with the mobile phase containing acetonitrile (ACN) or methanol (MeOH) as an organic solvent. Among eight corticosteroids, cortisone and hydrocortisone, those only differ in C=O and C-OH at position 11, were co-eluted in use of ACN, on the other hand, triamcinolone acetonide and flusolone acetonide, those only differ F residue at position 6, were co-eluted in use of MeOH. However, all eight corticosteroids were successfully separated within 8 min by the mobile phase with tetrahydrofuran (THF). It was found that THF is quite effective for the improvement of the selectivity in the separation of corticosteroids, as already shown in the separation between berberine and palmatine, and between codeine and dihydrocodeine. This can be explained by the solubility of THF (octadecane can be soluble in THF), leading to the straight structure of the carbon chain of C18. Next, other than the straight carbon chain type columns (C18, C28), perfluorophenyl or biphenyl type columns were employed for the separation of eight corticosteroids. In use of these planer type columns, successful separation of eight corticosteroids was obtained within 8 min in use of ACN. This means the phenyl moiety of the stationary phase is effective for the small difference in the corticosteroid structure. Finally assay methods of flusolone acetonide

formulations were developed and applied for the determination of the active ingredient in the cream and the ointment. Fast assay was successful within 5 min.

Key words: Corticosteroids, Core-shell Columns, Tetrahydrofuran, Selectivity, Biphenyl column

1. はじめに

医薬品開発においては、分析業務の効率化や生産性の向上を目的とした、分析のハイスループット化が急務となっている。これに対応すべくHPLC分析では、汎用タイプの充てん剤粒子（5 μm ）より、更に小さな（2 μm 程度）粒子径充てん剤を用いる超高速分析技術、UHPLC法が開発され、注目されている^{1),2)}。しかし、充てん剤の微粒子化は、高性能化による分析時間の短縮化が図れる反面、カラムの圧損が急激に大きくなる。分析サイズ（4.6 mm内径、長さ15 cm）のカラム（5 μm ）を標準的な試験条件で用いたHPLC分析の場合、圧損は100 kg/cm²以下であるが、2.2 μm 充てん剤（5 cmカラム、カラム温度40 $^{\circ}\text{C}$ ）で、流速 0.7 mL/min、移動相メタノール70%では、300 kg/cm²近くとなった³⁾。高い圧損は、UHPLC専用装置が必要となるだけでなく、カラム寿命や機器の保守上も不利である。

そこで、新たにコアシェル（core-shell, CS）型充てん剤が注目されている⁴⁾。このタイプの充てん剤では、非多孔質シリカゲルの表面に多孔質シリカゲル層を被覆させる。見かけ上の粒子径は大きいため、カラム背圧を抑えることができるという特長を有しており、従来のHPLC装置が使用できる。CS構造と試料の分配の様子を模式的に図1に示す。メーカーにより各層の厚さが異なるが²⁾、試料はシェル層と分配し、この層が薄いほど高性能となる。一方、カラム圧損は粒子径全体に対して働くため、全多孔性の微粒子カラムに比べて、CSでは性能はそのまま粒子径を大きくでき、比較的低い圧損で使用できることになる。

このタイプの充てん剤は、実は既に1969年Kirklandにより発表されている⁵⁾。直径 30 μm の核の表面に約 0.5 μm の多孔質層が存在するシリカで、当時ペリキュラー型シリカと呼ばれていたものだが、このシリカでは試料負荷量や理論段数が高くなかったため実用に用いられることはほとんどなかった。その後、2000年、また2007年に中心核（コア）の直径を小さくし、分離性能と試料負荷量での欠点を克服したものが開発された^{6),7)}。日本でも2010年末から市販品が利用できるようになり^{8),9)}、我々も、汎用されているC18タイプのCS型カラムによる医薬品ジルチアゼム的高速純度試験法について報告した²⁾。

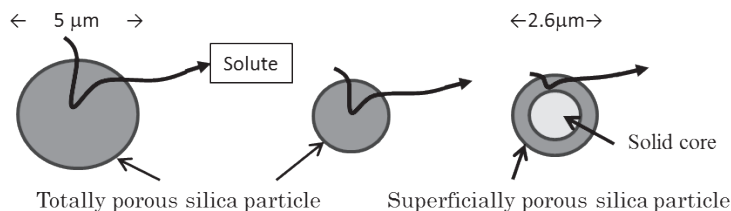


図1 全多孔性充てん剤（左）とコアシェル型充てん剤（右）の構造

本研究では、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、フルオシノニド、コルチゾンアセテート、フル

オシノロンアセトニド等、コルチコステロイド計8種類を取上げ、CS型逆相HPLCカラムによる迅速一斉分離法の開発を目的とする。まず、汎用性のC18カラム及び同系列の直鎖型であるC28カラムを用いて検討を行った¹⁰⁾。CS型の逆相カラムは、当初はC18タイプのものがほとんどであったが、近年、C18型以外の様々なタイプのCS型逆相カラムが開発されている。そこで、次にこれらコルチコステロイドの一斉分離分析における選択性の改善について、平面性を有するフェニル系のカラムを用いての検討を行った¹¹⁾。最後に、これらの結果を踏まえ、CS型のカラムを用いるコルチコステロイド製剤の定量法について検討し、市販製剤（クリーム剤、軟膏剤）中の成分定量に応用した。

2. 実験方法

2.1 試薬および試料

p-ヒドロキシ安息香酸メチル（メチルパラベン、MeP）、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル（エチルパラベン、EtP）、*p*-ヒドロキシ安息香酸*n*-プロピル（*n*-プロピルパラベン、nPrP）、*p*-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル（イソプロピルパラベン、iPrP）、*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル（ブチルパラベン、BuP）、ボイドポリウム（*t*₀）のマーカ物質としてウラシル、また、緩衝液調製用に用いたリン酸（85%）及びリン酸二水素カリウム、塩酸は、富士フィルム和光純薬工業（株）（東京）の試薬特級を購入し、使用した。移動相は、単純逆相モードである、水と有機溶媒（メタノール（MeOH）、テトラヒドロフラン（THF）、アセトニトリル（ACN））の混液とし、HPLC用を富士フィルム和光純薬工業（株）（東京）から購入した。水は、ElixUV純水製造装置（日本ミリポア社）を用いて精製したものを用いた。

パラベンの分離の検討に用いた混合試料溶液は、以下のように調製した。各パラベン及びウラシル 100 mgをとり、MeOHに溶かしそれぞれ 100 mLとし、各パラベンの原液とした。この原液それぞれ 5 mLをとり、水を加えて 50 mLとしてパラベン混合液（ウラシルを含む）を調製した。また、トリアムシノロン（TRI）、トリアムシノロンアセトニド（TRI-AD）、コルチゾン

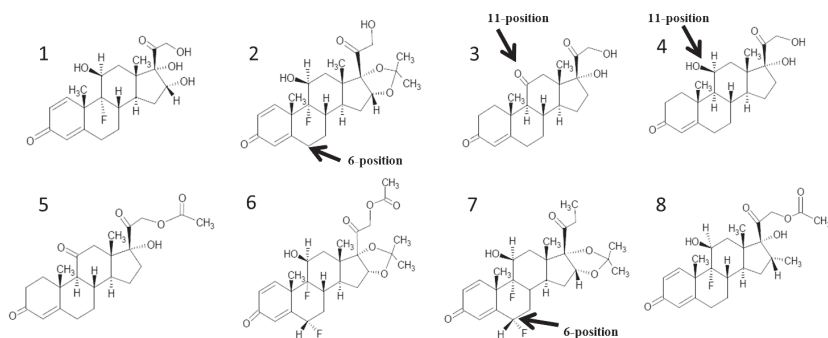


図2 試料の構造式

- 1: Triamcinolone; 2: Triamcinolone acetonide; 3: Cortisone; 4: Hydrocortisone;
5: Cortisone acetate; 6: Fluosinonide; 7: Fluosinolone acetonide; 8: Dexamethasone acetate

(COR)、ヒドロコルチゾン (H-COR)、コルチゾンアセテート (COR-A)、フルオシノニド (FLO)、フルオシノロンアセトニド (FL-AD)、デキサメタゾンアセテート (DEX-A) (市販品及び田辺三菱製薬 (株) から入手) の各試料は、MeOHに溶かし (0.1%)、適宜、移動相等で希釈して、試料溶液の混合液を調整し、用いた。図2これら試料の構造式を示す。また、これらの中で定量の検討に用いたFL-ADの製剤であるフルコートクリーム® 0.025%及びフルコート軟膏® 0.025%は市販品を購入して用いた。

2.2 装置及びカラム

装置は(株)島津製作所 (京都) のProminence装置一式 (UHPLC対応) を使用した。ポンプはLC-20AB (耐圧上限 40 MPa、約 400 kg/cm²)、オートインジェクターはSIL-20ACを用い、多波長検出器としてSPD-M20A、システムコントローラはCBM-20A、カラムオープンはCTO-20Aを、また、デガッサーDGU-20A3を使用した。なお、クロマトグラムのモニターは、波長 254 nm及び 210 nmで行い、カラムオープンは原則、40℃一定温度とした。流速も原則、1.0 mL/minとした。

なお、CS型カラムの性能を発揮させるためにカラム直後の配管は内径 0.1 mmのものを用いたが、検出器のセルは通常の 10 µLのものを使用し、スリット幅は 8 nm (他に 1.2 nm選択可能) とした。検出器の時定数 (レスポンス) 及びサンプリングタイムは、初期設定値 (640 ms) から80 msとした。

直鎖型のCS型カラムとしては、(株)島津ジーエルシーから購入したKinetex C18及びKinetex C18 EVO (いずれも 2.6 µm、4.6 mm i.d.×100 mm)、(株)クロマニックテクノロジーズ社から購入したSunshell C18及びSunshell PR-AQUA (C28) (いずれも 2.6 µm、4.6 mm i.d.×100 mm)、また、資生堂(株)から購入したCapcell Core C18 (2.7 µm、4.6 mm i.d.×100 mm) を使用した。一方、平面性を有するCS型カラムとして、(株)島津ジーエルシーから購入したKinetex 5F、Kinetex Biphenyl (いずれも 2.6 µm、4.6 mm i.d.×100 mm)、参考のためYMC-Pack Ph (5 µm、4.6×15 cm、全多孔性) 等も用いた。C18、5FおよびBiphenylカラムの固定相部位を模式的に図3に示す。また、比較のため、全多孔性のUHPLC用カラムとして(株)島津製作所 のShim-pack XR-ODS (2.2 µm、3.0 mm i.d.×50 mm)、コンベンショナルなHPLC用カラムとして、Phenomenex Gemini NX5u C18 (5 µm、4.6 mm i.d.×150 mm) を使用した。

ピークの理論段数 N 、理論段高さ H 及び分離度 R_s は、(株)島津製作所 (京都) のProminence装置

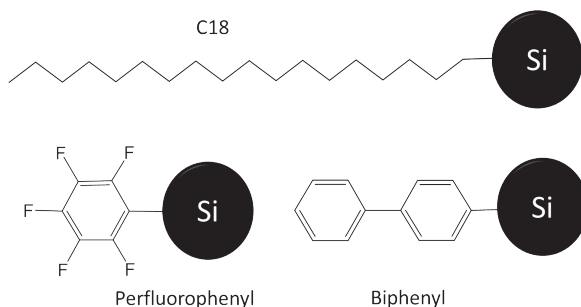


図3 C18、5F (perfluorophenyl) およびBiphenylカラムの固定相部位

一式に搭載されているデータ解析ソフトを用いて計算した。移動相は、有機溶媒と水との混液を用い、使用前にメンブレンフィルターでろ過し、分析に供した。

2.3 外用剤の定量法

＜クリーム剤（フルコートクリーム®0.025%）の定量法＞

本品の表示量に従い、フルオシノロンアセトニド（FL-AD）約 0.25 mgに対応する量（クリーム剤約 1 g）をビーカーに精密に量り、メタノール 20 mLを加えてよく攪拌し、50 mLのメスフラスコに洗い込む。メスフラスコを水溶液中（60℃）で加温し、一端基剤を溶解させた後、冷却する。その後、内標準溶液（ブチルパラベン₁のMeOH溶液（3→1000000））5 mLを正確に加え、水を加えて 50 mLとし、よく振り混ぜてろ過し、ろ液を試料溶液とする。別に、FL-AD標準品（あるいは原末）約 25 mgを精密に量り、メタノールを加えて正確に 50 mLとする。この液 5 mLを正確にとり、50%メタノールを加えて正確に 100 mLとする。この液 10 mLを正確にとり、内標準溶液 5 mLを正確に加え、50%メタノールを加えて 50 mLとし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20 μLにつき、下記の操作条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、内標準物質に対するFL-ADのピーク面積の比 Q_T 及び Q_S を求め、式（1）を用いてFL-ADの量を計算する。

$$\text{FL-ADの量 (mg)} = \text{FL-AD標準品の採取量 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \times 1/100 \text{ ---- (1)}$$

＜軟膏剤（フルコート軟膏®0.025%）の定量法＞

本品の表示量に従い、フルオシノロンアセトニド（FL-AD）約 0.25 mgに対応する量（軟膏剤約 1 g）をビーカーに精密に量り、ヘキサン 20 mLで溶かし、分液漏斗に洗い込む。ここに抽出溶媒としてアセトン：水 = 4：1 混液 10 mLを加え、10 分間激しく振り混ぜ、30 分静置する。下層を 50 mLのメスフラスコに分取する。さらに分液漏斗に抽出溶媒 10 mLを加え、同様の操作を行い、下層を先のメスフラスコに加える。これに内標準溶液（n-プロピルパラベン、又はイソプロピルパラベン₁のMeOH溶液（3→1000000））5 mLを正確に加えた後、50%メタノールを加え 50 mLとし、試料とする。別に、FL-AD標準品（あるいは原末）約 25 mgを精密に量り、メタノールを加えて正確に 50 mLとする。この液 5 mLを正確にとり、50%メタノールを加えて正確に 100 mLとする。この液 10 mLを正確にとり、内標準溶液 5 mLを正確に加え、50%メタノールを加えて 50 mLとし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20 μLにつき、下記の操作条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、内標準物質に対するFL-ADのピーク面積の比 Q_T 及び Q_S を求め、式（2）を用いてFL-ADの量を計算する。

$$\text{FL-ADの量 (mg)} = \text{FL-AD標準品の採取量 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \times 1/100 \text{ ---- (2)}$$

操作条件は、検出波長としてUV 254 nm、カラムはKinetex C18（2.6 μm、4.6 mm i.d.×100 mm）あるいは同等の性能を有するカラム、カラム温度は 40℃一定、移動相は水/ACN混液（3：2）、流量は 1 mL/min とする。

3. 結果及び考察

3.1 パラベン (*p*-ヒドロキシ安息香酸エステル) 混合物の分離によるCSカラムの評価

パラベン混合物は、中性化合物で安息香酸エステル部位の置換基がメチル基1つ違いのものや枝分かれのものが利用できるため、逆相HPLCカラムの性能評価に有用である¹²⁾。従来の5 µm粒子の充てん剤(4.6 mm×150 mmカラム)を、MeOH 60% (カラム温度40℃、流量1.0 mL/min)で用いるとカラム背圧は75 kg/cm²であったのに対し、全多孔性の微粒子UHPLC用充てん剤(2.2 µm、3 mm×50 mmカラム)を同条件で用いると、カラム長さが短いにも関わらず、275 kg/cm²と高い圧損を示した。一方、コアシェル型カラム(2.6 µm、4.6 mm×100 mmカラム)では、約200 kg/cm²前後と低い圧損であった。これは、カラムの圧損が充てん剤粒子の全粒子径に依存することから説明できる。また、2種類のコアシェル型カラムを用いたパラベンの分離においては、カラムの性能を示す理論段数は、15000段、理論段高さで6.5 µmと、装置の最適化を全て行っていない(例えば検出器のセル容量など)にもかかわらず、極めてよい性能が得られ、また、従来カラムと同等の分離が1/2以下の分析時間(数分以内)で達成された³⁾。

これは以下のカラムの性能(H :理論段高さ)と移動相の流速(u :線流速)との関係式: van Deemterの式: $H = A + B/u + C u$ の A 項($A = 2\lambda dp$ (λ :曲がりくねり係数、 dp :充てん剤の粒子径)及び C 項($C = C_{sm} \cdot dp^2/Dm + C_s \cdot df^2/Ds$ (C_{sm} 、 C_s :係数、 Ds :固定相中での拡散係数、 df :固定相(液体)の厚さ)の寄与によるものと考えられる¹³⁾。

コアシェル型の充てん剤では、従来の5 µmと比較し、 A 項では dp が小さいことのほか、粒子径のそろったものが製造できることが大きく寄与している。また、 C 項は、粒子径の2乗に比例し、また、固定相の厚さ df が0.5 µmであり、極めて値が小さくなる。

3.2 有機溶媒の選択性改善効果

今回検討に用いたコルチコステロイドの内、コルチゾンとデキサメタゾンアセテートを除く6種類については、日本薬局方¹⁴⁾に試験法が収載されており、ヒドロコルチゾンが吸着モードを採用している他は、残り5種類ではすべて固定相としてC18カラム(5~10 µm、15~300 mm)、移動相として、水とACNの混液を用いた条件となっている(表1)。そこでまず、最初に直鎖型のCSカラムであるC28カラム及びC18カラムについて、有機溶媒として汎用されるACNとMeOH

表1 日本薬局方(JP17)に収載されているコルチコステロイド類のHPLC条件

Sample	HPLC Mode	IS	HPLC conditions (Assay)			
			Column	Temp.	Detection	Mobile phase
TRI	Reversed-phase	MeP	C18 (5 µm, 4.0 i.d. × 150 mm)	25°C	254 nm	ACN25%
TRI-AD	Reversed-phase	Prednisolone	C18 (10 µm, 4.6 i.d. × 300 mm)	25°C	240 nm	ACN25%
H-COR	Normal-phase	Prednisolone	Silica gel (5 µm, 4.6 i.d. × 250 mm)	20°C	254 nm	CHCl ₃ :MeOH:AA= 1000:20:1 ^{a)}
COR-A	Reversed-phase	BuP	C18 (10 µm, 4.6 i.d. × 300 mm)	25°C	254 nm	ACN35%
FLO	Reversed-phase	Propyl benzoate	C18 (5 µm, 4.6 i.d. × 250 mm)	40°C	254 nm	ACN50%
FL-AD	Reversed-phase	EtP	C18 (5 µm, 4.6 i.d. × 250 mm)	40°C	254 nm	ACN30%

a) AA: Acetic acid (100)

に加え、THFを用いて、8種類のステロイドホルモン類の迅速一斉分離の検討を行った。

図4及び図5にC28カラムを用いた時の分離例を示す。全8種類を溶出させる分析時間をほぼ8分以内としたところ、必要とされる有機溶媒の割合は、ACNは40%、MeOHは55%、THFは37.5%となった。8種類の内、MeOHでは、COR (3) とH-COR (4) が分離されている一方、TRI-AD (2) とFL-AD (7) が重複し、ACNではMeOHで分離されていたCOR (3) とH-COR (4) が重複して溶出し、TRI-AD (2) とFL-AD (7) は分離された (図4)。

そこで、THFを用いて検討を行った (図5)。その結果、COR (3) とH-COR (4) が近接しているものの、これら8種類は8分程度で分離されることが分かった。これらの結果を踏まえ、COR (3) とH-COR (4) の分離選択性に優れたMeOHと、TRI-AD (2) とFL-AD (7) の分離選択性に優れたTHFを混合して分離を試みたところ、水:MeOH:THF=6:4:1の移動相を用いて、溶出の早い成分をほぼ等間隔で溶出させることができた。これらのC28カラムでの分離選択性は、C18カラムでも同様であった。C18カラムでの混液 (水:MeOH:THF=5:4:1) での分離を、ACN 40%での分離とともに図6に示す。

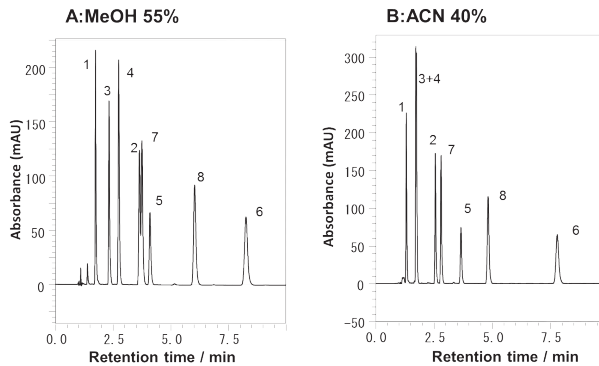


図4 C28カラム (Sunshell RP-AQUA) での分離例
A : MeOH 55%, B : ACN 40%、Sample numberは図2参照、
Detection: UV 254 nm、Flow rate: 1.0 mL/min

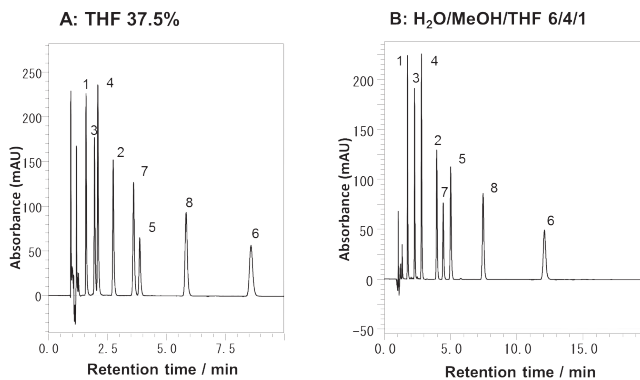


図5 C28カラム (Sunshell RP-AQUA) での分離例
A : THF 37.5%、B : H₂O/MeOH/THF=6/4/1、Sample numberは
図2参照、Detection: UV 254 nm、Flow rate: 1.0 mL/min

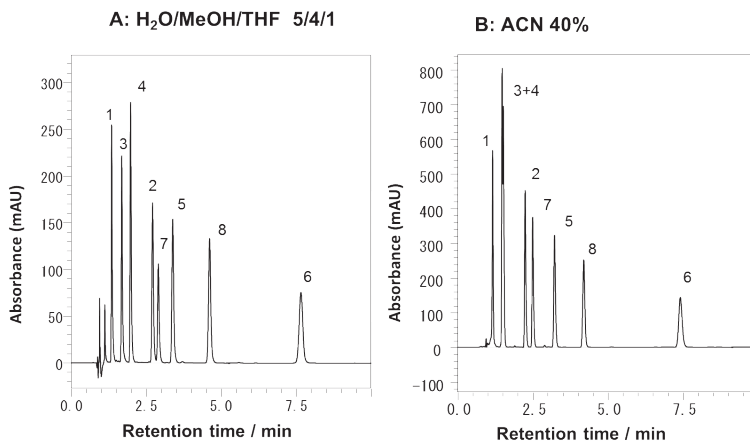


図6 C18カラムでの分離例

A: H₂O/MeOH/THF=5/4/1 and Sunshell C18, B: ACN 40% and Kinetex EVO C18
Sample numberは図2参照、Detection: UV 254 nm、Flow rate: 1.0 mL/min

一方、TRI-AD (2) とFL-AD (7) とは6位にフッ素があるかの違いであるが、この場合はTHFが両者をよく識別した。THFのACNまたMeOHと異なる分離選択性については、その溶解性にあると思われる。すなわち、C18固定相部位のオクタデカン (C₁₈H₃₈) は、MeOHには溶解しないが、THFには溶けることから、直鎖型C18では固定相がMeOHでは寝込んでいるのに対し、THFを用いると溶媒和され、立ち上がる (図7)¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。この違いがC18カラムでの生薬オウバクに含有されるベルベリンとパルマチンの分離¹⁸⁾、また、構造式で一か所の二重結合のみが異なるコデインとジヒドロコデインの分離¹⁹⁾ でTHFが極めて選択性改善に有用、又は必須であったことの理由の一つと考えられる。

以上、有機溶媒の選択性を検討した結果、MeOHとTHFとの混合溶媒により、物性の大きく異なる8種類の相互分離が10分以内で達成され、THFの有用性が確認された。また、直鎖型のカラムであるC18カラムとC28カラムでは、分離選択性の差はあまり認められなかった (図4Bと図6B)。

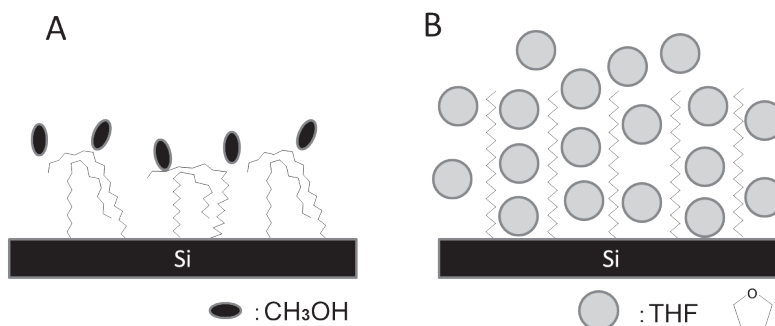


図7 固定相のMeOHでのA:寝込み構造およびB:THFでの溶媒和による立ち上がり (Si: シリカゲル)

3.3 平面性を有するカラムによる選択性改善

次に逆相HPLCにおいて、移動相有機溶媒として広く汎用されているACNを用いこととし、CS型の逆相固定相として、C18に加え、平面性を有していると考えられるパーフルオロフェニル(5F)カラム及びビフェニルカラムを追加して、上述のコルチコステロイド8種類の分離選択性について検討した。ACN 40%での分離例を図8に示す。

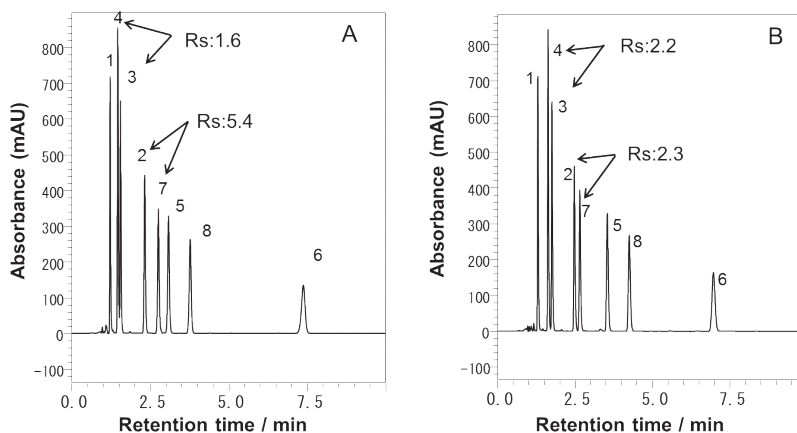


図8 平面性を有するカラム (A: Kinetex 5F, B: Kinetex Biphenyl) でのACN 40%での分離
Sample numberは図2参照、Detection: UV 254 nm、Flow rate: 1.0 mL/min

C18カラム (図6B) では、C28 (図4B) での分離と同様にCOR (3) とH-COR (4) が分離できていないが、5Fカラムでは両者は分離度1.6、ピークの理論段数 13000で、ビフェニルカラムでは、COR (3) とH-COR (4) が分離度2.2、ピークの理論段数が 14000で、また、TRI-AD (2) とFL-AD (7) が分離度 2.3、ピーク理論段数 17000で分離され、全て8成分が重複なして約8分以内で分離された。これらの2成分は、C18カラムでは、THFを用いなければ相互分離できなかったものであるが、平面性を有するビフェニル型のカラムにより、汎用されるACNにおいても分離されることが分かった。

3.4 コルチコステロイド製剤の定量結果

最後に応用として、ステロイドホルモン外用剤 (軟膏及びクリーム剤) の定量につき検討した。市場より購入したフルオシノロンアセトニド製剤 (フルコート®クリーム 0.025%及びフルコート®軟膏 0.025%) を対象として、最も汎用性のカラムであるC18カラムを選択し、抽出方法に付き、検討を行った。その結果、親水性基剤が用いられているクリーム剤ではメタノールの温浸抽出により、一方、ワセリンを主とした親油性基剤である軟膏ではヘキサン- (ア

表2 製剤の定量結果

Repetition	Cream, %	Ointment, %
1	98.6	96.6
2	98.7	95.1
3	98.8	96.3
4	98.8	93.9
5	98.4	96.0
6	98.4	94.0
Average	98.6	95.3
CV	0.19	1.23

セトン：水混液）による液液抽出により、良好に抽出されることが分かった。繰り返し6回の定量結果を表2に示す。プラセボ（基剤の組成）が入手できないため、添加回収実験等のバリデーションデータを取得していないものの、測定結果より、軟膏での測定結果が若干低めとなり、検討を要するものの、ほぼ定量されているものと判断された。図9にクリーム剤の定量時でのクロマトグラム例を示す。5分程度で分離定量が達成された。これら製剤では保存剤としてパラベン類が配合されており、クリーム剤では、MeP、nPrPが、軟膏剤ではBuPが含まれ、主薬近辺に溶出するこれらとの分離が必要であった。なお、図9は、内標準物質（IS）として、クリーム剤に反配合されていないBuPを用いて定量を行ったときのものである。

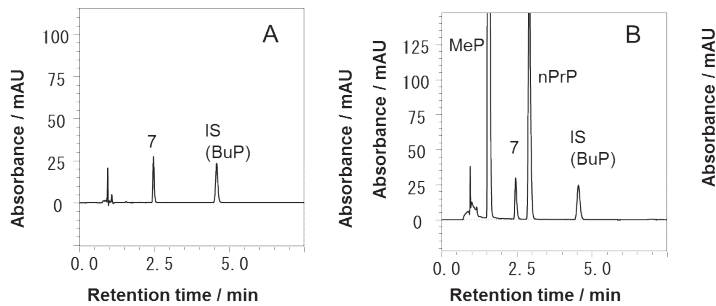


図9 クリーム製剤 (FLUCORT[®] cream 0.025%) の定量時でのクロマトグラム
A : Standard solution, B: Sample solution. Kinetex EVO C18, Detection: 254 nm; Flow rate: 1.0mL/min

4. ま と め

コルチゾン、ヒドロコルチゾン、フルオシノニド、コルチゾンアセテート、フルオシノロンアセトニド等、計8種類のコルチコステロイドにつき、CS型逆相HPLCカラムによる8分以内を目標とした迅速一斉分離法の検討を行った。その結果、疎水性固定相部位が直鎖型であるC18あるいはC28カラムでは、逆相HPLCで汎用される有機溶媒MeOHあるいはACNを用いた場合、一部の成分が重複して溶出したが、THFでは重複なしで分離されることが分かった。これは、THFの持つ溶解性が関係していると考えられ、THFとACNの混液を用いることで溶出位置を調整でき、等間隔での分離が達成された。

一方、カラムとして平面性を有するパーフルオロカラムあるいはビフェニルカラムを用いたところ、汎用される有機溶媒ACNを用いてもこれら8成分が重複することなく8分以内で分離され、これらコルチコステロイドのOH基あるいはF基等のわずかな識別に、平面性の固定相部位が有効であることが分かった。

以上の検討より、逆相HPLC法によるコルチコステロイドの一斉分離での分離選択性の改善には、有機溶媒の種類、また、平面性を有する固定相が有効であることが分かった。最後に定量法につき検討した結果、フルオシノロンアセトニド製剤の定量が、パラベン類を内標準物質（IS）とするIS法により、5分以内での迅速分離が達成できた。

引用文献

1. Waters, ACQUITY UPLC (2004), Shimadzu, Prominence UFLC (2006) など.
2. Nishi, H. and Nagamatsu, K. (2014) New trend in the LC separation analysis of pharmaceuticals -High performance separation by ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) with core-shell particle C18 columns-. *Anal. Sci.*, 30: 205-211.
3. 永松久実, 西村基弘, 西 博行. (2012) UHPLC法によるパラベンの分離とジルチアゼム製剤の定量—薬品分析化学実習のHPLC法からUHPLC法への移管. *安田女子大学紀要*, 40: 403-411.
4. Nagae, N. and Tsukamoto, T. (2013) Characteristics of superficially porous (core shell) C18 particle. *Chromatography*. 34: 41-47.
5. Kirkland, J. J. (1969) High-speed liquid chromatography with controlled-surface-porosity supports. *J. Chromatogr. Sci.*, 7: 7-12.
6. Kirkland, J. J., Truszkowski, F. A., Dilks, C. H. and Engel, G. S. (2000) Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. *J. Chromatogr. A*, 890: 3-13.
7. Kirkland, J. J., Langlois, T. J. and DeStefano, J. J. (2007) Fused core particles for HPLC columns. *Am. Lab.*, 39: 18-21.
8. Sanchez, C. and Farkas, T. (2012) The latest trend in LC analysis. *Am. Lab.*, 44: 11-14.
9. Wang, J., Chow, W. and Cheung, W. (2011) On the use of Kinetex-C18 core-shell 2.6 μ m stationary phase to the multiclass determination of antibiotics. *J. Agricul. & Food Chem.*, 59: 8589-8608.
10. Nagata, C., Morita, S., Shinohara, M. and Nishi, H. (2015) Separation and determination of corticosteroids by the reversed-phase HPLC with core-shell particle columns. *Chromatography*, 36 (Suppl.1): 26.
11. Uchida, K., Nagata, C., Umeda, M., Yorie, T. and Nishi, H. (2016) Separation and determination of corticosteroids by the reversed-phase HPLC with core-shell particle columns: Application of columns having a pheny moiety. *Chromatography*, 37(Suppl.1): 33.
12. 西 博行, 稲垣昌宣. (2015) パラオキシ安息香酸アルキルエステル (パラベン) 類のコアシェル型C18によるUHPLC分離及びキャピラリー GC-MS分析-薬品機器分析学実習におけるパラベン試料の有用性-. *安田女子大学紀要*, 43: 367-376.
13. Van Deemter, J. J., Zuyderweg, F. J. and Klinkenberg, A. (1956) Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography. *Chem. Eng. Sc.*, 5: 271-289.
14. 第十七改正日本薬局方：厚生労働省 (2016). <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>
15. Gritti, F.; Guiochon, G. (2005) Adsorption mechanism in RPLC. Effect of the nature of the organic modifier. *Anal. Chem.*, 77: 4257-4272.
16. Lippa, K. A.; Sander, L. C.; Mountain, R. D. (2005) Molecular dynamics simulations of alkylsilane stationary-phase order and disorder. 1. Effects of surface coverage and bonding chemistry. *Anal. Chem.*, 77: 7852-7861.
17. 長江徳和. JASIS2013 新技術説明会資料. (2013) http://chromanik.co.jp/technical/pdf/Jasis2013s_c.pdf
18. 武田朋子, 河野早苗, 西 博行. (2014) コアシェル型充填剤を用いる生薬成分分析 (その一) -ベルベリンとパルマチンの分離におけるTHFの選択性改善効果-. *日本分析化学会第63年会講演要旨集*, p.305, 広島.
19. 西 博行. (2015) 鎮咳薬コデイン及びジヒドロコデインのUHPLC分離におけるテトラヒドロフラン (THF) の分離選択性改善効果. *安田女子大学紀要*, 44: 371-379.

〔2020. 9. 17 受理〕

コントリビューター：大山 義彦 教授 (薬学科)

