〔 衛 生 化 学 〕
EISEI KAGAKU
35 (1) 49-54 (1989)

高速液体クロマトグラフィーによる歯磨中のクロルヘキシジンの定量

岸美智子, 土井佳代, 堀口佳哉, 伊藤和敏
神奈川県衛生研究所食品薬品部

Determination of Chlorhexidine in Tooth Pastes by High Performance Liquid Chromatography

MICHIKO KISHI, KAYO DOI, YOSHIYA HORIGUCHI and KAZUTOSI ITO
*Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories, 52-2,
Nakao-cho, Asahi-ku, Yokohama 241, Japan*

(Received June 22, 1988)

Determination of chlorhexidine in tooth paste was examined by using high performance liquid chromatography (HPLC). Chlorhexidine was extracted with methanol, isopropanol and acetonitrile.

The best recovery was obtained with methanol containing acetic acid and sodium dodecyl sulfonate (SDS).

Two g of sample was extracted with methanol-water-acetic acid (80:19.5:0.5) containing SDS (1%) and made up to 50 ml, and 20 μ l of this solution was injected to HPLC.

A chlorhexidine peak was separated from other component peaks in commercial tooth paste by using an ODS column, 1-dodecansulfonate (DSA) as an ion pairing agent and methanol-water-THF (830:160:10) containing 5% acetic acid as an elution solution.

The amounts of chlorhexidine in each 100 g of commercial tooth paste were ranged from 5.1 mg to 19.6 mg by this method.

Keywords — chlorhexidine; HPLC; tooth paste; SDS

はじめに

近年の生活向上に伴い清浄作用のみを目的とする化粧品歯磨(歯磨剤)に代り, ムシ歯予防や歯槽膿漏の予防等を目的にした歯磨の需要が増大しており, 各種の殺菌剤や抗炎症剤を配合した薬用歯磨が数多く市販されている。これらに配合されている殺菌剤としては *Streptococcus mutans* に対する抗菌力の強さ, 歯への付着性, 耐性菌の生じにくさといった性質等から, クロルヘキシジンを使用しているものがほとんどである。

ところで, クロルヘキシジンは消毒液をはじめ化粧品や軟膏中に配合されて広く用いられているため, 環境排水中へと放出された時は活性汚泥等に影響を及ぼす可能性が指摘されている。¹⁾ また, クロルヘキシジンは化粧用クリームによる発赤, じん麻疹

など過敏症の原因となったり, まれにはあるが, 粘膜面に使用してショック様症状をおこすことなどが知られ, その結果, 膣, 膀胱粘膜及び耳鼻科領域における粘膜の消毒に使用を禁止されている。²⁾

化粧品中にグルコン酸クロルヘキシジンを配合する場合の濃度上限は 0.05% と定められているが,³⁾ 歯磨中のクロルヘキシジンも, 使用後洗い流す性質の物とはいえ口腔粘膜より吸収される可能性があり, 配合量には十分注意が払われることが望まれる。常時使用する歯磨中にクロルヘキシジンが基準通りに正しく含有されているかどうかを定量確認することは衛生上重要なことと思われる。

従来歯磨中のクロルヘキシジンの定量には, 臭素及びアルカリとの反応により呈色する赤色を利用した比色法⁴⁾ が用いられてきた。しかしこの方法は, 呈色が不安定なこと, 共存する物質によっては濁りを

生じるなどから定量値のバラツキが大きく、また製品によっては呈色がすみやかに消失するなど、市販の薬用歯磨に適用するには不適當な方法であった。消毒液中や化粧品クリーム中のクロルヘキシジンの定量方法については、比色法、ガスクロマトグラフ法(GC法)、高速液体クロマトグラフ法(HPLC法)等の方法が報告されている。⁴⁻⁹⁾しかしGC法⁵⁾は揮発性を高めるために誘導体とする反応を要し、操作が煩雑である。HPLC法⁷⁻⁹⁾は逆相カラムを使ったイオンペア法で、クロルヘキシジンは良好に分離検出されているが、これまで報告されている方法では歯磨中のクロルヘキシジンの定量に用いると共存する物質との分離が不十分であった。今回検討したHPLCによる定量方法は、市販の薬用歯磨に配合される他成分と分離でき、操作も簡便で、再現性も良く良好な方法であったので報告する。

実験方法

1. 試薬 クロルヘキシジンジアセテート(ace-CH.)；シグマケミカル社製、塩酸クロルヘキシジン(HCl-CH.)；住友化学工業製、グルコン酸クロルヘキシジン(glu-CH.)；住友製薬工業製、日局グルコン酸クロルヘキシジン液の濃度を定量して用いる、臭化セチルトリメチルアンモニウム；住友化学工業製、その他の溶媒；和光純薬特級及びHPLC用。

2. 装置 高速液体クロマトグラフ；島津製作所製LC-4 A、検出器；島津製作所製SPD-2 AS、クロマトグラム用データ処理装置；島津製作所製CR 2 A。

3. HPLC条件 カラム；LiChrospher 100C-18 super (Merck 社製) 4 mm i.d. × 125 mm、移動相；酢酸 0.5%含有のメタノール-水 (3 : 1) 及び (5 : 1) 混合液、カラム温度；30 °C、流速；1 ml/min、測定波長；259 nm、検出感度；0.08 A.U.S.

4. 検量線の作成 ace-CH. 約 30 mg を精密に量りメタノールに溶かし 100 ml とし標準原液とする。標準原液をメタノール-水-酢酸 (80 : 19.5 : 0.5) 混合液 (以下メタノール酢酸混液) に溶かし、標準液を作成し、その 20 μ l を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積による絶対検量線法で検量線を作成する。

5. 抽出溶媒の検討 メタノール、イソプロパノール及びアセトニトリルと水及び酸との混合液についてクロルヘキシジンの抽出を検討した。抽出効率の検討はクロルヘキシジンを含まない 2 種の市販歯磨 100 g 中に glu-CH. を 10 mg 含有するように添加したモデル処方 (モデル I、モデル II) について行った (Table I)。歯磨モデル I は発泡剤としてラウリル硫酸ナトリウムを使用し、モデル II は発泡剤として石鹼を使用している。歯磨モデル 2 g を遠沈管にとり抽出溶媒 20 ml を加え、15 分間激しく振とうした後、3000 rpm 10 分間遠心分離を行い上澄みを得る。この操作を 2 回繰り返す、抽出溶媒を留去後メタノール酢酸混液に溶かし一定量とする。この 20 μ l を HPLC に注入し、ピーク面積を測定し検量線より定量し、glu-CH. に換算し回収率を求める。

6. 市販薬用歯磨中のクロルヘキシジンの定量
(1) HPLC 法による定量 —— 歯磨 2 g を遠沈管にとりイソプロパノール又は SDS 1 % 添加メタノール酢酸混液 20 ml を加え、15 分間激しく振とうした後、3000 rpm 10 分間遠心分離を行い上澄みを得る。この操作を 2 回繰り返す、イソプロパノール抽出液は溶媒留去後、メタノール酢酸混液に溶かし 50 ml とし試料溶液とする。メタノール酢酸混液抽出液は同液で 50 ml にメスアップし試料溶液とし、20 μ l を HPLC に注入し、面積値法により定量する。

(2) 比色法による方法⁴⁾ —— 歯磨 10 g を遠沈管にとり食塩 1 g 及び 10% 臭化セチルトリメチルアンモニウム溶液 3 ml を加え攪拌後メタノール 20 ml

TABLE I. Components of Tooth Paste Model I and II

Tooth paste model I	(%)	Tooth paste model II	(%)
Chlorhexidine digluconate	0.01	Chlorhexidine digluconate	0.01
CaHPO ₄	47.5	CaCO ₃	35.0
SiO ₂	2.5	SiO ₂	5.0
Sorbitol (60%)	8.0	Sorbitol (60%)	6.0
Glycerol	13.0	Diatomaceous earth	3.0
1-Dodecyl sulfate, Na (SDS)	1.5	Soap	3.8
CMC, Na	1.0	CMC, Na	1.0

ずつ2回抽出し、メタノール留去後、残留物を水及び臭化セチルトリメチルアンモニウム溶液を加えて溶かし50 mlとする。この10 mlを遠沈管にとり1%アルカリ性臭素溶液5 ml, エーテル10 mlを加え攪拌した後遠心分離を行い下層を取り、470 nmの吸光度を測定して定量を行う。

結果及び考察

1. HPLC 移動層の検討

クロルヘキシジンは強いアルカリ性を示す難溶性の物質で、HCl-CH₃及びglu-CH₃は溶液中では共存する他のイオンと塩を形成し易い事が知られている。すでに報告されているHPLCによる定量方法も逆相系でのペアードイオン法が主流であり、我々もカラムにODS系カラムを用い、移動層にはメタノール、酢酸及び水の混合液を用いる方法を検討した。イオンペア試薬として3種のアルキルスルホン酸及び1種のスルファニル酸を選び検討した。クロルヘキシジンとペンタンスルホン酸(PSA)とのペアードイオン及びオクタンスルホン酸とのペアードイオンは酢酸を0.5%含有するメタノール-水(5:1)混合液では保持されずにメタノールとほぼ同一時間で溶出した。またドデカンスルホン酸(DSA)及びドデシルスルファニル酸とのペアードイオンは酢酸0.5%含有のメタノール-水(3:1)混合液では溶出に20分以上を要した(Table II)。

定量に適した保持時間として10分以内を考え、イオンペア試薬にPSAを用い、酢酸0.5%含有メタノール-水(3:1)混合液を溶離液とする条件及びDSAをイオンペア試薬とし酢酸0.5%含有メタノール-水(5:1)混合液を溶離液とする条件の検討を行った。

市販歯磨中には研磨剤、粘調剤の他、保存料や香料が配合されている。保存料、香料等はメタノール濃度が高いほど短い保持時間で溶出してくる。市販

歯磨からメタノール酢酸混液で抽出した試料液について、各々の条件で分離を行った時のクロマトグラムをFig. 1に示した。酢酸0.5%含有メタノール-水(3:1)混合液で溶離した場合に保持時間5-6分に見られる大きなピークは、香料に由来するピークと思われる。市販歯磨中からは一般的に検出されるピークであるが、酢酸0.5%含有メタノール-水(5:1)混合液で溶離すると3分以内に溶出を完了し、クロルヘキシジンの溶出への影響が無視できる。したがって歯磨中のクロルヘキシジンの定量にはDSAをイオンペア試薬とし溶離液に酢酸0.5%含

Fig. 1. Chromatograms of Chlorhexidine (a) Extracted from a Commercial Tooth Paste with Isopropanol

Column: LiChrospher 100 C-18 super (4 mm i.d. × 125 mm).
Mobile phase:

(A); methanol-water-THF (740:250:10) sol. containing of PSA and acetic acid (0.5%).

(B); methanol-water-THF (830:160:10) sol. containing of DSA and acetic acid (0.5%).

TABLE II. Retention Time of Chlorhexidine

Ion-pairing agents	Mobile phase (MeOH : H ₂ O)	
	(3 : 1) (min)	(5 : 1) (min)
1-Pentansulfonate, Na (PSA)	3.8	<2
1-Octansulfonate, Na	4.4	<2
1-Dodecansulfonate, Na (DSA)	>20	5.6
1-Dodecylsulfate, Na (SDS)	>20	7.0

Concentration of ion-pairing agents in mobile phase : 0.005 M.
Concentration of acetic acid in mobile phase : 0.5% v/v.

有メタノール-水 (5 : 1) 混合液を用いる分離方法が良好と思われた。またクロルヘキシジンがシャープで安定したピークで検出される条件として、テトラヒドロフラン (THF) 1% の添加が必要であり、移動層には、0.005 M の DSA 及び 0.5% の酢酸を含むメタノール-水-THF (830 : 160 : 10) 混合液を用いた。

薬用歯磨中に配合され紫外外部吸収を持つ成分として、香料の他に薬用成分のアラントイン、グリチルレチン酸、酢酸トコフェロール、甘味料のサッカリンナトリウム、防腐剤のパラオキシ安息香酸エステル類等がある。これら成分の本条件における保持時間は、アラントイン 1.2 分、グリチルレチン酸アンモニウム 1.8 分、グリチルレチン酸 4.5 分、DL-トコフェロール 1.2 分、サッカリンナトリウム 1.2 分、パラオキシ安息香酸ブチル 1.5 分であった。

2. 検量線の作成

歯磨中のクロルヘキシジンはほとんどグルコン酸塩及び塩酸塩として使われているが、ペアードイオン法による HPLC では glu-CH., HCl-CH., ace-CH. の保持時間は同一となる。またそれぞれの面積値は、1—5 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で零点を通る直線性を示し、モル濃度あたりに換算すると同一の値を示した。純品が得られ易い、ace-CH. を用いて検量線を作成し glu-CH. 及び HCl-CH. の定量は分子量換算により行った。なおクロルヘキシジンピークの面積値は、

Fig. 2. Calibration Plots of the Chlorhexidines

Sample Solvent; methanol (—), methanol-water-acetic acid (80:19.5:0.5) sol. (.....).

●; chlorhexidine digluconate (glu-CH.), ▲; chlorhexidine dihydrochloride (HCl-CH.), ■; chlorhexidine diacetate (ace-CH.).

酢酸を 0.5% 含有しているメタノール-酢酸混液に溶かし注入した場合、メタノール溶液として注入して得られる値に比べ約 1.5 倍高い値を示した (Fig. 2). このことは、クロルヘキシジンの各塩は溶液中でイオンとして解離しており、HPLC 移動層中で DSA とイオンペアを形成して移動していると考えられるが、これらの結果は、移動層中でのイオンペアの形成率の違いによって起こったものと思われる。

HPLC に注入する試料溶液中に存在する DSA 及び酢酸のイオンペア形成への寄与について、検出されるピーク面積値の変化により検討したところ、DSA 濃度 0.005 M 以上では酢酸濃度 (0—0.5%) の影響を受けなかった。しかし DSA を含まないとき酢酸濃度 0.1% 以下では有意に低い面積値が得られた。また酢酸濃度 0.5% 以上では DSA 濃度 (0—0.005 M) による影響を受けなかった。市販歯磨中からメタノール-酢酸混液で抽出した抽出液中には SDS やリン酸イオン等が含まれると思われるが、酢酸濃度 0.5% 以上では、面積値に影響は見られなかった。

したがって検量線は純品が得られ易い ace-CH. を用いメタノール-酢酸混液に溶解して作製した。

3. 抽出溶媒の検討

1) 酸による影響 クロルヘキシジンの抽出について、種々の溶媒による抽出が報告されており、⁶⁻⁹⁾ その抽出効率より酸添加の影響がうかがわれた。そこで本実験では、モデル I 及びモデル II からのメタノール、イソプロパノール、アセトニトリルによるクロルヘキシジンの抽出効率と、それぞれに対する酸添加の影響について検討した (Table III).

SDS を含むモデル I の場合、イソプロパノールでは酸添加に関係なく 95% 以上の回収が得られたが、メタノール及びアセトニトリルでは酸を添加することにより 40% の回収率が 90% へと上昇した。その際、メタノールではリン酸添加より酢酸添加の方が効率が良く、アセトニトリルでは逆にリン酸添加の方が回収率は高かった。一方、石鹼を発泡剤とするモデル II の場合、いずれの溶媒も溶媒のみではほとんど回収されず、酸を加えることにより回収率は改善された。しかし、いずれも 80% 以下の回収に留まった。

2) SDS による影響 モデル II よりのクロルヘキシジン (glu-CH.) の抽出ではイソプロパノールで 12.9% と低く、アセトニトリル、メタノールでは

TABLE III. Recovery of Chlorhexidine Gluconate from the Tooth Paste Model

Solvent		Recovery from model I			Recovery from model II		
		Acetonitrile (%)	Methanol (%)	Isopropanol (%)	Acetonitrile (%)	Methanol (%)	Isopropanol (%)
Solvent	(100%)	37.7	43.4	98.3±1.9	0	0	12.9
Sol. -H ₂ O	(80:20)	88.9±3.9	88.8±2.2	95.0±2.0	0	0	
Sol. -HCOOH	(99:1)	89.0±4.0	93.3±1.1	98.2±1.9	0	0	
Sol. -H ₂ O-CH ₃ COOH	(80:19.5:0.5)	89.5±3.2	98.2±2.5	97.1±1.8	54.4±5.0	65.2±2.0	
Sol. -H ₂ O-HPO ₄	(80:19.5:0.5)	99.2±2.0	83.3±4.3		0	74.6±3.5	
Sol. -H ₂ O-CH ₃ COOH	(80:19.5:0.5)+SDS(1%)	90.3±2.0	100.1±1.2			94.6±1.9	
Sol. -H ₂ O-HPO ₄	(80:19.5:0.5)+SDS(1%)	98.3±4.3	95.0±1.8		100.0±2.6		
Sol. +SDS	(1%)					4.8	98.0±3.2

Recovery (%); mean±S.D., n=3.

全く抽出されなかった。モデルIとモデルIIからの抽出率の違いにSDSの関与が考えられたので、モデルIIにSDSを加え放置後イソプロパノール抽出及びメタノール抽出を行った。SDSの濃度によるglu-CH.の回収率の変化をFig.3に示した。モデル処方にはSDSを1.5%以上添加した場合に、イソプロパノール抽出では95%以上の回収が得られ、イソプロパノールによるモデルI及びモデルIIからの抽出率の違いはSDSの共存量によるものであった。しかしメタノール抽出では1.5%以上添加してもほとんど回収されなかった。またモデルIIからの抽出にSDSを1%添加したメタノールを用いても、回収率はSDSを1.5%添加したときと同様0から4.8%へと回収率が改善されたに留まった。歯磨モデルからのクロルヘキシジンの抽出に関して、SDSは明らかにイソプロパノールの抽出補助効果を示したが、メタノールにおいてはその効果は弱いものに留まると思われた。しかしながらモデルIIからの抽出に際しメタノール酢酸混液、アセトニトリルリン酸混液では80%以下の抽出率であったのに対し、SDSを1%添加することで94.6%、100%の回収率が得られ、SDSはメタノール、アセトニトリルなどの溶媒抽出に際して、酸による抽出効果を高める作用が認められた。

一般に界面活性剤は難溶性物質を可溶化させる性質をもつが、多くの歯磨は発泡剤としてSDSを配合しており、SDSがクロルヘキシジンの抽出に関与していることは好都合である。薬用歯磨に使用される発泡剤の濃度は0.5-2.0%といわれ、¹⁰⁾通常1%程度のSDSが配合されていると思われるが、個々の商品により配合成分や配合量は異なっている。

発泡剤にSDSを使用していればイソプロパノール又は酢酸メタノール混合液により十分抽出されると思われるが、抽出を完全に行うために、またSDS

Fig. 3. Effect of SDS Concentration on the Extraction of Chlorhexidine Digluconate from Tooth Paste Model II

Extract with isopropanol (●) and methanol (▲).

を含まない製品でも抽出可能とするためにSDSを1%程度含んだ溶媒を使用することが望ましいと思われた。

4. 市販薬用歯磨中のクロルヘキシジンの定量

6検体(3製造会社)の薬用歯磨につきクロルヘキシジンをHPLC法及び比色法によって定量した。Table IVに比色法によって得られた値を100としたときのHPLC法による定量値の値を括弧内に示し、HPLC法と比色法による定量値の比較検討を行った。市販歯磨中に配合されたクロルヘキシジンがグルコン酸塩であれ塩酸塩であれ、SDS 1%含有のメタノール酢酸混液で抽出した時に最も高い定量値が得られ、また比色法による定量値との相関もよかつ

TABLE IV. Recovery of Chlorhexidine from Commercial Tooth Pastes

Tooth paste	Co.	Colorimetry	HPLC (I)		HPLC (II)	
		mg/100 g	mg/100 g	(%)	mg/100 g	(%)
a (HCl-CH.)	A	9.9	9.1	(91.9)	10.1	(102.0)
b (glu-CH.)	A	16.8	14.7	(87.5)	16.3	(97.0)
c (HCl-CH.)	B	4.8	4.2	(87.7)	5.1	(106.2)
d (glu-CH.)	B	—	5.3		5.2	
e (HCl-CH.)	C	19.0	12.9	(67.3)	19.6	(103.2)
f (glu-CH.)	C	10.4	8.7	(83.7)	10.3	(99.0)

HPLC (I) : extract with isopropanol.

HPLC (II) : extract with methanol acetic acid sol. containing SDS (1%).

た。なお検体 d は発色した赤色がすみやかに退色し定量できなかったが、HPLC 法ではいずれの抽出溶媒によってもほぼ等しい定量値を得ることが出来た。検体 d には反応を妨害する物質が含まれているためと思われた。検体 e は、発泡剤として SDS、石鹼以外の界面活性剤を使用している検体であり、イソプロパノールでは低い定量値であったが SDS 添加メタノール酢酸混液では比色法と同様な値が得られた。薬用歯磨からのクロルヘキシジンの抽出には、発泡剤に使用している界面活性剤が関与しており、SDS は抽出効果を高める重要な作用をしていることが認められた。SDS 以外の界面活性剤を使用している製品であっても、抽出液に SDS を添加することでよい回収率を得ることが出来た。

SDS 1% 添加のメタノール酢酸混液により抽出を行い、HPLC により定量を行った結果、6 検体中のクロルヘキシジンの含量はグルコン酸クロルヘキシジン (glu-CH.) では 5.2 mg/100 g—16.3 mg/100 g であり、塩酸クロルヘキシジン (HCl-CH.) では 5.1 mg/100 g—19.6 mg/100 g であった。歯磨中へのクロルヘキシジンの配合量は粘膜面との接触か

ら、一般化粧品への配合基準より少ないことが望まれるが、今回定量を行った 6 検体中のクロルヘキシジン含量はいずれも一般化粧品への配合上限 (0.05%)³⁾ の半分以下であり、配合量を抑えようとする傾向がうかがえた。

ま と め

医薬部外品である薬用歯磨には、殺菌剤としてクロルヘキシジンを配合している製品が多い。アルカリ性臭素溶液による比色法では、定量値にバラツキが生じるため、HPLC による定量方法を検討した。SDS を 1% 含有するメタノール酢酸混液で抽出し、逆相カラムを用い、イオンペア試薬として DSA を用いることにより、共存物質の影響を受けずに良好な回収が得られた。

今回市販薬用歯磨中のクロルヘキシジン含量を HPLC 法によって定量したところ、含量はグルコン酸塩では 5.2 mg/100 g—16.3 mg/100 g、塩酸塩では 5.1 mg/100 g—19.6 mg/100 g であった。また比色法によっては定量できなかった製品も HPLC 法による定量が可能となり、本法の有用性が示された。

引 用 文 献

- 1) 坂上吉一, 横山 浩, 小瀬洋喜, 衛生化学, **29**, 342 (1983).
- 2) 厚生省, 薬発第 755 号 (1985).
- 3) 厚生省, 厚生省告示第 221 号 (1982).
- 4) A. Holbrook, *J. Pharmacol.*, **10**, 370 (1958).
- 5) B. Stuber, D. Casagrande, *J. Chromatogr.*, **109**, 193 (1975).
- 6) C. Huston, P. Wainwright, M. Cooke, *J. Chromatogr.*, **237**, 457 (1982).
- 7) 森謙一郎, 植田忠彦, 西田茂一, 吉原武俊, 都衛研年報, **32-1**, 107, (1981).
- 8) B.W. Bukanski, M.O. Masse, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **6**, 283 (1984).
- 9) L.E. Stevens, J.R. Durrwachter, D.O. Helton, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 83 (1986).
- 10) 阿部龍二, 相本健次, “化粧品科学ガイドブック,” 日本化粧品技術者会編, 薬事日報社, 1979.