

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) による 清浄綿中クロルヘキシジンの分析法の開発

宮本紫織 井上 智 岡 裕三 小笠原光憲 大瀬戸光明 井上博雄

Determination of Chlorhexidine in Clean Cotton by Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)

Shiori MIYAMOTO, Satoshi INOUE, Yuuzou OKA
Mitsunori OGASAWARA, Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUE

Determination of chlorhexidine in clean cotton by Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) was investigated.

As chlorhexidine is a strong dicationic base, it was able to be separated by HILIC having the property of cation exchange.

By optimizing condition, excellent peak resolution was achieved without any ion-pairing reagents. The condition of HPLC was as follows : column, HILIC column (150mm×4.6mm i.d.) ; mobile phase, 50mM ammonium formate (pH 3.0)-acetonitrile (20 : 80) ; flow rate, 0.5ml/min ; column temperature, 35 °C ; detection wavelength, 259nm. And the best recovery was obtained with mobile phase.

The standard concentration curve was linear in the range of 1-100 μ g/ml ($r=1.000$). The recovery in clean cotton was more than 96.0% and relative standard deviation was less than 0.6%.

Keywords : Chlorhexidine, HPLC, HILIC, clean cotton

はじめに

近年、細菌に関する問題が多発する中、清潔志向が一層高まり、それに伴い抗菌加工製品及び消毒薬等への関心が増大している。クロルヘキシジン (CH) は広い抗菌スペクトルを有するため、医薬品、医薬部外品、化粧品等多くの製品に使用されている。しかし、CHの副作用として、まれに接触性皮膚炎や発疹等の過敏症状を発症することが報告されており、化粧品中に配合できるCHの使用上限濃度は使用部位により各々定められ、医薬品や医薬部外品においても製品に定められた注意書きを記載することが義務づけられている。

CHの高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法として、すでにODSカラムを用いた方法が報告されている^{1~3)}。しかしODSカラムを用いる場合、移動相にイオンペア試薬を用いるため機器及びカラムの保守管理が複雑となり、製品の日常的な品質管理を行うにあたって、多くの

時間と労力を要する。

一方、汎用性の高い逆相クロマトグラフィーとは異なった分離手法として、近年、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) が注目されてきている⁴⁾。HILICモードでは極性の高い固定相及び有機溶媒含量の高い移動相を用い、親水性相互作用とイオン交換作用により、高極性化合物等に対し非常に良好な分離を示す。

今回、CHが強塩基性であるという性質に着目し、新たにHILICモードによる分析法を開発したので報告する。

材料と方法

1 装置

高速液体クロマトグラフはAlliance 2695 (Waters社) を、フォトダイオードアレイ検出器は2996 PDA (Waters社) を用いた。

2 HPLC条件

カラム ; AtlantisTM HILIC Silica (5 μ m, 150mm×4.6mm i. d)

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町 8 丁目234番地

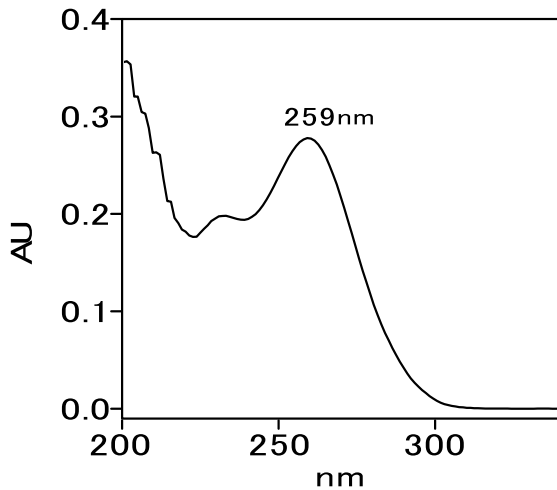


図1 クロルヘキシジンの吸収スペクトル

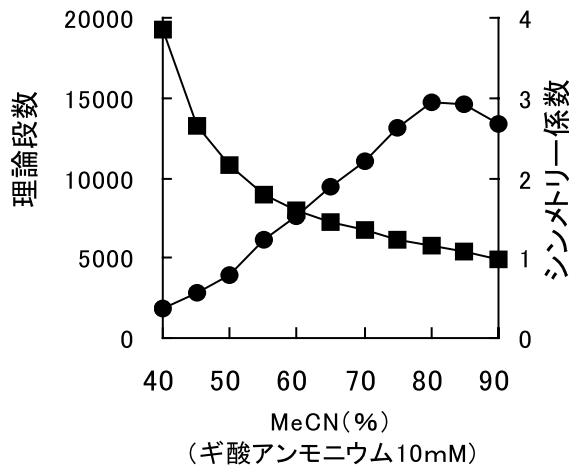


図3 アセトニトリル濃度と理論段数及びシンメトリー係数の関係
●:理論段数, ■:シンメトリー係数

(Waters社)

移動相: 50mMギ酸アンモニウム (pH 3.0): アセトニトリル (2:8)

流速: 0.5ml/min

検出波長: 259nm

カラム温度: 35℃

注入量: 10 μ l

3 試薬

20%グルコン酸クロルヘキシジン (CHG) 液は和光純薬工業株式会社製試薬特級を使用した。CH標準品は、「薬事法第14条第1項の規定に基づく承認不要医薬部外品基準」(承認不要医薬部外品基準)に基づき20% CHG液から再結晶精製後、融点を測定して132~134℃のものをういた。アセトニトリルはナカライテスク株式会社製高速液体クロマトグラフ用を、ギ酸は和光純薬工業株式会

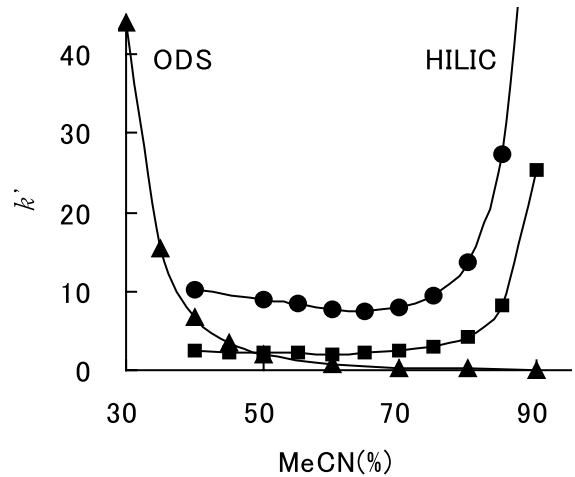


図2 アセトニトリル濃度と k' の関係

▲:過塩素酸ナトリウム ●:酢酸アンモニウム, ■:ギ酸アンモニウム,

HPLC条件A: カラム: TSK-gel ODS-80TS QA (5 μ m, 150mm \times 4.6mm i.d), 添加試薬: 50mM過塩素酸ナトリウム (アセトニトリルと混合後の全移動相における濃度), カラム温度: 40℃, 流速: 0.8ml/min

HPLC条件B: カラム: AtlantisTM HILIC Silica (5 μ m, 150mm \times 4.6mm i.d), 添加試薬: 10mM酢酸アンモニウム又は10mMギ酸アンモニウム (アセトニトリルと混合後の全移動相における濃度), カラム温度: 40℃, 流速: 1.0ml/min

社製試薬特級を、ギ酸アンモニウムはナカライテスク株式会社製試薬特級を使用した。

標準液は、CH標準品を105℃で2時間乾燥した後精析し、移動相で25mg/100mlの標準原液を調製した。さらに、移動相にて適宜希釈し、標準液を調製した。

4 実験試料

「承認不要医薬部外品基準」の製法に基づき、日本薬局方CHG液を水で希釈することにより0.02%のCHG液を調製し、その10.0mlを医療用脱脂綿1.5gに湿潤させ、ポリエチレン製の容器に密封し、121℃、15分の高圧蒸気法により滅菌して製したものを使用した。

5 実験操作

試料を開封し、内容物を50mlビーカーに移した後、容器を約10mlの移動相で3回洗浄し、ビーカーに合わせ10分間超音波処理にて溶出した。これを50mlメスフラスコに10mlガラス製注射器で圧縮抽出し、ビーカー及び脱脂綿を移動相で共洗いしながら正確に50mlとした。さらに、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを試験溶液とした。

結果及び考察

1 HPLC測定条件の検討

(1) 移動相の検討

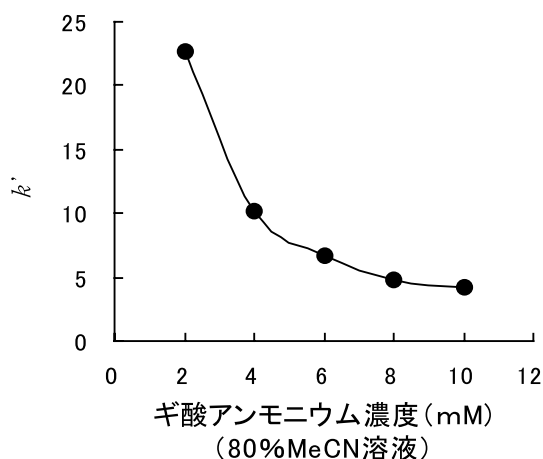


図4 移動相中のギ酸アンモニウム濃度と k' の関係

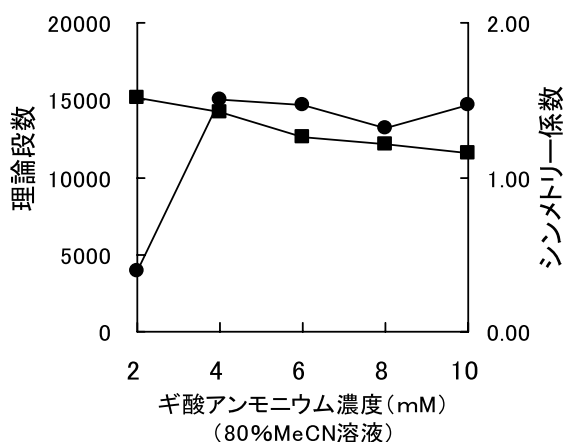


図5 移動相中のギ酸アンモニウム濃度と理論段数及びシンメトリー係数の関係
●；理論段数，■；シンメトリー係数

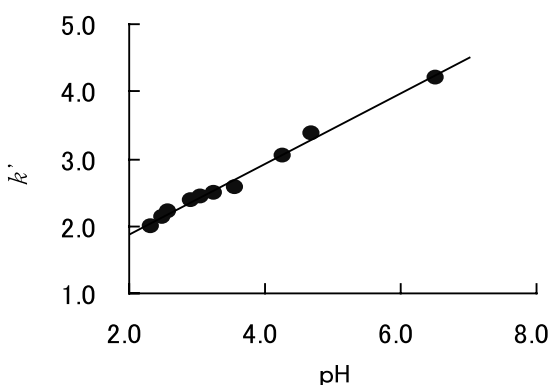


図6 移動相中のpHと k' の関係

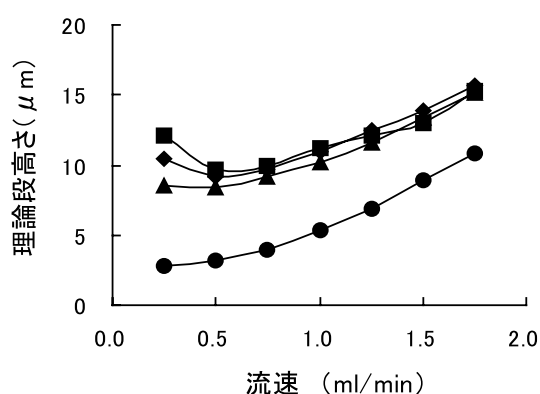


図7 移動相の流速及びカラム温度と理論段高さの関係
カラム温度：■：45℃，◆：40℃，▲：35℃，●：30℃

まず、CH標準液について、200～340nmにおける吸収スペクトルを測定した。そのスペクトルパターンを図1に示す。CHの吸収極大波長は259nmであったことからこれを測定波長とした。

次に移動相を検討するためにアセトニトリル-水系について、HILICカラムと一般的に汎用されているODSカラムを用いてHPLC法を行い、容量比 (k') を求めた。その結果を図2に示す。ODSカラムを用いた場合、有機溶媒含量が低いほどカラムに保持されたが、HILICカラムは親水性の物質及びカチオン性物質を保持する性質があるため、有機溶媒含量が高くなるほど k' が大きくなり保持された。HILICモードにおいてギ酸アンモニウムと酢酸アンモニウムを検討した結果、ギ酸アンモニウムは k' が10以内と分析に適しており、移動相にはギ酸アンモニウムを添加することとした。

また、移動相中のギ酸アンモニウム濃度を10mMと

し、アセトニトリル濃度を变化させたときの理論段数 (N) 及びシンメトリー係数 (S) を求めた結果を図3に示す。Sは、アセトニトリル濃度が高くなるほど1に近づき、左右対称性の優れたピークとなった。Nは、アセトニトリル濃度が80%の時に最大値となり、良好なピーク形状であったことから、移動相中のアセトニトリル濃度は80%とした。

次に、移動相のアセトニトリル80%溶液中のギ酸アンモニウム濃度を变化させたときの k' を求めた結果を図4に示す。その時のNとSを求めた結果を図5に示す。ギ酸アンモニウム濃度を高くするほど k' が小さくなり、CHは早く溶出した。Sは、ギ酸アンモニウム濃度が高くなるほど1に近づき、左右対称性の優れたピークとなった。Nについてはギ酸アンモニウム濃度を2mMまで下げると極端に小さな値となったがそれより高い濃度では大差もなく良好なピーク形状であった。そこで、移動相に添

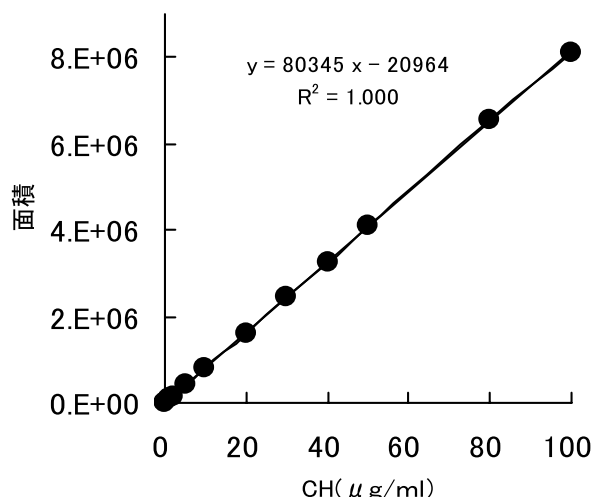


図8 クロルヘキシジンの検量線

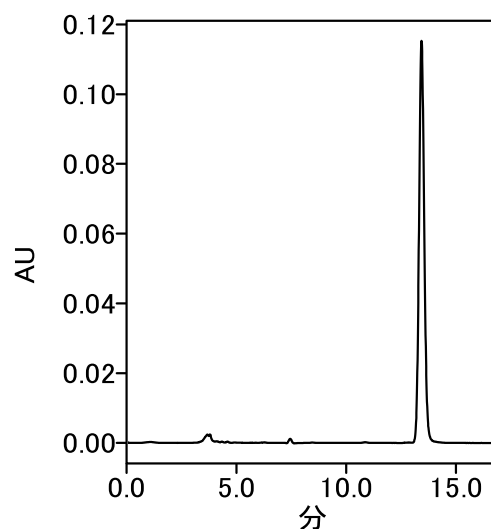


図9 清浄綿中のクロルヘキシジンのクロマトグラム

表1 添加回収実験結果

	吸光度法			HPLC法	
	添加量 (mg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
滅菌清浄綿	2.0	99.3	0.5	96.0	0.6
滅菌前清浄綿	2.0	100.7	0.5	99.9	0.2

(n = 6)

加するギ酸アンモニウム濃度はカラムに使用できる最大濃度である10mMとした。さらに、移動相のpHについて検討した結果を図6に示す。pHを下げるほどほぼ直線的に k' は減少したが、ギ酸のpKaが3.74であることを考慮し、移動相の緩衝性を保つため、移動相のpHは3.0とした。

(2) カラム温度及び移動相の流速の検討

さらに最適条件を求めるため、カラム温度及び移動相の流速の検討を試みた。移動相の流速とカラム温度を変化させたときの理論段高さの関係を図7に示す。カラム温度を低くするほど理論段高さは小さくなり良好なピーク形状が得られたが、カラム温度を25℃以下に一定に保つことは困難であることから、カラム温度は35℃とした。その時の最適流速は0.5ml/minであったことからこれを移動相の流速とした。

(3) 検量線

前述の測定条件で検量線を作成した結果を図8に示す。CHは1.0~100 μg/mlの範囲で相関係数1.000の原点を通る直線性を示した。

2 添加回収実験

本法の実製品に対する適応性を確認するため、「承認不要医薬部外品基準」の製法に基づき清浄綿を作製し、回収率を測定した。予め抽出溶媒についても検討を試みた結果、アセトニトリル濃度が高くpHが低いほど抽出率が向上することが確認された。しかし、一般的にHPLCに注入する試料溶液は移動相と同一あるいは移動相より溶出力の小さな少量の溶媒に溶解するのが望ましいとされている⁵⁾。このため、移動相を抽出溶媒として回収率を測定した。すでに森¹⁾らによってCHは蒸気圧滅菌等の高温で分解する事が報告されているため、試料は蒸気圧滅菌を施していない清浄綿及び蒸気圧滅菌を施した清浄綿を作製し測定した。その時のクロマトグラムを図9に、添加回収実験の結果を表1に示す。その結果、回収率は96.0%以上、相対標準偏差は0.6%以下と大変良好な結果であったことから、移動相が抽出溶媒として適している事が確認された。また、従来法及び今回開発したHPLC法の相関関係は大変良好であった。これらのことから、今回開発したHILICによる定量は再現性及び操作性に優れ、実試料においても十分適応できることが明らかとなった。

ま と め

CHをHILICにより分離・定量した結果、次のようなことが明らかとなった。

- 1 k' , 理論段数, シンメトリー係数, 理論段高さを相互的に勘案し, 最適移動相として50mMギ酸アンモニウム (pH3.0) : アセトニトリル (2 : 8) を選択した。
- 2 流速及びカラム温度の最適条件は, それぞれ0.5ml/min 及び35℃であった。
- 3 検量線は, 1.0~100mg/mlの範囲で相関係数1.000 の良好な直線性を示した。
- 4 清浄綿を作製し, 添加回収実験を行なったところ, 回収率及び相対標準偏差はそれぞれ96.0%以上及び

0.6%以下と大変良好な結果であり, 抽出溶媒として移動相が適していることが確認された。また, 従来法との相関は良好であった。

文 献

- 1) 森 譲一郎ほか:東京衛研年報, 32-1, 107-109 (1981)
- 2) 春山 道子ほか:衛生化学, 41 (5), 367-374 (1995)
- 3) 岸 美智子ほか:衛生化学, 35 (1), 49-54 (1989)
- 4) B. A. Olsen: J. Chromatogr, A, 913, 113-122 (2001)
- 5) (社)日本分析化学会関東支部: 高速液体クロマトグラフィーハンドブック (2002)