

イミノクタジンアルベシル酸塩及びイミノクタジン酢酸塩

(1) 装置

ポストカラム反応蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフを用いる。

(2) 試薬試液

アセトニトリル、塩化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、乳酸、ニンヒドリン、ブタノール、ヘキサン、メタノール、硫酸、リン酸一カリウム：試薬特級

トリエチルアミン：純度 99%以上のもの

CBA シリカゲルミニカラム：内径 15mm、長さ 65mm のカラムにカラムクロマトグラフィー用 CBA シリカゲル（シリカゲルにカルボキシメチル基を化学的に結合させたもの）1000mg を充てんしたものの又はこれと同等の性能を有するもの

水：蒸留水又は精製水

過塩素酸ナトリウム溶液：過塩素酸ナトリウム 14.1g、水酸化ナトリウム 400mg 及び乳酸 1.8mL に水を加えて 1L としたもの

トリエチルアミン溶液：水酸化ナトリウム 40g 及びトリエチルアミン 0.75mL に水を加えて 1L としたもの

発蛍光液：ニンヒドリン 3g に水 1L を加えて溶かしたもの

リン酸緩衝溶液（pH6）：リン酸一カリウム 2.713g を水 1L に溶かした溶液 400mL と、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液 7mL を混和し、pH を 6 に調整したもの

イミノクタジン酢酸塩標準品

(3) 試験溶液の調製

ア 抽出

試料 200mL を 500mL の分液漏斗に量り取り、トリエチルアミン 0.15mL 及び水酸化ナトリウム 8g を加える。この溶液に塩化ナトリウム 5g 並びにブタノール及びヘキサンの混液（1:1）100mL を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振とうし、暫時放置した後、有機溶媒層を分取する。残った水層についても、ブタノール及びヘキサンの混液（1:1）100mL を加え、同様の振とう及び分取の操作を繰り返す。全有機溶媒層を 500mL の分液漏斗に合わせる。

イ 濃縮

水 30mL 及び 1mol/L 硫酸 2mL を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振とうし、暫時放置した後、水層を分取する。残った有機溶媒層についても、水 20mL 及び 1mol/L 硫酸 0.5mL を加え、同様の振とう及び分取の操作を繰り返す。全水層を 500mL のナス型フラスコに合わせ、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 40 以下で 2mL に濃縮する。この濃縮液にリン酸緩衝液 5mL を加えた後、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH6 に調整する。

ウ カラムクロマトグラフィー

あらかじめ、CBA シリカゲルミニカラムにメタノール 5mL 及び水 5mL を流し入れ、洗浄しておく。これにナス型フラスコ中の溶液を流し入れ、リン酸緩衝液 5mL で展開し、流出液を捨てる。次いで 0.1mol/L 塩酸メタノール溶液 10mL で展開し、溶出液を 50mL のナス型フラスコに取り、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 40 以下で有機溶媒を留去する。この残留物に過塩素酸ナトリウム溶液及びアセトニトリルの混液（17:5）2mL を加えて溶解し、試験溶液とする。

(4) 高速液体クロマトグラフの操作条件

充てん剤：シリカゲルにオクタデシルシランを化学的に結合させたものを用いる。

カラム：内径 2～6mm、長さ 15～30cm のステンレス管を用いる。

カラム槽温度：50

溶離液：過塩素酸ナトリウム溶液及びアセトニトリルの混液 (17:5) を用い、イミノクタジン酢酸塩から誘導化される蛍光体が 10～15 分で流出するように流速を調整する。

検出器：励起波長 395nm、けい光波長 500nm で測定する。

蛍光反応槽：溶離液に対し、0.5mol/L 水酸化ナトリウム溶液及び発蛍光液を一定量注入する。

蛍光反応槽温度：60

感度：イミノクタジンの 0.5ng から誘導される蛍光体の相当量が十分確認できるように感度を調整する。

(5) 検量線の作成

イミノクタジン酢酸塩標準品よりイミノクタジンとして 200mg/L のメタノール溶液を調製し、この溶液を過塩素酸ナトリウム溶液及びアセトニトリルの混液 (17:5) で希釈して 0.025～1 mg/L 溶液を数点調製し、それぞれを 20 μL ずつ高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高又はピーク面積を測定しイミノクタジンの検量線を作成する。

(6) 定量試験

試験溶液から 20 μL を取り、高速液体クロマトグラフに注入し、(5)の検量線によりイミノクタジンの重量を求め、これに基づき、試料中のイミノクタジンの濃度を算出する。