

ジラムの測定方法

(1) 装置

紫外分光光度型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

エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム、L-システイン塩酸塩、水酸化ナトリウム、硫酸水素テトラブチルアンモニウム、塩酸、ヘキサン、クロロホルム、ヨウ化メチル：試薬特級又はこれと同等のもの

水：蒸留水又は精製水

EDTA-システイン溶液：エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム25.0gとL-システイン塩酸塩25.0g、水酸化ナトリウム12.5gを500mLメスフラスコに取り、水を標線まで正確に測り、調整したもの

アルミナミニカラム：内径9mm、長さ62mmのカラムにカラムクロマトグラフィー用中性アルミナ1000mgを充てんしたもの又はこれと同等の性能を有するもの

C₁₈ シリカゲルミニカラム：内径8mm、長さ28mmのカラムにカラムクロマトグラフィー用C₁₈シリカゲル(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)200mgを充てんしたもの又はこれと同等の性能を有するもの

ジラム標準品

(3) 試験溶液の調製

ア 抽出、メチル化

試料20mLを100mLの分液漏斗に量り取り、EDTA・システイン溶液20mLを加えて振とう機を用いて20分間振とうする。その後試料溶液に0.4M硫酸水素テトラブチルアンモニウム水溶液1mL、2M塩酸3.5mL、ヨウ化メチル20μL、ヘキサン及びクロロホルムの混液(1:3)40mLを加え、30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、同混液30mL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200mLのナス型フラスコに合わせる。

イ 濃縮

L-システイン塩酸塩0.02gを加え、すり合わせ減圧濃縮器を用いて40°C以下で溶媒を留去する。この残留物に水5mLを加えて溶解する。

ウ カラムクロマトグラフィー

あらかじめ、C₁₈ シリカゲルミニカラムにアセトニトリル5mL、次いで水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、水5mLで展開し、流出液を捨てる。次いでアセトニトリル5mLで展開し、溶出液を50mLナス型フラスコに取る。あらかじめ、アルミナミニカラムにアセトニトリル5mLを流し入れ、アセトニトリル30mLで展開し、溶出液を100mLナス型フラスコに取り、L-システイン塩酸塩0.02gを加え、すり合わせ減圧濃縮器を用いて40°C以下で溶媒を留去する。この残留物にメタノール及び水(50:50)の混液で抽出し、10mLメスフラスコに取って定容し、試験溶液とする。

(4) 高速液体クロマトグラフの操作条件

充填剤：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：40°C

溶離液：メタノール及び水の混液(55:45)を用い、ジラムから誘導されるジメチルジチオカルバミン酸メチル(以下「DMDCメチル」という)が4~6分で流出するように流速を調整する。

検出器：波長272nmで測定する。

感度:ジラムの1ngから誘導されるDMDCメチル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

ジラム標準品よりEDTA・システイン溶液を用いて20mg/Lのジラム溶液を調製し、この50 μ L～400 μ Lをそれぞれ100mL分液漏斗にとり、EDTA・システイン溶液20mLを加え、振とう機を用いて20分間振とうする。その後試料溶液に0.4M硫酸水素テトラブチルアンモニウム水溶液1mL、2M塩酸3.5mL、ヨウ化メチル20 μ L、ヘキサン及びクロロホルムの混液(1:3)40mLを加え、30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、同混液30mL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200mLのナス型フラスコに合わせ、L-システイン塩酸塩0.02gを加え、すり合わせ減圧濃縮器を用いて40 $^{\circ}$ C以下で溶媒を留去する。この残留物に水5mLを加えて溶解する。

あらかじめ、C₁₈ シリカゲルミニカラムにアセトニトリル5mL、次いで水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、水5mLで展開し、流出液を捨てる。次いでアセトニトリル5mLで展開し、溶出液を50mLナス型フラスコに取る。

あらかじめ、アルミナミニカラムにアセトニトリル5mLを流し入れ、アセトニトリル30mLで展開し、溶出液を100mLナス型フラスコに取り、L-システイン塩酸塩0.02gを加え、すり合わせ減圧濃縮器を用いて40 $^{\circ}$ C以下で溶媒を留去する。この残留物にメタノール及び水(50:50)の混液で抽出し、10mLメスフラスコに取って定容する。

上記操作に用いるジラム溶液を50 μ L～400 μ Lに変量することによりジラム0.05～0.4mg/Lから誘導されるジメチルジチオカルバミン酸メチル溶液を数点調製し、それぞれ20 μ L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検量線を作成する。

(6) 定量試験

試験溶液から20 μ Lを取り、高速液体クロマトグラフに注入し、(5)の検量線によりジラムの重量を求め、これに基づき、試料中のジラムの濃度を算出する。