

ホラムスルフロンの測定方法

(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

メタノール、アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用又はこれと同等のもの

リン酸、トルエン：特級

水：蒸留水又は精製水

固相抽出カラム：内径9mm、長さ65mm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)500mgを充てんしたもの又はこれと同等の性能を有するもの

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シリカゲル500mgを充てんしたもの又はこれと同等の性能を有するもの

ホラムスルフロン標準品

(3) 試験溶液の調製

抽出

試料200mLを1000mLの三角フラスコに測り取り、2Nリン酸でpH2.5に調整する。あらかじめメタノール5mL、次いで水5mLを流し入れ洗浄した固相抽出カラムに毎分10～20mLの流速で流し入れ、ガラス容器を40mLの水で洗い同様に固相抽出カラムに流し入れ、約5分間吸引を続け水分を除去する。メタノール5mL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℃以下で溶媒を留去する。

精製

この残留物をトルエン20mLに溶解する。あらかじめトルエン5mLを流し入れ洗浄したシリカゲルミニカラムに毎分10～20mLの流速で流し入れ、溶出液は廃棄する。シリカゲルミニカラムが乾燥するまで吸引する。ガラス容器をトルエン/メタノール(95:5, v/v)30mLで洗い展開し、溶出液を100mL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℃以下で溶媒を留去する。

残留物をアセトニトリル/水(1/1, v/v)2mLに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

カラム：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内径2～6 mm、長さ15～30 cmのステンレス管に充てんしたもの又はこれと同等の分離性能を有するものを用いる。

カラム槽温度：温度16℃

溶離液：10mmol/Lリン酸溶液及びアセトニトリルの混液(80:20)から(50:50)までの濃度勾配を10分間で行い、そのまま10分間維持し、次に同混液(50:50)から(20:80)までの濃度勾配を5分間で行い、そのまま2分間維持する。ホラムスルフロンが19～21分で流出するように流速を調整する。

検出器：波長233nmで測定する。

感度：ホラムスルフロンの1ng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

ホラムスルフロン標準品より1000mg/Lのアセトニトリル及び水の混液(1:1)溶液を調製し、この溶液をアセトニトリル及び水の混液(1:1)で希釈して0.1～2 mg/L溶液を数点調製し、それぞれを100 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ホラムスルフロンの検量線を作成する。

(6) 定量試験

試験溶液から100 μLを取り、高速液体クロマトグラフに注入し、(5)の検量線によりホラムスルフロンの重量を求め、これに基づき、試料中のホラムスルフロンの濃度を算出する。