

セフチオフル試験法

1. 分析対象化合物

セフチオフル、デスフロイルセフチオフル

2. 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。

3. 試薬・試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

ジチオエリスリトール ジチオエリスリトール (特級)

ジチオエリスリトール・ホウ酸緩衝液 塩化カリウム3.7 g, ジチオエリスリトール4.0 g及びホウ酸ナトリウム19.0 gを水1,000 mLに溶かす。

ヨウ化アセトアミド ヨウ化アセトアミド (1級)

ヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液 ヨウ化アセトアミド7.0 gをリン酸緩衝液 (pH 7) 50 mLに溶かす。

4. 標準品

セフチオフル 本品は塩酸セフチオフル99%以上を含む。

5. 標準溶液の調製

a デスフロイル化法

標準品にジチオエリスリトール・ホウ酸緩衝液15 mLを加え、50°Cの水浴中で15分間振とうする。これにヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液3 mLを加え、振り混ぜた後、室温で30分間放置する。これに5%リン酸を加えてpH 2.5に調整し、4°Cに冷却する。

b 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に、メタノール5 mL及びリン酸緩衝液 (pH 7) 5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにa デスフロイル化法で得られた溶液を注入した後、リン酸緩衝液 (pH 7) 5 mL及び0.01 mol/L水酸化ナトリウム溶液3 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにアセトニトリル及び水の混液 (2 : 8) 3 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でアセトニトリル及び水を除去する。この残留物にアセトニトリル、トリフルオロ酢酸及び水の混液 (300 : 1 : 700) 1.0 mLを加えて溶かし、これを標準溶液とする。

6. 試験溶液の調製

a 抽出法及びデスフロイル化法

(1) 筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓の場合

筋肉の場合は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

脂肪の場合は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

肝臓及び腎臓の場合は、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

これにジチオエリスリトール・ホウ酸緩衝液70 mLを加え、細砕した後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行う。水層15 mLを採り、50°Cの水浴中で15分間振とうする。これにヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液3 mLを加え、振り混ぜた後、室温で30分間放置する。これに5%リン酸を加えてpH 2.5に調整し、4°Cに冷却した後、上記と同様の条件で遠心分離を行う。水層を採り4°Cに冷却する。

(2) 乳の場合

試料5.00 gを量り採り、ジチオエリスリトール・ホウ酸緩衝液10 mLを加え、1 mol/l水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 9.0に調整する。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行う。水層を採り、50°Cの水浴中で15分間振とうする。これにヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液3 mLを加え、振り混ぜた後、室温で30分間放置する。これに5%リン酸を加えてpH 2.5に調整し、4°Cに冷却した後、上記と同様の条件で遠心分離を行う。水層を採り4°Cに冷却する。

b 精製法

a 抽出法及びデスフロイル化法で得られた溶液に 5. 標準溶液の調製のb 精製法と同様の操作を行い、これを試験溶液とする。

7. 操作法

a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準溶液と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 µm）を用いる。

カラム管 内径4.0~6.0 mm, 長さ150 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40°C

検出器 吸光波長266 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル, トリフルオロ酢酸及び水の混液 (300 : 1 : 700) を用いる。デスフロイルセフチオフルが約7分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

8. 定量限界

0.05 mg/kg (デスフロイルセフチオフルとして)

9. 留意事項

(1) 試験溶液の調製

(1) 精製法において用いるオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムは、予めデスフロイル化したセフチオフル標準品を用いて、その保持、溶出性能及び精製効果を確認すると共に、定量限界が0.05 mg/kg以下であることを確認すること。

また、セフチオフル標準品を用いて添加・回収試験を行い、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの精製効果、回収率(80~110%)を確認すること。

(2) (1)の性能を有するミニカラムが入手困難な場合は、「○セフチオフル試験法の別法(250ページ参照)」を用いること。

(2) 標準溶液の調製

(1) セフチオフル12.2 mgに相当する標準品をメタノールに溶解して100 mLとし、セフチオフル標準原液とすること(デスフロイルセフチオフル100 mg/l)。本標準原液は、0~4℃保存で3か月間安定であること。

(2) セフチオフル各標準原液を水で遙減希釈した後、デスフロイル化法及び精製法により得られた溶液を検量線作成用標準溶液とすること。

10. 参考文献

なし

11. 類型

A

○セフチオフル試験法の別法

1. ~ 4. (セフチオフル試験法の1. ~ 4. を参照)

5. 標準溶液の調製

a デスフロイル化法

標準品にジチオエリスリトール・ホウ酸緩衝液15 mLを加え、50℃の水浴中で15分間振とうする。これにヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液3 mLを加え、振り混ぜた後、室温で30分間放置する。これを、4℃に冷却する。

b 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (350 mg) に、メタノール5 mL及びリン酸緩衝液 (pH 7) 5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに a デスフロイル化法で得られた溶液を注入した後、リン酸緩衝液 (pH 7) 5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにメタノール及び水の混液 (2 : 8) 5 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でメタノール及び水を除去する。この残留物にメタノール及び水の混液 (2 : 8) 1.0 mLを加えて溶かし、これを標準溶液とする。

6. 試験溶液の調製

a 抽出法及びデスフロイル化法

(1) 筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓の場合

筋肉の場合は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

脂肪の場合は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

肝臓及び腎臓の場合は、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

これにジチオエリスリトール・ホウ酸緩衝液70 mLを加え、細砕した後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行う。水層15 mLを採り、50°Cの水浴中で15分間振とうする。これにヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液3 mLを加え、振り混ぜた後、室温で30分間放置する。これを4°Cに冷却した後、上記と同様の条件で遠心分離を行う。水層を採り4°Cに冷却する。

(2) 乳の場合

試料5.00 gを量り採り、ジチオエリスリトール・ホウ酸緩衝液10 mLを加え、1 mol/l水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 9.0に調整する。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行う。水層を採り、50°Cの水浴中で15分間振とうする。これにヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液3 mLを加え、振り混ぜた後、室温で30分間放置する。これを4°Cに冷却した後、上記と同様の条件で遠心分離を行う。水層を採り4°Cに冷却する。

b 精製法

a 抽出法及びデスフロイル化法で得られた溶液に 5. 標準溶液の調製の b 精製法と同様の操作を行い、これを試験溶液とする。

7. (セフチオフル試験法の 7. を参照)