

头孢噻呋检测方法

1. 分析目标化合物

头孢噻呋、脱呋喃甲酰基头孢噻呋

2. 仪器设备

带紫外分光光度检测器的高效液相色谱仪。

3. 试剂

除下列试剂外，使用附录2所列试剂。

二硫赤藓醇：特级

二硫赤藓醇—硼酸缓冲液：将3.7g氯化钾、4.0g二硫赤藓醇和19.0g硼酸钠溶解在1,000mL水中。

碘乙酰胺：一级

碘乙酰胺—磷酸缓冲液：将7.0g碘乙酰胺溶解50mL磷酸缓冲液(pH7)中。

4. 标准品

头孢噻呋：含盐酸头孢噻呋99%以上。

5. 标准溶液的制备

a 脱呋喃甲酰基化方法

标准品中加入15mL二硫赤藓醇—硼酸缓冲液，50℃水浴中振荡15分钟。加入3mL碘乙酰胺—磷酸缓冲液，振荡混合后，室温下放置30分钟。加入5%磷酸，调节pH2.5，4℃下冷却。

b 净化方法

在十八烷基甲硅烷基化硅胶小柱(1000mg)中依次注入5mL甲醇和5mL磷酸缓冲液(pH7)，弃去流出液。柱中注入a脱呋喃甲酰基化方法所得的溶液后，顺次注入5mL磷酸缓冲液(pH7)和3mL0.01mol/L氢氧化钠溶液，弃去流出液。柱中注入3mL乙腈：水(2：8)混合溶液，收集流出液于磨口减压浓缩器中。40℃以下除去乙腈和水。残留物中加入1.0mL乙腈：三氟乙酸：水(300：1：700)混合溶液溶解，此为标准溶液。

6. 试验溶液的制备

a 提取方法和脱呋喃甲酰基化方法

① 肌肉、脂肪、肝脏和肾脏

肌肉：尽可能除去脂肪层，搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

脂肪：尽可能除去肌肉层，搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

肝脏及肾脏：搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

加入二硫赤藓醇—硼酸缓冲液，搅拌均匀后，以每分钟3000转离心分离10分钟，收集15mL水层，50℃水浴中振荡15分钟。加入3mL碘乙酰胺—磷酸缓冲液，振摇混匀后，室温下放置30分钟。加入5%磷酸，调整pH2.5，4℃下冷却后，按上述同样条件离心分离。收集水层，在4℃下冷却。

② 奶

称取5.00g样品，加10mL二硫赤藓醇—硼酸缓冲液，加入1mol/L氢氧化钠溶液，调整pH9.0。用振荡器激烈振荡5分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟。收集水层，50℃水浴中振荡15分钟。加入3mL碘乙酰胺—磷酸缓冲液，振摇混匀后，室温下放置30分钟。加入5%磷酸，调整pH2.5，4℃下冷却后，按上述同样条件离心分离。收集水层，在4℃下冷却。

b 净化方法

将a 提取方法和脱呋喃甲酰基化方法所得的溶液按照5 标准溶液的制备中b 净化方法进行相同的操作，此为试验溶液。

7. 操作方法

a 定性试验

按下列操作条件进行试验。试验结果应与标准品的一致。

操作条件

柱填充剂：十八烷基甲硅烷基化硅胶（粒径 $5\mu\text{m}$ ）。

柱：内径4.0~6.0mm，长150mm的不锈钢管。

柱温：40℃

检测器：波长266nm。

流动相：乙腈：三氟乙酸：水(300：1：700)混合溶液。调整流速使脱呋喃甲酰基头孢噻呋约7分钟流出。

b 定量试验

根据与a 定性试验相同的操作条件所得的试验结果，峰高法或峰面积法定量。

8. 定量限

0.05 mg/kg（以脱呋喃甲酰基头孢噻呋计）

9. 注意事项

（1）试验溶液的制备

① 净化方法所用的十八烷基甲硅烷基化硅胶小柱，预先用脱呋喃甲酰基化的标准品确认其保持、溶出性能和净化效果时，确证定量限 0.05mg/kg 以下。另外，使用头孢噻呋标准品进行添加、回收试验，确认十八烷基甲硅烷基化硅胶小柱净化效果和回收率（80~110%）。

② 当获得小柱①的性能有困难时，可以采用“○头孢噻呋检测方法的其它方法”）。

（2）标准溶液的配制

①将相当于头孢噻呋12.2mg的标准品溶解在甲醇中至100mL，配成头孢噻呋标准原液（脱呋喃甲酰基头孢噻呋100mg / L）。该标准原液保存在0~4℃，3个月内稳定。

②用水递减稀释标准原液，将脱呋喃甲酰基化方法和净化方法所得的溶液配成制作标准曲线用的标准溶液。

10. 参考文献

无

11. 类型

A.

○ 头孢噻呋检测方法的其它方法

1. ~4. （参照头孢噻呋检测方法的1. ~4. ）

5. 标准溶液的制备

a 脱呋喃甲酰基化方法

标准品中加入15mL二硫赤藓醇—硼酸缓冲液，50℃水浴中振荡15分钟。加入3mL碘乙酰胺—磷酸缓冲液，振摇混合后，室温下放置30分钟。4℃下冷却。

b 净化方法

十八烷基甲硅烷基化硅胶小柱(350mg)中依次注入5mL甲醇和5mL磷酸缓冲液(pH7)，弃去流出液。柱中注入a 脱呋喃甲酰基化方法所得的溶液后，注入5mL磷酸缓冲液，弃去流出液。柱中注入5mL甲醇：水（2：8）混合溶液，收集流出液于磨口减压浓缩器瓶中，40℃以下除去甲醇和水。残留物中加入1.0mL甲醇：水（2：8）混合溶液溶解，此为标准溶液。

6. 试验溶液的制备

a 提取方法和脱呋喃甲酰基化方法

① 肌肉，脂肪，肝脏和脏肾

肌肉：尽可能除去脂肪层，搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

脂肪：尽可能除去肌肉层，搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

肝脏和肾脏：搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

加入70mL二硫赤藓醇—硼酸缓冲液，搅拌后，以每分钟3000转离心分离10分钟，收集15mL水层，50℃水浴中振荡15分钟。加入3mL碘乙酰胺—磷酸缓冲液，振摇混匀后，室温下放置30分钟。4℃下冷却后，按上述同样条件离心分离。收集水层，在4℃下冷却。

② 奶

称取5.00g样品，加10mL二硫赤藓醇—硼酸缓冲液，用1mol / L 氢氧化钠溶液调整pH9.0。用振荡器激烈振荡5分钟，以每分钟3000转离心分离10分钟。收集水层，50℃水浴中振荡15分钟。加入3mL碘乙酰胺—磷酸缓冲液，振摇混匀后，室温下放置30分钟。4℃下冷却后，按上述同样条件离心分离。收集水层，在4℃下冷却。

b 净化方法

将a 提取方法和脱呋喃甲酰基化方法所得的溶液按照5. 标准溶液的配制中b 净化方法进行相同操作，此为试验溶液。

7. （参照头孢噻呋检测方法的7. ）