

ベンジルペニシリン試験法

1. 分析対象化合物

ベンジルペニシリン

2. 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。

継代保存用培地 ペプトン，肉エキス，塩化ナトリウム，寒天等の組成からなる培地を用いる。

検査用平板 加温溶解後55℃に保持した試験用培地1,000 mLに試験菌液5 mLを加えて混合した後，8 mLを内径85 mmのペトリ皿に分注し，水平に保って凝固させる。

試験菌液 継代保存用培地で継代培養した*Bacillus stearothermophilus* var.*calidolactis* C-953の菌株を増殖用培地に接種し，55℃で6時間培養したものを試験菌液とする。

試験用培地 牛心臓浸出液，ペプトン，塩化ナトリウム，寒天等の組成からなる培地を用いる。

増殖用培地 酵母エキス，トリプトン，ブドウ糖等の組成からなる培地を用いる。

ディスク 直径10 mm，厚さ1.5 mmのバルブディスクを用いる。

リン酸緩衝液 (pH 6.0) リン酸一カリウム7.0 gを水500 mLに溶解し，リン酸二ナトリウム6.0 gを水500 mLに溶解したものを加えて混合する。

3. 標準品

ベンジルペニシリンナトリウム 本品はベンジルペニシリン1,650単位/mg以上を含む。

融点 本品の融点は129～130℃である。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

(1) 筋肉，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。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。

これに水30 mLを加え，細砕した後，0.17 mol/L硫酸5 mL及び5%タンゲステン酸ナトリウム溶液5 mLを加え，振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後，毎分3,500回転で5分間遠心分離を行い，水層を吸引ろ過する。沈澱に水20 mLを加え，振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後，上記と同様の条件で遠心分離を行い，水層を吸引ろ過する。ろ液を合わせて，25%塩化ナトリウム溶液8 mLを加える。

(2) 乳の場合

試料25 gを量り採り、水25 mL及び飽和エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液5 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、毎分3,500回転で5分間遠心分離を行い、水層を吸引ろ過する。ろ液に25%塩化ナトリウム溶液6 mLを加える。

b 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) に、アセトニトリル10 mL、水10 mL及び2%塩化ナトリウム溶液5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにa抽出法で得られた溶液を注入した後、2%塩化ナトリウム溶液10 mL及び水10 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 (4:1) 5 mLを注入し、流出液にアセトニトリル及び水の混液 (4:1) を加えて10 mLとし、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 定量試験

試験溶液5 mL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し、この残留物にリン酸緩衝液 (pH 6.0) 1.0 mLを加えて溶かす。この溶液をディスクに吸着させ、55°Cで17時間培養する。阻止円の直径を標準品と比較して定量を行う。

b 確認試験

薄層板は、ガラス板上に薄層クロマトグラフ用微結晶セルロースを0.1 mmの厚さに延ばしたものを使用する。試験溶液5 mL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し、この残留物にアセトン及び水の混液 (1:1) 1.0 mLを加えて溶かす。この溶液4 µlを薄層板につけ、アセトン、水及び1-ペンタノールの混液 (1:3:4) を展開用溶媒として上昇法により100 mm展開した後、風乾する。

薄層板を薄層が上になるようにして、角型ペトリ皿に入れる。加温溶解した後、55°Cに保持した試験用培地1,000 mLに試験菌液5 mLを加えて混和した溶液を、薄層板上に2 mmの厚さになるように分注し、水平に保って凝固させる。1時間放置した後、55°Cで17時間培養し、阻止円のRf値を標準品と比較する。

6. 定量限界

筋肉、肝臓及び腎臓 0.005 mg/kg, 乳 0.001 mg/kg

7. 留意事項

(1) 標準溶液の調製

(1) 標準品をリン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解して標準原液とすること (ベンジルペニシリン1,667,000単位/l, 1,000 mg/l)。本標準原液は、-20°C保存で1年間安定であること。

- (2) 標準原液をリン酸緩衝液 (pH 6.0) で通減希釈し、定量試験用標準溶液とすること。
- (3) 標準原液を50%アセトン溶液で通減希釈し、確認試験 (薄層クロマトグラフィー) 用標準溶液とすること。

8. 参考文献

なし

9. 類型

A