

## エトベンザニドの測定方法

### (1) 装置

ガスクロマトグラフ質量分析計又は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

アセトニトリル、アセトン、塩化ナトリウム、塩酸、ジエチルエーテル、ヘキサン、無水硫酸ナトリウム、りん酸：  
試薬特級又はこれと同等のもの

ジエチレングリコール ジエチレングリコール：純度 98%以上のもの

固相抽出カラム：内径 10 mm、長さ 10 mm のカラムにカラムクロマトグラフィー用スチレンジビニルベンゼン共  
重合体（ポリスチレン系ゲル、粒径 50  $\mu\text{m}$ ）265 mg 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 10 mm、長さ 25 mm のカラムにカラムクロマトグラフィー用シリカゲル 690 mg を  
充てんしたもの又はこれと同等の性能を有するもの

エトベンザニド標準品

4-エトキシメトキシ安息香酸標準品

### (3) 試験溶液の調製

#### A 法 溶媒抽出法

- 1) 試料 200 ml を 500 ml の分液漏斗に量り取り、塩化ナトリウム 10 g 及び n-ヘキサン 50 ml を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振とうし、暫時放置した後、n-ヘキサン層を分取する。残った水層についても、n-ヘキサン 50 ml を加え、同様の振とう及び分取の操作を繰り返す。全 n-ヘキサン層を 300 ml の三角フラスコに合わせ、無水硫酸ナトリウム 20 g を加え、時々振り混ぜながら 30 分間放置した後、300 ml のナス型フラスコ中にろ過する。使用した三角フラスコを n-ヘキサン 20 ml で洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗い、その洗液をナス型フラスコに合わせ、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 40  $^{\circ}\text{C}$  以下で溶媒を留去する。この残留物に n-ヘキサン 5 ml を加えて溶かす。
- 2) あらかじめ、シリカゲルミニカラムに n-ヘキサン 5 ml を流し入れ、洗浄しておく。これに A 法 1) の溶液を流し入れ、n-ヘキサン 15 ml、n-ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(19:1)5 ml、次いで n-ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(17:3)10 ml で展開し、初めの溶出液 20 ml は捨て、次の溶出液 10 ml を 100 ml 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  $^{\circ}\text{C}$  以下で溶媒を留去する。ガスクロマトグラフ質量分析計を用いる場合は、この残留物にアセトンを加えて溶かし、1 ml とする。高速液体クロマトグラフを用いる場合は、この残留物にアセトニトリル及び蒸留水の混液(3:2)を加えて溶かし、4 ml としてエトベンザニドの試験溶液とする。
- 3) 1)において残った水層を 500 ml の分液漏斗に移し、りん酸 1ml 及びジエチルエーテル 50 ml を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振とうし、暫時放置した後、ジエチルエーテル層を分取する。残った水層についても、ジエチルエーテル 50 ml を加え、同様の振とう及び分取の操作を繰り返す。全ジエチルエーテル層を 300 ml の三角フラスコに合わせ、無水硫酸ナトリウム 20 g を加え、時々振り混ぜながら 30 分間放置した後、300 ml のナス型フラスコ中にろ過する。使用した三角フラスコをジエチルエーテル 20 ml で洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗い、その洗液をナス型フラスコに合わせ、2%ジエチレングリコールアセトン溶液 0.5 ml を加え、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 40  $^{\circ}\text{C}$  以下で溶媒を留去する。この残留物に蒸留水及びアセトニトリルの混液(3:2)を加えて溶かし、2 ml として 4-エトキシメトキシ安息香酸の試験溶液とする。

## B 法 固相抽出法

- 1) 試料 500 ml に、2 mol/L 塩酸を加えて pH を 3.5 に調整する。これを、あらかじめアセトニトリル 5 ml、次いで蒸留水 5 ml を流し入れ洗浄した固相抽出カラムに毎分 10~20 ml の流速で流し入れる。使用した容器を蒸留水 20ml で洗い、その洗液を固相抽出カラムに同様に流し入れ、次いで蒸留水 10 ml を流し、流出液を捨てた後、約 10 分間吸引を続け水分を除去する。アセトニトリル 5 ml で展開し、溶出液を 10 ml のメスフラスコに取り、アセトニトリルを加えて 10 ml とする。この溶液の 4 ml を 100 ml のナス型フラスコに移し、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 40 °C 以下で溶媒を留去し、n-ヘキサン 5 ml を加えて溶かす。以下、この溶液について A 法の 2)と同様の操作を行う。
- 2) B 法 1)のメスフラスコから 4 ml を 100 ml のナス型フラスコに取り、2%ジエチレングリコールアセトン溶液 0.5 ml を加え、すり合わせ減圧濃縮器を用いて 40 °C 以下で溶媒を留去し、蒸留水及びアセトニトリルの混液(3:2)を加えて溶かし、2 ml として 4-エトキシメトキシ安息香酸の試験溶液とする。

### (4) 測定機器の操作条件

#### 1) ガスクロマトグラフ部

分離管:内径 0.2~約 0.7 mm、長さ 10~30 mm の溶融シリカ製の管の内面に 50 %フェニルメチルポリシロキサンを 0.1~1.5 µm の厚さで被覆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。

キャリアーガス 高純度窒素ガス又はヘリウムガスを用い、内径 0.2~約 0.7 mm の分離管に対して線速度を毎秒 20~40 cm とする。

試料導入部温度:スプリットレス方式の場合は 200~270 °C、コールドオンカラム方式の場合は 50~100°C 分離管槽昇温プログラム 50°Cで 2 分保ち、50~約 280 °Cの範囲で毎分 2~20°Cの昇温を行う。

検出部:質量分析計

インターフェース部温度 :200~270 °C

イオン源温度 :150 °C以上

測定質量数 :179、121、304、339

感度 :エトベンザニドの 0.4 ng が十分確認できるように感度を調整する。

#### 2) 高速液体クロマトグラフ

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填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 40 °C

溶離液:エトベンザニドの場合はアセトニトリル及び蒸留水の混液(3:2)を用い、エトベンザニドが約 10 分で、4-エトキシメトキシ安息香酸の場合は蒸留水、アセトニトリル及びリン酸の混液(6:4:0.01)を用い、4-エトキシメトキシ安息香酸が約 15 分で流出するように流速を調整する。

検出器:エトベンザニドの場合は波長 267 nm で、4-エトキシメトキシ安息香酸の場合は波長 250 nm で測定する。

感度:エトベンザニド又は 4-エトキシメトキシ安息香酸の 1 ng 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

#### I エトベンザニドの検量線の作成

##### 1) ガスクロマトグラフ質量分析計を用いる場合

エトベンザニド標準品の 0.2~4 mg/Lアセトン溶液を数点調製し、それぞれを 2 µl ずつガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、縦軸にピーク高、横軸に重量を取ってエトベンザニドの検量線を作成する。

2) 高速液体クロマトグラフを用いる場合

エトベンザニド標準品の 500 mg/L アセトニトリル溶液を調製し、この溶液を蒸留水及びアセトニトリルの混液(3:2)で希釈して 0.05~1 mg/L 溶液を数点調製し、それぞれを 20  $\mu$ l ずつ高速液体クロマトグラフに注入し、縦軸にピーク高、横軸に重量を取ってエトベンザニドの検量線を作成する。

II 4-エトキシメトキシ安息香酸の検量線の作成

4-エトキシメトキシ安息香酸標準品の 500 mg/L アセトニトリル溶液を調製し、この溶液をアセトニトリル及び蒸留水の混液(3:2)で希釈して 0.05~1mg/L 溶液を数点調製し、それぞれを 20  $\mu$ l ずつ高速液体クロマトグラフに注入し、縦軸にピーク高、横軸に重量を取って 4-エトキシメトキシ安息香酸の検量線を作成する。

(6) 定量試験

A 法又は B 法のエトベンザニドの試験溶液から、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いる場合は 2  $\mu$ l を、高速液体クロマトグラフを用いる場合は 20  $\mu$ l を取り、ガスクロマトグラフ質量分析計又は高速液体クロマトグラフに注入し、(5)の検量線によりエトベンザニドの重量を求め、これに基づき、試料中のエトベンザニドの濃度を算出する。また、A 法又は B 法の 4-エトキシメトキシ安息香酸の試験溶液から 20  $\mu$ 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 4-エトキシメトキシ安息香酸の重量を求め、これに基づき、試料中の 4-エトキシメトキシ安息香酸の濃度を算出する。このエトベンザニドの濃度の値と 4-エトキシメトキシ安息香酸の濃度の値に係数 1.73 を乗じてエトベンザニドの濃度に換算したものを和し、試料中のエトベンザニドの濃度を算出する。