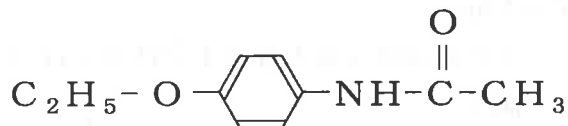


4'-エトキシアセトアニリド

(別名：フェナセチン、*p*-アセトフェネチジン)

4'-Ethoxyacetanilide (Phenacetin, *p*-Acetophenetidine)

【対象物質の構造】



CAS 番号：62-44-2 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$

【物理化学的性状】

分子量	融点(℃)	蒸気圧(Pa)	水溶解度(g/L)	LogPow
179.2	134～135	0.42 (25℃)	0.76 (25℃)	1.58 (文献値※)

※出典：(財) 化学物質評価研究機構：化学物質安全性（ハザード）評価シート，
整理番号 2000-44（実測値）

【毒性、用途】

毒性：急性経口毒性 LD50 ラット 3,600～4,000(mg/kg)

用途：医薬品（解熱鎮痛消炎剤）

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料 200mL をろ過し、試料ろ液を固相抽出カートリッジに通水して対象物質を保持させた後、メタノール 5mL で溶出させる。溶出液に精製水を加え 10mL に定容し、LC/MS/MS-SRM 法で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

p-アセトフェネチジン（4'-エトキシアセトアニリド）

：和光純薬工業株式会社（一級、含量 98.0%）

メタノール：和光純薬工業株式会社（LC/MS 用）

固相抽出カートリッジ：Sep-Pak Plus PS-2 Waters 社製

精製水

：超純水製造装置 Milli-RX 12+Milli-Q SP TOC（MILLIPORE 社製）により精製

0.1M 塩酸

：1mol/L 塩酸（和光純薬工業株式会社（容量分析用））を精製水で 10 倍希釈して調製

0.1M 水酸化ナトリウム水溶液

：1mol/L 水酸化ナトリウム溶液（和光純薬工業株式会社（容量分析用））を精製水で 10 倍希釈して調製

【器具】

吸引ろ過装置：吸引ろ過鐘等

ガラス繊維ろ紙

：GS25 55mm φ ADVANTEC TOYO 社製（使用前に 400℃、3 時間加熱処理する）

ガラス注射筒：10mL、200mL

メスシリンダー、メスフラスコ、目盛付受器（10mL）、pH 試験紙

（3）分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」における「初期・詳細環境調査における試料の採取方法」及び「採取試料の輸送、保管及び保存方法」に従う。

【試料の前処理及び試料液の調製】

〔水質〕

水質試料 200mL を pH5～9 の範囲内に調整し（0.1M 塩酸または 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液を用い、pH 試験紙で確認する。）、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する（注 1）。ろ過残さは、精製水 20mL で洗浄し、試料ろ液に合わせる。

この試料ろ液をメタノール 5mL 及び精製水 10mL でコンディショニングした固相抽出カートリッジ（Sep-Pak Plus PS-2）に 10mL/min.以下で通水する。通水終了後のカートリッジに精製水 20mL を通して洗浄した後、シリンジ等を用いてカートリッジに空気を通し、間隙水を除去する。その後、20～30 分間程度、空気を吸引し、できるだけ水分を除去する（注 2）。次いで 5mL のメタノールで溶出し、10mL 目盛付受器に受ける。これに精製水を加え 10mL に定容し、試料液とする。

【空試験液の調製】

試料と同じ量の精製水を用い、【試料の前処理及び試料液の調製】の項に従って

操作し、得られた試料液を空試験液とする。

【標準液の調製】

4'-エトキシアセトアニリド 50mg を正確に秤取り、メタノール 50mL に溶解し、1000 μ g/mL の標準原液を作製する。標準原液をメタノールで適宜希釈した後、50% メタノール/水で希釈し、0.02ng/mL から 10ng/mL の標準液を作製する。

【測定】

〔測定条件〕

(LC)

LC 機種 : SHIMADZU LC-20 Series

カラム : SUPELCO Ascentis C18 (2.1mm ϕ $\times$ 50mm, 3 μ m)

移動相 : A : 水、B : メタノール

0 $\rightarrow$ 6min. A:65 $\rightarrow$ 10 : B:35 $\rightarrow$ 90 linear gradient

6 $\rightarrow$ 7min. A : B=10 : 90

7 $\rightarrow$ 10min. A:10 $\rightarrow$ 65 : B:90 $\rightarrow$ 35 linear gradient

10 $\rightarrow$ 13min. A : B=65 : 35

流量 : 0.2 mL/min.

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 10 μ L

(MS)

MS 機種 : Applied Biosystems API3200

イオン化法 : ESI (+)

モニターイオン(m/z) : 180 $\rightarrow$ 110 (定量用)、180 $\rightarrow$ 138 (確認用)

ドリフト電圧(DP) : 46 V

コリジョン電圧(CE) : 29 V (180 $\rightarrow$ 110)、21 V (180 $\rightarrow$ 138)

イオンスプレー電圧(IS) : 4500 V

イオンソース温度(TEM) : 700 $^{\circ}$ C

カーテンガス(CUR) : 15 psig

ネブライザーガス(GS1) : 80 psig

ターボガス(GS2) : 70 psig

コリジョンガス(CAD) : 3 psig

〔検量線〕

標準溶液 (0.02ng/mL $\sim$ 10ng/mL) 10 μ L を LC/MS に注入し、ピーク面積と標準溶液濃度を用いて検量線を作成する。

〔定量〕

試料液 10 μ L を LC/MS に注入し、ピーク面積より試料液中の 4'-エトキシアセトアニリドの濃度を測定する。

〔濃度の算出〕

$$\text{水質試料中の濃度}(\mu\text{g/L}) = \text{最終試料液中の濃度}(\text{ng/mL}) \times \frac{\text{最終液量}(\text{mL})}{\text{試料量}(\text{mL})}$$

〔装置検出下限 (IDL)〕

本分析に用いた LC/MS (Applied Biosystems API3200) の IDL を次に示す (注 3)。

物質	IDL(pg)	注入量(μ L)	最終液量(mL)	試料量(mL)	IDL 試料換算値(μ g/L)
4'-エトキシアセトアニリド	0.04	10	10	200	0.0002

〔測定方法の検出下限 (MDL)、定量下限 (MQL)〕

本測定方法における検出下限及び定量下限を次に示す (注 4)。

物質	試料量(mL)	最終液量(mL)	注入量(μ L)	検出下限値(μ g/L)	定量下限値(μ g/L)
4'-エトキシアセトアニリド	200	10	10	0.0003	0.0008

(4) 注解 (分析上の注意点等)

(注 1)

SS が少なく、直接、所定の試料量を固相抽出カートリッジに通水できる場合は、ろ過操作を省略してもよい。

(注 2)

固相抽出カートリッジの水分除去が不十分な場合、回収率 (精製水における添加回収) が 80% 程度まで低下することがある。

(注3)

装置検出下限 (IDL) は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 17 年 3 月)に従って、表 1 のとおり算出した。

表 1 装置検出下限 (IDL) の算出 (Applied Biosystems API3200)

物質名	4'-エトキシアセトアニリド
試料量(mL)	200
最終液量(mL)	10
注入液濃度(ng/mL)	0.02
装置注入量(μL)	10
結果1 (pg)	0.2229
結果2	0.2263
結果3	0.2065
結果4	0.2121
結果5	0.1985
結果6	0.2282
結果7	0.2215
平均値	0.2166
標準偏差	0.0111
IDL(pg)	0.04
IDL試料換算値(μg/L)	0.0002
S/N	15
CV(%)	5.14

※IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

IDL 測定時 (0.02ng/mL) の SRM クロマトグラムを図 1 に示す。

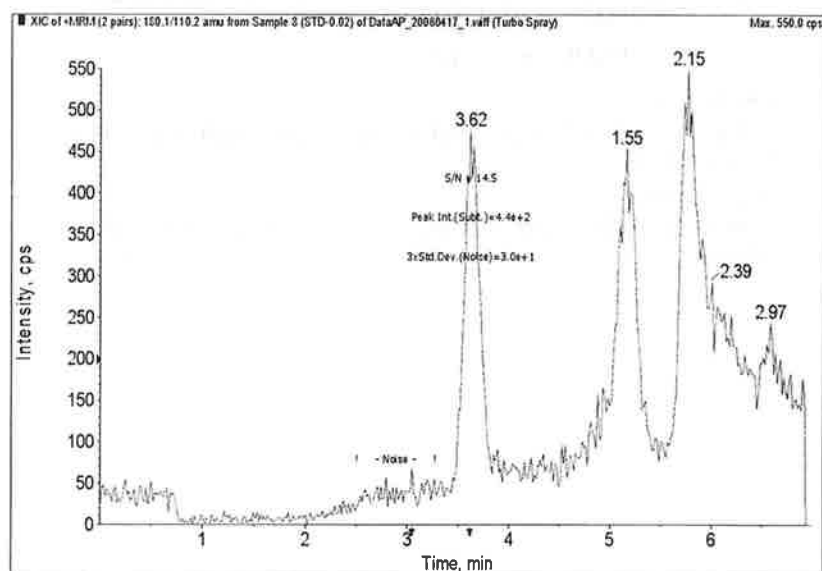


図 1 IDL 測定時の SRM クロマトグラム

(注4)

測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL) は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 17 年 3 月)に従って、表 2 のとおり算出した。MDL 算出用試料は、海水 (名古屋港) を用いた。

表 2 測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL) の算出

物質名	4'-エトキシアセトアニリド
試料量(mL)	200
標準添加量(ng)	0.2
試料換算濃度(μg/L)	0.001
最終液量(mL)	10
注入液濃度(ng/mL)	0.02
装置注入量(μL)	10
操作ブランク平均(μg/L) ^①	0
無添加平均(μg/L) ^②	0
結果1 (μg/L)	0.0009760
結果2	0.0009390
結果3	0.0010140
結果4	0.0011035
結果5	0.0009910
結果6	0.0008655
結果7	0.0008935
平均値	0.0009689
標準偏差	0.0000795
MDL(μg/L)	0.0003
MQL(μg/L)	0.0008
S/N	10
CV(%)	8.21

$$\text{※MDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

$$\text{※MQL} = \sigma_{n-1} \times 10$$

①操作ブランク平均：

試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均値

②無添加平均：

MDL算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

MDL 測定時（注入液濃度 0.02ng/mL、試料換算濃度 0.001 μ g/L）の SRM クロマトグラムを図 2 に示す。

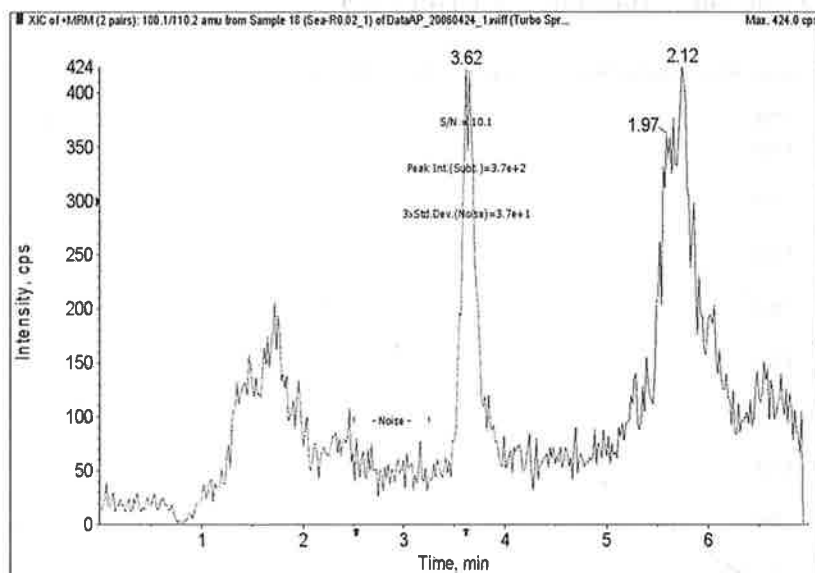


図 2 MDL 測定時の SRM クロマトグラム

§ 2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析のフローチャートを図 3 に示す。

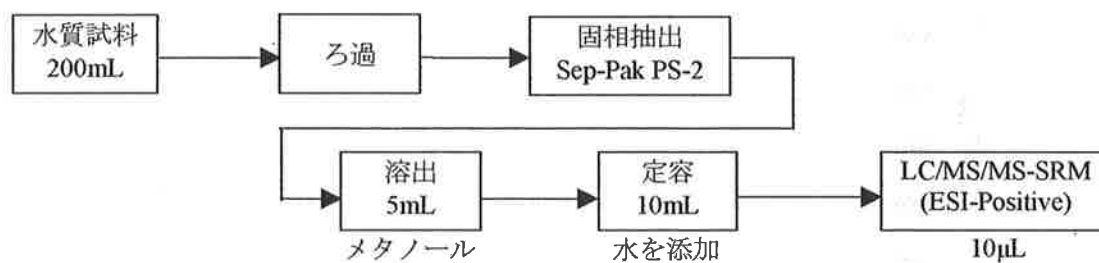


図 3 分析フロー

[検量線及びマススペクトル]

- 検量線

検量線 (0.02ng/mL～10ng/mL) を図4に示す。

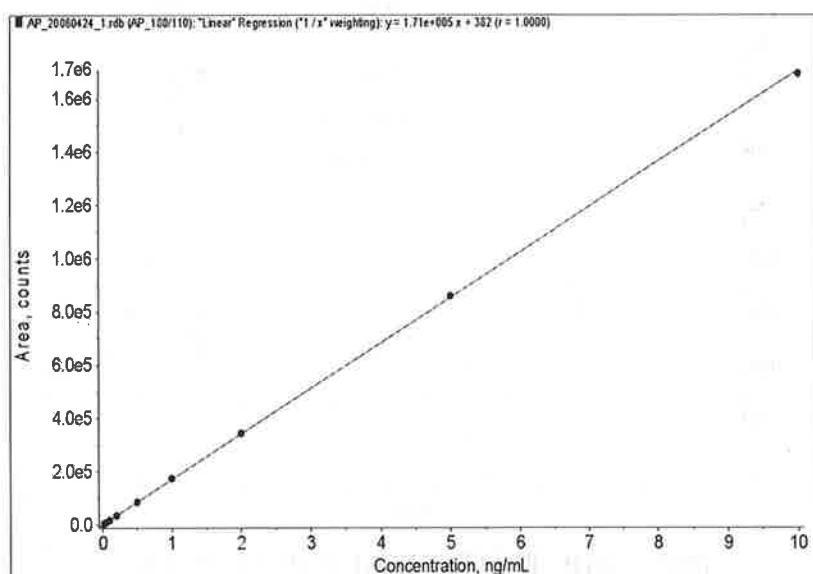


図4 検量線

- 検量線のクロマトグラム

標準溶液 (0.5ng/mL) の SRM クロマトグラムを図5に示す。

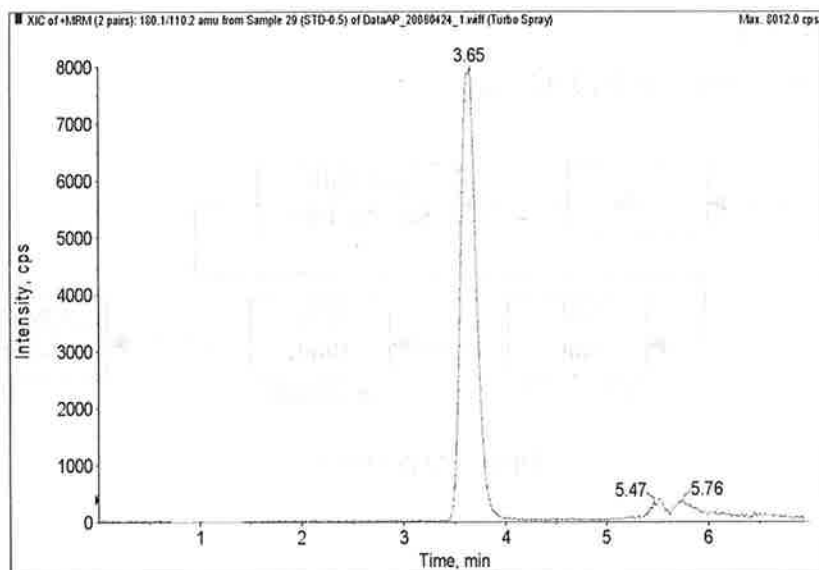


図5 標準溶液の SRM クロマトグラム (0.5ng/mL)

- マススペクトル

4'-エトキシアセトアニリドのマススペクトル (ESI (+)) を図6及び図7に示す。
 $[M+H]^+$ ($m/z = 180$) 及び $[M+Na]^+$ ($m/z = 202$) のイオンが主要ピークとして観測された。

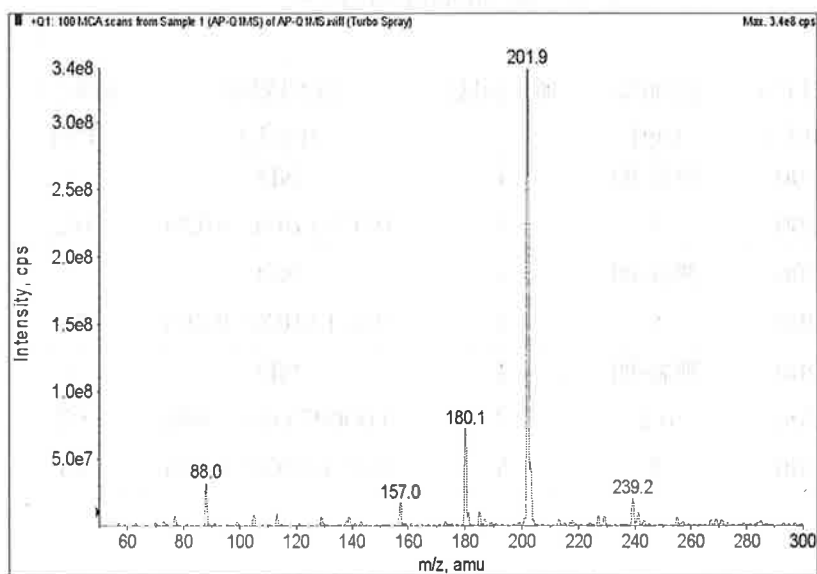


図6 4'-エトキシアセトアニリドのマススペクトル

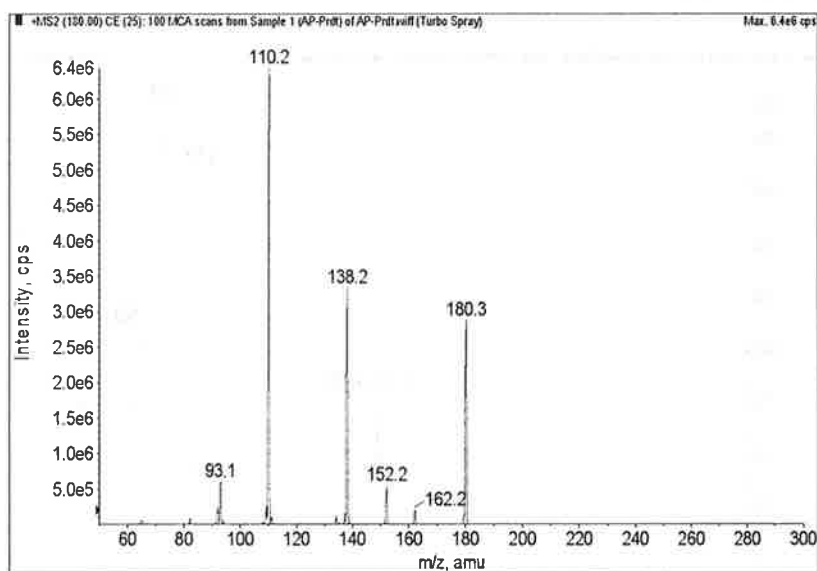


図7 4'-エトキシアセトアニリドのマス-マススペクトル
 (親イオン: $m/z = 180$)

〔添加回収試験結果〕

精製水、河川水（半場川）及び海水（名古屋港）への標準物質添加回収試験結果を表 3 に示す。

表 3 添加回収試験結果

試料名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)	変動係数 (%)
精製水	200	無添加	3	ND	-	-
	200	5	5	0.026 (0.024~0.026)	102	3.5
河川水	200	無添加	3	ND	-	-
	200	5	5	0.021 (0.020~0.022)	85	3.5
海水	200	無添加	3	ND	-	-
	200	0.2	7	0.00097 (0.00087~0.0011)	97	8.2
	200	5	5	0.023 (0.022~0.024)	93	4.1

添加回収試験の SRM クロマトグラムを図 8～11 に示す。なお、無添加の河川水、無添加の海水、0.2ng 添加した海水の SRM クロマトグラムは、それぞれ図 14、図 15、図 2 である。

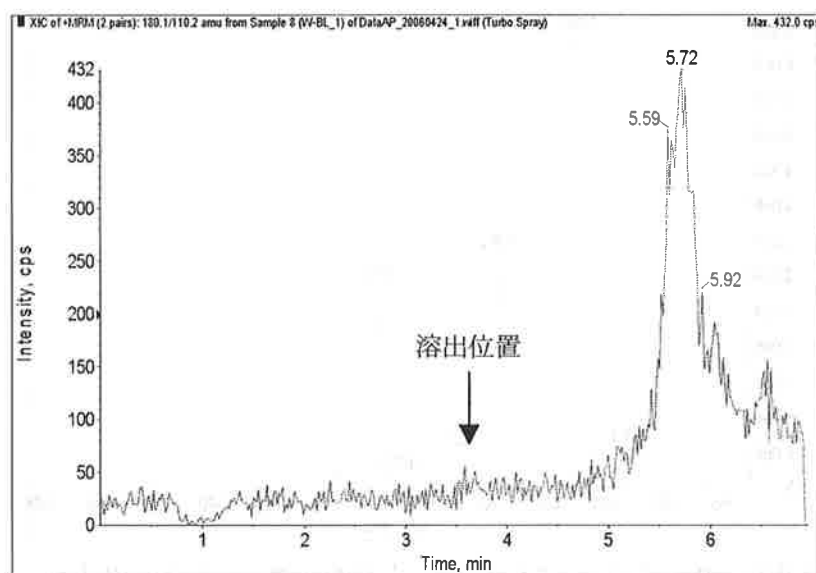


図 8 添加回収試験（精製水：無添加）の SRM クロマトグラム

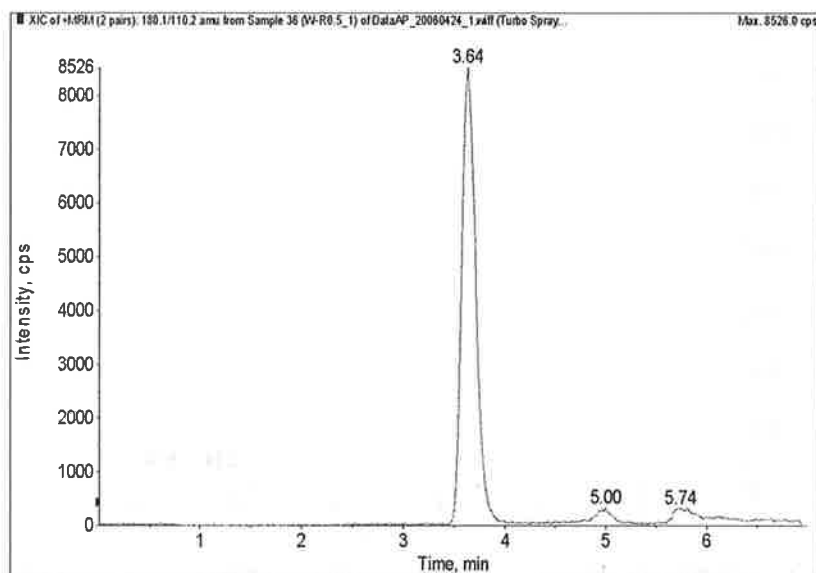


図 9 添加回収試験（精製水：5ng 添加）の SRM クロマトグラム

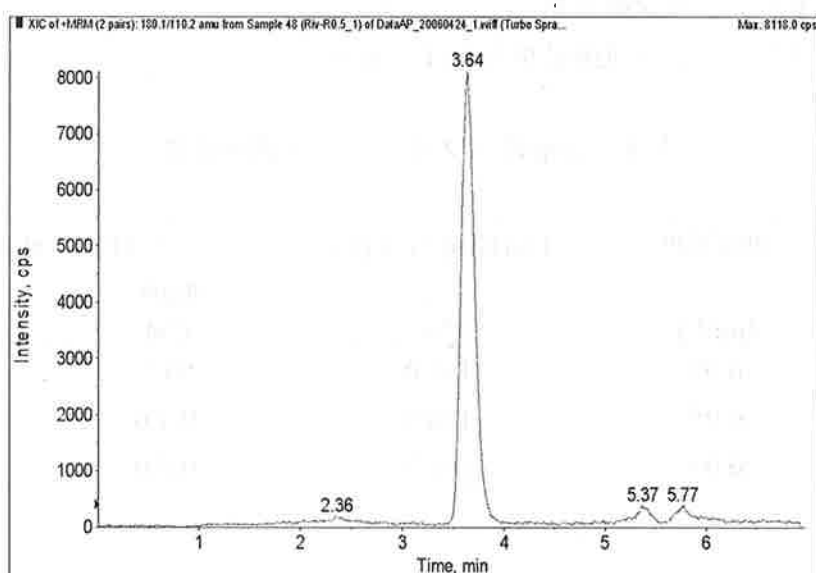


図 10 添加回収試験（河川水：5ng 添加）の SRM グロマトグラム

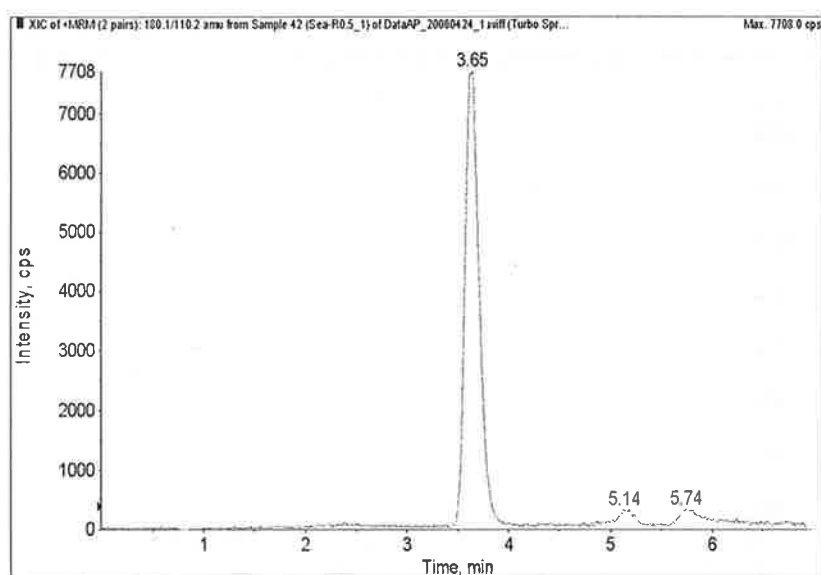


図 1 1 添加回収試験（海水：5ng 添加）の SRM クロマトグラム

〔分解性スクリーニング試験結果〕

分解性スクリーニング試験結果を表 4 に示す。

表 4 分解性スクリーニング試験結果

pH	初期濃度 ($\mu\text{g/L}$)	1 時間後の残存率 (%)	5 日後の残存率	
			暗所 (%)	明所 (%)
5	0.05	103.0	96.5	-
7	0.05	100.5	101.6	99.5
9	0.05	101.7	103.0	-

〔固相通水時の pH の検討〕

pH を 5、7、9 に調整した精製水 100mL にそれぞれ 4'-エトキシアセトアニリドを 5ng 添加したものを【試料の前処理及び試料液の調製】の項に従って操作し（ろ過操作は省略）、固相通水時の pH が回収率に与える影響について検討した。その結果を図 1 2 に示す。なお、pH の調整には Carmody の広域緩衝液を用い、精製水 100mL に対し、0.2M ホウ酸+0.05M クエン酸を 2mL 加え、これに pH メーターで測定しながら 0.1M リン酸三ナトリウムを必要量加えて調整した。

pH が 5 から 9 の範囲内では、回収率への影響は見られなかった。

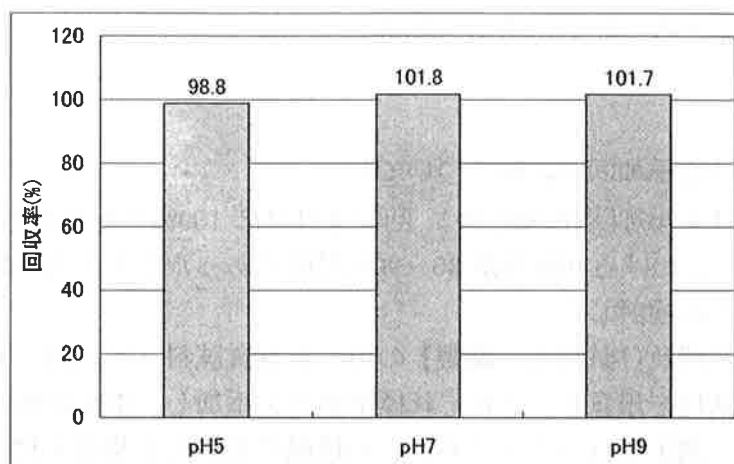


図 1 2 固相通水時の pH と回収率

〔固相抽出カートリッジからの溶出液量の検討〕

固相抽出カートリッジからの溶出液を 0-1、1-2、2-3、3-4、4-5mL の 5 つの分画に分取し、4'-エトキシアセトアニリドがどの分画に溶出するか調べた。その結果を図 1 3 に示す。

4'-エトキシアセトアニリドは、溶出液 2mL で 99%以上溶出した。

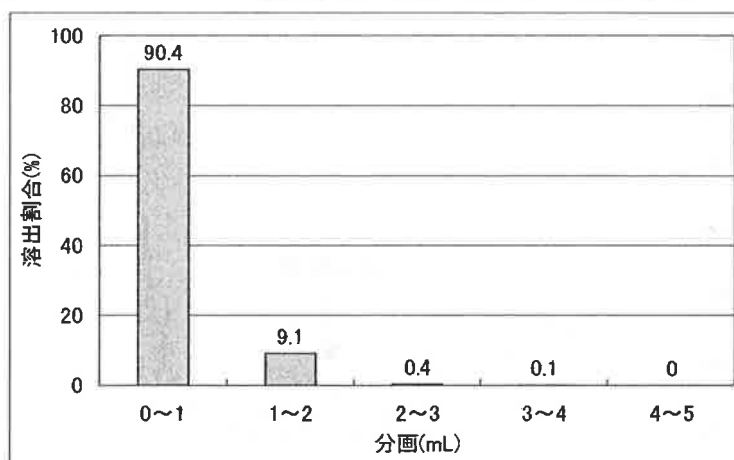


図 1 3 溶出溶媒量と溶出割合

〔ろ過及びろ過残さの処理の検討〕

水質試料をろ過した後のろ紙上のろ過残さに標準物質を添加し、精製水 20mL またはメタノール 20mL で洗浄して回収されるかどうか調べた結果、精製水とメタノールのいずれでもほぼ全量回収された。このことから、ろ過の際、ろ過残さには対

象物質はほとんど残らないと考えられる。

〔環境試料における添加回収試験について〕

精製水における添加回収試験では、回収率はほぼ 100%であったが、環境試料（河川水及び海水）における回収率が 80～90%程度であったことから、分析のどの段階で失われているか検討した。

【試料の前処理及び試料液の調製】の項の①水質試料、②試料ろ液、③最終試料液の各段階の試料を用意し、それぞれ標準物質を添加し、①及び②については残りの操作を行い、測定を行ったところ、どの段階で添加した場合も標準溶液（50%メタノール／水に添加）と比較すると 80～90%程度の値であった。

最終試料液に添加した場合も同程度の値であったことから、対象物質は、前処理の段階で失われているのではなく、何らかの理由で LC/MS における感度が若干低下しているものと推測される。

〔環境試料分析例〕

河川水（半場川）からは、4'-エトキシアセトアニリドは検出されなかった。

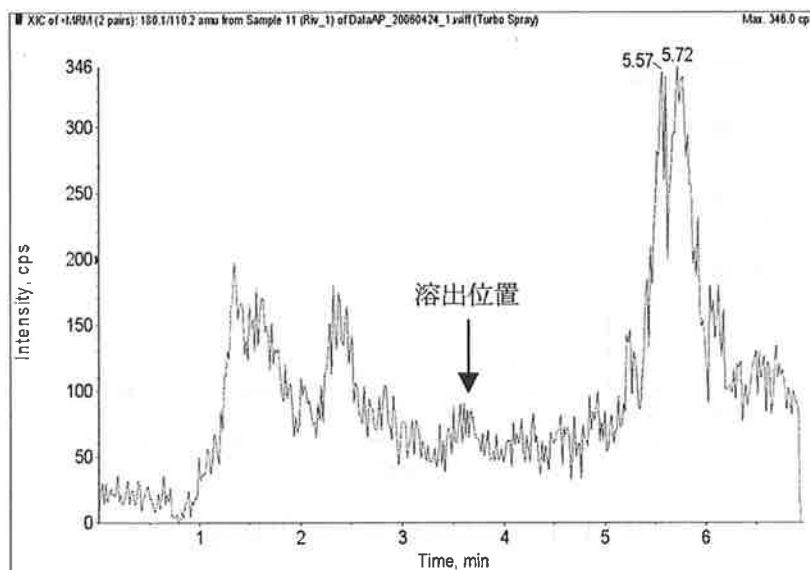


図 1 4 河川水（半場川）の SRM クロマトグラム

海水（名古屋港）からは、4'-エトキシアセトアニリドは検出されなかった。

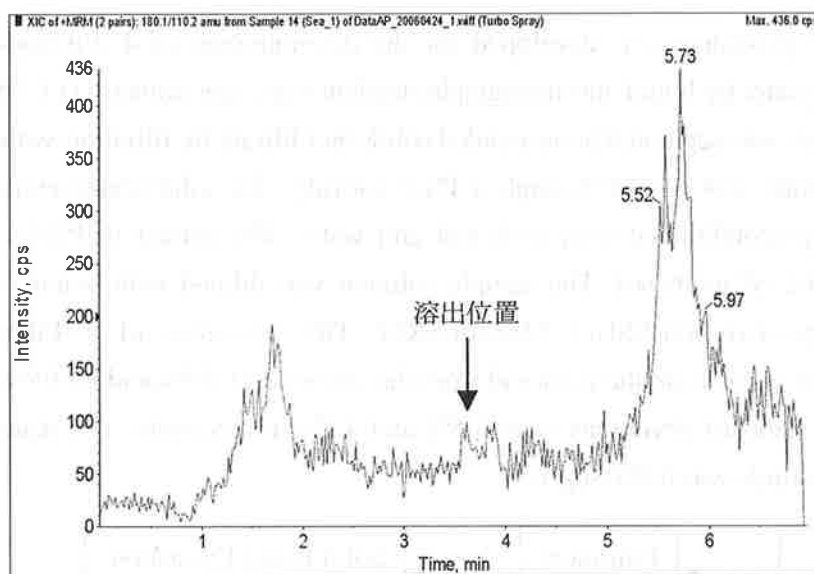


図15 海水（名古屋港）のSRMクロマトグラム

【評価】

本法により、水質試料中の4'-エトキシアセトアニリドを0.0003 μ g/Lの検出下限値で分析が可能である。

【参考文献】

（財）化学物質評価研究機構：化学物質安全性（ハザード）評価シート，整理番号2000-44

【担当者氏名・連絡先】

担当：愛知県環境調査センター

住所：〒462-0032 名古屋市北区辻町字流7番6号

TEL：052-910-5494 FAX：052-991-6241

担当者：中根 知康

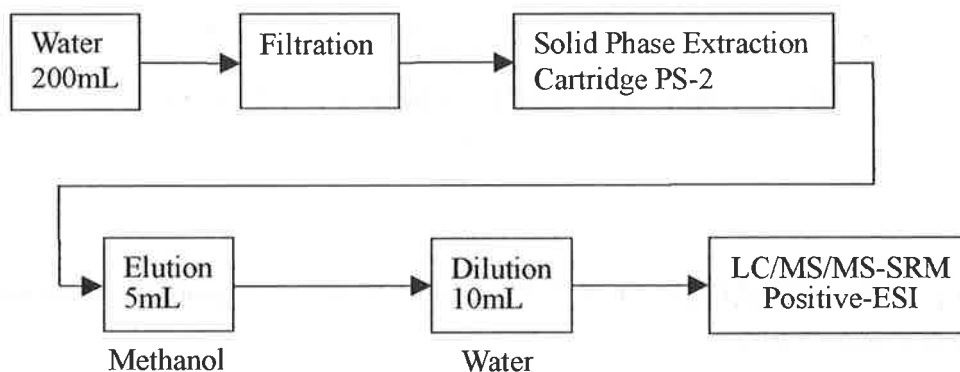
E-mail：kankyo-c@pref.aichi.lg.jp（所属）

E-mail：tomoyasu_nakane@pref.aichi.lg.jp（担当者）

Determination of 4'-Ethoxyacetanilide in water by LC/MS/MS

An analytical procedure was developed for the determination of 4'-Ethoxyacetanilide in environmental water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

A water sample was separated to suspended solids and filtrate by filtration with a glass fiber paper. The filtrate was passed through a PS-2 cartridge for solid phase extraction, which cartridge was preconditioned with methanol and water. The extract in PS-2 cartridge was eluted with 5mL of methanol. The sample solution was diluted with water to 10mL, and analyzed by positive ion-ESI-LC/MS/MS-SRM. The recoveries of 4'-Ethoxyacetanilide added in surface water from the river and from the sea were 81-89%.and 86-95%, respectively. These relative standard deviations were 3.5% and 4.1%, respectively. The detection limit of 4'-Ethoxyacetanilide was 0.0003 μ g/L.



物質名	分析法フローチャート	備考
4'-エトキシアセトアニリド	<pre> graph LR A[水質試料 200mL] --> B[ろ過] B --> C[固相抽出 Sep-Pak PS-2] C --> D[溶出 5mL メタノール] D --> E[定容 10mL 水を添加] E --> F[LC/MS/MS-SRM (ESI-Positive) 10μL] </pre>	分析法： LC/MS/MS-SRM イオン化法： ESI (+) カラム： SUPELCO Ascentis C18 内径 2.1mm φ 長さ 50mm 粒径 3μm 検出下限値： <水質> 0.0003μg/L