

### 【資料 3】有害試薬の使用 ベンジルアルコール確認試験法の改正検討

研究協力者：稲葉涼太，橋本秀樹，成瀬敦子，鈴木俊也（東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部医薬品研究科）

#### 【目的】

外原規 2021（現行法）における「ベンジルアルコール」の確認試験は、以下の通りであり、有害試薬クロロホルムを用いる試験法である。本研究では、クリーンアナリシスの観点から、有害試薬の代替溶媒若しくは赤外吸収スペクトル測定法を用いた代替試験法の検討を行った。

#### 「ベンジルアルコール」確認試験

本品 3 滴に過マンガン酸カリウム溶液（1→20）5mL を加え、希硫酸 2mL を加え 2 分間振り混ぜ、更にクロロホルム 20mL を加えて振り混ぜた後、クロロホルム層をとり、これを水浴上で蒸発するとき、残留物は、ベンズアルデヒドのようなにおいが発生する。この残留物をエタノール（95）5mL に溶かし、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液 1mL を加えるとき、橙色の沈殿を生じる。

#### 【方法】【結果】

##### 1）代替溶媒の検討

現行の確認試験を参考に①「代替溶媒の検討」及び②「液液分配を行わない方法（有機溶媒不使用）」を検討した。

①において、選択できる溶媒の条件としては、「水と分離すること」及び「水浴上で容易に蒸発できること」である。クロロホルムの代替溶媒として、ジエチルエーテル又はヘキサンに読み替え、同様に操作したところ、橙色の沈殿が

生じ、いずれも同様の結果が得られた（Fig. 1）。

②次に、フィルター除去により、液液分配操作を行わない方法（有機溶媒不使用）を検討した。現行法において、ベンジルアルコールを過マンガン酸カリウム溶液に加え、希硫酸を加えて振り混ぜる工程で、沈殿が生じるが、この液をフィルターにかけたところ、過マンガン酸カリウム反応物を除去することができ、透明の液が得られた。このろ過した液に対して、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液を加えた。ベンジルアルコール反応液では、橙色の沈殿が生じた（Fig. 2）。一方、空試験では過マンガン酸カリウムが還元されていないため、沈殿せずに過マンガン酸カリウム液がフィルターを素通りし、紫色の液が得られた（Fig. 2）。上記のことから、②の空試験においては紫色、試料溶液では橙色の沈殿を生じることが示された。

以上、Fig. 3 に結果のまとめを示した。①「代替溶媒の検討」として、溶媒を変更した結果、クロロホルムをジエチルエーテル又はヘキサンに変更しても同様の結果が得られた。また、②「液液分配を行わない方法」として、試験操作として、有機溶媒層をとり、蒸発させ、エタノールで溶解させるまでの工程を、フィルターろ過で置き換えても、橙色の沈殿が得られることが示された。よって、ベンジルアルコールの確認試験に用いる溶媒は、クロロホルムからジエチルエーテル又はヘキサンへ変更可能であることを確認し、さらに、抽出操作を行わなく

ても呈色反応可能, すなわち確認試験が可能であることを確認した.

## 2) 赤外吸収スペクトル測定法の検討

代替試験法として, 赤外吸収スペクトル測定法による確認試験を検討した.

日本薬局方 (JP18) におけるベンジルアルコールの確認試験は, 赤外吸収スペクトル測定法を採用しており, 液膜法により試験を行うと規定している. 参照スペクトルが収載されており, 定性に用いる具体的な波数は明示していない. また, 掲載しているスペクトルは  $4000\text{ cm}^{-1}$  ~  $600\text{ cm}^{-1}$  である. また, 食品添加物公定書 (第 10 版) におけるベンジルアルコールの確認試験は, 日本薬局方と同様に, 液膜法で測定し, 参照スペクトルと比較する内容となっており, 定性に用いる波数は特に明示されていない. こちらも掲載しているスペクトルは  $4000\text{ cm}^{-1}$  ~  $600\text{ cm}^{-1}$  である.

外原規 2021 の一般試験法: 赤外吸収スペクトル測定法における確認方法では, 「各条に記載された波数を確認する」又は, 「参照スペクトルと比較するか」のいずれかで確認することになっている. 今回, 外原規の条件に従い, 以下の条件で測定を行った. また, 試験に用いたベンジルアルコールは, 異なる 3 社の製品について測定した. うち A 社製品は「香料及び化粧品原料」の用途も明示して販売している製品であった.

### 【測定装置】

IRTracer-100 (島津製作所)

アポダイズ関数: Happ-Genzel

積算回数: 32 回

分解能:  $4\text{ cm}^{-1}$

波数範囲  $4000\text{ cm}^{-1}$  ~  $400\text{ cm}^{-1}$

解析: 大気補正

光源: セラミックス光源

校正: ポリスチレン  $0.04\text{mm}$  膜

測定セル: KBr 液膜法セル

### 【測定したベンジルアルコール】

異なるメーカー 3 社のベンジルアルコールを測定.

A 社製品: 純度 > 99.0%, 有機合成研究用, 医薬品, 香料及び化粧品原料

B 社製品: 純度 > 99.0%

C 社製品: 純度 > 97.0%

化粧品原料としての用途を記載した 1 製品及び試薬として流通している 2 製品, 合計 3 製品のベンジルアルコールについて測定した. その結果, 日本薬局方及び食品添加物公定書に収載されている参照スペクトルと同様のスペクトルが得られた (Fig. 4). また, 市販 3 社製品のベンジルアルコールの赤外吸収スペクトルを比較したところ, いずれも同一波数に吸収を認めた (Fig. 5a). さらに, A 製品を対象に B 社製品と C 社製品について相関プロットで解析したところ, 回帰線から乖離したスポットは認められず, メーカー間による差は特になかった (Fig. 5b, 5c).

次に, 外原規の一般試験法では, 窓板について「塩化ナトリウム, 臭化カリウムなど」とされていることから, 塩化ナトリウムと臭化カリウムの窓板で測定した赤外吸収スペクトルを比較した (Fig. 6a). その結果, 相関プロットが全体的にカーブしており, 吸収強度に差があるものの, 同一の波長で吸収が見られた (Fig. 6b). 青の帯で示した部分は, 相関性が取れなかった箇所であるが, これは,  $600\text{ cm}^{-1}$  未満の領域であるため反応によるものではなく, NaCl の窓板による吸収の影響と考えられる. 窓板は,  $4000\text{ cm}^{-1}$  ~  $600\text{ cm}^{-1}$  の波数で確認するのであれば, 塩化ナトリウムでも測定可能であった. このことから日本薬局方や食添公定書と同様に  $600\text{ cm}^{-1}$  未満は掲載しないようにすることで, 窓板を明確に指定する必要性が回避できると考えられた.

次に, 赤外吸収スペクトル解析ソフトを用い

て、構造からスペクトル予測を行い、予測をもとに実測データを解析し、定性に使用できると考えられる波数を抽出した (Fig. 7).

フェニル基由来の吸収については、特に強度が得られている  $730\text{ cm}^{-1}$  及び  $700\text{ cm}^{-1}$  の3本のピークは、フェニル基に由来するものと推測された。次に、アルカン由来の吸収については、 $2870\text{ cm}^{-1}$  のピークが特徴的に観測されており、これはアルカン由来と推測された。次に、ヒドロキシ基については、 $3330\text{ cm}^{-1}$  に水酸基特有のブロードな吸収と、 $1020\text{ cm}^{-1}$  に比較的強い吸収がヒドロキシ基由来と推測された。また、 $1455\text{ cm}^{-1}$  については、フェニル基、アルカン、ヒドロキシ基いずれもこの波数での吸収が予測されており、複合して吸収を示していると考えられた (Fig. 7, 8).

以上の結果から、特徴的な6か所の吸収について、産業技術総合研究所のデータベースの数値、3製品の実測値を比較し、外原規に従いまるめ処理をした波数をまとめた (Table 1). (注: 外原規から抜粋. 波数  $2000\text{ cm}^{-1}$  以上では  $10\text{ cm}^{-1}$ , 波数  $2000\text{ cm}^{-1}$  未満では  $5\text{ cm}^{-1}$  単位で波数をまるめ, 末尾に「付近」の語句を付ける). 産業技術総合研究所のデータベースと実測値は一致しており、得られた波数について、スペクトル解析の観点からも妥当であると考えられた。従って、以下に示す波数からベンジルアルコールの主要な構造を確認することが可能であると考えられた。

【ベンジルアルコールの定性に使用できると考えられる波数】  $3330\text{ cm}^{-1}$ ,  $2870\text{ cm}^{-1}$ ,  $1455\text{ cm}^{-1}$ ,  $1020\text{ cm}^{-1}$ ,  $735\text{ cm}^{-1}$  及び  $700\text{ cm}^{-1}$  付近.

以上、代替試験法として、赤外吸収スペクトル測定法による確認試験が設定可能であることが示された。

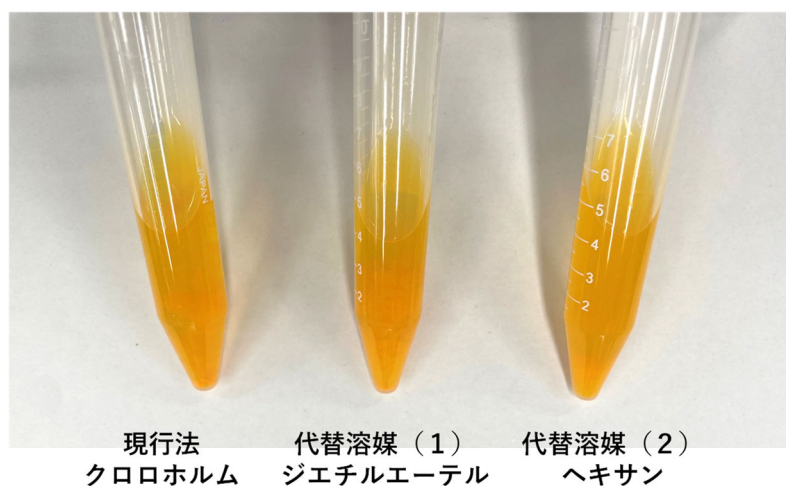


Fig. 1 現行法（クロロホルム）と代替溶媒（ジエチルエーテル及びヘキサン）を用いた場合のベンジルアルコールの確認試験の結果

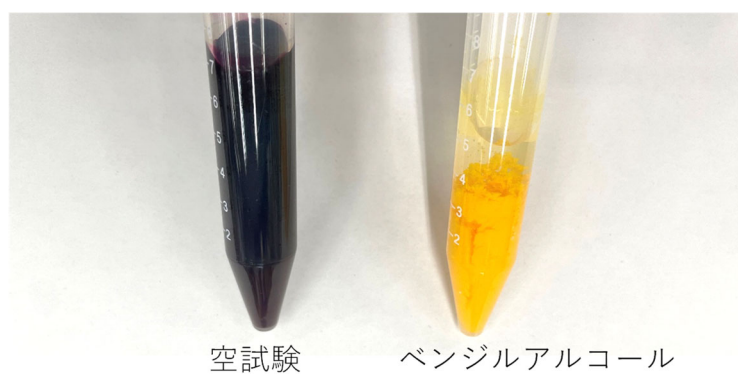


Fig. 2 空試験及び過マンガン酸カリウム反応物のフィルター除去操作（有機溶媒不使用）を行った場合のベンジルアルコールの確認試験の結果

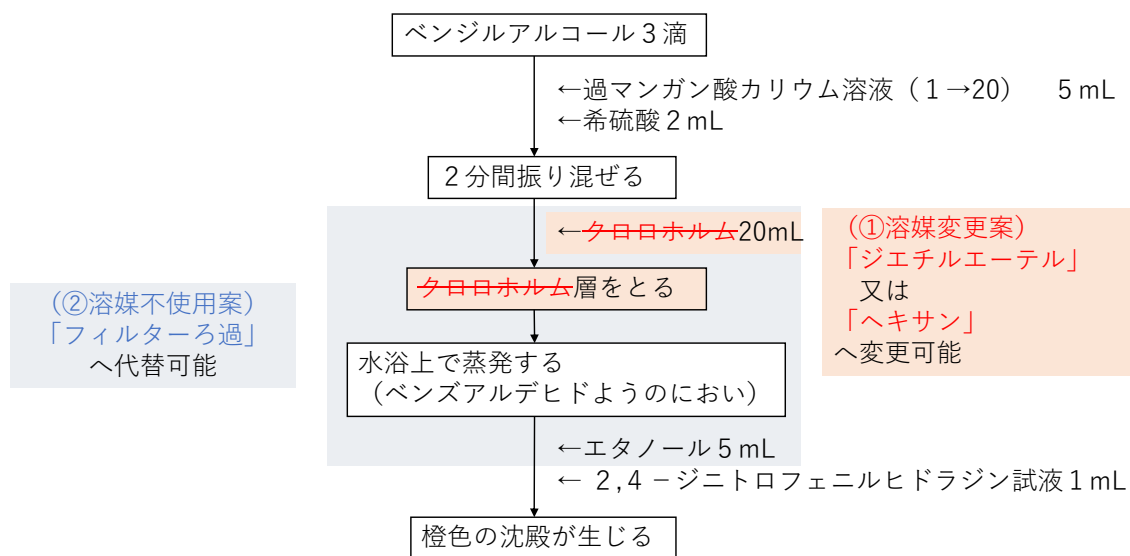


Fig. 3 ベンジルアルコールの確認試験の代替溶媒の検討結果のまとめ

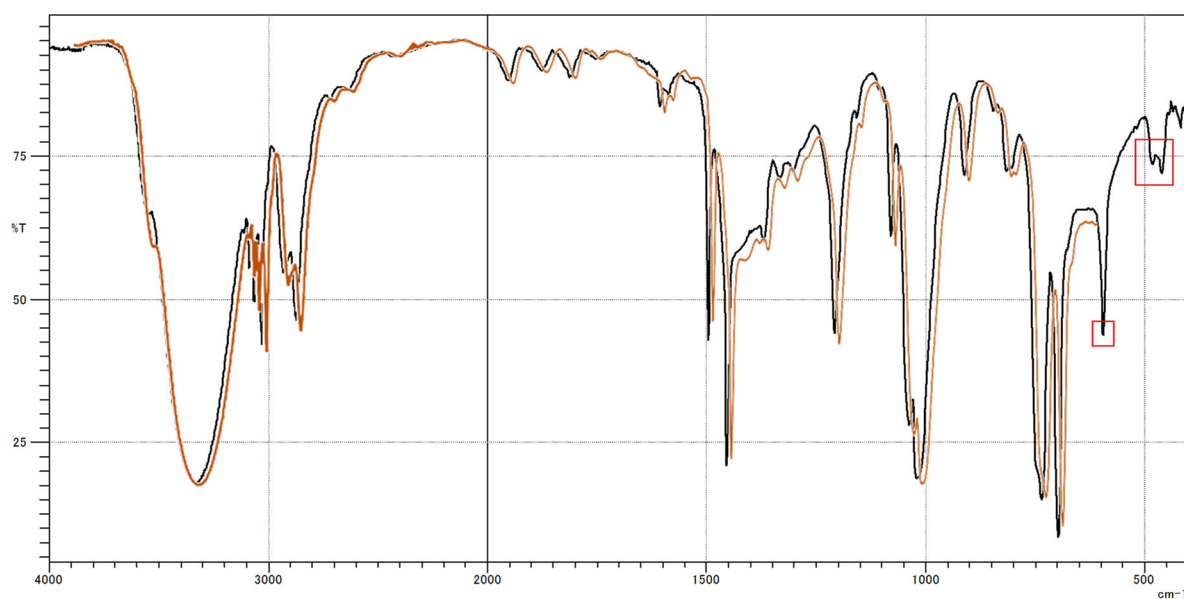


Fig. 4 ベンジルアルコールの赤外吸収スペクトル

黒線: A 社製ベンジルアルコール, オレンジ線: 日本薬局方に収載のスペクトル

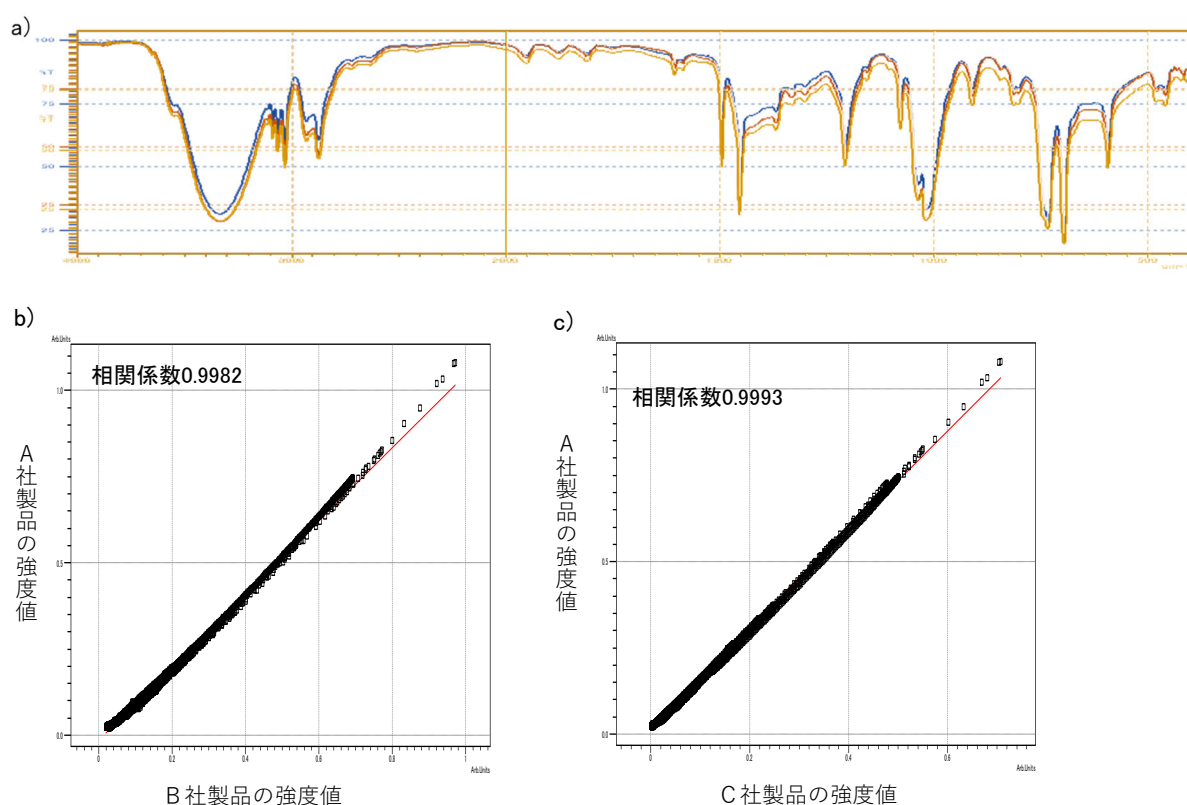


Fig. 5 市販3社製品のベンジルアルコールの赤外吸収スペクトル (a), A社製品/B社製品の強度値の相関 (b) 及びA社製品/C社製品の強度値の相関 (c)

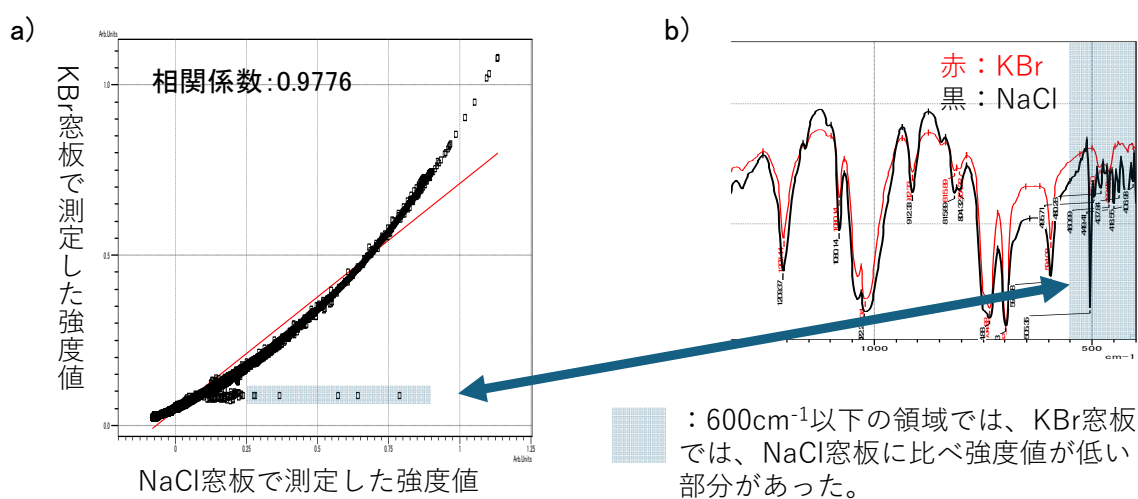


Fig. 6 臭化カリウム (KBr) の窓板と塩化ナトリウム (NaCl) の窓板で測定したベンジルアルコールの赤外吸収スペクトルの比較

KBr 窓板/NaCl 窓板の強度値の相関 (a), KBr 窓板/NaCl 窓板でのベンジルアルコールの赤外吸収スペクトル (b)

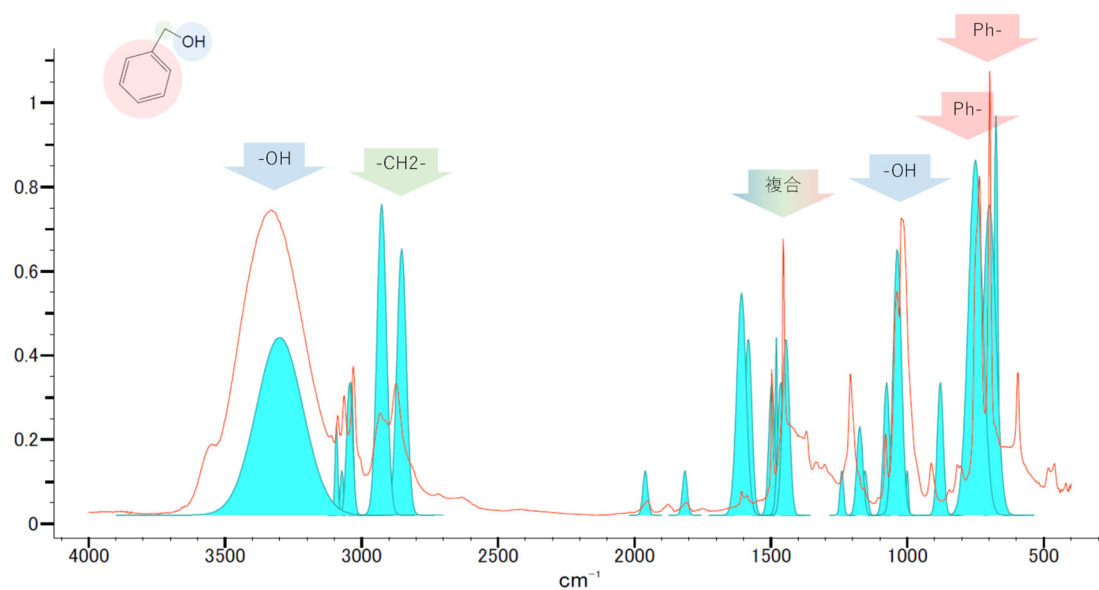


Fig. 7 ベンジルアルコールの実測赤外吸収スペクトル及び構造から推定されるシグナル

オレンジ線: 実測したスペクトル

青色のピーク: ベンジルアルコールの構造から推定されるシグナル

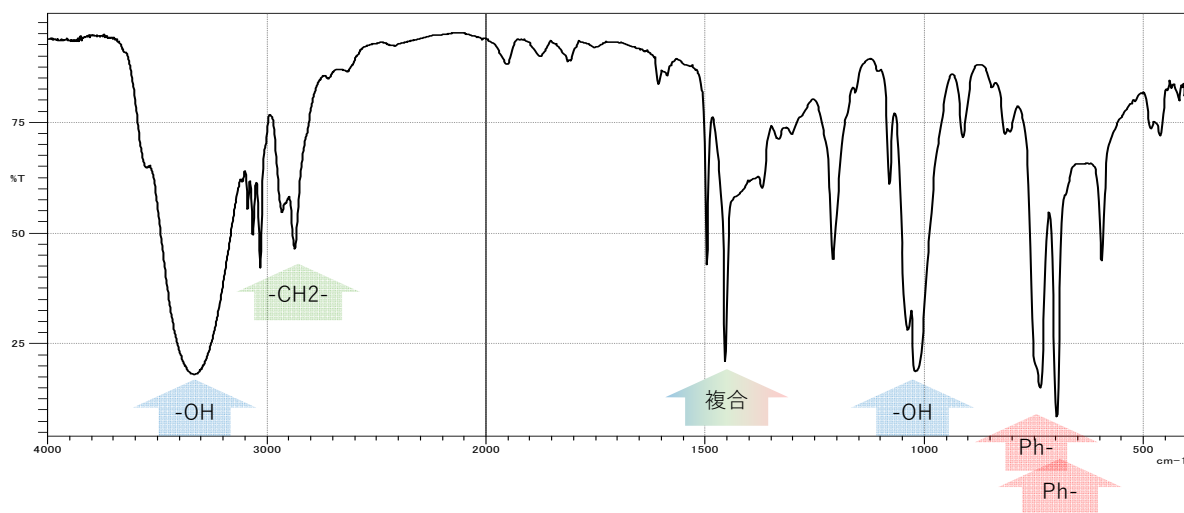


Fig. 8 ベンジルアルコールの実測赤外吸収スペクトル (透過率を縦軸にしたスペクトル)

**Table 1** ベンジルアルコールのデータベースからの参考値並びに実測値，及び定性に使用可能と考えられる波数

| (参考値)<br>産業技術総合<br>研究所 | 製品の実測値  |         |         | 波数<br>(cm <sup>-1</sup> ) | 関連が推測される分子構造          |                      |       |
|------------------------|---------|---------|---------|---------------------------|-----------------------|----------------------|-------|
|                        | A社      | B社      | C社      |                           | R-CH <sub>2</sub> -OH | R-CH <sub>2</sub> -R | Ph-R  |
| 3326                   | 3331.07 | 3331.07 | 3332.99 | 3330 cm <sup>-1</sup> 付近  | 伸縮, 強                 |                      |       |
| 2875                   | 2873.94 | 2873.94 | 2873.94 | 2870 cm <sup>-1</sup> 付近  |                       | 対称伸縮, 中              |       |
| 1454                   | 1454.33 | 1454.33 | 1454.33 | 1455 cm <sup>-1</sup> 付近  | 変角, 中                 | 変角, 中                | 伸縮, 強 |
| 1018                   | 1020.34 | 1022.27 | 1022.27 | 1020 cm <sup>-1</sup> 付近  | 伸縮, 強                 |                      |       |
| 736                    | 734.88  | 734.88  | 734.88  | 735 cm <sup>-1</sup> 付近   |                       |                      | 変角, 強 |
| 698                    | 698.23  | 698.23  | 698.23  | 700 cm <sup>-1</sup> 付近   |                       |                      | 変角, 強 |