厚生労働行政推進調査事業費（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
総括研究報告書

医薬部外品原料規格の整備に関する試験法の開発研究

研究代表者　内山　奈穂子　国立医薬品食品衛生研究所　生活衛生化学部　部長

【資料 3】有害試薬の使用　医薬部外品原料規格「酢酸 d-α-トコフェロール」純度試験の改正検討

研究協力者：武田章弘（大阪健康安全基盤研究所　衛生化学部医薬品課）

[目的]

外原規収載「酢酸 d-α-トコフェロール」について，現行の有害試薬トルエンを用いた純度試験から，代替溶媒を用いた代替試験法の検討を行い，改正法案を設定した．

外原規 2021（現行法）における「酢酸 d-α-トコフェロール」純度試験（3）α-トコフェロールは，以下の通りであり，有害試薬トルエン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を用いた試験法の検討を行った．

【外原規現行法】「酢酸 d-α-トコフェロール」
純度試験（3）α-トコフェロール

本品 0.10g をとり，ヘキサン 10mL を正確に加えて溶かし，試料溶液とする．別にトコフェロール標準品 0.050g をとり，ヘキサンに溶かし正確に 100mL とする．この液 1 mL を正確に量り，ヘキサンを加えて正確に 10mL とし，標準溶液とする．試料溶液及び標準溶液 10 μL につき，**トルエンと酢酸（100）の混液（19：1）**を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーにより試験を行う．薄層板を風乾した後，これに塩化鉄（Ⅲ）六水和物のエタノール（99.5）溶液（１→500）を均等に噴霧した後，更に２，２′－ビピリジルのエタノール（99.5）溶液（1→200）を均等に噴霧して２～３分間放置するとき，標準溶液から得たスポットに対応する位置の試料溶液から得たスポットは，標準溶液のスポットより大きくなく，かつ濃くない．

[方法]

外原規「α-ナフトール」確認試験（3）「酢酸 d-α-トコフェロール」の純度試験（3）（α-トコフェロール）の規定に準じて，市販のα-トコフェロールを用いて検討を行った．薄層版は TLC ガラスプレートシリカゲル 60（Merck Millipore）（20×20 cm）を用いた．

市販の酢酸 d-α-トコフェロール及びα-トコフェロールは，それぞれ 1 社の試薬を用いた．

酢酸 d-α-トコフェロール

A 社製品：　純度>96.0%

α-トコフェロール

B 社製品：　含量 98.0%以上（HPLC）

[結果]

まず，現行の試験法（展開溶媒：トルエンと酢酸（100）の混液（19：1））にて，市販の酢酸 d-α-トコフェロール（A 社製品）を用いて試料溶液を調製し，純度試験の対象成分として市販のα-トコフェロール（B 社製品）を用いて標準溶液（0.05 mg/mL）を調製し，純度試験を実施した（Fig. 1）．また 3 濃度のα-トコフェロール溶液（5，0.5，0.05 mg/mL）を調製し，同時に比較した．その結果，α-トコフェロール 3 溶液いずれも Rf 値：0.46 付近に淡赤色のスポットを認めた（Fig. 1）．また，現行の純度試験（標準溶液から得たスポットに対応する位置の試料溶液から得たスポットは，標準溶液のスポットより大きくなく，かつ濃くない）が実施できることを確認した．

次に，展開溶媒をヘキサン/酢酸エチル/酢酸（100）混液に変更し，溶媒比率をそれぞれ 9 条件

①ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（0：19：1）
②ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（4.75：14.25：1）
③ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（9.5：9.5：1）
④ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（14.25：4.75：1）
⑤ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（19：0：1）
⑥ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（15：4：1）
⑦ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（16：3：1）
⑧ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（17：2：1）
⑨ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（18：1：1）

として，市販のα-トコフェロールを用いて確認試験を行った. その結果, Rf 値はそれぞれ① 1.00，②1.00，③0.97，④0.74，⑤0.07，⑥0.73，⑦0.60，⑧0.55，⑨0.35 であり，いずれも赤色の同色調のスポットを認めた（Fig. 2）. この結果から，溶媒比率を⑧ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（17：2：1）に設定し，市販の酢酸 d-α-トコフェロールを用いて試料溶液を調製し, 市販のα-トコフェロールを用いて標準溶液（0.05 mg/mL）を調製し，再度確認試験を行った. また 3 濃度のα-トコフェロール溶液（5，0.5，0.05 mg/mL）を用いて同時に比較した. その結果，Rf 値は 0.41 付近であり，また，α-トコフェロール 3 溶液いずれも Rf 値：0.41 付近に赤色の同色調のスポットを認めたことから, 試験としての再現性を確認した（Fig. 3）. また，現行法と改正案法での TLC 結果を比較したところ, 現行法よりスポットの色はより鮮明な赤色を呈したことから, 改正案法により視認性が向上した（Fig. 4）.

以上の結果から，「酢酸 d-α-トコフェロール」純度試験（3）α-トコフェロールにおいて用いる展開溶媒とその比率は，【現行】トルエンと酢酸（100）の混液（19：1）から，有害試薬を排除した【改正案】ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（17：2：1）とすることが可能であることが示された.

以下に改正案を示す.

【改正案】「酢酸 d-α-トコフェロール」
純度試験（3）α-トコフェロール

本品 0.10g をとり, ヘキサン 10mL を正確に加えて溶かし，試料溶液とする. 別にトコフェロール標準品 0.050g をとり，ヘキサンに溶かし正確に 100mL とする. この液 1 mL を正確に量り, ヘキサンを加えて正確に 10mL とし，標準溶液とする. 試料溶液及び標準溶液 10μL につき，**ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（100）混液（17：2：1）**を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーにより試験を行う. 薄層板を風乾した後，これに塩化鉄（Ⅲ）六水和物のエタノール（99.5）溶液（1→500）を均等に噴霧した後，更に 2,2′－ビピリジルのエタノール（99.5）溶液（1→200）を均等に噴霧して 2～3 分間放置するとき, 標準溶液から得たスポットに対応する位置の試料溶液から得たスポットは, 標準溶液のスポットより大きくなく, かつ濃くない.

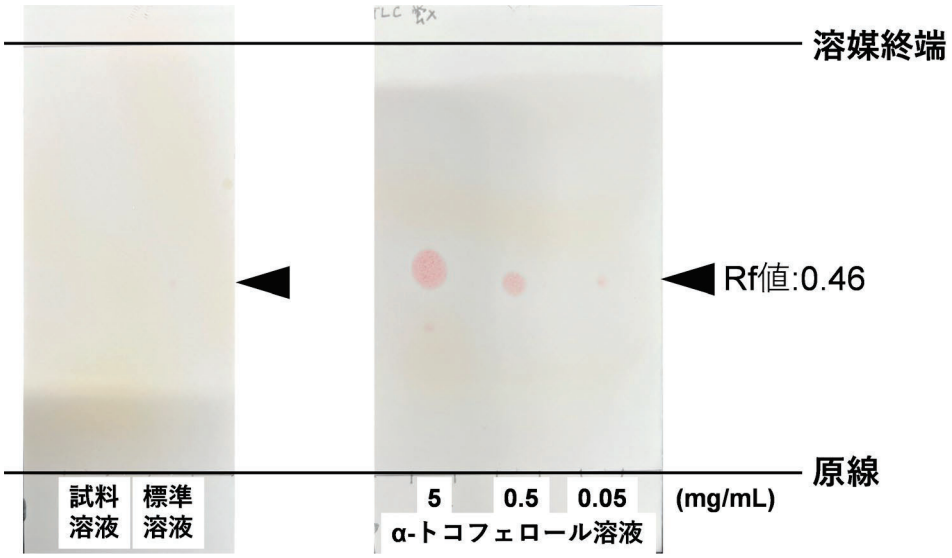
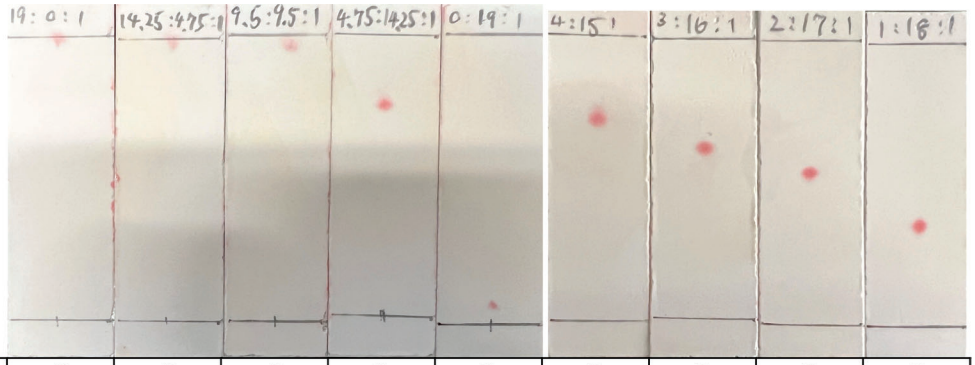


Fig. 1 酢酸 d-α-トコフェロール（試料溶液），α-トコフェロール（標準溶液：0.05 mg/mL），α-トコフェロール溶液（5，0.5，0.05 mg/mL）の TLC 分析
展開溶媒（現行法）：トルエン／酢酸（100）混液（19：1）



展開溶媒条件	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
酢酸エチル	19	14.25	9.5	4.75	0	4	3	2	1
ヘキサン	0	4.75	9.5	14.25	19	15	16	17	18
酢酸(100)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Rf値	1.00	1.00	0.97	0.74	0.07	0.73	0.60	0.55	0.35

Fig. 2　α-トコフェロールの TLC 分析

α-トコフェロール（0.5 mg/mL）

展開溶媒：

①ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（0：19：1）

②ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（4.75：14.25：1）

③ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（9.5：9.5：1）

④ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（14.25：4.75：1）

⑤ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（19：0：1）

⑥ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（15：4：1）

⑦ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（16：3：1）

⑧ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（17：2：1）

⑨ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（18：1：1）

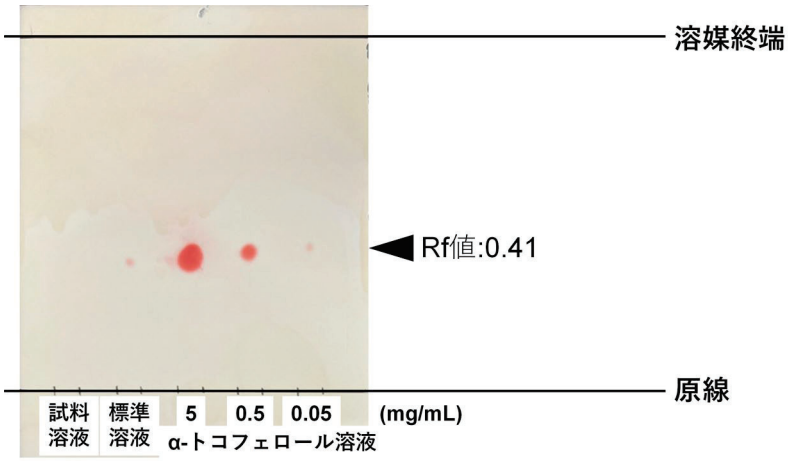


Fig. 3 酢酸 d-α-トコフェロール（試料溶液），α-トコフェロール（標準溶液：0.5 mg/mL），α-トコフェロール溶液（5，0.5，0.05 mg/mL）の TLC 分析
展開溶媒： ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（17：2：1）

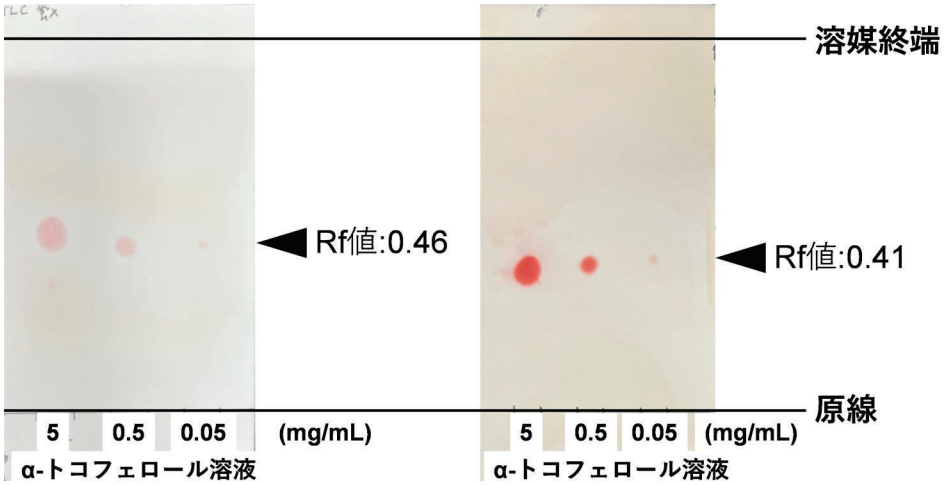


Fig. 4 α-トコフェロール溶液（5，0.5，0.05 mg/mL）の TLC 比較
A）展開溶媒（現行法）： トルエン／酢酸（100）混液（19：1）
B）展開溶媒（改正案法）：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸（17：2：1）