

Succinic Anhydride로부터 N-Hydroxysuccinimide의 친환경 생산공정 개발

구본석¹, 백정연¹, 박화인¹, 정인찬¹, 김우선^{2,*}

¹한서대학교 화학과

31962, 충청남도 서산시 해미면 한서1로 46

²(주)네이퓨

34168, 대전광역시 유성구 대학로 31, 2008호

(2020년 2월 25일 접수; 2020년 4월 13일 수정본 접수; 2020년 4월 13일 채택)

Eco-Friendly Production Process of N-Hydroxysuccinimide from Succinic Anhydride

Bon Suk Goo¹, Jeong yeon Baek¹, Hwa In Park¹, In Chan Jung¹, and Woo-Sun Kim^{2,*}

¹Department of Chemistry, Hanseo University

46, Hanseo 1-ro, Haemi-myeon, Seosan-si, Chungnam, 31962, Korea

²NAF Co., Ltd.

2008 Ho, Hanjin BDG, 31, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34168, Korea

(Received for review February 25, 2020; Revision received April 13, 2020; Accepted April 13, 2020)

요 약

제약화학 및 정밀화학 산업에서 널리 사용되는 N-히드록시숙신이마이드(N-Hydroxysuccinimide, NHS)의 새로운 친환경적인 합성법을 개발하였다. 기존 합성법은 숙신산에 히드록시아민 반응 후 강산을 촉매로 약 70%의 수율로 NHS를 얻는다. 이 방법은 저가 숙신산을 사용하여 NHS를 얻을 수 있으나 NHS를 정제하는 데에 많은 용제가 필요하고 후처리 과정이 복잡하여 수율이 낮은 문제점이 있다. 그리고 대량생산하기에는 고온반응에 따른 안전상의 위험성이 있으며 산성 촉매를 사용함에 따른 많은 폐기물 발생과 다양한 용제를 사용함에 따라 고비용의 생산비로 인해 경제적이지 않다. 이런 단점을 보완하기 위해서 반응성이 우수한 무수 숙신산을 사용하였으며 용제의 단일화 그리고 결정화 방법을 통해 고순도 및 고수율의 NHS를 제조하는 경제적인 방법을 개발하였다. 특히 촉매를 사용하지 않는 무촉매 반응과 저온의 반응조건을 확보함으로써 80% 이상의 높은 수율로 NHS를 제조하는 새로운 친환경적인 공업적인 합성법이다. 향후에는 이 결과를 바탕으로 스케일 업 연구를 통해 상용화 생산기술을 확립하여 국외 기술이전을 추진할 예정이다.

주제어 : 무촉매, N-히드록시숙신이마이드, 이소부틸알코올, 히드록시아민, 무수 숙신산

Abstract : A new eco-friendly synthetic method for N-hydroxysuccinimide (NHS), widely used in the pharmaceutical and fine chemical industries, is developed. Conventional synthesis method yields NHS of about 70% after its reaction with NH₂OH to succinic acid. In this method, NHS can be obtained using low-cost succinic acid, but a great deal of solvents are required as an extraction method to purify NHS, while the work-up process is complicated, resulting in low yield. In addition, there is a safety risk due to the high reaction temperature for commercial production, and it is not economical due to the high cost of production from the generation of much waste because of an acid catalyst and the use of various solvents. In order to make up for this shortcoming, this study used succinic anhydride as a raw material under low temperature reaction and developed a new eco-friendly industrial synthesis method using isobutyl alcohol for a single solvent and non-catalytic reaction. The economic evaluation confirms that there is a cost reduction effect of about 20%. In the future, based on this result, studies may establish a commercial production technology through scale-up research and proceed with foreign technology transfer.

Keywords : Non-catalyst, N-Hydroxysuccinimide, Isobutyl alcohol, Hydroxylamine, Succinic anhydride

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kws5457@gmail.com; Tel: +82-42-863-1693; Fax: +82-42-864-1693

doi: 10.7464/ksct.2020.26.2.91 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

N-히드록시숙신이마이드(N-Hydroxysuccinimide, NHS)는 제약화학 및 생화학 분야에서 펩티드가 커플링될 때 라세미 작용의 발생을 억제할 수 있는 활성 에스테르의 제조를 위한 카르복실산의 활성화 시약(activating reagent)으로 널리 사용되며 [1-3], 항생제, 아미노산, 단백질 등의 전구체 등의 제약생산에서 매우 광범위하게 사용된다. 또한 NHS는 매우 중요한 정밀화학 및 화학 원료로서 항원, 항체, 효소 및 핵산의 아미노산, 카르복실기를 보호하는 기능이 또는 당 그룹과의 합성 펩타이드, 유산균 산화 및 중합반응에 널리 사용된다[4-9]. 또한 최근에는 화장품 산업분야에서 피부컨디셔닝제(skin-conditioning agent)로써 향산화 및 표백효과 등의 화장품에 사용되고 있다[10].

종래의 NHS의 합성법은 Figure 1에 나타난 바와 같이 숙신산(1)과 히드록실아민(2)과의 반응으로 히드록실아민의 암모늄염(3)을 거쳐 중간체인 N-hydroxysuccinamic acid(4)를 얻고 이를 산 촉매하에서 반응시켜 NHS(5)를 얻는다[11-13].

이때 강산과 고온의 반응에 따라 부산물이 많이 증가하였으며 반응물은 색상이 짙은 갈색을 보이며 부반응이 많이 진행되어 수율이 낮다. 이의 색상을 제거하기 위해 활성탄을 사용하였으며 과량의 추출용매가 요구됨에 따라 환경적으로나 경제성 측면에서도 불리하였다.

이와 같은 숙신산은 무수 숙신산 대비하여 반응 중 물의 발생량이 많으며 생성된 물을 제거하기 위한 공비용매와 부생염인 황산나트륨을 제거하기 위한 유기용매와 고온반응에 따른 격렬한 조건으로 부산물의 증가로 정제과정을 거쳐야 하며 물 제거에 오랜 시간이 걸리는 등의 생산비용 및 경제성이 열악하다. 또한 강산의 사용으로 인한 불순물이 증가하며 고순도 NHS를 얻기 위해 과량의 추출용매가 요구되며 이의 수율이 낮은 문제점이 있다.

이런 문제점을 극복하기 위해서 본 연구에서는 반응성이 높은 무수 숙신산을 사용하여 저온반응과 무촉매 그리고 단일 용매를 사용하는 친환경적이고 경제성이 우수하며 상업적 생산에 안전한 NHS를 제조하는 새로운 합성법을 개발하였다.

2. 실험방법

2.1. 기기 및 시약

반응에 사용한 무수 숙신산($\geq 99.0\%$) 및 황산히드록실암모늄($\geq 99\%$)는 junsei chemical사의 제품을 이소부틸알코올(\geq

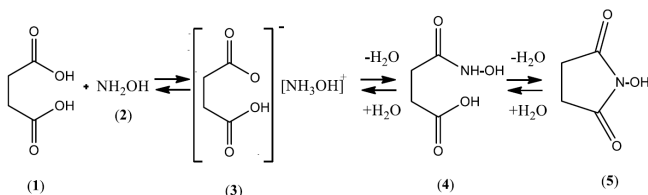


Figure 1. Synthesis of NHS using Succinic acid over acid catalyzt.

99.5%), NaOH ($\geq 98.0\%$), 아세톤($\geq 99.5\%$)는 삼전화학에서 구매하여 정제 없이 사용하였다.

합성한 화합물의 구조분석을 위하여 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, bruker), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, bruker), FT-IR spectrometer (FTS165, Bio-Rad)를 사용하였고 원소분석은 한국 고분자시험 연구원에 의뢰하여 C, H, N은 원소분석기(EA 2000, thermo finnigan)를 O는 원소분석기(EA 1112, thermo finnigan)를 사용하여 분석하였다. 녹는점(melting point)은 전자동 측정기인 A. krüss optronic 사의 M5000을 사용하여 측정하였으며, 합성된 NHS 순도는 1.0 N NaOH 용액으로 적정방법(titration method)을 사용하여 아래의 식에 따라 구하였다.

$$\text{순도}(\%) = [115.09 \times (V - V_a) \times F \times N / \text{시료}(\text{g}) \times 1,000] \times 100$$

V: 1.0 N NaOH의 소비량(ml)

V_a: blank test에 소비된 1.0 N NaOH 용액의 ml

F: 1.0 N NaOH 용액의 factor

N: NaOH 용액의 농도

2.2. 합성

기계식 교반기(mechanical stirrer)와 딘스탁 장치(Dean-Stark trap)가 장착된 3구 둥근 플라스크에 황산히드록실암모늄(98.5 g, 0.6 mole, 0.6 eq.), 이소부틸알코올(100 ml)를 넣고 교반하에 30.6% (w/w) NaOH 용액(144.0 g, 1.1 mole, 1.1 eq)을 약 30 min에 걸쳐 적가하며 반응기 내부온도는 15-20 °C로 유지한다. NaOH 용액의 적가가 완료된 후 무수 숙신산(100.0 g, 1.0 mole, 1.0 eq.)를 가하고 반응기 내부온도는 20-30 °C로 유지하여 약 30 min 동안 반응한다. 추가로 반응기 내부온도를 40 °C로 승온시키고 약 한 시간 동안 교반한다. 이때 반응물은 NHS와 숙신산과 중간체인 N-hydroxysuccinamic acid의 혼합물이 생성된다. 이때 N-hydroxysuccinamic acid은 분리하지 않았으며 혼합물의 상태로 $^1\text{H-NMR}$ 로 확인하였다.

N-hydroxysuccinamic acid (백색고체) [14]: m.p. 82-86 °C; FT-IR (KBr): 3259, 1708, 1656, 1423, 1219 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D₂O): δ 2.34 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₂), 2.57 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₂); HRMS (ESI) calcd. for C₄H₆NO₄ (M-H)⁻, 132.0302; found, 132.0303.

반응 중 생성된 물은 이소부틸알코올과 공비증류를 통하여 약 100 torr에서 감압증류하며 딘스탁 분별화 장치를 통하여 물을 제거하며 반응 종결은 물의 양으로 확인한다. 약 14 h 후 물의 양이 136.0 g이 제거되면 반응이 종결된다. 감압증류 중 내부온도는 초기 50 °C에서 반응종결 단계인 65 °C까지 상승한다.

반응 종결 후, 상온으로 냉각하여 반응 중 생성된 황산나트륨을 여과하여 제거한다. 이때 여과액을 $^1\text{H NMR}$ 로 분석한 결과, NHS의 함량은 96%, 숙신산의 함량은 4%이었다. 여과액을 증류하여 이소부틸알코올 50 ml를 증류해 내고 아세톤 30 ml를 반응기에 넣고 교반하면서 60 °C에서 환류하여 용해시킨다. 반응기 내부온도를 약 15 °C로 서서히 냉각하여 결정화하고

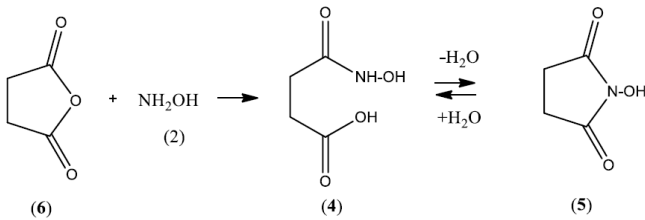


Figure 2. Synthesis of NHS using Succinic anhydride without catalysis.

백색의 NHS (91.8 g, 80%)를 여과하여 얻는다.

N-hydroxysuccinimide (백색고체): m.p. 96-98 °C, 원소분석: calcd. For C₄H₅NO₃; C, 41.75; H, 4.38; N, 12.17; O, 41.70. Found: C, 41.55; H, 4.42; N, 12.02; O, 41.95, 순도(%) : 99.78, ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 2.70 (s, 4H), ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 27.0, 164.3, FT-IR (KBr) (ν_{max} cm⁻¹): 1,700, 2,800-3,200.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 개발된 NHS의 합성법은 Figure 2에 나타내었다. 기존방법에서는 촉매로 강산 또는 루이스 산 및 pH 조절용으로 인산염 등의 촉매를 사용하였으며, 공비증류용매로 톨루엔, 부생되는 황산나트륨 염 제거를 위해 에틸알코올 등의 유기용매를 사용하고 반응물로부터 NHS를 선택적으로 추출하기 위해 과량의 에틸아세테이트를 사용하였다[15]. 그러나 본 연구는 낮은 반응온도와 감압증류를 통한 효율적인 물 제거 그리고 반응액의 pH를 조절함으로써 무촉매 반응과 효율적인 용매 선정으로 용매의 단일화를 이루었다.

Table 1에 본 연구에 사용한 원료, NaOH 농도, 촉매, pH 조절, 반응시간 등의 반응조건에 따른 NHS의 수율을 조사하였으며 그 결과를 나타내었다. 반응의 종결은 제거된 물의 양을 측정하여 결정하였으며 NaOH의 사용량은 원료 기준 1.0 당량 대비 좋은 결과를 보인 1.1 당량을 선정하였다. 비교 반응원료로는 숙신산과 촉매는 루이스 산인 아세트산아연, 붕산을 사용하였으며 숙신산 기준 0.2 당량을 사용하였다[16].

상기 표식(Table 1)과 같이, 숙신산(entry 1-2)을 원료로 NHS를 얻을 때 이론량의 물을 제거함에 어려움이 있었고 200 °C의 높은 온도에서 이론량의 물을 제거할 수 있었다. 숙신산 반응

의 활성도는 무수 숙신산 반응의 활성도보다 낮고, 반응에 필요한 활성화 에너지가 높다[17]. 따라서 200 °C의 고온의 반응온도와 오랜 반응시간이 필요하며 반응공정에서 촉매가 필요하고, 촉매는 산성물질을 사용한다. 강산성 물질은 히드록실아민과 먼저 반응하여 히드록실아민염을 형성하기 때문에 촉매로 인한 반응성은 저하된다. 반응이 진행되는 동안, 히드록실아민염은 유리 히드록실아민으로 해리하기 어렵거나 유리 히드록실아민의 농도가 낮아 반응에 불리하다[18].

상기 공정은 공비증류용매인 톨루엔으로 반응 생성물인 물을 완전 제거하고, 톨루엔을 제거한 후 반응기에 잔류하는 고점도 NHS 반응 혼합물은 고온반응에 의한 NHS의 분해를 유발하며, 미반응물 히드록실아민이 남아 있을 경우 폭발의 위험이 있어 주의해야 한다[19-22]. 이어서 NHS 반응물로부터 과량의 에틸알코올을 사용하여 황산나트륨 염을 제거해야 한다. 생성된 NHS 내에는 고형질의 불순물이 많고 색상을 띠어 활성탄을 처리해야 하며 NHS 내의 부 반응물인 숙신산을 제거하기 위해 과량의 에틸아세테이트로 여러 번 추출하여 정제함으로써 많은 공정비용과 용제비가 발생된다.

따라서 본 연구(entry 3-5)에서 반응성이 우수한 무수 숙신산(6)을 사용하였으며, 반응용매, 물을 제거하기 위한 공비용매 그리고 염 제거 용매로 사용하는 다기능성 이소부틸알코올은 NHS에 불용성인 톨루엔 대비 NHS와의 용해성이 있어 반응물의 균일화가 가능하며 반응속도가 빠르며 물의 공비효과도 우수하다. 물을 제거한 후, 부생된 황산나트륨 염을 여과함으로써 NHS 반응물은 불순물이 거의 없고 변색이 없으며 여과액에 아세톤을 혼합하여 결정화를 유발하여 NHS(5)를 고순도의 높은 수율로 얻을 수 있다.

본 연구에서 다기능성 이소부틸알코올을 반응용매로 사용하여 반응속도를 높였으며 물의 사용을 최소화함으로써 물로 인한 역반응을 최소화하였고 황산히드록실아민암모늄의 중화점을 조정함으로써 pH의 최적 산점을 찾아 친환경적인 무촉매 반응을 이루었다. 또한 감압조건에서의 저온반응으로 물 제거 효율도 상승되었고 반응시간을 단축하였으며 NHS의 제조조건이 온화하여 폐기물 발생이 적고 순도 및 수율이 크게 향상된 결과를 보였다. 이는 기존공정 대비 감압증류에 의한 비교적 낮은 온도조건에서 물 제거를 하여 부 반응이 거의 일어나지 않았으며 반응물인 NHS의 안정성이 유지되며 NHS 분해가 방지되는 효과가 있다. 고가의 촉매비용이 발생이 안되며 활성탄을

Table 1. Yields of NHS under various reaction conditions.

Entry	Starting materials	Molar equiv. of NaOH ^a	Catalyst	pH ^b	Temp. (°C)	Press. (torr)	Time (h) ^c	Yield (%) ^d
1	Succinic acid	1.0 eq	Zn(OAc) ₂	3.0	200	760	18	68
2	Succinic acid	1.0 eq	B(OH) ₃	3.0	200	760	18	70
3	Succinic anhydride	1.1 eq	B(OH) ₃	3.0	65	100	15	70
4	Succinic anhydride	1.1 eq	None	3.6 - 3.8	65	100	14	80
5	Succinic anhydride	1.2 eq	None	3.8 - 4.0	65	100	14	75

^a 원료(숙신산 또는 무수 숙신산) 기준 1.0 ~ 1.1 eq. 사용, ^b 원료(숙신산 또는 무수 숙신산) 투입 후, ^c 이론치의 물의 제거된 시간, ^d 정제 후 수율

Table 2. Economic evaluation of NHS raw material costs from succinic acid and succinic anhydride.

Materials	Unit price (\$/kg)	Amount used (g)	Price (\$)	Yield (%)
Succinic acid	3.0	1,429	4.29	
Hydroxylamine sulfate	3.3	1,191	3.93	
NaOH	0.4	483	0.19	
Boric acid	0.88	150	0.13	
Toluene	1.30	124	0.16	
Ethyl alcohol	1.72	169	0.29	
Ethyl acetate	1.32	1,159	1.53	
NHS		1,000	10.52	70
Succinic anhydride	3.8	1,101	4.18	
Hydroxylamine sulfate	3.3	1,085	3.58	
NaOH	0.4	485	0.19	
Isobutyl alcohol	2.1	88	0.19	
Acetone	2.6	130	0.34	
NHS		1,000	8.48	80

사용하지 않음에 따라 폐기물의 발생이 적었다.

NHS의 실용적인 합성법을 확인하기 위해 신규의 무수 숙신산과 기존의 숙신산을 이용한 합성법의 경제성을 검토하였으며 그 결과를 아래 Table 2에 정리하였다.

기존의 숙신산을 사용했을 때는 고온의 반응조건과 산촉매 사용으로 부산물이 많이 생성됨으로써 수율이 최대 70%로 얻었으며 다양한 용제의 사용과 특히 NHS 추출용제인 에틸아세테이트의 과량 사용으로 용제비가 발생되었다. 이는 다양한 용제를 사용함에 따른 용제탱크 운영과 폐기물로 인한 생산비 및 환경비용이 발생된다.

신규의 무수 숙신산을 사용했을 경우는 저온반응 및 무촉매 반응으로 NHS 수율이 80%로 높았으며 단일용제 이소부틸알코올과 정제용제인 아세톤 혼합용제를 사용함으로써 용제회수가 단순하며 생산비 절감과 폐액이 발생되지 않는 친환경공정이다.

Table 2에 나타난 바와 같이 기존 공정대비 신규 공정은 약 20%의 원가 절감의 효과가 있으며 가격 경쟁력이 있는 신규 공정임을 확인하였다.

4. 결론

본 논문에서는 정밀화학 및 의약품 산업에서 널리 사용되는 NHS의 공업적으로 안전하고 친환경적이고 경제성이 있는 새로운 제조법을 개발하기 위해 연구하였다. 본 제조공정은 활성도가 높은 무수 숙신산을 출발물질로 하여 저온반응, 무촉매 반응으로 폐기물이 없는 최적의 조건을 개발하였다. 기존의 숙신산을 사용한 NHS 합성보다 수율이 70%에서 80%로 향상된 결과를 얻었으며 경제성 측면에서도 약 20%의 원가 절감 효과가 있음을 확인하였다.

이 결과를 산업화에 적용시 종래의 NHS 제조방법들에 비해 온화한 반응조건과 공정시간을 획기적으로 줄일 수 있으며 폐기물에 의한 환경문제를 일으키지 않으면서 NHS의 분리과정,

정제과정도 우수한 청정생산기술기반을 제공하고 상업생산의 안전성 및 경제성 향상에 크게 기여할 것으로 판단된다.

References

1. Knight, D. W., "N-Hydroxysuccinimide," *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. (2001).
2. Anderson, G. W., Zimmerman, J. F., and Callahan, F. M., "N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis," *J. Am. Chem. Soc.*, **85**(19), 3039-3039 (1963).
3. Anderson, G. W., Zimmerman, J. E., and Callahan, F. M., "The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis," *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1839-1842 (1964).
4. Nefkens, G. H. L., Tesser, G. I., and Nivard R. J. F., "Synthesis and Reactions of Esters of N-Hydroxyphthalimide and N-Protected Amino Acids," *Rec. Trav. Chim. Des Pays-Bas.*, **81**, 683-690 (1962).
5. Ishii, Y., and Sakaguchi, S., "A New Strategy for Alkane Oxidation with O₂ using N-Hydroxyphthalimide (NHPI) as a Radical Catalyst," *Catal. Surv. Asia*, **3**, 27-35 (1999).
6. Ishii, Y., Sakaguchi, S., and Iwahama, T., "Innovation of Hydrocarbon Oxidation with Molecular Oxygen and Related Reactions," *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 393-427 (2001).
7. Sheldon, R. A., and Arends, I. W. C. E., "Organocatalytic Oxidations Mediated by Nitroxyl Radicals," *Adv. Synth. Catal.*, **346**, 1051-1071 (2004).
8. Vanderbilt, D. P., and Butler, G. B., "Bifunctional Synthetic Enzymes via Alternating Copolymerization. I. Copolymers Containing Alternating Imidazole and Hydroxamic Functions," *J. Macromol. Sci. PartA - Chem.*, **22**, 541-578 (1985).
9. Ahn, K., Koo, D., and Willson, C. G., "Synthesis and Polymerization of T-BOC Protected Maleimide Monomers: N-(t-butyloxycarbonyloxy) Maleimide and N-[p-(t-butyloxy

- carbonyloxy)-phenyl]maleimide,” *Polymer*, **36**, 2621-2628 (1995).
10. Gottschalck, T. E., and Bailey, J. E., “International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook,” 12th ed., Personal Care Products Council, USA, 1272-1280 (2008).
 11. Son, D. L., Shun, N., and Kohki, E., “Synthesis of N-Hydroxysuccinimide from Succinic Acid and Hydroxylammonium Chloride using Amberlyst A21 as Reusable Solid Base Catalyst,” AIP Conference Proceedings 1929, 020017-1-020017-6 (2018).
 12. Tang, X., Niu, B., Yang, F., Liu, G., Li, R., Wang, X., Zang, Q., and Li, M., “Preparation Method of N-hydroxysuccinimide,” CN 108558728 (2018).
 13. Kajikawa, Y., “Process for Producing cyclic N-Hydroxyimide Compounds,” EP 17575834 (2007).
 14. Mecinovici, J., Loenarz, C., Chowdhury, R., and Schofield, C. J., “2-Oxoglutarate Analogue Inhibitors of Prolyl Hydroxylase Domain 2,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(21), 6192-6195 (2009).
 15. Xing, L., Niu, B., Yang, F., Liu, G., Li, R., Wang, X., Zhang, Q., and Li, M., “Method for Preparing N-Hydroxysuccinimide,” CN108558728 (2018).
 16. Kim, D. N., and Kim, S. C., “Practical Synthesis of N-Hydroxysuccinimide Using Lewis Acid Catalyst,” *Appl. Chem. Eng.*, **30**(3), 313-315 (2019).
 17. Jaensch, H., “Process For Preparing N-Substituted Cyclic Imides,” U.S. Patent, 2011/0319635 A1 (2011).
 18. Elke, F., “Process for the Preparation of Cyclic N-Hydroxydicarboximides,” U.S. patent 6,316,639 B1 (2001).
 19. “Technical Policy to Fire Explosion Prevention for Hydroxylamine Etc.,” Korea Occupational Safety and Health Agency., KOSHA GUIDE (P-142-2014).
 20. Hazardous Materials Handbook, 5th Edition, Maruzen, (1998).
 21. “Explosion Hazard and Safe Handling of Hydroxylamine, Etc.,” JNIOH, (NIIS-SG-No.1), (2001).
 22. “Technical Guidelines for Safe Handling of Hydroxylamine, Etc.,” Ministry of Health, Labor and Welfare Ordinance No. 212, (2001).