

有害な試薬を使用する試験法の見直しの検討状況（報告）

1. 背景

飼料添加物の成分規格を確認する一部の試験法は、次の①又は②に該当する有害な試薬を使用する試験法であり、現在、試験の実施が困難な状況である。

① モントリオール議定書の規制対象物質（オゾン層破壊物質）
（四塩化炭素等）

② 発がん性を有する物質（ベンゼン、クロロホルム等）

このため、有害な試薬を用いる試験法の見直しを順次進めることとした。

2. 現在の状況

飼料添加物の成分規格において、(1)及び(2)では、ベンゼンを使用する試験法が定められている。昨年度は、(1)及び(2)の試験法の見直しとして、ベンゼンを用いない試験法の開発を行った。

(1) ビタミン D 定量法

(2) ビタミン A 定量法（第 1 法）

本年度は、業界から、以下の試験法について早期見直しの要望があったことから、これらの試験法について、優先的に見直しを行うこととした。

(3) 塩酸チアミン定量法（臭化シアン）

(4) 硝酸チアミン定量法及び確認試験法（臭化シアン、クロロホルム）

(5) 塩酸ピリドキシン定量法及び確認試験法（酢酸第二水銀、クロロホルム）

3. 今後の予定

○昨年度開発した試験法（(1) ビタミン D 定量法、(2) ビタミン A 定量法）については、順次省令の改正の手続きを進めていく。

(1) ビタミン D 定量法

(2) ビタミン A 定量法（次回以降）

○今後見直しが必要な試験法については、来年度以降、見直しを検討する。

○本年度見直しを行う(3)～(5)の試験法については、今後、見直しが終了した試験法から、順次省令の改正の手続きを進めていく。

(参考)

1. ビタミン D 定量法 (抜粋)

遮光容器を用い、操作は、速やかに行う。

8,000 ビタミン D 国際単位を含む量の試料を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、フラスコに入れ、無アルデヒドエタノール 50mL 及びピロガロールのエタノール溶液 (2→10) 20mL を加える。次に、水酸化カリウム溶液 (9→10) 8 mL を加え、還流冷却器を付け、水浴上で 30 分間加熱し、けん化する。速やかに常温まで冷却し、ベンゼン 100mL を全量ピペットを用いて加え、栓をし、よく振り混ぜた後、分液漏斗に移し、これに水酸化カリウム試液 40mL を加え、15 秒間激しく振り混ぜた後、静置し、水層を除く。

ベンゼン層に水酸化カリウム溶液 (3→100) 40mL を加え、振り混ぜた後、静置し、水層を除く。これに水 40mL を加え、静かに 2～3 回倒立した後、静置し、水層を除く。さらに、毎回水 40mL ずつで洗い、回の進むにつれて次第に強く振る。洗液がフェノールフタレイン試液で呈色しなくなるまで洗った後、水をできる限り除く。次に、乾燥した円形のろ紙 (直径 9 cm) に切り込みを入れたものを加え、ベンゼン層が澄明になるまで振り混ぜる。

ベンゼン層 50mL を全量ピペットを用いて量り、ガラス栓付 100mL のナス型フラスコに入れ、40°C の水浴中で振り動かしながらアスピレーターを用いて減圧留去する。残留物にアセトン 1.0 mL を全量ピペットを用いて加え、栓をしてよく振り混ぜて溶かし、薄層クロマトグラフ用試料溶液とする。この試料溶液 0.2 mL を全量ピペット又はマイクロピペットを用いて量り、薄層クロマトグラフ用シリカゲル (蛍光剤入り) を用いて調製した薄層板にスポットする。別に、ビタミン D・プレ D 溶液を同一の薄層板のすみにスポットする。次に、n-ヘキサン・酢酸エチル混液 (4 : 1) を展開溶媒として約 15cm 展開した後、薄層板を風乾し、紫外線 (主波長 254nm) を照射し、薄層クロマトグラフ用試料溶液から得たビタミン D 及びプレ D の部分をステンレス製ミクロスパーテルで 5 分以内にかきとり、50mL のビーカーに入れる。

アセトン 5 mL ずつで 6 回抽出し、ろ紙を用いて 50mL の丸底フラスコ中にろ過する。ろ紙は、少量のアセトンで洗い、洗液をろ液に合わせる。アセトン抽出液を、40°C の水浴中で振り動かしながらアスピレーターを用いて減圧留去する。速やかに室温に戻し、残留物に内部標準液 B 液 0.50mL を全量ピペット又はマイクロピペットを用いて加え、溶かし、試料溶液とする。

試料溶液及びビタミン D 標準液につき、次の条件でガスクロマトグラフ法により試験を行い、半値幅法によりピロ D 及び酢酸スチグマステロールそれぞれのピーク面積を求め、その面積比を求める。

試料1g中のビタミンDの国際単位数

$$= S \times \frac{\text{試料溶液の内部標準物質に対するピロDのピーク面積比}}{\text{標準溶液の内部標準物質に対するピロDのピーク面積比}} \times V \times \frac{1}{W}$$

S：標準液 0.5 mL 中のビタミン D の国際単位数（標準液 1 mL 中には、1,600 国際単位のビタミン D を含む。）

V：希釈倍数（上記の場合は、 $2 \times 5 = 10$ である。）

W：試料の g 数

なお、操作条件は、次のとおりとする。

検出器：水素炎イオン化検出器

分離管：内径 4 mm、長さ 1.5 m のガラスカラム（1.5 %メチルフェニルシリコーン—AW—DMCS 80～100 メッシュ）

温度：分離管 225℃ 試料注入口 250℃ 検出器 300℃

注入量：5 μ L

キャリアーガス及び流速：窒素、内部標準物質が約 40～60 分後に現れるように窒素の流速を調整する。

ビタミン D・プレ D 溶液：ビタミン D 標準品 5 mg（4.5～5.4 mg）を量り、二塩化エチレン 10mL を加えて溶かし、水浴中で 30 分間還流する。用時調製する。