

有害な試薬等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、農林水産省の委託事業により、ベンゼンを使用する試験法から順次見直しを進めることとした。

2. 現在の状況

飼料添加物の成分規格において、ベンゼンを使用する試験法が定められており、そのうちの(1)から(3)について、委託事業により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 …R3 委託事業にて開発
- (2) ビタミン A 定量法（第 1 法） …R3 委託事業にて開発
- (3) ニコチン酸アミド定量法 …R5 委託事業にて開発

他方、業界から、ベンゼン以外の有害な試薬等を使用する以下(4)から(7)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、優先的に試験法の開発を行った。

- (4) 塩酸チアミン定量法（臭化シアン）
- (5) 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）
- (6) 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）
- (7) 1,4-ジオキサン試験法（試験が実施できない）

ビタミン D 定量法及びその他試験法に関する所要の改正について、飼料添加物規格小委員会において議論され、了承を得た。

【審議経過】

令和 6 年 11 月 27 日 飼料添加物規格小委員会

3. 今後の予定

- 1) 飼料添加物規格小委員会において了承された改正案について、所要の手続きを行う。
- 2) 見直しが必要な試験法については、今後も順次試験法の検討を行う。

(参考)

ビタミンD 定量法 (抜粋)

操作法

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50 mL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100 mL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40 mL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)40 mLを加え、振り混ぜた後、静置し、水層を除く。これに水40 mL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40 mL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50 mLを全量ピペットを用いて量り、ガラス栓付100 mLのナス型フラスコに入れ、40℃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15 cm展開した後、薄層板を風乾し、紫外線(主波長254 nm)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、50 mL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50 mLの丸底フラスコ中へろ過する。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℃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0.50 mL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。

(参考)

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。

$$\begin{aligned} & \text{試料1g中のビタミンDの国際単位数} \\ = & S \times \frac{\text{試料溶液の内部標準物質に対するピロDのピーク面積比}}{\text{標準溶液の内部標準物質に対するピロDのピーク面積比}} \times V \times \frac{1}{W} \end{aligned}$$

S：標準液0.5 mL中のビタミンDの国際単位数(標準液1mL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 °C 試料注入口250 °C 検出器300 °C

注入量：5 µL

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。