

飼料添加物の試験法等の見直しについて（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(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
（本分科会にて報告済）
- (2) ビタミン A 定量法（第 1 法） …R3 委託事業にて開発
（本分科会にて報告済）
- (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(6)の試験法について早期見直しの要望があったことから、R4 年度の委託事業で、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)

本年度の委託事業においては、ベンゼンを用いる以下の試験法の開発を進めている。

- (7) d-ビオチン定量法
- (8) 鉛試験法（ジチゾン法）

上記（4）～（6）の試験法及びその他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7年 9月12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、2の(4)～(6)の改正案について、所要の手続きを行う。
- (2) 開発が終了した試験法から、今後順次飼料添加物規格小委員会で省令の改正案について御議論いただく。

(参考)

塩酸チアミン、硝酸チアミン及び塩酸ピリドキシンの成分規格 (抜粋)

(35) 塩酸チアミン

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

含量 本品は、105℃で2時間乾燥した後、定量するとき、塩酸チアミン ($C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$) 98.0～102.0%を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、白色の結晶又は結晶性の粉末で、臭いはない、又は僅かに特異な臭いを有する。
- ② 本品は、水に溶けやすく、エタノール又はグリセリンに溶けにくく、エーテル又はベンゼンにほとんど溶けない。
- ③ 融点 約245℃(分解)

確認試験

- ① 本品の水溶液(1→500)2 mLにヨウ素試液2～3滴を加えるときは赤褐色の沈殿又は混濁を、マイヤー試液2～3滴を加えるときは帯黄白色の沈殿又は混濁を、ピクリン酸試液1 mLを加えるときは黄色の沈殿又は混濁を生じる。
- ② 本品の水溶液(1→500)1 mLに酢酸鉛試液1 mL及び水酸化ナトリウム溶液(1→10)1 mLを加え、加温するとき、溶液は、黄色を経て褐色に変わり、放置するとき、黒褐色の沈殿を生じる。
- ③ 本品の水溶液(1→500)5 mLに1 mol/L水酸化ナトリウム試液2.5 mL及びフェリシアン化カリウム試液0.5 mLを加え、次に、イソブタノール5 mLを加え、2分間激しく振り混ぜ、放置し、紫外線下で観察するとき、イソブタノール層は青紫色の蛍光を発する。この蛍光は、酸性にすると消え、アルカリ性に戻すと再び現れる。
- ④ 本品の水溶液(1→500)は、塩化物の定性反応を呈する。

純度試験

- ① pH 本品1.0 g(0.95～1.04 g)に水を加えて溶かし、100 mLとした溶液のpHは、2.7～3.4でなければならない。

- ② 溶状 本品1.0 g(0.95～1.04 g)に水を加えて溶かし、10 mLとすると
き、その溶液の色は、0.017 mol/L重クロム酸カリウム液1.5 mLに水を加えて1,000 mLとした溶液の色より濃くてはならない。
- ③ 硫酸塩 本品1.5 g(1.45～1.54 g)を量り、硫酸塩試験法により試料溶液を調製し、0.005 mol/L硫酸0.35 mLを用いて比較液を調製して硫酸塩の試験を行うとき、試料溶液の呈する混濁は、比較液の呈する混濁より濃くてはならない(0.011%以下)。
- ④ 硝酸塩 本品0.5 g(0.45～0.54 g)に水25 mLを加えて溶かし、この溶液2 mLに硫酸2 mLを加え、振り混ぜ、放冷した後、硫酸第一鉄試液を層積するとき、接界面に暗褐色の輪帯を生じてはならない。
- ⑤ 重金属 本品1.0 g(0.95～1.04 g)を量り、重金属試験法第1法により試料溶液を調製し、鉛標準液2.0 mLを用いて比較液を調製して重金属の試験を行うとき、試料溶液の呈する色は、比較液の呈する色より濃くてはならない(20 µg/g以下)。

乾燥減量 5.0%以下(0.5 g, 105 °C, 2時間)

強熱残分 0.20%以下(1 g)

定量法 本品及び塩酸チアミン標準品をそれぞれ105 °Cで2時間乾燥し、それぞれの約0.1 gを0.001 gの桁まで量り、その数値を記録し、それぞれに0.001 mol/L塩酸試液を加えて溶かし、これらを200 mLの全量フラスコにそれぞれ入れ、更に0.001 mol/L塩酸試液を標線まで加えてそれぞれ200 mLとする。これらの溶液2 mLを全量ピペットを用いて量り、50 mLの全量フラスコにそれぞれ入れ、0.001 mol/L塩酸試液を標線まで加えてそれぞれ50 mLとし、試料溶液及び標準液とする。試料溶液5 mLを共栓試験管T及びT' に全量ピペットを用いて量り、Tには、臭化シアン試液3.0 mLを加え、振り混ぜ、さらに、水酸化ナトリウム溶液(1→10)5.0 mLを30秒以内に加え、振り混ぜ、T' には、水酸化ナトリウム溶液(1→10)5.0 mLを加え、振り混ぜ、さらに、臭化シアン試液3.0 mLを加え、振り混ぜる。別に、標準液5 mLを共栓試験管S及びS' に全量ピペットを用いて量り、試料

溶液と同様に操作する。それぞれの溶液につき、水を対照液とし、波長368 nmにおける吸光度 A_T 、 $A_{T'}$ 、 A_S 及び $A_{S'}$ を測定する。

$$\begin{aligned} & \text{塩酸チアミン}(\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl})\text{の量}(\text{mg}) \\ &= \text{塩酸チアミン標準品の量}(\text{mg}) \times \frac{A_T - A_{T'}}{A_S - A_{S'}} \end{aligned}$$

(イ) 保存の方法の基準

遮光した気密容器に保存すること。

イ 製剤 (略)

(51) 硝酸チアミン

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

含量 本品は、105℃で2時間乾燥した後、定量するとき、硝酸チアミン($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$)98.0～102.0%を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、白色～微黄白色の結晶又は結晶性の粉末で、臭いはない、又は僅かに特異な臭いを有する。
- ② 本品は、水にやや溶けにくく、エタノールに極めて溶けにくく、クロロホルムにほとんど溶けない。
- ③ 融点 約193℃(分解)

確認試験

- ① 塩酸チアミン製造用原体の確認試験①、②及び③を準用する。
- ② 本品の水溶液(1→50)は、硝酸塩の定性反応①及び②を呈する。

純度試験

- ① pH 本品1.0 g(0.95～1.04 g)に水を加えて溶かし、100 mLとした溶液のpHは、6.5～8.0でなければならない。
- ② 塩化物 本品0.20 g(0.195～0.204 g)を量り、塩化物試験法により試料溶液を調製し、0.01 mol/L塩酸0.3 mLを用いて比較液を調製して塩化物

の試験を行うとき、試料溶液の呈する混濁は、比較液の呈する混濁より濃くてはならない(0.053%以下)。

- ③ 硫酸塩 本品1.5 g(1.45～1.54 g)に水30 mL及び希塩酸2 mLを加えて溶かし、これに水を加えて50 mLとし、これを試料溶液とする。0.005 mol/L硫酸0.35 mLに希塩酸2 mL及び水を加えて50 mLとし、これを比較液として硫酸塩の試験を行うとき、試料溶液の呈する混濁は、比較液の呈する混濁より濃くてはならない(0.011%以下)。

- ④ 重金属 本品1.0 g(0.95～1.04 g)を量り、重金属試験法第1法により試料溶液を調製し、鉛標準液2.0 mLを用いて比較液を調製して重金属の試験を行うとき、試料溶液の呈する色は、比較液の呈する色より濃くてはならない。ただし、試料は、加温して溶かす(20 µg/g以下)。

乾燥減量 1.0%以下(0.5 g, 105 °C, 2時間)

強熱残分 0.20%以下(1 g)

定量法 本品及び塩酸チアミン標準品をそれぞれ105 °Cで2時間乾燥し、以下塩酸チアミン製造用原体の定量法を準用する。

硝酸チアミン($C_{12}H_{17}N_5O_4S$)の量(mg)

$$= \text{塩酸チアミン標準品の量(mg)} \times \frac{F_r - F_r'}{F_s - F_s'} \times 0.1941$$

(イ) (略)

イ 製剤(その1)

(ア) 成分規格

硝酸チアミン製造用原体の成分規格を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

硝酸チアミン製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

ウ 製剤(その2)

(ア) 成分規格

本品は、硝酸チアミン製造用原体に、賦形物質を混和した粉末又は粒子で

ある。

含量 本品は、定量するとき、表示量の90～110%に相当する硝酸チアミン($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$)を含む。

確認試験

- ① 本品の表示量に従い、硝酸チアミン製造用原体0.02 gを含む量を量り、水50 mL及び希酢酸10 mL、並びに硬化油、高級飽和脂肪酸、脂肪酸、植物性油脂又は動物性油脂を含む製剤にあつては、クロロホルム20 mLを加え、振り混ぜた後、静置し、水層をろ過する。初めのろ液10 mLを除き、次のろ液5 mLを量り、マイヤー試液2～3滴を加えるとき、帯黄白色の沈殿又は混濁を生じる。
- ② ①のろ液1 mLを量り、水を加えて20 mLとし、その溶液5 mLを量り、以下硝酸チアミン製造用原体の確認試験③を準用する。

定量法 硬化油、高級飽和脂肪酸、脂肪酸、植物性油脂又は動物性油脂を含むものにあつては第1法を、その他のものにあつては第2法を用いる。

第1法 硝酸チアミン($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$)約0.02 gを含む量の本品を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、クロロホルム50 mLを加え、振り混ぜた後、ガラスろ過器(G4)を用いてろ過し、ろ過器上の残留物は、さらに、クロロホルム20 mLずつで3回洗う。残留物のクロロホルム臭がなくなった後、加温した0.1 mol/L塩酸試液約190 mLで抽出しながらろ過し、放冷した後、ろ液を200 mLの全量フラスコに入れ、ろ液に0.1 mol/L塩酸試液を標線まで加えて200 mLとし、この溶液2 mLを全量ピペットを用いて量り、100 mLの全量フラスコに入れ、0.001 mol/L塩酸試液を標線まで加えて100 mLとし、試料溶液とする。別に、塩酸チアミン標準品を105 °Cで2時間乾燥し、その約0.1 gを0.001 gの桁まで量り、その数値を記録し、0.1 mol/L塩酸試液を加えて溶かし、1,000 mLの全量フラスコに入れ、更に0.1 mol/L塩酸試液を標線まで加えて1,000 mLとする。こ

の溶液2 mLを全量ピペットを用いて量り、100 mLの全量フラスコに入れ、0.001 mol/L塩酸試液を標線まで加えて100 mLとし、標準液とする。試料溶液2 mLずつを共栓遠心沈殿管T及びT' に全量ピペットを用いて量り、酸性塩化カリウム試液3 mLずつを加える。Tには、臭化シアン試液3 mLを加え、振り混ぜた後、水酸化ナトリウム溶液(3→10)2 mLを30秒以内に加え、振り混ぜ、全量ピペットを用いてイソブタノール15 mLを加え、密栓し、2分間激しく振り混ぜる。T' には、水酸化ナトリウム溶液(3→10)2 mLを加え、振り混ぜた後、臭化シアン試液3 mLを加え、振り混ぜ、全量ピペットを用いてイソブタノール15 mLを用いて加え、密栓し、2分間激しく振り混ぜる。別に、標準液2 mLを共栓遠心沈殿管S及びS' に全量ピペットを用いて量り、試料溶液と同様に操作する。各遠心沈殿管を緩速度で2分間遠心分離した後、各イソブタノール層を別の試験管にとり、必要ならば、無水硫酸ナトリウム1～2 gを少量ずつ加え、穏やかに振り混ぜた後、放置し、澄明なイソブタノール溶液をとる。各イソブタノール溶液につき、励起波長約370 nm、蛍光波長約440 nmで蛍光の強度 F_T 、 $F_{T'}$ 、 F_S 及び $F_{S'}$ を測定する。

硝酸チアミン($C_{12}H_{17}N_5O_4S$)の量(mg)

$$= \text{塩酸チアミン標準品の量(mg)} \times \frac{F_T - F_{T'}}{F_S - F_{S'}} \times 0.1941$$

第2法 硝酸チアミン($C_{12}H_{17}N_5O_4S$)約0.02 gを含む量の本品を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、加温した0.1 mol/L塩酸試液150 mLを加え、振り混ぜた後、ろ過する。ろ紙上の残留物を0.1 mol/L塩酸試液20 mLずつで2回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、200 mLの全量フラスコに入れ、0.1 mol/L塩酸試液を標線まで加えて200 mLとする。この溶液2 mLを全量ピペットを用いて量り、100 mLの全量フラスコに入れ、0.001 mol/L塩酸試液を標線まで加えて100 mLとし、試料溶液として、以下第1法を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

硝酸チアミン製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(37) 塩酸ピリドキシン

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

含量 本品は、デシケーター(減圧, シリカゲル)で4時間乾燥した後、定量するとき、塩酸ピリドキシン($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$)98.0%以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、白色～微黄色の結晶性の粉末で、臭いはなく、苦味及び酸味を有する。
- ② 本品は、水に溶けやすく、エタノールに溶けにくく、アセトン、エーテル又はクロロホルムにほとんど溶けない。
- ③ 本品の水溶液(1→50)の pH は、2.5～3.5 である。
- ④ 本品は、光により徐々に変化する。
- ⑤ 融点 約 206 °C(分解)

確認試験

- ① 本品の水溶液(1→1,000)1 mL に塩化第二鉄試液 1 滴を加えるとき、溶液は、橙褐色を呈し、次に、塩酸 1 滴を加えるとき、黄色に変わる。
- ② 本品の水溶液(1→10,000)1 mL に新たに調製した 2,6-ジブロムキノンクロロイミドのエタノール溶液(1→4,000)2 mL 及びアンモニア試液 1 滴を加えるとき、溶液は、青色を呈する。また、本品の水溶液(1→10,000)1 mL にホウ酸の飽和溶液 1 mL を加えた後、同様の操作を行うとき、溶液は、青色を呈しない。
- ③ 本品 0.5 g(0.45～0.54g)に水 1 mL を加え、加温して溶かし、放冷した後、ピクリン酸試液 6 mL を加え、2～3 時間放置する。析出した結晶をろ取し、少量の氷水で洗い、105 °Cで 2 時間乾燥するとき、その融点は、156～159 °C(分解)である。
- ④ 本品の水溶液(1→10)は、塩化物の定性反応を呈する。

純度試験 重金属 本品 1.0 g(0.95～1.04 g)を量り、重金属試験法第 1 法により

試料溶液を調製し、鉛標準液 3.0 mL を用いて比較液を調製して重金属の試験を行うとき、試料溶液の呈する色は、比較液の呈する色より濃くてはならない(30 µg/g 以下)。

乾燥減量 0.30%以下(1 g、減圧、シリカゲル、4時間)

強熱残分 0.10%以下(1 g)

定量法 本品をデシケーター(減圧、シリカゲル)で4時間乾燥し、その約0.4 g を0.001 gの桁まで量り、その数値を記録し、非水滴定用酢酸第二水銀試液 10 mLを加え、振り混ぜて溶かした後、非水滴定用氷酢酸60 mLを加え、0.1 mol/L過塩素酸で滴定する(指示薬 塩化メチルロザニリン試液2滴)。この場合において、滴定の終点は、溶液の紫色が青色に変わるときとする。同様の方法で空試験を行い補正する。

塩酸ピリドキシン($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$)の量(mg)

$$= \text{塩酸ピリドキシン標準品の量(mg)} \times \frac{A_r}{A_s} \times \frac{1}{5}$$

(イ) 保存の方法の基準

遮光した気密容器に保存すること。

イ 製剤(その1)

(ア) 成分規格

塩酸ピリドキシン製造用原体の成分規格を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

塩酸ピリドキシン製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

ウ 製剤(その2)

(ア) 成分規格

本品は、塩酸ピリドキシン製造用原体に、賦形物質を混和した粉末又は粒子である。

含量 本品は、定量するとき、表示量の90～110%に相当する塩酸ピリドキシン($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$)を含む。

確認試験

- ① 本品の表示量に従い、塩酸ピリドキシン製造用原体0.01 gを含む量を量り、水10 mL、及び硬化油、高級飽和脂肪酸、脂肪酸、植物性油脂又は

動物性油脂を含む製剤にあつては、クロロホルム3 mLを加え、振り混ぜた後、静置し、水層をろ過し、試料溶液とする。この溶液1 mLを量り、以下塩酸ピリドキシン製造用原体の確認試験①を準用する。

- ② ①の試料溶液1 mLを量り、水を加えて10 mLとし、この溶液1 mLを量り、以下塩酸ピリドキシン製造用原体の確認試験②を準用する。
- ③ ①の試料溶液1 mLを量り、リンタングステン酸試液0.5 mLを加えるとき、溶液は、白濁する。

定量法 硬化油、高級飽和脂肪酸、脂肪酸、植物性油脂又は動物性油脂を含むものにあつては第1法、その他のものにあつては第2法を用いる。

第1法 塩酸ピリドキシン($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$)約0.02 gを含む量の本品を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、クロロホルム50 mLを加え、振り混ぜた後、ガラスろ過器(G4)を用いてろ過し、ろ過器上の残留物は、さらに、クロロホルム20 mLずつで3回洗う。残留物のクロロホルム臭がなくなった後、温湯約90 mLで抽出しながらろ過し、放冷した後、100 mLの全量フラスコに入れ、ろ液に水を標線まで加えて100 mLとする。この溶液25 mLを全量ピペットを用いて量り、200 mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて200 mLとし、試料溶液とする。別に、塩酸ピリドキシン標準品をデシケーター(減圧, シリカゲル)で4時間乾燥し、その約0.1 gを0.001 gの桁まで量り、その数値を記録し、水を加えて溶かし、100 mLの全量フラスコに入れ、更に水を標線まで加えて100 mLとする。この溶液5 mLを全量ピペットを用いて量り、200 mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて200 mLとし、標準液とする。試料溶液1 mLを全量ピペットを用いて量り、25 mLの全量フラスコに入れ、バルビタール緩衝液2.0 mL、イソプロパノール9.0 mL及び新たに調製した2, 6—ジブロムキノンクロルイミドのエタノール溶液(1→4,000)2.0 mLを加え、よく振り混ぜ、さらに、イソプロパノールを標線まで加えて25 mLとし、90分間放置した後、試料溶液の代わりに水1 mLにつき、試料溶液と同様に操作して得た溶液を対照液として、波長650 nm付近の極大波長

における吸光度 A_T を測定する。別に、標準液1 mLを全量ピペットを用いて量り、試料溶液と同様に操作して吸光度 A_S を測定する。

$$\begin{aligned} & \text{塩酸ピリドキシン}(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}) \text{の量}(\text{mg}) \\ &= \text{塩酸ピリドキシン標準品の量}(\text{mg}) \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{5} \end{aligned}$$

第2法 塩酸ピリドキシン($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$)約0.02 gを含む量の本品を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、水60 mLを加え、激しく振り混ぜた後、ろ過し、残留物を水10 mLずつで2回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、100 mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて100 mLとする。この溶液25 mLを全量ピペットを用いて量り、200 mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて200 mLとし、試料溶液とし、以下第1法を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。