

ビタミン D 定量法の改正案

6 飼料添加物一般の試験法

(33) ビタミン D 定量法

ビタミン D 定量法は、ビタミン D₃油製造用原体、ビタミン D 粉末製造用原体その他の飼料添加物中のビタミン D を、ガスクロマトグラフ法又は液体クロマトグラフ法により定量する方法である。

原則として、第 2 法を用いるが、含有するビタミン D がエルゴカルシフェロールの場合は、第 1 法を用いる。ただし、第 1 法は、ビタミン D に対するビタミン E（酢酸 dl- α -トコフェロール）の質量比が 2,500 以下のものに適用することができる。

1 ビタミン D 国際単位は、ビタミン D₃0.025 μ g に相当する。

試薬・試液

無アルデヒドエタノール（略）

n-ヘキサン（略）

ベンゼン（略）

アセトン（略）

シリカゲル 薄層クロマトグラフ用（蛍光剤入り）

酢酸スチグマステロール（略）

液体クロマトグラフ用メタノール CH₃OH 無色で、澄明の液体で、水と混和する。

水を対照液として、層長 10 mm で吸光度を測定するとき、波長 210 nm において 0.70 以下、波長 220 nm において 0.30 以下、波長 230 nm において 0.15 以下、波長 240 nm において 0.07 以下、波長 254 nm において 0.02 以下のものとする。

本法の試薬は、上記以外のものにあつては、日本産業規格試薬の特級の規格に適合するものを用いる。

標準品・標準液（略）

ケイソウ土・ジギトニンカラムの調製（略）

操作法

遮光容器を用い、操作は、速やかに行う。

① 第 1 法

ビタミン D 粉末製剤にあつては、8,000 ビタミン D 国際単位を含む量を有効数

字3桁まで量り、その数値を記録し、アスコルビン酸ナトリウム溶液（1→20）20 mL を加え、還流冷却器を付け、水浴中で泥状又は乳状とした後、これを試料として試験を行う。

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）20 mL 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。ステロールが混在している場合にあっては、ケイソウ土・ジギトニンカラムによる脱ステリン操作を行う。試料をけん化抽出したベンゼン層 50 mL を減圧留去して得られた残留物に、n—ヘキサン 3 mL を加えて溶かしたものを、ケイソウ土・ジギトニンカラムに加えた後、n—ヘキサンを追加し、0.5 mL/min の流速で流下させ、溶出液約 30 mL を集める。この溶出液の溶媒を留去した後、残留物にアセトン 1.0 mL を全量ピペットを用いて加え、溶かし、以下薄層クロマトグラフ用試料溶液として試験を行う。薄層クロマトグラフ用試料溶液 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・プレビタミン D 溶液を薄層クロマトグラフ用試料溶液のスポットと重ならないように同一の薄層板にスポットする。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 及びプレビタミン 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℃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。

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 ビタミン 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

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

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 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。

② 第 2 法

本品 1 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の遠沈管に入れ、ジメチルスルホキシド 20 mL を加え、10 分間超音波処理を行い、エタノール 50 mL を加え、再度 10 分間超音波処理を行い、1,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄液を 200 mL 全量フラスコに入れ、残留物にエタノール 50 mL を加え、10 分間超音波処理を行い、1,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄液を合わせ、エタノールを標線まで加えて 200 mL とし、必要に応じてエタノールで正確に希釈し、メンブランフィルター（0.45 μm）を用いてろ過し、試料溶液とする。この溶液 10 μL につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。得られたクロマトグ

ラムからコレカルシフェロールのピーク高さ又は面積を測定し、別に求める検量線によりコレカルシフェロール濃度を求め、含量を算出する。

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：265 nm）

カラム：内径 4.6 mm、長さ 150 mm のステンレス管に粒径 3 μ m の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲル（炭素含有率が 20 %以上のもの）を充填したもの

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：液体クロマトグラフ用メタノール－水（97+3）

流量：1.0 mL/min

カラムの選択：ビタミン D₂標準品 100 mg 及びビタミン D₃標準品 100 mg を 0.1 mg の桁まで量り、エタノールを加えて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、更にエタノールを標線まで加えて 100 mL とする。この溶液 1 mL を全量ピペットを用いて量り、100 mL 全量フラスコに入れ、エタノールを標線まで加えて 100 mL とする。この溶液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、エルゴカルシフェロール、コレカルシフェロールの順に溶出し、その分離度が 1.8 以上のものを用いる。また、試料溶液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、コレカルシフェロールと夾雑物のピークが重ならないものを用いる。

検量線の作成

ビタミン D₃標準品約 100 mg を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、エタノールを加えて溶かし、更にエタノールを標線まで加えて 100 mL とし標準原液とする。標準原液の一定量にエタノールを加え、1 mL 中に 100 ビタミン D 国際単位、200 ビタミン D 国際単位、400 ビタミン D 国際単位及び 600 ビタミン D 国際単位を含有するように正確に希釈し、各溶液を標準液とする。標準液 10 μ L ずつにつき、以下試料溶液の場合と同様に液体クロマトグラフ法により試験を行う。得られたクロマトグラムからコレカルシフェロールのピーク面積を求めて検量線を作成する。

試料 1 g 中のビタミン D₃の国際単位数=C×V×200/W

C：検量線から求めた試料溶液中のビタミン D₃の濃度（ビタミン D 国際単位/mL）

V：試料溶液の希釈倍率

W：試料採取量（g）

7 飼料添加物一般の試験法並びに各飼料添加物の成分規格及び製造方法等の基準に用いる標準品、試薬・試液、容量分析用標準液、標準液、色の比較液、計量器・用器、ろ紙、滅菌法及びベルトラン糖類定量表の規定

(2) 試薬・試液

メタノール、液体クロマトグラフ用 一般試験法のビタミン D 定量法に定めるところによるものとする。

液体クロマトグラフ用メタノール メタノール、液体クロマトグラフ用に定める。

8 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

(30) エルゴカルシフェロール

ア 製造用原体 (略)

イ 製剤 (その1 液状)

(ア) 成分規格

本品は、エルゴカルシフェロール製造用原体に、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混和した油液又は水溶性液状物である。

含量 (略)

確認試験

① ビタミン D 定量法第 1 法で得た薄層クロマトグラフ用試料溶液 10 μ L を量り、ビタミン D 及びプレビタミン D を含む溶液と並行して同一薄層板にスポットし、展開した後、紫外線 (主波長 254 nm) を照射するとき、ビタミン D 及びプレビタミン D のスポットは、暗紫色を呈し、これらの Rf 値は等しい。

② ビタミン D 定量法第 1 法で得た試料溶液及び標準液のガスクロマトグラフィーのクロマトグラムから、保持時間の小さいピロビタミン D、保持時間の大きいイソピロビタミン D 及び酢酸スチグマステロールのピーク保持時間を求めるとき、これらの酢酸スチグマステロールに対する保持比は等しい。

(イ) 保存の方法の基準 (略)

ウ 製剤 (その2 粉状)

(ア) 成分規格

本品は、エルゴカルシフェロール製造用原体に、賦形物質を混和した粉末又は粒子である。

含量 (略)

確認試験

エルゴカルシフェロール製剤 (その1 液状) の確認試験を準用する。

(70) ビタミン D 粉末

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

含量 (略)

物理的・化学的性質 (略)

確認試験

ビタミン D 定量法第 2 法により調製した試料溶液及び標準液 10 μ L につき、定量法の操作条件で液体クロマトグラフ法により試験を行うとき、試料溶液及び標準液から得たコレカルシフェロールのピークに係る保持時間は一致する。

純度試験 (略)

乾燥減量 (略)

(イ) 製造の方法の基準 (略)

(ウ) 保存の方法の基準 (略)

イ 製剤 (その 1) (略)

ウ 製剤 (その 2) (略)