

ビタミン A 定量法の改正案

(32) ビタミン A 定量法

ビタミン A 定量法は、ビタミン A 油製造用原体、ビタミン A 粉末製造用原体その他の飼料添加物中のビタミン A を紫外部の吸光度測定又は液体クロマトグラフ法により定量する方法である。この場合において、定量を妨害する物質が存在するときは、適当な前処理を行う必要がある。

各条で別に規定する場合を除き、次のいずれかの方法によるものとする。

1 ビタミン A 単位 (1 ビタミン A 国際単位と同じ。) は、ビタミン A (アルコール型) 0.300 µg に相当する。

試薬 (略)

操作法

遮光容器を用い、できる限り空気又は他の酸化剤との接触を避け、操作は、速やかに行う。

① 第 1 法

試料約 0.5 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、イソプロパノールを加えて溶かし、250 mL の全量フラスコに入れ、更にイソプロパノールを標線まで加えて 250 mL とする。この溶液を、層長 10 mm で 326 nm における吸光度が約 0.5 となるように、イソプロパノールで正確に薄めて試料溶液とし、吸収極大の波長を測定する。また、層長 10 mm で 300 nm、310 nm、320 nm、326 nm、330 nm、340 nm 及び 350 nm における吸光度を測定し、326 nm の吸光度を 1.000 としたときの各波長における吸光度の比を求める。吸収極大の波長が 325~328 nm の間にあり、かつ、得られた各波長における吸光度の比が、それぞれ表の値の±0.030 の範囲内であれば、326 nm の吸光度 A から試料 1 g 中のビタミン A 単位を算出する。

$$1 \text{ g 中のビタミン A 単位数} = E_{1\text{cm}}^{1\%} (326 \text{ nm}) \times 1,900$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} (326 \text{ nm}) = \frac{A}{W} \times \frac{V}{100}$$

V : 試料溶液の総 mL 数

W : 試料溶液 VmL 中の試料の g 数

酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノールの確認のため、次の確認試験を行う。

試料、薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール標準品及び薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール標準品についてそれぞれ 15,000 ビタミン A 単位を含む量を量り、それぞれ石油エーテル 5 mL に溶かし、試料溶液及び各標準液とする。この溶液につき、薄層クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液及び各標準液 5 μ L ずつを薄層クロマトグラフ用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に、ベンゼンを展開溶媒として約 10cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに三塩化アンチモン試液を噴霧し、試料溶液及び各標準液の青色に呈色した主なスポットの Rf 値は等しい。

第 1 法により吸光度を測定し、吸収極大の波長が 325~328nm の間にないとき又は吸光度の比が表示した値の ± 0.030 の範囲内にないときは、第 2 法又は第 3 法を用いる。

λ (nm)	酢酸レチノール	パルミチン酸レチノール
300	0.578	0.590
310	0.815	0.825
320	0.948	0.950
326	1.000	1.000
330	0.972	0.981
340	0.786	0.795
350	0.523	0.527

② 第 2 法

(略)

③ 第 3 法

約 40,000 ビタミン A 単位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、100 mL の遠心沈殿管に入れ、ジメチルスルホキシド 20 mL を加え、10 分間超音波処理し、エタノール 50 mL を加え、更に 10 分間超音波処理し、1,000 \times 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 \times 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、メンブランフィルター (0.45 μ m) を用いてろ過し、試料溶液とする。この溶液 10 μ L 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酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノ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酢酸レチノール濃度若しくはパルミチン酸レチノール濃度又はその両方を求め、それぞれ次式により含量を算出し、含量をビタミン A 量とする。

$$\underline{1 \text{ g 中のビタミン A 単位} = C \times V \times F \times 200 / W}$$

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

V：試料溶液の希釈倍率

F：酢酸レチノール標準液又はパルミチン酸レチノール標準液の補正係数

W：試料採取量（g）

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：326 nm）

カラム：内径 4.6 mm、長さ 150 mm のステンレス管に粒径 5 μm 以下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 14%以上のもの）を充填する。

カラム温度：25～40 °Cの一定温度

移動相：液体クロマトグラフ用メタノール

流量：1.0 mL/min

カラムの選択：検量線の作成により調製した酢酸レチノール標準原液及びパルミチン酸レチノール標準原液の一定量を正確に量って混合し、イソプロパノールを加え、1 mL 中に酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノールがそれぞれ 100 ビタミン A 単位相当量を含むように正確に希釈する。この溶液 10 μL につき、上記の条件で操作するとき、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノールの順に溶出し、その分離度が 30 以上のものを用いる。

検量線の作成

酢酸レチノールが含まれている場合にあつては、定量用酢酸レチノール 100 万ビタミン A 単位相当量を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、イソプロパノールを加えて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、更にイソプロパ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イソプロパノールを加え、1 mL 中に酢酸レチノールが 10 ビタミン A 単位相当量を含むように正確に希釈する。この溶液につき、326 nm の吸光度を測定し、次式により補正係数を確認する。

$$F = A \times 1.9$$

A : 酢酸レチノール標準液又はパルミチン酸レチノール標準液の 326 nm における吸光度

別に標準原液の一定量にイソプロパノールを加え、1 mL 中に 100 ビタミン A 単位相当量、200 ビタミン A 単位相当量、400 ビタミン A 単位相当量及び 600 ビタミン A 単位相当量を含む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酢酸レチノールのピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成する。

パルミチン酸レチノールが含まれている場合にあつては、定量用パルミチン酸レチノール 100 万ビタミン A 単位相当量を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、以下酢酸レチノール標準液と同様に操作し、補正係数の確認及び検量線を作成する。

[同時改正箇所]

7 試薬・試液

(1) 試薬・試液

酢酸レチノール、定量用 $C_{22}H_{32}O_2$

確認試験 本品 100 万ビタミン A 単位相当量を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、イソプロパノールを加えて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、更にイソプロパノールを標線まで加える。この溶液の一定量にイソプロパノールを加え、1 mL 中に 10~15 ビタミン A 単位を含むように正確に希釈し、試料溶液とする。この溶液につき、吸収スペクトルを測定するとき、波長 325 nm ~328 nm に吸収の極大を示す。

純度試験 吸光比 確認試験の試料溶液につき、波長 300 nm、310 nm、320 nm、326 nm、330 nm、340 nm 及び 350 nm における吸光度 A1、A2、A3、A4、A5、A6 及び A7 を測定するとき、A1/A4 は 0.548~0.608、A2/A4 は 0.785~0.845、A3/A4 は 0.918~0.978、A5/A4 は 0.942~1.002、A6/A4 は 0.756~0.816、A7/A4 は 0.493~0.553 でなければならない。

定量用酢酸レチノール 酢酸レチノール、定量用の項に定める。

定量用パルミチン酸レチノール パルミチン酸レチノール、定量用の項に定める。

パルミチン酸レチノール、定量用 $C_{36}H_{60}O_2$

確認試験 酢酸レチノール標準品の確認試験を準用する。

純度試験 吸光比 確認試験の試料溶液につき、波長 300 nm、310 nm、320 nm、326 nm、330 nm、340 nm 及び 350 nm における吸光度 A1、A2、A3、A4、A5、A6 及び A7 を測定するとき、A1/A4 は 0.560～0.620、A2/A4 は 0.795～0.855、A3/A4 は 0.920～0.980、A5/A4 は 0.951～1.011、A6/A4 は 0.765～0.825、A7/A4 は 0.497～0.557 でなければならない。

8 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

(76) ビタミン A 粉末

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

含量 (略)

確認試験 ビタミン A 定量法第 2 法で得たイソプロパノール溶液 2 mL を量り、減圧でイソプロパノールを留去し、残留物にクロロホルム 1 mL を加えて溶かし、三塩化アンチモン試液 3 mL を加えるとき、溶液は、30 秒以内に青色を呈するが、この色は、30 秒以内に退色する。又は第 3 法で測定するときの酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノール若しくはその両方の保持時間が一致する。

純度試験・乾燥減量 (略)

定量法 ビタミン A 定量法第 2 法又は第 3 法により試験を行う。第 2 法により試験を行う場合にあつては、本品約 0.1 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、フラスコに入れ、水 2 mL を加え、振り動かしながらしばらく加温した後、試験を行う。

(イ)・(ウ) (略)

イ・ウ (略)

(77) ビタミン A 油

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

含量 (略)

確認試験 本品をクロロホルムに溶かし、表示単位に従い、1 mL 中 30 ビタミン A 単位を含む溶液を調製し、この溶液 1 mL を量り、三塩化アンチモン試液 3 mL を加えるとき、溶液は、30 秒以内に退色する。又は第 3 法で測定するときの酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノール若しくはその両方の保持時間が一致する。

純度試験

① 紫外吸収スペクトル 本品は、ビタミン A 定量法第 1 法で測定できる条件に適合し、又は第 2 法で測定するときの f の値が 0.85 以上。又は第 3 法で測定するとき、試料溶液及び標準液から得たピークは一致しなければならない。

②・③ (略)

定量法 (略)

(イ)・(ウ) (略)

イ～エ (略)

(163) ビタミン AD

ア 製剤 (その 1 液状)

(ア) 成分規格

(略)

含量・確認試験 (略)

定量法

① ビタミン A ビタミン A 定量法第 2 法又は第 3 法により試験を行う。

② (略)

(イ) (略)

イ 製剤 (その 2 粉状)

(ア) 成分規格

(略)

含量・確認試験 (略)

定量法

① ビタミン A ビタミン A 定量法第 2 法又は第 3 法により試験を行う。第 2 法により試験を行う場合にあっては、500 ビタミン A 単位以上に相当し、油脂 1 g 以下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、フラスコに入れ、水 2 mL を加え、振り動かしながらしばらく加温した後、無アルデヒドエタノール 30 mL 及びピロガロールのエタノール溶液 (1→10) 1 mL を加え、試験を行う。

② (略)

(イ) (略)

(164) ビタミン ADE

ア 製剤 (その 1 液状)

(ア) 成分規格

(略)

確認試験 (略)

定量法

① ビタミン A ビタミン A 定量法第 2 法又は第 3 法により試験を行う。

②・③ (略)

(イ) (略)

イ 製剤 (その 2 粉状)

(ア) 成分規格

(略)

含量・確認試験 (略)

定量法

① ビタミン A ビタミン A 定量法第 2 法又は第 3 法により試験を行う。第 2 法により試験を行う場合にあっては、500 ビタミン A 単位以上を含み、油脂 1 g 以下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、フラスコに入れ、水 2 mL を加え、振り動かしながらしばらく加温した後、無アルデヒドエタノール 30 mL 及びピロガロールのエタノール溶液 (1→10) 1 mL を加え、試験を行う。

② (略)

(イ) (略)