

6 資 審 第 50 号

令和6年12月24日

農林水産大臣 江藤 拓 殿

農業資材審議会長 君嶋 祐子

飼料添加物の成分の規格の改正に係る諮問について（答申）

令和5年7月21日付け5消安第2360号をもって諮問のあった標記の件について、下記のとおり答申する。

記

- 1 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号。以下「省令」という。）別表第2の6に規定するビタミンA定量法について、有害な試薬を用いず、ビタミンAに適用できる試験法を別紙のとおり新たに定めることは、適当と認める。
- 2 その他所要の改正を行うことは、適当と認める。

ビタミン A 定量法について、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）において次の事項を成分の規格等として定めること。（下線部が改正部分。）

6 飼料添加物一般の試験法

(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 の範囲内にあれば、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 の間がないとき又は吸光度の比が表示した値の ± 0.030 の範囲内がないときは、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

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、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。

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

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っては、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 µL 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っては、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 A 1、A 2、A 3、A 4、A 5、A 6 及び A 7 を測定するとき、A 1 / A 4 は 0.560～0.620、A 2 / A 4 は 0.795～0.855、A 3 / A 4 は 0.920～0.980、A 5 / A 4 は 0.951～1.011、A 6 / A 4 は 0.765～0.825、A 7 / A 4 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っては、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）

6 資 審 第 52 号
令和 6 年 12 月 24 日

農林水産大臣 江藤 拓 殿

農業資材審議会長 君嶋 祐子

飼料添加物の製造の方法等の基準及び成分の規格の設定等に係る諮問について（答申）

令和 6 年 7 月 23 日付け 6 消安第 2529 号をもって諮問のあった標記の件について、下記のとおり答申する。

記

たん白質の加水分解により製造される L-イソロイシンを飼料添加物として製造等することができるよう、法第 3 条第 1 項の規定に基づき定められた L-イソロイシンの製造の方法等の基準及び成分の規格について、当該 L-イソロイシンの基準及び規格を追加する改正を行うことは適当と認める。

L-イソロイシンについて、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）において次の事項を成分の規格及び製造の方法等の基準として定めること（下線部が改正部分）。

※既指定の「L-イソロイシン」については「L-イソロイシン（その 1）」と名称を改める。

各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

L-イソロイシン

L-イソロイシン （その 1）

イ 製剤

(7) 成分規格

L-イソロイシン （その 1） 製造用原体の成分規格を準用する。

(4) 保存の方法の基準

L-イソロイシン （その 1） 製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

L-イソロイシン（その 2）

ア 製造用原体

(7) 成分規格

含量 本品は、105℃で 4 時間乾燥した後、定量するとき、L-イソロイシン（ $C_6H_{13}NO_2$ ）98.0%以上を含む。

物理的・化学的性質 L-イソロイシン（その 1）の物理的・化学的性質と同じ

確認試験 L-イソロイシン（その 1）製造用原体の確認試験を準用する。

純度試験 L-イソロイシン（その 1）製造用原体の純度試験を準用する。

乾燥減量 2.0%以下（5 g，105℃，4 時間）

強熱残分 1.0%以下（1 g）

定量法 本品を 105℃で 4 時間乾燥し、その約 0.25 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、ギ酸 3 mL を加えて溶かし、非水滴定用氷酢酸 50 mL を加え、0.1 mol/L 過塩素酸で滴定する（電位差滴定法）。指示薬（クリスタルバイオレット・氷酢酸試液 1 mL）を用いる場合の終点は、溶液の紫色が青色を経て、緑色になるときとする。別に、同様の方法で空試験を行い補正する。

0.1 mol/L 過塩素酸 1 mL = 13.12 mg $C_6H_{13}NO_2$

(イ) 製造の方法の基準

羽毛又は羊毛を加水分解した後、粗結晶を精製し、得られた固形物を乾燥して製造すること。

(ロ) 保存の方法の基準

L-イソロイシン（その１）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

イ 製剤

(ア) 成分規格

L-イソロイシン（その２）製造用原体の成分規格を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

L-イソロイシン（その２）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

7 資 審 第 5 号

令和7年4月25日

農林水産大臣 江藤 拓 殿

農業資材審議会長 君嶋 祐子

飼料添加物の成分の規格の改正に係る諮問について（答申）

令和6年11月21日付け6消安第4634号をもって諮問のあった標記の件について、下記のとおり答申する。

記

- 1 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号。以下「省令」という。）別表第2の6に規定するビタミンD定量法について、有害な試薬を用いず、ビタミンD₃（コレカルシフェロール）に適用できる試験法を別紙のとおり新たに定めることは、適当と認める。
- 2 その他所要の改正を行うことは、適当と認める。

ビタミン D 定量法について、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）において次の事項を成分の規格等として定めること。（下線部が改正部分。）

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 *d*l- 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 粉末製剤にあっては、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 °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。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

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入ろ過する。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 0.50 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 °C 試料注入口 250 °C 検出器 300 °C

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。

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 μm 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 °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 μL 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 μL 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 μL 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 = $C \times V \times 200 / W$

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

(31) 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。

(47) コレカルシフェロール

ア 製造用原体 (略)

イ 製剤(その1 液状)

(ア) 成分規格

含量 (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。

定量法 (略)

(イ) 保存の方法の基準 (略)

ウ 製剤(その2 粉状)

(ア) 成分規格

含量 (略)

確認試験 コレ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。

定量法 (略)

(イ) 保存の方法の基準 (略)

(79) 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 エルゴカルシフェロールが含まれる場合にあつては、エルゴカルシフェロール製剤(その1 液状)の確認試験を準用し、コレカルシフェロールが含まれる場合にあつては、コレ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。

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)

(80) ビタミン D₃ 油

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 コレ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。

純度試験 (略)

定量法 (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 液状)

(ア) 成分規格 (略)

含量 (略)

確認試験 コレ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。

定量法 (略)

(イ) 保存の方法の基準 (略)

エ 製剤(その 3 粉状)

(ア) 成分規格 (略)

含量 (略)

確認試験 コレ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。

定量法 (略)

(イ) 保存の方法の基準 (略)