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。

各条で別に規定する場合を除き、第１法を用いるが、第１法で測定できる条件に適合しないものには、第２法を用いる。

①　第１法

試料約0.5gを0.001g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、250mL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250mLとする。この溶液を、層長10mmで326nm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10mmで300nm、310nm、320nm、326nm、330nm、340nm及び350nmにおける吸光度を測定し、326nm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325～328nm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、326nmの吸光度Aから試料１g中のビタミンA単位を算出する。

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

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

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５mLに溶かし、試料溶液及び標準液とする。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。試料溶液及び標準液５μL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、試料及び標準品の青色に呈色した主なスポットの位置を比較して確認する。

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

別に規定する場合を除き、500ビタミンA単位以上に相当し、油脂１g以下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30mL及びピロガロールのエタノール溶液（１→10）１mLを加える。次に、水酸化カリウム溶液（９→10）３mL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、水30mLを加え、分液漏斗Aに移す。フラスコは、水10mLで洗った後エーテル40mLで洗い、洗液を分液漏斗Aに入れ、よく振り混ぜ、放置する。水層を分液漏斗Bに分取し、エーテル30mLでフラスコを洗った後、洗液を分液漏斗Bに入れ、振り混ぜ、抽出する。水層はフラスコに分取し、エーテル層は分液漏斗Aに合わせる。分取した水層は、分液漏斗Bに入れ、エーテル30mLを加え、振り混ぜ、抽出する。エーテル層は、分液漏斗Aに合わせる。これに水10mLを加え、静かに２～３回倒立した後静置し、分離した水層を除く。さらに、水50mLずつで３回洗い、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、水50mLずつで洗った後、10分間放置する。水をできる限り除き、エーテル抽出液を三角フラスコに移し、エーテル10mLずつで２回洗い込む。次に、無水硫酸ナトリウム５g（4.5～5.4g）を加え、振り混ぜた後、傾斜してエーテル抽出液をナス型フラスコに移す。残った硫酸ナトリウムは、エーテル10mLずつで２回以上洗い、洗液をフラスコに合わせる。エーテル抽出液を45℃の水浴中で振り動かしながらアスピレーターを用いて濃縮して約１mLとし、30秒以内にイソプロパノールを加えて溶かし、１mL中に６～10ビタミンA単位を含むように正確に薄め、試料溶液とする。この溶液につき、層長10mmで波長310nm、325nm及び334nmにおける吸光度A_1、A_2及びA_3を測定する。

１g中のビタミンA単位数＝$E^{1\%}_{1cm}$（325nm）×1,830

$$E^{1\%}_{1cm}(325nm)=\frac{A_2}{W}\times\frac{V}{100}\times f$$

$$f=6.815-2.555\times\frac{A_1}{A_2}-4.260\times\frac{A_3}{A_2}$$

f：補正係数

V：試料溶液の総mL数

W：試料溶液VmL中の試料のg数

⑶3　ビタミンD定量法

ビタミンD定量法は、ビタミンD_3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により定量する方法である。ただし、この定量法は、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以下のものに適用される。

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）20mL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。

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50mLを減圧留去して得られた残留物に、n-ヘキサン３mL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、0.5mL/minの流速で流下させ、溶出液約30mL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1.0mL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。

１ビタミンD国際単位は、ビタミンD_3 0.025μgに相当する。

試薬・試液

無アルデヒドエタノール　エタノール〔特級〕１Lに50%水酸化カリウム溶液５mL及び亜鉛末５g（4.5～5.4g）を加え、約２時間還流した後、蒸留し、初めと終わりのそれぞれ約10%を除く。

n-ヘキサン〔特級〕　水を対照液とし、層長10mmで吸光度を測定するとき、波長240～250nmにおいて、$E^{1\%}_{1cm}$＝0.3以下のものを使用する。

ベンゼン　ベンゼン〔特級〕を用時蒸留し、初めと終わりのそれぞれ約10%を除く。

アセトン　アセトン〔特級〕に過マンガン酸カリウムを少量ずつ加え、振り混ぜ、２～３日放置して紫色が消えなくなった後、蒸留し、留液に新たに焼いた無水炭酸カリウムを加えて脱水し、分留管を付け、湿気を避けて蒸留し、56℃の留分を集める。

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　スチグマステロール〔特級〕0.54g（0.535～0.544g）を量り、ピリジン4.8mLを加えて溶かし、無水酢酸1.2mLを加え、60～70℃の水浴中で１時間加温し、室温で一夜放置した後、これを水中に注ぎ込み、生じた沈殿をろ取する。この沈殿を水で洗った後、エタノールにより再結晶する（融点143～145℃）。

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