標準品・標準液

ビタミンD_2標準品　日本薬局方エルゴカルシフェロール　この場合において、波長265nmにおける吸光度を測定するとき、$E^{1\%}_{1cm}$＝465（0.01g，エタノール，1,000mL）以上のものを用いる。

ビタミンD_3標準品　日本薬局方コレカルシフェロール　この場合において、波長265nmにおける吸光度を測定するとき、$E^{1\%}_{1cm}$＝470（0.01g，エタノール，1,000mL）以上のものを用いる。

ビタミンD・プレD溶液　ビタミンD標準品５mg（4.5～5.4mg）を量り、二塩化エチレン10mLを加えて溶かし、水浴中で30分間還流する。用時調製する。

内部標準液　A液　酢酸スチグマステロール0.050g（0.0495～0.0504g）を量り、アセトンを加えて溶かし、100mLの全量フラスコに入れ、更にアセトンを標線まで加えて100mLとする。冷暗所に保存する。

B液　A液10mLを全量ピペットを用いて量り、100mLの全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更にアセトンを標線まで加えて100mLとする。用時調製する。

ビタミンD標準液　ビタミンD0.040g（0.0395～0.0404g）を量り、アセトンを加えて溶かし、100mLの全量フラスコに入れ、更にアセトンを標線まで加えて100mLとする。この溶液10mLを全量ピペットを用いて量り、100mLの全量フラスコに入れ、内部標準液A液10mLを全量ピペットを用いて加え、アセトンを標線まで加えて100mLとし、ビタミンD標準液とする。用時調製する。

ケイソウ土・ジギトニンカラムの調製

ジギトニン600mg（599.5～600.4mg）に水10mLを加え、加温溶解し、約１時間放置した後、その５mLを量り、クロマトグラフ用ケイソウ土10g（9.5～10.4g）に加え、均等に混和し、その３g（2.5～3.4g）を量り、n-ヘキサンと共に10×300mmの褐色ガラス管に流し込み、大部分のn-ヘキサンを流出し、ケイソウ土・ジギトニンカラムを調製する。

操作法

遮光容器を用い、操作は、速やかに行う。

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）20mLを加える。次に、水酸化カリウム溶液（９→10）８mL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100mL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40mL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）40mLを加え、振り混ぜた後、静置し、水層を除く。これに水40mL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40mL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９cm）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50mLを全量ピペットを用いて量り、ガラス栓付100mL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1.0mL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。この試料溶液0.2mL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D溶液を同一の薄層板のすみにスポットする。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15cm展開した後、薄層板を風乾し、紫外線（主波長254nm）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、50mLのビーカーに入れる。

アセトン５mLずつで６回抽出し、ろ紙を用いて50mL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0.50mL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

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

S：標準液0.5mL中のビタミンDの国際単位数（標準液１mL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、２×５＝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４mm、長さ1.5m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：５μL

キャリヤーガス及び流速：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。

⑶④　沸点測定法及び蒸留試験法

沸点の測定及び蒸留試験は、別に規定する場合を除き、次の第１法又は第２法によるものとする。沸点は、最初の留液５滴が冷却器の先端から留出したときから、最後の留液がフラスコの底部から蒸発するときまでの温度とする。また、蒸留試験は、各条に規定する温度範囲の留分の容量を量るものである。

第１法　各条に規定する温度範囲が５℃未満のとき用いる。

