操作法

別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

各条に規定する量の試料をネスラー管に入れ、適量の水を加えて溶かし、40mLとする。これに希塩酸１mL及び水を加えて50mLとし、試料溶液とする。別に、各条で規定する量の0.005mol/L硫酸を量り、希塩酸１mL及び水を加えて50mLとし、比較液とする。この場合、試料溶液が澄明でないときは、両液を同条件でろ過する。

試料溶液及び比較液に塩化バリウム試液２mLずつを加え、混和し、10分間放置した後、黒色の背景を用い、ネスラー管の上方又は側方から観察して混濁を比較する。

試料溶液の呈する混濁は、比較液の呈する混濁より濃くてはならない。

⑶7　硫酸呈色物試験法

硫酸呈色物試験法は、試料中に含まれる微量の不純物で硫酸により容易に着色する物質を試験する方法である。

操作法

あらかじめネスラー管を硫酸呈色物用硫酸でよく洗う。別に規定する場合を除き、試料が固体の場合には、ネスラー管に硫酸呈色物用硫酸５mLを入れ、試料を粉末とし、各条に規定する量を少量ずつ加え、ガラス棒でかき混ぜて完全に溶かす。試料が液体の場合には、各条に規定する量を量り、ネスラー管に入れ、硫酸呈色物用硫酸５mLを加え、振り混ぜる。この間、発熱し温度が上昇するものは冷却し、温度の影響のあるものは標準温度に保ち、15分間放置した後、溶液を白色の背景を用い、ネスラー管に入れた各条に規定する色の比較液と側方から観察して比色する。

⑶8　ろ紙クロマトグラフ法

ろ紙クロマトグラフ法は、ろ紙を用い、混合物を移動相で展開させてそれぞれの成分に分離する方法であり、物質の確認又は純度の試験等に用いる。

操作法

別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

幅20～30mm、長さ400mmの長方形のろ紙の下端から約50mmの高さを原線とし、この中央に、各条で規定する量の試料溶液を、マイクロピペット又は毛細管を用いてスポットし、風乾する。次に、あらかじめ展開溶媒を入れ、その蒸気で飽和させておいた高さ約500mmの展開用容器に、このろ紙を入れ、器壁に触れないように注意して吊るし、下端から約10mmまでを器底の展開溶媒中に浸し、容器を密閉し、常温で展開を行う。

展開溶媒の先端が原線から各条に規定する距離まで上昇したとき、ろ紙を容器から取り出し、30秒以内に溶媒の先端の位置に印を付け、風乾した後、各条に規定する方法により、スポットの位置及び色等を調べる。Rf値は、次式により求める。

$$Rf=\frac{\text{原線からスポットの中心までの距離}}{\text{原線から溶媒先端までの距離}}$$

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

⑴　標準品

標準品は、一定の純度又は一定の生物学的作用を有するように調製された物質で、飼料添加物を生物学的又は理化学的に試験するときに用いるものである。

アスコルビン酸　$C_6H_8O_6$〔日本薬局方標準品〕

L-アスコルビン酸-２-リン酸エステルトリスシクロヘキシルアンモニウム　$C_6H_6O_9P\cdot 3[CH_2(CH_2)_4CHNH_3]$

含量　本品は、定量するとき、L-アスコルビン酸-２-リン酸エステルトリスシクロヘキシルアンモニウム（$C_6H_6O_9P\cdot 3[CH_2(CH_2)_4CHNH_3]$）98.0%以上を含む。

物理的・化学的性質　本品は、白色の粉末である。

確認試験　本品につき、赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、波数2,939cm^{-1}、2,859cm^{-1}、1,719cm^{-1}、1,586cm^{-1}、1,448cm^{-1}、1,389cm^{-1}及び974cm^{-1}付近に吸収を認める。

純度試験　本品0.01g（0.005～0.014g）を水20mLに溶かし、試料溶液とする。この溶液20μLにつき、次の条件で液体クロマトグラフ法の自動面積測定法によりピーク面積を測定し、面積百分率法によりL-アスコルビン酸-２-リン酸エステルトリスシクロヘキシルアンモニウム以外のピーク面積の和を求めるとき、2.0%以下である。

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：250nm）

カラム：内径4.6mm、長さ150mmのステンレス管に粒径５μm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を充塡する。

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相：リン酸二水素カリウム13.6g（13.55～13.64g）及びテトラブチルアンモニウムヒドロキシド試液4.0mLを水950mLに溶かし、２mol/L水酸化ナトリウム試液でpHを6.0に調整した後、水を加えて1,000mLとする。この溶液950mLにアセトニトリル50mLを加え、混和する。

流速：1.0mL/min

面積測定範囲：L-アスコルビン酸-２-リン酸エステルトリスシクロヘキシルアンモニウムの保持時間の６倍

乾燥減量　0.5%以下（0.1g，シリカゲル，24時間）

定量法　本品約11mgを0.1mgの桁まで量り、その数値を記録し、0.1mol/L塩酸を加えて溶かし、100mLの全量フラスコに入れ、0.1mol/L塩酸を標線まで加えて100mLとする。この溶液2.0mLを全量ピペットを用いて量り、100mLの全量フラスコに入れ、0.1mol/L塩酸・炭酸ナトリウム緩衝液（pH10）を標線まで加えて100mLとし、試料溶液とする。この試料溶液につき、0.1mol/L塩酸・炭酸ナトリウム緩衝液（pH10）を対照として263nm付近の極大波長における吸光度Aを測定する。

$$\text{L-アスコルビン酸-２-リン酸エステルトリスシクロヘキシルアンモニウムの量（mg）}=\frac{A}{279.5}\times 50{,}000$$

L-アスコルビン酸-２-リン酸エステルマグネシウム　$(C_6H_6O_9P)_2Mg_3\cdot 10H_2O$

含量　本品は、定量するとき、98.0%以上を含む。

物理的・化学的性質　本品は、白色の粉末で、僅かに特異な臭いを有する。

確認試験

①　本品２mg（1.5～2.4mg）に0.1mol/L塩酸試液を加えて100mLとし、この溶液につき、吸収スペクトルを測定するとき、波長235～239nmに吸収の極大を示す。

②　本品の水溶液（１→50）５mLに塩化第二鉄試液１滴を加えるとき、この溶液は、赤褐色を呈する。

③　本品0.1g（0.05～0.14g）に硫酸２mL及び過酸化水素水15mLを加え、溶液が約５mLになるまで加熱し、放冷した後、水を加えて50mLとする。この溶液１mLに３mol/L硫酸１mL、モリブデン酸アンモニウム試液１mL及びアミドール・亜硫酸水素ナトリウム試液１mLを加えるとき、その溶液は、青色を呈する。

④　本品0.5g（0.45～0.54g）に硫酸２mL及び過酸化水素水30mLを加え、溶液が約５mLになるまで加熱する。放冷した後、水を加えて20mLとし、１mol/L水酸化ナトリウム試液で中和した溶液は、マグネシウム塩の定性反応を呈する。