④　アルミニウム　本品0.2ｇ（0.15～0.24ｇ）を量り、白金製又は石英製のるつぼに入れ、硫酸少量を加えて潤し、徐々に加熱してできる限り低温でほとんど灰化した後、放冷し、更に硫酸１mLを加え、徐々に加熱して450～550℃で灰化するまで強熱する。残留物に少量の硝酸（１→150）を加えて溶かし、50mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて50mLとし、試料溶液とする。別に、アルミニウム標準液１mLを全量ピペットを用いて量り、100mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて100mLとする。この溶液１mLを全量ピペットを用いて量り、10mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて10mLとする。更にこの溶液４mLを全量ピペットを用いて量り、50mLの全量フラスコに入れ、少量の硝酸（１→150）を加えた後、水を標線まで加えて50mLとし、標準液とする。試料溶液及び標準液につき、次の条件で原子吸光光度法（フレームレス方式（電気加熱方式））により測定するとき、試料溶液の吸光度は、標準液の吸光度以下でなければならない（20μg／ｇ以下）。

光源ランプ：アルミニウム中空陰極ランプ
分析線波長：309.3nm
乾燥温度：140℃
灰化温度：900℃
原子化温度：2,600℃

水分　5.0％以下（直接滴定）

定量法　本品約0.20ｇを0.001ｇの桁まで量り、その数値を記録し、メタノールを加えて溶かし、200mLの全量フラスコに入れ、更にメタノールを標線まで加えて200mLとし、試料原液とする。この試料原液５mLを全量ピペットを用いて量り、50mLの全量フラスコに入れ、メタノールを標線まで加えて50mLとし、メンブランフィルター(0.45μm)を用いてろ過し、ろ液を試料溶液とする。別に、25-ヒドロキシコレカルシフェロール標準品約0.050ｇを0.0001ｇの桁まで量り、その数値を記録し、メタノールを加えて溶かし、50mLの全量フラスコに入れ、更にメタノールを標線まで加えて50mLとする。この溶液５mLを全量ピペットを用いて量り、50mLの全量フラスコに入れ、メタノールを標線まで加えて50mLとし、標準原液とする。この標準原液をメンブランフィルター（0.45μm）を用いてろ過し、標準液とする。試料溶液及び標準液20μL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25-ヒドロキシコレカルシフェロールのピーク面積を求める。

$$25\text{-ヒドロキシコレカルシフェロール（}C_{27}H_{44}O_2\cdot H_2O\text{）の含量（％）}=\frac{A_T}{A_S}\times\frac{W_S}{W_T}\times p\times 400$$

ｐ　：25-ヒドロキシコレカルシフェロール標準品の純度
W_T：本品の採取量（mg）
W_S：25-ヒドロキシコレカルシフェロール標準品の採取量（mg）
A_T：試料溶液の25-ヒドロキシコレカルシフェロールのピーク面積
A_S：標準液の25-ヒドロキシコレカルシフェロールのピーク面積

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：270nm）
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：28℃付近の一定温度
移動相：メタノール・アセトニトリル・水混液（55：22：23）
流量：毎分約1.0mL

(ｲ)　製造の方法の基準

*Saccharomyces cerevisiae*に属する菌株を宿主とした５，７，24-コレスタトリエノール生産組換え体を好気的に培養し、培養を終了した後、培養液を加熱処理し、５，７，24-コレスタトリエノールを分離し、紫外線照射の化学的処理により製造すること。

(ｳ)　保存の方法の基準

遮光した密封容器に入れ、空気を窒素で置換し、冷所に保存すること。

イ　製剤

(ｱ)　成分規格

本品は、25-ヒドロキシコレ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である。

含量　本品は、定量するとき、表示量の90～120％に相当する25-ヒドロキシコレカルシフェロール（$C_{27}H_{44}O_2\cdot H_2O$）を含む。

確認試験

①　定量法により調製した試料溶液及び標準液100μL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25-ヒドロキシ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。

②　定量法により調製した試料原液及び標準原液10μLずつを蛍光剤入り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、ｎ-ヘキサン・酢酸エチル混液（１：１）を展開溶媒として、約12cm展開した後、薄層板を風乾し、紫外線（主波長254nm）を照射するとき、試料原液及び標準原液から得た25-ヒドロキシコレカルシフェロールのスポットのRf値は等しい。

乾燥減量　8.0％以下（１ｇ，105℃，４時間）

定量法　本品約0.35ｇを0.001ｇの桁まで量り、その数値を記録し、100mLの全量フラスコに入れ、ジメチルスルホキシド15mLを加え、粉末が見えなくなるまで超音波処理する。液が半透明になつたら、酢酸エチルを標線まで加えて100mLとし、５分間静置し、試料原液とする。この試料原液の上澄液３mLを全量ピペットを用いて量り、100mLの全量フラスコに入れ、イソプロパノール・酢酸エチル・イソオクタン混液（１：30：69）を標線まで加えて100mLとし、メンブランフィルター（0.45μm）を用いてろ過し、試料溶液とする。別に、25-ヒドロキシコレカルシフェロール標準品約0.020ｇを0.0001ｇの桁まで量り、その数値を記録し、200mLの全量フラスコに入れ、メタノール15mLを加え、20分間振り混ぜて溶かし、酢酸エチルを標線まで加えて200mLとし、標準原液とする。この標準原液３mLを全量ピペットを用いて量り、200mLの全量フラスコに入れ、イソプロパノール・酢酸エチル・イソオクタン混液（１：30：69）を標線まで加えて200mLとし、メンブランフィルター（0.45μm）を用いてろ過し、ろ液を標準液とする。また、別に、標準液10mLを40℃で一晩又は室温で３～４日間放置し、プレ-25-ヒドロキシコレカルシフェロールを生成させ、メンブランフィルター（0.45μm）を用いてろ過し、ろ液をプレ-25-ヒドロキシコレカルシフェロールの保持時間の確認及びカラムの選定のための分離溶液とする。試料溶液、標準液及び分離溶液100μL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。なお、試料溶液中の25-ヒドロキシコ