

1 酸分解ジエチルエーテル抽出法による粗脂肪定量法の油さいへの適用

小森谷 敏一^{*}, 松原 光里^{*}

Study of Application of Acid Hydrolysis and Ether Extraction Method to the Determination of Crude Fat in Oil Foots

Toshiichi KOMORIYA^{*} and Hikari MATSUBARA^{*}

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

In this work, the application of a hydrolysis and ether extraction method to determine the crude fat content of soybean and rapeseed oil foots was studied.

Samples were hydrolyzed with hydrochloric acid (4:1) by heating to 70~80 °C for 1 hour, and the liberated fatty acids were extracted via liquid-liquid distribution with diethyl ether. After washing diethyl ether layer with water, the diethyl ether was recovered, from the fat solution and the residue was dried at 95~100 °C for 3 hours and weighed and referred to as crude fat.

Determination of the crude fat content of three types each of soybean and rapeseed oil foots was undertaken using the hydrolysis and ether extraction method. Results indicated a crude fat content for soybean oil foots ranging from 60.17 % to 76.74 %, with repeatability in terms of a relative standard deviation (RSD_r) of not more than 1.0 %, and a crude fat content for rapeseed oil foots of 63.01 % to 67.43 %, with RSD_r of not more than 0.97 %.

A collaborative study was conducted in 11 laboratories using soybean and rapeseed oil foots. The RSD_r and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_R) were not more than 0.62 % and 1.1 %, with HorRat values of 0.85 and 0.84, respectively..

This method was validated and applied for use in the inspection of the crude fat content of soybean and rapeseed oil foots.

Key words: crude fat ; hydrolysis and ether extraction method ; soybean oil foots ; rapeseed oil foots ; collaborative study

キーワード：粗脂肪；酸分解ジエチルエーテル法；大豆油さい；なたね油さい；共同試験

1 緒 言

飼料中の粗脂肪の定量法にはジエチルエーテル抽出法及び酸分解ジエチルエーテル抽出法があり、加水分解しないと十分に脂肪が抽出されない試料については酸分解ジエチルエーテル抽出法が適用されている。現在、飼料分析基準¹⁾において酸分解ジエチルエーテル抽出法が適用される試料には、エキスパンド状の飼料、粉末油脂を原料とする配合飼料（ほ乳期子牛育成用代用乳配合飼料及びほ乳期子豚育成用配合飼料に限る）及び脂肪酸カルシウムを原料とする乳用牛飼育用配合飼料がある。今回、大豆油さい及びなたね油さい（食用大豆油及び食用なたね油の精製工程（脱ガム後の原油

^{*} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

の脱酸工程)で発生するアルカリ性油さいを硫酸にて中和したもので脂肪酸ナトリウムが主成分のもの²⁾中の粗脂肪の定量法として酸分解ジエチルエーテル抽出法への適用要請があったことから、その検討結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

大豆油さい及びなたね油さい各3種類(製造ロットの違う3種類)を用いた。使用に際して、40℃の水浴中で約30分間加温した後、ホモジナイザーで5分間かき混ぜて均質にしたものを供試試料とした。

2.2 装置及び器具

- 1) ホモジナイザー：Hsiangtai 製 HG-200 (使用時回転数 6500 rpm)
- 2) ロータリーエバポレーター：BÜCHI Labortechnik AG 製 R-200
- 3) 恒温乾燥機：株式会社 東洋製作所製 DRM420DB
- 4) 電子天秤：株式会社 島津製作所製 AW320

2.3 定量方法

分析試料 2 g を正確に量って 100 mL のビーカーに入れ、エタノール 2 mL を加え、ガラス棒で混和して試料を潤した後、塩酸 (4+1) 20 mL を加えて時計皿で覆い、70~80℃の水浴上でときどきかき混ぜながら1時間加熱した後放冷した。

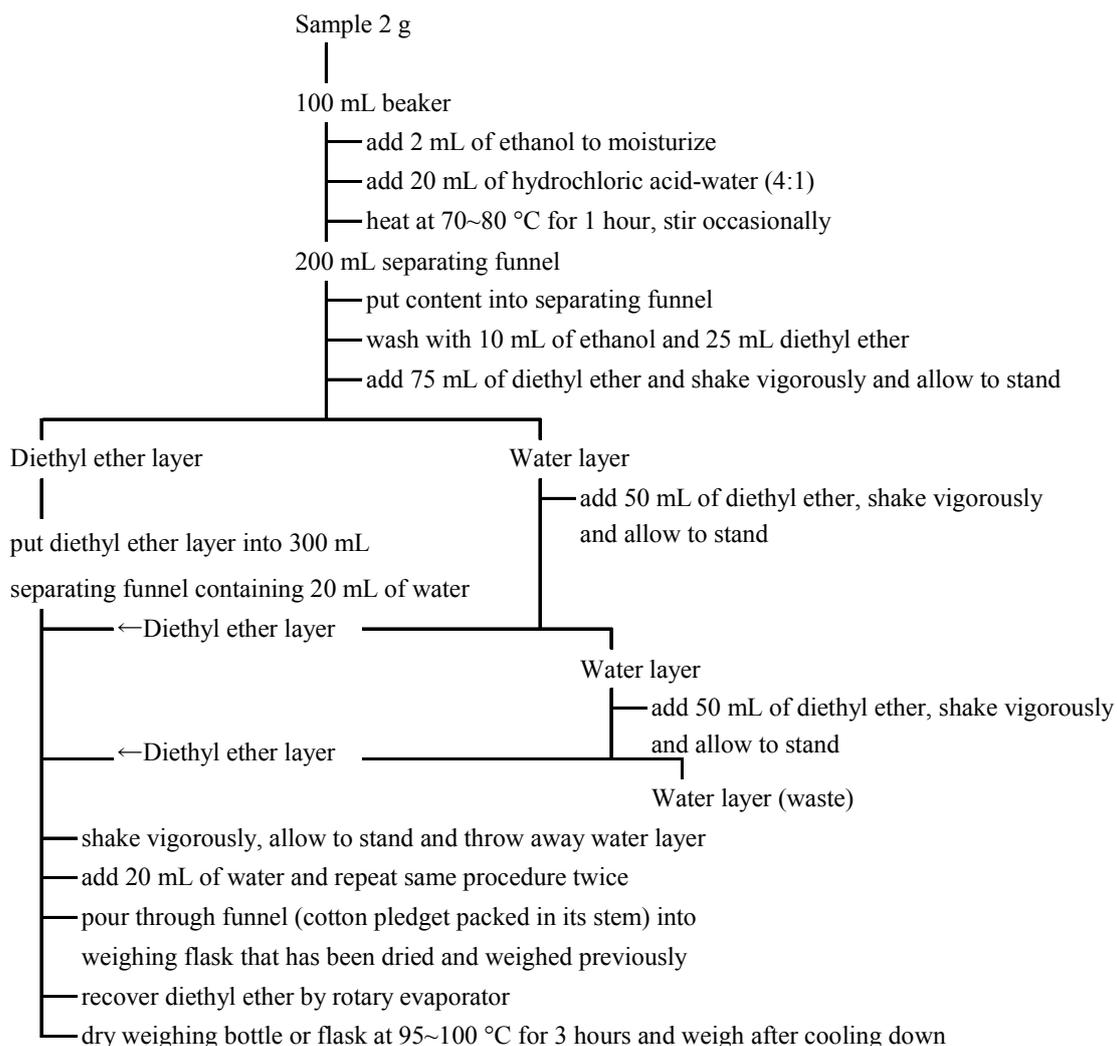
先のビーカーの内容物を 200 mL の分液漏斗 A に入れ、ビーカーをエタノール 10 mL 及びジエチルエーテル 25 mL で順次洗浄し、洗液を分液漏斗 A に合わせた。更にジエチルエーテル 75 mL を分液漏斗 A に加え、手で激しく1分間振り混ぜた後静置した。ジエチルエーテル層(上層)をピペット等でとり、あらかじめ水 20 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 B に加えた。

分液漏斗 A にジエチルエーテル 50 mL を加え、同様に2回操作し、各ジエチルエーテル層をピペット等でとり、分液漏斗 B に合わせた。

分液漏斗 B を手で激しく1分間振り混ぜた後静置し、水層(下層)を捨てた。更に水 20 mL を分液漏斗 B に加え、同様に2回操作した。ジエチルエーテル層をあらかじめ脱脂綿を詰め硫酸ナトリウム(無水) 15 g を入れた漏斗で 300 mL のなす形フラスコ(あらかじめ 95~100℃で乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの)にろ過した。

次に、ロータリーエバポレーターで先のなす形フラスコ内のジエチルエーテルを回収し、なす形フラスコをはずして窒素ガス流下にてジエチルエーテルを揮散させた。95~100℃で3時間乾燥し、デシケーター(シリカゲル)中で放冷後、重さを正確に量り、試料中の粗脂肪量を算出した。

参考のため、フローシートを Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Testing procedure of crude fat in oil foots

3 結果及び考察

3.1 ジエチルエーテル抽出法による確認

大豆油さい及びなたね油さい各 1 種類を用いてジエチルエーテル抽出法（飼料分析基準¹⁾第 3 章 3.1) による粗脂肪の定量値の確認を行った。その結果は Table 1 のとおりであり、ジエチルエーテルの循環時に油さい自体が固化して、粗脂肪が十分に抽出されていないと考えられた。

Table 1 Crude fat content measured by ether extraction method

Kind of samples	Lot No.	Crude fat (%)	
Soybean oil foots	1	54.28	55.84
Rapeseed oil foots	1	55.81	57.01

3.2 酸分解ジエチルエーテル抽出法による粗脂肪の定量値

大豆油さい及びなたね油さい各 3 種類を用い、2.3 に従って粗脂肪の定量値の確認を行った。その結果は Table 2 のとおりであり、大豆油さいの繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 1.0 %以下、なたね油さいの繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 0.97 %以下であっ

た。

また、3.1 で実施したジエチルエーテル抽出法による粗脂肪の定量値と比較して高く定量されることが確認できた。

参考までに、大豆油さい及びなたね油さい各 1 種類を用い、酸分解ジエチルエーテル抽出法による 2 試験室間（試料提供者及び FAMIC）における比較検討を行った。その結果は Table 3 のとおりであり、 F 検定においていずれの試料も有意差は認められなかった。

Table 2 Content of crude fat measured by hydrolysis and ether extraction method

Kind of samples	Lot No.	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Soybean oil foots	1	75.04	1.0
	2	76.74	0.66
	3	60.17	0.65
Rapeseed oil foots	1	62.83	0.97
	2	65.68	0.67
	3	67.43	0.18

a) Mean value ($n=7$)

b) Relative standard deviations of repeatability

Table 3 Comparison of crude fat between two laboratories measured by hydrolysis and ether extraction method

Lab.No.		1		2		F -value
Kind of samples	Lot No.	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	
Soybean oil foots	2	76.74	0.66	76.17	0.56	$F_0=1.431$
Rapeseed oil foots	2	65.68	0.67	64.81	0.30	$F_0=5.016$

$F(6,6;0.025)=5.820$

a) Mean value ($n=7$)

b) Relative standard deviations of repeatability

3.3 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、以下の方法で共通試料による共同試験を実施した。大豆油さい及びなたね油さい各 1 kg を 2.1 に従い、それぞれ均質化した後、約 80 g に小分けしたものを各試験室に配布し、明示の 2 点反復で実施した。参加試験室は、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、JA 東日本くみあい飼料株式会社、協同飼料株式会社研究所、日清丸紅飼料株式会社総合研究所、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 11 試験室）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{3), 4)}を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行った後、繰

返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

その結果を Table 4 に示した。大豆油さいでは、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R として 0.52 %及び 1.1 %であった。また、なたね油さいでは、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R として 0.62 %及び 1.1 %であった。IUPAC のプロトコールでは化学分析法の妥当性確認を行うにあたり、試験室間共同試験データから求めた RSD_R と修正 Horwitz 式から求めた室間再現精度 ($PRSD_R$) の比である HorRat は 2 以内であることがよいとされているが、粗脂肪のような経験的分析法は HorRat の対象外としている。そこで、本試験結果について、参考までに HorRat を計算したところ、大豆油さい及びなたね油さいでそれぞれ 0.85 及び 0.84 であった。

Table 4 Collaborative study results of crude fat

Lab.No.	Kind of samples			
	Soybean oil foots (%)		Rapeseed oil foots (%)	
1	66.56	66.47	65.04	64.18
2	65.58	66.63	64.53	64.73
3	65.76	65.51	63.72	63.50
4	65.98	65.95	64.22	63.28
5	65.56	65.51	63.02	63.44
6	65.67	66.11	63.64	63.67
7	67.01	66.34	63.57	64.01
8	67.23	66.88	63.76	63.09
9	65.87	65.40	63.93	63.09
10	67.02	67.24	65.03	65.17
11	65.46	64.80	63.64	63.15
Mean value ^{a)} (%)	66.12		63.88	
RSD_r ^{b)} (%)	0.52		0.62	
RSD_R ^{c)} (%)	1.1		1.1	
$PRSD_R$ ^{d)} (%)	1.2		1.3	
(Reference) HorRat	0.85		0.84	

a) $n=22$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

4 まとめ

以下の結果から、大豆油さい及びなたね油さい中の粗脂肪の定量法として飼料分析基準の酸分解ジエチルエーテル抽出法を適用することは、妥当であると考えられた。

- 1) ジエチルエーテル抽出法ではジエチルエーテルの循環時に油さい自体が固化して十分に抽出されていないことが確認された。
- 2) 大豆油さい及びなたね油さい各 3 種類を用いて酸分解ジエチルエーテル抽出法にて定量した結

果，大豆油さいの繰返し精度は，相対標準偏差（ RSD_r ）として 1.0 %以下，なたね油さいの繰返し精度は，相対標準偏差（ RSD_r ）として 0.97 %以下であった。

- 3) 大豆油さい及びなたね油さいを用いて 11 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ，良好な結果を得た。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所，JA 東日本くみあい飼料株式会社，協同飼料株式会社研究所，日清丸紅飼料株式会社総合研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

また，本検討に際して試料の提供いただいた日清丸紅飼料株式会社関係者各位にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号(2008).
- 2) 第 2 回農業資材審議会飼料分科会飼料栄養部会議事録，(2013).
- 3) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 4) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19th Edition, Volume II*, Gaithersburg, MD, USA (2012).