

7 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中の油脂の酸価及び過酸化物価の測定法

名塚 英一^{*1}, 松原 光里^{*2}

Determination of Acid Value and Peroxide Value of Fat in Dry and Semi-dry Type Pet Foods

Eiichi NAZUKA^{*1} and Hikari MATSUBARA^{*2}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Sendai Regional Center),

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method was developed to determine the levels of acid value and peroxide value of fat in dry type and semi-dry type pet foods.

After adding petroleum ether to the sample, the sample was shaken for 2 hours. The petroleum ether in the flask was filtrated and collected in a separatory funnel. After washing with water twice, the petroleum ether layer was dehydrated, filtrated and evaporated by a rotary evaporator. The residue in the flask was then used for determinations of acid value and peroxide value by the titration.

Repetitive tests were conducted on two kinds of dry type dog food, two kinds of dry type cat food and a semi-dry type dog food. The resulting repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) of acid value and peroxide value were not more than 4.6 % and 10 %, respectively. A branching test was conducted on a dry type dog food. The resulting intermediate precision in terms of standard relative deviations (RSD_I) of acid value and peroxide value were 4.3 % and 6.7 %, respectively.

A collaborative study was conducted in 12 laboratories using dry and semi-dry type dog foods. Repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R), and HorRat for acid value were 1.2 %, 2.9 % and 0.64, respectively, for dry type dog food and 2.4 %, 6.7 % and 1.4, respectively, for semi-dry type dog food. For peroxide value, RSD_r and RSD_R were 4.1 % and 12 %, respectively, for dry type dog food and 3.0 % and 18 %, respectively, for semi-dry type dog food.

This method was validated and established for use in the inspection of acid value and peroxide value of fat in dry and semi-dry type pet foods.

Key words: acid value; peroxide value; pet food; collaborative study

キーワード：酸価；過酸化物価；愛玩動物用飼料；共同試験

1 緒 言

平成19年の米国における愛玩動物用飼料へのメラミン混入を契機に、愛玩動物用飼料の安全性への関心が高まっている。このような背景の中、「愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律」により、愛玩動物用飼料の基準・規格¹⁾が設定され、当該基準・規格に合わない愛玩動物用飼料や愛玩動物に対する健康被害を与える可能性がある有害な物質を含む愛玩動物用飼料の製造等が禁止

^{*1} 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 現 仙台センター

^{*2} 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

されている。

愛玩動物用飼料の使用が原因となって、愛玩動物に健康被害が生じた場合に、その原因究明、実態把握等は、原則的に「愛玩動物用飼料等の検査法」²⁾に記載された分析法により実施する必要がある。しかし、酸価及び過酸化物価は、品質劣化の指標となる成分であるにもかかわらず、「愛玩動物用飼料等の検査法」に記載されていないことから、分析法の確立が急務となっている。

今回、一般財団法人化学物質評価研究機構が平成23年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業において開発した愛玩動物用飼料中の酸価・過酸化物価の測定法³⁾（以下「CERI法」という。）を基に、「愛玩動物用飼料等の検査法」への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）を1 mmの網ふるいを通すまで粉碎したものをを用いた。なお、検討に用いた愛玩動物用飼料の原材料をTable 1に示した。

2.2 試薬

- 1) 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液
容量分析用，和光純薬工業製
- 2) 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液
容量分析用，関東化学製
- 3) ジエチルエーテル
油脂酸価・過酸化物価測定用，同仁化学研究所製及び特級
- 4) エタノール，石油エーテル，2,2,4-トリメチルペンタン，酢酸及びヨウ化カリウムは特級を用いた。
- 5) フェノールフタレイン試液
フェノールフタレイン（特級）1 g をエタノール 100 mL に溶かした。
- 6) ヨウ化カリウム飽和溶液
ヨウ化カリウム 36 g を煮沸冷却した水 25 mL に飽和させたもの。使用の都度調製し，使用時までは暗所に保存した。
- 7) デンプン試液
デンプン（溶性，E. Merck 製）1 g を少量の水で均一なペースト状にしたものを，熱水 100 mL 中にかき混ぜながら加え，更に穏やかに煮沸しながら透明になるまでかき混ぜた後放冷し，上澄み液を使用した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) ガラス繊維ろ紙：GFP-95 桐山製作所製

Table 1 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry type for old dogs	Grains (Wheat flour, Maize, Hominy feed, Corn gluten meal, Defatted rice bran), Meat (Chicken by-product meal, Meat meal, Powdered chicken meat), Oils and fats (Animal fat, Fish oil, Wheat germ oil), Beet pulp, Alfalfa, Soybean oil, Powdered milk, Fish (Fish meal, Powdered dried sardine), Vegetables (Paprika, Powdered cabbage, Powdered carrot, Powdered spinach, Powdered pumpkin), Oligosaccharide, Beer yeast, Powdered egg yolk, Chlorella, Glucosamine, β -glucan, Clove, Basil, Rosemary, Minerals (Ca, P, Na, Cl, I, Zn, Cu), Vitamins (A, B, E, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , Niacin, Pantothenic acid, Inositol, Choline), Antioxidants (Rosemary extracts)
Dry type for old dogs	Maize, Chicken, Animal fat, Soybean, Linseed, Chicken extracts, Corn gluten, Egg, Glucosamine, Chondroitin sulfate, Minerals (Ca, P, Na, K, chloride, Cu, Fe, Mn, Se, Zn, I), Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, β -carotene, Niacin, Pantothenic acid, Folic acid, Biotin, Choline), Amino acids (Arginine, Taurine, Tryptophan, Lysine), Lactic acid, Phosphoric acid, Antioxidants (Mixed tocopherol, Citric acid, Rosemary extracts)
Dry type for cats of all life stage	Soybean meal, Maize, Tapioca, Meat (Chicken, etc.), Corn gluten meal, Oils and fats (Animal fat, Vege oil, etc.), Fish (Fish meal, etc.), Bonito extracts, Minerals (Ca, P, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), Vitamins (A, D ₃ , E, K ₃ , B ₁ , B ₂ , Pantothenic acid, Niacin, B ₆ , Folic acid, Biotin, Choline, C), Amino acids (Taurine), Preservative (Propionic acid, Ammonium propionate), Green tea extracts
Dry type for adult cats	Chicken meal, Powdered cone, Corn gluten meal, Chicken fat, Powdered brown rice, Whole wheat flour, Powdered herring, Natural flavor, Tomato fiber, Dried chicken liver, Beer yeast, Dried chicory, Abocado oil, Abocado meal, Potassium chloride, Calcium carbonate, Taurine, Lecithin, Dried yucca, Methionine, Dried kelp, Vitamin A, Vitamin D ₃ , Vitamin E, Vitamin B ₁₂ , Vitamin B ₂ , Niacin, Choline chloride, Calcium Pantothenate, Folic acid, Vitamin B ₆ , Vitamin B ₁ , Biotin, Vitamin C, Zinc polysaccharide complex, Manganese polysaccharide complex, Iron polysaccharide complex, Copper polysaccharide complex, Cobalt polysaccharide complex, Calcium iodate, Sodium selenate
Semi-dry type for over thirteen dogs	Grains (Maize, Wheat flour, etc.), Meat (Chicken by-product meal, Powdered white meat, etc.), Sugar (High-fructose corn syrup, Sucrose, Oligosaccharide), Animal fat, Beans (Powdered soybean, Defatted soybean, etc.), Beer yeast, Vegetables (Beet pulp, Powdered carrot, Powdered pumpkin, Powdered spinach), Herb, Fish (Dried small fish), Propylene glycol, Glycerin, Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Minerals (Cl, Cu, I, K, Zn), Malic acid, Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D, E, K, Choline, Pantothenic acid), Glucosamine hydrochloride (derived from shrimp, crab), Coloring (Titanium dioxide, Food red no.106, Food yellow no.4, Food yellow no.5, Food blue no.1), Chondroitin sulfate (derived from shark), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Semi-dry type for adult dogs	Grains (Maize, Wheat flour, etc.), Sugar (High-fructose corn syrup, Sucrose), Meat (Chicken by-product meal, Beef by-product meal, Chicken extracts, etc.), Animal fat, Beans (Defatted soybean, Powdered soybean, etc.), Fish (White fish meal, Fish meal), Beer yeast, Vegetables (Powdered carrot, Powdered pumpkin, Powdered spinach), Powdered cheese, Propylene glycol, Minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, Na, P, Zn), Glycerin, Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Malic acid, Coloring (Titanium dioxide, Food red no.106, Food yellow no.4, Food yellow no.5, Food blue no.1), Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, Choline, Pantothenic acid), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Dry type for adult dogs	Lamb meal, Rice, Steamed oats, Brown rice, Maize, Green field beans, Corn gluten meal, Animal fat, Chicken by-product meal, Chicken digest, Blend oils omega 3&6 (Canola oil, Sunflower oil, Linseed oil, Fish oil), Vitamin A, Vitamin B ₃ , Vitamin E, Vitamin K ₃ , Vitamin B ₁ , Vitamin B ₂ , Vitamin B ₃ , Vitamin B ₅ , Vitamin B ₆ , Vitamin B ₁₂ , Folic acid, Biotin, Copper sulfate, Copper chelate, Zinc sulfate, Zinc chelate, Mn oxide, Mn chelate, Iron sulfate, Iron chelate, Se, I, Ca, Domestic fermentation powder, Cartilage of shark, Antioxidants (Vitamin E, Rosemary extracts)
Dry type for adult dogs	Raw meat of chicken, Dried meat of chicken, Brown rice, Coarsely ground rice, Chicken fat, Beet pulp, Pea protein, Potato protein, Protein hydrolyzate, Dried lamb, Dried salmon, Sunflower oil, Oats, Linseed, Fish oil, Dried egg, Tomato, Pomegranate, Blueberry, Cranberry, Pumpkin, Spinach, Carrot, Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, β -carotene, Choline, Niacin, Pantothenic acid, Biotin, Folic acid), Minerals (K, Chloride, Se, Na, Mn, I, Zn, Fe, Cu), Antioxidants (Mixed tocopherol, Rosemary extracts)
Semi-dry type for adult dogs	Grains (Maize, Wheat flour, etc.), Meat (Chicken by-product meal, Beef by-product meal, Powdered white meat, etc.), Beans (Defatted soybean, etc.), Sugar (High-fructose corn syrup, Sucrose, Oligosaccharide), Animal fat, Beer yeast, Herb, Vegetables (Powdered carrot, Powdered pumpkin, Powdered spinach), Fish (Dried small fish), Propylene glycol, Glycerin, Minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, Na, P, Zn), Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Malic acid, Coloring (Titanium dioxide, Food red no.106, Food yellow no.4, Food yellow no.5, Food blue no.1), Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, Choline, Pantothenic acid), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)

2.4 定量方法

1) 油脂試料の調製

油脂試料の調製操作は遮光した状態で行った。分析試料一定量（200 g 以下で、抽出される油脂が約 10 g 以上となるよう愛玩動物用飼料に表示されている粗脂肪の量から推定した量）を量って 500 mL の共栓三角フラスコに採取した。分析試料の採取量に対して 1.5 倍容量の石油エーテルを加え、軽く振り混ぜた後、更に 2 時間振り混ぜて（280 rpm）抽出した。500 mL の三角フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をガラス繊維ろ紙（ただし、セミドライ製品はろ紙（5 種 B））を用いて吸引ろ過した。抽出液の入っていた共栓三角フラスコ及び残さを一定量の石油エーテル（最初の抽出に用いた石油エーテルの 1/2 容量の石油エーテル）で洗浄し、同様に吸引ろ過した。ただし、ろ液の量は最大でもビーカーの目盛りで 300 mL までとした。得られたろ液を 500 mL の分液漏斗に入れ、ろ液に対して 1/2 容量の水を加え、1 分間激しく振り混ぜた後、10 分間以上静置し、水層と石油エーテル層が十分分離した後、水層（下層）を捨てた。エマルジョンが発生した場合は、エマルジョンを含む水層部分を共栓遠心遠沈管に分取し、1600×g で 5 分間遠心分離を行い、分離した石油エーテル層を分液漏斗に残った石油エーテル層に合わせた。更にろ液の 1/2 容量の水を先の分液漏斗に同量の水を加え、同様に 2 回操作した。

分液漏斗中の石油エーテル層を、あらかじめ脱脂綿を詰め、硫酸ナトリウム（無水）40 g 以上の適量を入れた漏斗で 500 mL なす形フラスコにろ過した。

ろ液を 40 °C 以下の水浴で減圧濃縮した後、窒素ガスを送って石油エーテルを完全に除去し、油脂試料を得た。

2) 酸価の測定

Table 2 に従い推定される酸価に応じた油脂試料の一定量を正確に量って 200 mL 共栓三角フラスコに入れた。なお、油脂試料が固化している場合は、40 °C 以下の水浴で溶かしてから量った。共栓三角フラスコにジエチルエーテル-エタノール（2+1）100 mL を加えて油脂試料を溶かした。必要に応じて、40 °C 以下の水浴中で共栓三角フラスコを加熱し溶かした。これにフェノールフタレイン試液数滴を加え、滴定前の鮮やかな黄色から約 30 秒間持続する淡いオレンジ色を呈するまで 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液で滴定した。同時に空試験を実施（空試験においては、滴定前の無色透明から約 30 秒間持続する淡紅色を呈するまで滴定を行った。）し、先の滴定値を補正し、次式により油脂試料の酸価を算出した。

$$\text{酸価} = (V_S - V_B) \times f \times 5.611 / W$$

V_S : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量 (mL)

V_B : 空試験における 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量 (mL)

f : 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の係数

W : 油脂試料量 (g)

Table 2 Amount of fat sample to be weighed corresponding to estimate acid value

Estimate acid value	Fat sample (g)
1 or less	20
1 ~ 4	10
4 ~ 15	2.5
15 ~ 75	0.5
75 or more	0.1

3) 過酸化物価の測定

Table 3 に従い推定される過酸化物価に応じた油脂試料の一定量を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れた。なお、油脂試料が固化している場合は、40 °C 以下の水浴で溶かしてから量った。酢酸-2,2,4-トリメチルペンタン (3+2) 35 mL を加えて油脂試料を完全に溶かした。必要に応じて、40 °C 以下の水浴中で共栓三角フラスコを加温して溶かした。窒素ガスを 1 分間送って、共栓三角フラスコ内の空気を窒素で置換し、更に窒素ガスを送りながらヨウ化カリウム飽和溶液 1 mL を加え、直ちに栓をして 1 分間円を描くように振り混ぜた後、暗所にて 5 分間静置した。これに水 75 mL を加えて、栓をして激しく振り混ぜた後、デンプン試液 1 mL を加え、水層（下層）において滴定前のデンプン試薬による青色が消失するまで 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液により滴定した。なお、滴定は、溶液の乳化を避けるため溶剤層（上層）と水層（下層）ができるだけ混ざらないよう水平方向に穏やかに振り混ぜた。同時に空試験を行い、デンプン試液で発色しないことを確認した。次式により油脂試料の過酸化物価を算出した。

$$\text{過酸化物価 (meq/kg)} = (V_S - V_B) \times f \times 10/W$$

V_S : 滴定に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液の量 (mL)

V_B : 空試験における 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液の量 (mL)

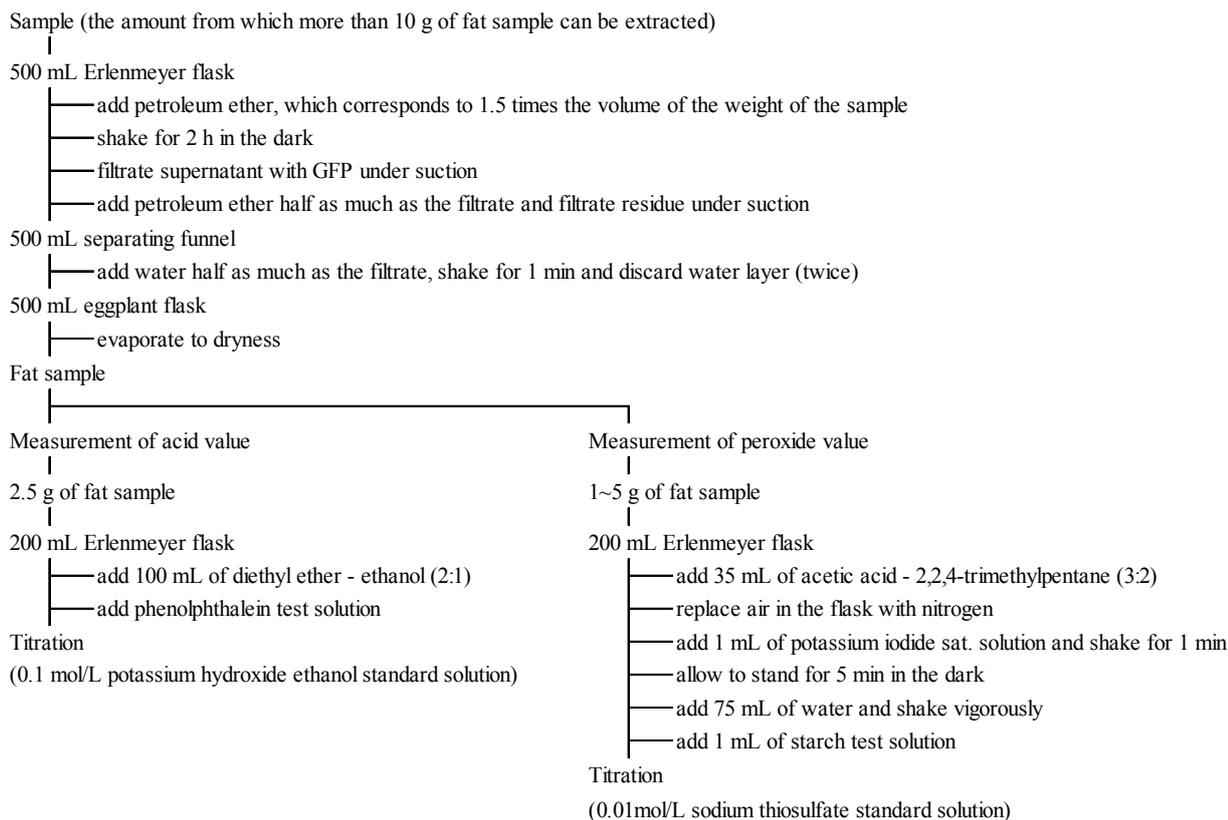
f : 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液の係数

W : 油脂試料量 (g)

Table 3 Amount of fat sample to be weighed corresponding to estimate peroxide value

Estimate peroxide value (meq/kg)	Fat sample (g)
10 or less	5
10 ~ 50	5 ~ 1
50 or more	1 ~ 0.5

参考のため、フローシートを Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Testing procedure of acid value and peroxide value of fat in dry and semi-dry type pet foods

2.5 吸引ろ過方法の検討

2.4 の 1)の吸引ろ過抽出において、CERI 法に示されているろ紙 (5 種 B) の代わりに、ガラス繊維ろ紙を用いて検討した。

2.6 酸価測定用ジエチルエーテルの検討

2.4 の 2)の酸価の測定において、CERI 法に示されている酸化防止剤が封入された油脂酸価・過酸化価測定用のジエチルエーテルの代わりに、ジエチルエーテル (特級) を用いて検討した。なお、測定は 2.4 の 1)及び 2)に従い、ドライ製品 (犬用及び猫用) 及びセミドライ製品を用いてそれぞれ 5 点併行で行った。

3 結果及び考察

3.1 吸引ろ過方法の検討

油脂試料の抽出工程において、ドライ製品を CERI 法に示されているようにろ紙 (5 種 B) を用い、振とう抽出後の残さも含めた抽出液全量を吸引ろ過したところ、ろ紙が目詰まりし、吸引ろ過に非常に時間を要した。そこで、ろ紙 (5 種 B) の代わりに、ガラス繊維ろ紙を用いるとともに、第 1 段階で振とう抽出後の抽出液の上澄みのみを吸引ろ過し、第 2 段階で共栓三角フラスコの残さに最初の半量の石油エーテルを加え、残さを含めて吸引ろ過した場合、ろ紙の目詰まりが改善された。なお、この方法でも目詰まりが解消しない試料があり、その場合には、第 2 段階のろ過の際に、ガラス繊維ろ紙を新しいものに替えることで、目詰まりが改善された。

一方、セミドライ製品においては、供試した試料ではろ紙（5種 B）を使用しても目詰まりは認められなかった。

3.2 酸価測定用ジエチルエーテルの検討

CERI 法では、酸価の測定に使用するジエチルエーテルに酸化防止剤が封入された油脂酸価・過酸化物価測定用の試薬を用いることとなっているが、ジエチルエーテル（特級）で酸価の測定が可能かどうか検討した。ドライ製品（犬用及び猫用）及びセミドライ製品を用いて 5 点併行により、油脂酸価・過酸化物価測定用及び特級における酸価の平均値の差が統計的に有意かどうか確認するため、有意水準 5 % で両側検定の t 検定を行ったところ、 $t(2)=2.65$, $p=0.12$ であり、有意差は認められなかった（Table 4）。また、油脂酸価・過酸化物価測定用及び特級の空試験における 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量は、それぞれ 0.07 mL 及び 0.06~0.10 mL となり、酸価の測定に影響を与えると考えられるような差は認められなかった。このことから、基本的には酸価の測定の際、試薬の用途に合わせたジエチルエーテル（油脂酸価・過酸化物価測定用）を用いることが適切と考えるが、特級試薬による空試験の滴定で 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量が 0.10 mL 以下であることを確認すれば、本検討に用いた試料の酸価の測定に、特級試薬を用いることが可能と考えられた。

Table 4 Comparison of diethyl ether for acid value measurement

Pet food types	Kind of diethyl ether	
	For fat acid value, peroxide value measurement ^{a)}	High grade ^{a)}
Dry type for dogs	6.79	6.63
Dry type for cats	4.72	4.68
Semi-dry type	6.31	6.23

a) Mean value ($n=5$)

3.3 酸価及び過酸化物価の繰返し精度

ドライ製品（犬用及び猫用）各 2 種類、セミドライ製品 2 種類を用い、5 点併行で酸価及び過酸化物価を測定した結果をそれぞれ Table 5 及び Table 6 に示した。ドライ製品（犬用及び猫用）及びセミドライ製品における酸価の繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 4.6 % 以下、過酸化物価の繰返し精度は、 RSD_r として 10 % 以下であった。

Table 5 Measurement of acid value

Pet food types	No.	Measurement ^{a)}	RSD _r ^{b)} (%)
Dry type for dogs	1	7.43	4.6
	2	5.91	3.9
Dry type for cats	1	7.35	3.4
	2	4.59	1.4
Semi-dry type	1	8.80	3.3
	2	5.57	1.8

a) Mean value ($n=5$)

b) Relative standard deviations of repeatability

Table 6 Measurement of peroxide value

Pet food types	No.	Measurement ^{a)} (meq/kg)	RSD _r ^{b)} (%)
Dry type for dogs	1	12.61	4.0
	2	19.79	6.1
Dry type for cats	1	6.58	5.4
	2	15.53	2.0
Semi-dry type	1	2.14	10
	2	3.26	5.6

a) Mean value ($n=5$)

b) Relative standard deviations of repeatability

3.4 酸価及び過酸化値の中間精度

共同試験を実施前に、滴定における終点の判断等による試験者間の測定値への影響を検証するため、ドライ製品（犬用）1点を用い、試験者と試験日の効果を判定しない枝分かれ試験2名、3日間、各2点併行により酸価及び過酸化値を2.4に従い測定した。厚生労働省通知⁴⁾に従い平均値並びに併行精度及び中間精度の相対標準偏差（RSD_r及びRSD_i）を求めた。その結果はTable 7のとおりであり、酸価の平均測定値は4.80、その併行精度及び中間精度はそれぞれRSD_r及びRSD_iとして4.3%及び4.3%、過酸化値の平均測定値は20.59 meq/kg、その併行精度及び中間精度はそれぞれRSD_r及びRSD_iとして6.1%及び6.7%であった。酸価及び過酸化値において、RSD_r及びRSD_i間に大きな差異は認められなかったことから、試験者間の測定値への影響は併行精度と同程度であると考えられた。

Table 7 Intermediate precision of acid value and peroxide value

No.	Acid value		Peroxide value (meq/kg)	
	1	4.77	4.96	21.56
2	4.91	4.92	22.50	19.82
3	4.48	4.93	18.51	18.65
4	4.95	4.87	21.67	20.57
5	4.49	4.92	19.33	21.26
6	4.83	4.53	22.19	19.60
Mean value ^{a)}	4.80		20.59	
RSD _r ^{b)} (%)	4.3		6.1	
RSD _I ^{c)} (%)	4.3		6.7	

a) $n=12$

b) Relative standard deviations of repeatability within a day

c) Relative standard deviations of intermediate precision within a single laboratory

3.5 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。愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）各約 5 kg を 2.1 に従い、調製した後、約 80 g 及び 140 g に小分けしたものをを用い、非明示の 2 点反復で実施した。なお、共同試験において滴定時に空試験を行い、酸価については測定値を補正し、過酸化価については空試験における溶液の発色が認められないことを確認した。参加試験室は一般財団法人日本食品分析センター名古屋支所、一般財団法人マイコトキシシン検査協会、一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所、JA 東日本くみあい飼料株式会社本社品質安全部、協同飼料株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、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、同札幌センター、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 12 試験室）であった。結果の解析については、酸価は、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順 ^{5), 6)} 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 検定した後、繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。その後、酸価の平均値を抽出油脂中のオレイン酸相当の遊離脂肪酸 (%) として換算し ⁷⁾、更に均質性試験時の油脂抽出率から、愛玩動物用飼料中のオレイン酸相当の遊離脂肪酸 (%) を算出し、修正 Horwitz 式 ⁸⁾ を用いて予測室間再現精度 (PRSD_R) を求め、先に算出した RSD_R から HorRat を求めた。過酸化価は、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定した後、繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。

酸価の解析結果を Table 8 に示した。ドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R として 1.2 % 及び 2.9 % であり、HorRat は 0.64 であった。また、セミドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R として 2.4 % 及び 6.7 % であり、HorRat は 1.4 であり、良好な結果を得た。

過酸化価の解析結果を Table 9 に示した。ドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は

RSD_f及びRSD_Rとして4.1%及び12%であった。また、セミドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度はRSD_f及びRSD_Rとして3.0%及び18%であった。過酸化物価については、過酸化物価を物質量に換算する適当な方法がないことから、HorRatは算出しなかった。ただし、参考として、愛玩動物用飼料中の油脂が酸化して生成した過酸化物が全てステアリン酸2個及びオレイン酸1個と仮定した場合、チオ硫酸ナトリウムによる滴定の反応式から過酸化物価を物質量に換算する方法で本法について仮に計算した場合、ドライ製品及びセミドライ製品におけるHorRatはそれぞれ2.0以上となった。過酸化物価は、本共同試験の解析手段として引用できる適当な方法がないことから、今後、過酸化物価を評価する新たな知見が得られた際に、再度共同試験を実施する等により再評価する必要があると考えられた。

Table 8 Collaborative study results of acid value

Lab. No.	Pet food types			
	Dry type		Semi-Dry type	
	(mg KOH/g-oils)		(mg KOH/g-oils)	
1	7.200	7.162	7.620	7.624
2	6.818	6.762	6.621	6.401
3	6.771	6.582	6.752	6.385
4	6.706	6.680	6.457	6.457
5	6.965	6.975	6.815	6.882
6	6.555	6.556	5.631	6.208
7	6.871	6.734	6.660	6.506
8	7.073	7.236	6.890	6.891
9	7.005	6.935	6.849	6.910
10	7.023	7.049	6.502	6.730
11	6.720	6.961	6.248	6.371
12	6.935	6.804	6.147	6.147
Mean value ^{a)} (mg KOH/g-oils)	6.878		6.613	
Free fatty acids (as oleic) ^{b)} (%)	3.460		3.326	
Crude fat content ^{c)} (%)	12.3		7.6	
RSD _f ^{d)} (%)	1.2		2.4	
RSD _R ^{e)} (%)	2.9		6.7	
PRSD _R ^{f)} (%)	4.5		4.9	
HorRat	0.64		1.4	

a) $n=24$

b) Acid value $\times 0.503$

c) $n=5$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of repeatability between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 9 Collaborative study results of peroxide value (meq/kg)

Lab. No.	Pet food types			
	Dry type (meq/kg)		Semi-Dry type (meq/kg)	
1	29.31	31.45	2.911	2.890
2	30.00	30.15	3.015	3.015
3	32.64	30.67	4.066	3.880
4	42.93	42.93	12.24 ^{a)}	13.77 ^{a)}
5	31.29	31.89	3.405	3.731
6	32.47	32.99	3.843 ^{b)}	3.048 ^{b)}
7	37.77	38.24	5.205	5.205
8	33.23	33.52	3.677	3.742
9	32.55	33.97	4.494	4.521
10	32.81	32.06	3.902	3.813
11	31.27	35.34	4.080	4.236
12	35.92	40.18	4.322	4.010
Mean value ^{c)} (meq/kg)	33.98		3.906	
RSD _r ^{d)} (%)	4.1		3.0	
RSD _R ^{e)} (%)	12		18	

a) Data excluded by Cochran test of the first round

b) Data excluded by Cochran test of the second round

c) Dry type: $n=24$; Semi-Dry type: $n=20$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of repeatability between laboratories

4 まとめ

愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中の油脂の酸価及び過酸化値の測定法について CERI 法を基に検討し、愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否について検討したところ、油脂試料の調製時における吸引ろ過でガラス繊維ろ紙を使用し、かつ初めに振とう抽出後の抽出液の上澄みのみを吸引ろ過した後、共栓三角フラスコの残さに最初の半量の石油エーテルを加え、残さを含めて吸引ろ過することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) ドライ製品（犬用及び猫用）各 2 種類、セミドライ製品 2 種類を用い、酸価及び過酸化値の定量値を確認した結果、酸価の繰返し精度は、相対標準偏差（RSD_r）として 4.6 %、過酸化値の繰返し精度は、相対標準偏差（RSD_r）として 10 %であった。
- 2) ドライ製品（犬用）を用いて中間精度を確認した結果、酸価は相対標準偏差（RSD_r）として 4.3 %、過酸化値は相対標準偏差（RSD_r）として 6.7 %であった。
- 3) 酸価について、ドライ製品及びセミドライ製品を用いて本法に従い 12 試験室において共同試験を実施したところ、良好な結果を得た。
- 4) 過酸化値について、本法に従い 12 試験室において共同試験を実施したところ、ドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 4.1 % 及び 12 % であった。また、セミドライ製品では、繰返し精度及び室間再現精度は RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 3.0 % 及び 18 % であった。現時点で、過酸化値の解析結果を評価する適当な方法がないことか

ら、今後新たな知見が得られた際、再評価する必要があると考えられた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター名古屋支所，一般財団法人マイコトキシン検査協会，一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所，JA 東日本くみあい飼料株式会社本社品質安全部，協同飼料株式会社研究所，全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，省令第 1 号 (2009).
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 3) 一般財団法人化学物質評価研究機構：平成 23 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 (2013).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて，平成 19 年 11 月 15 日，食安発第 1115001 号 (2007).
- 5) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 6) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA
- 7) 日本工業規格 JIS K 0070-1992：化学製品の酸価，けん化価，エステル価，よう素価，水酸基価及び不けん化物の試験方法 (1992).
- 8) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).