

7 全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料中の粗脂肪の測定法の追加検討及び共同試験

鈴木 知華*

Additional Consideration and Collaborative Study of Measurement Method of Crude Fat in Dried Whole Milk and Formula Feed Including Dried Whole Milk

Chika SUZUKI*

(* Sendai Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

This paper presents the result of a collaborative study I have conducted for validating the measurement of crude fat in dried whole milk for feed and formula feed including dried whole milk.

A sample was transferred into a tall beaker, added hydrochloric acid (4:1), and heated in a water bath of 70 °C to 80 °C for 1 hour. The mixture was then transferred to a separating funnel, and the liberated fat was extracted with diethyl ether. Having washed diethyl ether layer with water, the diethyl ether was evaporated. The residue was dried, and the crude fat was weighed.

A collaborative study was conducted by twelve laboratories using dried whole milk, formula feed for suckling pigs, milk replacers for suckling calves, and milk replacers for suckling calves and suckling pigs. The resulting repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were less than 2.0 % and less than 4.1 % respectively. The HorRat were less than 2.0.

This method was thus validated as useful for inspection of crude fat in dried whole milk for feed and formula feed including dried whole milk.

Key words: crude fat; acid hydrolysis and ether extraction method; dried whole milk; collaborative study

キーワード：粗脂肪；酸分解ジエチルエーテル抽出法；全脂粉乳；共同試験

1 緒 言

飼料中の粗脂肪の測定法としては、飼料分析基準¹⁾に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（以下「酸分解法」という。）が収載されており、現在全脂粉乳については前者の適用となっている。しかし、全脂粉乳及び全脂粉乳を主原料とする配合飼料においてジエチルエーテル抽出法では十分に粗脂肪が抽出されないことが飼料製造業者から示唆され、酸分解法の適用拡大又は分析法の改良が要請されている。一方、全脂粉乳中の脂肪の測定法としては、アルカリ加水分解を行うレーゼ・ゴットリーブ法（以下「RG法」という。）がAOAC INTERNATIONAL²⁾等の国際的な標準分析法として広く用いられており、我が国の乳及び乳製品の成分規格等に関する省令³⁾にも収載されている。このため、平成29年度に鈴木らは、全脂粉乳及び全脂粉乳を原料とする配合飼料を用い、RG法及び酸分解法の二法間の測定値の同等性及び二法の適用性の検討を行った⁴⁾。その結果、RG法に対する酸分解法の測定値の比は1.001~1.041であり、有意水準5%で二方法間の測定値に有意な差が認められた。酸分解法がRG法よりも高い測定値を示した原因は、分解物

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

が水とともにエーテル層に混入しているためと考えられたことから、平成30年度に安田らは、酸分解法のエーテル層を洗浄する水の量を20 mL から60 mL で3回に変更した方法（以下「酸分解改良法」という。）とRG法の比較検討を行い、二方法間の測定値に有意な差が認められないことを確認した⁵⁾。

今回、前回とは異なる全脂粉乳を原料とする数種の配合飼料を用いて、追加で酸分解改良法とRG法の比較検討を実施するとともに、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 追加検討

2.1.1 試料

1 mm の網ふるいを通過した3種類の全脂粉乳を含む配合飼料を用いた。

なお、検討に用いた配合飼料をTable 1に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pigs	Grains	2	Wheat flour, dextrin, starch, potato starch
	Oil seed meal	2	Wheat gluten enzyme degradation
	Animal products	76	Dried skim milk, dried whole milk, whey protein concentrate, casein
	Others	20	Glucose, vegetable oil, fructose, lactose, yeast extracts, calcium carbonate, lecithin, silicate, bread yeast, licorice extracts, dry yeast cell wall, egg powder, stevia, <i>Bacillus coagulans</i> , oligosaccharide, dextran fermentation by-product concentrate, silicic anhydride, bentonite, citric acid, lactic acid, feed yeast, medium chain fatty acid calcium, milk thistle extracts, <i>Saccharomyces cerevisiae boulardii</i> , vegetable hardened oil, feed additives
For milk replacer for suckling calves 1	Grains	3	Dextrin, potato starch, corn starch
	Animal products	65	Dried skim milk, dried whole milk, whey protein concentrate, casein
	Others	32	Vegetable oil, lactose, silicic anhydride, lecithin, licorice extracts, brewers yeast, bread yeast, egg powder, lactoferrin concentrate, glucose, stevia, salt, calcium carbonate, zeolite, lactic acid bacteria, butyric acid bacteria, oligosaccharide, saccharification bacteria, natural aluminum silicate, galacto-oligosaccharide, garlic powder, cumin powder, thyme, licorice powder, feed additives
For milk replacer for suckling calves and suckling pigs	Grains	1	Dextrin, potato starch, corn starch
	Animal products	88	Whey protein concentrate, dried whole milk, dried skim milk, casein
	Others	11	Vegetable oil, lactose, egg powder, licorice extracts, brewers yeast, bread yeast, glucose, stevia, calcium carbonate, zeolite, lactic acid bacteria, butyric acid bacteria, oligosaccharide, saccharification bacteria, lecithin, silicic anhydride, natural aluminum silicate, galacto-oligosaccharide, feed additives

2.1.2 試薬

- アンモニア水（質量分率 28 %），エタノール，塩酸，ジエチルエーテル，石油エーテル及びフェノールフタレインは特級を用いた。水は Elix Essential 5（Merck Millipore 製）により精製した精製水（JIS K 0557 の A3 に分類される水）を用いた。

2) フェノールフタレイン試液

フェノールフタレイン 1 g をエタノールに溶かして 100 mL とした。

2.1.3 測定方法

1) RG 法

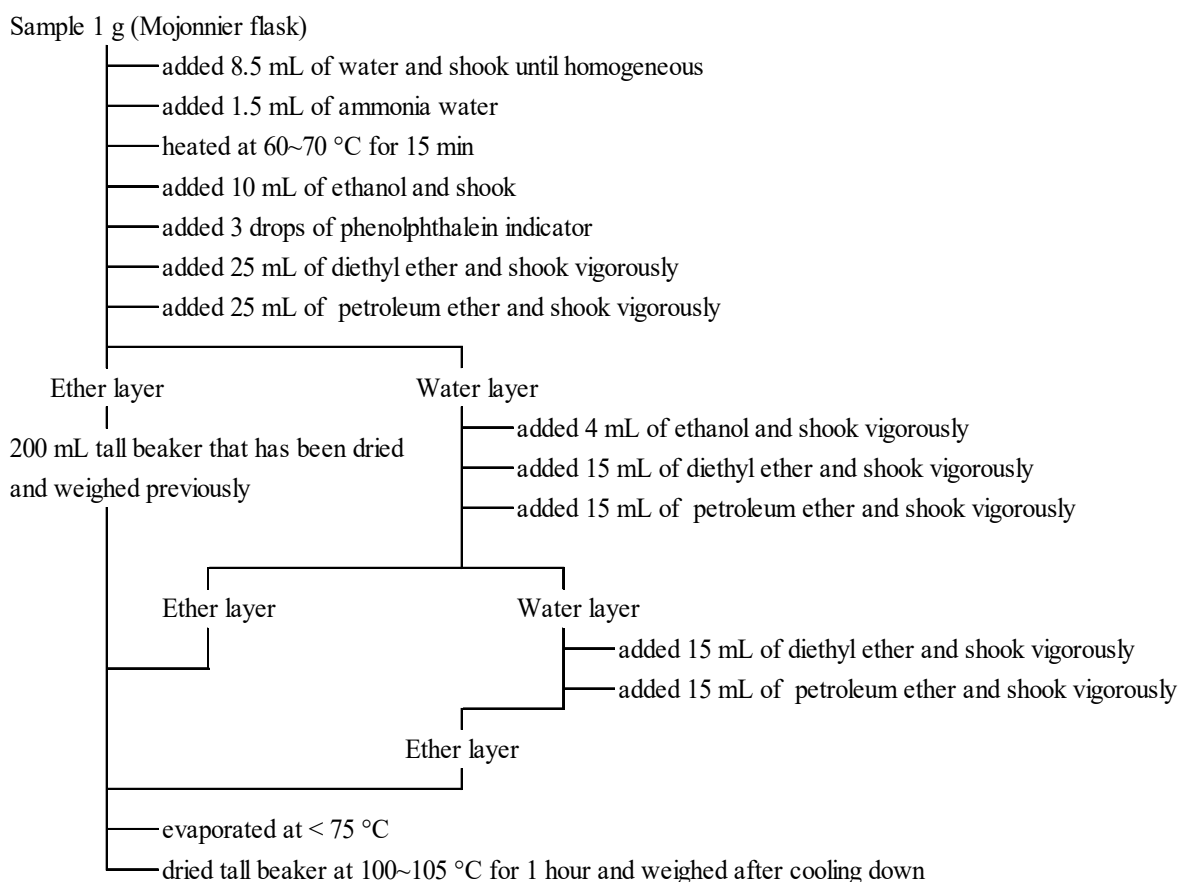
分析試料 1 g を正確に量ってマジョニア管に入れ、水 8.5 mL を加え、加温しながら振り混ぜて試料を溶かした後、アンモニア水 1.5 mL を加え、60~70 °C の水浴中でときどき振り混ぜながら 15 分間加熱した後放冷した。

エタノール 10 mL を加えて振り混ぜた後、フェノールフタレイン試液 3 滴及びジエチルエーテル 25 mL を加え、手で 1 分間激しく振り混ぜた。さらに、石油エーテル 25 mL を加え、同様に振り混ぜた後静置し、上層（ジエチルエーテル・石油エーテル層）を 200 mL のトールビーカー（あらかじめ 100~105 °C で 1 時間乾燥し、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）に入れた。

マジョニア管にエタノール 4 mL を加え、手で 15 秒間激しく振り混ぜた。ジエチルエーテル 15 mL を加え、1 分間激しく振り混ぜ、更に石油エーテル 15 mL を加え、同様に振り混ぜた後静置し、上層を先のトールビーカーに加える操作を 2 回行った。

次に、先のトールビーカー内の溶媒を 75 °C 以下で除去し、100~105 °C で 1 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り、試料中の粗脂肪量を算出した。

なお、測定法の概要を Scheme 1 に示した。

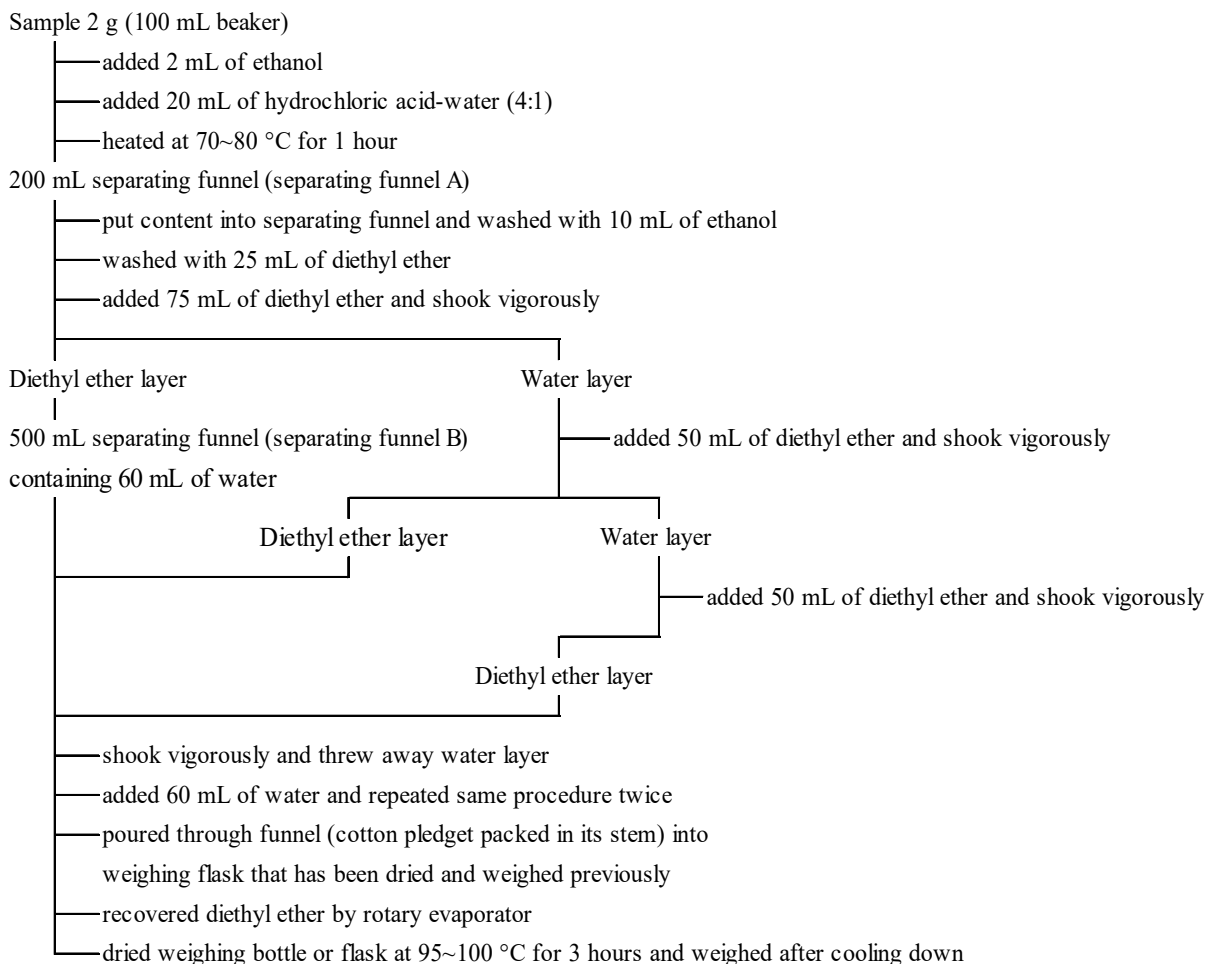


Scheme 1 Measurement procedure (Rose-Gottlieb method)

2) 酸分解改良法

飼料分析基準第3章3.2の方法から、エーテル層を洗浄する水の量を20 mLで3回から60 mLで3回に変更した。また、これに伴いエーテル層洗浄操作に用いる分液漏斗Bは、500 mL容のものに変更した。

なお、測定法の概要をScheme 2に示した。



Scheme 2 Measurement procedure
(Acid hydrolysis-ether extraction method (modified method))

2.2 共同試験

2.2.1 試料

1 mmの網ふるいを通過した全脂粉乳2種類及び全脂粉乳を原料とする配合飼料4種類を約3gずつ小分けしたもの（試料名は非明示）各2袋を試験用試料として計12袋を各試験室に配付した。

なお、試験に用いた配合飼料は2.1.1及びTable 2に示したものをを用いた。

Table 2 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For milk replacer	Animal products	95	Dried whole milk, dried skim milk
for suckling calves 2	Others	5	Glucose, dry yeast cell wall, lactic acid bacteria

2.2.2 試薬

エタノール、塩酸、ジエチルエーテル及び硫酸ナトリウム（無水）は特級又はこれ以上のものを用いた。水は JIS K 0557 の A3 に分類される精製水又はこれ以上のものを用いた。

2.2.3 分析試料

非明示の 2 点反復で、2.2.1 の試験用試料を用い、各 2.00 g を量り分析試料とした。

2.2.4 測定方法

2.1.3 の 2) によった。

2.2.5 報告方法

2.2.3 の分析試料 12 点の分析値は、分析試料中濃度 (%) で表し、5 桁目を四捨五入して有効桁数 4 桁まで報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

令和元年 12 月 23 日から令和 2 年 1 月 31 日まで

2.2.7 解析方法

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^{6), 7)}を参考に、Cochran 検定、single Grubbs 検定及び paired Grubbs 検定を行い、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_f) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し、得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式⁸⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター、日清丸紅飼料株式会社総合研究所検査グループ、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大阪支所、日本農産工業株式会社品質保証部品質管理グループ、フィード・ワン株式会社研究所、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）

3 結果及び考察

3.1 追加検討

全脂粉乳及び全脂粉乳を含む配合飼料について、鈴木らが行った酸分解法及び RG 法による測定値を比較した結果は、酸分解法が RG 法よりも高い測定値を示し、測定値に有意な差が認められた⁴⁾。この原因として、酸分解法では分解物が水とともにエーテル層に混入しているためと考えられたことから、安田らは酸分解法のエーテル層を洗浄する水の量を 2.1.3 の 2) に示した酸分解改良法のとおり変更し、RG 法との比較検討を行った。その結果、測定値に有意な差は認められなかった⁵⁾。

安田らが検討に用いた配合飼料はいずれも全脂粉乳を主原料とし、粗脂肪を約 20 % 含む配合飼料であったが、今回、全脂粉乳の配合割合が異なる、粗脂肪を約 10 % から 30 % 含む 3 種類の

配合飼料を用いて、酸分解改良法と RG 法との比較検討を行った。

その結果は Table 3 のとおり、RG 法及び酸分解改良法による測定値について *t*-検定を行った結果はそれぞれ $p = 0.319$, 0.429 及び 0.122 であり、有意水準 5 % で二方法間の測定値に有意な差は認められなかった。

よって、RG 法及び酸分解改良法のいずれも飼料分析基準への適用が可能であると考えられるが、既に飼料分析基準に記載され、国内の飼料分析に広く用いられている酸分解法を改良した酸分解改良法が、飼料分析基準への記載により適した方法であると考えられた。

Table 3 Content of crude fat measured by Rose-Gottlieb method and acid hydrolysis-ether extraction method (modified method) and *t*-test results

Sample types	Rose-Gottlieb method		Acid hydrolysis method (modified method)		Ratio of the measured value (acid hydrolysis method (modified method) /Rose-Gottlieb method)	<i>p</i> value	Significant difference
	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)			
Formula feed for suckling pigs	10.02	0.51	10.07	0.88	1.005	0.319	No
Formula feed for milk replacer for suckling calves 1	30.69	0.03	30.75	0.30	1.002	0.429	No
Formula feed for milk replacer for suckling calves and suckling pigs	18.14	0.34	18.07	0.19	0.996	0.122	No

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 共同試験

酸分解改良法の室間再現精度を確認するため、2.2 により共同試験を実施した。

結果は Table 4-1及び4-2のとおりであった。全脂粉乳1, 全脂粉乳2, ほ乳期子豚育成用配合飼料, ほ乳期子牛育成用代用乳用 1, ほ乳期子牛育成用代用乳用 2及びほ乳期子牛育成用代用乳用・ほ乳期子豚育成用配合飼料について、それぞれ RSD_rは2.0, 0.73, 0.94, 1.1, 1.2及び1.7%, RSD_Rは3.8, 1.2, 4.1, 3.1, 2.7及び3.0%, HorRat は2.0, 0.62, 1.5, 1.7, 1.2及び1.3であり、AOAC の共同試験に関するガイドライン⁷⁾に定められた室間再現精度の目標値 ($0.5 < \text{HorRat} \leq 2$) を満たしていた。HorRat については、1.5を超えるものが散見されたが、安定した測定値を得るにはある程度試験に慣れる必要があり、多くの試験室が本法を実施した経験がないことが原因として考えられた。

Table 4-1 Collaborative study for crude fat (1)

Lab. No.	Dried whole milk 1		Dried whole milk 2		Formula feed for suckling pigs	
	(%)		(%)		(%)	
1	27.05	26.64	25.82	25.87	10.12 ^{a)}	10.67 ^{a)}
2	26.84	26.86	25.70	25.74	10.19	10.28
3	26.77	26.92	26.15	26.31	10.00	10.13
4	25.32 ^{c)}	25.49 ^{c)}	25.23	24.99	11.03	11.21
5	27.18	26.33	26.02	25.66	10.21	10.41
6	24.39 ^{d)}	25.64 ^{d)}	23.59 ^{b)}	24.37 ^{b)}	9.835	9.765
7	27.08	26.97	25.91	25.77	9.930	9.932
8	26.76	26.92	25.74	25.95	10.52	10.28
9	26.86	26.78	25.59	25.42	10.40	10.23
10	26.98	26.96	25.59	25.51	10.00	9.905
11	25.13 ^{d)}	23.24 ^{d)}	25.74	25.44	10.36	10.29
12	27.09	26.60	26.14	25.53	9.520	9.522
No. labs ^{e)}	12		11		11	
No. outliers ^{f)}	0		1		1	
Mean value (%)	26.37		25.72		10.18	
RSD _r ^{g)} (%)	2.0		0.73		0.94	
RSD _R ^{h)} (%)	3.8		1.2		4.1	
PRSD _R ⁱ⁾ (%)	1.9		2.0		2.8	
HorRat	2.0		0.62		1.5	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Not excluded by single Grubbs test, as more than 2/9 of the laboratories flagged for removal.

d) Not excluded by paired Grubbs test, as more than 2/9 of the laboratories flagged for removal.

e) Number of laboratories retained after eliminating outliers

f) Number of outlier laboratories removed in parentheses

g) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

h) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 4-2 Collaborative study for crude fat (2)

Lab. No.	Formula feed for milk replacer for suckling calves 1		Formula feed for milk replacer for suckling calves 2		Formula feed for milk replacer for suckling calves and suckling pigs	
	(%)		(%)		(%)	
1	30.69	31.00	19.63	20.41	18.11	18.05
2	30.47	30.33	19.90	19.95	18.02	17.91
3	32.58	32.93	19.40	19.35	20.99 ^{a)}	21.78 ^{a)}
4	31.17	32.03	20.03	19.90	17.49	16.90
5	30.86	30.53	19.54	19.78	18.27	18.42
6	29.71	29.10	18.67	18.55	17.30	17.37
7	30.04	30.33	19.38	19.89	18.45	18.15
8	30.73	30.45	20.72	20.16	18.32	17.53
9	30.06	30.02	20.01	19.97	17.56	17.63
10	30.55	30.57	20.07	19.92	18.16	18.13
11	29.33	29.89	18.82	18.93	16.61	17.56
12	30.43	29.43	19.66	19.72	18.65	18.42
No. labs ^{b)}	12		12		11	
No. outliers ^{c)}	0		0		1	
Mean value (%)	30.55		19.68		17.86	
RSD _r ^{d)} (%)	1.1		1.2		1.7	
RSD _R ^{e)} (%)	3.1		2.7		3.0	
PRSD _R ^{f)} (%)	1.8		2.3		2.4	
HorRat	1.7		1.2		1.3	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Number of laboratories retained after eliminating outliers

c) Number of outlier laboratories removed in parentheses

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

4 まとめ

全脂粉乳を原料とする配合飼料を用いた RG 法及び酸分解改良法の比較検討を追加で実施するとともに、酸分解改良法の共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) RG 法及び酸分解改良法による測定値について t -検定を行った結果、測定値に有意な差は認められなかった。
- 2) 全脂粉乳及び全脂粉乳を原料とする配合飼料を用いて 12 試験室において酸分解改良法の共同試験を実施したところ、AOAC の共同試験に関するガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，日清丸紅飼料株式会社総合研究所検査グループ，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大阪支所，日本農産工業株式会社品質保証部品質管理グループ及びフィード・ワン株式会社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) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, AOAC official method 932.02 fat (crude) or ether extract in dried milk products. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 3) 厚生省令：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令，昭和 26 年 12 月 27 日，厚生省令第 52 号 (1951).
- 4) 鈴木 知華，安田 紗紀恵：全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料中の粗脂肪の測定法の開発，飼料研究報告，**43**，17-21 (2018).
- 5) 安田 紗紀恵，鈴木 知華，沼田 歩美：全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料中の粗脂肪の測定法の開発，飼料研究報告，**44**，49-56 (2019).
- 6) Willian Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, Pure & Appl. Chem., **67**(2), 331-343 (1995).
- 7) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 8) Michael Thompson: 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).