

## 技術レポート

## 2 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

安田 紗紀恵<sup>\*1</sup>, 鈴木 知華<sup>\*2</sup>, 沼田 歩美<sup>\*1</sup>Development of Crude Fat Measurement Method in Dried Whole Milk  
and Dried Whole Milk-Based Formula FeedSakie YASUDA<sup>\*1</sup>, Chika SUZUKI<sup>\*2</sup> and Ayumi NUMATA<sup>\*1</sup>(\*<sup>1</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),<sup>\*2</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Sendai Regional Center, FAMIC))

We have investigated the applicability of Rose-Gottlieb (RG) method and acid hydrolysis and ether extraction (AH/EE) method for the measurement of crude fat in dried whole milk for feed and formula feed mainly composed of dried whole milk.

In the AH/EE method, a sample was transferred into a tall beaker, dissolved in 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 liquid-liquid extracted with diethyl ether. Having washed diethyl ether layer with water, the diethyl ether was evaporated. In the improved AH/EE method, we changed the amount of water for washing the diethyl ether layer from 20 mL to 60 mL. The residue was dried at 95 °C to 100 °C for 3 hours, and the crude fat was weighed.

In order to improve the operability of the RG method, we changed the container of extraction from a Majonnier flask to a separating funnel. A sample was transferred into a tall beaker, added with 8.5 mL of water and 1.5 mL of 28 v/v% ammonia water, and heated in a water bath of 60 °C to 70 °C for 15 minutes. The mixture was then transferred into a separating funnel. The tall beaker was washed with ethanol, diethyl ether and petroleum ether. Then the cleaning solution was transferred into the separating funnel for liquid-liquid extraction by shake. Subsequently, diethyl ether and petroleum ether layer were transferred into another tall beaker and evaporated. The residue was dried at 100 °C to 105 °C for 1 hour, and weighed as crude fat.

RG and improved AH/EE methods were applied to dried whole milk, formula feed mainly composed of dried whole milk, and reference material respectively. A comparative study of measured values of these methods was subsequently conducted. The result of the *t*-test was: *t* (8) = 0.448 and *p* = 0.666, which did not indicate any significant differences.

We also made the similar comparison between measured values which had been acquired by two different RG methods: the one using a Majonnier flask and the other using a separating funnel, both of which had been applied to the same materials mentioned above. The result of the *t*-test was: *t* (6) = 2.153 and *p* = 0.075, which did not indicate any significant differences.

Key words: crude fat; Rose-Gottlieb method; acid hydrolysis and ether extraction method; dried whole milk

<sup>\*1</sup> 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<sup>\*2</sup> 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

キーワード：粗脂肪；レーゼ・ゴットリーブ法；酸分解ジエチルエーテル抽出法；全脂粉乳

## 1 緒 言

飼料中の粗脂肪の測定法としては、飼料分析基準<sup>1)</sup>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 INTERNATIONAL<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>（以下「乳等省令」という。）にも収載されている。このため、平成 29 年度に鈴木らは、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<sup>4)</sup>。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ことは、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。そこで今回、酸分解法の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 回に変更した方法と RG 法の比較検討を行ったので、その概要を報告する。

また、RG 法で分析を行う際の操作性の向上を目的とし、脂肪抽出容器をマジョニア管から分液漏斗に変更が可能かどうかについても併せて検討を行ったので、その概要についても報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

1 mm の網ふるいを通過した 7 種類の全脂粉乳及び 3 種類の全脂粉乳を主原料とする配合飼料を用いた。また、粉乳標準物質は、公益社団法人日本分析化学会が販売し、脂質として RG 法により値付けされている粉末状の調製粉乳（付与値 19.26 g/100 g，不確かさ 0.95 g/100 g）を用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の例を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pigs 1	Animal products	98	Dried whole milk, whey protein concentrate, milk protein concentrate,
	Others	2	Dry yeast cell wall, lactic acid bacteria
For suckling pigs 2	Animal products	93	Dried whole milk, dried skim milk, dried whey,
	Others	7	Glucose, dry yeast cell wall, lactic acid bacteria, fructooligosaccharide syrup, silicon dioxide
For milk replacer for suckling calves	Animal products	95	Dried whole milk, dried skim milk,
	Others	5	Glucose, dry yeast cell wall, lactic acid bacteria

## 2.2 試 薬

- 1) 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 Milli-Q Integral 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．

## 2.3 測定方法

- 1) マジョニア管使用 RG 法（以下「マジョニア管 RG 法」という．）

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．

- 2) 分液漏斗使用 RG 法（以下「分液漏斗 RG 法」という．）

分析試料 1 g を正確に量って 100 mL のトールビーカーに入れ，水 8.5 mL を加え，ガラス棒でかき混ぜて試料を溶かした後，アンモニア水 1.5 mL を加えて時計皿で覆い，60~70 °C の水浴中でときどきかき混ぜながら 15 分間加熱した後放冷した．

先のトールビーカーの内容物を 200 mL の分液漏斗に入れ，トールビーカーをエタノール 10 mL で洗浄し，洗液を分液漏斗に加えて 1 分間激しく振り混ぜた後，フェノールフタレイン試液 3 滴を加えた．次に，ジエチルエーテル 25 mL でトールビーカーを洗浄し，洗液を分液漏斗に加え，1 分間激しく振り混ぜた．さらに，石油エーテル 25 mL でトールビーカーを洗浄し，洗液を分液漏斗に加え，同様に振り混ぜた後静置した．上層（ジエチルエーテル・石油エーテル層）を 5 mL の駒込ピペットでとり，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．

先の分液漏斗にエタノール 4 mL を加え，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合わせる操作を更に 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 2 に示した．

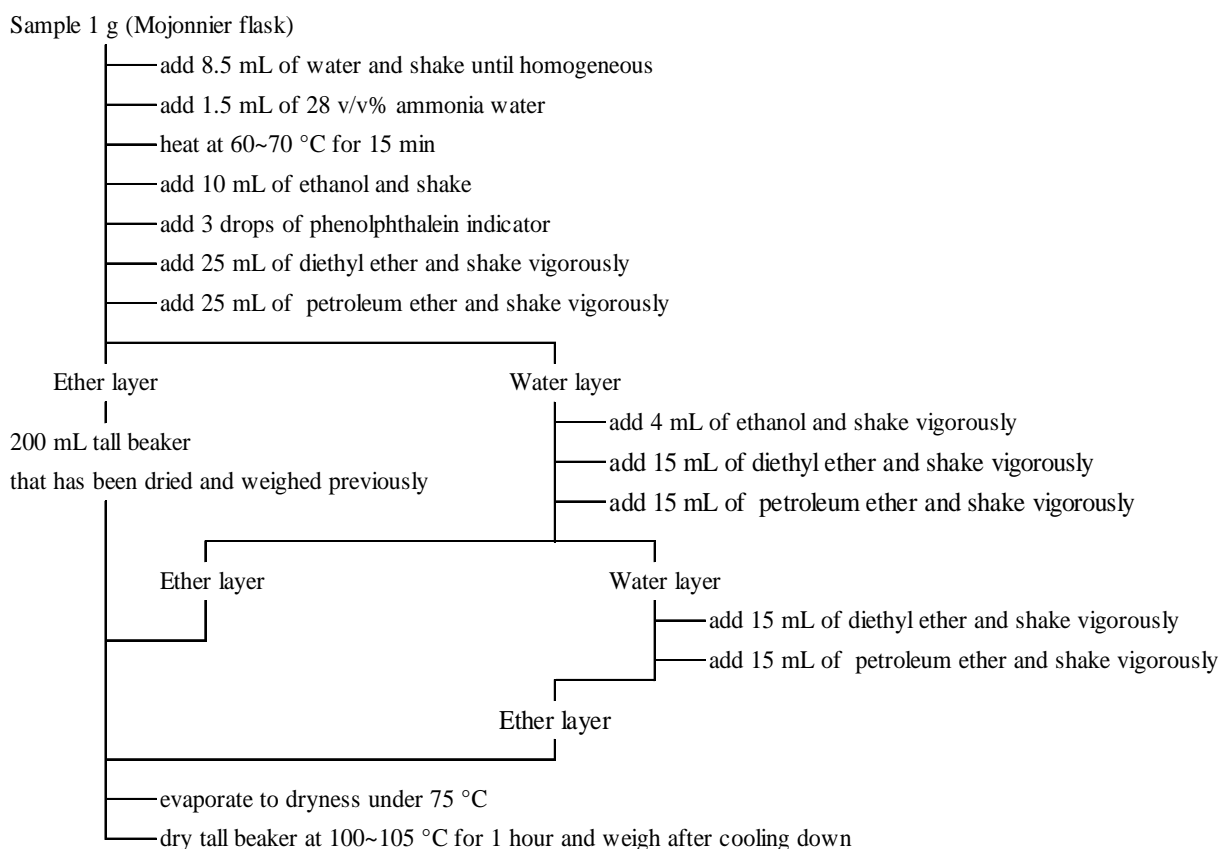
## 3) 酸分解法

飼料分析基準第3章 3.2の方法によった. エーテル層洗浄操作に用いる分液漏斗 B は, 規定どおり 300 mL 容のものを用いた.

## 4) 酸分解法の洗浄水量を増やした方法 (以下「酸分解改良法」という.)

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, 3) 及び 4) の測定法の概要を Scheme 3 に示した.



Scheme 1 Measurement procedure (Rose-Gottlieb method with Mojonnier flask)

Sample 1 g (100 mL beaker)

- add 8.5 mL of water and stir until homogeneous
- add 1.5 mL of 28 v/v% ammonia water
- heat at 60~70 °C for 15 min

200 mL separating funnel

- put content into 200 mL separating funnel
- wash the beaker with 10 mL of ethanol and put content into 200 mL separating funnel
- add 3 drops of phenolphthalein indicator
- wash the beaker with 25 mL of diethyl ether, put content into 200 mL separating funnel and shake vigorously
- wash the beaker with 25 mL of petroleum ether, put content into 200 mL separating funnel and shake vigorously

Ether layer

Water layer

200 mL tall beaker

that has been dried and weighed previously

Ether layer

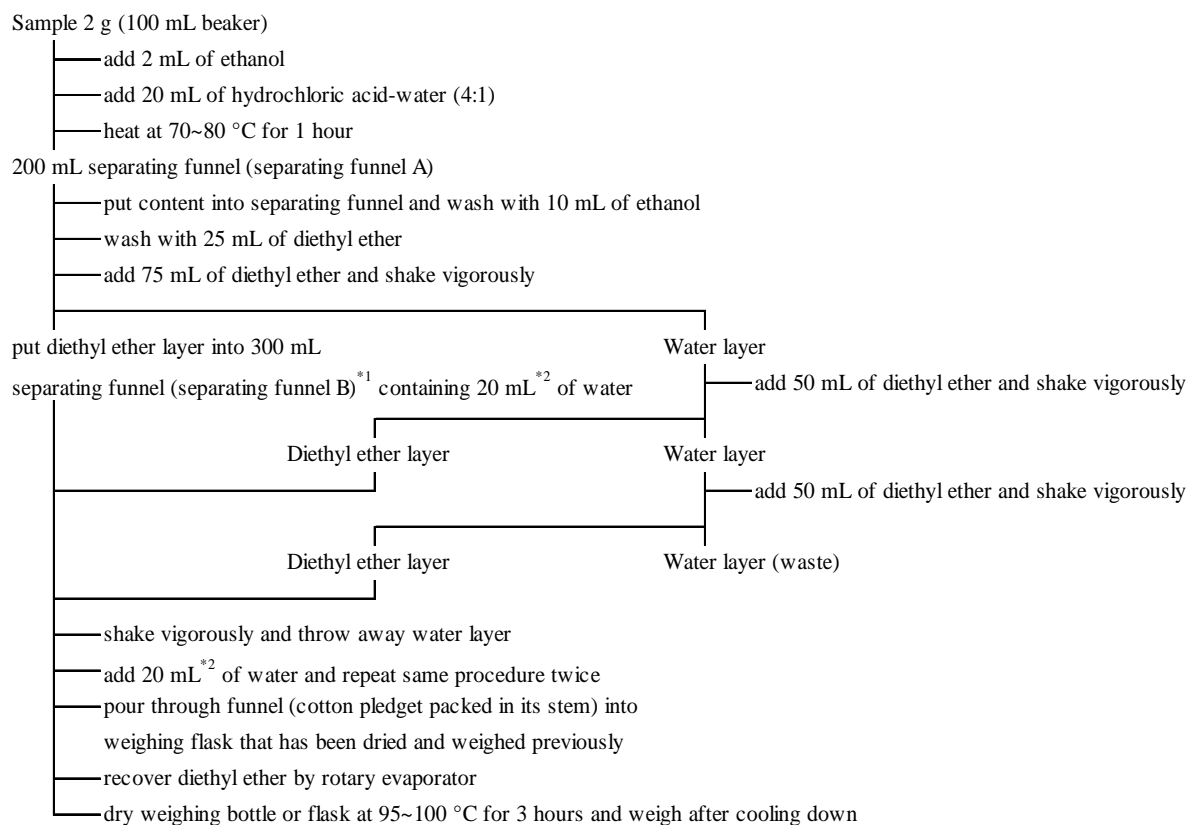
Water layer

Ether layer

- evaporate to dryness under 75 °C

- dry tall beaker at 100~105 °C for 1 hour and weigh after cooling down

Scheme 2 Measurement procedure (Rose-Gottlieb method with separating funnel)



\*1: use a 500 mL separating funnel in the improving method

\*2: wash the diethyl ether layer with 60 mL of water and repeat washing two more times

**Scheme 3** Measurement procedure (acid hydrolysis and ether extraction method and its improving method)

### 3 結果及び考察

#### 3.1 酸分解法のエーテル層洗浄水量の違いによる比較

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<sup>4)</sup>。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、酸分解法のエーテル層を洗浄する水の量を増やすことにより、残存する分解物を除去できないか確認することとした。そこで、洗浄する水の量を 2.3 の 4) に示した酸分解改良法のとおり変更し、Table 2 に示した 9 種類の試料の粗脂肪を RG 法及び酸分解改良法で測定して RG 法との比較検討を行った。

その結果は Table 2 のとおりであり、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、 $t(8) = 0.448$ ,  $p = 0.666$  であり、有意な差は認められなかった。この結果から、酸分解法のエーテル層の洗浄を水 20 mL で 3 回から水 60 mL で 3 回に変更することにより、酸分解法では除去できなかった分解物が除去されているものと考えられた。

Table 2 Content of crude fat measured by Rose-Gottlieb method and acid hydrolysis and ether extraction method (improving method)

Sample types	Rose-Gottlieb method		Acid hydrolysis method (improving method)		Ratio of the measured value (acid hydrolysis method (improving method) /Rose-Gottlieb method)
	Crude fat <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Crude fat <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	
Dried whole milk 3	26.55	0.2	26.46	0.1	0.997
Dried whole milk 5	25.90	0.2	25.97	1.0	1.003
Dried whole milk 6	26.32	0.2	26.55	0.5	1.009
Dried whole milk 7	25.43	0.0	25.43	0.3	1.000
Dried whole milk 8	25.83	0.2	25.76	0.1	0.997
Formula feed for suckling pigs 1	20.86	0.4	20.89	0.5	1.001
Formula feed for suckling pigs 2	20.01	0.2	20.01	1.2	1.000
Formula feed for milk replacer for suckling calves	20.63	0.1	20.62	0.9	0.999
Reference material	20.18	0.4	20.16	0.0	0.999

a) Mean ( $n = 3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.2 RG 法で使用する脂肪抽出容器の比較

鈴木らは、RG 法の脂肪抽出容器としてマジョニア管を使用した。分析法の適用性を広げるために、酸分解法と同様に脂肪抽出容器として分液漏斗を使用する 2.3 の 2) に示した分液漏斗 RG 法を検討した。7 種類の試料の粗脂肪をマジョニア管 RG 法及び分液漏斗 RG 法で測定し比較した結果は Table 3 のとおりであった。マジョニア管 RG 法及び分液漏斗 RG 法の測定値について  $t$ -検定を行った結果、 $t(6) = 2.153$ ,  $p = 0.075$  であり、有意な差は認められなかった。

Table 3 Rose-Gottlieb method with Majonnier flask and separating funnel

Sample types	Rose-Gottlieb method with Majonnier flask		Rose-Gottlieb method with separating funnel		Ratio of the measured value (Majonnier flask /separating funnel)
	Crude fat <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Crude fat <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	
Dried whole milk 1	25.46	0.1	25.31	0.2	1.006
Dried whole milk 3	26.55	0.2	26.50	0.2	1.002
Dried whole milk 4	26.43	0.2	26.14	0.2	1.011
Dried whole milk 5	25.90	0.2	25.87	0.2	1.001
Formula feed for suckling pigs 1	20.86	0.4	20.70	0.4	1.008
Formula feed for suckling pigs 2	20.01	0.2	20.11	0.2	0.995
Formula feed for milk replacer for suckling calves	20.63	0.1	20.46	0.1	1.009

以上の結果から、RG 法及び酸分解改良法の二法間の測定値は同等であると考えられた。また、RG 法で使用する脂肪抽出容器は、マジョニア管及び分液漏斗のいずれも使用可能であると考えられた。

これらのことから、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収載され、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、飼料分析基準への収載により適した方法であると考えられた。

#### 4 まとめ

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、RG 法及び酸分解法の同等性を確認したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 酸分解法のエーテル層の洗浄を水 20 mL で 3 回から水 60 mL で 3 回に変更することにより RG 法と同等の測定値が得られた。
- 2) 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、 $t(8) = 0.448$ ,  $p = 0.666$  であり測定値に有意な差は認められなかった。
- 3) RG 法について、マジョニア管を使用した場合と分液漏斗を使用した場合とを比較し  $t$ -検定を行った結果、 $t(6) = 2.153$ ,  $p = 0.075$  であり測定値に有意な差は認められなかった。
- 4) 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収載され、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、飼料分析基準への収載により適した方法であると考えられた。

#### 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.
- 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)。