

1 愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの液体クロマトグラフによる定量法の開発及び共同試験

杉本 泰俊^{*1}, 伊藤 紗織^{*2}, 桑原 正良^{*3}

Development and Collaborative Study of Determination Method of Sodium Nitrite in Pet Food by LC

Yasutoshi SUGIMOTO^{*1}, Saori ITOU^{*2} and Masayoshi KUWABARA^{*3}

(^{*1} Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

(Now Nagoya Regional Center, FAMIC),

^{*2} Kobe Regional Center, FAMIC (Now Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC),

^{*3} Kobe Regional Center, FAMIC)

We have developed a quantitative determination method the concentration of sodium nitrite in pet foods using a liquid chromatograph with ultraviolet (LC-UV), and conducted a collaborative study.

Sodium nitrite was extracted with ammonium acetate solution. The sample solution was deproteinized with zinc sulfate solution and sodium hydroxide solution before its filtration. The filtrate was further purified with a SPE mini-column (graphitized carbon cartridge, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into a LC-UV to determine the concentration of sodium nitrite. LC-UV separation was then carried out on a NH₂ column (Asahipak NH2P-50 4E, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm from Showa Denko K.K.; Tokyo, Japan) using phosphoric acid buffer as a mobile phase.

Recovery tests were conducted on eight kinds of pet foods. Dry food for cats, formed jerky for dogs and dried jerky for dogs (hard type) were added with 20 and 100 mg/kg of sodium nitrite respectively. Semi-dry food for dogs and dried jerky for cats (soft type) were added with 20 and 200 mg/kg of sodium nitrite respectively. Confectionery (biscuit) for dogs and milk powder for dogs were added with 20, 100 and 200 mg/kg of sodium nitrite respectively. Wet food for cats was added with 5, 30 and 100 mg/kg of sodium nitrite respectively. The resulting mean recoveries ranged from 92.4 % to 108 % for sodium nitrite. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 7.0 % for sodium nitrite.

A collaborative study was conducted by eleven laboratories using six kinds of pet foods, all of which were added with sodium nitrite according to the following specifications: 160 mg/kg for dry food for cats, 80 mg/kg for semi-dry food for dogs, 30 mg/kg for wet food for cats, 120 mg/kg for formed jerky for dogs, 50 mg/kg for confectionery (biscuit) for dogs, 20 mg/kg for milk powder for dogs. The resulting range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R), and HorRat, were 95.2 % to 102 %, less than 4.6 % and less than 7.6 %, and less than 0.93 respectively.

This method was thus validated and established as adequate for use in inspections of sodium nitrite in pet foods.

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 名古屋センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 肥飼料安全検査部

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

Key words: sodium nitrite; liquid chromatograph with ultraviolet (LC-UV); pet food; collaborative study

キーワード：亜硝酸ナトリウム；液体クロマトグラフ；愛玩動物用飼料；共同試験

1 緒 言

亜硝酸ナトリウムはヘモグロビン等に作用して、加熱等により変色しにくい赤色を呈するといった発色効果があり、国内においては食品添加物（発色剤）に指定され¹⁾、広く食肉加工品等に使用されている。また、ボツリヌス菌等の微生物の発育阻止作用も認められている。

国内における食品中の規制値²⁾は、亜硝酸根としての最大残存量として食肉製品及び鯨肉ベーコンで 0.070 g/kg、魚肉ソーセージ及び魚肉ハムで 0.050 g/kg 並びにいくら、すじこ及びたらこで 0.0050 g/kg とされている。愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムについては、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令³⁾において、亜硝酸ナトリウムとして 100 g/t の基準値が定められている。なお、飼料における基準値はない。

愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの定量法としては、甲斐⁴⁾及び杉村ら⁵⁾が検討した愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの分光光度計による定量法が既に愛玩動物用飼料等の検査法⁶⁾に記載されているが、アスコルビン酸等の還元物質を添加された愛玩動物用飼料では回収率が低下するという問題があり、また、粉ミルクは適用対象になっていない。

今回、一般財団法人日本冷凍食品検査協会が平成 27 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業において開発した液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）を用いた定量法⁷⁾（以下「冷食協法」という。）を基に、還元物質を添加された愛玩動物用飼料及び粉ミルクにも適用可能な分析法を開発するとともに、共通試料を用いた共同試験を実施し、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 分析法開発

2.1.1 試 料

愛玩動物用飼料（ドライ製品（猫用）、セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ（犬用）及びソフトタイプ（猫用））、菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（犬用））は 1 mm 以下になるまで粉砕（粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクを除く。）した。なお、ジャーキーで有姿のままでは粉砕が困難な試料は、はさみ等を用いて裁断したのち粉砕した。愛玩動物用飼料（ウェット製品（猫用））はフードプロセッサで粉砕した。

なお、検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Composition of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry food for cats	Brans (wheat bran, rice bran), beans (soybean meal), starches (tapioca), vegetable protein extracts (corn gluten meal), meats (poultry byproduct), oils and fats (chicken oil, vegetable oil), fishes (bonito meal), yucca extracts, vegetables (dried carrot, broccoli powder), minerals (Fe, Mn, Zn, K, Co, Na, Ca, Cl, Se), amino acids (DL-methionine, taurine), vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , niacin, pantothenic acid, V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. C, biotin, folic acid, choline), coloring (food yellow no. 5, food blue no. 1), antioxidant (mixed tocopherol)
Semi-dry food for dogs	Grains (wheat flour, etc.), meats (chicken, etc.), sugars, potatoes (sweet potato, etc.), vegetables (carrot, pumpkin, spinach, etc.), minerals (P, Na, Ca, Mg, K, Fe, Zn, Cu, Mn, I), quality preservation agent (propylene glycol), thickening agent (glyceline), preservative (potassium sorbate), amino acids (L-lysine hydrochloride), vitamins (choline, V. E, V. C, niacin, pantothenic acid, V. A, V. B ₆ , V. B ₁ , V. B ₂ , folic acid, V. B ₁₂ , V. D), pH adjuster, antioxidant (sodium erythorbate, mixed tocopherol, rosemary extracts), coloring (titanium dioxide, food yellow no. 5, food red no. 106, food yellow no. 4, food blue no. 1)
Wet food for cats	Bonito, chicken, oligosaccharide, minerals (Ca, Cu, Mn, Zn), vitamins (V. A, V. E, V. K, V. B ₁ , V. B ₂ , folic acid, biotin)
Formed jerky for dogs	Meats (chicken, beef), wheat flour, defatted soybean, brans, vegetable oil, sorbitol, propylene glycol, minerals (Na), sodium polyphosphate, seasoning, antioxidant (potassium sorbate), pH adjuster, sodium metaphosphate, coloring (food red no. 102, food red no. 106, food yellow no. 5, food blue no. 1)
Dried jerky for dogs (hard type)	Deer meat
Dried jerky for cats (soft type)	Chicken (white meat), glycerin (humectants), propylene glycol (quality pretention agent), antioxidant (sodium sulfite)
Confectionery (biscuit) for dogs	Wheat flour, margarine, caster sugar, chicken egg, rice embryo and fermented soybean extracts, tree extracts, galacto-oligosaccharide, protein concentrated whey powder (dairy products), dried skim milk, milk oligosaccharide, vegetable oil, sweetener (D-sorbitol), calcium carbonate, green tea extract, antioxidant (V. E, rosemary extracts)
Milk powder for dogs	Milk protein, dextrin, animal fat, dried skim milk, vegetable oil, dietary fiber, glucose, bifidus bacteria for animal, dry yeast, chondroitin sulfate, glucosamin, DL-methionine, L-arginine, L-cystine, L-carnitine, milk oligosaccharide, pH adjuster, emulsifier, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. C, pantothenic acid, niacin, folic acid, biotin, choline, carotene), minerals (Ca, P, K, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I), inositol, nucleotide, flavour (butter, milk cream)

2.1.2 試 薬

- 1) 亜硝酸ナトリウム, アンモニア水 (質量分率 28%), 酢酸アンモニウム, 水酸化ナトリウム, 硫酸亜鉛七水和物, リン酸水素二ナトリウム十二水和物, リン酸二水素ナトリウム二水和物及び過塩素酸ナトリウム一水和物は特級を用いた. 水は Milli-Q Element A10 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.

2) 酢酸アンモニウム緩衝液

酢酸アンモニウム 80 g を水に溶かして 1 L とし、アンモニア水 (1+4) で pH を 9.0 に調整した。使用に際して、この液の一定量を水で 10 倍に希釈した。

3) 硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%)

硫酸亜鉛七水和物 178 g を水に溶かして 1 L とした。

4) 水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%)

水酸化ナトリウム 30 g を水に溶かして 100 mL とした。

5) リン酸緩衝液

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 1.79 g, リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.78 g 及び過塩素酸ナトリウム一水和物 14.04 g を水に溶かして 1 L とした。

6) 亜硝酸ナトリウム標準液

亜硝酸ナトリウム (105 °C で 4 時間乾燥したもの) 500 mg を正確に量って 500 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜硝酸ナトリウム標準原液を調製した (この液 1 mL は、亜硝酸ナトリウムとして 1 mg を含有する。) 。

使用に際して、標準原液の一定量をリン酸緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 µg を含有する各標準液を調製した。

2.1.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) フードプロセッサ : MK-K80 パナソニック製
- 3) グラファイトカーボンミニカラム : ENVI-Carb (充てん剤量 500 mg リザーバー容量 6 mL) Sigma-Aldrich 製
- 4) メンブランフィルター : HLC-DISK 13 水系 (孔径 0.45 µm) 関東化学製
- 5) LC : Prominence 島津製作所製

2.1.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 5 g を正確に量って 200 mL の首太全量フラスコに入れ、酢酸アンモニウム緩衝液 150 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C の水浴中で 10 分間静置した。続いて硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%) 20 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C の水浴中で 5 分間静置した。更に氷中で 5 分間静置した後、水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%) 2 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、10 分間静置した。首太全量フラスコの標線までリン酸緩衝液を加え、ろ紙 (5 種 C) でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液 5 mL 以上を試料溶液とした。

2) カラム処理

グラファイトカーボンミニカラムを水 5 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、自然流下させ、初めの流出液 3 mL を捨てた。10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 2 mL を受けた。

この液をメンブランフィルター (孔径 0.45 µm) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各亜硝酸ナトリウム標準液各 20 μ L を LC に注入しクロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

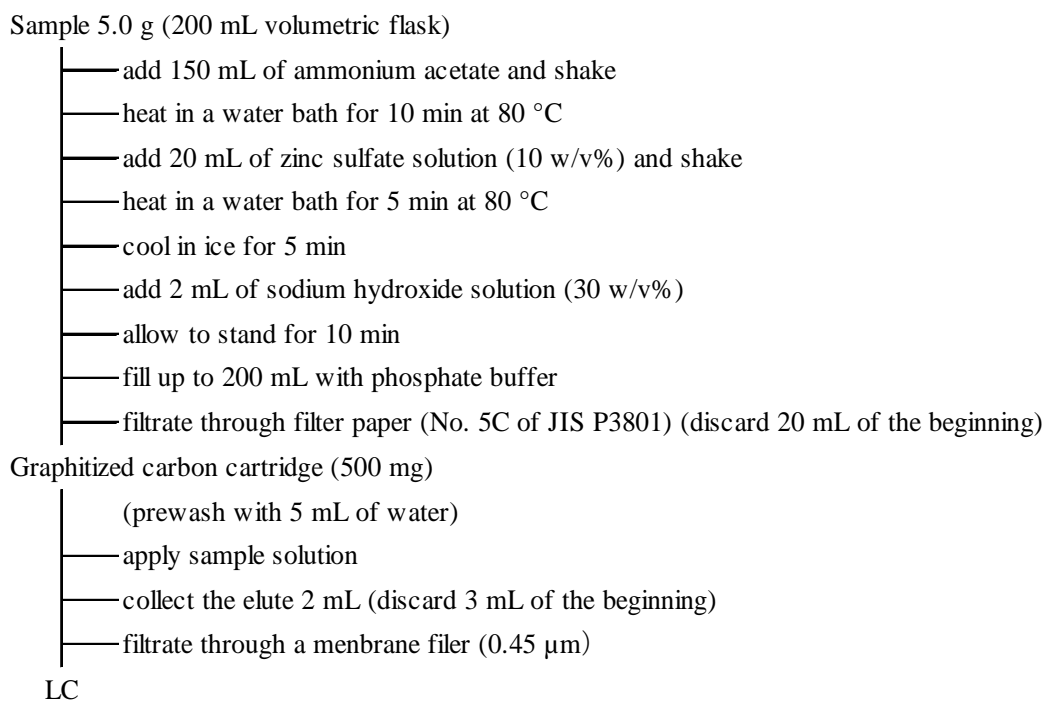
Table 2 Operating condition of LC

Column	Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μ m), Showa Denko K.K
Mobile phase	Phosphoric acid buffer
Flow rate	0.8 mL/min
Detector	UV detector (Wavelength: 220 nm)
Column temperature	40 $^{\circ}$ C

4) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の亜硝酸ナトリウム量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for sodium nitrite in pet foods

2.1.5 夾雑ピークの検討用溶液

1) ブランク溶液

試料を用いないで 2.1.4 の 1)及び 2)に従い調製した。

2) 酢酸アンモニウム/リン酸緩衝液

2.1.2 の 2)の酢酸アンモニウム緩衝液を 2.1.4 の 1)の試料溶液中の濃度と同じになるようにリン酸緩衝液で希釈した。

3) 硫酸亜鉛/リン酸緩衝液

2.1.2 の 3)の硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%) を 2.1.4 の 1)の試料溶液中の濃度と同じになるようにリン酸緩衝液で希釈した。

4) 水酸化ナトリウム/リン酸緩衝液

2.1.2 の 4)の水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%) を 2.1.4 の 1)の試料溶液中の濃度と同じになるようにリン酸緩衝液で希釈した。

5) ドライ製品/リン酸緩衝液

Table 1 のドライ製品 (猫用) 5.0 g を正確に量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ、リン酸緩衝液 250 mL で 20 分間振り混ぜて抽出した。抽出液をろ紙 (5 種 C) でろ過した後、ろ液の一定量をリン酸緩衝液で 50 倍に希釈した。

2.1.6 添加回収試験

2.1.2 の 6)の亜硝酸ナトリウム標準原液をリン酸緩衝液で正確に希釈し添加に用いた。

ドライ製品 (猫用)、成型ジャーキー (犬用) 及び素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用) について、20 及び 100 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 2.5 µg/mL)、セミドライ製品 (犬用) 及び素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (猫用) について、20 及び 200 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 5 µg/mL)、菓子類 (犬用ビスケット) 及び粉ミルク (犬用) について、20、100 及び 200 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5、2.5 及び 5 µg/mL)、ウェット製品 (猫用) について、5、30 及び 100 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.125、0.75 及び 2.5 µg/mL) になるように添加後よく混合し、直ちに 2.1.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

2.2 共同試験

2.2.1 共同試験用試料

2.1 の試料のうち、ドライ製品 (猫用)、セミドライ製品 (犬用)、ウェット製品 (猫用)、成型ジャーキー (犬用)、菓子類 (犬用ビスケット) 及び粉ミルク (犬用) について、約 6 g 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。

2.2.2 配付試薬

1) 亜硝酸ナトリウム標準原液

亜硝酸ナトリウム (105 °C で 4 時間乾燥したもの) 1000 mg を正確に量って 500 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜硝酸ナトリウム標準原液を調製した (この液 1 mL は、亜硝酸ナトリウムとして 2000 µg を含有する。) 。

2) 検量線作成用標準原液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 125 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までリン酸緩衝液を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 1000 µg を含有する検量線作成用標準原液を調製した。

3) ドライ製品添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 80 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 1600 µg を含有するドライ製品添加用標準液を調製した。

4) セミドライ製品添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 40 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 800 μg を含有するセミドライ製品添加用標準液を調製した。

5) ウェット製品添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 15 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 300 μg を含有するウェット製品添加用標準液を調製した。

6) 成型ジャーキー添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 60 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 1200 μg を含有する成型ジャーキー添加用標準液を調製した。

7) 菓子類添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 25 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 500 μg を含有する菓子類添加用標準液を調製した。

8) 粉ミルク添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 200 μg を含有する粉ミルク添加用標準液を調製した。

2)を 1 本及び 3)~8)を各 2 本、濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

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た。分析試料としては、亜硝酸ナトリウムとしてドライ製品（猫用）に 160 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対してドライ製品添加用標準液 0.5 mL 添加）を、セミドライ製品（犬用）に 80 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対してセミドライ製品添加用標準液 0.5 mL 添加）を、ウェット製品（猫用）に 30 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対してウェット製品添加用標準液 0.5 mL 添加）を、成型ジャーキー（犬用）に 120 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して成型ジャーキー添加用標準液 0.5 mL 添加）を、菓子類（犬用ビスケット）に 50 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して菓子類添加用標準液 0.5 mL 添加）を、粉ミルク（犬用）に 20 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して粉ミルク添加用標準液 0.5 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の直前に添加して調製した試料を用いた。

2.2.4 定量方法

2.1.4 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（mg/kg）で表し、4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

平成 31 年 1 月 7 日から平成 31 年 2 月 1 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^{8), 9)}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_r) 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¹⁰⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

JA 東日本くみあい飼料株式会社品質保証部分析・開発センター, ジーエルサイエンス株式会社, 一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター, 一般財団法人日本食品検査首都圏事業所, 一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所, 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 11 試験室)

3 結果及び考察

3.1 分析法開発

3.1.1 検量線

2.1.2 の 6)により調製した亜硝酸ナトリウム標準液各 20 µL を LC に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 1 のとおりであり、亜硝酸ナトリウムとして 0.1~10 µg/mL (注入量として 0.002~0.2 µg 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、亜硝酸ナトリウムを 4~400 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の亜硝酸ナトリウムの濃度範囲に相当する。

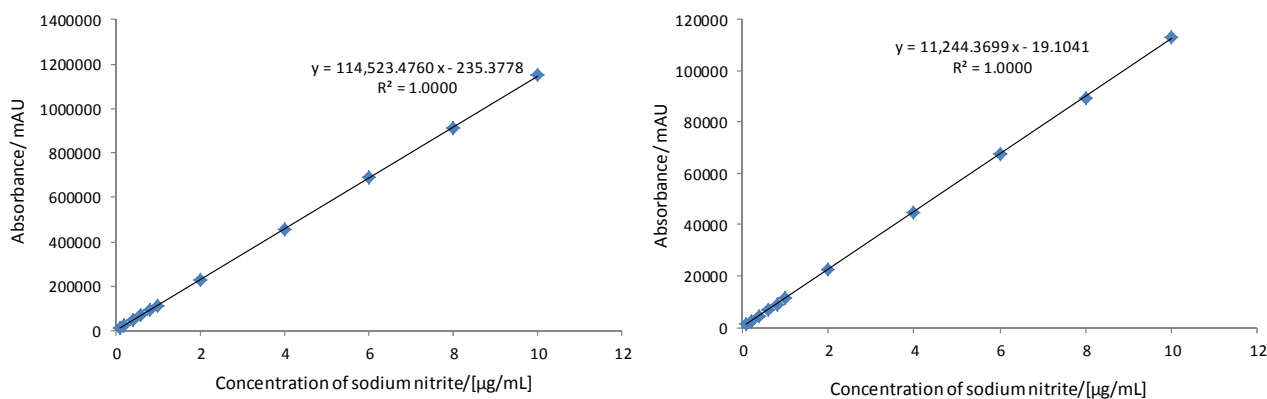


Fig. 1 Calibration curves of sodium nitrite by peak area (left) and peak height (right)

3.1.2 グラファイトカーボンミニカラムからの流出画分の確認

成型ジャーキー5.0 g を 2.1.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液に、亜硝酸ナトリウムとして 100 mg/kg 相当量を添加 (最終試料溶液中で 2.5 µg/mL 相当量) し、グラファイトカーボンミニカラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 3 のとおりであり、亜硝酸ナトリウムは流出液 2~8 mL の画分では 98.7 %以上の流出を認めた。このため、冷食協法と同様に初めの流出液 3 mL を捨て、その後の 2 mL を用いることとした。

Table 3 Elution pattern of sodium nitrite from graphitized carbon cartridge

Target	(%) ^{a)}			
	0~2 mL	2~4 mL	4~6 mL	6~8 mL
Sodium nitrite	26.0	98.7	99.8	99.9

$n = 1$

a) Quantitated concentration in sample solution after column treatment /
Concentration in sample solution before column treatment $\times 100$

3.1.3 妨害物質の検討

Table 1 の愛玩動物用飼料各 1 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC に注入し、得られたクロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても亜硝酸ナトリウムの定量を妨げるピークは認められなかった。なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

また、Fig. 2 の B~F では、保持時間の約 25~35 分頃に大きなピークが出現し、その後、吸光度がマイナスの値を示す挙動が確認された。このことについて、2.1.5 で調製した各溶液を LC に注入し、試料及び試薬類の有無によるクロマトグラムの違いについて確認した。その結果、Fig. 3 のとおり、ブランク溶液及び硫酸亜鉛/リン酸緩衝液の硫酸亜鉛を含む溶液でのみ同様の挙動が確認されたことから、この挙動を示す原因は試料溶液中に含まれる硫酸亜鉛に由来するものと示唆された。このため、本条件で試料溶液を測定する場合は、1 本あたりの測定時間を長くとり、この挙動が収まりクロマトグラムのベースラインが安定することを確認する必要があると考えられた。

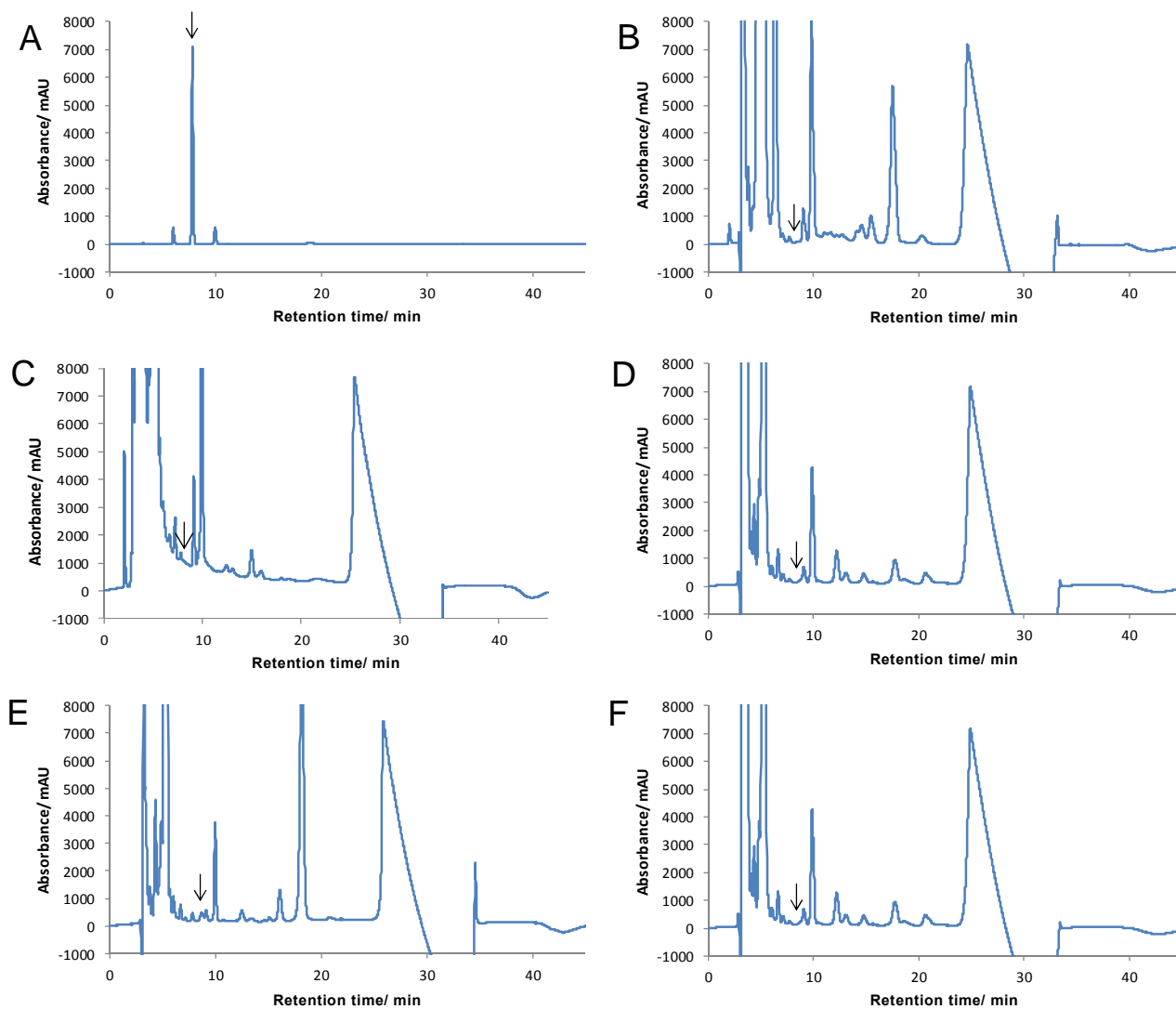


Fig. 2 Chromatograms of standard solution and blank sample solutions (LC operating conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention time of sodium nitrite.)

A: Standard solution (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 12 μg as sodium nitrite)

B: Dry type for cats

C: Wet type for cats

D: Formed jerky for dogs

E: Confectionery (biscuit) for dogs

F: Milk powder for dogs

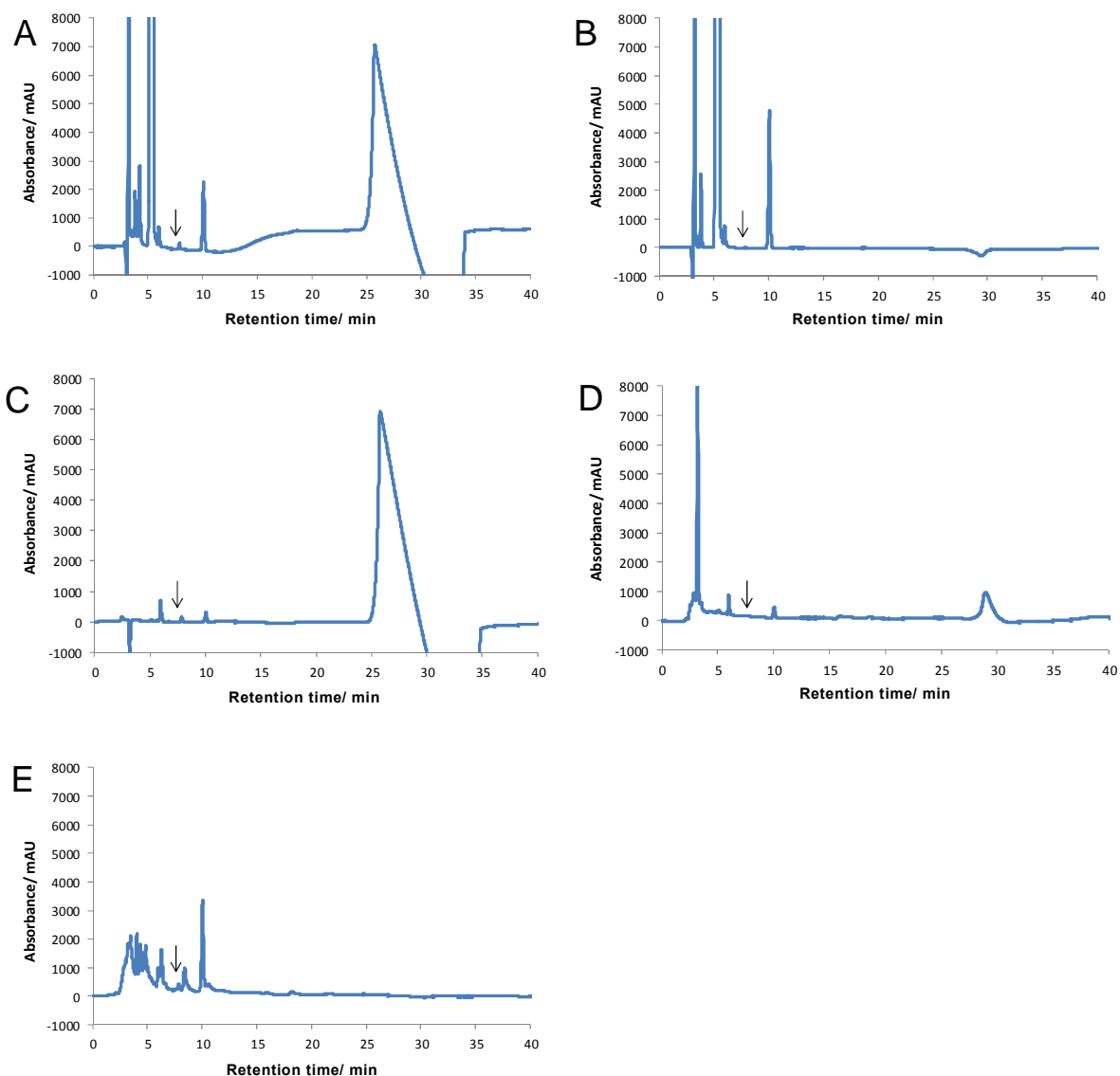


Fig. 3 Chromatograms of blank solution, reagent solutions and sample solution (LC operating conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention time of sodium nitrite.)

A : Blank solution

B : Ammonium acetate / Phosphoric acid buffer

C : Zinc sulfate / Phosphoric acid buffer

D : Sodium hydroxide / Phosphoric acid buffer

E : Dry type for cats / Phosphoric acid buffer

3.1.4 添加回収試験

2.1.6 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 4 のとおり，平均回収率は 92.4~108 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.0 % 以下の成績が得られ，愛玩動物用飼料等の検査法第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「試験法の妥当性確認法」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

なお，得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 4 Recoveries for sodium nitrite in pet foods

Samples	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Dry type for cats	20	93.0	7.0
	100	101	1.6
Semi-dry type for dogs	20	108	1.2
	200	100	0.7
Wet food for cats	5	108	2.7
	30	92.4	1.3
	100	94.7	1.3
Formed jerky for dogs	20	107	1.4
	100	103	1.6
Dried jerky for dogs (hard type)	20	102	1.7
	100	97.3	0.7
Dried jerky for cats (soft type)	20	102	1.1
	200	93.2	0.8
Confectionery (biscuit) for dogs	20	105	0.2
	100	101	0.7
	200	102	0.4
Milk powder for dogs	20	108	1.4
	100	103	2.8
	200	101	0.7

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

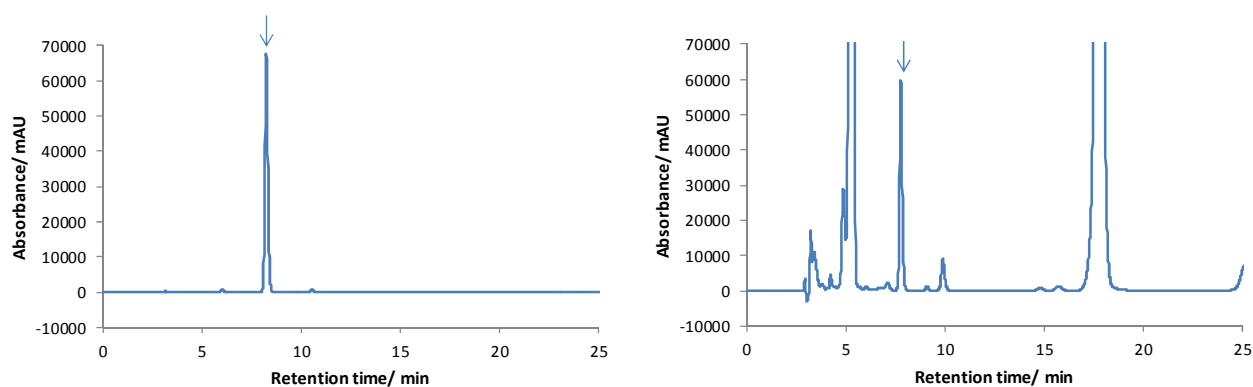


Fig. 4 Chromatograms of sodium nitrite

(Arrows indicate the peaks of sodium nitrite peak.)

Left: Standard solution (6 µg/mL: 0.12 ng as sodium nitrite.)

Right: Sample solution of dried jerky for cats (soft type) (spiked at 200 mg/kg of sodium nitrite (0.1 ng as sodium nitrite))

3.1.5 定量限界（下限）及び検出限界の検討

亜硝酸ナトリウムの検量線が直線性を示した範囲，0.1~10 µg/mL の下端付近となる濃度（ウ

エット製品以外は 20 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.5 µg/mL 相当量），ウエット製品は 5 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.125 µg/mL 相当量）の添加回収試験の結果，得られたピークの *SN* 比が 10 以上であったため，これらを亜硝酸ナトリウムの定量限界（下限）の濃度とした．なお，定量限界（下限）濃度における添加回収試験結果は Table 4 のとおり良好であった．この濃度は，愛玩動物用飼料中の基準値（100 mg/kg）に対して，1/5（ウエット製品は水分含有量 10% に換算した場合）であり，試験法の妥当性確認法に定められた目標を満たしていた．

本法の検出限界を確認するため，添加回収試験により得られたピークの *SN* 比が 3 となる濃度を求めた．その結果，検出限界は，ウエット製品以外は 6 mg/kg，ウエット製品は 2 mg/kg であった．この濃度は，同様に試験法の妥当性確認法に定められた目標を満たしていた．

3.2 共同試験

開発した分析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 5 のとおりであり，ドライ製品（猫用），セミドライ製品（犬用），ウエット製品（猫用），成型ジャーキー（犬用），菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（犬用）について，平均回収率は 95.2, 102, 97.1, 100, 101 及び 99.5 %， RSD_f は 1.4, 2.2, 4.4, 1.5, 1.8 及び 4.6 %， RSD_R は 5.3, 7.6, 7.2, 2.6, 5.3 及び 7.1 %，*HorRat* は 0.70, 0.93, 0.76, 0.34, 0.60 及び 0.70 であり，試験法の妥当性確認法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．

参考のため，各試験室で使用した LC の機種を Table 6 に示した．また，LC カラムは全ての試験室で Asahipak NH2P-50 4E（内径 4.6 mm，長さ 250 mm，粒径 5 µm，昭和電工製）を使用した．

Table 5 Collaborative study for sodium nitrite

Lab. No.	Dry type for cats		Semi-dry type for dogs		Wet food for cats		Formed jerky for dogs		Dried jerky for dogs (hard type)		MilK powder for dogs	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	137	135	84.8	82.5	25.9	25.2	121	121	46.0	45.6	13.4 ^{c)}	14.0 ^{c)}
2	140	144	90.8	89.5	28.2	29.9	126	124	50.4	48.6	19.5	19.2
3	143 ^{a)}	162 ^{a)}	78.7	77.5	28.9	32.5	119	120	54.2	54.9	21.3	21.3
4	159	156	68.3	68.1	28.4	25.6	118	118	48.1	49.6	16.7	18.1
5	154	153	85.7	80.3	30.2	32.4	120	116	49.0	48.7	18.6	19.8
6	162	157	74.6	77.9	27.4	26.7	116	119	50.6	48.6	19.4	21.7
7	155	151	87.6	84.5	29.1	27.5	118	120	70.7 ^{b)}	69.9 ^{b)}	28.4 ^{c)}	28.7 ^{c)}
8	157	159	83.8	80.8	31.5	30.7	125	125	53.2	55.3	20.9	21.3
9	150	147	87.4	89.6	29.3	29.9	115	120	50.3	50.8	19.4	19.4
10	159	160	82.3	83.4	31.0	29.7	124	120	50.6	51.5	19.5	19.8
11	156	154	79.8	79.4	30.7	29.9	118	118	50.4	50.0	19.9	22.4
Spiked level (mg/kg)	160		80		30		120		50		20	
No. labs ^{d)}	10		11		11		11		10		9	
No. outliers ^{e)}	1		0		0		0		1		2	
Mean value (mg/kg)	152		81.7		29.1		120		50.3		19.9	
Mean recovery (%)	95.2		102		97.1		100		101		99.5	
RSD _r ^{f)} (%)	1.4		2.2		4.4		1.5		1.8		4.6	
RSD _R ^{g)} (%)	5.3		7.6		7.2		2.6		5.3		7.1	
PRSD _R ^{h)} (%)	7.5		8.2		9.6		7.8		8.8		10	
HorRat	0.70		0.93		0.76		0.34		0.60		0.70	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Data excluded by paired Grubbs test

d) Number of laboratories retained after eliminating outliers

e) Number of outlier laboratories removed in parentheses

f) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

g) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 6 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC
1	Prominence, Shimadzu
2	LC-2000Plus series, JASCO
3	Prominence, Shimadzu
4	Waters2487, Waters
5	Prominence, Shimadzu
6	Prominence, Shimadzu
7	Prominence, Shimadzu
8	1260Infinity, Agilent Technologies
9	Prominence, Shimadzu
10	Alliance 2695, Waters
11	Alliance 2695, Waters

4 まとめ

愛玩動物用飼料に含まれる亜硝酸ナトリウムについて、冷食協法を基に、還元物質を添加された愛玩動物用飼料及び粉ミルクにも適用可能な LC を用いた定量法を開発するとともに、共同試験を実施し、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、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ （注入量として 0.002~0.2 μg 相当量）の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、亜硝酸ナトリウムを 4~400 mg/kg を含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。
- 2) 今回用いた試料について、本法に従って得られたクロマトグラムにおいて、定量を妨げる妨害ピークは認められなかった。
- 3) 亜硝酸ナトリウムとしてドライ製品（猫用）、成型ジャーキー（犬用）及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）に 20 及び 100 mg/kg 相当量、セミドライ製品（犬用）及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（猫用）に 20 及び 200 mg/kg 相当量、菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（犬用）に 20, 100 及び 200 mg/kg 相当量、ウェット製品（猫用）に 5, 30 及び 100 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 4) 本法の亜硝酸ナトリウムの定量限界（下限）は、20 mg/kg （ウェット製品は 5 mg/kg ）であった。検出限界は 6 mg/kg （ウェット製品は 2 mg/kg ）であった。設定した定量限界（下限）及び検出限界は、試験法の妥当性確認法に定められた目標を満たしていた。
- 5) 亜硝酸ナトリウムとしてドライ製品（猫用）に 160 mg/kg 相当量を、セミドライ製品（犬用）に 80 mg/kg 相当量を、ウェット製品（猫用）に 30 mg/kg 相当量を、成型ジャーキー（犬用）に 120 mg/kg 相当量を、菓子類（犬用ビスケット）に 50 mg/kg 相当量を、粉ミルク（犬用）に 20 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 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、試験法の妥当性確認法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 JA 東日本くみあい飼料株式会社品質保証部分析・開発センター、ジーエルサイエンス株式会社、一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター、一般財団法人日本食品検査首都圏事業所、一般財団法人日本食品分析センター彩都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) 厚生省令：食品衛生法施行規則，昭和 23 年 7 月 13 日，厚生省令第 23 号 (1948)。
- 2) 厚生省告示：食品、添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959)。
- 3) 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，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009)。
- 4) 甲斐 茂浩：愛がん動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの分光光度計による定量法の共同試験，飼料研究報告, 36, 120-125 (2011)。

- 5) 杉村 靖, 森口 里美, 浪越 充司, 山西 正将, 若宮 洋市, 永原 貴子: 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品等への適用のための妥当性確認～カドミウム, 水銀, 鉛, ヒ素, エトキシキン, ジブチルヒドロキシトルエン, ブチルヒドロキシアニソール及び亜硝酸ナトリウムについて～, 飼料研究報告, **40**, 123-140 (2015).
- 6) 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).
- 7) 一般財団法人日本冷凍食品検査協会: 平成 27 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業 (2015).
- 8) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331-343 (1995).
- 9) 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).
- 10) 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).