

技術レポート**6 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**

甲斐 茂浩*

**Collaborative Study of Determination of Sodium Nitrite
in Pet Foods by Spectrophotometric Analysis**

Shigehiro KAI*

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

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 とされているが、飼料中における基準はない。また、愛がん動物用飼料（以下「ペットフード」という。）にも使用されているが、現在基準値は設定されていない³⁾。しかし、犬及び猫が亜硝酸ナトリウムを大量に含有するペットフードを食べることにより、チアノーゼなどを引き起こす可能性があることから、国内でもペットフード中の亜硝酸ナトリウムについて、基準値を設定することが検討されているところである。

現在、ペットフード中の定量法としては、財団法人日本食品分析センターが、平成 21 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方法（以下「分析センター法」という。）があり⁴⁾、愛がん動物用飼料等の検査法に収載されている試験法の妥当性確認に従い⁵⁾、その精度と真度が確認されているところであるが、共同試験による室間再現精度は確認されていない。

今回、この分析センター法を用いて、共同試験を行い、愛がん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ので、その概要を報告する。

2 実験方法**2.1 分析試料**

愛がん動物用飼料成猫用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品及び成犬用ウェット製品を、ドライ製品及びセミドライ製品についてはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、ウェット製品はフードプロセッサで粉碎して供試試料として用いた。

それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

Table 1 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry type for adult cats	Meat (Chicken, Turkey), Fat (Chicken), Fish (Salmon), Barley, Oats, Oatmeal, Cereals, Flaxseed, Vegetables (Potato, Carrot, Greenpiece, Spinach, Kelp, Chicory, Tomato, Parsley), Fruits (Apple, Blueberry, Cranberry), Minerals (Mn, Zn, Cu, Se), Yeast, Egg, Vitamins (Choline Chloride, Pantothenic acid, Biotin, A, E, B ₁ , D, B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , Folic acid, L-carnitine, Niacin), Extract (Rosemary, Yucca schidigera, GreenTea, Barley) Potassium chloride, Methionine, Taurine, Potassium iodate
Semi-dry type for dogs	Chicken, Tapioca, d-Sorbitol, Glycerin, Propylene glycol, Gelatin, Botanical protein, Baking powder, Sodium Chloride, Sodium Nitrite, Amino acid, Oligosaccharide, Vitamins (C, E), Sorbic acid
Wet type for adult dogs	Meat (Chicken, Beef, Mutton), Fish, Wheat flour, Minerals, Sodium Nitrite, Vitamins (Choline Chloride, Pantothenic acid, Biotin, Folic acid), Antioxidant(EDTA-Ca-Na), Coloring agents (Titanium dioxide)

2.2 試薬

- 1) 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。
- 2) 亜硝酸ナトリウム標準液 亜硝酸ナトリウム [NaNO₂] (105 °C で 4 時間乾燥したもの) 50 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 0.1 mg を含有する。)。使用に際して、標準原液の一定量を酢酸アンモニウム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 0.05~1 µg を含有する数点の亜硝酸ナトリウム標準液を調製した。
- 3) 硫酸亜鉛溶液 硫酸亜鉛七水和物 178 g を水に溶かして 1 L とした。
- 4) スルファニルアミド溶液 スルファニルアミド 1 g を塩酸 (10 w/v%) に溶かして 100 mL とした (使用時に調製し褐色瓶に貯蔵する。)
- 5) ナフチルエチレンジアミン溶液 N-(1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩 0.5 g を水に溶かして 100 mL とした (使用時に調製し褐色瓶に貯蔵する。)
- 6) 活性炭素 活性炭素を水で洗浄した後、風乾した。
- 7) その他、特記している試薬以外は特級を用いた。

2.3 定量方法

1) 試料溶液の調製

分析試料 5.0 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 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 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、10 分間静置した。首太全量フラスコの標線まで酢酸アンモニウム緩衝液を加え、ろ紙 (5 種 C) でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液を試料溶液とした。

ろ液が着色していた場合は、更に先のろ液に活性炭素約 0.5 g を加え、ろ紙 (5 種 C) でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液を試料溶液とした。

同時に、水 5 mL を用いて同一操作を行い、空試験溶液を調製した。

2) 定 量

試料溶液及び空試験溶液 10 mL を共栓試験管に正確に入れ、スルファニルアミド溶液 1 mL を正確に加え、密栓して混和した。続いてナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL を正確に加え、密栓して混和した後、15 分間静置して試料溶液 (A) を得た。

活性炭素による処理を行った場合は、別に試料溶液 10 mL を共栓試験管に正確に入れ、塩酸 (10 w/v%) 1 mL を正確に加えた後、密栓して混和し、更にナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL を正確に加えて以下同様に操作を行い試料溶液 (B) を得た。

各亜硝酸ナトリウム標準液及び酢酸アンモニウム緩衝液について、同様の操作を行った。

酢酸アンモニウム緩衝液を対照液として試料溶液 (A) 及び空試験溶液について、波長 540 nm で吸光度を測定した。試料溶液 (A) の吸光度から空試験溶液の吸光度 (活性炭素処理を行った場合は空試験溶液の吸光度と試料溶液 (B) の吸光度を足した吸光度) を差し引いて吸光度を得た。

同時に酢酸アンモニウム緩衝液及び各亜硝酸ナトリウム標準液について、試料溶液 (A) の場合と同一条件で吸光度を測定した。得られた各亜硝酸ナトリウム標準液の吸光度から酢酸アンモニウム緩衝液の吸光度を差し引いて吸光度を得た。得られた吸光度から検量線を作成して、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。

Sample 5.0 g (for blank solution : 5 mL of water)

- add 150 mL of ammonium acetate and shake
- heat in a water bath for 10 min at 80 °C (shake occasionally)
- add 20 mL of Zinc sulfate solution (10 w/v%) and shake
- heat in a water bath for 5 min at 80 °C (shake occasionally)
- cool in ice for 5 min
- add 2 mL of Sodium hydroxide solution (30 w/v%)
- allow to stand for 10 min
- top up to 200 mL with ammonium acetate
- filtrate with filter (No.5C) (discard 20 mL of the beginning)

Sample solution

- (only when the sample solution has colored, operate it after this)
- add about 0.5 g of active carbon
- filtrate with filter (No.5C) (discard 20 mL of the beginning)

Sample solution

Standard solution, blank solution and sample solution

- add 1 mL of sulfanilamide solution
- (When active carbon is used, the one that 1 mL of HCl (10 w/v%) was added instead of 1 mL of sulfanilamide solution is made at the same time.)
- add 1 mL of naphthylethylenediamine solution and shake
- allow to stand for 15 min

Spectrophotometer (540 nm, reference : ammonium acetate)

Scheme 1 Analytical procedure for Sodium Nitrite in pet foods

3 結果及び考察

3.1 共同試験

猫用ドライ製品，全成長段階犬用セミドライ製品及び成犬用ウェット製品に亜硝酸ナトリウムとして4，100及び20 mg/kg相当量をそれぞれ添加した試料を用い，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，日本ハム株式会社中央研究所，株式会社日清製粉グループ本社 QE センター，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の計9試験室において本法に従って共同試験を実施した。

その結果はTable 2に示したように，猫用ドライ製品では平均回収率は95.0%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として2.4%及び4.6%であり，HorRatは0.36であった。犬用セミドライ製品では，平均回収率は102%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として1.6%及び2.0%であり，HorRatは0.26であった。成犬用ウェット製品では，平均回収率は97.2%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として1.1%及び1.9%であり，HorRatは0.19であった。

なお，参考のため，各試験室で使用した分光光度計の機種等をTable 3に示した。

Table 2 Collaborative study results of Sodium Nitrite

Lab.No.	Dry type for adult cats		Semi-dry type for dogs		Wet type for adult dogs	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	3.92	3.96	103	99.7	19.0	19.0
2	3.95	4.03	97.8	100	19.5	19.2
3	3.86	3.86	102	104	19.2	19.3
4	3.69	3.92	101	96.3	19.5	19.7
5	3.80	3.57	103	104	20.3	19.6
6	3.66	3.78	101	102	19.1	19.2
7	4.03	3.95	103	102	19.8	20.0
8	3.67	3.75	103	102	19.2 ^{e)}	21.0 ^{e)}
9	3.46	3.53	103	102	19.3	19.3
Spiked level (mg/kg)	4.00		100		20.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	3.80		102		19.4	
Recovery ^{a)} (%)	95.0		102		97.2	
RSD _r ^{b)} (%)	2.4		1.6		1.1	
RSD _R ^{c)} (%)	4.6		2.0		1.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	13		8.0		10	
HorRat	0.36		0.26		0.19	

a) Dry type for adult cats and Semi-dry type for dogs : $n=18$, Wet type for adult dogs: $n=16$ (without Lab. No. 8)

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

e) Data excluded by Cochran test

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Instruments	
1	Shimadzu	UV-2450
2	Hitachi	U-2900
3	Hitachi	U-2001
4	Hitachi	U-3010
5	Shimadzu	UV-1800
6	JASCO	V-530
7	Shimadzu	UV-mini 1240
8	Shimadzu	BioSec-1600
9	Shimadzu	UV-mini 1240

4 まとめ

愛がん動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムについて、分析センター法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討するため、妥当性確認の補足として共同試験を実施したところ、次の結果

を得た。

- 1) 猫用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品及び成犬用ウェット製品に亜硝酸ナトリウムとして 4, 100 及び 20 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用い、9 試験室において本法に従って共同試験を実施した。その結果、猫用ドライ製品では平均回収率は 95.0 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 2.4 % 及び 4.6 % であり、HorRat は 0.36 であった。犬用セミドライ製品では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 1.6 % 及び 2.0 % であり、HorRat は 0.26 であった。成犬用ウェット製品では、平均回収率は 97.2 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 1.1 % 及び 1.9 % であり、HorRat は 0.19 であった。

謝 辞

共同試験に参加いただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所、日本ハム株式会社中央研究所、株式会社日清製粉グループ本社 QE センターの試験室の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。
- 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。
- 3) 農林水産省令・環境省令：愛がん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) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 ペットフード中の有害物質の分析法の開発 (2009)。
- 5) 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：「愛がん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)。