

7章: DDGS のための推奨される分析手順

はじめに

飼料成分の分析は、成分含量が保証値を満たしていることを確認し、飼料の配合に用いるための栄養成分組成と、潜在的な汚染物質の存在とその含量を知るために、飼料業界では一般的な手法となっている。したがって、DDGS を含む飼料原料中のさまざまな化学物質の測定の正確性は不可欠となる。分析手順は、特定の実験室のバリデーション・レベルに基づいて分類できる(Thiex、2012)。単一の実験室内でのバリデーションは、特定の

実験室、技術者および機器に適用されるが、複数の実験室間におけるバリデーションでは、分析結果が当該実験室と、他の実験室との間でどの程度再現性があるかの情報を得るために、2~7 か所の実験室でのバリデーションが行われる。完全に調和したプロトコルを用いた共同研究のバリデーションは、少なくとも 8 か所の実験室において、同一の手順を使用して許容できるデータが提供されることで得られる。DDGS に関する推奨分析手順についての優れた総説が Thiex(2012)によって公表されており、本章ではその重要点を紹介する。

DDGS の取引基準を満たすための推奨分析方法(AFIA、2007 年)

分析項目	方法	備考
水分	NFTA 2.2.2.5	Lab Dry Matter (105°C/3hr)
CP	AOAC 990.03	Protein (Crude) in Animal Feed
CP	AOAC 2001.11	Protein (Crude) in Animal Feed and Pet Food Copper Catalyst
粗脂肪	AOAC 945.16	Oil in Cereal Adjuncts (Petroleum Ether)
粗繊維	AOAC 978.10	Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food (F.G. Crucible)

配合設計のための DDGS の栄養成分分析の推奨方法

分析項目	方法	備考
酸性デタージェント繊維 (ADF)	AOAC 973.18	Fiber, Acid Detergent and Lignin, H ₂ SO ₄ in Animal Feed and ISO, 2008 are equivalent
酸性デタージェントリグニン (ADL)	AOAC 973.18	Fiber, Acid Detergent and Lignin, H ₂ SO ₄ in Animal Feed and ISO 13906:2008 are equivalent
中性デタージェント繊維 (NDF)	AOAC 2002.04	AOAC 2002.04 Amylase Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds and ISO 16472:2006 are equivalent
でん粉	No official method	AOAC 920.40 is no longer valid because of discontinued production of the enzyme needed for the assay, AOAC 996.11 is most commonly used but has deficiencies.
アミノ酸	AOAC 995.12 ISO 13903:2005	AOAC 994.12 for all amino acids except tyrosine and tryptophan
トリプトファン	AOAC 988.15	
灰分	AOAC 942.05 ISO 5984:2002	AOAC 942.05 and ISO 5984:2002 are equivalent. Note: If the ash contains unoxidized carbon, the sample should be re-ashed

分析項目	方法	備考
塩素	AOAC 969.10	AOAC 969.10 is the Potentiometric Method and AOAC 943.01 is the Volhard Method
	AOAC 943.01	
	ISO 6495:1999	
クロム	No official method	No methods have been validated
フッ素	Microdiffusion technique (Mineral Tolerances of Animals, 2005)	No methods have been validated
ヨウ素	ICP-MS technique (Mineral Tolerances of Animals, 2005)	No methods have been validated
リン	AOAC 965.17	AOAC 965.17 Phosphorus in Animal Feed, Photometric Method, ISO 6491:1998 Determination of Total Phosphorus Content – Spectrophotometric Method, and ISO 27085:2009 can be used
	ISO 6491:1998	
	ISO 27085:2009	
セレン	AOAC 996.16	AOAC 996.16 Selenium in Feeds and Premixes, Fluorometric Method and AOAC 996.17 Selenium in Feeds and Premixes, Continuous Hydride Generation Atomic Absorption Method are acceptable
	AOAC 996.17	
イオウ	AOAC 923.01	AOAC 923.01 Sulfur in Plants and ISO 27085:2009 are comparable
	ISO 27085:2009	
微量ミネラル	AOAC 968.08	Solubilization involves either dry ash followed by dissolving in acid, or wet ash using various acids depending on the elements being measured. Detection includes gravimetric techniques, visible spectrophotometry, flame and graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (AOAC 968.08; ISO 6869:2000), or atomic mass spectroscopic detection (ICP-MS; ISO 27085:2009)
	ISO 6869:2000	
	ISO 27085:2009	

DDGS で考えられる汚染物質を測定するための推奨手順(Caupert ら、2012)

マイコトキシン(カビ毒)

1960年代以降、ヒトの健康に対する毒性の懸念から、食品や飼料中のマイコトキシン含量を分析するための多くの分析方法が開発されてきた(Trucksess、2000)。その中でも、TLC(薄層クロマトグラフィー)法、エライザ法および免疫センサーに基づく方法は、迅速なスクリーニングに広く使用されているが、FD(蛍光検出)を備えたHPLC(高速液体クロマトグラフィー)およびMS(質量分析検出)は、確認および参照方法として使用されている(Krska ら、2008)。

ただし、マイコトキシンの分析には、迅速、正確、低コストが求められるため、オンサイトメソッド・テストキットが、USDA(米国農業省)のGIPSA(穀物及び包装業者・飼育場検査管理部)によって開発および承認されて、DDGS

に関するマイコトキシン分析に用いられている(表 1; <http://www.gipsa.usda.gov/GIPSA/webapp?area=home&subject=lr&topic=hb>)。

これらの方法は、単一のマイコトキシンを検出するためのものであり、使用が比較的簡単で、定量感度が高く、高い試料処理能力(サンプルスループット)を可能にしている。DDGS中のマイコトキシンを分析するために6種類の製品がGIPSAにより承認されている(アフラトキシン;4種、フモニシン;1種、ゼアラレノン;1種)。DDGSに関して、マイコトキシン汚染の可能性を検討する場合、承認された分析手順を用いて正確な結果を得ることが不可欠となる。飼料中のマイコトキシンの存在と含量を測定するにはHPLCが推奨されている。HPLCと様々な検出器を使用することで、飼料中のほとんどのマイコトキシンを分離して検出することが出来る(Krska ら、2008)。米国の主要な研究所で使用されている方法は表 2 に示したとおりであり、これらの方法は、個々の実験室で検証されており、最近、査読済みの科学誌で公表されている。

表 1. GIPSA が承認している DDGS 用マイコトキシン・テストキット(Zhang ら、2009 から改編)

商品名	製造者	分析範囲	分析方法	抽出方法	クリーンアップ法
アフラトキシン					
Veratox Aflatoxin	Neogen Corporation	5–50 ppb	Microtiter Well Plate Assay	Methanol/water (70 + 30)	ELISA
Ridascreen FAST SC	R-Biopharm	5–100 ppb	Microtiter Well Plate Assay	Methanol/water (70 + 30)	ELISA
Aflatest	Vicam	5–100 ppb	Immunoaffinity Column	Methanol/water (80 + 20)	Affinity column
FluroQuant® Afla IAC	Romer	5–100 ppb	Fluorometry	Methanol/water (80 + 20)	Affinity column
フモニシン					
AgraQuant Total Fumonisin 0.25/5.0	Romer	0.5–5 ppm	Direct Competitive ELISA	Methanol/water (70 + 30)	ELISA
ゼアラレノン					
ROSA® Zearalenone	Charm Sciences, Inc.	50–1000 ppb	Lateral Flow Strip	Methanol/water (70 + 30)	

表 2. 飼料中のマイコトキシン分析の推奨方法(Zhang ら、2009 から改編)

項目	分析方法	検出範囲	引用文献
アフラトキシン			
トウモロコシ、アーモンド、ブラジルナッツ、ピーナッツ、ピスタチオナッツ	HPLC – FD	5 – 30 ppb	AOAC 994.08
デオキシニバレノール			
穀類、穀類副産物	HPLC – UV	ppm (detection limit)	MacDonald et al., 2005a
フモニシン			
トウモロコシ、圧ベントウモロコシ	HPLC – FD	0.5 – 2 ppm	AOAC 2001.04
トウモロコシ、トウモロコシ主体飼料	Thin layer chromatography (TLC)	ppm (detection limit)	Rottinghaus et al., 1992
T2トキシン			
食品、飼料	Thin layer chromatography (TLC)	ppm (detection limit)	Romer Labs, 1986
ゼアラレノン			
トウモロコシ、小麦、飼料	Microtiter Well Plate Assay	0.8 ppm (detection limit)	AOAC 994.01
大麦、トウモロコシ、小麦粉、ポレンタ、トウモロコシ主体のベビーフード	HPLC – FD	0.05 ppm (detection limit)	MacDonald et al., 2005b
アフラトキシン、デオキシニバレノール、フモニシン、T2トキシン、ゼアラレノン			
食品、飼料	LC/MS/MS	Aflatoxins (1 – 100 ppb); Deoxynivalenol, (1, 1000 ppb) Fumonisin (16 – 3,200 ppb) T-2, (2 – 1,000 ppb) Zearalenone (20 – 1,000 ppb)	Sulyok et al., 2007

抗生物質の残留

米国食品医薬品庁(FDA)の動物用医薬品センター(CVM)では、HPLCとイオントラップタンデム質量分析計を使用して、以下に示す13種類の抗生物質残留物についてDDGSでの検出を行っている(Heller, 2009)。

- ・アンピシリン
- ・バシトラシン A
- ・クロラムフェニコール
- ・クロルテトラサイクリン
- ・クラリスロマイシン
- ・エリスロマイシン
- ・モネンシン
- ・オキシテトラサイクリン
- ・ペニシリン G
- ・ストレプトマイシン
- ・タイロシン
- ・バージニアマイシン M₁

この手順の抽出効率の範囲は65~97%であり、定量限界は0.1~1.0 μg/gであった。精度の範囲は88~111%で、CV(変動係数)は4~30%である。バージニアマイシン残基を検出するためにFDAが承認した唯一の方法は、バイオアッセイ(QA@Phibro.com)であり、バージニアマイシン残基の存在を正確に測定するために推奨されている。このバイオアッセイは、バージニアマイシン分子の両方のサブユニットが存在する場合にのみ発生する可能性がある生物活性を検出する。Heller(2009)のLC-MS法は、1つのサブユニットのみを検出し、高い割合で偽陽性を引き起こす可能性がある。

引用文献

- AFIA. 2007. Evaluation of Analytical Methods for Analysis of Distillers Grain with Solubles: AFIA Sub Working Group Final Report. American Feed Industry Association. Available online: www.aafi.org/Aa/Files/BAMN-percent20BSE-percent20DDGS-percent20Biosecurity-percent20Awareness/DDGS-percent20FINAL-percent20Report-percent20and-percent20Recommendations2-07.pdf. Accessed May 30, 2012.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International (OMA). AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Caupert, J., Y. Zhang, P. Imerman, J.L. Richard, and G.C. Shurson. 2012. Mycotoxin Occurrence in DDGS. In: Distillers Grain Production, Properties, and Utilization, ed. K. Liu and K.A. Rosentrauer, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 219-234.
- Heller, D.N. 2009. Analysis of Antibiotics in Distillers Grains Using Liquid Chromatography and Ion Trap Tandem Mass Spectroscopy, ed. C.V.M Food and Drug Administration, Office of Research. Department of Health and Human Services. Rockville, MD.
- ISO. 1998. ISO 6491:1998, Animal Feeding Stuffs - Determination of Phosphorus Content - Spectrometric Method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 1999. ISO 6495:1999, Animal Feeding Stuffs - Determination of Water-Soluble Chloride Content. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2000. ISO 6491:1998, Animal Feeding Stuffs - Determination of the Contents of Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Potassium, Sodium, and Zinc - Method Using Atomic Absorption Spectrometry. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2002. ISO 5984:2002, Animal Feeding Stuffs - Determination of Ash Content. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2005. ISO 13903:2005, Animal Feeding Stuffs - Determination of Amino Acid Content. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2006. ISO 16472:2006, Animal Feeding Stuffs - Determination of Amylase-Treated Detergent Fiber Content (aNDF). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- ISO. 2008. ISO 13906:2008, Animal Feeding Stuffs – Determination of Acid Detergent Fiber (ADF) and Acid Detergent Lignin (ADL) Content. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2009. ISO 27085:2009, Animal Feeding Stuffs – Determination of Calcium, Sodium, Phosphorus, Magnesium, Potassium, Iron, Zinc, Copper, Manganese, Cobalt, Molybdenum, Arsenic, Lead, and Cadmium by ICP–AES. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- MacDonald, S.J., D. Chan, P. Brereton, A. Damant, and R. Wood. 2005a. Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunofluorescence column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study. *J. of AOAC International* 88:1197–1204.
- MacDonald, S.J., S. Anderson, P. Brereton, R. Wood, and A. Damant. 2005b. Determination of zearalenone in barley, maize and wheat flour, polenta, and maize-based baby food by immunofluorescence column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study. *J. of AOAC International* 88:1733–1740.
- Mineral Tolerances of Animals. 2005. National Academy Press, Washington, DC.
- Romer Labs, Inc. 2010. T-2 Toxin. Romer Labs, Inc., Union, MO. Available online: www.romerlabs.com/downloads/Mycotoxins/T2-Toxin.pdf.
- Rottinghaus, G.E., C.E. Coatney, and C.H. Minor. 1992. A rapid, sensitive, thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2. *J. Vet Diag. Invest.* 4:326–329.
- Sulyok, M., R. Krska, and R. Schuhmacher. 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chem.* 389:1505–1523.
- Thiex, N. 2012. Analytical Methodology for Quality Standards and Other Attributes of DDGS In: *Distillers Grain Production, Properties, and Utilization*, ed. K. Liu and K.A. Rosentrater, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 193–217.
- Trucksess, M.W. 2000. Natural Toxins. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th Edition. Chapter 49, 1 – 2.
- Zhang, Y., J. Caupert, J. Richard, P. Imerman and J. Shurson, 2009. The occurrence and concentration of mycotoxins in U.S. distillers dried grains with solubles. *J. Ag. Food Chemistry* 57:9828–9837.