

**技術レポート****4 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**～ ゼアラレノン, フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 並びにプロピレングリコール ～野村 昌代<sup>\*1</sup>, 伊藤 千晶<sup>\*1</sup>, 設楽 賢治<sup>\*1</sup>, 保田 伊世<sup>\*1</sup>,  
小塚 健志<sup>\*1</sup>, 新井 詠子<sup>\*2</sup>, 高橋 亜紀子<sup>\*1</sup>**Validation Study on Application of Analytical Methods of Zearalenone,  
Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>, and Propylene Glycol to Snack Type Pet Foods**Masayo NOMURA<sup>\*1</sup>, Chiaki ITO<sup>\*1</sup>, Kenji SHIDARA<sup>\*1</sup>, Iyo YASUDA<sup>\*1</sup>, Kenji KOZUKA<sup>\*1</sup>, Eiko ARAI<sup>\*2</sup>  
and Akiko TAKAHASHI<sup>\*1</sup><sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Sendai Regional Center)**1 緒 言**

独立行政法人農林水産消費安全技術センターが定める「愛玩動物用飼料等の検査法」（以下「検査法」という。）<sup>1)</sup>に収載する分析法については、従来、流通量及び摂食量の多い、ドライ、セミドライ及びウェット製品といった総合栄養食等主食的に用いられるものを先行して整備を進めてきたが、平成 25 年 10 月、米国 FDA において、中国産ジャーキーに起因すると推測される犬猫への原因不明の健康被害が発生しているとの公表<sup>2)</sup>が発表されたことを受け、スナック製品 5 分類（成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）への適用範囲拡大のための妥当性確認についても実施している。

平成 27 年度は、ドライ、セミドライ及びウェット製品を適用範囲として検査法に収載されているかび毒（ゼアラレノン並びにフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>）の分析法並びにドライ及びセミドライ製品を適用範囲として検査法に収載されている添加物（プロピレングリコール）の分析法について、スナック製品 5 分類への分析法適用のための妥当性確認を実施したので、その概要を報告する。

今回検討のゼアラレノン及びフモニシンについては、現在のところ我が国において、愛玩動物用飼料中の含有許容値は設定されていない。プロピレングリコールについては、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令<sup>3)</sup>において、猫を対象とする販売用愛玩動物用飼料に用いてはならないとされている。

**2 実験方法****2.1 試 料**

市販のスナック製品 5 分類（成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフト

---

<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

タイプ) , 菓子類及び粉ミルク) を試料に用い, 検査法に準じて分析用試料を調製した. すなわち, 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎 (粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクを除く.) し, 混合し用いた.

検討に用いた試料の分類, 種類及びその原材料名を表 1-1~1-3 に示した. なお, 原材料名は, 検討に用いた各試料に表記されていた名称に準拠した.

表 1-1 検討に用いた試料の分類, 種類及びその原材料名  
(ゼアラレノンの分析法の検討)

| 分類                                   | 種類                  | 原材料名  |
|--------------------------------------|---------------------|---|
| 成型ジャーキー<br>(水分20 ~ 35 %程度)           | 犬用成型ジャーキー           | 肉類(鶏ササミ等), でん粉類, 豆類, 糖類, ミネラル類(塩化ナトリウム), 増粘安定剤(ソルビトール, グァーガム), 保存料(ソルビン酸カリウム, デヒドロ酢酸ナトリウム), pH調整剤(ソルビン酸, デヒドロ酢酸ナトリウム), 調味料, 発色剤(亜硝酸ナトリウム), 消臭剤(ポリアクリル酸ナトリウム), 食用色素(カaramel, 赤106), ビタミンE  |
|                                      | 猫用成型ジャーキー           | 鶏ササミ, 食塩, ソルビトール, グリセリン, リン酸塩(Na), 酸化防止剤(V.C), 発色剤(亜硝酸Na)   |
| 素材乾燥ジャーキー<br>(ハードタイプ. 水分10 ~ 15 %程度) | 犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ) | 鶏ササミ, グリセリン, 砂糖, 塩, デヒドロ酢酸ナトリウム   |
| 素材乾燥ジャーキー<br>(ソフトタイプ. 水分25 %程度)      | 犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ) | 鶏ささみ, じゃがいもでん粉, グルコサミン, オリゴ糖, グリセリン, プロピレングリコール, 塩化Na   |
| 菓子類                                  | 犬用ビスケット             | 小麦粉, 砂糖, 植物油, タピオカでん粉, 野菜(ほうれん草, にんじん, カボチャ), ミルクパウダー, チョリ抽出物(食物繊維, オリゴ糖含有), 膨張剤, ミネラル類(カルシウム, ナトリウム), 香料, ユッカエキス, 食用色素(黄4, 黄5, 青1)   |
| 粉ミルク                                 | 犬用粉ミルク              | 乾燥乳清蛋白質濃縮物, 乾燥乳清粉末, 動物性油脂, 植物性油脂, ブドウ糖, レシチン, タウリン, デンプン, ラクトフェリン, プロバイオティクス( <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ), 香料, ケイ素, ビタミン類(ビタミンA, ビタミンB <sub>1</sub> 塩酸塩, ビタミンB <sub>2</sub> , ビタミンB <sub>6</sub> 塩酸塩, グリシン酸鉄, パントテン酸カルシウム, 硫酸第一鉄, 硫酸銅, 硫酸マンガン, 亜セレン酸ナトリウム, 酸化亜鉛, 硫酸コバルト) |

表 1-2 検討に用いた試料の分類, 種類及びその原材料名  
(フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> の分析法の検討)

| 分類                                   | 種類                  | 原材料名  |
|--------------------------------------|---------------------|---|
| 成型ジャーキー<br>(水分20 ~ 35 %程度)           | 犬用成型ジャーキー           | 肉類(鶏ササミ等), 野菜類(にんじん, グリンピース等), でん粉類, 豆類, 増粘安定剤(グリセリン, グァーガム), 保存料(デヒドロ酢酸ナトリウム)  |
|                                      | 猫用成型ジャーキー           | マグロ, 鶏肉, 脱脂大豆, 牛肉, でん粉類, 小麦たん白, 豚脂, 酵母, 食塩, オリゴ糖, ソルビトール, 膨張剤, 調味料, ミネラル類(Ca, P), リン酸塩(Na, K), 乳酸Na, 酸化防止剤(ビタミンC), 保存料(ソルビン酸), ビタミン類(E, A), 乳酸Ca, 発色剤(亜硝酸Na)  |
| 素材乾燥ジャーキー<br>(ハードタイプ. 水分10 ~ 15 %程度) | 犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ) | 鶏ササミ, グリセリン, 砂糖, 塩, デヒドロ酢酸ナトリウム   |
| 素材乾燥ジャーキー<br>(ソフトタイプ. 水分25 %程度)      | 犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ) | 鶏ささみ, じゃがいもでん粉, グルコサミン, オリゴ糖, グリセリン, プロピレングリコール, 塩化Na   |
| 菓子類                                  | 犬用ビスケット             | 小麦粉, 還元麦芽糖, 植物性油脂, でん粉類, オリゴ糖, 膨張剤, 香料, 保存料(プロピオン酸Ca)   |
| 粉ミルク                                 | 犬用粉ミルク              | 粉乳(脱脂粉乳, カゼイン), 油脂類(植物性油脂, 動物性油脂, $\gamma$ -リノレン酸), 卵黄粉末, 大豆たん白, オリゴ糖, L-カルニチン, ミネラル類(Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), 乳化剤, ビタミン類(A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , D, E, K, ニコチン酸, パントテン酸, 葉酸, コリン), 香料, タウリン |

表 1-3 検討に用いた試料の分類、種類及びその原材料名  
(プロピレングリコールの分析法の検討)

| 分類                                | 種類                  | 原材料名  |
|-----------------------------------|---------------------|---|
| 成型ジャーキー<br>(水分20～35%程度)           | 犬用成型ジャーキー           | 鶏ササミ, でんぷん類, 大豆たん白, 食塩, 炭酸Ca, グリセリン, リン酸Na  |
|                                   | 猫用成型ジャーキー           | 鶏ササミ, 食塩, ソルビトール, グリセリン, リン酸塩(Na), 酸化防止剤(V.C), 発色剤(亜硝酸Na)   |
| 素材乾燥ジャーキー<br>(ハードタイプ. 水分10～15%程度) | 犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ) | 肉類(鶏ササミ等), 増粘安定剤(ソルビトール), 保存料(デヒドロ酢酸ナトリウム)  |
| 素材乾燥ジャーキー<br>(ソフトタイプ. 水分25%程度)    | 犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ) | 鶏ササミ, 食塩, グリセリン, 保存料(ソルビン酸K), 酸化防止剤(エリソルビン酸Na)  |
| 菓子類                               | 犬用ビスケット             | 小麦粉, マーガリン, グラニュー糖, 鶏卵, 米胚芽・大豆発酵抽出物, 樹木抽出物, ガラクトオリゴ糖, たんぱく質濃縮ホエイパウダー(乳製品), 脱脂粉乳, 乳糖, 植物油脂, 甘味料(D-ソルビトール), 炭酸カルシウム, 緑茶抽出物, 酸化防止剤(ビタミンE, ローズマリー抽出物)   |
| 粉ミルク                              | 犬用粉ミルク              | 粉乳(脱脂粉乳, カゼイン), 油脂類(植物性油脂, 動物性油脂, $\gamma$ -リノレン酸), 卵黄粉末, 大豆たん白, オリゴ糖, L-カルニチン, ミネラル類(Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), 乳化剤, ビタミン類(A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , D, E, K, ニコチン酸, パントテン酸, 葉酸, コリン), 香料, タウリン |

## 2.2 試薬

検査法に既収載の各分析法に規定されている試薬を用いた。

なお、検査法に既収載の各分析法の該当する章、節及び番号を表2に示した。

表 2 愛玩動物用スナック製品等の検討対象とした各成分の検査法収載法

| 成分  | 検討対象とした検査法収載法 |                              |
|---|---------------|------------------------------|
| ゼアラレノン  | 検査法第5章第1節7    | 液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法      |
| フモニシンB <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 及びB <sub>3</sub> | 検査法第5章第2節3    | フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法 |
| プロピレングリコール  | 検査法第7章6       | ガスクロマトグラフ質量分析計による単成分分析法      |

## 2.3 装置及び器具

各分析法の検討に用いた装置及び器具を表3に示した。

表 3 検討に用いた装置及び器具

| 成分  | 装置及び機器  |
|---|---|
| ゼアラレノン  | 1) 粉碎機: ZM-200 Retsch製 (1 mmスクリーン, 回転数14000 rpm)<br>2) 振とう機: レシプロシェーカーSR-2W (使用時振動数300 rpm) タイテック製<br>3) ガラス繊維ろ紙: GFP- 60 桐山製作所製<br>4) ブフナー漏斗: SU 97 桐山製作所製<br>5) ロータリーエバポレーター: R-200 BÜCHI製<br>6) 多機能カラム: MultiSep 226 AflaZON+カートリッジ Romer Labs製<br>7) 遠心分離器: Model 1-14 久保田製作所製<br>8) 高速遠心分離器: H-36 コクサン製<br>9) 液体クロマトグラフ質量分析計:<br>液体クロマトグラフ部: Prominence 島津製作所製<br>質量分析計部: LCMS-2010EV 島津製作所製<br>10) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計:<br>液体クロマトグラフ部: ACQUITY UPLC System Waters製<br>質量分析計部: Xevo TQD LC/MS/MS System Waters製  |
| フモニシンB <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 及びB <sub>3</sub> | 1) 粉碎機: ZM-200 Retsch製 (1 mmスクリーン, 回転数14000 rpm)<br>2) 振とう機: レシプロシェーカーSR-2W (使用時振動数300 rpm) タイテック製<br>3) ガラス繊維ろ紙: GFP- 60 桐山製作所製<br>4) ブフナー漏斗: SU 97 桐山製作所製<br>5) pHメーター: D-52 堀場エステック製<br>6) ロータリーエバポレーター: R-200 BÜCHI製<br>7) 多機能カラム: MultiSep 211 Fumカートリッジ Romer Labs製<br>8) 吸引マニホールド: GL-SPE ジーエルサイエンス製<br>9) 遠心分離器: Model 1-14 久保田製作所製<br>10) 高速遠心分離器: H-36 コクサン製<br>11) 液体クロマトグラフ質量分析計:<br>液体クロマトグラフ部: Prominence 島津製作所製<br>質量分析計部: LCMS-2010EV 島津製作所製<br>12) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計:<br>液体クロマトグラフ部: ACQUITY UPLC System Waters製<br>質量分析計部: Xevo TQD LC/MS/MS System Waters製 |
| プロピレングリコール  | 1) 粉碎機: ZM-200 Retsch製 (1 mmスクリーン, 回転数14000 rpm)<br>2) 振とう機: ストロングシェイカーSR-2DW タイテック製(使用時振動数280 rpm)<br>3) 超音波洗浄器: US-2 エスエヌディ製<br>4) グラファイトカーボントリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム多機能カラム(充てん剤量500 mg/500 mg/500 mg): Supelclean Envi-Carb II /SAX/PSA Sigma-Aldrich製<br>5) ガスクロマトグラフ質量分析計:<br>ガスクロマトグラフ部: GC-2010 島津製作所製<br>質量分析計部: GCMS-QP2010 島津製作所製  |

## 2.4 定量方法

### 1) ゼアラレノン

検査法に既記載の液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法（以下「ゼアラレノン収載法」という。）に準拠した。

ゼアラレノン収載法では、1回目の振とうはアセトニトリル-水（21+4）75 mL を、2回目の振とうはアセトニトリル-水（21+4）50 mL をそれぞれ加えて行い、200 mL の全量フラス

コに定容することとなっているが、分析試料が抽出溶媒を吸収して振とうができない場合には、抽出溶媒量等を以下のように変更した。

- i 分析試料が抽出溶媒を吸収して 1 回目の振とうができない場合はアセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を、2 回目の振とうができない場合はアセトニトリル-水 (21+4) 80 mL を加えるよう変更した。
- ii 1 回目の振とうを 100 mL でも行えない場合は、アセトニトリル-水 (21+4) 120 mL を、2 回目の振とうはアセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加え、250 mL の全量フラスコに定容するように変更した。さらに MultiSep からの流出液 3 mL のうち 2 mL 採るところを 2.5 mL に変更した。

また、液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）による測定において、ゼアラレノンの保持時間にピークが認められた場合には、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）を用いて下記の測定条件で測定を行い、当該ピークがゼアラレノンであることを確認した。

#### 測定条件

（液体クロマトグラフ部）

カラム：ZORBAX Eclipse XDB-C18（内径 4.6 mm，長さ 150 mm，粒径 5  $\mu$ m） Agilent Technologies 製

溶離液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (9+1)（1 min 保持）→19 min→10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (1+4)（15 min 保持）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部）

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

イオン源温度：150 °C

デソルベーションガス：N<sub>2</sub>（800L/h，400 °C）

キャピラリー電圧：0.6 kV

コーンガス：N<sub>2</sub>（50 L/h）

コーン電圧：表 4 のとおり

コリジョンガス：Ar（0.4 Pa）

コリジョンエネルギー：表 4 のとおり

モニターイオン：表 4 のとおり

表 4 確認方法における MS/MS 測定条件

| かび毒名   | 測定モード | プリカーサーイオン<br>( <i>m/z</i> ) | プロダクトイオン              |                       | コーン電圧<br>(V) | コリジョンエネルギー<br>(eV) |
|--------|-------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|--------------------|
|        |       |                             | 定量用<br>( <i>m/z</i> ) | 確認用<br>( <i>m/z</i> ) |              |                    |
| ゼアラレノン | —     | 317                         | 175                   | —                     | 52           | 24                 |
|        |       |                             | —                     | 131                   | 52           | 32                 |

2) フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>

検査法に既記載のフモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法（以下「フモニシン収載法」という。）に準拠した。

フモニシン収載法では、1 回目の振とうはアセトニトリル-水（1+1）100 mL を、2 回目の振とうはアセトニトリル-水（1+1）50 mL をそれぞれ加えて行い、200 mL の全量フラスコに定容することとなっているが、分析試料が抽出溶媒を吸収し 2 回目の振とうができなかった場合には、アセトニトリル-水（1+1）80 mL を加えるよう変更した。

また、LC-MS による測定において、フモニシンの保持時間にピークが認められた場合には、LC-MS/MS を用いて下記の測定条件で測定を行い、当該ピークがフモニシンであることを確認した。

## 測定条件

（液体クロマトグラフ部）

カラム：ZORBAX Eclipse XDB-C18（内径 2.1 mm，長さ 150 mm，粒径 5 μm） Agilent Technologies 製

溶離液：0.1 v/v%ギ酸溶液-0.1 v/v%ギ酸アセトニトリル（3+1）→5 min →（1+1）（3 min 保持）→2 min→（3+1）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部）

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法

イオン源温度：150 °C

デソルベーションガス：N<sub>2</sub>（800 L/h，400 °C）

キャピラリー電圧：0.6 kV

コーンガス：N<sub>2</sub>（50 L/h）

コーン電圧：表 5 のとおり

コリジョンガス：Ar（0.4 Pa）

コリジョンエネルギー：表 5 のとおり

モニターイオン：表 5 のとおり

表 5 確認方法における MS/MS 測定条件

| かび毒名                | 測定モード | プリカーサーイオン<br>( <i>m/z</i> ) | プロダクトイオン              |                       | コーン電圧<br>(V) | コリジョンエネルギー<br>(eV) |
|---------------------|-------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|--------------------|
|                     |       |                             | 定量用<br>( <i>m/z</i> ) | 確認用<br>( <i>m/z</i> ) |              |                    |
| フモニシンB <sub>1</sub> | +     | 722                         | 334                   | —                     | 40           | 40                 |
|                     |       |                             | —                     | 352                   | 38           | 38                 |
| フモニシンB <sub>2</sub> | +     | 706                         | 336                   | —                     | 34           | 34                 |
|                     |       |                             | —                     | 354                   | 32           | 32                 |
| フモニシンB <sub>3</sub> | +     | 706                         | 336                   | —                     | 34           | 34                 |
|                     |       |                             | —                     | 354                   | 32           | 32                 |

### 3) プロピレングリコール

検査法に既収載のガスクロマトグラフ質量分析計による単成分分析法（以下「プロピレングリコール収載法」という。）に準拠した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 妨害物質の検討

各成分に係る妨害物質の検討結果を以下の 1)~3)に示した。

#### 1) ゼアラレノン

表 1-1 に示した試料を含む 17 検体のスナック製品（成型ジャーキー（犬用）11 検体，成型ジャーキー（猫用）1 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）3 検体，素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）1 検体及び菓子類（犬用）1 検体）を用い，ゼアラレノン収載法により調製した試料溶液を LC-MS に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認した。その結果，検討したスナック製品 4 分類（成型ジャーキー，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）のいずれの試料においてもゼアラレノンの定量を妨げるピークは認められなかった。なお，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1 検体及び成型ジャーキー（犬用）8 検体において，検出限界以下のゼアラレノンのピークが認められた。検出したピークは，2.4 の 1)に示した LC-MS/MS を用いた測定結果からゼアラレノンと判断した。

一方，粉ミルクについては，ゼアラレノン収載法により調製した試料溶液を LC-MS に注入し測定した結果，著しい感度の低下がおき，その後に測定した試料溶液及び標準液の感度低下も認められたため，以降の検討は実施しなかった。

本検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を図 1 に示した。

また，本分析法により調製した成型ジャーキー（犬用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）及び菓子類（犬用）のブランク試料溶液にゼアラレノンとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.25 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加したマトリックス標準液について，本法に従って調製した同濃度のゼアラレノン標準液に対するピーク面積比を確認したところ，ピーク面積比はいずれも 106 %であり，ゼアラレノンは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

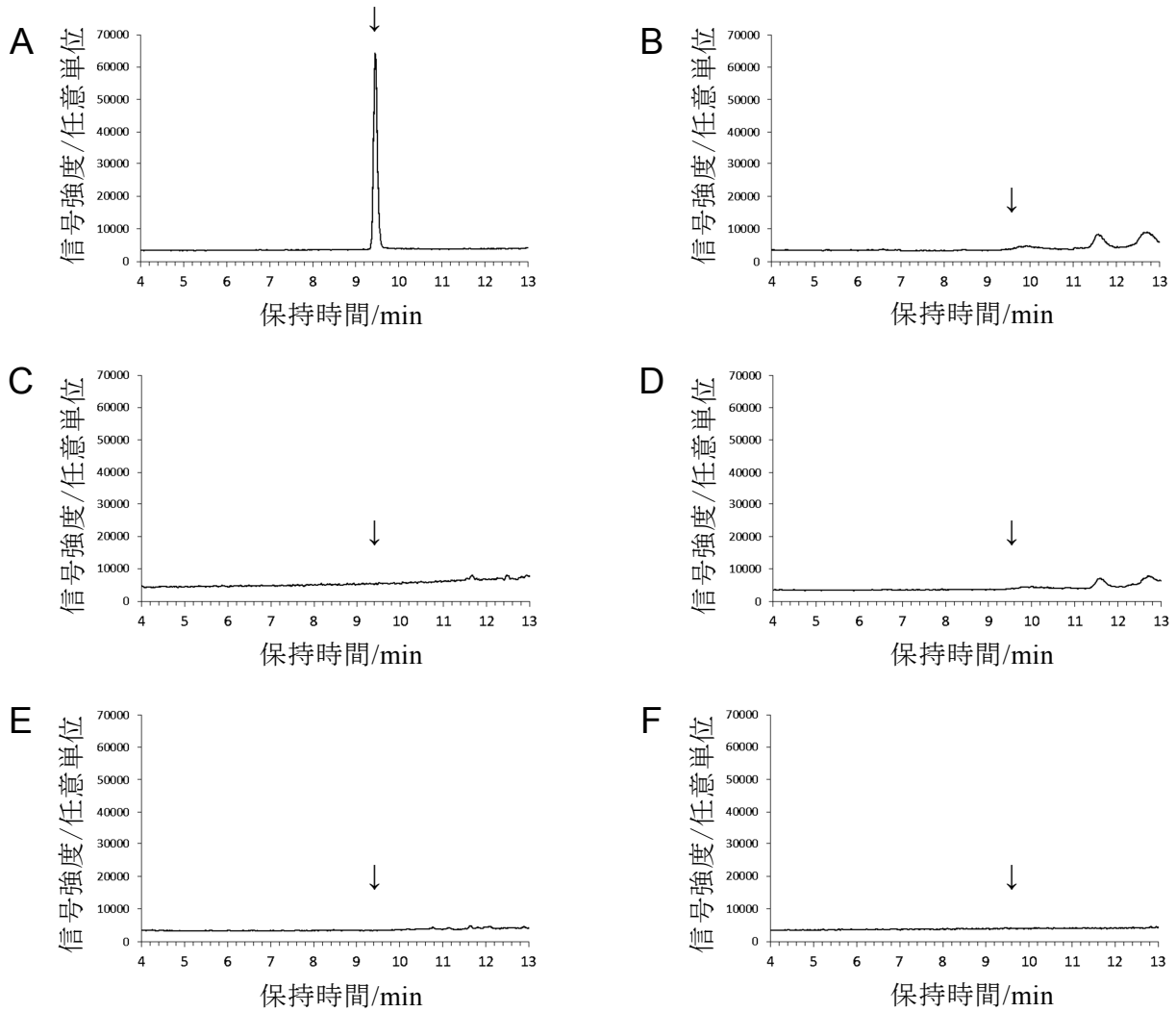


図1 ゼアラレノン収載法の妨害物質の検討時に得られた選択イオン検出クロマトグラムの例

(↓: ゼアラレノンの保持時間を示す. スケールは全図共通. )

- A: 標準液 (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : ゼアラレノンとして 0.5 ng )
- B: 成型ジャーキー (犬用)
- C: 成型ジャーキー (猫用)
- D: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- E: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)
- F: 菓子類 (犬用ビスケット)



2) フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>

表 1-2 に示した試料を含む 17 検体のスナック製品（成型ジャーキー（犬用）11 検体，成型ジャーキー（猫用）1 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）3 検体，素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）1 検体及び菓子類（犬用ビスケット）1 検体）を用い，フモニシン収載法により調製した試料溶液を LC-MS に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認した．その結果，検討したスナック製品 4 分類（成型ジャーキー，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）のいずれの試料においてもフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> の定量を妨げるピークは認められなかった．なお，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1 検体及び成型ジャーキー（犬用）9 種類において，検出限界以下のフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 又は B<sub>3</sub> のピークが認められた．検出したピークは，2.4 の 2) に示した LC-MS/MS を用いた測定結果からフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 又は B<sub>3</sub> と判断した．

一方，粉ミルクについては，ガラス繊維ろ紙でろ過が行えず，フモニシン収載法による試料溶液の調製が行えなかったため，適用は不可と考えられた．

本検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を図 2 に示した．

また，本分析法により調製した成型ジャーキー（犬用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）及び菓子類（犬用ビスケット）のブランク試料溶液に各フモニシンとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.3 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加したマトリックス標準液について，本法に従って調製した同濃度の各フモニシン標準液に対するピーク面積比を確認したところ，ピーク面積比は 101~108 % であり，各フモニシンは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった．

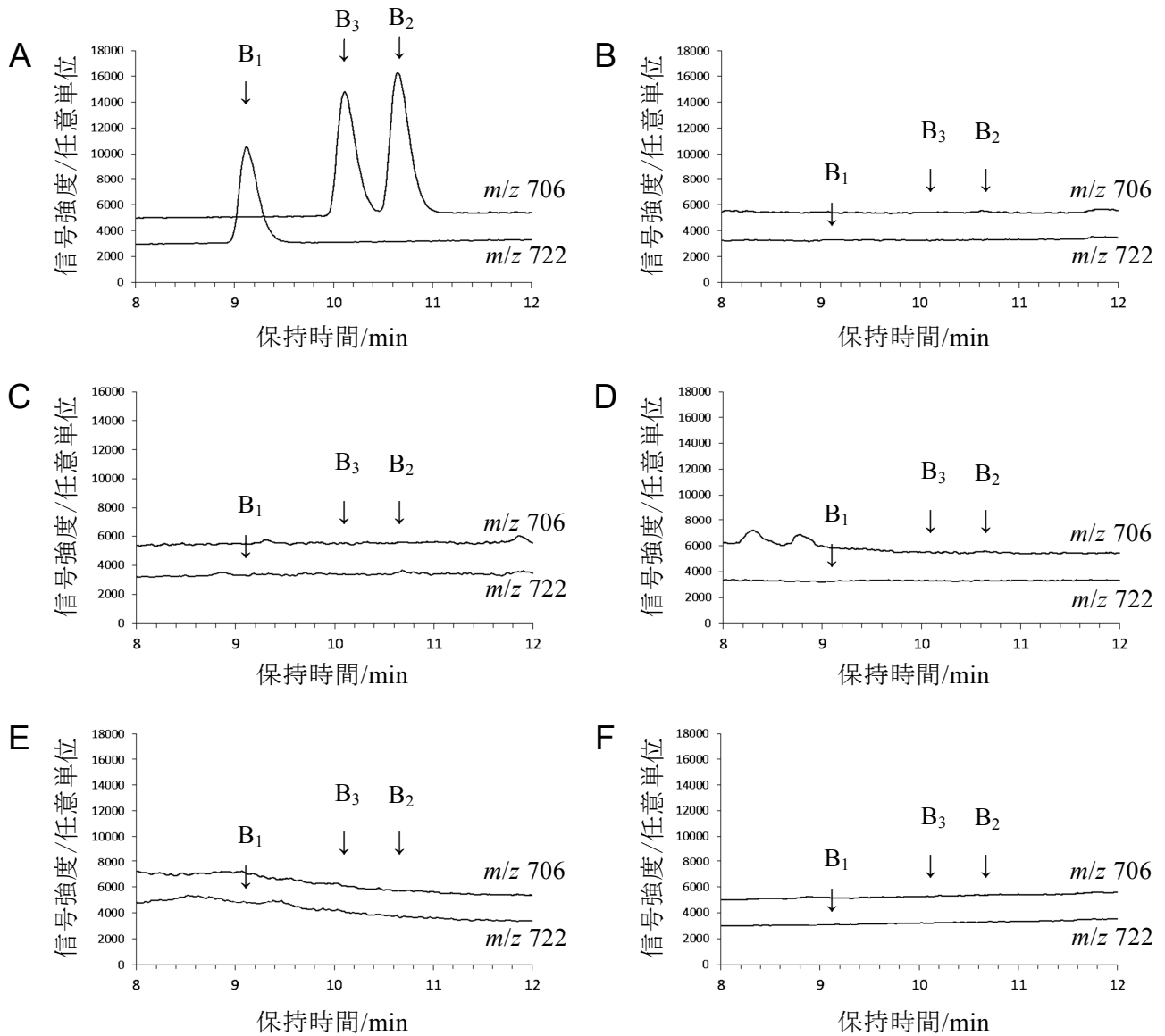


図2 フモニシン収載法の妨害物質の検討時に得られた選択イオン検出クロマトグラムの例

(↓B<sub>1</sub>, ↓B<sub>2</sub>及び↓B<sub>3</sub>は、それぞれフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>及び B<sub>3</sub>の保持時間を示す。

スケールは全図共通。ベースラインはシフトさせている。)

- A: 標準液 (0.05 μg/ mL : フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>及び B<sub>3</sub>として各 0.25 ng)
- B: 成型ジャーキー (犬用)
- C: 成型ジャーキー (猫用)
- D: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- E: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)
- F: 菓子類 (犬用ビスケット)

### 3) プロピレングリコール

表 1-3 に示した試料を含む 22 検体のスナック製品（成型ジャーキー（犬用）11 検体，成型ジャーキー（猫用）4 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）3 検体及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）4 検体）を用い，プロピレングリコール収載法により調製した試料溶液をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認した．その結果，検討したスナック製品 3 分類（成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ））のいずれの試料においてもプロピレングリコールの定量を妨げるピークは認められなかった．なお，成型ジャーキー（犬用）4 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1 検体及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）2 検体から定量限界（下限）以上のプロピレングリコールのピークが検出され，成型ジャーキー（猫用）1 検体から検出限界以上定量限界（下限）未満のプロピレングリコールのピークが検出された．検出したピークは，2 つの確認イオンの強度比からプロピレングリコールと判断した．

一方，菓子類及び粉ミルクについては，水膨潤させた試料が高い粘性を持ち，遠心沈殿管の壁面に貼り付いてヘキサンの混合が行えなかったため，本法は適用できなかった．

本検討で得られたクロマトグラムの一例を図 3 に示した．

また，本分析法により調製した成型ジャーキー（犬用），成型ジャーキー（猫用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）のブランク試料溶液にプロピレングリコールとして 500 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 50 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加したマトリックス標準液について，本法に従って調製した同濃度のプロピレングリコール標準液に対するピーク面積比を確認したところ，ピーク面積比は 101~112 %であり，プロピレングリコールは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった．

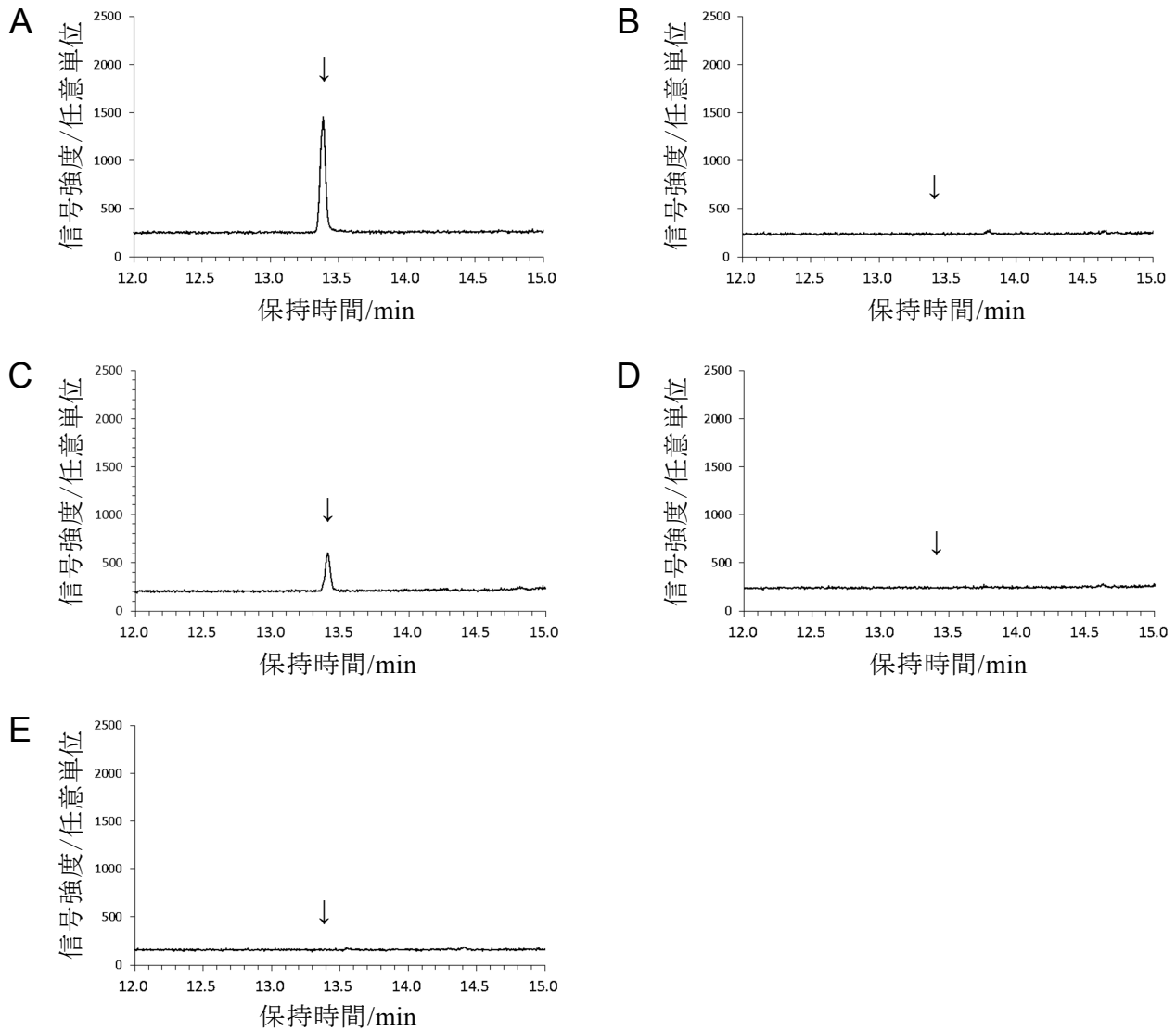


図3 プロピレングリコール収載法の妨害物質の検討時に得られた  
選択イオン検出クロマトグラムの例

(↓: プロピレングリコールの保持時間を示す. スケールは全図共通.)

- A: 標準液 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : プロピレングリコールとして 5 ng)
- B: 成型ジャーキー (犬用)
- C: 成型ジャーキー (猫用)
- D: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- E: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)

### 3.2 添加回収試験

各成分に係る添加回収試験の結果を以下の 1)~3)に示した.

#### 1) ゼアラレノン

表 1-1 に示した成型ジャーキー (犬用), 成型ジャーキー (猫用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用), 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用) 及び菓子類 (犬用ビスケット) にゼアラレノンとして各 1 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.25 及び

0.05  $\mu\text{g/mL}$  相当量) を添加した試料を用い、ゼアラレノン収載法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 6-1 のとおり、ゼアラレノンの平均回収率は 86.8~110 %，その繰返し精度は  $\text{RSD}_r$  として 17 %以下であった。

得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を図 4 に示した。

表 6-1 ゼアラレノンの添加回収試験結果

| 添加濃度<br>(mg/kg) | 試料                    | 繰返し数 | 添加回収率<br>(%) | 繰返し精度<br>$\text{RSD}_r$ (%) |
|-----------------|-----------------------|------|--------------|-----------------------------|
| 1.0             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 102          | 4.3                         |
|                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 93.7         | 4.4                         |
|                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 95.1         | 6.1                         |
|                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 105          | 6.2                         |
|                 | 菓子類(犬用ビスケット)          | 5    | 101          | 6.4                         |
| 0.2             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 95.8         | 8.4                         |
|                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 101          | 4.1                         |
|                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 110          | 2.2                         |
|                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 97.7         | 4.4                         |
|                 | 菓子類(犬用ビスケット)          | 5    | 86.8         | 17                          |

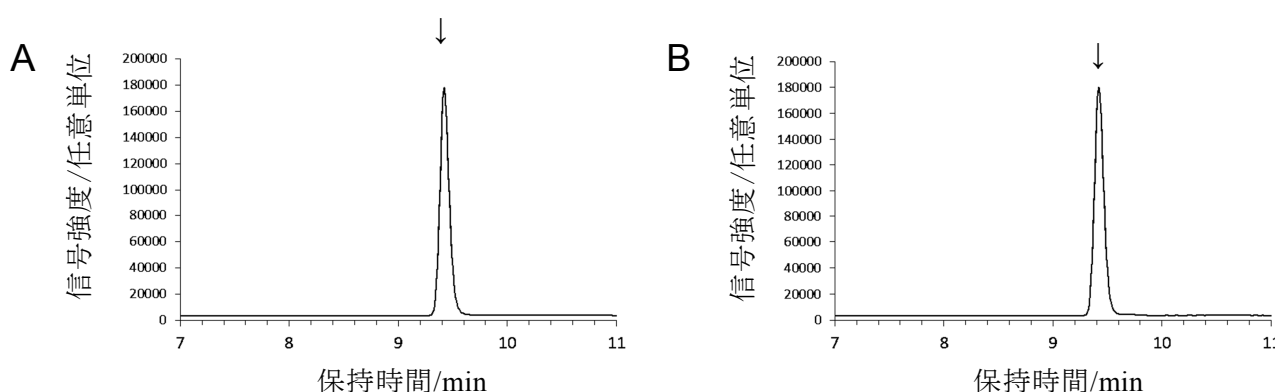


図 4 ゼアラレノンの添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例

(↓: ゼアラレノンのピークを示す. スケール両図共通. )

A: 標準液 (0.25  $\mu\text{g/mL}$ : ゼアラレノンとして 2.5 ng)

B: 成型ジャーキー (犬用) (試料中 1 mg/kg 相当量添加: 最終試料溶液中で 0.25  $\mu\text{g/mL}$  相当量)

## 2) フモニシン $\text{B}_1$ , $\text{B}_2$ 及び $\text{B}_3$

表 1-2 に示した成型ジャーキー (犬用), 成型ジャーキー (猫用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用), 素材乾燥ジャーキー (猫用) 及び菓子類 (犬用ビスケット) にフモニシン  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$  及び  $\text{B}_3$  としてそれぞれ 1 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.3 及び 0.06  $\mu\text{g/mL}$  相当量) 添加した試料を用い、フモニシン収載法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 6-2 のとおりであり、平均回収率 37.2~103 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 23 %以下であった。低回収率の傾向が認められ、フモニシン収載法のスナック製品への適用は難しく、スナック製品に適用する別の定量方法の検討が必要と考えられた。

本検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を図 5 に示した。

表 6-2 フモニシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> の添加回収試験結果

| 添加成分名                   | 添加濃度<br>(mg/kg) | 試料                    | 繰返し数 | 添加回収率<br>(%) | 繰返し精度<br>$RSD_r$ (%) |
|-------------------------|-----------------|-----------------------|------|--------------|----------------------|
| フモニシン<br>B <sub>1</sub> | 1.0             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 50.9         | 19                   |
|                         |                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 84.5         | 11                   |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 43.6         | 13                   |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 84.9         | 6.2                  |
|                         |                 | 菓子類(犬用ビスケット)          | 5    | 66.5         | 9.5                  |
|                         | 0.2             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 82.6         | 4.0                  |
|                         |                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 77.7         | 2.4                  |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 52.1         | 6.4                  |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 103          | 13                   |
|                         |                 | 菓子類(犬用ビスケット)          | 5    | 72.1         | 21                   |
| フモニシン<br>B <sub>2</sub> | 1.0             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 49.9         | 14                   |
|                         |                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 82.2         | 11                   |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 37.2         | 11                   |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 63.2         | 5.4                  |
|                         |                 | 菓子類(犬用ビスケット)          | 5    | 65.3         | 7.9                  |
|                         | 0.2             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 75.8         | 2.6                  |
|                         |                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 74.7         | 2.9                  |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 48.4         | 6.7                  |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 63.0         | 5.8                  |
|                         |                 | 菓子類(犬用ビスケット)          | 5    | 70.4         | 23                   |
| フモニシン<br>B <sub>3</sub> | 1.0             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 51.6         | 15                   |
|                         |                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 89.7         | 11                   |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 40.1         | 12                   |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 67.7         | 5.3                  |
|                         |                 | 菓子類(犬用ビスケット)          | 5    | 66.3         | 8.2                  |
|                         | 0.2             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 70.0         | 3.2                  |
|                         |                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 76.3         | 2.8                  |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 45.2         | 9.3                  |
|                         |                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 77.2         | 9.1                  |
|                         |                 | 菓子類(犬用ビスケット)          | 5    | 71.0         | 21                   |

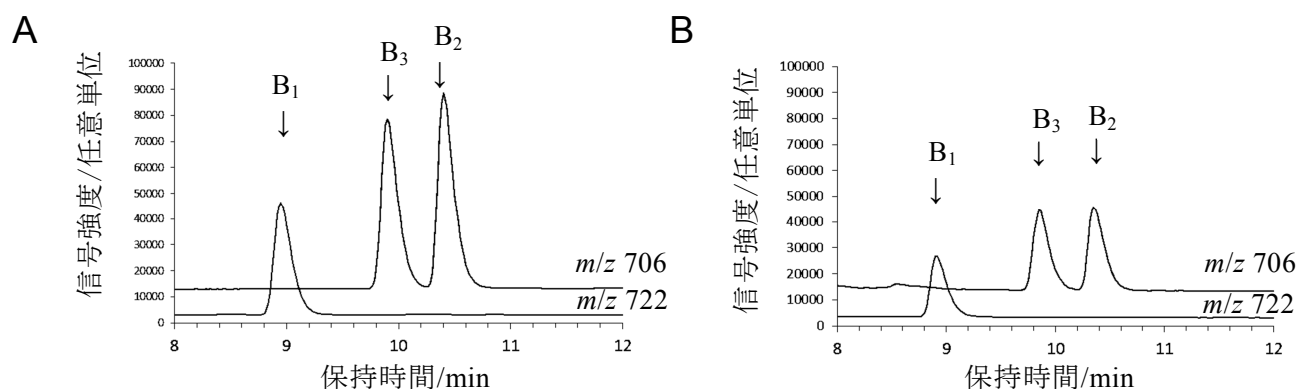


図5 フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラム例  
 (↓B<sub>1</sub>, ↓B<sub>2</sub> 及び ↓B<sub>3</sub> は、それぞれフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> の保持時間を示す。  
 スケールは両図共通。ベースラインはシフトさせている。)

A: 標準液 (0.3 µg/mL : フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> として各 1.5 ng)

B: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用) (1 mg/kg 相当量添加 : 最終試料溶液中で 0.3 µg/mL 相当量)

### 3) プロピレングリコール

表 1-3 に示した成型ジャーキー (犬用), 成型ジャーキー (猫用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用) 及び素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用) にプロピレングリコールとして 5000 及び 500 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 50 及び 5 µg/mL 相当量) 添加した試料を用いて, プロピレングリコール収載法により 5 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を検討した。その結果は表 6-3 に示したとおり, プロピレングリコールの平均回収率は 98.4~104 %, 繰返し精度は RSD<sub>r</sub> として 2.9 % 以下であった。

得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を図 6 に示した。

表 6-3 プロピレングリコールの添加回収試験結果

| 添加濃度<br>(mg/kg) | 試料                    | 繰返し数 | 添加回収率<br>(%) | 繰返し精度<br>RSD <sub>r</sub> (%) |
|-----------------|-----------------------|------|--------------|-------------------------------|
| 5000            | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 98.4         | 2.0                           |
|                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 100          | 1.2                           |
|                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 103          | 2.9                           |
|                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 99.3         | 1.7                           |
| 500             | 成型ジャーキー(犬用)           | 5    | 102          | 1.5                           |
|                 | 成型ジャーキー(猫用)           | 5    | 97.0         | 2.3                           |
|                 | 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) | 5    | 102          | 2.2                           |
|                 | 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) | 5    | 104          | 2.6                           |

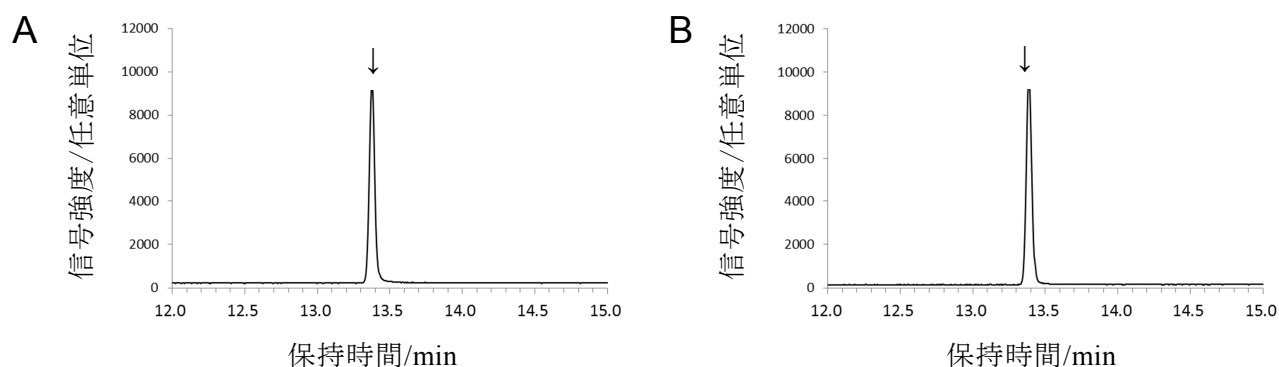


図6 プロピレングリコール添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの例

(↓: プロピレングリコールのピークを示す. スケールは両図共通.)

A: 標準液 (50 µg/mL: プロピレングリコールとして 50 ng)

B: 成型ジャーキー (猫用) (5000 mg/kg 相当量添加: 最終試料溶液中で 50 µg/mL 相当量)

### 3.3 定量限界 (下限) 及び検出限界の検討

各分析法の定量限界 (下限) 及び検出限界については, 今回の添加回収試験における平均回収率及び繰返し精度の標準偏差並びに検査法第 11 章 3 (4) から総合的に判断することとした.

その結果, 表 7 のとおり, ゼアラレノン収載法のスナック製品 4 分類 (成型ジャーキー, 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ) 及び菓子類) における定量限界 (下限) 及び検出限界は, ドライ製品, セミドライ製品及びウェット製品における定量限界 (下限) 及び検出限界を変更することなく適用できると考えられた. 同様に, プロピレングリコール収載法のスナック製品 3 分類 (成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)) における定量限界 (下限) 及び検出限界は, ドライ製品及びセミドライ製品における定量限界 (下限) 及び検出限界を変更することなく適用できると考えられた.

表 7 スナック製品における各成分の定量限界 (下限) 及び検出限界

| 成分         | 定量限界<br>(下限) | 検出限界       |
|------------|--------------|------------|
| ゼアラレノン     | 0.2 mg/ kg   | 0.1 mg/ kg |
| プロピレングリコール | 500 mg/ kg   | 200 mg/ kg |

## 4 まとめ

かび毒 (ゼアラレノン並びにフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>) 及び添加物 (プロピレングリコール) の検査法収載法のスナック製品 5 分類への適用性の確認について検討した結果, 表 8 のとおり, 適用範囲の追加が可能であった. なお, ゼアラレノンについては, ゼアラレノン収載法の一部変更を要した.

フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> については, スナック製品 5 分類に適用する別の定量方法の検討が必要と考えられた.

また, ゼアラレノン収載法は粉ミルクに対して, プロピレングリコール収載法は菓子類及び粉ミルクに対して, それぞれ試料溶液測定時の感度低下及び脱脂操作が行えないため適用不可であった.



表 8 検討した各分析法の追加適用範囲

| 成分         | 分析法             | 追加可能な適用範囲                              |
|------------|-----------------|--|
| ゼアラレノン     | 検査法第2章第1節7を一部変更 | 成型ジャーキー，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類 |
| プロピレングリコール | 検査法第7章6のとおり     | 成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）     |

## 文 献

- 1) 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).
- 2) U.S. Food and Drug Administration: FDA releases progress on jerky pet treat investigation, <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm371450.htm>, cited 15 Apr. 2016.
- 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).