

## 技術レポート

## 5 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品への適用のための妥当性確認

～有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法～

鈴木 知華\*, 奥富 幸\*, 高橋 亜紀子\*

## Validation Study on Application of the Simultaneous Determination Method of Organochlorine Pesticides by GC to Snack Type Pet Food

Chika SUZUKI\*, Yuki OKUTOMI\* and Akiko TAKAHASHI\*

(\* Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

The applicability of a simultaneous determination method of organochlorine pesticides in dry and semi-dry type pet food using a gas chromatograph equipped with an electron capture detector (GC-ECD) to snack type pet food was investigated.

Nineteen organochlorine pesticides (aldrin,  $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -BHC,  $\delta$ -BHC, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, dieldrin, endrin, hexachlorobenzene, heptachlor, heptachlor epoxide, *trans*-heptachlor epoxide, methoxychlor and nitrofen) were extracted by adding acetonitrile-water (3:1) and acetonitrile to sample. The extracted solution was filtered and the filtrate was purified with a SPE column (Chem Elut, 20 mL, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), gel permeation chromatography (GPC) and a SPE column (Sep-Pak Plus Florisil cartridge, Waters Corporation; Milford, MA, USA) and injected into the GC-ECD to determine the levels of the nineteen pesticides. The GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-1701, 0.25 mm i.d.  $\times$  30 m, film thickness 0.25  $\mu$ m from Agilent Technologies Inc.).

Spike tests were conducted on formed jerky, dried jerky (both hard and soft), biscuit and milk powder spiked with 0.002 or 0.1 mg/kg of six DDT related compounds, 0.01 or 0.05 mg/kg of methoxychlor and 0.002 or 0.01 mg/kg of other twelve compounds. Recoveries ranged from 81.0 to 118 % for formed jerky, dried jerky and biscuit, and relative standard deviations of repeatability (RSD<sub>r</sub>) were not more than 11 %. Meanwhile, recoveries ranged from 46.8 to 170 % and RSD<sub>r</sub> were not more than 15 % for milk powder.

This method was validated for analysis of organochlorine pesticides in snack type pet food except for milk powder.

Key words: organochlorine pesticides; gas chromatograph equipped with electron capture detector (GC-ECD); gel permeation chromatography (GPC); snack type pet food

キーワード：有機塩素系農薬；電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ；ゲル浸透クロマトグラフィー；愛玩動物用飼料（スナック製品）

\* 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

## 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」<sup>1)</sup>（以下「検査法」という。）に記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、主に主食として用いられるものを先行して整備を進めてきた。しかしながら、平成 25 年 10 月、米国 FDA が、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公表した<sup>2)</sup>ことを受け、現在では成型ジャーキー、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（以下「スナック製品 5 分類」という。）の妥当性確認も実施している。平成 25 年度以前に検査法に記載され、スナック製品 5 分類について妥当性確認を行っていない分析法については、随時、適用範囲拡大のための妥当性確認を行っている。

平成 28 年度は、ドライ製品及びセミドライ製品を対象とする有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その 1）有機塩素系農薬 18 成分同時分析法（以下「有機塩素系農薬収載法」という。）について、スナック製品 5 分類への適用範囲拡大のための妥当性確認を行った。

今回検討した成分のうち、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令<sup>3)</sup>において基準値が定められているものを Table 1 に示した。

Table 1 Maximum limits of organochlorine pesticides in pet food

Pesticides	Maximum limit ( $\mu\text{g/g}$ )
BHC (Total of $\alpha$ -BHC, $\beta$ -BHC, $\gamma$ -BHC and $\delta$ -BHC)	0.01
DDT (Total of $p,p'$ -DDD, $p,p'$ -DDE, $p,p'$ -DDT and $o,p'$ -DDT)	0.1
Total of aldrin and dieldrin	0.01
Endrin	0.01
Total of heptachlor and heptachlor epoxide	0.01

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

市販のスナック製品 5 分類の愛玩動物用飼料を試料に用い、それぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。ジャーキーで有姿のままでは粉砕が困難な試料は、はさみ等を用いて細断したのち粉砕した。

検討に用いた試料の分類、種類及びその原材料名を Table 2 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。

Table 2 Ingredients list of snack type pet foods used in this study

Classification	Type	Ingredients
Formed jerky (about 20~35 % moisture content)	Formed jerky (for dogs)	Chicken white meat, white fish, corn starch, non-glutinous rice, wheat flour, powdered mashed potato, salt, vegetable oil (contain soybean oil and canola oil), powdered starch syrup, collagen peptide (salmon), wheat protein, glycerin, propylene glycol, pH adjuster, preservative (potassium sorbate), antioxidants (sodium erythorbate, V. E), color former (sodium nitrite)
	Formed jerky (for cats) 1	Meat (chicken, beef), soybean protein, wheat flour, fish meat, beef tallow, actinidia polygama, glycerin, thickening agent (modified starch), sorbitol, minerals (Ca, P, Na), preservative (sorbic acid, sodium dehydroacetate), seasoning, color former (sodium nitrite), sodium polyacrylate, coloring agents (caramel, food red no.106), V. E
	Formed jerky (for cats) 2	Tuna, chicken, defatted soybean, beef, starches, wheat protein, lard, yeast, salt, oligosaccharide, sorbitol, leavening agent, seasoning, minerals (Ca, P), phosphate (Na, K), sodium lactate, antioxidant (V.C), preservative (sorbic acid), vitamins (V. E, V. A), calcium lactate, color former (sodium nitrite)
	Formed jerky (for cats) 3	Chicken white meat, salt, sorbitol, glycerin, sodium phosphate, antioxidants (V. C), color former (sodium nitrite)
Dried jerky (hard, about 10~15 % moisture content)	Dried jerky (hard) (for dogs)	Chicken white meat, salt
	Dried jerky (soft) (for dogs) 1	Chicken white meat, glycerin, sodium lactate, trehalose, potassium chloride, antioxidants (V. E, sodium erythorbate), sodium phosphate, preservative (potassium sorbate)
Dried jerky (soft, about 25 % moisture content)	Dried jerky (soft) (for dogs) 2	Chicken white meat, glucosamine, fructo-oligosaccharide, glycerin, sodium lactate, trehalose, potassium chloride, antioxidants (V.E, sodium erythorbate), sodium phosphate, preservative (potassium sorbate), pH adjuster, flavoring agent, color former (sodium nitrite)
	Dried jerky (soft) (for dogs) 3	Beef tendon, salt, glycerin, propylene glycol, preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite)
	Dried jerky (soft) (for dogs and cats)	Cod, D-sorbitol
Confectionery	Confectionery (biscuit for dogs) 1	Wheat flour, sugar, vegetable oil, tapioca starch, vegetables (spinach, carrot, pumpkin), milk powder, chicory extracts (containing dietary fiber and oligosaccharide), leavening agent, minerals (Ca, Na), flavoring agent, yucca extracts, coloring agents (food yellow no. 4, food yellow no. 5, food blue no. 1)
	Confectionery (biscuit for dogs) 2	Wheat flour, margarine, granulated sugar, egg, rice germ and soybean fermentation extracts, trees extracts, galactooligosaccharide, whey protein concentrated powder (dairy products), non-fat dry milk, lactose, vegetable oil, sweetener (D-sorbitol), calcium carbonate, green tea extracts, antioxidants (V. E, rosemary extracts)
Milk powder	Milk powder (for dogs) 1	Dry milk (non-fat dry milk, casein), oils and fats (vegetable oil, animal fat, $\gamma$ -linolenic acid), powdered egg yolk, soybean protein, oligosaccharide, L-carnitine, minerals (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), emulsifier, vitamins (V. A, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , V. B <sub>6</sub> , V. B <sub>12</sub> , V. D, V. E, V. K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), flavoring agent, taurine
	Milk powder (for dogs) 2	Milk protein, animal fat, non-fat dry milk, vegetable oil, powdered egg yolk, milk oligosaccharide, dry yeast, pH adjuster, emulsifier, taurine, L-arginine, L-cystine, DHA, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. K, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , pantothenic acid, niacin, V. B <sub>6</sub> , folic acid, carotene, biotin, V.B <sub>12</sub> , V.C, choline), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), nucleotide, flavoring agent (milk cream)

## 2.2 試薬

- 1) アセトニトリル, 塩化ナトリウム, ヘキサン, シクロヘキサン, アセトン及びジエチルエーテルは残留農薬・PCB 試験用を用いた. 2,2,4-トリメチルペンタンは液体クロマトグラフ用を用いた. 水は Milli-Q Integral 5 (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) 各農薬標準品  
各農薬標準品は, Table 3 に示した製造元, 純度の標準品を使用した.

Table 3 Pesticide standards used in this study

Name	Manufacturers	Formula	MW	CAS No.	Purity (%)
Aldrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	364.9	309-00-2	99.0
$\alpha$ -BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	290.8	319-84-6	98.0
$\beta$ -BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	290.8	319-85-7	98.4
$\gamma$ -BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	290.8	58-89-9	98.6
$\delta$ -BHC	Sigma-Aldrich	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	290.8	319-86-8	99.4
<i>o,p'</i> -DDD	Sigma-Aldrich	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>	320.0	53-19-0	99.8
<i>p,p'</i> -DDD	Sigma-Aldrich	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>	320.0	72-54-8	99.5
<i>o,p'</i> -DDE	CHEM SERVICE	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	318.0	3424-82-6	99.5
<i>p,p'</i> -DDE	CHEM SERVICE	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	318.0	72-55-9	99.5
<i>o,p'</i> -DDT	CHEM SERVICE	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	354.5	789-02-6	97.8
<i>p,p'</i> -DDT	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	354.5	50-29-3	98.5
Dieldrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	380.9	60-57-1	99.0
Endrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	380.9	72-20-8	99.5
Heachlorobenzene	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	284.8	118-74-1	99.5
Heptachlor	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub>	373.3	76-44-8	99.0
Heptachlor epoxide	CHEM SERVICE	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub> O	389.3	1024-57-3	99.5
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	CHEM SERVICE	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub> O	389.3	28044-83-9	98.7
Methoxychlor	CHEM SERVICE	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>3</sub> O	345.7	72-43-5	99.3
Nitrofen	Wako Pure Chemical Industries	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	284.1	1836-75-7	99.0

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機 :  
粉砕機 1 : ZM 200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)  
粉砕機 2 : (粉砕機 1 による粉砕前の粗粉砕に必要な応じ使用) : GM 200 Verder Scientific 製 (使用時回転数 2000~8000 rpm)
- 2) 振とう機 : ストロングシェーカー SR-2DW タイテック 製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) : Chem Elut, 20 mL Agilent Technologies 製
- 4) ゲル浸透クロマトグラフ : GPC システム ジーエルサイエンス 製
- 5) メンブランフィルター : Millex-LH (孔径 0.45  $\mu$ m, 直径 25 mm, PTFE 製) Merck Millipore 製
- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム : Sep-Pak Plus Florisil cartridge (充てん剤量 910 mg) Waters 製

- 7) 電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ（以下「GC-ECD」という。）：GC-2010 Plus 島津製作所製
- 8) 溶融石英製キャピラリーカラム（14%シアノプロピルフェニル-86%ジメチルポリシロキサンコーティング）：DB-1701（内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ） Agilent Technologies 製
- 9) 溶融石英製キャピラリーカラム（5%ジフェニル-95%ジメチルポリシロキサンコーティング）：DB-5（内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ） Agilent Technologies 製

#### 2.4 定量方法

定量方法は、検査法第 6 章第 2 節 1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その 1）に従って定量した。

ただし、ドライ製品及びセミドライ製品を対象とする有機塩素系農薬収載法の検量線は、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.01~0.2  $\mu\text{g}$  含有する数点の混合標準液を調製するとなっているが、アルドリン、 $\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHC、*o,p'*-DDD、*p,p'*-DDD、*o,p'*-DDE、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド及び *trans*-ヘプタクロルエポキシドについては、ウェット製品を対象とする検査法第 6 章第 2 節 5 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その 2）（以下「ウェット製品有機塩素系農薬収載法」という。）を検査法に採用する際に、0.005~0.5  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で検量線が作成できることを確認している。ヘキサクロロベンゼン、メトキシクロール及びニトロフェンについては、ウェット製品有機塩素系農薬収載法の分析対象化合物になっていない。今回、有機塩素系農薬収載法におけるメトキシクロール以外の各農薬の定量限界相当濃度 0.005  $\mu\text{g/mL}$  を含む、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 及び 0.2  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬混合標準液を調製し、各農薬の検量線を作成した。

*trans*-ヘプタクロルエポキシドは、ウェット製品有機塩素系農薬収載法の分析対象化合物に含まれ、有機塩素系農薬収載法には分析対象化合物に含まれないが、参考までに検討を行った。

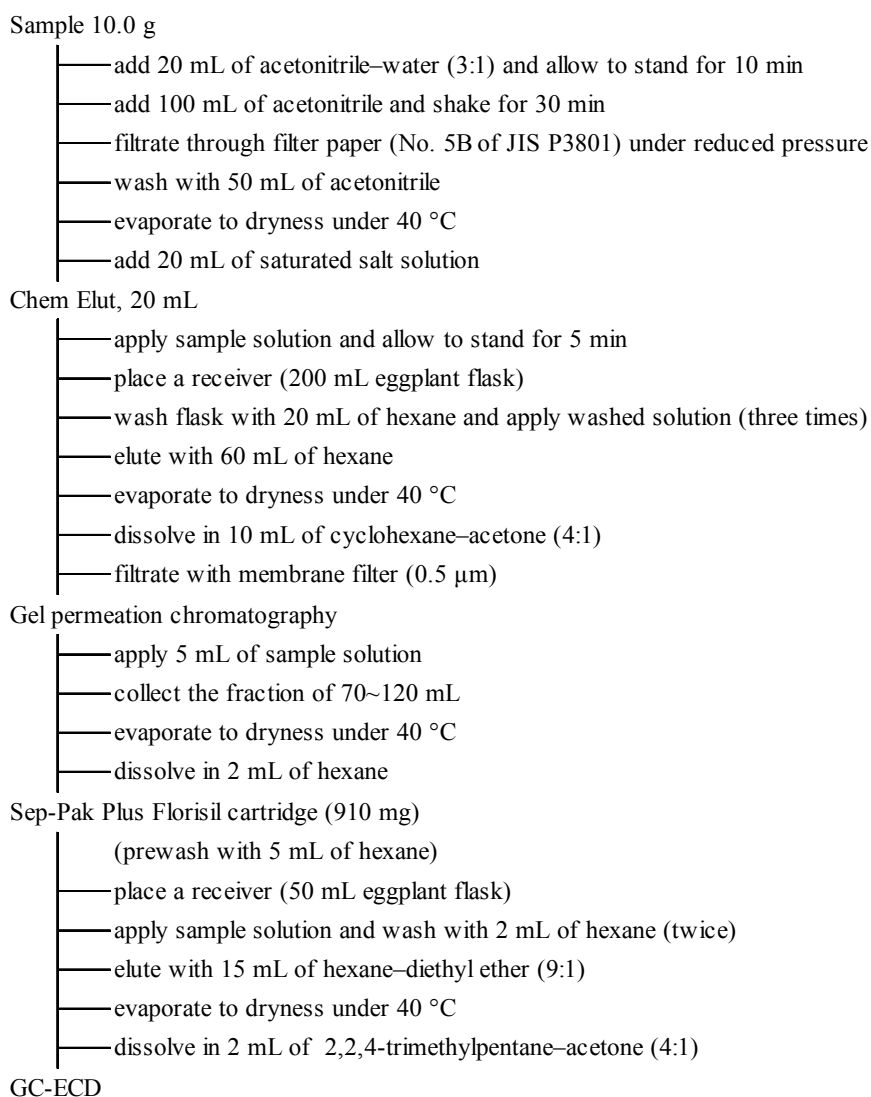
なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。また、ゲル浸透クロマトグラフの条件及び GC-ECD の測定条件を Table 4 及び Table 5 に示した。

Table 4 Operating conditions of gel permeation chromatography (GPC)

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 $\mu\text{m}$ ), Showa Denko
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 $\mu\text{m}$ ), Showa Denko
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	70~120 mL

Table 5 Operating conditions of gas chromatograph equipped with electron capture detector (GC-ECD)

Column	DB-1701 (0.25 mm i.d ×30 m, 0.25 μm film thickness), Agilent Technologies DB-5 (0.25 mm i.d ×30 m, 0.25 μm film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	80 °C (hold for 1 min) → ramp 20 °C/min → 180 °C → ramp 2 °C/min → 260 °C → ramp 5 °C/min → 275 °C (hold for 5 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	280 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Detector	Electron capture detector
Detector temperature	280 °C
Injection volume	1 μL



Scheme 1 Analytical procedure for organochlorine pesticides in dry and semi-dry type pet food

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

1 mL 中にヘキサクロロベンゼン、メトキシクロール及びニトロフェンとしてそれぞれ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 及び 0.2  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬混合標準液を調製し、各標準液各 1  $\mu\text{L}$  をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク高さを用いて検量線を作成した。検量線の一例は Fig. 1-1 のとおりであり、各 0.005~0.2  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として各 0.005~0.2 ng 相当量) の範囲で決定係数 0.99 以上の直線の検量線を示したことから、検量線作成用標準液の最低濃度をウェット製品有機塩素系農薬収載法に合わせることにした。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.002~0.08 mg/kg 含有する分析用試料を有機塩素農薬収載法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

また、筆者らが用いた GC-ECD では低濃度範囲において傾きが変わる傾向が認められ、1 mL 中にヘキサクロロベンゼン、メトキシクロール及びニトロフェンとしてそれぞれ 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 及び 0.025  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬低濃度混合標準液を調製し、同様に検量線を作成した結果、Fig. 1-2 のとおり各 0.005~0.025  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として各 0.005~0.025 ng 相当量) の範囲で決定係数 0.999 以上の直線性を示した。測定に使用する GC-ECD によっては、低濃度範囲で作成した検量線によるヘキサクロロベンゼン、メトキシクロール及びニトロフェンの算出が適すと考えた。

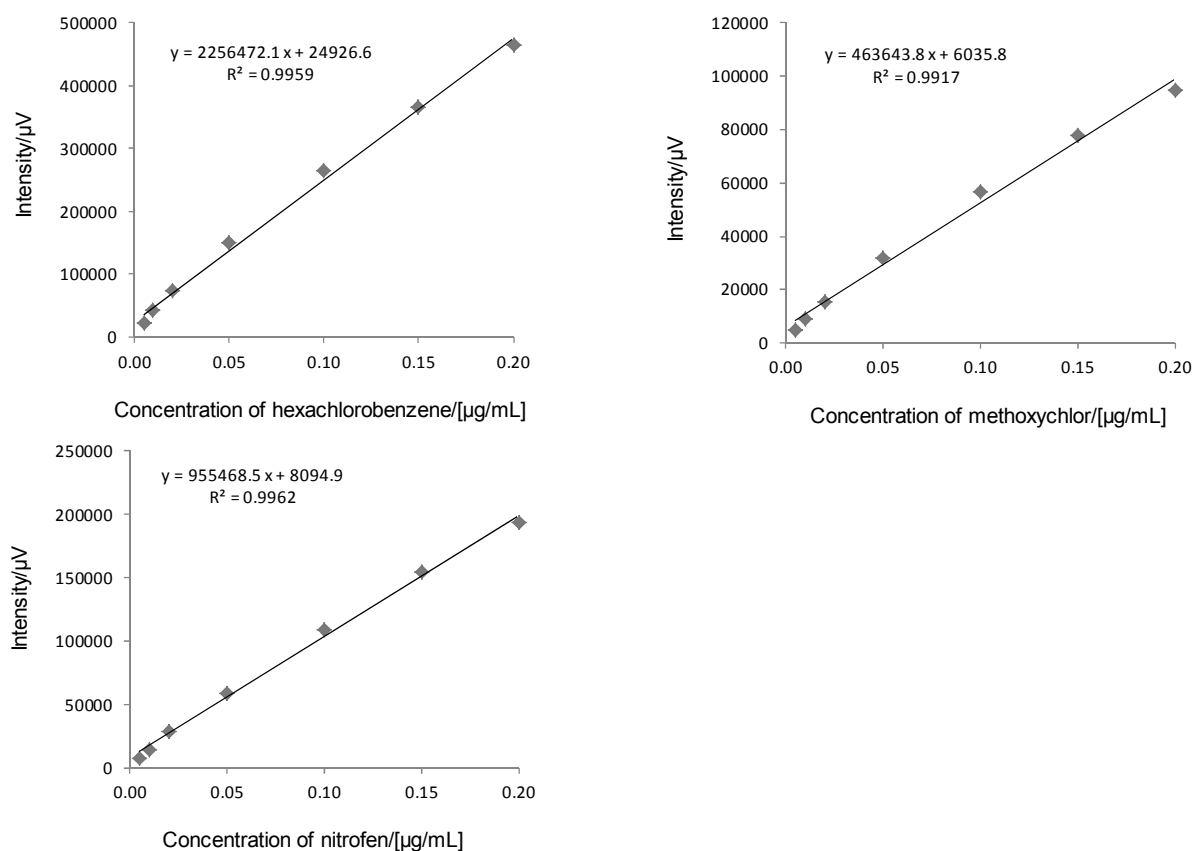


Fig. 1-1 Calibration curves of hexachlorobenzene, methoxychlor and nitrofen by peak height

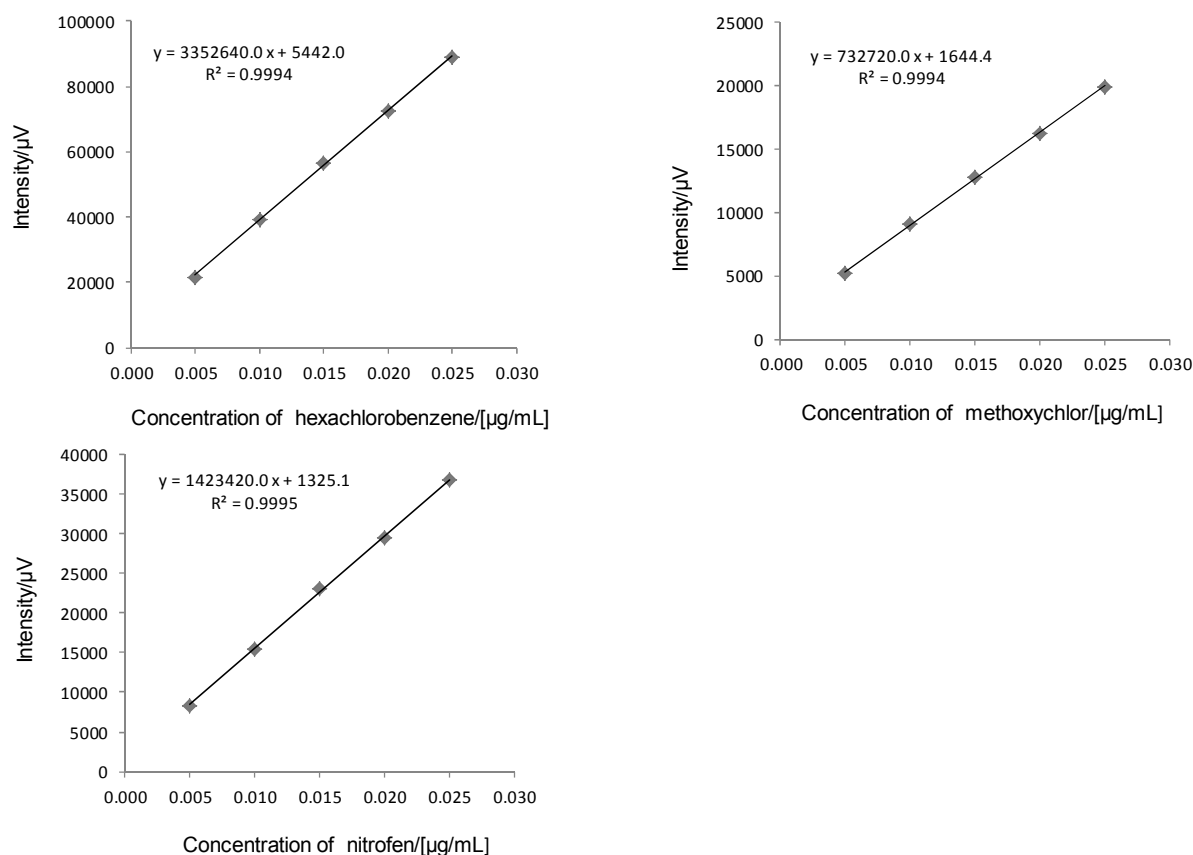


Fig. 1-2 Calibration curves of hexachlorobenzene, methoxychlor and nitrofen by peak height (low concentration)

### 3.2 妨害物質の検討

Table 2 に示した試料を用い、妨害物質の検討を行った。検討に用いた粉ミルク（犬用）2 点については、いずれも抽出溶媒で振り混ぜると固まりが生じ、粉ミルク（犬用）2 では試料溶液を調製出来なかった。粉ミルク（犬用）2 以外の各 1 点を用い、有機塩素系農薬収載法により調製した試料溶液をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムを確認した結果、粉ミルク以外の試料において定量を妨げるピークは認められなかった。粉ミルク（犬用）1 については、抽出溶媒で振り混ぜると固まりが生じ、その後の吸引ろ過、多孔性ケイソウ土カラム処理に時間を要した。粉ミルク（犬用）1 の試料溶液のクロマトグラムは、多くの夾雑ピークが認められた。夾雑ピークの大きさ及び保持時間は、測定の都度変わり、夾雑ピークが測定対象成分であるか妨害ピークであるかの判別が行えなかった。

なお、成型ジャーキー（猫用）2 の試料溶液のクロマトグラムでは、*p,p'*-DDE の保持時間に定量限界濃度未満のピークを、素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用・猫用）の試料溶液のクロマトグラムではヘキサクロロベンゼンの保持時間にヘキサクロロベンゼンの定量限界濃度以上（ヘキサクロロベンゼンとして 0.0071 mg/kg 相当）のピークを検出した。当該試料溶液について測定に用いる溶融石英製キャピラリーカラムを DB-1701 からコーティングの材質が異なる DB-5 に変えて測定し同様の結果となったことから、当該ピークはそれぞれ *p,p'*-DDE 及びヘキサクロロベンゼンであると判断した。

本検討で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。



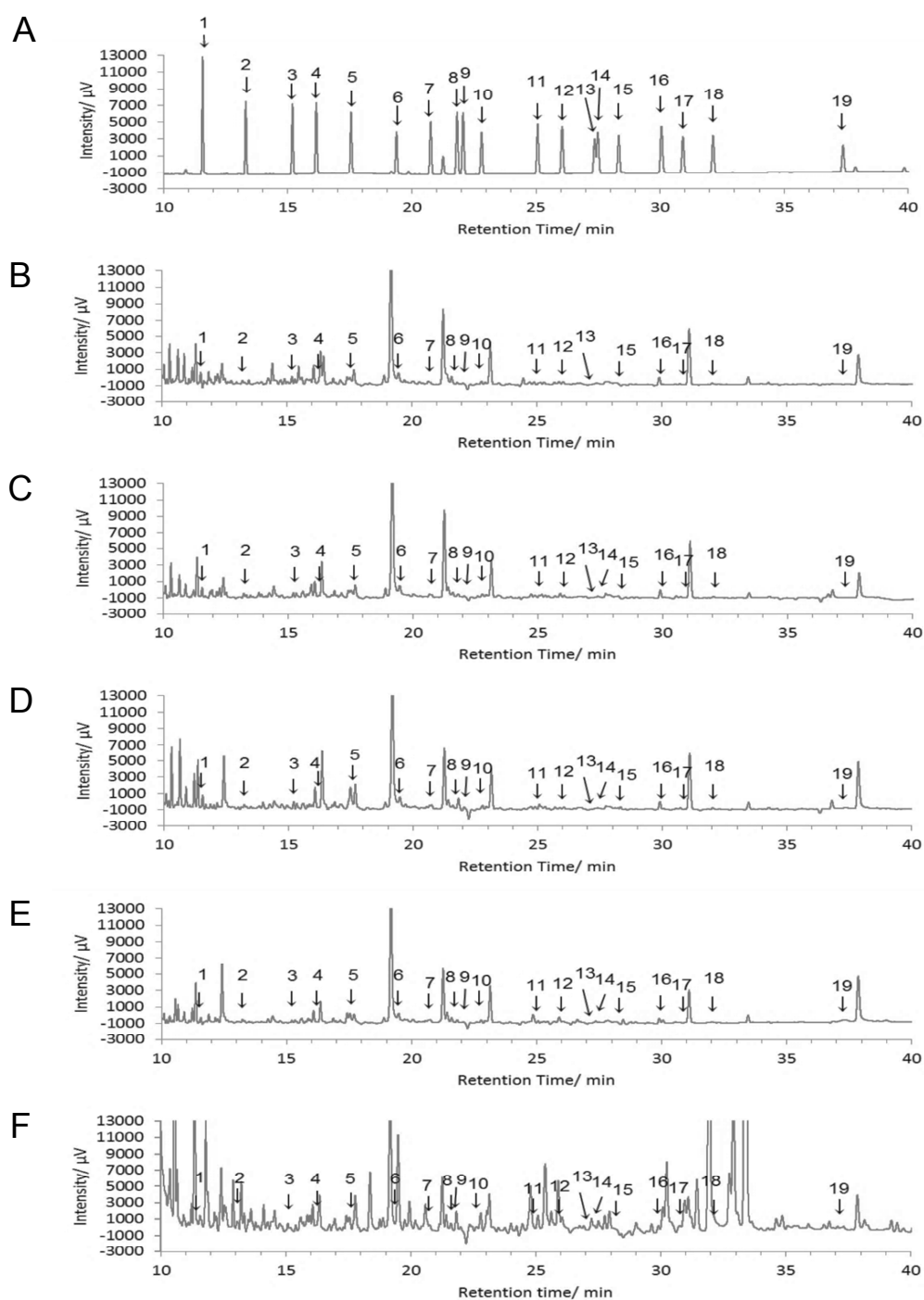


Fig. 2 Chromatograms of standard and blank solutions

(GC-ECD conditions are shown in Table 5. Arrows indicate the retention time of pesticides.)

1 Hexachlorobenzene	6 $\beta$ -BHC	11 <i>p,p'</i> -DDE	16 Nitrofen
2 $\alpha$ -BHC	7 $\delta$ -BHC	12 Dieldrin	17 <i>p,p'</i> -DDD
3 $\gamma$ -BHC	8 Heptachlor epoxide	13 <i>o,p'</i> -DDD	18 <i>p,p'</i> -DDT
4 Heptachlor	9 <i>trans</i> -Heptachlor epoxide (for reference)	14 Endrin	19 Methoxychlor
5 Aldrin	10 <i>o,p'</i> -DDE	15 <i>o,p'</i> -DDT	

A: Standard solution (0.005  $\mu\text{g/mL}$ : 0.005 ng as each pesticide)

B~F: Sample solutions (B: formed jerky (for cats) 3, C: dried jerky (hard) (for dogs), D: dried jerky (soft) (for dogs) 3, E: confectionery (biscuit for dogs) 2 and F: milk powder (for dogs) 1)

### 3.3 添加回収試験

Table 2 に示した成型ジャーキー（猫用）3，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）3，菓子類（犬用ビスケット）2 及び粉ミルク（犬用）1 に，アルドリン， $\alpha$ -BHC， $\beta$ -BHC， $\gamma$ -BHC， $\delta$ -BHC，ディルドリン，エンドリン，ヘキサクロロベンゼン，ヘプタクロル，ヘプタクロルエポキシド，*trans*-ヘプタクロルエポキシド及びニトロフェンとして 0.002 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.005 及び 0.025  $\mu$ g/mL 相当量），*o,p'*-DDD，*p,p'*-DDD，*o,p'*-DDE，*p,p'*-DDE，*o,p'*-DDT 及び *p,p'*-DDT（以下「DDT 類」という．）として 0.002 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.005 及び 0.05  $\mu$ g/mL 相当量）並びにメトキシクロールとして 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.025 及び 0.125  $\mu$ g/mL 相当量）になるようにそれぞれ添加後よく混合し，一夜静置した後に有機塩素系農薬収載法に従って試験を実施し，平均回収率及び繰返し精度を求めた．

なお，DDT 類として 0.1 mg/kg 相当量添加した試験区の測定には，ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液を更に 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に 5 倍希釈し，DDT 類の測定に供する最終試料溶液とした．

その結果は Table 6 のとおりであり，成型ジャーキー（猫用）3，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）3 及び菓子類（犬用ビスケット）2 については有機塩素系農薬 18 成分の平均回収率は，81.0~118 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 11 %以下であり，検査法第 11 章 試験法の妥当性確認法<sup>1)</sup>（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．粉ミルク（犬用）1 で認められた夾雑ピークは，前述のとおり測定対象成分であるか妨害ピークであるかの判別が行えなかったため，添加回収試験値から夾雑ピークの分析値は差し引かず，その結果は参考とした．粉ミルク（犬用）1 については，有機塩素系農薬 18 成分の平均回収率は 46.8~170 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 15 %以下であった．*p,p'*-DDD，*p,p'*-DDE，*o,p'*-DDT，エンドリン，ニトロフェン及びヘキサクロロベンゼンについての平均回収率は，試験法の妥当性確認法に定められた真度の目標値の範囲外であった．粉ミルクの結果は，低回収率の傾向にあったが，*p,p'*-DDD，エンドリン及びニトロフェンでは，120 %を超える回収率になる結果も認められた．これは，粉ミルクの抽出操作において抽出溶媒で振り混ぜる際に固まりが生じその後の操作が困難になること，夾雑ピークの影響等が要因と考えられた．

得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した．

Table 6 Recoveries for pesticides

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Aldrin	0.002	Formed jerky (for cats) 3	95.3	6.2
		Dried jerky (hard) (for dogs)	110	7.5
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	97.6	1.6
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	108	4.7
		Milk powder (for dogs) 1	70.1	9.0
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	102	5.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	97.6	6.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	95.2	4.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	98.7	2.2
		Milk powder (for dogs) 1	60.8	9.7
$\alpha$ -BHC	0.002	Formed jerky (for cats) 3	87.7	4.7
		Dried jerky (hard) (for dogs)	92.7	4.2
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	89.9	3.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	94.6	1.9
		Milk powder (for dogs) 1	85.0	13
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	95.9	6.7
		Dried jerky (hard) (for dogs)	95.3	5.5
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	88.3	2.8
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	92.6	1.4
		Milk powder (for dogs) 1	71.4	3.1
$\beta$ -BHC	0.002	Formed jerky (for cats) 3	103	4.6
		Dried jerky (hard) (for dogs)	109	3.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	104	3.6
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	111	2.7
		Milk powder (for dogs) 1	99.0	5.3
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	111	6.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	107	7.4
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	97.8	3.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	109	3.0
		Milk powder (for dogs) 1	84.3	3.5
$\gamma$ -BHC	0.002	Formed jerky (for cats) 3	94.6	3.3
		Dried jerky (hard) (for dogs)	97.7	2.3
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.3	2.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	99.5	1.9
		Milk powder (for dogs) 1	82.7	5.6
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	103	5.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	101	6.2
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	94.4	2.5
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	97.1	1.2
		Milk powder (for dogs) 1	78.0	3.4

Table 6 Recoveries for pesticides (continuation)

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
<i>δ</i> -BHC	0.002	Formed jerky (for cats) 3	98.0	4.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	6.4
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	100	3.9
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	107	3.1
		Milk powder (for dogs) 1	88.3	7.2
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	107	8.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	103	7.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	100	4.9
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	102	3.2
		Milk powder (for dogs) 1	82.3	6.1
<i>o p'</i> -DDD	0.002	Formed jerky (for cats) 3	98.2	3.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	105	3.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	95.9	5.7
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	109	4.8
		Milk powder (for dogs) 1	76.8	2.8
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	109	0.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	105	1.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	109	2.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	109	3.6
		Milk powder (for dogs) 1	89.9	5.6
<i>p p'</i> -DDD	0.002	Formed jerky (for cats) 3	99.7	4.6
		Dried jerky (hard) (for dogs)	107	1.2
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	95.3	8.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	105	4.8
		Milk powder (for dogs) 1	135	15
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	107	1.2
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	2.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	108	2.8
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	110	4.1
		Milk powder (for dogs) 1	87.6	5.6
<i>o p'</i> -DDE	0.002	Formed jerky (for cats) 3	102	5.4
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	3.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.5	4.6
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	118	5.9
		Milk powder (for dogs) 1	79.1	8.5
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	107	1.4
		Dried jerky (hard) (for dogs)	107	2.3
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	110	1.6
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	107	3.7
		Milk powder (for dogs) 1	83.1	7.5

Table 6 Recoveries for pesticides (continuation)

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
<i>p,p'</i> -DDE	0.002	Formed jerky (for cats) 3	99.1	6.9
		Dried jerky (hard) (for dogs)	101	3.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	105	2.8
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	100	2.3
		Milk powder (for dogs) 1	68.8	8.3
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	104	2.4
		Dried jerky (hard) (for dogs)	102	1.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	110	1.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	106	3.0
		Milk powder (for dogs) 1	77.0	9.3
<i>o,p'</i> -DDT	0.002	Formed jerky (for cats) 3	88.6	11
		Dried jerky (hard) (for dogs)	91.8	3.3
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	92.0	8.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	93.0	3.5
		Milk powder (for dogs) 1	46.8	10
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	108	2.8
		Dried jerky (hard) (for dogs)	105	1.7
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	109	2.5
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	108	2.7
		Milk powder (for dogs) 1	78.0	6.7
<i>p,p'</i> -DDT	0.002	Formed jerky (for cats) 3	98.5	5.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	102	5.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	93.1	5.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	103	5.6
		Milk powder (for dogs) 1	77.1	5.4
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	108	2.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	102	0.5
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	108	1.5
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	108	4.1
		Milk powder (for dogs) 1	80.1	10
Dieldrin	0.002	Formed jerky (for cats) 3	99.3	6.0
		Dried jerky (hard) (for dogs)	103	2.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	98.6	5.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	97.8	7.8
		Milk powder (for dogs) 1	96.7	3.9
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	111	8.6
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	7.3
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.7	5.9
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	104	1.8
		Milk powder (for dogs) 1	80.3	6.5

Table 6 Recoveries for pesticides (continuation)

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Endrin	0.002	Formed jerky (for cats) 3	97.4	4.0
		Dried jerky (hard) (for dogs)	108	4.7
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	105	2.4
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	104	2.0
		Milk powder (for dogs) 1	170	7.3
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	111	7.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	112	8.0
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	110	5.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	110	1.3
		Milk powder (for dogs) 1	96.3	6.2
Hexachlorobenzene	0.002	Formed jerky (for cats) 3	84.9	4.4
		Dried jerky (hard) (for dogs)	90.0	2.0
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	93.1	5.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	88.2	3.0
		Milk powder (for dogs) 1	58.6	14
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	87.8	7.9
		Dried jerky (hard) (for dogs)	92.3	6.1
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	84.2	3.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	81.0	3.5
		Milk powder (for dogs) 1	54.4	11
Heptachlor	0.002	Formed jerky (for cats) 3	91.1	5.0
		Dried jerky (hard) (for dogs)	94.6	5.1
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	93.6	5.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	99.6	2.9
		Milk powder (for dogs) 1	62.0	6.9
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	107	3.8
		Dried jerky (hard) (for dogs)	104	7.1
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	95.9	4.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	100	1.6
		Milk powder (for dogs) 1	67.3	7.2
Heptachlor epoxide	0.002	Formed jerky (for cats) 3	96.0	5.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	2.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	112	4.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	101	1.9
		Milk powder (for dogs) 1	94.6	3.0
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	111	5.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	107	6.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	101	5.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	106	0.9
		Milk powder (for dogs) 1	80.6	4.8

Table 6 Recoveries for pesticides (continuation)

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	0.002	Formed jerky (for cats) 3	96.1	7.9
		Dried jerky (hard) (for dogs)	95.2	4.0
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	101	5.8
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	101	3.2
		Milk powder (for dogs) 1	84.6	9.5
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	108	7.8
		Dried jerky (hard) (for dogs)	105	6.4
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.4	2.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	104	1.8
		Milk powder (for dogs) 1	77.6	4.5
Methoxychlor	0.01	Formed jerky (for cats) 3	97.1	9.9
		Dried jerky (hard) (for dogs)	95.4	3.1
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	108	8.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	106	5.1
		Milk powder (for dogs) 1	94.8	3.6
	0.05	Formed jerky (for cats) 3	110	4.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	103	7.4
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.7	3.4
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	105	2.2
		Milk powder (for dogs) 1	85.4	2.1
Nitrofen	0.002	Formed jerky (for cats) 3	101	5.3
		Dried jerky (hard) (for dogs)	111	7.2
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	101	4.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	109	3.2
		Milk powder (for dogs) 1	125	3.6
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	114	5.0
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	4.7
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	101	4.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	107	2.7
		Milk powder (for dogs) 1	91.2	7.7

Colored cells stand for outside the criteria of recovery rate at each concentration listed in the 3 (3) of chapter 11 of Analytical standards of petfood.

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

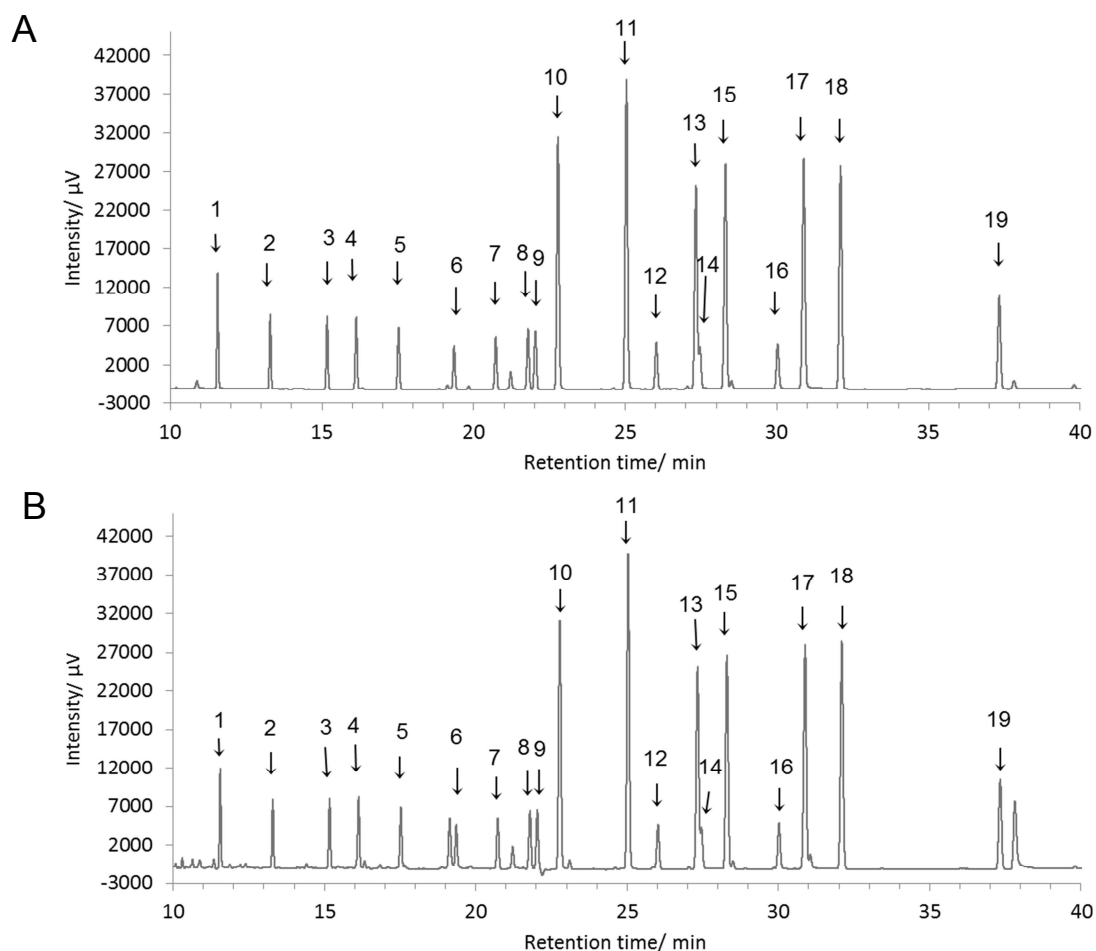


Fig. 3 Chromatograms of standard and spiked sample solution

(GC-ECD conditions are shown in Table 5. Arrows indicate the retention time of pesticides.)

1 Hexachlorobenzene	6 $\beta$ -BHC	11 <i>p,p'</i> -DDE	16 Nitrofen
2 $\alpha$ -BHC	7 $\delta$ -BHC	12 Dieldrin	17 <i>p,p'</i> -DDD
3 $\gamma$ -BHC	8 Heptachlor epoxide	13 <i>o,p'</i> -DDD	18 <i>p,p'</i> -DDT
4 Heptachlor	9 <i>trans</i> -Heptachlor epoxide (for reference)	14 Endrin	19 Methoxychlor
5 Aldrin	10 <i>o,p'</i> -DDE	15 <i>o,p'</i> -DDT	

A: Standard solution (0.05  $\mu\text{g/mL}$  for six DDT related compounds, 0.025  $\mu\text{g/mL}$  for methoxychlor and 0.005  $\mu\text{g/mL}$  for other twelve compounds: 0.05 ng, 0.025 ng and 0.005 ng as each pesticide.)

B: Five-fold diluted sample solution of formed jerky (for cats) 3 spiked at high concentration of pesticide (spiked at 0.1 mg/kg of six DDT related compounds, 0.05 mg/kg of methoxychlor and 0.01 mg/kg of other twelve compounds: 0.05  $\mu\text{g/mL}$ , 0.025  $\mu\text{g/mL}$  and 0.005  $\mu\text{g/mL}$ , as each pesticides in the diluted sample solution)

### 3.4 定量限界及び検出限界

スナック製品 5 分類の各試料に有機塩素系農薬収載法の各農薬の定量限界濃度相当量を添加した添加回収試験を実施し、平均回収率、繰返し精度の標準偏差及びピークの *SN* 比から総合的に判断した。

その結果、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）、素材乾燥ジャーキー（ソ



フトタイプ) 及び菓子類中の各有機塩素系農薬の定量限界及び検出限界は、有機塩素系農薬収載法に規定されたドライ製品及びセミドライ製品におけるメトキシクロールの定量限界 0.01 mg/kg 及びその他の農薬の定量限界各 0.002 mg/kg 並びにメトキシクロールの検出限界 0.003 mg/kg 及びその他の農薬の検出限界各 0.0007 mg/kg を変更することなく適用できると考えられた。一方、粉ミルクについては、3.2 で記載した夾雑ピークの影響で回収率が不良の成分があり、ピークの SN 比も安定しなかったため、定量限界等の検討はできなかった。

なお、Table 6 に示したとおり、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）、素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）及び菓子類の当該定量限界における添加回収試験結果は、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した。

#### 4 まとめ

検査法に収載されているドライ製品及びセミドライ製品を対象とする有機塩素系農薬収載法について、ニトロフェン、ヘキサクロロベンゼン及びメトキシクロールの検量線並びに本法のスナック製品 5 分類への適用範囲拡大について検討した結果、以下の結果が得られた。

1) ニトロフェン、ヘキサクロロベンゼン及びメトキシクロールの検量線について、各 0.005~0.2 µg/mL（注入量として各 0.005~0.2 ng 相当量）の範囲で直線性を示したことから、検量線作成用標準液の最低濃度をウェット製品有機塩素系農薬収載法に合わせることにした。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.002~0.08 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各農薬濃度範囲に相当する。

2) 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）及び菓子類について、有機塩素系農薬収載法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。一方、粉ミルクについては、多くの夾雑ピークが認められ、夾雑ピークの大きさ及び保持時間は、測定の都度変わり、夾雑ピークが測定対象成分であるか妨害ピークであるかの判別が行えなかった。

3) 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に、アルドリノ、 $\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHC、ディルドリン、エンドリン、ヘキサクロロベンゼン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド及びニトロフェンとして 0.002 及び 0.01 mg/kg 相当量、DDT 類として 0.002 及び 0.1 mg/kg 相当量並びにメトキシクロールとして 0.01 及び 0.05 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、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）及び菓子類については、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、有機塩素系農薬収載法の適用が可能であると考えられた。一方、夾雑ピークが測定対象成分であるか妨害ピークであるかの判別が行えず、その結果を参考とした、粉ミルクについては、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、エンドリン、ヘキサクロロベンゼン及びニトロフェンについて試験法の妥当性確認法に定められた真度の目標値を逸脱していた。

4) 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）及び菓子類中の各有機塩素系農薬の定量限界及び検出限界は、有機塩素系農薬収載法に規定されたドライ製品及びセミドライ製品におけるメトキシクロールの定量限界 0.01 mg/kg 及びその他の農薬の定量限界各

0.002 mg/kg 並びにメトキシクロールの検出限界 0.003 mg/kg 及びその他の農薬の検出限界各 0.0007 mg/kg を変更することなく適用できると考えられた。一方、粉ミルクについては、定量限界等の検討は行えなかった。

- 5) 有機塩素系農薬収載法の粉ミルクへの適用については、抽出溶媒による振とうの際に固まりが生じその後の操作が困難であり、試料によっては試料溶液の調製が行えない試料があったこと、また、得られたクロマトグラムには、定量に影響する夾雑ピークが認められたことから不適と考えられた。

## 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 28 Dec. 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).