

7 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のプロピレングリコールのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

小塚 健志^{*1}, 山本 謙吾^{*2}

Determination of Propylene Glycol in Dry and Semi-dry Type Pet Food by GC-MS

Kenji KOZUKA^{*1} and Kengo YAMAMOTO^{*2}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Food Labeling Monitoring Department))

An analytical method was developed to determine the level of propylene glycol in dry type and semi-dry type pet food using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

After adding water to the samples and further defatting them with hexane, propylene glycol was extracted with methanol. The extract was purified with Supelclean ENVI-Carb-II/SAX/PSA (Sigma-Aldrich Co. LLC; St. Louis, MO, USA), and injected into the GC-MS for determination of the propylene glycol level. GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-WAX; 0.25 mm i.d. × 30 m, film thickness 0.25 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA).

Recovery tests were conducted on pet foods. Five kinds of dry type pet food were spiked with 500 mg/kg or 5000 mg/kg of propylene glycol. The resulting mean recoveries ranged from 94.3 % to 105 % and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 4.3 %. Two kinds of semi-dry type pet food were spiked with 500 mg/kg or 5000 mg/kg of propylene glycol. The resulting mean recoveries ranged from 99.3 % to 106 % and RSD_r were not more than 2.1 %.

A collaborative study was conducted in eleven laboratories, using dry type pet foods spiked with 1000 mg/kg and 5000 mg/kg of propylene glycol, respectively, and using semi-dry type pet food that contained propylene glycol. The resulting mean recoveries, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 102 %, 98.6 %, 1.5 %, 2.3 %, 4.7 %, 3.3 % and 0.83, 0.75 for dry type pet food. The resulting RSD_r, RSD_R and HorRat were 2.5 %, 4.5 % and 0.95 for semi-dry type pet food.

This method was validated and established for use in the inspection of propylene glycol in dry type and semi-dry type pet food.

Key words: propylene glycol; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); pet food; collaborative study

キーワード：プロピレングリコール；ガスクロマトグラフ質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；愛玩動物用飼料；共同試験

^{*1} 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

^{*2} 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 表示監視部

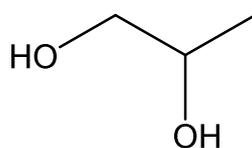
1 緒 言

プロピレングリコールは、吸湿性及び粘性がある無色の液体で、品質保持剤等として用いられる。食品、添加物等の規格基準¹⁾では、使用基準量として生めん及びいかくん製品で 2.0 %以下、ギョウザ、シューマイ、春巻及びワンタンの皮で 1.2 %以下、その他の食品で 0.60 %以下としている。

愛玩動物用飼料においては、プロピレングリコールは、セミドライ製品の保湿性を向上させるために数%の割合で添加されるが、猫の赤血球を減少させるおそれがあり 0.5 %を超える添加で健康影響の可能性がある²⁾と報告されている。このことから、省令³⁾ではプロピレングリコールは、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規定し、一方、局長通知⁴⁾で原材料に由来するプロピレングリコールであって、その含有量が猫への健康影響が想定されない量である場合まで規制対象とはしないとされている。猫用愛玩動物用飼料に原材料としてプロピレングリコールの添加が疑われる場合にはその含有量を確認する必要性が生じるが、平成 26 年度検討当時には、愛玩動物用飼料等の検査法（以下「ペット検査法」という。）⁵⁾にはその分析法が記載されていない状況にあった。

そこで、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 25 年度愛玩動物用飼料安全確保体制強化委託事業」において開発した方法（以下「JFRL 法」という。）⁶⁾を基に、ペット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。

参考にプロピレングリコールの構造式等を Fig. 1 に示した。



propane-1,2-diol

$C_3H_8O_2$ MW: 76.09 CAS No.: 57-55-2

Fig. 1 Chemical structure of propylene glycol

2 実験方法

2.1 試 料

愛玩動物用飼料（猫用ドライ製品、犬用ドライ製品及び犬用セミドライ製品）をそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。なお、検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry type for cats 1	Corn, chicken, corn gluten meal, animal oil and fat, rice, beet pulp, fish oil, green pea, chicken extract, vegetable oil, wheat, hydrolyzed crustacean, hydrolyzed pig cartilage, carnitine, minerals (Ca, Na, K, Cl, Cu, Fe, Mn, Se, Zn, I), vitamins (V.A, V.B ₁ , V.B ₂ , V.B ₆ , V.B ₁₂ , V.C, V.D ₃ , V.E, β -carotene, niacin, pantothenic acid, folic acid, biotin, choline), amino acids (threonine, taurine, tryptophan, methionine, lysine), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts)
Dry type for cats 2	Grains (corn, corn gluten meal, wheat flour, rice bran, hominy feed), meats (meat meal, chicken meal, powdered white meat), fishes (fish meal, powdered fish, powdered white fish, etc.), oils and fats (animal fat, evening primrose oil), soybean meal, oligosaccharide, vegetables (powdered cabbage, powdered carrot, powdered spinach, powdered pumpkin), beer yeast, beet pulp, β -glucan, milk calcium, glucosamine, rosemary, basil, minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I), vitamins (V.A, V.D, V.E, V.K, V.B ₁ , V.B ₂ , V.B ₆ , pantothenic acid, niacin, folic acid, choline), amino acids (methionine, taurine), food yellow no.5, food yellow no.4, food blue no.1, food red no.3, food red no.102, antioxidants (rosemary extracts)
Dry type for cats 3	Grains (corn, wheat flour, etc.), vegetable protein, meats (chicken, chicken extracts, etc.), oils and fats (palm oil, soybean oil, etc.), soybean, fishes (fish extracts, bonito, dried bonito, etc.), vegetables (spinach, carrot, etc.), vitamins (V.A, V.B ₁ , V.B ₂ , V.B ₅ , V.B ₆ , V.B ₁₂ , V.E, choline, niacin, folic acid), minerals (Zn, K, Ca, Cl, Se, Fe, Cu, Na, Mn, I, P), amino acids (taurine, methionine), preservative (potassium sorbate), coloring (food red no.102, food blue no.2, food yellow no.4, food yellow no.5), antioxidants (citric acid, BHA, BHT), pH adjuster
Dry type for dogs 1	Corn protein, animal fat (pig and cattle), corn, fish meal, wheat, potato protein, egg, minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), sugar, rice, hydrolyzed protein (chicken and turkey), buttermilk powder, cellulose powder, methionine, psyllium husk, vitamins (V.A, V.B ₁ , V.B ₂ , V.B ₆ , V.B ₁₂ , niacin, pantothenic acid, biotin, V.C, V.D ₃ , V.E, V.K, choline), taurine, sunflower oil, antioxidants (BHT, BHA, propyl gallate)
Dry type for dogs 2	Chicken, rice, whole wheat, beef tallow, sucrose, meat extracts (gravy), beer yeast, oats, milk powder, corn, soybean, canola oil, glucose, fish oil, fish, fructo-oligosaccharide, yucca extracts, antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts), vitamins (V.C, V.E, V.B ₃ , calcium pantothenate, V.A acetate, V.B ₁ , V.B ₆ , V.D, folic acid, V.K, V.B ₁₂ , biotin), minerals (Ca, P, Fe, S, Zn, Cu, Se, Mn, K, I, Co)
Semi-dry type for dogs 1	Chicken, defatted soybean, corn starch, D-sorbitol, processed starch, glycerin, minerals (Ca, P, Zn, Na, Cu, I), sodium lactate, seasoning, powdered egg yolk, sugar, flavoring, salt, thickening (guar gum), pH adjuster, preservative (sorbic acid), perilla oil, antioxidant (extracted vitamin E), vitamins (V.A, V.E, V.D, calcium pantothenate, V.B ₁₂ , V.B ₂), powdered cartilage of shark, glucosamine, yeast
Semi-dry type for dogs 2	Beef, chicken, pork, soybean curd refuse, soft roe of salmon, mashed potato, starch syrup, wheat protein, wheat flour, corn starch, rice bran, defatted soybean, egg, vegetable oil, cheese, minerals (Na, Cl, Zn, Fe, Cu, I), yeast, sasa extract, lactobacillus, wetting (sorbitol, glycerin), pH adjuster (sodium lactate, sodium phosphate, DL-malic acid), calcium-enriching (calcium phosphate, calcium lactate), antioxidants (sodium erythorbate, vitamin E), oligosaccharide, preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)

2.2 試薬

- 1) メタノール及びヘキサンは特級を用いた。
- 2) プロピレングリコール標準液

プロピレングリコール標準品（純度 99.9 %, 和光純薬工業製）100 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてプロピレングリコール標準原液を調製した（この液 1 mL は、プロピレングリコールとして 5 mg を

含有する。）。

使用に際して、プロピレングリコール標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にプロピレングリコールとして 5, 20, 40, 60, 80, 100 及び 120 µg を含有する各標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 280 rpm）
- 3) 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（以下「3 層ミニカラム」という。）：
Supelclean Envi-Carb II /SAX/PSA（充てん剤量 500 mg／500 mg／500 mg） Sigma-Aldrich 製
- 4) 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（以下「2 層ミニカラム」という。）： Bond Elut SAX/PSA（充てん剤量 500 mg／500 mg） Agilent Technologies 製
- 5) ガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）：
GC 部：GC-2010 島津製作所製
MS 部：GCMS-QP2010 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 脱脂

分析試料 2.0 g を量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、水 2 mL（セミドライ製品は水 1 mL）を加え、よく振り混ぜて試料を潤した後、更にヘキサン 20 mL を加え、固形物と溶液を混ざり合うまで振り混ぜてから、10 分間振り混ぜて脱脂した。脱脂後の内容物を 2000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を捨てた。ヘキサン 20 mL を先の共栓遠心沈殿管に加えて同様に操作した後、窒素ガスを送って共栓遠心沈殿管内に残ったヘキサンを除去し、抽出に供する残留物とした。このとき、ヘキサンを効率良く除去するため、必要に応じて 40 °C の水浴中で共栓遠心沈殿管を加温した。

2) 抽出

メタノール 20 mL を残留物に加え、共栓遠心沈殿管を時々振り混ぜながら水温 50 °C で 20 分間超音波処理した後、2000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 50 mL の首太全量フラスコに入れた。先の残さにメタノール 20 mL を加え、固形物と溶液を混ざり合うまで振り混ぜてから、10 分間振り混ぜた後、2000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を先の 50 mL の首太全量フラスコに合わせた。更に首太全量フラスコの標線までメタノールを加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

3) カラム処理

3 層ミニカラムをメタノール 10 mL で洗浄した。20 mL の全量フラスコを 3 層ミニカラムの下に置き、試料溶液 5 mL を正確にミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してプロピレングリコールを流出させた。更にメタノール 10 mL を 3 層ミニカラムに加えて同様に流出させた。

更に全量フラスコの標線までメタノールを加え、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

4) GC-MS による測定

試料溶液及び各プロピレングリコール標準液各 1 μ L を GC-MS に注入し、選択イオン検出（以下「SIM」という。）クロマトグラムを得た。

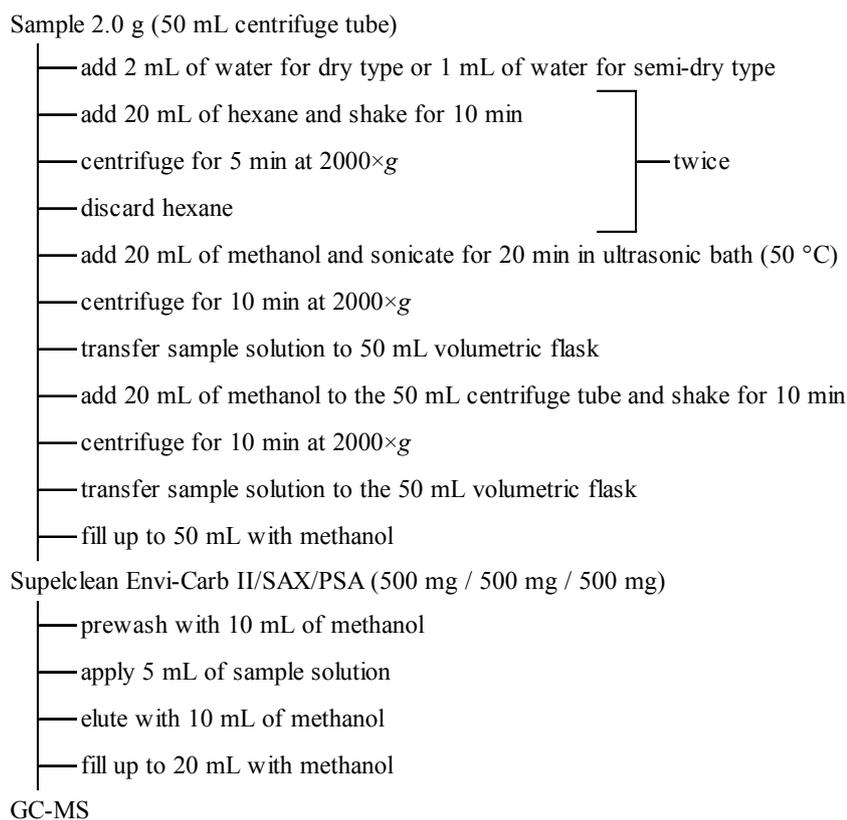
Table 2 Operating conditions of GC-MS

Column	DB-WAX (0.25 mm i.d. \times 30 m, 0.25 μ m film thickness, Agilent Technologies)
Column temperature	60 $^{\circ}$ C (hold for 1 min) \rightarrow ramp 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 145 $^{\circ}$ C \rightarrow ramp 30 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C (hold for 5 min)
Injection mode	Split (split ratio 1:50)
Injection temperature	250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	250 $^{\circ}$ C
Ion source temperature	230 $^{\circ}$ C
Ionization	Electron ionization (EI)
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	m/z 61 (for quantification), 45 and 76 (for confirmation)

4) 計 算

得られた定量イオンの SIM クロマトグラムからプロピレングリコールのピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のプロピレングリコール量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for propylene glycol in dry and semi-dry type pet food by GC-MS

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 2) に従って調製した 1 mL 中にプロピレングリコールとして 5, 20, 40, 60, 80, 100 及び 120 μg 含有する各標準液各 1 μL を GC-MS に注入し、得られた定量イオンの SIM クロマトグラムからプロピレングリコールのピーク面積を求めて検量線を作成した。得られた検量線は Fig. 2 のとおり 5~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (注入量として 5~120 ng) の範囲で直線性を示した。

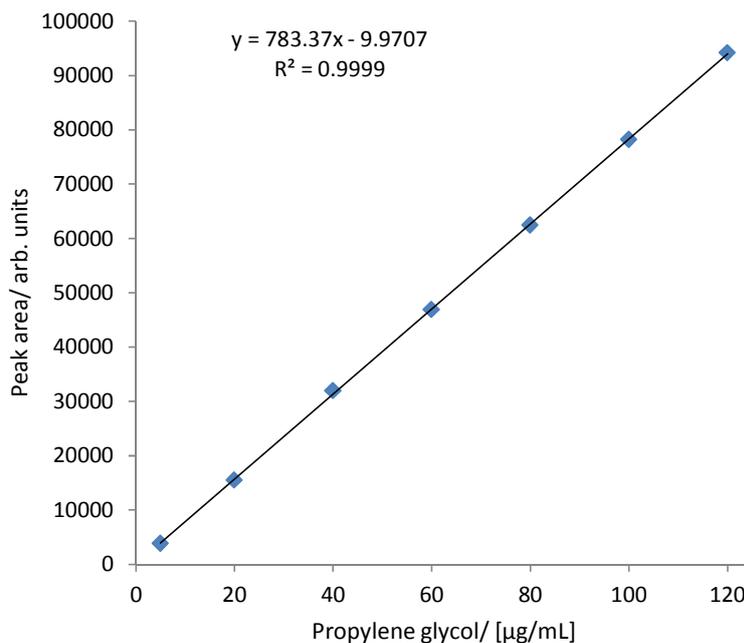


Fig. 2 Calibration curve of propylene glycol by peak area

3.2 JFRL 法からの変更点

GC カラムの液相は、水の存在下で温度を上げると急速に劣化する可能性がある。今回の検討の中で、同一の GC カラムを用いて 1500 回程度 GC-MS による測定をした結果、プロピレングリコールの保持時間が 1 min 程度早くなった。また、試料溶液の含水率が高くなるほど、ライナーの不活性処理剤の成分と考えられるピークが大きくなって検出された。水を含まない標準液を GC-MS に注入して測定した直後に、含水の試料溶液を注入して測定すると、プロピレングリコールのピークがかさ上げされる現象も認められた。これらのことから、水によるライナー等への影響を抑えるべきと考え、GC-MS に注入する水の量を減らすために JFRL 法に次の変更を加えた。

1) 試料溶液の含水率を下げるための変更

i 脱脂工程での変更

分析試料の採取量を 5.0 g から 2.0 g に変更し、これに加える水の量を 5 mL からドライ製品では 2 mL に、セミドライ製品では 1 mL に変更した。

また、分析試料の採取量を減らしたことから、これを脱脂するためのヘキサン量を 30 mL から 20 mL に変更した。

ドライ製品では JFRL 法と同様に加水量を分析試料の量に対して同量としたが、セミドライ製品では、分析試料に同量の水を加えたとき、試料の粘性が高まりヘキサンと十分に混ざらなかったため、分析試料の量に対して半量とした。JFRL 法の開発において、ドライ製品は加水によりプロピレングリコールの抽出率が向上したとしているが、ドライ製品で分析試料に同量の水を加えた場合とセミドライ製品で分析試料に半量の水を加えた場合、両者とも加水後の含水率は 50 %程度となることから、セミドライ製品に対する加水量を JFRL 法の半分としても問題ないと考えられた。原材料としてプロピレングリコールが添加されているセミドライ製品で加水量のみ換えて本法により定量した。その結果は Table 3 に示すとおり、

分析試料に同量の水と半量の水を加えた場合でプロピレングリコールの定量値への特段の影響は認められなかった。

Table 3 Quantitative value for propylene glycol by different quantity of water

		Quantity of water (mL)	
		1	2
Propylene glycol (mg/kg)	Run 1	21197	21180
	Run 2	20810	21122
	Run 3	21391	21162
	Mean	21133	21155

ii カラム処理工程での変更

カラム処理の際に、JFRL 法では抽出液をミニカラムに入れて得られた流出液を GC-MS による測定に供する試料溶液としている。これを抽出液 5 mL をミニカラムに入れて得られた流出液と、更にメタノール 10 mL をミニカラムに入れて得られた流出液を合わせた後に、メタノールで 20 mL に定容したものを試料溶液とするように変更した。

2) ミニカラムの変更

JFRL 法では GC-MS による測定に供する試料溶液に着色が認められる場合があったため、充てん剤にグラファイトカーボンを追加して色素を除去することとした。このため、用いるミニカラムをトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルとエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルを積層した 2 層ミニカラムから 3 層ミニカラムに変更した。

3) 3 層ミニカラムからの流出画分の確認

1)及び 2)によりカラム処理に変更を行ったことから、猫用ドライ製品を用い、2.4 の 1)及び 2)に従い抽出した液にプロピレングリコールとして 5000 mg/kg 相当量（最終試料溶液で 50 µg/mL 相当量）を添加し、50 mL の首太全量フラスコの標線までメタノールを加えて作製した試料溶液を 2.4 の 3)に従い 3 層ミニカラムに入れてミニカラムからの流出画分を確認した。その結果、Table 4 のとおり、プロピレングリコールはメタノール 0~10 mL の画分に 98.0 %以上流出し、その後の 10~15 mL の画分に微量の流出が認められた。このことから、試料溶液 5 mL を負荷、流出した後、更にメタノール 10 mL を加えてプロピレングリコールを流出させることとした。

Table 4 Elution pattern of propylene glycol from Supelclean Envi-Carb II /SAX/PSA

	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Methanol			
	Load	Elution		
	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL	
Only standard solution	37.9	61.0	0.4	99.2
In the presence of matrix components of dry type for cats	41.2	61.4	0.3	103

a) n=1

1)の変更により、JFRL法に比べると、本法ではGC-MSに注入される水の量を減らすことができたが、定量値の精確さを維持するためには、50回程度のGC-MSへの注入ごとに新しい不活性処理されたライナーへの交換が必要であった。

3.3 妨害物質の検討

10種類のドライ製品の愛玩動物用飼料で、本法により調製した試料溶液をGC-MSに注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、全ての試料で妨害となるピークは認められなかった。

3種類のセミドライ製品の愛玩動物用飼料で、本法により調製した試料溶液をGC-MSに注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、全ての試料で妨害となるピークは認められなかった。なお、全ての試料で微少なプロピレングリコールのピークが確認された。検出したピークは、定量イオンと確認イオンとの強度比からプロピレングリコールと判断した。

3.4 添加回収試験

1) ドライ製品

ドライ製品の分析試料に500及び5000 mg/kg相当量（最終試料溶液で5及び50 µg/mL相当量）のプロピレングリコールを添加し、本法により5点併行で定量して回収率及び繰返し精度を求めた。その結果はTable 5に示すとおり、プロピレングリコールの平均回収率は94.3~105%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として4.3%以下であった。

Table 5 Recoveries of propylene glycol (dry type pet foods)

Pet food types	Spiked level (mg/kg)			
	500		5000	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Dry type for cats 1	105	1.1	98.9	1.3
Dry type for cats 2	101	1.1	98.5	1.8
Dry type for cats 3	103	2.8	101	1.5
Dry type for dogs 1	94.3	1.3	95.0	4.3
Dry type for dogs 2	100	1.3	104	0.8

a) Mean (n=5)

b) Relative standard deviation of repeatability

2) セミドライ製品

セミドライ製品の分析試料に500及び5000 mg/kg相当量（最終試料溶液で5及び50 µg/mL相当量）のプロピレングリコールを添加し、本法により5点併行で定量して回収率及び繰返し精度を求めた。その結果はTable 6に示すとおり、プロピレングリコールは99.3~106%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として2.1%以下であった。

Table 6 Recoveries of propylene glycol (semi-dry type pet foods)

Pet food types	Spiked level (mg/kg)					
	500			5000		
	Propylene glycol ^{a)} (mg/kg)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Propylene glycol ^{a)} (mg/kg)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
Semi-dry type for dogs 1	724	106	2.1	5337	103	0.9
Semi-dry type for dogs 2	815	102	0.7	5269	99.3	1.0

a) Mean ($n=5$)

b) Mean ($n=5$); Blank values of propylene glycol were 196 mg/kg in semi-dry type for dogs 1 and 303 mg/kg in semi-dry type for dogs 2.

c) Relative standard deviation of repeatability

なお，得られた定量イオンの SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した.

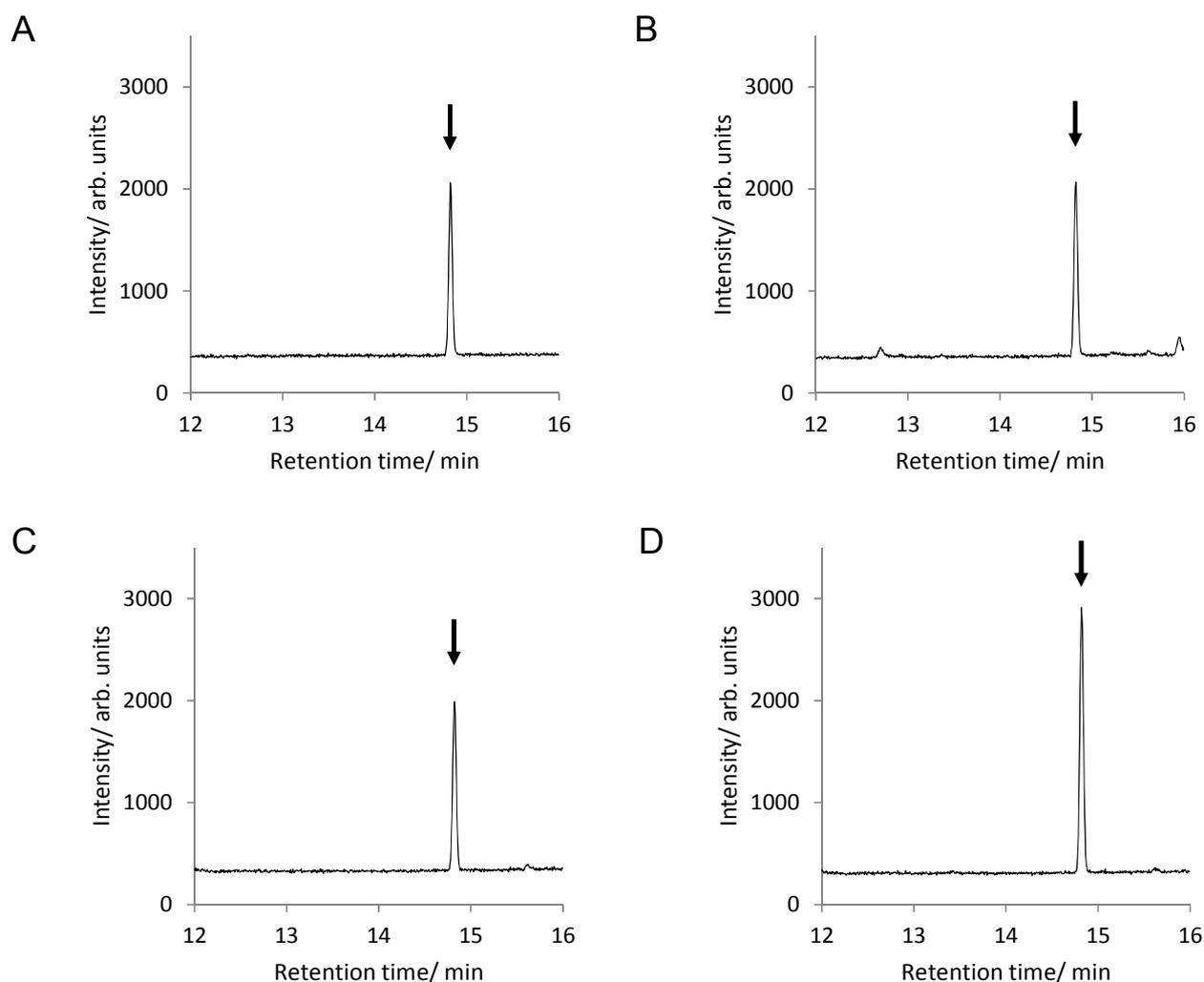


Fig. 3 Selected ion monitoring chromatograms of propylene glycol
(Arrows indicate the peaks of propylene glycol.)

- A: Standard solution (5 $\mu\text{g/mL}$: 5 ng as propylene glycol)
 B: Sample solution of dry type pet food for cats spiked at 500 mg/kg of propylene glycol
 (5 $\mu\text{g/mL}$ as propylene glycol)
 C: Sample solution of dry type pet food for dogs spiked at 500 mg/kg of propylene glycol
 (5 $\mu\text{g/mL}$ as propylene glycol)
 D: Sample solution of semi-dry type pet food for dogs (blank value of propylene glycol: 196
 mg/kg) spiked at 500 mg/kg of propylene glycol (6.96 $\mu\text{g/mL}$ as propylene glycol)

3.5 定量限界（下限）及び検出限界

本法の定量限界（下限）及び検出限界を確認するため、3.4の添加回収試験で調製した500 mg/kg相当量（最終試料溶液で5 $\mu\text{g/mL}$ 相当量）のプロピレングリコールを添加した試料溶液1 μL をGC-MSに注入し、得られた定量イオンのSIMクロマトグラムからプロピレングリコールのピークのSN比が10及び3となる濃度を求めた。その結果、得られたピークのSN比が10以上となる濃度は500 mg/kgであった。また、SN比が3以上となる濃度は200 mg/kgとなった。

なお、Table 5及びTable 6に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良

好であった。

3.6 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、愛玩動物用飼料のドライ製品にプロピレングリコールとして 1000 mg/kg 及び 5000 mg/kg 相当量（分析用試料 2.0 g に対して 1 mL 中に 2 mg 及び 10 mg を含有する標準液を 1 mL）を、各試験室にて分析開始の前日にそれぞれ添加して調製した試料、並びにプロピレングリコールを含有したセミドライ製品の試料を用いた。参加試験室は、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、一般財団法人日本冷凍食品検査協会関西事業所、JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部、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）であった。

1) セミドライ製品の試料の均質性確認

セミドライ製品の試料の均質性確認については、Thompson らの harmonized protocol⁷⁾に基づき、ランダムに抜き取った 10 袋で各 2 点併行分析して行った。この分析結果を Table 7 に、また、その結果に基づく一元配置の分散分析結果を Table 8 に示した。分散比 F_0 は F 境界値を下回り、有意水準 5 %において試料間に有意な差は認められず、この試験用試料の均質性に問題はないと判断した。

Table 7 Homogeneity test of the semi-dry type pet food for the collaborative study I

No. of sample	Propylene glycol	
	(mg/kg)	
1	2960	3020
2	2990	3010
3	3030	3030
4	2960	2920
5	3010	3040
6	2990	3060
7	3050	3050
8	3000	3000
9	3020	3060
10	2900	3020

Table 8 Homogeneity test of the semi-dry type pet food
for the collaborative study II

Source	$S^a)$	$\phi^b)$	$V^c)$	$F_0^d)$	$F_{crit.}^e)$
Between samples	22380	9	2487	1.82	3.02
Analytical error	13700	10	1370		
Total	36080	19			

a) Sum of squared deviation

b) Degree of freedom

c) Unbiased variance (Mean square)

d) F value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

e) F critical value: $F(9, 10; \alpha=0.05)$

2) 共同試験結果

共同試験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、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の 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_f) 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。

結果は Table 9 のとおりであった。犬用ドライ及び猫用ドライについて平均回収率はそれぞれ 102 及び 98.6 % であり、犬用ドライ、犬用セミドライ及び猫用ドライについて RSD_f はそれぞれ 1.5, 2.5 及び 2.3 %, RSD_R はそれぞれ 4.7, 4.5 及び 3.3 %, HorRat はそれぞれ 0.83, 0.95 及び 0.75 であった。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 10 に示した。

Table 9 Collaborative study for propylene glycol

Lab. No.	Pet food types					
	Dry type for dogs (mg/kg)		Semi-dry type for dogs ^{a)} (mg/kg)		Dry type for cats (mg/kg)	
1	1070	1080	3700 ^{c)}	3840 ^{c)}	6250 ^{c)}	5870 ^{c)}
2	1020	1020	3260	3120	4740	4790
3	1090	1110	3220	3110	4980	4890
4	981	987	3380	3250	4980	5110
5	953	966	3270	3190	5210	5110
6	1090	1070	3280	3270	5090	5080
7	1040	1020	3220	3300	5020	4740
8	1030	975	3110	3090	4990	4700
9	909 ^{b)}	998 ^{b)}	3070	3080	4860	5080
10	990	984	2740	2980	4740	4650
11	1000	1010	3100	3090	4930	4930
Spiked level (mg/kg)	1000		—		5000	
Mean value ^{d)} (mg/kg)	1020		3160		4930	
Mean recovery ^{d)} (%)	102		—		98.6	
RSD _r ^{e)} (%)	1.5		2.5		2.3	
RSD _R ^{f)} (%)	4.7		4.5		3.3	
PRSD _R ^{g)} (%)	5.6		4.8		4.4	
HorRat	0.83		0.95		0.75	

a) The sample containing propylene glycol

b) Data excluded by Cochran test

c) Data excluded by single Grubbs test

d) $n=20$

e) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

f) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 10 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC column (i.d.×length, film thickness)
1	GC: FOCUS GC, Thermo ELECTRON MS: POLARIS Q, Thermo ELECTRON	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
2	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
3	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	GC: FOCUS GC, Thermo ELECTRON MS: POLARIS Q, Thermo ELECTRON	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
7	GC: CP-3800, VARIAN MS: 300-MS, VARIAN	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
8	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-WAX, J&W Scientific (0.32 mm×30 m, 0.5 μm)
9	GC: 6840A, Agilent Technologies MS: 5973N, Agilent Technologies	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
10	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
11	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

愛玩動物用飼料（ドライ及びセミドライ製品）中のプロピレングリコールについて、JFRL法を基に、GC-MSによる定量法のペット検査法への適用の可否を検討したところ、GC-MSによる測定に供する試料溶液の含水率を減らすように変更し、ミニカラムの充てん剤にグラファイトカーボンを追加することにより、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5~120 μg/mL（注入量として5~120 ng）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、5及び50 μg/mL相当濃度とした。

2) 本法に従って得られた定量イオンのSIMクロマトグラムでは、10種類のドライ製品及び3種類のセミドライ製品の愛玩動物用飼料において定量を妨げるピークは認められなかった。

3) 本法に従い、5点併行で定量して回収率及び繰返し精度を検討したところ、良好な結果が得られた。

4) 本法におけるプロピレングリコールの定量限界（下限）及び検出限界は、試料中で500 mg/kg及び200 mg/kgであった。

5) 愛玩動物用飼料のドライ製品にプロピレングリコールとして1000 mg/kg及び5000 mg/kg相当量を添加した試料、並びにプロピレングリコールを含有したセミドライ製品の試料を用いて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、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一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所，一般財団法人食品環境検査協会東京事業所，一般財団法人日本冷凍食品検査協会関西事業所及び JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 2) 第 2 回農業資材審議会飼料分科会・中央環境審議会合同会合（ペットフード関連）：平成 20 年 12 月 24 日，資料 1 (2008).
- 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) 農林水産省消費・安全局長，環境省自然環境局長通知：愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律の施行について，平成 21 年 5 月 29 日，21 消安第 2236 号，環自総発第 090529009 号 (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).
- 6) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 25 年度愛玩動物用飼料安全確保体制強化委託事業（ペットフード中のプロピレングリコールの分析法開発）(2014).
- 7) Michael Thompson, Stephen L.R.Ellison, Roger Wood: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78(1)**, 145-196 (2006).
- 8) William Horwitz: Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67(2)**, 331-343 (1995).
- 9) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 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).