

# フラン及びメチルフラン類縁体の分析法開発

小木曾基樹<sup>1</sup> 橋本千尋<sup>1</sup> 鳥海栄輔<sup>1\*</sup> 西村佳那子<sup>1</sup> 飯塚誠一郎<sup>1</sup> 山下直樹<sup>1</sup> 阪本和広<sup>2</sup> 山本祐士<sup>2</sup> 山田友紀子<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>一般財団法人日本食品分析センター <sup>2</sup>農林水産省

## はじめに

フラン及びメチルフラン類縁体は食品の加熱等により非意図的に生成することが知られ、ヒトへの影響が懸念される有害化学物質です。今回、ヘッドスペース/GC-MS法を用いた同時分析法を開発し、5種類の食品(コーヒー、リンゴジュース、しょうゆ、乳幼児用調製粉乳及びベビーフード)についてその適用性を確認しましたのでご紹介します。

## フラン及びメチルフラン類縁体の特性

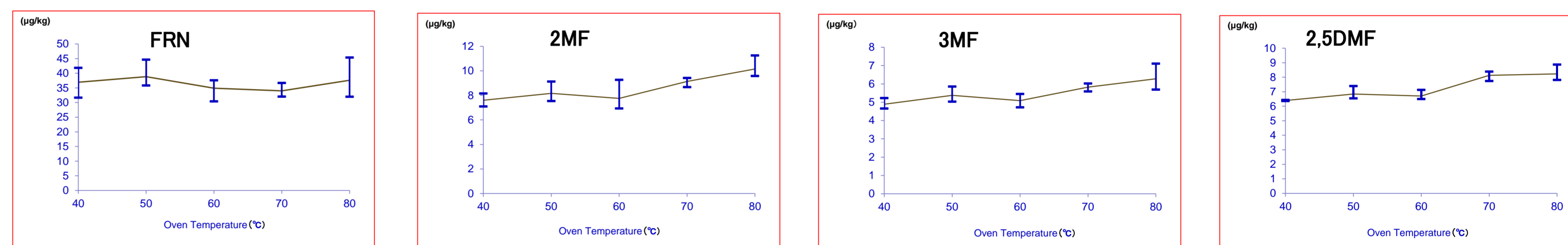
物質名	構造	沸点(°C)	性状	毒性学的特徴
フラン (FRN)		31	無色透明の液体	・肝毒性や遺伝毒性発がん性あり。
2-メチルフラン (2MF)		63	無色〜わずかに薄い黄色の液体	・フランと同程度の肝毒性を示す。
3-メチルフラン (3MF)		66	無色〜わずかに薄い黄色の液体	・フランと同程度の肝毒性を示す。
2,5-ジメチルフラン (2,5DMF)		92-94	無色透明の液体	・毒性データがほとんどない。 ・これら3種は構造異性体である。
2-エチルフラン (2EF)		92	薄い黄色の液体	
2,3-ジメチルフラン (2,3DMF)		92-94	微黄色〜褐色の液体	

## 分析法の留意点②: 二次的な生成の回避

### 問題点

ヘッドスペース法はバイアル瓶ごとサンプルを加熱し、気相に移行した測定対象物質をGCに導入する手法であるため、加熱温度が高いほど高感度に測定ができる。一方、フラン及びメチルフラン類縁体は、食品を加熱することにより食品中の成分から二次的に生成することが知られている。⇒二次的に生成しない加熱最適条件の確立が必須

ヘッドスペースサンプラーのオープン温度を40, 50, 60, 70及び80°Cに設定した際のFRN, 2MF, 3MF及び2,5DMFの濃度変化を確認



加熱温度については、70°C以上で増加傾向が見られ二次生成が生じたと判断。また、加熱温度を60°Cとした際の加熱時間の違いによる影響についても確認し、15分から30分までの範囲では、明らかな変化は確認されなかった。⇒オープンの加熱条件は60°C, 15分間に設定

## 分析法の留意点③: サンプルの保管条件

フラン及びメチルフラン類縁体は揮発性が高いことから、試料保管中のこれらの物質の減衰を調査した。方法は、保管中の酸化を防ぐため、試料を容器にヘッドスペースがないように詰め、冷蔵ではガラス容器、冷凍では合成樹脂容器を用いて、それぞれ約1か月間保管した。

冷蔵保管では減衰が確認されず、冷凍保管では減衰が確認された。種々の検証の結果、これらの物質の減衰は保管温度帯(つまり酸化)によるものではなく、合成樹脂容器への吸着によるものと考えられた。⇒調査試料の保管は、ガラス容器を用いた冷蔵保管

## 分析法の検討

・**溶媒抽出法**; 濃縮操作が発生し、その工程でフラン及びメチルフラン類縁体の減少、消失が確認された。⇒**適用困難**

・**SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) 法**; ロスなく高濃縮が可能な手法であるが、測定対象物質以外にも多量な夾雑物質も抽出及び濃縮されてしまうことが確認された。⇒**適用困難**

・**Dean-Stark蒸留装置による蒸留法**; 蒸留操作時、試料の長時間加熱によりフラン及びメチルフラン類縁体の二次生成が確認された。⇒**適用困難**

・**ヘッドスペース/GC-MS法**; 操作中の損失を防ぎ、低沸点物質である特性を生かし、高感度分析が可能な手法。メチルフラン類縁体のアルキル側鎖が長くなるにつれて沸点が高くなる⇒揮発性が低くなる成分の感度に懸念があるが、他の手法に比べ可能性が高い。⇒**適用**

## 分析法の留意点①: 機器測定条件の確立

### 問題点

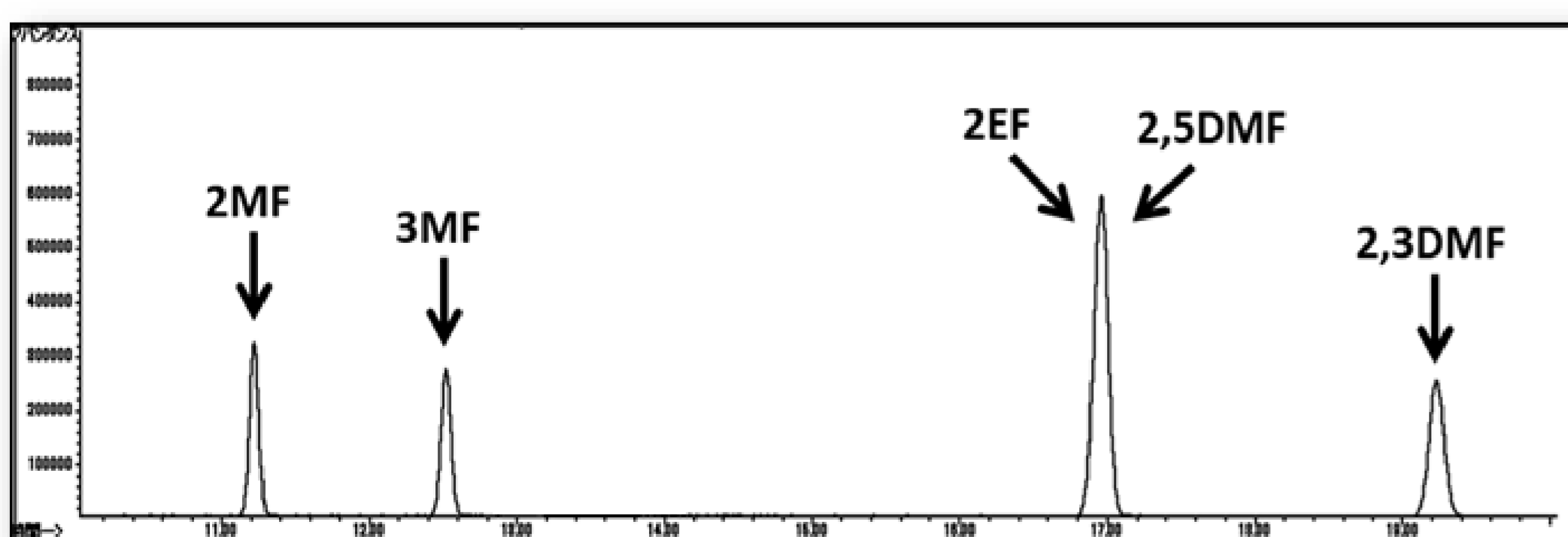
分子量が小さく揮発性が高いフランを十分に保持するためには多孔性樹脂(ポーラスポリマー)または中極性(ポリエチレングリコール)カラムの使用が適当であるが、構造異性体である2,5DMFと2EFは分離しない。

FRN, 2MF, 3MF, 2,5DMF, 2EF及び2,3DMFを同時に測定でき、かつ2,5DMFと2EFが分離する条件の確立が必須

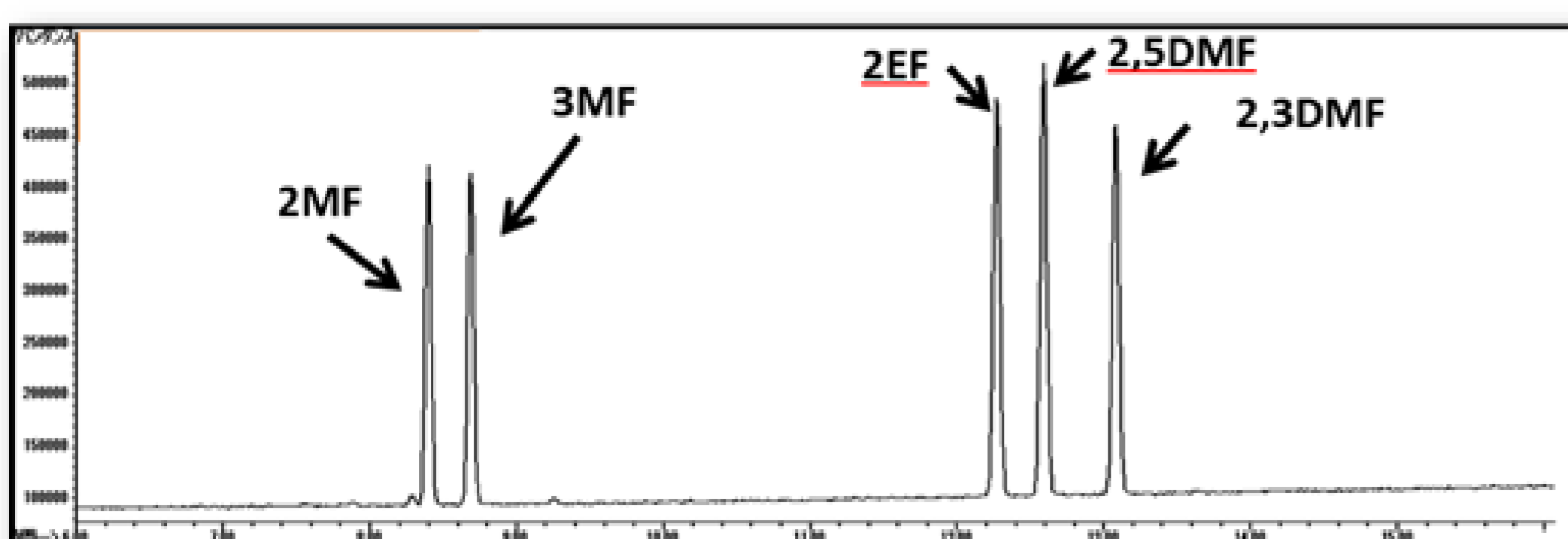
FRNの保持を弱めることにはなるが微極性カラム(5%フェニルメチルポリシロキサンカラム)による分離を検討。

昇温条件を最適化することにより、構造異性体を全て分離することが可能となった。

⇒**微極性カラムによる分離条件を設定**



中極性(ポリエチレングリコール)カラムによる分離



微極性(5%フェニルメチルポリシロキサン)カラムによる分離

## 開発試験法

### 【試験法】

20 mL容ヘッドスペース用バイアル  
 + 塩化ナトリウム 4 g  
 オープンで加熱(80°C, 30分以上)  
 放冷  
 + 水(氷冷)9 mL  
 + 試料 1 g  
 密栓  
 + 5 µg/mLフラン-d<sub>4</sub>内標準溶液 10 µL  
 + 0.5 µg/mLフラン類縁体内標準溶液 20 µL  
 混和(ポルテックスミキサー)  
 HS-GC-MS

### 【測定条件】

<ヘッドスペースサンプラー操作条件>  
 機種: 7697A(Agilent Technologies)  
 オープン温度: 60 °C  
 バイアル加熱時間: 15 min  
 ループ温度: 130 °C  
 トランスファーライン温度: 130 °C

<ガスクロマトグラフ質量分析計操作条件>  
 機種: 7890B/5977B (Agilent Technologies)  
 カラム: DB-5MS(Agilent Technologies)  
 φ 0.25 mm × 60 m, 膜厚 1 µm  
 導入系: スプリット 15:1  
 試料注入口温度: 220 °C  
 カラム温度: 40 °C(1 min保持)→3 °C/min昇温→80 °C→15 °C/min昇温→220 °C(5 min保持)→15 °C/min降温→150 °C  
 ガス流量: ヘリウム(キャリアーガス) 1.5 mL/min  
 イオン源温度: 230 °C  
 イオン化法: EI  
 設定質量数: m/z  
 68(フラン)  
 82(2-メチルフラン, 3-メチルフラン)  
 96(2-エチルフラン, 2,3-ジメチルフラン, 2,5-ジメチルフラン)  
 72(フラン-d<sub>4</sub>)  
 85(2-メチルフラン-d<sub>3</sub>, 3-メチルフラン-d<sub>3</sub>)  
 99(2, 5-ジメチルフラン-d<sub>4</sub>)

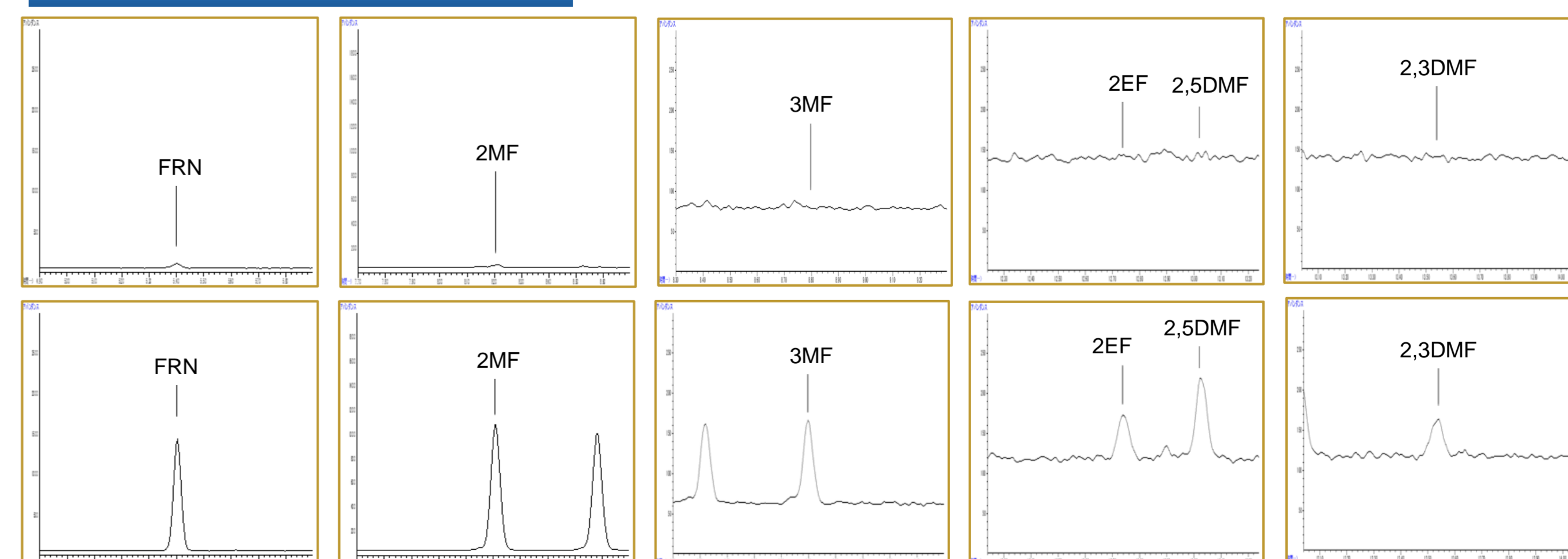
## 分析法の評価

コーヒーに対して、同日4併行、5日間の繰り返しで添加回収試験を実施し、真度(回収率)、精度(併行精度、中間精度)、測定の不確かさ、定量下限および検出下限を算出した。

測定化合物	添加濃度 (µg/kg)	回収率 <sup>a</sup> (%)	併行精度 <sup>b</sup> (%)	中間精度 <sup>c</sup> (%)	標準不確かさ	拡張不確かさ	検出下限 (µg/kg)	定量下限 (µg/kg)
FRN	5 <sup>d</sup>	100	1.9	2.4	0.1	0.2	0.4	1.2
	50	99	1.0	2.7	1.3	2.5	—	—
2MF	5 <sup>d</sup>	103	2.1	2.1 <sup>e</sup>	0.1	0.2	0.4	1.1
	50	94	3.4	4.5	2.1	4.3	—	—
3MF	1	107	3.5	4.6	0.1	0.1	0.2	0.5
	10	101	2.5	4.0	0.4	0.8	—	—
2,5DMF	1	116	4.4	4.7	0.1	0.1	0.2	0.5
	10	101	3.1	4.7	0.5	1.0	—	—
2EF	1	110	7.2	10.0	0.1	0.2	0.4	1.1
	10	99	2.5	4.1	0.4	0.8	—	—
2,3DMF	1	76	9.7	11.9	0.1	0.2	0.3	0.9
	10	78	2.8	4.7	0.4	0.7	—	—
	100	79	3.8	6.3	5.0	10.0	—	—

a 20試行の平均, b 相対標準偏差(再現性), c 相対標準偏差(試験所内再現性), d ブランク値を差し引いた値, e RSDi=RSDrとして表示

## クロマトグラム例



上段: コーヒー試料のSIMクロマトグラム, 下段: コーヒー試料に各対象成分を定量下限相当添加したSIMクロマトグラム

## まとめ

構造異性体関係にあるメチルフラン類縁体を完全に分離する条件を確立し、揮発性の大きく異なるフランおよびメチルフラン類縁体(2MF, 3MF及び2,5DMF)を、試験操作中に二次生成することなく、高感度かつ同時に測定できる分析法を開発した。さらに5種類の食品について、単一試験室での妥当性を確認し、液状から固形状までの幅広い食品に適用できることを確認した。

なお、本分析法の開発は、平成30~令和2年度 農林水産省 安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業「食品中のメチルフラン類縁体の分析法の開発」(JPJ008617,3001)により実施した。