

令和3年3月31日

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
研究成果報告書

課題番号：3001

食品中のメチルフラン類縁体の分析法の開発

研 究 期 間：平成30年度～令和2年度（3年間）

研究総括者名：小木曾 基樹

試験研究機関名：一般財団法人日本食品分析センター

1 研究目的

フランは、食品の加熱工程等において非意図的に生成することが知られており、世界的に含有実態調査、暴露量評価がされている。さらに近年では、海外においてフランと同時に生成するメチルフラン類縁体の暴露量がフランに比して無視できないレベルにあることが報告され、それに伴い肝毒性に対する懸念を増加させる要因として指摘されている。

一方、メチルフラン類縁体については、国際的な基準を満たす妥当性が確認された標準的な方法が報告されておらず、国内において公的な含有実態調査は実施されていない。そこで、本研究では、我が国特有の食品を対象として、定量下限が1 µg/kg以下を満たすフラン類縁体の分析法を開発する。また、開発した方法が、コーデックス委員会の手続きマニュアル (Codex Alimentarius Commission Procedural Manual) に定められている性能基準等に留意しつつ、実態調査への使用にあたり要求される性能を満たすことを目標とする。

開発した分析法は、行政機関における、加工食品に含まれるフラン及びメチルフラン類縁体の含有実態調査への利用や、経口摂取量の推計やフラン類低減の調査、技術開発への活用が期待できる。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題1：加工食品中に含まれるメチルフラン類縁体の定量分析法の開発

フランは沸点31.36℃ (Merck ; 14th, 2006) の液体で、揮発性溶媒の中でも気化性の高いジエチルエーテル34.6℃ (Merck ; 13th, 2001) とほぼ同様の物性を有する物質であることから、ヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計 (HS-GC-MS) による測定が一般的である。

Becalskiら (2010、2016) 等の先行研究において、2-メチルフラン及び3-メチルフランもフランと同時に測定されている報告があることから、我が国特有の食品を対象にその適用性を検証し、問題が認められれば改良するなどして分析法を確立し、妥当性データを取得する。

2,5-ジメチルフランについても、Merjaら (1992)¹、Shenら (2016)²のHS-GC-MSによる報告があるが、2,5-ジメチルフランは沸点が92-94 °C (lit.) と比較的高いこと、フラン及びメチルフラン類縁体は加熱により2次生成することが報告されているため、実態調査レベルの高感度分析へのHS-GC-MSの適用には何らかの問題が生じることが危惧される。そこで、先に報告されているメチルフラン類縁体測定法の2,5-ジメチルフランへの適用性を確認し、改良等による適用が困難と判断された場合は、新たに分析法を確立する。

- 1: Merja L, Jukka K, Heikki K (1992). Comparison of changes in headspace volatiles of some coffee blends during storage. Food Chemistry, 43, 35-40.
- 2: Shen MY, Liu Q, Jia HB, Jiang YJ, Nie SP, Xie JH, Li C and Xie MY (2016). Simultaneous determination of furan and 2-alkylfurans in heat-processed foods by automated static headspace gas chromatography-mass spectrometry. LWT-Food Science and Technology, 72, 44-54.

(小課題 1-1) 文献調査

メチルフラン類縁体の測定に関する文献を収集し、違いを整理し、個々の操作を評価した上でメチルフラン分析法の骨格を企画する（行政部局と協議）。

(小課題 1-2) 2-メチルフラン及び3-メチルフランの定量分析法

小課題1-1で企画した分析法を基にフラン、2-メチルフラン及び3-メチルフランの分析法を開発する。主な開発ポイントは以下の通り。

- ① 静的 (static) HS-GC-MSを採用する。
- ② メチルフラン類縁体は加熱により2次生成することが知られており、Shenらの報告²では、しょうゆにおいて60℃、15分を超えて加温することにより、フラン及び2-メチルフランが2次生成すると述べられている。したがって、加温条件は最大でも60℃、15分を目安とする。
- ③ いずれも安定同位体試薬が市販されているため、サロゲート法とする。
- ④ 定量下限の目標は、EFSA評価書^{注1}Appendix E ; Previously reported occurrence dataを参考に、各物質1 µg/kg以下とする（行政部局と協議）。
- ⑤ 確立した分析法について2,5-ジメチルフランの適用を確認する。

(小課題 1-3) 2,5-ジメチルフランの定量分析法

小課題1-2において、2,5-ジメチルフランがフラン、メチルフランと同時に分析できないことが判明した場合は、新たに2,5-ジメチルフランの分析法を確立する。

主な開発ポイントは以下の通り。

- ① HS-GC-MSにおいてはオープン温度を上げることにより増感が期待できるが、上述のようにフラン及び2-メチルフランは60℃、15分を超える条件では2次生成が報告されているため、同時分析においてはオープン温度をさらに上げることはできない。しかしながら、2,5-ジメチルフランに関しては、80℃、30分まで2次生成が認められていない²ことから、まずは加温条件を変えることにより2,5-ジメチルフランの測定が可能かを確認する。
- ② ①で成立しない場合は、溶媒抽出、GC-MS測定を基本とした分析法を確立する。
- ③ Shenらの報告²では、2,5-ジメチルフランと2-エチルフランは保持時間がほぼ一致し、MSスペクトルも類似しているため、デコンボリューションソフトを使用し、分別定量を行っている。さらにShenらの報告²では述べられていない3-エチルフラン、2,3-ジメチルフランに関しても、類似の挙動を示す可能性が考えられる。

したがって、これらの化合物の保持時間及びMSスペクトルを確認し、分離が困難な場合はその分別定量手法を確認、提案する。

但し、3-エチルフランは標準品を入手する目途が立っていない。また、これらの物質は安定同位体試薬が販売されていない。

- ④ 定量下限の目標は、EFSA評価書^{注1}Appendix E ; Previously reported occurrence dataを参考に、各物質1 µg/kg以下とする（行政部局と協議）。
- ⑤ 溶媒抽出法の場合は、さらに沸点の高い2-プロピル、ブチル、ペンチルフランも同時測定ができる可能性がある。

(小課題 1-4) 単一試験室での妥当性評価

マトリックスを6種以上設定し（行政部局と協議）、開発した方法について単一試験室による妥当性評価（複数機種のHS-GC-MSによる評価も含む）を実施する。また、コーデックス委員会の手続きマニュアル（Codex Alimentarius Commission Procedural Manual）に定められている性能基準等に留意しつつ、開発した手法が実態調査への使用にあたり要求される性能を満たすことを確認する。

なお、ヘッドスペースサンプラーのガス導入機構は各メーカーにより異なっているため、評価データの一部は、国内で主に使用されるアジレント・テクノロジー及び島津製作所の主要2社の機種で確認を行う。

本研究内容については、令和元年度中に行政部局と協議し、マトリックスを5種（コーヒー浸出液、りんごジュース、しょうゆ、乳児用調製粉乳、ベビーフード）に設定することとした。また、令和元年度の終了段階で行政部局と協議し、各マトリックスにおいて、以下の性能を満たすことを目標とした。

【定量下限】1 µg/kg

（コーヒー浸出液（フラン、2-メチルフランのみ）、しょうゆは、5 µg/kg）

3 濃度で添加回収試験（1回4連、5日間繰り返し）において、

【各添加濃度における回収率】70-120%

【各添加濃度における中間精度（RSDi）】20%以下

(小課題 1-5) 複数試験室での妥当性評価

各分析法について、複数試験室間で以下の内容を評価する。

- ① あらかじめ濃度を確認した複数濃度の試料を準備する。
- ② ①の試料を各試験室において、各濃度N=6で測定を行う。
- ③ 得られた測定値から各濃度における室間再現精度及びHORRAT値を確認する。

本研究内容については、令和元年度終了の段階において、HS-GC-MSを保有し、かつ妥当性評価の実施に必要な期間を確保できる協力機関がない見通しとなったことから、行政部局との調整の結果、同一機関（一般財団法人日本食品分析センター）内の別の独立した試験室において、小課題1-4で設定した性能を満たすことを確認することとした。

注1: Risks for public health related to the presence of furan and methylfurans in food

2) 中課題2：メチルフラン類縁体濃度とフラン濃度との関係の解析

(小課題 2-1) 含有濃度の測定

中課題1で妥当性データを取得した食品をはじめ、我が国特有の食品や海外での調査例が少ない食品を中心に市販製品を購入し（行政部局と協議）、開発した分析法により含有濃度を測定する。

本研究内容については、行政部局との調整により、妥当性データを取得した食品及び分子種に限り実施した。

(小課題 2-2) 結果の解析

食品別にメチルフラン類縁体濃度とフラン濃度との関係を整理する。

(2) 達成目標及び進捗目標

- ・国内で流通する多様な食品群に対応可能で、実態調査への使用にあたり要求される性能を満たすフラン及びメチルフランの同時分析法並びに2,5-ジメチルフラン分析法の確立。
- ・我が国特有の食品や海外での調査例が少ない食品のフラン及びメチルフラン類縁体の濃度を測定し、食品別にメチルフラン類縁体濃度とフラン濃度との関係を明らかにする。

(3) 研究成果の行政施策・措置への貢献

開発した分析法は、加工食品に含まれるフラン及びメチルフラン類縁体の含有実態調査に利用するとともに、経口摂取量の推計やフラン類低減の調査、技術開発への活用が期待できる。

(4) 年次計画

項目	平成30年度	令和元年度	令和2年度
1. 加工食品中に含まれるメチルフラン類縁体の定量分析法の開発			
(1) 文献調査	←→ 分析法案の設計		
(2) 2-メチルフラン及び3-メチルフランの定量分析法	←→ メチルフラン分析法の確立		
(3) 2,5-ジメチルフランの定量分析法	←→ ジメチルフラン分析法の確立		
(4) 単一試験室での妥当性評価		室内妥当性評価 ←→	
(5) 複数試験室での妥当性評価			室間妥当性評価 ←→
2. メチルフラン類縁体濃度とフラン濃度との関係の解析			
(1) 含有濃度の測定			買い取り調査 ←→
(2) 結果の解析			データ解析 ←→
所要経費（合計）	8,000千円	8,074千円	8,140千円

(注) 中課題1の小課題(2)～(4)については、令和元年度に終了予定であったが、固体のマトリックスの分析法について追加の検討を必要としたこと、単一試験室での妥当性評価を一部再取得する必要性が生じたことから、終了予定が令和2年度前半に変更となった。

また特殊機器であるヘッドスペースサンプラーを保有している協力機関において、複数試験室での妥当性評価の実施に必要な期間を確保できない見通しとなったことから、行政部局と協議し、令和2年度に追加取得する単一試験室での妥当性評価の結果をもって確立された方法に

より、中課題1の小課題（5）の方向性と中課題2の内容の一部見直しを実施することとした。

（5）実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	日本食品分析センター	小木曾 基樹	3
1. 加工食品中に含まれるメチルフラン類縁体の定量分析法の開発		○ 飯塚 誠一郎 (30年6月～令和2年3月)	12
		鳥海 栄輔 (令和2年4月～)	10
(1) 文献調査		△ 小木曾 基樹	前出
		藤田 和弘	—
		小寺 和樹	—
(2) 2-メチルフラン及び3-メチルフランの定量分析法		△ 西村 佳那子	25
		橋本 千尋	37
(3) 2,5-ジメチルフランの定量分析法		△ 小寺 和樹	5
		岩部 雄大	8
		(31年7月～)	
		横関 俊昭	—
		北川 未来	1
		(31年7月～)	
		伊藤 朱美	0.4
(4) 単一試験室での妥当性評価		△ 鳥海 栄輔	前出
		西村 佳那子	前出
		橋本 千尋	前出
		小寺 和樹	前出
(5) 複数試験室での妥当性評価		△ 鳥海 栄輔	前出
		西村 佳那子	前出
		橋本 千尋	前出
		小寺 和樹	前出
2. メチルフラン類縁体濃度とフラン濃度との関係の解析		○ 鳥海 栄輔	前出
(1) 含有濃度の測定		△ 西村 佳那子	前出
		橋本 千尋	前出
		小寺 和樹	前出
(2) 結果の解析		△ 鳥海 栄輔	前出
		西村 佳那子	前出
		橋本 千尋	前出
		小寺 和樹	前出

（注1） 研究総括者には◎、中課題責任者には○、小課題責任者には△を付すこと。

(6) 各年度の研究費

平成30年度	8,000,000円
令和元年度	8,074,000円
令和2年度	8,140,000円

3 研究推進会議の開催状況

別添(1)のとおり。

4 研究成果の概要(別紙1参照)

(1) 主な成果

1) 成果の内容(別添(2)参照)

(ア) 加工食品中のフラン及びメチルフラン類縁体等の単一試験室における妥当性確認

海外の先行研究において報告されていた分析法(HS-GC/MS法)を改良し、フラン(FRN)及びメチルフラン類縁体等(2-メチルフラン(2MF)、3-メチルフラン(3MF)、2,5-ジメチルフラン(2,5DMF)、2,3-ジメチルフラン(2,3DMF)、2-エチルフラン(2EF))の6種を同時分析が可能な分析法を開発した。開発した分析法について、海外における含有実態情報及び各分析種の毒性情報を考慮し、表1に示す5種類の加工食品(コーヒー浸出液、りんごジュース、しょうゆ、乳幼児用調製粉乳、ベビーフード)と分析種の組合せについて単一試験室での妥当性を評価したところ、精確な分析が可能であることが確認できた。コーヒー浸出液、しょうゆについては、別の独立した試験室においても同様に妥当性を評価し、6種又は5種の分析種について精確な分析が可能であることを確認した。

表1 単一試験室での妥当性が確認された食品と分析種の組合せ

	FRN	2MF	3MF	2,5DMF	2,3DMF	2EF
コーヒー浸出液	✓	✓	✓	✓	✓	✓
りんごジュース	✓	✓	✓	✓		
しょうゆ	✓	✓	✓	✓		✓
乳幼児用調製粉乳	✓	✓	✓	✓		
ベビーフード	✓	✓	✓			✓※

※ベビーフード/2EFの組合せについては、単一試験室での妥当性は確認されたものの、(イ)で実施した含有実態調査において適切に濃度を測定できなかった製品が一部存在した。

(イ) メチルフラン類縁体等濃度とフラン濃度との関係の解析

(ア)で妥当性を確認した5種類の加工食品それぞれについて、妥当性が確認された分析種を対象として、国内で流通する製品を対象に予備的な含有実態調査を行い、各食品中のフラン及びメチルフラン類縁体等濃度の構成比を推定した。その結果、コーヒー浸出液を除く4種の加工食品では、フランが最も高濃度に含まれていたが、フラン及びメチルフラン類縁体等の構成比は異なっていた。コーヒー浸出液については、その他の食品とは異なり、2-メチルフランが最も高濃度に含まれており、特徴的な構成比であった(表20)。

2) 成果の活用（別添（2）参照）

開発した分析法について、農林水産省が、必要に応じて複数試験室間での妥当性を確認した上で、加工食品中のフラン及びメチルフラン類縁体等の含有実態調査に活用するとともに、経口摂取量の推定やフラン及びメチルフラン類縁体等の低減技術の開発に活用する。

（2）各研究課題の成果

1) 中課題1：加工食品中に含まれるメチルフラン類縁体の定量分析法の開発

（ア）研究目標

国内で流通する多様な食品群に対応可能で、実態調査への使用にあたり要求される性能を満たすフラン及びメチルフランの同時分析法並びに2,5-ジメチルフラン分析法の確立。

（イ）研究内容

フランは沸点31.36℃（Merck；14th, 2006）の液体で、揮発性溶媒の中でも気化性の高いジエチルエーテル34.6℃（Merck；13th, 2001）とほぼ同様の物性を有する物質であることから、ヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計（HS-GC-MS）による測定が一般的である。

本研究では、まずメチルフラン類縁体等の測定に関する文献を収集し、測定法の違いを整理し、個々の測定法の操作を評価した上でメチルフラン分析法の骨格を策定する。

策定した分析法の骨格を基に、フラン、2-メチルフラン及び3-メチルフランの分析法を開発、またその分析法について2,5-ジメチルフランへの適用可能性を確認する。開発した分析法では2,5-ジメチルフランがフラン、メチルフランと同時に分析できないことが判明した場合は、新たに2,5-ジメチルフランの個別分析法を確立する。

なお、分析法の開発にあたっては、

- ①ヘッドスペース法を第一優先とする。
- ②フラン同様に各類縁体の定量下限も1 µg/kgを目標とする。
- ③2-エチルフラン、プロピルフラン、ブチルフラン、ペンチルフランへの適用可能性を確認する。

分析法確立後は単一試験室による妥当性評価を実施し、コーデックス委員会の手続きマニュアル（Codex Alimentarius Commission Procedural Manual）に定められている性能規準等に留意しつつ、開発した方法が実態調査への使用にあたり要求される性能を満たすことを確認する。

また、当初は、複数試験室での妥当性評価を行う計画であったが、ヘッドスペースサンプラーの保有機関を複数確保できない見通しとなったことから、行政部局と協議し、同一機関内の別の独立した試験室にて、妥当性評価を実施する。

（ウ）研究結果

2,5-ジメチルフランまで含めた同時分析法の確立には、各成分の分離、適用サンプルにおいて2次生成しない加温条件の設定が初年度の大きな問題であったが、文献調査並びに分析カラム選定及びヘッドスペースサンプラーの温度制御の検討を実施したことで解決に至った。

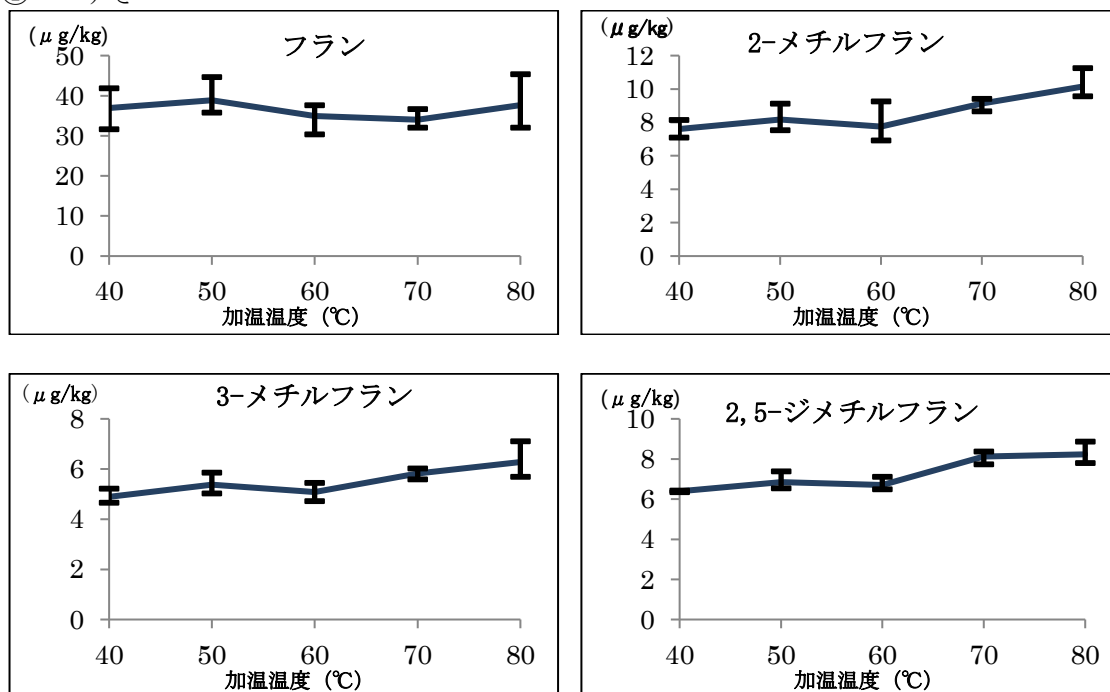
《2次生成しない加温条件の設定検討》

1) 加温時間を15分で固定し、ヘッドスペースサンプラーのオープン温度を40、50、60、70、80℃として測定した際のフラン及び各メチルフラン類縁体の濃度変化を図1に示した(試行回数3回で実施し、エラーバーは最小値と最大値を示している)。

加温温度については、みそでは、フラン以外の物質で70℃以上になると検出値が増加したことから、ヘッドスペースサンプラー内でメチルフランやジメチルフランが2次生成していると考えられた。一方、ベビーフード及びコーヒー浸出液では、ヘッドスペースサンプラー内で2次生成を示唆する結果は得られなかった。

さらに、3回の試行から得られた結果から、コーヒー浸出液(液状試料)ではばらつきが小さく精度良く測定できていることが判ったが、みそやベビーフードといった半固形試料ではばらつきが大きいことが確認された。これはフランが室温で揮散するため、試料の均質化に時間をかけて十分に行えないことを反映しているものと判断された。さらに、みそでは、2,5-ジメチルフランの内標準物質の回収率が40 %を下回り、測定値の信頼性に疑問が生じる状態となった。

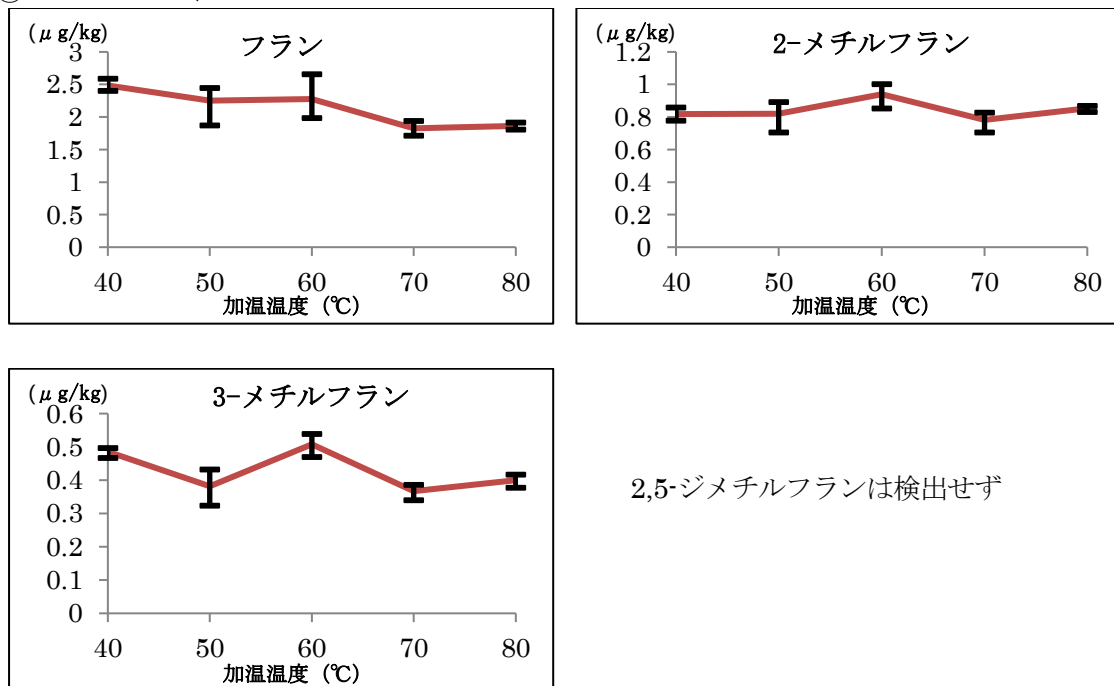
① みそ



※試行回数3回で実施し、エラーバーは最小値と最大値を示す

図-1-1 フラン及びメチルフラン類縁体の加熱温度による検出値の変化

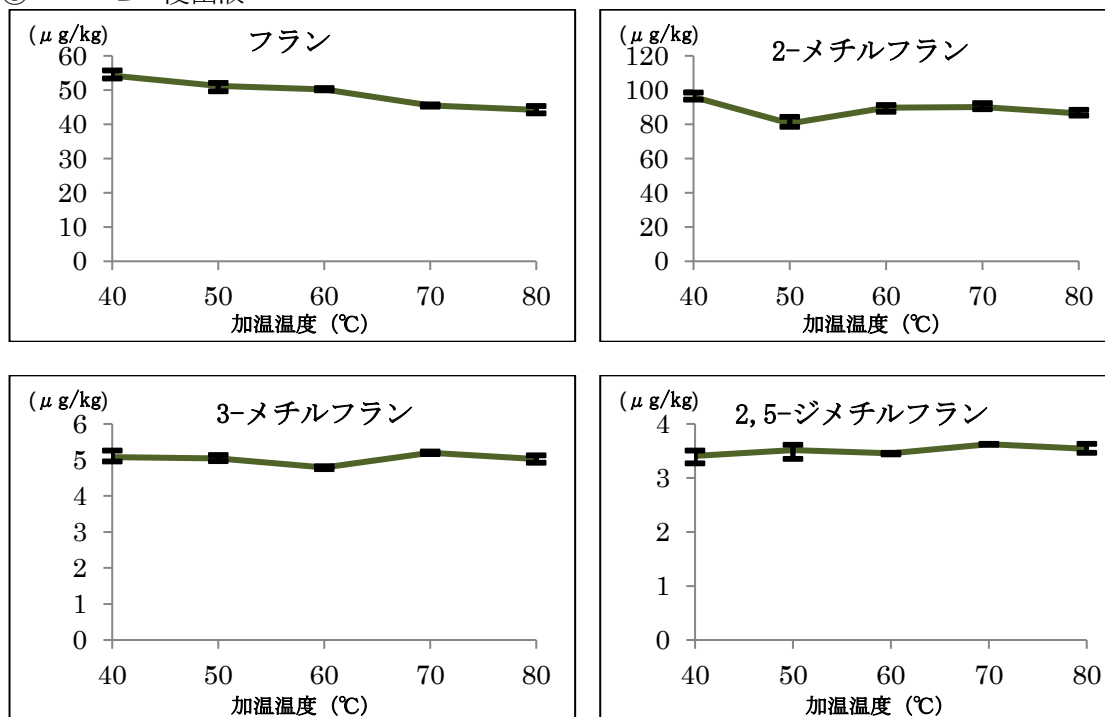
② ベビーフード



※試行回数3回で実施し、エラーバーは最小値と最大値を示す

図-1-2 フラン及びメチルフラン類縁体の加熱温度による検出値の変化

③ コーヒー浸出液



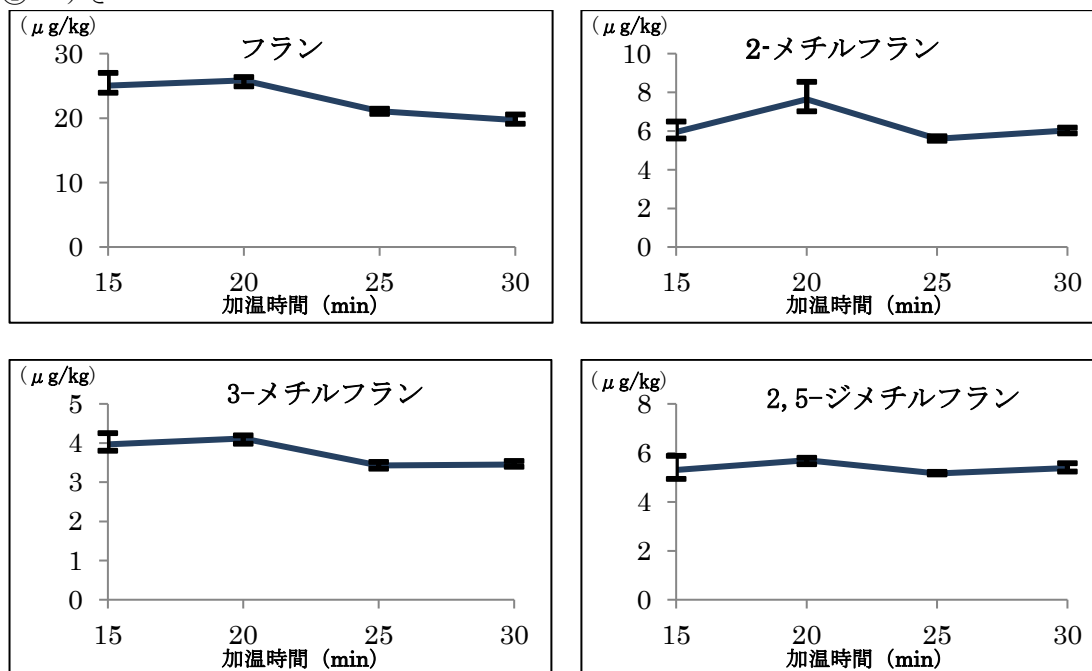
※試行回数3回で実施し、エラーバーは最小値と最大値を示す

図-1-3 フラン及びメチルフラン類縁体の加熱温度による検出値の変化

2) 加温温度を 60℃で固定し、加温時間を 15、20、25、30 分として測定した際のフラン及び各メチルフラン類縁体の濃度変化を図 2 に示した(試行回数 3 回で実施し、エラーバーは最小値と最大値を示している)。

加温時間については、フラン及びメチルフラン類縁体のいずれにおいても、2次生成を示唆する結果は得られなかった。

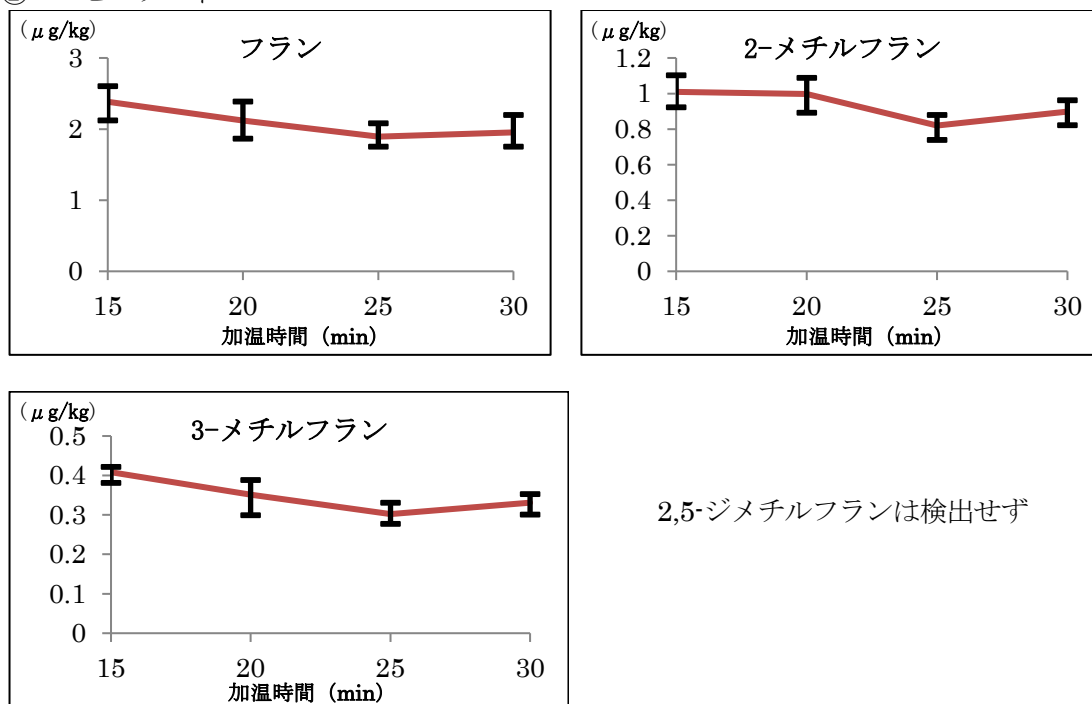
① みそ



※試行回数3回で実施し、エラーバーは最小値と最大値を示す

図-2-1 フラン及びメチルフラン類縁体の加熱時間による検出値の変化

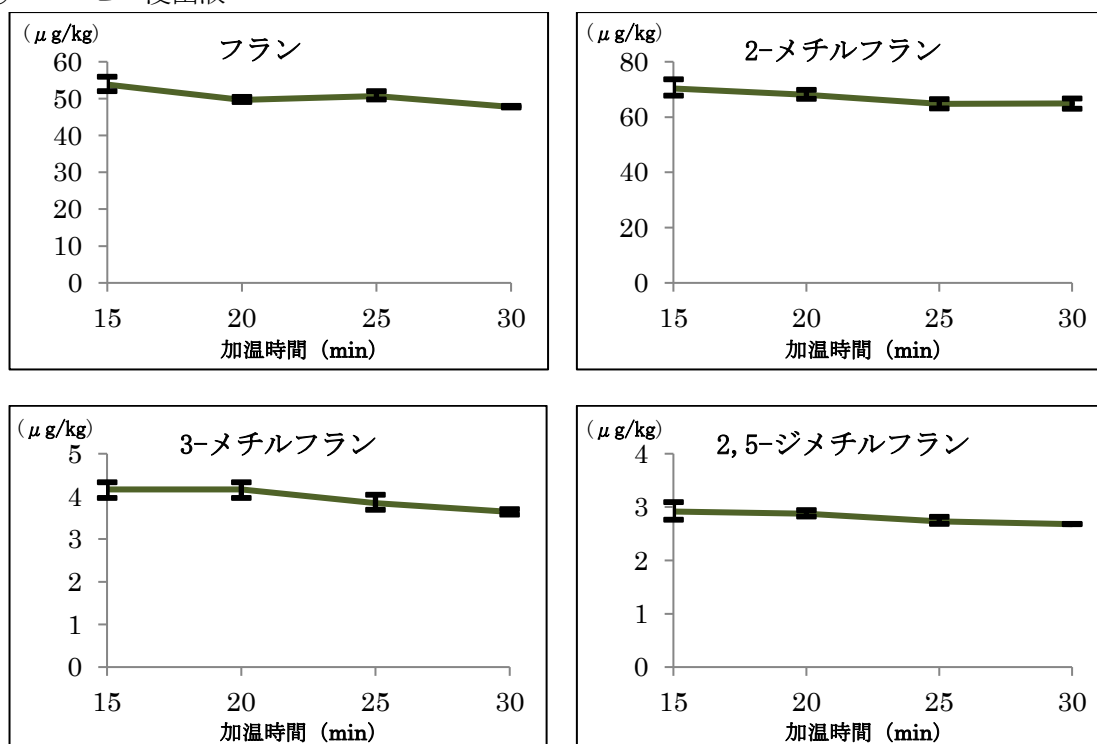
② ベビーフード



※試行回数3回で実施し、エラーバーは最小値と最大値を示す

図-2-2 フラン及びメチルフラン類縁体の加熱時間による検出値の変化

③ コーヒー浸出液



※試行回数3回で実施し、エラーバーは最小値と最大値を示す

図-2-3 フラン及びメチルフラン類縁体の加熱時間による検出値の変化

次いで発生した課題は固形試料に対しての定量値のばらつき、液体試料も含めた保管中でのフラン類の減衰であった。本課題に対しても種々の検討を行った結果、固形試料の調製に適切な時間、試料の保管には温度帯（冷蔵あるいは冷凍）よりも保管容器の影響が大きい（ポリプロピレン製容器では吸着がある）等の結果が得られ、解決に至った。

なお、固形試料の調製に適切な時間の検討は、本事業とは別途に実施した検討であるが、参考として記述する。

《固形試料の調製に適切な時間の検討》

固形試料において、なるべく固形物の残存をなくし、均質化が必要となる。そのため調製方法の評価として、2種の半固形試料を用いて、調製時間による定量値の変化と試料の状態の確認を実施した。結果を表2に示した。

表2 調製時間による定量値の変化と試料の状態

試料名	ホモジナイズ時間(分)	フラン(ppb)	平均(ppb)	残存率(%)	サンプルの状態
ドリア	0	16.2	15.5	100	
		16.5			
		13.9			
	0.5	13.4	12.5	81	固形物がかなり残っていた
		12.9			
		11.2			
	1.0	11.8	11.3	73	固形物がわずかに残っていた
		11.4			
		10.7			
	2.0	10.4	10.8	70	ペースト状になっていた
		11.0			
		11.1			
ホワイトシチュー	0	8.74	8.47	100	
		8.39			
		8.29			
	0.5	7.60	7.76	92	固形物がかなり残っていた
		7.48			
		8.22			
	1.0	6.15	6.02	71	固形物がわずかに残っていた
		5.89			
	2.0	5.23	5.10	60	ペースト状になっていた
		5.19			
		4.88			

上記結果からはホワイトシチュー0分においてもばらつきのない結果が得られているが、通常、固形物の残存はばらつきの大きな原因となる。そのため、ホモジナイズは、上記結果よりサンプルの状態に留意しつつ、1分以内で実施することが望ましいと判断した。

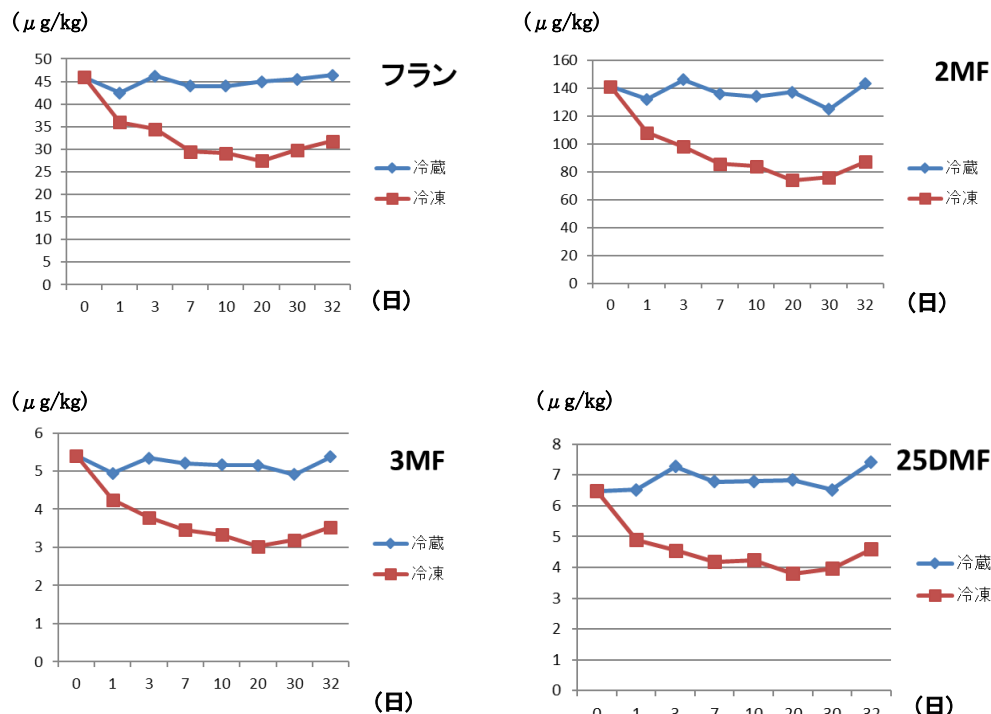
《試料の保管に適切な温度帯の検討》

平成30年度の検討からフラン類が保管期間中に減衰している懸念があったことから、試料中の適切な保管条件を確認した。

フラン類を比較的高濃度に含有するブラックコーヒーを、①冷蔵；ガラス容器（ヘッドスペースバイアル）に注ぎ、口まで満たした状態で密封した。②冷凍；ポリプロピレン製の溶液を冷凍保管するための市販の専用容器にコーヒーを注ぎ、口まで満たした状態で密封した。①、②を0～32日目まで保管し、フラン～2,5-ジメチルフランまで測定し、傾向を調べた。なお、保存試料は測定回数分作成し、測定の都度1本ずつ開封し、試験した。

その結果（図3）冷蔵保存では減衰はみられず、冷凍保存では明らかに減衰した。冷凍保存の方が減衰したことから、保管温度の違いではなく、保管容器の材質の違い、すなわちポリプロピレンにフラン類が吸着したものと推察された。

したがって、試料の保管はガラス容器に口まで満たした状態で冷蔵保管することにより、約1ヶ月（32日間）の保管が可能と結論づけた。



冷蔵；ガラス製 20mL 容ヘッドスペースバイアルにより保存（2～8℃）

冷凍；ポリプロピレン製 3mL 容クライオバイアルにより保存（-10℃以下）

図3 冷蔵及び冷凍保管によるフラン及びメチルフラン類縁体の減衰確認

以上の検討結果より、フラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン及び2,5-ジメチルフランの同時分析が可能な分析法が確立された。

（別紙2；液体中のフラン及びメチルフラン類縁体等分析法手順書参照）

（別紙3；乳児用調製粉乳及びベビーフード中のフラン及びメチルフラン類縁体等分析法手順書参照）

研究2年目（令和元年度）から3年目（令和2年度）にかけて、確立した分析法にて妥当性評価を実施した。

計画当初は代表的なマトリックスを6種以上と設定したが、行政部局との調整により、コーヒー浸出液、透明りんごジュース、しょうゆ、乳児用調製粉乳及びベビーフードの5種を対象としての実施に変更した。

令和元年度にはコーヒー浸出液（無糖ペットボトルコーヒー）、透明りんごジュース、しょうゆの液体試料3種についてデータ取得を実施し、フラン(FRN)、2-メチルフラン(2MF)、3-メチルフラン(3MF)及び2,5-ジメチルフラン(2,5DMF)に加え、2-エチルフラン(2EF)、2,3-ジメチルフラン(2,3DMF)及びペンチルフラン(PEN)も分析対象とし、試行数4回、5日間の室内再現性試験を実施した。結果を表3～5に示した。なお、コーヒー浸出液はフラン、2-メチルフランの高濃度含有試料であり、回収率等の算出にあたりコントロール値（マトリックス由来ブランク値）による影響を極力避けるため、「一晩のスターラー攪拌」といった減衰操作を実施したものを使用した。それでも添加濃度に対して無視できないレベルのコントロール値は測定結果から差し引いて回収率を算出した。

表3 コーヒー浸出液の室内再現性結果

測定化合物	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	標準 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 標準不確かさ	拡張 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 拡張不確かさ	検出下限 (µg/kg)	定量下限 (µg/kg)
FRN	1*	92.26	21.27	23.27	0.21	0.10	0.43	0.20	0.74	2.14
	50	99.36	1.02	2.66	1.25	5.17	2.50	10.33		
	500	102.95	1.73	3.00	14.60	43.39	29.20	86.78		
2MF	1**	93.99	7.60	16.03	0.15	0.10	0.31	0.21	0.53	1.53
	50	94.11	3.40	4.46	2.13	5.25	4.26	10.50		
	500	103.86	3.23	9.30	49.02	46.42	98.04	92.80		
3MF	1	106.65	3.54	4.62	0.05	0.12	0.10	0.24	0.17	0.49
	10	100.73	2.49	4.03	0.41	1.11	0.82	2.23		
	100	102.09	3.29	5.96	6.12	11.29	12.23	22.57		
25DMF	1	115.62	4.42	4.69	0.05	0.13	0.11	0.25	0.19	0.54
	10	101.41	3.13	4.71	0.48	1.11	0.95	2.23		
	100	100.64	3.54	6.03	6.06	11.05	12.11	22.10		
2EF	1	109.51	7.18	9.95	0.11	0.12	0.22	0.24	0.38	1.09
	10	98.98	2.49	4.08	0.40	1.09	0.81	2.18		
	100	101.14	3.40	5.84	5.90	11.11	11.80	22.23		
23DMF	1	76.28	9.70	11.89	0.09	0.08	0.18	0.17	0.32	0.91
	10	78.39	2.82	4.72	0.37	0.87	0.74	1.73		
	100	79.14	3.77	6.27	4.99	8.75	9.97	17.50		
PEN	1	107.69	4.81	10.67	0.12	0.12	0.24	0.24	0.41	1.18
	10	94.84	3.30	4.38	0.43	1.08	0.86	2.15		
	100	95.71	6.05	6.72	6.63	10.85	13.26	21.71		

*コントロール値(0.1～0.7 µg/kg)を引いて計算

**コントロール値(0.1～0.5 µg/kg)を引いて計算

表4 透明りんごジュースの室内再現性結果

測定化合物	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	標準 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 標準不確かさ	拡張 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 拡張不確かさ	検出下限 ($\mu\text{g/kg}$)	定量下限 ($\mu\text{g/kg}$)
FRN	1*	102.58	3.56	12.92	0.13	0.11	0.25	0.22	0.44	1.26
	10	103.27	1.77	1.81	0.18	1.08	0.36	2.17	—	—
	100	100.85	0.87	0.89	0.90	11.09	1.79	22.18	—	—
2MF	1	101.81	3.85	6.61	0.07	0.11	0.14	0.23	0.24	0.68
	10	94.29	5.90	5.90	0.56	1.05	1.13	2.11	—	—
	100	98.89	3.39	3.95	3.96	11.04	7.93	22.08	—	—
3MF	1	103.91	3.72	5.30	0.06	0.11	0.11	0.23	0.19	0.55
	10	96.80	5.45	5.55	0.54	1.07	1.08	2.14	—	—
	100	100.86	2.91	3.13	3.17	11.15	6.35	22.30	—	—
25DMF	1	107.67	5.92	5.92	0.06	0.12	0.13	0.24	0.22	0.64
	10	95.91	6.41	6.68	0.64	1.05	1.28	2.11	—	—
	100	102.85	4.16	4.40	4.52	11.29	9.03	22.58	—	—
2EF	1	121.96	4.40	15.09	0.18	0.13	0.37	0.27	0.64	1.84
	10	102.70	5.99	6.05	0.62	1.13	1.24	2.26	—	—
	100	109.37	5.37	5.45	5.95	12.02	11.91	24.04	—	—
23DMF	1	69.02	9.91	20.23	0.14	0.08	0.28	0.15	0.49	1.40
	10	68.61	5.68	6.48	0.45	0.76	0.89	1.52	—	—
	100	74.13	4.92	4.92	3.67	8.19	7.33	16.39	—	—
PEN	1	122.35	26.82	49.97	0.63	0.14	1.26	0.28	2.18	6.30
	10	80.52	20.30	32.29	2.68	0.91	5.36	1.83	—	—
	100	109.34	21.43	30.18	34.05	12.40	68.09	24.80	—	—

*コントロール値(0.1～0.3 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算

表5 しょうゆの室内再現性結果

測定化合物	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	標準 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 標準不確かさ	拡張 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 拡張不確かさ	検出下限 ($\mu\text{g/kg}$)	定量下限 ($\mu\text{g/kg}$)
FRN	5*	110.39	4.47	6.83	0.36	0.58	0.72	1.16	1.24	3.59
	10**	104.16	2.33	3.69	0.37	1.09	0.73	2.19	—	—
	100***	100.03	1.04	1.22	1.22	11.00	2.44	22.00	—	—
2MF	5 [※]	93.13	7.91	7.91	0.37	0.52	0.75	1.04	1.29	3.74
	10 ^{※※}	92.68	7.09	8.26	0.78	1.03	1.55	2.07	—	—
	100 ^{※※※}	98.94	3.71	3.76	3.78	11.05	7.55	22.09	—	—
3MF	5	95.93	6.53	7.19	0.35	0.53	0.69	1.06	1.20	3.46
	10	93.60	6.62	7.49	0.70	1.03	1.41	2.07	—	—
	100	102.85	3.50	3.50	3.62	11.37	7.24	22.74	—	—
25DMF	5	96.68	8.15	8.48	0.41	0.53	0.82	1.06	1.41	4.09
	10	93.83	7.05	8.27	0.77	1.03	1.55	2.06	—	—
	100	103.03	3.48	3.48	3.58	11.31	7.16	22.62	—	—
2EF	5	94.07	8.62	8.62	0.41	0.52	0.81	1.03	1.40	4.05
	10	91.88	7.68	9.19	0.84	1.01	1.69	2.02	—	—
	100	100.56	3.56	3.80	3.82	11.05	7.63	22.10	—	—
23DMF	5	45.18	10.14	25.13	0.57	0.25	1.14	0.50	1.97	5.71
	10	49.58	9.67	13.26	0.66	0.55	1.33	1.10	—	—
	100	52.11	5.23	5.36	2.81	5.76	5.61	11.52	—	—
PEN	5	92.16	9.72	9.72	0.46	0.52	0.92	1.05	1.60	4.62
	10	91.59	6.67	8.34	0.79	1.04	1.57	2.08	—	—
	100	100.25	3.58	5.01	5.18	11.37	10.36	22.74	—	—

*コントロール値(1.6～4.5 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算, **コントロール値(2.5～10 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算, ***コントロール値(9.3～17 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算※コントロール値(0.2～0.7 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算, ※※コントロール値(1.0～1.6 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算, ※※※コントロール値(2.1～3.0 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算

令和元年度の液体試料3種の結果を基に、行政部局との協議の上、以下の方向性を令和2年度の研究方針とした。

《液体試料における追加の評価》

- ① コーヒー浸出液において性能基準（定量下限；1 $\mu\text{g/kg}$ 、中間精度；20%以下）を満たす結果が得られなかったフラン及び 2-メチルフランについて、目標定量下限を 5 $\mu\text{g/kg}$ と再設定し、同方法にて再度評価する。
- ② 透明りんごジュースで評価できた分析対象種（フラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン及び 2, 5-ジメチルフラン）において混濁りんごジュースへの適用確認を実施する

《固体試料における妥当性評価》

- ③ 2種類の固形試料（乳児用調製粉乳及びベビーフード）にて妥当性評価を実施す

る。ただし、ベビーフードに関しては、行政部局と協議し、海外の含有実態情報や毒性情報を考慮の上、本事業では、2,5-ジメチルフランは除外し、2-エチルフランを対象とした。

なお、①～③の妥当性評価実施において、機器測定時の注入方法や採用基準を以下のように定めて運用した。

- i) 分析法手順書に示した測定順序例に従い、サンプル注入の前後で検量線をとるが、基本的にはサンプル注入前の検量線にて評価をする。
- ii) 検量線の性能基準として、相関係数0.999以上であること。
- iii) 妥当性評価の回収率算出時、添加濃度に対して無視できないレベルのコントロール値は測定結果から差し引く

① ～③の研究結果としては、

- ① コーヒー浸出液において、定量下限を 5 µg/kg と再設定して実施したフラン及び2-メチルフランの結果は性能基準を十分に満たす結果であった（表6）。
- ② 混濁りんごジュースへの適用確認においては、透明りんごジュースで妥当性が確認された4分析種（フラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン及び2,5-ジメチルフラン）いずれにおいても、性能基準を満たす回収率が得られた（表7）。
- ③ 乳児用調製粉乳及びベビーフードそれぞれの試料において、対象とした分析種で良好な結果が得られた（表8及び9）。

同一機関内の独立した別の試験室による妥当性評価については、対象試料をコーヒー浸出液及びしょうゆの2試料としたが、いずれの対象分析種についても性能基準を十分に満たす結果が得られた（表10及び11）。

（エ）研究成果の活用における留意点

液体試料としては3種、固形試料としては2種に対して、それぞれ本分析法を適用可能な分析対象種を選択した。他のマトリックスに本試験法を適用する場合は、分析対象種ごとに妥当性の確認が必要と思われる。

（オ）研究目標の達成に当たっての問題点

フランは揮発性が高いため、その分析においては安定同位体試薬であるd₄-フランを内標準物質として用いることが常法となっている。本研究でも各分析対象種に対して、入手可能な安定同位体試薬を入手、使用したが、入手先であるメーカーから輸入ができなくなる等の問題が事業中にもあり、内標準物質の入手には一部不安がある。

本研究では、評価試料及び分析対象種に一定の制限を設けたが、AOACのFURAN Working Groupでは評価対象をフラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン、2,5-ジメチルフラン、2-エチルフラン及び2-ペンチルフランとしている。そのため、2-ペンチルフランまでを測定対象とした場合を想定した別法での分析法を検討したが、現時点では2-ペンチルフランを高感度で測定できる分析法を確立できなかった。

表6 コーヒー浸出液の室内再現性結果

測定化合物	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	標準 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 標準不確かさ	拡張 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 拡張不確かさ	検出下限 (µg/kg)	定量下限 (µg/kg)
FRN	5*	99.92	1.87	2.41	0.12	0.55	0.24	1.10	0.42	1.20
	50	99.36	1.02	2.66	1.25	5.17	2.50	10.33		
	500	102.95	1.73	3.00	14.60	43.39	29.20	86.78		
2MF	5*	102.57	2.10	2.10	0.11	0.56	0.22	1.13	0.37	1.08
	50	94.11	3.40	4.46	2.13	5.25	4.26	10.50		
	500	103.86	3.23	9.30	49.02	46.42	98.04	92.80		
3MF	1	106.65	3.54	4.62	0.05	0.12	0.10	0.24	0.17	0.49
	10	100.73	2.49	4.03	0.41	1.11	0.82	2.23		
	100	102.09	3.29	5.96	6.12	11.29	12.23	22.57		
25DMF	1	115.62	4.42	4.69	0.05	0.13	0.11	0.25	0.19	0.54
	10	101.41	3.13	4.71	0.48	1.11	0.95	2.23		
	100	100.64	3.54	6.03	6.06	11.05	12.11	22.10		
2EF	1	109.51	7.18	9.95	0.11	0.12	0.22	0.24	0.38	1.09
	10	98.98	2.49	4.08	0.40	1.09	0.81	2.18		
	100	101.14	3.40	5.84	5.90	11.11	11.80	22.23		
23DMF	1	76.28	9.70	11.89	0.09	0.08	0.18	0.17	0.32	0.91
	10	78.39	2.82	4.72	0.37	0.87	0.74	1.73		
	100	79.14	3.77	6.27	4.99	8.75	9.97	17.50		
PEN	1	107.69	4.81	10.67	0.12	0.12	0.24	0.24	0.41	1.18
	10	94.84	3.30	4.38	0.43	1.08	0.86	2.15		
	100	95.71	6.05	6.72	6.63	10.85	13.26	21.71		

*令和2年度取得データ

表7 混濁りんごジュースへの適用確認結果

項目名:FRN

測定回数	測定重量 (ng)		
	添加重量(ng)	添加重量(ng)	添加重量(ng)
	1	10	100
1回目	0.9762977	9.572220601	97.67523489
2回目	0.955218189	9.488761911	97.29837111
3回目	0.985925802	9.768348081	99.58528487
4回目	0.998940992	9.784762292	98.66702351
5回目	0.93991022	9.63113039	99.53968543
平均値(ng)	0.9713	9.649	98.55
回収率(%)	97.13	96.49	98.55
標準偏差	0.02	0.13	1.05
相対標準偏差(%)	2.4	1.3	1.1

項目名:2MF

測定回数	測定重量 (ng)		
	添加重量(ng)	添加重量(ng)	添加重量(ng)
	1	10	100
1回目	1.098233364	10.03033903	98.29845573
2回目	1.019175971	10.11480111	99.82345901
3回目	1.032095802	9.900155525	95.31826456
4回目	1.021410297	10.18098912	98.79494699
5回目	1.004780646	10.03141535	98.06757135
平均値(ng)	1.0351	10.052	98.06
回収率(%)	103.51	100.52	98.06
標準偏差	0.04	0.11	1.68
相対標準偏差(%)	3.5	1.0	1.7

項目名:3MF

測定回数	測定重量(ng)		
	添加重量(ng)	添加重量(ng)	添加重量(ng)
	1	10	100
1回目	1.03363671	10.09877536	101.0486628
2回目	1.001327281	10.04940969	100.6386368
3回目	1.013629581	9.970381901	101.4154678
4回目	1.017881257	10.41303901	101.2388079
5回目	1.038431935	10.13535571	100.9513831
平均値(ng)	1.0210	10.133	101.06
回収率(%)	102.10	101.33	101.06
標準偏差	0.02	0.17	0.29
相対標準偏差(%)	1.5	1.7	0.3

項目名:25DMF

測定回数	測定重量 (ng)		
	添加重量(ng)	添加重量(ng)	添加重量(ng)
	1	10	100
1回目	1.076254877	9.71585395	100.0750868
2回目	1.120985887	9.964663994	97.80844177
3回目	1.136126305	9.717843885	100.2619517
4回目	1.061863792	9.827901081	101.1206225
5回目	1.088853778	9.776989355	101.1620372
平均値(ng)	1.0968	9.801	100.09
回収率(%)	109.68	98.01	100.09
標準偏差	0.03	0.10	1.36
相対標準偏差(%)	2.8	1.0	1.4

表8 調製粉乳の室内再現性結果

測定化合物	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	標準 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 標準不確かさ	拡張 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 拡張不確かさ	検出下限 (µg/kg)	定量下限 (µg/kg)
FRN	1*	95.90	2.59	3.97	0.04	0.11	0.08	0.21	0.13	0.38
	10	94.90	1.34	2.49	0.24	1.04	0.47	2.09	—	—
	100	100.50	2.08	2.35	2.36	11.06	4.72	22.11	—	—
2MF	1**	97.10	3.66	3.76	0.04	0.11	0.07	0.21	0.13	0.36
	10	100.30	1.61	1.89	0.19	1.10	0.38	2.21	—	—
	100	97.26	1.02	1.81	1.76	10.70	3.52	21.40	—	—
3MF	1	104.85	2.66	4.99	0.05	0.12	0.10	0.23	0.18	0.52
	10	99.88	1.94	1.94	0.19	1.10	0.39	2.20	—	—
	100	97.14	1.40	1.64	1.59	10.69	3.19	21.37	—	—
25DMF	1	109.27	4.01	6.07	0.07	0.12	0.13	0.24	0.23	0.66
	10	98.79	1.49	1.99	0.20	1.09	0.39	2.17	—	—
	100	96.98	1.15	2.75	2.67	10.67	5.33	21.34	—	—

*一部コントロール値(0.3～1.8 µg/kg)を引いて計算

**一部コントロール値(0.2～1.8 µg/kg)を引いて計算

表9 ベビーフードの室内再現性結果

測定化合物	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	標準 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 標準不確かさ	拡張 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 拡張不確かさ	検出下限 (µg/kg)	定量下限 (µg/kg)
FRN	1*	95.34	2.45	5.16	0.05	0.10	0.10	0.21	0.17	0.49
	10	92.36	1.60	3.54	0.33	1.02	0.65	2.03	—	—
	100	98.90	1.55	1.90	1.88	10.88	3.76	21.76	—	—
2MF	1**	104.98	3.09	9.47	0.10	0.12	0.20	0.23	0.34	0.99
	10	99.58	2.18	2.43	0.24	1.10	0.48	2.19	—	—
	100	97.90	1.66	2.10	2.06	10.77	4.11	21.54	—	—
3MF	1	105.27	3.13	4.45	0.05	0.12	0.09	0.23	0.16	0.47
	10	100.14	1.56	2.00	0.20	1.10	0.40	2.20	—	—
	100	97.23	1.78	1.78	1.73	10.70	3.46	21.39	—	—
2EF	1*	99.61	8.96	12.04	0.12	0.11	0.24	0.22	0.41	1.20
	10*	102.67	2.23	4.47	0.46	1.13	0.92	2.26	—	—
	100*	103.03	2.41	2.52	2.60	11.33	5.19	22.67	—	—

*一部コントロール値(0.1～0.2 µg/kg)を引いて計算

**一部コントロール値(0.1 µg/kg)を引いて計算

表10 同一機関内の独立した別試験室によるコーヒー浸出液の室内再現性結果

測定化合物	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	標準 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 標準不確かさ	拡張 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 拡張不確かさ	検出下限 (µg/kg)	定量下限 (µg/kg)
FRN	5	94.92	1.73	6.24	0.30	0.52	0.59	1.04	1.09	2.96
	50	98.49	1.76	3.86	1.90	5.42	3.80	10.83	—	—
	500	97.40	1.47	2.63	12.81	43.41	25.62	86.81	—	—
2MF	5	102.18	1.39	2.35	0.12	0.56	0.24	1.12	0.44	1.20
	50	100.28	1.04	2.04	1.02	5.52	2.05	11.03	—	—
	500	97.36	1.91	3.46	16.84	43.39	33.69	86.79	—	—
3MF	1	103.82	3.67	4.70	0.05	0.11	0.10	0.23	0.18	0.49
	10	100.66	1.40	2.93	0.29	1.11	0.59	2.21	—	—
	100	99.65	1.47	1.91	1.90	10.96	3.81	21.92	—	—
25DMF	1	111.74	2.95	7.74	0.09	0.12	0.17	0.25	0.32	0.86
	10	98.37	2.40	3.06	0.30	1.08	0.60	2.16	—	—
	100	97.49	1.68	1.98	1.93	10.72	3.86	21.45	—	—
2EF	1	108.96	5.32	12.95	0.14	0.12	0.28	0.24	0.52	1.41
	10	95.25	2.90	4.63	0.44	1.05	0.88	2.10	—	—
	100	99.54	1.84	2.26	2.25	10.95	4.50	21.90	—	—
23DMF	1	106.08	4.97	10.25	0.11	0.12	0.22	0.23	0.40	1.09
	10	92.21	2.11	3.78	0.35	1.01	0.70	2.03	—	—
	100	91.85	1.83	3.30	3.03	10.10	6.06	20.21	—	—

表11 同一機関内の独立した別試験室によるしょうゆの室内再現性結果

測定化合物	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	標準 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 標準不確かさ	拡張 不確かさ	Horwitz修正式に 基づく 拡張不確かさ	検出下限 ($\mu\text{g/kg}$)	定量下限 ($\mu\text{g/kg}$)
FRN	5*	95.31	4.30	7.08	0.34	0.52	0.67	1.05	1.24	3.38
	10*	97.95	3.15	6.37	0.62	1.08	1.25	2.15		
	100**	97.48	1.05	1.94	1.89	10.72	3.78	21.45		
2MF	5***	103.64	1.62	2.71	0.14	0.57	0.28	1.14	0.51	1.40
	10***	101.73	0.99	2.26	0.23	1.12	0.46	2.24		
	100	97.57	1.25	1.97	1.92	10.73	3.84	21.47		
3MF	5	100.58	1.69	2.34	0.12	0.55	0.24	1.11	0.43	1.18
	10	99.23	1.71	3.64	0.36	1.09	0.72	2.18		
	100	98.74	0.83	1.00	0.99	10.86	1.97	21.72		
25DMF	5	102.52	2.14	3.76	0.19	0.56	0.39	1.13	0.71	1.93
	10	101.41	2.19	3.47	0.35	1.12	0.70	2.23		
	100	96.46	1.39	2.02	1.95	10.61	3.90	21.22		
2EF	5	98.90	4.44	4.84	0.24	0.54	0.48	1.09	0.88	2.39
	10	96.55	2.88	3.09	0.30	1.06	0.60	2.12		
	100	98.31	1.44	1.67	1.64	10.81	3.28	21.63		

*コントロール値(1.2~2.0 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算**コントロール値(0.2~3.5 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算***コントロール値(0.2 $\mu\text{g/kg}$)を引いて計算

《別法検討内容》

【測定機器の検討】

a) 液体注入による検出法液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた測定系の検討

①構造異性体である2, 5DMFと2EFが分離できない。

②定量下限1 $\mu\text{g/kg}$ を担保するには最少検出濃度は0.05 $\mu\text{g/ml}$ 程度と見積もられ、50倍濃縮 (50 g→1 ml)が必要となる。

→適用不可と判断された。

b) ヘッドスペース法でないガスクロマトグラフ質量分析計での測定系検討

LC-MS/MS法検討同様、定量下限1 $\mu\text{g/kg}$ を担保するには最少検出濃度は0.05 $\mu\text{g/ml}$ 程度と見積もられ、50倍濃縮 (50 g→1 ml)が必要となる

→適用不可。ただし、パルスドスプリットレス注入 (加圧注入) を採用すれば、10倍程度の増感が見込めるため、再検討の余地あり。

【前処理法の検討】

a) SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) 法の適用

高濃縮するの手法のため、特にプロピル〜ペンチルの領域でサンプル由来の夾雑ピークの影響が大きい

→適用不可と判断された。

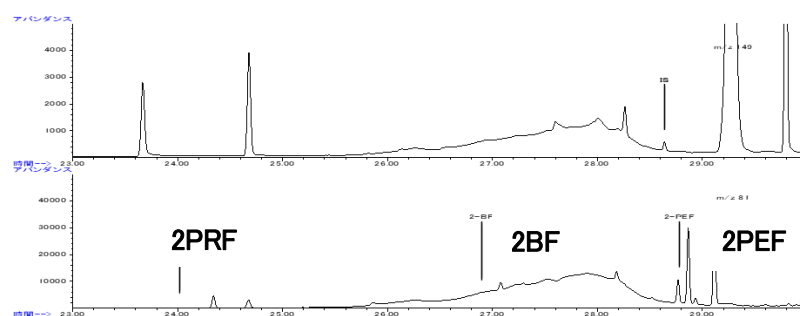


図4 SBSE法による粉乳サンプルのクロマトグラム

粉乳サンプル

b) 溶媒抽出法の適用

メタノール抽出、エーテル転溶をベースに検討を行ったところ、目的物質の回収があまり良くない結果であった。要因として濃縮工程でのロスが考えられたため検討を行った。

検討方法としては、ヘキサンで調製された標準溶液1 ml又はそれを5倍に希釈したもの5 mlを、いずれも0.5 mlまで窒素気流下で濃縮した後、再びヘキサンで1 mlとし(1 mlを濃縮と5 mlを濃縮)、元の標準溶液と比較した。

表12 濃縮試験の結果 (2, 5DMF、2EF、2, 3DMF)

	IS(2.5DMF-d3)	2.5DMF	2EF	2.3DMF
濃縮1ml	114	63	62	64
濃縮5ml	35	65	55	77
濃縮乾固	No peak	No peak	No peak	No peak

※表中、ISは絶対回収率(%)、各成分はIS(2, 5DMF-d3)に対する相対回収率(%)

表13 濃縮試験の結果 (2PRF、2BF、2PEF)

	IS(2PEF-d11)	2PEF	2PRF	2BF
濃縮1ml	113	83	76	80
濃縮5ml	109	80	52	73
濃縮乾固	No peak	No peak	No peak	No peak

※表中、ISは絶対回収率(%)、各成分はIS(2, 5DMF-d3)に対する相対回収率(%)

結果として、濃縮率を上げる(濃縮に時間をかける)ことで回収率の低下が確認され、乾固させることで全物質が完全にロスすることが分かった。また、d体との挙動も他と異なっていた。

↓

SBSE 法も含め、濃縮操作が発生する精製工程が必要とされる手法は適用不可と判断された。

c) 精油定量器(Dean-Stark 蒸留器)による蒸留法の適用

蒸留法は以下の特性がある。

- ・揮発性物質しか捕集しないため、精製工程を経ることなく濃縮が可能
- ・サンプル採取量も比較的増やすことができる(～ 40 g程度)

そのため、適用の検討を行ったところ、試薬レベルの回収試験では、2, 5DMF/2EF～2PEFまで、十分な回収が得られた。

しかし、検体を用いた試験において、その含有濃度をヘッドスペース法の値と比較したところ、主に2-EF、2PEFで精油定量器により得られた数値がヘッドスペース法よりも高くなる結果が得られた。これは、精油定量器での蒸留は加熱による2次生成が起こっていると考えられた。

↓

適用不可と判断された。

2) メチルフラン類縁体濃度とフラン濃度との関係の解析

(ア) 研究目標

我が国特有の食品や海外での調査例が少ない食品のフラン及びメチルフラン類縁体の含有濃度及び構成比を明らかにする。

(イ) 研究内容

本研究課題については、研究目標に記載の通り、当初の計画では「我が国特有の食品や海外での調査例が少ない食品」に対して含有調査を予定したが、中課題1で妥当性が確認された分析種/マトリックスの組合せにて、含有実態調査を実施し、食品別にメチルフラン類縁体等濃度とフラン濃度との関係性を取りまとめ、関係を整理することとした。

(ウ) 研究結果

市販品各種の含有濃度結果を表14～20に示した。

なお、各含有濃度算出において、適用する検量線範囲及び採用基準等は以下の通りとした。

- i) 含有濃度が30 ppb未満の時;使用する検量線の点数及び濃度(調製重量として)は50、20、10、5、2及び1 ngとする。
- ii) 含有濃度が30 ppb以上の時;使用する検量線の点数及び濃度(調製重量として)は500、200、100、50、20及び10 ngとする。
- iii) 分析法手順書に示した測定順序例に従い、分析日ごとにサンプル注入の前後で検量線をとるが、基本的にはサンプル注入前の検量線にて評価をする。
- iv) 検量線の性能基準として、相関係数0.999以上であること。

コーヒー浸出液;市販の缶コーヒー(ブラックコーヒー)について、フランの濃度は44～110 µg/kg、2-メチルフラン46～210 µg/kgであり、2-メチルフランがフランよりも高い傾向がみられた。3-メチルフラン、2,5-ジメチルフランについては濃度が低く数µg/kgであり、2,3-ジメチルフラン及びエチルフランに至っては定量下限(1 µg/kg)未満であった。

インスタントコーヒーについては、表示「粉2 g に対し 140 mL」に従って調製した浸出液について試験を実施した(表示がないものも粉2 g に対し 140 mL とした)。フラン及びメチルフラン類縁体等の濃度は缶コーヒーよりも低い傾向にあった。

りんごジュース;市販のりんごジュース(100%りんごジュース)について、フランの濃度は多いもので5 µg/kg程度であった。2-及び3-メチルフランについても若干の痕跡は見られたものの、定量下限(1 µg/kg)未満となった。対象とした2,5-ジメチルフランについては検出下限以上となることはなかった。

しょうゆ;濃口7種、うすくち7種を対象とした市販のしょうゆについては、濃口しょうゆでフランの濃度は38～75 µg/kg程度、うすくちしょうゆで15～43 µg/kg程度であった。フランに次いで濃度が高かった類縁体は2-メチルフランであり、その濃度は、濃口しょうゆで6～16 µg/kg程度、うすくちしょうゆでは定量下限(5 µg/kg)を下回る痕跡～8 µg/kg程度となった。他の液体試料と比較して特徴的であったのは、濃口しょうゆで2,5-ジメチルフランが定量下限を超えて検出され、2-メチルフランと同程度の濃度の試料があった点であった。

乳児用調製粉乳;市販の乳児用調製粉乳7種についてフラン、2-, 3-メチルフラン及び2,5-ジメチルフランを対象に調製された液体中の濃度として確認したところ、フラン及び2-メチルフランの定量下限(1 µg/kg)未満のわずかな痕跡が確認されただけであり、3-メチルフラン及び2,5-ジメチルフランに至っては痕跡さえ確認されなかった。

ベビーフード；野菜、果物、穀物それぞれを主原料とする市販のベビーフード7種ずつについて、フラン、2-, 3-メチルフラン及び2-エチルフランを対象に濃度を測定したところ、主原料に関わらずすべての試料からフランの含有が確認され、その濃度は果物が最も低く 2~24 µg/kg、次いで穀物で 2~53 µg/kg、野菜で 12~81 µg/kg であった。特徴的であったのは、野菜及び穀物を主原料とするベビーフード数種において、2-エチルフランの濃度が比較的高かったことであり、特に野菜を主原料とするベビーフードではフランよりも 2-エチルフランの濃度が高い傾向が見られた。ただし、ベビーフードの含有濃度の測定結果表中（表 18）、色付きセルとした 5 試料については、内標準物質として使用した 2, 5-ジメチルフランの d 体での補正が適当ではない結果が得られた。これは試料中の成分の影響により、内標準物質として使用した 2, 5-ジメチルフランの d 体と 2-エチルフランの挙動が異なったためと思われる。2-エチルフランの d 体による補正検証ができれば、改善できる可能性が高いと思われる。

表14 含有濃度結果（コーヒー浸出液）

	FRN	2MF	3MF	25DMF	23DMF	2EF
	LOQ ; 5 µg/kg	LOQ ; 5 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg
缶コーヒー①	51	46	2	2	np	np
缶コーヒー②	47	93	4	3	tr	tr
缶コーヒー③	44	110	4	5	tr	tr
缶コーヒー④	110	210	9	9	tr	1
缶コーヒー⑤	69	120	7	4	tr	(0.8)
缶コーヒー⑥	97	200	9	8	tr	1
缶コーヒー⑦	87	210	9	9	tr	1
インスタントコーヒー①	17	87	3	6	np	(0.6)
インスタントコーヒー②	17	91	4	8	tr	(0.7)
インスタントコーヒー③	15	110	4	8	tr	(0.8)
インスタントコーヒー④	(2)	(4.9)	tr	(0.6)	np	np
インスタントコーヒー⑤	(3)	10	tr	(0.8)	np	np
インスタントコーヒー⑥	(2)	7	tr	(0.6)	np	np
インスタントコーヒー⑦	16	21	1	1	np	np
インスタントコーヒー⑧	7	24	1	2	np	np
インスタントコーヒー⑨	(3)	(4.7)	tr	(0.5)	np	np
インスタントコーヒー⑩	(2)	5	tr	(0.5)	np	np
インスタントコーヒー⑪	6	17	1	1	np	tr
インスタントコーヒー⑫	(4)	11	(0.8)	(0.8)	np	np
インスタントコーヒー⑬	tr	tr	tr	tr	np	np
インスタントコーヒー⑭	(2)	(4)	tr	tr	np	np

() の数値；定量下限を下回るが数値化可能レベル

tr；定量下限未満，数値化が適切でない痕跡

np；痕跡なし

表15 含有濃度結果（りんごジュース）

	FRN	2MF	3MF	25DMF
	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg
りんごジュース①	5	(0.5)	tr	np
りんごジュース②	4	(0.4)	tr	np
りんごジュース③	1	(0.5)	tr	np
りんごジュース④	tr	tr	tr	np
りんごジュース⑤	3	np	np	np
りんごジュース⑥	4	(0.4)	tr	np
りんごジュース⑦	tr	tr	tr	np

() の数値；定量下限を下回るが数値化可能レベル

tr；定量下限未満，数値化が適切でない痕跡

np；痕跡なし

表16 含有濃度結果（しょうゆ）

	FRN	2MF	3MF	25DMF	2EF
	LOQ ; 5 µg/kg	LOQ ; 5 µg/kg	LOQ ; 5 µg/kg	LOQ ; 5 µg/kg	LOQ ; 5 µg/kg
濃口しょうゆ①	65	10	tr	(4)	np
濃口しょうゆ②	41	11	tr	(3)	np
濃口しょうゆ③	58	11	tr	5	np
濃口しょうゆ④	38	16	tr	(2)	np
濃口しょうゆ⑤	47	12	tr	15	tr
濃口しょうゆ⑥	75	11	tr	10	np
濃口しょうゆ⑦	42	6	tr	tr	np
うすくち醤油①	27	(4)	tr	tr	np
うすくち醤油②	43	6	tr	tr	tr
うすくち醤油③	30	5	tr	tr	tr
うすくち醤油④	15	(2)	tr	tr	np
うすくち醤油⑤	30	8	tr	5	np
うすくち醤油⑥	19	tr	tr	tr	tr
うすくち醤油⑦	25	(4)	tr	tr	tr

() の数値；定量下限を下回るが数値化可能レベル

tr；定量下限未満，数値化が適切でない痕跡

np；痕跡なし

表17 含有濃度※結果（乳児用調製粉乳）

	FRN	2MF	3MF	25DMF
	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg
調製粉乳①	tr	tr	np	np
調製粉乳②	tr	tr	np	np
調製粉乳③	tr	tr	np	np
調製粉乳④	tr	tr	np	np
調製粉乳⑤	tr	tr	np	np
調製粉乳⑥	tr	tr	np	np
調製粉乳⑦	tr	tr	np	np

tr ; 定量下限未満, 数値化が適切でない痕跡

np ; 痕跡なし

※濃度は表示に従って調製した液中の濃度

表18 含有濃度結果（ベビーフード）

	FRN	2MF	3MF	2EF
	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg	LOQ ; 1 µg/kg
ベビーフード（主原料；野菜）①	64	6	4	91
ベビーフード（主原料；野菜）②	18	3	3	34
ベビーフード（主原料；野菜）③	36	3	(0.9)	26
ベビーフード（主原料；野菜）④	81	5	1	140
ベビーフード（主原料；野菜）⑤	46	4	3	5
ベビーフード（主原料；野菜）⑥	12	2	2	10
ベビーフード（主原料；野菜）⑦	49	4	1	110
ベビーフード（主原料；果物）①	20	tr	tr	tr
ベビーフード（主原料；果物）②	24	(0.6)	(0.5)	tr
ベビーフード（主原料；果物）③	2	tr	np	np
ベビーフード（主原料；果物）④	12	2	(0.6)	np
ベビーフード（主原料；果物）⑤	3	(0.7)	tr	tr
ベビーフード（主原料；果物）⑥	4	(0.6)	(0.6)	tr
ベビーフード（主原料；果物）⑦	4	(0.6)	(0.7)	tr
ベビーフード（主原料；穀物）①	25	4	(0.7)	15
ベビーフード（主原料；穀物）②	11	2	2	33
ベビーフード（主原料；穀物）③	2	tr	tr	3
ベビーフード（主原料；穀物）④	5	2	(0.5)	35
ベビーフード（主原料；穀物）⑤	20	3	2	8
ベビーフード（主原料；穀物）⑥	18	3	tr	3
ベビーフード（主原料；穀物）⑦	53	5	(0.7)	110

（ ）の数値；定量下限を下回るが数値化可能レベル

tr；定量下限未満，数値化が適切でない痕跡

np；痕跡なし

網掛セル；内標準物質回収率50%以下

表19 食品別含有濃度一覧 (μg/kg)

	FRN*	FRN	2MF	3MF	25DMF	23DMF	2EF
コーヒー浸出液 (缶コーヒー)	53～100	44～110	46～210	2～9	2～9	np～tr	np～1
コーヒー浸出液 (インスタントコーヒー)	5～22	tr～17	tr～110	tr～4	tr～8	np～tr	np～(0.8)
りんごジュース	0.4～19**	tr～5	np～(0.5)	np～tr	np		
しょうゆ (濃口)	35～85	38～75	6～16	tr	tr～15		np～tr
しょうゆ (うすくち)	25	15～43	(1)～8	tr	tr～5		np～tr
乳児用調製粉乳	2～13	わずかなtr	わずかなtr	np	np		
ベビーフード 主原料；野菜	5～37	12～81	2～6	(0.9)～4			5～140
ベビーフード 主原料；果物		2～24	tr～2	np～(0.7)			np～tr
ベビーフード 主原料；穀物		2～53	tr～5	tr～2			3～33

() の数値；定量下限を下回るが数値化可能レベル

tr；定量下限未満，数値化が適切でない痕跡

np；痕跡なし

*H19食品安全委員会データより

**野菜，果物等ジュース全般の数値

表20 食品別含有濃度構成比 (%) ※1,2

	FRN	2MF	3MF	25DMF	23DMF	2EF
コーヒー浸出液 (缶コーヒー)	33.6	61.3	2.7	2.5	0.0	0.2
コーヒー浸出液 (インスタントコーヒー) ※4	24.3	68.7	1.8	5.2	0.0	0.1
りんごジュース ※4	87.9	12.1	0.0	0.0		
しょうゆ (濃口)	76.0	16.6	0.0	7.4		0.0
しょうゆ (うすくち)	86.4	11.9	0.0	1.7		0.0
乳児用調製粉乳 ※5						
ベビーフード 主原料；野菜 ※3	49.9	4.0	1.9			44.2
ベビーフード 主原料；果物	87.3	8.3	4.4			0.0
ベビーフード 主原料；穀物 ※3	50.9	6.9	2.4			39.8

※1；構成比は各製品の構成比を算出した後，平均した。

また，小数点第2位を四捨五入しているため，構成比の合計が100%とならないことがある。

※2；構成比算出時，定量下限未満の濃度は0 μg/kgとして扱った。なお，定量下限を下回るが数値化可能であったものは構成比に考慮した。

※3；内標準物質の回収率が低かった製品は除外した。

※4；全分析種が定量下限未満の製品は除外した。

※5；乳児用調製粉乳は全製品，全分析種で定量下限未満のため構成比算出せずとした。

(エ) 研究成果の活用における留意点

乳児用調製粉乳については，今回の予備調査では検出下限以上で検出されることがなかったが，H19食品安全委員会「食品に含まれるフランに関する安全性評価情報に関する調査報告書」では，「FDA、スイス、EU 工業会、ドイツからの食品中フラン」結果として，乳幼児用調製乳（液体）中のフランが2 μg/kg～13 μg/kg程度の範囲で含有が確認された例もあり，相違が見られた。「乳児用調製粉乳」の含有実態という視点では，調査

範囲を広げつつ、引き続き含有実態について情報収集が必要かと思われる。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

2-エチルフランは安定同位体試薬が入手できず、内標準物質として 2,5-ジメチルフランのd体を代用した。液体試料や固体試料でもほとんどの試料は適切な補正がなされた結果が得られたが、ベビーフード5試料について内標による補正ができなかった。2-エチルフランのd体による補正検証ができれば、改善できる可能性が高いと思われる。また、ベビーフードの測定においては、さらなる分析法の改良が必要と考えられる。

5 研究成果の発表

別添のとおり。

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

当研究の成果として、フラン及びメチルフラン類縁体等（2-メチルフラン、3-メチルフラン、2,5-ジメチルフラン、2,3-ジメチルフラン、2-エチルフラン）を精確に定量する分析法を確立、その分析法を用いて、複数の食品において含有実態調査を可能とした。ただし、調査が可能な分析種は、食品の種類により異なり、食品の種類によっては一部に限られる。

また、いずれの食品においても、ペンチルフランについては適用が困難であった。JECFA によれば2-ペンチルフランの毒性は、フランの1000分の1と低く、中国の含有実態データによれば食品中の濃度も同程度又はそれらよりも低いと報告されているが、AOACのFURAN Working Groupでは評価対象に2-ペンチルフランが加わっていることを考慮すると、今後、対象とした分析法の確立が求められるかもしれない。

また、食品種についても、本研究内では限りがあり、決して十分な数の食品種に対応できたわけではない。この点も今後は更なる検証が必要ではないかと思われる。

<研究総括者の自己評価>

項目		評価結果
試験研究全体		A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている
研究中課題	加工食品中に含まれるメチルフラン類縁体の定量分析法の開発	A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている
	メチルフラン類縁体濃度とフラン濃度との関係の解析	A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている
自己評価コメント		当初、海外の情報を踏まえて測定対象物質を拡げて分析法の検討を行ったこともあり、令和元年度まではやや進捗が遅れていたが、最終年度を終える段階に至り研究課題は概ね達成することができた。

別添

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用し うる成 果の有 無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
3001	3	有	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無

(1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	食品中のメチルフラン類縁体の分析法の開発推進会議	2019年02月20日	農林水産省 消費・安全局 第5会議室	18	有	計画の事業概要について説明及び30年度事業 の進捗状況の説明及び内容の討議
		2020年02月17日	農林水産省 消費・安全局 第4及び5会議室	19	有	計画の事業概要及び30年度事業について説明 並びに31年度進捗状況の説明及び内容の討議
		2021年02月26日	Web開催	17	有	3ヵ年の成果報告及び質疑

(2)行政が活用しうる成果

区分:①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
②	加工食品中のフラン及びフラン類縁体等の分析 法の確立	加工食品中の含有実態調査	農林水産省において、含有実態調査 の実施を検討中

(3)学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

(4)口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名

(5)出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6)国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7)国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考

(9)購入物品

品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		

食品中のメチルフラン類縁体の分析法の開発

研究内容

フランと同時にメチルフラン類縁体を精確に定量可能な分析法を開発・フランの分析法として、**ヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計**(HS-GC-MS)を用いた分析法がある。

この手法を基に、モノメチルフラン(2-メチルフラン及び3-メチルフラン)、ジメチルフラン(2,5-ジメチルフラン)も同時に定量可能な分析法を構築する。また同試験法にてさらに側鎖の長いエチル、プロピル、ブチル、ペンチルフランへの適用も確認する。分析法確立後は単一試験室での妥当性評価を実施する。

↓

・メチルフラン類縁体等とフランについて、開発した試験法を用いて、国内で流通する妥当性が確認された品目を対象に含有量調査を実施し、食品別にメチルフラン類縁体濃度とフラン濃度との関係を整理する。

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
オープンで加温(80℃, 30分以上)
放冷
+ 水(氷冷)9 mL
+ 試料 1 g
密栓
+ 5 µg/mLフラン-d₄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(ボ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ブラー操作条件>
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) φ0.25 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), 110(2-プロピルフラン), 124(2-ブチルフラン), 138(2-ペンチルフラン), 72(フラン-d₄), 85(2-メチルフラン-d₃, 3-メチルフラン-d₃), 99(2, 5-ジメチルフラン-d₃), 149(2-ペンチルフラン-d₁₁)

研究機関: 一般財団法人日本食品分析センター
研究総括者: 小木曾 基樹
問い合わせ先: TEL; 042-372-6705 E-mail; ogisom@jfri.or.jp

研究成果①

以下の組合せにより単一試験室において妥当性評価を実施し、性能基準を満たす結果を得た。

マトリックス	分析対象種	定量下限
コーヒー浸出液	FRN, 2MF, 3MF, 2,5DMF, 2,3DMF, 2EF	1 µg/kg(FRN及び2MFは5 µg/kg)
りんごジュース	FRN, 2MF, 3MF, 2,5DMF	1 µg/kg
しょうゆ	FRN, 2MF, 3MF, 2,5DMF, 2EF	5 µg/kg
乳児用調製粉乳	FRN, 2MF, 3MF, 2,5DMF	1 µg/kg
ベビーフード	FRN, 2MF, 3MF, 2EF	1 µg/kg

性能基準; 3濃度での添加回収試験において、
【各添加濃度における回収率】70~120 %
【中間精度(RSDi)】20 %以下

研究成果②

食品別にメチルフラン類縁体等濃度及びフラン濃度の関係性整理を目的に以下5品目の含有量調査を実施した。

食品別含有濃度一覧

	FRN	2MF	3MF	2,5DMF	2,3DMF	2EF
コーヒー浸出液 (缶コーヒー)	44~110	46~210	2~9	2~9	np~tr	np~1
コーヒー浸出液 (インスタントコーヒー)	tr~17	tr~110	tr~4	tr~8	np~tr	np~(0.8)
りんごジュース	tr~5	np~(0.5)	np~tr	np		
しょうゆ (濃口)	38~75	6~16	tr	tr~15		np~tr
しょうゆ (うすくち)	15~43	(1)~8	tr	tr~5		np~tr
乳児用調製粉乳	わずかなtr	わずかなtr	np	np		
ベビーフード 主原料; 野菜	12~81	2~6	(0.9)~4			5~140
ベビーフード 主原料; 果物	2~24	tr~2	np~(0.7)			np~tr
ベビーフード 主原料; 穀物	2~53	tr~5	tr~2			3~33

まとめ

当研究の成果として、フラン及びメチルフラン類縁体等を精確に定量する分析法を確立、その分析法を用いて、複数の食品における含有実態調査を可能とした。

一方で、ペンチルフランについては適用が困難であったほか、プロピル、ブチルフランについては今回は対象から除外することとなり、これらを対象とする分析法の確立は今後の課題として残った。

液体中のフラン及びメチルフラン類縁体等分析法手順書

液体中のフラン及びフラン類縁体分析法手順書

1. 適用範囲

コーヒー浸出液、りんごジュース、しょうゆ（フラン又はフラン類縁体として5～500 µg/kg含有(コーヒー浸出液(フラン、2-メチルフランのみ)及びしょうゆ)、又は1～500 µg/kg含有(コーヒー浸出液(フラン、2-メチルフラン以外)及びりんごジュース))の測定に適用する。

他の液体試料に適用する場合は妥当性の確認を実施すること(乳児用調製粉乳については別紙3参照)。

2. 測定項目

フラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン、2,5-ジメチルフラン、2,3-ジメチルフラン及び2-エチルフラン(コーヒー浸出液)

フラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン、2,5-ジメチルフラン(りんごジュース)

フラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン、2,5-ジメチルフラン及び2-エチルフラン(しょうゆ)

3. 測定方法の概要

試料と水を加えたヘッドスペース用バイアルを加温し、気相中のフラン及びフラン類縁体をヘッドスペース-ガスクロマトグラフィー質量分析法(HS-GC/MS法)により測定する。

吸着のおそれがあるため、調製にはガラス器具を使用する。

4. 器具及び装置

- ・ ヘッドスペース用バイアル【ガラス】(10 mL, 20 mL)
- ・ 銀アルミクリンップキャップ(20 mm, PTFE/シリコンセプタム)
- ・ 全量ピペット【ガラス】
(1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 2.5 mL, 5 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL)
- ・ 駒込ピペット【ガラス】
- ・ 全量フラスコ【ガラス】(10 mL, 20 mL, 100 mL, 300 mL)
- ・ マイクロシリンジ【ガラス】(10 µL, 25 µL, 100 µL, 250 µL)
- ・ パスツールピペット【ガラス】
- ・ 試薬計量スプーン
- ・ 電子天秤(最小表示桁数0.1 mg及び最小表示桁数0.01 mg)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ GC用分析カラム(5 %フェニル-95 %メチルポリシロキサンカラム
サイズ ; φ0.25 mm×60 m, 膜厚 1 µm) *1
- ・ ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ-質量分析計

*1 : DB-5MS(Agilent Technologies)またはこれと同等のもの

5. 試薬

- ・ フラン(東京化成工業㈱, 純度 99.0 %以上)
- ・ 2-メチルフラン(東京化成工業㈱, 純度 98.0 %以上)
- ・ 3-メチルフラン(東京化成工業㈱, 純度 98.0 %以上)
- ・ 2,5-ジメチルフラン(SIGMA-ALDRICH, 純度 98.5 %以上)
- ・ 2,3-ジメチルフラン(東京化成工業㈱, 純度 98.0 %以上)

- ・ 2-エチルフラン(富士フイルムワコーケミカル㈱，純度 98.0 %以上)
- ・ フラン-d₄(SIGMA-ALDRICH)
- ・ 2-メチルフラン-d₃(Tronto Research Chemicals)
- ・ 3-メチルフラン-d₃(Tronto Research Chemicals)
- ・ 2,5-ジメチルフラン-d₃(Tronto Research Chemicals)
- ・ メタノール(関東化学㈱，残留農薬試験・PCB試験用)
- ・ 塩化ナトリウム(関東化学㈱，特級)
- ・ 水(純水製造装置により製造した水)

6. 標準溶液の調製

6.1 フラン標準溶液の調製

- ① 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに，20 mL容全量ピペットを用いてメタノール*²20 mLを採取し，密栓したものを，電子天秤(最小表示桁数0.1 mg)により秤量する(W1)。
- ② さらに，このヘッドスペース用バイアルに，100 μ L容マイクロシリンジ*³を用いてフラン50 μ Lを注入したものを再度秤量する(W2)。これらの秤量値の差(W2－W1) mgを全液量20.05 mLで除した値を，2.5 mg/mLフラン標準原液の正確なフラン濃度とする。
- ③ 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに，20 mL容全量ピペットにより氷冷した水*⁴20 mLを採取し，密栓する。このヘッドスペース用バイアルに，100 μ L容マイクロシリンジ*³を用いてフラン標準原液40 μ Lを注入し，5 μ g/mL のフラン標準溶液を調製する。標準溶液の正確な濃度は，標準原液の正確なフラン濃度から算出されるフラン採取量(μ g)を，全液量20.04 mLで除した値より求める。
- ④ 9 mL容全量ピペットを用いて氷冷した水*⁴9 mLを採取した10 mL容ヘッドスペース用バイアルに，5 μ g/mLのフラン標準溶液1 mLを1 mL容全量ピペットにより採取し，密栓して0.5 μ g/mLのフラン標準溶液を調製する。
- ⑤ ④と同様に，0.5 μ g/mLフラン標準溶液を用いて，0.05 μ g/mLのフラン標準溶液を調製する。

名 称	調製濃度	使用溶液	使用量	水採取量
フラン標準溶液 1	5 μ g/mL	フラン標準原液	40 μ L	20 mL
フラン標準溶液 2	0.5 μ g/mL	フラン標準溶液 1	1 mL	9 mL
フラン標準溶液 3	0.05 μ g/mL	フラン標準溶液 2	1 mL	9 mL

*²：氷を張ったボール(約5 L容)を用意し，メタノールが入った容器を氷に埋めて30分以上放置し，冷却しておく。

*³：氷を張ったボール(約5 L容)を用意し，アルミホイルで包んだマイクロシリンジを埋めて冷却しておく。

*⁴：氷を張ったボール(約5 L容)を用意し，水が入ったガラス容器を氷に埋めて30分以上放置し，冷却しておく。

6.2 フラン-d₄内標準溶液の調製

6.1 ①～③と同様に，フラン-d₄内標準原液及び5 μ g/mLフラン-d₄内標準溶液を調製する。

6.3 フラン類縁体標準溶液の調製

電子天秤(最小表示桁数0.1 mg)上で、あらかじめメタノール約50 mLを入れた100 mL容の全量フラスコに、2-メチルフラン、3-メチルフラン、2,3-ジメチルフラン、2,5-ジメチルフラン及び2-エチルフラン各0.1 gを精密に量りとる。これをメタノールで定容し、フラン類縁体標準原液(1000 µg/mL)とする。

このフラン類縁体標準原液を、以下の要領でメタノール及び6.4で調製するフラン類縁体内標準溶液により希釈し、フラン類縁体標準溶液を調製する。

名 称	調製濃度		使用溶液	使用量	定容量	希釈 操作
フラン類縁体標準溶液 1	200	µg/mL	フラン類縁体標準原液	2 mL	10 mL	A
フラン類縁体標準溶液 2	100	µg/mL	フラン類縁体標準原液	1 mL	10 mL	A
フラン類縁体標準溶液 3	50	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 1	5 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 4	25	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 1	2.5 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 5	10	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 2	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 6	5	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 3	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 7	2.5	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 4	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 8	1	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 5	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 9	0.5	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 6	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 10	0.25	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 7	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 11	0.1	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 8	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 12	0.05	µg/mL	フラン類縁体標準溶液 9	2 mL	20 mL	B

*： 上記希釈と同割合で調製してもよい。

希釈操作

A： あらかじめメタノールを約5 mL加えた10 mL容全量フラスコに、250 µL容マイクロシリンジを用いて、2-メチルフラン-d₃内標準原液(100 µg/mL)*5を200 µL(20 µg)及びフラン類縁体内標準溶液1(25 µg/mL)を 200 µL(5 µg)を添加し、そこへ全量ピペットを用いてフラン類縁体標準原液を採取し、メタノールにより定容する。

B： フラン類縁体内標準溶液2により、20 mL容全量フラスコを用いて定容する。

*5： 2-メチルフラン-d₃は、不純物が多く強度が出ないため、他のフラン類縁体内標準物質の4倍の濃度で調製した。

6.4 フラン類縁体内標準物質標準溶液の調製

電子天秤(最小表示桁数0.01 mg)上で、あらかじめメタノール約10 mLを入れた20 mL容の全量フラスコに、2-メチルフラン-d₃を2 µL(2 mg)、3-メチルフラン-d₃及び2,5-ジメチルフラン-d₃ 各5 µL(5 mg)を10 µL容マイクロシリンジを用いて量る。これをメタノールで20 mLに定容し、各原液とする(2-メチルフラン-d₃：100 µg/mL、3-メチルフラン-d₃及び2,5-ジメチルフラン-d₃：250 µg/mL)。

この各原液を、以下の要領でメタノールにより希釈し、フラン類縁体内標準溶液を調製する。

名 称	調製濃度	使用溶液	使用量	定容量
フラン類縁体 内標準溶液 1	25 µg/mL	3-メチルフラン-d ₃ 標準原液及び 2,5-ジメチルフラン-d ₃ 標準原液	各 1 mL	10 mL
フラン類縁体 内標準溶液 2	0.5 µg/mL (3-メチルフラン-d ₃ 及び 2,5-ジメチルフラン-d ₃) 2 µg/mL (2-メチルフラン-d ₃)* ⁵	2-メチルフラン-d ₃ 標準原液及び フラン類縁体 内標準溶液 1	各 6 mL	300 mL

7. 試験溶液の調製

7.1 試料の調製

インスタントコーヒー；表示「粉2 gに対し140 mL」に従って調製する。表示がない製品についても同様の調製とする。なお調製は沸騰させた直後のお湯を加え、インスタントコーヒーが完全に溶解するまでスパーテル等で攪拌した後、速やかにバイアルに分注し、冷蔵する。

7.2 検量線作成用標準溶液の調製

- ① 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに塩化ナトリウム約4 gを量りとり、80℃のオーブンで30分以上加温し、試験開始時まで室温に戻しておく。
- ② 氷冷した水（8℃以下、約200 mL）*⁴を準備しておく。
- ③ ①のバイアルに10 mL容全量ピペットを用いて②の水10 mLを採取し、密栓する。
- ④ ③のバイアルに25 µL容マイクロシリンジ*³を用いて5 µg/mLフラン-d₄内標準溶液を10 µLを添加する。
- ⑤ ④のバイアルに25 µL容または100 µL容マイクロシリンジ*³を用いてフラン標準溶液を以下の要領で添加する。

調製重量	使用溶液	使用量
500 ng	フラン標準溶液 1	100 µL
200 ng	フラン標準溶液 1	40 µL
100 ng	フラン標準溶液 1	20 µL
50 ng	フラン標準溶液 1	10 µL
20 ng	フラン標準溶液 1	4 µL
10 ng	フラン標準溶液 2	20 µL
5 ng	フラン標準溶液 2	10 µL
2 ng	フラン標準溶液 2	4 µL
1 ng	フラン標準溶液 3	20 µL

- ⑥ ⑤のバイアルに25 μ L容マイクロシリンジを用いてフラン類縁体標準溶液を20 μ L添加する。

調製重量		使用溶液
500	ng	フラン類縁体標準溶液 4
200	ng	フラン類縁体標準溶液 5
100	ng	フラン類縁体標準溶液 6
50	ng	フラン類縁体標準溶液 7
20	ng	フラン類縁体標準溶液 8
10	ng	フラン類縁体標準溶液 9
5	ng	フラン類縁体標準溶液 10
2	ng	フラン類縁体標準溶液 11
1	ng	フラン類縁体標準溶液 12

- ⑦ ⑥のバイアルをボルテックスミキサーで混和する。

7.3 試料溶液の調製

- ① 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに塩化ナトリウム約4 gを量りとり，80℃のオーブンで30分以上加温し，試験開始時までに室温に戻しておく。
- ② 氷冷した水（8℃以下，約400 mL）*4を準備しておく。
- ③ ①のバイアルに9 mL容全量ピペットを用いて②の水9 mLを採取する。
- ④ 電子天秤上で，③のバイアルに試料*6 1 gを精密に量り取り，密栓する。
- ⑤ ④のバイアルに25 μ L容マイクロシリンジを用いて5 μ g/mLフラン-d₄内標準溶液を10 μ L添加する。
- ⑥ ⑤のバイアルに25 μ L容マイクロシリンジを用いてフラン類縁体内標準溶液2を20 μ L添加する。
- ⑦ ⑥のバイアルをボルテックスミキサーで混和する。

*6：試料を採取する際は，氷を張ったボール（約5 L容）を用意し，風袋ごと試料を氷に埋めて冷却した状態で取り扱う。

8. 添加回収試験溶液の調製

8.1 対象試料及び添加濃度

- ① コーヒー抽出液に対して，フラン及び2-メチルフランは500，50及び5 μ g/kg，ほかのフラン類縁体は100，10及び1 μ g/kgを添加する。
- ② 透明りんごジュースに対して，すべての測定項目について100，10及び1 μ g/kgを添加する。
- ③ しょうゆに対して，すべての測定項目について100，10及び5 μ g/kgを添加する。

なお，各添加濃度は，基本的に以下の検量線範囲にて評価を実施する。

・添加濃度；10,5 及び 1 μ g/kg

使用する検量線の点数及び濃度（調製重量として）；50,20,10,5,2 及び 1 ng

（切片のずれを考慮し，50 ng は除くことも可とする）

・添加濃度；500,100 及び 50 μ g/kg

使用する検量線の点数及び濃度（調製重量として）；500,200,100,50,20 及び 10 ng

8.2 添加回収試験用試料溶液の作成

- ① 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに塩化ナトリウム約4 gを量りとり，80℃のオーブンで30分以上加温し，試験開始時までに室温に戻しておく。
- ② 氷冷した水（8℃以下，約400 mL）*4を準備しておく。
- ③ ①のバイアルに9 mL容全量ピペットを用いて②の水9 mLを採取する。
- ④ 電子天秤上で，③のバイアルに試料*61 gを精密に量り取り，密栓する。
- ⑤ ④のバイアルに25 µL容マイクロシリンジを用いて5 µg/mLフラン-d₄内標準溶液を10 µL添加する。
- ⑥ ⑤のバイアルに25 µL容または100 µL容マイクロシリンジを用いてフラン標準溶液を以下の要領で添加する。

試料	調製重量		使用溶液	使用量
コーヒー浸出液	500	ng	フラン標準溶液 1	100 μ L
	50	ng	フラン標準溶液 1	10 μ L
	5	ng	フラン標準溶液 2	10 μ L
透明りんごジュース	100	ng	フラン標準溶液 1	20 μ L
	10	ng	フラン標準溶液 2	20 μ L
	1	ng	フラン標準溶液 3	20 μ L
しょうゆ	100	ng	フラン標準溶液 1	20 μ L
	10	ng	フラン標準溶液 2	20 μ L
	5	ng	フラン標準溶液 2	10 μ L

- ⑦ ⑥のバイアルに25 μ L容マイクロシリンジを用いてフラン類縁体標準溶液を20 μ L添加する。

試料	調製重量		使用溶液
コーヒー浸出液	500	ng	フラン類縁体標準溶液 4
	100	ng	フラン類縁体標準溶液 6
	50	ng	フラン類縁体標準溶液 7
	10	ng	フラン類縁体標準溶液 9
	5	ng	フラン類縁体標準溶液 10
	1	ng	フラン類縁体標準溶液 12
透明りんごジュース	100	ng	フラン類縁体標準溶液 6
	10	ng	フラン類縁体標準溶液 9
	1	ng	フラン類縁体標準溶液 12
しょうゆ	100	ng	フラン類縁体標準溶液 6
	10	ng	フラン類縁体標準溶液 9
	5	ng	フラン類縁体標準溶液 10

- ⑧ ⑦のバイアルをボルテックスミキサーで混和する。

9. HS-GC-MSによる測定

試験溶液について、以下の条件でクロマトグラフィーを行う。

<測定条件例>

<ヘッドスペースサンプラー操作条件>

機種：7697A(Agilent Technologies) またはこれと同等のもの

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) またはこれと同等のもの

カラム：DB-5MS(Agilent Technologies) またはこれと同等のもの

サイズ； $\phi 0.25$ mm×60 m, 膜厚 1 μ m

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-エチルフラン及び 2,3-ジメチルフラン, 2,5-ジメチルフラン)
72(フラン- d_4), 85(2-メチルフラン- d_3 , 3-メチルフラン- d_3),
99(2, 5-ジメチルフラン- d_3)

<測定順序例*7>

1. 50 ng 標準溶液	14. 試料溶液	27. 2 ng 標準溶液
2. 50 ng 標準溶液	15. 試料溶液	28. 1 ng 標準溶液
3. 20 ng 標準溶液	16. 試料溶液	
4. 10 ng 標準溶液	17. 試料溶液	
5. 5 ng 標準溶液	18. 10 ng 標準溶液	
6. 2 ng 標準溶液	19. 試料溶液	
7. 1 ng 標準溶液	20. 試料溶液	
8. 試料溶液	21. 試料溶液	
9. 試料溶液	22. 試料溶液	
10. 試料溶液	23. 50 ng 標準溶液	
11. 試料溶液	24. 20 ng 標準溶液	
12. 試料溶液	25. 10 ng 標準溶液	
13. 10 ng 標準溶液	26. 5 ng 標準溶液	

*7：低濃度(調製重量として)域としての一例を示した。標準溶液の基本的な注入順としての一例であり、試料溶液の注入本数については適宜変更してよい。なお、高濃度域での性能検証や市販品分析においては、使用する標準溶液を適切な溶液に変更すること。ただし、その場合においても、測定感度の変動確認として合間に注入する確認用標準溶液は「10 ng 標準溶液」とする。

10. 試料中濃度の計算

標準溶液の重量と、フラン類縁体のピーク高さ又はフランとフラン-d₄及びフラン類縁体とフラン類縁体内標準物質のピーク高さ比から検量線(最小二乗法)を作成し、次式により試料中のフラン及びフラン類縁体濃度を算出する。なお、検量線範囲は測定対象物質の検出量に応じて5点以上を適宜設定する。また、検量線範囲を上回る場合は、試料量を減らして再試験する。

$$\text{試料中濃度}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C}{W} \times F$$

C : 試験溶液中の重量(ng)
W : 採取量(g)
F : 標準原液または溶液のファクター*8

*8 : ファクター(F) ; 表示濃度に対する実際の濃度のずれを補正する係数

1) フラン標準原液

$$\text{6.1.②で算出した } 2.5 \text{ mg/mL} = \frac{(W2 - W1) \text{ mg}}{20 \text{ mL} + 50 \mu\text{L} / 1000}$$

フラン標準原液の正確なフラン濃度

$$\text{フラン標準原液のファクター} = \frac{\text{6.1.②で算出した } 2.5 \text{ mg/mL}}{\text{フラン標準原液の正確なフラン濃度}} \times \text{標準品の純度}$$

2.5 mg/mL

2) フラン標準溶液

$$\text{フラン標準溶液のファクター} = \frac{2.5 \text{ mg/mL} \times \text{フラン標準原液のファクター} \times \frac{40 \mu\text{L}}{1000}}{20 \text{ mL} + 40 \mu\text{L} / 1000} \times \frac{1}{\frac{5 \mu\text{g/mL}}{1000}}$$

3) フラン類縁体標準原液/溶液

$$\text{標準原液/溶液のファクター} = \frac{\text{それぞれのフラン類縁体の}}{\text{正確な採取量 g}} \times \text{標準品の純度}$$

0.1 g

11. 注意事項

- ① 試料を採取するバイアル内の水を冷却された状態に保つため、電子天秤に置く直前までバイアルを氷に埋めておく。
- ② フラン標準溶液及びフラン-d₄内標準溶液は、冷却された状態に保つため、操作中は氷に埋めておく。
- ③ 機器測定時は9.測定順序例に従い、サンプル注入の前後で検量線をとるが、基本的にはサンプル注入前の検量線にて評価を実施する。ただし、本法は内標準物質を使用しているとはいえ、気液平衡を利用したヘッドスペース法であり応答値の変動が大きい場合、相関等が基準（相関係数0.999以上）を満たさない場合はサンプル注入後の検量線にて評価を実施するなどの対応も可とする。

液体中のフラン及びフラン類縁体分析法(HS-GC/MS) フローチャート

<検量線作成用標準溶液>

20 mL 容ヘッドスペース用バイアル
| +塩化ナトリウム 4 g(試薬計量スプーン)
| オープンで加温(80℃, 30 分以上)
|
| 放冷
| +水(氷冷)10 mL(10 mL 容全量ピペット)
| 密栓
| +5 µg/mL フラン-d₄内標準溶液 10 µL(25 µL 容マイクロシリンジ)
| +フラン標準溶液(マイクロシリンジ)
| +フラン類縁体標準溶液 20 µL(25 µL 容マイクロシリンジ)
| 混和(ボルテックスミキサー)
|
| HS-GC-MS

<試料溶液>

20 mL 容ヘッドスペース用バイアル
| +塩化ナトリウム 4 g(試薬計量スプーン)
| オープンで加温(80℃, 30 分以上)
|
| 放冷
| +水(氷冷)9 mL(9 mL 容全量ピペット)
| 試料 1 g(電子天秤, パスツールピペット)
|
| 密栓
| +5 µg/mL フラン-d₄内標準溶液 10 µL(25 µL 容マイクロシリンジ)
| +0.5 µg/mL フラン類縁体内標準溶液 20 µL(25 µL 容マイクロシリンジ)
| 混和(ボルテックスミキサー)
|
| HS-GC-MS

乳児用調製粉乳及びベビーフード中のフラン及びメチルフラン類縁体等
分析法手順書

乳児用調製粉乳及びベビーフード中のフラン及びフラン類縁体分析法手順書

1. 適用範囲

乳児用調製粉乳*及びベビーフード(フラン又はフラン類縁体として1～500 µg/kg含有)の測定に適用する。

*飲用する液体としたものを対象とする。

2. 測定項目

フラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン及び2,5-ジメチルフラン(乳児用調製粉乳)

フラン、2-メチルフラン、3-メチルフラン及び2-エチルフラン(ベビーフード)

3. 測定方法の概要

試料と水を加えたヘッドスペース用バイアルを加温し、気相中のフラン及びフラン類縁体をヘッドスペース-ガスクロマトグラフィー質量分析法(HS-GC/MS法)により測定する。

吸着のおそれがあるため、調製にはガラス器具を使用する。

4. 器具及び装置

- ・ ヘッドスペース用バイアル【ガラス】(10 mL, 20 mL)
- ・ 銀アルミクリンブキャップ(20 mm, PTFE/シリコンセプタム)
- ・ 全量ピペット【ガラス】
(1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 2.5 mL, 5 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL)
- ・ 駒込ピペット【ガラス】
- ・ 全量フラスコ【ガラス】(10 mL, 20 mL, 100 mL, 300 mL)
- ・ マイクロシリンジ【ガラス】(10 µL, 25 µL, 100 µL, 250 µL)
- ・ 葉さじ
- ・ 試薬計量スプーン
- ・ 電子天秤(最小表示桁数0.1 mg及び最小表示桁数0.01 mg)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ ブレンダー(Kai House SELECT クイックブレンダー スタンダード)
- ・ GC用分析カラム(5 %フェニル-95 %メチルポリシロキサンカラム
サイズ ; φ0.25 mm×60 m, 膜厚 1 µm) *1
- ・ ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ-質量分析計

*1 : DB-5MS(Agilent Technologies)またはこれと同等のもの

5. 試薬

- ・ フラン(東京化成工業㈱, 純度 99.0 %以上)
- ・ 2-メチルフラン(東京化成工業㈱, 純度 98.0 %以上)
- ・ 3-メチルフラン(東京化成工業㈱, 純度 98.0 %以上)
- ・ 2,5-ジメチルフラン(SIGMA-ALDRICH, 純度 98.5 %以上)
- ・ 2-エチルフラン(富士フイルムワコーケミカル㈱, 純度 98.0 %以上)
- ・ フラン-d₄(SIGMA-ALDRICH)
- ・ 2-メチルフラン-d₃(Tronto Research Chemicals)
- ・ 3-メチルフラン-d₃(Tronto Research Chemicals)
- ・ 2,5-ジメチルフラン-d₃(Tronto Research Chemicals)

- ・ メタノール(関東化学㈱, 残留農薬試験・PCB試験用)
- ・ 塩化ナトリウム(関東化学㈱, 特級)
- ・ 水(純水製造装置により製造した水)

6. 標準溶液の調製

6.1 フラン標準溶液の調製

- ① 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに, 20 mL容全量ピペットを用いてメタノール*²20 mLを採取し, 密栓したものを, 電子天秤(最小表示桁数0.1 mg)により秤量する(W1)。
- ② さらに, このヘッドスペース用バイアルに, 100 μ L容マイクロシリンジ*³を用いてフラン50 μ Lを注入したものを再度秤量する(W2)。これらの秤量値の差(W2-W1) mgを全液量20.05 mLで除した値を, 2.5 mg/mLフラン標準原液の正確なフラン濃度とする。
- ③ 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに, 20 mL容全量ピペットにより氷冷した水*⁴20 mLを採取し, 密栓する。このヘッドスペース用バイアルに, 100 μ L容マイクロシリンジ*³を用いてフラン標準原液40 μ Lを注入し, 5 μ g/mL のフラン標準溶液を調製する。標準溶液の正確な濃度は, 標準原液の正確なフラン濃度から算出されるフラン採取量(μ g)を, 全液量20.04 mLで除した値より求める。
- ④ 9 mL容全量ピペットを用いて氷冷した水*⁴9 mLを採取した10 mL容ヘッドスペース用バイアルに, 5 μ g/mLのフラン標準溶液1 mLを1 mL容全量ピペットにより採取し, 密栓して0.5 μ g/mLのフラン標準溶液を調製する。
- ⑤ ④と同様に, 0.5 μ g/mLフラン標準溶液を用いて, 0.05 μ g/mLのフラン標準溶液を調製する。

名 称	調製濃度	使用溶液	使用量	水採取量
フラン標準溶液 1	5 μ g/mL	フラン標準原液	40 μ L	20 mL
フラン標準溶液 2	0.5 μ g/mL	フラン標準溶液 1	1 mL	9 mL
フラン標準溶液 3	0.05 μ g/mL	フラン標準溶液 2	1 mL	9 mL

*2: 氷を張ったボール(約5 L容)を用意し, メタノールが入った容器を氷に埋めて30分以上放置し, 冷却しておく。

*3: 氷を張ったボール(約5 L容)を用意し, アルミホイルで包んだマイクロシリンジを埋めて冷却しておく。

*4: 氷を張ったボール(約5 L容)を用意し, 水が入ったガラス容器を氷に埋めて30分以上放置し, 冷却しておく。

6.2 フラン-d₄内標準溶液の調製

6.1 ①～③と同様に, フラン-d₄内標準原液及び5 μ g/mLフラン-d₄内標準溶液を調製する。

6.3 フラン類縁体標準溶液の調製

電子天秤(最小表示桁数0.1 mg)上で, あらかじめメタノール約50 mLを入れた100 mL容の全量フラスコに, 2-メチルフラン, 3-メチルフラン, 2,5-ジメチルフラン及び2-エチルフラン各0.1 gを精密に量り取る。これをメタノールで定容し, フラン類縁体標準原液(1000 μ g/mL)とする。

このフラン類縁体標準原液を, 以下の要領でメタノール及び6.4で調製するフラン類縁体内

標準溶液により希釈し，フラン類縁体標準溶液を調製する。

名 称	調製濃度	使用溶液	使用量	定容量	希釈 操作
フラン類縁体標準溶液 1	200 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準原液	2 mL	10 mL	A
フラン類縁体標準溶液 2	100 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準原液	1 mL	10 mL	A
フラン類縁体標準溶液 3	50 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 1	5 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 4	25 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 1	2.5 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 5	10 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 2	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 6	5 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 3	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 7	2.5 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 4	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 8	1 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 5	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 9	0.5 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 6	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 10	0.25 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 7	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 11	0.1 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 8	2 mL	20 mL	B
フラン類縁体標準溶液 12	0.05 $\mu\text{g/mL}$	フラン類縁体標準溶液 9	2 mL	20 mL	B

*： 上記希釈と同割合で調製してもよい。

希釈操作

A： あらかじめメタノールを約5 mL加えた10 mL容全量フラスコに，250 μL 容マイクロシリンジを用いて，2-メチルフラン- d_3 内標準原液(100 $\mu\text{g/mL}$)*5を200 μL (20 μg)及びフラン類縁体内標準溶液1(25 $\mu\text{g/mL}$)を 200 μL (5 μg)を添加し，そこへ全量ピペットを用いてフラン類縁体標準原液を採取し，メタノールにより定容する。

B： フラン類縁体内標準溶液2により，20 mL容全量フラスコを用いて定容する。

*5： 2-メチルフラン- d_3 は，不純物が多く強度が出ないため，他のフラン類縁体内標準物質の4倍の濃度で調製した。

6.4 フラン類縁体内標準物質標準溶液の調製

電子天秤(最小表示桁数0.01 mg)上で，あらかじめメタノール約10 mLを入れた20 mL容の全量フラスコに，2-メチルフラン- d_3 を2 μL (0.002 g)，3-メチルフラン- d_3 及び2,5-ジメチルフラン- d_3 各5 μL (0.005 g)を10 μL 容マイクロシリンジを用いて量る。これをメタノールで20 mLに定容し，各原液とする(2-メチルフラン- d_3 ：100 $\mu\text{g/mL}$ ，3-メチルフラン- d_3 及び2,5-ジメチルフラン- d_3 ：250 $\mu\text{g/mL}$)。

この各原液を，以下の要領でメタノールにより希釈し，フラン類縁体内標準溶液を調製する。

名 称	調製濃度	使用溶液	使用量	定容量
フラン類縁体内標準溶液 1	25 $\mu\text{g/mL}$	3-メチルフラン- d_3 標準原液及び2,5-ジメチルフラン- d_3 標準原液	各 1 mL	10 mL
フラン類縁体内標準溶液 2	0.5 $\mu\text{g/mL}$ (3-メチルフラン- d_3 及び 2,5-ジメチルフラン- d_3) 2 $\mu\text{g/mL}$ (2-メチルフラン- d_3)*5	2-メチルフラン- d_3 標準原液及びフラン類縁体内標準溶液 1	各 6 mL	300 mL

7. 試験溶液の調製

7.1 試料の調製

ベビーフード；氷冷下，ブレンダーを用いて60秒以内に調製する（試料により30秒～60秒の間で適宜実施）。

7.2 検量線作成用標準溶液の調製

- ① 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに塩化ナトリウム約4 gを量りとり，80℃のオーブンで30分以上加温し，試験開始時までに室温に戻しておく。
- ② 氷冷した水(8℃以下，約200 mL)*4を準備しておく。
- ③ ①のバイアルに10 mL容全量ピペットを用いて②の水10 mLを採取し，密栓する。
- ④ ③のバイアルに25 μ L容マイクロシリンジ*3を用いて5 μ g/mLフラン-d₄内標準溶液を10 μ Lを添加する。
- ⑤ ④のバイアルに25 μ L容または100 μ L容マイクロシリンジ*3を用いてフラン標準溶液を以下の要領で添加する。

調製重量		使用溶液	使用量
500	ng	フラン標準溶液 1	100 μ L
200	ng	フラン標準溶液 1	40 μ L
100	ng	フラン標準溶液 1	20 μ L
50	ng	フラン標準溶液 1	10 μ L
20	ng	フラン標準溶液 1	4 μ L
10	ng	フラン標準溶液 2	20 μ L
5	ng	フラン標準溶液 2	10 μ L
2	ng	フラン標準溶液 2	4 μ L
1	ng	フラン標準溶液 3	20 μ L

- ⑥ ⑤のバイアルに25 μ L容マイクロシリンジを用いてフラン類縁体標準溶液を20 μ L添加する。

調製重量		使用溶液
500	ng	フラン類縁体標準溶液 4
200	ng	フラン類縁体標準溶液 5
100	ng	フラン類縁体標準溶液 6
50	ng	フラン類縁体標準溶液 7
20	ng	フラン類縁体標準溶液 8
10	ng	フラン類縁体標準溶液 9
5	ng	フラン類縁体標準溶液 10
2	ng	フラン類縁体標準溶液 11
1	ng	フラン類縁体標準溶液 12

- ⑦ ⑥のバイアルをボルテックスミキサーで混和する。

7.3 試料溶液の調製

- ① 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに塩化ナトリウム約4 gを量りとり，80℃のオーブンで30分以上加温し，試験開始時までに室温に戻しておく。
- ② 氷冷した水（8℃以下，約400 mL）*4を準備しておく。
- ③ ①のバイアルに10 mL容全量ピペットを用いて②の水10 mLを採取する。

- ④ 電子天秤上で、③のバイアルに試料*6 1 g*7を精密に量り取り、密栓する。
- ⑤ ④のバイアルに25 µL容マイクロシリンジを用いて5 µg/mLフラン-d₄内標準溶液を10 µL添加する。
- ⑥ ⑤のバイアルに25 µL容マイクロシリンジを用いてフラン類縁体内標準溶液2を20 µL添加する。
- ⑦ ⑥のバイアルをボルテックスミキサーで混和する。

*6：試料を採取する際は、氷を張ったボール(約5 L容)を用意し、風袋ごと試料を氷に埋めて冷却した状態で取り扱う。

*7：乳児用調製粉乳は、粉末状態で採取し、20 mL容ヘッドスペース用バイアル中で製品表示通り調製した液体ミルクとして1 gとなるように採取量を設定する。
調製例；13 gの粉乳を100 mLのお湯で溶く製品については、粉末0.13 gを採取する。

8. 添加回収試験溶液の調製

8.1 対象試料及び添加濃度

乳児用調製粉乳及びベビーフードともに、分析対象種すべてにおいて100, 10及び1 µg/kgを添加する。

なお、各添加濃度は、基本的に以下の検量線範囲にて評価を実施する。

・添加濃度；10 及び 1 µg/kg

使用する検量線の点数及び濃度(調製重量として)；50,20,10,5,2 及び 1 ng

(切片のずれを考慮し、50 ng は除くことも可とする)

・添加濃度；100 µg/kg

使用する検量線の点数及び濃度(調製重量として)；500,200,100,50,20 及び 10 ng

8.2 添加回収試験用試料溶液の作成

- ① 20 mL容ヘッドスペース用バイアルに塩化ナトリウム約4 gを量りとり、80℃のオーブンで30分以上加温し、試験開始時まで室温に戻しておく。
- ② 氷冷した水(8℃以下、約400 mL)*4を準備しておく。
- ③ ①のバイアルに10 mL容全量ピペットを用いて②の水10 mLを採取する。
- ④ 電子天秤上で、③のバイアルに試料*6 1 g*7を精密に量り取り、密栓する。
- ⑤ ④のバイアルに25 µL容マイクロシリンジを用いて5 µg/mLフラン-d₄内標準溶液を10 µL添加する。
- ⑥ ⑤のバイアルに25 µL容または100 µL容マイクロシリンジを用いてフラン標準溶液を以下の要領で添加する。

調製重量		使用溶液	使用量
100	ng	フラン標準溶液 1	20 µL
10	ng	フラン標準溶液 2	20 µL
1	ng	フラン標準溶液 3	20 µL

- ⑦ ⑥のバイアルに25 μL 容マイクロシリンジを用いてフラン類縁体標準溶液を20 μL 添加する。

調製重量		使用溶液
100	ng	フラン類縁体標準溶液 6
10	ng	フラン類縁体標準溶液 9
1	ng	フラン類縁体標準溶液 12

- ⑧ ⑦のバイアルをボルテックスミキサーで混和する。

9. HS-GC-MSによる測定

試験溶液について、以下の条件でクロマトグラフィーを行う。

<測定条件例>

<ヘッドスペースサンプラー操作条件>

機種：7697A(Agilent Technologies) またはこれと同等のもの

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) またはこれと同等のもの

カラム：DB-5MS(Agilent Technologies) またはこれと同等のもの

サイズ； $\phi 0.25$ mm×60 m, 膜厚 1 μ m

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-エチルフラン及び2,5-ジメチルフラン)
72(フラン- d_4), 85(2-メチルフラン- d_3 , 3-メチルフラン- d_3),
99(2, 5-ジメチルフラン- d_3)

<測定順序例*8>

1. 50 ng 標準溶液	14. 試料溶液	27. 2 ng 標準溶液
2. 50 ng 標準溶液	15. 試料溶液	28. 1 ng 標準溶液
3. 20 ng 標準溶液	16. 試料溶液	
4. 10 ng 標準溶液	17. 試料溶液	
5. 5 ng 標準溶液	18. 10 ng 標準溶液	
6. 2 ng 標準溶液	19. 試料溶液	
7. 1 ng 標準溶液	20. 試料溶液	
8. 試料溶液	21. 試料溶液	
9. 試料溶液	22. 試料溶液	
10. 試料溶液	23. 50 ng 標準溶液	
11. 試料溶液	24. 20 ng 標準溶液	
12. 試料溶液	25. 10 ng 標準溶液	
13. 10 ng 標準溶液	26. 5 ng 標準溶液	

*8：低濃度(調製重量として)域としての一例を示した。標準溶液の基本的な注入順としての一例であり、試料溶液の注入本数については適宜変更してよい。なお、高濃度域での性能検証や市販品分析においては、使用する標準溶液を適切な溶液に変更すること。ただし、その場合においても、測定感度の変動確認として合間に注入する確認用標準溶液は「10 ng 標準溶液」とする。

10. 試料中濃度の計算

標準溶液の重量と、フラン類縁体のピーク高さ又はフランとフラン-d₄及びフラン類縁体とフラン類縁体内標準物質のピーク高さ比から検量線(最小二乗法)を作成し、次式により試料中のフラン及びフラン類縁体濃度を算出する。なお、検量線範囲は測定対象物質の検出量に応じて5点以上を適宜設定する。また、検量線範囲を上回る場合は、試料量を減らして再試験する。

$$\text{試料中濃度}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C}{W} \times F$$

C : 試験溶液中の重量(ng)
W : 採取量(g)
F : 標準原液または溶液のファクター*9

*9 : ファクター(F) ; 表示濃度に対する実際の濃度のずれを補正する係数

1) フラン標準原液

$$\text{6.1.②で算出した } 2.5 \text{ mg/mL} = \frac{(W2 - W1) \text{ mg}}{20 \text{ mL} + 50 \mu\text{L} / 1000}$$

フラン標準原液の正確なフラン濃度

$$\text{フラン標準原液のファクター} = \frac{\text{6.1.②で算出した } 2.5 \text{ mg/mL}}{\text{フラン標準原液の正確なフラン濃度}} \times \text{標準品の純度}$$

2.5 mg/mL

2) フラン標準溶液

$$\text{フラン標準溶液のファクター} = \frac{2.5 \text{ mg/mL} \times \text{フラン標準原液のファクター} \times \frac{40 \mu\text{L}}{1000}}{20 \text{ mL} + 40 \mu\text{L} / 1000} \times \frac{1}{\frac{5 \mu\text{g/mL}}{1000}}$$

3) フラン類縁体標準原液/溶液

$$\text{標準原液/溶液のファクター} = \frac{\text{それぞれのフラン類縁体の}}{\text{正確な採取量 g}} \times \text{標準品の純度}$$

0.1 g

11. 注意事項

- ① 試料を採取するバイアル内の水を冷却された状態に保つため、電子天秤に置く直前までバイアルを氷に埋めておく。
- ② フラン標準溶液及びフラン-d₄内標準溶液は、冷却された状態に保つため、操作中は氷に埋めておく。
- ③ 機器測定時は9.測定順序例に従い、サンプル注入の前後で検量線をとるが、基本的にはサンプル注入前の検量線にて評価を実施する。ただし、本法は内標準物質を使用しているとはいえ、気液平衡を利用したヘッドスペース法であり応答値の変動が大きい場合、相関等が基準（相関係数0.999以上）を満たさない場合はサンプル注入後の検量線にて評価を実施するなどの対応も可とする。

フラン及びフラン類縁体分析法(HS-GC/MS) フローチャート

<検量線作成用標準溶液>

20 mL 容ヘッドスペース用バイアル
| +塩化ナトリウム 4 g(試薬計量スプーン)
| オープンで加温(80℃, 30 分以上)
|
| 放冷
| +水(氷冷)10 mL(10 mL 容全量ピペット)
| 密栓
| +5 µg/mL フラン-d₄内標準溶液 10 µL(25 µL 容マイクロシリンジ)
| +フラン標準溶液(マイクロシリンジ)
| +フラン類縁体標準溶液 20 µL(25 µL 容マイクロシリンジ)
| 混和(ボルテックスミキサー)
|
| HS-GC-MS

<試料溶液>

20 mL 容ヘッドスペース用バイアル
| +塩化ナトリウム 4 g(試薬計量スプーン)
| オープンで加温(80℃, 30 分以上)
|
| 放冷
| +水(氷冷)10 mL(10 mL 容全量ピペット)
| 試料 1 g(電子天秤, 薬さじ)
|
| 密栓
| +5 µg/mL フラン-d₄内標準溶液 10 µL(25 µL 容マイクロシリンジ)
| +0.5 µg/mL フラン類縁体内標準溶液 20 µL(25 µL 容マイクロシリンジ)
| 混和(ボルテックスミキサー)
|
| HS-GC-MS