

LC/MSによる環境水中の人工甘味料の分析

長谷川敦子
(調査研究部)

Analysis of artificial sweeteners in the environmental water by LC/MS

Atsuko HASEGAWA
(Research Division)

キーワード： LC/MS, スクラロース, アセスルファム, 水域環境

1 はじめに

人工甘味料は甘味をつけるために食品に添加されるものであって、いわゆる有害物質ではない。今回対象としている物質はスクラロースとアセスルファムであるが、いずれも砂糖よりはるかに強い甘味を持ちながらほとんどカロリーがなく、ダイエット効果をうたう飲食物に使用されている。カロリーがないということは人体内で代謝されてエネルギーになることなく排泄されていることが想定される。また近年、人口甘味料については下水道処理効率が低いという報告や¹⁾、環境中で生分解されにくい²⁾ため、下水処理水が流入する湖などの閉鎖水系で濃度が高くなっているという報告がある¹⁻³⁾。ちなみに、スクラロースは欧州においては2005年頃から使われ始めているが、2008年の調査では27カ国の120河川で検出されたという報告もあり⁴⁾、広範囲な水域環境において人口甘味料の存在が徐々に顕著になっている状況が窺える。一方、ヒトの生活排水由来の物質であることと分解しにくい特性に着目して、下水の漏洩調査や下水処理放流水の影響範囲を把握するためのトレーサーとして有望とも考えられている⁵⁾。一方、我が国でも同じ物質が甘味料として広く使用されていることから、環境中の甘味料の存在実態をもとにすれば、生活排水に由来する影響が及んでいる範囲や影響の程度の推定が可能となり、今後の様々な調査を行う際に同位体トレーサーと類似した新たな発生源の究明手法としての可能性が期待される。そこで環境水中における存在実態を把握するため、高感度で簡易な

分析方法の開発に取り組むこととした。なお、本研究では対象物質の測定に適するLC/MSを用い、なるべく低濃度まで確認できるよう、前処理、機器分析条件などを検討し、実用的な分析法として確立することを目的とした。次いで、神奈川県内の河川水や海水中の人工甘味料の濃度を調査し、下水道や生活排水等の人為的な排水による影響と考えられる実態を確認したので報告する。

2 実験方法

2.1 対象物質

検討対象としたスクラロースとアセスルファムの構造などを図1、2に示す。

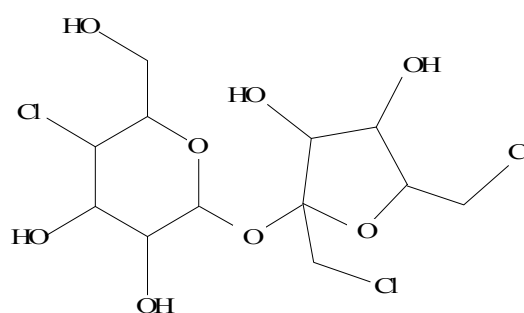


図1 スクラロース (sucralose)

Cas.No. : 56038-13-2

分子式 $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$

分子量 : 397.64 日本での認可は1999年

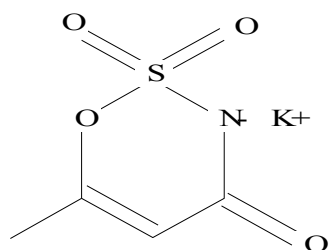


図2 アセスルファムカリウム (acesulfame K)
 Cas.No. : 55589-62-3
 分子式 $C_4H_4KNO_4S$ 分子量 : 201.24
 日本での認可は 2000 年

アセスルファムは通常水溶性の高いカリウム塩の形で使用される。測定濃度はカリウム (K) が水素 (H) に置き換わった形 (分子量 : 163.15) で表示されている。

2. 2 試薬及び器具

スクラロース及びアセスルファムカリウム標準品は、和光純薬製高速液体クロマト用、内部標準物質として用いる安定同位体スクラロース- d_6 は Campro 社 (ドイツ) 製を用いた。アセトニトリル、メタノールは関東化学製 LC/MS 用、イオンペア剤 DAAA (diamylammonium acetate), DHAA (dihexylammonium acetate) は東京化成製 LC/MS 用 0.5 M 水溶液、蟻酸は和光純薬製特級を用いた。水試料から対象物質を抽出するために固相抽出カートリッジである OASIS HLB Plus (Waters 社製, 225 mg) を用いた。試験液が濁ったときはシリンジフィルタ (ワットマン製 13 mm GD/X, PVDF 0.2 μ m) を用いて濾過した。試料処理に用いるガラス器具はすべて使用直前にアセトンで洗浄して用いた。

2. 3 装置及び測定条件

液体クロマトグラフは、Waters 製 ACQUITY UPLC, カラムは ACQUITY UPLC BEH-Shield RP18 (1.7 μ m 2.1 \times 150 mm), 移動相は 0.2 mM DHAA 水溶液 / アセトニトリルで混合割合を変化させたグラディエント分析を行った。水は和光純薬製 LC/MS 用超純水を用いた。質量分析計は Waters Quattro Premier XE を用い、イオン化はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) で、タンデムイオン化を行った。その他の測定条件を表 1 に示した。

表 1 LC/MS の測定条件

HPLC (Waters ACQUITY UPLC)	
Mobile phase	A: 0.2 mM DHAA water B: acetonitrile
0 min	A:B=90:10
0.0 \rightarrow 7.0 min	A:90 \rightarrow 75 B:10 \rightarrow 25
7.0 \rightarrow 12 min	A:75 \rightarrow 10 B:25 \rightarrow 90
12 \rightarrow 12.4 min	A:B=10:90
12.4 \rightarrow 12.5 min	A:10 \rightarrow 90 B:90 \rightarrow 10
12.5 \rightarrow 15 min	A:B=90:10
Flow	200 μ L/min
Oven temp.	40 $^{\circ}$ C
Injection vol.	10 μ L
MS (Waters Quattro Premier XE)	
Ionization	ESI-negative
Source temp.	120 $^{\circ}$ C
Desolvation temp.	450 $^{\circ}$ C
Desolvation gas flow	200 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Collision gas flow	0.3 mL/min
Cone voltage	sucralose 30 V acesulfame 22 V
Collision energy	sucralose 12 eV acesulfame 14 eV
Monitor ion	
Sucralose	395.2 $>$ 358.8
Sucralose- d_6	401.2 $>$ 364.8
Acesulfame	161.6 $>$ 81.5

2. 4 試料採取

水試料はガラス瓶に採取し、分析まで冷蔵保存した。なお、河川水、海水試料を 1 か月室温において分析したところ、定量値にほとんど変化はなかったため、対象物質の保存安定性は良好であると考えられる。

2. 5 試料前処理法

メタノール 5 mL, 次いで純水 5 mL で固相抽出カートリッジを洗浄した。水試料 100 mL にスクラロース d_6 水溶液 (10 μ g/mL \times 10 μ L) を加え、蟻酸を滴下して pH を 3 以下にした後、10 mL/min の流速でカートリッジを通過させ対象物質を抽出した後、間隙水を除去し、なるべく水をとらないようにしてメタノール 2 mL で溶出させた。溶出させたメタノール溶液を 40 $^{\circ}$ C に加温しながら窒素気流下で乾固寸前まで濃

縮し、純水で 1 mL としたものを LC/MS 用試液とした。試験液が濁った場合は濾過してから測定に供した。前処理の手順を図 3 に示す。

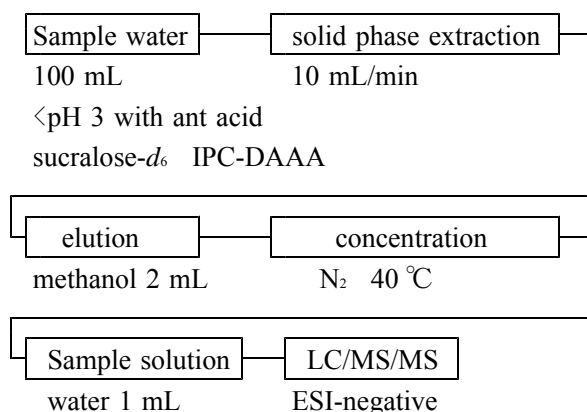


図 3 試料前処理

3 結果と考察

3. 1 測定条件

3. 1. 1 定量法

LC/MS 測定においてアセスルファムはスクラロースのおよそ 100 倍高感度であって感度差が大きかったうえ、共存物質から感度が影響を受ける程度も大きく異なった。測定自体は同時にすることが可能であるが、定量は精度のより高い方法を取り、スクラロースが d 体を内標準物質とする相対検量線法、アセスルファムは絶対検量線法で行った。

3. 1. 2 イオンペア剤

イオンペア剤 DHAA を用いて固相抽出を行うと、吹きつけ濃縮で析出が見られて水溶解度の低い物質が多く共存していることがわかり、回収率が低下したため固相抽出には DAAA を用いることとした。LC 測定では移動相に DAAA を用いるより、DHAA の方がアセスルファムが強く保持され、イオン化を抑制する共存物質と分離でき、ピーク形状も良好であったので、固相抽出には DAAA、LC 測定には DHAA とイオンペア剤を使い分けることにした。またイオンペア剤の使用濃度は数 mM にすることが多いが、移動相の DHAA 濃度が高いとスクラロースの感度が低下したので、濃度は 0.2 mM とした。

3. 2 添加回収試験

河川水及び海水試料に標準溶液を添加したも

のと無添加の試料を 2. 5 に従って前処理して分析し、その定量値の差から添加回収率を求めた結果を表 2 に示した。純水を使った予備的な検討ではアセスルファムを 1000 mL 濃縮しても良好な回収率が得られていたが、環境水の実試料では破過を起こすものが多かったので、濃縮量を 100 mL とした。なおスクラロースの回収率を求める場合、d 体の添加は試料水ではなく最終の試験液に行った。検出下限値 (LOD) は S/N 3 相当のピーク強度を与える濃度を試料量で換算したものである。

表 2 添加回収試験結果

	Sucralose	Acesulfame
pure water		
sample volumn (mL)	1000	1000
standard added (ng)	100	1.0
recovery (% , n=5)	99	98
RSD (%)	9.2	9.4
river water		
sample volumn (mL)	100	100
standard added (ng)	100	100
recovery (% , n=5)	103	90
RSD (%)	15	6.6
sea water		
sample volumn (mL)	100	100
standard added (ng)	100	100
recovery (% , n=6)	105	91
RSD (%)	4.3	5.1
LOD (ng/L)	50	0.5

RSD: relative standard deviation
sucralose-d₆ was added after elution

3. 3 実試料の測定結果

神奈川県内の河川水と東京湾、相模湾の沿岸で採取した海水を分析した結果、ほとんどすべての検体からスクラロースとアセスルファムが検出された。両方とも多くは数百 ng/L の濃度レベルにあったが、スクラロースはアセスルファムよりやや低いことが多かった。これらの物質は天然には存在しない化合物で、外洋の海水では極めて低濃度であるために検出は困難と思われるが、河川水等に対しては生活排水等の影

響が及んでいるかどうかを判断する一つの指標に使える可能性がある。試料の採取地点(2008～2010年に採取)及び測定結果を図4と表3に示す。表3の中の括弧付きの数値は、定量下限に達しない濃度だったため、濃縮率を上げて再測定して得られたものである。スクラロースのみなら、イオンペア剤を加えず容量の大きい固相抽出カートリッジを用いることにより、試料量を増やして数十倍の高感度測定が可能である。試料のクロマトグラムを図5に示す。

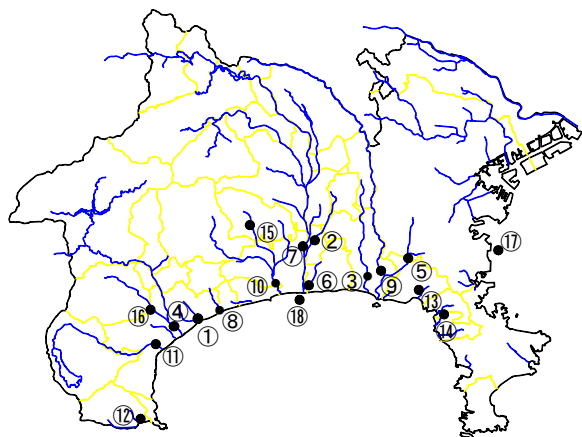


図4 試料採取地点

表3 試料分析結果 (ng/L)

Sampling site	Sucralose	Acesulfame
river water		
①	100	250
②	250	1900
③	250	3000
④	(24)	290
⑤	1200	5200
⑥	120	920
⑦	(20)	320
⑧	120	570
⑨	1200	17000
⑩	890	3800
⑪	110	370
⑫	(40)	140
⑬	(60)	240
⑭	360	720
⑮	280	300
⑯	(71)	680
sea water		
⑰	80	N.A.
⑱	240	610

*N.A.: not analysed

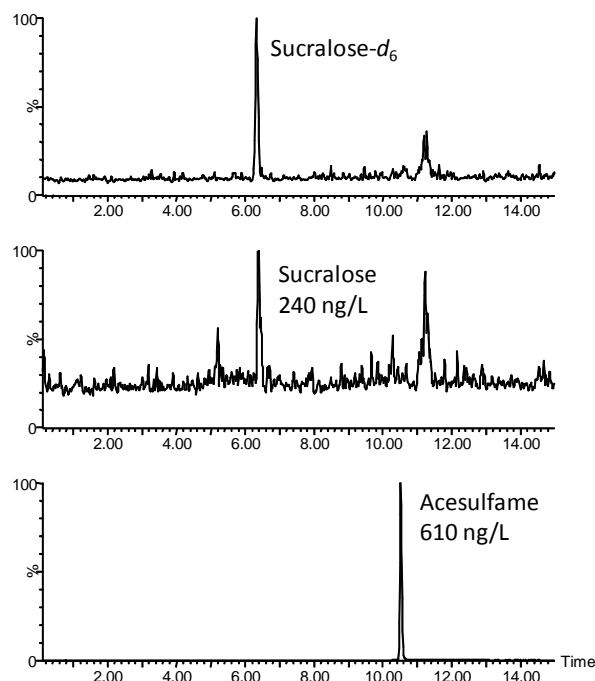


図5 LC/MS/MSによる試料のクロマトグラム (相模湾の例 (図4の⑱))

このように下流域中心ではあるが、ほぼ県全域の河川及び沿岸の海水から検出された測定結果からしても、神奈川県下の環境水中に人工甘味料物質が存在することは、欧州の状況と同様に既に一般的な現象であって、人為的な影響が及んでいる実態が確認された。なお、両物質の濃度差はシェアや使用形態によるものと考えられる。

4 まとめ

河川水や海水といった環境水中から、アセスルファムとスクラロースといった人工甘味料を検出するための簡易で高感度な分析法を開発した。また、この分析法によって神奈川県内の河川や沿岸を調査した結果、ほぼすべての検体から対象物質を検出した。これらの存在は、下水道放流水をはじめとする人為的な起源の排水の影響が及ぶうる範囲やその程度を示す指標のひとつとなると考えられる。なお、今回確立した分析法を用い、例えば、人口甘味料をトレーサーとして使用し、神奈川県内の上流域の河川水路等の調査データを蓄積すれば、富栄養化が問題となっている水源湖沼等へ流入する原因物質が人為由来か自然由来であるかといった発生源

の寄与解明のための有力な手法となると考えられる。そのほか、下水の漏洩や配管の誤接続や処理水などの影響範囲を調査するトレーサーとしての使用の可能性も考えられ、これらについては環境濃度と感度の面からアセスルファムが有望であると思われる。したがって、今後は広範な水域や各種排水の調査データ等を蓄積し、この手法の有効性を検証していく必要がある。なお、両物質とも食品添加物として広く使用されているが、飲料水用のプラントのオゾン処理ではアセスルファムよりスクラロースの方が残留性が高いという報告⁶⁾や、スクラロースの半減期は数年以上という報告⁷⁾などがあり、今後、環境中水ではスクラロースの濃度が高まる可能性があるのではと考えられる。また、分子に塩素を含む構造であることも考慮すれば、環境水中の濃度についての調査データを、今後とも蓄積していくことが必要ではないかと思われる。

5 謝辞

入手困難な試薬を提供していただいた中部大学応用生物学部鈴木教授に感謝します。

参考文献

- 1) Scheurer M, Brauch HJ, Lange FT. : Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). , Anal Bioanal Chem. , 394 (6) p.1585 (2009).
- 2) Lubick N.: Artificial sweetener persists in the environment, Environ. Sci. Technol., 42 (9) p.3125 (2008)
- 3) Swedish EPA : Report "Measurements of Sucralose in the Swedish Screening Program 2007" (2008)
- 4) Loos R, Gawlik BM, Boettcher K, Locoro G, Contini S, Bidoglio G.:Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method, J Chromatogr A. ;1216(7) p.1126-31 (2009)
- 5) Buerge IJ, Buser HR, Kahle M, Müller MD, Poiger T.:Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: an ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater, Environ. Sci. Technol. 43 (12)

p.4381 (2009)

- 6) Scheurer M, Storck FR, Brauch HJ, Lange FT.:Performance of conventional multi-barrier drinking water treatment plants for the removal of four artificial sweeteners, Water Res. Apr 10 (2010) [Epub ahead of print]
- 7) Grice HC, Goldsmith LA.:Sucralose: An Overview of the Toxicity Data, Food and Chemical Toxicology. 38(2) p.S1-S6(2000)

地域課題研究 [平成 19 ~ 20 年度]

テーマ：環境基準超過水域の原因究明