

資料

LC-MS/MSを用いた環境試料中の人工甘味料の分析

花岡 雄哉, 楨本 佳奈, 木村 淳子

Analysis of Artificial Sweeteners in Environmental Sample using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

HANAOKA Yuya, MAKIMOTO Yoshiyasu and KIMURA Junko

(Received : November 28, 2022)

広島県内の環境試料中の人工甘味料の動態を把握するため、アセスルファムカリウム、サッカリン、スクラロース、アスパルテームの4物質を同時分析する方法を確立した。

確立した分析法を用いて、下水処理場の放流水が流入している県内河川水を分析した結果、人工甘味料の存在が確認された。

Key words : 人工甘味料, スクラロース, LC-MS/MS

緒 言 方 法

人工甘味料は、砂糖に比べて低カロリーで甘みが強いので、砂糖の代替品として様々な食品に広く使用されている。その反面、アセスルファムカリウムやスクラロース等一部の人工甘味料は体内で代謝されず、そのほとんどが体外に排泄される [1]。また、排泄された人工甘味料は下水処理場で処理されず、環境中へ放出されることが報告されている [2]。国内でも、他の自治体の河川水等で人工甘味料が検出されている [3, 4]。

一方、人工甘味料は難分解性であり、主に生活排水由来であることから、化学トレーサーとしての利用も検討されている [5]。

広島県でも環境試料中の人工甘味料の動態を調査し、生活排水等の影響を把握するため、人工甘味料の分析法を検討した。対象とした人工甘味料は、アセスルファムカリウム、サッカリン、スクラロース、アスパルテームの4種類である。これら4物質を同時分析する方法を確立し、その分析法を用いて県内河川の調査を試みたので報告する。

1 試薬及び器材

測定対象とした人工甘味料は、アセスルファムカリウム（富士フィルム和光純薬㈱製、HPLC用、以下ACEという）、サッカリンナトリウム二水和物（富士フィルム和光純薬㈱製、食品分析用）、スクラロース（富士フィルム和光純薬㈱製、HPLC用、以下SUCという）及びアスパルテーム（富士フィルム和光純薬㈱製、食品分析用、以下APMという）を使用した。超純水を用いて各物質1000mg/Lの標準原液をそれぞれ調製し、それらを混合希釈して各100mg/Lの混合標準原液を調製、適宜希釈して使用した。なお、サッカリンナトリウム二水和物についてはサッカリン（以下SACという）として1000mg/Lとなるよう調製した。

また、SACに対するサロゲートとしてサッカリン-d4 (Toronto Research Chemicals社製、以下SAC-d4という)を使用した。

希釈等に用いた超純水はメルク社製の超純水製造装置Milli-Qにより精製したものを使用した。

pH調整等に用いたギ酸は富士フィルム和光純薬㈱製 (LC/MS用) を超純水で適宜希釈し使用した。

溶出等に用いたメタノールは関東化学㈱製 (LC/MS用) を、25%アンモニア水は富士フィルム和光純薬㈱製 (和光一級) を使用した。

表1 分析条件

装置	Agilent 1290 Infinity II, Agilent 6470 Triple Quad LC/MS	
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent, 2.1 × 100 mm, 3.5µm)	
流速	0.2 mL/min	
注入量	5µL	
カラム温度	40°C	
移動相	A : 0.1%ギ酸水溶液 B : メタノール	
LC	グラジエント	0 → 1 min A : B = 90 : 10 1 → 5 min A : 90 → 20 B : 10 → 80 5 → 9 min A : B = 20 : 80 9 → 10 min A : 20 → 90 B : 80 → 10 10 → 15 min A : B = 90 : 10
MS/MS	イオンソース	AJS (Agilent Jet Stream, ESI)
	乾燥ガス	N ₂ , 300°C, 10 L/min
	ネブライザ	N ₂ , 50 psi
	シースガス	N ₂ , 400°C, 12 L/min
	キャピラリー電圧	3500 V (ポジティブ), 3500 V (ネガティブ)
	ノズル電圧	0 V (ポジティブ), 0 V (ネガティブ)

表2 MRM条件

Compound Name	MRM	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
ACE	162 > 82	80	12	4	Negative
SAC	182 > 42.1	150	32	4	Negative
SAC-d4	186 > 42.1	150	36	4	Negative
SUC	441 > 395	100	8	4	Negative
APM	295.1 > 120.1	100	28	4	Positive

表3 溶出溶媒の混合比率

混合に使用した アンモニア水濃度	比 率			溶出溶媒中の アンモニア濃度
	メタノール	超純水	アンモニア水	
0% (アンモニアなし)	100	0	0	0%
	87	13	0	
	75	25	0	
	63	37	0	
	50	50	0	
2.5%	100	0	4	0.1%
	87	9	4	
	75	21	4	
	63	33	4	
	50	46	4	
25%	100	0	4	1%
	87	9	4	
	75	21	4	
	63	33	4	
	50	46	4	

固相カートリッジは Waters社製の Oasis HLB Plus (225mg, 以下 HLB という) 及び Sep-Pak PS2 Plus (300mg, 以下 PS2 という) を使用した。

コンセントレーターは Waters社製を使用した。
遠心機は久保田商事(株)製の S700FR を使用した。

2 分析装置及び測定条件

測定は Agilent社製の LC-MS/MS (Agilent 1290 Infinity II, Agilent 6470 Triple Quad LC/MS) を使用

した。分析条件を表 1 に、各測定物質の MRM 条件を表 2 に示す。

3 分析法検討

前処理方法は一般的な固相抽出法とし、固相カートリッジ及び溶出溶媒について検討するとともに、超純水を使用した添加回収試験を行った。

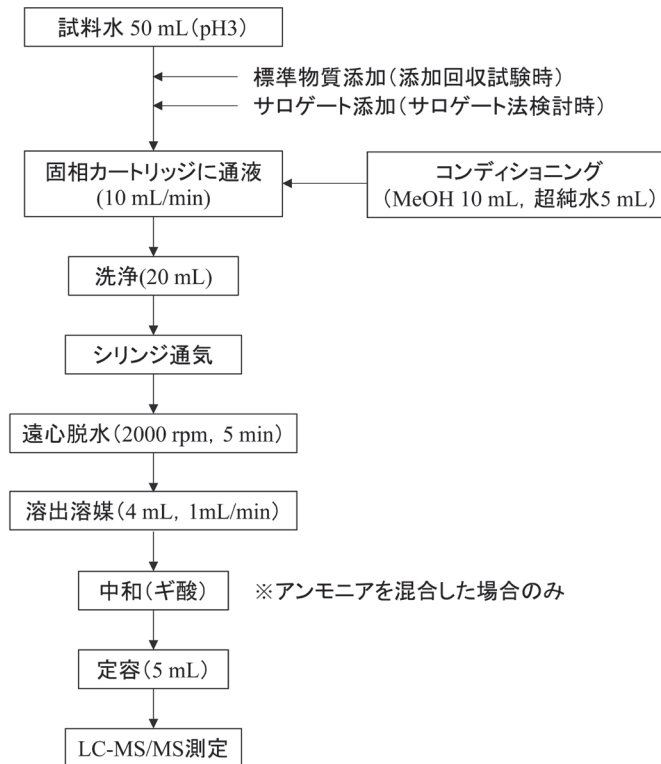


図1 分析フロー

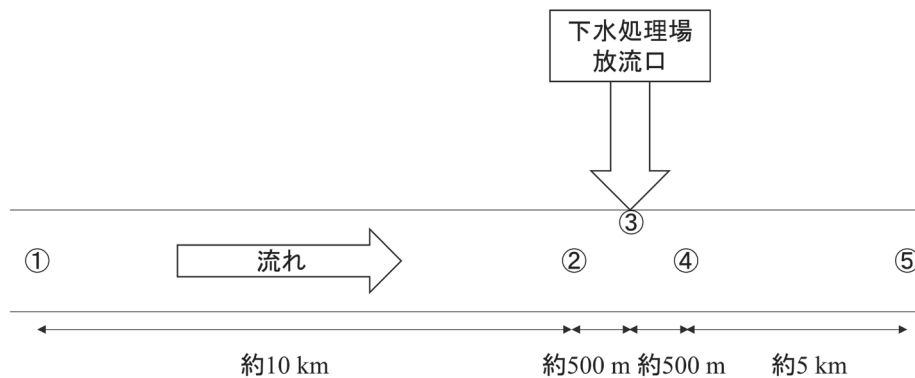


図2 採水地点 (①~⑤)

3-1 固相カートリッジ及び溶出溶媒の検討

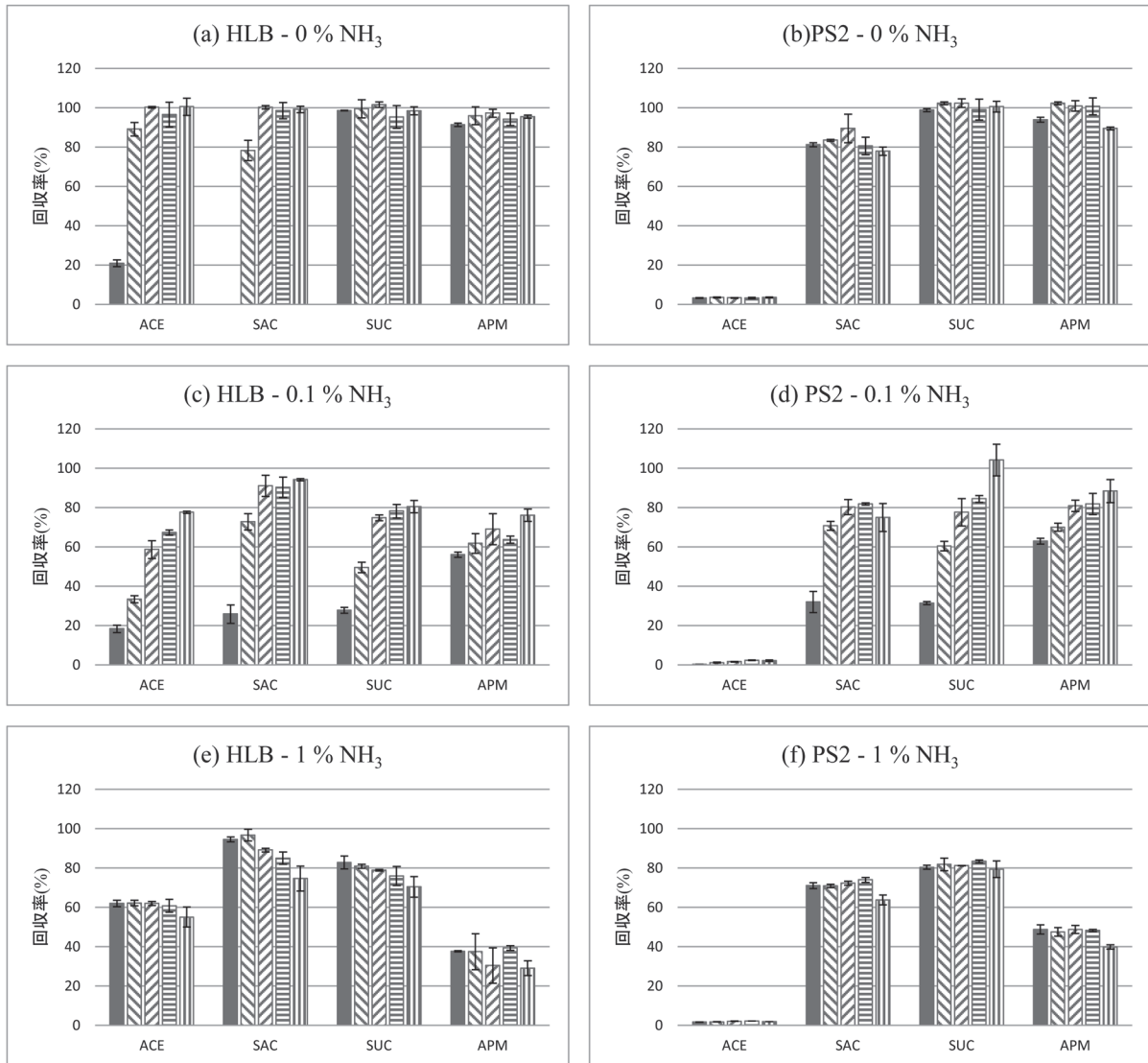
固相カートリッジについて、環境分析等で広く用いられている HLB 及び PS 2 の 2 種類を検討した。また、溶出溶媒について、メタノールの混合比率を 50-100 まで 5 段階、混合するアンモニア水濃度を 3 段階とした計 15 種類の溶出溶媒を調製し検討した。溶出溶媒の混合比率を表 3 に示す。

ギ酸を用いて pH3 に調整した超純水 50mL に対し各物質 5 μ g/L を添加し、あらかじめメタノール 10mL 及び超純水 5mL でコンディショニングを行った固相カートリッジにコンセンレーターを用いて 10mL/min で通水した。固相カートリッジを超純水 20mL で洗浄

し、シリンジによる通気及び遠心分離 (2000rpm, 5 min) によって脱水後、溶媒 4mL (1mL/min) で溶出した。対象とする人工甘味料の塩基に対する安定性を考慮し、溶出溶媒にアンモニア水を混合したものについては溶出液を等量のギ酸により中和した。溶出液を超純水により 5mL に定容後、LC-MS/MS により測定し回収率を求めた。図 1 に分析フローを示す。

3-2 添加回収試験

固相カートリッジに HLB、溶出溶媒に水/メタノール溶液 (1 : 1) を用いて、超純水への添加回収試験を行った。実験は図 1 の分析フローに基づいて行い、



溶出溶媒のメタノールの混合比率: ■ 100 ▨ 87 ▩ 75 ▪ 63 ▫ 50

図3 固相抽出条件ごとの人工甘味料の回収率

バーは標準誤差

n = 3

各物質の添加量は0.5, 5, 20, 100 μ g/Lの4段階とした。

図を示す。

4 河川水測定

3で確立した分析法(固相カートリッジ: HLB, 溶出溶媒: 水/メタノール溶液(1:1))を用いて, 河川水の測定及び添加回収試験を行った。また, 河川水中のSACに対しSAC-d4を用いたサロゲート法の検討を行った。

4-1 試料採取

広島県内の河川において, 下水処理場の放流水が流入している地点及びその上流側, 下流側を含む計5地点で2022年8月に採水した。図2に採水地点の模式

4-2 河川水の測定及び添加回収試験

4-1で示した5地点の河川水を使用し, 人工甘味料の測定及び添加回収試験を行った。添加回収試験では, それぞれ濃度が異なると想定される3地点(①, ③, ⑤)の河川水を用いた。

ギ酸を用いてpH3に調整した河川水50mLまたは, pH3に調整済みの河川水50mLに対し各物質5 μ g/Lとなるよう添加したものを, 図1のフローに基づいて前処理を行い, LC-MS/MSにより測定した。添加回収試験については回収率を求めた。

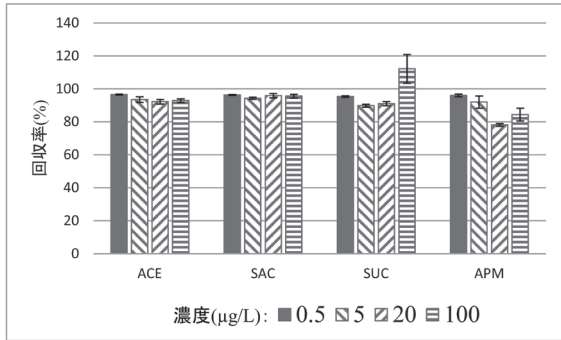


図4 人工甘味料濃度と回収率
バーは標準誤差
n = 3

4-3 サロゲート法の検討

SACに対し、SAC-d4を用いてサロゲート法の検討を行った。実験は地点①、地点③及び地点⑤の3地点の河川水を使用した。

ギ酸を用いてpH3に調整した河川水50mLに対し、各物質5µg/L、SAC-d4を2µg/Lとなるよう添加し、図1のフローに基づいて前処理を行い、LC-MS/MSにより測定した。

5 検出下限値・定量下限値の算出

検出下限値及び定量下限値は、各標準物質が1µg/Lとなるよう調製したサンプルを7回繰り返し測定し算出した。

結果及び考察

1 分析法検討

1-1 固相カートリッジ及び溶出溶媒の検討

図3に各条件における回収率の結果を示す。

溶出溶媒のアンモニア濃度が0%のものを用いた場合(図3(a), (b)), HLBではメタノール比率が100でACE, SACの回収率が大きく低下(21, 0%)したが、その他の比率では4物質とも良好な回収率が得られた(78-102%)。一方、PS2ではACEはどのメタノール比率でもほとんど回収できなかった(3-4%)が、その他3物質は良好な回収率が得られた(78-102%)。

溶出溶媒のアンモニア濃度が0.1%のものを用いた場合(図3(c), (d)), HLBでは4物質ともメタノール比率が高くなるに従って回収率が低下する傾向にあり、4物質とも良好な回収率が得られたのはメタノール比率が50の時のみであった(76-94%)。一方、PS2ではアンモニア濃度が0%のものを用いた場合と同様、ACEはどのメタノール比率でもほとんど回収できなかった(0-2%)。その他3物質についてはHLB

表4 広島県内河川における人工甘味料濃度 (µg/L)

地点	ACE	SAC	SUC	APM
①	0.20	< 0.02	0.84	< 0.01
②	0.86	0.07	2.01	< 0.01
③	0.32	0.10	4.95	< 0.01
④	0.62	0.09	4.00	< 0.01
⑤	0.47	0.08	3.91	< 0.01
検出下限値	0.02	0.02	0.03	0.01
定量下限値	0.05	0.05	0.10	0.03

①,③,⑤ : n = 3, ②,④ : n = 1

と同様メタノール比率が高くなるに従い回収率が低下した。

溶出溶媒のアンモニア濃度が1%のものを用いた場合(図3(e), (f)), HLBでは全体的にメタノール比率が低くなるに従って回収率が低下する傾向にあり、良好な回収率が得られたのはSAC及びSUCのみであった(70-97%)。一方、PS2ではアンモニア濃度が0%のものを用いた場合と同様、ACEはどのメタノール比率でもほとんど回収できなかった(2%)。良好な回収率が得られたのはメタノール比率が63以上のSAC及びSUCのみであった(71-83%)。

山口らによるとメタノールの比率が50%以上の水/メタノール溶液で溶出した場合、今回対象とする人工甘味料はほぼ100%溶出している[4]。また、竹峰らによると固相カートリッジにHLBを用いた場合、25%アンモニア水/メタノール溶液(1:25)を使用するとACE及びSACの回収率が向上している[6]。

以上の結果と夾雑物の溶出しにくさを考慮して、固相カートリッジにHLB、溶出溶媒に水/メタノール溶液(1:1)を用いることとした。

1-2 添加回収試験

図4に各添加濃度における回収率の結果を示す。

どの濃度においても、4物質とも良好な回収率が得られた(78-112%)。

2 河川水測定

2-1 河川水の測定及び添加回収試験

表4に各地点における対象物質の測定結果を示す。

ACE, SAC, SUCはほぼすべての地点で検出された。一方、APMはどの地点でも検出されなかった。これは分解性の違いによるものと考えられる。APM以外の3物質は体内で代謝されず、そのほとんどが体外に排泄されるのに対し、APMは体内で加水分解され

表5 河川水を用いた添加回収試験の回収率 (%)

地点	ACE	SAC	SUC	APM
①	98	65	87	98
③	85	45	29	87
⑤	92	65	34	96

n = 3

てフェニルアラニン、アスパラギン酸及びメタノールに分解されるため [1], 検出されなかったと考えられる。また, 検出された ACE, SAC, SUC の濃度は, 既報とほぼ同程度であった [3, 4]。

検出された 3 物質のうち, SUC が最も濃度が高かった。SUC は下水処理場の放流口である地点③の濃度が最も高く, そこから下流側に行くに従って薄くなっており, 既報で報告されているように人工甘味料が下水処理場から環境中へ放出されていることが示唆された。

表 5 に地点①, ③, ⑤の河川水を用いて行った添加回収試験の結果を示す。

ACE, APM については, 超純水の場合と同様, 3 地点とも良好な回収率が得られたが, SAC, SUC については一部地点で回収率が低下した。特に下水処理場の放流口である地点③の回収率が大きく低下しており, 夾雑物の影響が示唆された。この影響を除くため, SAC に対し SAC-d4 を用いたサロゲート法の検討を行った。

2-2 サロゲート法の検討

表 6 に地点①, ③, ⑤の SAC に対する回収試験の結果を示す。

絶対検量線法では回収率が 50% 程度であったが, サロゲート法では 95% 以上と良好な回収率が得られた。SAC 以外の 3 物質についても同様にサロゲート法を用いれば環境試料中の夾雑物の影響を受けず, 良好な回収率が得られることが期待できる。但し, SAC-d4 の回収率が 50% 未満の検体があったため, イオンサプリメント対策についても検討する必要がある。

ま と め

固相カートリッジ 2 種類, 混合比率の異なる溶出溶媒 15 種類の計 30 種類の組み合わせを検討し, ACE, SAC, SUC, APM の 4 種類の人工甘味料を同時分析する方法を確立した。

確立した分析法を用いて, 広島県内の河川において, 人工甘味料の分析を行った結果, ACE, SAC, SUC が検出され, 特に SUC の濃度が高かった。また,

表6 SACの定量方法の違いと回収率 (%)

地点	SAC		SAC-d4
	絶対検量線法	内部標準法	
①	44	95	49
③	53	96	57
⑤	57	97	62

n = 3

SUC は下水処理場の放流口が最も濃度が高く, 下流側に行くに従って薄くなっており, 未処理のものが環境中へ放出されている可能性が示唆された。但し, 環境試料では試料の性状によっては回収率が大きく低下するため, サロゲート法が必要と考えられる。今後, SAC 以外についてもサロゲート法の検討を行い, 環境試料中の人工甘味料の動態をより正確に把握していきたい。

文 献

- [1] 斎藤雅文, 堀由美子, 中島啓. 人工甘味料と糖代謝. 日本栄養・食糧学会誌. 2013, 66 (2), 69-75.
- [2] Scheurer M, Brauch HJ and 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. 2009, 394, 1585-1594.
- [3] 長谷川敦子. LC/MSによる環境水中の人工甘味料の分析. 神奈川県環境科学センター研究報告. 2010, 33, 58-62.
- [4] 山口之彦, 山本敦史, 角谷直哉. 大阪市内河川における人工甘味料の分布状況. 大阪市立環境科学研究所報告. 2016, 79, 29-34.
- [5] 中田晴彦, 折式田崇仁, 細野高啓, 利部慎, 小野昌彦, 徳永貴大, 嶋田純. 地下水中の合成甘味料をトレーサーとした熊本地域の水流動機構の推定と人為影響評価の可能性. 日本地球化学会年会講演要旨集. 2012, 59, 326-327.
- [6] 竹峰秀祐, 大塚宜寿, 野尻喜好, 茂木守, 蓑毛康太郎, 堀井勇一. LC/MS/MSによる水質試料中の人工甘味料の分析法の検討. 日本水環境学会シンポジウム講演集. 2017, 20, MS20-P-06.