

大阪市内河川における人工甘味料の分布状況

山口之彦¹⁾、山本敦史²⁾、角谷直哉¹⁾

Distribution of artificial sweeteners in rivers throughout Osaka City

Yukihiko YAMAGUCHI¹⁾, Atsushi YAMAMOTO²⁾ and Naoya KAKUTANI¹⁾

Abstract

A simultaneous analysis method of five sweeteners (acesulfame : ACE, saccharin : SAC, aspartame : APM, cyclamate : CYC, sucralose : SUC) by high performance liquid chromatograph with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) after solid phase extraction (SPE) was applied to water samples from rivers throughout Osaka City. The present method was modified with respect to two points of previous method. The elute solvent in SPE was modified from methanol to 60 % methanol-distilled water. The ion mode of APM and SUC in LC-MS/MS was modified from negative mode to positive mode. The detection limit of APM and SUC was enhanced tenfold after method modification.

The water samples were collected in twenty points from rivers throughout Osaka City. Three sweeteners (ACE, SAC and SUC) were detected in water from almost all sampling points. Concentration ranges of ACE, SAC and SUC were 0.1-5.6, <0.01-1.1 and 0.13-3.9 µg/L, respectively. High concentrations were detected at downstream sites of the sewage plants operated by Osaka City and Osaka Prefecture.

Key words: artificial sweetener, river water, Osaka City, acesulfame, sucralose

I 緒言

人工甘味料(artificial sweetener, AS)は、食品添加物であり、食品衛生法において、使用が認められている[1]。AS の甘味は通常の糖と比較して数百倍高いことから少量の使用で食品に十分な甘味を持たせることができる。また、低カロリーであることからダイエットをうたう食品によく使用されている。低カロリーであることは人の体内でエネルギーに変換されないことを意味している。実際、アセスルファム(acesulfame, ACE)、サッカリン(saccharin, SAC)およびスクラロース(sucralose, SUC)は、体内で代謝されず、90%以上がそのまま体外へ排泄される[2]。大阪市を例にすると、下水道処理人口普及率が99.9%であることから[3]、排泄されたASのほとんどが下水処理場へ運ばれると考えられる。下水処理場におけるASの処理率は、低い報告があり[4]、ASを含んだ放流水が河川水へ放出されていることが考えられる。実際、神奈川県全域の河川および多摩川でACEおよびSUCが検出されたことが報告されている[5,6]。

また、このようなASの保存性の高さを利用して、地下水脈の流動機構の推定[7]や下水道由来の地下水汚染

の調査[8]などがある。

今回対象としたASはACE、SAC、サイクラミン酸(cyclamate, CYC)、アスパルテーム(aspartame, APM)およびSUCの5種類である。CYCは、以前使用されていたが、発がん性が疑われたため、現在、国内での使用は禁止されている。しかし、わが国において以前使用していたものがいまだに地下水に検出される報告[8]もあることから対象とした。

環境水からのAS一斉分析は、主に固相カートリッジに試料水を通水してASを吸着させる固相抽出法を用いるのが一般的である。また、食品からの分析においても水抽出した試料の抽出液を精製するために固相カートリッジを用いる方法があり、両者ともに手法としては同じである。そのため、食品分野で使用されている方法を水試料の分析に応用することは可能であると考えられる。これらの方法で使用されている固相カートリッジは、HLB[5,6,9]、C₁₈[10,11,12]、アルミナ[12]およびStrata X[12]など多種にわたっているが、主に環境水で用いられているのはHLB[5,6,9]であった。次に前処理操作においては、ACE、SACおよびCYCは環境水中でイオン化しているため、pHを酸性側に調整したのち[6-8]、また

1) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 公立鳥取環境大学環境学部
〒689-1111 鳥取市若葉台北一丁目 1 番 1 号
Tottori University of Environmental Studies, 1-1-1 Wakabadaikita, Tottori 689-1111, Japan

はイオンペア剤を添加したのちに[5,10]、固相カートリッジに負荷している方法が多い。測定においては、高速液体クロマトグラフ(HPLC)が主に用いられる。ASの一斉分析法を考えた場合、SUCが、UV吸収、蛍光を持たず、HPLC-RIに感度を持っていることから松本らは[14]抽出液を分けて、それぞれのASに最適な検出器を用いた分析法を構築している。ASすべてに感度を示すのは質量分析計(MS)であることから最近ではASの一斉分析にはLC-MSおよびLC-MS/MSの適用がなされている[5-11]。

本研究では、既存の様々な分析方法を踏まえて、若干の検討および改良を加えた分析方法を構築した。改良法を用いて大阪市内河川の河川水におけるASの濃度を測定し、濃度レベル、分布等を把握し、その起源を推測した。

II 試料と方法

1) 試薬および機材

AS標準品：ACE、SAC、APMおよびSUCはそれぞれアセスルファミカリウム、サッカリンナトリウム二水和物、アスパルテムおよびスクラロースとして和光純薬より入手した。CYCは、シクロヘキシルスルファミン酸ナトリウムとして関東化学より入手した。

AS標準溶液：それぞれの標準品から精製水を用いて1000 μ g/Lの水溶液を個別に作成した。これらを混合、希釈し、1 μ g/Lの混合水溶液を作成した。

AS検量線用標準溶液：AS混合水溶液を精製水で段階的に希釈し、0.0001-1 μ g/mLの範囲で5点以上の検量線用標準水溶液を作成した。

メタノール：高速液体クロマトグラフ用を用いた。

60%メタノール水溶液：メタノール60mLを精製水で100mLとした。

塩酸：精密分析用(35%)を用いた。

20%塩酸：塩酸4mLを精製水で7mLにした。

ギ酸 - 特級試薬を用いた。

0.1%ギ酸：ギ酸0.5mLを精製水で500mLにした。

固相カートリッジ：HLBはWaters社製 Oasis HLB Plusを用いた。C18およびPS-2はWaters社製 SepPak Plusを用いた。

精製水：蒸留水製造装置(ヤマト科学社製 Autostill WG 220)を用いて蒸留したものを用いた。

マニホールド：スペルコ社製を用いた。

2) 装置

コンセントレーター - Waters社製を用いた。

LC/MS/MS - ABSciex社製のAPI2000およびWaters社製のXevo TQを用いた。

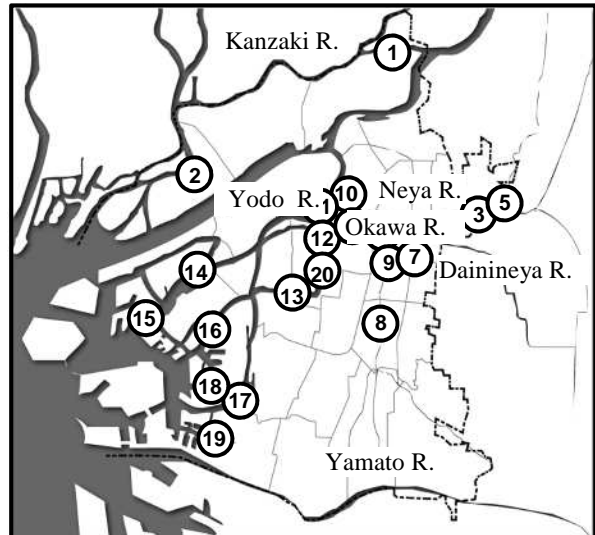


Fig.1 Sampling Points in Rivers throughout Osaka City

1. Komatsu Br.
2. Chifune Br.
3. Imazu Br.
4. Kyobashi Br.
5. Tokuei Br.
6. Shimoshiromi Br.
7. Tennouden Br.
8. Minambenten Br.
9. Shiromi Br.
10. Sakuranomiya Br.
11. Tenjin Br. (R)
12. Tenjin Br. (L)
13. Daikoku Br.
14. Kasugade Br.
15. Tenpozanwatashi
16. Jinbeiwatashi
17. Senbonmatsuwatashi
18. Funamachiwatashi
19. Down Stream of Suminoeohashi Br.
20. Honmachi Br.

3) 試料採取

大阪市内河川の20ヶ所(Fig. 1)で2015年7月に採取した。

4) 試験溶液の調整

河川水100mLに20%塩酸溶液を0.5mL添加し、振り混ぜ、あらかじめメタノール5mLおよび蒸留水5mLでコンディショニングしたHLB固相カートリッジにコンセントレーターを用いて10mL/分で酸性に調整した河川水全量を通水した。通水後、固相カートリッジをマニホールドで10分間通気し、乾燥させた。乾燥後、60%メタノール水溶液4mLで溶出した。溶出液は窒素気流下で2mLまで濃縮し、試験溶液とした。

5) LC/MS/MSの測定条件

測定は主にXevo TQを用いた。測定条件を以下に示す。

分離用カラムは関東化学製 Mightysil RP18 GP 2.1mm \times 150mm 粒径5 μ mを用いた。移動相はA:0.1%ギ酸、B:メタノールを用いA/B 70/30(5分)-35分-30/70-0/100(5分)-70/30(10分)でグラジエントを行った。流速は0.2mL/分、カラム温度は40 $^{\circ}$ C、注入量5 μ Lで行った。

イオン源は ESI を用い、イオン源温度は 300 とした。イオンモードは、ACE、SAC、CYC はネガティブ、APM、SUC はポジティブモードを用いた。MRM は、ACE: 162>78, 82, SAC: 182>106, 42, CYC: 178>80, APM: 295>180, 120, SUC: 419>239, 221 を用いた。

6) 分析法の検討

固相カートリッジ、溶出溶媒、LC/MS/MS の条件について検討を行った。

(1) 固相カートリッジの検討

既法では、主に HLB 固相カートリッジを使用しているが[5,6,9]、他の固相カートリッジ(C₁₈、PS-2)についても検討した。

検討に用いた方法は、精製水 100 mL に 2.5 µg/mL となるように対象の AS を添加し、ギ酸で pH2 に調整したのちにメタノール 5 mL、精製水 5 mL でコンディショニングした上述の 3 種の固相カートリッジに通水した。それぞれの固相カートリッジはメタノール 4 mL で溶出し、LC/MS/MS を用いて回収率を求めた。試験は、それぞれの固相カートリッジに対して 3 連で行った。

(2) 溶出時のメタノールの割合

固相カートリッジからの溶出溶媒として、メタノールを使用している報告[5,6]が多いが、一方でアセトニトリルと精製水の混合液を用いる報告[8]もある。AS は、極性が高いことから溶出溶媒に精製水を混合することで極性の低い夾雑物の混入を少なくできるメリットがある。そこで、メタノール - 精製水混合溶液を検討した。

精製水 10 mL に 1 µg/mL となるように対象の AS を添加し、0.1 % 塩酸溶液にした後、HLB 固相カートリッジに通水させた。溶出液のメタノール割合を 10-100 % まで 10 % 刻みで割合を変え、溶出させ、回収率を求めた。

(3) LC/MS/MS 条件検討

既法の多くは対象とした AS のプレカーサーイオン(MI)として、負イオンを使用している。この場合、SUC の検出下限は、他の AS の 10-100 倍程度高い。そこで、SUC の検出下限を低くする条件を検討した。

(4) 回収試験

分析法の検討後、作成した 4) に示す分析法を用いて、精製水および河川水を用いて添加回収試験を行った。河川水については汚染度の高い St.3 と低い St.10 の異なる 2 地点を用いた。添加量は精製水で 0.2 µg、河川水では、予備試験において ACE、SAC、SUC が検出されたため、回収試験が成立するように 5 µg とした。試験は 3 連で行った。

III 結果と考察

1) 分析方法の検討

(1) 固相カートリッジの検討

対象とした 5 種類の AS について、3 種類の固相抽出カートリッジを用いた回収試験の結果を Table 1 に示す。

C₁₈ は、ACE、SAC、CYC で他のカートリッジより回収率が、低い傾向にあった。C₁₈ は他のカートリッジがポリマーを基材にしているのに対して、シリカゲルを基材にしていることに起因していると考えられた。

PS-2 および HLB は、APM および SUC の回収率においては良好であった。他の 3 種については、18-63% であった。SAC については PS-2 で最も高い回収率を示した。

Table 1 Recoveries(%) of Five Sweeteners by using Three Different Solid Phase Cartridges

	HLB	C ₁₈	PS-2
ACE	39.7±6.6	2.3±0.3	34.0±4.7
SAC	18.2±0.4	8.7±1.2	58.5±5.6
CYC	62.8±8.0	6.0±0.4	56.6±5.5
APM	117.4±13.3	103.6±7.8	139.9±13.9
SUC	72.5±8.0	57.3±3.9	86.0±7.0

(2) 溶出時のメタノールの割合

溶出溶媒のメタノールの割合を 10-100 % で 10 % ごとに变化させた場合の AS の溶出率の変化を Fig.2 に示している。

ACE および CYC はメタノールの割合が 30 % ですすでに 90 % 以上の溶出率を示した。これに対して SAC、APM および SUC における 30 % メタノールでの溶出率は、それぞれ 44 %、64 % および 30 % であった。これは水の割合が多い溶媒に対する溶解性の違いによるものである。対象とした AS が、100 % 溶出するためには、メタノールが 50 % 以上必要であった。そのため、溶出溶媒は 60 % メタノール水溶液を用い、溶媒量は、4 mL とした。

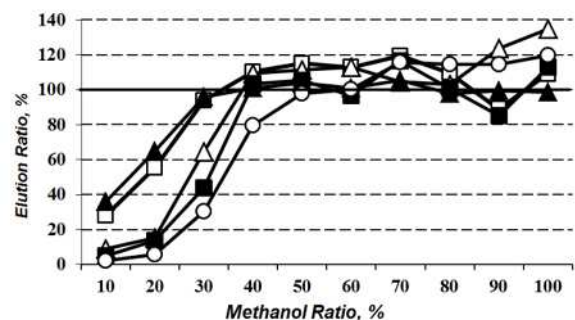


Fig.2 Effect of Methanol Ratio on Elution Ratio of five Sweeteners from HLB Cartridge
 :ACE :SAC :CYC :APM :SUC

(3) LC/MS/MS 条件検討

SUC の検出下限が他の人工甘味料と比較して高いことから、LS/MS/MS 条件を見直した。これまで、対象の AS についてネガティブモードで行っていたが、SUC および APM はポジティブモードで検出されることから、ポジティブモードで条件検討を行った。

APM は m/z 295($[M+H]^+$) m/z 120 で感度が得られた。SUC はプロトン付加分子イオン $[M+H]^+$ で、感度が得られなかったが、Na 付加イオンである m/z 419 ($[M+Na]^+$)からプロダクトイオン(M3) m/z 239 が得られた。一般に Na 付加体では、M3として Na^+ の 23 のみが優位に生成されることが多いが、SUC では、 m/z 239 と Na^+ 以外のイオンが優位に生成した。この MRM は Xevo TQ および API2000 とともに採取できたことから機器特有のものではないと考えられた。Table 2 に対象とした AS の M1、M3、検量線範囲等を示す。ここに示すように APM および SUC のポジティブモードはネガティブモードと比較して検量線範囲の下限が 10 倍低くなっているが、検量線範囲は狭くなっている。ポジティブモードで検出下限が低くなることから、この条件を使用することとした。

Table 2 LC/MS/MS Acquisition Parameters in MRM Mode

	IM	M1	M3	CV	CE	Range μg/mL
ACE	(-)	162*1	82	24	16	0.0001-1
SAC	(-)	182*1	106	36	20	0.0005-1
CYC	(-)	178*1	80	40	20	0.0001-1
APM	(-)	293*1	261	24	10	0.002-1
	(+)	295*2	120	20	30	0.0001-0.05
SUC	(-)	395*1	359	26	14	0.01-1
	(+)	419*3	239	30	20	0.001-0.1

IM: Ionization Mode CV: Core Voltage
 CE: Collision Energy
 Range: Range of Concentration in Calibration Curve
 *1: $[M-H]^-$ *2: $[M+H]^+$ *3: $[M+Na]^+$

(4) 回収試験

回収試験の結果を Table 3 に示す。

Table 3 Recoveries(%) of Five Sweeteners from Distilled and River Water

	Distilled Water	River Water St.3	River Water St.10
ACE	78.0±1.0	90.7±4.5	83.8±2.0
SAC	54.5±8.5	71.6±3.1	71.7±1.4
CYC	68.3±4.7	3.6±0.5	68.5±2.8
APM	73.2±4.0	78.8±5.6	85.6±2.9
SUC	90.7±6.8	57.2±2.9	63.3±3.5

精製水における平均回収率($n=3$)は、ACE、APM および SUC で、78 %、73 %、91 % と 70 % 以上で良好だっ

たのに対し、SAC、CYC で 54 %、68 % と前者より低い傾向にあった。

AS の河川水における回収率をみると、St.3 で低い傾向があり、汚染度と関連しているものと考えられる。St.3 の CYC の回収率が極端に低い理由については不明である。

2) 大阪市内河川における AS 濃度

大阪市内河川において、対象とした 5 種類の人工甘味料のうち ACE、SAC および SUC がほぼ全採取地点検出された。Table 4 に河川域および汽水域での濃度範囲を示す。

Table 4 Concentration Ranges(μg/L) of ACE, SAC and SUC in River and Estuary in Osaka City

	ACE	SAC	SUC
River	0.10~5.6	<0.01~0.47	0.13~3.9
Estuary	0.11~5.4	0.021~1.1	0.14~2.3

これらの濃度レベルは、神奈川県内の河川水[6]および多摩川[6]のものと同様であった。

Table 4 に示すように ACE および SUC は河川域および汽水域で大きな差が認められなかった。通常、水溶解度は塩分濃度が高くなると低下する。河川水と海水が混合する汽水域においても水溶解度が低くなり、海水による希釈以上に濃度が低下することが考えられる。これらのことから、今回みられた河川水および汽水域での濃度差は ACE および SUC の水溶解度が塩分濃度に左右されないほど高いことに起因していると考えられる。また、これらのことから ACE、SAC および SUC は、海まで到達していることは容易に推測できる。

3) 大阪市内河川における分布

ACE および SUC の大阪市内河川における濃度分布を Fig.3 に示す。これらの起源として下水処理場が考えられることから、大阪市の下水処理場()および大阪府近傍に位置する大阪府の下水処理場()の位置を濃度分布とともに Fig.3 に示した。

ACE および SUC とともに寝屋川、第二寝屋川で濃度が高く、大川で濃度が低くなっている。大川は淀川から分岐しており、淀川の水と同じと考えられる。このことより淀川における ACE および SUC の濃度は低いと考えられる。また、河口域の濃度は寝屋川、第二寝屋川の濃度より低い傾向を示した。ACE に対する SUC の濃度比(ACE/SUC)は、0.77-2.3 であり、20 地点中 14 地点が 1 以上、つまり、ACE の濃度が高い地点であった。神奈川県内の河川水における ACE/SUC は、すべて 1 以上[5]であり、大阪市内河川の結果とは異なった。

ACE および SUC の濃度分布と大阪府、大阪市の下水処理場の位置をみると、濃度の高い採取地点の上流には下水処理場が位置していた。また、下水処理場の

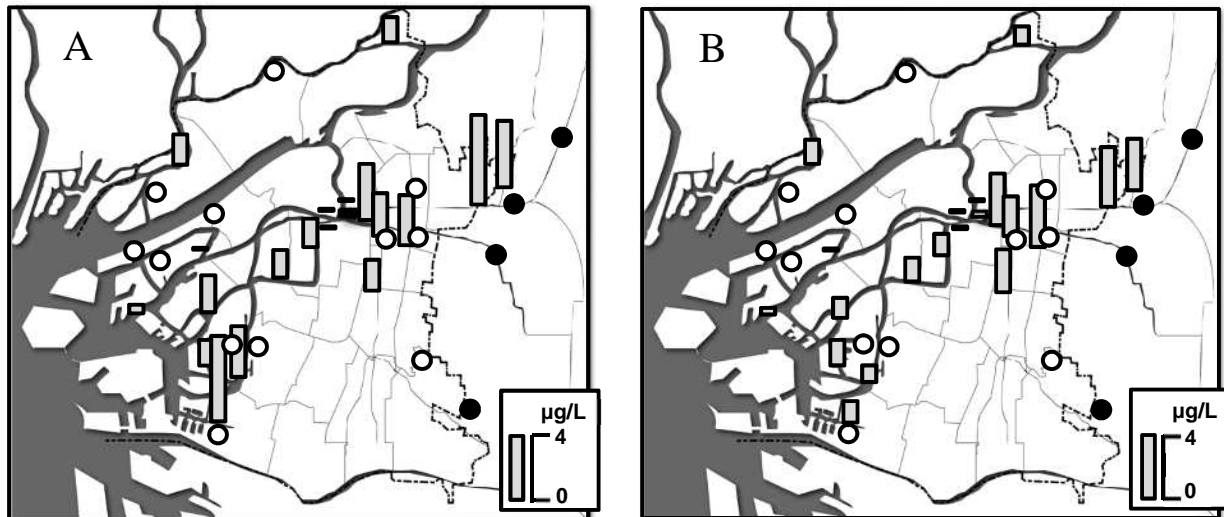


Fig. 3 Distribution of ACE(A) and SUC(B) in Rivers throughout Osaka City.

○ : Sewage Plant Operated by Osaka City

● : Sewage Plant Operated by Osaka Prefecture

放流水に AS が検出されている報告があること[6,8]から、大阪市内河川に検出された AS の起源の一つとして下水処理場があげられるものと考えられる。

IV まとめ

5 種類の AS について、河川水からの一斉分析法を既法をもとに改良した。改良点は、溶出溶媒および LC/MS/MS 測定条件の変更であった。溶出溶媒は、メタノールから 60%メタノール水溶液に変更した。非極性の物質の溶出を抑えることが可能となった。LC/MS/MS 測定条件は APM および SUC のイオンモードをネガティブからポジティブに変更した。これらの定量下限が 1/10 となった。

大阪市内河川の 20 か所より採水し、改良法を用いて、AS の濃度を測定した。ACE、SAC および SUC が検出され、それらの濃度範囲はそれぞれ、0.1-5.6、< 0.01-1.1、0.13-3.9 µg/L であった。濃度の高い地点の上流には、大阪市および大阪府の下水処理場があり、河川水中の AS の起源の一つとして、下水処理場が考えられた。

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ. http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/
- 2) 斎藤雅文, 堀由美子, 中島啓. 人工甘味料と糖代謝-2000 年以降の臨床研究から-. 日本栄養・食糧学会誌 2013; **66**: 69-75.
- 3) 大阪市下水道局ホームページ. <http://www.city.osaka.lg.jp/kensetsu/>
- 4) M. Scheurer, H. J. Brabch and F. T. Lange. 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
- 5) 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.
- 6) 今井志保, 川中洋平, 石井善昭. 多摩川河川水および水処理施設からの放流水における人工甘味料の存在状況の調査. 第 24 回環境化学討論会要旨集 2015
- 7) 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機構の推定と人為影響評価の可能性. 第 59 回日本地球化学年会要旨集 2012; 326-327.
- 8) 磯貝早耶, 高田秀重, 藤澤美晴. 合成甘味料の高密度分析による下水由来の地下水汚染の実態把握. 第 24 回環境化学討論会要旨集 2015
- 9) B. Subedi and K. Kannan. Fate of Artificial Sweeteners in Wastewater Treatment Plants in New York State, U.S.A. Environmental Science and Technology 2014; **48**: 13668-13674.
- 10) 小山政道, 吉田和郎, 内堀伸健, 和田伊知郎, 秋山和幸, 佐々木珠美. LC/MS による食品中の 9 種甘味料の一斉分析法. 食品衛生学会誌 2005; **46**: 72-78.
- 11) 畑野和弘, 中尾朱美. LC/MS による食品中のスクラロースの測定. 食品衛生学雑誌 2002; **43**: 267-272.

- 12) 岸弘子, 川名清子. イオン交換クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーによる食品中のスクラロースの分析. 食品衛生学雑誌 2001; **42**: 133-138.
- 13) 山辺智子, 竹村学, 河口裕香, 木村佳樹, 西口真平, 北田善三. 誘導体化法を用いた HPLC による食品中のスクラロースの分析. 日本食品化学学会誌 2012; **19**: 54-58.
- 14) 松本ひろ子, 平田恵子, 坂牧成恵, 萩野賀世, 牛山博文. サイクラミン酸、ズルチンの HPLC による定量及び LC/MS/MS による確認と 8 種甘味料の系統的分析. 化学生物総合管理 2010; **6**: 25-35.

(WEB サイトの内容は 2017 年 8 月 1 日に確認した)