

「牛肉中のホルモンの分析法開発」

研究協力者 東京都立衛生研究所 橋本 常生

研究要旨

牛生体に存在するホルモン(エストラジオール、テストステロン、プロゲステロン)が牛の雌雄、性周期、品種等の違いによる濃度を調査するため、牛肉を対象とした分析法を検討した。

通常、牛組織中では ppt から ppb レベルの低濃度でホルモンが存在するため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)の分析では検出が困難であり、高感度なラジオイムノアッセイ(RIA)による分析が必要である。そのため本研究では牛肉を対象とした RIA 測定のための分析法を開発した。試料調製では固相抽出カートリッジ等を用い操作の簡便化や迅速化を図った。牛肉にホルモンを添加し本分析法での回収も良好であった。牛肉からの検出限界はエストラジオール-17 β で1ppt、テストステロンで10ppt、プロゲステロンで0.04ppbであった。

A. 研究目的

牛肉に存在するホルモンのエストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロンをラジオイムノアッセイ (RIA) で測定するための簡便で迅速な分析法(試料調製法)を開発する。

RIA 用牛血清アルブミン(和光純薬)が0.5%となるよう0.1mol リン酸緩衝液(pH7.0)で溶解した。

アセトニトリル、メタノール、n-ヘキサン、イソプロパノール、シクロヘキサン等の有機溶媒は HPLC 用を用いた。

Sep-Pak[®] Vac C18(1g/6cc)、Sep-Pak[®] Vac tC18(1g/6cc)、Oasis[™]HLB(200mg/6cc)(以下 C18、tC18、Oasis と略す)(Waters 社製)、Extrelut[®]-3(以下 Extrelut と略す、メルク社製)、Bond Elut[®] DEA(500mg/3cc、以下 DEA と略す、Varian 社製)

B. 研究方法

1. 試料

分析法の検討には輸入牛肉を用いた、特に HPLC での添加回収実験では各ホルモンがピークとして認められない試料を使用した。

3. 装置

ホモジナイザー：Ultra-Tarrax T25(Janke kunkel Ika[®]-Labortechnik)

高速液体クロマトグラフ：ポンプ880-PU 型、オートサンプラー851-AS 型、検出器フォトダアイオードアレイ MD-910及び紫外部870-UV(いずれも日本分光社製)

固相抽出マニホールド(ジーエルサイエンス社製)

2. 試薬類

標準品：エストラジオール(estradiol-17 β 、以下 EST と略す)、テストステロン(testosterone、以下 TES)、プロゲステロン(progesterone、以下 PRO)は和光純薬(生化学用)を使用した。

ゼロ濃度標準血清(EST 用、TES 用、PRO 用、Diagnostic Products Corporation 社製)

牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液；

4. RIA 測定：S R L 社測定依頼

(株)エスアールエル

本社：東京都立川市曙町2-41-19

(042)526-7270 〒190-8567

RIA 使用キット：DPC エストラジオールキット、プロゲステロンキット及びトータルテストステロンキット（輸入元：ニッポン・ディーピーシー・コーポレーション、製造元：Diagnostic Products Corporation）

5. 試料調製法

5-1. 抽出

試料(ミンチした牛肉)5.0g を遠心管にとりアセトニトリル/メタノール(4:1)60ml を加えてホモジナイズした後、約3000rpm で10分間遠心分離した。上層の抽出液を n-ヘキサンを用いて洗浄後、下層を分取しイソプロパノールを20ml 以上加え、35° 以下で減圧濃縮した。残留物にアセトニトリル/水(2:8)5ml を加え十分に溶解させた。

5-2. 精製

5-2-1. Sep Pak® Vac C18 による精製

あらかじめアセトニトリル10ml 及びアセトニトリル/水(2:8)10ml でコンディショニングした C18カートリッジに上記の抽出残留物を負荷し、アセトニトリル/水(2:8) (3ml 及び2ml)でカートリッジに移した。次に同混液10ml で洗浄し、減圧吸引(約5分間)によりカートリッジを乾燥後、アセトニトリル10ml で溶出した。この溶出液を約40° で窒素気流下、濃縮乾固した。

5-2-2. Bond Elut® DEA による分画

DEA カートリッジはあらかじめイソプロパノール/シクロヘキサン(5:95)10ml 及びシクロヘキサン10ml でコンディショニングし、上記の濃縮残留物をシクロヘキサ約2ml で負荷した。カートリッジをシクロヘキサン10ml で洗浄後、イソプロパノール/シクロヘキサン(1:99)10ml で PRO 及び TES を溶出し、続いてイソプロパノール/シクロヘキサン(5:95)11ml で EST を溶出

した。各分画液は約40°、窒素気流下で濃縮乾固した。EST 分画は EST 用ゼロ濃度血清0.5ml で、PRO、TES 分画は PRO または TES 用ゼロ濃度血清1.0ml で十分に溶解した(HPLC での分析では各分画の濃縮残留物を移動相に適宜溶解して検討した。) (スキーム 1)。

C. 研究結果及び考察

1. 試料調製法

試料調製法については、著者らが主に HPLC での分析法を開発してきた^{1,2)}。そのため本研究では、その手法を基礎として操作法の簡易化をはかり、ベンゼン及びジクロロメタンなど問題となる溶媒を使わない方法を検討した。

1-1. 抽出方法

試料組織のタンパク変性をさせ、ホルモンを抽出させる目的でアセトニトリル/メタノール(3:1)を抽出溶媒に用いた。今回、実際の試料では筋肉質の部分を試料としたが、脂肪含量は数パーセン以上あり、n-ヘキサンによる脱脂を行った。また本操作ではジクロロメタンによる再抽出を行わず、アセトニトリル/メタノール抽出液を減圧濃縮することとした。そのため突沸が起こりやすくなったが、抽出液にイソプロパノールを加え35° 以下で濃縮を行うことにより突沸を防ぎ操作性が向上した。

1-2. 精製法

従来、ケトステロイド(PRO、TES 等)類とエストロゲン(EST 等)類を DEA カラムで分画後 Sephadex LH20で精製していたが、操作が煩雑で時間がかかり、ベンゼンを使用するなど多少問題があった。そこで本研究では簡便に操作ができる固相抽出カートリッジ等で精製後、DEA で分画する操作法を検討した。

1-2-1. 固相抽出による精製

精製操作で汎用される逆相系固相抽出力

ートリッジ(C18^{3,4)}、tC18⁵⁾、Oasis⁶⁾)及び多孔質ケイソウ土が充填された Extrelut カラムでの精製を検討した。逆相系のカートリッジカラムはアセトニトリル/水(2:8)でホルモンを負荷し、洗浄後アセトニトリルで溶出したところ、いずれも良好な回収が得られた。しかし実際の試料を負荷したところ特に Oasis で、また tC18でも多少、試料が固相で目詰まりを起こし、負荷や洗浄に時間を要し操作性に問題があった。C18では負荷または洗浄時に多少減圧吸引が必要な場合があるが短時間で処理でき操作性は良好であった。また C18の標準品での回収率は EST で95.4%、TES で99.1%、PRO で99.1%であった。一方 Extrelut では、脂溶性成分の除去を目的にシクロヘキサンでカラムに負荷し溶媒を除去後、アセトニトリルでの溶出を試みたが EST で約60%と回収率が悪かった。そのため、水系試料から脂溶性化合物を抽出する手法、すなわちアセトニトリル/水(2:8)でホルモンを Extrelut に負荷し酢酸エチルで溶出した。このときの EST は89.7%、TES は91.5%、PRO は94.6%と回収はほぼ良好であったが、C18等と比べ脂溶性の残渣量が多く、C18等がより精製効果があると認められた。以上の結果から固相抽出カートリッジでの精製には C18を用いることとした。

1-2-2. Bond Elut DEA による分画

シクロヘキサン及びシクロヘキサン/イソプロパノールを用いステロイドの溶出を検討した。ホルモンをシクロヘキサンで負荷し、15ml 以上溶出したがいずれのホルモンも溶出しなかった。次にシクロヘキサン/イソプロパノール(99:1)で溶出したところ約2ml で PRO が、3~8ml で TES が溶出し、EST は20ml 以上でも溶出されなかった。そのためシクロヘキサン/イソプロパノール(95:5)を流したところ約10ml で EST の溶出が完了した。以上の結果か

ら、シクロヘキサン約2ml でカラムに負荷し、シクロヘキサン10ml で洗浄後シクロヘキサン/イソプロパノール(99:1)10ml で PRO と TES を溶出させ、シクロヘキサン/イソプロパノール(95:5)11ml で EST を溶出させた。このときの回収率(標準品、HPLC)は EST が94.9%、TES が93.6%、PRO が97.1%と良好な結果が得られた。

1-3. RIA 測定用溶解液

本研究で用いた RIA キットは主に臨床試料(血液等)を対象に開発されたものであり、血清または血漿から直接測定される。牛肉から抽出精製後の残留物のマトリックスは血清や血漿のそれと大きく異なり、測定系、特に抗原抗体反応への影響が考えられ RIA 測定値に差がでる可能性が考えられる。そのため試料調製後の溶解溶液の選択を検討した。牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液^{7,8)}及びゼロ濃度標準血清にホルモン標準品を添加(EST:20~3600pg/ml、TES:200~16000pg/ml、PRO:0.1~40ng/ml)して RIA 測定値と比較した。EST では牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液に溶解した EST20pg/ml 及び50pg/ml 溶液の測定値がいずれも10pg/ml(検出限界)以下となり、低濃度での EST の検出が不可能であった。一方、ゼロ濃度標準血清に溶解した場合はそれぞれ15.9±2.8pg/ml 及び39.5±6.1pg/ml と添加濃度より多少低く測定される傾向がみられたが、牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液に比べ添加濃度との差が少ない結果が得られた。また PRO、TES についてもゼロ濃度標準血清に溶解した場合の方がより添加濃度に一致した。以上の結果から試料調製後の溶解溶液には各ホルモンのゼロ濃度標準血清を用いる方がより誤差の少ない測定結果が得られると考えられた。また TES 及び PRO のゼロ濃度標準血清は TES、PRO のいずれの測定にも用いることができるため試料調製での TES・

PRO 分画は同一の標準血清で溶解後 TES 及び PRO の測定が可能であった。

2. 検出限界

RIA 測定キットの検量線濃度範囲は EST で20~3600pg/ml、TES で200~16000pg/ml、PRO で0.1~40ng/ml であり、実際の依頼検査の検出限界は EST は10pg/ml、TES は50pg/ml である。PRO は試料の影響がありため0.2ng/ml を検出限界としている。

試料調製では EST で10倍、PRO 及び TES で5倍濃縮されるので、牛肉中の検出限界は1ppt(EST)、10ppt(TES)、0.04ppb(PRO)である。

3. 添加回収実験

3-1. HPLC による添加回収

通常 HPLC では天然に存在する ppt レベルの微量のホルモンを検出することは不可能であるため、高濃度のホルモンを添加して回収実験を行った。添加回収に使用する牛肉試料はあらかじめ HPLC でホルモンと同じ保持時間にピークのないことを確認した。その試料に各ホルモンを0.2ppm 相当添加し試料調製後、HPLC で回収率を求めたところ、EST で $90.8 \pm 2.5\%$ 、TES で $95.0 \pm 2.8\%$ 、PRO で $92.7 \pm 5.0\%$ (表1) とバラツキも少なく良好な結果が得られた。

3-2. RIA による添加回収

牛肉試料に一定量のホルモンを添加し、本法により試料調製後、RIA での測定値を表2に示した。また無添加(ブランク)試料の測定値を各添加試料の測定値より差し引いて回収率を求めたところ EST5ppt 添加で90%、50ppt 添加で64.8%であった。50ppt の添加では回収率がいくぶん低い、これは、「1-3. RIA 測定用溶解液」の項で EST 標準品を RIA で測定したとき、その測定値が多少低い値を示す傾向がみられたことによる影響と考えられる。TES では、ブランクの濃度が検出限界(10ppt)以下であり、

0及び10ppt で計算したため、回収率は40ppt で63.5~88.5%、200ppt で74.7~79.7%の範囲を示した。PRO では0.4及び4ppb 添加で80%以上の回収が得られた。

D. 結論

牛肉中のエストラジオール-17 β 、テストステロン、プロゲステロンの分析法は、試料よりアセトニトリル/メタノールで抽出し、n-ヘキサンで脱脂後、固相抽出(Sep Pak C18及び Bond Elut DEA)カートリッジで精製して RIA で測定した。牛肉にエストラジオール-17 β (5及び50ppt)、テストステロン(40及び200ppt)、プロゲステロン(0.4及び4ppb)を添加したとき、本分析法の回収率は60~90%であった。牛肉での検出限界はエストラジオール-17 β で1ppt、テストステロンで10ppt、プロゲステロンで0.04ppb と高感度な分析が可能で、牛生体中のホルモン濃度を調査する上で有効な分析法である。

E. 文献等

- 1)宮崎奉之 他：食衛誌、36(6)、786-753 (1995)
- 2)厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 理化学編、p452-459(1991)
- 3)貫山道子 他：第34回全国衛生化学技術協議会年会講演集、p54-55(1997)
- 4)Tsujioka, T. et al. : *Research in Veterinary Science*, 52 105-109(1992)
- 5)長南隆夫 他：日本食品衛生学会第75回 学術講演会要旨集、p52(1998)
- 6)堀江正一 他：食衛誌、39(6)、383-389 (1998)
- 7)橋本常生 他：食衛誌、34(3)、211-215 (1993)
- 8)Klingler, W. et al. : *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 311, 352-353(1982)

牛肉5g(ミンチ)

アセトニトリル/メタノール(4:1) 60ml
遠心分離(3000rpm) 10分間.
n-ヘキサン 30ml(分液漏斗200ml)

抽出液(下層)

イソプロパノール20ml以上添加
減圧濃縮(35°C以下) *1

残留物 *2

Sep Pak Vac C18 (1g/6cc) カートリッジ

アセトニトリル/水(2:8) 5+3+2ml 負荷 *3
アセトニトリル/水(2:8) 10ml 洗浄
吸引乾燥(5分間)
アセトニトリル10ml 溶出
濃縮乾固(窒素ガス気流下) *4

Bond Elut DEA(500mg/3cc)カートリッジ

シクロヘキサン 約2ml 負荷
シクロヘキサン 10ml 洗浄
溶出
(1)イソプロパノール/シクロヘキサン(1:99)10ml(テストステロン, プログステロン画分)
(2)イソプロパノール/シクロヘキサン(5:99)11ml(エストラジオール画分)
濃縮乾固(窒素ガス気流下)
セロ濃度標準血清 1ml(テストステロン, プログステロン画分)
0.5ml(エストラジオール画分)
溶解

R I A 試験溶液

スキーム1. R I Aによる牛肉中ホルモンの分析法

コンデューション

- (1) Sep Pak C18 Vac : アセトニトリル10mlを通した後, アセトニトリル/水(2:8)で洗浄した.
- (2) Bond Elut DEA : イソプロパノール/シクロヘキサン(5:99)10mlを通した後, シクロヘキサン10mlで洗浄した.

- *1 突沸を避けるためイソプロパノールを20ml以上添加し, 35°C以下で減圧濃縮する.
- *2 イソプロパノール等を窒素気流下で除く.
- *3 必要に応じ減圧吸引して滴下させる.
- *4 十分に水分を除く.

表 1 HPLCによるホルモンの添加回収率

化合物	添加濃度(ppm)	平均回収率(%)±標準偏差
エストラジオール	0.2	90.8±2.5
テストステロン	0.2	95.0±2.8
プロゲステロン	0.2	92.7±5.0

n=5

HPLCは紫外部検出(230nm)により分析した。

ホルモンが検出されないことを確認した牛肉を用いた。

表 2 RIAによるホルモンの添加回収率

化合物	添加濃度	RIA測定値 (平均±標準偏差)	回収率(%)
エストラジオール	0(ppt)	2.9±0.4	—
	5	7.4±0.8	90.0
	50	35.2±6.1	64.6
テストステロン	0(ppt)	10未満	—
	40	35.4±6.8	63.5~88.5
	200	159.4±16.5	74.7~79.7
プロゲステロン	0(ppb)	0.38±0.06	—
	0.4	0.71±0.13	82.5
	4	3.76±0.20	84.5

n=5