

畜水産食品中のプロゲステロン含有量調査

坂井隆敏[#], 根本了, 松田りえ子, 穂山浩

Survey of progesterone levels in livestock and fishery products

Takatoshi Sakai[#], Satoru Nemoto, Rieko Matsuda,
Hiroshi Akiyama

In order to investigate the progesterone (P4) levels present in foods, an analytical method for P4 in livestock and fish-based food products was developed. The developed method was applied to the measurement of P4 in various bovine, swine, poultry and salmon samples. The contents of P4 in bovine muscle, bovine fat, swine fat and chicken eggs, were high, ranging from <0.1 (below the limit of quantification) to 167.7 ng/g. Conversely, the contents of P4 in foods such as bovine liver, swine muscle, swine liver, poultry meat and salmon, were very low (<0.1 ng/g). The contents of P4 in cow milk were <10 ng/g, while those in cheese and butter ranged from 58.3 to 96.1 ng/g and 155.0 to 427.5 ng/g, respectively. The results suggest that P4 levels in foods such as bovine muscle, bovine fat, swine fat, chicken eggs, cheese and butter appear to exceed the uniform limits (0.01 ppm = 10 ng/g) regulated in the positive list system for agricultural chemical residues in foods in Japan.

Keywords: progesterone, livestock products, fishery products

1. 緒言

プロゲステロン (P4) は、黄体ホルモンとして作用するステロイドホルモンの一種であり、生物に広く存在する天然型ホルモンである。また、牛の受精卵着床障害の治療や習慣性流産の防止などを目的として承認・使用¹⁾されている動物用医薬品の有効成分でもある。

我が国においては、P4について食品中の残留基準は設定されていない。通常、残留基準が設定されていない農薬、飼料添加物または動物用医薬品 (農薬等) については一律基準 (0.01 ppm = 10 ng/g) が適用されるが、P4のように天然に食品に含有され、かつ動物用医薬品の成分でもある物質については、食品・添加物等の規格基準 (昭和34年厚生省告示第370号) の一般規則8により²⁾、「農薬等の成分である物質が自然に食品に含まれる物質と同一であるとき、当該食品において当該物質が含

まれる量は、当該食品に当該物質が通常含まれる量を超えてはならない (自然に含有される量の程度で残留する場合には、ポジティブリスト制度における一律基準を適用しない)」ことが規定されている。

このため、本規定の対象となる物質について規格基準の適合判定を行う場合、得られた分析値と「食品に通常含まれる量」を比較する必要がある。したがって、これら物質が食品に通常どの程度含有されているかを把握しておく必要があるが、P4がどのような食品にどの程度含有されているかについては詳細な情報が得られていない。また、分析法については、血漿や河川水等中のP4分析法については幾つか報告があるものの³⁻⁶⁾、種々の食品に適用可能な分析法については報告が無い。

そこで本研究では、自然に含有される畜水産食品中のP4の含有量を把握するために、畜水産食品中のP4分析法を開発した。また、開発した分析法を用いて種々の畜水産食品中のP4含有量を調査した。

[#] To whom correspondence should be addressed:

Takatoshi Sakai; Division of Foods, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext.334; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: tasakai@nihs.go.jp

2. 実験方法

2.1 調査食品および検体数

調査対象食品として、牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓・乳、豚の筋肉・脂肪・肝臓、鶏の筋肉・脂肪・肝臓・皮・卵、

さけ、チーズおよびバターを選択した。各食品の検体数は、牛の筋肉・脂肪・乳、鶏卵、チーズおよびバターについては20検体、その他の食品については10検体とした。なお、これらの検体は、都内のスーパーマーケット等で購入したものをを用いた。

2.2 試薬および試液

P4標準品はシグマ・アルドリッチ製（純度99.6%）、P4-¹³C₃標準品は林純薬工業（株）製（純度99.9%）、P4-d₉標準品は関東化学（株）製（純度98.0%）のものをを用いた。

アセトニトリルは、アセトニトリル／ヘキサン分配には関東化学（株）製の残留農薬試験・PCB試験用（300倍濃縮検定品）を、標準溶液調製および液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）用移動相には関東化学（株）製のLC-MS用を用いた。アセトン、酢酸エチルおよび*n*-ヘキサンは関東化学（株）製の残留農薬試験・PCB試験用（300倍濃縮検定品）を、エタノールおよび蒸留水は関東化学（株）製のLC用を用いた。塩化ナトリウムは和光純薬工業（株）製の残留農薬・PCB試験用を用いた。

また、オクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）ミニカラムはジールサイエンス（株）製InertSep C18（1g）を、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル（PSA）ミニカラムはアジレント製Bond Elut PSA（1g）を用いた。

2.3 器具及び装置

ホモジナイザーはPOLYTRON 3100（KINEMATICA製）を、ロータリーエバポレーターはN-1100シリーズロータリーエバポレーター（東京理化工機（株）製）を用いた。

液体クロマトグラフはProminenceシリーズHPLC（（株）島津製作所製）を、質量分析計はAPI 4000（Sciex製）を用いた。また、分析カラムは関東化学（株）製Mightysil RP 18GP（粒子径3.0μm、内径3mm、長さ150mm）を用いた。

2.4 標準溶液の調製

P4標準品、P4-¹³C₃標準品およびP4-d₉標準品をそれぞれ正確に量り採り、アセトニトリルに溶解して1mg/mLの標準原液を調製した。

調製した各標準原液をアセトニトリルおよび水（1：1）混液で希釈・混合し、それぞれ0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.0125および0.015mg/Lの標準溶液を調製し、検量線作成用標準溶液とした。

また、P4-¹³C₃標準品およびP4-d₉標準品をアセトンで希釈・混合し、0.1mg/L溶液を調製し、これを回収率確

認用安定同位体標準溶液とした。本溶液は、P4の回収率を確認することを目的として、試料に添加して分析を実施した。

2.5 試験溶液の調製

a) 抽出

検体を正確に量り採り、エタノールおよび水（1：1）混液を等量（重量比）加えてホモジナイズし、調製試料とした。調製試料20.0g（脂肪の場合は10.0g）を量り採り、回収率確認用安定同位体標準溶液0.1mLを添加した。これにアセトン50mLを加えてホモジナイザーで2分間ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。上澄液を採り、残留物にアセトン30mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様の条件で遠心分離した。上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、アセトンで正確に100mLとした。この10mL（脂肪の場合は20mL）を採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃で約1mLまで濃縮した後、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。残留物に10w/v%塩化ナトリウム溶液30mLを加え、酢酸エチル30mLずつで2回振とう抽出した。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターを用いて40℃で約1mLまで濃縮した後、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。得られた残留物をアセトニトリルおよび水（4：1）混液1mLに溶解した。

b) 精製

あらかじめアセトニトリル5mL、アセトニトリルおよび水（4：1）混液5mLを順次注入して洗浄したODSミニカラムに、上記a)で得られた溶液を注入し、さらにアセトニトリルおよび水（4：1）混液10mLを注入し、全溶出液を採った。溶出液を、ロータリーエバポレーターを用いて40℃で約1mLまで濃縮した後、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。得られた残留物をアセトンおよび*n*-ヘキサン（3：1）混液1mLに溶解した。

次いで、あらかじめアセトンおよび*n*-ヘキサン（3：1）混液10mLを注入して洗浄したPSAミニカラムに、上記で得られた溶液を注入し、さらにアセトンおよび*n*-ヘキサン（3：1）混液10mLを注入し、全溶出液を採った。溶出液を、ロータリーエバポレーターを用いて40℃で約1mLまで濃縮した後、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。得られた残留物にアセトニトリルおよび水（1：1）混液1.0mLを加えて溶解したものを試験溶液とした。

2.6 検量線の作成

検量線作成用標準溶液それぞれ10μLをLC-MS/MSに注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。

2.7 定量

試験溶液 10 μ L を LC-MS/MS に注入し、上記で作成した検量線を用いて P4 の含有量を求めた。

なお、試験溶液の測定で得られた P4 のピーク面積値が検量線作成用標準溶液の最大濃度 (0.015 mg/L) の測定で得られたピーク面積値を超過した場合には、試験溶液をアセトニトリルおよび水 (1:1) 混液で適宜希釈して再測定を行い、算出された分析値に希釈倍率を乗じて含有量を求めた。また、試験溶液のピーク面積値が検量線作成用標準溶液の最小濃度 (0.0025 mg/L) のピーク面積値未満の場合には、さらに低濃度の検量線作成用標準溶液を調製し、低濃度定量用の検量線を作成した後、含有量を求めた。

2.8 添加回収試験

対象食品は、牛の筋肉・肝臓・脂肪・乳、鶏の筋肉・卵、さけ、うなぎ、しじみおよびはちみつを選択した。これらの食品をそれぞれ均一化し、ブランク試料を調製した。調製したブランク試料に P4 を添加 (鶏卵以外の食品は 10 ng/g、鶏卵は 100 ng/g) ・攪拌し、添加試料を調製した。各食品を用いて調製したブランク試料 (1 つ) および添加試料 (5 つ) について、上記「2.4 試験溶液の調製」に記載した方法に従い試験溶液を調製した。調製した試験溶液を LC-MS/MS で測定し、各添加試料中の P4 の回収率を求め、真度および併行精度を算出した。なお、ブランク試料中に P4 が検出された食品については、各添加試験溶液中の P4 濃度からブランク試験溶液中の P4 を差し引き、回収率を求めた。

2.9 測定条件

a) 液体クロマトグラフィー条件

注入量 10 μ L、カラム温度 40℃、移動相 0.1 vol% ギ酸 (A 液) およびアセトニトリル (B 液)、流速 0.4 mL/min、グラジエント ($t_{\min}$) t_0 : B 液 35%, t_5 : B 液 35%, t_{25} : B 液 95%, $t_{25.1}$: B 液 99%, t_{30} : B 液 99%, $t_{30.1}$: B 液 35%, t_{40} : B 液 35%

b) 質量分析条件

イオン化 ESI・ポジティブモード、測定モード 選択反応モニタリング (SRM)、イオンスプレー電圧 5500 V、脱溶媒温度 700℃、測定イオン m/z 315 > 97 (P4), m/z 318 > 112 (P4- $^{13}C_3$), m/z 324 > 113 (P4- d_9)

3. 結果および考察

3.1 LC-MS/MS によるプロゲステロンの分析

はじめに、LC-MS/MS の測定条件を最適化した。その結果、P4 について良好なピーク形状および測定感度

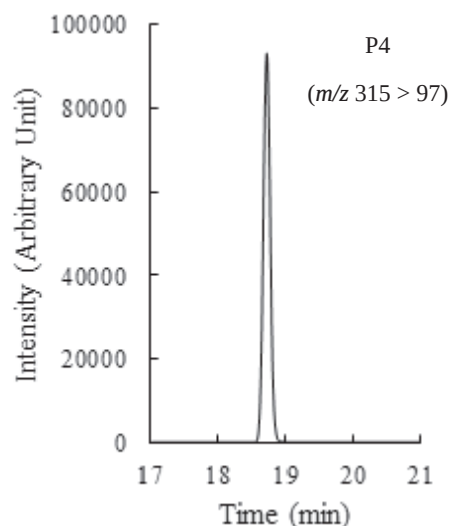


Fig. 1. SRM chromatogram of P4 standard solution (0.01 mg/L)

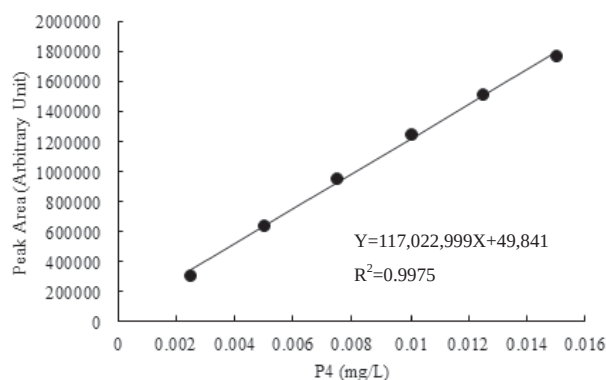


Fig. 2. Calibration curve for P4

が得られ (図1)、また、0.0025 mg/L ~ 0.015 mg/L の濃度範囲で検量線を作成したところ、決定係数 0.99 以上の良好な直線性が得られた (図2)。

種々の検討を行い確立した P4 分析法の各食品への適用性を検証した。すなわち、上記「2.7 添加回収試験」に記載した方法に従い添加回収試験を実施した。その結果、添加した P4 の真度は 76 ~ 98%, 併行精度は 1.7 ~ 27.0 RSD% であり、牛の脂肪 (真度 97%・併行精度 27.0 RSD%) および鶏卵 (真度 98%・併行精度 16.7 RSD%) を除いて良好な真度および併行精度が得られた (表1)。牛の脂肪および鶏卵における併行精度が高値となった原因としては、調製したブランク試料の均一性が十分ではなかったことが推察された。一方、P4 の安定同位体標識標準品であり、P4 と類似の物性等を有するが天然には存在しない物質である P4- $^{13}C_3$ および P4- d_9 については、それぞれ真度 77 ~ 95%・併行精度 2.4 ~ 10.2 RSD% および真度 75 ~ 93%・併行精度 1.8 ~ 7.4 RSD% と良好な

Table 1 Results of recovery tests for P4

Food	P4			P4- ¹³ C ₃		P4-d ₉	
	Blank (ng/g)	Trueness (%)	Repeatability (RSD%)	Trueness (%)	Repeatability (RSD%)	Trueness (%)	Repeatability (RSD%)
Bovine muscle	ND	82	1.7	79	3.7	78	3.4
Bovine fat	8.5	97	27.0	95	4.2	93	3.3
Bovine liver	ND	80	4.5	81	3.5	83	3.6
Cow's milk	8.1	89	7.5	80	2.8	78	1.8
Poultry muscle	ND	82	2.2	81	3.3	75	2.5
Hen's egg	75.0	98	16.7	87	10.2	89	4.9
Eel	ND	76	3.8	77	4.2	76	4.6
Salmon	ND	84	2.7	84	2.4	84	3.2
Freshwater clam	ND	81	6.1	81	4.8	78	5.1
Honey	ND	92	6.2	91	4.6	92	7.4

ND: not detected

Table 2 P4 contents in foods

Food	n	Contents of P4 (ng/g)			Recovery of isotope-labelled P4 fortified (%)	
		median	minimum	maximum	P4- ¹³ C ₃	P4-d ₉
Bovine muscle	20	45.8	<0.1	53.9	79 - 92	74 - 89
Bovine fat	20	77.0	<0.1	122.3	81 - 103	82 - 98
Bovine liver	10	-	<0.1	<0.1	79 - 98	78 - 97
Bovine kidney	10	5.5	<0.1	9.3	75 - 84	72 - 82
Cow's milk	20	8.2	5.2	9.8	77 - 95	75 - 92
Swine muscle	10	-	<0.1	<0.1	80 - 96	77 - 92
Swine fat	10	25.9	<0.1	53.1	83 - 97	79 - 103
Swine liver	10	-	<0.1	<0.1	74 - 92	74 - 87
Poultry muscle	10	-	<0.1	<0.1	86 - 94	83 - 94
Poultry fat	10	-	<0.1	<0.1	84 - 98	79 - 99
Poultry liver	10	-	<0.1	<0.1	79 - 88	78 - 86
Poultry skin	10	-	<0.1	<0.1	75 - 88	77 - 86
Hen's egg	20	90.3	43.3	167.7	81 - 113	79 - 116
Salmon	10	-	<0.1	<0.1	72 - 83	71 - 80
Cheese	20	68.9	58.3	96.1	83 - 99	81 - 95
Butter	20	260.0	155.0	427.5	81 - 92	85 - 101

結果が得られた。これらの結果から、本分析法を用いることにより、種々の食品中のP4を精確に分析可能であると判断された。また、実態調査においては、P4-¹³C₃およびP4-d₉などの安定同位体標識標準品を添加し、これらの回収率を確認しながら分析を行うことにより、添加回収試験で適用性検証を実施していない食品も含め、広範囲な畜水産食品について精確な分析が可能と推察された。

なお、本分析法の定量下限値は、分析対象化合物であるP4が含まれていた食品もあったため、食品によっては精確な値を求めることはできなかったが、使用したP4-¹³C₃およびP4-d₉の標準溶液のピークのS/Nなどから0.1ng/g程度であると推定された。

3.2 各食品中のプロゲステロン含有量

本分析法を用いて種々の食品中のP4を分析した。先ず、どのような食品にどの程度含有されているかについてスクリーニング的に調査を実施した。結果を表2に示した。

P4の回収率確認を目的として添加したP4-¹³C₃およびP4-d₉の回収率は、調査した全ての試料において良好（それぞれ、回収率72～113%および71～116%）であったことから、本調査で得られた各試料中のP4含有量は概ね信頼性の高い値であると考えられた。なお、含有量は絶対検量線法で得られた値を採用し、安定同位体を用い

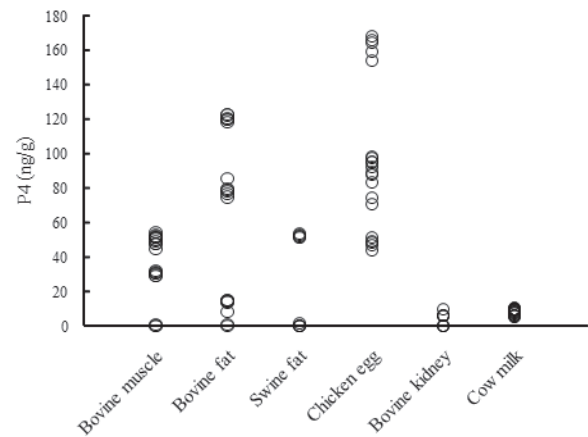


Fig. 3. P4 contents in each sample

た内標準法による補正等を行わなかった。

牛の筋肉・脂肪および豚の脂肪においては、P4が0.1ng/g未満から122.3ng/gの範囲で検出された。鶏卵では43.4～167.7ng/gの範囲で検出され、一律基準値（0.01ppm=10ng/g）の16倍のP4を含有する試料があることが確認された。また、牛の腎臓・乳については、本研究で調査した試料中のP4含有量は全て一律基準値未満であったものの、試料によっては一律基準値を超過する可能性もあることが示唆された（図3）。一方、牛の肝臓、豚の筋肉・肝臓、鶏の筋肉・脂肪・肝臓・皮、さけにおけるP4は全て0.1ng/g未満であり、これらの食品においてプロゲステロン含有量が一律基準値を超過する可能性は低いと考えられた。

牛乳において、調査した全20試料において5.2～9.8ng/gの範囲でP4が検出されたことから、乳製品であるチーズおよびバターについて追加調査したところ、全試料において検出され、チーズでは58.3～96.1ng/g、バターでは155.0～427.5ng/gの範囲で検出された。この結果より、乳製品であるチーズおよびバターでは含有量が高いことが示唆された。

本調査は、P4が含有される可能性が高い食品のスクリーニングを目的としたため、各食品の試料数（各食品10～20試料）は、統計解析により含有量の上限値を推定するに足る試料数（50試料程度）には至っていない。食品・添加物等の規格基準における規定を円滑に運用するためには、各食品におけるP4含有量の上限値を統計的に推定し、得られた値を基に「各食品に通常含まれる量」を適切に設定する必要がある。そのためには、本調査において含有量が一律基準値を超過した、もしくは試料によっては超過する可能性があると思われた食品について、追加調査を実施する必要があると考えられた。

4. おわりに

本研究において、先ず畜水産食品中のP4の分析法を開発した。次に開発した方法を用いて種々の畜水産食品中のP4含有量をスクリーニング的に調査した結果、0.1 ng/g未満～427.5 ng/gの範囲で検出された。牛の筋肉・脂肪、豚の脂肪、鶏卵、チーズ及びバターでは含有量が一律基準値を超過して検出される場合があることが確認された。食品・添加物等の規格基準における規定の円滑な運用には、調査試料数を増やし、得られた結果を基に通常含まれる量の上限値を推定する必要があると考えられた。

謝辞

本調査は、「厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部基準審査課 食品に含有される天然ホルモンに関する調査（プロゲステロン）」事業により実施した。

引用文献

- 1) 農林水産省動物医薬品検査所, 動物医薬品等データベース, http://www.nval.go.jp/asp/asp_dbDR_idx.asp (平成27年5月9日確認)
- 2) 厚生省告示第370号“食品・添加物等の規格基準”(昭和34年12月28日)
- 3) Zhang S, Mada SR, Sharma S, Torch M, Mattison D, Caritis S, Venkataramanan S: *J-Pharm Biomed Anal.* 2008;48:1174-80.
- 4) Fernandes RMT, Gomes GC, Porcari AM, Pimentel JRV, Porciuncula PM, Martins-Junior HA, Miguez PHP, da Costa JL, Amaral PH, Perecin F, Meurer EC, Furtado PV, Simas RC, Eberlin MN, Ferreira CR, Madureira EH: *Theriogenology.* 2011;76:1266-74.
- 5) Abdel-Khalik J, Bjorklund E, Hansen M: *J Chromatogr B.* 2013;928:58-77.
- 6) Tolgyesi A, Verebey Z, Sharma VK, Kovacsics L, Fekete J: *Chemosphere.* 2010;78:972-9.