コイの筋肉及び胆嚢中のシプリノールサルフェート及び胆汁酸類のキャピラリーガスクロマトグラフィーによる定量

(平成3年1月18日受理)

田中義人^{*1} 毛利隆美^{*1} 深町和美^{*1}
高橋克巳^{*1} 安元 健^{*2}

Determination of Cyprinol and Cholic Acids in Bile and Muscle of Carp by Capillary Gas Chromatography

Yoshito TANAKA^{*1}, Takami MOHRI^{*1}, Kazumi FUKAMACHI^{*1}, Katsumi TAKAHASHI^{*1}
and Takeshi YASUMOTO^{*2}

(^{*1}Fukuoka Environmental Research Center: 39, Mukaida, Mukaisano, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01, Japan; ^{*2}Tohoku University: 1-1, Amemiya-machi, Tsutsumidori, Aoba-ku, Sendai-shi 981, Japan)

In recent years, many incidents of food poisoning by carp have been reported. It is important to determine the nature and amounts of the causative substances. Accurate determinations of cyprinol, one of the causative substances, and some bile acids were examined.

Cyprinol and cholic acids were extracted from bile and muscle of carp. After alkalysis and derivatization of cyprinol, etc., analysis was carried out by FID-GC equipped with a fused silica methyl 50% phenylsilicone capillary column (25 m × 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness). GC conditions were as follows: the sample was injected into solvent-cut injector and solvents were removed for 2 minutes at room temperature. The column temperature was programmed from 200°C to 260°C at 8°C/min. The injection temperature was 280°C.

The detection limit of cyprinol was 5 ng, and those of cholic acid, etc. were 3 ng, based on the amount giving a signal equal to 3 times the amplitude of the baseline noise.

(Received January 18, 1991)

Key words: シプリノール cyprinol; キャピラリーガスクロマトグラフィー capillary gas chromatography; 胆汁酸 bile acid; コイ carp; 食中毒 food poisoning; フルオロアルシル化 fluoroacylation

緒 言

近年、コイによる食中毒が、我が国及び台湾、香港などではしばしば報告されている^{1)~6), 8), *3}が、いまだその原

因物質について、すべてが解明されたとはいえない。コイ毒はフグ毒や他の自然毒と比較すると、その致死率は低いが、東洋には疲労時や病人が精力回復のために、コイ料理やコイの生の胆嚢を摂取する習慣があり、それに伴う中毒例が以前からあった。コイによる中毒の原因物質としては、胆汁成分が推測されており⁹⁾、その一つにシプリノール (cyprinol) が報告されている^{*4}。Cyprinol

^{*1} 福岡県衛生公害センター：〒818-01 福岡県太宰府市大字向佐野字迎田 39

^{*2} 東北大学農学部：〒981 仙台市青葉区堤通雨宮 1-1

^{*3} 橋本周久：日本水産学会秋期大会要旨集 p. 505 (1988).

Fig. 1. Analytical method of cyprinol sulfate, cholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid and lithocholic acid

は、コレスタン骨格をもつ高分子化合物であり、その分析は、けい光分析による HPLC 法が応用されている¹⁰⁾が、いまだ GC による分析方法は報告されていない。そこで、今回、胆汁成分であるコール酸 (cholic acid) 類の分析¹¹⁾を cyprinol に応用し、cholic acid 類と同時に誘導体化後、化学結合型シリカキャピラリーカラム、メチル 50% フェニルシリコン (OV-17 相当; 内径 0.32 mm, 膜厚 0.25 μ m, 長さ 25 m) を用いる GC 定量法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬及び標準溶液

Cyprinol sulfate 標準液: cyprinol sulfate 標準品は、橘田ら¹²⁾の方法に準じて、コイの胆嚢よりエタノール抽出、エーテル脱脂、ブタノール抽出を行い、精製した¹²⁾ものを使用した。また、純度は TLC 及び HPLC-MS で

単一物質であることを確認した¹²⁾。検量線用の標準溶液としては、250 μ g/ml となるように酢酸エチルに溶解し、適宜希釈して用いた。

胆汁酸類の標準液: cholic acid (C. A.) は和光純薬工業(株)製 (特級), deoxycholic acid (D. C.) は Sigma 社製 (特級), chenodeoxycholic acid (C. D.), lithocholic acid (L. C.) は和光純薬工業(株)製 (特級) をそれぞれ用いた。検量線用の標準溶液としては、それぞれ 50 μ g/ml となるように酢酸エチル溶解し、適宜希釈して用いた。

内部標準溶液: 東京化成工業(株)製 (一級) テトラトリアコンタン (C_{34}) を酢酸エチルに溶解し 50 μ g/ml となるように試料溶液に添加して用いた。

反応試薬: 和光純薬工業(株)製ガスクロマトグラフ分析用無水トリフルオロ酢酸 (以後 TFAA と略す), 和光純薬工業(株)製ヘキサフルオロイソプロパノール (以後 HFIP と略す) を使用した。

他の試薬はいずれも特級品を使用した。

¹²⁾ 橘田和美, 村田道雄, 安元 健: 日本水産学会秋期大会要旨集 p. 964 (1988).

Fig. 2. The effect of reaction time on derivation

Fig. 3. The effect of reaction temperature on derivation

Table 1. Reproducibility of the Retention Time for Cyprinol Sulfate, C. A., C. D., L. C. and D. C.¹⁾

Sample No.	Retention time of each standard (min)				
	Cyprinol sulfate	C. A.	C. D.	L. C.	D. C.
1	15.9	8.6	8.8	9.2	9.3
2	16.0	8.6	8.9	9.2	9.3
3	15.9	8.6	8.9	9.2	9.3
4	15.8	8.6	8.8	9.2	9.3
5	15.9	8.6	8.8	9.2	9.3
Mean	15.90	8.60	8.85	9.17	9.32
S. D.	0.044	0.011	0.011	0.013	0.013
R. S. D., %	0.28	0.13	0.13	0.14	0.14

¹⁾ 106.25 ng of cyprinol sulfate and 25 ng of other standards were injected.

S. D.: Standard deviation

Table 2. Reproducibility of Peak Area for Cyprinol Sulfate, C. A., C. D., L. C. and D. C.¹⁾

Sample No.	Area of each standard				
	Cyprinol sulfate	C. A.	C. D.	L. C.	D. C.
1	4679	6766	5493	6108	6891
2	4847	6896	5604	6171	6990
3	4795	6912	5549	6264	7113
4	4691	7070	5680	6404	7011
5	4773	7186	5896	6491	7168
Mean	4754	6966	5644	6287	7034
S. D.	63.62	146.3	140.2	142.4	97.07
R. S. D., %	1.34	2.10	2.48	2.26	1.38

¹⁾ 106.25 ng of cyprinol sulfate and 25 ng of other standards were injected.

S. D.: Standard deviation

2. 装置及び器具

ガスクロマトグラフ: 水素炎イオン化検出器 (FID) 付き (株) 島津製作所製 GC-7A 型を用いた。

試料導入装置: (株) 島津製作所製ムービングニードル型ソルベントカット試料導入装置を用いた。

キャピラリーカラム: Quadrex 製化学結合型シリカキャピラリーカラム, メチル 50% フェニルシリコン (OV-17 相当; 内径 0.32 mm, 膜厚 0.25 μ m, 長さ 25 m) を使用した。

3. 実験方法

3.1 試料液の調製

調製方法の概要を, Fig. 1 に示した。試料液は, 武田らの方法¹⁾に準じて調製した。すなわち, 試料に同量の熱

Fig. 4. Calibration curve of cyprinol sulfate

*S.: peak area for cyprinol sulfate

I. S.: peak area for internal standard

エタノールを加えてホモジナイズを行いろ過助材としてハイフろスーパーセルを用い, 吸引ろ過した。残留物は, さらに 1 回抽出を行い, ろ過した。抽出ろ液は合わせ, 減圧下で溶媒を留去した。残留物は少量の蒸留水に溶かし, 分液漏斗に洗い込み, 同量のエーテルで 3 回抽出して, 脱脂を行った。水層は同量のブタノールで 3 回抽出を行い, ブタノール層は, 合わせて減圧下で溶媒を留去した。残留物の一定量を 5 ml バイアル瓶にとり, 4.5 N 水酸化ナトリウム溶液 3 ml に溶解し, 120° で 15 時間, アルカリ分解^{13), 14)}を行った。次に, 分解液は少量の蒸留水に溶かし, 分液漏斗に洗い込み, 4.5 N 塩酸で pH 1 に調整した後, 同量の酢酸エチルで 3 回抽出した。その酢酸エチル層を合わせて 10 ml の蒸留水で, 5 回水洗を行った。次に, 酢酸エチル層は, 無水硫酸ナトリウム 10 g で脱水した後, 減圧下で濃縮し, 10 ml の定容にした。その試料の一定量を 1 ml のバイアル瓶にとり, 溶媒留去後, 誘導体化試薬 TFAA 0.2 ml, HFIP 0.1 ml をそれぞれ添加して, 40°, 30 分間反応させ誘導体化して, GC に供した。

3.2 GC 条件

3.1 で調製した試料液を試料導入装置に注入し, 3 分間溶媒を留去した後, 注入口中に移動させカラム温度を 200° から 260° まで毎分 8° の速度で昇温した。その後, 全成分が溶出し終わるまでカラムオープン温度を保持した。

Table 3. Recovery (%) of Cyprinol Sulfate, C. A., C. D., L. C. and D. C. from Muscle and Bile¹⁾

Sample	Added (μ g)	Recovery (%)				
		Cyprinol sulfate	C. A.	C. D.	L. C.	D. C.
Muscle	100	99.5	100.6	100.5	99.3	103.5
S. D.		3.0	1.3	1.1	2.1	2.0
Bile	200	94.7	94.8	97.0	93.9	99.3
S. D.		5.1	5.4	4.8	6.6	5.4

¹⁾ Each value represents the mean of five experiments

S. D.: Standard deviation

Table 4. Analytical Results of Cyprinol Sulfate, C. A., C. D., L. C. and D. C. from Muscle and Bile of Carp

Sample	Cyprinol sulfate	C. A.	C. D.	L. C.	D. C.
Bile (mg/ml)	112.9	3.8	4.6	0.3	ND ^{a)}
Muscle (μ g/g)	ND ^{b)}	ND ^{c)}	ND ^{c)}	ND ^{c)}	ND ^{c)}

^{a)} ND: < 10.0 μ g/ml

^{b)} ND: < 6.25 μ g/g

^{c)} ND: < 10.0 μ g/g

結果及び考察

1. 誘導体化条件の検討

Cyprinol は難揮発性化合物であり、揮発性を高めるため誘導体化して、分析を行った。誘導体化試薬としては、bromotrimethylsilane (Aldrich Chemical Company) や *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (ガスクロ工業(株)製) を用いるシリル化, TFAA, HFIP を用いたフルオロアシル化及び、メチルエステル化を検討した。その結果、後者の TFAA 及び HFIP を用いた方法で良好な結果が得られた。

1.1 反応時間の検討

各標準溶液の適当量を取り、溶媒を留去した後、誘導体化試薬 TFAA 0.2 ml, HFIP 0.1 ml を添加し、反応温度を 40° に固定して、反応時間 15 分、30 分、60 分、120 分でそれぞれ反応させ、各誘導体の生成量を GC ピーク面積測定によって検討した。その結果、生成量は 15

分でも最高値を示し、その後一定値を示した (Fig. 2)。したがって、反応時間は、短時間でも十分であると思われたが安全のため、30 分間とした。

1.2 反応温度の検討

1.1 と同様に各標準溶液の適当量を取り、溶媒を留去した後、誘導体化試薬を添加し、反応時間を 30 分に固定して、反応温度を 30°, 40°, 50°, 60° としそれぞれ反応させた場合の誘導体生成量を、GC ピーク面積測定によって検討した。その結果、実験した各温度において、生成量は一定値を示し (Fig. 3)、反応温度は低い温度でも十分であったが、安全のため、40° とした。

1.3 誘導体化反応効率の検討

1.1, 1.2 で検討した条件での、反応回数の検討を行った。すなわち、各標準溶液の適当量 (0.5 ml) をとり、溶媒留去後、反応温度 40°, 反応時間 30 分で誘導体化反応を、1 回から 3 回まで繰り返し行い、それぞれの誘導

Fig. 5. Gas chromatograms of cyprinol sulfate, cholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, lithocholic acid in the samples and authentic sample

Peak a: cholic acid (C. A.); Peak b: chenodeoxycholic acid (C. D.); Peak c: lithocholic acid (L. C.); Peak d: deoxycholic acid (D. C.); Peak e: cyprinol; Peak f: internal standard

A: authentic sample (cyprinol 230 ng, C. A., D. C., C. D., L. C. 125 ng)

B: bile (sample weight 0.0005 ml)

C: muscle (sample weight 2.4 g)

Fig. 6. Mass spectra of cyprinol derivative (HFIP-TFAAester)
A: standard; B: sample (bile)

体生成量を GC ピーク面積で測定した。その結果、cyprinol の GC ピーク面積は反応回数 1 回 (ピーク面積 51071), 2 回 (同 52768), 3 回 (同 50187) で一定値を示し、1 回の反応で十分であった。

2. ガスクロマトグラムの保持時間及びピーク面積強度の再現性

各標準液を用い、3.2 の GC 条件及び 1 の誘導化条件に従って、それぞれ 5 回分析を行い、ガスクロマトグラムの保持時間とピーク面積の再現性を検討した。その結果は、保持時間の再現性を Table 1 に、ピーク面積の再現性を Table 2 にそれぞれ示した。Table 1 及び Table 2 より明らかなようにそれぞれの保持時間の相対標準偏差は 0.3% 以下で良い再現性を示した。また、ピーク面積の再現性の相対標準偏差も 2.5% 以下と良好な結果を得た。

3. 検量線

本実験では、分析精度をよくするために、内部標準物質 (I.S.) の使用を検討した結果、試料中に混入の恐れのないテトラトリアコンタン (C_{34}) の使用が可能であった。したがって、検量線は、cyprinol については、25 ng から 500 ng までを GC に注入し、それぞれのピーク面積と I.S. のピーク面積との比から作成した。また、他の cholic acid 類は 25 ng から 125 ng までについて作成した。その結果、実験を行った範囲では、原点を通る良好な直線性が得られた。Cyprinol についての結果を Fig. 4 に示す。検出限界値は、cyprinol では、5 ng (S/N=3 に相当する量として)、他の cholic acid 類では、ともに 3 ng であった。また、定量下限値は筋肉試料 250 g を使用した場合で 10 ppm であった。

4. 添加回収実験及び分析結果

本法に従って、抽出、アルカリ分解、誘導体化を行い、

コイの筋肉及び胆汁の試料中における cyprinol, C. A., D. C., C. D., L. C. 濃度を測定した。また、筋肉 (10 g), 胆汁 (0.0005 ml) 両試料に各標準液を適当量添加し、添加回収率を求めた。それらの結果を Table 3 及び Table 4 に示した。回収率は、多少のばらつきはあるが、ほぼ良好な結果であった。また、Fig. 5 に試料抽出物及び標準液のガスクロマトグラムを、Fig. 6 に得られた胆汁中シブリノール誘導体のマススペクトルの結果を示した。

文 献

- 1) 武田由比子, 天野立嗣, 内山 充, 松本清司, 降矢 強, 戸部満寿夫, 本田喜善, 中村幸男: 食衛誌. 21, 50~57, (1980).
- 2) 本田喜善, 堀内達一, 串間奉文: 宮崎県衛生研究所報. 21, 12 (1984).
- 3) 須山 隆: 臨床と研究 62, 493~496 (1985).
- 4) 山本良高, 脇坂 治, 藤本昭一, 加世田延寛, 前原忠彦, 麻生和義, 久長修一, 田仲謙次郎: 日本内科学会誌 77, 122~125 (1988).
- 5) 松本 純, 菅野 弘, 丹治伸夫: 同上 77, 102~105 (1988).
- 6) 大和田 章: 同上 75, 129~132 (1986).
- 7) Chen, C. F., Yen, T. S., Hsu, H. C.: J. Formosan Med. Assoc. 75, 149~157 (1976).
- 8) Chan, D. W. S., Teung, C. K., Chan, M. K.: British Medical Journal 897~900 (1985).
- 9) Asakawa, M., Noguchi, T., Hashimoto, K.: J. Food Hyg. Soc. Japan 31, 222~226 (1990).
- 10) Goto, J., Shao, G., Miura, H., Nanbara, T.: Analytical Sciences 5, 19~22 (1989).
- 11) Imai, K.: J. Chromatogr. 120, 181~184 (1976).
- 12) 毛利隆美, 田中義人, 深町和美, 堀川和美, 高橋克巳, 稲田義和, 安元 健: 食衛誌. 33, 133~143 (1992).
- 13) Setchell, K. D. R., Lawson, A. M.: J. Lipid Research. 24, 1,085~1,091 (1983).
- 14) Alme, B., Brenelgaard, A.: *ibid.* 18, 339~362 (1977).