

計畫編號：DOH 89-TD-1084

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度  
科技研究發展計畫

草魚膽汁之毒性學研究(二)

研究報告

執行機構：國立台灣海洋大學食品科學系

計畫主持人：黃登福

研究人員：黃登福、葉彥宏

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

# 目錄

中文摘要	1
英文摘要	3
前言	5
材料與方法	7
結果	15
討論	21
結論與建議	24
參-考文獻	25
圖表	28
附錄	43

## 中文摘要

為知草魚膽汁中之膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽之組成，乃首先從草魚膽汁中純化出  $5\alpha$ -cyprinol sulfate，其過程為將草魚膽汁藉 PHP-LH-20 和 silica gel 兩種管柱層析純化後，取其酒精溶出物，經減壓濃縮除去溶劑後，以氘甲烷做結晶，將此結晶物經紅外光譜儀 (FT-IR)、氫原子 ( $^1\text{H}$ ) 及碳-13 ( $^{13}\text{C}$ ) 核磁共振光譜儀 (NMR) 和質譜儀 (MS) 之化學分析，結果發現  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之分子式為  $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{SO}_8$ ，分子量 532，其在草魚膽汁係以  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 存在。

同時研發高效能液相層析法 (HPLC) 分析膽酸和膽鹽之方法，發現以 ODS 逆向層析管，溶媒系統 0.3 % ammonium carbonate/ acetonitrile (73: 27, v/v) 10min→(68: 32) 10min→(50: 50) 10min，即可將 14 種膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽分離。其中 deoxycholic acid 和 glycodeocholic acid 會在 18 分鐘時同時溶出，但另以溶出條件 buffer 0.3 % ammonium carbonate/ acetonitrile (73: 27, v/v) 即可區分此兩種膽酸成分。經採樣 14 種魚類膽汁，經以 HPLC 方法分析膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽，得知草魚和鯉魚膽汁中之  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之含量為膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽全量之 94 % 以上，而鱒魚、鰻魚和鯖魚等 12 種魚類膽汁中膽酸主要成分為 taurocholic acid 和 taurochenodeoxycholic acid，而香魚膽汁中膽酸主要成分為 cholic acid 和 taurocholic acid。除草魚和鯉魚膽外，其它魚類膽汁中都未檢出  $5\alpha$ -cyprinol sulfate，在陸地脊椎動物方面雞膽主要成份為 glycolithocholic acid 和 taurocholic acid，而鴨膽主要膽汁成份為 taurochenodeoxycholic acid、cholic acid 和 ursodeoxycholic acid。

為知  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之毒性，乃以口胃管餵食老鼠生理食鹽水

(0.6ml)、草魚膽汁 (100 mg/ 0.6ml) 、  $5\alpha$ -cyprinol sulfate (100 mg/ 0.6ml) 、 butanol extract (100 mg/ 0.6ml) 和  $5\alpha$ -cyprinol (100 mg/ 0.6ml) ，6 小時後，發現草魚膽汁、butanol extract、 $5\alpha$ -cyprinol 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 組之老鼠，其血漿中 BUN 和 creatinine 顯著上升 ( $P<0.05$ )，顯示除對照組之外，其他各組老鼠腎功能都受損。但  $5\alpha$ -cyprinol 組之老鼠，氨基酸轉氨酵素 AST 和 ALT 未見變化，顯示  $5\alpha$ -cyprinol 之毒作用器官為腎臟，而草魚膽汁和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之毒作用器官為肝臟和腎臟。

關鍵字：草魚、鯉魚、膽汁、膽酸、膽醇鹽

## 英文摘要 (Abstract)

To elucidate the responsible toxic components in the bile juice of grass carp, the bile alcohol salt from grass carp bile juice was purified and identified. By IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  and MS spectrometry analyses, a compound with molecular formula of  $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{SO}_8$  and molecular weight of 532 was obtained from grass carp bile juice and identified as  $5\alpha$ -cyprinol sulfate.

In the meantime, the determination method for bile acids in fish bile juices was developed. It was found that high performance liquid chromatography (HPLC), with a reversed ODS column and a buffer system of 0.3 % ammonium carbonate/ acetonitrile (73: 27, v/v) 10min→(68: 32) 10min→(50: 50) 10min, clearly separated 14 bile acids. Among them, deoxycholic acid and glycodeoxycholic acid appeared at the same time. These two components were further separated by using other buffer 0.3 % ammonium carbonate/ acetonitrile (73: 27, v/v). Based on the analyses of above HPLC method, 14 samples of bile juices obtained from 14 fish species were determined. It was found that the major component of bile juices was  $5\alpha$ -cyprinol sulfate for grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). The bile juices of rainbow trout (*Bodianus oxycephalus*), rock trout (*Salmo salar*), japanese eel (*Anguilla japonica*), spanish mackerel (*Aixos maru*), right eyed flounder (*Pleuronectes cornutus*), rudder fish (*Girella punctata*), black scraper (*Thamnaconus modestus*), tongue sole (*Paraplagusia bilineata*), japanese jack (*Trachurus japonicus*) and mackerel (*Scomberomorus commerson*) contained mainly taurocholic acid and taurochenodeoxycholic acid, but that of ayu (*Plecoglossus altirelis*) fish contained mainly cholic acid and taurocholic acid. Chicken (*Pectoralis major*) bile juice was mainly composed of glycolithocholic acid and taurocholic acid, but duck (*Anas platyhynchos var. domestica*) bile

juice was mainly inclusive of taurochenodeoxycholic acid, cholic acid and ursodeoxycholic acid.

To compare the toxicity of 5  $\alpha$ -cyprinol sulfate and grass carp bile juice, the rats were separately administered with saline (0.6 ml), grass carp bile juice (100 mg/ 0.6ml), 5  $\alpha$ -cyprinol sulfate (100 mg/ 0.6 ml), butanol extract (100 mg/ 0.6ml) and 5  $\alpha$ -cyprinol (100 mg/ 0.6ml). After 6 hr, the plasma of rats were examined. The value of BUN and creatinine in the plasma of rats treated with grass carp bile juice, 5  $\alpha$ -cyprinol sulfate, butanol extract and 5  $\alpha$ -cyprinol were significantly higher than that of saline group. The function of liver was also affected by raw bile juice and 5  $\alpha$ -cyprinol sulfate, but not by 5  $\alpha$ -cyprinol.

Key words : grass carp, common carp, bile juice, bile acids, bile alcohol.

## 前言

我國民間有人相信吞食動物膽汁如草魚、鯉魚、蛇和雞膽汁等皆具有名目、清熱等療效。但在台灣[3]、泰國[21]、香港[2]、韓國[22]和日本[21]曾報告因生吞草魚或鯉魚膽汁而發生急性中毒之案例，其主要症狀為急性腎衰竭症，以及其他如肝腸胃道及中樞神經系統等障害。最近台灣亦發生多起因長期食用蛇膽而引起黃疸和腎衰竭症狀，顯示攝食不同動物膽汁，似乎都會引起肝、腎之病變。

有關動物膽汁之毒性，多位學者[4-6, 20]曾指出，草魚膽汁對大鼠會引起溶血、腸胃疾病和腎病變等症狀。部分學者[20, 25]曾針對草魚膽汁毒性化合物的性質加以研究，僅發現草魚膽汁毒性化合物可以溶於乙醇中，耐熱，pH 4-12 具穩定性。Chen et al. [7, 8]以乙醇粗抽出物，了解草魚膽粗毒抽出物會引起尿中大量排出水分和鹽分，亦發現膽酸鹽 (sodium cholate) 會使大鼠引起溶血症。其後，Chen 和 Kuo[9]亦指出，膽鹽化合物 sodium cholate，sodium deoxycholate 和 sodium chenodeoxycholate 會造成老鼠生理電解質不平衡以及溶血現象。本研究室亦發現草魚膽汁之毒性遠大於蛇膽和雞膽，草魚膽會引起大鼠肝、腎功能下降，甚至死亡，而蛇膽和雞膽對大鼠而言，少量攝食不會引起毒性，但是長期吞食，仍會有毒，但毒性較草魚膽汁為弱[16]。

由於草魚和鯉魚膽汁致毒發病快，病情顯惡，嚴重致死，引起國內外研究者之興趣。而蛇膽則須長期服用，才有致病的可能性。這些因動物不同，其膽汁所引起之中毒症亦有所不同，而一般脊椎動物之膽汁中，其成份主要含有膽鹽[25]，而草魚、鯉魚之膽汁中則含有高量的膽醇 5 $\alpha$ -cyprinol [14, 15]，因此膽鹽和膽醇被懷疑可能是膽汁之致毒成份。Chen 和 Kuo [9]曾指出膽鹽之急性中毒症狀為血液電解質不平衡及血壓下降；本研究室[19]則探討了膽鹽之累積毒性，顯示大鼠長期攝食膽鹽會引起肝臟和腎臟之累積毒性，其中以肝功能異常最先出現，接下來才是腎衰竭，這些

膽鹽之毒作用均與長期攝食動物膽汁所引起之毒性者相似。但長期服用蛇膽所引起之黃疸和腎衰竭，是否即為膽鹽所致，仍有待進一步之探討。因此有關草魚膽和其他動物膽汁之毒性化合物的毒性作用，中毒機制及化學結構，目前仍未完全了解，因此乃進行本研究。本研究第一年度即自草魚膽汁中純化膽醇成份，並加以定性、定量，進而以小白鼠建立草魚膽汁和膽醇之致死曲線，其次開發分析動物（草魚、鯉魚、蛇和雞等）膽汁之膽醇和膽酸組成份之高效能液態層析分析法，並檢測這些組成份在各種不同動物膽汁中之含量。另以膽醇和膽酸之純品做動物之急性和慢性毒性試驗，並與草魚膽汁原液之動物毒性試驗結果做了比較分析，了解草魚膽原液之毒作用較膽醇更毒。本年度擬自草魚膽汁中純化膽醇鹽成份，並加以定性、定量，並繼續建立動物膽汁中膽醇鹽和膽酸組成份，並大製備膽醇和膽醇鹽，重新做毒理性試驗，以了解草魚膽汁原液之毒作用是否由膽醇鹽所致，並比較草魚膽汁、粗抽出液、膽醇和膽醇鹽之毒性差異性。

## 材料與方法

### (一) 材料

1. 自市場取得海水魚類和淡水魚類膽囊如：草魚 grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)，鯉魚 common carp (*Cyprinus carpio*)，黑點龍 rainbow trout (*Bodiamus oxycephalus*)，鮭魚 rock trout (*Salmo salar*)，日本鰻 Japanese eel (*Anguilla japonica*)，花鰹 spanish mackerel (*Aixos maru*)，比目魚 right eyed flounder (*Pleuronectes cornutus*)，黑毛 rudder fish (*Girella punctata*)，黑達仔 black scraper (*Thamnaconus modestus*)，狗舌 tongue sole (*Paraplagusia bilineata*)，真鰹 Japanese jack mackerel (*Trachurus japonicus*)，土托 mackerel (*Scomberomorus commerson*)，豆魚 mullet (*Liza macrolepis*)，香魚 ayu fish (*Plecoglossus altirelis*)，陸地脊椎動物：雞 chicken (*Pectoralis major*) 和 鴨 duck (*Anas platyhynchos var. domestica*)，以低溫方式帶回實驗室，用針扎破膽囊取膽汁，在  $-18^{\circ}\text{C}$  下儲存備用，草魚膽汁中之固形物含量為 16.24 %。
2. Sephadex LH-20 購自 Amersham Pharmacia Biotech 公司 (Sweden)。
3. Silica gel、RP-18 ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $25 \times 0.3\ \text{cm i.d.}$ ) methanol-d4 購自 Merck 公司 (Germany)。
4. 各種膽酸及其膽酸鹽 cholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid, lithocholic acid, glycocholic acid, glycodeoxycholic acid, glycolithocholic acid, glycochenodeoxy acid, taurocholic acid, tauroolithocholic acid, taurodeoxycholic acid 和 taurochenodeoxycholic acid 等十三種標準品，均採購自 Sigma 公司 (U.S.A)。另  $5\ \alpha$ -cyprinol 和  $5\ \alpha$ -cyprinol sulfate 係由草魚膽汁依下列純化方法所生產。

## (二) 方法

### 1. $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之精製方法

取草魚膽汁之凍乾粉末 5 g，以 80 % 乙醇 100 ml 經三次抽出後，抽出液混合濃縮，再以二氯甲烷 100 ml 脫脂三次，脫脂後的草魚膽汁毒性化合物經濃縮乾固，殘留物再以  $H_2O$ /butanol (1: 1, v/v) 溶液 100 ml 連續抽出三次，取 butanol 抽出液，以真空濃縮機抽乾溶劑。

#### (1) PHP-LH-20 管柱層析

將草魚膽汁所得之 butanol extract，以少量 90 % 乙醇溶液溶解之後，將其置於 PHP-LH-20 管柱 (20× 2cm) 內，以各 300 ml 的 50 % 和 90 % 乙醇溶液沖洗之，收集 300 ml 的 90 % 乙醇沖洗溶液，以真空濃縮機抽乾溶劑 [21]。

#### (2) Silica gel 管柱層析

取 silica gel 15 g 懸浮在苯中，置於直徑 (20× 2cm) 的管柱內。取 PHP-LH-20 管柱層析之 90 % 乙醇溶出的草魚膽汁毒性化合物沖洗物將其溶在苯中，而後置於 silica gel 管柱中，連續以七種溶劑：苯、苯及乙酸乙酯的混合溶液 (1: 1, v/v)、乙酸乙酯、乙酸乙酯與丙酮的混合溶液 (1: 1, v/v)、丙酮、丙酮與乙醇的混合溶液 (1: 1, v/v) 和乙醇，各 20 ml 沖洗之，分別收集以減壓濃縮機去除溶劑，類似  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之毒性化合物則在乙醇溶液中溶出。

### (3) 草魚膽汁類似 5 $\alpha$ -cyprinol sulfate 毒性化合物之結晶

取出已由 PHP-LH-20 及 silica gel 管柱層析後之 5  $\alpha$ -cyprinol sulfate 類似物置於三角椎瓶內，加入適當之氘甲烷溶液，並將此溶液加熱至 80 °C，如無法完全溶解，再加入適量之氘甲烷，使其形成過飽合溶液，降溫靜置此溶液使結晶析出。

## 2. 草魚膽汁類似 5 $\alpha$ -cyprinol sulfate 毒性化合物之結構測定

(a) IR: 取約 5mg 草魚膽汁 5  $\alpha$ -cyprinol sulfate 類似物之結晶物，與已在 110 °C 高溫乾燥過之溴化鉀共研磨，待其完全混合均勻，壓錠供 IR spectrometer (Bio-Rad FTS 155/165 Win-IR, USA) 測定，以測定其官能基在波數 4000 $\text{cm}^{-1}$  到 300 $\text{cm}^{-1}$  之吸收光譜。

(b)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 取純化之草魚膽汁 5  $\alpha$ -cyprinol sulfate 類似物晶體 30mg，以 methanol -d<sub>4</sub> 溶解，以 NMR spectrometer (Bruker AM-300WB FT-NMR, Germany) 測定。以測定質子數和碳數，及測定碳氫結合之位置。

(c) GC-MS: 取一顆草魚膽汁 5  $\alpha$ -cyprinol sulfate 類似物之結晶物，直接以 GC-MS (Finnigan Mat TSQ-46c GC/MS/MS/DS, USA) 測定之，以測定其分子量。

## 3. 以 HPLC 方法分析膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽

取各種動物之膽汁 0.5-1 ml 加以凍乾，以 80 % 乙醇 10ml 經三次抽出後，抽出液混合濃縮，再以二氯甲烷 10 ml 脫脂二次，脫脂後經濃縮乾固，以 90 % 乙醇 5ml 溶解之後，將其置於 PHP-LH-20 管柱 (5x 2 cm) 內，分別以 (1) 0.1 M acetic acid 之 90 % 乙醇溶液。(2) 0.2 M formic acid 之 90 % 乙醇

溶液。(3) 0.3 M acetic acid-potassium acetate 之 90 % 乙醇溶液。溶出：(1) 膽酸和膽醇硫酸鹽，(2) 甘胺酸膽酸鹽，(3) 牛磺胺酸膽酸鹽等成分。其溶出成分用逆向相層析管 (ODS column, 25x 0.3cm) 以高壓液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析，流速為 0.8ml/ min，流出液為 0.3 % ammonium carbonate/ acetonitrile (73: 27, v/v) 10min→(68: 32) 10min→(50: 50) 10min，測定波長為 UV 210 nm，即可分析 14 種膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽。另外，其中的 deoxycholic acid 和 glycodeocholic acid 會在 18 分鐘時同時溶出，另以溶出條件 buffer 0.3 % ammonium carbonate/ acetonitrile (73: 27, v/v) 則可將其二化合物分離檢測[10,11,13,23]。並且建立膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽之標準檢量線 (2.5-30  $\mu$ g)。另以雞膽汁和香魚膽汁 0.5 ml 添加各種膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽，經乙醇抽出後以 PHP-LH-20 純化膽酸、甘胺酸膽酸鹽和牛磺胺酸膽酸鹽成分後，以 HPLC 方法測其回收率。

4. 實驗用動物老鼠分別飼養於不銹鋼籠中，動物室內溫度維持在  $24 \pm 1$  °C，50-60 % 相對溼度，以自動定時器控制光照週：0700-1900 為光照期 (light peroid)，1900-0700 為黑暗期 (dark peroid)，保持 12 小時的日夜照明循環。飼料與飲水 (蒸餾水) 採自由攝取方式，每天給予新鮮飼料 (PMI feeds, USA)。實驗前一天，開始禁食，禁食期間仍照常飲水，並加裝代謝籠，取得尿液。隔天稱重後，以乙醚麻醉，使用口胃管直接投予老鼠，草魚膽汁、草魚膽汁之 butanol extract (簡稱 butanol extract)、 $5\alpha$ -cyprinol 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 以及生理食鹽水，經過 6 小時，麻醉解剖，由腹大動脈抽血。

## 5. 急性毒之實驗設計

30 rats

├— 6 rats/ group



分別以口胃管餵予以下之物質



Dose of bile juice or bile salts (mg in 0.6 ml saline)				
Saline	Grass carp powder	BuOH extract	5 $\alpha$ -Cyprinol	5 $\alpha$ -Cyprinol sulfate
	100	100	100	100

├— 6 小時後



犧牲老鼠



取血液和尿液



生化指標分析

## 6. 血液樣品之前處理

抽出之血液分別放入試管 a (含少量 heparin) 和試管 b (不含任何物質)。試管 a 立即緩慢搖勻後，以血球分析儀 (Cell Hematology Analyzer, DYN 500, Sequoia-turner, U.S.A.) 測定 red blood cell (RBC)、hemoglobin (Hgb)、white blood cell (WBC) 和 hematocrit (Hct)。試管 b 立即以離心機於 3000 x g 下離心 10 分鐘，離心後取上層液，即血漿，做以下分析。

## 7. 血漿之分析

### (1) AST (aspartate transaminase) 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 AST 的活性。原理是利用 2-oxaloacetate 與 l-aspartate 在 AST 的催化下，會形成 glutamate 和 oxaloacetate，而 oxaloacetate 與  $\text{NADH}+\text{H}^+$  在 malate dehydrogenase (MDH) 之氧化作用下形成 malate 和  $\text{NAD}^+$ 。 $\text{NADH}$  在 340nm 有較高的吸光值，經酵素變成  $\text{NAD}^+$  後吸光值降低，在 340nm 波長下測定吸光值降低速度即可算出 AST 的活性。

### (1) ALT (alanine transaminase) 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 ALT 的活性。原理是利用 l-alanine 與  $\alpha$ -keto-glutarate 在 ALT 的催化下，會形成 glutamate 和 pyruvate，而 pyruvate 與  $\text{NADH}+\text{H}^+$  在 lactate dehydrogenase (LDH) 之氧化作用下形成 lactate 和  $\text{NAD}^+$ 。 $\text{NADH}$  在 340 nm 有較高的吸光值，經酵素變成  $\text{NAD}^+$  後吸光值降低，在 340 nm 波長下測定吸光值降低速度即可算出 ALT 的活性。

## (2) BUN (blood urea nitrogen) 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 BUN 的活性。原理是利用 urea 和  $H_2O$  在 urease 作用下，會形成  $NH_4^+$  和  $CO_2$ ，而  $NH_4^+$  與 2-oxaloacetate、 $NADH+H^+$  在 glutamate dehydrogenase 催化下形成 l-glutamate 和  $NAD^+ + H_2O$ 。在 340nm 波長下測  $NADH+H^+$  之吸光值衰變程度，即可換算出 BUN 之含量。

## (4) Creatinine 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 creatine 的含量。原理是利用 creatine 和 picric acid 在鹼性環境下，會形成橘黃色之 creatine-picric acid 之錯化合物，此物質在 510 nm 下有特定之吸光。

## (5) ALP (alkaline phosphatase) 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 alkaline phosphatase 的活性。原理是利用 4-nitrophenyl phosphate 和  $H_2O$  在 alkaline phosphatase 作用下水解成 4-nitrophenol 和 phosphate，4-nitrophenol 在 405 nm 下有特定之吸光。

## 8. 尿液之分析

### (1) Urea N (urea nitrogen)

將尿液稀釋 10 倍後，取定量，再依血漿中 BUN 測定方法檢測。

### (2) Creatinine

將尿液稀釋 10 倍後，取定量，再依血漿中 creatinine 測定方法檢測。

## 9. 統計分析:

實驗數據以變異數分析 (analysis of variance procedure) 測試各實驗組間是否有差異，若有差異再以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's new multiple range test) 做進一步分析[24]。

## 結果

### 1. 草魚膽汁中類似 $5\alpha$ -cyprinol sulfate 毒性化合物之構造鑑定

經由 PHP-LH-20 和 silica gel 兩種管柱層析純化後再結晶之  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 類似物，以紅外光譜儀 (FT-IR) 測定之光譜結果如 Fig. 1 所示。由光譜圖可知在波數  $3400-3700\text{ cm}^{-1}$  有羥基吸收，於波數  $2930\text{ cm}^{-1}$  有 C-H stretch 吸收峰的位置，波數  $1060$ 、 $1040$ 、 $1020$ 、 $980$  和  $890\text{ cm}^{-1}$  有五支吸收峰，此區域波峰則提供了此物質具有 allocholic acid nucleus 的特性。但波數  $1700\text{ cm}^{-1}$  並沒有 C=O 基之吸收，表示游離態草魚膽汁之毒性化合物為膽醇而非膽酸，另外在波數  $1210$ 、 $840\text{ cm}^{-1}$  具有硫酸根之吸收，此結果與 Mohri et al. [21] 者相同。

草魚膽汁純化所得之結晶體，經溶於 99.8 % methanol-d<sub>4</sub>，在 300 MHz 下所測得之氫原子核磁共振光譜如 Fig. 2 所示。可知在化學位移 0.0-2.5 ppm 為所有烷基碳上氫原子之吸收位置，將此區積分線值換算，可知草魚膽汁類似  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之毒性化合物不含羥基碳上之氫原子總數為三十六，其中於化學位移 0.70 ppm 及 0.79 ppm 之呈 singlet 狀的 a 與 b 二吸收峰，是三級碳所接甲烷基氫原子之吸收峰，各擁有三個氫原子，因此它應該是第十八個碳及第十九個碳之氫原子吸引。另 c 吸收峰位於 0.98 ppm，依據積分線換算顯示此吸收峰含有三個氫原子，此現象為 a、b 兩吸收峰相同，顯示其為甲烷基氫原子之吸收峰，因 c 為 double 之吸收峰，根據 spin-spin splitting (m+1) 規則，可推知 c 應為二級碳所接甲烷基氫原子吸收峰。其次，3.3-4.0 ppm 為晶體中含羥基碳上之氫原子之吸收，將此區積分線值換算，可知氫原子總數為七，吸收峰 d 是溶劑甲醇碳上三個氫原子的吸收。在 3.54 ppm 之吸收峰 e，呈現 doublet 狀，表示和此含羥基碳相接的碳是三級碳，將 e 吸收峰之積分線值換算成氫原子數目，顯示 e 吸收峰共含有四個氫原

子。位於 3.77 ppm 之 singlet 狀吸收峰 f，由積分值換算後，顯示 f 只含有一個氫原子，所以 f 為含二級羥基碳上之氫原子之吸收峰。吸收峰 g 及 h 分別為 3.92 ppm 及 3.96 ppm，為 singlet 狀吸引峰，積分值顯示 g、h 二吸引峰各含有一個氫原子，因此 g、h 亦為含二級羥基碳上之氫原子之吸引。而 4.87 ppm 為溶劑之吸收。

綜合氫原子核磁共振光譜儀 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 測定草魚膽汁之膽醇鹽成份，可知所純化出之晶體，共含有三個甲烷基以及五個羥基，甲烷基分別是兩個接在三級碳上之甲烷基；羥基則包含三個二級羥基以及兩個一級羥基。所有含羥基之碳上氫原子種數為七，不含羥基之碳上氫原子種數為三十六，所以此晶體一共含有四十八個氫原子。

草魚膽汁中類似膽醇之毒性化合物結晶體，經以碳-13 核磁共振光譜儀 ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) 測定，得知其碳-13 核磁共振光譜如 Fig. 3 所示。其中化學位移 48.2 ppm 前之碳-13 吸收為此毒性化合物上不含羥基碳之吸收，48.5-50.0 ppm 是溶劑甲醇碳原子之吸收，63.0-74.0 ppm 之五支吸收峰，則代表草魚膽汁膽醇鹽化合物上含有羥基碳之吸收。將此圖之各碳原子吸收之化學位移 (chemical shift) 與 Asakawa et al. [1] 所發表之  $5\alpha$ -cyprinol 的  $^{13}\text{C-NMR}$  數據相對照，結果如 Table 1 所示。顯示兩者結果相似，因此推論所得之結晶物應為含二十七個碳原子之物質。

另外，草魚膽汁中之膽醇化合物結晶體，其質譜儀 (MS) 如 Fig. 4 所示，顯示其離子親體為 532 ( $m/z$ )。因此綜合 MS、NMR 和 IR 等光譜之化學鑑定其分子式為  $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{SO}_8$ ，含有四個 OH 基及一個硫酸根之膽醇鹽，其結構類似膽固醇之  $5\alpha$ -cyprinol sulfate。

## 2. 以 HPLC 方法分析膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽

分析膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽之條件，係以自 Sigma 公司購買之 cholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid, lithocholic acid, glycocholic acid, glycolithocholic acid, glycochenodeoxy acid, taurocholic acid, taurocholic acid, taurodeoxycholic acid 和 taurochenodeoxycholic acid 等十三種膽酸和膽酸鹽純品，另外膽醇硫酸鹽純品由上述的方法純化，以 HPLC 配合 UV detector 的分析方法。首先膽汁酸本身除了-COOH 所致 200nm 附近的吸收以外，紫外光部分無強力吸收，經檢測膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽在 UV 波長之吸光 (Fig. 5)，發現 UV 190 nm 感度最佳，唯其干擾度也最大，因此為降低干擾程度，膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽之檢測，似乎以波長 210 nm 為最適當。因此本研究乃以 UV 210 nm 為檢出波長。另以 HPLC 分析膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽之過程中，經以 Hypersil phenyl column (25 x 0.3 cm) 和 Merck ODS column (25 x 0.3 cm) 分析，得知以 ODS column 分析所得之結果較佳，因此本研究仍以 ODS column 為分析管柱。其次，探討溶媒對膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽之溶出，發現 buffer 以 0.3 % ammonium carbonate/ acetonitrile (73: 27, v/v) 10min→(68: 32) 10min→(50: 50) 10min，即可將 14 種膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽分離。但其中 deoxycholic acid 和 glycodeoxycholic acid 會在 18 分鐘時同時溶出，另以溶出條件 buffer 0.3 % ammonium carbonate/ acetonitrile (73: 27, v/v) 則可區分此兩種膽酸成分，如 Figs. 6-7 所示。14 種膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽 (2.5-32  $\mu$ g) 經以上述 HPLC 分析條件測定，得知其各別檢量線如 Table 2: ursodeoxycholic acid,  $Y = 0.08535X + 0.04948$  ( $r = 0.99594$ ) ; cholic acid,  $Y = 0.08752X - 0.03372$  ( $r = 0.99450$ ) ; chenodeoxycholic acid,  $Y = 0.11113X - 0.43268$  ( $r = 0.99848$ ) ; deoxycholic acid,  $Y = 0.08681X + 0.08770$  ( $r = 0.99554$ ) ; lithocholic acid,  $Y = 0.09952X - 0.20032$  ( $r = 0.99547$ ) ; glycocholic acid,  $Y =$

$1.17443X - 1.15603$  ( $r = 0.99367$ ) ; glycochenodeoxycholic acid,  $Y = 0.78870X - 0.73754$  ( $r = 0.99319$ ) ; glycodeoxycholic acid,  $Y = 1.02115X - 0.87664$  ( $r = 0.99434$ ) ; glycolithocholic acid,  $Y = 1.15806X - 0.5152$  ( $r = 0.99471$ ) ; taurocholic acid,  $Y = 0.62856X - 0.7696$  ( $r = 0.99560$ ) ; taurochenodeoxycholic acid,  $Y = 0.59444X - 0.84724$  ( $r = 0.99509$ ) ; taurodeoxycholic acid,  $Y = 0.76263X - 1.01000$  ( $r = 0.99451$ ) ; tauroolithocholic acid,  $Y = 0.64853X - 0.53172$  ( $r = 0.99250$ ) ; cyprinol sulfate,  $Y = 39.1271X - 0.26439$  ( $r = 0.99920$ ) [(Y)=波峰面積, (X)=膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽的量, (r)=相關係數], 顯示各種膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽以 HPLC 分析, 其量與 UV 吸收度均呈直線關係, 相關係數均為 0.99 以上。

利用上述 HPLC 檢測膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽成分, 若以干擾波峰之參倍量做為檢出界限, 則各別為 cholic acid 24.0  $\mu$ g, deoxycholic acid 23.0  $\mu$ g, chenodeoxycholic acid 23.0  $\mu$ g, ursodeoxycholic acid 24.0  $\mu$ g, lithocholic acid 23.0  $\mu$ g, glycocholic acid 3.0  $\mu$ g, glycolithocholic acid 2.5  $\mu$ g, glycochenodeoxy acid 4.0  $\mu$ g, glycodeoxycholic acid 3.0  $\mu$ g, taurocholic acid 4.5  $\mu$ g, tauroolithocholic acid 4.0  $\mu$ g, taurodeoxycholic acid 4.0  $\mu$ g, taurochenodeoxycholic acid 5.5  $\mu$ g。另以雞膽汁和香魚膽汁添加各種膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽, 經乙醇抽出後以 PHP-LH-20 純化膽酸、甘胺酸膽酸鹽和牛磺胺酸膽酸鹽成分後, 以 HPLC 方法測其回收率得知各種膽酸和膽酸鹽平均回收率各為 cholic acid 95.0 %, deoxycholic acid 98.0 %, chenodeoxycholic acid 91.0 %, ursodeoxycholic acid 98.0 %, lithocholic acid 83.5 %, glycocholic acid 94.0 %, glycolithocholic acid 85.5 %, glycochenodeoxy acid 94.0 %, glycodeoxycholic acid 90.0 %, taurocholic acid 96.0 %, tauroolithocholic acid 97.5 %, taurodeoxycholic acid 84.5 %, taurochenodeoxycholic acid 89.0 %, cyprinol sulfate 95.0 % (Table 3)。

數種海水魚類、淡水魚類膽汁中之膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽經以上述 HPLC 方法測定 (Fig. 8)，得知魚類膽汁中之膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽含量如表四、五所示，顯示草魚膽汁之主要成分為膽醇硫酸鹽  $5\alpha$ -cyprinol sulfate，其含量佔膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽全成分之 94.6%。而鯉魚膽汁之主要成分仍為  $5\alpha$ -cyprinol sulfate，其含量佔膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽含量之 94.5% (Table 4)。而其它魚類主要膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽含量如 Table 5 所示，顯示除香魚 (ayu fish) 外，其它魚類之膽汁成分主要為 taurocholic acid 和 taurochenodeoxycholic acid，而香魚主要成分為 cholic acid 和 taurocholic acid 各佔 63.4% 和 36.6%，這些魚類之膽汁中，皆未含有  $5\alpha$ -cyprinol sulfate。

在陸地脊椎動物方面雞膽汁含有的成份有 cholic acid (1.2%), chenodeoxycholic acid (3.1%), lithocholic acid (6.1%), taurocholic acid (23.9%), tauroolithocholic acid (3.2%), glycolithocholic acid (62.5%)，主要以 glycolithocholic acid 和 taurocholic acid 為主；而鴨膽汁成份有 cholic acid (17.5%), chenodeoxycholic acid (9.7%), ursodeoxycholic acid (15.5%), deoxycholic acid (8.4%), lithocholic acid (9.0%), taurocholic acid (2.4%), taurochenodeoxycholic acid (37.9%)，主要以 taurochenodeoxycholic acid、cholic acid 和 ursodeoxycholic acid 為主 (Table 6)。

### 3. 草魚膽汁中 $5\alpha$ -cyprinol sulfate 對老鼠之毒性

為知草魚膽汁中  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之毒性，乃分別口胃管餵食老鼠草魚膽汁、butanol extract、 $5\alpha$ -cyprinol 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 各 100 mg，經 6 小時後，犧牲老鼠測定其血液中之生化指標，對老鼠影響情形如 Table 7 所示。餵食 0.6 ml 草魚膽汁、butanol extract 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 之老鼠，

其血液中 RBC 和 Hct 的值均高於控制組者和  $5\alpha$ -cyprinol ( $P<0.05$ )，在 Hgb 的值方面  $5\alpha$ -cyprinol 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 比草魚膽汁和 butanol extract 有下降的情形，但 WBC 方面，各組則無明顯變化。

其次，草魚膽汁、butanol extract、 $5\alpha$ -cyprinol 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 組老鼠之血漿中，其 BUN 和 creatinine 的值均明顯高於控制組者 ( $P<0.05$ )。

另外，血漿中 AST 和 ALT 之活性方面，除草魚膽汁、butanol extract 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 組者與控制組者有明顯差異 ( $P<0.05$ )外， $5\alpha$ -Cyprinol 組者與控制組者無明顯差異，而 ALP 之活性方面，草魚膽汁、butanol extract、 $5\alpha$ -cyprinol 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 與控制組者有明顯差異 ( $P<0.05$ )。

## 討論

自古以來中國人生病或進補時，即喜好偏方。中國閩南地區及台灣則有食用草魚膽汁以求明目、止咳的偏方存在，但食用草魚膽卻有腎衰竭之食物中毒事件發生。至於是草魚膽汁中何種物質所導致，引起我們的興趣。因此我們從草魚膽汁中純化  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 後，再分別探討不同魚種膽汁中膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽之含量，進而進行  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 對老鼠生理之影響。

動物膽汁中膽酸鹽主要成分，一般為 sodium cholate、sodium chenodeoxycholate、sodium lithocholate 和 sodium deoxycholate，其中 sodium cholate 和 sodium chenodeoxycholate 為一級膽鹽，以人類膽汁而言，兩者共佔膽酸鹽重量之 80%，其中以 sodium cholate 含量最多。本研究以 HPLC 方法測定十幾種海水魚類、淡水魚類和陸地脊椎類動物之膽汁，其膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽之含量，發現草魚和鯉魚的膽汁主要成分  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 各佔 90% 以上，而  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 在草魚和鯉魚的膽汁中各含有 64.5 mg/g 和 123.8 mg/g，其他膽酸的所佔的比例相當的少(小於 6% 以下)，此結果與 Mohri et al. [21] 的結果相同，所以  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 被推測是引起鯉魚膽中毒的主要原因[1, 21]。另外在吞食草魚膽所引起中毒的現象，推測也是  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 所產生的。而其它魚類除香魚外，其膽汁成分主要為 taurocholic acid 和 taurochenodeoxycholic acid，而香魚者主要為 cholic acid 和 taurocholic acid。在陸地脊椎動物方面雞膽主要膽汁成份為 glycolithocholic acid 和 taurocholic acid，而鴨膽主要膽汁成份為 taurochenodeoxycholic acid、cholic acid 和 ursodeoxycholic acid。顯示魚類膽汁中主要成分與陸上動物者所有不同。鴨膽汁和雞膽汁並沒有膽醇存在，因此推測中毒的原因可能係膽酸和膽酸鹽為毒作用物質所致。我們將在

一章中，繼續探討草魚膽汁、草魚膽汁之 butanol extract、膽醇和膽醇硫酸鹽以口餵管餵食老鼠之毒作用差異性。另外吞食草魚膽囊，相傳具有明目之功能，是否真有此療效，是值得日後研究的課題。

在臨床生化檢驗中，以血漿之 AST、ALT 和 ALP 的活性，可作為肝功能試驗的指標，而腎功能方面的指標，則以檢測血漿或尿液之 BUN 和 creatinine 為主。因此本報告主要以此五項指標來探討老鼠之肝和腎的功能。

由以上實驗的結果，可得知下之結論：即老鼠灌食 0.6 ml 草魚膽汁、butanol extract 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 和 6 小時後，會引起明顯的肝功能下降和腎功能衰竭，此結果與 Chen et al. [3-5]、Chan et al. [2]、Park et al. [22] 和野口等人 (1991) 的臨床醫學報告相符合，顯示老鼠吞食草魚膽汁亦會引起與人類相同之症狀。吞食草魚膽引起腎功能衰竭之真正機制，依學者推測，膽鹽會誘導 acid hydrolase 從 lysosome 中釋放出大量 hemoglobin 和  $K^+$ ，其中 hemoglobin 會堆積在腎小管中，使腎功能下降。而推測  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 可能也會產生此影響。

至於草魚膽汁、butanol extract 和  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 其血液 RBC、Hct 和 Hgb 皆有明顯上升，其原因至今仍無法完全明瞭，可能與溶血現象有關 [7]，唯仍須進一步探討。

另外，Chen et al. [3] 將家鼠以口胃管方式灌食豬膽汁，發現不會引起中毒現象。另外，Chen et al. [8, 9] 將大母花鼠以靜脈注射方式，打入鯉魚、大頭鱧、虱目魚和吳郭魚之膽汁萃取物，發現皆會引起中毒現象，只是虱目魚和吳郭魚較弱些。因此由上述結果推測，陸生動物膽汁 (如蛇膽汁、雞膽汁和豬膽汁) 之毒性，可能遠低於水生動物膽汁 (如草魚膽汁、鯉魚膽汁、大頭鱧膽汁、虱目魚膽汁和吳郭魚膽汁) 之毒性，推測此兩類動物膽汁成份可能不相同。

本研究室 [15]指出定期的服用草魚膽汁，會嚴重地影響肝、腎功能。然而吞食蛇膽汁和雞膽汁雖無肝、腎腫大現象，但仍可看出定期地服用低毒性的蛇膽汁和雞膽汁，亦會影響肝、腎功能。此現象有助於進一步了解，目前國內低量但定期服用蛇膽汁之消費者的安全問題。

由以上結果，我們得知草魚膽汁之毒性遠大於蛇膽汁和雞膽汁，且知草魚膽汁之毒作用器官包括肝臟和腎臟，顯示草魚膽汁之致毒成份不只膽鹽一種，以 HPLC 方法分析草魚膽汁顯示其主要成分為膽醇硫酸鹽  $5\alpha$ -cyprinol sulfate，其含量佔膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽全成分之 94.6%，故推測  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 才是草魚膽汁主要毒成份。然而蛇膽汁和雞膽汁所引起的毒性卻不如草魚膽汁所引起的來的嚴重，而蛇膽汁和雞膽汁之毒作用，首先出現在肝臟功能之變化上，但若長期攝食時，亦會引起腎功能之衰竭現象。以 HPLC 方法分析鴨膽汁和雞膽汁顯示其主要成分為膽酸和膽酸鹽所組成，並沒有膽醇成分，因此推測鴨膽汁和雞膽汁之毒性可能係膽酸和膽酸鹽之毒作用所致。

## 結論與建議

1. 以 HPLC 方法配合 ODS column 可將 14 種不同膽酸、膽酸鹽和膽醇硫酸鹽成分分離。
2. 以 HPLC 方法分析 14 種海水魚類、淡水魚類膽汁之膽鹽成分，得知 tauro-conjugated 的膽鹽成分較多，另外草魚和鯉魚膽汁中之主成分為  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 分別佔 94.5 % 和 94.5 %。
3. 在陸地脊椎動物方面雞膽汁以 glycolithocholic acid 和 taurocholic acid 為主，而鴨膽以 taurochenodeoxycholic acid、cholic acid 和 ursodeoxycholic acid 為主。
4. 草魚膽汁中  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 的毒性大於  $5\alpha$ -cyprinol。
5. 推測  $5\alpha$ -cyprinol sulfate 為草魚膽汁之主要毒組成，含引起急性腎衰竭、黃膽及肝腫大。

## 參考文獻

1. Asakawa, M., Noguchi, T. and Hashimoto, K. 1990. Isolation of a toxin from carp (*Cyprinus carpio*) bile. J. Food Hyg. Soc. 31, 222-226.
2. Chan, D. W. S., Yeung, C. K. and Chan, M. K. 1985. Acute renal failure after eating raw fish gallbladder. Bri. Med. J. 290, 897.
3. Chen, W. Y., Yen, T. S., Cheng, J. T., Huang, P. C., Hsu, H. C. and Lin, M. R. 1976. Experimental study on acute renal damage by bile of grass carp. J. Formosan Med. Assoc. 75, 566.
4. Chen, C. F., Fang, H. S., Huang, P. C., Lin, C. P., Chen, W. Y. and Yen, T. S. 1979. Influence of renal excretion by the toxic Substance from grass carp bile. J. Formosan Med. Assoc. 78, 909.
5. Chen, C. F., Chen, W. Y. and Yen, T. S. 1983. The effect of raw grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) bile on renal function in the conscious rat. J. Formosan Med Assoc. 82, 1203-1209.
6. Chen, C.F. 1984. The effect on gastrointestinal motility after ingestion of raw bile of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in the conscious rats. Proc. Natl. Sci. Counc. ROC (B) 8, 78-82.
7. Chen, C. F., Yen, T. S., Chen, W. Y., Chapman, B. J. and Munday, K. A. 1984. The renal, cardiovascular and hemolytic actions in the rat of a toxic extract from the bile of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Toxicon 22, 433-439.
8. Chen, C. F., Lin, M. C. and Liu, H. M. 1990. Plasma electrolyte changes after ingestion of bile extract of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in rats. Toxicol. Lett. 50, 221-228.
9. Chen, C. F. and Kuo, C. H. 1992. Toxic effect of bile acid ingestion in rats. J. Formosan Med Assoc. 91, 743-746.

10. Goto, J., Kato, H., Sarata, Y. and Nambara T. 1980. Separation and determination of bile acids in human bile by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromat.* 3, 991-1003.
11. Goto, J., Hasegawa, M., Kato, H. and Nambara, T. 1978. A new method for simultaneous determination of bile acids in human bile without hydrolysis. *Chin. Chem. Acta.* 87, 141-147.
12. Hasegawa, S., Uenoyama, R., Takeda, F., Chuma, J., Suzuki, K., Kamiyama, F., Yamazaki, K. and Baba, S. 1984. A fully automatic method for analysis of individual bile acids in the serum using high-performance liquid chromatography for clinical use. *J. Liq. Chromat.* 7, 2267- 2287.
13. Hoshida, T. 1962. Stero-bile acids and bile sterols. XLVI. Isolation of a new bile sterol, 3a, 7a, 12a-trihydroxy-26, 27-epoxycholestane from carp bile. *J. Biochem.* 52, 125-130.
14. Hoshita, T., Nagayoshi, S. and Kouchi, M. 1964. Stero bile acids and bile sterols. LXIII. Studies on the bile of the family cyprinidae. *J. Biochem.* 56, 177-181.
15. Hwang, D. F., Lai, Y. S. and Chiang, M. T. 1996. Toxic effects of grass carp snake and chicken bile juices in rats. *Toxicol. Lett.* 85, 85-95.
16. Ishida, H., Miyamoto, H., Kajino, T., Nakayasu, H., Nukaya, H. and Tsuji, K. 1996. Study on the bile salt from megamouth shark. I. The structures of a new bile alcohol, 7-deoxycymnol, and its new sodium sulfates. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 1289-1292.
17. Kuraki, S., Shimazu, K., Kuwaba, M., Une, M., Kihira, K., Kuramoto, T. and Takahiko, H. 1985. Identification of bile alcohols in human bile. *J. Lipid Res.* 26, 230-240.
18. Lai, Y. S., Hwang, D. F., Chiang, M. T. and Jeng, S. S. 1996. Toxicity of bile salts

- (sodium cholate and sodium chenodeoxycholate) in rats. *Nutr. Sci. J.* 21, 288-297.
19. Lin, C. T., Huang, P. C., Yen, T. S. and Chen, W. Y. 1977. Partial purification and some characteristic nature of a toxic fraction of the grass carp bile. *J. Chin. Biochem. Soc.* 6, 1-8.
  20. Ng, H. L. and Kum, K. P. 1977. Common ichthyogalltoxic fishes in China. *J. Zoology* 3, 28.
  21. Mohri, T., Tanaka, Y., Fukamachi, K., Horikawa, K., Takahashi, K., Inada, Y. and Yasumoto, T. 1992. Cyprinol as water-soluble poisoning component of carp. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 33, 133-143.
  22. Park, S. K., Kim, D. G., Kang, S. K., Han, J. S., Kim, S.G., Lee, J. S. and Kim, M. C. 1990. Toxic acute renal failure and hepatitis after ingestion of raw carp bile. *Nephron* 56, 188-193.
  23. Pentad Scientific Co. 1997. Data of Applied Analyses for the Utmost Novelties of HPLC. Taipei.
  24. Puri, S. C. and Mullen, K. 1980. Multiple comparisons. In: Hall, G. K. (Ed), *Applied Statistics for Food and Agricultural Scientists*. Medical Publishers, Boston, pp. 146-162.
  25. Yip, L. L., Chow, C. L., Yung, K. H. and Chiu, K. W. 1981. Toxic material from the gallbladder of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Toxicon* 19, 567-569.
  26. 陳湘玲. 1988. 草魚膽汁毒性物質化學結構之研究。國立台灣大學生化研究所碩士學位論文，台北。

Table 1. <sup>13</sup>C-NMR data of grass carp bile alcohol and salt in comparison with standard of 5  $\alpha$ -cyprinol

Carbon No.	Grass carp bile alcohol (ppm)	Grass carp bile salt (ppm)	5 $\alpha$ -Cyprinol* <sup>1</sup> (ppm)	Carbon No.	Grass carp bile alcohol (ppm)	Grass carp bile salt (ppm)	5 $\alpha$ -Cyprinol (ppm)
19	10.47(q)	10.46(q)	10.50(q)	22	37.48(t)	37.32(t)	37.51(t)
18	13.01(q)	13.02(q)	13.05(q)	23	37.70(t)	37.61(t)	37.73(t)
21	18.05(q)	18.01(q)	18.09(q)	5	40.52(d)	40.41(d)	40.53(d)
15	24.13(t)	24.10(t)	24.17(t)	8	41.17(d)	41.09(d)	41.20(d)
11	24.75(t)	24.59(t)	24.78(t)	25	44.42(d)	43.17(d)	44.47(d)
24	28.75(t)	28.71(t)	28.80(t)	14	43.28(d)	42.22(d)	43.30(d)
2	29.35(t)	29.30(t)	29.36(t)	13	47.49(s)	47.43(s)	47.52(s)
4	29.41(t)	29.24(t)	29.43(t)	17	48.15(d)	48.28(d)	48.34(d)
6	29.52(t)	29.45(t)	29.53(t)	27	63.82(t)	68.96(t)	63.81(t)
9	32.74(d)	32.65(d)	32.75(d)	7	67.21(d)	67.14(d)	67.24(d)
1	33.16(t)	33.08(t)	33.19(t)	3	68.79(d)	68.72(d)	68.82(d)
16	36.54(t)	36.46(t)	36.57(t)	26	64.02(t)	63.02(t)	64.02(t)
10	36.90(s)	36.82(s)	36.93(s)	12	73.99(d)	73.90(d)	74.04(d)
20	37.17(d)	37.11(d)	37.22(d)				

\*<sup>1</sup>: Data cited from Haslewood et al., (1955).

Table 2. Linear regression equation\* and correlation coefficient between concentration of bile components and absorbance in HPLC

Bile components	Linear equation coefficient		Correlation coefficient
	a	b	
Ursodeoxycholic acid	0.08535	0.04948	0.99594
Cholic acid	0.08752	-0.03372	0.99450
Chenodeoxycholic acid	0.11113	-0.43268	0.99848
Deoxycholic acid	0.08681	0.08770	0.99554
Lithocholic acid	0.09952	-0.20032	0.99547
Glycocholic acid	1.17443	-1.15603	0.99367
Glycochenodeoxycholic acid	0.78870	-0.73754	0.99319
Glycodeoxycholic acid	1.02115	-0.87664	0.99434
Glycolithocholic acid	1.15806	-0.5152	0.99471
Taurocholic acid	0.62856	-0.7696	0.99560
Taurochenodeoxycholic acid	0.59444	-0.84724	0.99509
Taurodeoxycholic acid	0.76263	-1.01000	0.99451
Taurolithocholic acid	0.64853	-0.53172	0.99250
Cyprinol sulfate	39.1271	-0.26439	0.99920

\* $Y = aX + b$ , where Y= relative peak area and X= amount of bile acid and cyprinol sulfate injected into HPLC (2.5-32  $\mu$ g).

Table 3. Recovery of bile acids and cyprinol sulfate added in the bile of chicken and ayu fish

Bile components	Recovery (%)		
	Chicken	Ayu fish	Average
Cholic acid	94±2.8* <sup>1</sup>	96±2.3* <sup>1</sup>	95.0±1.0
Deoxycholic acid	97±2.5	99±2.3	98.0±1.0
Lithocholic acid	82±2.1	85±2.6	83.5±1.5
Chenodeoxycholic acid	92±2.3	90±1.8	91.0±1.0
Ursodeoxycholic acid	100±2.0	96±2.6	98.0±2.0
Taurocholic acid	95±3.1	97±2.9	96.0±0.5
Tauroolithocholic acid	99±3.0	96±2.8	97.5±1.5
Taurodeoxycholic acid	86±2.4	83±2.7	84.5±1.5
Taurochenodeoxycholic acid	88±2.1	90±2.3	89.0±0.5
Glycocholic acid	96±4.3	92±3.1	94.0±2.0
Glycolithocholic	84±2.6	87±2.4	85.5±1.5
Glycodeoxycholic acid	89±2.4	91±3.1	90.0±0.5
Glycochenodeoxycholic acid	93±2.5	95±2.1	94.0±1.0
Cyprinol sulfate	96±3.4	94±2.6	95.0±1.0

\*<sup>1</sup> Data represent mean ± S.D.(n=3).

Table 4. Levels of bile acids and cyprinol sulfate in the bile of other fish

Sample	Sample No	Cyprinol sulfate (mg/g)	Taurochenodeoxycholic acid (mg/g)	Taurocholic acid (mg/g)	Cholic acid (mg/g)
<i>Bodianus oxycephalus</i> (rainbow fish) 黑點龍	3	n.d.* <sup>1</sup>	0.4±0.1* <sup>2</sup> (3.8)* <sup>3</sup>	133.3±4.2 (96.2)	n.d.
<i>Salmo salar</i> (rock trout) 鮭魚	2	n.d.	4.7±1.2 (9.3)	87.9±2.3 (90.7)	n.d.
<i>Anguilla japonica</i> (japanese eel) 日本鰻	6	n.d.	6.9±2.1 (10.5)	77.4±3.0 (89.5)	n.d.
<i>Aixos maru</i> (spanish mackerel) 花鯷	3	n.d.	25.1±1.6 (17.9)	78.5±4.2 (82.1)	n.d.
<i>Pleuronectes cornutus</i> (right eyed flounder) 比目魚	2	n.d.	33.2±2.5 (23.4)	96.5±3.7 (76.6)	n.d.
<i>Girella punctata</i> (rudder fish) 黑毛	4	n.d.	29.5±1.6 (20.7)	108.6±4.6 (79.3)	n.d.
<i>Thamnaconus modestus</i> (black scraper) 黑達仔	3	n.d.	26.7±2.4 (23.4)	97.6±4.6 (76.6)	n.d.
<i>Paraplagusia bilineata</i> (tongue sole) 狗舌	4	n.d.	28.4±2.6 (32.3)	68.5±2.5 (67.7)	n.d.
<i>Trachurus japonicus</i> (japanese jack mackerel) 真鯷	3	n.d.	55.9±3.1 (42.6)	75.4±5.4 (57.4)	n.d.
<i>Scomberomorus commerson</i> (mackerel) 土托	3	n.d.	66.3±2.9 (47.6)	78.6±2.4 (52.4)	n.d.
<i>Liza macrolepis</i> (mullet) 豆魚	5	n.d.	154±5.1 (100)	n.d.	n.d.
<i>Plecoglossus altirelis</i> (ayu fish) 香魚	2	n.d.	n.d.	34.4±3.4 (36.6)	89.5±5.1 (63.4)

\*<sup>1</sup> Not detected.

\*<sup>2</sup>Data represent mean ± S.D.

\*<sup>3</sup>Data in parenthesis represent percentage.

Table 5. Levels of bile acids and cyprinol sulfate in grass carp and common carp

No	Wet weight of gallbladder (g)	Levels of bile acids and cyprinol sulfate (mg/g)					
		Cyprinol Sulfate	Cholic acid	Chenodeoxy- cholic acid	Lithocholic acid	Taurocholic acid	Taurocheno- deoxycholic acid
<b>Grass carp</b>							
1	18.8	67.3	0.33	1.7	0.25	0.61	0.78
2	15.2	62.6	0.42	2.1	0.37	0.52	0.65
3	17.6	77.4	0.59	2.2	0.31	0.56	0.61
4	15.7	74.3	0.57	2.5	0.45	0.47	0.82
5	19.2	52.4	0.48	0.7	0.51	0.55	0.58
6	17.6	65.1	0.37	1.6	0.26	0.46	0.49
7	15.5	66.5	0.31	1.6	0.52	0.42	0.56
8	16.2	65.6	0.78	0.4	0.42	0.35	0.62
9	18.4	61.3	0.34	1.5	0.47	0.55	0.76
10	15.9	52.1	0.67	2.3	0.43	0.37	0.71
Mean ± S.D.	17.0±1.5	64.5±8.1 (94.6) * <sup>1</sup>	0.49±0.1 (0.71)	1.66±0.7 (2.44)	0.40±0.1 (0.58)	0.49±0.1 (0.71)	0.67±0.1 (0.96)
<b>Common carp</b>							
1	3.1	121.9	3.7	4.4	0.32	n.d.* <sup>2</sup>	n.d.
2	1.7	132.7	2.4	3.2	0.43	n.d.	n.d.
3	2.3	97.6	3.1	3.4	0.42	n.d.	n.d.
4	2.6	129.6	3.5	4.3	0.31	n.d.	n.d.
5	1.9	133.3	2.9	3.6	0.27	n.d.	n.d.
6	2.1	142.1	3.6	2.9	0.33	n.d.	n.d.
7	3.0	127.2	3.7	4.2	0.46	n.d.	n.d.
8	2.5	135.6	2.4	4.4	0.31	n.d.	n.d.
9	1.6	98.2	2.6	3.7	0.47	n.d.	n.d.
10	2.8	119.5	3.0	2.8	0.37	n.d.	n.d.
Mean ± S.D.	2.4±0.5	123.8±15.1 (94.5) * <sup>1</sup>	3.1±0.5 (2.36)	3.7±0.6 (2.82)	0.37±0.1 (0.28)		

\*<sup>1</sup>Data in parenthesis represent percentage.\*<sup>2</sup> Not detected.

Table 6. Levels of bile acids in chicken (*Pectoralis major*) and duck\*<sup>1</sup> (*Anas platyhynchos var. domestica*)

Bile acid	chicken		duck	
	Concentration (mg/g)	%	Concentration (mg/g)	%
Cholic acid	9.6±0.5	1.2±0.1* <sup>2</sup>	45.2±2.3	17.5±0.5
Chenodeoxycholic acid	25.2±2.2	3.1±0.1	28.2±1.6	9.7±0.3
Ursodeoxycholic acid	n.d.	n.d.* <sup>3</sup>	43.5±2.1	15.5±0.4
Deoxycholic acid	n.d.	n.d.	31.6±1.9	8.4±0.1
Lithocholic acid	68.7±2.1	6.1±0.2	37.5±2.1	9.0±0.2
Taurocholic acid	152.6±3.1	23.9±1.6	16.8±1.5	2.4±0.1
Taurochenodeoxycholic acid	n.d.	n.d.	97.5±3.4	37.9±0.7
Taurolithocholic acid	35.9±0.6	3.2±0.7	n.d.	n.d.
Glycolithocholic acid	228.4±1.6	62.5±2.1	n.d.	n.d.

\*<sup>1</sup> Mean of triplicate.

\*<sup>2</sup> Data represent mean ± S.D.

\*<sup>3</sup> Not detected.

Table 7. Toxic effects of grass carp bile powder, n-butanol (BuOH) extract, 5  $\alpha$  -cyprinol and 5  $\alpha$  -cyprinol sulfate on the physiological functions of the rats after 6 hour administration

Physiological functions* <sup>1</sup>	Dose (mg in 0.6 ml saline)* <sup>2</sup>				
	Control (0.6 ml saline)	Grass carp powder	BuOH extract	5 $\alpha$ -Cyprinol	5 $\alpha$ -Cyprinol sulfate
		100	100	100	100
<b>In blood</b>					
RBC(10 <sup>4</sup> cell/dl)	762±24 <sup>a</sup>	847±33 <sup>b</sup>	828±25 <sup>b</sup>	796±35 <sup>ab</sup>	856±29 <sup>b</sup>
Hematocrit(%)	44.8±7.1 <sup>a</sup>	53.5±2.3 <sup>b</sup>	54.7±5.3 <sup>b</sup>	47.6±5.8 <sup>ab</sup>	54.0±5.5 <sup>b</sup>
WBC(cell/dl)	6500±1900 <sup>a</sup>	6700±1100 <sup>a</sup>	5100±1200 <sup>a</sup>	5300±3200 <sup>a</sup>	4900±1100 <sup>a</sup>
Hemoglobin(g/dl)	14.2±1.6 <sup>ab</sup>	15.2±1.5 <sup>b</sup>	14.6±0.6 <sup>ab</sup>	13.6±1.0 <sup>a</sup>	13.5±1.1 <sup>a</sup>
BUN(mg/dl)	11.3±2.7 <sup>a</sup>	17.7±1.0 <sup>b</sup>	16.8±1.0 <sup>b</sup>	16.7±1.0 <sup>b</sup>	19.8±0.9 <sup>c</sup>
Creatinine(mg/dl)	0.44±0.02 <sup>a</sup>	0.62±0.03 <sup>b</sup>	0.61±0.04 <sup>b</sup>	0.62±0.06 <sup>b</sup>	0.63±0.05 <sup>b</sup>
AST(U/l)	118±16 <sup>a</sup>	598±11 <sup>b</sup>	577±20 <sup>b</sup>	139±18 <sup>a</sup>	689±26 <sup>c</sup>
ALT(U/l)	39±11 <sup>a</sup>	210±47 <sup>b</sup>	253±46 <sup>b</sup>	47±16 <sup>a</sup>	261±50 <sup>b</sup>
ALP(U/l)	298±7 <sup>a</sup>	365±22 <sup>b</sup>	359±35 <sup>b</sup>	332±20 <sup>b</sup>	364±17 <sup>b</sup>
<b>In urine</b>					
BUN(mg/dl)	391±10 <sup>a</sup>	490±14 <sup>b</sup>	573±30 <sup>c</sup>	462±23 <sup>a</sup>	608±36 <sup>c</sup>
Creatinine(mg/dl)	12.7±1.3 <sup>a</sup>	17.2±1.7 <sup>b</sup>	19.2±1.6 <sup>b</sup>	17.5±1.2 <sup>b</sup>	28.5±2.5 <sup>c</sup>

\*<sup>1</sup> RBC= Red blood cell, WBC= White blood cell, BUN= Blood urea nitrogen, AST= Aspartate transaminase, ALT= Alanine transaminase, ALP= Alkaline phosphatase.

\*<sup>2</sup> Values represent mean  $\pm$  S.D., and values in the same row having different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

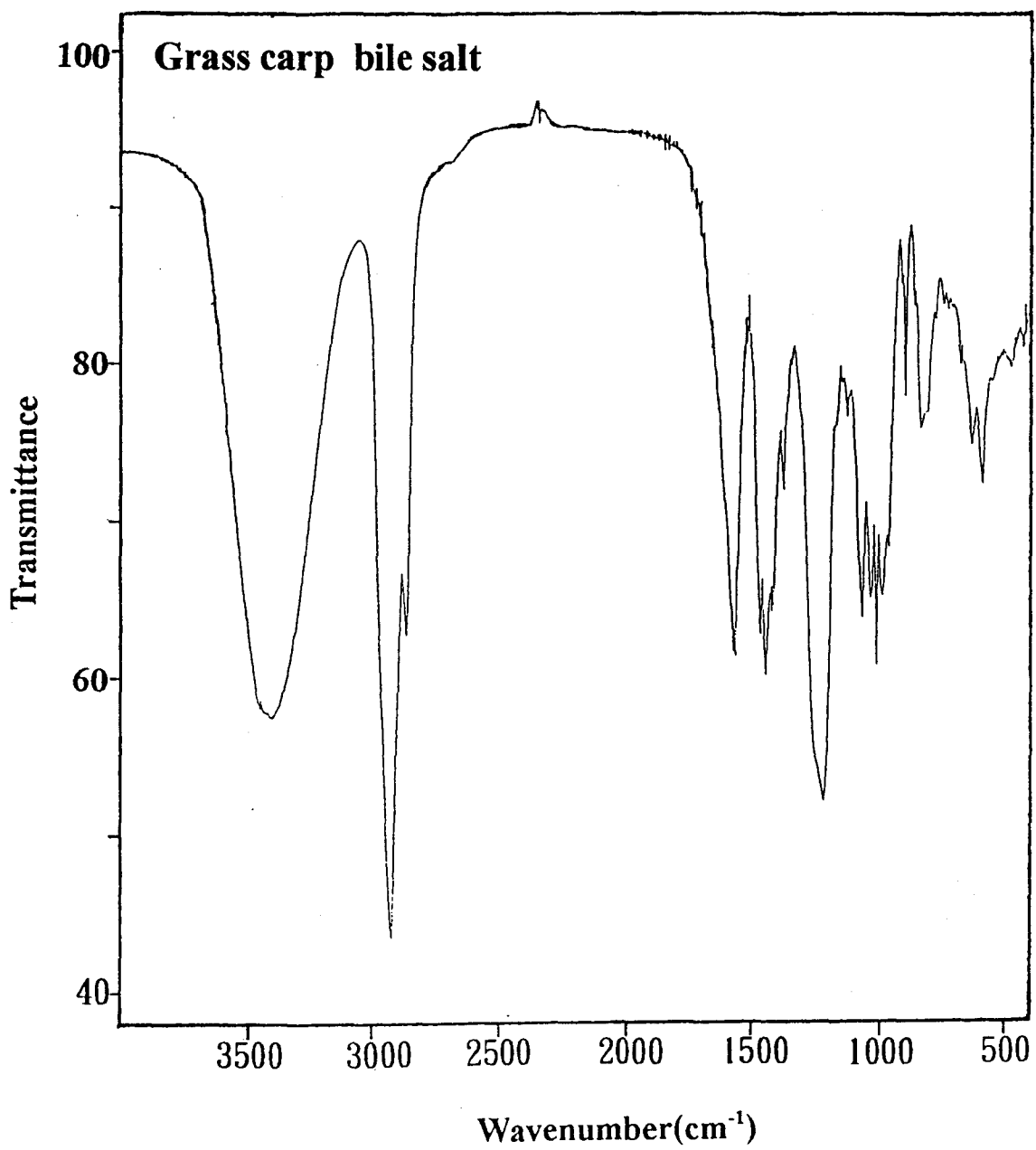


Fig. 1. IR sepectrum.

# Grass carp bile salt

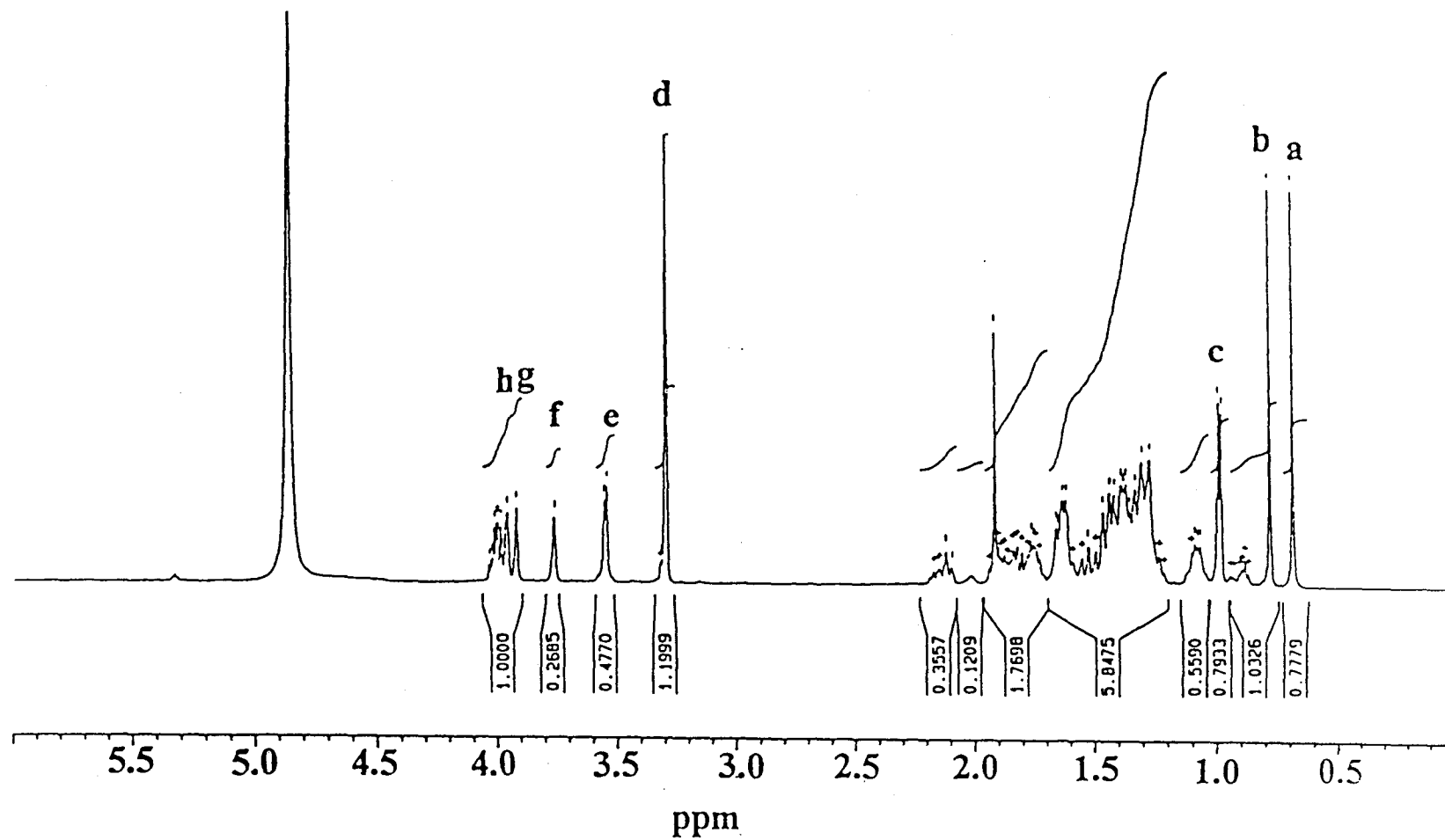


Fig. 2. <sup>1</sup>H NMR spectrum.

**Grass carp bile salt**

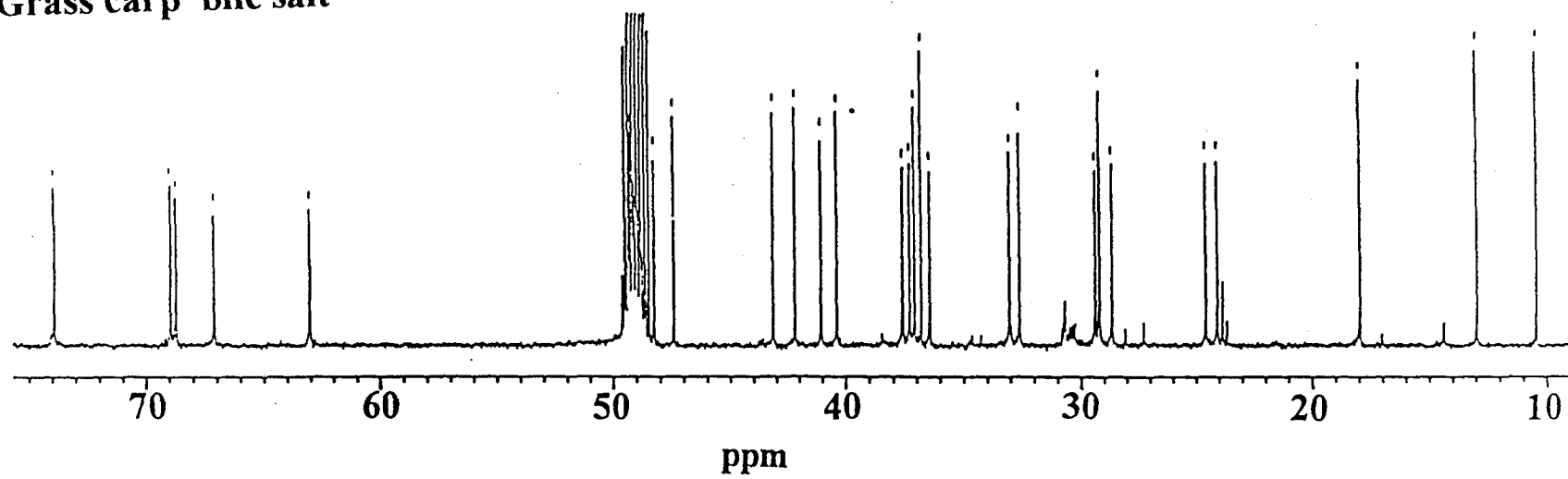


Fig. 3.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum.

# Grass carp bile salt

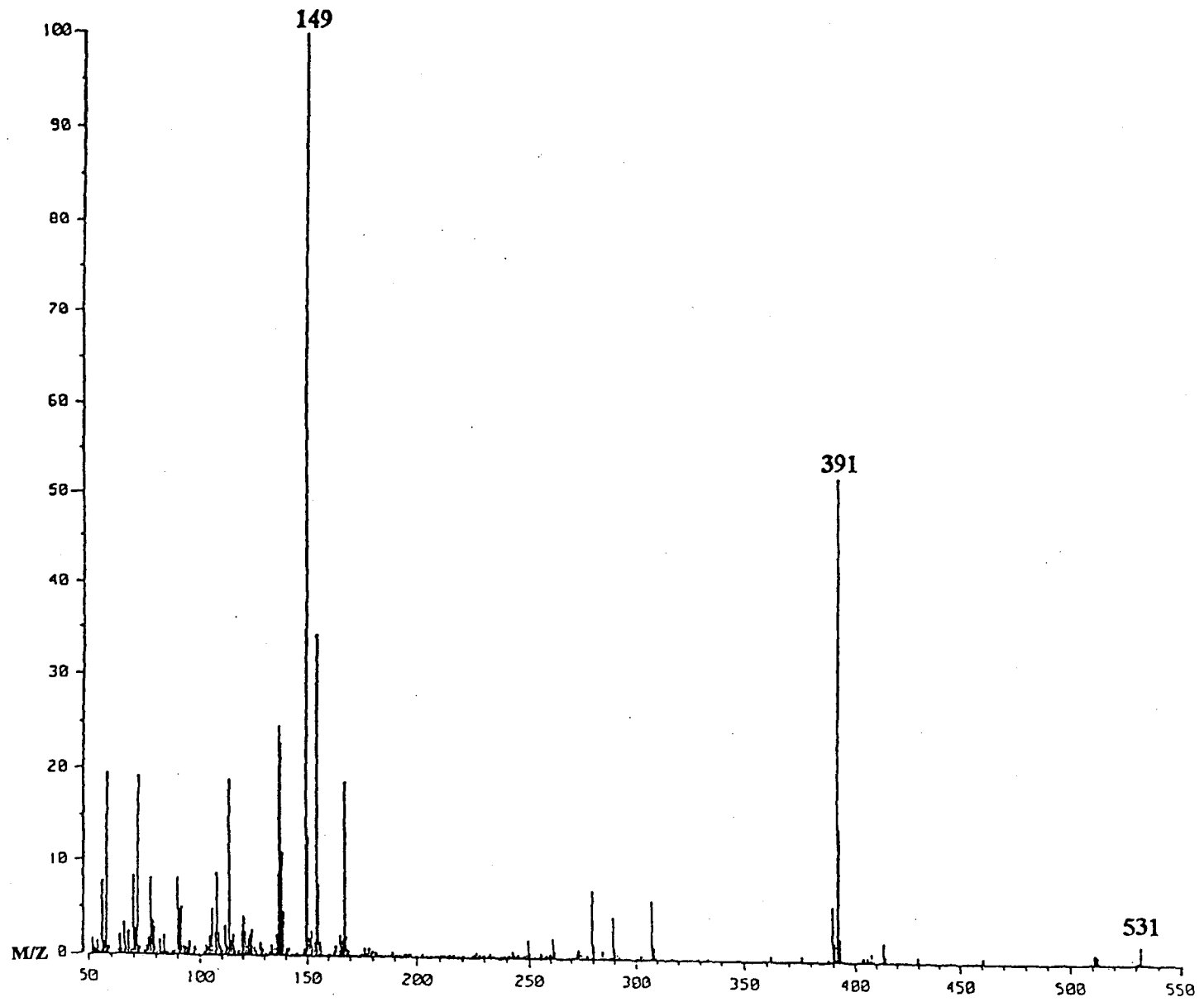


Fig. 4. FAB-mass sepectrum.

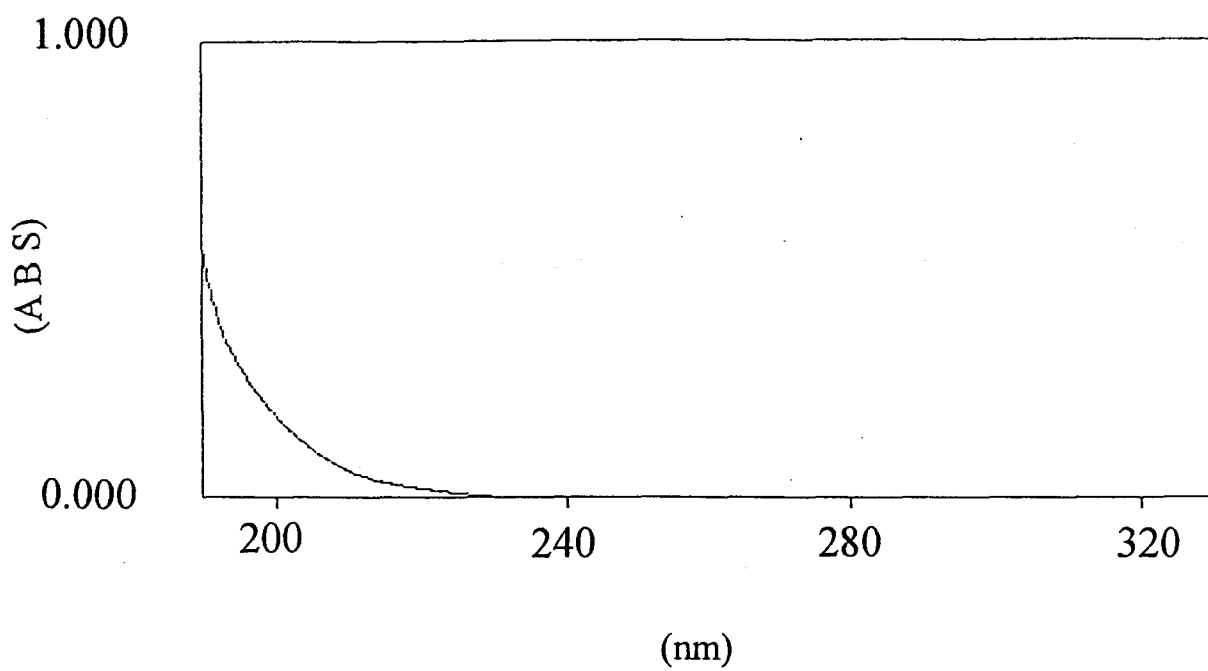


Fig. 5. UV scanning spectrum of cholic acid.

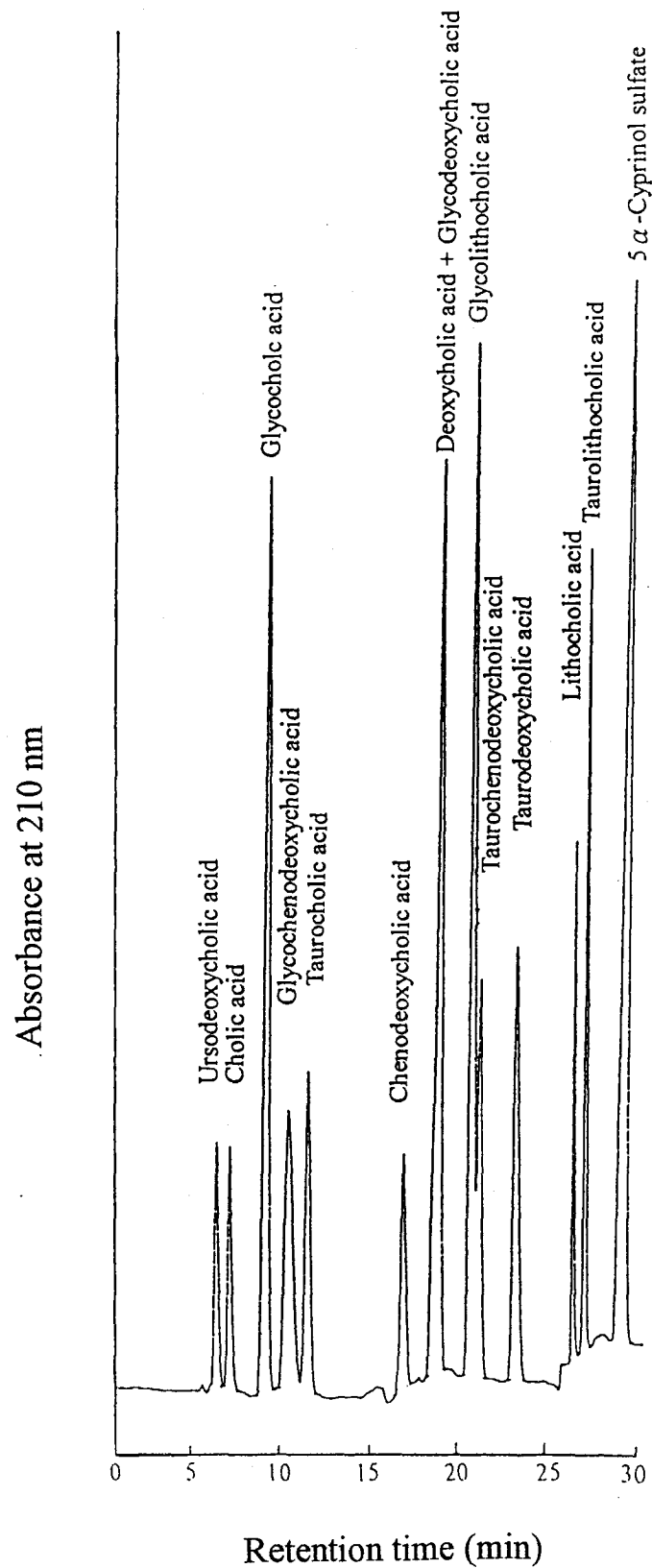


Fig. 6. HPLC profile of authentic bile acid.

層析條件: column, Merck ODS column (25x 0.3cm)。

溶出條件: 流速 0.8ml/ min, uv210nm, buffer 以 0.3 % Ammonium carbamate/ Acetonitrile (73:27)10min→(68:32)10min→(50:50)10min。

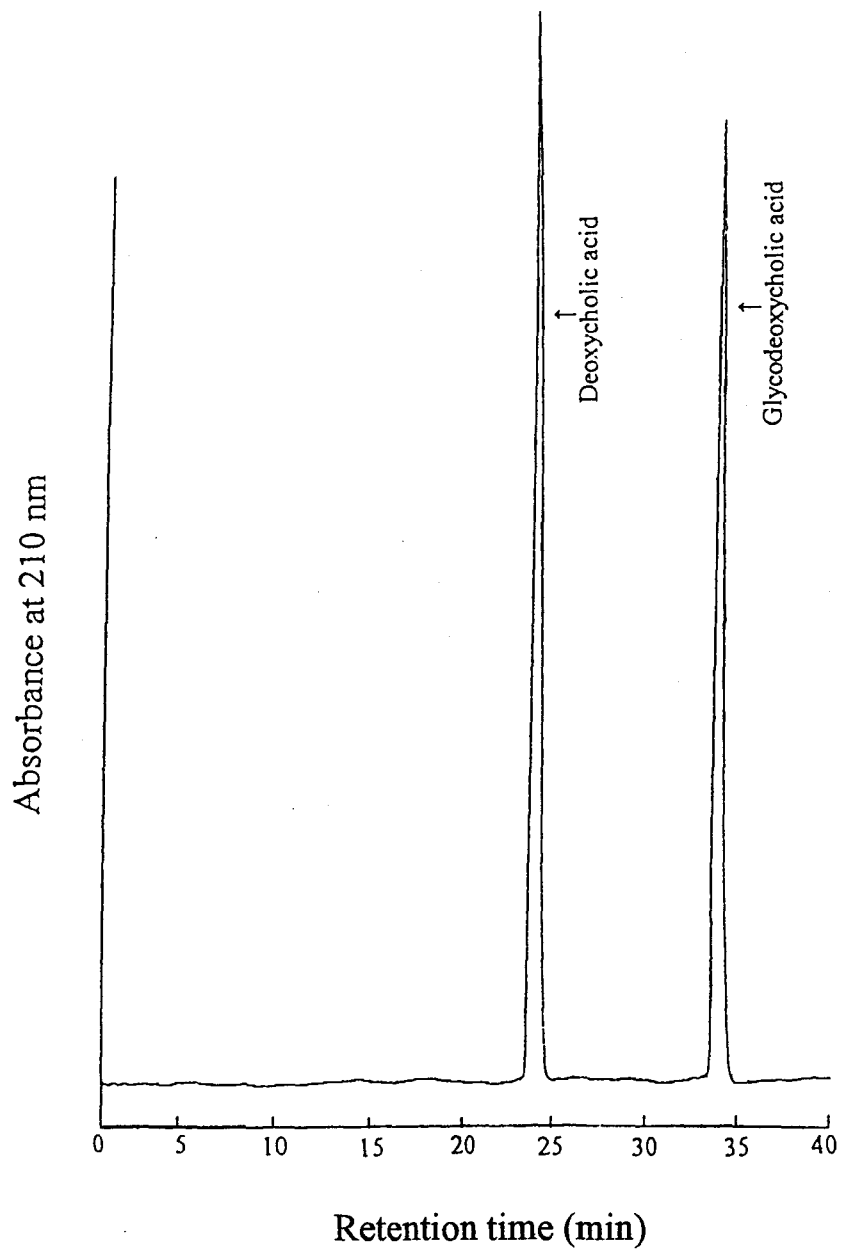


Fig. 7. HPLC profile of authentic bile acid.

層析條件: column, Merck ODS column (25x 0.3cm)。

溶出條件: 流速 0.8ml/ min, uv210nm, buffer 以 0.3 % Ammonium carbamate/ Acetonitrile (73:27)。

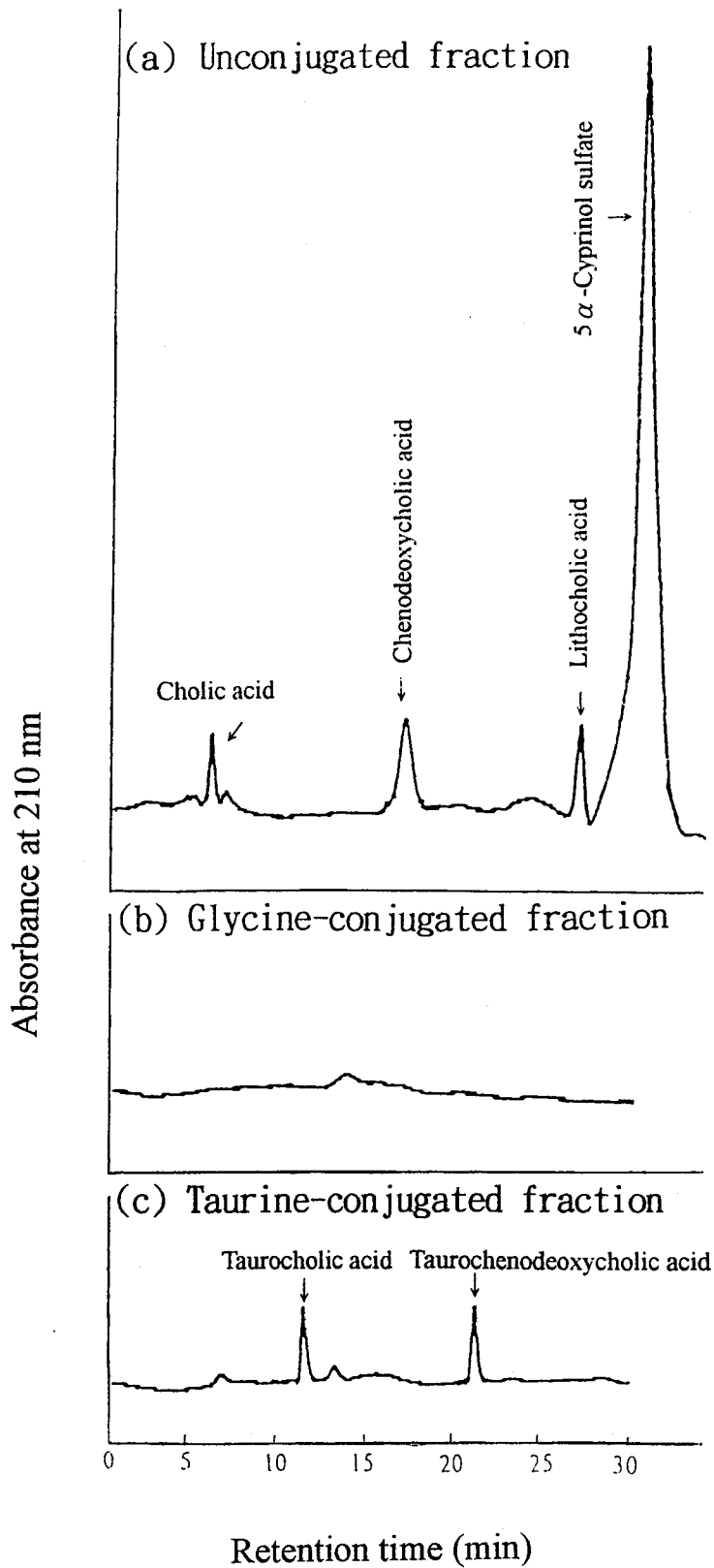
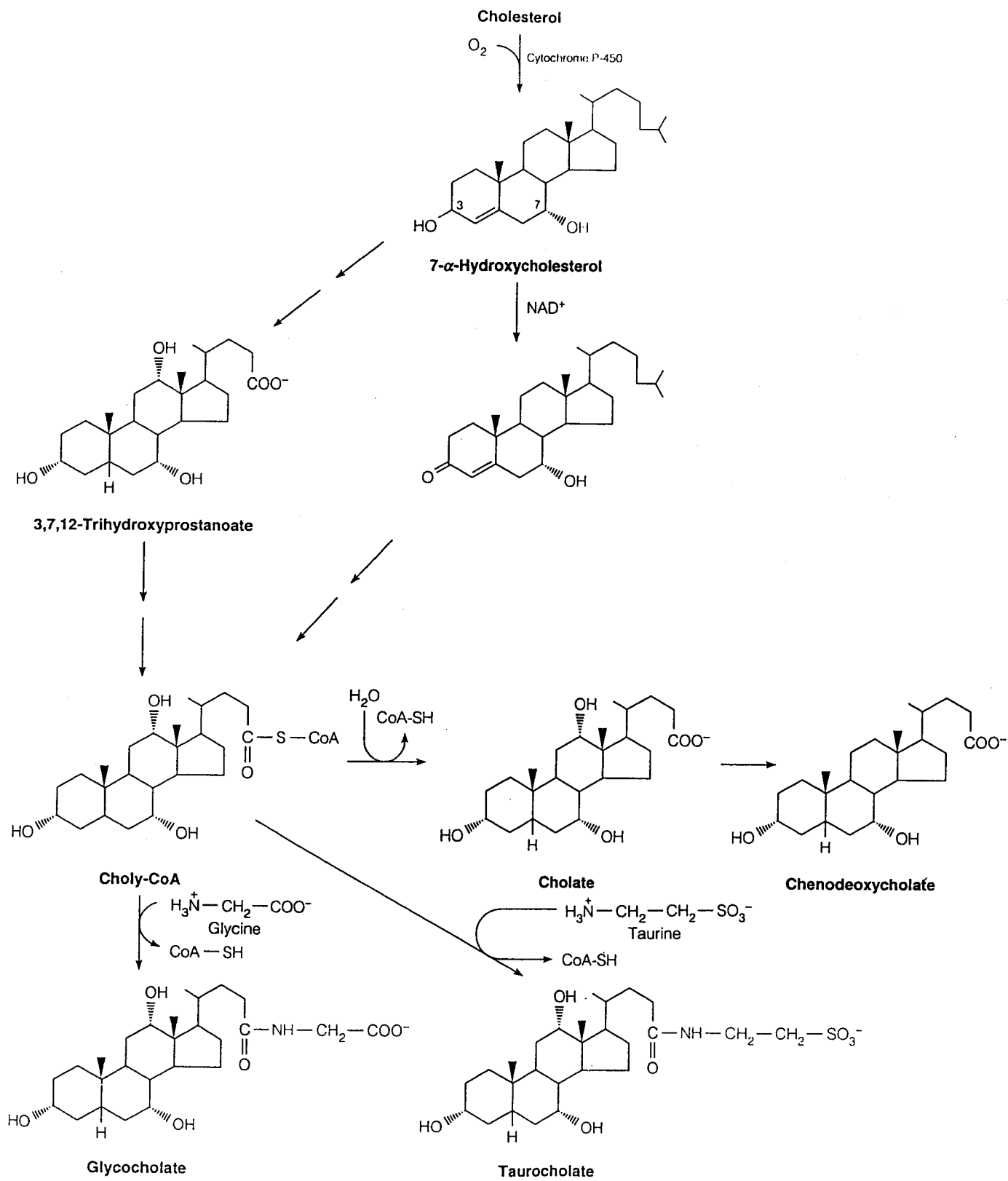
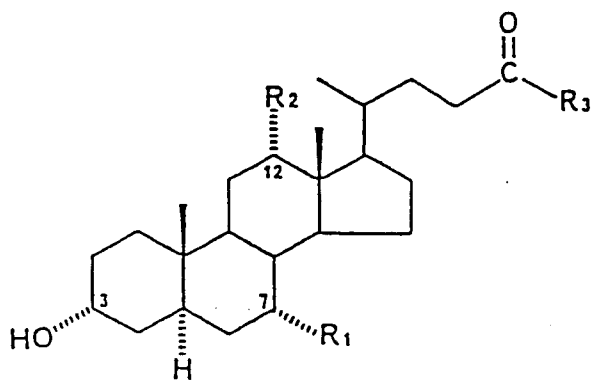


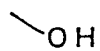
Fig. 8. HPLC profile of bile acids in three separated fraction of obtained from grass carp bile by PHP-LH-20 column chromatography. (a) 0.1M acetic acid in 90 % ethanol, (b) 0.2M formic acid in 90 % ethanol and (c) 0.3M acetic acid-potassium acetate in 90 % ethanol.



Appendix 1. The pathway of bile acid biosynthesis.



R<sub>3</sub>

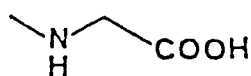


Free Bile Acid

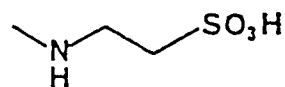
R<sub>1</sub>

R<sub>2</sub> (Free Bile Acids)

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	(Free Bile Acids)
H	H	Lithocholic (LC)
OH	H	Chenodeoxycholic (CDC)
H	OH	Deoxycholic (DC)
OH	OH	Cholic (C)

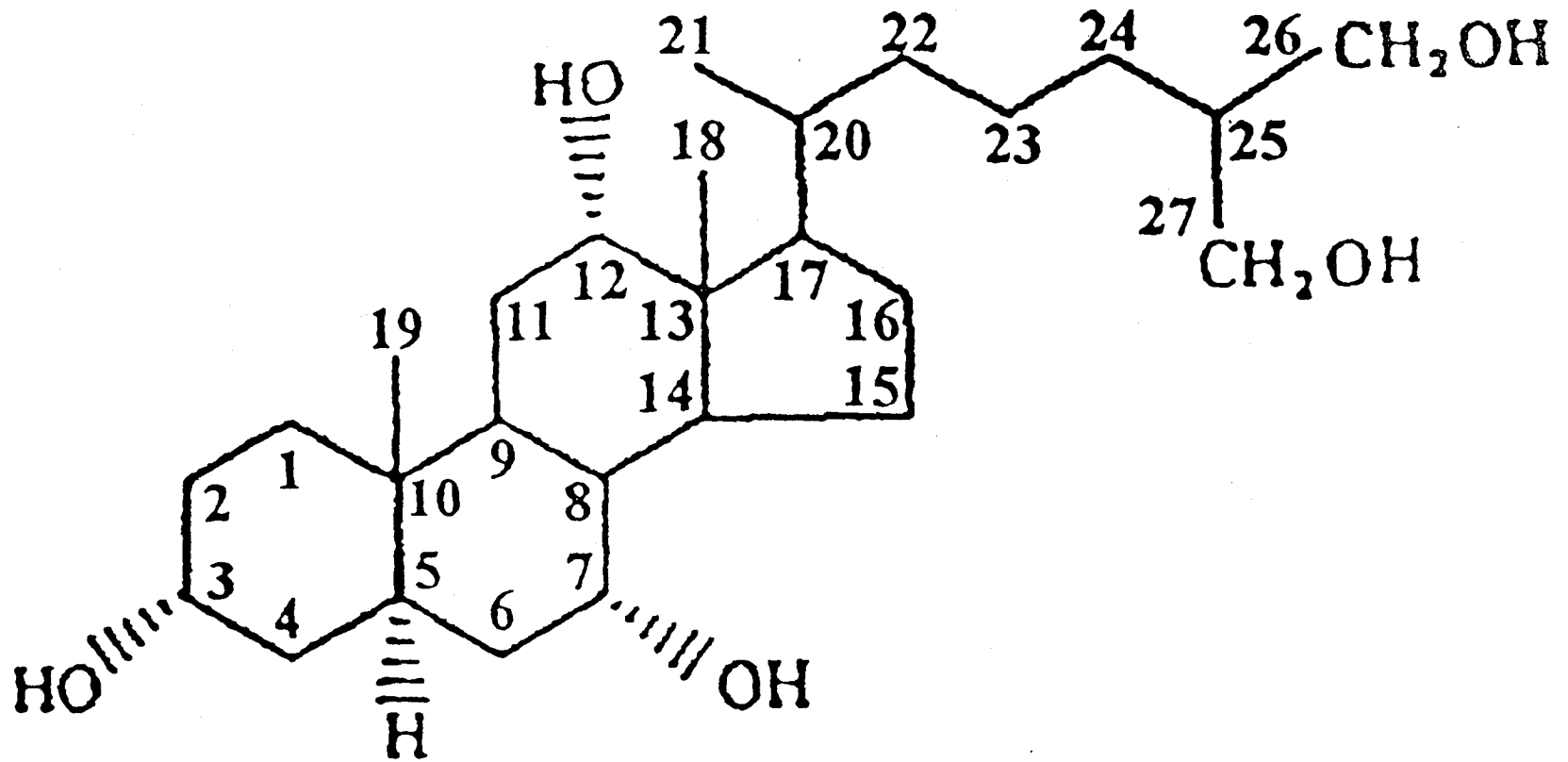


Glyco-

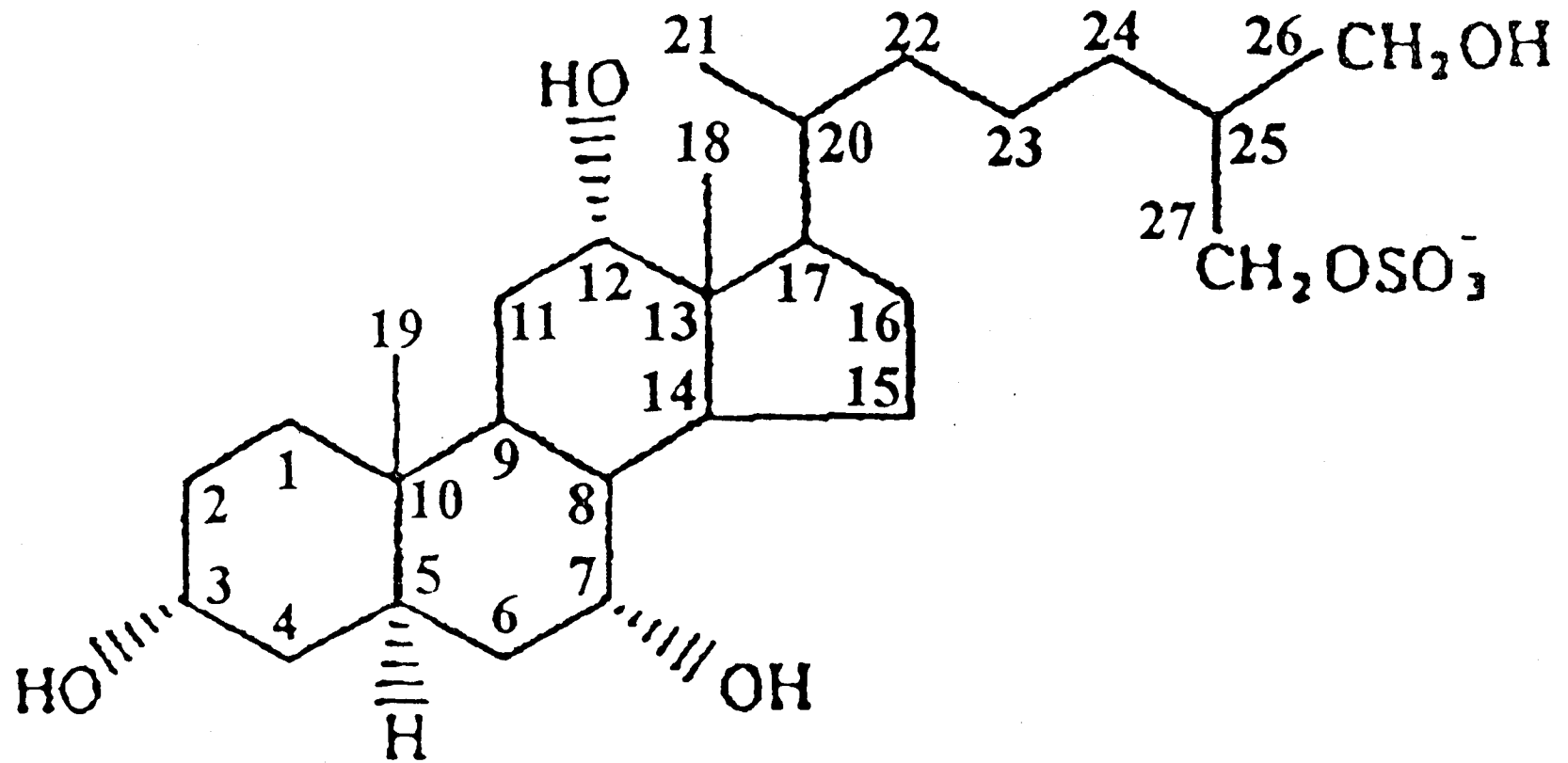


Tauro-

Appendix 2. Chemical structures of free and conjugated bile acids.



Appendix 3. The structure of 5 $\alpha$ -cyprinol.



Appendix 4. The structure of 5 $\alpha$ -cyprinol sulfate.