九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

コイ尿中中性ステロイドのガスクロマトグラフ分析

矢野，友紀
九州大学農学部水産化学第一教室

石尾，真弥
九州大学農学部水産化学第一教室

https://doi.org/10.15017/23266

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 33 (1), pp.33-41, 1978-09. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

九大農学芸誌 (Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
第33巻 第1号 33-41 (1978)

コイ尿中中性ステロイドのガスクロマトグラフ分析

矢野友紀・石尾真弥
九州大学農学部水産化学第一教室
(1978年6月17日 受理)

Gas Chromatographic Analysis of Neutral Steroids in Carp Urine

TOMOKI YANO and SHINYA ISHIO
Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-04, Fukuoka 812

緒言

魚類の血液や組織中にはサメ，エイに見られる 11-ハイドロキシコルチコステロン (Idler and Truscott, 1966) やサケの 11-ケトテストステロン (Idler *et al.*, 1960; Schmidt and Idler, 1962) などの特殊な例を除いて哺乳類とほぼ同種のステロイドホルモンが存在し，それらの生合成径路も哺乳類と大差ないことが知られている．しかしながら，ステロイドホルモンの代謝に関する研発は少なく，アンドロゲン (Breuer and Ozon, 1965; Lisboa and Breuer, 1966) とエストロゲン (Breuer *et al.*, 1963) について若干の報告があるのみで，プロゲスチンとコルチコステロイドについてはほとんど何も知られていない (Idler and Truscott, 1972)．また，魚尿中の代謝産物については著者らの知る限り，わずかに Mckim (1966) がニジマスの尿からテトラヒドロコルチゾンを同定したと報じているのみである．

近年，Horning *et al.* (1967) によつて人尿中のステロイドホルモン代謝産物のガスクロマトグラフ分析法は著しく進歩した．すなわち，尿中ステロイドのうち17位にジヒドロキシアセトン基側鎖をもつステロイドは熱分解を受けやすいため，ガスクロマトグラフ分析が非常に困難であつたが，彼等はこれらのステロイドの20位のケトン基をメトオキシム (MO) 化した後，21位の水酸基をトリメチルシリル (TMSi) 化すると熱に安定な化合物に変わる (Fales and Luukkainen, 1965) ことにヒントを得て，尿中ステロイドの一斉分析法を確立した．この方法はステロイドのガスクロマトグラフ分析上画期的なもので，今日のステロイド分析の中心となつている．その後，立体障害を受けた 11β および *tert* 17α の水酸基のシリル化法も確立され (Sakauchi and Horning, 1971; Thenot and Horning, 1972)，尿中ステロイド分析時の分解，テーリングの問題は完全に解決された．一方，Ryhage (1964) によつて開発されたガスクロマトグラフ—質量分析法はステロイド化学の分野に急速に普及し，現在では μg ～ ng 量のステロイドの構造を決定しうるまでになつた．

著者らはこれらの技術を用いてコイ (*Cyprinus carpio*) 尿中のステロイド代謝産物を同定した．

本研究の遂行にあたり，九州大学農学部の小林邦男助教授には大変有益なご助言を頂いた．ここに厚くお礼申し上げる．

材料および方法

1. 試薬の精製

メタノール，アセトン，酢酸エチルは市販の試薬特級品を使用前に蒸留した．ピリジンは試薬特級品を KOH 顆粒上で4時間煮沸還流後蒸留し，褐色瓶中に貯えた．Amberlite XAD-2 樹脂 (Rohm and Haas 社) は蒸留水で繰り返えし洗つて表面に浮遊する微小粒子を除いた後カラムにつめメタノール，アセトン，水で十分に洗浄した (Bladlow, 1968)．アンドロステロン他12種の標品ステロイド (Table 1 参照) は Sigma 社から購入した．これらのステロイドはガスクロマトグラフ的に純粋であつたので，特に精製せずに使用した．

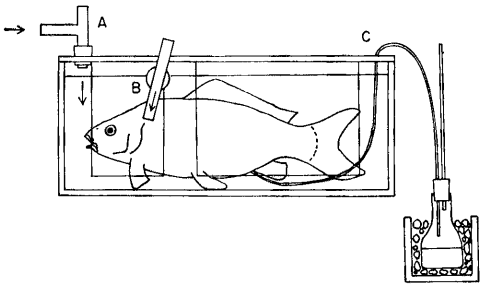

Fig. 1. Showing a cannulated carp (*Cyprinus carpio*) with the cannula attached to the ice-cooled receiver flask. Water enters the box at A and emerges at B.

2. 供試魚

コイ業者から購入した全長 26～28 cm, 体重 248～280 g のコイ 10 尾を水温 22±1°C の水槽 (29.5×60×30 cm) 中に各 2 尾ずつ入れ, 約 1 カ月予備飼育した.

3. 採尿

コイを 100 ppm の MS-222 (トリカインメタン硫酸塩) 溶液中で 5 分間麻酔し, 膀胱にカテーテル (1 cm の長さに切つた内径 1 mm のポリエチレンチューブの先端に小さなシリコーンゴム外套をとりつけ, 他端に 30 cm× 1 mmφ のシリコーンチューブを接続したもの) を挿入した. ついで, 魚を採尿用小型水槽 (Fig. 1) に移し, シリコーンチューブの自由な一端を水槽外にとり出し, 受器フラスコに連結した. 水槽には活性炭で脱塩素処理した水道水を 22±1°C に調節し, 十分なエアレーションを行なつた後, 100 ml/min の割合で供給した.

実験室多尿症 (Grafflin, 1931) の影響を避けるため, 初めの 24 時間に排泄された尿は捨て, つぎの 48 時間に排泄された尿を集めた. コイ 10 尾から 48 時間尿 10 検体を採取したが, そのうち 8 検体 (雄 3 尾, 雌 5 尾) を下記によつて加水分解し, 残りの 2 検体 (雌雄各 1 尾) を遊離ステロイドの分析にあてた.

4. 酵素分解とソルボリシス

予備試験の結果, コイ尿中には β-グルクロニダーゼ阻害物質が含まれていることが判つたので, これを除くため尿を Amberlite XAD-2 カラム (約2.5 g, 15 cm× 5 mmφ) に注ぎ, 流速 0.5 ml/min で透過させた. 蒸留水 10 ml でカラムを洗つた後, ステロイドをメタノール 12.5 ml で溶出した. ついで溶出液を減圧下に窒素気流中で蒸発乾固し, 残渣を坂内(1971) の方法に従つて加水分解した. すなわち, 尿中ステロイドを 25 ml の水に溶解し, これに 0.5 M 燐酸緩衝液 (pH 6.0) 5 ml を加え, pH 6.0 に調整した後, 細菌性 β-グルクロニダーゼ 1000 単位 (約 16 mg, Sigma 社) と防腐のためのクロロホルム数滴を加え, 37°C で 24 時間持続振とうした (酵素分解). ついで, 硫酸抱合体を分解するために, 酢酸エチル 25 ml, 1/5 濃度の市販ホルマリン 0.5 ml, 50 % v/v H_2SO_4 溶液 1.5 ml, NaCl 6.25 g を加え 5 分間激しく振とうし, さらに 33°C で 43 時間接続振とうした (ソルボリシス). 内容物を分液漏斗に移し, 上層の酢酸エチル層を分離後, 水層をさらに 25 ml の酢酸エチルで抽出した. 酢酸エチル層を合わせ, 7.5 ml の 8 % NaOH-10 % NaCl 溶液で 5 回, 7.5 ml の 10 % NaCl 溶液で 3 回洗浄後, 無水 Na_2SO_4 で脱水し, 溶媒を窒素ガス気流中で減圧除去した.

5. 遊離ステロイド

コイの 48 時間尿を蒸留水で 100 ml に希釈し, 25 g の NaCl を添加後, 100 ml の酢酸エチルで 2 回抽出した. 抽出液を合わせ, 8 % NaOH-10 % NaCl 溶液 30 ml で 5 回, 10 % NaCl 溶液 30 ml で 3 回洗浄後, 無水 Na_2SO_4 で乾燥し, 溶剤を窒素ガス気流中で留去した.

6. MO-TMSi 誘導体の作製

ステロイド試料をテフロンキャップ付反応管 (5 cm× 5 mmφ) に移し, 下記の A, B 法に従つて MO-TMSi 誘導体を作製した. 両法とも 11-ケト基以外の全ケト基を MO 基に変える点では同じであるが, A法 (Horning and Horning. 1970; Horning *et al.*, 1967) は立体障害を受けた 11 β と *tert* 17 α の水酸基をエーテルに変えることが出来ないのに対し, B法 (Thenot and Horning, 1972) はステロイド分子内の全水酸基を TMSi エーテル化しうる.

(A) ステロイド試料にメトキシアミン塩酸塩 2 mg と乾燥ピリジン 0.2 ml を加え, 十分溶解させた後, 密栓し室温で一夜放置した (MO 化). ついでピリジンを窒素ガス気流中で除去後, 残渣を 2 ml の 5 % Na_2CO_3-10 % NaCl 溶液に溶かし, 3 ml の酢酸エチルで抽出した. 抽出液を 2 ml の 5 % Na_2CO_3-10 % NaCl 溶液で 2 回洗浄後, 無水 Na_2SO_4 で乾燥し, 減圧下に 40°C で溶剤を留去した. 残渣を少量の酢酸エチルを用いて反応管 (5 cm× 5 mmφ) に移し, 溶剤を留去後, ビストリメチルシリルアセトアミド (BSA) 20 μl を加え室温に 1 時間放置した (TMSi 化).

(B) ステロイド試料にメトキシアミン塩酸塩 1

mg と乾燥ピリジン 10 μl を加え，十分溶解後密栓し，60°C で 30 分間加熱した (MO 化)．ピリジンを窒素ガス気流中で蒸発させ，残渣に N-トリメチルシリルイミダゾール (TSIM) 10 μl を加え 100°C で 2 時間加熱した (完全 TMSi 化)．なお，標品ステロイドについても全く同様に処理して MO-TMSi 誘導体を作製した．

7. ガスクロマトグラフ分析

ガスクロマトグラフ分析は水素炎イオン化検知器 (FID) を備えた島津製 4 BMPF により，3 m × 4 mmφ のガラスカラムを用い，1% OV-1 と 2% QF-1 Shimalite W (酸，シラン処理，80～100 メッシュ) でそれぞれ 170°C および 150°C から 2°C/min の昇温分析を行なつた．試料導入口と検出器は 280°C に保ち，窒素ガス流量は 60 ml/min とした．なお，分析 1 回につき試料溶液 1～2 μl をマイクロシリンジでカラムに注入した．

8. MU 値の測定

Horning *et al.* (1967) の方法に従つて試料溶液に *n*-パラフィン (Applied Science Laboratories Inc.) を混入してガスクロマトグラフ分析を行ない，コイ尿中ステロイドおよび標品ステロイドの MO-TMSi 誘導体のメチレンユニット (MU) 値を測定した．

MU 値は昇温分析でのステロイドの保持時間を *n*-パラフィンのそれと比較して表わすピーク同定法である．すなわち C_{18}～C_{34} の *n*-パラフィンは昇温分析においてほぼ等間隔に溶出することから，目的のステロイドをはさむ前後の *n*-パラフィンの炭素数を標準にとり，その位置を定めるものである．この方法によれば分析温度，キャリヤーガス流速，液相濃度に比較的影響されず正確な同定ができる．

9. ガスクロマトグラフ—質量分析

ガスクロマトグラフ—質量分析は日立製 RM-50 GC により，3 m × 4 mmφ のガラスカラムを用い，1% OV-1 または 2% QF-1 Shimalite W (80～100 メッシュ) で 130°C より 1°C/min の昇温分析を行なつた．試料導入口，インターフェイスは 250°C に保ち，ヘリウムガス流量は約 30 ml/min，イオン化電圧と電流はそれぞれ 50 eV と 80 μA とした．

結　　果

1. 尿量

キャニュレーション直後のコイ尿の流速は 23～25 ml/kg·hr の高値を示した．おそらく実験室多尿症 (Grafflin, 1931) のせいと思われる．この流速は 24 時間以内に 5.3～7.9 ml/kg·hr に減少し，その後はほぼ一定となつた．前述のごとく，初めの 24 時間に排泄された尿は捨て，つぎの 48 時間に採取した尿を実験に供した．なお，1 尾当りの 48 時間尿量は 72～105 ml で，平均 86 ml であつた．

2. ガスクロマトグラフ分析

標準ステロイドとコイ尿中ステロイドの 1% OV-1 および 2% QF-1 カラムによる分析例を Figs. 2～4 に示す．TSIM により完全シリル化した試料の場合には 2% QF-1 の方が分離がよいが，BSA により部分シリル化した試料の場合 1% OV-1 の方がむしろ分離がよかつた．クロマトグラム上の Ⅰ～Ⅻ のピークの MU 値を標準ステロイドのそれらと対比した結果を Table 1 に示す．Table 1 から判るように Ⅰ の MU 値はアンドロステロン MO-TMSi 誘導体のそれに一致する．同様にして他のピークの MU 値を比較すると，Ⅱ はエチオコラノロン，Ⅲ はデヒドロエピアンドロステロン (DHEA)，Ⅳ はアンドロステンジオール，Ⅴ はプレグナンジオール，Ⅵ はプレグナントリオール，Ⅶ はコレステロール，Ⅷ はテトラヒドロコルチゾン (THE)，Ⅸ はテトラヒドロコルチゾール (THE)，Ⅹ はコルトロン，Ⅺ は β-コルトロン，Ⅻ はコルトール，Ⅻ は β-コルトールの誘導体にそれぞれ相当する．なお Fig. 4 において Ⅻ と Ⅻ のピークは他のピークに隠れて検出できなかつた．

アンドロステロン，エチオコラノロン，プレグナンジオール，THE，THF のピークは比較的大きく確認が容易であつたが，他のピークは概して小さく，試料によつては検出されないことがあつた．またアンドロステンジオールピークは個体差が大きく，試料によつてアンドロステロンピークより大きかつたり．DHEA ピークより小さかつたりした．この点含量が少なく，変動幅の小さい人尿中のアンドロステンジオールと著しく異なる．一方，ステロイドパターンの雌雄差は認められず，また遊離ステロイドの量はコレステロールを除いて検出限界以下であつた．コレステロールは代謝産物というよりは，むしろ前駆体と呼ぶべきであるが，排泄量が人尿に比して著しく多く，しかもかなりの量がフリー型であつた．なおコレステロールを除く 12 種のステロイド代謝産物のうち，ほとんどのステロイドは酵素分解のみでほぼ完全に遊離されたのに反し，DHEA とアンドロステンジオールは一部硫酸抱合しているらしく，さらにソルボリシスしなければ完全に遊離されなかつた．

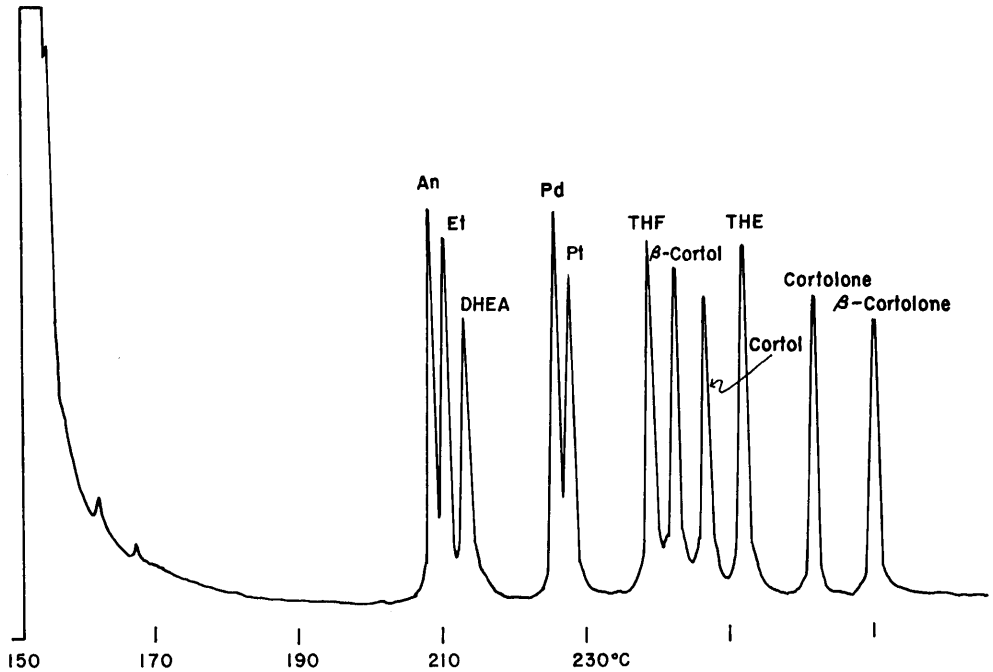

Fig. 2. Gas chromatogram of reference steroids as TMSi and MO-TMSi derivatives (TSIM, 100°C). Separation conditions; 3m×4mm i. d. glass column, 2% QF-1 on 80-100 mesh Shimalite W, temperature programmed at 2°C/min from 150°C. An=androsterone, Et=etiocholanolone, DHEA=dehydroepiandrosterone, Pd=pregnanediol, Pt=pregnanetriol, THF=tetrahydrocortisol, THE=tetrahydrocortisone.

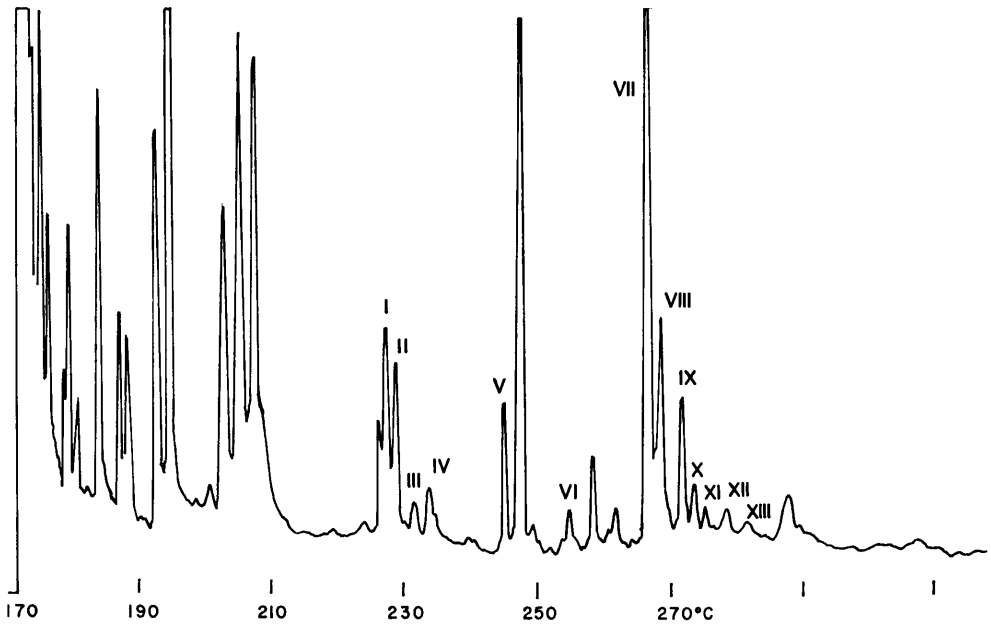

Fig. 3. Gas chromatogram of carp urinary steroids as TMSi and MO-TMSi derivatives (BSA, 20°C). Separation conditions are the same as for Fig. 2, except that a 1% OV-1 (on 80-100 mesh Shimalite W) column was used, and initial temperature was 170°C. I; androsterone, II; etiocholanolone, III; DHEA, IV; androstenediol, V; pregnanediol, VI; pregnanetriol, VII; cholesterol, VIII; THE, IX; THF, X; cortolone, XI; β-cortolone, XII; cortol, XIII; β-cortol.

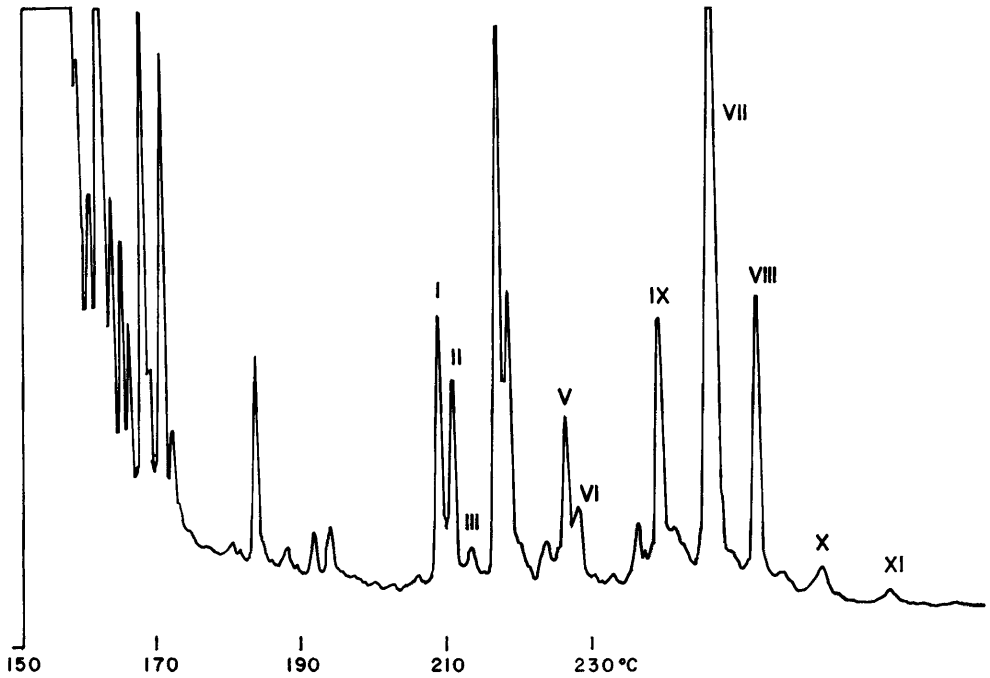

Fig. 4. Gas chromatogram of carp urinary steroids as TMSi and MO-TMSi derivatives (TSIM, 100°C). Separation conditions are the same as for Fig. 2. I ; androsterone, II ; etiocholanolone, III ; DHEA, V ; pregnanediol, VI ; pregnanetriol, VII ; cholesterol, VIII ; THE, IX ; THF, X ; cortolone, XI ; β-cortolone.

Table 1. Methylene unit (MU) values for MO-TMSi derivatives of carp urinary steroids and reference steroids determined by temperature programming with OV-1 and QF-1 liquid phases.

Steroid	Liquid phase		Steroid	Liquid phase	
	OV-1[1]	QF-1[2]		OV-1	QF-1
Compound I (Androsterone)	25.02 (25.02)	26.96 (26.98)	Compound VIII (THE)[4]	31.21 (31.21)	33.43 (33.44)
Compound II (Etiocholanolone)	25.23 (25.22)	27.24 (27.27)	Compound IX (THF)[5]	31.80 (31.82)	31.67 (31.66)
Compound III (DHEA)[3]	25.63 (25.65)	27.76 (27.76)	Compound X (Cortolone)	32.06 (32.09)	34.32 (34.31)
Compound IV (Androstenediol)	25.84 (25.84)	— —	Compound XI (β-Cortolone)	32.35 (32.35)	35.11 (35.07)
Compound V (Pregnanediol)	27.58 (27.58)	29.30 (29.27)	Compound XII (Cortol)	32.63 (32.64)	— (32.89)
Compound VI (Pregnanetriol)	29.06 (29.05)	29.71 (29.72)	Compound XIII (β-Cortol)	32.81 (32.84)	— (32.27)
Compound VII (Cholesterol)	30.77 (30.80)	32.57 (32.58)			

1) 1% OV-1 column, temperature programming at 2°C/min, starting at 170°C.
2) 2% QF-1 column, temperature programming at 2°C/min, starting at 150°C.
3) Dehydroepiandrosterone.
4) Tetrahydrocortisone.
5) Tetrahydrocortisol.

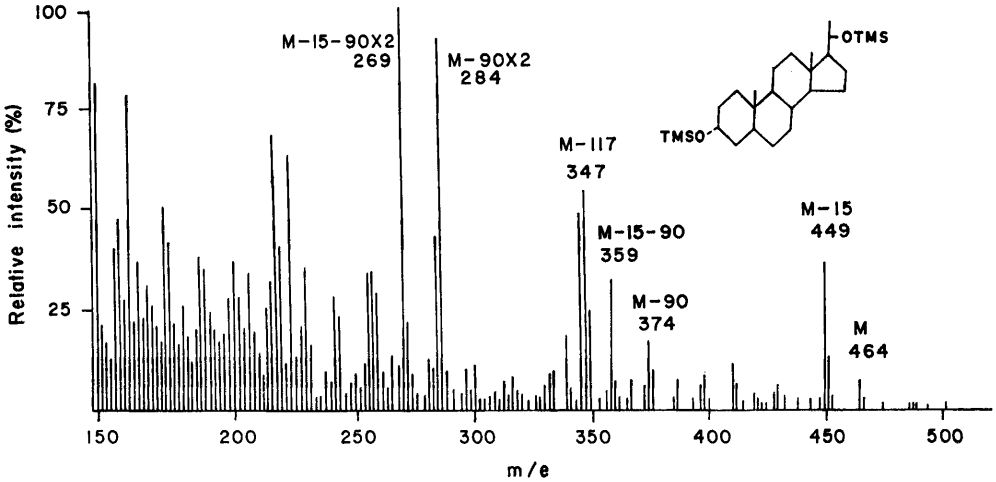

Fig. 5. Mass spectrum of compound V. The fragmentation pattern coincided with that of authentic pregnanediol TMSi derivative. The GC column was a 3 m×4 mm i. d. glass coil packed with 1% OV-1 on Shimalite W. The column temperature was programmed at 1°C/min from 130 to 230°C.

3. ガスクロマトグラフ—質量分析

コイ尿中ステロイドをガスクロマトグラフ—質量分析計にかけ Ⅰ～Ⅻ のマススペクトルを測定した結果，Ⅰ～Ⅹについてはそれぞれ対応する標品ステロイドのMO-TMSi 誘導体のマススペクトルと完全に一致した．しかしながら，Ⅺ～Ⅻ については充填剤からのノイズに邪魔されたり（1% OV-1），巨大なコレステロールピークと重なつたり（2% QF-1)して，満足なマススペクトルが得られなかつた．

ステロイドのMO-TMSi 誘導体のフラグメンテーションパターンに共通した特長はメトキシル基やトリメチルシラノールの離脱に基づく M-31, M-90, M-90×2 等のピークが大きくて確認しやすいことである．Fig. 5 に V（プレグナンジオール TMSi 誘導体）のマススペクトルを示す．m/e 464 が親ピーク (M) で，M-90, M-90×2 に対応するピークが m/e 374, 284 に見られる．m/e 449 (M-15), 359 (M-90-15), 269 (M-90×2-15) はそれらから，さらにメチル基が離脱したために生じたピーク群である．m/e 347 (M-117) は全側鎖の離脱に基づくピークである．つぎに Fig. 6 にⅨ (THF MO-TMSi 誘導体) のマススペクトルを示す．m/e 683 が親ピーク (M) で，M-31, M-31-90, M-31-90×2, M-31-90×3 に対応するピークがそれぞれ m/e 652, 562, 472, 382 に見られる．m/e 523 (M-160), 433 (M-160-90), 343 (M-160-90×2) の一連のピークは全側鎖とトリメチルシラノールの離脱に基づくピーク群である．

考　　察

哺乳類のステロイドホルモンはその代謝過程において，Δ^4 二重結合の還元，3位のカルボニル基の還元，20位のカルボニル基の還元を受け，グルクロン酸または硫酸抱合体として腎臓および胆のうから排泄される（岩井，1967；中尾，1967；松本・魚住，1972)．そしてこの代謝を行なう主要な器官は肝臓と考えられている．

魚類のステロイドホルモンの代謝に関しては Lisboa and Breuer (1966) が肝臓切片を用いた *in vitro* の実験でテストステロンがアンドロステロンやエチオコラノロンに代謝されることを報告している．アンドロゲンは肝臓のみならず，卵巣 (Callard and Leathem, 1965; Reinboth *et al.*, 1966)，精巣 (Simpson *et al.*, 1963)，スタニウス小体 (Cédard *et al.*, 1963) 等においても部分的な代謝を受けることが知られている．プロゲステンについては Arai *et al.* (1969) の報告が唯一のもので，彼等はニジマスの腎組織がプロゲステロンをプレグナンジオン，プレグナノロンおよびそれらの異性体に還元する機能をもつと述べている．

本報において同定したプレグナンジオールとプレグナントリオールは哺乳類ではプロゲステロンの終末代謝産物として知られており，また THE, THF, コ

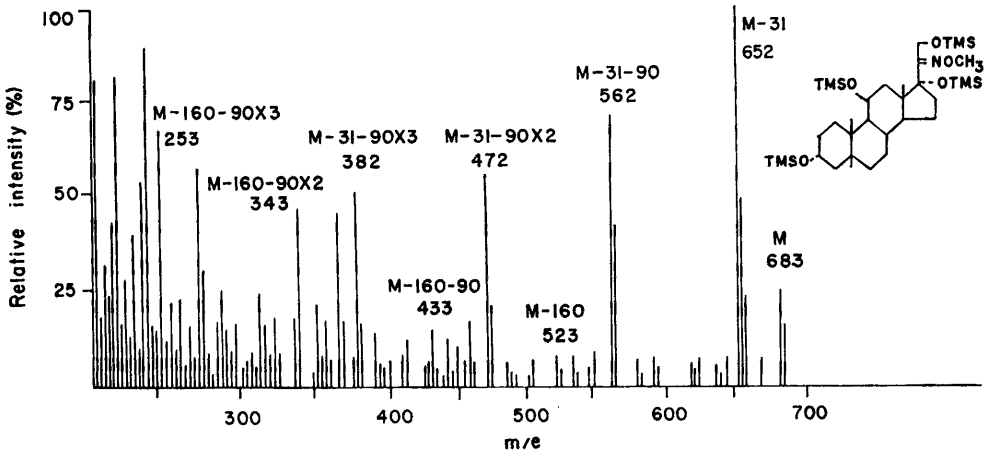

Fig. 6. Mass spectrum of compound IX. The fragmentation pattern coincided with that of authentic THF MO-TMSi derivative. GC conditions are the same as for Fig. 5, except that a 2% QF-1 column was used.

ルトロン，β-コルトロン，コルトール，β-コルトールはコルチゾン，コルチゾールの代謝産物として知られている．これらのステロイドがコイ尿中から検出されたことは魚類のステロイドホルモンの代謝径路が哺乳類と基本的に同じであり，代謝産物の少なくとも一部は腎臓から排泄されることを意味する．排泄径路としては腎臓の他，鰓，胆のう，体表面等が考えられるが，これらの問題については今後さらに検討したい．人尿中には上記のステロイドの他，11-ケトアンドロステロン，11-ケトエチオコラノロン，11-ハイドロキシアンドロステロン，11-ハイドロキシエチオコラノロン，プレグナノロン，プレグネンジオール，プレグネントリオール，プレグネントリオロン，テトラヒドロコルチコステロン等のステロイドの存在が知られているが，これらは今回の実験では検出されなかつた．恐らく存在しないのではなく，検出限界以下であつたためと思う．

予備試験中にコイ尿中に β-グルクロニダーゼ阻害物質が含まれることがわかり，これを除くためいろいろ苦心したが，Amberlite XAD-2 樹脂で処理するのが最も効果的であつた．この阻害物質は人間の尿中の β-グルクロニダーゼ阻害物質としてよく知られているグルコサツカロ-1,4-ラクトン (Marsh, 1963) か，またはそれに類似したものかも知れない．

人尿中のステロイドの分析は現在，医学方面で副腎皮質，睾丸，卵巣，脳下垂体等の内分泌器官の機能検査や妊娠の診断に広く活用されている．魚尿中のステロイドの分析も今後データを蓄積してゆけば，魚卵の成熟度の判定，魚病の診断，さらに農薬や産業廃液によつて起きる魚の生理機能障害の早期発見等に利用できる可能性がある．

要　　約

コイ尿中のステロイド代謝産物を β-グルクロニダーゼとソルボリシス（酢酸エチル－1N H_2SO_4）によつて分解し，得られた遊離ステロイドを酢酸エチルで抽出，溶剤を留去後，MO-TMSi 誘導体にかえてガスクロマトグラフ分析した．分析には島津製 4 BMPF 型ガスクロマト装置を用い，分離は 1%OV-1 と 2%QF-1 カラムで行なつた．

コイ尿中ステロイド（I～XIII）のMU値を標品ステロイドのそれらと対比した結果，アンドロステロン，エチオコラノロン，DHEA，アンドロステンジオール，プレグナンジオール，プレグナントリオール，コレステロール，THE，THF，コルトロン，β-コルトロン，コルトール，β-コルトールを検出した (Table 1)．アンドロステロン～コルトロンについてはさらにマススペクトル測定によつてその構造を確認し得た．

文　　献

Arai, R., H. Tajima and B. Tamaoki 1969 In vitro transformation of steroids by the head kidney, the body kidney, and the corpuscles of Stannius of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **12**: 99-109

Bladlow, H. L. 1968 Extraction of steroid

conjugates with a neutral resin. *Steroids*, **11**: 265-272

Breuer, H. and R. Ozon 1965 Métabolisme des hormones stéroïdes androgènes et oestrogènes chez les Vertébrés inférieurs. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, **54**: 17-33

Breuer, H., R. Ozon and C. Mittermayer 1963 Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. I. Vorkommen von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen bei Fishen und Amphibien. *Z. Physiol. Chem.*, **333**: 272-281

Callard, I. P. and J. H. Leathem 1965 In vitro steroid synthesis by the ovaries of elasmobranchs and snakes. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, **54**: 35-48

Cédard, L. and M. Fontaine 1963 Sur la présence de steroïdes sexuels dans les corpuscules de Stannius du Saumon atlantique (*Salmo salar* L.). *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* **257**: 3095-3097

Fales, H. M. and T. Luukkainen 1965 o-Methoximes as carbonyl derivatives in gas chromatography, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance. *Anal. Chem.*, **37**: 955-957

Grafflin, A. L. 1931 Urine flow and diuresis in marine teleosts. *Am. J. Physiol.*, **97**: 602-610

Horning, E. C. and M. G. Horning 1970 Metabolic profile : Chromatographic methods for isolation and characterization of a variety of metabolites. *In* "Methods in Medical Research", Vol. 12, ed. by R. E. Olson, Year Book Publishers Inc., Chicago. pp. 372-411

Horning, E. C., M. G. Horning, N. Ikekawa, E. M. Chambaz, P. I. Jaakonmaki, and C. J. W. Brooks 1967 Studies of analytical separations of human steroids and steroid glucuronides. *J. Gas Chromatog.*, **5**: 283-289

Idler, D. R., P. J. Schmidt and A. P. Ronald 1960 Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **38**: 1053-1057

Idler, D. R. and B. Truscott 1966 1α-Hydroxycorticosterone from cartilaginous fish : a new adrenal steroid in blood. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **23**: 615-619

Idler, D. R. and B. Truscott 1972 Corticosteroids in fish. *In* "Steroids in nonmammalian vertebrates", ed. by D. R. Idler, Academic Press, New York and London. pp. 126-252

岩井一義 1967 女性ホルモン. 島薗ら：病気の生化学, Vol. 11(A), 内分泌系 I. 中山書店, 東京, 37-44頁

Lisboa, B. P. and H. Breuer 1966 Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. VI. Reduktiver Stoffwechsel von Testosterone und verwandter C_{19}-Steroide in Leberpräparationen der Forelle, des Tritons, des Frosches und des Huhnes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **6**: 114-124

Marsh, C. A. 1963 Metabolism of D-glucuronolactone in mammalian systems. *Biochem. J.*, **86**: 77-86

松本圭史・魚住 徹 1972 医化学領域におけるホルモンとその代謝. A. ステロイドホルモン. 熊原雄一編：医化学実験法講座 6 A, 内分泌系 I, 中山書店, 東京, 13-33頁

Mckim, J. M. 1966 "Stress Hormone Metabolites and their Fluctuations in the Urine of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) under the Influence of Various Sublethal Stressors", Thesis, University of Michigan, Ann Arbor

中尾 健 1967 副腎皮質ステロイド. 島薗ら編：病気の生化学. Vol. 11(B) 内分泌系 II. 中山書店, 東京, 1-59頁

Reinboth, R., I. P. Callard and J. H. Leathem 1966 In vitro steroid synthesis by the ovaries of the teleostfish, *Centropristes striatus* (L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **7**: 326-328

Ryhage, R. 1964 Use of a mass spectrometer as a detector and analyzer for effluents emerging from high temperature gas liquid chromatography columns. *Anal. Chem.*, **36**: 759-764

坂内 昇 1971 尿中ステロイドのガスクロマトグラフィー. 完全シリル化とその尿中ステロイド分析への応用. 医学のあゆみ, **76**: 749-753

Sakauchi, N. and E. C. Horning 1971 Steroid trimethylsilyl ethers. Derivative formation for compounds with highly hindered hydroxyl groups. *Anal. Letters*, **4**: 41-52

Schmidt, P. J. and D. R. Idler 1962 Steroid hormones in the plasma of salmon at various states of maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2**: 204-214

Simpson, T. H., R. S. Wright and H. Gottfried 1963 Steroids in the semen of dogfish (*Squalus acanthias*). *J. Endocrinol.*, **26**: 489-498

Thenot, J-P and E. C. Horning 1972 MO-TMSi derivatives of human urinary steroids for GC and GC-MS studies. *Anal. Letters*, **5**: 21-23

Summary

Steroid metabolites in carp (*Cyprinus carpio*) urine were hydrolyzed with β-glucuronidase and by solvolysis (ethylacetate-1 N H_2SO_4). The liberated steroids were extracted with ethylacetate, converted to methoxime-trimethylsilyl derivatives, and subjected to gas chromatographic (GC) analysis. The GC separations were carried out on 1 % OV-1 and 2 % QF-1 columns, and the retention data (MU values) of carp urinary steroids (I-XIII) were compared with those of reference steroids identically treated with the above procedures (Table 1). The structures of the compounds I-X were also confirmed by GC-Mass spectrometry.

The results showed the presence of androsterone, etiocholanolone, DHEA, androstenediol, pregnanediol, pregnanetriol, cholesterol, THE, THF, cortolone, β-cortolone, cortol and β-cortol in the urine of carp.