

報 文

高速液体クロマトグラフィーによるヒト血漿中鎖脂肪酸の定量 及びホモシステイン濃度との関連性評価

園部千賀子¹, 中村真裕美¹, 和田 光弘¹, 中島憲一郎^{®1}

セミマイクロカラム高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による簡便で汎用性の高い中鎖脂肪酸 (medium-chain fatty acids, MCFAs) 類の分析法を確立した。MCFAs は 2-(4-hydrazinocarbonylphenyl)-4,5-diphenylimidazole (HCPI) を用いて蛍光ラベル化後, HPLC 分析を行った。血漿試料の前処理として, CH₃CN 及びジメチルホルムアミド混液による簡便な除タンパク操作を行うのみで血漿中の MCFAs を定量可能であった。C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄ 及び C₁₆ の 6 種類のラベル化した MCFAs は CH₃CN と水混液によるグラジエント溶出により 35 分以内に分離・定量することができた。シグナル/ノイズ比が 3 の場合の検出下限は 7.3 ~ 13.0 fmol/5 µL injection と高感度であった。更に本法をヒト血漿に適用し, MCFAs と冠血管疾患の独立危険因子であるホモシステインとの関連性について, 血漿濃度レベルに基づいて評価を行った。

1 緒 言

中鎖脂肪酸 (medium-chain fatty acids, MCFAs) は, ミルクやココナツオイルなどの食品に多く含まれる天然成分であり, 未熟児及び手術後の栄養補給を目的に用いられている¹⁾²⁾。また, その効果として, 体脂肪及び体重の減少効果や, tumor necrosis factor- α によるフリーラジカル形成の抑制作用及び抗菌作用などの報告がある^{2)~10)}。そのうち, 体脂肪の減少作用及びそれに伴う体重の減量効果は近年大きく注目されており, これを多く含む食用油が特定保健用食品として市販されている。MCFAs は長鎖脂肪酸 (long-chain fatty acids, LCFAs) に比べて脂肪組織中に貯蓄されにくく, β -酸化を受けやすいため, エネルギー効率の低下を誘導すると考えられ, 体重や体脂肪を減少させると考えられている²⁾³⁾⁷⁾。

他方, 肥満や生活習慣病は近年, 急激な増加傾向にあり, これらの予防に対して社会的な関心が非常に高まっている。動脈硬化症や糖尿病などの生活習慣病の危険因子として肥満や血漿中ホモシステイン (Hcy) 濃度の上昇や, 血漿中アディポネクチン濃度の低下などが知られている。特に肥満は, 冠動脈疾患 (coronary artery disease, CAD) 及び 2 型糖尿病の重要な危険因子となることが知られている¹¹⁾¹²⁾。肥満は, 血漿中遊離脂肪酸 (free fatty acids, FFAs) 濃度の著しい上昇を伴い, 粥腫発生を引き起こし, 動脈硬化症の進行を促進する。更に, アディポネクチン濃度の低下によりインスリン抵抗性を誘発し, 糖尿病を悪化

させる¹³⁾。よって, 健康人の MCFAs 濃度レベルとその変動を調べることで, これらを予防する上で重要な臨床的知見を得ることができると考えられる。

本研究では, より簡便で汎用性の高い MCFAs の分析法を開発する目的で, セミマイクロカラム HPLC-蛍光 (FL) 定量法を開発し, ヒト血漿に適用した。著者らはこれまでに, 蛍光ラベル化試薬, 2-(4-hydrazinocarbonylphenyl)-4,5-diphenylimidazole (HCPI) を用いる数種の飽和脂肪酸 [ラウリル酸 (C₁₂), ミリスチン酸 (C₁₄), パルミチン酸 (C₁₆), ステアリン酸 (C₁₈)]¹⁴⁾, カルニチン及びアシルカルニチン¹⁵⁾ の HPLC-FL 及び 2 種の飽和脂肪酸 (C₁₆, C₁₈) の化学発光法を報告している¹⁶⁾。HPLC-FL 法は, 高感度かつ装置が安価であり, 汎用される方法である。これに加えて, セミマイクロカラムを用いることで, 溶離液量及び試料量を削減することができ, 環境への負荷や経費を軽減することができる。更にヒト血漿のような採取量の限られる試料を測定するのに有効な方法である。今回はセミマイクロカラムを用いることで, 廃液量の軽減及び使用血漿量を減量することが可能であった。MCFAs 及び内標準物質 (I.S.) の HCPI ラベル化体は, イソクラティックな溶離条件での同時溶出が困難であったため, グラジエント溶離条件を用いて分離・定量を行った。更に, 本法をヒト血漿に適用し, MCFAs と冠血管疾患の独立危険因子である Hcy との関連性について, 血漿濃度レベルで評価を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

カプロイル酸 (C₆), カプリル酸 (C₈) 及び C₁₄ はシグ

¹ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命科学専攻; 852-8521
長崎県長崎市文教町 1-14

マ製特級試薬を用いた。カプリン酸 (C_{10} , 特級), C_{12} (特級) 及び CH_3CN (HPLC分析用) は和光純薬製を用いた。 C_{16} (1級) は東京化成工業から購入した。I.S. として検討したエナント酸 (C_7) 及びマーガリン酸 (C_{17}) はナカライテスク製特級試薬を用いた。HCPI は以前報告した方法により当研究室で合成した¹⁴⁾。ジメチルホルムアミド (DMF, 特級) 及び 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC, 特級) は同仁化学より購入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

水は、蒸留水製造装置ピュアライン WL-21p (ヤマト科学) で製造した精製水をメンブレンフィルター (JGWP04700, 0.2 μm , ミリポア) を用いて濾過したものをを用いた。

MCFA 標準品は DMF を用いて溶解し、すべて 100 $\mu mol/mL$ となるように調製したものを保存溶液とした。分析時には、保存溶液を DMF で適宜希釈して使用した。なお、 C_{14} 及び C_{16} は長鎖脂肪酸であるが、中鎖脂肪酸に近い長鎖脂肪酸として分析対象に含めている。

2.2 試料

血漿試料は、住民基本健康診断の受診者から採取されたものをを用いた。検体は分析まで $-30^{\circ}C$ 以下で保存した。

2.3 HPLC システム及び測定条件

MCFA の分析に用いた HPLC システムは、2 台の HPLC 用送液ポンプ (LC-10AD 及び LC-20AD, 島津), SCL-10AD_{VP} 型システムコントローラー (島津), 7125 型インジェクター (試料注入量, 5 μL , レオダイン), CTO-6AS 型カラムオーブン ($35^{\circ}C$, 島津), RF-10A_{XL} 型 FL 検出器 (島津) 及び 3066 型記録計 (横河) から成る。分離カラムには市販の ODS カラム (Daisopak SP-120-5-ODS-BP, 250 \times 2.0 mm i.d., 5 μm , ダイソー) を、溶離液には H_2O [MP 1] 及び CH_3CN [MP 2] を用いて、総流速 0.4 mL/min で送液した。タイムプログラムは 47% MP2 (0~7 min), 47~62% MP2 (7~16 min, linear), 62% MP2 (16~19 min), 62~95% MP2 (19~31 min, linear), 95% MP2 (31~35 min) 及び 47% MP2 (35~45 min) とした。検出波長は、 $\lambda_{ex} = 335$ nm 及び $\lambda_{em} = 455$ nm を用いた。

2.4 ヒト血漿の前処理及び蛍光ラベル化

ヒト血漿 50 μL に、I.S. 10 μL を添加後、 CH_3CN/DMF (30/70) 混液 240 μL を加え除タンパクを行った。30 秒間攪拌後、1500g で 15 分間遠心分離し、得られた上澄み 250 μL をメンブレンフィルター (0.2 μm) を用いて濾過したものを試料溶液とした。

ラベル化反応は以下に示す操作で行った。試料溶液 50 μL

に、1.0 M EDC 25 μL , 10% ピリジン 25 μL 及び 30 mM HCPI 50 μL を加え、室温で 45 分間反応させた。

2.5 メソッドバリデーション

検量線は、血漿に既知濃度の MCFA 標準溶液を添加し、内標準法により作成した。検出下限は、MCFA 標準品を用い、シグナル/ノイズ (S/N) 比が 3 となる場合の濃度を算出した。正確さ、日内及び日間 (7 日間内の 5 日) の繰り返し測定における精度は、既知濃度の標準添加血漿を用いて算出した。回収率は、標準添加血漿及び未添加血漿の MCFA ピーク高さの差と標準品のピーク高さの比から算出した。

2.6 血漿中 Hcy の定量

ヒト血漿中の Hcy 濃度の測定は、ammonium-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate (SBD-F) を蛍光ラベル化試薬として用いる HPLC-FL 法を改良して用いた¹⁷⁾¹⁸⁾。分離カラムには市販の Daisopak SP-120-5-ODS-BP (250 \times 2.0 mm i.d., 5 μm , ダイソー) を用い、溶離液として 25 mM phosphate buffer (pH 2.0)/ CH_3CN (96 : 4) を流速 0.3 mL/min で送液した。定量下限 ($S/N = 10$) は 1.0 nmol/mL であった。検体は Hcy 濃度を基に、 <15 nmol/mL の検体を Normal Hcy 群、 ≥ 15 nmol/mL の検体を High Hcy 群に分類し、両者間での MCFA 濃度を比較した。Normal Hcy 群及び High Hcy 群間の MCFA 濃度の差の検定は Student's *t*-test を用い、 $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした。各群での性別あるいは年齢における MCFA 濃度差の検定は、一元配置分散分析法で全体の群間の差を確認した後、有意であった場合 ($P < 0.05$) に、個々の群間の差を Tukey 法を用いて行い、 $P < 0.05$ の場合に有意差有りとした。

3 結果及び考察

3.1 メソッドバリデーション

MCFA 標準溶液を添加したヒト血漿試料を用いて添加検量線を作成したところ、0.1~500 nmol/mL の範囲において良好な直線性 ($r \geq 0.999$) を示した。I.S. には、 C_7 及び C_{17} のうち、分離のより良好であった C_{17} を用いた。これらの化合物はいずれも血漿試料から検出されなかった。添加検量線を作成した際のクロマトグラムを Fig. 1 に示す。ヒト血漿試料に添加した標準溶液濃度はそれぞれ 30 nmol/mL である。保持時間はそれぞれ 11.5 min (C_6), 14.5 min (C_7), 17.0 min (C_8), 22.5 min (C_{10}), 27.0 min (C_{12}), 30.5 min (C_{14}), 33.3 min (C_{16}) 及び 34.5 min (C_{17}) であった。各 MCFA の回収率は 98.9~107.6% であった (Table 1)。

MCFA 標準溶液を用いた場合の装置検出下限は S/N 比 3 のとき、7.8 pmol/mL (= 13.0 fmol; C_6), 5.6 pmol/mL

(= 9.3 fmol ; C₈), 7.5 pmol/mL (= 12.5 fmol ; C₁₀), 5.8 pmol/mL (= 9.7 fmol ; C₁₂), 4.4 pmol/mL (= 7.3 fmol ; C₁₄) 及び 5.9 pmol/mL (= 9.8 fmol/5 µL injection ; C₁₆) であった。これはコンベンショナルな ODS カラムを用いる方法¹⁴⁾と比較すると、同程度の検出感度 (従来法では 7~57 fmol/20 µL injection ; S/N=3) であり、かつ本法では測定に必要な血漿量を 1/2 に減量することができた (従来法では 100 µL)。一方、検出下限値は、27.8 fmol

(C₆), 20.9 fmol (C₈), 23.8 fmol (C₁₀), 17.1 fmol (C₁₂), 10.9 fmol (C₁₄) 及び 13.6 fmol/5 µL injection ; (C₁₆) であった。室温下での 3-プロモアセチル-7-メトキシクマリンを用いた誘導体化あるいはクロロホルムによる固相抽出を行っている既報の HPLC-FL 検出を用いた MCFAs 定量法¹⁹⁾²⁰⁾における検出下限は、それぞれ 0.4 pmol/5 µL injection (S/N=3) 及び 10~500 pmol/50 µL injection (S/N=5) であり、本法の感度はこれらよりも高感度であった。更に従来のコンベンショナルカラム法に比べ、移動相流速を 40% に、また試料注入量を 25% に低減することができ、環境への負荷が少ない分析法とすることができた¹⁴⁾。

Table 2 に本法の正確さ、日内及び日間の繰り返し測定における精度を示す。正確さは 95.4~106.4%, 精度は R.S.D. (n=5) で日内変動は 7.0% 以下、日間変動は 4.6%

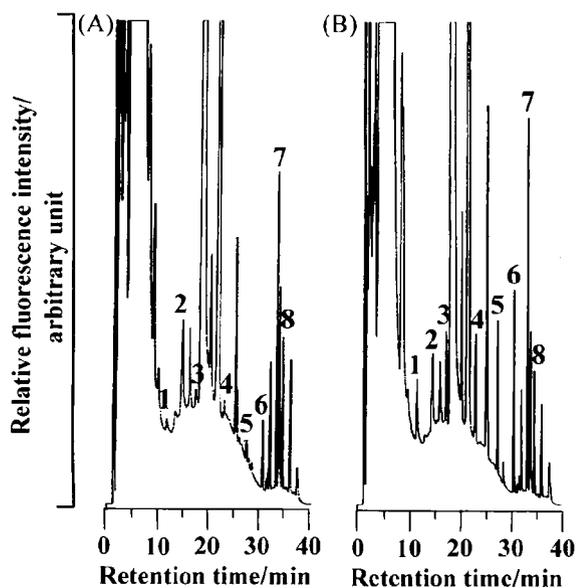


Fig. 1 Chromatograms of HCPI-MCFAs in human plasma (A) and that spiked with a standard mixture (B)

Peaks : 1 = C₆, 2 = C₇, 3 = C₈, 4 = C₁₀, 5 = C₁₂, 6 = C₁₄, 7 = C₁₆ and 8 = C₁₇; Spiked concentrations : 30 nmol/mL ; Retention time : 11.5 min for C₆, 14.5 min for C₇, 17.0 min for C₈, 22.5 min for C₁₀, 27.0 min for C₁₂, 30.5 min for C₁₄, 33.3 min for C₁₆ and 34.5 min for C₁₇

Table 1 Calibration range and recovery of MCFAs in human plasma

MCFAs	Calibration range/nmol mL ⁻¹	r ^{a)}	Recovery, % ^{b)}
C ₆	0.1~50	1.000	99.8
	1~500	1.000	
C ₈	0.1~50	1.000	98.9
	1~500	0.999	
C ₁₀	0.1~50	1.000	107.6
	1~500	0.999	
C ₁₂	0.1~50	1.000	102.5
	1~500	1.000	
C ₁₄	0.1~50	0.999	99.0
	1~500	1.000	
C ₁₆	0.1~50	1.000	101.5
	1~500	0.999	

a) Correlation coefficient ; b) Recovery % = peak height of MCFAs spiked to plasma/peak height of standard × 100

Table 2 Accuracy, intra- and inter-day assay precision of the proposed method

MCFAs	Spiked conc./nmol mL ⁻¹	Found conc. (Mean ± S.D.) ^{a)} /nmol mL ⁻¹	Accuracy, %	Precision, % (R.S.D.) ^{a)}	
				Intra-day	Inter-day
C ₆	1	1.0 ± 0.1	103.0	4.9	3.7
	500	489.2 ± 30.1	97.8	6.1	3.2
C ₈	1	1.0 ± 0.1	95.4	5.2	1.6
	500	487.7 ± 27.4	97.5	5.6	1.5
C ₁₀	1	1.0 ± 0.1	102.2	6.5	1.1
	500	481.6 ± 31.8	96.3	6.6	2.6
C ₁₂	1	1.1 ± 0.1	104.9	5.9	4.6
	500	491.5 ± 21.6	98.3	4.4	1.4
C ₁₄	1	1.0 ± 0.1	99.9	5.6	3.5
	500	496.8 ± 19.5	99.4	3.9	1.8
C ₁₆	1	1.0 ± 0.1	106.4	7.0	4.0
	500	505.8 ± 18.3	101.2	3.6	2.3

a) n = 5

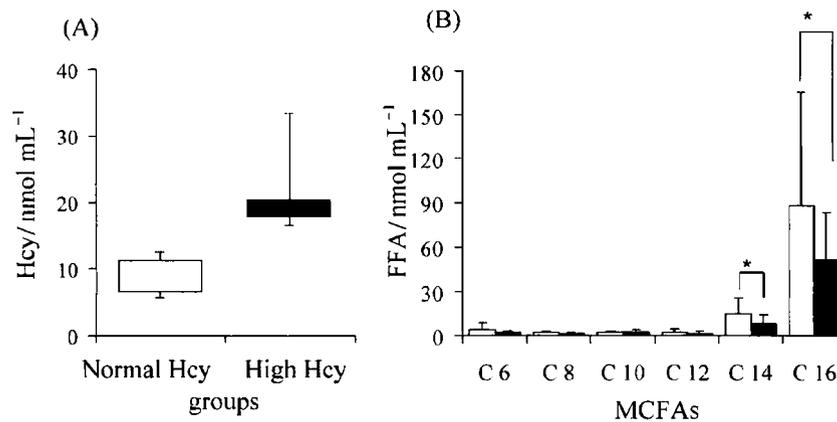


Fig. 2 Hcy (A) and MCFAs (B) concentrations in human plasma for Normal Hcy and High Hcy groups

○, □: Normal Hcy group ($n = 25$), 5 ~ 15 nmol/mL; ●, ■: High Hcy group ($n = 24$), >15 nmol/mL

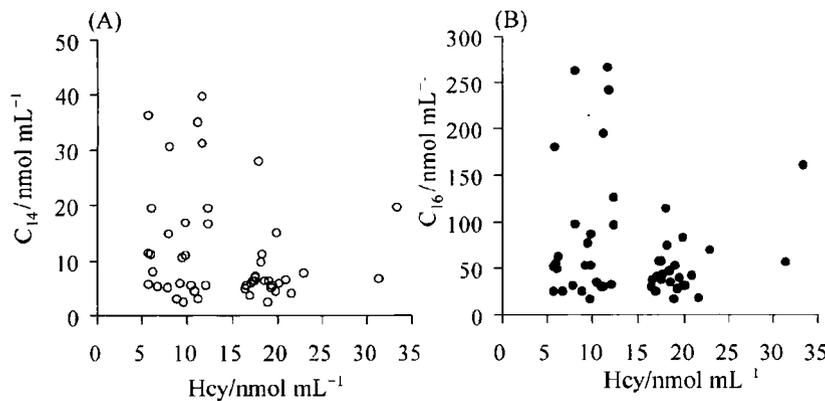


Fig. 3 Correlations between concentration of C_{14} (A) and C_{16} (B) with that of Hcy in human plasma

以下と良好であった。

3・2 中鎖脂肪酸とホモシステインの濃度レベルにおける関連性の評価

あらかじめ血漿中 Hcy 濃度レベルを測定した検体を High Hcy 群 (≥ 15 nmol/mL) 及び Normal Hcy 群 (< 15 nmol/mL) の 2 群に分類した。Hcy の基準範囲は 5 ~ 15 nmol/mL と考えられており²¹⁾、高ホモシステイン血症が動脈硬化などの血管障害のリスクを高めることが知られている²²⁾。両群の血漿中 Hcy 濃度レベル (平均 \pm SD) は、それぞれ 19.9 ± 4.2 nmol/mL ($n = 24$) 及び 9.1 ± 2.3 nmol/mL ($n = 25$) であった [Fig. 2 (A)]。この 2 群間において MCFAs の血漿濃度レベルの比較を行った [Fig. 2 (B), $P < 0.05$]。High Hcy 群において C_{14} [14.3 ± 11.6 nmol/mL (Nor) vs. 7.9 ± 5.6 nmol/mL (High)] 及び C_{16} [88.0 ± 78.4 nmol/mL (Nor) vs. 51.2 ± 32.1 nmol/mL (High)] は、Normal Hcy 群に比ベ有意に低い濃度を示したが、その他の脂肪酸に有意差は見られなかった。ま

た、 C_{12} では High Hcy 群において低濃度となる傾向が見られたが、統計学的には有意差は見られなかった [2.4 ± 2.0 nmol/mL (Nor) vs. 1.6 ± 1.1 nmol/mL (High)]。

次に、両 Hcy 群間で差が見られた C_{14} 及び C_{16} について血漿 Hcy 濃度レベルとの相関性を検討した ($n = 49$)。Fig. 3 (A) は C_{14} と Hcy 濃度間の相関性を検討した結果である。相関係数 (r) は 0.20 であり、両者の間には明確な相関は見られなかった。同様に C_{16} の場合にも相関は見られなかった [$r = 0.11$, Fig. 3 (B)]。

各 Hcy 群において性別及び年齢別に MCFAs の血漿濃度レベルを比較した。年齢別の比較では、50 歳代以下、60 歳代及び 70 歳代以上の群に分類した。

まず、両群について性別による MCFAs の血漿濃度レベルの比較を行った。 C_{10} において、男性の Normal Hcy 群 (1.5 ± 1.0 nmol/mL, $n = 9$) と女性の High Hcy 群 (2.9 ± 1.1 nmol/mL, $n = 12$) で有意な差が見られた ($P < 0.05$)。このほか、 C_{14} において女性の Normal Hcy 群 (16.6 ± 11.1 nmol/mL, $n = 16$) と High Hcy 群 (5.9 ± 1.2 nmol/mL,

$n = 12$) で有意な差が見られた ($P < 0.05$)。今回の結果から Hcy レベルのほか、性別による差などが特定の脂肪酸レベルに複合的に関与していることが示唆されたが、より明確なものにするためには、今後検体数を増やすなどの検討が必要であろうと考える。

次に、年齢別での両群間の MCFAs の血漿濃度レベルを比較した。C₁₂、C₁₄ 及び C₁₆ に関して同年代で、High Hcy 群において Normal Hcy 群よりも低い血漿中濃度を示す傾向が見られたが、いずれの場合も有意差は見られなかった。

これまでに、脂質代謝パラメーターと Hcy 及びアディポネクチンの濃度レベルにおける相関性に関する幾つかの疫学調査が行われている^{23)~25)}。FFAs を含む脂質代謝パラメーターとアディポネクチンの濃度レベルには相関性があることが示されており²⁶⁾、また FFAs と幾つかの脂質代謝パラメーターとの相関性、及び FFAs と CAD リスクとの相関性を示す報告がある²⁷⁾²⁸⁾。更に幾つかの脂質代謝パラメーターと Hcy の濃度レベルには相関性が示されているが、著者らの知る限り FFAs と Hcy の濃度レベルにおけるその相関性に関する報告はない^{23)~25)}。本研究は、MCFAs と Hcy との関連性について、血漿濃度レベルで評価を行った初めての報告である。

4 結 言

本法は、除タンパク操作のみの簡便な前処理によるヒト血漿中 MCFAs の定量が可能であった。また、セミマイクロカラムを用いることで測定に必要な血漿量及び廃液量を減量することができ、被験者及び環境への負荷の少ない分析法とすることができた。

更に、MCFAs と Hcy の血漿濃度レベルにおける関連性について評価を行ったところ、C₁₄ 及び C₁₆ などの血漿中存在比の大きい脂肪酸の濃度が Hcy 濃度レベルに影響を与える可能性が示された。また、性別及び年齢が血漿中 MCFAs 濃度レベルに与える影響は、幾つかの MCFAs で統計的な有意差が見られたものの、そのばらつきの大きさから明確な関連性を見いだすことはできなかった。この点については今後、検体数を増やすなど、更なる検討を行うことが必要であると考えられる。

以上、本法は血漿中 MCFAs 測定のための感度も十分であり、MCFAs 類の分析に有用であると考えられる。

文 献

- 1) W. Guo, J. K. Choi, J. L. Kirkland, B. E. Corkey, J. A. Hamilton: *Biochem. J.*, **349**, 463 (2000).
- 2) B. Marten, M. Pfeuffer, J. Schrezenmeir: *Int. Dairy J.*, **16**, 1374 (2006).
- 3) J. Han, J. A. Hamilton, J. L. Kirkland, B. E. Corkey, W. Guo: *Obes. Res.*, **11**, 734 (2003).
- 4) B. S. Cha, T. P. Ciaraldi, K. S. Park, L. Carter, S. R. Mudaliar, R. R. Henry: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **289**, E151 (2005).
- 5) U. L. J. Sousa, M. Arnold, W. Langhans, N. Geary, M. Leonhardt: *Physiol. Behav.*, **87**, 388 (2006).
- 6) H. Kono, N. Enomoto, H. D. Connor, M. D. Wheeler, B. U. Bradford, C. A. Rivera, M. B. Kadiiska, R. P. Mason, R. G. Thurman: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **278**, G467 (2000).
- 7) A. A. Papamandjaris, D. E. Macdougall, P. J. H. Jones: *Life Sci.*, **62**, 1203 (1998).
- 8) Y. Nishi, H. Hiejima, H. Hosoda, H. Kaiya, K. Mori, Y. Fukue, T. Yanase, H. Nawata, K. Kangawa, M. Kojima: *Endocrinol.*, **146**, 2255 (2005).
- 9) F. V. Immerseel, J. D. Buck, F. Boyen, L. Bohez, F. Pasmans, J. Volf, M. Sevcik, I. Rychlik, F. Haesebrouck, R. Ducatelle: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3582 (2004).
- 10) H. Thormar, C. E. Isaacs, H. R. Brown, M. R. Barshatzky, T. Pessolano: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 27 (1987).
- 11) N. G. Forouhi, N. Sattar: *Atherosclero. Suppl.*, **7**, 11 (2006).
- 12) A. Garg: *Clin. Cornerstone*, **8**, S7 (2006).
- 13) N. G. Forouhi, N. Sattar: *Atheroscler. Suppl.*, **7**, 11 (2006).
- 14) K. Nakashima, Y. Taguchi, N. Kuroda, S. Akiyama: *J. Chromatogr.*, **619**, 1 (1993).
- 15) G. L. Duan, K. Nakashima, N. Kuroda, S. Akiyama: *J. Chin. Pharm. Sci.*, **4**, 22 (1995).
- 16) N. Kuroda, Y. Ohyama, K. Nakashima, K. Nakashima, S. Akiyama: *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1525 (1996).
- 17) A. J. Garcia, R. A. Castro: *J. Chromatogr. B*, **779**, 359 (2002).
- 18) I. Ferme, C. Arcelloni, G. Mazzola, A. D. Angelo, R. Paroni: *J. Chromatogr. B*, **719**, 31 (1998).
- 19) A. Takadate, T. Masuda, C. Tajima, C. Murata, M. Irikura, S. Goya: *Anal. Sci.*, **8**, 663 (1992).
- 20) J. Stein, V. Milovic, S. Zeuzem, W. F. Caspary: *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 2915, (1993).
- 21) L. Brattstrom, D. E. Wilcken, J. Ohrvik, L. Brudin: *Circulation*, **98**, 2520, (1998).
- 22) G. N. Welch, J. Loscalzo: *N. Engl. J. Med.*, **338**, 1042 (1998).
- 23) Z. Dzielinska, A. Januszewicz, A. Wiecek, M. Demkow, M. Makowiecka-Ciesla, A. Makowiecka-Ciesla, A. Prejbosz, J. Kadziela, R. Mielniczuk, E. Florczak, J. Janas, M. Januszewicz, W. Ruzyllo: *Thromb. Res.*, **110**, 365 (2003).
- 24) A. E. Altinova, F. Toruner, N. Bukan, D. G. Yasar, M. Akturk, N. Cakir, M. Arslan: *Endocr. J.*, **54**, 221 (2007).
- 25) H. Sakuta, T. Sizuki, H. Yasuda, T. Ito: *Endocr. J.*, **52**, 241 (2005).
- 26) E. L. Bernstein, P. Koutkia, K. Ljungquist, J. Brey, B. Canavan, S. Grinspoon: *Metabolism*, **53**, 790 (2004).
- 27) T. Tholstrup, C. Ehnholm, M. Jauhiainen, M. Petersen, C. E. Høy, P. Lund, B. Sandström: *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**, 564, (2004).
- 28) S. Pilz, H. Scharnagl, B. Tiran, U. Seelhorst, B. Wellnitz, B. O. Boehm, J. R. Schaefer, W. März: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 2542 (2006).

HPLC Determination of Medium-Chain Fatty Acids in Human Plasma and Their Relationship with Homocysteine Concentration

Chikako SONOBE¹, Mayumi NAKAMURA¹, Mitsuhiro WADA¹ and Kenichiro NAKASHIMA¹

¹ Department of Clinical Pharmacy, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

(Received 21 March 2008, Accepted 4 June 2008)

A simple and rapid semi-micro column HPLC-fluorescence method for the determination of medium-chain fatty acids (MCFAs) is described. The MCFAs involving C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄ and C₁₆ were labeled with 2-(4-hydrazinocarbonylphenyl)-4,5-diphenylimidazole (HCPI). A simple deproteinization with a mixture of CH₃CN and dimethylformamide was employed for the extraction of MCFAs in plasma. The separation of HCPI-MCFAs was achieved within 35 min on a semi-micro ODS column (Daisopak-SP-120-5-ODS-BP, 250 × 2.0 mm, i.d.) by gradient elution with a mixture of H₂O and CH₃CN. The detection limits of MCFAs at a signal-to-noise ratio of 3 were in the range of 0.15 ~ 0.26 pmol/5 μL injection. Furthermore, the proposed method was applied to determine MCFAs in human plasma. The relation between the levels of MCFAs and homocysteine, which is considered to be an independent risk factor for atherosclerosis, was estimated.

Keywords : medium chain fatty acid ; homocysteine ; HPLC ; fluorescence labeling.