

アシルカルニチン ($C_3 \sim C_{10}$, C_5 -di $\sim C_{12}$ -di) 定量分析

—カルボン酸分析計を応用した定量分析法—

木 戸 内 清

要約: カルボン酸分析計を応用したアシルカルニチン定量分析法について検討した結果、炭素数 10 (デカノイル) 以下のモノカルボン酸アシルカルニチンと炭素数 12 (ドデカンジオイル) 以下のジカルボン酸アシルカルニチンの同時分析ができ、また 10 nmol から 1000 nmol/ml の間でよい定量性を得た。本分析法は 1 検体 2 時間 30 分で尿アシルカルニチンの連続自動分析ができ、有機酸代謝異常症の診断と病態の解析に有用であることを確認した。

見出し語: 有機酸代謝異常症, カルニチン, アシルカルニチン, 液体クロマトグラフィー

研究目的

有機酸代謝異常症の化学診断にはガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー (GC/MS) による有機酸分析がもっぱら用いられている。しかしこの方法では診断できず、アシルカルニチン分析によって初めて診断されたグルタル酸尿症 1 型¹⁾や中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症²⁾が最近報告された。

生体内に蓄積するアシル CoA を直接反映するアシルカルニチンの定量分析は従来の有機酸分析とともに有機酸代謝異常症の診断とその病態の解析に欠かすことができない³⁾。

著者たちはカルボン酸分析計を応用したアシルカルニチン分析法の確立に取り組んでい

る^{4)~6)}。今回、炭素数 10 (デカノイル) 以下のモノカルボン酸アシルカルニチンと炭素数 12 (ドデカンジオイル) 以下のジカルボン酸アシルカルニチンの同時分析が可能となり、また高感度化と分析時間の短縮ができたので報告する。

研究方法

分離液の流速は 0.6 ml/min に設定した。低圧グラジエント装置 (東京理科器械) を用いて 2 時間 20 分間に 10 mM 磷酸・120 mM 過塩素酸バッファー (A 液) のアセトニトリル濃度を 0% から 50% (B 液; 50% アセトニトリル/A 液, v/v) に換えた [0-5 分 (100%

名古屋市立東市民病院小児科

(Depart. of Pediatrics, Nagoya City Higashi General Hospital)

A液); 6-30分 (97% A液, 3% B液ステップ); 31分 (85% A液, 15% B液); 32-45分の間で80% A液, 20% B液にグラジエント; 46-65分 (80% A液, 20% B液); 66-70分の間で55% A液, 45% B液にグラジエント; 71-90分 (55% A液, 45% B液); 91-95分の間で45% A液, 55% B液にグラジエント; 96-110分 (45% A液, 55% B液); 111-120分の間で100% B液にグラジエント; 121-140分 (100% B液)]. ONPH 試薬の塩酸濃度は 0.4 M とした。他の分析条件と尿の前処理法は従来と同じである⁶⁾。アシルカルニチン標品はカルニチンと有機酸クロライドあるいは酸無水物を用いて合成した。生体試料としてプロピオン酸血症例, メチルマロン酸尿症例, グルタル酸尿症 1型およびマルチプルアシル CoA 脱水素酵素反応の欠損症例の尿を用いた。

研究結果および考察

今回の検討により, 本分析法の感度は昨年報告した検出感度の約3倍となり, 定量性は10 nmol~1000 nmol の間でよい直線性を確認した。アジピルカルニチンと3メチルグルタルルカルニチンは10-15%のアセトニトリル濃度で分離したが, 今回設定したグラジエント条件では同じ分離時間であった(図1)。18種のアシルカルニチンの分離時間の変動係数(C.V.%)は0.14から0.71の間にあり(表1), 複雑なグラジエント設定にもかかわらずよい再現性を確認した。分離液の流速として0.6 ml/minを用いたことにより, 分析時間の短縮が可能となり, 1検体が2時間20分, 1分析サイクル2時間30分で連続自動分析できた。プロピオン酸血症例とメチルマロン酸尿症例(図2)では特異的なアシルカルニチンとしてプロピオニルカルニチンがそれぞれ4274,978 $\mu\text{mol/g creatinine}$ が検

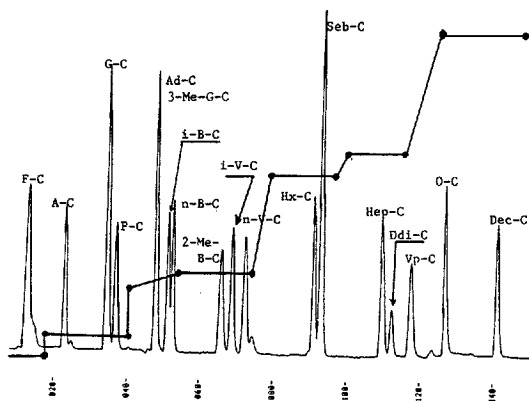


図1. アシルカルニチン標品の分析クロマトグラム

- F-C: カルニチン, A-C: アセチルカルニチン, G-C: グルタルルカルニチン
P-C: プロピオニルカルニチン, Ad-C: アジピルカルニチン
3-Me-G-C: 3-メチルグルタルルカルニチン, i-B-C: イソブチルルカルニチン
n-B-C: ブチルルカルニチン, 2-Me-B-C: 2メチルブチルルカルニチン
i-V-C: イソバレリルルカルニチン, n-V-C: バレリルルカルニチン
Hx-C: ヘキサノイルカルニチン, Seb-C: セバシルカルニチン
Hep-C: ヘプタノイルカルニチン, Ddi-C: ドデカンジオイルカルニチン
Vp-C: パルプロイルカルニチン, O-C: オクタノイルカルニチン
Dec-C: デカノイルカルニチン

表 1. The reproducibility of retention time for acylcarnitines

samples(n=5)	retention times(min.)		C.V.(%)
	mean	± S.D.	
acetylcarnitine	23.83	0.17	0.71
glutarylacarnitine	39.99	0.23	0.57
propionylcarnitine	42.14	0.22	0.51
adipylcarnitine	57.88	0.08	0.14
3-methylglutarylacarnitine	57.88	0.08	0.14
iso-butyrylcarnitine	60.76	0.13	0.21
n-butyrylcarnitine	61.94	0.17	0.28
suberylcarnitine	72.76	0.46	0.63
2-methylbutyrylcarnitine	74.80	0.47	0.63
iso-valerylcarnitine	77.59	0.47	0.61
n-valerylcarnitine	80.55	0.45	0.56
hexanoylcarnitine	97.98	0.17	0.18
sebacylcarnitine	98.27	0.17	0.18
heptanoylcarnitine	101.30	0.26	0.26
dodecandioylcarnitine	109.40	0.63	0.58
valproylcarnitine	106.04	0.26	0.25
octanoylcarnitine	112.80	0.46	0.40
decanoylcarnitine	136.04	0.20	0.15

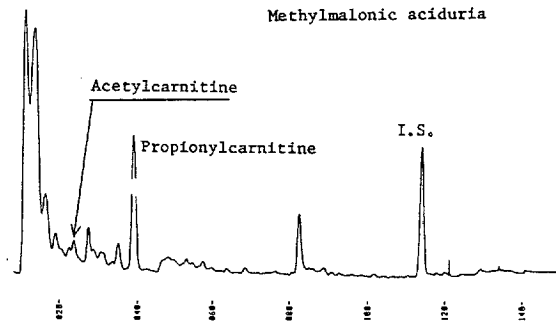


図 2. メチルマロン酸尿症例の尿アシルカルニチン分析クロマトグラム

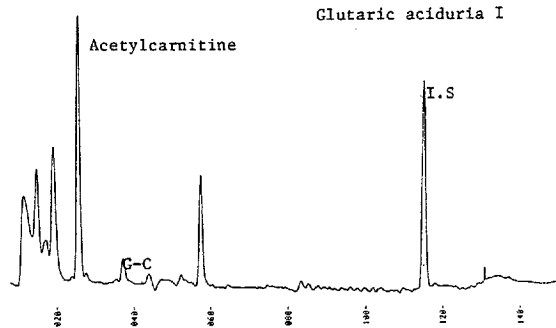


図 3. グルタル酸尿症 1 型例の尿アシルカルニチン分析クロマトグラム

出された。グルタル酸尿症 1 型例 (図 3) ではグルタリルカルニチン $240 \mu\text{mol/g creatinine}$ が、またマルチプルアシル CoA 脱水素酵素反応の欠損症例 (図 4) では優位の異常アシルカルニチンとしてイソブチリルカルニチン $2930 \mu\text{mol/g creatinine}$ 、イソバレリルカルニチン $830 \mu\text{mol/g creatinine}$ が認め

られた。これらの尿ではジカルボン酸アシルカルニチンは検出感度 10 nmol/ml 以下の濃度であった。クレアチニン値の高い濃縮尿ではアセチルカルニチンとバレリルカルニチンのそれぞれの分離時間に一致した不明ピークが重なり、アセチルカルニチンの定量には、前処理法の改善を含めてさらに検討が必要で

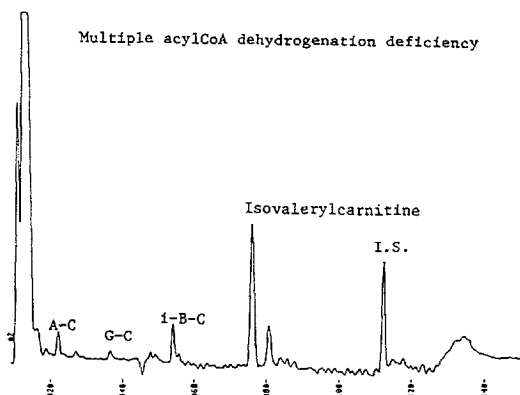


図 4. マルチプルアシル CoA 脱水素反応欠損症例の尿アシルカルニチン分析クロマトグラム

あった。しかし、有機酸代謝異常症で尿中に排泄される特異的なアシルカルニチンの分析がグラジエント時間 2 時間 20 分とカラム平衡時間 10 分の計 2 時間 30 分で連続的に分析できた。本分析法は有機酸代謝異常症の診断とカルニチン代謝の解析に有用な情報を提供できることを確認した。

文 献

- 1) Bergman I., *et al.*: Acute profound dystonia in infants with glutaric aciduria. *Pediatrics*. **88**: 228-234, 1989.
- 2) Roe C. R., *et al.*: Recognition of mediumchain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in asymptomatic siblings of children dying of sudden infant death of Reye-like syndromes. *J. Pediatr.*, **108**: 13-18, 1986.
- 3) Sugiyama N., *et al.*: Carnitine deficiency in inherited organic acid disorders and Reye syndrome. (in press)
- 4) Kidouchi K., *et al.*: Analytical method for urinary glutarylcarnitine, acetylcarnitine and propionylcarnitine with a carboxylic acid analyzer and a reversed-phase column. *J. Chromatogr.*, **423**: 297-303, 1987.
- 5) Kidouchi K., *et al.*: Identification of glutarylcarnitine in glutaric aciduria type I by carboxylic acid analyzer with an ODS reverse-phase column. *Clin. Chim. Acta*, **164**: 261-266, 1987.
- 6) Kidouchi K., *et al.*: Urinary acylcarnitines in a patient with neonatal multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency, quantified by a carboxylic acid analyzer with a reversed-phase column. *Clin Chim Acta*. **173**: 263-272, 1988.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:カルボン酸分析計を応用したアシルカルニチン定量分析法について検討した結果,炭素数 10(デカノイル)以下のモノカルボン酸アシルカルニチンと炭素数 12(ドデカンジオイル)以下のジカルボン酸アシルカルニチンの同時分析ができ,また 10nmol から 1000nmol/ml の間でよい定量性を得た。本分析法は 1 検体 2 時間 30 分で尿アシルカルニチンの連続自動分析ができ,有機酸代謝異常症の診断と病態の解析に有用であることを確認した。