

## 内部標準物質を用いた尿中VMA, HVA, dopamine測定と内部精度管理

花井潤師、川崎尚典、福士勝、佐藤泰昌、菊地由生子

### 要 旨

札幌市における神経芽細胞腫スクリーニングにおいて、現行のVMA, HVA, Dopamine (DA) のHPLC測定に内部標準物質としてHomovanillyl alcoholを用い、外部標準法と内部標準(内標)法との測定値の比較及び内部精度管理における内標法の有用性を検討した。内標法はオートサンプラーの注入量の影響を受けず、再現性に優れ、定量法として有用な方法であった。しかし、実際の定量法として採用するには、標準液・コントロール・抽出液中の内標の濃度をすべて同一にする必要があり、溶液の濃度管理を注意深く行う必要があった。さらに、抽出液に内標を加えることにより、検体ごとの測定精度を監視することが可能となり、内部精度管理法としてきわめて有用であることが明らかとなった。

### 1. 緒 言

神経芽細胞腫スクリーニングにおける VMA, HVA 定量は、HPLC を用いた外部標準物質による絶対検量線法(外標法)で行っていることから、HPLC の機器精度が直接検査精度を左右し、日内・日差変動のばらつきの最も大きな要因となっている。これに対し、内部標準法(内標法)はオートサンプラーの注入誤差を原理的に無視することが可能で、1994 年度の日本マス・スクリーニング学会で東京都予防医学協会の穴沢らは内標として Homovanillyl alcohol(HVOH)を用いた測定法の有用性を報告した<sup>1)</sup>。今回、現行の VMA, HVA, Dopamine (DA) 測定に応用し、外標法と内標法との測定値の比較及び内部精度管理における内標法の有用性を検討したので報告する。

### 2. 方 法

#### 2-1 試薬

標準液はVMA, VLA, DOPAC, 5-HIAA (各0.2

mg/ml), HVA (0.4 mg/ml), DA (50 ng/ml)を含み、さらに内部標準物質として、homovanillyl alcohol (HVOH)を1mg/mlになるよう加え、0.001%のヒビテン溶液を用い調製した。なお、HVOH(1mg/ml, メタノール溶液)は東京都予防医学協会穴沢氏よりご供与いただいた。

#### 2-2 HPLC測定

HPLC測定は、カラム: Inertsil ODS2 (4.6 x 250 mm), 移動相: 0.1M リン酸緩衝液 (pH 3.0) - アセトニトリル (9:1)の混液 (3 mM n-オクタンスルホン酸塩含有), 流速1.2 ml/分, カラム温度: 42 °Cで行った。検出器はcoulochem 5100A (ESA) を用い、設定電圧をD1: 120 mV, D2: 230 mVとし、D1でDOPAC, DA, 5-HIAAを、D2でVMA, HVA, VLAで定量した。

#### 2-3 尿抽出

ろ紙尿抽出溶液はHVOH 1 mg/mlを含む0.001%ヒビテン水溶液とし、尿ろ紙 (No.327)の5 mmディ

コメント:

スク3枚に抽出液 0.5 ml 加え、10分間振とう抽出し、数分間放置後、上清を試料とした。

### 3. 結果

#### 3-1 クロマトグラフィー

上記条件下、各物質の溶出時間(分)は DET 1において、DOPAC; 6.2、5-HIAA; 8.7、DA; 9.5、DET 2において、VMA; 3.4、VLA; 7.2、HVA; 12.7であった。また、HVOHの溶出時間は11.2分で、DET 1、DET 2それぞれで検出可能であった(図1)。また、コントロール尿 1 に内標を添加した場合でも、他の成分の影響もほとんど受けず、良好な分析が可能であった。

#### 3-2 ピーク比の直線性

標準溶液の各物質と HVOH とのピーク比の直線性は、VMA で 0.025 ~ 1.0 mg/ml (HVA は 2 倍量)、DA で 6.25 ~ 250 ng/ml まで良好であった(図 2)。

#### 3-3 注入量の影響

ルーチン検査での注入量20mlでの定量値と、注入量を15、25 mlに変化させた時のそれぞれの定量値を比較すると(n=10)、い

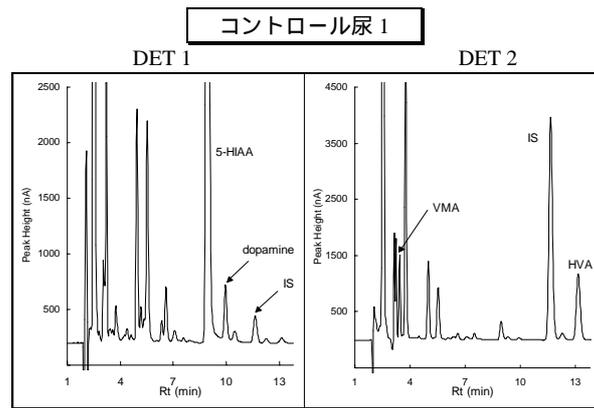
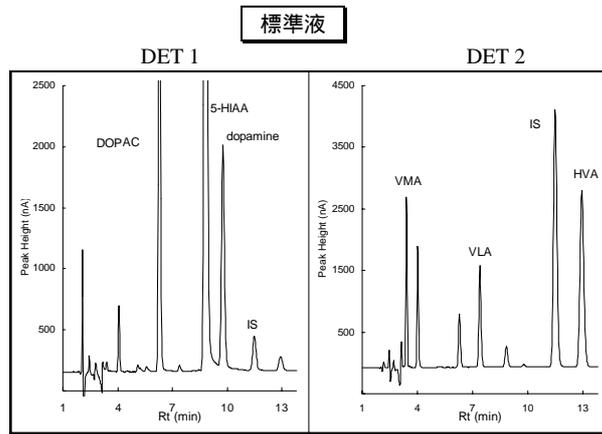


図 1. 内部標準物質を用いた HPLC 測定

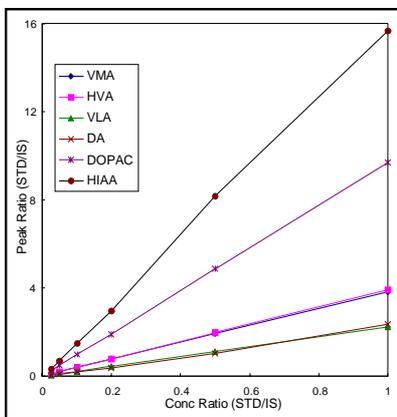


図 2. 検量線のピーク比

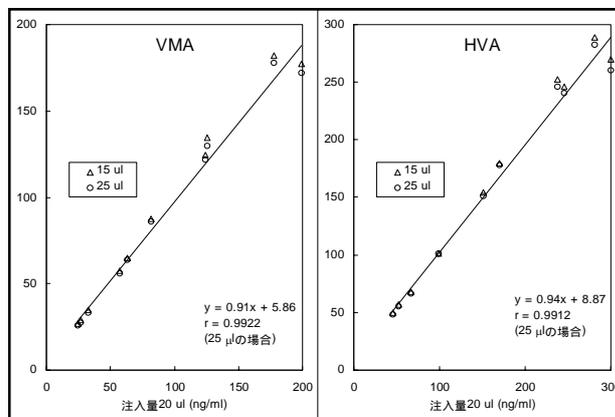


図 3. 注入量と定量値の関連性

ずれの場合も定量値の変化はなく、相関関係も良好であった(図3)。

### 3-4 定量値の再現性

ガイドラインのコントロール尿1, 2にHVOH (1 mg/ml)を添加し、外標法および内標法でのVMA, HVAの測定値について、同時再現性(n=6)、日差再現性(n=7)を検討した結果、同時再現性は内標法がCVで0.3~0.6%、外標法が1.0~2.1%と内標法の方が変動が少なかった。日差再現性は内標法が1.5~2.5%、外標法が1.9~2.6%と差は認められなかった(表1)。

表 1. 定量値の再現性

|          | 同時再現性                  |                        |                         |                        |
|----------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
|          | 内標法                    |                        | 外標法                     |                        |
|          | Control 1              | Control 2              | Control 1               | Control 2              |
| VMA      | 0.55%<br>(132.4 ± 0.7) | 0.37%<br>(561.9 ± 2.1) | 2.08%<br>(140.0 ± 2.9)  | 1.02%<br>(563.2 ± 5.7) |
| HVA      | 0.35%<br>(209.4 ± 0.7) | 0.31%<br>(604.2 ± 1.9) | 1.97%<br>(221.3 ± 18.0) | 1.06%<br>(605.5 ± 6.4) |
| dopamine | 0.85%<br>(17.1 ± 0.1)  | 0.51%<br>(64.2 ± 0.3)  | 1.54%<br>(18.0 ± 0.3)   | 0.65%<br>(64.4 ± 0.4)  |

(カッコ内 mean ± SD ng/ml, n=6)

|          | 日差再現性                  |                         |                        |                         |
|----------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
|          | 内標法                    |                         | 外標法                    |                         |
|          | Control 1              | Control 2               | Control 1              | Control 2               |
| VMA      | 1.70%<br>(130.9 ± 2.2) | 2.49%<br>(558.9 ± 13.9) | 2.63%<br>(132.7 ± 3.5) | 2.34%<br>(564.2 ± 13.2) |
| HVA      | 1.50%<br>(207.9 ± 3.1) | 1.73%<br>(604.2 ± 10.4) | 2.10%<br>(210.6 ± 4.4) | 1.85%<br>(610.0 ± 11.3) |
| dopamine | 6.21%<br>(18.1 ± 1.1)  | 6.58%<br>(67.6 ± 4.5)   | 6.65%<br>(18.4 ± 1.2)  | 6.89%<br>(68.3 ± 4.7)   |

(カッコ内 mean ± SD ng/ml, n=7)

### 3-5 内部精度管理の指標

ろ紙抽出液に内標を添加し、内標ピーク高の変化をみたところ、あるアッセイにおいて、内標ピークの低下したサンプルを確認した(図4)。図中、矢印のサンプルのピーク高が低下していたが、印の標準液も同様に低下したときがあり、そのすべてのピークが一樣に低下していたことから、オートサンプラーの注入ミス(ロータシールの劣化)と判断することができた。

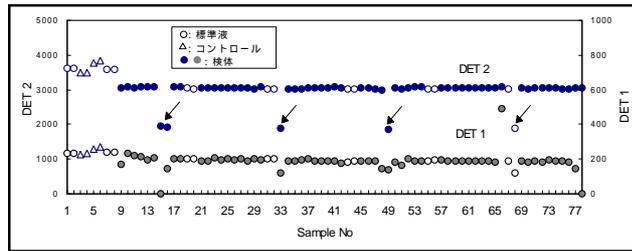


図 4. ルーチン測定時における内標ピーク高の変化

## 4. 考察

内標法は標準液やサンプルすべてに同一濃度の物質を添加することから、HPLC 測定における注入量の変動や感度の変化を細かく監視することが可能である。しかしながら、実際の定量法として採用するには、標準液・コントロール・抽出液すべての濃度を一定にする必要があり、現在の測定系ではその濃度管理がかなり煩雑と思われる。したがって、現時点では、定量法としては外標法で行い、標準液・コントロール・抽出液それぞれに内標を添加し、内標のピーク高の監視をすることが適当と考える。これにより、オートサンプラーの注入量を検体ごとに監視することができ、さら

に、これまで標準液ごとにしか監視できなかった検出器の感度変化を検体ごとにモニターすることが可能となった。今後、内標を用いた HPLC 測定は、クレアチニン同時測定を行っていない施設では必ず取り入れるべきであり、現在行っている  $\bar{X}$ -R 管理図とともに神経芽細胞腫スクリーニングの内部精度管理の標準法とすべきと考える。

## 5. 結語

現在行っている神経芽細胞腫スクリーニングの HPLC 測定法において、標準液・コントロール・抽出液に内標を添加することにより、検体それぞれの注入量のおよび検出器の感度の変化を監視することが可能となり、より詳細な内部精度管理が可能となった。

## 6. 文献

## Measurement of Urinary VMA, HVA and Dopamine and Results of Internal Quality Control Using an Internal Standard Compound

Junji Hanai, Naofumi Kawasaki, Masaru Fukushi, Yasumasa Sato and Yuko Kikuchi

We studied measurement of urinary VMA, HVA and dopamine using a high performance liquid chromatography (HPLC) by adding homovanillyl alcohol (HVOH) as an internal standard compound. HVOH was eluted at 11.2 min. without any interference. Reproducibility of data obtained with the internal standard method was better than those obtained with the external standard method. Moreover, we were able to monitor an accuracy of sample volume injected by an autosampler and changing the response of a detector, by checking peak height of the internal standard. We conclude that the internal standard compound should be utilized in VMA and HVA measurement using HPLC in the neuroblastoma screening

1) 穴沢昭、他：日本マス・スクリーニング学会誌，  
4 (2), 101-102, 1994