

STANOVENÍ METANEFRINU A NORMETANEFRINU V KREVNI PLAZMĚ POMOCÍ HPLC S ELEKTRO- CHEMICKOU DETEKČÍ

ALICE VRÁNKOVÁ, TEREZA
ŠKRAMLÍKOVÁ, JIŘÍ WIDIMSKÝ JR., TOMÁŠ
ZELINKA, ONDŘEJ PETRÁK, ROBERT
HOLAJ, BRANISLAV ŠTRAUCH, JÁN ROSA,
JAN ŠKRHA a ZDENA JÚZOVÁ

III. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakulní
nemocnice v Praze, U nemocnice 1, 128 08 Praha 2
alice.vrankova@vfn.cz

Došlo 26.1.09, přijato 10.6.09.

Klíčová slova: metanefriny, plazma, HPLC-ED, validace

Úvod

Stanovení katecholaminů a jejich *O*-methylmetabolitů, zejména metanefrinu (MN) a normetanefrinu (NMN), je užitečné v diagnostice tumoru chromafinních buněk feochromocytomu (FEO). Tento typ nádoru syntetizuje, ukládá a metabolizuje katecholaminy a většinou je také vylučuje. Proto je možné zvýšenou koncentrací katecholaminů a jejich metabolických produktů v moči a v plazmě využít jako diagnostické markery tohoto typu nádoru¹. Nadprodukce katecholaminů nádorem vede u většiny pacientů k zvýšení krevního tlaku, proto podezření na FEO vzniká převážně u pacientů s hypertenzí. Zde je ovšem nutné rozlišit, o jaký fenotyp FEO se jedná. Noradrenergní fenotyp, produkující převážně noradrenalin (NA), resp. NMN, adrenergní fenotyp produkující hlavně adrenalin (A), resp. MN nebo fenotyp smíšený, který produkuje obě látky současně. Pacienti s adrenergním fenotypem FEO mají na rozdíl od ostatních fenotypů spíše záchtavovitě zvyšování krevního tlaku a normotenzí, případně hypotenzí^{2,3}.

Vědecké studie z poslední doby zabývající se touto problematikou vyzdvihují především stanovení volných metanefrinů v plazmě jako nejcitlivější stanovení vzhledem k diagnóze FEO^{4,5}. Jedním z důvodů preference metanefrinů je kontinuální produkce těchto látek nádorovou buňkou, na rozdíl od katecholaminů, které jsou produkovány jen periodicky. Rovněž bylo zjištěno, že u pacientů s FEO pochází převážná část nadprodukce NMN a MN v plazmě z metabolismu katecholaminů v dření nadledvin, nikoli z nádorových buněk. Toho se využívá zejména u takových typů FEO, jejichž nádorové buňky katechola-

miny neprodukují. Zde se stanovením plazmatických metanefrinů zamezí vzniku falešně negativních výsledků⁶.

Nejvíce používanou metodou pro stanovení NMN a MN v plazmě je HPLC s elektrochemickou detekcí (ED)^{7–10}. Tato technika je méně nákladnou alternativou k používaným separačním technikám ve spojení s hmotnostní spektrometrií^{10,11}. Další možnosti pro stanovení metanefrinů jsou imunochemické metody založené na reakci se značenými protilátkami^{12,13}. U imunochemických metod se poukazuje na problém zkřížených reakcí a analytických interferencí¹⁰, rovněž pořizovací cena imunochemických souprav je vyšší.

Při zavádění metody stanovení plazmatických metanefrinů pomocí HPLC-ED jsme se nejdříve zaměřili na ověření validačních parametrů metody. Vzhledem k tomu, že metoda již byla interně validována v publikaci Lenders a spol.⁷, orientovali jsme se hlavně na validaci při převodu metody, která zahrnuje stanovení opakovatelnosti a správnosti. Rovněž jsme ověřili platnost této již publikované validované metody kontrolou způsobilosti metody, neboli kontrolou kalibrační přímky a stanovili tak linearitu a citlivost metody¹⁴ a její mez detekce a mez stanovitelnosti. Navíc jsme určili reprodukovatelnost metody. Rovněž jsme posuzovali schopnost metody správně zařadit pacienty (s nádorem, bez nádoru) a výsledky stanovení jsme porovnali s jinou dostupnou metodou, která rovněž interpretuje výsledky vzhledem k přítomnosti či nepřítomnosti FEO. Srovnávaná metoda stanovuje volné katecholaminy v moči metodou HPLC s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD).

K určení koncentračního rozmezí u pacientů bez nádoru a nalezení koncentrační hranice, nad níž se nacházejí pacienti s feochromocytomem, jsme analyzovali tři skupiny dobrovolníků. První skupinu tvořili zdraví pacienti s normotenzí, další pacienti s hypertenzí a poslední skupinou byli pacienti s feochromocytomem.

Experimentální část

Chemikálie

Standardy – NMN ((±) normetanefrin hydrochlorid), MN ((±) metanefrin hydrochlorid) a HMBA (4-hydroxy-3-methoxybenzylamin-hydrochlorid), používaný jako vnitřní standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Chemikálie pro extrakci na pevné fázi (SPE) – hydroxid draselný (Penta, Chrudim, ČR), hydroxid amonný a dihydrogenfosforečnan amonný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), methanol, koncentrovaná kyselina octová a voda pro chromatografii (Merck KGaA, Darmstadt, Německo).

Chemikálie pro přípravu mobilní fáze (MF) – acetonitril, voda pro chromatografii, kyselina fosforečná (vše Merck, Darmstadt, Německo), kyselina oktansulfonová, dihydrogenfosforečnan sodný, monohydrát a dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (vše Sigma-

Aldrich, St. Louis, USA).

Přístroje a doplňkový materiál

Extrakce: čtyřiadvacetipolohový vakuový extraktor (Phenomenex, Torrance, USA), SPE kolonky obsahující iontoměnič (Varian, Palo Alto, USA), dávkovače kapalin Seripettor (Brand, Wertheim, Německo), vakuová odparka Jouan RC10.22 (Saint-Herblain, Francie)

Chromatografie: HPLC systém Agilent 1100 složený z odplynovače G1379A, kvartérní pumpy G1311A, autosampleru G1329A, termostatu autosampleru G1330B, termostatu kolony G 1316A (Agilent Technologies, Wilmington, USA), elektrochemický (coulometrický) detektor (ESA, Chelmsford, USA), předkolona SecurityGuard [4,0 × 3,0 mm] a analytická kolona C18, velikost částic 5 μm, [250 × 4,6 mm] (Phenomenex, Torrance, USA)

Podmínky odběru vzorku krve

Krev pro stanovení plazmatických metanefrinů je odebírána na lačno, pomocí kanyly a po předchozí dietě. Omezení určitých potravin a léků je zapotřebí z důvodu možné interference při chromatografické analýze. Odběr krve se provádí vleže nebo vsedě, pacientovi se zavede kanyla a po patnáctiminutovém klidu se přistupuje k odběru. Tím se nezvyšují hodnoty analytů stresem. Po odběru je nutné co nejrychleji oddělit krvinky od plazmy centrifugací, aby se sledované látky nerozkládaly. Jako stabilizátor používáme heparin a plazmu uchováváme při –80 °C do dalšího zpracování¹⁵.

Extrakce

Extrakční kolonky je nutné nejdříve aktivovat a promýt 10% amoniakem a 2 ml 1% hydroxidu draselného v methanolu a poté 2 ml vody. Potom je možné uvést 0,5 ml plazmy nebo 0,5 ml vody na kolonku se standardními vzorky resp. slepým pokusem. Současně se na všechny kolonky uvádí vnitřní standard (IS) HMBA v množství 2 ng (74 nmol l⁻¹) na kolonku. Tento dávkovaný obsah

kolonek se okyslí 0,05% (9 mmol l⁻¹) kyselinou octovou (kvůli vyšší stabilitě analytů v kyselém prostředí¹⁵).

Dalším krokem je promytí extrakčních kolonek 2 ml 10 mmol l⁻¹ kyseliny octové v methanolu, poté 2 ml 20 mmol l⁻¹ fosforečnanu amonného o pH 8,5 a nakonec 2 ml vody.

Analyty zadržené na kolonkách nakonec eluujeme 2 ml 10% amoniaku v methanolu. Eluát poté odpařujeme ve vakuové odparce a odparek rozpustíme ve 150 μl mobilní fáze (MF) (cit.¹⁶). 100 μl roztoku nakonec dávkuje na kolonu kapalinového chromatografu.

Ředění standardů na ověření linearity

Aby bylo možné zhodnotit linearitu pro celou koncentrační oblast od nuly až po více než dvacetinásobek koncentrační hranice, nad níž se vyskytuje feochromocytom^{11,17}, změřili jsme šest bodů ve fyziologické oblasti koncentrací a také tři body nad hraniční koncentrací. Pro ověření fyziologické oblasti koncentrací jsme přidávali: 0; 4,4; 8,8; 13,2; 17,5; 22 pg (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 nmol l⁻¹) NMN a 0; 4,7; 9,4; 14; 18,7; 23,4 pg (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 nmol l⁻¹) MN. Pro oblast patologických koncentrací byla přidávána množství: 100, 250 a 500 pg (4,55; 11,38 a 22,76 nmol l⁻¹) NMN a 100, 250 a 500 pg (4,28; 10,70 a 21,39 nmol l⁻¹) MN (cit.¹¹).

Výsledky a diskuse

Validace metody

Opakovatelnost jsme určili desetinásobným opakovaným stanovením v jedné a téže směsné plazmě. Zmíněná stanovení byla provedena na třech hladinách¹⁷. První hladinou byla směsná plazma zdravých dobrovolníků s normálními hodnotami, druhou hladinu tvořila směsná plazma hypertoniků a poslední hladinu představovala hraniční koncentrace pacientů s nádorem. Zmíněná směsná plazma byla extrahována a měřena během jednoho dne jako měření za podmínek opakovatelnosti¹⁸. Výsledky jsou

Tabulka I

Opakovatelnost stanovení směsné plazmy metodou HPLC-ED změřená v rámci jednoho dne a reprodukovatelnost stanovení změřená po týdnu skladování

Skupiny pacientů	Způsob provedení (n=10)	Průměr ± směrodatná odchylka [nmol l ⁻¹]		Variační koeficient [%]	
		NMN	MN	NMN	MN
Zdraví dobrovolníci	opakovatelnost	0,49 ± 0,03	0,31 ± 0,01	6,1	4,4
	reprodukovatelnost	0,48 ± 0,04	0,28 ± 0,03	8,6	9,1
Pacienti s hypertenzí	opakovatelnost	0,55 ± 0,03	0,44 ± 0,02	5,7	4,9
	reprodukovatelnost	0,50 ± 0,04	0,43 ± 0,03	8,2	7,9
Pacienti s FEO	opakovatelnost	7,5 ± 0,6	3,8 ± 0,2	6,9	6,1
	reprodukovatelnost	6,6 ± 0,9	3,4 ± 0,4	13,0	12,2

uvedeny v tab. I. Z tabulky vyplývá, že opakovatelnost vyjádřená variačním koeficientem (CV) nepřekročila u NMN v žádné koncentrační hladině 6,9 %. Pro MN byla nejvyšší hodnota u pacientů bez nádoru 4,9 %, u pacientů s FEO pak 6,1 %.

Reprodukovatelnost jsme změřili desetinásobným opakovaným stanovením v jedné a téže směsné plazmě s několikadenními intervaly⁸ (měření za podmínek reprodukovatelnosti¹⁸). Výsledky jsou rovněž uvedeny v tab. I, z níž plyne, že variační koeficient těsnosti shody dosahoval u všech sledovaných koncentračních hladin vyšších hodnot, ale nepřekročil 13 % u žádné skupiny ani analytu. Zvýšení variačního koeficientu v případě reprodukovatelnosti plně odpovídá zahrnutí variability do výsledků (měření v různých dnech) a zároveň odpovídá požadavku na maximální hodnotu variačního koeficientu při měření přesnosti, kterou je 15 % (cit.¹⁹). Změřením opakovatelnosti i reprodukovatelnosti jsme získali představu o shodnosti (přesnosti) metody. Výsledky koreluji s literaturou^{8,10,11}. Lenders a spol.⁷ uvádí variační koeficient reprodukovatelnosti u skupiny pacientů se zvýšenými hodnotami analytů v plazmě až 16,3 %. Pagliari a spol.⁹ uvádí dokonce variační koeficient reprodukovatelnosti pro volný MN v plazmě více než 32 %.

Správnost (výťažnost) metody jsme ověřili pomocí známých koncentračních přídavek standardů (spolu s vnitřním standardem) ke vzorku směsné plazmy a zároveň ve stejném koncentračním rozsahu k 1,14% (0,2 mol l⁻¹) kyselině octové (k ověření stability analytů v kyselém prostředí). Standardní přídávky v plazmě i v kyselině octové jsme extrahovali postupem uvedeným výše. Koncentrační rozmezí přidávaných standardů pokrývalo oblast fyziologických koncentrací analytů v plazmě šesti body (0–1 nmol l⁻¹) a oblast patologických koncentrací dalšími třemi body (100, 250 a 500 pg na kolonku).

Zmíněné standardy jsme přidávali na kolonky v průběhu extrakce. Jednu kolonku se směsnou plazmou jsme ponechali bez přídávky (slepý pokus).

Každý jednotlivý standard (v plazmě a kyselině octové) jsme změřili 3×. Vnitřní standard HMBA byl ve všech vzorcích přítomen v koncentraci 74 nmol l⁻¹. Z těchto výsledků jsme získali kalibrační přímky.

Tímto způsobem testování jsme zjistili správnost pomocí výťažnosti, viz tab. II a zároveň i linearitu metody¹⁴, viz tab. III.

Výťažnost obou analytů vzhledem k vnitřnímu standardu HMBA se liší podle toho, zda jde o přídávky ke směsné plazmě nebo ke slepému vzorku (0,2 mol l⁻¹ kyselina octová). Zatímco výťažnost obou analytů z plazmy se pro celou sledovanou oblast koncentrací pohybuje mezi 96 a 125 % a v blízkosti koncentrační hranice dosahuje 96 %, výťažky z kyseliny octové jsou podstatně nižší (viz tab. II). Zejména v kritické oblasti koncentrační hranice nedosahuje výtěžek pro MN ani 55 %. Celková ztráta při extrakci se pohybuje mezi 30–40 %, tedy odpovídá výtěžku Lendersa a spol.⁷. Roden a spol.⁸ uvádí výtěžek obou analytů zjištěný metodou HPLC-ED vzhledem k vnitřnímu stan-

Tabulka II
Výťažnost stanovení přídavek standardů metanefrinů do směsné plazmy a kyseliny octové metodou HPLC-ED

Koncentrace [nmol l ⁻¹]	Směsná plazma		Kyselina octová (0,2 mol l ⁻¹)	
	střední ^a změřená koncentrace [nmol l ⁻¹]	výtěžek [%]	střední ^a změřená koncentrace [nmol l ⁻¹]	výtěžek [%]
<i>NMN</i>				
0,2	0,25	125	0,23	115
0,4	0,45	113	0,32	80
0,6	0,64	107	0,47	78
0,8	0,92	115	0,56	70
1	0,96	96	0,73	73
4,55	4,24	99	5,28	123
11,38	11,35	106	12,44	116
22,76	23,32	109	18,73	109
<i>MN</i>				
0,2	0,21	105	0,18	90
0,4	0,46	115	0,23	58
0,6	0,72	120	0,41	68
0,8	0,85	106	0,43	54
1	0,96	96	0,54	54
4,28	4,69	110	4,72	110
10,7	12,07	113	16,86	158
21,39	24,12	113	28,7	134

^a n=3

dardu HMBA 90–105 %, Lagerstedt a spol.¹⁰ dokonce 100 % pro NMN metodou LC-MS/MS. Roden ovšem neudává ztrátu analytů při extrakci. Vyšší výtěžek analytů z 0,2 mol l⁻¹ kyseliny octové proti jejich výtěžku z vody⁷ se nepotvrdil. Tím bylo zpochybněno předchozí tvrzení o zvýšené stabilitě analytů v kyselém prostředí a o vyšším výtěžku analytů při okyselení náplně kolonek v průběhu extrakce^{15,16}.

Kalibrační přímky obou analytů v plazmě vykazují vynikající linearitu přes celou koncentrační oblast (0 až 22,76 nmol l⁻¹ pro NMN, 0–21,39 nmol l⁻¹ pro MN). Koeficient determinace (R^2) pro přídávky NMN v plazmě dosahuje hodnoty 0,9995, pro MN dokonce 0,9999. Velmi dobré linearity bylo dosaženo rovněž při přídávku obou analytů do 0,2 mol l⁻¹ kyseliny octové, kde R^2 pro NMN je vyšší než 0,97, pro MN opět vyšší než 0,99 (viz tab. III).

Pro ověření platnosti publikované metody⁷ je důležité se orientovat na linearitu a citlivost metody. Linearita byla testována koncentračními přídávky standardů v rámci stanovení správnosti (viz výše). Z vynesných kalibračních

Tabulka III

Parametry lineární závislosti známé a změřené koncentrace přídavek standardů metanefrinů do směsné plazmy a kyseliny octové metodou HPLC-ED

Parametry lineární závislosti	Směsná plazma		Kyselina octová (0,2 mol l ⁻¹)	
	NMN	MN	NMN	MN
Směrnice, l nmol ⁻¹	1,086	1,129	0,924	1,399
Úsek na ose y	-0,069	-0,042	0,242	-0,334
Koeficient determinace (R ²)	0,999	0,999	0,977	0,991

křivek jsme určili směrnice, které jsme použili pro výpočet meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ)^{14,20}. Pro určení uvedených mezí byly pro kalibrační závislosti vynášeny výšky píků místo jejich plochy. Druhým parametrem pro výpočet LOD a LOQ bylo určení maximálního kolísání základní linie v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku stanovovaných analytů a to z chromatogramu slepého pokusu. Mez detekce jsme pak vypočítali pomocí podílu trojnásobku maximálního kolísání základní linie a směrnice zde uvedené kalibrační přímky. Mez stanovitelnosti byla počítána jako poměr desetinásobku maximálního kolísání základní linie a směrnice¹⁴.

LOD pro stanovení NMN v plazmě jsme určili jako 15 fmol při dávkovaném množství 100 µl neboli 150 pmol l⁻¹, pro MN je to 32 fmol ve 100 µl (320 pmol l⁻¹). LOQ pak odpovídá 50 fmol NMN ve 100 µl (500 pmol l⁻¹) a 110 fmol MN ve 100 µl (1,1 nmol l⁻¹). Výsledky plně odpovídají publikovanému článku⁷, který uvádí LOD 25 fmol NMN a 50 fmol MN metodou HPLC-ED. Roden a spol.⁸ určili LOD 11 fmol NMN a 17 fmol MN metodou HPLC-ED. LOQ pro oba analyty uvádějí autoři zhruba 10× nižší. Autoři neuvádějí způsob určení mezí. Pagliari a spol.⁹ určili cca 10× vyšší LOD (HPLC-ED), další autoři došli k řádově stejným hodnotám pomocí LC-MS/MS^{10,11}.

Ověřili jsme senzitivitu a specifitu metody. Senzitivita je definována jako pravděpodobnost, že výsledek stanovení bude metodou zařazen jako pozitivní u nemocných, specifita jako pravděpodobnost, že výsledek bude negativní u osob bez nemoci²¹. Sledovali jsme správně zařazení výsledků stanovení u 21 pacientů bez FEO (negativní) a 21 pacientů s nádorem (pozitivní) a výsledky porovnali s metodou stanovení volných katecholaminů v moči pomocí HPLC-FLD²². Ověření přítomnosti (nepřítomnosti) FEO bylo potvrzeno vyšetřením počítačovou tomografií (CT) nebo magnetickou rezonancí (MR), případně histologicky. Vypočítali jsme senzitivitu metod jako podíl správně pozitivních výsledků buď NMN (NA) nebo MN (A) a správně pozitivních výsledků jednoho z těchto analytů plus falešně negativních výsledků obou z analytů. Dále jsme určili spe-

cifitu metod jako podíl správně negativních výsledků obou analytů a správně negativních výsledků obou analytů plus falešně pozitivních výsledků buď NMN (NA) nebo MN (A).

Porovnáním výsledků metody stanovení volných plazmatických metanefrinů (HPLC-ED) s výsledky stanovení volných močových katecholaminů (HPLC-FLD) jsme zjistili, jak se výstupy obou metod shodují a zároveň ověřili jejich vypovídací schopnost, viz tab. IV. Ze 42 pacientů jsme metodou HPLC-ED na základě stanovení NMN v plazmě správně zařadili všechny pacienty. 21 pacientů bez FEO jsme stanovili jako negativní a 21 pacientů s FEO jako pozitivní. Stanovením MN jsme rovněž správně zařadili všechny pacienty bez FEO (negativní), ovšem pouze 13 z 21 pacientů s FEO jsme označili jako pozitivní. Výsledek odpovídá skutečnosti, že všech 8 pacientů špatně zařazených jako negativní vyšetřením MN mělo noradrenergní fenotyp FEO, tedy nádor zvýšeně produkující NA, případně NMN. Srovnávaná metoda HPLC-FLD správně zařadila všech 21 pacientů s FEO jako pozitivní vyšetřením NA. Čtyři pacienty bez FEO špatně zařadila jako pozitivní na základě stanovení NA a jednoho po stanovení A (tab. IV). Z uvedeného jsme vypočítali senzitivitu a specifitu obou metod na základě našich výsledků (viz výše). Zjistili jsme tak 100% senzitivitu i specifitu podle stanovení 42 vzorků metanefrinů z plazmy metodou HPLC-ED a 100% senzitivitu a 77% specifitu stanovením 42 vzorků katecholaminů z moči s použitím HPLC-FLD. Dříve publikovaná studie, která byla ovšem provedena s mnohonásobně vyšším počtem pacientů, uvádí senzitivitu a specifitu metanefrinů v plazmě 99 %, resp. 89 % a senzitivitu a specifitu katecholaminů v moči 86 %, resp. 88 % (cit.⁴).

Správnou identifikaci všech 42 pacientů metodou HPLC-ED se potvrdil význam zařazení pacientů s hypertenzí mezi normální kontrolní vzorky (fyziologické koncentrace pacientů bez FEO), viz níže. Pokud by se nepřidala skupina hypertoniků bez FEO mezi normální hodnoty, tři z výsledků (správně negativní) bychom špatně zařadili mezi pacienty s FEO (falešně pozitivní).

Tabulka IV

Počet správně zařazených pacientů z jejich celkového počtu jednotlivými metodami

Správně zařazení pacienti	Stanovení volných metanefrinů v plazmě (HPLC-EC)		Stanovení volných katecholaminů v moči (HPLC-FLD) či (HPLC-FLD)	
	NMN	MN	NA	A
<i>Pacienti bez FEO (n=21)</i>				
Negativní	21	21	17	20
<i>Pacienti s FEO (n=21)</i>				
Pozitivní	21	13	21	10

Určení fyziologických a patologických koncentračních rozmezí

Abychom mohli určit hranici mezi normálními (fyziologickými) a patologickými (u pacientů s nádorem) koncentracemi analytů, stanovili jsme analytické koncentrace metanefrinů od 15 zdravých dobrovolníků, 50 pacientů s hypertenzí a 26 pacientů s feochromocytomem.

Určili jsme koncentrační hranici mezi zdravými a nemocnými pacienty (tab. V). Pro upřesnění jsme kontrolní pacienty bez FEO (normální hodnoty) rozdělili na dvě skupiny, zdraví dobrovolníci a pacienti s hypertenzí. Tím jsme ověřili předpoklad, že kontrolní hodnoty pacientů s hypertenzí zasahují do mírně vyšších koncentrací než u zdravých. Zároveň jsme zjistili, že nejvyšší koncentrace NMN u normálních hodnot nepřesahuje nejnižší koncentraci NMN u pacientů s FEO. Tím jsme vytvořili koncentrační hranici. U MN se horní normální a spodní patologická koncentrace kryjí, což koreluje s předchozími publikacemi^{7,11}. Vzhledem k tomu, že u adrenergního fenotypu FEO (nádoru zvýšeně produkujícího A, případně MN) se u všech sledovaných pacientů nacházely výrazně zvýšené hodnoty MN a současně i hodnoty NMN byly zvýšené nad koncentrační mez, zmíněný fakt výsledky nezkrsluje. Porovnáním získaných referenčních intervalů s publikovanými jsme zjistili, že výsledky získané stejnou metodou (HPLC-ED) jsou velmi blízké^{7,10}.

Závěr

Metoda stanovení volných metanefrinů v plazmě HPLC-ED splňuje všechny požadované analytické parametry pro její validaci. Ověřením senzitivity a specificity při diagnóze jsme našli vynikající rozlišovací schopnost metody. V porovnání se stanovením volných katecholaminů z moči metodou HPLC-FLD má stanovení metanefrinů v plazmě vyšší specificitu, protože všichni pacienti bez FEO byli metodou správně zařazeni jako negativní, na rozdíl od srovnávané metody. Určili jsme referenční meze pro pacienty bez FEO (negativní) a s FEO (pozitivní). Prokázalo se, že je nezbytné zařadit hypertenzní pacienty mezi normální hodnoty, protože mírně zvyšují hraniční koncentraci a tím se zabráni vzniku falešně pozitivních výsledků.

Práce vznikla za podpory výzkumných záměrů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky MSM 0021620807 a MSM 0021620808.

LITERATURA

- Eisenhofer G., Walther M. M., Huynh T. T., Li S. T., Bornstein S. R., Vortmeyer A., Mannelli M., Goldstein D. S., Linehan W. M., Lenders J. W. M., Pacák K.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1999 (2001).
- Amar L., Servais A., Gimenez-Roqueplo A. P., Zinzindohoue F., Chatellier G., Plouin P. F.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2110 (2005).
- Eisenhofer G., Lenders J. W., Goldstein D., Mannelli M., Csako G., Walther M. M., Brouwers F. M., Pacák K.: *Clin. Chem.* 51, 735 (2005).
- Lenders J. W. M., Pacák K., Walther M. M., Linehan W. M., Mannelli M., Friberg P., Keiser H. R., Goldstein D. S., Eisenhofer G.: *J. Am. Med. Assoc.* 28, 1427 (2002).
- Goldstein D., Eisenhofer G., Flynn J. A., Wand G., Pacák K.: *Hypertension* 43, 907 (2004).
- Pacák K.: *Habilitační práce*. Univerzita Karlova, Praha 2002.
- Lenders J. W., Eisenhofer G., Armando I., Keiser H. R., Goldstein D. S., Kopin I. J.: *Clin. Chem.* 39, 97 (1993).
- Roden M., Raffesberg W., Raber W., Bernroider E., Niederle B., Waldhäusl W., Gasic S.: *Clin. Chem.* 47, 1061 (2001).
- Pagliari R., Cottet-Emard J. M., Peyrin L.: *J. Chromatogr.* 563, 23 (1991).
- Lagerstedt S. A., O'Kane D. J., Singh R. J.: *Clin. Chem.* 50, 603 (2004).
- Jong W. H. A., Graham K. S., van der Molen J. C., Links T. P., Morris M. R., Ross H. A., de Vries E. G. E., Kema I. P.: *Clin. Chem.* 53, 1684 (2007).
- Gao I. C., Lu H. K., Luo Q. Y., Chen L. B., Deng Y., Zhu R. S.: *Clin. Exp. Med.* 8, 87 (2008).
- Pacák K., Aguilera B., Saban E., Kvetnansky R., (ed.): *Stress Current Neuroendocrine and Genetic Approaches*, str. 582. New York Academy of Sciences, New York 2004.

Tabulka V

Rozmezí normálních a patologických koncentrací NMN a MN v plazmě

Skupina pacientů	Analyt	Rozmezí hodnot [nmol l ⁻¹]	Střed ± směrodatná odchylka [nmol l ⁻¹]
Zdraví dobrovolníci (n=15)	NMN	0,190–0,840	0,49 ± 0,24
	MN	0,073–0,563	0,35 ± 0,21
Pacienti s hypertenzí (n=50)	NMN	0,154–0,979	0,59 ± 0,18
	MN	0,153–0,915	0,43 ± 0,22
Pacienti s FEO (n=26)	NMN	1,355–41,682	12 ± 11
	MN	0,182–164,015	9 ± 25

14. <http://www.hplc.cz/index.html>, staženo 10. prosince 2007.
15. Willemsen J. J., Sweep C. G. J., Lenders J. W. M., Ross H. A.: *Clin. Chem.* 49, 1951 (2003).
16. <http://www.catecholamine.org/labprocedures/procedure/plasmamet.htm>, staženo 5. září 2007.
17. <http://www.scribd.com/doc/2353306/Guia-EurachemThe-Fitness-for-Purpose-of-Analytical-Methods>, staženo 10. prosince 2007.
18. <http://shop.normy.biz/detail-polozky.php?katcis=20617>, staženo 10. prosince 2007.
19. <http://www.fda.gov/cder/guidance/1320fnl.pdf>, staženo 10. prosince 2007.
20. Pacáková V., Štulík K.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*. SPN, Praha 1986.
21. <http://new.euromise.org/czech/tajne/ucebnice/html/html/node5.html>, staženo 10. prosince 2007.
22. <http://www.cskb.cz/cksb.php?pg=doporuceni-validace-a-verifikace-metod>, staženo 10. prosince 2007.

A. Vránková, T. Škramlíková, J. Widimský Jr., T. Zelinka, O. Petrák, R. Holaj, B. Štrauch, J. Rosa, J. Škrha, and Z. Jůzová (*3rd Internal Department, First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic*): **Determination of Metanephrine and Normetanephrine in Blood Plasma by HPLC with Electrochemical Detection**

Determination of catecholamines and their O-methyl metabolites, normetanephrine (NMN) and metanephrine (MN), in biological fluids plays an important role in the diagnosis of pheochromocytoma (PHEO) – chromaffin cells tumor. The aim of the study was to validate a HPLC-ED (Electrochemical Detection) method for the determination of MN and NMN in blood plasma and to compare the obtained data with those published previously. The ability of the proposed method to distinguish the patients with and without PHEO has been proved and the results were compared with the HPLC determination of free catecholamines in urine. Both methods interpret the results in relation to the presence of PHEO. Finally the concentration limits for patients with and without PHEO have been established. Analytical parameters of the method including the repeatability, accuracy, LOD, LOQ and reproducibility as well as its sensitivity and specificity in tumor diagnosis were determined. The hypertonic patients should be included in patients without PHEO as they increase the concentration limit. This helps to avoid false positive results.