

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**STANOVENÍ METANEFŘINŮ V BIOLOGICKÝCH
MATERIÁLECH METODOU HPLC-ED
- VLASTNÍ MODIFIKACE METODY**

Mgr. MARTINA ULRYCHOVÁ

2006

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF BIOCHEMICAL SCIENCES

**DETERMINATION OF METANEPHRINES IN
BIOLOGICAL MATERIALS BY METHOD HPLC-ED
- OUR MODIFICATION OF METHOD**

Mgr. MARTINA ULRYCHOVÁ

2006

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat paní Ing. Jaroslavě Vávrové, Ph.D. a panu prof. RNDr. Miloši Tichému, CSc. za odborné vedení a cenné rady během mé práce.

Seznam zkratek

3-MT	3-methoxytyramin
A	plocha piku
ACN	acetonitril
ACTH	adrenokortikotropin
c	koncentrace
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol-O-methyltransferáza
CT	počítačová tomografie
DA	dopamin
DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
E	napětí
ED	elektrochemická detekce
EDTA	chelaton III
EPI	epinefrin, adrenalin
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
HMBA	4-hydroxy-3-methoxybenzylamoniumchlorid
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
kreat.	kreatinin
MAO	monoaminoxidáza
MeOH	metanol
MIBG	¹²³ I-metajodbenzyl-guanidin
MN	metanefrin
MRI	magnetická rezonance
NEPI	norepinefrin, noradrenalin
NMN	normetanefrin
SPE	extrakce na pevné fázi
TK	krevní tlak

Souhrn:

Feochromocytom - nádor chromafinních buněk dřeně nadledvin, je vzácnou příčinou hypertenze, která je způsobena zvýšenou sekrecí katecholaminů. Jako biochemické markery pro diagnostiku feochromocytomů se mohou stanovovat hladiny katecholaminů a jejich metabolitů. Mezi metabolity katecholaminů patří metanefriny a kyselina vanilmandlová. Zavedli jsme stanovení normetanefrinu, metanefrinu a 3-methoxytyraminu v plazmě a moči chromatografickou metodou s elektrochemickou detekcí.

Ke vzorkům byl přidán 4-hydroxy-3-methoxybenzylamoniumchlorid jako vnitřní standard. Metoda zahrnovala v preanalytické fázi extrakci na SPE kolonkách. Následná kvantifikace metanefrinů byla provedena metodou HPLC s elektrochemickou detekcí.

Po zavedení pracovních podmínek bylo nutné provést validaci postupu. Nejprve jsme provedli kalibraci metody a následně jsme testovali její přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost), správnost a výtěžnost.

Summary:

Pheochromocytoma – tumor of chromaffin cells represents a rare cause of hypertension resulting from increased catecholamine secretion. Concentration of catecholamines and their metabolites can be used in diagnosis of pheochromocytoma as tumor markers. Metanephrines and vanilmandelic acid are ranked among metabolites of catecholamines. We put into practice determination of normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine in plasma and urine by chromatographic method with electrochemical detection.

Samples were mixed with 4-hydroxy-3-methoxybenzylamoniumchlorid as internal standard. A method included solid-phase extraction (SPE) with Oasis HLB sorbent in preanalytical phase. Quantification of metanephrines was carried out by HPLC method with electrochemical detection.

Validation of procedure was necessary after installation of conditions. The first we have been measured calibration of method and than we tested its preciseness (intraassay and interassay), correcteness and recovery.

1.	ÚVOD.....	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1.	KATECHOLAMINY.....	9
2.1.1.	Působení katecholaminů v organismu.....	9
2.1.2.	Biosyntéza katecholaminů.....	11
2.2.	METANEFRINY A METABOLICKÉ ODBOURÁNÍ KATECHOLAMINŮ.....	13
2.3.	PATOBIOCHEMIE KATECHOLAMINŮ.....	16
2.5.1.	Stavy nedostatku katecholaminů.....	16
2.5.2.	Poruchy biosyntézy katecholaminů.....	16
2.5.2.1.	Jaterní poruchy.....	16
2.5.2.2.	Parkinsonův syndrom.....	16
2.5.3.	Nadprodukce katecholaminů.....	17
2.5.3.1.	Feochromocytom a feochromocytoblastom.....	17
2.5.3.1.1.	Klinické projevy feochromocytomu.....	18
2.5.3.1.2.	Terapie feochromocytomu.....	19
2.5.3.2.	Neuroblastom.....	19
2.5.3.3.	Melanom.....	20
2.4.	DIAGNOSTIKA NÁDORŮ PRODUKUJÍCÍCH KATECHOLAMINY.....	20
2.5.	METODY STANOVENÍ KATECHOLAMINŮ A METANEFRINŮ.....	22
2.5.1.	Odběr vzorku pro analýzu katecholaminů a metanefrinů.....	23
2.5.1.1.	Interference.....	23
2.5.1.2.	Metodika odběru.....	23
2.5.2.	Extrakce katecholaminů z biologického materiálu.....	24
2.5.2.1.	SPE na Al ₂ O ₃	24
2.5.2.2.	Iontově-výměnná SPE.....	24
2.5.2.3.	Izolace pomocí kyseliny borité.....	25
2.5.3.	Extrakce metanefrinů z biologických vzorků.....	25
2.5.4.	Chromatografické stanovení - HPLC.....	26
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
3.1.	MATERIÁL A POMŮCKY.....	28
3.1.1.	Chemikálie.....	28
3.1.2.	Biologický materiál.....	28
3.1.3.	Přístroje a pomůcky.....	29
3.2.	PRACOVNÍ POSTUP HPLC ANALÝZY.....	30
3.2.1.	Příprava roztoků.....	30
3.2.1.1.	Mobilní fáze.....	30
3.2.1.2.	Roztoky standardů.....	30
3.2.1.3.	Roztoky pro SPE.....	31
3.2.2.	Úprava separačních podmínek pro HPLC analýzu.....	31
3.2.2.1.	Napětí v celách elektrochemického detektoru.....	31
3.2.2.2.	Složení mobilní fáze.....	32
3.2.2.3.	pH mobilní fáze.....	33
3.2.2.4.	Výběr analytické kolony.....	33
3.2.3.	Zakonzentrování vzorků metodou SPE.....	33
3.2.4.	Kalibrace metody.....	34
3.2.5.	Přesnost a správnost metody.....	35
3.2.6.	Výtěžnost.....	35
3.2.7.	Stanovení metanefrinů v biologických materiálech.....	36
4.	VÝSLEDKY.....	37
4.1.	OPTIMALIZACE HPLC-ED PRO STANOVENÍ METANEFRINŮ.....	37
4.2.	SPE.....	37
4.3.	KALIBRACE.....	38
4.4.	PŘESNOST A SPRÁVNOST METODY.....	38
4.5.	VÝTĚŽNOST METODY.....	40
4.6.	STANOVENÍ METANEFRINŮ V BIOLOGICKÝCH MATERIÁLECH.....	41
5.	DISKUZE.....	43
6.	ZÁVĚR.....	47
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	48
8.	PŘÍLOHY.....	50

1. Úvod

Metanefrin, normetanefrin a 3-methoxytyramin jsou O-methylované metabolity adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu. Vznikají působením enzymu katechol-O-methyltransferázy (COMT) na katecholaminy. Katecholaminy jsou důležité neurotransmitery v sympatickém nervovém systému, působí tak na řadu buněk v různých tkáních a mají úlohu v regulaci kardiovaskulárních a metabolických funkcí.

Příčinou zvýšené tvorby a vyplavování katecholaminů do cirkulace jsou nádory chromafinních buněk dřeně nadledvin a buněk sympatických nervových zakončení, které katecholaminy produkují. Tyto nádory jsou označovány jako feochromocytomy a neuroblastomy. Metanefriny stejně jako katecholaminy mají význam při jejich diagnóze. Výhodou diagnostiky metanefrinů oproti katecholaminům je větší senzitivita a specifita stanovení.

Pro kvantitativní stanovení metanefrinů je nutné zaručit velkou citlivost metody. Dříve se používaly metody spektrofotometrické, fluorescenční nebo radioenzymatické, ale žádná z těchto metod nenašla širší uplatnění, a postupně byly vytlačeny metodami chromatografickými (GC, HPLC).

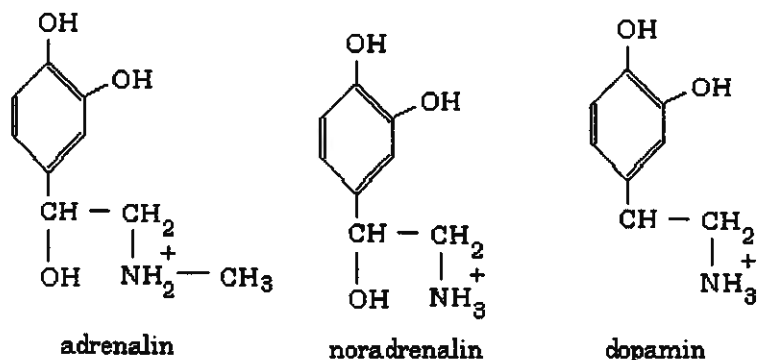
V literatuře se uvádí jako nejběžněji používaná metoda stanovení koncentrace metanefrinů vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí. Cílem naší práce bylo zavedení vlastní modifikace této metody na stanovení koncentrace metanefrinů, která by byla jednoduchá a vhodná pro analýzy v rutinních provozech laboratoří klinické biochemie v České republice.

2. Teoretická část

2.1. Katecholaminy

Z historického hlediska byla poprvé objevena funkce dřeně nadledvin, jako zdroje látky ovlivňující krevní tlak, Oliverem a Schaferem v roce 1895. Tato neznámá látka byla izolována a identifikována jako katecholamin (1).

Jako katecholaminy jsou souhrnně označovány adrenalin, noradrenalin a dopamin, poněvadž jsou odvozeny od pyrokatecholu (anglicky catechol) (Obr.1) (2). Jsou to monoaminy vázané na benzenové jádro se dvěma vicinálními hydroxylovými skupinami - katechol. Prstencová struktura dává těmto sloučeninám vlastnosti přirozených fluorescentů, citlivých na světlo a snadno oxidovatelných (1). Tyto vlastnosti katecholaminů jsou důležité pro metody, jimiž se stanovují.



Obr 1: Vzorce katecholaminů

2.1.1. Působení katecholaminů v organismu

Katecholaminy jsou hormony produkované sympatoadrenomedulárním systémem. Patří mezi neurotransmitery sympatického nervového systému, které vyvolávají kardiovaskulární a metabolické efekty stimulací adrenergických receptorů v mnoha různých buňkách. Rovněž patří mezi klasické hormony přenášené krevním oběhem.

Biologické účinky katecholaminů můžeme rozdělit na děje vyvolané katecholaminy jako molekulami zprostředkujícími nervový signál nebo na děje, kde katecholaminy působí jako hormony a mají účinky metabolické.

Aktivita sympatického nervového systému se zvyšuje při stresových situacích, kdy se katecholaminy ve větší míře vyplavují. Jejich cílem je zlepšit výkonnost organismu a působit tak jako obranný mechanismus.

Působení adrenalinu a noradrenalinu je ovlivněno převážně lokalizací a funkcí tkání, na něž mediátory působí. Shrnutí účinků působení katecholaminů na různé tkáně je uvedeno v tabulce (Tabulka 1). Hlavní úlohou katecholaminů jako neurotransmiterů jsou účinky hemodynamické (regulace krevního tlaku). Vyvolávají konstriktci nebo dilataci cévní stěny a mají účinky na srdeční sval. Mezi metabolické účinky patří stimulace glykolýzy, glukoneogeneze a lipolýzy.

Účinky katecholaminů jsou zprostředkovány dvěma typy adrenergických receptorů – α a β , přes které katecholaminy ovlivňují buněčné pochody.

Po navázání katecholaminů na α_1 -receptor se zvýší aktivita fosfodiesterázy, uvolní se 1,4,5-inositoltrifosfát a diacylglyceroly, čímž stoupá aktivita proteinkináz a aktivuje se buněčný metabolismus. Receptory α_1 jsou běžně přítomny na periférii a vyvolávají kontrakci hladké svaloviny, α_2 -receptory mají funkci regulační, inhibují aktivitu adenylátcyklázy, jejímž prostřednictvím působí β -receptory.

Po vazbě s katecholaminy β -receptory uvolní adenylátcyklázu, která působí prostřednictvím cAMP jako druhého posla na zvýšení aktivity enzymů. Hlavní funkcí β -receptorů je přenos signálu sympatiku na efektor. Receptory β mají také dvě podskupiny β_1 a β_2 , β_1 -receptory jsou typické pro myokard a β_2 -receptory se nachází hlavně ve svalovině bronchů.

Jsou známy i receptory dopaminergní, kde je mediátorem dopamin, který ale vzhledem k podobnosti struktury s adrenalinem a noradrenalinem může působit i na receptory adrenergní.

Tabulka 1: Účinky katecholaminů v organismu

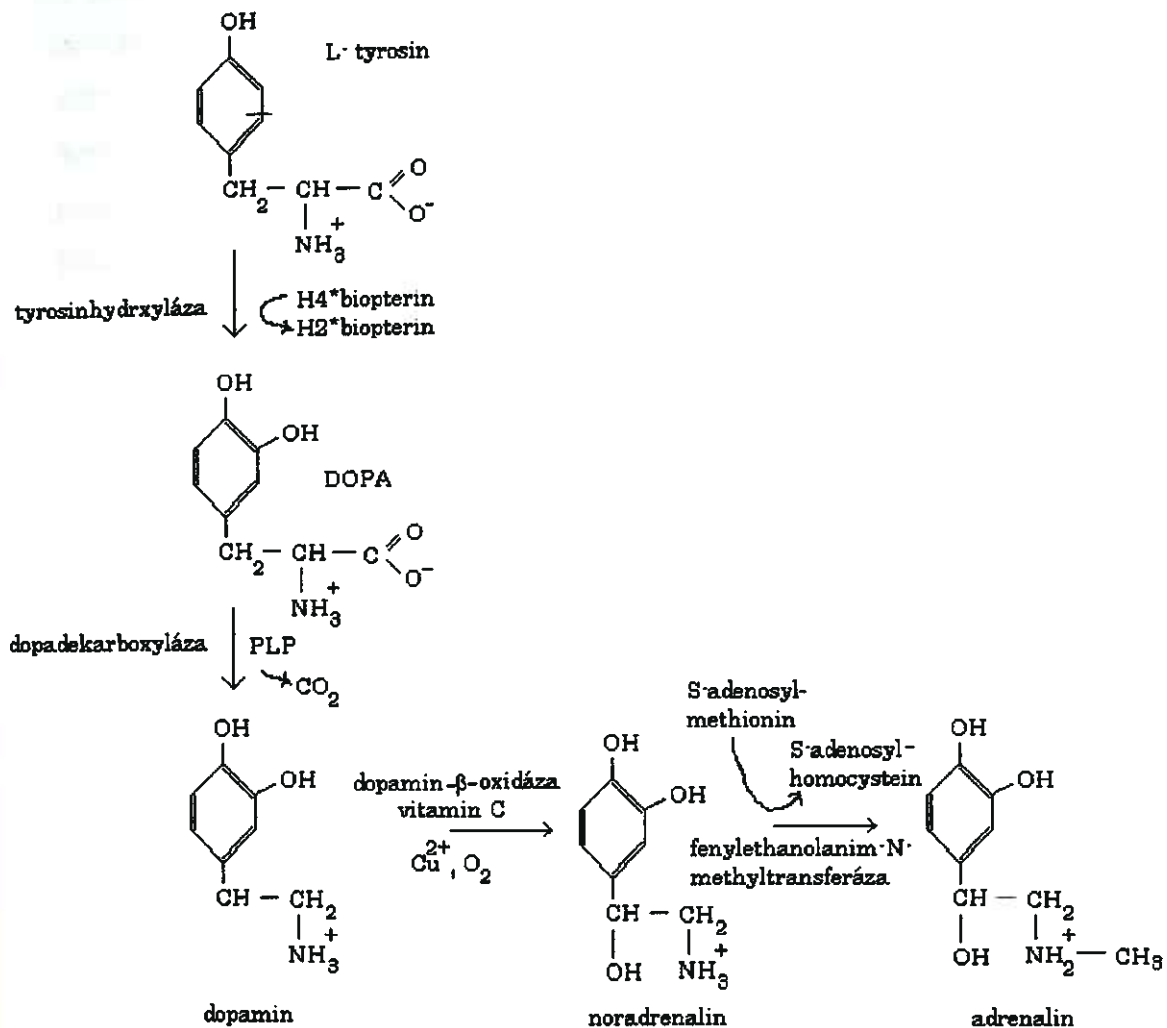
α-receptory - adrenalin, méně noradrenalin	β-receptory - noradrenalin, méně adrenalin
zvýšená glykogenolýza (α_1)	zvýšená glykogenolýza
zvýšená glukoneogeneze (α_1)	zvýšená glukoneogeneze (β_2)
	zvýšená lipolýza (β_2)
	snížená utilizace glukózy
snížená sekrece insulinu (α_2)	zvýšená sekrece insulinu (β_2)
	zvýšená sekrece glukagonu (β_2)
	zvýšené svalové K^+ vychytávání (β_2)
zvýšená srdeční stažlivost (α_1)	zvýšená srdeční stažlivost (β_1)
	zvýšená srdeční frekvence (β_1)
arteriální vasokonstrikce - zvýšení TK (α_1) - vnitřnosti, ledviny, kůže, genitál	arteriální vasodilatace - snížení TK (β_2) - sval
kontrakce svěračů (α_1) - GIT, močové ústrojí	relaxace svalu (β_2) - GIT, bronchy, močové ústrojí
agregace krevních destiček (α_2)	
rozšíření zorniček (α_1)	
pocení	

2.1.2. Biosyntéza katecholaminů

Hlavními místy biosyntézy katecholaminů jsou mozek, dřevě nadledvin a sympatické neurony. Po syntéze jsou katecholaminy v chemicky nezměněné formě skladovány v chromafinních granulích dřevě nadledvin a ve vezikulech postgangliových nervových zakončení. Během skladování jsou katecholaminy v komplexu s nerozpustnými proteiny – chromograniny, které slouží k jejich inaktivaci jako prevence před enzymatickou degradací dokud nejsou uvolněny z vezikul. Pak je jejich biologický poločas 1-2 minuty než se naváží na příslušné receptory, proto je nutné rychlé a chlazené zpracování krevních vzorků ihned po odběru (1).

Biosyntéza katecholaminů vychází z tyrosinu (Obr.2). Ten je hydroxylován na DOPA (3,4-dihydroxyfenylalanin) působením tyrosinhydroxylázy. Kofaktorem této reakce je stejně jako u hydroxylace fenylalaninu na tyrosin tetrahydropteridin. DOPA se dekarboxyluje na dopamin reakcí katalyzovanou dopadekarboxylázou, závislou na pyridoxalfosfátu. Dopamin se dále hydrolyzuje na noradrenalin působením enzymu dopamin- β -hydroxylázy, který obsahuje měď. Tato reakce vyžaduje také přítomnost kyseliny askorbové. Adrenalin vzniká methylací

noradrenalinu. Tato reakce je katalyzována N-methyl-transferázou a donorem methylových skupin je S-adenosylmethionin.

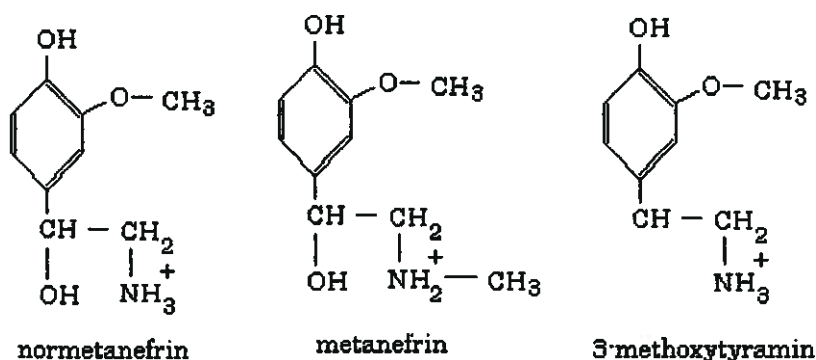


Obr. 2: Biosyntéza katecholaminů

V určitých neuronech centrálního nervového systému, především v kmenových gangliích, proběhne syntéza jen k dopaminu (dopaminergní neurony). V terminálním retikulu postgangliových sympatických neuronů se tvoří hlavně noradrenalin (noradrenergí neurony). Jen v chromafinních buňkách nadledvin vede syntéza až k adrenalinu. Adrenalin se hromadí společně s malým množstvím noradrenalinu ve vezikulech buněk dřeně nadledvin a odtud je vyplavován na signál pregangliových sympatických neuronů do krevního řečiště. Proti noradrenalinu působí adrenalin i v místech vzdálených od lokalizace svého skladování a uvolňování (2).

2.2. Metanefriny a metabolické odbourání katecholaminů

Metanefriny – metanefrin, normetanefrin a 3-methoxytyramin jsou O-methylované deriváty katecholaminů adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu. Vznikají jako meziprodukty jejich metabolismu v organismu (Obr.3).



Obr. 3: Vzorce metanefrinů

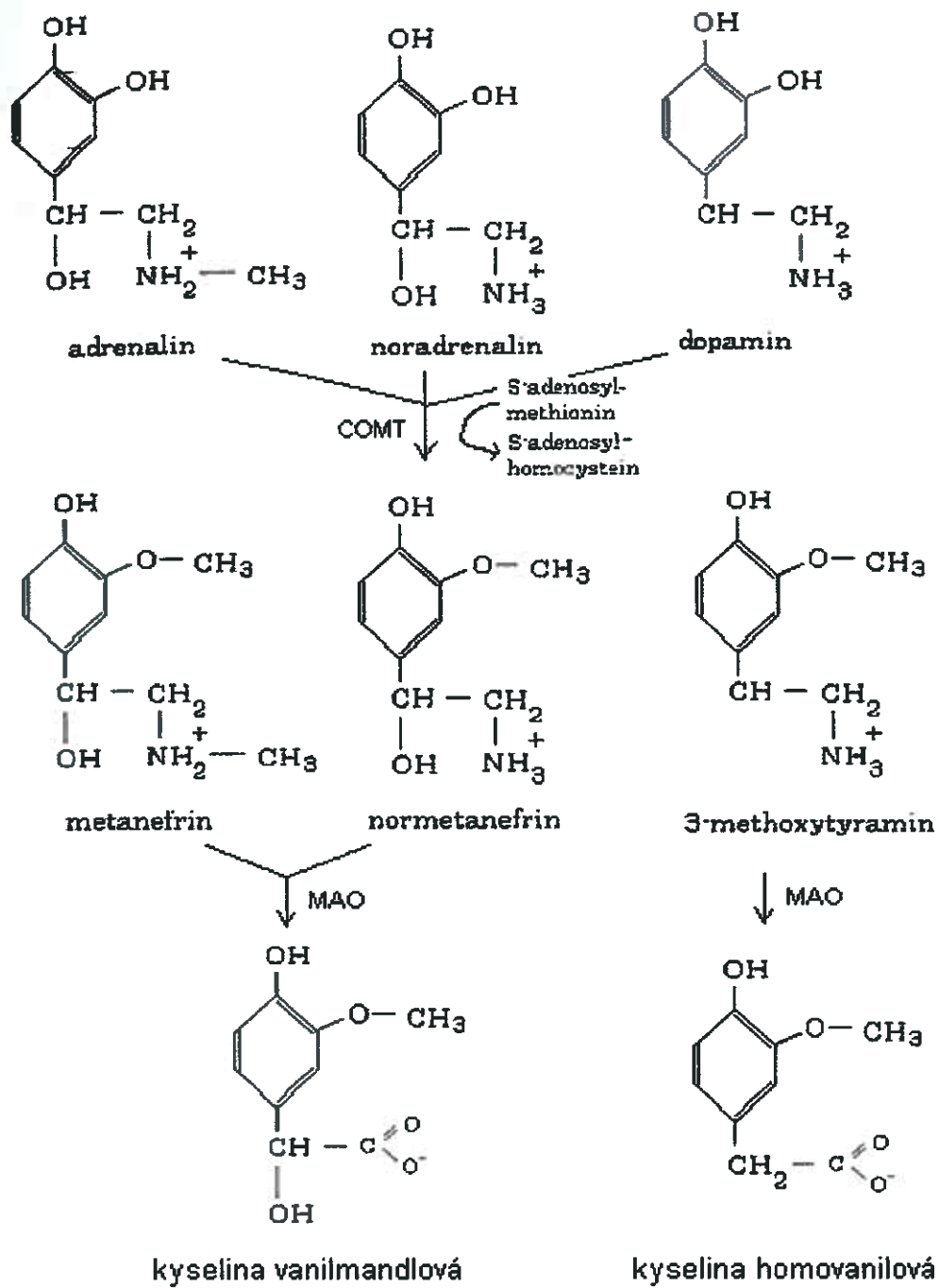
Pouze malá část volných endogenních katecholaminů vyplavených z vezikul se dostane až k receptorům buněk. Stejně tak se jen malé množství objeví v krevní cirkulaci. Většina katecholaminů je zpětně vychytávána nervovými zakončeními (1).

Princip degradace katecholaminů, které se dostanou do krve, byl neznámý do roku 1956, kdy Armstrong ukázal na přítomnost organických kyselin majících

4-hydroxy a 3-methoxy skupinu na benzenovém jádře. Rovněž se mu podařilo izolovat 4-hydroxy-3-methoxy-mandlovou kyselinu. Další autoři později dokázali existenci methoxylovaných aminů – metanefrinu, normetanefrinu a konečného produktu dopaminového metabolismu - kyseliny homovanilové (1).

Odborourávání katecholaminů probíhá nejprve enzymovou methylací hydroxyskupiny v poloze 3 benzenového jádra za vzniku metanefrinu, normetanefrinu nebo 3- methoxytyraminu. Tato reakce je katalyzována enzymem pyrokatechol-O-methyltransferázou (COMT), která přenáší methylový zbytek z donoru, kterým je S-adenosylmethionin. Dále pak následuje eliminace molekuly dusíku z postranního řetězce monoaminoxidázou (MAO) za vzniku aldehydů a oxidace až ke konečným produktům - kyselině vanilmandlové z metanefrinu a normetanefrinu nebo kyselině homovanilové z dopaminu, jejíž vylučování močí je mírou obratu katecholaminů (Obr.4) (2).

Katecholaminy přijímané potravou se před objevením v systémové cirkulaci konjugují - nejvíce dopamin (90%), méně adrenalin a noradrenalin (60-70%). Tyto sulfátové a glukuronové konjugáty metanefrinů se vylučují močí. Volná frakce v plazmě a moči pak ukazuje jen na endogenní produkci katecholaminů (1).



Obr. 4: Odbourávání katecholaminů v organismu

2.3. Patobiochemie katecholaminů

2.5.1. Stavy nedostatku katecholaminů

Stavy nedostatku katecholaminů jsou vzácné. I při oboustranné adrenalektomii jsou sympatické neurony schopny kompenzovat ztrátu katecholaminů tvořených v dřeni nadledvin. Snížené vylučování kyseliny vanilmandlové se současným zvýšením exkrece kyseliny homovanilové lze pozorovat při familiární dysautonomii, vrozené poruše vývoje vegetativního nervového systému. Také při fenylketonurii a melanomu je vylučování kyseliny vanilmandlové sníženo (2).

2.5.2. Poruchy biosyntézy katecholaminů

2.5.2.1. Jaterní poruchy

Při těžkých onemocněních jater dochází k poruchám syntézy katecholaminů. Bývají zvýšené hladiny některých aminokyselin – fenylalaninu, tyrosinu, tryptofanu a naopak koncentrace rozvětvených aminokyselin sniženy. Protože všechny tyto aminokyseliny soutěží o jeden transportní systém, přechází ve větší míře do CNS fenylalanin a inhibuje hydroxylaci tyrosinu na DOPA.

Fyziologické neurotransmitery tak vznikají v menším množství zatímco se tvoří nepravé transmitery - tyramin, oktopamin a 2-fenylethanolamin, které nejsou schopné plnit fyziologické funkce. Dále inhibují biosyntézu dopaminu a noradrenalinu a zesilují tak cerebelární poruchy (2).

2.5.2.2. Parkinsonův syndrom

Parkinsonův syndrom vzniká degenerativními změnami v substantia nigra, v níž mizí melaninové buňky. Biochemicky nacházíme výrazné snížení obsahu dopaminu hlavně v extrapyramidové oblasti.

Parkinsonův syndrom se vyznačuje spíše poruchami neuromuskulárními. Důležitým příznakem je svalová stuhlost (rigor), obličej jako maska, pomalá

šouravá chůze a poruchy artikulace. V pozdějším stádiu choroby se vyskytuje také klidový třes končetin (tremor).

Jako terapie se osvědčily velké dávky L-DOPA. Tato aminokyselina je prekurzorem dopaminu a může pronikat přes hematoencefalickou bariéru. Zvýšená nabídka prekurzoru urychluje dekarboxylaci L-DOPA na dopamin a tak se zvýší koncentrace dopaminu v postižené oblasti mozku. Rovněž se pak podávají inhibitory periferní dopadekarboxylázy, aby se tak ochránila L-DOPA před odbouráním než vstoupí do CNS (2).

2.5.3. Nadprodukce katecholaminů

Nadprodukce a nadměrná sekrece katecholaminů se vyskytuje u feochromocytomu, feochromocytoblastomu, neuroblastomu a jiných nádorů tkání produkujících tyto látky.

2.5.3.1. Feochromocytom a feochromocytoblastom

Feochromocytom je nádor vycházející z chromafinních buněk sympatoadrenomedulárního systému s trvalou nebo paroxyzmální hypersekrecí katecholaminů (3). Poprvé byl objeven Pickem v roce 1912. Nejčastěji se jedná o nádory dřeně nadledvin. Asi 10-15 % případů feochromocytomů bývá lokalizováno extraadrenálně (4).

Feochromocytom je stále velmi vzácnou příčinou hypertenze, přibližně 0,1 % stavů hypertenze je jím způsobena. Jedná se převážně o nádory benigní, avšak až v 10 % se může vyskytovat maligní forma. Maligní nádorová tkáň metastazuje do lymfatických uzlin, kostí, jater a plic, pro diagnózu je pak určující průkaz chromafinních buněk ve tkáních, ve kterých se normálně nevyskytují (např. lymfatické uzliny) (4).

Přibližně v dalších 10 % případů je feochromocytom spojen s familiárním výskytem jednak jako součást syndromu mnohočetné endokrinní neoplazie, dále jako součást von Hippel-Lindauova syndromu, u Recklinghausenovy neurofibro-

matózy a u familiární paragangliomatózy. U pacientů se sporadickým feochromocytomem je až 25% výskyt mutací výše zmíněných genů (4)

2.5.3.1.1. Klinické projevy feochromocytomu

Klinické projevy jsou z velké části způsobeny nadprodukcí katecholaminů, méně často pak i lokálním útlakem tumoru. Sekrece katecholaminů z feochromocytomu výrazně kolísá. Spektrum příznaků závisí na způsobu vylučování. Projevy jsou buď paroxysmální nebo trvalé.

Pro feochromocytom jsou typické záchvatovité příznaky: vzestup krevního tlaku, tachykardie, subjektivně pak bolesti hlavy, palpitace, pocení, zblednutí a následné zčervenání. Jak trvání paroxysmů (od několika minut po několik hodin), tak i interval mezi záchvaty jsou velmi variabilní. Další příznaky jako např. třes, nauzea a zvracení, poruchy zraku, dušnost a bolesti v břiše jsou již vzácnější (4).

Z trvalých příznaků je pak na prvním místě nutné uvést hypertenzi. Opačným příznakem je ortostatická hypotenze, která může doprovázet i trvalou hypertenzi a takto komplikovat podávání antihypertenzní terapie. S metabolickým působením katecholaminů souvisí i porucha glukózového metabolismu. K projevům tzv. hypermetabolického stavu navozeného nadprodukcí katecholaminů bývá řazen úbytek hmotnosti a působení katecholaminů na gastrointestinální trakt se může projevit také zácpou. Prvními projevy feochromocytomu mohou být klinické příznaky, které jsou zapříčiněny současnou nadprodukcí jiných hormonů jako např. ACTH. Charakter příznaků může být také ovlivněn typem vylučovaných katecholaminů: např. noradrenalin - působí díky vazokonstrikci způsobené α -receptory diastolickou hypertenzi, kdežto adrenalin působí díky stimulaci β -receptorů více hypertenzi systolickou, tachykardií, pocení a třes (4).

Vzácností však nejsou ani situace, kdy je feochromocytom diagnostikován u pacientů s náhodně zjištěným tumorem nadledviny u plně asymptomatických pacientů. Až 10 % těchto nádorů může být diagnostikováno jako feochromocytom (4).

2.5.3.1.2. *Terapie feochromocytomu*

Základním terapeutickým krokem při léčbě feochromocytomu je jeho chirurgické odstranění, v případě adrenální formy adrenalectomie. Dnes se provádí již většinou laparoskopicky v závislosti na velikosti tumoru (4). U neoperovatelných případů se pouze snižuje účinek zvýšeného množství katecholaminů pomocí látek, které blokují α a β adrenergní receptory (2).

Před operací je nutná dostatečná medikamentózní příprava. Základním lékem jsou α -blokátory, nyní jsou k dispozici pouze selektivní α_1 -blokátory (prazosin, doxazosin), β -blokátory jsou podávány v případě tachykardie doprovázející terapii α_1 -blokátory. Při špatné toleranci nebo při nedostatečném účinku této kombinace je také možné podávat blokátory kalciových kanálů. V případě inoperabilních nebo maligních nádorů jsou výše uvedené látky léky volby (4).

Léčba cytostatiky, stejně tak i podávání inhibitorů syntézy katecholaminů (α -methyltyrosin) není u nás k dispozici a terapeutické podávání ^{131}I -metajodbenzylguanidinu nepřineslo zatím uspokojivé výsledky.

V případě hypertenzní krize je lékem volby také α -blokátor fentolamin v intravenózní formě. Další možností je podání nitroprusidu sodného a v případě doprovázející tachykardie pak i s β -blokátory.

Dlouhodobá prognóza u benigních tumorů je velmi dobrá, ačkoliv je možné očekávat recidivy tumoru s projevy vzdálených metastáz, proto je nutné i po úspěšné operaci tumoru pacienty pravidelně sledovat (4).

2.5.3.2. Neuroblastom

Neuroblastom je nádor vycházející ze sympatických ganglií, je lokalizován v dřeni nadledvin, často je vysoce maligní a metastazující. Buňky sympatických neuroblastomů mohou snadno podlehnout spontánní nebo indukované diferenciaci na ganglioneuroblastom nebo ganglioneurom. Neuroblastom je velmi závažným onemocněním v pediatrické medicíně, je příčinou 7,5% nádorových bujení u dětí mezi 0 – 14 rokem, jeho incidence je 1 : 7000 narozených dětí. Primární neuroblastomy jsou vyvolané poruchou supresorových genů (17 chromozom) (5).

Pacienti s neuroblastomem nemají vyšší hladiny katecholaminů v krvi, ale je u nich zvýšená sekrece dopaminu (3).

2.5.3.3. Melanom

Melanom je nádorem melanocytů, vzniká v kůži z buněk produkujících pigment melanin, který je syntetizován z tyrosinu stejně jako katecholaminy. U melanomu proto můžeme detekovat zvýšení hladiny DOPA (2). Maligní melanom se označuje jako melanoblastom, benigní pak jako pigmentový névus.

Maligní melanom vzniká nádorovou přeměnou melanocytů, která je vyvolána nejen působením ultrafialové složky slunečního záření, ale i jiným potlačením imunosuprese vlivy zevního i vnitřního prostředí. Projevuje se nerovnoměrným zvětšováním pigmentového ložiska. V průběhu rozrůstání ložiska do plochy se mohou vytvářet světlá depigmentovaná místa.

2.4. Diagnostika nádorů produkujících katecholaminy

Feochromocytom je stále vzácnou příčinou hypertenze, avšak jeho záchyt s používáním moderních diagnostických postupů v poslední době stoupá. Je tedy důležité ho vyloučit u všech expanzí nadledvin pro možnost letálního ohrožení pacienta při manipulaci s nepoznaným feochromocytomem. Naopak jeho výskyt je stále vzácný mezi pacienty se záchvatovitou hypertenzí, kde je význam této diagnózy mnohdy přeceňován (4).

Důležitým laboratorním vyšetřením při diagnostice feochromocytomu je vyšetření katecholaminů.

Jejich vyšetření je prvním diagnostickým postupem při podezření na feochromocytom. Katecholaminy se stanovují jednotlivě, jejich sumární stanovení se opouští (3). Pro vlastní diagnostiku feochromocytomu má hlavní význam stanovení adrenalinu a noradrenalinu a jejich metabolitů v plazmě nebo v moči za 24 hodin. Referenční hodnoty uvádí tabulka (Tabulka 2). Je nutné, aby vyšetření byla provedena ve stabilizovaném stavu pacienta a s dostatečně včas vysazenou antihypertenzní medikací (4).

Tabulka 2: Referenční hodnoty katecholanminů a metanefrinů v plazmě a moči

Plazmatické katecholaminy		
NEPI: 100 - 400 ng/l	EPI: < 50 ng/l	DA: < 90 ng/l
0,6 - 2,36 nmol/l	0,27 nmol/l	0,59 nmol/l (2)
Močové katecholaminy		
NEPI: 72 - 312 nmol/24h	EPI: 2,4 - 96 nmol/24h	DA: 240 - 2280 nmol/24h
20 - 250 nmol/g kreat.	3 - 60 nmol/g kreat.	35 - 2000 nmol/g kreat. (2)
Plazmatické metanefriny		
NMN: 18 - 112 ng/l	MN: 12 - 61 ng/l	
0,1 - 0,61 nmol/l	0,06 - 0,31 nmol/l (6)	
Močové metanefriny		
NMN: 480 - 2400 nmol/24h	MN: 264 - 1440 nmol/24h	3-MT: 240 - 1680 nmol/24h
10 - 1600 nmol/g kreat.	15 - 660 nmol/g kreat.	110 - 800 nmol/g kreat. (2)

Nejlepší senzitivity a specificity dosahuje vyšetření plazmatického metanefrinu a normetanefrinu. Význam vyšetřování vanilmandlové kyseliny v moči klesl pro nízkou specifitu a senzitivitu. V případě diagnostických pochyb je možno provést farmakologické testy. Bezpečnější jsou testy supresní (klonidinový), které je vhodné provést v případě hraničního zvýšení katecholanminů. Provokační (glukagonové) testy se dnes již prakticky neprovádějí (4,6).

Menší význam má laboratorní vyšetření v určení lokalizace nádoru (3). Vzniká-li nádor v dřeni nadledvin, produkuje především adrenalin, při extraadrenální lokalizaci pak hlavně noradrenalin. Některé nádory však produkují jak adrenalin tak noradrenalin (2,3). Při zvýšené tvorbě adrenalinu lze pozorovat hyperglykémii, glykosurii a vzrůst volných mastných kyselin v krvi v důsledku rostoucí glykogenolýzy a lipolýzy (2).

Dopamin je ve větší míře secernován maligními feochromocytomy – feochromoblastomy. Význam má však jen pozitivní nález (normální exkrece dopaminu feochromoblastom nevylučuje). Zvýšená sekrece dopaminu je rovněž charakteristická při neuroblastomu, ganglioneuroblastomu a ganglioneuromu (3).

V posledních letech se rovněž začalo mluvit o stanovení chromograninu A v séru jako nádorového markeru u feochromocytomu. Chromogranin A je protein o 439 aminokyselinách, o kterém je známo, že se vyskytuje a uvolňuje z buněk společně s katecholaminy. Hlavním zdrojem chromograninu A jsou vezikuly dřeně nadledvin. Rovněž se ukázalo, že degradace tohoto proteinu v krevním řečišti je na rozdíl od katecholaminů pomalá (7).

Základním vyšetřením, vhodným k lokalizaci tumoru, je CT nebo MRI vyšetření břicha, které slouží i k vyhledávání metastáz a extraadrenálních forem umístěných pod bránicí. V případě abnormálních hormonálních testů a negativního nálezu na CT nebo MRI nebo k vyloučení vzdálených metastáz je vhodné provést scintigrafické vyšetření pomocí ¹²³I-metajodbenzyl-guanidinu (MIBG) k dalšímu upřesnění lokalizace extraadrenálně uloženého tumoru.

U pacientů s diagnostikovaným feochromocytomem v nižším věku nebo s extraadrenálními formami je vhodné provádět genetické vyšetření (4).

2.5. Metody stanovení katecholaminů a metanefrinů

Před 30 lety byly k detekci feochromocytomů používané biochemické testy pro stanovení 4-hydroxy-3-methoxymandlové kyseliny spektrofotometrickou metodou. Princip metody popsal Pisano (8). V literatuře se rovněž objevují zmínky o technikách fluorimetrických, radiometrických a imunochemických (1).

Nicméně vývoj plynové, vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy dovořil kvantifikaci metabolitů katecholaminů s větší senzitivitou a specifitou a eliminoval tak nevýhody předchozích stanovení (1,6,9-18).

Pro stanovení katecholaminů a metanefrinů z biologických matric je nutné vzorek nejprve správně odebrat a předem čistit a koncentrovat pomocí extrakčních technik.

2.5.1. Odběr vzorku pro analýzu katecholaminů a metanefrinů

Správný postup odebírání vzorku je u stanovení katecholaminů a jejich metabolitů velmi důležitý.

2.5.1.1. Interference

S analýzou interferuje velké množství látek, které ovlivňují stanovení, protože obsahují katecholy nebo mají podobnou strukturu. Existují také látky, které zvyšují vyplavování katecholaminů do krve nebo ovlivňují jejich odbourávání a vylučování z organismu.

Dva dny před odběrem by měl pacient držet dietu. Neměl by jíst čokoládu, moučnický, ovoce, zeleninu, ořechy a měl by se vyvarovat kouření, pití alkoholu, ovocných šťáv, čajů a kávy (3).

Se stanovením interferuje řada léků, proto se doporučuje aby pacient vynechal podle možností všechny léky. Alespoň dva týdny před odběrem by se měly vysadit α -methyl-dopa, α -methyl-p-tyrosin, isoproterenol, dobutamin, carbidopa, klonidin, guanfacin a moxonidin. Acetaminophen je potřeba vysadit 5 dní před odběrem, protože má podobnou strukturu a interferuje při HPLC stanovení. Dva dny před sběrem by se neměly užívat přípravky levodopy, teofylinu, rezerpinu, prazosin, sulfomamidy, diuretika, nitroglycerin, izoproterenol, labetalol, niacin, riboflavin, chinidin, chinin, tetracykliny, erytromycin a salicylátová analgetika. Při stanovení metanefrinů vadí také inhibitory monoaminoxidázy. Analýzu nelze také provést po rentgenovém vyšetření s jodovými kontrastními přípravky (3,9).

2.5.1.2. Metodika odběru

Plazmatické hladiny hormonů snadno vzrůstají při stresových situacích. Odběry by se měly provádět u ležících pacientů, kteří mají kanylu pro odběr krve zavedenou nejméně 15 minut před odběrem. Chybné odběry v sedě nebo ve stoje způsobují falešně pozitivní výsledky (9).

K analýze jsou potřeba 1-2 ml plazmy. Krev se odebírá do zkumavky s heparinem (10j/ml krve), použití EDTA jako antikoagulačního činidla se nedoporučuje pro nízkou stabilitu analytů. Protože je biologický poločas

katecholaminů krátký (řádově minuty), musí se odebraná krev ihned uložit do ledu a nejdéle do půl hodiny centrifugovat při 5°C a 3000 ot./min, plazma se pak skladuje při -70°C.

Sběr moči se provádí po 24 hodin do nádoby s 30 ml 3 mol/l HCl. Kyselé prostředí po dobu sběru je podmínkou, protože většina metanefrinů je v konjugaci s kyselinou glukuronovou nebo v sulfatované formě a pro diagnostiku je nutná kyselá hydrolyza.

2.5.2. Extrakce katecholaminů z biologického materiálu

Chromatografická analýza pro diagnostiku katecholaminů z biologického materiálu je možná po předchozí extrakci látek ze vzorku. Izolační postupy pro stanovení katecholaminů lze dělit dle tří základních principů: extrakce na pevné fázi Al_2O_3 , iontově-výměnná SPE a izolace pomocí kyseliny borité.

2.5.2.1. SPE na Al_2O_3

Tato metoda je metodou nejčastější. Jedná se o extrakci na kyselinou promyté alumině při alkalickém pH (9,11). Výběr kyselin často používaných pro následnou eluci adsorbovaných katecholaminů zahrnuje kyseliny chlorovodíkovou, fosforečnou, octovou a chloristou. Nejčastěji publikované využití však našla jako desorbent kyselina chlorovodíková, protože dobře redukuje chromatografické artefakty. Používá se po předchozím propláchnutí kolonky etylacetátem.

Mnoho autorů využívalo pro stanovení plazmatických katecholaminů po izolaci na Al_2O_3 metodu HPLC s elektrochemickou detekcí, ale u vzorků moči byla specifita extrakce limitována. Použití izolace na alumině jako přípravy vzorku u analýzy moči je vhodnější u HPLC s fluorescenčním detektorem (1,9,13).

2.5.2.2. Iontově-výměnná SPE

Alternativou extrakce katecholaminů na Al_2O_3 je použití silných kation-výměnných pryskyřic. Silné kationové iontoměniče jsou nevýhodné pro svou malou selektivitu (1), zatímco selektivita slabých karboxylových iontoměničů se dá

zlepšit použitím eluce kyselinou boritou (1). Izolace katecholaminů je založena na vazbě aminových skupin a eluce kyselinou boritou souvisí s vazbami cis-diolových skupin molekuly katecholaminů.

Byla také publikována kombinace iontově-výměnné extrakce s izolací na alumině, tento způsob přípravy vzorku omezí interference při HPLC, ale děje se tak na úkor delšího času potřebného pro úpravu vzorku před analýzou (1).

2.5.2.3. Izolace pomocí kyseliny borité

Postup s vyšší specifitou, která byla dosažena při izolaci kyselinou boritou, byl dále zdokonalen použitím imobilizovaných gelů s kyselinou fenyloboritou a pevných fází kyseliny borité. Tyto gely zadržují vicinální hydroxylové skupiny v alkalické oblasti. Eluce se pak provede na základě poklesu pH. Je to jednoduchá a rychlá metoda předcházející HPLC analýze (1).

2.5.3. Extrakce metanefrinů z biologických vzorků

Chromatografická analýza metanefrinů z biologického materiálu se stejně jako u katecholaminů nemůže provádět bez extrační izolace vzorku.

Metabolity katecholaminů jsou navíc v moči přítomné ve formě konjugátů sulfátů a kyseliny glukuronové. Volné metanefriny jsou zastoupeny pouze ze 3 %, proto se před izolací provádí kyselá hydrolyza. Plazmatické analyty se izolují přímo.

Extrakce metanefrinů se provádí hlavně na základě kationtové výměny s použitím slabých sulfonových a karboxylových iontoměníčů (1,9,10). Existují i kombinované techniky kationt- a aniont-výměnné extrakce (1). V literatuře jsou popisovány i mechanismy izolace založené na systému reverzní fáze (11) nebo spojení principu extrakce na reverzní fázi s kationtovou výměnou (12).

2.5.4. Chromatografické stanovení - HPLC

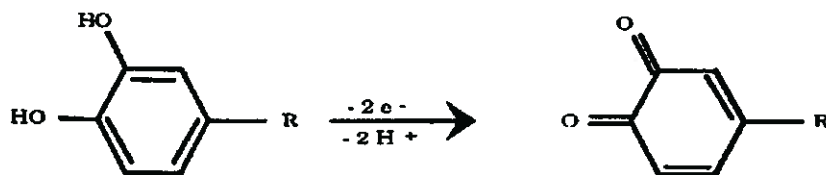
Vysokoučinná kapalinová chromatografie dovoluje kvantifikaci katecholaminů a jejich metabolitů s větší senzitivitou a specifitou než ostatní metody.

Fluorimetrická nebo elektrochemická detekce zajišťuje potřebnou citlivost pro analýzu katecholaminů a jejich metabolitů, po předchozím přečištění a zakoncentrování pomocí izolačních technik. Je možná i automatizace zařazením purifikační předkolumny do HPLC systému.

Katecholaminy jsou přirozeně fluorescenční látky, ale použití fluorescenčního detektoru u HPLC je omezeno přítomností velkého množství dalších fluorescenčních látek přítomných v biologickém materiálu. Dochází tak k interferencím. Pro fluorimetrickou detekci je nutné použití předkolumnové nebo postkolumnové derivatizace činidly jako jsou trihydroxyindol a ethylendiamin.

Elektrochemická detekce je pro stanovení katecholaminů nejvhodnější. Je to technika velmi citlivá, schopná zachytit velmi nízké koncentrace elektrochemicky aktivních látek (1).

Detekce je založená na elektrochemické reakci, ve které se jedna látka transformuje v druhou tím, že buď přijme (redukce) nebo odevzdá (oxidace) elektron (Obr.5). V cele detektoru je umístěn pár inertních elektrod, na kterých je vložený potenciál umožňující průběh reakce. Během elektrochemického děje dochází ke změně velikosti měřeného elektrického proudu v cele detektoru.



Obr.5: Princip elektrochemické detekce

Metanefriny jsou díky hydroxylové skupině na benzenovém jádře snadno oxidovatelné. Při vložení určitého potenciálu dochází k reakci, při které vzniká z hydroxylové skupiny ketoskupina a uvolní se elektron.

V literatuře jsme našli aplikace pro stanovení metanefrinů, kde se používala technika iontově-párové kapalinové chromatografie v systému obrácených fází. Do mobilní fáze obsahující EDTA, NaH_2PO_4 , acetonitril a vodu se přidával jako iontově-párující činidlo oktansulfonát sodný. Pro elektrochemickou detekci se nastavovala napětí 0,37-0,4V v ochranné cele a v analytické cele na první elektrodě 0,1-0,15 V a na druhé elektrodě -0,065 – -0,39V. Používané kolony byly dlouhé 250 mm, měli průměr 4 mm a byly plněné částicemi o průměru 5 μm (9,10).

V poslední době se popisuje i spojení chromatografických metod s hmotnostní spektrometrií (8,9). Molekuly NMN ($M_r = 183$) a MN ($M_r = 197$) jsou protonované a dávají molekulové ionty - m/z 184 a 198. Spontánní ztrátou vody z protonovaných molekulových iontů vznikají fragmenty s m/z 166 a 180 a ztrátou methoxy skupiny se vytvoří fragmenty s m/z 134 a 148. Detekce založená na principu hmotnostní spektrometrie zvyšuje specifitu stanovení (11,12,14,15).

3. Experimentální část

3.1. Materiál a Pomůcky

3.1.1. Chemikálie

- deionizovaná voda - čištěna pomocí MilliQ Plus systému - Millipore (USA)
- metanol – Kulich (ČR)
- acetonitril – Merck (SRN)
- oktan-sulfonát sodný – Fluka (SRN)
- EDTA – Lachema (ČR)
- dihydrogenfosforečnan sodný – Fluka (SRN)
- kyselina fosforečná – Lachema (ČR)
- kyselina octová ledová – Penta (ČR)
- kyselina chlorovodíková – Penta (ČR)
- hydroxid amonný (26%) – Lachema (ČR)
- normetanefrin (NMN) – Sigma-Aldrich (SRN)
- metanefrin (MN) – Sigma-Aldrich (SRN)
- 3- metoxytyramin (3-MT) - Sigma-Aldrich (SRN)
- 4-hydroxy-3-methoxybenzylamoniumchlorid (HMBA) – Merck (SRN)
- kalibrační standard pro metanefriny v moči- Recipe (SRN)
- kontrolní standardy pro metanefriny v moči- Recipe (SRN)

3.1.2. Biologický materiál

- vzorky plazmy pacientů fakultní nemocnice v Hradci Králové
- vzorky moči pacientů fakultní nemocnice v Hradci Králové

3.1.3. Přístroje a pomůcky

- HPLC
 - pumpa LC-10AD VP – Shimadzu (JPN)
 - kolona Lichrocard 250-4, Lichrospher RP-18e, 5 μ m – Merck (SRN)
 - kolona Lichrocard 125-3, Purospher RP-18e, 5 μ m – Merck (SRN)
 - ochranná cela – model 5021 – ESA (USA)
 - analytická cela – model 5011 – ESA (USA)
 - softwarový systém CSW 1.7
- předvážky Sartorius PT 600 – Sartorius (SRN)
- analytické váhy MC 1 – Sartorius (SRN)
- pH metr PHM 93 - Radiometer Copenhagen (Dánsko)
- úpravna vody MilliQ Plus – Millipore (USA)
- centrifuga – Labofuge 400R – Heraeus instruments (SRN)
- vakuový odpařovací systém RC 1010 Jouan –Trigon-plus (ČR)
- vakuový odsávač pro SPE – Supelco (USA)
- SPE kolonky Oasis MCX (3cc, 60 mg, 30 μ m) – Waters (USA)
- filtry 0,22 μ m typ GVWP - Millipore (USA)
- pipety 1 – 5 ml , 50 – 200 μ l , 1 ml a 250 μ l
- injekční stříkačka 100 μ l
- ultrazvuková lázeň
- filtrační aparatura
- odměrné baňky – 50, 100 ml
- zkumavky
- kádinky
- chladič box
- destilační aparatura

3.2. Pracovní postup HPLC analýzy

3.2.1. Příprava roztoků

3.2.1.1. Mobilní fáze

Mobilní fázi jsme připravili podle publikace Eisenhofera (9). Nejdříve jsme udělali zásobní roztok, navážením 138 g dihydrogenfosforečnanu sodného, 1,28 g oktansulfonátu sodného a 100 mg EDTA a vše jsme rozpustili v 1000 ml deionizované vody. Tento zásobní roztok měl dobu expirace 6 měsíců při laboratorní teplotě.

Pro přípravu mobilní fáze jsme použili 100 ml zásobního roztoku, 50 – 100 ml acetonitrilu a vše jsme dolili deionizovanou vodou přibližně do 950 ml. Poté jsme upravili pH na hodnotu 3 použitím 85% kyseliny fosforečné a doplnili jsme objem na 1000 ml.

Výsledné koncentrace jednotlivých komponent ve vodném roztoku mobilní fáze byly pro: NaH_2PO_4 1 mol/l, EDTA 0,13 mmol/l, oktansulfonát sodný 0,34 mmol/l a acetonitril 50–100 ml/l.

Takto připravenou mobilní fázi jsme museli ještě přefiltrovat přes 0,22 μm filtr a odvzdušnit 15 minut ultrazvukem.

3.2.1.2. Roztoky standardů

Roztoky standardů jsme ředili 0,2 mol/l kyselinou octovou.

Zásobními roztoky standardů byly normetanefrin (NMN), metanefrin (MN), 3-metoxytyramin (3-MT) a 4-hydroxy-3-methoxybenzylamoniumchlorid (HMBA) o koncentraci 100 mg/l. Připravili jsme je navážením 5 mg do 50 ml 0,2 mol/l kyseliny octové.

Ze zásobních roztoků jsme dále ředili pracovní koncentrace standardů MN, NMN a 3-MT – 50 $\mu\text{g/l}$. Odpipetovali jsme 50 μl zásobního roztoku do 100 ml CH_3COOH .

Pro kalibraci stanovení metanefrinů v moči a kontrolu přesnosti a správnosti jsme použili komerčně dodávané standardy.

Jako vnitřní standard jsme použili roztok 4-hydroxy-3-methoxybenzyl-amoniumchloridu. Pro získání vnitřního standardu (HMBA) na stanovení metanefrinů jsme ředili zásobní roztok na koncentraci 100 µg/l.

3.2.1.3. Roztoky pro SPE

Pro SPE jsme používali tyto chemikálie:

deionizovaná voda

100% metanol

0,1 mol/l HCl (8,1 ml 36,5% HCl do 1 litru deionizované vody)

60% metanol s 5 % (obj.%) NH₄OH (5 ml NH₄OH 26% p.a. a 60 ml metanolu do 100 ml vody)

5% (obj.%) NH₄OH v metanolu (5 ml NH₄OH 26% p.a. do 100 ml metanolu)

3.2.2. Úprava separačních podmínek pro HPLC analýzu

3.2.2.1. Napětí v celách elektrochemického detektoru

Při hledání optimální hodnoty napětí jsme vycházeli z publikace Eisenhofera (9), kde byly uvedeny hodnoty napětí 370 mV na ochranné cele, 150 mV na první elektrodě a -390 mV na druhé elektrodě analytické cely. Postupně jsme zkoušeli měnit napětí v jednotlivých celách. Testované hodnoty napětí v celách jsou uvedeny v tabulkách (Tabulky 3 a 4).

Tabulka 3: Optimalizace napětí v analytických celách

napětí v ochranné cele (mV)	napětí v analytické cele - 1. elektroda (mV)	napětí v analytické cele - 2. elektroda (mV)
370	450	-390
370	390	-390
370	250	-390
370	150	-390
370	100	-390
370	150	-300
370	150	-350
370	150	-390
370	150	-450
370	150	-500

Tabulka 4: Optimalizace napětí v ochranné cele

napětí v ochranné cele (mV)	napětí v analytické cele - 1. elektroda (mV)	napětí v analytické cele - 2. elektroda (mV)
330	150	-390
350	150	-390
370	150	-390
390	150	-390
410	150	-390

3.2.2.2. Složení mobilní fáze

Složení mobilní fáze pro metanefriny bylo rovněž podrobně popsáno Eisenhoferem - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 13,8 g/l, EDTA 10 mg/l, oktansulfonát sodný 128 mg/l a acetonitril 50-100 ml/l, pH=3 (9). Literární odkaz ale přesně neudává množství přidaného acetonitrilu do mobilní fáze, proto jsme zkoušeli optimalizovat jeho koncentraci – 50, 75 a 100 ml/l.

Návod pro přípravu jsme přebrali po zkušenostech s mobilní fází dříve používanou v naší laboratoři pro stanovení katecholaminů ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10,35 g/l, kyselina trichlooctová 3,27 g/l, EDTA 0,56 mg/l, SDS 2,307g/l, destilovaný methanol 10ml/l a ACN 160 ml/l, pH 3). Tato mobilní fáze při podmínkách detekce metanefrinů vyvolávala značný šum na základní linii.

3.2.2.3. pH mobilní fáze

Doporučované pH pro stanovení metanefrinů se pohybuje v intervalu 3-3,4 (9). Upravili jsme pH mobilní fáze na hodnoty: 3,794; 3,552; 3,316; 3,275; 3,200; 3,078; 2,952 a 2,834 a následně jsme testovali velikost signálu poskytovaného metanefriny o koncentraci 10 µg/l.

3.2.2.4. Výběr analytické kolony

Pro stanovení katecholaminů jsme běžně používali kolonu Lichrocart 125-3 – Purospher RP-18e (5µm). Po nadávkování předem přečištěných vzorků plazmy na tuto kolonu bylo na chromatogramu nedokonalé rozlišení piků metanefrinů. Tento problém jsme vyřešili výměnou kolony. Dále jsme používali kolonu Lichrocart 250-4 – Lichrospher RP-18e (5µm), která již všechny eluční zóny látek v plazmě dostatečně oddělila.

3.2.3. Zakoncentrování vzorků metodou SPE

Koncentrace metanefrinů v séru jsou příliš nízké, nelze je detekovat pouze metodou HPLC-ED bez předchozího zakoncentrování. Z tohoto důvodu jsme použili kolonky pro extrakci na pevné fázi - SPE (solid phase extraction). Při jejich výběru jsme se řídili literárními údaji, v nichž byla extrakce prováděna buď na principu kationtové výměnné extrakce nebo na základě extrakce na reverzní fázi. Pro náš experiment jsme nakonec vybrali kolonku Oasis MCX (Waters), která oba tyto principy spojuje. Postup elučních kroků pro extrakci je aplikací firemního manuálu pro kolonky (Schéma 1), který jsme modifikovali vynecháním kroku promývání 60% metanolem s 5 % NH₄OH.

Schéma 1: Postup SPE

Kondicionace kolonky:

- *1 ml 100 % metanolu*

Ekvilibrace kolonky:

- *1 ml vody*

Dávkování vzorku:

- *1 ml vzorku*

Promývání:

- *1 ml 0,1 M HCl - odstraní proteiny a zadrží bazické látky iontově výměnným mechanismem*
- *1 ml 100% metanol - odstraní interferující látky zadržované hydrofobní interakcí, může se použít jako eluční krok pro neutrální a kyselé látky*
- *1 ml 60% metanol s 5 % NH₄OH - odstraní polárnější bazické látky*

Eluce:

- *1 ml 5% NH₄OH v metanolu - bazické látky*

Odpaření a rekonstituce ve 100 µl mobilní fáze

Průtok by neměl přesáhnout 1 ml/min

3.2.4. Kalibrace metody

Pro kalibrace jsme naředili standardní roztok na koncentrace odpovídající hladinám metanefrinů v biologických materiálech. Koncentrace metanefrinů v kalibračních roztocích jsou uvedeny ve výsledcích. Pro kalibraci metanefrinů v moči jsme použili komerčně dodávaný kalibrátor, který jsme před extrakcí ještě 100 x zředili, protože koncentrace metanefrinů v moči jsou vyšší než je adsorpční kapacita SPE kolonek. K 1 ml každého vzorku jsme přidali 100 µl interního standardu HMBA o koncentraci 100 µg/l a 1 ml směsi vzorku se standardem jsme

extrahovali na SPE kolonkách. Po extrakci jsme provedli HPLC analýzu a sestrojili kalibrační křivky pro jednotlivé metanefriny.

3.2.5. Přesnost a správnost metody

Přesnost (opakovatelnost i reprodukovatelnost) a správnost jsme měřili ve vybraných kontrolních materiálech, které odpovídají hladinám metanefrinů v biologických vzorcích. Koncentrace těchto vzorků jsou uvedeny ve výsledcích. Provedli jsme 10 měření pro každou koncentraci. Pro vzorky moči jsme použili komerčně dodávané močové kontroly, které jsme stejně jako komerční kalibrátor ještě 100x ředili, protože koncentrace metanefrinů v moči jsou vyšší než je adsorpční kapacita SPE kolonek.

Pro zjištění přesnosti jsme vypočítali směrodatnou odchylku a variační koeficient. Správnost jsme určili jako absolutní chybu a chybu relativní vztaženou ke správné hodnotě. Pro výpočet jsme použili průměrné hodnoty koncentrací z 10 měření a známé koncentrace standardních roztoků.

3.2.6. Výtěžnost

Výtěžnost (recovery) byla měřena ve dvou vzorcích moči a v jednom vzorku plazmy. Stanovení byla provedena v dubletech. Používaná kyselina octová měla koncentraci 0,2 mol/l.

U močových vzorků jsme pipetovali roztoky podle tabulky (Tabulka 5). Koncentrace standardů NMN, MN a 3-MT byly 1,369; 1,312 a 1,498 $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka 5: Pipetovací protokol stanovení výtěžnosti metanefrinů v moči

	V moč (μl)	V kyselina octová (μl)	V standard (μl)
vzorek	50	4950	0
vzorek s přídavkem	50	4900	50

Pro stanovení výtěžnosti metanefrinů v plazmě jsme pipetovali následující objemy roztoků (Tabulka 6). Koncentrace standardů NMN, MN a 3-MT byly 10,95; 10,50 a 11,99 nmol/l .

Tabulka 6: Pipetovací protokol stanovení výtěžnosti metanefrinů v plazmě

	V plazma (μl)	V kyselina octová (μl)	V standard (μl)
vzorek	900	100	0
Vzorek s přidavkem	900	0	100

K 1 ml takto připravených vzorků jsme přidali 100 μl vnitřního standardu a připravený materiál jsme dávkovali na SPE kolonky. Po extrakci jsme měřili koncentraci vzorků na HPLC a vypočítali výtěžnost.

3.2.7. Stanovení metanefrinů v biologických materiálech

Po zavedení a optimalizování metody jsme začali stanovovat metanefriny v moči a plazmě. Vzorky moči jsme před analýzou 100 x zředili. K 1 ml vzorku jsme přidali 100 μl vnitřního standardu a pak jsme 1 ml směsi dávkovali na SPE kolonky. Po zakoncentrování vzorku jsme materiál dávkovali na HPLC.

4. Výsledky

4.1. Optimalizace HPLC–ED pro stanovení metanefrinů

Při optimalizaci podmínek HPLC-ED metody pro stanovení metanefrinů jsme zjistili, že nejlépe vyhovují napětí 370 mV na ochranné cele, 150 mV na první elektrodě a -390 mV na druhé elektrodě analytické cely coulochemického detektoru (Obr. 8-10).

Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití mobilní fáze s koncentrací acetonitrilu 75 ml/l.

Optimální hodnota pH mobilní fáze byla 3,078 (Obr.11).

Na koloně Lichrocart 125-3 – Purospher RP-18e (5 μ m) se nepodařilo dostatečně oddělit píky jednotlivých látek ve vzorcích biologického materiálu, proto jsme použili kolonu delší. Kolona Lichrocart 250-4 – Lichrospher RP-18e (5 μ m) již všechny píky dostatečně oddělila.

4.2. SPE

Při extrakci na pevné fázi jsme museli vynechat promývání 60% metanolem s 5% NH₄OH, protože zbytky vody znemožňovaly odpařování rozpouštědla.

Konečný postup SPE byl následující:

Kondicionace a ekvilibrace kolonky:

1,25 ml metanol / 1,25 ml vody

Dávkování vzorku:

1 ml směsi - (1 ml plazmy nebo 100x ředěné moči + 100 μ l IS c = 100 μ g/l)

Promývání:

1,25 ml destilované vody / 1,25 ml 0,1 mol/l HCl / 1,25 ml metanol

Eluce:

1,25 ml 5% NH₄OH v metanolu

Odpaření a rekonstituce ve 100 μ l mobilní fáze

4.3. Kalibrace

Naměřené plochy píků pro jednotlivé koncentrace metanefrinů uvádí tabulky (Tabulky 7 a 8). Kalibrační křivky jsou uvedeny v přílohách (Obr. 12-17).

Tabulka 7: Výsledky kalibrace pro koncentrace plazmatických metanefrinů

NMN		MN		3-MT	
c(nmol/l)	plocha píku	c(nmol/l)	plocha píku	c(nmol/l)	plocha píku
0,109	306,582	0,058	389,590	0,195	990,124
0,219	594,687	0,117	518,980	0,389	1788,126
0,438	1107,229	0,233	1041,446	0,779	2190,235
0,875	1998,842	0,466	1803,955	1,558	3914,256
1,751	3637,659	0,933	3029,194	3,115	8375,193
3,502	5302,992	1,866	4173,707		

Tabulka 8: Výsledky kalibrace pro koncentrace metanefrinů v moči

NMN		MN		3-MT	
c(μ mol/l)	plocha píku	c(μ mol/l)	plocha píku	c(μ mol/l)	plocha píku
5,603	122620	2,985	62893	1,246	28380
2,802	59175	1,493	32570	0,623	14956
1,401	28605	0,746	18514	0,312	8375
0,700	12917	0,373	9924	0,156	3914
0,350	5302	0,187	4173	0,078	2190
0,175	3637	0,093	3029	0,039	1788
0,088	1998	0,047	1803	0,019	990

4.4. Přesnost a správnost metody

Správnost a přesnost měření v sérii a mezi sériemi pro 10 vzorků různých koncentrací, které jsou srovnatelné s hladinami metanefrinů v biologických materiálech uvádí tabulky (Tabulky 9-12).

Tabulka 9: Opakovatelnost měření (intraassay) pro koncentrace metanefrinů v plazmě

	NMN	MN	3-MT	NMN	MN	3-MT
měření č. 1	1,306	1,302	0,951	0,596	0,626	0,614
měření č. 2	1,278	1,298	0,889	0,617	0,518	0,570
měření č. 3	1,380	1,326	0,989	0,573	0,517	0,596
měření č. 4	1,359	1,352	0,912	0,586	0,517	0,526
měření č. 5	1,356	1,319	0,970	0,607	0,625	0,571
měření č. 6	1,329	1,322	0,874	0,671	0,542	0,544
měření č. 7	1,339	1,271	0,845	0,607	0,588	0,477
měření č. 8	1,330	1,271	0,782	0,650	0,614	0,531
měření č. 9	1,332	1,287	0,892	0,631	0,550	0,497
měření č. 10	1,412	1,292	0,800	0,650	0,568	0,580
Průměr (nmol/l)	1,342	1,304	0,890	0,619	0,566	0,550
směrodatná odchylka	0,037	0,026	0,069	0,031	0,044	0,044
variační koeficient (%)	2,786	1,978	7,696	5,056	7,848	7,917

Tabulka 10: Reprodukovatelnost (interassay) a správnost měření pro koncentrace metanefrinů v plazmě

	NMN	MN	3-MT	NMN	MN	3-MT
teoretická c (nmol/l)	0,274	0,262	0,300	0,548	0,524	0,600
měření č. 1	0,283	0,250	0,327	0,596	0,445	0,616
měření č. 2	0,307	0,277	0,268	0,555	0,482	0,638
měření č. 3	0,295	0,260	0,267	0,583	0,514	0,514
měření č. 4	0,293	0,295	0,314	0,628	0,510	0,588
měření č. 5	0,313	0,271	0,315	0,527	0,549	0,628
měření č. 6	0,293	0,297	0,307	0,538	0,535	0,598
měření č. 7	0,319	0,235	0,297	0,604	0,439	0,619
měření č. 8	0,286	0,232	0,315	0,613	0,526	0,629
měření č. 9	0,269	0,249	0,309	0,582	0,529	0,608
měření č. 10	0,274	0,253	0,312	0,549	0,547	0,595
Průměr (nmol/l)	0,293	0,262	0,303	0,578	0,508	0,603
směrodatná odchylka	0,016	0,023	0,020	0,034	0,040	0,035
variační koeficient (%)	5,525	8,631	6,704	5,886	7,809	5,832
absolutní chyba (nmol/l)	0,019	0,000	0,003	0,030	-0,016	0,003
relativní chyba (%)	7,004	-0,088	1,023	5,389	-3,139	0,543

Tabulka 11: Opakovatelnost měření (intraassay) pro koncentrace metanefrinů v moči

	NMN	MN	3-MT	NMN	MN	3-MT
měření č. 1	1,318	0,625	0,677	5,994	4,099	1,417
měření č. 2	1,734	0,785	0,878	6,671	4,376	1,444
měření č. 3	1,780	0,768	0,897	6,056	4,191	1,306
měření č. 4	1,463	0,655	0,803	7,434	5,001	1,560
měření č. 5	1,475	0,695	0,734	6,592	4,795	1,581
měření č. 6	1,721	0,692	0,785	7,058	4,918	1,478
měření č. 7	1,789	0,692	0,833	6,725	4,676	1,652
měření č. 8	1,791	0,736	0,801	7,062	4,702	1,480
měření č. 9	1,480	0,644	0,727	6,394	4,360	0,975
měření č. 10	1,732	0,777	0,789	6,092	4,295	1,209
Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	1,628	0,707	0,792	6,608	4,541	1,410
směrodatná odchylka	0,175	0,057	0,068	0,483	0,316	0,200
variační koeficient (%)	10,730	8,090	8,537	7,312	6,968	14,210

Tabulka 12: Reprodukovatelnost (interassay) a správnost měření pro koncentrace metanefrinů v moči

	NMN	MN	3-MT	NMN	MN	3-MT
Teoretická c ($\mu\text{mol/l}$)	1,496	0,688	0,834	8,335	4,579	1,657
měření č. 1	1,654	0,737	0,790	8,337	4,578	1,653
měření č. 2	1,552	0,655	0,865	8,437	4,367	1,529
měření č. 3	1,494	0,667	0,796	8,338	4,351	1,479
měření č. 4	1,633	0,602	0,743	7,366	4,214	1,392
měření č. 5	1,625	0,727	0,712	8,125	4,080	1,455
měření č. 6	1,672	0,615	0,760	7,682	4,206	1,654
měření č. 7	1,256	0,727	0,854	7,636	4,134	1,743
měření č. 8	1,308	0,549	0,684	6,529	3,613	1,753
měření č. 9	1,553	0,695	0,729	6,356	3,487	1,471
měření č. 10	1,235	0,603	0,666	6,800	3,933	1,668
Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	1,498	0,658	0,760	7,560	4,096	1,580
směrodatná odchylka	0,169	0,064	0,067	0,778	0,338	0,129
variační koeficient (%)	11,314	9,771	8,785	10,289	8,253	8,192
absolutní chyba ($\mu\text{mol/l}$)	0,002	-0,030	-0,074	-0,775	-0,483	-0,077
relativní chyba (%)	0,144	-4,408	-8,881	-9,293	-10,544	-4,665

4.5 Výtěžnost metody

Výtěžnost metody stanovení metanefrinů v moči a v plazmě uvádí tabulky (Tabulky 13-14).

Tabulka 13: Výtěžnost stanovení metanefrinů v moči

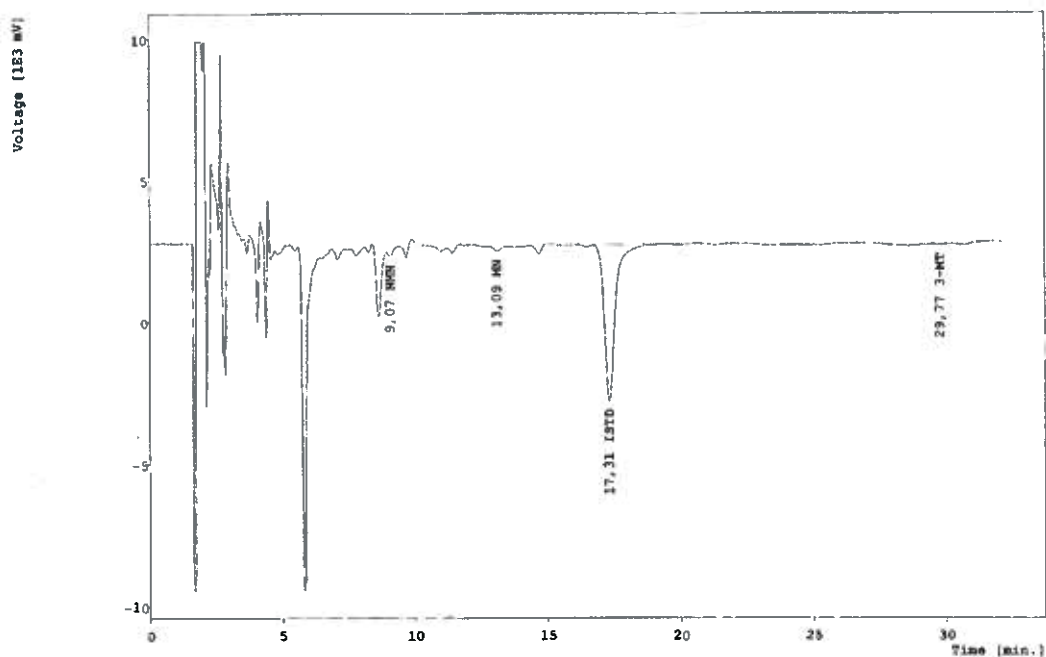
	přidavek ($\mu\text{mol/l}$)			naměřená c ($\mu\text{mol/l}$)			recovery (%)		
	NMN	MN	3-MT	NMN	MN	3-MT	NMN	MN	3-MT
moč 1	0	0	0	0,492	0,204	0,137			
moč 1 s přidavkem	1,369	1,312	1,498	1,849	1,59	1,497	99,12	105,64	90,79
moč 1 s přidavkem	1,369	1,312	1,498	1,792	1,486	1,611	94,96	97,71	98,40
moč 1	0	0	0	0,561	0,155	0,256			
moč 1 s přidavkem	1,369	1,312	1,498	1,859	1,352	1,689	94,81	91,23	95,66
moč 1 s přidavkem	1,369	1,312	1,498	2,053	1,377	1,633	108,98	93,14	91,92
recovery průměr (%)							99,47	96,93	94,19

Tabulka 14: Výtěžnost stanovení metanefrinů v plazmě

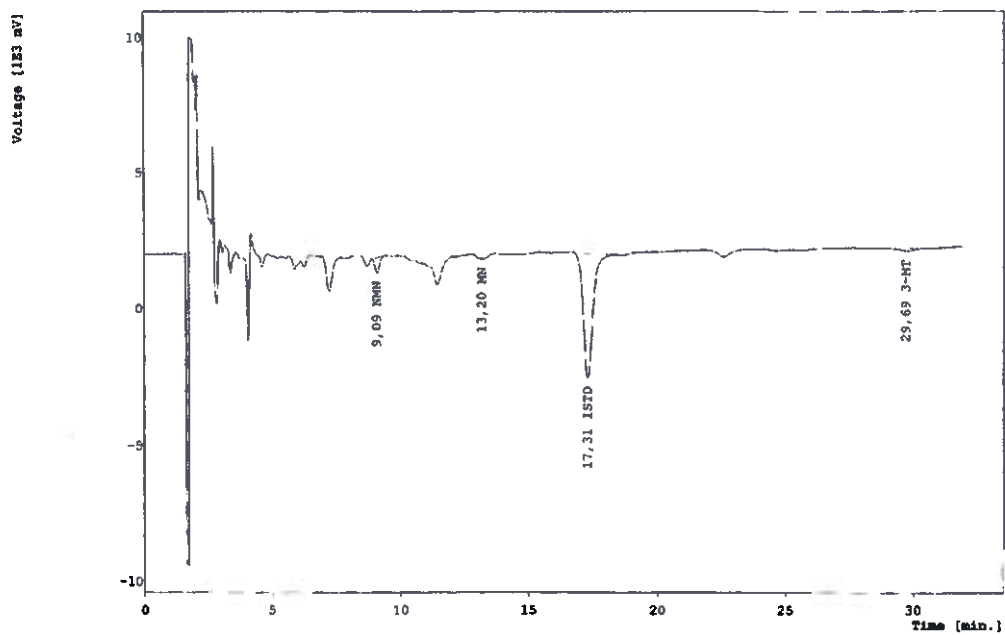
	přidavek ($\mu\text{mol/l}$)			naměřená c ($\mu\text{mol/l}$)			recovery (%)		
	NMN	MN	3-MT	NMN	MN	3-MT	NMN	MN	3-MT
plazma	0	0	0	1,9	0,12	1,285			
plazma s přidavkem	1,095	1,05	1,199	2,927	1,264	2,89	93,79	108,95	133,86
plazma s přidavkem	1,095	1,05	1,199	2,988	1,226	2,342	99,36	105,33	88,16
recovery průměr (%)							96,58	107,14	111,01

4.6. Stanovení metanefrinů v biologických materiálech

Vzorové chromatogramy získané analýzou plazmy a 100 x ředěné moči jsou znázorněny na obrázcích (Obr. 6 a 7).



Obr. 6: Chromatogram stanovení metanefrinů v plazmě



Obr. 7: Chromatogram stanovení metanefrinů ve 100 x ředěné moči

5. Diskuse

Stanovení metanefrinů bylo často požadováno jako další metoda vhodná pro diferenciální diagnostiku feochromocytomů. Pro značný zájem ze strany lékařů jsme se rozhodli, že bychom kromě katecholaminů a kyseliny vanilmandlové, mohli provádět i stanovení metanefrinů.

Při zavádění postupu stanovení metanefrinů v biologických vzorcích jsme se při volbě separačních podmínek opírali o literární podklady. Pro naši práci jsme vybrali článek publikovaný Eisenhoferem (9), ve kterém byla přesně popsána metodika stanovení metanefrinů v biologických materiálech na HPLC-ED. Tento postup jsme zvolili z důvodu dostupného technického vybavení v naší laboratoři. Rovněž chemikálie používané při tomto pokusu jsme měli k dispozici.

Již dříve jsme v naší laboratoři zavedli metodu stanovení katecholaminů na HPLC s coulochemickou detekcí a chtěli jsme metanefriny analyzovat obdobným způsobem. Katecholaminy se stejně jako metanefriny stanovují na principu iontově-párové chromatografie na obrácené fázi.

Při prvních pokusech jsme veškeré podmínky stanovení zachovali stejné jako u analýzy katecholaminů. Podle zmíněného literárního zdroje jsme nastavili pouze napětí v celách coulochemického detektoru na hodnoty napětí 370 mV na ochranné cele, 150 mV na první elektrodě a -390 mV na druhé elektrodě analytické cely. Pro chromatografické dělení látek jsme použili kolonu Lichrocart 125-3 -Purospher RP-18e (5 μ m). Mobilní fáze obsahovala NaH₂PO₄·2H₂O (10,35 g/l), kyselinu trichlooctovou (3,27 g/l), EDTA (0,56 mg/l), SDS (2,307 g/l), destilovaný methanol (10ml/l) a ACN (160 ml/l) a její pH bylo upraveno na hodnotu 3. Průtok mobilní fáze byl u obou metod 1 ml/min. Při těchto prvních analýzách však složení mobilní fáze vyvolávalo značný šum na základní linii, proto jsme se rozhodli nahradit mobilní fázi používanou pro stanovení katecholaminů pomocí mobilní fáze, která byla popsána v Eisenhoferově článku (9). Nová mobilní fáze měla rovněž hodnotu pH rovnou 3 a skládala se z NaH₂PO₄·H₂O (13,8 g/l), EDTA (10 mg/l), oktansulfonátu sodného (128 mg/l) a acetonitrilu 75 (ml/l).

Za těchto podmínek jsme byli schopni analyzovat standardy jednotlivých metanefrinů rozpuštěné v kyselině octové. V dalších pokusech jsme se snažili optimalizovat podmínky detekce. Testovali jsme velikost signálu, poskytovaného

metanefriny o koncentraci 10 µg/l, a zachovali jsme podmínky, při kterých byla zaznamenána nejsilnější odezva detektoru. Tímto jsme získali optimální napětí na jednotlivých celách detektoru, což jsou hodnoty 370 mV na ochranné cele, 150 mV na první elektrodě a -390 mV na druhé elektrodě analytické cely. Tyto údaje se shodují s literárním podkladem, ze kterého jsme čerpali (9).

Po zavedení podmínek detekce jsme optimalizovali složení mobilní fáze. Určili jsme, že nejvhodnější koncentrace acetonitrilu je 75 ml/l a nejlepší hodnota, na kterou je třeba upravit pH mobilní fáze, se pohybuje v intervalu 2,9-3,1.

Po identifikaci piků na chromatogramech standardů, jsme mohli přikročit k analýze reálných vzorků plazmy a moče. Vystalo nám hned několik problémů týkajících se preanalytické přípravy vzorků. Metanefriny se vyskytují v plazmě ve velmi nízkých koncentracích. Další nesnáze by u stanovení metanefrinů z plazmy způsobovaly proteiny, které by zanášely chromatografickou kolonu. Proto jsme museli vzorky jak zakoncentrovat tak deproteinovat. Rozhodli jsme se použít stejně jako většina autorů extrakci na pevné fázi.

Výběr SPE kolonek mezi různými autory se značně lišil. Eisenhofer (9) a Roden (10) používali kationtově výměnné extrakční kolonky. Crocket (12) použil extrakční disky, které pracují ve smíšeném módu kationtové výměny a reverzní fáze. Pro naši práci jsme nakonec vybrali SPE kolonky MCX Oasis o velikosti 2 ml a s 60 mg sorbentu (Waters, USA).

K plazmatickým vzorkům jsme přidali vnitřní standard (HMBA) a směs jsme aplikovali na kolonky po předchozí kondicionaci a ekvilibraci metanolem a destilovanou vodou. Následně jsme kolonky promývali vodou, kyselinou chlorovodíkovou a metanolem. K eluci metanefrinů ze sorbentu jsme použili 5% roztok amoniaku v metanolu.

Močové vzorky jsme se následně snažili přečistit obdobným způsobem jako plazmu, aby byl mezi preanalytickou přípravou moči a plazmy minimální rozdíl. Moč jsme ředili, tak aby koncentrace metanefrinů ve výsledném roztoku ředěné moči byly řádově stejné, jako jsou hladiny v plazmě. Naředěnou moč a vzorky plazmy jsme pak extrahovali stejným postupem.

Chromatogramy analýzy metanefrinů v biologickém materiálu, při použití kolony o délce 125 mm, kterou jsme již dříve používali pro stanovení

katecholaminů, neměly dostatečné rozlišení píků. Zkusili jsme proto vzorky biologického materiálu analyzovat na koloně Lichrocart 250-4 – Lichrospher RP-18e (5 μ m), čímž se rozlišení zlepšilo.

Po všech těchto pokusech jsme mohli říci, že máme podmínky metody pro stanovení metanefrinů zavedené a mohli jsme přistoupit k validaci metody.

Nejprve jsme provedli kalibraci metody a následně jsme testovali její přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost), správnost a výtěžnost.

Metodu jsme kalibrovali za použití komerčně dodávaného močového standardu. Údaje z kalibračních chromatogramů jsme použili k sestrojení kalibračních křivek, které jsou přímo uloženy v programu pro chromatografické analýzy. Výhodou těchto automatických kalibrací je, že si program sám vypočítá z plochy pod křivkou chromatografického píku měřeného analytu a vnitřního standardu koncentraci analytu již vztaženou na vnitřní standard.

Pro určení přesnosti jsme měřili jak opakovatelnost (intraassay) tak reprodukovatelnost (interassay). V obou případech jsme provedli deset analýz a vypočítali jsme směrodatné odchylky a variační koeficienty. U opakovatelnosti byly průměrné hodnoty variačních koeficientů v procentech 3,9; 4,9 a 7,8 pro NMN, MN a 3-MT v plazmě a 9,0; 7,5 a 11,4 pro NMN, MN a 3-MT v moči. Při měření reprodukovatelnosti byly průměrné hodnoty variačních koeficientů v procentech 5,6; 8,2 a 6,3 pro NMN, MN a 3-MT v plazmě a 10,4; 9,0 a 8,4 pro NMN, MN a 3-MT v moči. Vyhodnocení variačního koeficientu při měření v sérii a mezi sériemi ukázalo, že metoda je použitelná pro rutinní analýzy biologického materiálu.

Správnost jsme určili jako chybu absolutní a chybu relativní vztaženou ke správné hodnotě. Pro výpočet jsme použili průměrné hodnoty koncentrací z 10 měření a známé koncentrace standardních roztoků. Pro metanefriny v plazmě se relativní chyba pohybovala do 7,0 %. U metanefrinů v moči byla maximální relativní chyba 10,5 %.

Výtěžnost analýz metanefrinů ve vzorcích biologického materiálu byla v procentech 96,6; 107,1 a 111,0 pro NMN, MN a 3-MT v plazmě a 99,5; 96,9 a 94,2 pro NMN, MN a 3-MT v moči.

Námi optimalizovanou metodou kapalinové chromatografie jsme schopni stanovit normetanefrin, metanefrin a 3-methoxytyramin ve vzorcích moči a plazmy. Metanefriny v moči se pohybují v oblasti koncentrací řádově $\mu\text{mol/d}$. Metanefriny v plazmě mají koncentrace nižší, řádově jsou v nmol/l .

Námi hodnocené vzorky moči obsahovaly metanefriny v koncentracích od 0,072 do 3,459 $\mu\text{mol/d}$. Při určování pozitivitu dosud vycházíme z referenčních mezí převzatých z literatury (3,9). Z 20 pacientů jich 19 mělo hladiny metanefrinů pohybujících se v těchto hodnotách. U jedné pacientky jsme však zaznamenali pozitivní nález normetanefrinu, později byla tato pacienta operována pro feochromocytom.

Námi naměřené plazmatické koncentrace metanefrinů se pohybují v intervalu od 0,065 do 1,472 nmol/l . Hladiny metanefrinů u některých vzorků byly ve srovnání s publikovanými referenčními hodnotami vyšší. Maximální naměřené hodnoty NMN a MN byly 0,787 a 1,313 nmol/l . Vyšší hladiny metanefrinů v plazmě mohou být způsobené nedodržením podmínek pro odběr krve nebo lékovými interferencemi. Proto je třeba dobře informovat lékaře a sestry o postupech správně provedených odběrů krve a o lécích, které by mohly se stanovením metanefrinů interferovat. Dalším možným řešením jak předcházet ovlivnění analýz, je možnost volby jiného preanalytického postupu, kterým by se interferující látky lépe odstranily. Pak by bylo potřebné znovu řešit přístup k přípravě vzorku, tedy izolaci vlastního analytu z biologické matrice.

6. Závěr

Cílem této rigorózní práce bylo vyvinout metodu stanovení metanefrinů, která by byla vhodná pro rutinní analýzy v laboratořích klinické biochemie. Doposud nebyla v české literatuře tato metoda na stanovení metanefrinů publikována a laboratoře, které metanefriny stanovují používají k analýzám komerčně dodávané kity.

Pro analýzu metanefrinů jsme použili metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí po předchozí úpravě materiálu pomocí extrakce na pevné fázi. Během naší práce jsme ověřili a upřesnili dříve publikované podmínky chromatografických analýz a zavedli jsme do klinicko-laboratorní praxe vlastní postup preanalytické přípravy vzorků biologických materiálů. Díky naší modifikaci metody budou laboratoře schopné jednoduchým postupem stanovovat metanefrin, normetanefrin a 3-methoxytyramin v moči i v plazmě.

Naši modifikaci chromatografického stanovení metanefrinů jsme po optimalizaci podmínek validovali. Metoda je dostatečně citlivá a reprodukovatelná. Variační koeficienty měření v sérii a mezi sériemi vzorků vyhovují současným kritériím pro stanovení analytu v biologických materiálech. Pro použitelnost této metody v praxi jsou výsledky validace uspokojivé.

Nevýhodou postupu by se mohla zdát dlouho trvající kondicionace chromatografické kolony nutná před první analýzou ze série vzorků. Doba vlastní analýzy se pak pohybuje v intervalu od 20 do 30 minut.

Při stanovení hladiny metanefrinů ve vzorcích moči jsme neprokázali žádné interference. V plazmatických vzorcích jsme se ovšem s lékovými interferencemi setkali. Léčiva a látky, které s metanefriny při stanovení interferují, budeme dále zkoušet identifikovat.

7. Seznam použité literatury

1. **Peaston R. T., Weikove C.** Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem*, 2004, 41, p. 17-38.
2. **Karlson P., Gerok W., Gross W.** Pathobiochemie. *Akademia Praha*, 1987.
3. **Zima T.** Laboratorní diagnostika. *Galen*, 2002.
4. **Zelinka T.** Feochromocytom. www.zdn.cz - server onkologie, 2003.
5. **Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil** Cancer Medicine. 6th ed. *BC Decker*, 2003. www.ncbi.nlm.nih.gov
6. **Stejskal D., Lačňák B., Václavík J., Zuber R.** volné plazmatické metanefriny a jejich využití v diagnostice feochromocytomu. *Klin. Biochem. Metab*, 2005, 4, p. 201-206.
7. **Yanaihara H., Hata M., Nashikawa Y., Hoshino M., Yanaihara N., Murai M.** Application of region-specific immunoassay for human chromogranin A: Substantial clue for detection and measurement of chromogranin A in human plasma. *Regulatory Peptides*, 1999, 80, p.83-90.
8. **Pisano J.J., Crout J.R., Abraham D.** Determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. *Clin Chim Acta*, 1962, 7, p. 285-291.
9. **Eisenhofer G.** www.catecholamine.org
10. **Roden M. et al.** Quantification of unconjugated metanephrines in human plasma without interference by acetaminophen. *Clin Chem*, 2001, 47:6, p.1061-1067.
11. **Lagerstedt S. A., O'Kane D. J., Singh R. J.** Measurement of plasma free metanephrine and normetanephrine by liquid chromatography – tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Chem*, 2004, 50:3, p. 603-611.
12. **Crockett D. K., Frank E. L., Roberts W. L.** Rapid analysis of metanephrine and normetanephrine in urine by gas chromatography – mass spectrometry. *Clin Chem*, 2002, 48:2, p.332-337.
13. **Berquist J., Ściubisz A., Kaczor A., Silberring J.** Catecholamines and methods for their identification and quantification in biological tissues and fluids. *J. Neurosci*, 2002, 113, p. 1-13.
14. **Peterson Z.D. et al.** Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis – electrospray ionization – time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2002, 776, p. 221-229.
15. **Kushnir M.M., Urry F.M., Frank E.L., Roberts W.L., Shushan B.** Analysis of catecholamines in urine by positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *Clin.Chem.* 2002, 48:2, p. 323-331.
16. **Chan E.C.Y., Wee P.Y., Ho P.C.** Evaluation of degradation of urinary catecholamines and metanephrines and deconjugation of their sulfoconjugates using stability-indicating reversed-phase ion-pair HPLC

- with electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 22, p. 515-526.
17. **Chan E.C.Y., Wee P.Y., Ho P.Y., Ho P.C.** High-performance liquid chromatographic assay for catecholamines and metanephrines using fluorimetric detection with pre-column 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride derivatization. *J. Chrom B.*, 2000, 749, p. 179-189.
 18. **Vuerensola K., Siren H.** Determination of urinary catecholamines with capillary electrophoresis after solid-phase extraction. *J. Chrom A*, 2000, 895, p. 317-327.
 19. **Lenders J. W. M., Eisenhofer G., Mannelli M., Pacak K.** Pheochromocytoma. *Lancet*, 2005, 366, p. 665-675.
 20. **Lenz T., Gossmann J., Schulte K.L., Salewski L., Geiger H.** Diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Lab*, 2002, 48, p.5-18
 21. **Nikolajsen R.P.H., Hansen A.M.** Analytical methods for determining urinary catecholamines in healthysubjects. *Anal. Chim.Acta*, 2001, 449, p. 1-15.
 22. **Willemsen J.J., Sweep C.G.J., Lenders J.W.M., Ross H.A.** Stability of plasma free metanephrines during collection and storage as assessed by an optimized hplc method with electrochemical detection. *Clin. Chem.*, 2003, 49-11, p.1951-1953.

8. Přílohy

Seznam příloh:

Obr. 8: Závislost velikosti signálu na napětí 1. elektrody v analytické cele

Obr. 9: Závislost velikosti signálu na napětí 2. elektrody v analytické cele

Obr. 10: Závislost velikosti signálu na napětí v ochranné cele

Obr. 11: Závislost velikosti signálu na pH mobilní fáze

Obr. 12: Kalibrační křivka pro NMN v moči

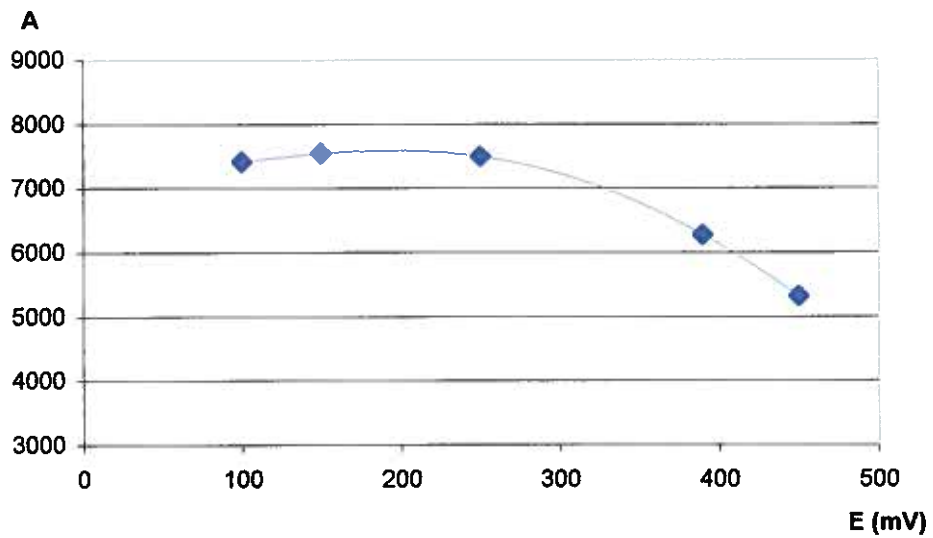
Obr. 13: Kalibrační křivka pro MN v moči

Obr. 14: Kalibrační křivka pro 3-MT v moči

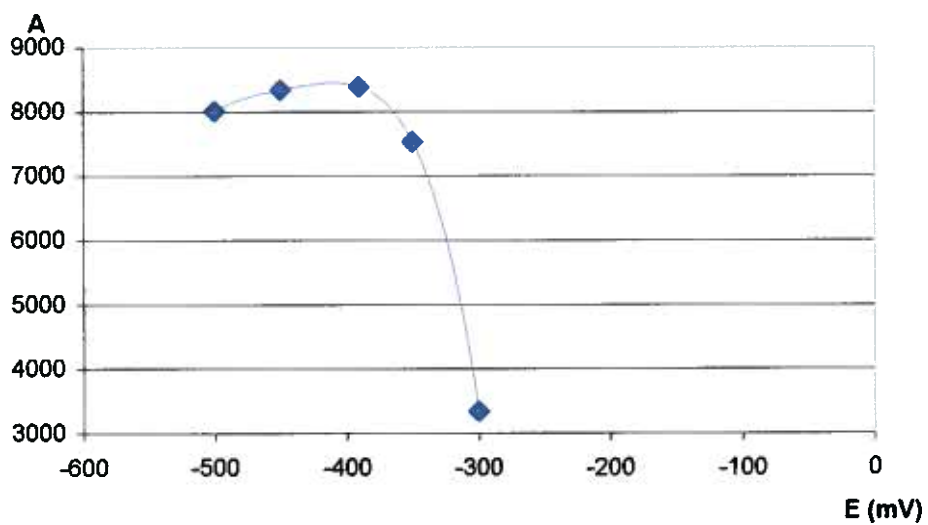
Obr. 15: Kalibrační křivka pro NMN v plazmě

Obr. 16: Kalibrační křivka pro MN v plazmě

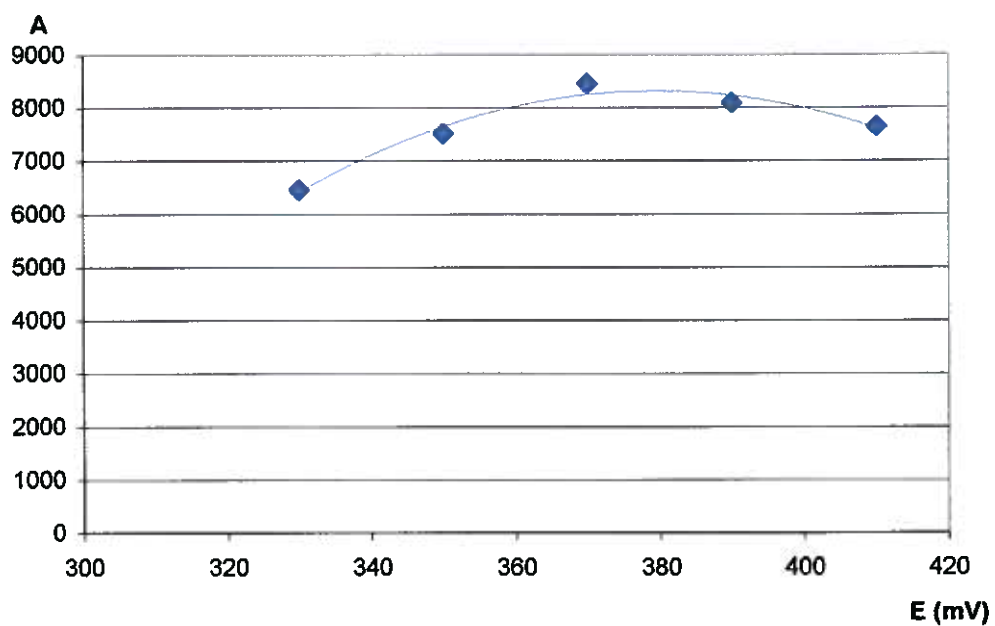
Obr. 17: Kalibrační křivka pro 3-MT v plazmě



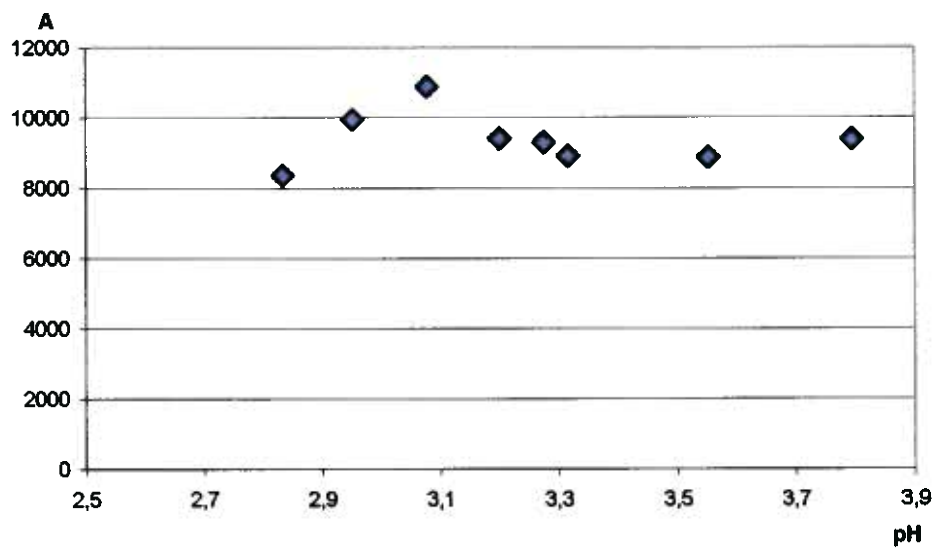
Obr. 8: Závislost velikosti signálu na napětí 1. elektrody v analytické cele



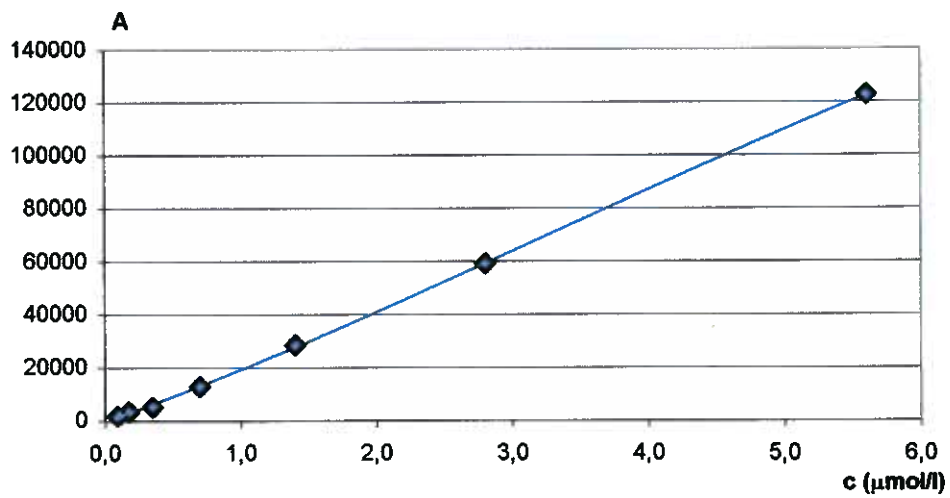
Obr. 9: Závislost velikosti signálu na napětí 2. elektrody v analytické cele



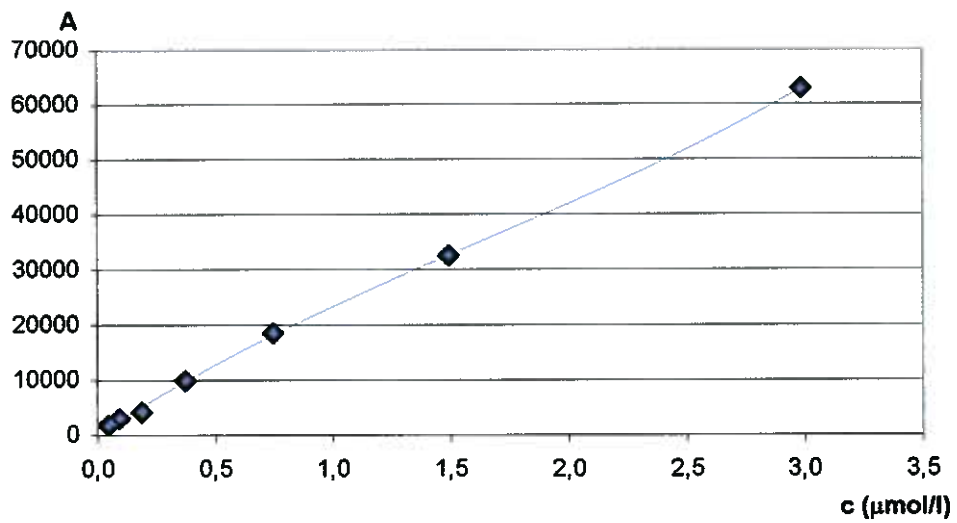
Obr. 10: Závislost velikosti signálu na napětí v ochranné cele



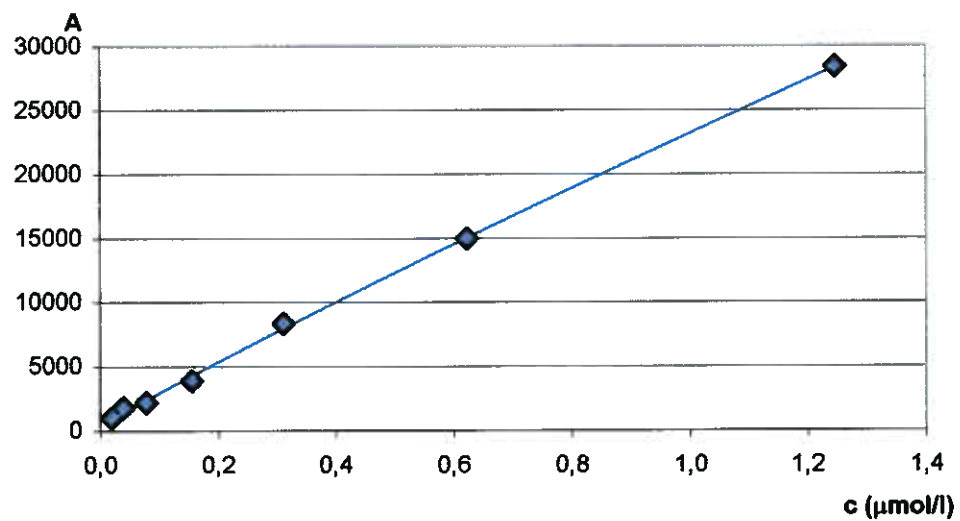
Obr. 11: Závislost velikosti signálu na pH mobilní fáze



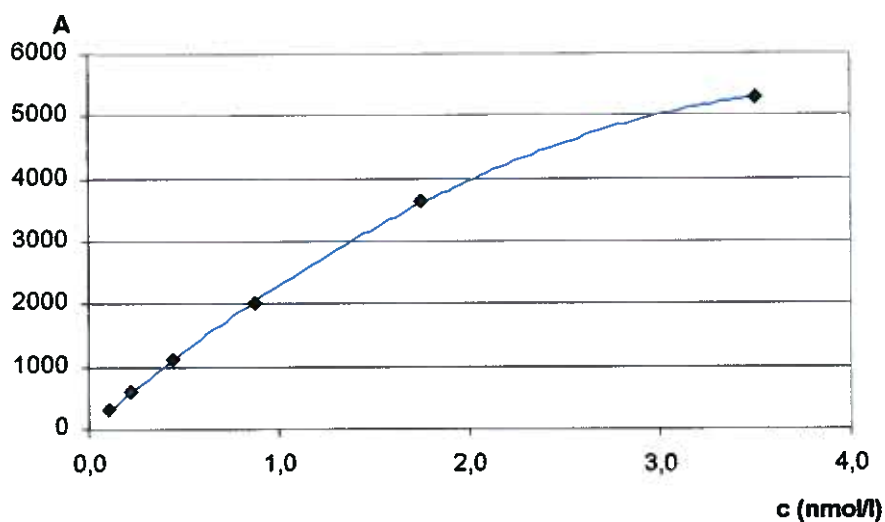
Obr. 12: Kalibrační křivka pro NMN v moči



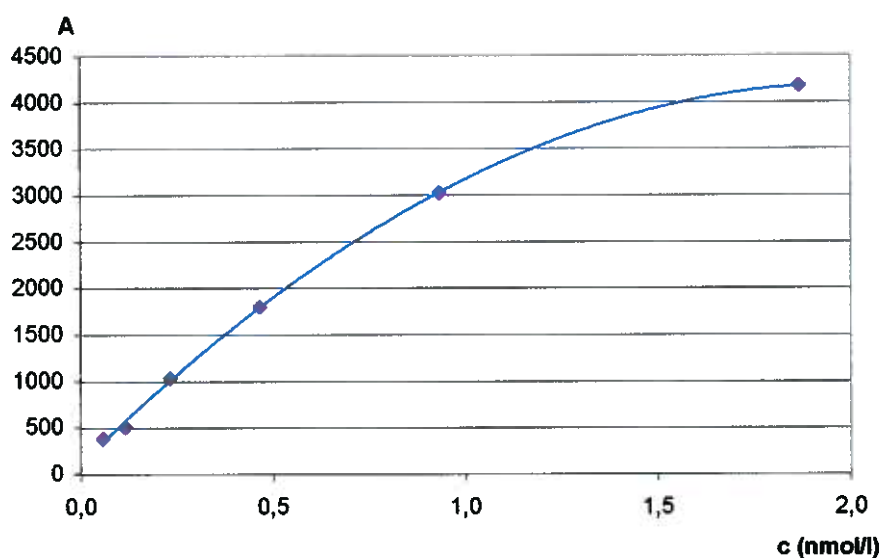
Obr. 13: Kalibrační křivka pro MN v moči



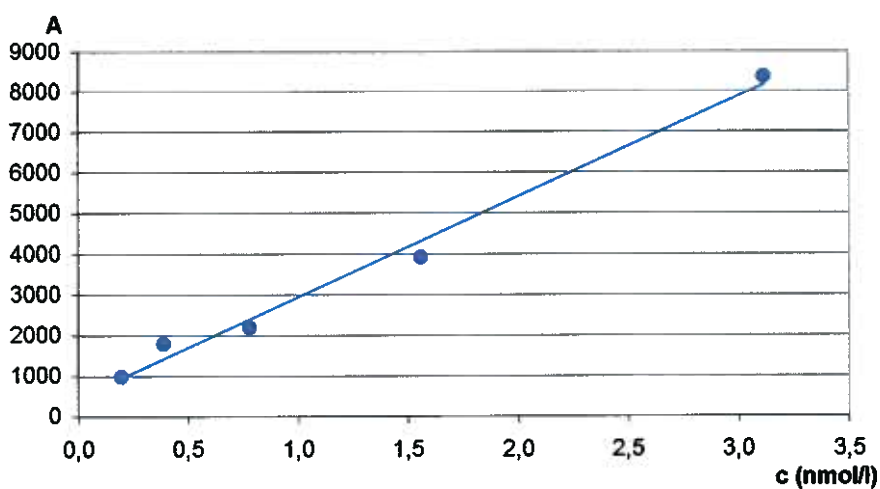
Obr. 14: Kalibrační křivka pro 3-MT v moči



Obr. 15: Kalibrační křivka pro NMN v plazmě



Obr. 16: Kalibrační křivka pro MN v plazmě



Obr. 17: Kalibrační křivka pro 3-MT v plazmě