

Stanovení metanefrinů v plazmě a moči metodou HPLC-ED

Ulrychová M., Vávrová J., Palička V.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN v Hradci Králové

SOUHRN

Cíl studie: Katecholaminy a jejich metabolity jsou využívány v diagnostice feochromocytomu. Naše sdělení se zabývá validací metody na stanovení normetanefrinu (NMN) a metanefrinu (MN) v plazmě a v moči.

Název a sídlo pracoviště: Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN v Hradci Králové.

Materiál a metoda: Byla použita metoda HPLC s elektrochemickou detekcí (ED). Separací podmínky: mobilní fáze 1 mol/l NaH_2PO_4 , 0,34 mmol/l 1-oktansulfonát sodný, 0,13 mmol/l EDTA, 75 ml/l acetonitril, analytická kolona C18 RP, průtok mobilní fáze 1 ml/min. Podmínky detekce (elektrochemický detektor ESA Coulochem II): ochranná cela s potenciálem 370 mV, analytická cela se 150 mV a -390 mV. Příprava vzorku: přidavek vnitřního standardu 4-hydroxy-3-methoxy-benzylamoniumchloridu, izolace analytů a jejich přečištění extrakcí na pevné fázi s použitím SPE kolonek Oasis MCX, Waters (sorbenť kondicionován metanolem a vodou, promýván 0,1 mol/l HCl a metanolem, eluce vzorku 5% metanolicným roztokem hydroxidu amonného).

Výsledky: Průměrná opakovatelnost 7,4 % a reprodukovatelnost 8,0 %. Hodnoty výtěžnosti se pohybovaly v rozsahu 94–111 %. Ověření referenčních intervalů: NMN v plazmě 0,1–0,61 nmol/l, MN v plazmě 0,06–0,31 nmol/l, NMN v moči 0,480–2,400 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ MN v moči 0,264–1,440 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$.

Závěry: Stanovení metanefrinů uvedenou metodou HPLC s elektrochemickou detekcí je rychlou a přesnou metodou pro stanovení metabolitů katecholaminů v plazmě a v moči.

Klíčová slova: metanefrin, normetanefrin, feochromocytom, HPLC-ED.

SUMMARY

Ulrychová M., Vávrová J., Palička V.: Determination of metanephrines in plasma and urine by HPLC-ED

Objective: Catecholamines and their metabolites are used for diagnosis of pheochromocytoma. Our communication deals with validation of methods for determination of normetanephrine (NMN) and metanephrine (MN) in plasma and urine.

Settings: Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Medical Faculty Hospital, Charles University, Hradec Kralové, Czech Republic

Material and Methods: HPLC method with electrochemical detection (ED) was used. Separation conditions was as follows: mobile phase 1 mol/l NaH_2PO_4 , 0.34 mmol/l 1-octansulfonic acid sodium salt, 0.13 mmol/l EDTA, 75 ml/l acetonitrile, C18 RP analytical column, flow rate 1 ml/min. Detection conditions (electrochemical detector ESA Coulochem II): conditioning cell with potential 370 mV, analytical cell 150 and -390 mV. Sample preparation: addition of 4-hydroxy-3-methoxy-benzylamoniumchloride as internal standard, isolation and purification were performed by solid-phase extraction (Oasis MCX, Waters). Sorbent was conditioned with methanol and water and washed by 0.1 mol/l HCl and methanol. For sample elution 5% ammonium hydroxide in methanol was used.

Results: Average of repeatability 7.4% and reproducibility 8%. Recovery values ranged from 94–111%. We also calculated inter-in reference intervals. Plasma values were: 0.1–0.61 nmol/l for NMN and 0.06–0.31 nmol/l for MN. Urine values: 0.480–2.400 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ for NMN and 0.264–1.440 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ for MN.

Conclusion: Rapid and precise method for determination of catecholamine metabolites in plasma and urine was successfully validated.

Key words: metanephrine, normetanephrine, pheochromocytoma, HPLC-ED.

Úvod

Metanefrin, normetanefrin a 3-methoxytyramin jsou O-metylované metabolity adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu. Odbourávání katecholaminů probíhá nejprve enzymovou metylací hydroxyskupiny v poloze 3 benzenového jádra za vzniku metanefrinu, normetanefrinu nebo 3-methoxytyraminu. Tato reakce je katalyzovaná enzymem katechol-O-metyltransferázou (COMT), která přenáší metylový zbytek z donoru S-adenosylmethioninu. Následuje eliminace dusíku z postranního řetězce působením monoaminoxidázy (MAO), vznikající aldehydy se pak oxidují až ke konečným produktům – kyselině vanilmandlové z metanefrinu a normetanefrinu nebo kyselině homovanilové z dopaminu. Vylučování těchto finálních

produktů močí lze sledovat jako míru obratu katecholaminů v organismu [1].

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 [1, 2, 3, 4, 5]. Metanefriny, stejně jako katecholaminy, mají význam při jejich diagnostice. Výhodou jejich stanovení oproti katecholaminům je větší senzitivita a specifita [2, 3, 4, 5].

Pro kvantitativní stanovení metanefrinů je nutno zaručit vysokou citlivost metody. Dříve používané spektrofotometrické, fluorescenční nebo radioenzymatické metody jsou postupně nahrazovány citlivějšími separačními postupy, zejména metodami chromatografický-

mi [1]. V literatuře se uvádí jako nejvíce používaná metoda na stanovení koncentrace metanefrinů vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou (coulometrickou) detekcí [1, 2, 3, 6] a s izolací stanovovaných analytů pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) [1, 2, 3, 4, 6]. V současnosti se také stále více rozvíjí využití chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií [2,4,7,8].

Materiál a metody

Chemikálie a přístroje

V práci byly používány standardy normetanefrin (NMN), metanefrin (MN), 3-methoxytyramin (3-MT) (Sigma-Aldrich, Německo) a vnitřní standard 4-hydroxy-3-methoxybenzylamoniumchlorid (HMBA) (Merck, Německo). Standardy jsme ředili kyselinou octovou (Penta, ČR). Pro kalibraci metody a kontroly jsme použili komerčně dodávaný kalibrátor a kontrolní materiály pro měření metanefrinů v moči (Recipe, Německo).

Pro přípravu mobilní fáze jsme použili acetonitril (ACN) (Merck), oktansulfonát sodný, dihydrogenfosforečnan sodný (Fluka, Švýcarsko), etylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA) a kyselinu fosforečnou (Lachema, ČR). Hydroxid amonný (26%) (Lachema), kyselina chlorovodíková (Penta) a metanol (Kulich, ČR) jsme využívali pro extrakci na pevné fázi. Deionizovanou vodu jsme získali pomocí MilliQ Plus systému (Millipore, USA). Roztoky jsme filtrovali přes 0,22 µm filtry GVWP (Millipore). Pro SPE (solid phase extraction) jsme používali kolonky Oasis MCX – 3cc, 60 mg, 30 µm (Waters, USA). Pro vlastnímu chromatografickému rozdělení metanefrinů jsme využívali separační předkolonky a kolony s reverzní fází Lichrocard 250-4 a Lichrospher RP-18e, 5 µm (Merck).

Analýzy jsme prováděli na modulárním HPLC systému sestaveném z pumpy LC-10AD VP (Shimadzu, Japonsko), degasseru a autosampleru (Hewlett Packard, USA), ochranné cely – model 5021 a analytické cely – model 5011 (ESA, USA).

Příprava vzorků

Požadavky preanalytické fáze pro odběr krve k vyšetření metanefrinů předpokládají klid pacienta a zavedení kanyly minimálně 15 minut před odběrem. Odebrané vzorky heparinizované krve byly chlazeny na ledu a co nejrychleji transportovány do laboratoře. Vzorky moči byly získány sběrem po dobu 24 hodin do nádoby

s 30 ml 6 mol/l HCl. Získanou plazmu a moč jsme pak uchovávali při -20 °C.

K 1 ml vzorku plazmy, 100krát ředěné moči nebo standardu jsme přidávali vždy 50 µl vnitřního standardu HMBA. Ředění moči jsme volili pro sjednocení postupu stanovení v krvi a v moči. K izolaci sledovaných analytů jsme používali SPE na Oasis MCX kolonkách [8]. Sorbent jsme nejdříve kondicionovali 1,25 ml metanolu a promytím 1,25 ml deionizované vody. Po dávkování 1 ml směsi vzorku a vnitřního standardu jsme kolonku proplachovali destilovanou vodou, 0,1 mol/l kyselinou chlorovodíkovou a metanolem. K proplachování kolonek jsme používali vždy 1,25 ml činidel. Pro eluci zachycených metanefrinů jsme používali 1,25 ml 5% (obj.) roztoku hydroxidu amonného v metanolu. Vzorek jsme odpařili a rekonstituovali ve 100 µl mobilní fáze.

HPLC analýza

Pro přípravu mobilní fáze jsme použili postup podle Eisenhofera [6]: 1 mol/l NaH₂PO₄, 0,34 mmol/l 1-oktansulfonát sodný, 0,13 mmol/l EDTA, 75 ml/l acetonitril. Koncentrovanou kyselinou fosforečnou jsme vždy upravili pH na hodnotu v rozsahu 2,9 až 3,1. Připravenou mobilní fázi jsme vždy přefiltrovali přes 0,22 µm filtr a odvodušili v ultrazvukové lázni. Při analýze byl používán průtok mobilní fáze 1 ml/min. Analýzu jsme prováděli na principu iontové párové kapalinové chromatografie na obrácené stacionární fázi. Napětí v ochranné cele detektoru (E) jsme nastavili na 370 mV, na první elektrodě analytické cely (E1) na 150 mV a na druhé elektrodě (E2) na -390 mV [6]. Citlivost byla na obou elektrodách 100 nA. Vzorky moči jsme dávkovali v objemech 20 µl, vzorky krve v objemech 90 µl materiálu připraveného extrakcí.

Výsledky

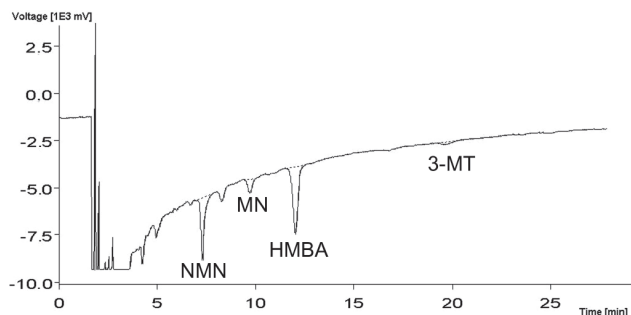
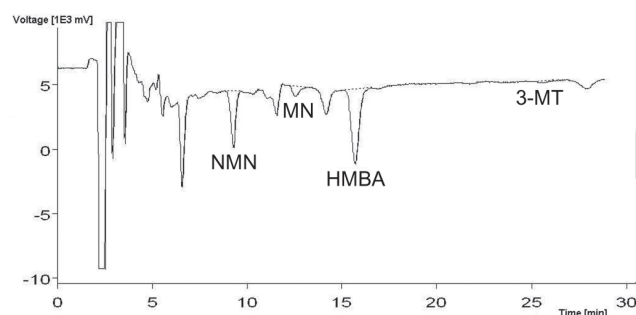
Chromatogramy vzorků plazmy a moči ukazují obrázky 1 a 2. Pro identifikaci píků metanefrinů a určení výtěžnosti jsme ke vzorkům přidali standardy NMN a MN o známé koncentraci. Průměrná výtěžnost u močových vzorků byla 99,5 % (NMN) a 96,9 % (MN), u plazmy pak 96,6 % (NMN) a 107,1 % (MN). Reproductibilitnost stanovení byla určena pomocí standardních roztoků na hladinách koncentrací běžných v biologických materiálech. Koncentrace, při kterých bylo měření provedeno, a vypočtené variační koeficienty jsou uvedeny v tabulce 1.

Table 1. Reproducibility of measurement for various concentrations of metanephrines (n = 10)

	Metanephrines in plasma				Metanephrines in urine			
	^c (nmol/l)	CV (%)	^c (nmol/l)	CV (%)	^c (µmol/l)	CV (%)	^c (µmol/l)	CV (%)
NMN	4.17	2.7	0.81	5.0	1.62	10.7	8.33	7.3
MN	2.29	2.0	0.36	7.8	0.71	8.1	4.58	6.9

Table 2. Repeatability of measurement for various concentrations of metanephrines. (n = 10)

	Metanephrines in plasma				Metanephrines in urine			
	c (nmol/l)	CV (%)	c (nmol/l)	CV (%)	c (μ mol/l)	CV (%)	c (μ mol/l)	CV (%)
NMN	4.17	5.5	0.81	5.9	1.62	11.3	8.33	10.3
MN	2.29	8.6	0.36	7.8	0.71	9.7	4.58	8.2

**Fig. 1.** Chromatogram of metanephrines in urine**Fig. 2.** Chromatogram of metanephrines in plasma

Výsledky měření opakovatelnosti uvádí tabulka 2. Správnost jsme hodnotili jako relativní chybu vztaženou ke správné hodnotě koncentrace. Pro metanephriny v plazmě byly relativní chyby 6,2 % (NMN) a 1,6 % (MN). U metanephrinů v moči byly naměřeny relativní odchylky 4,7 % (NMN) a 7,5 % (MN).

Při ověření referenčních rozmezí jsme vycházeli z publikovaných hodnot 0,1–0,61 nmol/l pro NMN, 0,06–0,31 nmol/l pro MN v plazmě [6] a 0,480–2,400 μ mol za 24 h pro NMN, respektive 0,264–1,440 μ mol/24 h pro MN v moči [9]. Měřili jsme koncentrace metanephrinů v plazmě a moči 20 zdravých osob. U plazmatických vzorků byly průměrné koncentrace pro NMN 0,467 nmol/l (SD = 0,184) a 0,263 nmol/l (SD = 0,225) pro MN. Ve vzorcích moči jsme naměřili průměrné hladiny metanephrinů 0,527 μ mol/l (SD = 0,661) a 0,191 μ mol/l (SD = 0,162).

Diskuse

Při hledání vhodných podmínek stanovení metanephrinů v biologických vzorcích jsme se při volbě separačních podmínek opírali o literární podklady, zejména o práci Eisenhofera [6]. Podrobně jsme optimalizovali složení a pH mobilní fáze, kde podle našich zkušeností důležitou roli sehrával obsah acetonitrilu a vymezení přijatelného rozsahu pH. Za daných podmínek detekce je vhodné po-

užít pro rozpouštění standardů jednotlivých metanephrinů kyselinu octovou (použití kyseliny chlorovodíkové má za následek příliš vysoký počáteční signál detektoru). Testovali jsme velikost signálu, poskytovaného metanephriny o koncentraci 10 μ g/l, podmínky, při kterých byla zaznamenána nejsilnější odezva detektoru, jsme pak zachovali. Optimalizovali jsme obdobně i napětí v jednotlivých celcích detektoru. Napětí jsme vkládali v rozsahu 200 až 500 mV, 50 až 200 mV a -200 až -500 mV pro E, E1 a E2. Výsledné optimální nastavení napětí na měřicích celcích bylo E = 370 mV, E1 = 150 mV a E2 = -390 mV při pH mobilní fáze v rozsahu 2,9–3,1 a přidavku acetonitrilu do mobilní fáze v množství 75 ml/l.

Zabývali jsme se rovněž několika variantami přípravy vzorků, především SPE izolací jednotlivých analytů s ohledem na podmínky následné analýzy a coulochemické detekce. Vzorky plazmy jsme před analýzou deproteinovali a zakonzentrovali. Většina postupů literárně popsaných využívá extrakci na pevné fázi. Eisenhofer [6] a Roden [3] používali kationtové výměnné extrakční kolonky, Crockett [4] použil extrakční disky, které pracují ve smíšeném modu kationtové výměny a reverzní fáze. Během naší práce jsme testovali kolonky LC-WCX od firmy Supelco a Oasis HBL a MCX firmy Waters. Nakonec jsme zvolili SPE kolonky MCX Oasis o velikosti 2 ml a s 60 mg sorbentu (Waters, USA). Pro zpracování vzorků moče jsme vycházeli z předpokladu, že výsledný extrakt by měl obsahovat řádově blízké koncentrace metanephrinů, jako extrakt po zpracování vzorků plazmy, proto jsme vzorky moče před zpracováním ředili. Naředěnou moč jsme pak extrahovali stejným postupem jako vzorky plazmy. Blízká úroveň koncentrací stanovovaných analytů ve vzorcích umožňuje analýzu plazmy i moči shodnou metodou HPLC detekce. Po vymezení optimálního postupu stanovení metanephrinů jsme metodu nakalibrovali a validovali. Naměřené parametry odpovídají současným požadavkům pro stanovení analytů v biologickém materiálu. Referenční hodnoty námi ověřené na souboru nemocniční populace se shodují s literárními údaji [6, 9]. Dosud otevřenou a nedořešenou otázkou, související s analýzou metanephrinů v biologických materiálech, zůstává problematika lékových interferencí, kterou se hodláme v příštím období zabývat.

Závěr

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s coulochemickou detekcí je vhodná pro rutinní stanovení metanephrinu a normetanephrinu v moči a v plazmě. Je to metoda dostatečně citlivá a reprodukovatelná. Va-

riační 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.

Literatura

1. **Peaston, R. T., Weikove, C.** Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann. Clin. Biochem.*, 2004, 41, p. 17–38.
2. **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, s. 603–611.
3. Roden, M. et al. Quantification of unconjugated metanephrines in human plasma without interference by acetaminophen. *Clin. Chem.*, 2001, 47, p. 1061–1067.
4. **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, p. 332–337.
5. **Lenders, J. W. M., Eisenhofer, G., Mannelli, M., Pacak, K.** Pheochromocytoma. *Lancet*, 2005, 366, p. 665–675.
6. **Eisenhofer, G.** Cataloging Internet resource: The foundation for catecholamine research. Dostupný z [www: <http:// www.catecholamine.org>](http://www.catecholamine.org).
7. **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.
8. **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.
9. **Zima, T.** *Laboratorní diagnostika*. Praha : Galen 2002.

Prezentace práce byla podpořena cestovním grantem ČSKB.

Do redakce došlo 25. 7. 2007.

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Martina Ulrychová
ÚKBD LF UK a FN
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: ulrycmar@fnhk.cz