

Vývoj a implementace metody stanovení volných metanefrinů v plazmě pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí pro rutinní využití v diagnostické laboratoři

Rajska M., Procházková P., Bartoníková D., Weiperová L., Loučka P., Minář J., Radina M.

Spadia lab, a.s., Dr. Slabihoudka 6232/11, 708 52 Ostrava

SOUHRN

Cíle studie: Vývoj a implementace metody stanovení volných metanefrinů v plazmě pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) pro rutinní použití v diagnostické laboratoři, která eliminuje omezení klasické kapalinové (HPLC) nebo plynové chromatografie (GC) a imunoanalytických metod, jako jsou náročná příprava vzorků, derivatizace a interferující substance.

Typ studie: Vývoj analytické metody. Posouzení vhodnosti pro rutinní použití v diagnostické laboratoři.

Název a sídlo pracoviště: Laboratoř klinické biochemie – Oddělení instrumentálních metod, Spadia lab, a.s., Dr. Slabihoudka 6232/11, 708 52 Ostrava.

Materiál a metody: Vývoj a validace metody byly provedeny na LC-MS/MS systému Agilent 6490 Triple Quadrupole. Pro chromatografickou separaci byla použita kolona SeQuant[®]ZIC[®]HILIC HPLC 3,5 mm, 100Å, PEEK 100 x 2,1 mm metal-free (Merck KGaA, Německo) a gradientová eluce. Pro stanovení analytických parametrů metody byly použity lyofilizované kalibrační a kontrolní materiály z firmy Recipe Chemicals and Instruments GmbH (Německo) a Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH (Německo). Do studie bylo zařazeno 40 pacientů s diagnózou arteriální hypertenze.

Výsledky: Analytické parametry nově vyvinuté metody jsou vyhovující. Variační koeficienty (CV) preciznosti v sérii a mezilehlá preciznost se pohybovaly pod 10 %. Výťažnost, určená metodou standardního přídatku se pohybovala v rozmezí 89 až 98 %. Limit stanovitelnosti pro MN byl 0,035 nmol/l, pro NMN 0,049 nmol/l. Metoda splňuje požadavky validace pro oba analyty. Bylo provedeno srovnání tří metod stanovení volných metanefrinů v plazmě: 2-MET Plasma ELISA^{Fast Track} (Labor Diagnostika Nord GmbH, Německo), HPLC metoda s elektrochemickou detekcí (ECD) a komerčně dodávaná diagnostická souprava FEO Kit (VUOS a.s., Česká republika) a nově vyvinutá LC-MS/MS metoda. Statistická analýza byla provedena pomocí programu MedCalc 16.1 (Medcalc Software bvba, Belgie) s využitím Passing Bablokovy regresní analýzy.

Závěr: Neuroendokrinní tumory představují heterogenní skupinu onemocnění s různou klinickou symptomatologií a etiopatogenezí. Neuroendokrinní tumory, jako jsou feochromocytom nebo paragangliom, vykazují setrvalou nebo paroxyzmální nadměrnou produkci katecholaminů. Jejich 3-O-methylované metabolity, metanefrin (MN) a normetanefrin (NMN), jsou preferovány pro diferenciální diagnostiku feochromocytomu vzhledem k jejich vysoké diagnostické senzitivitě a specificitě. Prezentovaná LC-MS/MS metoda eliminuje nevýhody klasických chromatografických technik a imunoanalytických metod, přičemž zásadními aspekty jsou: jednoduchá příprava vzorku, krátká doba analýzy a požadované analytické parametry.

Klíčová slova: volné plazmatické metanefriny, feochromocytom, LC-MS/MS.

SUMMARY

Rajska M., Procházková P., Bartoníková D., Weiperová L., Loučka P., Minář J., Radina M.: Development and implementation of method for analysis of free metanephrines in plasma by the liquid chromatography tandem mass spectrometry for routine use in clinical laboratory.

Objective: The development and implementation of method for the determination of free metanephrines in plasma by the liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) suitable for routine practice in diagnostic laboratory which overcomes inconveniences related with classical liquid (HPLC) or gas chromatography (GC) and immunoassay approaches, like extensive sample preparation, the step of derivatization or interfering substances.

Design: Analytical method development. Assessment of suitability for routine practice in diagnostic laboratory.

Settings: Department of Clinical Biochemistry – Instrumental methods section, Spadia lab, a.s., Dr. Slabihoudka 6232/11, 708 52 Ostrava

Material and Methods: Method development and validation were performed on Agilent 6490 Triple Quadrupole LC-MS/MS system. Chromatographic separation was achieved on SeQuant[®]ZIC[®]HILIC HPLC 3,5 μm, 100Å, PEEK 100 x 2,1 mm metal-free HPLC Column (Merck KGaA, Germany) by gradient elution. For determination of analytical parameters lyophilised plasma calibrators (purchased from RECIPE Chemicals and Instruments GmbH, Germany) and controls (purchased from Recipe Chemicals and Instruments GmbH and Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Germany) were used. The study included 40 patients with diagnosis arterial hypertension.

Results: The analytical performance of the new developed method is satisfactory. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were below 10 %. Recoveries determined by standard addition were from 89 to 98 %. The limit of quantification for MN was 0.035 nmol/l, for NMN was 0.049 nmol/l. This method fulfilled requirements for validation parameters for both analytes. Comparison of three methods for quantification of free metanephrines in plasma was performed

– 2-MET Plasma ELISA^{Fast Track} (Labor Diagnostika Nord GmbH, Germany), FEO Kit (VUOS a.s., Czech Republic) dedicated for HPLC-ECD systems and developed LC-MS/MS method. Statistical analysis was performed using the MedCalc 16.1 (Medcalc Software bvba, Belgium) using the Passing Bablok regression.

Conclusions: Neuroendocrine tumors represent a clinically and etiologically diverse group of disorders. Neuroendocrine tumors, such as pheochromocytomas or paragangliomas, exhibit a persistent or paroxysmal excessive catecholamines production. 3-O-methylated catecholamine metabolites, metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN), are prioritized for diagnosis of pheochromocytoma due to their highest diagnostic sensitivity and specificity. Presented LC-MS/MS method overcomes classical HPLC and immunoassay approaches. Method provides simple step of sample preparation, short run-time and required analytical parameters.

Keywords: free plasma metanephrines, pheochromocytoma, LC-MS/MS.

Úvod

Neuroendokrinní tumory představují heterogenní skupinu onemocnění s různou klinickou symptomatologií a etiopatogenezí. Neuroendokrinní tumory, které pocházejí z chromafinní tkáně sympatického nebo parasympatického nervového systému, jako jsou feochromocytom nebo paragangliom, vykazují setrvalou nebo paroxysmální nadměrnou produkci katecholaminů. Jejich 3-O-methylované metabolity, metanepfrin (MN) a normetanepfrin (NMN), jsou preferovány pro diferenciální diagnostiku feochromocytomu vzhledem k jejich vysoké diagnostické senzitivitě a specifitě [1, 3, 5]. Pokud je feochromocytom správně diagnostikován, může být úspěšně odstraněn a vyléčen až v 90 % případů [2]. V případě, že tyto tumory nejsou diagnostikovány, mohou mít fatální následky pro lidský organismus a končit smrtí v důsledku maligní hypertenze, srdečního selhání, infarktu myokardu, arytmií, cévní mozkové příhody nebo metastáz. Včasná diagnostika, založená na biochemickém průkazu nadprodukce katecholaminů a jejich metabolitů, má proto zcela zásadní význam [2].

V laboratorní diagnostice jsou pro stanovení volných plazmatických metanepfrinů využívané metody klasické kapalinové chromatografie s následnou spektrofotometrickou, fluorescenční či elektrochemickou (ECD) detekcí, metody plynové chromatografie nebo imunoanalytické metody. Tyto metody mají mnoho

nevýhod a omezení, jako je např. náročná příprava vzorku a dlouhý čas analýzy u HPLC metod, nutný krok derivatizace u GC metod či interferující substance u imunoanalytických metod [1, 4].

Cílem této práce byl vývoj metody stanovení volných metanepfrinů v plazmě pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), která eliminuje výše uvedená omezení a následná implementace metody do rutinní praxe v diagnostické laboratoři.

Materiál a metoda

Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 40 pacientů s diagnózou arteriální hypertenze. K definování analytických parametrů metody byly použity jak lyofilizované komerčně dostupné materiály, tak vzorky pacientů. 20 patientských vzorků a kontrolní materiály byly využity při vývoji metody a pro stanovení analytických parametrů LC-MS/MS metody, dalších 20 patientských vzorků a čtyři kontrolní vzorky byly využity pro stanovení koncentrací MN a NMN za účelem srovnání tří různých metod.

Volné metanepfriny u osmi patientských vzorků a u tří kontrolních materiálů byly stanoveny pomocí tří odlišných metod – ELISA, HPLC s ECD detekcí a LC-MS/MS (Tabulka 1, n=11). U dalších 12 patientských vzorků a 1 kontrolního vzorku bylo stanovení provede-

Table 1: The parameters of statistical analysis for FEO and ELISA methods

	MN (n = 11)		NMN (n = 11)	
	FEO	ELISA	FEO	ELISA
Mean nmol/l	0.266	0.309	0.769	0.295
Median nmol/l	0.167	0.186	0.688	0.262
Lowest value nmol/l	0.090	0.141	0.471	0.128
Highest value nmol/l	1.214	0.627	1.998	0.552
p (Wilcoxon test)	0.52		0.001	
Passing- Bablok regression				
Intercept A	0.122		-0.014	
95% CI	(-3.379 – 0.186)		(-0.691 - 0.072)	
Slope B	0.567		0.365	
95% CI	(0.000 – 21.202)		(0.240 – 1.507)	
Linearity, p	0.77		0.77	

Table 2: The parameters of statistical analysis for FEO and LC-MS/MS methods

	MN (n = 24)		NMN (n = 24)	
	FEO	LC-MS/MS	FEO	LC-MS/MS
Mean nmol/l	0.294	0.302	0.797	0.798
Median nmol/l	0.215	0.208	0.705	0.720
Lowest value nmol/l	0.090	0.099	0.471	0.399
Highest value nmol/l	1.244	1.278	2.016	2.223
p (Wilcoxon test)	0.25		0.55	
Passing- Bablok regression				
Intercept A	0.001		-0.130	
95% CI	(-0.038 - 0.020)		(-0.550 - 0.047)	
Slope B	1.070		1.219	
95% CI	(0.966 - 1.283)		(0.973 - 1.839)	
Linearity, p	0.48		0.48	

no pouze pomocí chromatografických metod (Tabulka 2, n=24). Pro statistickou analýzu dat byl použit statistický program MedCalc 16.1 (Medcalc Software bvba, Belgie).

Chemikálie

Lyofilizované kalibrátory ClinCal®Serum Calibrator Set for Metanephrines (RECIPE Chemicals and Instruments GmbH, Německo) a kontroly (ClinChek®Serum Control for Metanephrines RECIPE Chemicals and Instruments GmbH, Germany a Endocrine Plasma Controls Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Německo), interní standardy - Metanephrine-d3, Normetanephrine-d3 (Sigma-Aldrich, USA), rozpouštědla - isopropanol (Sigma-Aldrich, USA), acetonitril, methanol, voda (Vitrum VWR, Česká republika).

Přístrojové vybavení

LC-MS/MS systém - Agilent Technologies 1290 Infinity kapalinový chromatograf ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 6490 Triple Quadrupole, MRX Microplate Reader (Dynex), Coulochem III HPLC Systém (ESA Biosciences Inc., USA), Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf Centrifuge 5424.

Zpracování vzorků

Před odběrem periferní žilní krve bylo potřeba dodržet speciální dietní opatření, z jídelníčku bylo nutné vyřadit potraviny bohaté na tyrosin - banány, ořechy, sýr. Pokud je to možné, po konzultaci s ošetřujícím lékařem, bylo nutné vysazení některých léků: alfa-methyl-dopa a jiná centrálně působící antihypertenziva, lokální anestetika, inhibitory MAO, antiarytmika. Vyšetření také ovlivňují alkohol, benzodiazepiny, opioidy apod. [5, 6]. Odběr byl proveden do odběrové soupravy s antikoagulačním činidlem EDTA v souladu s pokyny pro pre-analytickou fázi [7]. Po odběru byla krev centrifugována 10 min při 4000 g a získaná plazma byla do provedení analýzy uchována při -20 °C. Před analýzou byla plazma temperována na laboratorní teplotu.

LC-MS/MS analýza

K 200 µl vzorku (kalibrátoru, kontroly, plazmy) bylo přidáno 50 µl interního standardu (0,25 ng MN-d3 a 0,25 ng NMN-d3) a krátce promícháno na vortexu. Vzorky byly precipitovány v 1 ml isopropanolu, 30 sec míchány na vortexu a následně centrifugovány 10 min při 13 000 g. 1 ml supernatantu byl převeden do čisté skleněné zkumavky a pod mírným proudem dusíku odpařen. Po rekonstituci ve 100 µl ACN/H₂O (90:10) byly vzorky centrifugovány 10 min při 13 000 g. K současnému stanovení volných metanepfrinů (metanepfrinu a normetanepfrinu) v plazmě bylo pro nástřik k LC-MS/MS analýze použito 5 µl supernatantu.

Pro analýzu byla použita kolona SeQuant®ZIC®HILIC HPLC 3,5 mm, 100Å, PEEK 100 x 2,1 mm metal-free HPLC Column (Merck, Německo) a analyty byly separovány gradientovou elucí mobilních fází A (50 mM vodný roztok NH₄COOH) a B (acetonitril) při průtokové rychlosti 0,3 ml/min a teplotě 45 °C s následnou hmotnostní detekcí (parametry iontového zdroje a MRM přechody – Tabulka 3). Celková doba analýzy byla 6 min a retenční časy separovaných analytů byly 2,4 min pro MN a 2,6 min pro NMN (obr. 1).

Komerčně dostupné metodiky – IVD diagnostické kity

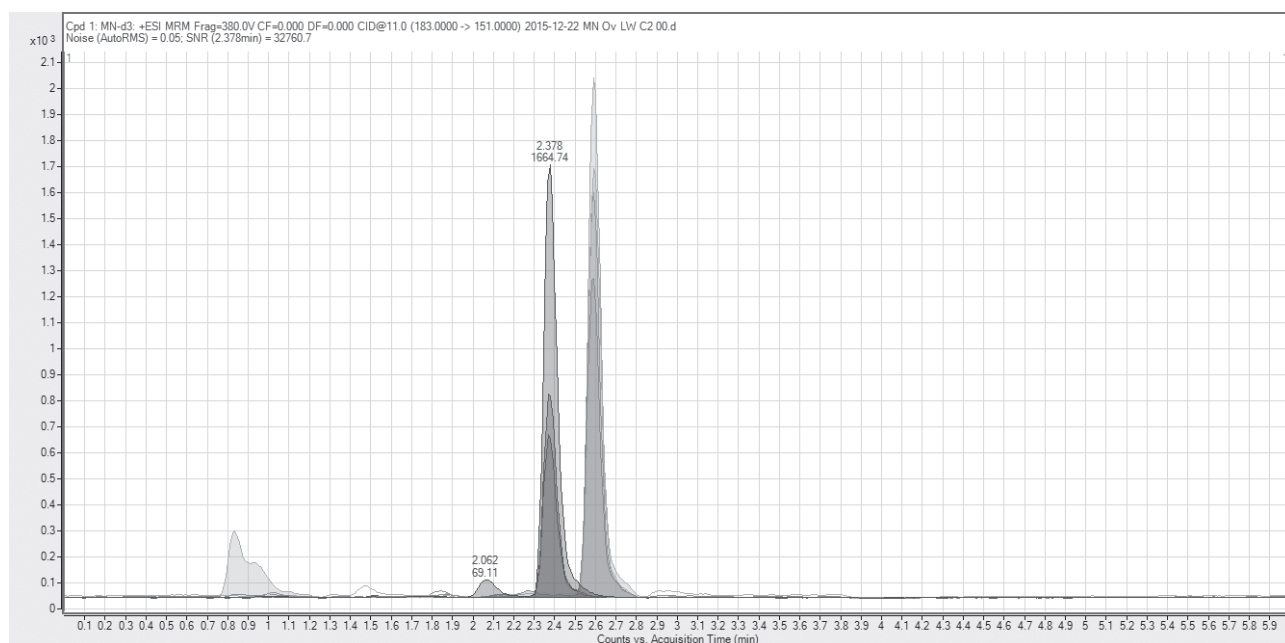
U komerčních metod bylo postupováno podle návodu v příbalových letáčích k IVD diagnostickým kitům 2-MET Plasma ELISA^{Fast Track} (Labor Diagnostika Nord GmbH, Německo) s následnou fotometrickou detekcí (MRX Microplate Reader) a FEO Kit (VUOS a.s., Česká republika) s následnou elektrochemickou detekcí (Coulochem III HPLC Systém, ESA Biosciences Inc., USA).

Výsledky

Vyvinutá metoda stanovení volných metanepfrinů v plazmě pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)

Table 3. Mass spectrometry and mass transition conditions. (*quantifier)

Ion source parameters				Precursor (m/z)	Product (m/z)	Frag	CE
AJS ESI	positive		MN*	180	165	380	11
Gas temp.	135	°C	MN	180	148	380	11
Gas flow	12	l/min	MN-d3*	183	151	380	11
Nebulizer	45	Psi	MN-d3	183	168	380	11
Sheath gas temp.	400	°C	NMN*	166	134	380	14
Sheath gas flow	10	l/min	NMN	166	106	380	18
Capillary	4000	V	NMN-d3*	169	137	380	14
Nozzle voltage	0	V	NMN-d3	169	109	380	18

**Fig. 1.** Chromatogram of MN and NMN.

poskytla vyhovující analytické parametry pro oba analyty. Rozsah kalibrace pro metanefrin byl 0,035 – 7,175 nmol/l s limitem kvantifikace 0,035 nmol/l (CV = 4,8 %). Rozsah kalibrace pro normetanefrin byl 0,049 – 9,956 nmol/l s limitem kvantifikace 0,049 nmol/l (CV = 6,7 %). Limit kvantifikace byl stanoven experimentálně měřením postupně ředěného kontrolního materiálu a určením nejnižší hodnoty, při které bylo dosaženo CV < 20 % (za podmínek opakovatelnosti) a výtěžnosti ± 20 %. Výtěžnost, určená metodou standardního přídávku se pohybovala v rozmezí 89 – 98 %. Variační koeficienty (CV) preciznosti v sérii a mezilehlé preciznosti se pohybovaly pod 10 %. Pro určení preciznosti v sérii (intra-

assay precision) byl použit pool patientských vzorků (počet stanovení n=12), pro určení mezilehlé preciznosti (interassay precision) byly použity kontrolní materiály ClinChek® for Metanephrines (počet stanovení n=20), viz. Tabulka 4.

Pro posouzení vhodnosti vyvinuté metody pro rutinní použití v diagnostické laboratoři bylo provedeno srovnání dříve používané metodiky 2-MET Plasma ELISAFast Track a nově vyvinuté LC-MS/MS metody s komerčně dostupnou metodikou FEO Kit s ECD detekcí. Pro statistickou analýzu dat byl použit statistický program MedCalc 16.1. Základní statistické parametry všech srovnávaných skupin jsou uvede-

Table 4. Intraassay and interassay precision

Precision	Unit	Intraassay (n=12)		Interassay			
		MN	NMN	MN (n=20)		NMN (n=20)	
Cteor	nmol/l	-	-	0.295	1.207	0.628	2.079
MEAN	nmol/l	0.118	0.778	0.295	1.212	0.630	2.200
SD	nmol/l	0.006	0.019	0.012	0.049	0.051	0.205
CV	%	5.4	2.4	4.2	4.1	8.1	9.3

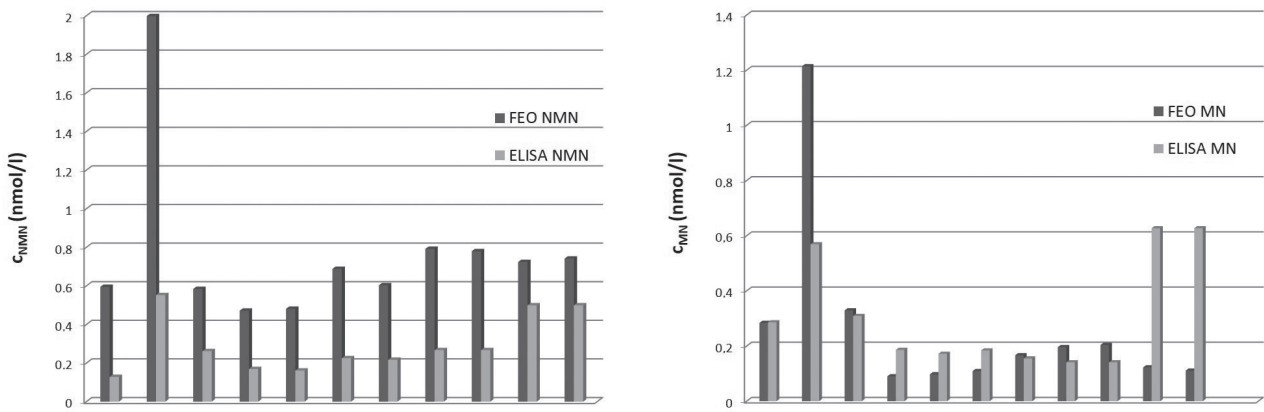


Fig. 2.: Graphical representation of measured values obtained by FEO Kit and 2-MET Plasma ELISA^{Fast Track}.

ny v Tabulce 1 a Tabulce 2. Byla testována normalita rozložení dat testem D'Agostino-Pearson test s výsledkem zamítnutí normality dat a pro další porovnání byl využit neparametrický Wilcoxonův test. Dále byly výsledky statisticky zpracovány Passing-Bablokovou neparametrickou regresí (Obr. 4) a Bland-Altmanovým diagramem na srovnání metodik (Obr. 6). Pro grafickou vizualizaci rozložení dat byl použit box-and-whisker graf (Obr. 3 a 5).

Srovnání metodik FEO kit a 2-MET Plasma ELISAFast Track

Metanefrin a normetanefrin v plazmě

Jako referenční metoda byla použita metodika FEO-kit. Výsledky vyhodnocení Passing-Bablokovou regresí jsou uvedeny v Tabulkách 1 a 2. V případě úseku A, pro MN i NMN, zahrnuje 95% interval spolehlivosti 0, což poukazuje na nepřítomnost systematické chyby měřicího systému. V případě směrnice B, pro MN i NMN, zahrnuje 95% interval spolehlivosti 1, což vylučuje přítomnost proporcionální chyby měření. Ke stejnému závěru jsme došli pomocí Wilcoxonova párového testu pro MN ($p=0,52$). Pro normetanefrin Wilcoxonův párový test poukázal na statisticky významný rozdíl mezi srovnávanými metodami ($p=0,001$).

I přes uvedené skutečnosti je patrné, že pro validní posouzení shody těchto metod na základě výše uvedených statistických testů byl k dispozici malý počet dat, $n=11$. Po pečlivé vizuální analýze dat je patrné (viz. Tabulka 3, Obr. 2. a Obr. 3.), že minimální a maximální hodnoty koncentrace a interval mezi 1. a 3. kvantilem pro výsledky stanovené metodikou FEO Kit a metodikou 2-MET Plasma ELISAFast Track se významně liší. Metodika 2-MET Plasma ELISAFast Track neumožňuje správné zachycení zvýšených hladin normetanefrinu v plazmě.

Srovnání metodik FEO kit a vyvinuté LC-MS/MS metody

Metanefrin a normetanefrin v plazmě

Pro srovnání chromatografických metod byl použit větší soubor vzorků ($n=24$). Jako referenční metoda byla použita metodika FEOkit. Výsledky vyhodnocení Passing-Bablokovou regresí jsou uvedeny v Tabulce 2. V případě úseku A, pro MN i NMN, zahrnuje 95% interval spolehlivosti 0, což vylučuje přítomnost systematické chyby měřicího systému v celém rozsahu měření. V případě směrnice B, pro MN i NMN, zahrnuje 95% interval spolehlivosti 1, což vylučuje přítomnost proporcionální chyby měření. K posouzení rozdílů mezi výsledky byl použit diferenční Bland-Altmanův graf (Obr. 6). Při pohle-

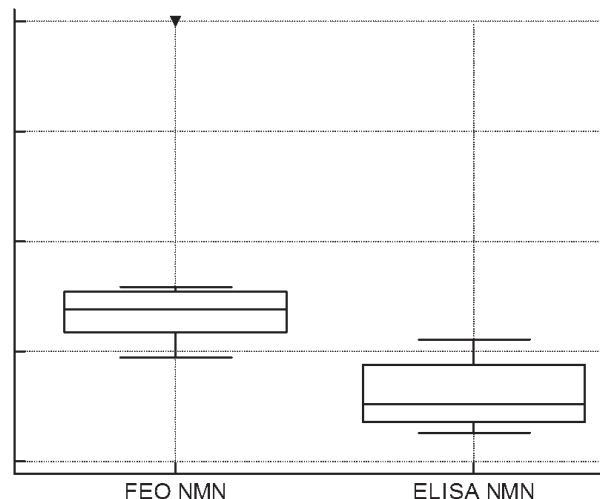
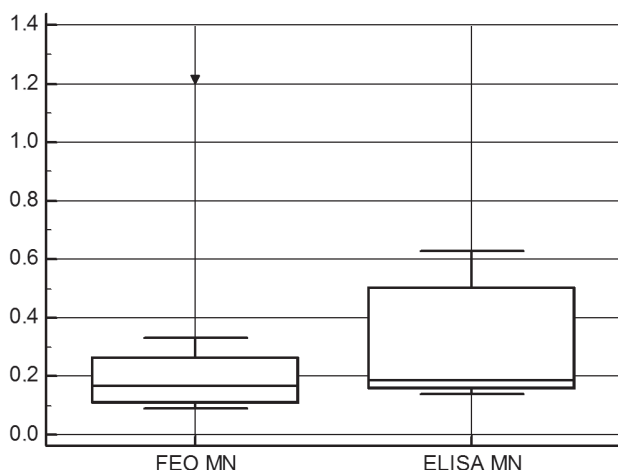


Fig. 3.: Box-and-whisker graphs of FEO Kit and 2-MET Plasma ELISA^{Fast Track}.

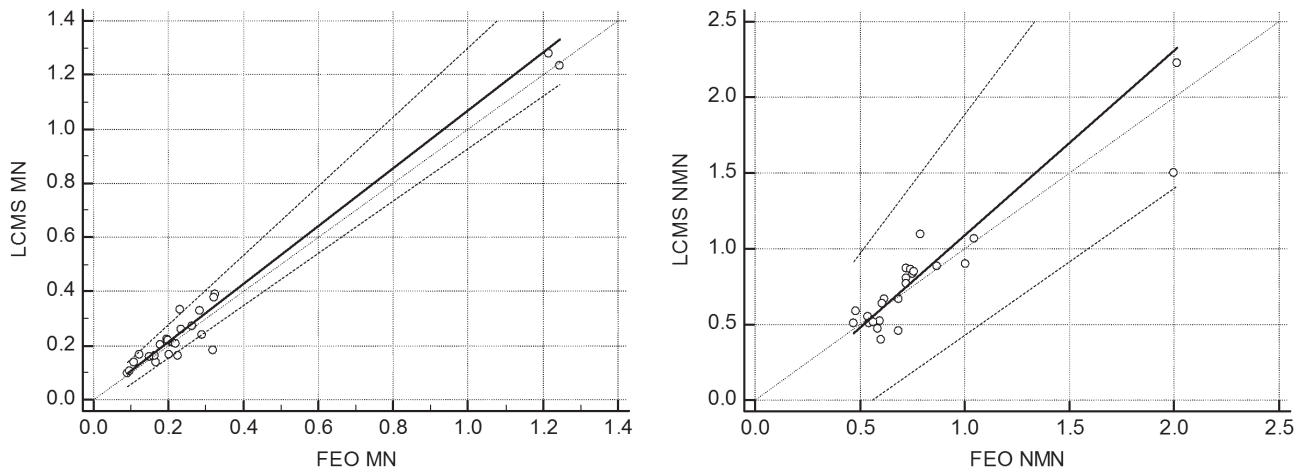


Fig. 4.: Passing-Bablok regression – comparison of FEO kit and LC-MS/MS.

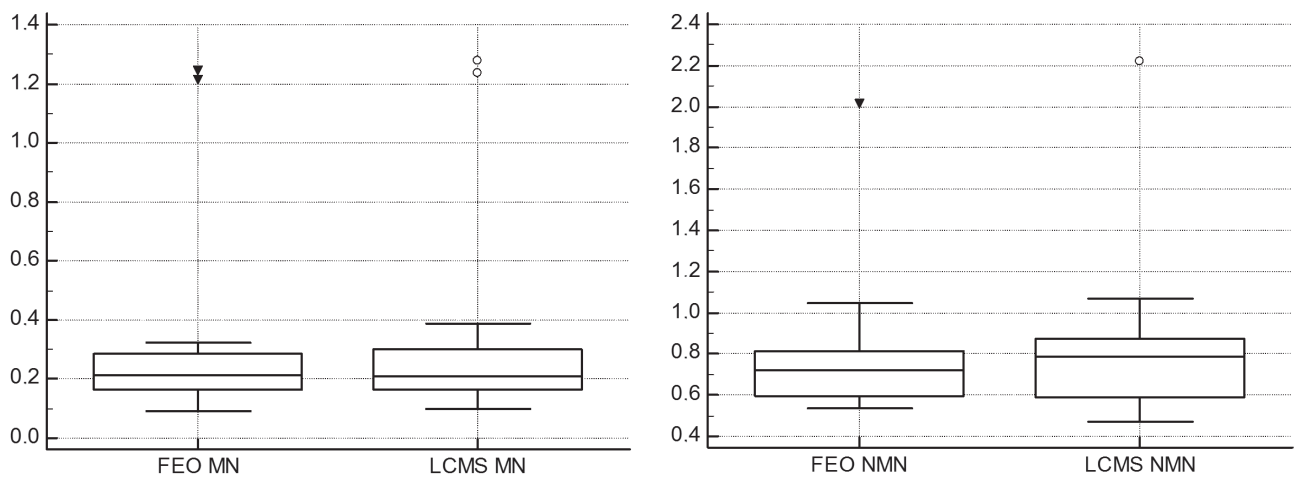


Fig. 5.: Box-and-whisker graphs of FEO Kit and LC-MS/MS.

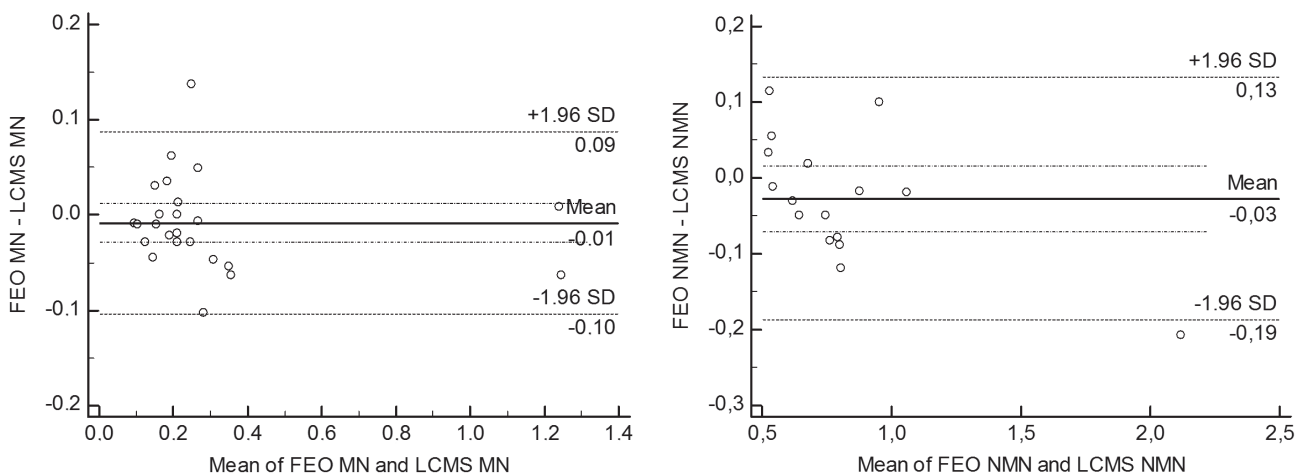


Fig. 6.: Blandt-Altman difference graph for FEO Kit and LC-MS/MS

du na graf vidíme, že hodnoty jsou rovnoměrně rozloženy a neprojevuje se trend, který by signalizoval přítomnost systematické chyby (pro metanefrín jeden odlehlý bod, pro normetanefrín dva odlehlé body). 95% interval spolehlivosti průměru diferencí zahrnuje 0, z čehož vyplývá,

že mezi metodami není statistický rozdíl. Ke stejnému závěru jsme došli pomocí Wilcoxonova párového testu ($p=0,25$ pro MN, $p=0,55$ pro NMN). Grafická vizualizace rozložení dat pomocí box-and-whisker grafu (Obr. 5) výsledky výše uvedené statistické analýzy podporuje.

Závěr

Včasná diagnostika feochromocytomu je zcela zásadní pro léčbu a chirurgickou intervenci. Diagnostický algoritmus neuroendokrinních tumorů je založen na několika aspektech: klinická symptomatologie, laboratorní diagnostika a zobrazovací techniky. Laboratorní průkaz nadprodukce katecholaminů a/nebo jejich metabolitů tumorem je limitován řadou faktorů: zvýšení hladin katecholaminů, které nemusí být specifické pro feochromocytom (produkce sympatickým nervovým systémem), přítomnost „němých“ feochromocytomů nebo epizodické vylučování katecholaminů. 3-O-methylované metabolity katecholaminů, metanefrin (MN) a normetanefrin (NMN), jsou preferovány pro diferenciální diagnostiku feochromocytomu vzhledem k jejich vysoké diagnostické senzitivitě a specifitě. Nádorové buňky uvolňují volné metanefriny plynule a nezávisle na produkci katecholaminů [2,4].

Cílem prezentované práce byl vývoj analytické metody a posouzení vhodnosti pro rutinní použití v diagnostické laboratoři. K přednostem prezentované metody patří relativně nenáročná příprava vzorků, krátký čas analýzy a splnění požadované analytické parametry. Příprava vzorků je založena na precipitaci proteinů isopropanolem a následném odpaření pod proudem dusíku, nevyžaduje extrakci na tuhé fázi [3]. Limitací prezentované metody je skutečnost, že i když separace analytů je dosažena použitím 5 min gradientu, před nástřikem dalšího vzorku je kolonu nutné ekvilibrovat 80% mobilní fází B, aby se předešlo ztrátě intenzity píku normetanefrinu. Prezentovaná LC-MS/MS metoda splňuje požadavky kladené na analytické parametry a statistická analýza provedená pomocí Passing-Bablokovy regrese a Bland-Altmanových diagramů pro srovnání s referenční metodikou (FEO Kit) potvrdila vhodnost použití tohoto postupu pro stanovení volných metanefrinů v plazmě v rutinní diagnostické laboratoři. Metoda eliminuje nevýhody klasické HPLC metody s ECD detekcí, tj. především náročná příprava vzorku a dlouhý čas analýzy (50 min). Metoda rovněž eliminuje omezení imunoanalytických metod, jako jsou

interferující substance a falešně negativní výsledky. Statistická analýza a srovnání metodiky 2-MET Plasma ELISAFast Track s referenční metodou FEO Kit ukazuje na významnou rozdílnost mezi hodnotami stanovenými pomocí ELISA a pomocí chromatografických metod.

Literatura

1. **de Jong, W., de Vries, E., Kema, I. P.** Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines. *Clinical Biochemistry*, 2011, 44, p. 95 – 103
2. **Marney, L. C., Laha, T. J., Baird, G. S., Rainey, P. M., Hoofnagle, A. N.** *Clinical Chemistry*, 2008, 54:10, p. 1729 – 1732
3. **Cryer, P. E.** Pheochromocytoma. *West. J. Med.*, 1992, 156: p. 399-407
4. **Stejskal, D., Lačňák, B., Václavík, J., Zuber, R.** Volné plazmatické metanefriny a jejich využití v diagnostice feochromocytomu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2005, 13 (34), No. 4, p. 201 - 206
5. **Brabcova Vrankova, A., Portychova, L., Nyvltova, Z., Widimsky, J., Zelinka, T., Škrka, J., Horna, A.** Vývoj nového kitu pro stanovení volných plazmatických metanefrinů. *Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXV. Moderní Elektrochemické Metody 2015*, s. 13 – 16.
6. Mayo Clinic. Metanephrines, Fractionated, Free, Plasma [online]. UK, Rochester, MN 55901, 1995-2016 [cit. 2016-01-11]
7. Ministerstvo zdravotnictví České republiky, Číselníky dasta, Metanefrin (P; látková konc. [nmol/l] chromatografie-HPLC) [online]. ČR, Palackého nám. 375, Praha 2, 128 00, [cit. 2016-01-16]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/_KOMP_201512140902META-NEPH.htm#_TAB_P_METANEPH_HPLC

Do redakce došlo 24. 3. 2016

Adresa pro korespondenci
Mgr. Magdalena Rajska
Dr. Slabihoudka 6232/11
708 52 Ostrava
e-mail: magdalena.rajaska@spadia.cz