

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra organické chemie



**Vývoj nových chromatografických metod pro
stanovení plazmatických a močových metanefrinů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Barbora Agatha Halouzková
Studijní program	N1407 Chemie
Forma studia:	Prezenční
Studijní obor:	Bioorganická chemie, 5. ročník
Vedoucí práce:	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Konzultant práce:	Mgr. Barbora Sokolová, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 15. 5. 2015

.....

Bc. Barbora Agatha Halouzková

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za naprosto profesionální vedení diplomové práce, dále své konzultantce Mgr. Barboře Sokolové, Ph.D. za cenné a zkušené rady udílené v průběhu diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému úseku Instrumentálních metod Laboratoří AGEL a.s. Nový Jičín. V neposlední řadě patří obrovský dík mé rodině a zvláště manželovi za pevné nervy, které se mnou po celou dobu museli mít.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Agatha Halouzková
Název práce	Vývoj nových chromatografických metod pro stanovení plazmatických a močových metanefrinů
Typ práce	diplomová
Pracoviště	Laboratoře AGEL a.s. Nový Jičín
Vedoucí práce	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Konzultant práce	Mgr. Barbora Sokolová, Ph.D.
Rok obhajoby	2015

Abstrakt

Tato práce se zabývá vývinem a validací nové, rychlé a robustní metody kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, která by umožnila stanovení plazmatických a močových metanefrinů (normetanefrinu a metanefrinu) coby metabolitů katecholaminů adrenalinu a noradrenalinu. Metanefriny jsou z klinického hlediska významnými diagnostickými markery pro diagnostiku nádorového onemocnění feochromocytomu, projevujícího se paroxysmálními záchvaty hypertenze, kontinuální hypertenzí, orthostatickou hypertenzí, palpitacemi, nevolností, nadměrným pocením, tachykardií či bolestmi hlavy. Podstata tohoto onemocnění může mít genetický základ (v současné době je sledována skupina zhruba desíti genů podílejících se na vzniku tohoto onemocnění), může se ale objevovat rovněž sporadicky. Roční incidence tohoto onemocnění je v současnosti 1 na 100 000 osob, z toho zhruba 10% případů má genetický základ. Počet pacientů je odhadován ale mnohem vyšší, poněvadž spousta případů je skryta pod diagnózou hypertenze.

V současné době jsou v České republice pro laboratorní diagnostiku tohoto onemocnění používány metody RIA, ELISA, GC/MS a HPLC/ED. Ve světě se ale do popředí dostává metoda HPLC/MS, jež vyniká v konfirmaci s těmito metodami vysokou diagnostickou senzitivitou, specifitou, robustností, rychlostí a menší časovou náročností na přípravu vzorku.

Klíčová slova: metanefrin, normetanefrin, feochromocytom, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, validace in house metody

Počet stran:	114
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's name	Bc. Barbora Agatha Halouzková
Title	The development of new chromatography methods for the determination of metanephrines
Type of thesis	Diploma
Department	AGEL Laboratories, Nový Jičín
Supervisor	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Consultant	Mgr. Barbora Sokolová, Ph.D.
The year of presentation	2015

Abstract

This work deals with the development and validation of a new rapid and robust HPLC-MS-MS analytical method for the determination of plasma and urine metanephrines. The metanephrines are metabolites of catecholamines and from the clinical point of view they serve as the gold standard for the laboratory diagnosis of rare cancer disease - pheochromocytoma. The clinical symptoms of pheochromocytoma include paroxysmal hypertension attacks, permanent hypertension, orthostatic hypertension, palpitations, nausea, increased sweating, tachycardia and headache. The hereditary as well as sporadic forms of this disease are known and the year incidence is about 1/100 000. The proportion of hereditary forms is believed to be around 10 % however a significant number of hereditary cases seem to be undiagnosed. Various analytical methods (radioimmunoanalysis, ELISA, GC-MS, HPLC-ED etc.) for the determination of plasma and urinary metanephrines have been described. The HPLC-MS-MS method has some advantages which include increased sensitivity, specificity and simple sample pretreatment.

Key words: metanephrine, normetanephrine, pheochromocytom, liquid chromatography, mass spectrometry, in house method validation

Language	Czech
Number of pages	114

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE	3
2. ÚVOD.....	4
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	5
3.1. Biosyntéza a degradace katecholaminů.....	6
3.2. Fyziologické účinky katecholaminů	9
3.3. Patobiochemie katecholaminů	11
3.4. Diferenciální diagnostika feochromocytomu	16
3.5. Vyšetřovací metody feochromocytomu.....	18
3.5.1. Laboratorní diagnostika feochromocytomu	18
3.5.2. Zobrazovací metody v diagnostice feochromocytomu	20
3.5.3. Přehled analytických metod stanovení plazmatických a močových metanefrinů	23
3.5.3.1. Zásady preanalytické fáze stanovení plazmatických a močových metanefrinů....	23
3.5.3.2. Přehled metod stanovení plazmatických a močových metanefrinů	24
3.5.3.2.1. Fotometrické metody stanovení metanefrinů	24
3.5.3.2.2. Imunochemické metody stanovení metanefrinů.....	24
3.5.3.2.3. Metody stanovení metanefrinů plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií.....	25
3.5.3.2.4. Metody stanovení metanefrinů kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí	26
3.5.3.2.5. Metody stanovení metanefrinů kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií.....	29
3.5.3.3. Extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction).....	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1. Materiál a přístroje.....	31
4.1.1. Chemikálie	31
4.1.2. Přístrojové vybavení.....	32
4.2. Příprava zásobních roztoků a standardů	32
4.3. Použitá instrumentace	33
4.4. Optimalizace podmínek.....	35
4.5. Optimalizace separace	35
4.6. Optimalizace přípravy vzorku.....	36
4.7. Kvantifikace	38
4.8. Validace metody.....	38
4.8.1. Validace metody stanovení močových metanefrinů.....	38
4.8.1.1. Příprava, uchování a zpracování vzorku	39

4.8.1.2.	Volba vhodné kalibrační metody.....	39
4.8.1.3.	Linearita.....	40
4.8.1.4.	Mezilehlá preciznost	40
4.8.1.5.	Opakovatelnost	40
4.8.1.6.	Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)	41
4.8.2.	Validace metody – plazmatické metanefriny.....	41
4.8.2.1.	Příprava, uchovávání a zpracování vzorku	41
4.8.2.2.	Volba vhodné kalibrační metody.....	42
4.8.2.3.	Linearita.....	42
4.8.2.4.	Mezilehlá preciznost	43
4.8.2.5.	Opakovatelnost	43
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
5.1.	Optimalizace MS parametrů	45
5.2.	Optimalizace LC parametrů.....	49
5.3.	Optimalizace přípravy vzorku.....	54
5.3.1.	Optimalizace přípravy vzorku moči	54
5.3.2.	Optimalizace přípravy vzorku plazmy	55
5.3.3.	Příprava interního standardu	55
5.3.4.	Extrakce na pevné fázi (SPE).....	55
5.4.	Výsledky validace – Močové metanefriny.....	61
5.4.1.	Linearita.....	61
5.4.2.	Vymezení hladin L1, L2, opakovatelnost, reprodukovatelnost.....	63
5.4.3.	Mezilehlá preciznost	73
5.4.4.	Limit detekce a limit kvantifikace.....	84
5.5.	Výsledky validace – Plazmatické metanefriny.....	84
5.5.1.	Linearita.....	84
5.5.2.	Opakovatelnost	86
5.5.3.	Mezilehlá preciznost	96
5.5.4.	Limit detekce a limit kvantifikace.....	107
6.	ZÁVĚR.....	108
7.	LITERATURA.....	109

1. CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma analytické metody stanovení plazmatických a močových metanefrinů.
- Vývin nové, rychlé a robustní metody kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, která umožní stanovení plazmatických a močových hladin metanefrinů (metanefrinu a normetanefrinu)
- Validace metody
- Aplikace metody na reálné patientské vzorky

2. ÚVOD

Katecholaminy se řadí do skupiny biogenních aminů. Strukturně se jedná o sloučeniny s 3,4-dihydroxyfenylovým jádrem, jejichž hlavními zástupci jsou adrenalin, noradrenalin a dopamin. Z fyziologického hlediska se jedná o zástupce hormonů a neurotransmiterů. [1, 2, 3] Metanefriny se řadí mezi jejich *O*-methylované metabolity. [4] V posledních letech byla metanefrinům věnována pozornost z hlediska patobiochemického, neboť jejich nadměrné vyplavování v těle svědčí pro nádorové onemocnění feochromocytom. Jedná se o nádor, tvořený v dřeni nadledvin, který je v 90% případů benigní, 10% je případů je maligních. Může mít genetický základ, zároveň se může objevovat sporadicky. Toto onemocnění je často skryto za diagnózou hypertenze, proto bývá spousta případů objevena *post mortem*. Feochromocytom se projevuje paroxysmálními záchvaty hypertenze, které jsou způsobeny pulzním vylučováním katecholaminů. Zároveň ale dochází ke kontinuálnímu vyplavování metanefrinů. [5, 6] Právě průkaz nadprodukce metanefrinů hraje důležitou roli v laboratorní diagnostice feochromocytomu. [7] Laboratorně jsou metanefriny stanovovány v moči a v plazmě. Mezi metody stanovení plazmatických a močových metanefrinů se řadí GC/MS, RIA, ELISA, HPLC/ED, fluorimetrické metody a HPLC/UV, přičemž v České republice jsou nejfrekventovanějšími metodami RIA a HPLC s elektrochemickou detekcí. [8, 9] Ve světě se ale v posledních letech dostává do popředí metoda HPLC/MS/MS, která se vyznačuje svou rychlostí, robustností a menší náročností a podstatně vyšší citlivostí než výše zmíněné metody. [10] Právě stanovení plazmatických a močových metanefrinů pomocí metody HPLC/MS/MS se věnuje tato diplomová práce. Cílem této práce je uvést do problematiky katecholaminů a metanefrinů, popsat způsob optimalizace metody HPLC/MS/MS, tedy optimalizaci MS podmínek, separace, přípravu vzorku a dále popsat proces validace, který se sestává z ověření linearity, opakovatelnosti, reprodukovatelnosti, mezilehlé preciznosti, výtěžnosti a limitů detekce.

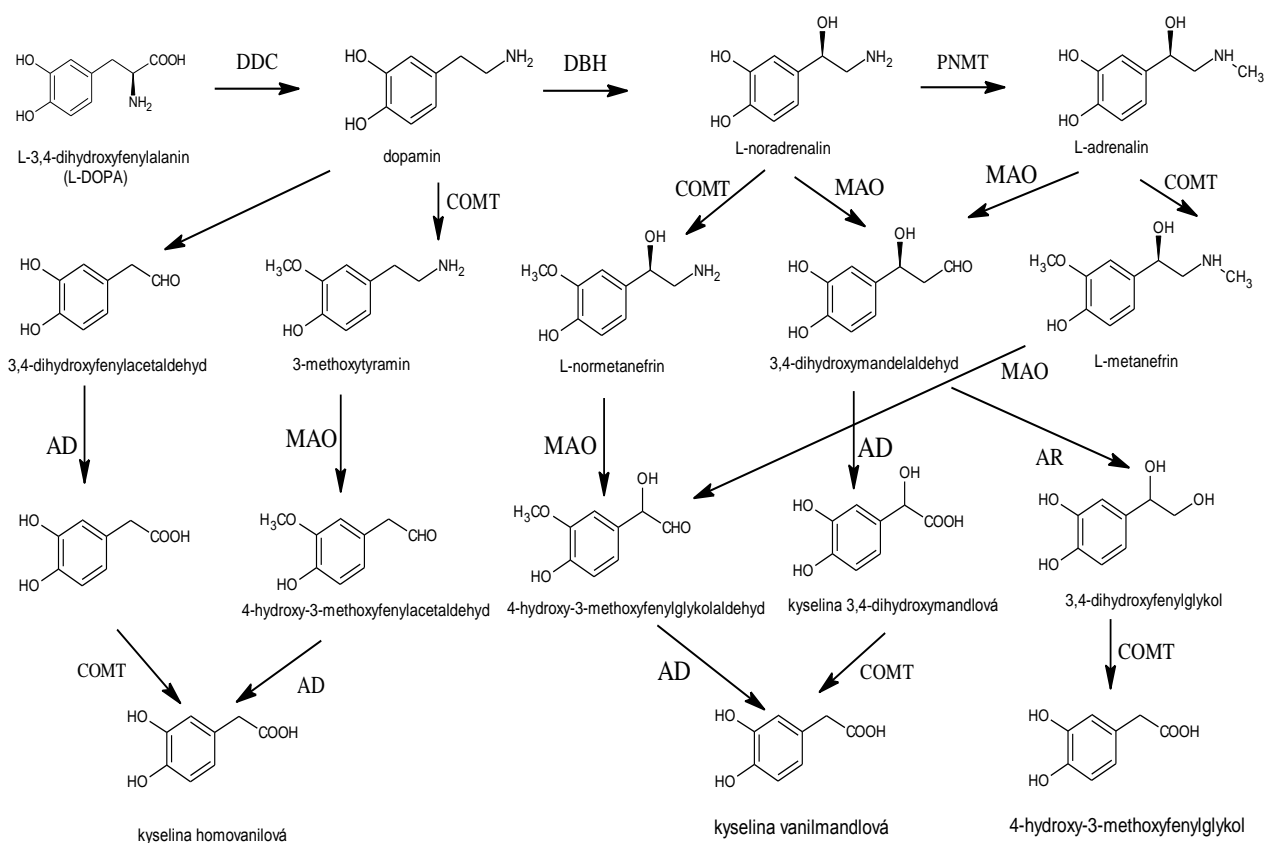
3. TEORETICKÁ ČÁST

Termín biogenní aminy představuje skupinu aminů obsahujících biogenní substance, jako jsou katecholaminy, serotonin a histamin. Tyto sloučeniny, které fungují jako neurotransmitery a hormony, jsou syntetizovány z aminokyselin: katecholaminy z tyrosinu, serotonin z tryptofanu a histamin z histidinu. Tyto biogenní aminy v lidském těle zasahují svou funkcí jak do centrálního, tak periferního nervového systému. [11] Katecholaminy se konkrétně řadí mezi biogenní monoaminy, zahrnující sloučeniny s dihydroxyfenylovou skupinou a aminoskupinou. Katechol se sám o sobě v lidském těle nevyskytuje, ale sloučeniny katechol ve své struktuře obsahující, se v lidském těle vyskytují a nazývají se katecholy. [1, 12] Známe tři katecholaminy vyskytující se *in vivo* a to adrenalin (známý též jako epinefrin), noradrenalin (známý též jako norepinefrin) a dopamin. [2] Tyto látky hrají klíčovou roli ve fyziologii jako neurotransmitery a hormony. [3] Regulují řadu funkcí, jako je psychomotorická aktivita, emoce, učení, stresová odpověď a rovněž byly zkoumány jako biomarkery mnoha onemocnění včetně oblasti diabetes, onemocnění srdce, bolesti či úzkosti. [3, 13]

Jak již bylo výše zmíněno, problematika katecholaminů byla intenzivně studována. Skupina těchto látek byla objevena ale až v první polovině minulého století. Jako první byl objeven adrenalin. Walter B. Cannon si myslel, že dřeň nadledvin a sympatický nervový systém fungují jako jednotka a skutečně v roce 1939 formálně navrhl, že adrenalin není jen aktivní součást dřeně nadledvin, ale funguje též jako neurotransmitter sympatického nervového systému. V roce 1946, asi rok po Cannonově smrti von Euler identifikoval noradrenalin jako sympatický neurotransmitter. [14] Roku 1970 jim za tento objev společně s Juliem Axelrodem byla udělena Nobelova cena za fyziologii v medicíně. [15] Centrální neurotransmitter dopamin, který byl považován za prekurzor adrenalinu a noradrenalinu, byl objeven jako poslední. [145] Do roku 2000 tomuto katecholaminu nebyla věnována taková pozornost jako adrenalinu a noradrenalinu. V této době se na něj začali soustředit Arvid Carlsson a Paul Greengard, kteří zjistili, že dopamin v mozku sám o sobě hraje roli neurotransmiteru a rovněž hraje klíčovou roli v regulaci pohybu a jeho ztráta v nigrostriatálním systému vede k řadě poruch, které vymezují Parkinsonovu poruchu. Carlsson rovněž demonstroval efektivní léky k léčbě schizofrenie blokadou dopaminových receptorů v mozku a Greengard zjistil, že komunikace mezi nervovými buňkami zprostředkovaná dopaminem probíhá velmi malým, difúzním procesem zvaným synaptická transmise, jaký je v řeči, pohybu a citlivosti. Rovněž Carlsson a Greengard za svůj výzkum katecholaminů obdrželi v roce 2000 Nobelovu cenu.

3.1. Biosyntéza a degradace katecholaminů

Hlavním místem syntézy katecholaminů je dřeň nadledvin a sympatické neurony s tím, že dřeně nadledvin je produkován především adrenalin (zhruba 80%, noradrenalin pouze 20%) a sympatickými neurony je uvolňována většina noradrenalinu. [16, 17] Syntetická dráha pro noradrenalin je identická k té, kterou používají adrenergní neurony. Nicméně dřeň nadledvin produkuje navíc enzym fenylethanolamin-*N*-methyltransferasu, kterou adrenergní neurony nemají. Je to z toho důvodu, že pouze dřeň nadledvin je vystavena dostatečně vysokým hladinám kortizolu (v důsledku dostředivého krevního toku z kortexu), což vede k indukci PNMT genové exprese a ten poté katalyzuje konečný krok syntetické dráhy, kdy je noradrenalin převeden na adrenalin, jak bude podrobněji rozebráno níže. [17]



Obr.č.1 Schéma syntézy a metabolismu katecholaminů; **COMT**: katechol-*O*-methyltransferáza, **MAO**: monoaminoxidáza, **AD**: adrenalin, **PNMT**: fenylethanolamin-*N*-methyltransferasa, **DBH**: dopamin- β -hydroxylasa, **DDC**: dihydroxyfenylalanin dekarboxyláza

Jak bylo již na začátku uvedeno, prekurzorem pro jejich syntézu je aminokyselina tyrosin. [18] Ta je přijata chromafinními buňkami v mozku a převedena na adrenalin a

noradrenalin následujícími kroky. [19] V prvním kroku hraje klíčovou roli tyrosinhydroxylasa, enzym určující rychlost syntézy všech katecholaminů, který v poloze 3 hydroxyluje tyrosin a převádí jej tím na dihydroxyfenylalanin (zkráceně DOPA). [20] Fosforylace pomocí cAMP dependentní proteinkinasy stimuluje tyrosin hydroxylázu a umožňuje její rychlý aktivační nástup. [17] Syntetická dráha v dopaminergních neuronech dále pokračuje enzymem dihydroxyfenylalanin dekarboxylasou, díky kterému je dihydroxyfenylalanin převeden na dopamin. Dihydroxyfenylalanin dekarboxyláza, nebo také dekarboxyláza aromatických kyselin (zkráceně AADC) je cytoplazmatický enzym, který byl dříve nazýván DOPA/L-DOPA dekarboxylasou, než bylo zjištěno, že dekarboxyluje mnohem vyšší množství substrátů. Jak tedy bylo řečeno, dihydroxyfenylalanin je převeden na dopamin. Ten je dále konvertován na noradrenalin pomocí enzymu dopamin- β -hydroxylasy (zkráceně DBH). Dopamin- β -hydroxylasa potřebuje jako kofaktor kyselinu askorbovou, což vysvětluje, proč se v dřeni nadledvin hromadí tak velké množství tohoto vitamínu. Syntetická dráha následně pokračuje enzymem fenylethanolamin-*N*-methyltransferasou (zkráceně PNMT), kterým je noradrenalin jak v noradrenergických neuronech, tak v dřeni nadledvin převeden na adrenalin. Tomuto kroku je přítomen jako kofaktor S-adenosylmethionin, jenž je donorem methylové skupiny. [12, 17, 19, 21, 22]

Takto vzniklé katecholaminy dále podstupují metabolický a inaktivační proces, který může nastat dvěma možnými způsoby a to pomocí enzymu katechol-*O*-methyltransferasy (zkráceně COMT) nebo pomocí enzymu monoaminoxidasy (zkráceně MAO) nebo oběma zároveň. [19, 23] Enzym monoaminoxidasa je hlavním enzymem zodpovídajícím za degradaci katecholaminů a jeho inhibicí lze docílit zvýšeného množství katecholaminů v nervových zakončeních nebo zvýšení dostupnosti pro receptory. Hlavní úlohou tohoto enzymu je oxidativní deaminace, kdy je odstupující amino skupina nahrazena skupinou aldehydickou. [17] V případě monoaminoxidasy byly popsány dvě isoformy a to MAO_A a MAO_B, přičemž právě MAO_A vykazuje poměrně silnou afinitu k serotoninu a noradrenalinu. Role monoaminoxidasy jako inaktivátoru katecholaminů byla zvažována již pravděpodobně v roce 1937 Blaschkem, Richterm a Schlossmanem, kdy tento fakt tyto výzkumníci prokázali na extraktu z jater zjednodušenou oxidací adrenalinu. Richter poté v roce 1940 prokázal, že orálně podávaný adrenalin byl vylučován močí jako konjugát ester sulfátu a následně si z toho vyvodil, že sulfátová konjugace představuje hlavní proces, kterým je adrenalin v těle inaktivován. Rolí MAO v metabolismu katecholaminů se dále začali zabývat Armstrong a McMillan, kteří zjistili, že hlavním konečným produktem metabolismu adrenalinu a noradrenalinu je kyselina

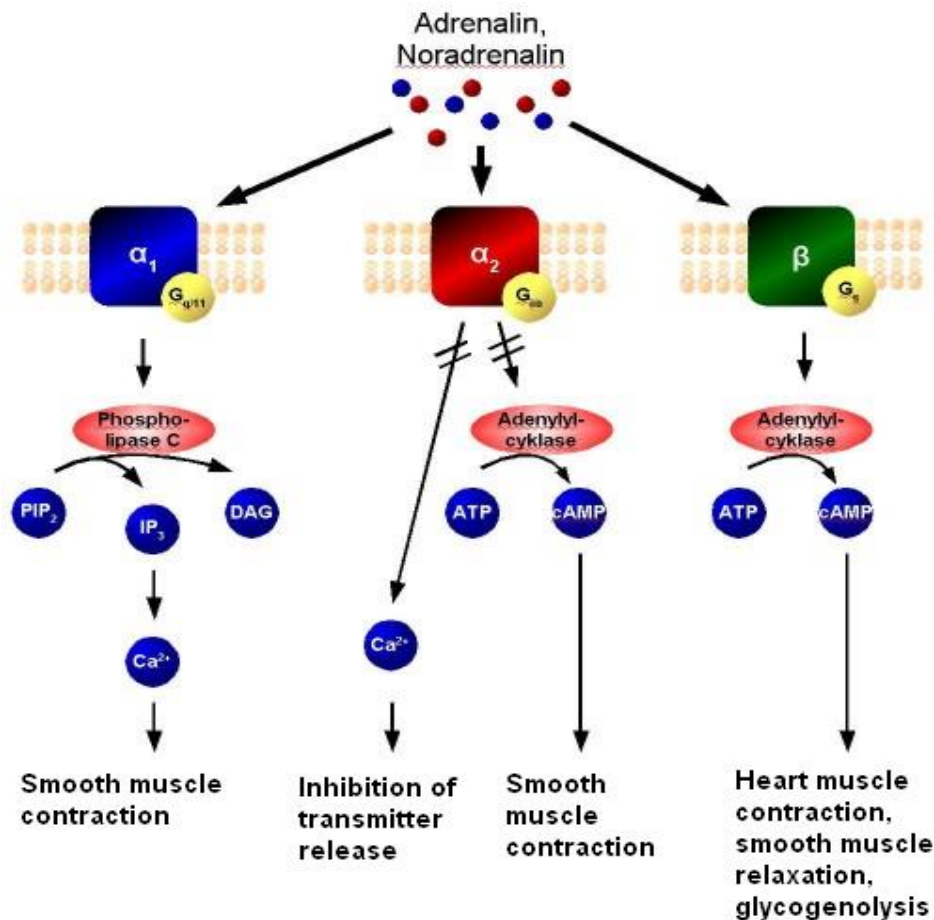
vanilmandlová. Toto tvrzení bylo podepřeno i skutečností, že se zvýšené množství této kyseliny nacházelo v moči pacientů s diagnózou feochromocytomu, onemocnění, které bude podrobně probráno později. [12, 24] Druhým zmíněným enzymem je katechol-*O*-methyltransferasa, jež se vyskytuje v synaptické štěrbině a je zodpovědná za metylaci katecholaminů. Donorem methylové skupiny je v tomto případě S-adenosylmethionin. [12] Katechol-*O*-methyltransferasa existuje ve formě dvou izoenzymů. Jedna forma má extra 50 aminokyselin na N-terminálním konci proteinu a je vázaná na membrány. Druhá forma postrádá membránový ukotvující ocas a je v cytoplasmě ve volné formě. Membránově vázaná katechol-*O*-methyltransferasa má mnohem větší afinitu ke katecholaminům a zdá se, že tento izoenzym je více zodpovědný za jejich *O*-methylaci. Důležitost *O*-methylace pro metabolismus cirkulujících katecholaminů byla poprvé rozpoznána, když Axelrod, La Brosse a kol. našli značnou produkci metanefrinu z intravenózní infuze radioaktivně značeného adrenalinu. Toto zjištění kontrastovalo s pozdějšími objevy, že noradrenalin vylučovaný sympatickými nervy byl především deaminován. [24]

Degradace katecholaminů může nastat dvěma možnými cestami a to právě pomocí již zmíněné monoaminoxidasy (tzv. proces oxidativní deaminace) a katechol-*O*-methyltransferasy (tzv. proces *O*-methylace). Degradací katecholaminů procesem oxidativní deaminace dochází ke vzniku 3,4-dihydroxyfenylglykolu z noradrenalinu. Takto vzniklý 3,4-dihydroxyfenylglykol je dále *O*-methylován pomocí katechol-*O*-methyltransferasy na 3-methoxy-4-hydroxyfenylglykol. Alternativní metabolickou cestou je konverze katecholaminů na metanefriny uvnitř dřeně nadledvin. K tomuto procesu dochází díky přítomnosti katechol-*O*-methyltransferasy v chromafinních buňkách dřeně nadledvin. Přes 90% cirkulujícího metanefrinu a zhruba 40% normetanefrinu vzniká uvnitř dřeně nadledvin z katecholaminů uvolňovaných do cytoplazmy z vezikulárních úložných buněk. Méně než 10% cirkulujícího metanefrinu vzniká z metabolismu adrenalinu po jeho vyplavení do oběhu. [4] Nadledvinky ale rovněž reprezentují samostatný největší zdroj cirkulujícího normetanefrinu, čítajícího 23 – 40% z celkového plazmatického objevu tohoto metabolitu. [24] Konečnými produkty tohoto metabolismu jsou kyselina vanilmandlová (metabolický produkt adrenalinu a noradrenalinu) a kyselina homovanilová (metabolický produkt adrenalinu). [16, 25]. Tato kyselina se tvoří především v játrech oxidací MHPG za katalýzy alkohol dehydrogenasou a je vylučována močí. [4, 26] Protože kyselina vanilmandlová je kyselý metabolit, je za její samozřejmou dráhu tvorby považována methylace kyseliny 3,4-dihydroxymandlové, deaminovaného kyselého metabolitu adrenalinu a noradrenalinu. Tato metabolická cesta byla podpořena i dalším výzkumem

kyseliny 3,4-dihydroxymandlové, který vedl Axelroda k objevu již zmíněné katechol-*O*-methyltransferasy, enzymu zodpovědného za *O*-methylační krok. [24] *O*-methylačí pomocí katechol-*O*-methyltransferasy vznikají metabolické produkty, takzvané volné metanefriny, konkrétně metanefrin z adrenalinu, normatenefrin z noradrenalinu a 3-methoxytyramin z dopaminu. [16, 27, 23]. Všechny katecholaminy a jejich metabolity včetně volných metanefrinů jsou následně metabolizovány enzymem monoaminoxidasou na kyselinu vanilmandlovou nebo sulfotrasferasou na konjugované metanefriny, přičemž zhruba 97% močových metanefrinů bývá konjugováno se sulfátem nebo glukuronidem a k této konjugaci dochází zpravidla v gastrointestinálním traktu. [16] Je důležité uvědomit si, že močové metanefriny jsou odlišnými metabolity než volné plazmatické metanefriny. Volné plazmatické metanefriny totiž vznikají pomocí katechol-*O*-methyltransferasy v dřeni nadledvin a tyto jsou konjugovány především na sulfát-konjugované metanefriny, které mají podstatně delší poločas života než volné metanefriny. Tyto konjugované metanefriny představují hlavní produkt, který je eliminován močí a tudíž stanovení močových metanefrinů odráží hlavně sulfát-konjugované metanefriny. [4] Rovněž je důležité, že většina z metabolismu katecholaminů probíhá v buňkách, kde jsou katecholaminy syntetizovány. Toto indukuje sympatické nervy, buňky dřene nadledvin a buňky nádoru feochromocytomu. [24]

3.2. Fyziologické účinky katecholaminů

Fyziologické účinky adrenalinu a noradrenalinu jsou iniciovány jejich vazbou na adrenergní receptory (obr.2), jejichž existenci poprvé v roce 1948 postuloval Alquist. Tyto receptory se nachází na povrchu cílových buněk a jsou typickými příklady seven-pass transmembránových proteinů, které jsou spojeny s G-proteiny. Po navázání katecholaminů na tyto G-proteinové receptory dojde k iniciaci cAMP signální dráhy, která okamžitě aktivuje buněčné odpovědi. Rychlost, s jakou jsou tyto odpovědi aktivovány, poskytuje vysvětlení pro řadu účinků katecholaminů. V této skupině se nachází 2 hlavní třídy adrenergních receptorů a to α -adrenergní receptory, zahrnující podskupiny α_1 a α_2 receptorů pro adrenalin a noradrenalin a β -adrenergní receptory zahrnující podskupiny β_1 a β_2 receptorů pro adrenalin. [19, 28, 29] Tyto adrenergní receptory strukturně a funkčně náleží do skupiny metabotropních receptorů, kde každý receptor má svůj farmakologický profil, své efekторы a lokalizaci v mozku. Všechny β -receptory jsou spřaženy s G_s proteiny a většina α -receptorů je spřažena s G_q proteiny s tím, že α_2 receptory jsou spřažené ještě s G_i proteiny, které fungují jako autoreceptory katecholaminergních synapsí. Celková fyziologie těchto receptorů do značné míry závisí na tom, jaký receptor je aktivován a na tom, kde se nachází. [12]



Obr.č.2: Adrenergní receptory a jejich fyziologické účinky, převzato [30]

Již v roce 1901 si anglický fyziolog J.N. Langley všimnul, že injekce extraktu z dřeně nadledvin vpravená do těla zvířete stimulovala sympatické nervy, tedy nervy autonomního systému, který zvyšoval srdeční puls, krevní tlak a způsoboval kontrakci hladkého svalstva. Tři roky před ním John J. Abel z John Hopkinsovy univerzity isoloval hormon adrenalin z dřeně nadledvin, což zapůsobilo jako výzva pro Langleyho studenta T.R. Elliotta z University of Cambridge, aby experimentálně vpravil injekci adrenalinu do těla zvířete. Elliott upozoroval, že surový extrakt tohoto hormonu vyvolal v těle zvířete odpověď podobnou elektrické stimulaci sympatických nervů, což jej vedlo k myšlence, že adrenalin může být vylučován ze sympatických nervů a může tak vyvolávat odpovědi svalových buněk k tvorbě stahů. Elliott tedy jako první formuloval koncept neurální komunikace myšlenkou chemických neurotransmiterů. (neurotransmitters) Katecholaminy a jejich metabolity, metanefriny, se skutečně mezi takovéto neurotransmitery řadí a mají řadu fyziologických účinků, které již tehdy zpozorovali Elliott a Langley. Obecně platí, že cirkulující adrenalin a noradrenalin uvolněný z dřeně nadledvin má

ty samé účinky na cílové orgány jako přímá stimulace sympatickými nervy, ačkoliv jejich účinek je trvalejší. [19] Skupina těchto látek rovněž disponuje schopností regulovat řadu funkcí, jako jsou aktivita, emoce, učení nebo stresová odpověď a rovněž hrají významnou roli v kontrole metabolismu sacharidů a tuků či regulaci kardiovaskulárního systému, srážení krve a regulaci akutní adaptivní reakce těla. [13, 31] Noradrenalin v centrální nervové soustavě zprostředkovává funkce, které ovlivňují zejména proces pozornosti, spánku, nálady a kognitivní procesy. [12] Dopamin rovněž zasahuje svou regulací do řady oblastí, například do mesolimbické, kde ovlivňuje náladu nebo dokáže způsobit dysfunkce spojené s duševními poruchami. Dále zasahuje do oblasti mesokortikální, kde ovlivňuje schopnost udržet pozornost, dělat rozhodnutí a jeho výkyvy v této oblasti mají za následek dysfunkce spojené s mentálními poruchami. V neposlední řadě také zasahuje do oblasti nigrostriatální, kde vyvolává pohybové iniciace a naopak jeho nerovnováha dokáže způsobit dysfunkce spojené s Parkinsonovým onemocněním. [32] Následující kapitola bude ale věnována onemocnění, na jehož projevech mají katecholaminy a jejich metabolity metanefriny zásadní podíl a to nádorovému onemocnění feochromocytomu.

3.3. Patobiochemie katecholaminů

V roce 1930 se u amerického prezidenta Dwighta D. Eisenhowera objevila hypertenze. Do roku 1955 utrpěl celkem 8 krát infarkt myokardu a dokonce 14 krát srdeční zástavu. Zemřel na ischemickou kardiomyopatii a pitvou byl u něj zcela nečekaně objeven 1,5cm velký feochromocytom, který se nacházel v levé dřeni nadledvin. [33] V této době už bylo toto onemocnění známé, neboť první případ byl popsán již v roce 1886 Felixem Fränkelem. Termín feochromocytom byl definován ale až v roce 1912 patologem Ludwigem Pickem. Poprvé tento typ nádoru odstranili v roce 1926 Švýcar César Roux a Američan Charles Horacio Mayo. Pojem feochromocytom je odvozen z řeckého phaios (tmavý), chroma (barva), kytos (buňka) a oma (nádor). [34] Jedná se o vzácný typ nádoru definovaný metabolizací, skladováním, ale ne vždy sekrecí katecholaminů dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu. [35] Vychází především z chromafinních buněk dřene nadledvin. [5] Zhruba v 10% případech je tento nádor produkován paragangliem a v tom případě se jedná o paragangliom. [24] Samotná WHO klasifikovala v roce 2004 feochromocytom jako nádor vznikající z katecholamin produkujících chromafinních buněk v dřeni nadledvin – tzv. intraadrenální paraganglioma. [6] S tím úzce souvisí nádory extraadrenálního sympatického a parasympatického paraganglia, které jsou klasifikovány jako extraadrenální paragangliomy. Ačkoliv je libovolná, poskytuje tato nomenklatura zdůraznění správné vazby nádorů v různých místech. Na rozdíl od nadledvin a extraadrenálních

sympatických paragangliomů, ty od parasympatiku tkáně (hlavně v oblasti pánve, břicha, krku a hrudníku) produkují podstatně nižší množství katecholaminů. A přestože tyto nádory vychází ze stejné tkáně, jejich genetický základ, klinická manifestace a prognóza se liší [6, 35] Celkově se jedná se o nádory vzácné, s incidencí 1 na 100 000 osob za rok nebo méně. [7] Tyto nádory mohou být sporadické nebo mohou být součástí nějakého genetického onemocnění. Dříve se odhadovalo, že familiární forma feochromocytomu se vyskytuje jen velmi zřídka a to maximálně v 10 % případů. Prevalence se ukázala být mnohem vyšší. Nedávná studie prováděná zejména ve střední Evropě ukázala, že se jedná až o 24%. [36] V současné době je se vznikem tohoto nádoru spojeno asi 10 genů s tím, že se předpokládá, že se nejedná o konečné číslo. Mezi geny zodpovědné za vznik feochromocytomu patří SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, RET, NF1, VHL, MAX a THEM 127. Ze strany genetické predispozice se jedná nejčastěji o familiární paragangliomatózu, jež je spojená s geny SDHB na chromozomu 1p36.1-35p, SDHD na chromozomu 11q23 a SDHAF₂, mnohočetnou endokrinní neoplasií typu II, jež je spojená s genem RET2 na chromozomu 10q11.2, neurofibromatosu typu I spojenou s genem NF1 na chromozomu 17q11.2 a asociovaného s von Recklinghausenovou chorobou nebo von Hippel-Lindau syndrom spojený s genem VHL na chromozomu 3p25-26. [5, 6, 35, 36] Familiární případy jsou v diagnostikovány včasněji a jsou častější bilaterální, opakující se a objevující se v mladším věku než sporadické případy. [35] Zhruba 10% těchto nádorů je maligních. Malignita může být diagnostikována přítomností lymfatických uzlin, útrobních nebo kostních (až 70%) metastáz. Prognóza je u těchto pacientů velice variabilní, v některých případech mohou přežít i 20 let a více a jde zejména o pacienty s izolovanými kostními metastázemi. Metastatická ložiska byla nalezena rovněž v játrech nebo plicích. Patologické vyšetření může rozlišit, zda se jedná o primární nebo metastatický feochromocytom, paragangliom nebo neendokrinní nádor a zda se jedná o sporadické nebo hereditární onemocnění. [6, 35] Recidiva a malignita jsou více časté v případě velkých nebo extraadrenálních nádorů. Pacienti s familiálními nebo extraadrenálními nádory by měli být sledováni na neurčito.

Syndrom von Hippel-Lindau se dělí na tři základní typy (1, 2, 3), přičemž se všechny klinickými projevy od sebe liší. Feochromocytom ale bývá přítomen pouze u von Hippel-Lindau syndromu 2. VHL syndrom 2 se ještě dělí na typ 2A, který zahrnuje hemangioblastomy CNS, endolymfatické tumory, feochromocytomy a epididymální cystadenomy a VHL 2B, kde se kromě feochromocytomu řadí ještě karcinom ledvin, nádory pankreatu, cysty ledvin, endolymfatické tumory nebo epididymální cystadenomy a VHL 2C, který se projevuje pouze

přítomností feochromocytomu. [36] Pacienti s von Hippel-Lindau syndromem nebo familiálním paragangliomem mohou mít uni nebo bilaterální feochromocytom nebo feochromocytom plus sekretující nebo nesekretující paragangliom. Von Hippel-Lindau tumor supresorové proteiny (pVHL) za normálních podmínek v komplexu s proteiny elonginem B, C a cullinem 2 váží alfa podjednotku proteinu HIF a zprostředkovávají její ubiquitinem zprostředkovanou degradaci. Dojde – li ale k hypoxickému stavu, protein HIF z tohoto komplexu unikne a po heterodimerizaci s podjednotkou beta aktivuje řadu mitogenních, angiogenních a růstových faktorů, například VEGF, PDGF, TGF- α nebo erythropoetin. [37]

Mnohočetná endokrinní neoplasie typu 2 (MEN-2) se dělí na dvě formy (A a B). Forma A se projevuje u feochromocytomu a rovněž u medulárního karcinomu štítné žlázy nebo familiárního medulárního karcinomu štítné žlázy. Typ B kromě feochromocytomu zahrnuje rovněž mnohočetné neuromy nebo Marfanoidní rysy. [36] Syndrom mnohočetné endokrinní neoplasie typu 2 (MEN-2) je podmíněn mutací v RET genu. Normální regulace RET proteinu, tyrosinkinasového receptoru, je esenciální pro vývoj sympatických neuronů. Konstitutivní aktivace RET pomocí germ linie (v MEN-2) nebo somatické mutace aktivuje různé signální dráhy zapojené do vývoje lidských neuroendokrinních nádorů zahrnujících i feochromocytom. Ten se projevuje přibližně u 50 % pacientů s MEN-2. [7, 35, 37]

SDH mutace dělíme do pěti tříd a to SDHA, SDHB, SDHC, SDHD a SDHAF₂. SDHA mutace se projevuje především u neurodegenerativních onemocnění a pouze u 3 % případů feochromocytomu. Mutace SDHD zpravidla úzce souvisí s paragangliomy hlavy a krku a ve většině případů bývají benigní. Naproti tomu SDHB mutace jsou spojeny především s vysokým počtem maligních onemocnění (až 80 % případů), jež jsou v současnosti standardními postupy jen obtížně léčitelná. Z tohoto důvodu je důležité provádět genetické vyšetření jak u pacienta, u něhož byla mutace prokázána, tak u celé rodiny a je zcela nezbytné nabídnout jim celoživotní nebo dlouhodobé sledování, aby mohla být případně včas zahájena léčba. Kromě feochromocytomu se u pacientů s SDHB mutací může manifestovat Carney-Stratakisův syndrom, různé renální karcinomy, neuroblastom, nebo papilární karcinom štítnice. Mutace v šesti genech kódujících sukcinátdehydrogenasovou podjednotku C (SDHC) byly popsány pouze u parasympatických paragangliomů a solitárních krčních paragangliomů a většinou měly benigní charakter. Testování mutací je rutinně dostupné pro čtyři z výše uvedených genů a to RET, VHL, SDHB a SDHD. [6, 35, 36, 37] Funkční studie dysfunkce sukcinát dehydrogenasy (SDH) nebo mitochondriálního komplexu II ve familiálním paragangliomu ukázala spojení mezi karcinogenezí a změnou v podjednotkách B a D. V hereditárních případech s SDHB a

SDHD mutací projevuje nádor ztrátu alely zbývajícího divokého typu s kompletní inhibicí aktivity komplexu II elektronového přenosu vedoucího k aktivaci proangiogenních a hypoxie – inducible transkripčních faktorů. [38]

Celková hereditární predispozice pro feochromocytom je odhadována zhruba na 20 – 30%. Detailní medicínální a rodinná historie může být obzvláště důležitá při zobrazování základních hereditárních podmínek. S absencí jakékoliv rodinné historie feochromocytomu nebo paragangliomu, popis náhlé smrti neúplně vysvětlující kardiovaskulární příhody u rodinných příslušníků, může zvyšovat domněnku, že je tato rodina zatížena hereditárním onemocněním, zejména protože v současnosti se považuje za fakt, že nejméně 50% katecholamin produkujících nádorů zůstává nediodagnostikovaných i po smrti. Klinické manifestace u pacientů nebo jiných rodinných příslušníků mohou rovněž signalizovat zejména genetický základ onemocnění. Zjištění, že nejméně 36% feochromocytomů nebo paragangliomů u dětí je způsobeno germ-line mutací, má důležitý potenciál pro genetické testování u pediatrických pacientů s těmito nádory. [6, 39] Algoritmus pro zjišťování hereditárního zatížení feochromocytomem shrnuje schéma č. 1.

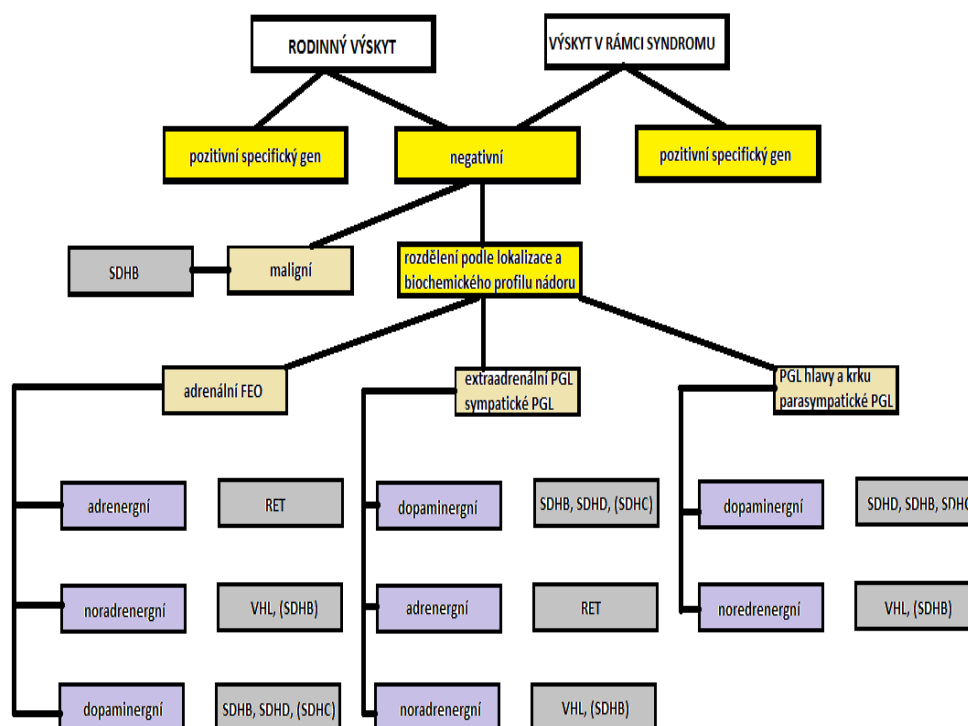


Schéma č. 1.: Algoritmus pro genetická vyšetření u pacientů s paragangliomem nebo feochromocytomem [35]

Feochromocytom a paragangliom jsou definovány syntézou a/nebo sekrecí katecholaminů dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu. Katecholaminy jsou částečně nebo plně převedeny uvnitř nádoru enzymem katechol-*O*-methyl transferasou na inaktivní metabolity metanefrin a normetanefrin. Vyplavování aktivních katecholaminů do cirkulace může být kontinuální nebo paroxysmální. Přítomnost katecholamin produkujících nádorů může být diagnostikována rovněž na základě vysokých koncentrací metanefrinu a normetanefrinu v plazmě a moči. [6, 36] Stanovení metanefrinů je v tomto případě upřednostňováno před stanovením katecholaminů z důvodu vyšší diagnostické senzitivity, neboť jak již bylo uvedeno, katecholaminy bývají z feochromocytomu vylučovány paroxysmálně, zatímco metanefriny feochromocytom vylučuje kontinuálně. [35, 40]

Katecholaminy adrenalin a noradrenalin jsou vylučovány z dřeně nadledvin při feochromocytomu poměrně často a v poměrně velkém množství a mají řadu účinků na chování, metabolismus a kardiovaskulární systém. Toto je běžně nazýváno FIGHT OR FLIGHT odpověď. [29] Jedná se o poplachovou reakci organismu, která vzniká v důsledku výrazného stresu a je zaměřená na zvládnutí nebezpečných situací obrany, útěku, tedy tzv. fight or flight neboli česky bojuj nebo uteč. Tato reakce je ovládána podkorovými centry hypothalamu a je zprostředkována především sympatoadrenálním systémem a glukokortikoidy. Následkem této reakce dochází ke zvýšenému prokrvení svalstva, přičemž prokrvení trávicího traktu současně klesá. Zároveň dochází ke zrychlení srdeční a dechové frekvence. [41]

Mezi nejčastější symptomy onemocnění feochromocytomu patří bolesti hlavy, palpitace, nadměrné pocení, střídání hypertenze s hypotenzí, kontinuální hypertenze, paroxysmální hypertenze, ortostatická hypotenze, únava, hyperglykemie (zaznamenáno u 40 % pacientů), nauzea, váhový úbytek, nervozita, transpirace, blednutí, úzkost až panika a strach, arytmie, červenání, zrakové problémy a diabetes, což odráží účinky adrenalinu a noradrenalinu na β -adrenergní receptory. Četnost těchto symptomů shrnuje tabulka č. 1. Symptomy jsou různé a často jsou paroxysmální vzhledem k proměnlivému a neuspořádanému vyplavování katecholaminů v nádoru. [7, 16, 33, 42, 43, 44, 45, 46] Asi polovina pacientů ale může mít jen paroxysmální hypertenzi, někteří jsou dokonce normotenzní. Normotenze se zpravidla vyskytuje u asymptomatických pacientů a bývá zdůvodňována desenzitizací adrenergních receptorů v důsledku dlouhodobě zvýšených hladin katecholaminů v cirkulaci. Zajímavostí je, že pacienti s normotenzí vykazují rovněž vymizení poklesu krevního tlaku v nočních hodinách. [36] Kontinuální hypertenze ale bývá častější než paroxysmální. Jedinci s kontinuální hypertenzí mají ale ještě navíc epizody výrazně zvýšeného krevního tlaku. Ty mohou být

vyvolány některými podněty, jako jsou fyzická námaha, kouření, močení, defekace, anestezie či tlakové podněty na abdominální oblast. Kromě aktivních feochromocytomů ještě existují tzv. němé feochromocytomy, které neprojevují klinickou manifestaci ani nejsou pozitivní při běžně používaných laboratorních vyšetřeních, poněvadž neprodukují katecholaminy v dostatečném množství, aby se jejich účinek jakkoliv projevil. [16, 36]

Tabulka č. 1.: nejčastější symptomy zaznamenané u pacientů

SYMPTOMY HLÁŠENÉ PACIENTY	ČETNOST (%)
bolesti hlavy	70%
Palpitace	50 - 70%
nadměrné pocení	60 - 70%
kontinuální hypertenze	50 - 60%
paroxysmální hypertenze	30%
orthostatická hypotenze	10 - 15%
Únava	25 - 40%
Hyperglykemie	40%
Nauzea	10 - 40%
váhový úbytek	20 - 40%
Nervozita	35 - 40%
Transpirace	65 - 75%
Blednutí	40 - 45%
úzkost, až panika a strach	20 - 40%
Tachykardie	50 - 70%
návaly horka	18%
zrakové problémy	3 - 21%
Horečka	až 66%

3.4. Diferenciální diagnostika feochromocytomu

Katecholamin sekretující nádory mimikují paroxysmální podmínky s hypertenzí nebo poruchami srdečního rytmu, především panické ataky, ve kterých sympatická aktivace související s úzkostí vyvolává projevy a symptomy feochromocytomu. Akutní kardiovaskulární případy, jako je infarkt myokardu, plicní edém a mrtvice, rovněž zvyšují hladiny plazmatických a močových metanefrinů na několik dní. Diagnostika feochromocytomu se tak v těchto případech provádí až za deset dní po takovéto události. [7, 47] Do diferenciální diagnostiky feochromocytomu lze rovněž zahrnout městnavou srdeční slabost, anxiózní neurózu, hypoglykémii, sepsi, šok, spánkovou apnoe či dumping syndrom. [16] Na falešně pozitivních

výsledcích mají ale zásadní podíl i léčiva, která nezřídka mohou zvyšovat hladiny. Mezi nejčastější léčiva způsobující zvýšení hladin katecholaminů a metanefrinů se řadí efedrin a pseudoefedrin, antihypertenziva, vasodilatancia, tricyklická antidepresiva, dopamin, ethanol, hydraziny, fenothiaziny, chlorpromazin, bromokriptin, klonidin, buspiron, blokátory kalciového kanálu, dexametazon, dopamin, diuretika, MAO inhibitory, nikotin, prochlorperazin, izoproterenol, reserpin, propafenon, teofylin, levodopa nebo methyldopa. Míru účinku léčiv na hladiny katecholaminů a metanefrinů shrnuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2: Látky způsobující možné zvýšení hladin katecholaminů a metanefrinů

Léky	Katecholaminy		Metanefriny	
	Noradrenalin	Adrenalin	Normetanefrin	Metanefrin
<i>Tricyklická antidepresiva</i>	+++	-	+++	-
<i>Neselektivní α-blokátory</i>	+++	-	+++	-
<i>Selektivní α-blokátory</i>	+	-	-	-
<i>β-blokátory</i>	+	+	+	+
<i>Blokátory kalciových kanálů</i>	+	+	-	-
<i>Vasodilatátory</i>	+	-	Není známo	Není známo
<i>MAO inhibitory</i>	-	-	+++	+++
<i>Sympatomimetika</i>	++	++	++	++
<i>Stimulancia</i>				
<i>kofein</i>	++	++	Není známo	Není známo
<i>teofylin</i>	++	++	Není známo	Není známo
<i>nikotin</i>	++	++	Není známo	Není známo
<i>Kokain</i>	++	++	Není známo	Není známo
<i>Antiparkinsonika</i>	++	-	Není známo	Není známo
<i>Paracetamol</i>			++	-

Na snížení hodnot se naopak podílí methylglukamin (v moči) a deficit nebo farmakologická inhibice monoaminoxidasy. Mezi nejčastější fyziologické příčiny významných zvýšení hladin patří odběr ve stoje nebo vsedě, který může zvýšit hodnoty oproti odběru vleže až trojnásobně, dále tělesná námaha, mentální stres, ztráta krve nebo hladovění, které může vést k hypoglykemii. [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]

3.5. Vyšetřovací metody feochromocytomu

3.5.1. Laboratorní diagnostika feochromocytomu

Pokud je zvažována diagnóza feochromocytom, je nutné nejprve provést biochemickou diagnostiku. [46, 54] Pro laboratorní diagnostiku feochromocytomu je nutné vyšetření s vysokou specifitou a senzitivitou, protože se jedná o vzácné onemocnění, jehož pozdní diagnostika nebo nediodagnostikování může vést k ohrožení na životě pacienta. [55] Pro diagnostiku feochromocytomu je důležitý průkaz nadprodukce katecholaminů. [46] Katecholaminy jsou ale nádorovými buňkami vylučovány v menších množstvích a často paroxysmálně. Naopak jejich O-methylované metabolity metanefriny jsou nádorovými buňkami vylučovány kontinuálně a zcela nezávisle na katecholaminech. Stanovení volných plazmatických metanefrinů a močových metanefrinů, zejména metanefrinu a normetanefrinu má tedy vyšší diagnostickou senzitivitu než stanovení samotných plazmatických nebo močových katecholaminů. Diagnostická senzitivita se v tomto případě blíží k 100 % a to i v případech tzv. němých feochromocytomů a hereditárních forem feochromocytomů, kde často docházelo ke vzniku falešně negativních výsledků. Typickým příkladem nízké senzitivity je například stanovení kyseliny vanilmandlové, finálního metabolitu katecholaminů a metanefrinů nebo katecholaminů v moči. (tab. č. 3.) [16, 46, 36, 55]

Tab.č.3: Diagnostická senzitivita a specifita jednotlivých biochemických vyšetření pro diagnózu feochromocytomu a paragangliomu

<i>Parametr</i>	<i>Senzitivita (%)</i>	<i>Specifita (%)</i>
<i>Plazmatické katecholaminy</i>	84	81
<i>Plazmatické metanefriny</i>	99	89
<i>Metanefriny v moči</i>	97	69
<i>Katecholaminy v moči</i>	86	88
<i>Celkové močové metanefriny</i>	77	93
<i>Kyselina vanilmandlová</i>	64	95

Plazmatické metanefriny jsou stanovovány ve své volné podobě, zatímco močové metanefriny jsou stanovovány až po hydrolýze konjugátů. Někteří autoři [56] doporučují provádět pro komplexní diagnostiku feochromocytomu stanovení jak plazmatických katecholaminů (adrenalinu, noradrenalinu), tak současně stanovení močových metanefrinů (metanefrinu, normetanefrinu) s tím, že součet výsledných koncentrací adrenalinu a noradrenalinu by měl

přesahovat hladinu 2 000 pg/ml a součet hladin močových metanferinů by měl přesahovat hladinu 1,8 mg/24h. Diagnostická senzitivita u tohoto stanovení dosahovala 98% u familiárních i sporadických feochromocytomů, jak dokládá článek 4054-15.

Biochemické stanovení plazmatických katecholaminů, katecholaminů v moči, volných plazmatických metanefrinů a metanefrinů v moči vyžaduje disciplínu jak ze strany pacientů, tak ze strany zdravotnického personálu. Před samotným odběrem je nutné dodržet dietní pokyny výše zmíněné, aby nedocházelo k falešnému zvyšování hladin katecholaminů nebo metanefrinů. V případě odběru plazmatických katecholaminů nebo metanefrinů dochází k odběru z pažní žíly a pro získání relevantních výsledků je třeba dodržovat určité podmínky pro přípravu pacienta před samotným odběrem. Z léčiv je potřeba vysadit adrenalin a látky jemu podobné minimálně týden před odběrem, dále minimálně 48 hodin před odběrem neužívat paracetamol, nekonzumovat kávu, čokoládu, čaj, nekouřit a minimálně 8-10 hodin před odběrem lačnit. Podrobnou přípravu na samotný odběr je rovněž nutné konzultovat se svým ošetřujícím lékařem. [57] Samotné vyšetření by mělo probíhat podle předpisů bezprostředně ráno po probuzení, nejlépe vleže (odběr vsedě nebo ve stoje by mohl způsobit falešnou pozitivitu), zavedením kanyly do žíly. Poté následuje zhruba 15-ti až 30-ti minutové zklidnění (po zavedení kanyly prudce vzroste hladina adrenalinu a noradrenalinu, tudíž by to opět mohlo vést k falešné pozitivě). K odběru postačí citrátová plazma. Odběr se provádí na ledu a ihned poté musí být neprodleně dopraven do laboratoře k následnému zpracování. Stabilita vzorku je značně závislá na teplotě. Při teplotě 2-8°C je vzorek stabilní zhruba šest hodin, při delší prodlevě před zpracováním je potřeba jej zamrazit na teplotu -20°C. Při tomto typu odběru může být někdy doporučována hospitalizace. [58] Odběr na močové katecholaminy a metanefriny vyžaduje rovněž disciplínu. K tomuto vyšetření je vyžadován 24 hodinový sběr moči do sběrné nádoby. Do ní je nutné nalít před zahájením sběru 20 ml 25 % kyseliny chlorovodíkové určené ke konzervaci vzorku. Moč je celou dobu nutné uchovávat v lednici a nejlépe na tmavším místě. Sběr moči je zahájen prvním vymočením mimo sběrnou nádobu. Od té doby začíná 24 hodinový sběr již do sběrné nádoby. Sběr je zakončen důkladným promícháním moče nasbírané ve sběrné nádobě a následným přelitím vzorku do lahvičky určené pro analýzu. Do laboratoře se dodávají zpravidla dva vzorky moče o objemech 2x20 ml. I u tohoto typu vyšetření je nutné dodržovat dietní režim. Zhruba 2-3 dny před samotným odběrem je třeba úplně omezit konzumaci kávy, černého čaje, bylinkového čaje, čokolády, banánů, pomeranče, sýrů, ovocných nápojů, Coca-Coly, Kofoly, ořechů či potravin s obsahem vanilky. Po stejnou dobu je současně po domluvě s ošetřujícím lékařem doporučeno vysadit

antiparkinsonika, antihypertenziva, alfa blokátory (např. imipramin, amitriptylin, nortryptylin, amoxapin), MAO inhibitory, antihistaminika, betalytika, antipsychotika (např. clonazepin, chlorpromazin), sulfonamidy, salicyláty, vasodilatancia (např. hydralaziny, nitráty), diuretika (např. furosemid, HCHT), jodové preparáty nebo přípravky s obsahem chininu. Rovněž není doporučena větší fyzická zátěž, která by se mohla podílet na vzniku falešně pozitivních výsledků. [57, 58, 59]

I přes disciplínu při odběru může ale dojít ke vzniku falešně pozitivních výsledků, na jejichž vzniku může mít podíl například městnavá srdeční slabost, hypertenze, šok, sepse, renovaskulární hypertenze nebo panická porucha, jak již bylo zmíněno výše. V tomto případě je doporučeno provést tzv. clonidinový supresní test, určený ke confirmaci nebo vyloučení diagnózy feochromocytomu. Tento test umožňuje odlišit zvýšené uvolňování katecholaminů v důsledku zvýšené aktivity sympatiku od nadprodukce a zvýšené sekrece katecholaminů tkáň feochromocytomu. Clonidin je centrálně působící α -2 mimetikum, používané jako antihypertenzivum. Působí na centrální nervovou soustavu, kde stimuluje receptory v neuronech, které regulují hladiny katecholaminů. Jejich stimulace tedy vede k celkovému snížení tonu sympatiku. [36, 41] Je vhodný zejména pro osoby se zvýšenou hladinou noradrenalinu. Při clonidinovém testu je podávána dávka 4,3 μ g/kg. Po dvou až třech hodinách by mělo dojít ke snížení hladin katecholaminů a metanefrinů. Pokud k tomuto snížení nedojde, je diagnóza feochromocytomu vysoce pravděpodobná. V případě, že dojde k významnému poklesu hladin, je velmi pravděpodobné, že původ zvýšených hodnot byl v sympatických nervech. Clonidinový test se používá ale pouze v případě, že hladina plazmatického noradrenalinu přesáhla hodnotu 750 ng/l. [58] Kromě clonidinového supresorového testu se používá ještě glukagonový test. Jedná se o provokační test u feochromocytomu, který nevykazuje charakteristické vysoké hladiny plazmatických katecholaminů. Test se provádí intravenózním podáním glukagonu, přičemž následně dochází k trojnásobnému vzestupu hladin plazmatických katecholaminů a současně dochází k vzestupu krevního tlaku. V tomto případě je test pozitivní. Vzhledem k tomu, že se ale jedná o test rizikový, je jeho použití velmi omezené, v dnešní době již velice ojedinělé. [60]

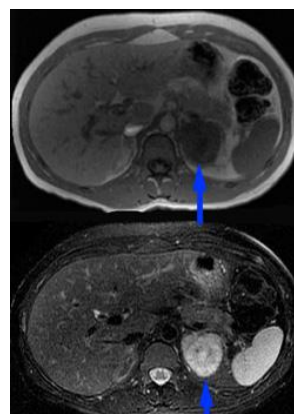
3.5.2. Zobrazovací metody v diagnostice feochromocytomu

V případě pozitivního laboratorního výsledku se následně přistupuje k provedení morfologických vyšetření, která slouží k přesné lokalizaci tumoru, přičemž nejčastěji se provádí vyšetření břicha a pánve pomocí CT (obr. č. 3), dále se přistupuje k vyšetření pomocí

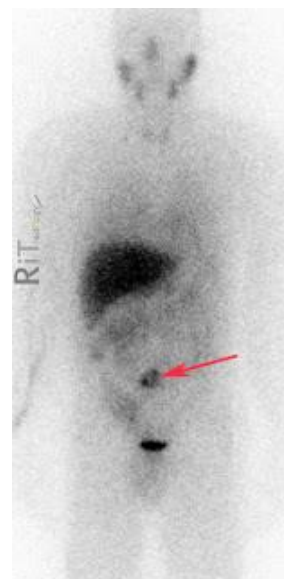
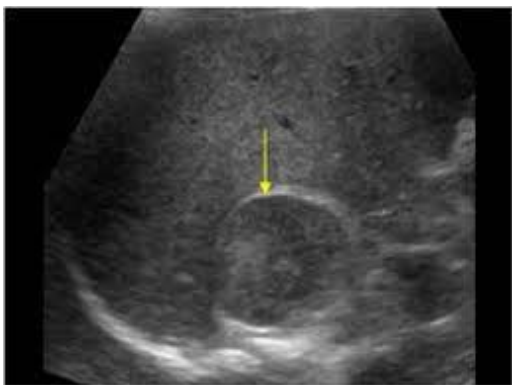
magnetické rezonance (obr. č. 4). [46, 61] Pro oblast dřeně nadledvin jsou tyto zobrazovací metody vhodné, magnetická rezonance se používá zejména u pacientů alergických na jodovou kontrastní látku, dětí nebo u těhotných pacientek, rovněž je vhodná pro lokalizaci paragangliomu nebo extraadrenálního feochromocytomu. [46] V úvahu taktéž připadá sonografie břicha (obr. č. 5), nevýhodou tohoto vyšetření je ale nesnadná lokalizace drobných tumorů a subjektivní přístup vyšetřujícího. V případě, že se tumor nepodaří lokalizovat v oblasti pánve a břicha, přistupuje se k zúžení oblasti pátrání na hrudník, krk a hlavu, kde se jako nejvhodnější vyšetření jeví opět magnetická rezonance. V okamžiku objevení zdroje nadprodukce katecholaminů se dále přistupuje k otázce, zda je nutná okamžitá indikace operačního zákroku nebo zda je vhodné provést doplňující vyšetření, které potvrdí nebo vyvrátí maligní charakter tumoru, přičemž větší riziko malignity představují nádory s velikostí přesahující 5cm s extraadrenální lokalizací a naopak menší nádory s převahující nadprodukcí noradrenalinu se jeví jako méně rizikové. Mezi další doplňující metody se řadí funkční vyšetření. Ta jsou vhodná v případě, že není 100 % jistota, že se jedná o feochromocytom (může se jednat například o nefunkční adenom nadledviny) nebo v okamžiku, kdy se nedaří úspěšně nalézt zdroj nadprodukce katecholaminů pomocí CT nebo magnetické rezonance. Nejčastější funkční zobrazovací metodou je vyšetření pomocí značeného ^{123}I *m*-jodbenzylguanidinu (MIBG) (obr. č. 6). Diagnostická senzitivita tohoto vyšetření pro oblast nadledvin dosahuje zhruba 95%, u maligních nádorů a paragangliomů ale klesá z důvodu menší diference buněk. V tomto případě je vhodné provést vyšetření pomocí značeného oktrotidu nebo pozitronovou emisní tomografií s použitím [^{18}F]-fluorodeoxyglukosy (obr. č. 7) v případě, že bylo MIBG vyšetření negativní. [62, 63, 64, 65, 66]



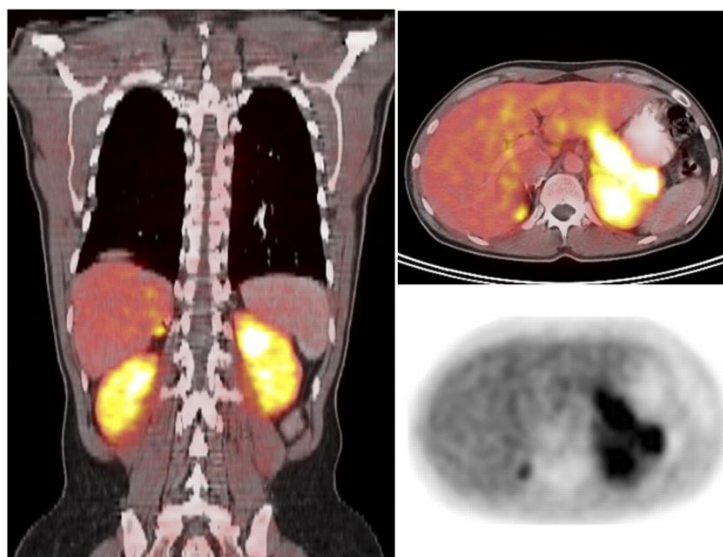
Obr. č. 3.: CT snímek feochromocytomu



Obr. č. 4.: MRI snímek feochromocytomu



Obr. č. 5.: sonografický snímek feochromocytomu Obr. č. 6.: MIBG funkční zobrazení



Obr. č. 7.: PET snímek s použitím $[^{18}\text{F}]$ -fluorodeoxyglukosy

V okamžiku správné lokalizace tumoru a potvrzení nebo vyvrácení malignity se přistupuje k dalšímu kroku a tím je léčba. V podstatě jediným možným léčebným řešením u pacienta s feochromocytomem je resekce tumoru (obr. č. 8) [61, 63]. Stejně jako v případě laboratorního vyšetření i zde je nanejvýš nutná předoperační disciplína. Zhruba 10-14 dní před operací by měla být podávána léčiva z řady alfablokátorů (např. prazosin, tetrazosin, doxazosin) s tím, že dávky těchto alfablokátorů jsou postupně zvyšovány, aby se co nejvíce zabránilo účinkům cirkulujících katecholaminů, které jsou vyplavovány během resekce tumoru. [38, 61] Dále je možné přidat betablokátory, ovšem až po nástupu účinku alfablokátorů a to zejména v případě, dojde-li ke vzniku tachykardie v důsledku podání alfablokátorů. Samotná resekce tumoru se

v současné době provádí nejčastěji laparoskopicky. V průběhu operace může dojít ke vzniku některých komplikací, nejčastěji se jedná o hypertenzní špičky nebo arytmie, k nimž dochází v důsledku manipulace s nádorem, popřípadě může dojít k prudkému poklesu krevního tlaku v důsledku úspěšného podvazu žil nádoru. Mezi časté pooperační komplikace patří například hypoglykemie. Úspěšnou resekcí to ale pro pacienta ještě zdaleka nekončí. Po operaci musí být opakovaně provedena laboratorní vyšetření sledující pokles hladin katecholaminů a metanefrinů, dále je nutné pacienta kontrolovat z hlediska možné recidivy, která je obvyklá u hereditárních feochromocytomů, popřípadě z hlediska možného maligního zvratu, který není neobvyklý u pacientů zatížených SDHB mutací. Sledování pacientů je dlouhodobé, recidiva je možná i po dvaceti letech. [38]



Obr. č. 8.: Feochromocytom po resekcí

3.5.3. Přehled analytických metod stanovení plazmatických a močových metanefrinů

3.5.3.1. Zásady preanalytické fáze stanovení plazmatických a močových metanefrinů

Jak již bylo zmíněno, odběr vzorku na metanefriny, ať již močové nebo plazmatické, vyžaduje značnou disciplínu, stejně jako jeho následné skladování a zpracování. Stanovení metanefrinů je prováděno v plazmě nebo v moči. Pro zpracování volných plazmatických metanefrinů slouží jako primární vzorek nesrážlivá krev, která je odebírána do skleněné nebo plastové zkumavky s protisrážlivou úpravou, například heparinátem sodným nebo K₂EDTA a glutathionem jako antioxidantem (fialová vacuette zkumavka). Krev bývá odebírána v poloze vleže se zavedeným žilním katetrem a zkumavka je ihned umístěna na ledovou tříšť. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi labilní analyt, musí být plazma bezprostředně nejpozději do patnácti minut od odběru

oddělena a materiál musí být okamžitě zamražen. Stabilita plazmy při teplotě 20-25°C je maximálně 2-24 hodin, v lednici při teplotě 4°C se stabilita zvyšuje na dva dny a při teplotě -20°C dokáže vydržet stabilní zhruba 1 – 6 měsíců. Pro provedení vyšetření bývá zpravidla vyžadován 1 ml plazmy. Odběr na močové metanefriny bývá obvykle prováděn do skleněné nebo plastové nádoby. Sběr bývá prováděn po dobu 24 hodin, jak již bylo popsáno výše. Moč jako odběrový materiál na metanefriny je oproti plazmě stabilnější, při teplotě 4-8°C vydrží zhruba čtrnáct dní, stabilizovaná kyselinou chlorovodíkovou na pH 2-3 dokáže vydržet dlouhodobě. [48, 67, 68, 69]

3.5.3.2. Přehled metod stanovení plazmatických a močových metanefrinů

Metod pro stanovení metanefrinů je celá řada, za zmínku stojí především fotometrie, fluorimetrie, RIA, ELISA, GC, HPLC nebo LC-MS/MS. [8, 9, 70, 71]

3.5.3.2.1. Fotometrické metody stanovení metanefrinů

Stanovení metanefrinů fotometrickou metodou nerozlišuje mezi metanefrinem a normetanefrinem. Při této metodě se nejprve provádí kyselá hydrolyza, po které se nekonjugované metanefriny naadsorbují na katexovou pryskyřici. Následně se provede eluce roztokem amoniaku a oxidace na žlutý vanilin pomocí jodistanu. Žlutý vanilin se poté stanoví fotometricky při vlnové délce 360 nm. Nejčastějšími interferencemi, doprovázejícími tuto metodu jsou kontrastní barviva pro rentgen, léčiva jako propanolol nebo fenoxkyyseliny. Vzhledem k pracnosti a zdoluhavosti se ale tato metoda příliš nepoužívá. [48, 72] Z hlediska citlivosti je na tom fluorimetrie lépe než fotometrie. Tato metoda spočívá v chemické oxidaci a tautomerizaci metanefrinů na jejich trihydroxyindolové deriváty. Fluorimetricky se stanovují především metanefriny v moči. Ta je nejprve hydrolyzována a následně purifikována chromatografií na katexech. Purifikací se dosáhne oddělení metanefrinu od normetanefrinu na základě rozdílného pH. K excitaci dochází při vlnové délce 405 – 422nm, k emisi poté dochází při vlnové délce 510 – 531nm. Metoda je stejně jako fotometrie pracná a tedy velmi málo využívaná. [73]

3.5.3.2.2. Imunochemické metody stanovení metanefrinů

Naopak mezi velmi frekventované metody ke stanovení metanefrinů se řadí imunochemické metody, zvláště pak RIA a ELISA.

Pro RIA metodu se používají ¹²⁵I značený octopamin nebo synefrin jako heterogenní konjugáty pro kompetitivní reakce. Jodace se v tomto případě neprovádí. Jako derivatizační technika se

v tomto případě dá použit například acetylace. Před imunoreakcí je proteinová matrice odstraněna precipitačním činidlem. Po provedení imunoreakce je imunokomplex následně vysrážen druhou protilátkou v polyethylenglykolu, poté je odstředěn, dekantován a u vzniklé sraženiny je proměřena radioaktivita.

Metoda ELISA se používá zejména pro stanovení volných plazmatických metanefrinů. Její princip spočívá v převedení metanefrinu a normetanefrinu na jejich N-acylované deriváty. Pro tuto metodu se využívají speciální kity. Metanefrin a normetanefrin se naváží na mikrotitrační destičku. Acylované metanefriny soutěží o fixní počet antisérových vazebných míst. Jakmile systém dospěje do rovnováhy, volný antigen a volné antisérové komplexy jsou odstraněny promytím. Protilátky navázané na pevnou fázi metanefrinu a normetanefrinu jsou detekovány anti-rabbit IgG peroxidasou. Reakce substrátu TMB/peroxidasa je monitorován při vlnové délce 450 nm. Množství protilátky vázané na pevnou fázi metanefrinů je inverzně úměrný ke koncentraci metanefrinů ve vzorku. Při přípravě vzorku dochází nejprve k precipitaci. Následně se provádí acylace acylačním pufrem. Poté se provede reakce s králičím antisérem proti metanefrinům a následně dochází k inkubaci vzorku. Poté se vzorek promyje, následně se přidá tetramethylbenzidin a poté se opět inkubuje, tentokrát ve tmě za laboratorní teploty. Po inkubaci se přidá 0,25M kyselina sírová jako stop činidlo. Poté se provede odečet absorbance. [48, 74, 75]

3.5.3.2.3. Metody stanovení metanefrinů plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií

Další technikou, užívanou ke stanovení metanefrinů je GC/MS. Derivatizace vzorku je prováděna silylací nebo acylací, s tím, že technika silylace nebývá v případě metanefrinů příliš frekvencovaná. Problematikou silylační techniky se zabývali Hattox a Murphy, kteří studovali trimethylsilylové deriváty katecholaminů a jejich metabolitů. [76] Jako silylační činidlo použili terc-butyldimethylchlorosilan pro stanovení kyseliny vanilmandlové, homovanilové a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové v moči. [77] Pro derivatizaci metanefrinu a normetanefrinu v moči použili jako derivatizační činidlo N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid a N-methyl-bis-heptafluoroacetamin. Díky této derivatizaci dosáhli větší senzitivity v důsledku vyšší molekulové hmotnosti parentních fragmentů. [78] Tato metoda byla porovnána s metodou HPLC a bylo zjištěno, že při použití GC/MS metody se silylovou derivatizací dochází k absenci lékových interferencí, které bývají u HPLC metody běžné. Nicméně derivatizační technika acylace bývá více využívána. Její popularita spočívá v důsledku stability a vzniku excelentních

spekter v důsledku acylace. Jako acylační činidlo se v tomto případě nejčastěji používá anhydrid kyseliny pentafluoropropionové (PFPA) a pentafluoropropanol (PFP – OH). [79] Studium acylace jako derivatizační techniky pro GC/MS se zabývala práce Canfella a kol., který ještě před samotnou derivatizací využil úpravu vzorku pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) a tímto způsobem stanovoval metanefriny v moči. [80] Na jeho práci navázal Ehrhart a Schwartz, kteří začali podobným způsobem stanovovat plazmatické katecholaminy. [81] Užití kombinace PFPA s PFP – OH bylo rovněž vyzkoušeno pro stanovení kyseliny vanilmandlové a homovanilové. [82] Kromě silylace a acylace se ještě jako derivatizační technika používá alkylace. Jako alkylační činidlo pro metanefriny se používá ethylchloroformát. [83]

3.5.3.2.4. Metody stanovení metanefrinů kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí

Roku 1993 byla poprvé popsána technika kapalinové chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí pro stanovení volných plazmatických metanefrinů. Tato metoda je v současné době používána zcela rutinně jak pro stanovení volných plazmatických metanefrinů, tak pro stanovení metanefrinů v moči. [16, 84] Před samotným měřením se zpravidla provádí extrakční procedura, při které jsou odstraněny vlivy matrice.

Pro stanovení močových metanefrinů se zpravidla využívá nejprve kyselé hydrolyzy pomocí kyseliny chlorovodíkové, kdy dojde k uvolnění vázaných metanefrinů. Po hydrolyze se provede neutralizace moči na pH 7 (pro tento úkon se běžně používá roztok hydroxidu sodného nebo draselného). Následně je pak provedena extrakce na pevné fázi a stanovení metanefrinů pomocí HPLC/ECD. Z hlediska nákladnosti je HPLC/ECD méně nákladnou technikou než imunochemická stanovení nebo HPLC/MS.

Z principiálního hlediska spočívá metoda HPLC s elektrochemickou detekcí v separaci analytu, který prochází za určitých podmínek kolonou v kapalinovém chromatografu a následně podléhá elektrochemickým reakcím na elektrodách umístěných v analytické cele. Pro HPLC s elektrochemickou detekcí jsou používány nejčastěji amperometrický detektor, které snímá proud při konstantním elektrodovém potenciálu (ten je volen v oblasti limitního proudu, tedy jedná se o koncentrační detektor) a coulometrický detektor, na němž dochází k úplné elektrolýze a jedná se o hmotnostní detektor. [85] Tyto detektory měří proud, jenž vzniká v důsledku průchodu redukovatelné nebo oxidovatelné látky měrnou celou. Výhodou elektrochemické detekce je rychlost a citlivost odezvy a skutečnost, že se jedná o specifické detektory. Naopak hlavní nevýhodou je pasivace elektrod s následným čištěním. Mobilní fáze

navíc musí být vodivá, což znemožňuje využití těchto detektorů pro NP-HPLC. [86] Pro stanovení metanefrinů se používá nejčastěji coulometrická detekce s elektrodoým polem. Při této detekci se používá systém 4 – 16 průtočných coulometrických cel, na nichž dochází k elektrochemickým přeměnám analytu. Na každou z cel je vložen jiný konstantní potenciál, při kterém se dotyčná látka oxiduje nebo redukuje. Tento potenciál je nazýván dominantní. [87] V klinické praxi se nejčastěji používá HPLC ve spojení s elektrochemickým detektorem Coulochem (Obr. č. 9, 10), v jehož případě je možné provádět elektrochemickou analýzu ve spojení s chromatografickou separací i v uspořádání průtokové injekční analýzy. V sestavě jsou kromě HPLC a detektoru Coulochem zpravidla zapojené ještě elektrochemické cely a to kondicionační cely a analytické cely. Kondicionační cely má v tomto případě zpravidla stejnou funkci jako předkolona v kapalinové chromatografii, tedy slouží k zachycování nečistot, které by mohly ztížit detekci analytu v analytické celi. V analytické celi dochází k redoxním reakcím na elektrodách, které jsou v celi umístěny a na něž je vloženo určité napětí. Mezi nejčastěji používané elektrody se řadí grafitová, konkrétně porézní uhlíkové elektrody, skelný uhlík a nebo BDD elektrody (borem dopovaný diamant). Po těchto reakcích se analyt dostává na detektor a výsledný chromatogram se poté objeví v softwaru na počítači. Mezi hlavní nevýhody této metody patří nutnost provádět elektrochemické čištění téměř před každou analýzou, případně ještě během analýzy a poměrně dlouhá doba ustalování detektoru.



Obr.č. 9: HPLC/ED sestava



Obr.č. 10: elektrochemický detektor Coulochem



Obr.č. 11: Kondičionální cela a analytická cela v HPLC/ED sestavě

3.5.3.2.5. Metody stanovení metanefrinů kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií

Poslední roky se ve světě dostává do popředí metody LC/MS a LC-MS/MS. [10] Tato metoda se v případě stanovení katecholaminů a metanefrinů jeví jako rychlá, přesná a robustní, senzitivní a specifická. LC/MS metoda byla vyvinuta pro stanovení plazmatických i močových metanefrinů v méně než nanomolárních koncentracích. Pretreatment vzorku se nejčastěji provádí pomocí extrakce na pevné fázi (SPE), dá se ale rovněž provést pomocí liquid-liquid extrakce (LLE), supported-liquid extrakce (SLE) nebo online extrakce na pevné fázi. [23, 26, 88, 89, 90] Je-li zvažováno stanovení metanefrinů pomocí LC/MS, je nutné vzít v úvahu, že se musí na samotné sestavě nejprve nastavit podmínky, metoda se musí takzvaně „naladit“, to znamená, že na základě výsledků ladění jsou získána data o optimálních MRM přechodech, kolizních energiích, declusterizačních potenciálech, vstupních potenciálech, výstupních potenciálech a samozřejmě je vyřešena otázka, zda se bude měřit v pozitivním nebo negativním módu. [26, 91] Po naladění hmotnostního spektra přichází otázka optimalizace podmínek na kapalinové sestavě, což s sebou nese výběr správné kolony, mobilní fáze, teploty na koloně nebo napětí na kapiláře a zda se bude měřit při izokratické nebo gradientové eluci. [26, 88, 91] Mezi nejčastější kolony, na kterých jsou metanefriny stanovovány, se řadí HILIC [23, 88], pentafluorofenylová kolona [92], C18 kolona [26] nebo kyano kolona [70].

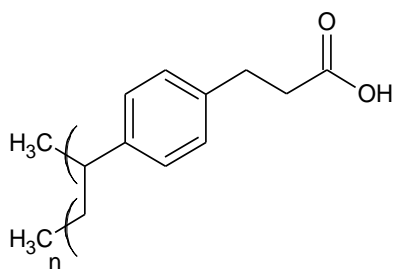
3.5.3.3. Extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)

Extrakce na pevné fázi jako pretreatment vzorku před stanovením metanefrinů pomocí LC/MS je velmi rozšířená. Je používána zvláště v případech, kde se vyskytuje analyt ve vzorku o nižší koncentraci, než je jeho limit stanovení danou analytickou metodou. Při tomto typu extrakce si vybereme kolonku naplněnou vhodným pevným adsorbentem (Obr. č. 9), který na svém povrchu zachycuje a zakoncentrovává vybraný analyt v kapalném vzorku, který touto kolonkou proléváme. Po extrakci na kolonku se nanese vhodné činidlo, které již zakoncentrovaný analyt z pevného adsorbentu vymyje (vyeluuje). Takto prekoncentrovaný analyt je poté možné stanovit vybranou analytickou metodou. [93]

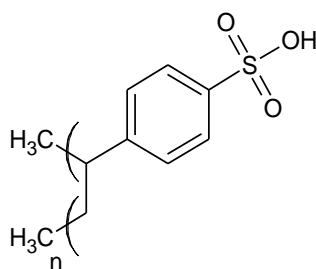


Obr. č. 12: Kolonka pro extrakci na pevné fázi

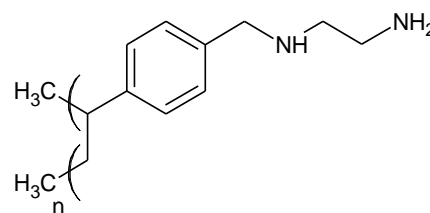
Mezi nejčastější SPE kolonky pro stanovení metanefrinů se řadí Strata X-CW (obr. č. 10), pracující na principu výměny slabých kationtů, Strata X-C (Obr. č. 11) pracující na principu výměny silných kationtů, nebo Strata X-AW (Obr. č. 12) pracující na principu výměny slabých aniontů. Kolonka Strata X-CW je určena k retenci bazických sloučenin s pKa vyšším než 8, například kvartnérních amoniových bazí. Dokáže současně odstranit matrix interference, jako jsou proteiny, soli, neionizovatelné molekuly a fosfolipidy. Kolonka Strata X-C je rovněž určena k retenci bazických sloučenin a to s pak nižším než 10,5. Kolonka Strata X-AW je určena k retenci sloučenin s kyselým charakterem s pKa nižším než 5. [94, 95]



Obr. č. 13: Strata X-CW



Obr. č. 14: Strata X-C



Obr. č. 15: Strata X-AW

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části bylo na základě literární rešerše vyvinout novou, rychlou a robustní metodu kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, která umožní stanovení plazmatických a močových hladin metanefrinů. Rovněž byly kladeny nároky na co nejnižší časovou a ekonomickou náročnost metody.

4.1. Materiál a přístroje

4.1.1. Chemikálie

Standardy

Metanefrin hydrochlorid ... Sigma Aldrich (USA)

Normetanefrin hydrochlorid ... Sigma Aldrich (USA)

Metanefrin-d3 ... Sigma Aldrich (USA)

Normetanefrin-d3 ... Sigma Aldrich (USA)

Certifikované referenční materiály

Endocrine urine control, normal range, LOT 4013, exp 09/2016 (Chromsystems, Německo)

Endocrine urine control, pathological range, LOT 2014, exp. 05/2017 (Chromsystems, Německo)

Calibration standard Metanephrines, LOT 2413, exp. 06/2015 (Chromsystems, Německo)

Ostatní chemikálie

Methanol, absolute LC-MS ... Biosolve

Acetonitril, HPLC gradient grade ...CHEM-LAB

Voda, HPLC grade ...CHEM-LAB

Kyselina mravenčí pro LC/MS ... Sigma Aldrich (USA)

Kyselina trichloroctová pro LC/MS ... Sigma Aldrich (USA)

Mravenčan amonný ...Fluka

Octan amonný ... Fluka

Biologický materiál

Vzorky plazmy byly získány od pacientů z úseku hematologie Laboratoří Agel, a.s. v Novém Jičíně.

Ostatní materiál

Analytické kolony

Kinetex HILIC 2.6 μ 100A ... Phenomenex

Synergi 4 μ Hydro RP 4 μ 80A ... Phenomenex

Kinetex 5 μ PFP 100A ... Phenomenex

Gemini 5 μ C18 110A ... Phenomenex

4.1.2. Přístrojové vybavení

Supelco Manifold

Centrifuga minispin

Centrifuga

Třepačka Vibromix 104 EV ... Tehtnica

Termovap

Vialky ... Chromservis

Inserty Bottom Spring ... Chromservis

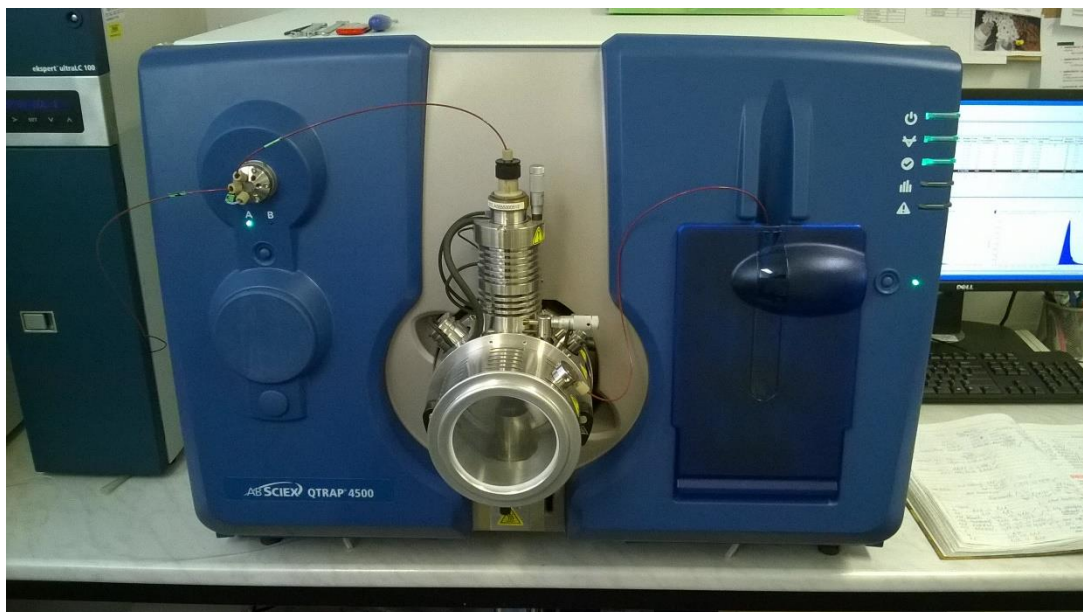
HPLC/MS/MS ... AB SCIEX (USA)

4.2. Příprava zásobních roztoků a standardů

Byly připraveny methanolicke zásobní roztoky metanefrinu hydrochloridu, normetanefrinu hydrochloridu, metanefrinu-d₃ a normetanefrinu-d₃ o koncentracích 1,00 mg.ml⁻¹. Z těchto zásobních roztoků byly postupným ředěním připravovány roztoky pracovní o vybraných koncentracích.

4.3. Použitá instrumentace

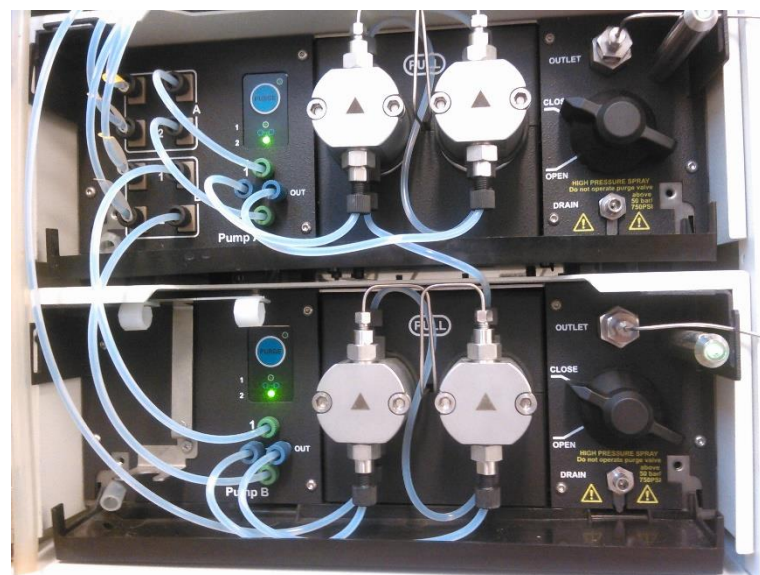
Pro analýzu močových a plazmatických metanefrinů byl použit systém AB SCIEX QTRAP 4500 LC/MS/MS s trojitým kvadrupólem (obr. č. 16). Systém kapalinové chromatografie obsahoval autosampler (obr. č. 17), pumpu (obr. č. 18, 19) a termostat kolon (obr. č. 17). Hmotnostní spektrometr pracoval na principu trojitého kvadrupólu s použitím elektrospreje jako iontového zdroje.



Obr. č. 16: hmotnostní spektrometr AB Sciex 4500



Obr. č. 17: HPLC sestava s autosamplerem a termostatem kolon



Obr.č. 18: HPLC pumpa



Obr.č. 19: HPLC pumpa

4.4. Optimalizace podmínek

Prvním krokem při optimalizaci hmotnostního spektra bylo správné naladění metanefrinu a normetanefrinu. Jako ladící standard byl použit roztok metanefrinu a normetanefrinu o koncentraci 100 ng.ml^{-1} . Molekulová hmotnost metanefrinu je $180,1 \text{ g.mol}^{-1}$, molekulová hmotnost normetanefrinu je pak $166,1 \text{ g.mol}^{-1}$. Při ladění bylo důležité získat optimální hodnoty MRM přechodů (zkráceno z anglického multiple reaction monitoring; přechod na nejbližší stabilní fragment; přechod z mateřského iontu Q1 na dceřiný iont Q3), declusterizačních potenciálů (DP), vstupních potenciálu (EP) a výstupních potenciálů kolizní cely (CXP). Dále bylo nutné upravit tlak zamlžujícího plynu, tlak kolizního plynu, tlak sušícího plynu, curtain gas, napětí na kapiláře v iontovém zdroji, teplotu zamlžujícího plynu a počet cyklů během jednoho měření. Rovněž bylo důležité rozhodnout se, zda budou všechna následující měření provedena v pozitivním nebo negativním módu. Při výběru vhodné odpařovací teploty byly postupně vyzkoušeny teploty 550, 500, 450, 400 a 350°C. Následně byly změřeny roztoky se standardy metanefrinů a na základě velikosti plochy byla vybrána nejvhodnější teplota. Při výběru napětí na kapiláře byla postupně vyzkoušena napětí v rozsahu 1500 – 5500 V a opět na základě velikosti plochy bylo vybráno nejvhodnější napětí na kapiláře v iontovém zdroji.

4.5. Optimalizace separace

Prvním krokem při optimalizaci separace byl výběr vhodné kolony a mobilní fáze. Při tomto výběru musela být zohledněna strukturní povaha analytu. Vzhledem k tomu, že metanefriny

jsou látky bazického charakteru, byl výběr kolony směřován k reverzní fázi. Na základě rešerží byly vybrány kolony C18, pentafluorofenylová, hydropolar RP a HILIC. Všechny tyto kolony byly následně vyzkoušeny. Po výběru kolony následovala volba vhodné mobilní fáze, která byla rovněž volena na základě předchozí rešerže. Vzhledem k bazické povaze analytu byl výběr mobilní fáze veden k pufrované mobilní fázi, neboť se předpokládalo, že výsledné píky budou ostré, nerozmyté. Jako nejvhodnější volba vyplynula kyselina mravenčí ve vodě s acetonitrilem a kyselina octová ve vodě s acetonitrilem. Dále byly zvažovány mravenčan amonný v methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě, octan amonný s kyselinou mravenčí ve vodě v kombinaci s acetonitrilem, acetonitril obsahující 2mM mravenčan amonný v kombinaci s 0,05% roztoku kyseliny mravenčí ve vodě nebo samotná 0,1% kyselina mravenčí ve vodě. Při volbě mobilní fáze bylo zároveň zvažováno, zda bude analýza provedena při izokratické nebo gradientové eluci, jaký průtok bude optimální a jaká bude zvolena teplota na koloně. Na základě rešerže byl vybrán teplotní rozsah 30-35°C, nástřik 10µl a byla vyzkoušena izokratická i gradientová eluce. Při výběrech podmínek byl rovněž zohledňován čas analýzy, u něhož byla předpokládána maximální doba 10 minut na jeden vzorek.

4.6. Optimalizace přípravy vzorku

Na prvním místě bylo důležité rozlišit od sebe přípravu vzorku na stanovení volných plazmatických metanefrinů a metanefrinů v moči. Jelikož se jedná v případě plazmatických metanefrinů o vysoce labilní analyt, kladl se velký důraz na zachování teplotních podmínek, tzn. vzorky byly uchovávány v mrazáku při teplotě -20°C. Vzorky na metanefriny v moči byly rovněž uchovávány v mrazáku při teplotě -20°C, přestože by byly několik dnů schopny nezdegradovat i v mrazáku s nižší teplotou nebo v lednici. Po rozmrazení vzorků bylo nutné postupovat s maximální citlivostí, ale zároveň rychle, neboť hladina volných plazmatických metanefrinů kontinuálně s časem klesá.

Jako hlavní metoda přípravy vzorku byla na základě předchozích rešerží zvolena extrakce na pevné fázi (SPE). Ze širokého spektra SPE kolonek byly vybrány kolony Strata X-CW, Strata S-XC, Drug N a Drug B, všechny o objemech 1ml. Na těchto kolonkách byly vyzkoušeny následující dva postupy.

Ad1.: Extrakce byla prováděna na zařízení Supelco Manifold určeném pro extrakce na pevné fázi. (Obr. č. 20) Toto zařízení je běžně dostupné v sestavě s vakuovou pumpou, díky které se

dá řídit průtok roztoku přes kolonku. V prvním kroku docházelo nejprve ke kondicionaci kolonky, tedy na kolonku byl nanesen 1ml roztoku octanu amonného (3:1; v/v; 0,05M; pH=7). Po kondicionaci byl na kolonku nanesen loadingový roztok, v našem případě bylo tedy na kolonku nanášeno 300 µl plazmy a tento loadingový roztok byl pomalu přepouštěn přes kolonku (optimální průtok přes kolonku byl maximálně 1ml/min). Následně byla provedena série dvou promývání. Při prvním promývání došlo k odstranění interferencí pomocí 1 ml destilované vody, při druhém promývání došlo k odstranění zbylých interferencí pomocí 1 ml směsi methanol/acetonitril (1:1; v/v, 1ml). Po tomto promývání byla kolonka prosušena po dobu maximálně jedné minuty vakuem. Následně byly pod kolonky umístěny eluční zkumavky a na kolonku byl nanesen eluční roztok, v tomto případě byla použita směs methanol/acetonitril (1:1; v/v) : kyselina mravenčí (95:5; v/v). Eluce byla provedena pozvolna, aby zbytečně nedošlo k degradaci vzorku. Jakmile byl získán celý eluát, provedlo se ihned odpaření rozpouštědla v proudu dusíku při teplotě 40°C. Po odpaření veškeré kapaliny byl vzorek rekonstituován ve 100 µl mobilní fáze.

Ad2: V prvním kroku nejprve došlo k pretreatmentu vzorku. 300 µl bylo rozpuštěno v 5 ml destilované vody a tato směs byla použita jako loadingový roztok. Na SPE kolonku byl nejprve nanesen fosfátový pufr (pH=7) a následně 2ml destilované vody. Poté bylo na kolonku postupně nanášeno 1,5 ml loadingového roztoku a tento roztok byl opět opatrně přepouštěn přes kolonku. Následovala série promývání. Při prvním promývání došlo k odstranění interferencí pomocí 1 ml destilované vody, při druhém promývání byly zbylé interference odstraněny 500 µl směsí destilovaná voda/methanol (60:40; v/v). Kolonka byla poté krátce po dobu 10 sekund sušena v proudu vakua a následně byla promyta 500 µl methanolu. Poté byla pod kolonku nachystána eluční zkumavka, aby mohla být provedena eluce 1 ml methanolu obsahujícího 5 % kyseliny mravenčí. Po eluci byl vzorek stejně jako v prvním případě vysušen v proudu dusíku při teplotě 40°C a následně zrekonstituován ve 100 µl mobilní fáze.

V případě močových metanefrinů byly aplikovány stejné postupy, ovšem s tím rozdílem, že na začátku byla provedena hydrolyza vzorku. Byly vyzkoušeny dva postupy hydrolyzy. V prvním případě bylo použito 100 µl roztoku β-glukuronidasy, která byla přidána k 500 µl vzorku moče. Tato směs byla hydrolyzována po dobu 90 minut při teplotě 50°C. Po hydrolyze byl vzorek ochlazen na laboratorní teplotu a zpracován výše uvedenými postupy. Ve druhém případě bylo použito 500 µl vzorku moče, ke kterému bylo přidáno 100 µl 6M kyseliny chlorovodíkové. Tato směs byla hydrolyzována po dobu 20 minut při teplotě 90°C. Po hydrolyze byl vzorek ochlazen opět na laboratorní teplotu. Jeho pH se ovšem pohybovalo kolem hodnoty 1, proto

musel být vzorek zalkalizován roztokem 1M hydroxidu sodného na pH=7. Po neutralizaci byl vzorek rovněž zpracován výše uvedenými postupy. U obou postupů byla vyzkoušena rovněž precipitace kyselinou trichloroctovou a bylo provedeno porovnání spekter vzorku bez precipitace a s precipitací. Dále bylo před SPE extrakcí vyzkoušena centrifugace vzorků po dobu pěti minut při 13 000 ot./min ($r=10$ cm), přičemž došlo k vytvoření drobné peletky na dně Eppendorfovy zkumavky.



Obr. č. 20: Zařízení pro extrakci na pevné fázi Supleco Manifold

4.7. Kvantifikace

Pro kvantifikaci metody byly použity deuterované standardy metanefrinu a normetanefrinu. Tyto standardy byly přidány ke každému vzorku a na základě integrace ploch v softwaru Analyst 1.6.1 byly vypočteny reálné koncentrace metanefrinu a normetanefrinu v moči a plazmě.

4.8. Validace metody

4.8.1. Validace metody stanovení močových metanefrinů

Validace metody pro stanovení koncentrace normetanefrinu a metanefrinu v moči metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byla provedena v souladu s doporučeními výboru České společnosti klinické biochemie ČLS JEP: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích [96] a Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích [97]. V průběhu validačního procesu byly ověřeny následující parametry navrženého analytického

postupu a to opakovatelnost, mezilehlá preciznost, vychýlení, pracovní rozsah, meze detekce a stanovitelnosti a porovnání s HPLC-ED metodou.

4.8.1.1. Příprava, uchovávání a zpracování vzorku

Pro validaci metanefrinů v moči byl vybrán certifikovaný referenční materiál Endocrine urine control (výrobce Chromsystems GmbH, Německo), který je dodáván v lyofilizované podobě. Kalibrační standard byl po vyjmutí z mrazáku temperován 20 minut při laboratorní teplotě a následně byl rozpuštěn v 5 ml destilované vody. Standardy pro normální a patologické hladiny metanefrinů v moči byly rovněž po vyjmutí z mrazáku temperovány po dobu 20 minut při laboratorní teplotě, poté byly rozpuštěny v 8 ml destilované vody a následně se nechaly opět 20 minut odstát při laboratorní teplotě. Poté byly důkladně promíchány a rozalikovány pro všechna další měření. Zbylé zásobní roztoky byly opět neprodleně zmrazeny, aby nedošlo k rozložení analytu.

Zpracování vzorku

Bylo odebráno 500 μ l vzorku moči. Následně bylo přidáno 15 μ l směsi deuterovaných standardů metanefrinů a 100 μ l 6M kyseliny chlorovodíkové a byla provedena hydrolyza vzorku po dobu 20 minut při teplotě 90°C. Poté byl vzorek zneutralizován 695 μ l 1M roztoku hydroxidu draselného. Směs byla zvortexována a dále bylo odebráno 300 μ l vzorku pro následnou extrakci na pevné fázi, pro kterou byla použita extrakční kolonka Strata X-CW o objemu 1ml. Na kolonku byl nejprve nanesen 1ml 5 mM octanu amonného jako kondicionačního roztoku. Následně bylo naneseo 300 μ l vzorku, dále bylo provedeno první promývání 1ml destilované vody, druhé promývání 1ml směsi methanol/acetonitril v poměru 1:1. Poté byla směs vakuově vysušena a po důkladném vysušení kolonky byla provedena eluce roztokem směsi kyselina mravenčí/methanol/acetonitril v poměru 2,5:25:25. Po této eluci byl vzorek umístěn do proudu dusíku, kde došlo k odpaření elučního roztoku a vzorek byl poté rekonstituován ve 100 μ l mobilní fáze. Stejným způsobem byl zpracován i certifikovaný referenční materiál.

4.8.1.2. Volba vhodné kalibrační metody

Pro kalibraci byly použity certifikované referenční materiály Chromsystems GmbH, Německo. Kalibrace metody byla provedena v každé sérii měření jako jednobodová kalibrace s využitím certifikovaného referenčního materiálu Chromsystems, GmbH, Německo.

K výpočtu koncentrace byl využit vztah:

$$C_{\text{analyt}} = c_s \cdot (A_v \cdot IS_s) / (A_s \cdot IS_v),$$

kde c_{analyt} je koncentrace analytu ve vzorku
 c_s je koncentrace analytu v kalibračním standardu
 A_v je plocha píku analytu na chromatogramu vzorku
 IS_s je plocha píku interního standardu na chromatogramu kalibračního standardu
 A_s je plocha píku analytu na chromatogramu kalibračního standardu
 IS_v je plocha píku interního standardu na chromatogramu vzorku

4.8.1.3. Linearita

Měření linearity bylo provedeno v koncentračním rozsahu čtyřbodové kalibrační závislosti po dobu pěti následujících dnů, vytvořené roztoky o koncentracích $0,1L1$; $L1$; $0,75L1 + 0,25L2$; $L2$ pro měření linearity metanefrinů v moči. Mírou linearity močových metanefrinů byla hodnota korelačního koeficientu R^2 . Kalibrační závislost byla popsána rovnicí $y = ax + b$.

4.8.1.4. Mezilehlá preciznost

Mezilehlá preciznost byla realizována změřením série 10 vzorků na hladinách L1 a L2 den po dni v singletu na hladinách L1 a L2. Ze zjištěných hodnot byla poté vypočítána, hodnota BIAS, charakterizující míru vychýlení a variační koeficient (CV) a celková analytická chyba (TEa), pomocí nichž byla určena preciznost provedených měření.

4.8.1.5. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla realizována sérií 10 měření 10 vzorků na hladinách L1 a L2 v jednom dni. Na základě výsledků těchto měření byla vypočítána průměrná hodnota měření, variační koeficient, BIAS a hodnota směrodatné odchylky (SD).

Pro získání výše uvedených hodnot byly použity následující výpočty.

Pro výpočet aritmetického průměru byl použit vztah

$$A_M = \frac{\sum x_i}{10}$$

Kde S_{xi} je soubor výsledků x_1 až x_{10} a 10 je celkový počet měření.

Pro výpočet BIAS byl použit vztah

$$\text{BIAS (\%)} = \left(\frac{A_M}{\mu} \right) \cdot 100$$

kde A_M je aritmetický průměr 10 měření a μ je certifikovaná hodnota referenčního materiálu.

Pro výpočet variačního koeficientu byl použit vztah

$$CV = \left(\frac{S_D}{A_M} \right) \cdot 100$$

Kde S_D je hodnota směrodatné odchylky měření a A_M je aritmetický průměr 10 měření.

Pro výpočet celkové analytické chyby byl použit vztah

$$TE_a (\%) = 1,96 \cdot CV + |BIAS|$$

Kde CV je hodnota variačního koeficientu.

Pro výpočet výtěžnosti byl použit vztah

$$R_e = \left(\frac{A_M}{R_h} \right) \cdot 100$$

Kde A_M je aritmetický průměr naměřených koncentrací a R_h je referenční hodnota

4.8.1.6. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)

U metody byl rovněž stanoven limit detekce a limit kvantifikace. Limit detekce byl stanoven na základě poměru signál/šum = 3 (tedy na základě trojnásobku velikosti šumu). Limit kvantifikace byl poté stanoven na základě poměru signál/šum = 10 (tedy na základě desetinásobku velikosti šumu).

4.8.2. Validace metody – plazmatické metanefriny

Validace metody pro stanovení koncentrace normetanefrinu a metanefrinu v plazmě metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byla provedena v souladu s doporučeními výboru České společnosti klinické biochemie ČLS JEP: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích [96] a Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích [97]. V průběhu validačního procesu byly ověřeny následující parametry navrženého analytického postupu a to opakovatelnost, mezilehlá preciznost, vychýlení, pracovní rozsah, meze detekce.

4.8.2.1. Příprava, uchování a zpracování vzorku

Pro plazmatické metanefriny byly připraveny methanolicke zásobní pracovní roztoky o koncentracích 200 ng.ml⁻¹, 2 µg.ml⁻¹ a 20 µg.ml⁻¹. Koncentrace zásobního roztoku deuterovaných standardů byla 100 ng.ml⁻¹. Ředěním těchto roztoků s negativní plazmou byly připraveny vzorky o koncentracích 10 ng.ml⁻¹, 100 ng.ml⁻¹ a 1 µg.ml⁻¹. Důležité bylo brát ohled

na skutečnost, že stabilita plazmatických metanefrinů je podstatně nižší než stabilita metanefrinů v moči, tudíž manipulace se vzorky vyžadovala rychlost.

Zpracování vzorku

Byly připraveny vzorky o objemech 315 μl plazmy s přidavkem koncentrace 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po přidání standardů do plazmy se vzorek nejprve důkladně promíchá na vortexu po dobu 30 sekund a následně se centrifuguje po dobu 5 minut při 13000 ot./min ($r=10\text{ cm}$). Následně byla provedena extrakce na pevné fázi, pro niž byla použita kolonky Strata X-CW. V prvním kroku byla kolonka kondicionována 1 ml 5 mM octanu amonného. Poté bylo nanášeno 250 μl vzorku. Dále bylo provedeno první promývání 1 ml destilované vody a druhé promývání 1 ml směsi methanol/acetonitril v poměru 1:1. Kolonka poté byla vakuově vysušena. Následně byla provedena extrakce směsí kyselina mravenčí/methanol/acetonitril v poměru 2,5:25:25. Takto vyeluovaná směs byla vystavena proudu dusíku při teplotě 40°C, kde došlo k odpaření elučního roztoku. Závěrem byla směs rekonstituována ve 100 μl mobilní fáze.

4.8.2.2. Volba vhodné kalibrační metody

Pro kalibraci byly použity zakoupené standardy metanefrinu a normetanefrinu. Kalibrační metody byla provedena v každé sérii měření jako jednobodová kalibrace s využitím zakoupených standardů metanefrinů.

K výpočtu koncentrace byl využit vztah:

$$c_{\text{analyt}} = c_s \cdot (A_v \cdot IS_s) / (A_s \cdot IS_v),$$

kde	c_{analyt}	je koncentrace analytu ve vzorku
	c_s	je koncentrace analytu v kalibračním standardu
	A_v	je plocha píku analytu na chromatogramu vzorku
	IS_s	je plocha píku interního standardu na chromatogramu kalibračního standardu
	A_s	je plocha píku analytu na chromatogramu kalibračního standardu
	IS_v	je plocha píku interního standardu na chromatogramu vzorku

4.8.2.3. Linearita

Pro měření linearity metanefrinů v plazmě byla zvolena třibodová kalibrační závislost vytvořená připravenými roztoky o koncentracích 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Mírou

linearity plazmatických metanefrinů byla hodnota korelačního koeficientu R^2 . Kalibrační závislost byla popsána rovnicí $y = ax + b$, na jejímž základě byla u plazmatických metanefrinů vypočítána koncentrace metanefrinů v negativní plazmě.

4.8.2.4. Mezilehlá preciznost

Mezilehlá preciznost byla realizována změřením série 10 vzorků na hladinách L1 a L2 den po dni v singletu na hladinách L1 a L2. Ze zjištěných hodnot byla poté vypočítána celková analytická chyba (TEa), hodnota BIAS, charakterizující míru vychýlení a variační koeficient (CV), pomocí nichž byla určena preciznost provedených měření.

4.8.2.5. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla realizována sérií 20 měření a následným měřením 20 vzorků na hladinách L1 a L2 v jednom dni. Na základě výsledků těchto měření byla vypočítána průměrná hodnota měření, variační koeficient, BIAS a hodnota směrodatné odchylky (SD).

Pro získání výše uvedených hodnot byly použity následující výpočty.

Pro výpočet aritmetického průměru byl použit vztah

$$A_M = \frac{\sum x_i}{10}$$

Kde S_{xi} je soubor výsledků x_1 až x_{10} a 10 je celkový počet měření.

Pro výpočet BIAS byl použit vztah

$$BIAS (\%) = \left(\frac{A_M}{\mu} \right) \cdot 100$$

kde A_M je aritmetický průměr 10 měření a μ je certifikovaná hodnota referenčního materiálu.

Pro výpočet variačního koeficientu byl použit vztah

$$CV = \left(\frac{S_D}{A_M} \right) \cdot 100$$

Kde S_D je hodnota směrodatné odchylky měření a A_M je aritmetický průměr 10 měření.

Pro výpočet celkové analytické chyby byl použit vztah

$$TE_a (\%) = 1,96 \cdot CV + |BIAS|$$

Kde CV je hodnota variačního koeficientu.

Pro výpočet výtěžnosti byl použit vztah

$$R_e = \left(\frac{A_M}{R_h} \right) \cdot 100$$

Kde A_M je aritmetický průměr naměřených koncentrací a R_h je referenční hodnota.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Optimalizace MS parametrů

Laděním látek pomocí scan módu byly získány parametry hmotnostního spektra, na jejichž základě byly látky dále identifikovány na koloně. Měřením roztoků standardů metanefrinu a normetanefrinu byly získány parametry, jež jsou shrnuty v tab. 4. Pro všechna následující měření byl vybrán pozitivní mód.

Dále byla provedena optimalizace parametrů pro tlak zmlžovacího plynu, tlak kolizního plynu, napětí na kapiláře v iontovém zdroji, teplotu zamlžujícího plynu a počet cyklů během jednoho měření. Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 5

Na základě měření, jehož výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 6, byla vybrána odpařovací teplota 550°C. Dále bylo na základě měření, jejichž výsledek je shrnut v tabulce č. 7, vybráno napětí na kapiláře v iontovém zdroji, které činilo 5500V. Nejvhodnější teplota a napětí byly vybrány na základě největší plochy píku. (Obr. č. 21-25)

Tab.č. 4: Výsledné MS parametry

<i>Q1 Mass (Da)</i>	<i>Q3 Mass (Da)</i>	<i>Time</i>	<i>ID</i>	<i>DP (volts)</i>	<i>CE (volts)</i>	<i>CXP (volts)</i>
180.1	148.1	50	MN3	90	26	10
180.1	120.1	50	MN4	90	26	10
166.1	134.1	50	NMN3	75	31	7
166.1	106.2	50	NMN4	75	26	8
183.1	151.1	50	MN3 deut	90	26	10
183.1	123.1	50	MN4 deut	90	26	10
169.1	137.1	50	NMN3 deut	75	26	7
169.1	109.2	50	NMN4 deut	75	31	8

Tab.č. 5 Výsledné MS parametry

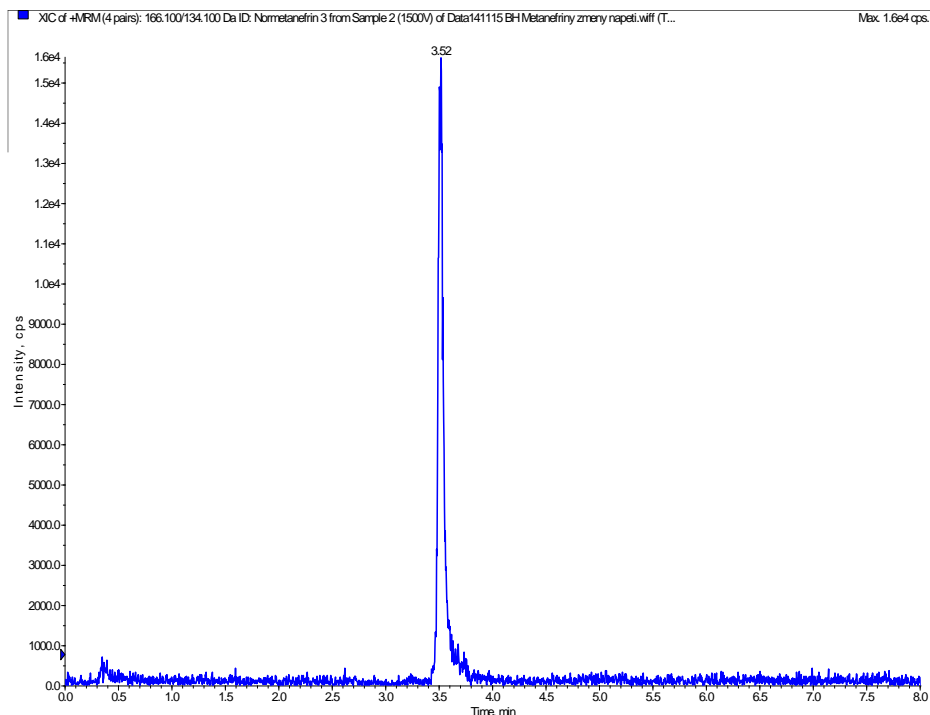
Polarita	pozitivní mód
Scan mód	MRM
Total scan time	0,2200 sec
Délka jedné analýzy	8,009 min
Počet cyklů	2184
Délka jednoho cyklu	0,2200 sec

Tab.č. 6: Optimalizace odpařovací teploty

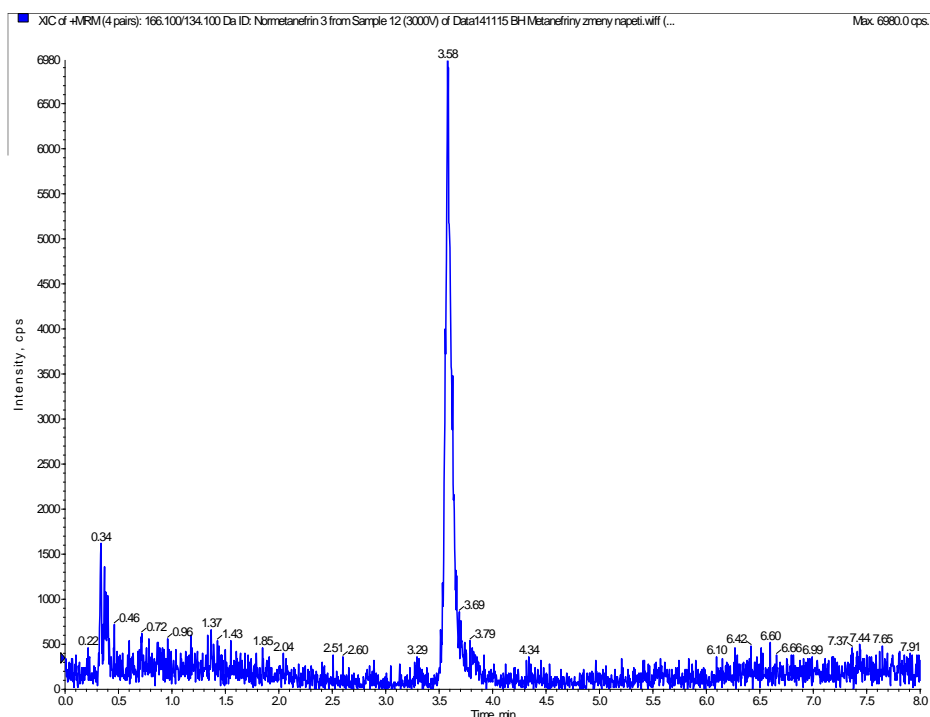
Teplota	plocha NMN3	plocha MN3
550	3,76E+04	9,63E+04
550	3,08E+04	8,20E+04
500	2,84E+04	6,51E+04
500	2,50E+04	6,43E+04
450	2,38E+04	6,03E+04
450	2,36E+04	5,50E+04
400	3,35E+04	6,59E+04
400	3,32E+04	6,33E+04
350	3,34E+04	6,68E+04
350	3,00E+04	6,43E+04

Tab.č. 7: Optimalizace napětí na kapiláře v iontovém zdroji

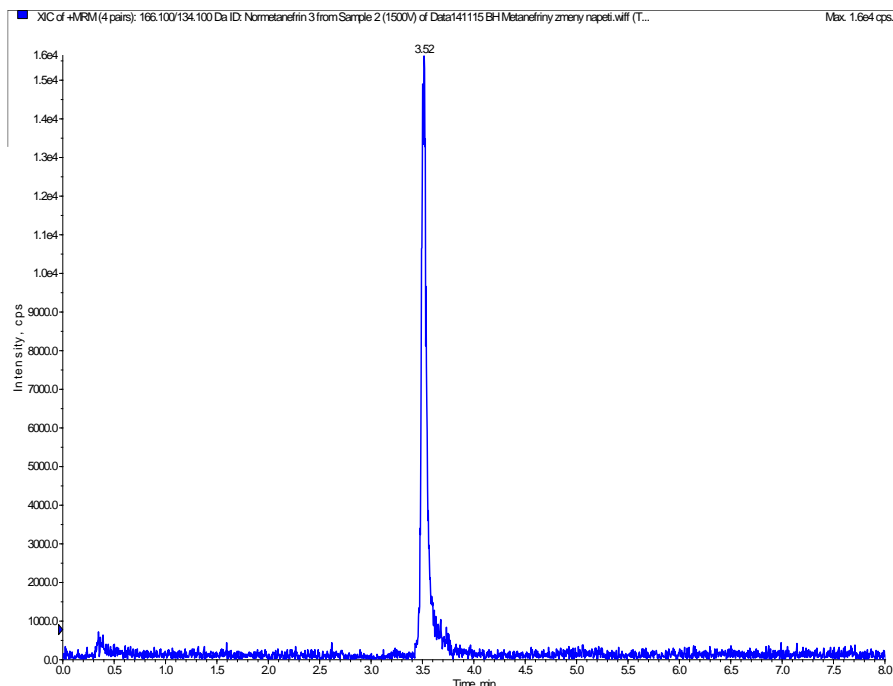
Napeti V	plocha NMN3	plocha MN3
1500	5,35E+04	7,64E+04
1500	4,91E+04	7,57E+04
2000	4,10E+04	5,75E+04
2000	3,80E+04	6,47E+04
2500	2,87E+04	5,67E+04
2500	2,51E+04	5,63E+04
3000	2,63E+04	5,08E+04
3000	2,63E+04	4,95E+04
3500	4,08E+04	7,11E+04
3500	4,31E+04	7,85E+04
4000	5,45E+04	7,88E+04
4000	5,79E+04	8,29E+04
5000	7,23E+04	8,41E+04
5000	6,50E+04	7,89E+04
5500	7,93E+04	1,37E+05
5500	7,00E+04	1,19E+05



Obr.č. 21: pík normetanefrinu při napětí 1500V

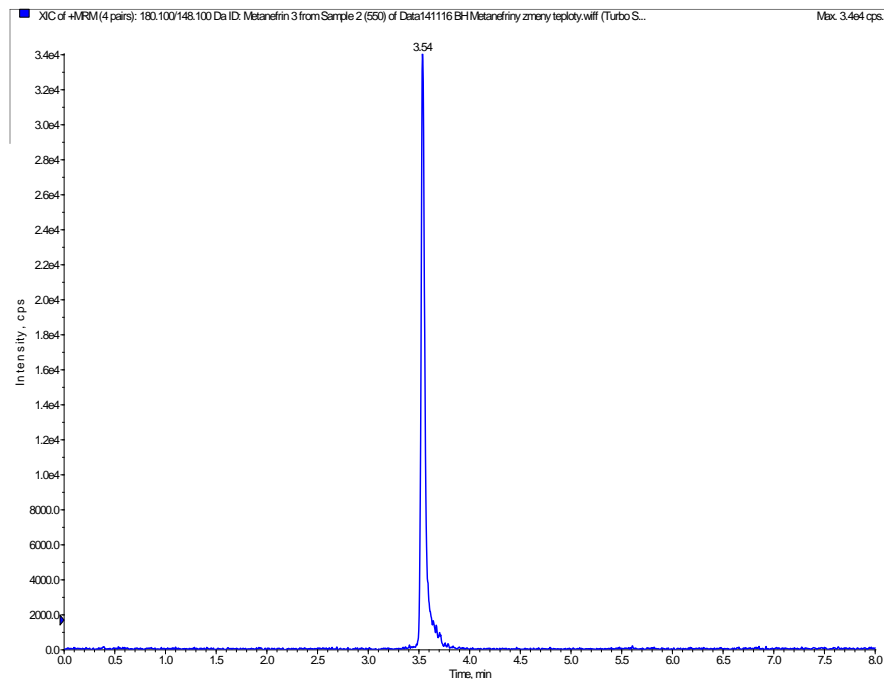


Obr.č. 22 pík normetanefrinu při napětí 3000V

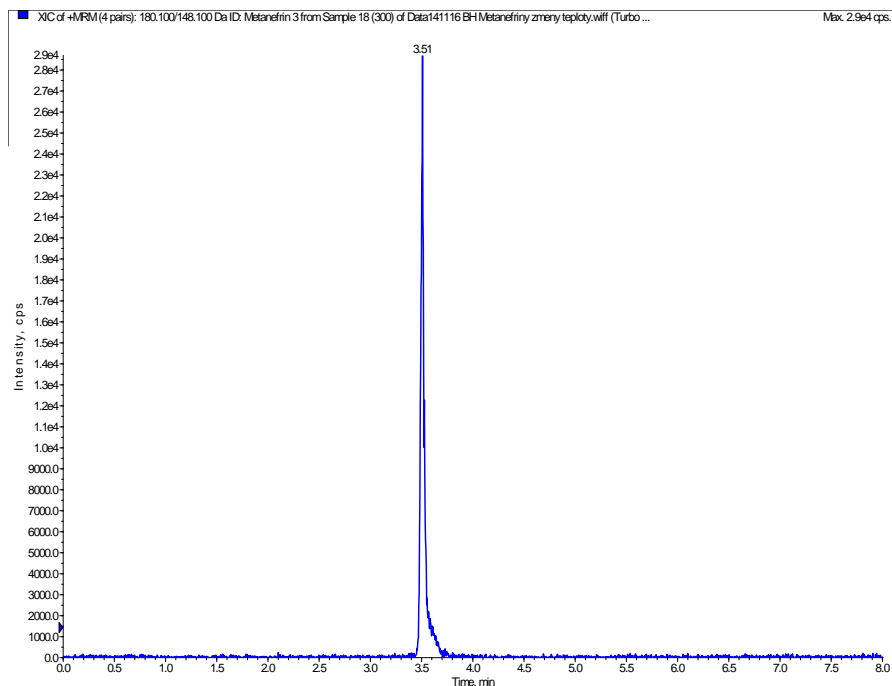


Obr.č. 23: pík normetanefrinu při napětí 5500V

Z výše uvedených obrázků je patrné, že optimum napětí se nachází na 5500V. Na obrázku č. 22 je patrný propad intenzity signálu oproti obrázku č. 23, na kterém je intenzita signálu vyšší. Z výše uvedených výsledků je tedy patrné, že zvyšování intenzity signálu při rostoucím napětí není lineární a dochází při něm k lokálním propadům.



Obr.č. 24: pík metanefrinu při teplotě 550°C

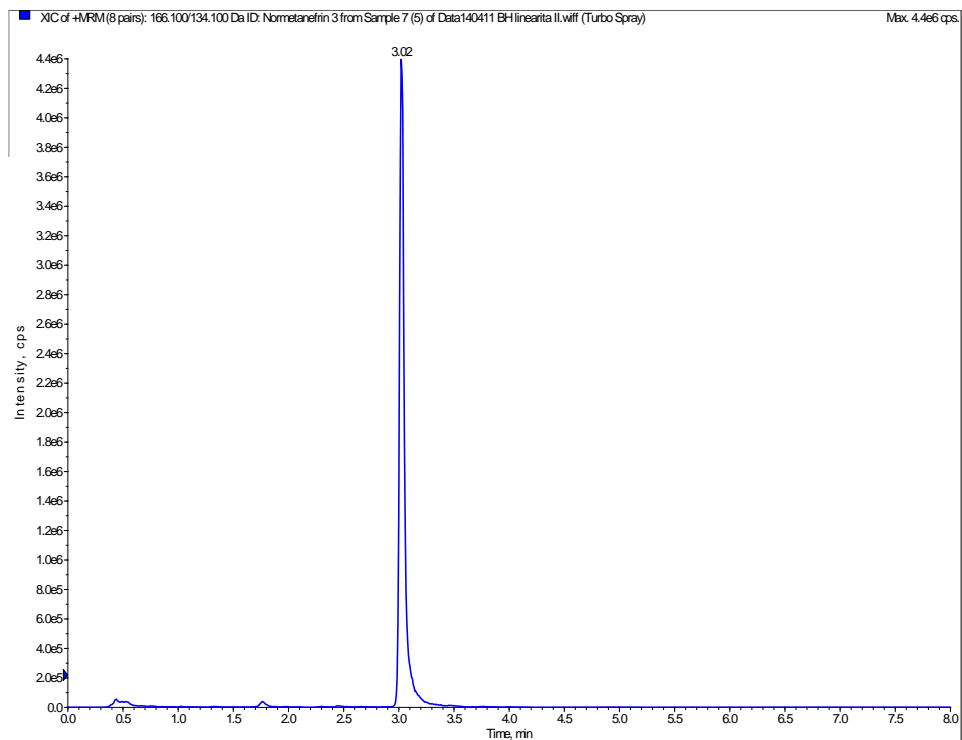


Obr.č. 25: pík metanefrinu při teplotě 300°C

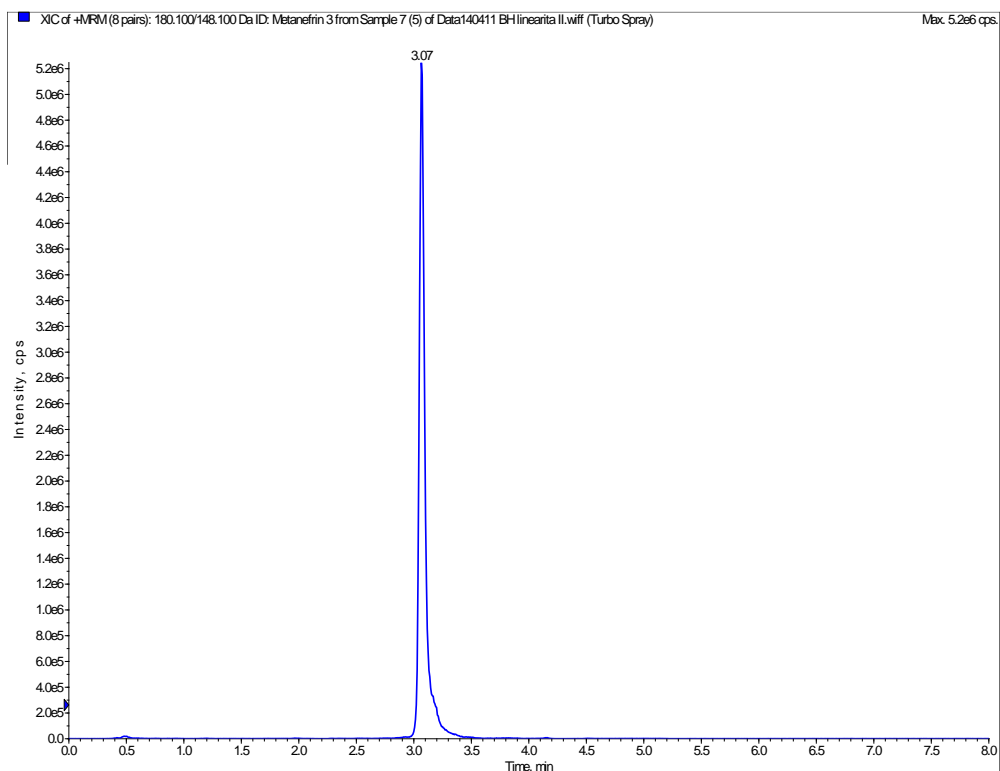
Z výše uvedených záznamů je patrné, že optimální plocha píku byla 550°C. Ve srovnání s obrázkem č. 25 je viditelné, že intenzita signálu je nižší než na obrázku č. 24.

5.2. Optimalizace LC parametrů

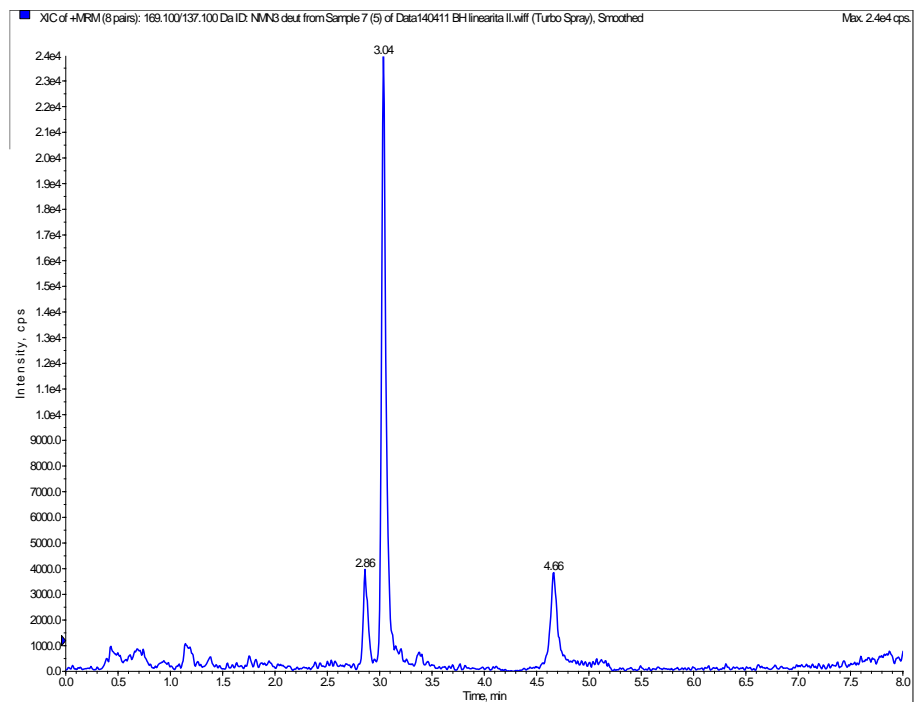
Optimalizace LC zahrnovala volbu vhodné kolony a mobilní fáze. Na základě provedených měření byla zvolena HILIC kolona. Kolona C18 byla vyloučena na základě příliš nízkého retenčního času, kdy se oba analyty nalézaly v oblasti mrtvého retenčního času (Obr. č. 30), pentafluorofenylová kolona byla vyloučen rovněž z důvodu nízkého retenčního času (Obr.č.31). Na koloně Synergi hydopropylar RP nebyl signál metanefrinů zaznamenán vůbec (Obr. č. 32).



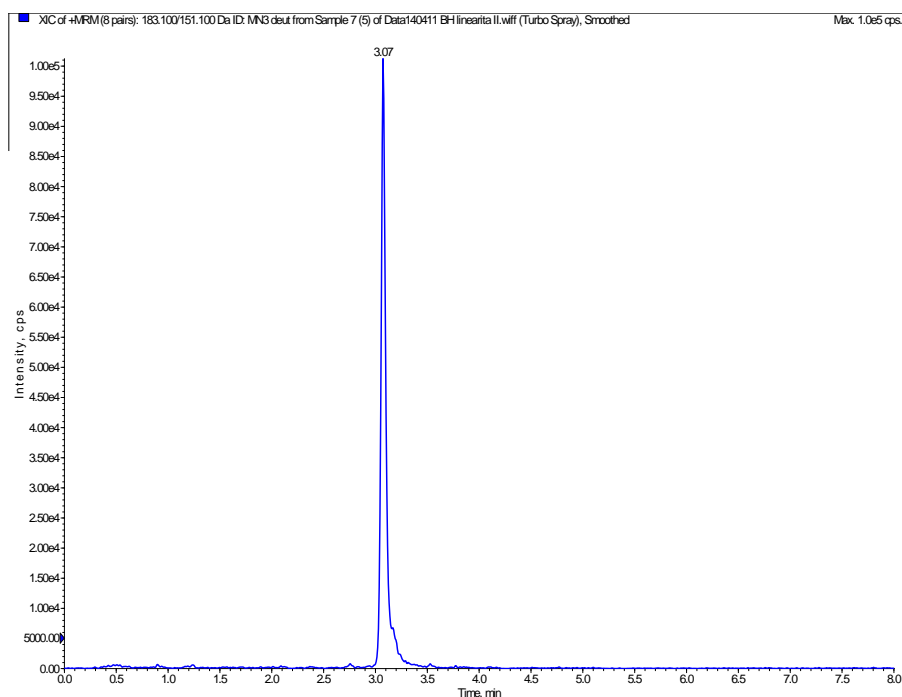
Obr.č. 26: pík normetanefrinu na HILIC koloně



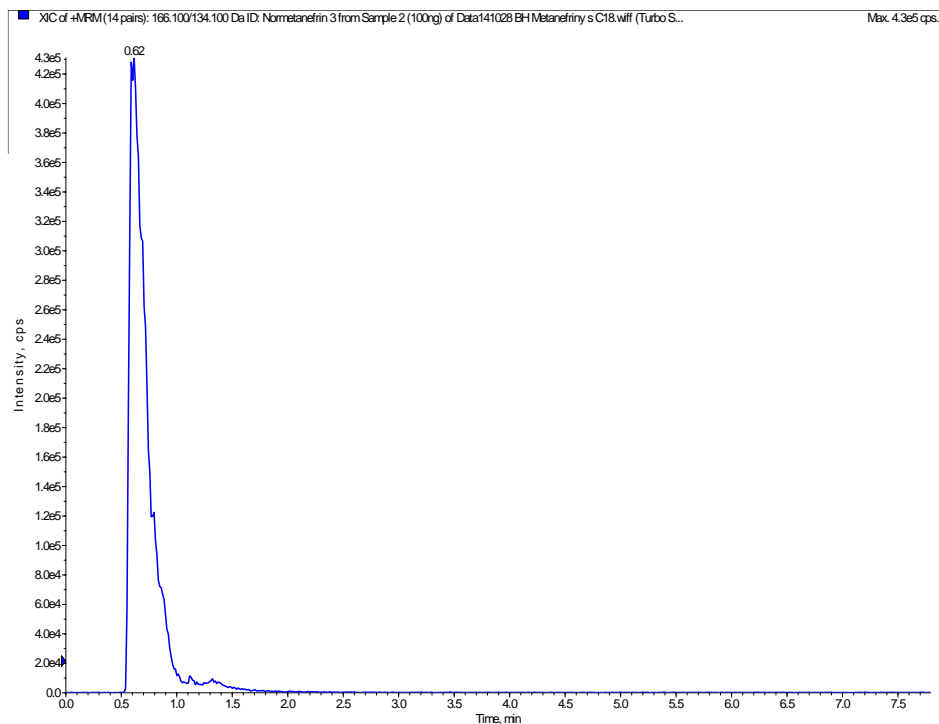
Obr.č. 27: pík metanefrinu na HILIC koloně



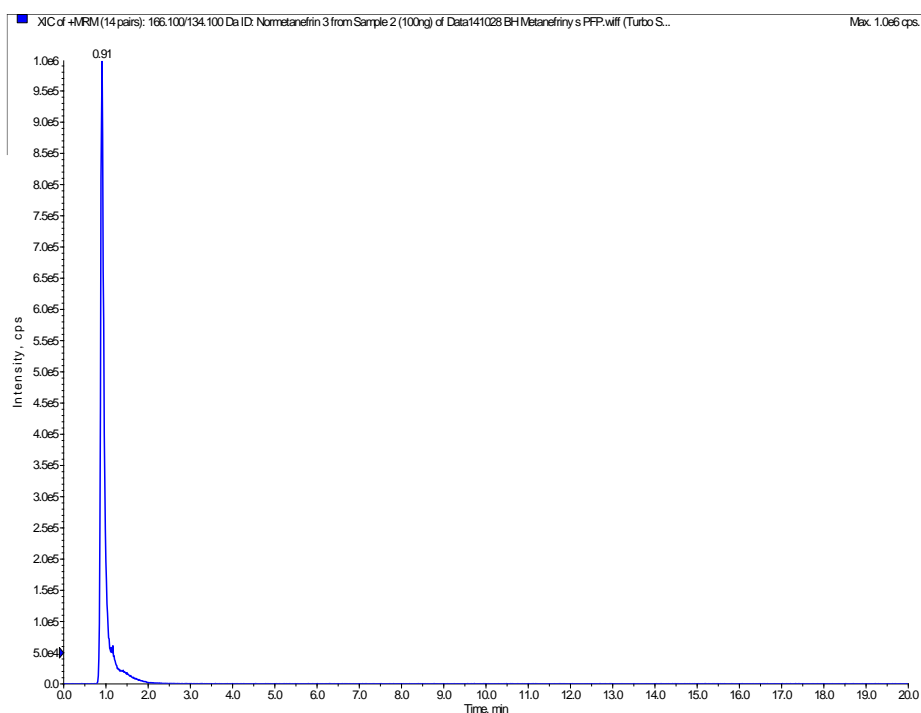
Obr.č. 28: pík deuterovaného normetanefrinu na HILIC koloně



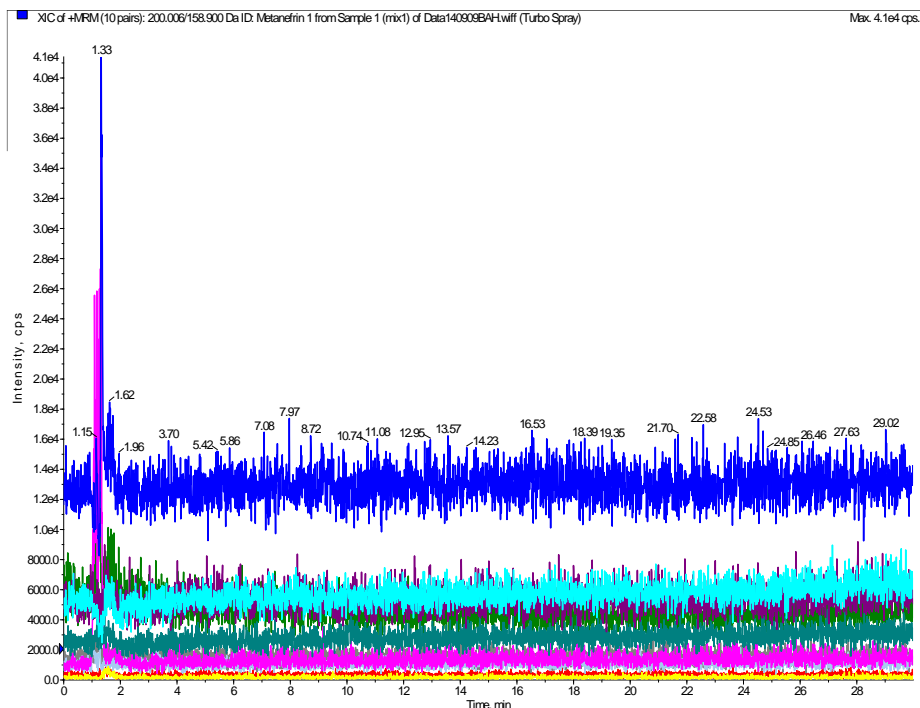
Obr.č. 29: pík deuterovaného metanefrinu na HILIC koloně



Obr.č. 30: pík normetanefrinu na C18 koloně



Obr.č. 31: pík normetanefrinu na pentafluorofenylové koloně



Obr.č. 32: záznam z kolony Synergi hydropolar RP

Z výše uvedených záznamů je patrné, že HILIC kolona oproti kolonám C18, pentafluorofenylové a Synergi hydropolar RP vykazovala neoptimálnější retenční čas a intenzitu signálu.

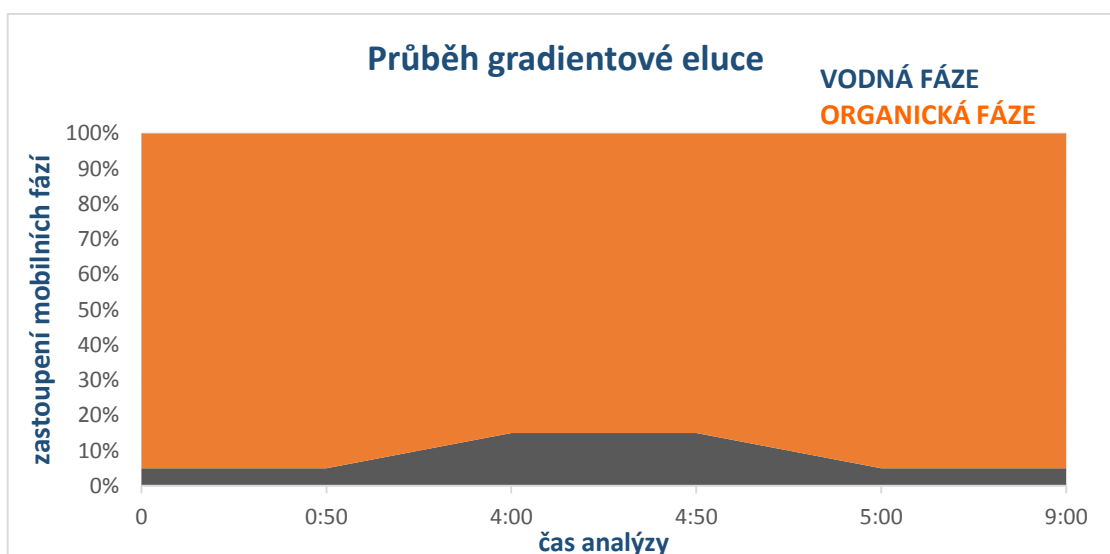
Dalším aspektem, který byl zohledněn při optimalizaci LC parametrů byla volba vhodné mobilní fáze a rozhodnutí, zda bude analýza probíhat při izokratické nebo gradientové eluci. Na základě provedených měření byla zvolena mobilní fáze o složení 5 mM mravenčan amonný/acetonitril za průběhu gradientové eluce. LC parametry jsou podrobně shrnuty v tabulkách 8 a 9. Průběh gradientové eluce je zaznamenán na obr. č. 33.

Tabulka č. 8: LC parametry

Mobilní fáze - složka A	5 mM mravenčan amonný
Mobilní fáze - složka B	acetonitril
Průtok	0,4 ml/min
Nástřik	10 µl
Teplota na koloně	35°C
Teplota v autosampleru	10°C
Eluce	gradientová

Tabulka č. 9: Průběh gradientové eluce

čas	A:B
0:00	5:95
0:50	5:95
4:00	15:85
4:50	15:85
5:00	5:95
8:00	5:95



Obr.č. 33: Grafické znázornění průběhu gradientové eluce

5.3. Optimalizace přípravy vzorku

5.3.1. Optimalizace přípravy vzorku moči

Byly zvažovány dva postupy na provedení hydrolýzy. Při prvním byla použita β -glukuronidasa a následná devadesátiminutová hydrolýza při 50°C. Vzorek byl poté ochlazen na laboratorní teplotu a pokračovalo se extrakcí na pevné fázi. Druhý typ hydrolýzy byl proveden pomocí 100 μ l kyseliny 6M kyseliny chlorovodíkové. Tento typ hydrolýzy probíhal 20 minut při teplotě 90°C. Vzorek byl následně ochlazen na laboratorní teplotu a zalkalizován hydroxidem draselným. Z výsledků provedených měření byla použita hydrolýza pomocí 6M kyseliny chlorovodíkové. Tento krok byl použit jak z hlediska časového, tak z hlediska výsledné intenzity signálu, neboť intenzity po provedení hydrolýzy β -glukuronidasou a 6M kyselinou chlorovodíkovou se významně nelišily. V úvahu byl rovněž brán aspekt ekonomický.

5.3.2. Optimalizace přípravy vzorku plazmy

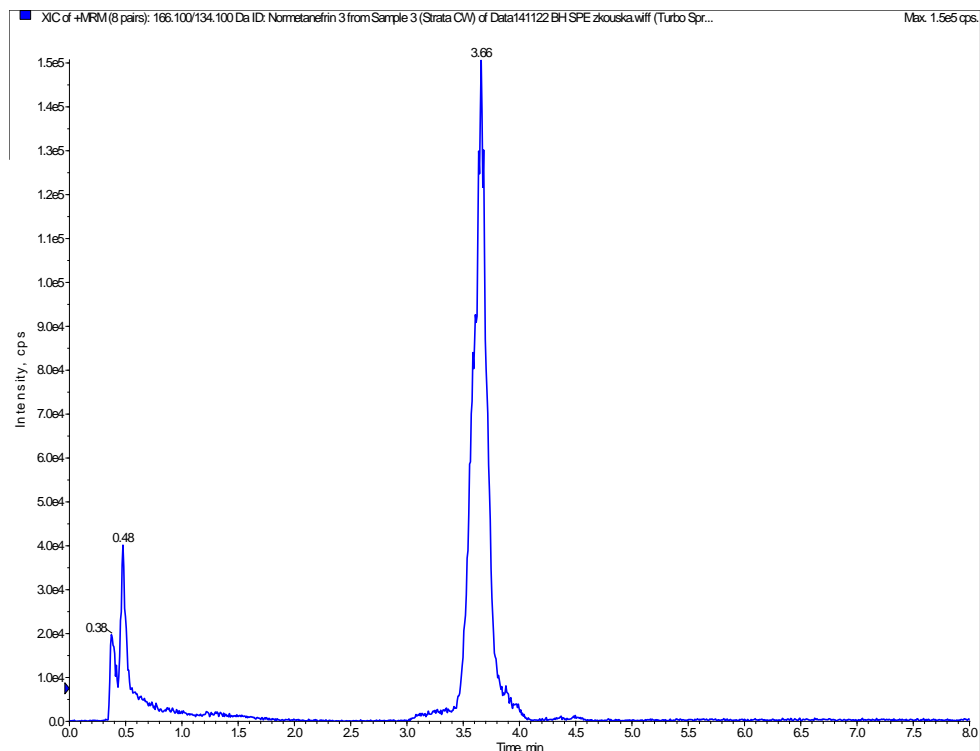
Vzhledem k vysoké labilitě metanefrinů v plazmě byl zvažován co nejkratší způsob manipulace se vzorkem. Vzorek byl uchováván v mrazáku při teplotě -20°C . Po vyjmutí z mrazáku byl vzorek pomalu rozpuštěn při laboratorní teplotě. Následně bylo do eppendorfky odebráno $300\mu\text{l}$ vzorku plazmy a dále bylo naspikováno $15\mu\text{l}$ deuterovaných standardů. Směs byla poté promíchána na vortexu, centrifugována ($13\,000\text{ ot./min}$ ($r=10\text{ cm}$)) a připravena na solid phase extrakci. K vzorku bylo pokusem přidáno i $100\mu\text{l}$ kyseliny trichloroctové jako precipitačního činidla, směs byla poté zvortexována a stočena. Na výsledném chromatogramu ale precipitace neměla vliv.

5.3.3. Příprava interního standardu

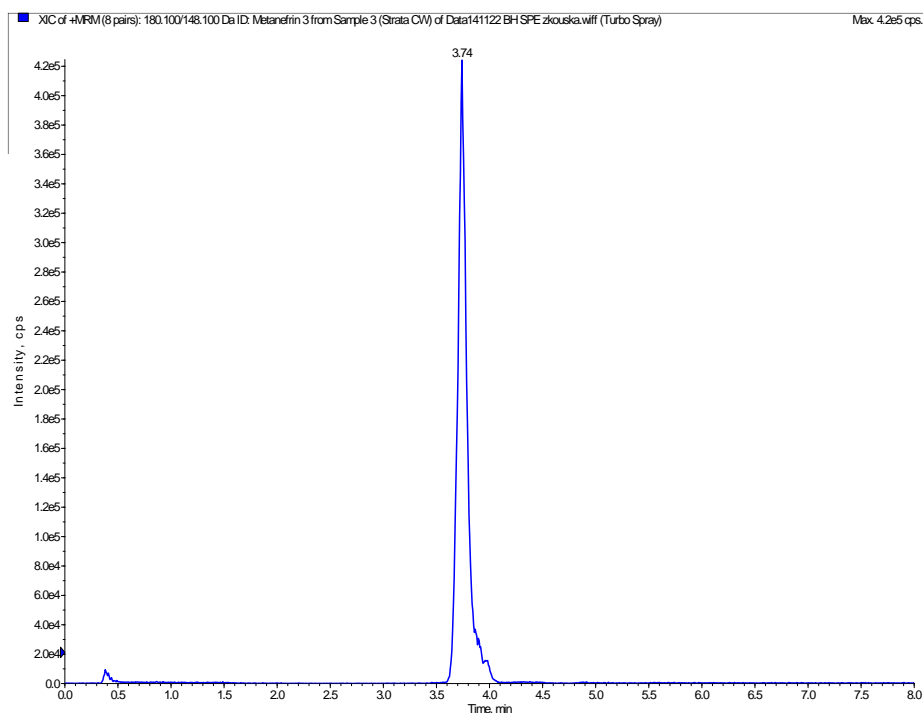
Jako interní standardy byly zvoleny deuterovaný metanefrin a deuterovaný metanefrin. Roztoky byly dodány v koncentraci 1 mg.ml^{-1} v roztoku methanolu. Tyto roztoky byly dále ředěny na cílovou koncentraci 100 ng.ml^{-1} , která byla poté spikována do vzorku po $15\mu\text{l}$. Ve výsledku se ale jako jediný interní standard používal deuterovaný metanefrin, poněvadž stabilita deuterovaného normetanefrinu byla příliš nízká a tudíž snižovala spolehlivost tohoto standardu.

5.3.4. Extrakce na pevné fázi (SPE)

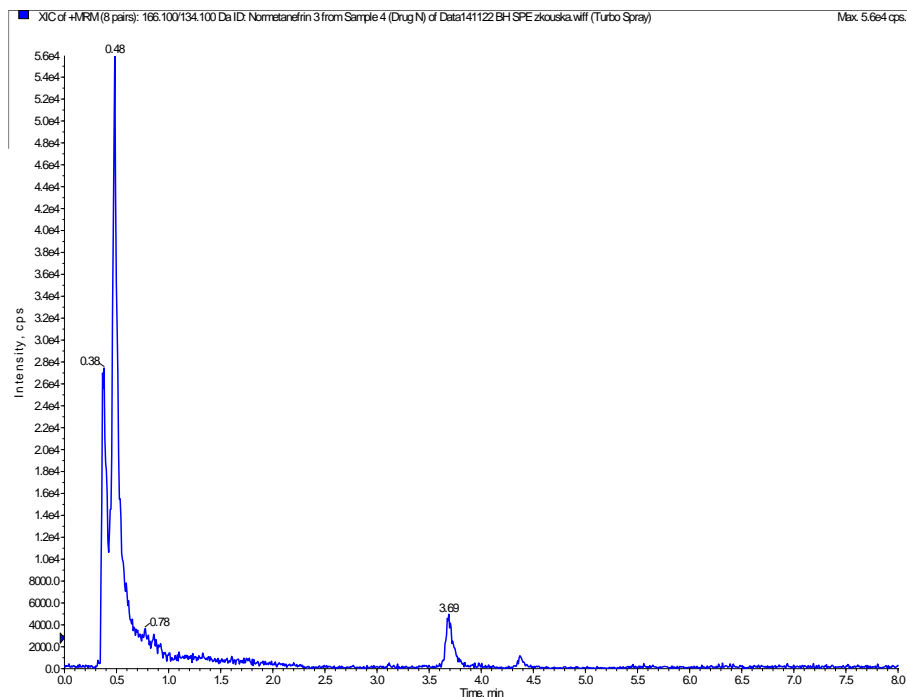
Po hydrolyze byla provedena extrakce na pevné fázi, kde byly vyzkoušeny extrakční kolony Strata X-CW (Obr.č. 34, 35), Drug N (Obr.č. 36,37), Drug B (Obr.č. 40,41) a Strata S-XC (Obr.č.38, 39) a Strata X-C (Obr. č. 42, 43). Postup pro extrakci na pevné fázi je již zmíněn v experimentální části a validačním protokolu. Při této příležitosti je ještě vhodné poznamenat, že rekonstituce musela být provedena mobilní fází. Byla rovněž provedena rekonstituce methanolem, která ale vedla k významnému štěpení píku, které je viditelné na obrázku č. 44.



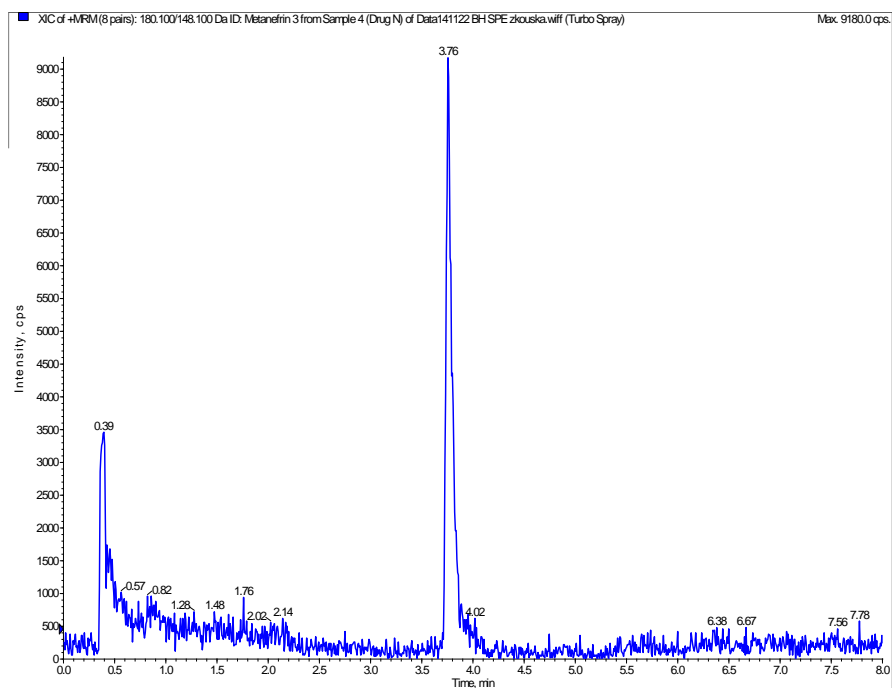
Obr.č. 34: pik normetanefrinu po SPE ekstrakci na kolonce Strata X-CW



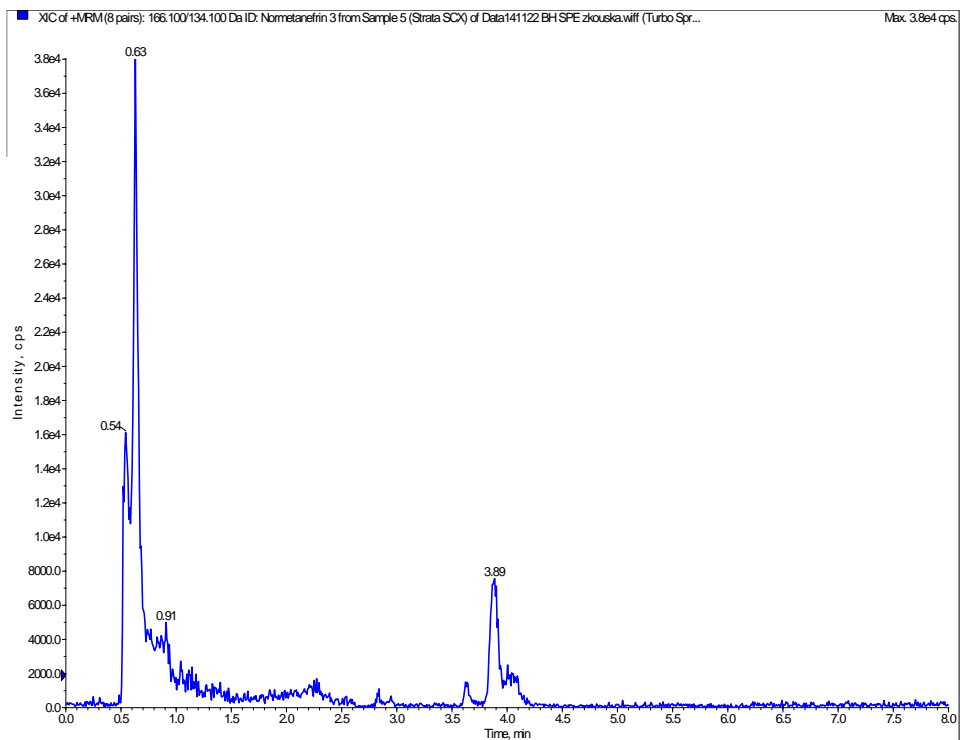
Obr.č. 35: pik metanefrinu po SPE ekstrakci na kolonce Strata X-CW



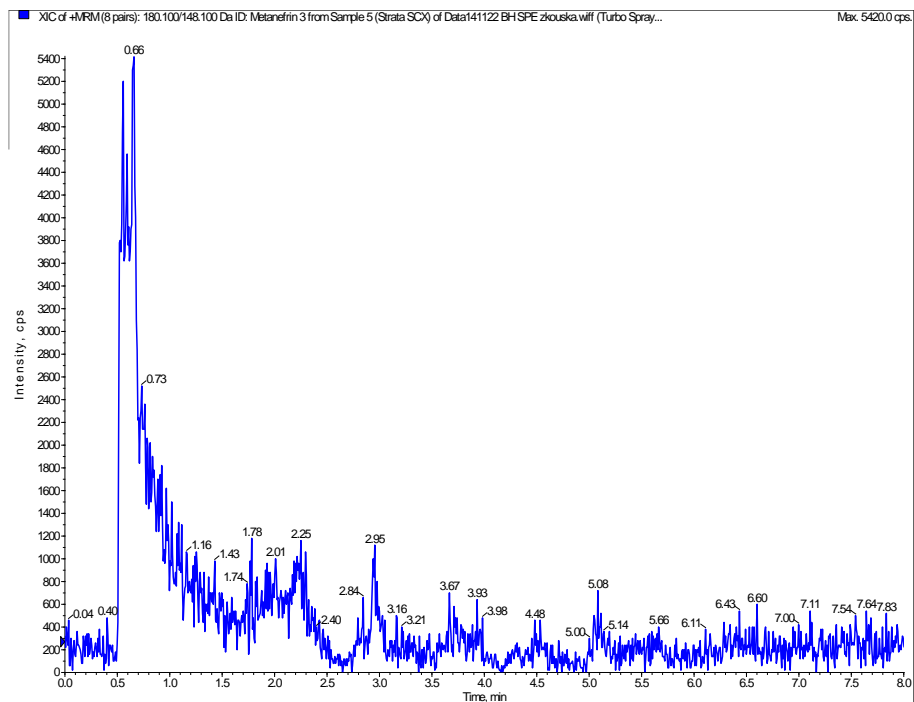
Obr.č. 36: *pík normetanefrinu po SPE exktrakci na kolonce Drug N*



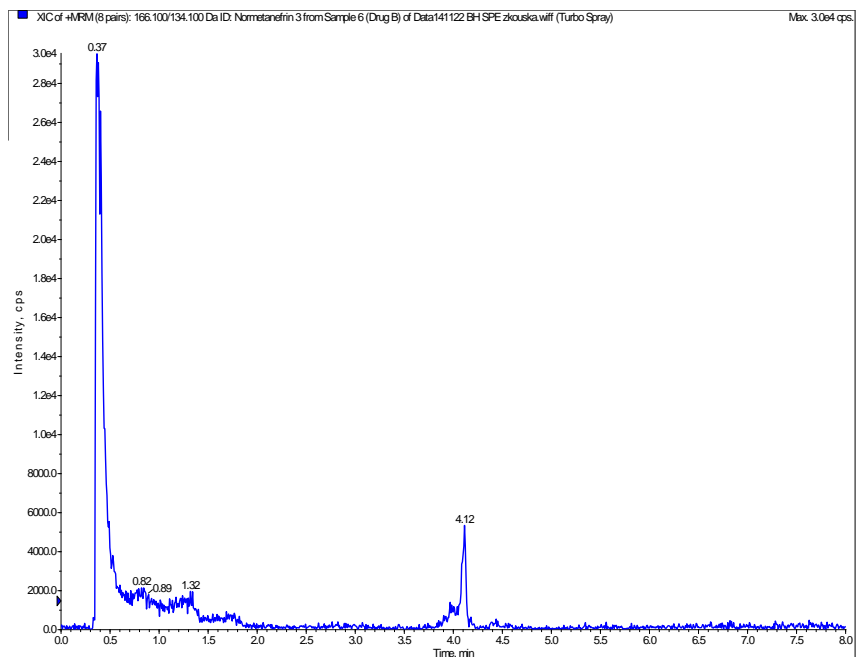
Obr.č. 37: *pík metanefrinu po SPE exktrakci na kolonce Drug N*



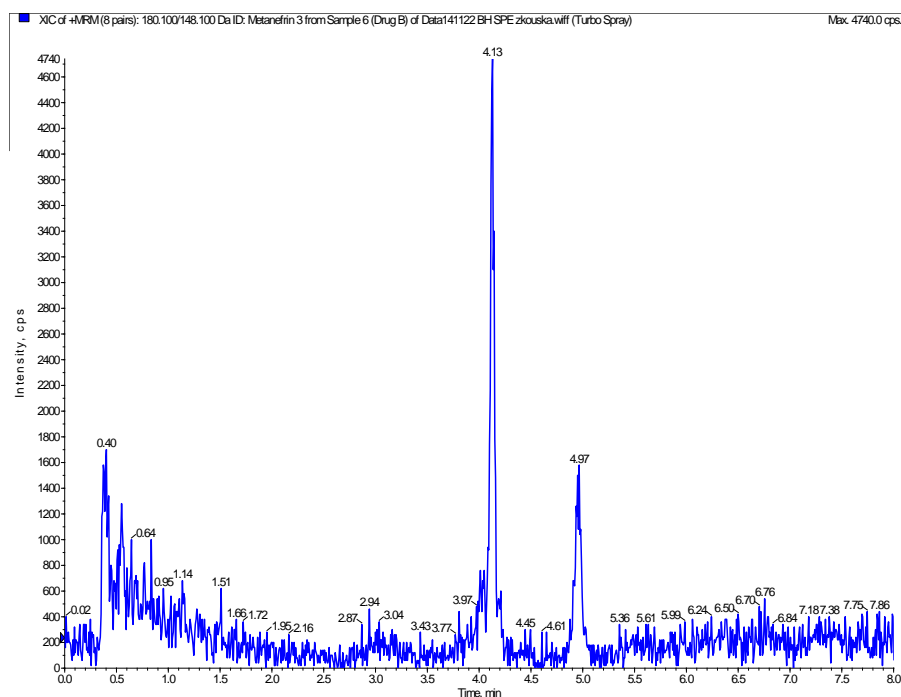
Obr.č. 38: pík normetanefrinu po SPE ekstrakci na kolonce Strata S-XC



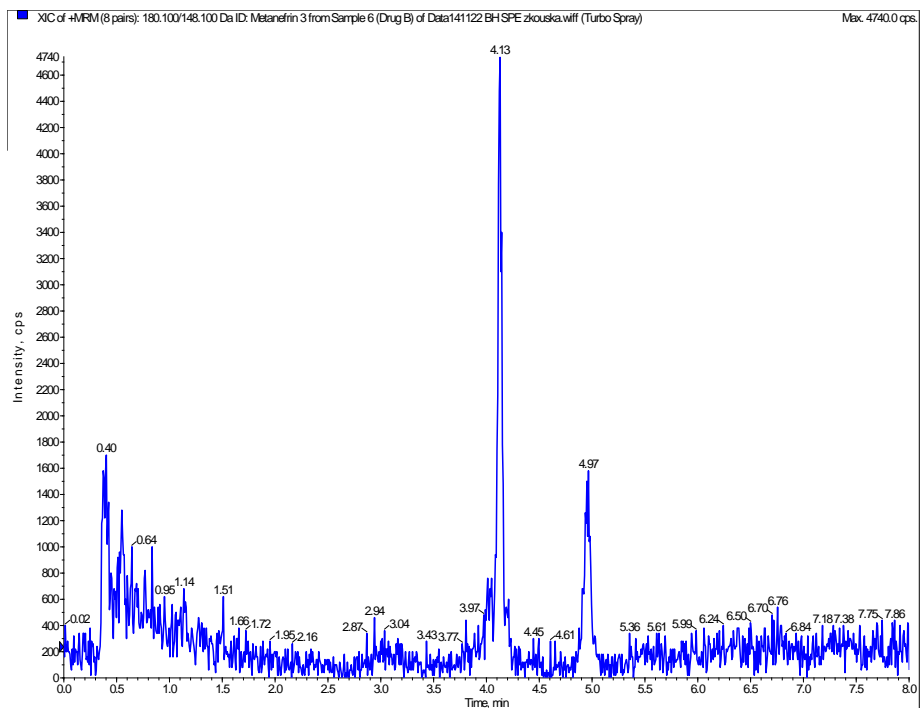
Obr.č. 39: pík metanefrinu po SPE ekstrakci na kolonce Strata S-XC



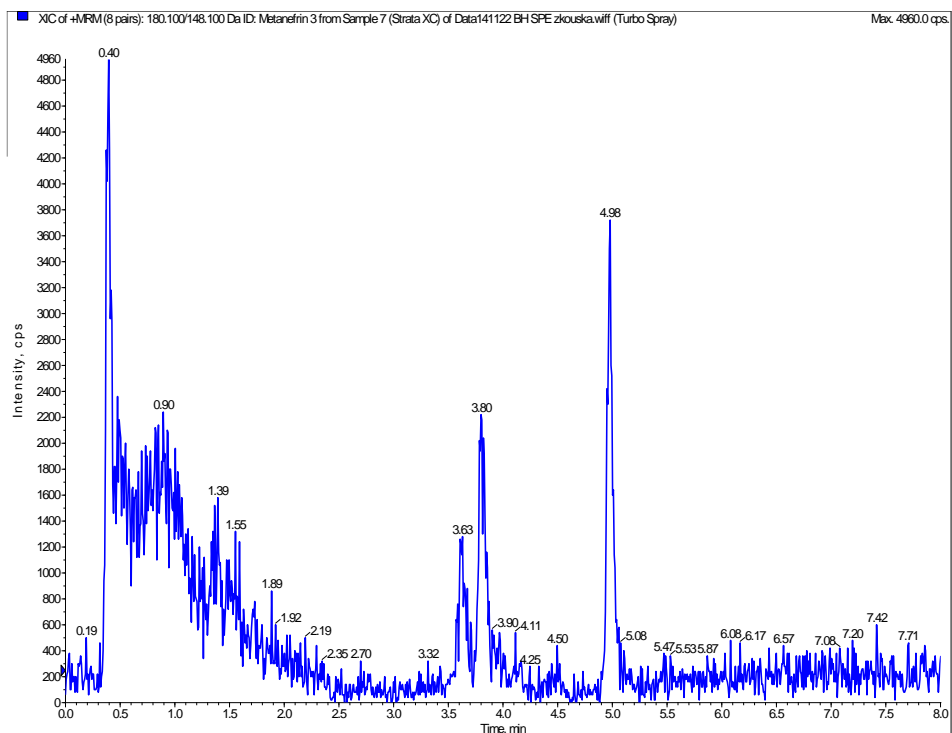
Obr.č. 40: pík normetanefrinu po SPE exktrakci na kolonce Drug B



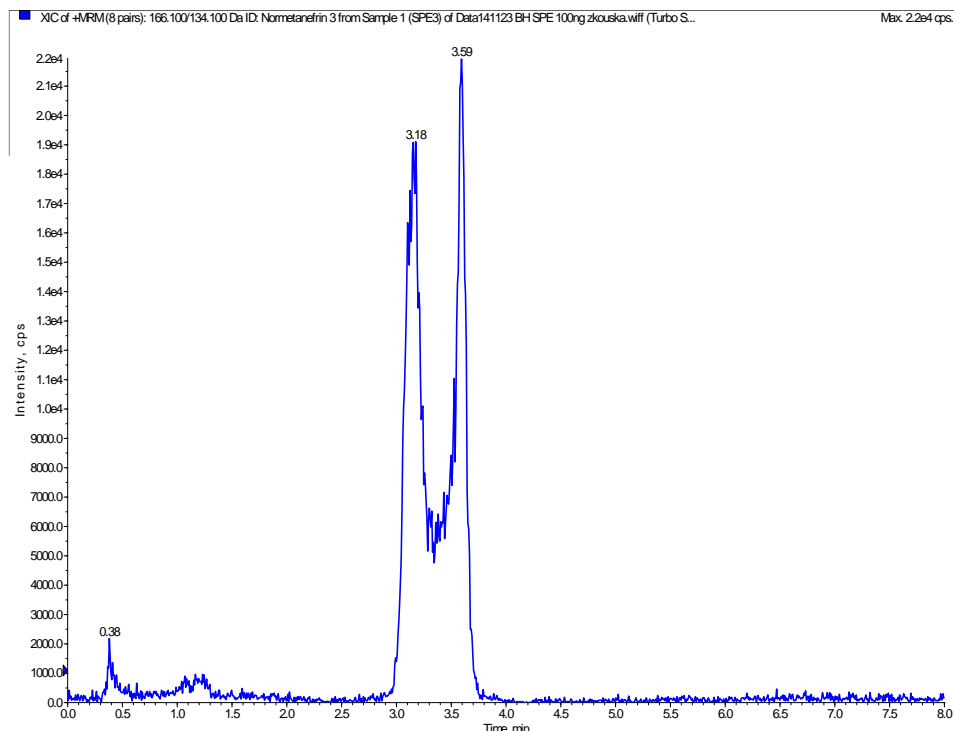
Obr.č. 41: pík metanefrinu po SPE exktrakci na kolonce Drug B



Obr.č. 42: Strata XC NMN



Obr.č. 43: Strata XC MN



Obr.č. 44: rekonstituce vzorku methanolem

Z výše uvedených záznamů je patrné, že k nejlepší extrakci docházelo na kolonce StrataX-CW. Na ostatních extrakčních kolonkách docházelo k viditelným štěpením píků nebo nedostatečným extrakcím analytu.

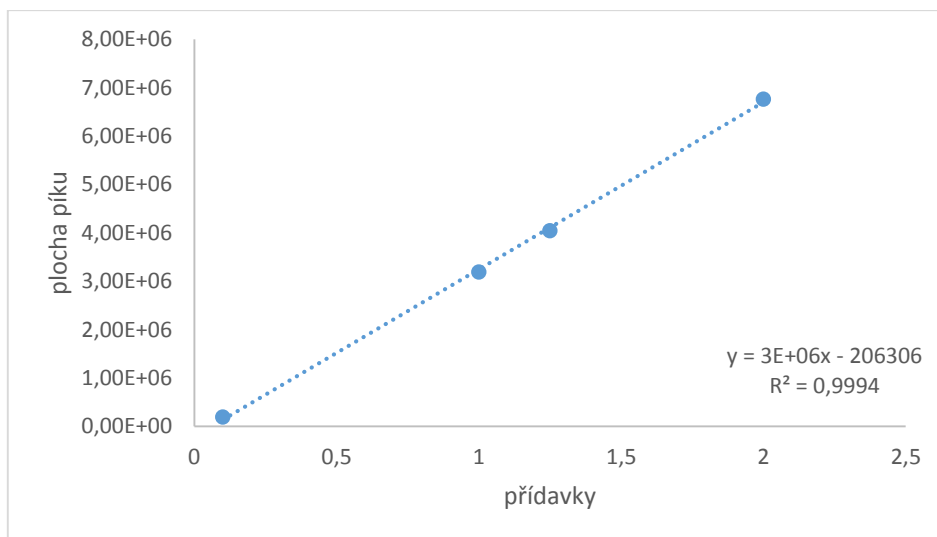
5.4. Výsledky validace – Močové metanefriny

5.4.1. Linearita

Bylo provedeno měření linearity. Linearita byla ověřena v koncentračním rozsahu 0,1L1, L1, 0,75L1 + 0,25L2, L2 (tab. č. 10, 11, Graf č. 1, 2). U linearity byla posuzována hodnota korelačního koeficientu, aby daná metoda splňovala všechny požadavky kladené na validaci metody, tj. hodnota korelačního koeficientu má být $R^2 \geq 0,99$.

Tab.č. 10: Koncentrační závislost plochy píku normetanefrinu na přidávkách

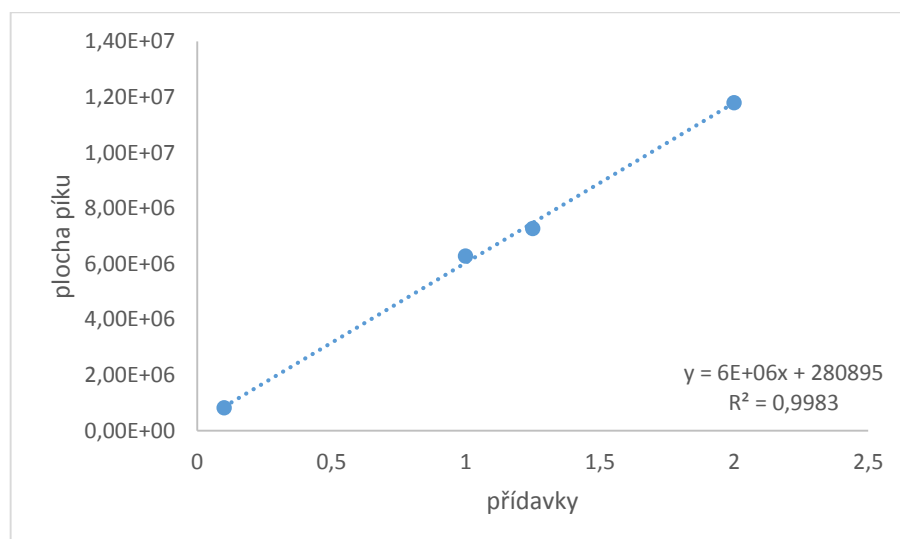
Přidavky	Plocha píku
0,1	1,93E+05
1	3,19E+06
1,25	4,05E+06
2	6,77E+06



Graf č. 1: Linearita normetanefrinu. Na grafu je uvedena závislost ploch na koncentraci normetanefrinu.

Tab.č. 11: Koncentrační závislost plochy píku metanefrinu na přidavcích

<i>Přidavky</i>	<i>Plocha píku</i>
0,1	8,08E+05
1	6,28E+06
1,25	7,26E+06
2	1,18E+07



Graf č. 2: Linearita metanefrinu. Na grafu je uvedena závislost ploch na koncentraci metanefrinu.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že hodnoty korelačního koeficientu pro normetanefrin a metanefrin splňují podmínku $R^2 \geq 0,99$, tedy metoda je lineární.

5.4.2. Vymezení hladin L1, L2, opakovatelnost, reprodukovatelnost

Opakovatelnost byla provedena změřením série 10 vzorků na hladinách L1 a L2 v průběhu jednoho dne za podmínek opakovatelnosti a změřením 10 vzorků v průběhu desíti dnů za podmínek reprodukovatelnosti. Míra přesnosti je poté vyjádřena hodnotou variačního koeficientu, Míru opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měření vyjadřuje hodnota variačního koeficientu $CV \leq 10\%$, míra správnosti je vyjádřena pomocí hodnoty $BIAS \leq 10\%$ a celková analytická TEa je dána hodnotou $TEa \leq 25$. Výsledky měření jsou podrobně shrnuty v tabulkách č. 12-35.

Tabulka č. 12: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L1 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedena data naměřená během jednoho dne

<i>Vzorek</i>	<i>koncentrace</i>	<i>bias</i>
1	283,5	12,5
2	308,2	37,2
3	301,6	30,6
4	274,2	3,2
5	297	26
6	280,4	9,4
7	293,7	22,7
8	304	33
9	290,4	19,4
10	281,4	10,4

Tabulka č. 13: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentracím normetanefrinu, hladiny L1 za podmínek opakovatelnosti: V tabulce jsou shrnuty výsledky dat naměřených během jednoho dne.

<i>počet výsledků (n)</i>	10
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	291,44
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	11,36
<i>Variační koeficient (CV)</i>	3,9
<i>referenční hodnota (RH)</i>	271
<i>Bias relativní (brel)</i>	7,5
<i>Uc,rel</i>	11%
<i>Výtěžnost</i>	107,5424
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	15,144

Tabulka č. 14: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L1 za podmínek reprodukovatelnosti.

V tabulce jsou uvedena data naměřená během desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	270,4	-0,6
2	292,2	21,2
3	313,2	41,2
4	308,8	37,8
5	286,1	15,1
6	299,4	28,4
7	246,9	-24,1
8	299,2	28,2
9	292,6	21,6
10	298,5	27,5

Tabulka č. 15: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L1 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	290,73
Směrodatná odchylka (SD)	19,44
Variační koeficient (CV)	6,7
referenční hodnota (RH)	271
Bias relativní (brel)	7,3
U_{c,rel}	15%
Výtěžnost	107,2804
Celková analytická chyba (Tea)	44,6024

Tabulka č. 16: Souhrn všech koncentrací normetanefrinu, hladiny LI. V tabulce jsou uvedena data z měření během jednoho dne a zároveň data naměřená během desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	283,5	12,5
2	318,2	47,2
3	311,8	40,8
4	308,8	37,8
5	327	56
6	310,4	39,4
7	293,7	22,7
8	304	33
9	290,4	19,4
10	281,4	10,4
11	270,4	-0,6
12	292,2	21,2
13	313,2	41,2
14	308,8	37,8
15	286,1	15,1
16	299,4	28,4
17	246,9	-24,1
18	299,2	28,2
19	292,6	21,6
20	298,5	27,5

Tabulka č. 17: Zhodnocení opakovatelnosti normetanefrinu, hladiny LI. V tabulce je uvedeno celkové zhodnocení dat, k jejichž naměření došlo v průběhu jednoho dne a zároveň dat, která byla porížena v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	291,09
Směrodatná odchylka (SD)	15,5
Variační koeficient (CV)	5,3
referenční hodnota (RH)	271
Bias relativní (brel)	7,4
Uc,rel	13%
nejistota průměru	1,70%
Výtěžnost	107,413
Celková analytická chyba (Tea)	17,788

Tabulka č. 18: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L1 za podmínek opakovatelnosti.

V tabulce jsou uvedena data naměřená během jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	141,9	-13,1
2	160,1	5,1
3	167,9	12,9
4	163,6	8,6
5	149,4	5,6
6	163,3	8,3
7	149	-6
8	168,4	13,4
9	167,1	12,1
10	171,4	16,4

Tabulka č. 19: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentracím metanefrinu, hladiny L1 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	160,21
Směrodatná odchylka (SD)	9,99
Variační koeficient (CV)	6,2
referenční hodnota (RH)	155
Bias relativní (brel)	3,4
Uc,rel	13%
Výtěžnost	103,3613
Celková analytická chyba (Tea)	22,9804

Tabulka č. 20: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L1 za podmínek reprodukovatelnosti.

V tabulce jsou uvedena data naměřená během desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	160,7	5,7
2	176,5	21,5
3	170,1	15,1
4	172	17
5	165,1	10,1
6	162,2	7,2
7	168,5	13,5
8	172,9	17,9
9	172,6	17,6
10	177,2	22,2

Tabulka č. 21: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentraci metanefrinu, hladiny L1 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	169,78
Směrodatná odchylka (SD)	5,64
Variační koeficient (CV)	3,3
referenční hodnota (RH)	155
Bias relativní (brel)	9,5
Uc,rel	12%
Výtěžnost	109,5355
Celková analytická chyba (Tea)	15,968

Tabulka č. 22: Souhrn všech koncentrací metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu jednoho dne a zároveň v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	141,9	-13,1
2	160,1	5,1
3	167,9	12,9
4	163,6	8,6
5	149,4	5,6
6	163,3	8,3
7	149	-6
8	168,4	13,4
9	167,1	12,1
10	171,4	16,4
11	160,7	5,7
12	176,5	21,5
13	170,1	15,1
14	172	17
15	165,1	10,1
16	162,2	7,2
17	168,5	13,5
18	172,9	17,9
19	172,6	17,6
20	177,2	22,2

Tabulka č. 23: Zhodnocení opakovatelnosti metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne a zároveň během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	165
Směrodatná odchylka (SD)	9,3
Variační koeficient (CV)	5,6
referenční hodnota (RH)	155
Bias relativní (brel)	6,5
Uc,rel	18%
nejistota průměru	7
Výtěžnost	106,4516
Celková analytická chyba (Tea)	17,476

Tabulka č. 24: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L2 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedena data naměřená během jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	877,6	-69,4
2	1091,2	144
3	840,7	106,3
4	1114,7	167,7
5	898,7	-48,3
6	957,5	10,5
7	987,3	40,3
8	920,7	-26,3
9	986,1	39,1
10	877	-70

Tabulka č. 25: Souhrn výsledků vztažených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L2 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	955,15
Směrodatná odchylka (SD)	91,63
Variační koeficient (CV)	9,6
referenční hodnota (RH)	947
Bias relativní (brel)	0,9
Uc,rel	19%
Výtěžnost	100,8606
Celková analytická chyba (Tea)	19,716

Tabulka č. 26: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti.

V tabulce jsou uvedeny výsledky dat, naměřených v průběhu deseti dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	901,9	45,1
2	841,3	-105,7
3	849	-125
4	854,6	-92,4
5	863,8	-83,2
6	898,5	-48,5
7	863,9	-83,1
8	864,4	-82,6
9	829	-118
10	838,4	-108,6

Tabulka č. 27: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	860,48
Směrodatná odchylka (SD)	24,06
Variační koeficient (CV)	2,8
referenční hodnota (RH)	947
Bias relativní (brel)	-9,1
Uc,rel	11%
Výtěžnost	90,86378
Celková analytická chyba (Tea)	14,588

Tabulka č. 28: Souhrn všech koncentrací normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená během jednoho dne a zároveň data naměřená během desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	877,6	-69,4
2	1091,2	144
3	840,7	106,3
4	1114,7	167,7
5	898,7	-48,3
6	957,5	10,5
7	987,3	40,3
8	920,7	-26,3
9	986,1	39,1
10	877	-70
11	901,9	45,1
12	841,3	-105,7
13	849	-125
14	854,6	-92,4
15	863,8	-83,2
16	898,5	-48,5
17	863,9	-83,1
18	864,4	-82,6
19	829	-118
20	838,4	-108,6

Tabulka č. 29: Zhodnocení opakovatelnosti normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených během jednoho dne a zároveň během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	907,82
Směrodatná odchylka (SD)	81,3
Variační koeficient (CV)	9
referenční hodnota (RH)	947
Bias relativní (brel)	-4,1
Uc,rel	19%
nejistota průměru	1,3
Výtěžnost	95,86272
Celková analytická chyba (Tea)	21,74

Tabulka č. 30: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L2 za podmínek opakovatelnosti.

V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	320,7	21,3
2	366,7	24,7
3	346,3	4,3
4	340,5	-1,5
5	328,5	-13,5
6	325	-17
7	321,5	-20,5
8	385,7	43,7
9	356,2	14,2
10	346,6	4,6

Tabulka č. 31: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentracím metanefrinu, hladiny L2 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	343,77
Směrodatná odchylka (SD)	21,28
Variační koeficient (CV)	6,2
referenční hodnota (RH)	342
Bias relativní (brel)	0,5
Uc,rel	12%
Výtěžnost	100,5175
Celková analytická chyba	12,652

Tabulka č. 32: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti.

V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	397,3	55,3
2	362,1	20,1
3	357,4	15,4
4	355,8	13,8
5	341,7	-0,3
6	316,6	-25,4
7	381,5	39,5
8	400,8	58,8
9	341	-1
10	342,5	0,5

Tabulka č. 33: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentraci metanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	359,67
Směrodatná odchylka (SD)	26,73
Variační koeficient (CV)	7,4
referenční hodnota (RH)	342
Bias relativní (brel)	5,2
Uc,rel	16%
Výtěžnost	105,1667
Celková analytická chyba	19,704

Tabulka č. 34: Souhrn všech koncentrací metanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených během jednoho dne a dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	320,7	21,3
2	366,7	24,7
3	346,3	4,3
4	340,5	-1,5
5	328,5	-13,5
6	325	-17
7	321,5	-20,5
8	385,7	43,7
9	356,2	14,2
10	346,6	4,6
11	397,3	55,3
12	362,1	20,1
13	357,4	15,4
14	355,8	13,8
15	341,7	-0,3
16	316,6	-25,4
17	381,5	39,5
18	400,8	58,8
19	341	-1
20	342,5	0,5

Tabulka č. 35: Zhodnocení opakovatelnosti metanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených během jednoho dne a zároveň během desíti jednotlivých dnů.

<i>počet výsledků (n)</i>	20
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	351,72
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	24,89
<i>Variační koeficient (CV)</i>	7,1
<i>referenční hodnota (RH)</i>	342
<i>Bias relativní (brel)</i>	2,8
<i>Uc,rel</i>	16%
<i>nejistota průměru</i>	3,3
<i>Výtěžnost</i>	102,8421
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	16,716

Bylo provedeno ověření opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že hodnoty CV, BIAS a TEa nepřevyšují maximální povolené hodnoty a jsou tedy plně vyhovující pro klinické účely, tedy splňují nároky kladené ČSKB pro validaci in house laboratorních metod. Variační koeficient ani v jednom případě nepřekročil hodnotu 10%, hodnota BIAS nikdy nepřekročila hranici 10% a celková analytická chyba byla vždy pod hodnotou 25%.

5.4.3. Mezilehlá preciznost

Mezilehlá preciznost byla provedena změřením série 10 vzorků na hladinách L1 a L2 v průběhu jednoho dne a změřením 10 vzorků v průběhu desíti dnů. Míru preciznosti měření vyjadřuje hodnota variačního koeficientu, správnost měření je pak dána hodnotou BIAS. Dle platného doporučení ČSKB pro in house vyvinuté metody je kladen důraz na to, aby byla hodnota variačního koeficientu $CV \leq 10\%$, hodnota BIAS $\leq 10\%$ a hodnota celkové analytické chyby nepřekročila 25%. Výsledky měření jsou podrobně shrnuty v tabulkách č. 36-59.

Tabulka č. 36: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L1, naměřených během jednoho dne (intraday)

<i>Vzorek</i>	<i>koncentrace</i>	<i>bias</i>
1	260,5	-10,5
2	298,1	27,1
3	259	-12
4	270,6	-0,4
5	268	-3
6	259,2	-11,8
7	230,5	-40,5
8	283,8	12,8
9	255,2	-15,8
10	263,9	-7,1

Tabulka č. 37: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentracím normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedena data naměřená během jednoho dne.

<i>počet výsledků (n)</i>	10
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	264,88
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	17,85
<i>Variační koeficient (CV)</i>	6,7
<i>referenční hodnota (RH)</i>	271
<i>Bias relativní (brel)</i>	-2,3
<i>Uc,rel</i>	14%
<i>Výtěžnost</i>	97,7417
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	15,432

Tabulka č. 38: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu deseti dnů.

<i>Vzorek</i>	<i>koncentrace</i>	<i>bias</i>
1	277,9	6,9
2	272,3	1,3
3	253,6	-17,4
4	278	7
5	273,2	2,2
6	244,3	-26,7
7	244,9	-26,1
8	237,7	-33,3
9	253,9	-17,1
10	273,1	2,1

Tabulka č. 39: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	260,89
Směrodatná odchylka (SD)	15,58
Variační koeficient (CV)	6
referenční hodnota (RH)	271
Bias relativní (brel)	-3,7
Uc,rel	13%
Výtěžnost	96,2694
Celková analytická chyba (Tea)	15,46

Tabulka č. 40: Souhrn všech koncentrací normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených během jednoho dne a zároveň během desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	260,5	-10,5
2	298,1	27,1
3	259	-12
4	270,6	-0,4
5	268	-3
6	259,2	-11,8
7	230,5	-40,5
8	283,8	12,8
9	255,2	-15,8
10	263,9	-7,1
11	277,9	6,9
12	272,3	1,3
13	253,6	-17,4
14	278	7
15	273,2	2,2
16	244,3	-26,7
17	244,9	-26,1
18	237,7	-33,3
19	253,9	-17,1
20	273,1	2,1

Tabulka č. 41: Zhodnocení opakovatelnosti normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených během jednoho dne a zároveň během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	262,89
Směrodatná odchylka (SD)	16,43
Variační koeficient (CV)	6,3
referenční hodnota (RH)	271
Bias relativní (brel)	-3
Uc,rel	15%
nejistota průměru	4,4
Výtěžnost	97,0074
Celková analytická chyba (Tea)	16,748

Tabulka č. 42: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn dat, naměřených během jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	157,1	-7,9
2	168,2	3,2
3	155,6	-9,4
4	153,8	-11,2
5	160,9	-4,1
6	162,1	-2,9
7	149,4	-15,6
8	167,2	2,2
9	166,1	1,1
10	168,5	3,5

Tabulka č. 43: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentracím metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	160,89
Směrodatná odchylka (SD)	6,70
Variační koeficient (CV)	4,2
referenční hodnota (RH)	165
Bias relativní (brel)	-2,5
Uc,rel	9%
Výtěžnost	97,5091
Celková analytická chyba (Tea)	10,732

Tabulka č. 44: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	167,3	2,3
2	155,1	-9,9
3	167,2	2,2
4	165,9	0,9
5	164,4	-0,6
6	159,4	-5,6
7	161,7	-3,3
8	157,5	-7,5
9	168,8	3,8
10	168,9	3,9

Tabulka č. 45: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	163,62
Směrodatná odchylka (SD)	4,93
Variační koeficient (CV)	3
referenční hodnota (RH)	165
Bias relativní (brel)	-0,8
Uc,rel	6%
Výtěžnost	99,1636
Celková analytická chyba (Tea)	6,68

Tabulka č. 46: Souhrn všech koncentrací metanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň v průběhu desíti jednotlivých dnů.

<i>Vzorek</i>	<i>koncentrace</i>	<i>bias</i>
1	157,1	-7,9
2	168,2	3,2
3	155,6	-9,4
4	153,8	-11,2
5	160,9	-4,1
6	162,1	-2,9
7	149,4	-15,6
8	167,2	2,2
9	166,1	1,1
10	168,5	3,5
11	167,3	2,3
12	155,1	-9,9
13	167,2	2,2
14	165,9	0,9
15	164,4	-0,6
16	159,4	-5,6
17	161,7	-3,3
18	157,5	-7,5
19	168,8	3,8
20	168,9	3,9

Tabulka č. 47: Zhodnocení opakovatelnosti metanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených během jednoho dne a zároveň během desíti jednotlivých dnů.

<i>počet výsledků (n)</i>	20
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	162,26
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	5,89
<i>Variační koeficient (CV)</i>	3,6
<i>referenční hodnota (RH)</i>	165
<i>Bias relativní (brel)</i>	-1,7
<i>Uc,rel</i>	16%
<i>nejistota průměru</i>	7,1
<i>Výtěžnost</i>	98,3394
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	14,156

Tabulka č. 48: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu jednoho dne.

<i>Vzorek</i>	<i>koncentrace</i>	<i>bias</i>
1	996,7	49,7
2	951,5	4,5
3	891,5	-55,5
4	908,1	-38,9
5	966,6	19,6
6	842,4	-104,6
7	1015,2	68,2
8	839,3	-107,7
9	905,9	-41,1
10	915	-32

Tabulka č. 49: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentracím normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

<i>počet výsledků (n)</i>	10
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	923,22
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	59,37
<i>Variační koeficient (CV)</i>	6,4
<i>referenční hodnota (RH)</i>	947
<i>Bias relativní (brel)</i>	-2,5
<i>Uc,rel</i>	13%
<i>Výtěžnost</i>	97,4889
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	15,044

Tabulka č. 50: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

<i>Vzorek</i>	<i>koncentrace</i>	<i>bias</i>
1	860,9	-86,1
2	969,4	22,4
3	861,7	-85,3
4	864,9	-82,1
5	885,5	-61,5
6	853,4	-93,6
7	870,5	-76,5
8	840,7	-106,3
9	872,8	-74,2
10	995,1	48,1

Tabulka č. 51: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	887,49
Směrodatná odchylka (SD)	51,67
Variační koeficient (CV)	5,8
referenční hodnota (RH)	947
Bias relativní (brel)	-6,3
Uc,rel	13%
Výtěžnost	93,7159
Celková analytická chyba (Tea)	17,668

Tabulka č. 52: Souhrn všech koncentrací normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	996,7	49,7
2	951,5	4,5
3	891,5	-55,5
4	908,1	-38,9
5	966,6	19,6
6	842,4	-104,6
7	1015,2	68,2
8	839,3	-107,7
9	905,9	-41,1
10	915	-32
11	860,9	-86,1
12	969,4	22,4
13	861,7	-85,3
14	864,9	-82,1
15	885,5	-61,5
16	853,4	-93,6
17	870,5	-76,5
18	840,7	-106,3
19	872,8	-74,2
20	995,1	48,1

Tabulka č. 53: Zhodnocení opakovatelnosti normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených během jednoho dne a zároveň během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	905,3
Směrodatná odchylka (SD)	57,19
Variační koeficient (CV)	6,3
referenční hodnota (RH)	947
Bias relativní (brel)	-4,4
Uc,rel	14%
nejistota průměru	1,3
Výtěžnost	95,5966
Celková analytická chyba (Tea)	16,748

Tabulka č. 54: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená během jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	384,3	42,3
2	301,4	-40,6
3	328,6	-13,4
4	362,5	20,5
5	310,5	-31,5
6	334,5	-7,5
7	326,3	-15,7
8	322,8	-19,2
9	330,4	-11,6
10	324,3	-17,7

Tabulka č. 55: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentracím metanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených během jednoho dne.

<i>počet výsledků (n)</i>	10
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	332,56
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	24,17
<i>Variační koeficient (CV)</i>	7,3
<i>referenční hodnota (RH)</i>	342
<i>Bias relativní (brel)</i>	-2,8
<i>Uc,rel</i>	15%
<i>nejistota průměru</i>	
<i>Výtěžnost</i>	97,23976608
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	17,108

Tabulka č. 56: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

<i>Vzorek</i>	<i>koncentrace</i>	<i>bias</i>
1	336,4	-5,6
2	326,4	-15,6
3	330,2	-11,8
4	300,1	-41,9
5	318,6	-23,4
6	289,7	-52,3
7	329,3	-12,7
8	298,1	-43,9
9	339,5	-2,5
10	365	23

Tabulka č. 57: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci metanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

<i>počet výsledků (n)</i>	10
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	323,33
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	22,58
<i>Variační koeficient (CV)</i>	7
<i>referenční hodnota (RH)</i>	342
<i>Bias relativní (brel)</i>	-5,5
<i>Uc,rel</i>	15%
<i>nejistota průměru</i>	
<i>Výtěžnost</i>	94,54093567
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	19,22

Tabulka č. 58: Souhrn všech koncentrací metanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	384,3	42,3
2	301,4	-40,6
3	328,6	-13,4
4	362,5	20,5
5	310,5	-31,5
6	334,5	-7,5
7	326,3	-15,7
8	322,8	-19,2
9	330,4	-11,6
10	324,3	-17,7
11	336,4	-5,6
12	326,4	-15,6
13	330,2	-11,8
14	300,1	-41,9
15	318,6	-23,4
16	289,7	-52,3
17	329,3	-12,7
18	298,1	-43,9
19	339,5	-2,5
20	365	23

Tabulka č. 59: Zhodnocení opakovatelnosti metanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	327,95
Směrodatná odchylka (SD)	23,25
Variační koeficient (CV)	7,1
referenční hodnota (RH)	342
Bias relativní (brel)	-4,1
Uc,rel	16%
nejistota průměru	3,5
Výtěžnost	95,8918
Celková analytická chyba (Tea)	18,016

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že hodnoty CV, BIAS a TEa nepřevyšují maximální povolené hodnoty a jsou tedy plně vyhovující pro klinické účely, tedy splňují nároky kladené

ČSKB pro validaci in house laboratorních metod. Variační koeficient ani v jednom případě nepřekročil hodnotu 10%, hodnota BIAS nikdy nepřekročila hranici 10% a celková analytická chyba byla vždy pod hodnotou 25%.

5.4.4. Limit detekce a limit kvantifikace

Měřením bylo zjištěno, že se limit detekce nachází při koncentraci 3,82 nmol.l⁻¹ pro normetanefrin a 2,54 nmol.l⁻¹ pro metanefrin. Dále bylo měřením zjištěno, že limitem kvantifikace je 10,91 nmol.l⁻¹ pro normetanefrin a 7,605 nmol.l⁻¹ pro metanefrin.

5.5. Výsledky validace – Plazmatické metanefriny

Ve srovnání stanovení metanefrinů v moči bylo stanovení plazmatických metanefrinů obtížnější z důvodu absence certifikovaného referenčního materiálu a tím i referenčního rozmezí. Referenční materiál i referenční rozmezí tedy musely být vytvořeny in house.

5.5.1. Linearita

Vzhledem k absenci vhodného certifikovaného referenčního materiálu, u nějž by pro účely této práce byla zajištěna metrologická návaznost, jsem připravila kalibrační a kontrolní materiál následujícím způsobem. K plazmě byl přidáván standard metanefrinu a normetanefrinu, přičemž byly zvoleny přídavky 10, 100 a 1000 ng.ml⁻¹. Následně byla sestrojena kalibrační křivka a vypočítána rovnice lineární regrese závislosti poměru plochy píku v retenčním čase analytu k ploše interního standardu na koncentraci přídavků analytu. Průsečík regresní přímky s koncentrační osou udává zápornou hodnotu koncentrace analytu ve zkoumaném vzorku.

Rovnice regresní přímky:

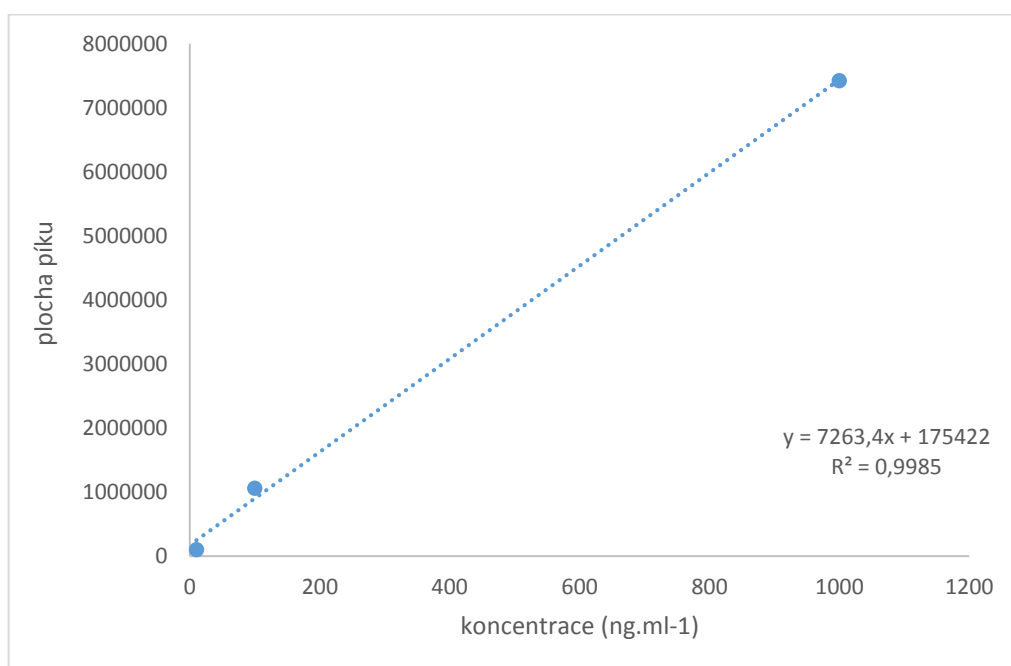
$$A v / IS V = a * c (analyt MNF, NMNF) + b$$

faktor spolehlivosti $R^2 = 0,99$

Bylo provedeno měření linearity. Linearita byla ověřena v koncentračním rozsahu hladin L1 – L3, tedy byly vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci 10 ng.ml⁻¹, 100 ng.ml⁻¹ a 1 µg.ml⁻¹ (tab.č. 60, 61). U linearity byla posuzována hodnota korelačního koeficientu, aby daná metoda splňovala všechny požadavky kladené na validaci metody, tj. hodnota korelačního koeficientu má být $R^2 \geq 0,99$.

Tabulka č. 60: Závislost plochy píku na koncentraci vzorku

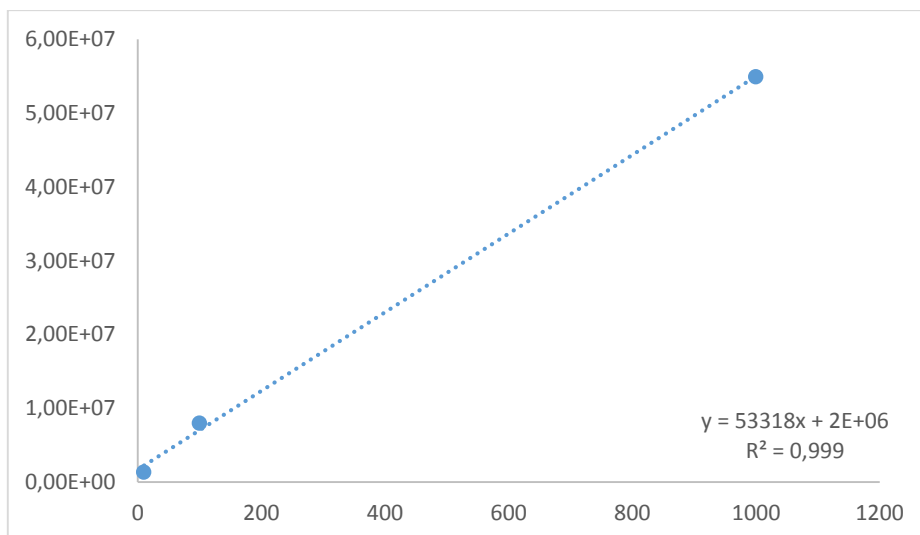
<i>koncentrace (ng.ml-1)</i>	<i>Průměrná plocha píku</i>
10	101371
100	1063120
1000	7424200



Graf č. 3: Zhodnocení linearity normetanefrinu. V grafu je znázorněna závislost plochy píku na koncentraci vzorku.

Tab. č. 61: Závislost plochy píku na koncentraci vzorku

<i>koncentrace (ng.ml-1)</i>	<i>Průměrná plocha píku</i>
10	1,38E+06
100	7,99E+06
1000	5,49E+07



Graf č. 4: Zhodnocení linearity metanefrinu. V grafu je znázorněna závislost plochy píku na koncentraci vzorku.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že hodnoty korelačních koeficientů R^2 ani v jednom případě neklesly pod hodnotu 0,99, tedy metoda je lineární a splňuje podmínky validace.

5.5.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla provedena změřením série 10 vzorků na hladinách L1 a L2 v průběhu jednoho dne za podmínek opakovatelnosti a změřením 10 vzorků v průběhu desíti dnů za podmínek reprodukovatelnosti. Míra přesnosti je poté vyjádřena hodnotou variačního koeficientu, Míru opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měření vyjadřuje hodnota variačního koeficientu $CV \leq 10\%$, míra správnosti je vyjádřena pomocí hodnoty $BIAS \leq 10\%$ a celková analytická TEa je dána hodnotou $TEa \leq 25$

Tabulka č. 62: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L1 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	83,49885	5,71844
2	74,66793	-3,1125
3	78,022	0,24159
4	79,83724	2,05683
5	79,67331	1,8929
6	83,42705	5,64664
7	77,18079	-0,5996
8	72,94482	-4,8356
9	72,6684	-5,112
10	73,26311	-4,5173

Tabulka č. 63: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentracím normetanefrinu, hladiny L1 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	77,52
Směrodatná odchylka (SD)	4,11
Variační koeficient (CV)	5,3
referenční hodnota (RH)	77,7804
Bias relativní (brel)	-0,3
Uc,rel	11%
Výtěžnost	99,6652
Celková analytická chyba (Tea)	10,688

Tabulka č. 64: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L1 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	80,99437	3,21397
2	81,64053	3,86013
3	79,17074	1,39034
4	74,30895	-3,4715
5	75,61204	-2,1684
6	74,57579	-3,2046
7	70,05862	-7,7218
8	75,45768	-2,3227
9	71,73865	-6,0418
10	76,82181	-0,9586

Tabulka č. 65: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L1 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	76,04
Směrodatná odchylka (SD)	3,75
Variační koeficient (CV)	4,9
referenční hodnota (RH)	77,7804
Bias relativní (brel)	-2,2
Uc,rel	11%
Výtěžnost	97,7624
Celková analytická chyba (Tea)	11,804

Tabulka č. 66: Souhrn všech koncentrací normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených během jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	83,49884502	5,71844
2	74,66792676	-3,1125
3	78,02199828	0,24159
4	79,83724477	2,05683
5	79,6733082	1,8929
6	83,42704894	5,64664
7	77,18078968	-0,5996
8	72,94482076	-4,8356
9	72,66839929	-5,112
10	73,26311237	-4,5173
11	80,99436921	3,21397
12	81,64053396	3,86013
13	79,17073561	1,39034
14	74,30894634	-3,4715
15	75,61203871	-2,1684
16	74,57578627	-3,2046
17	70,0586182	-7,7218
18	75,45768368	-2,3227
19	71,73864656	-6,0418
20	76,82180926	-0,9586

Tabulka č. 67: Zhodnocení opakovatelnosti normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne a zároveň během desíti jednotlivých dnů.

<i>počet výsledků (n)</i>	20
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	76,78
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	3,9
<i>Variační koeficient (CV)</i>	5,1
<i>referenční hodnota (RH)</i>	77,7804
<i>Bias relativní (brel)</i>	-1,3
<i>Uc,rel</i>	11%
<i>nejistota průměru</i>	2,1
<i>Výtěžnost</i>	98,7138
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	11,296

Tabulka č. 68: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L1 za podmínek opakovatelnosti.

V tabulce jsou uvedena data naměřená během jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	80,67678	-6,1782
2	80,06249	-6,7925
3	94,49831	7,64331
4	90,50542	3,65042
5	93,52568	6,67068
6	81,56264	-5,2924
7	81,0863	-5,7687
8	82,51965	-4,3354
9	87,33159	0,47659
10	78,06604	-8,789

Tabulka č. 69: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentracím metanefrinu, hladiny L1 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	84,98
Směrodatná odchylka (SD)	5,99
Variační koeficient (CV)	7,1
referenční hodnota (RH)	86,855
Bias relativní (brel)	-2,2
Uc,rel	15%
Výtěžnost	97,8412
Celková analytická chyba (Tea)	16,116

Tabulka č. 70: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L1 za podmínek reprodukovatelnosti.

V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	87,76273	0,907729
2	85,28625	-1,56875
3	84,00674	-2,84826
4	87,88432	1,029315
5	86,16929	-0,68571
6	82,40164	-4,45336
7	90,64337	3,78837
8	89,76033	2,905328
9	82,23285	-4,62215
10	87,1112	0,256202

Tabulka č. 71: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentraci metanefrinu, hladiny L1 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	86,33
Směrodatná odchylka (SD)	2,87
Variační koeficient (CV)	3,3
referenční hodnota (RH)	86,855
Bias relativní (brel)	-0,6
Uc,rel	7%
Výtěžnost	99,3955
Celková analytická chyba (Tea)	7,068

Tabulka č. 72: Souhrn všech koncentrací metanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	80,6767762	-6,1782
2	80,06248602	-6,7925
3	94,49830511	7,64331
4	90,50541898	3,65042
5	93,525679	6,67068
6	81,56264211	-5,2924
7	81,08630298	-5,7687
8	82,51964672	-4,3354
9	87,33158641	0,47659
10	78,06604296	-8,789
11	87,76272889	0,90773
12	85,28624779	-1,5688
13	84,00674085	-2,8483
14	87,88431545	1,02932
15	86,16928992	-0,6857
16	82,40164352	-4,4534
17	90,64337002	3,78837
18	89,76032789	2,90533
19	82,23284584	-4,6222
20	87,11120152	0,2562

Tabulka č. 73: Zhodnocení opakovatelnosti metanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	85,65
Směrodatná odchylka (SD)	4,62
Variační koeficient (CV)	5,4
referenční hodnota (RH)	86,855
Bias relativní (brel)	-1,4
Uc,rel	11%
nejistota průměru	1,4
Výtěžnost	98,6126
Celková analytická chyba (Tea)	11,984

Tabulka č. 74: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L2 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedena data naměřená během jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	5684,957478	-54,566
2	5463,969133	-275,55
3	5514,369983	-225,15
4	5557,016857	-182,51
5	5647,479922	-92,043
6	5392,89101	-346,63
7	5325,689876	-413,83
8	5403,229646	-336,29
9	5255,904083	-483,62
10	5365,752091	-373,77

Tabulka č. 75: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentracím normetanefrinu, hladiny L2 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	5461,13
Směrodatná odchylka (SD)	139,22
Variační koeficient (CV)	2,5
referenční hodnota (RH)	5739,52
Bias relativní (brel)	-4,9
Uc,rel	7%
Výtěžnost	95,1495
Celková analytická chyba (Tea)	9,8

Tabulka č. 76: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	5632,402745	-107,12
2	6226,515335	486,995
3	5779,297531	39,7775
4	6671,004887	931,485
5	5971,854627	232,335
6	5958,931332	219,411
7	5974,439286	234,919
8	5686,249807	-53,27
9	5727,604351	-11,916
10	6032,594114	293,074

Tabulka č. 77: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	5966,09
Směrodatná odchylka (SD)	307,45
Variační koeficient (CV)	5,2
referenční hodnota (RH)	5739,52
Bias relativní (brel)	3,9
Uc,rel	11%
Výtěžnost	103,947
Celková analytická chyba (Tea)	14,092

Tabulka č. 78: Souhrn všech koncentrací normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	5684,957478	-54,566
2	5463,969133	-275,55
3	5514,369983	-225,15
4	5557,016857	-182,51
5	5647,479922	-92,043
6	5392,89101	-346,63
7	5325,689876	-413,83
8	5403,229646	-336,29
9	5255,904083	-483,62
10	5365,752091	-373,77
11	5632,402745	-107,12
12	6226,515335	486,995
13	5779,297531	39,7775
14	6671,004887	931,485
15	5971,854627	232,335
16	5958,931332	219,411
17	5974,439286	234,919
18	5686,249807	-53,27
19	5727,604351	-11,916
20	6032,594114	293,074

Tabulka č. 79: Zhodnocení opakovatelnosti normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	5713,61
Směrodatná odchylka (SD)	347,93
Variační koeficient (CV)	6,1
referenční hodnota (RH)	5739,52
Bias relativní (brel)	-0,5
Uc,rel	12%
nejistota průměru	0
Výtěžnost	99,5485
Celková analytická chyba (Tea)	12,456

Tabulka č. 80: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L2 za podmínek opakovatelnosti.

V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	3672,749	61,6368
2	3765,292	154,18
3	3687,584	76,4719
4	3713,016	101,904
5	3681,226	70,114
6	3602,812	-8,3001
7	3758,227	147,115
8	3827,458	216,346
9	3814,036	202,924
10	3818,981	207,869

Tabulka č. 81: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentracím metanefrinu, hladiny L2 za podmínek opakovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	3734,14
Směrodatná odchylka (SD)	74,74
Variační koeficient (CV)	2,0
referenční hodnota (RH)	3611,11
Bias relativní (brel)	3,4
Uc,rel	5%
Výtěžnost	103,407
Celková analytická chyba (Tea)	7,32

Tabulka č. 82: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti.

V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	3806,03	194,919
2	3919,77	308,655
3	3860,42	249,315
4	3824,99	213,875
5	3882,68	271,567
6	3840,64	229,535
7	3803,56	192,447
8	3952,73	341,622
9	3930,48	319,369
10	3785,42	174,315

Tabulka č. 84: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentraci metanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	3860,67
Směrodatná odchylka (SD)	58,6
Variační koeficient (CV)	1,5
referenční hodnota (RH)	3611,11
Bias relativní (brel)	6,9
Uc,rel	8%
Výtěžnost	106,911
Celková analytická chyba (Tea)	9,84

Tabulka č. 85.: Souhrn všech koncentrací metanefrinu, hladiny L2 za podmínek reprodukovatelnosti. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených během jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	3672,748807	61,6368
2	3765,291622	154,18
3	3687,583915	76,4719
4	3713,015528	101,904
5	3681,226012	70,114
6	3602,811871	-8,3001
7	3758,227285	147,115
8	3827,457788	216,346
9	3814,035547	202,924
10	3818,980583	207,869
11	3806,029299	194,919
12	3919,765124	308,655
13	3860,424694	249,315
14	3824,98527	213,875
15	3882,677355	271,567
16	3840,64455	229,535
17	3803,556781	192,447
18	3952,73203	341,622
19	3930,479369	319,369
20	3785,424982	174,315

Tabulka č. 86: Zhodnocení opakovatelnosti metanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

<i>počet výsledků (n)</i>	20
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	3797,4
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	92,12
<i>Variační koeficient (CV)</i>	2,4
<i>referenční hodnota (RH)</i>	3611,11
<i>Bias relativní (brel)</i>	5,2
<i>Uc,rel</i>	7%
<i>nejistota průměru</i>	0,5
<i>Výtěžnost</i>	105,159
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	9,904

Z výsledků výše uvedených vyplývá, že hodnota variačního koeficientu ani v jednom případě nepřekročila hranici 10%, stejně jako hodnota BIAS. Hodnota Celkové analytické chyby se ve všech případech pohybovala pod hodnotou 25%. Lze tedy zkonstatovat, že tyto hodnoty splňují podmínky kladení na validaci metody.

5.5.3. Mezilehlá preciznost

Mezilehlá preciznost byla provedena změřením série 10 vzorků na hladinách L1 a L2 v průběhu jednoho dne a změřením 10 vzorků v průběhu desíti dnů. Míru preciznosti měření vyjadřuje hodnota variačního koeficientu, přesnost měření je pak dána hodnotou BIAS. Dle platného doporučení ČSKB pro in house vyvinuté metody je kladen důraz na to, aby byla hodnota variačního koeficientu $CV \leq 10\%$, hodnota BIAS $\leq 10\%$ a hodnota celkové analytické chyby nepřekročila 25%.

Tabulka č. 87: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	80,02657	2,24616
2	81,96241	4,182
3	77,45361	-0,3268
4	74,29459	-3,4858
5	67,94781	-9,8326
6	73,51919	-4,2612
7	78,11414	0,33373
8	73,31816	-4,4622
9	75,78795	-1,9925
10	76,44502	-1,3354

Tabulka č. 88: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentracím normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	75,89
Směrodatná odchylka (SD)	3,94
Variační koeficient (CV)	5,2
referenční hodnota (RH)	77,7804
Bias relativní (brel)	-2,4
Uc,rel	11%
Výtěžnost	97,5696
Celková analytická chyba (Tea)	12,592

Tabulka č. 89: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	72,56927	-5,21113
2	76,49044	-1,28996
3	75,82771	-1,95269
4	78,14728	0,366875
5	70,19448	-7,58592
6	77,98537	0,204968
7	82,51027	4,729868
8	80,63252	2,852124
9	76,93226	-0,84814
10	78,09205	0,311648

Tabulka č. 90: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	76,94
Směrodatná odchylka (SD)	3,57
Variační koeficient (CV)	4,6
referenční hodnota (RH)	77,7804
Bias relativní (brel)	-1,1
Uc,rel	10%
Výtěžnost	98,9195
Celková analytická chyba (Tea)	10,116

Tabulka č. 91: Souhrn všech koncentrací normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	80,02657	2,24616
2	81,96240884	4,182
3	77,4536148	-0,3268
4	74,29458713	-3,4858
5	67,94781335	-9,8326
6	73,51918942	-4,2612
7	78,11413876	0,33373
8	73,31816039	-4,4622
9	75,78794566	-1,9925
10	76,44502	-1,3354
11	80,02657	2,24617
12	81,96240884	4,18201
13	77,4536148	-0,3268
14	74,29458713	-3,4858
15	67,94781335	-9,8326
16	73,51918942	-4,2612
17	78,11413876	0,33374
18	73,31816039	-4,4622
19	75,78794566	-1,9925
20	76,44502	-1,3354

Tabulka č. 92: Zhodnocení mezilehlé preciznosti normetanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň výsledků dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	75,89
Směrodatná odchylka (SD)	3,83
Variační koeficient (CV)	5,1
referenční hodnota (RH)	77,7804
Bias relativní (brel)	-2,4
Uc,rel	11%
nejistota průměru	1,1
Výtěžnost	97,5696
Celková analytická chyba (Tea)	12,396

Tabulka č. 93: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	92,5356	5,6806
2	89,79938	2,94438
3	84,37558	-2,4794
4	97,54672	10,6917
5	95,95724	9,10224
6	94,25003	7,39503
7	90,84341	3,98841
8	90,01924	3,16424
9	85,25862	-1,5964
10	87,43561	0,58061

Tabulka č. 94.: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentracím metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat, naměřených během jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	90,80
Směrodatná odchylka (SD)	4,37
Variační koeficient (CV)	4,8
referenční hodnota (RH)	86,855
Bias relativní (brel)	4,5
Uc,rel	11%
Výtěžnost	104,542
Celková analytická chyba (Tea)	13,908

Tabulka č. 95: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	99,37167	12,5167
2	90,95334	4,09834
3	90,71786	3,86286
4	86,83248	-0,0225
5	98,37089	11,5159
6	87,06795	0,21295
7	95,42742	8,57242
8	90,30577	3,45077
9	92,30734	5,45234
10	93,01377	6,15877

Tabulka č. 96: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci metanefrinu, hladiny L1. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	92,44
Směrodatná odchylka (SD)	4,25
Variační koeficient (CV)	4,6
referenční hodnota (RH)	86,855
Bias relativní (brel)	6,4
Uc,rel	12%
Výtěžnost	106,43
Celková analytická chyba (Tea)	15,416

Tabulka č. 97.: Souhrn všech koncentrací metanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	92,5356	5,6806
2	89,79938166	2,94438
3	84,3755792	-2,4794
4	97,5467201	10,6917
5	95,95724428	9,10224
6	94,2500295	7,39503
7	90,8434107	3,98841
8	90,01923805	3,16424
9	85,25862133	-1,5964
10	87,43561	0,58061
11	99,37167383	12,5167
12	90,9533389	4,09834
13	90,717861	3,86286
14	86,83247565	-0,0225
15	98,37089275	11,5159
16	87,06795355	0,21295
17	95,427419	8,57242
18	90,30577467	3,45077
19	92,30733682	5,45234
20	93,01377052	6,15877

Tabulka č. 98: Zhodnocení mezilehlé preciznosti metanefrinu, hladiny L1. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených během jednoho dne a zároveň dat naměřených během desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	91,62
Směrodatná odchylka (SD)	4,28
Variační koeficient (CV)	4,7
referenční hodnota (RH)	86,855
Bias relativní (brel)	5,5
Uc,rel	11%
nejistota průměru	1,1
Výtěžnost	105,486
Celková analytická chyba (Tea)	14,712

Tabulka č. 99: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	5306,388	-433,13
2	5535,478	-204,04
3	5806,508	66,9882
4	5444,835	-294,68
5	5470,862	-268,66
6	5418,809	-320,71
7	5378,424	-361,1
8	5414,322	-325,2
9	5457,4	-282,12
10	5546,247	-193,27

Tabulka č. 100: Souhrn výsledků, vztahených ke koncentracím normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	5477,93
Směrodatná odchylka (SD)	135,15
Variační koeficient (CV)	2,5
referenční hodnota (RH)	5739,52
Bias relativní (brel)	-4,6
Uc,rel	7%
Výtěžnost	954,423
Celková analytická chyba (Tea)	9,5

Tabulka č. 101: Souhrn koncentrací normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	5818,355	78,8316
2	6018,666	279,143
3	5781,739	42,2156
4	5801,124	61,6005
5	5740,097	0,57387
6	5870,766	131,243
7	5824,098	84,5753
8	5851,381	111,858
9	5756,433	16,91
10	5932,558	193,035

Tabulka č. 102.: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci normetanefrinu, hladiny L2.

V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	5839,52
Směrodatná odchylka (SD)	84,43
Variační koeficient (CV)	1,4
referenční hodnota (RH)	5739,52
Bias relativní (brel)	1,7
Uc,rel	4%
Výtěžnost	101,742
Celková analytická chyba (Tea)	4,444

Tabulka č. 103: Souhrn všech koncentrací normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	5306,388478	-433,13
2	5535,478032	-204,04
3	5806,508247	66,9882
4	5444,835477	-294,68
5	5470,861557	-268,66
6	5418,809396	-320,71
7	5378,424099	-361,1
8	5414,322141	-325,2
9	5457,399791	-282,12
10	5546,247444	-193,27
11	5818,354601	78,8316
12	6018,665673	279,143
13	5781,738598	42,2156
14	5801,123541	61,6005
15	5740,09687	0,57387
16	5870,765741	131,243
17	5824,098287	84,5753
18	5851,380799	111,858
19	5756,433	16,91
20	5932,558	193,035

Tabulka č. 104: Zhodnocení mezilehlé preciznosti normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených během jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	20
aritmetický průměr (AM)	5658,72
Směrodatná odchylka (SD)	215,49
Variační koeficient (CV)	3,8
referenční hodnota (RH)	5739,52
Bias relativní (brel)	-1,4
Uc,rel	8%
nejistota průměru	0,9
Výtěžnost	98,5922
Celková analytická chyba (Tea)	8,848

Tabulka č. 105: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu jednoho dne.

Vzorek	koncentrace	bias
1	3551,595428	-59,517
2	3395,591319	-215,52
3	3401,478266	-209,63
4	3395,002624	-216,11
5	3211,329862	-399,78
6	3260,780221	-350,33
7	3261,368916	-349,74
8	3216,03942	-395,07
9	3246,651547	-364,46
10	3595,833246	-15,279

Tabulka č. 106.: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentracím metanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu jednoho dne.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	3353,57
Směrodatná odchylka (SD)	137,99
Variační koeficient (CV)	4,1
referenční hodnota (RH)	3611,11
Bias relativní (brel)	-7,1
Uc,rel	11%

Tabulka č. 107.: Souhrn koncentrací metanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedena data naměřená v průběhu desíti jednotlivých dnů.

Vzorek	koncentrace	bias
1	3631,069219	19,9572
2	3571,022354	-40,09
3	3758,933719	147,822
4	3787,191067	176,079
5	3631,775653	20,6637
6	3555,480813	-55,631
7	3559,012982	-52,099
8	3629,656352	18,5444
9	3474,947371	-136,16
10	3544,177874	-66,934

Tabulka č. 108: Souhrn výsledků, vztažených ke koncentraci metanefrinu, hladiny L2. V tabulce jsou uvedeny výsledky dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

počet výsledků (n)	10
aritmetický průměr (AM)	3614,44
Směrodatná odchylka (SD)	98,1
Variační koeficient (CV)	2,7
referenční hodnota (RH)	3611,11
Bias relativní (brel)	0,1
Uc,rel	5%
Výtěžnost	100,092
Celková analytická chyba (Tea)	5,392

Tabulka č. 109: Souhrn všech koncentrací metanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

<i>Vzorek</i>	<i>koncentrace</i>	<i>bias</i>
1	3551,595428	-59,517
2	3395,591319	-215,52
3	3401,478266	-209,63
4	3395,002624	-216,11
5	3211,329862	-399,78
6	3260,780221	-350,33
7	3261,368916	-349,74
8	3216,03942	-395,07
9	3246,651547	-364,46
10	3595,833246	-15,279
11	3631,069219	19,9572
12	3571,022354	-40,09
13	3758,933719	147,822
14	3787,191067	176,079
15	3631,775653	20,6637
16	3555,480813	-55,631
17	3559,012982	-52,099
18	3629,656352	18,5444
19	3474,947371	-136,16
20	3544,177874	-66,934

Tabulka č. 110: Zhodnocení mezilehlé preciznosti normetanefrinu, hladiny L2. V tabulce je uveden souhrn výsledků dat naměřených v průběhu jednoho dne a zároveň výsledků dat naměřených v průběhu desíti jednotlivých dnů.

<i>počet výsledků (n)</i>	20
<i>aritmetický průměr (AM)</i>	3483,95
<i>Směrodatná odchylka (SD)</i>	177,07
<i>Variační koeficient (CV)</i>	5,1
<i>referenční hodnota (RH)</i>	3611,11
<i>Bias relativní (brel)</i>	-3,5
<i>Uc,rel</i>	11%
<i>nejistota průměru</i>	0
<i>Výtěžnost</i>	96,4786
<i>Celková analytická chyba (Tea)</i>	13,496

Z výsledků výše uvedených vyplývá, že hodnota variačního koeficientu nepřekračuje hodnotu 10%, hodnota BIAS rovněž nepřesahuje hodnotu 10%. Hodnota celkové analytické chyby se nachází pod povolenou hranicí 25%.

5.5.4. Limit detekce a limit kvantifikace

Měřením bylo zjištěno, že se limit detekce nachází při koncentraci 5,07 nmol.l⁻¹ pro metanefrin a 13,64 nmol.l⁻¹. Dále bylo měřením zjištěno, že limitem kvantifikace je 15,21 nmol.l⁻¹ pro metanefrin a 38,209 nmol.l⁻¹ pro normetanefrin.

6. ZÁVĚR

Byla vyvinuta a zoptimalizována metoda HPLC s hmotnostní spektrometrií pro stanovení plazmatických metanefrinů a metanefrinů v moči. Metoda byla prováděna ESI ionizací v kladném módu a MRM režimu pro identifikaci a kvantifikaci metanefrinu a normetanefrinu. Z hlediska náročnosti se řadí tato metoda mezi méně náročné, jelikož byla vyvinuta poměrně jednoduchá příprava vzorku pomocí extrakce na pevné fázi. Z hlediska časové náročnosti se řadí tato analýza mezi rychlé, celkový čas analýzy je 8 minut. Byly vyzkoušeny různé typy kolon, z nichž k nejlepší separaci docházelo na koloně HILIC a to jak z hlediska retenčního času, tak z hlediska kvantifikačního. Rovněž byly vyzkoušeny různé typy mobilních fází, z nichž k nejlepší separaci vedla mobilní fáze o složení 5mM mravenčan amonný/acetonitril v poměru 5:95 a separace probíhala za podmínek gradientové eluce.

Metoda byla validována na základě podmínek stanovených Českou společností klinické biochemie pro in house metody (ČSKB ČSL JEP). Bylo provedeno ověření linearitu, přičemž ve všech případech byla hodnota korelačního koeficientu R^2 vyšší než 0,99. Dále bylo provedeno ověření opakovatelnosti, reprodukovatelnosti a mezilehlé preciznosti, přičemž byl kladen důraz na to, aby výsledné hodnoty variačního koeficientu (CV) nepřekračovaly hodnotu 10%, hodnota BIAS nepřekračovala hodnotu 10% a hodnota celkové analytické chyby byla pod 25%. Rovněž byly stanoveny limity detekce a kvantifikace pro normetanefrin v moči, metanefrin v moči, normetanefrin v plazmě a metanefrin v plazmě.

Metoda pro stanovení metanefrinů v moči je na základě výše uvedených výsledků připravena na použití v klinické praxi.

Metoda pro stanovení volných plazmatických metanefrinů je již z velké části zvalidována, nicméně vzhledem k absenci certifikovaného referenčního materiálu musí být ještě jasně stanoveno referenční rozmezí, které zatím této metodě chybí. Referenční rozmezí bude stanoveno na základě zkušební nasazení do praxe, při čemž dojde ke změření určitého počtu pacientů, na jehož základě bude toto rozmezí stanoveno.

7. LITERATURA

1. M. Tsunoda, Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (2006) 506–514.
2. R.-I. Chirita, A.-L. Finaru, C. Elfakir, Evaluation of fused-core and monolithic versus porous silica-based C18 columns and porous graphitic carbon for ion-pairing liquid chromatography analysis of catecholamines and related compounds, *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 633–640.
3. G. Zhang, Y. Zhang, C. Ji, T. McDonald, J. Walton, E.A. Groeber, R.C. Steenwyk, Z. Lin, Ultra sensitive measurement of endogenous epinephrine and norepinephrine in human plasma by semi-automated SPE-LC–MS/MS, *Journal of Chromatography B*, 895– 896 (2012) 186– 190.
4. J.W.M. Lenders, Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma, *Annales d'Endocrinologie*, 70 (2009) 161-165.
5. C. Pamporaki, R. Darr, M. Bursztyń, S. Glockner, S.R. Bornstein, J.W.M. Lenders, K. Pacak, A. Krinner, G. Eisenhofer, Plasma-free vs. deconjugated metanephrines for diagnosis of pheochromocytoma, *Clinical Endocrinology*, 79 (2013) 476–483.
6. K. Pacak, G. Eisenhofer, H. Ahlman, S.R. Bornstein, A.P. Gimenez-Roqueplo, A.B. Grossman, N. Kimura, M. Mannelli, A.M. McNicol, A.S. Tischler, Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium, *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3 (2007) 92-102.
7. P.F. Plouin, A.P. Gimenez-Roqueplo, Pheochromocytomas and secreting paragangliomas, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1 (2006) 49-56.
8. K. Iinuma, I. Ikeda, T. Oglhara, K. Hashizume, K. Kurata, Y. Kumahara, Radioimmunoassay of metanephrine and normetanephrine for diagnosis of pheochromocytoma, *Clinical Chemistry*, 32 (1986) 1879-1883.
9. G.C. Davis, P.T. Kissinger, Strategies for determination of serum or plasma norepinephrine by reverse-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 53 (1981) 156-159.
10. J.M.W. van den Ouweland, I.P. Kema, The role of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory, *Journal of Chromatography B*, 883– 884 (2012) 18– 32.
11. W.H.A. de Jong, E.G.E. de Vries, I. P. Kema, Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines, *Clinical Biochemistry*, 44 (2011) 95–103.
12. J. Axelrod, Neurotransmitters, *Scientific American*, 230 (1974) 58-71.
13. L.A. Hammad, M. Neely, B. Bridge, Y. Mechref, Fast liquid chromatography separation and multiple-reaction monitoring mass spectrometric detection of neurotransmitters, *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 2369–2376.
14. D.S. Goldstein, Catecholamines and stress, *Endocrine Regulations*, 37 (2003) 69–80.
15. C. Ji, J. Walton, Y. Su, M. Tella, Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC–MS/MS, *Analytica Chimica Acta*, 670 (2010) 84–91.
16. D. Stejskal, B. Lačňák, J. Václavík, R. Zuber, Volné plazmatické metanefriny a jejich využití v diagnostice feochromocytomu, *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 13 (2005) 201–206.
17. I. Klein, K. Ojamaa, Cardiovascular manifestations of endocrine disease, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75 (1992) 339-342.

18. V. Hanna, Metabolism of catecholamines, *Investigative Ophthalmology*, 4 (1965) 1095-1104.
19. H.D.El-Yassin, Hormones of the adrenal gland, Lecture 2013, Publikováno on-line (<http://www.comed.uobaghdad.edu.iq/uploads/Lectures/Biochemistry/biochemistry%202012-2013/dr.%20hadaf/6Hormones%20of%20the%20adrenal%20gland2013.pdf>).
20. T. Hasegawa, K. Wada, E. Hiyama, T. Masujima, Pretreatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385 (2006) 814–820.
21. I.J. Kopin, Metabolism of the catecholamines, *Z. Klinik Chemie*, 4 (1964) 115-123.
22. J.D. Fernstrom, M.H. Fernstrom, Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain, *Journal of Nutrition*, 137 (2007) 1539S-1547S.
23. W.H.A. de Jong, K.S. Graham, J.C. van der Molen, T.P. Links, M.R. Morris, H.A. Ross, E.G.E. de Vries, I.P. Kema, Plasma free metanephrine measurement using automated online solid-phase extraction HPLC–tandem mass spectrometry, *Clinical Chemistry*, 53 (2007) 1684–1693.
24. G. Eisenhofer, D.S. Goldstein, I.J. Kopin, J.R. Crout, Pheochromocytoma: rediscovery as a catecholamine-metabolizing tumor, *Endocrine Pathology*, 14 (2003) 193-212.
25. G. Eisenhofer, I.J. Kopin, D.S. Goldstein, Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine, *Pharmacological Reviews*, 56 (2004) 331–349.
26. L. Fang, Y. Lv, X. Sheng, S. Yao, Sensitive, rapid and easy analysis of three catecholamine metabolites in human urine and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatographic Science*, 50 (2012) 450–456.
27. Q. Gu, X. Shi, P. Yin, P. Gao, X. Lu, G. Xu, Analysis of catecholamines and their metabolites in adrenal gland by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 609 (2008) 192–200.
28. D.C. Fluck, Catecholamines, *British Heart Journal*, 34 (1972) 869-873.
29. L.M. Romero, L.K. Butler, Endocrinology of stress, *International Journal of Comparative Psychology*, 20 (2007) 89-95.
30. S. Jähnichen, Categories of adrenergic receptors, their signal transductions and their effects, 2007, Publikováno on-line, (http://en.wikipedia.org/wiki/Adrenergic_receptor#/media/File:Adrenoceptor-Signal_transduktion.PNG).
31. L.A. Kartsova, A.A. Sidorova, V.A. Kazakov, E.A. Bessonova, A.Y. Yashin, Determination of catecholamines by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Analytical Chemistry*, 59 (2004) 737–741.
32. G. Eisenhofer, D.S. Goldstein, I.J. Kopin, J.R. Crout, Pheochromocytoma: rediscovery as a catecholamine-metabolizing tumor, *Endocrine Pathology*, 3 (2003) 193-212.
33. F.H. Messerli, K.R. Loughlin, A.W. Messerli, W.R. Welch, The president and the pheochromocytoma, *American Journal of Cardiology*, 99 (2007) 1325–1329.
34. E.L. Boulpaep, W.F. Boron, *Medical physiology: a cellular and molecular approach*, Philadelphia: Saunders (2003), ISBN 0-7216-3256-4.
35. Z. Musil, A. Vícha, T. Zelinka, H. Turková, T. Labudová, M. Kohoutová, K. Pacák, Hereditary pheochromocytoma and paraganglioma, *Klinická Onkologie*, 25 (2012) S21– S 26.
36. J. Widimský, T. Zelinka, O. Petrák, B. Štrauch, L. Šafařík, M. Kasalický, A. Vranková, R. Holaj, Diagnostické a terapeutické postupy u feochromocytomu: současné trendy, *Vnitřní Lékařství*, 53 (2007) 428-433.

37. J. Bryant, J. Farmer, L.J. Kessler, R.R. Townsend, K.L. Nathanson, Pheochromocytoma: The expanding genetic differential diagnosis, *Journal of the National Cancer Institute*, 95 (2003) 1196-1204.
38. D.E. Benn, B.G. Robinson, Pheochromocytoma – quo vadis?, *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3 (2007) 377-377.
39. W.M. Manger, Diagnosis and management of pheochromocytoma – recent advances and current concepts, *Kidney International*, 70 (2006) S30–S35.
40. S.L. Kopal, E. Paran, A. Jamali, S. Mizrahi, R.J. Siegel, J. Leor, Pheochromocytoma: cyclic attacks of hypertension alternating with hypotension, *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5 (2008) 53-57.
41. Velký lékařský slovník, Publikováno on-line (<http://lekarske.slovníky.cz/>).
42. M. Jafri, E.R. Maher, The genetics of phaeochromocytoma: using clinical features to guide genetic testing, *European Journal of Endocrinology*, 166 (2012) 151–158.
43. J. Widimsky, T. Zelinka, O. Petrak, B. Strauch, J. Rosa, M. Michalský, M. Kasalický, L. Safarík, A. Vranková, R. Holaj, Pheochromocytoma: diagnosis and treatment, *Casopis Lékaru Českých*, 148 (2009) 365–369.
44. J. Widimsky, T. Zelinka, O. Petrak, B. Strauch, L. Safarík, M. Kasalický, A. Vranková, R. Holaj, Diagnostic and therapeutic procedures in pheochromocytoma: current trends, *Vnitřní Lékarství*, 53 (2007) 428–433.
45. T. Zelinka, G. Eisenhofer, K. Pacak, Pheochromocytoma as a catecholamine producing tumor: implications for clinical practice, *Stress*, 10 (2007) 195–203.
46. T. Zelinka, Feochromocytom, *Interní Medicína pro Praxi*, 1 (2007) 30-38.
47. E.R. Maher, C. Eng, The pressure rises: update on the genetics of phaeochromocytoma, *Human Molecular Genetics*, 11 (2002) 2347–2354.
48. FONS, Příručka laboratorních vyšetření, Publikováno on-line (<http://www.katalogfons.cz/Produkty/CB61E5AD-497D-40AA-9966-B8047E709B2B>).
49. G. Eisenhofer, D.S. Goldstein, M.M. Walther, P. Friberg, J.W. Lenders, H.R. Keiser, K. Pacak, Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88 (2003) 2656-2666.
50. A.M. Sawka, L. Thabane, A. Gafni, M. Levine, W.F. Young, Measurement of fractionated plasma metanephrines for exclusion of pheochromocytoma: Can specificity be improved by adjustment for age?, *BMC Endocrine Disorders*, 5:1 (2005) 1-9.
51. G. Eisenhofer, J.W. Lenders, D.S. Goldstein, M. Mannelli, G. Csako, M.M. Walther, F.M. Brouwers, K. Pacak, Pheochromocytoma catecholamine phenotypes and prediction of tumor size and location by use of plasma free metanephrines, *Clinical Chemistry*, 51 (2005) 735-744.
52. G. Eisenhofer, S. Brown, M. Peitzsch, D. Pelzel, P. Lattke, S. Glöckner, A. Stell, A. Prejbisz, M. Fassnacht, F. Beuschlein, A. Januszewicz, G. Siegert, H. Reichmann, Levodopa therapy in Parkinson's disease: influence on liquid chromatographic tandem mass spectrometric-based measurements of plasma and urinary normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine, *Annals of Clinical Biochemistry*, 51 (2014) 38–46.
53. J.W.M. Lenders, G. Eisenhofer, M. Mannelli, K. Pacak, Phaeochromocytoma, *Lancet*, 366 (2005) 665-675.
54. J.W. Lenders, K. Pacak, M.M. Walther, M.M. Linehan, M. Mannelli, P. Friberg, H.R. Keiser, D.S. Goldstein, G. Eisenhofer, Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best?, *Jama*, 287 (2002) 1427-1434.

55. B. Štrauch, T. Zelinka, Feochromocytom – klinické aspekty, *Medicína pro Praxi*, 6 (2009) 249-253.
56. E.L. Bravo, R. Tagle, Pheochromocytoma: state of the art and future prospects, *Endocrine Reviews*, 24 (2003) 539–553.
57. Lab Tests Online CZ, Metanefriny v moči, Publikováno on-line (<http://www.labtestsonline.cz/tests/UrineMetanephtrines.html?tab=3>).
58. Středomoravská nemocniční a.s., Clonidinový test pro diagnostiku feochromocytomu, Publikováno on-line (<http://laborator.nemsne.cz/metody/laboratornii-metody/soubory/clonidintest.pdf>).
59. LABIA - Biochemická laboratoř Lanškroun, Sběr moče na kyselinu vanilmandlovou, katecholaminy a 5-HIO, Publikováno on-line (http://www.labia.estranky.cz/clanky/navody/sber-moce-na-kys_-vanilmandlovou-a-5-hio.html).
60. Kolektiv autorů, Výkladový ošetřovatelský slovník, Grada Publishing a.s. (2007), ISBN-13: 978-80-247-2240-5.
61. K. Drbalová, Sekundární endokrinní hypertenze, *Medicína pro praxi*, 8 (2011) 514–517.
62. T. Zelinka, H. Turková, J. Widimský, Feochromocytom, *Onkologie*, 3 (2009) 343–347.
63. H. Dávidová, I. Balažovjeh, Feochromocytóm – diagnostika a liečba, *Cardiol*, 13 (2004) 303–309.
64. E. Ferdová, J. Ferda, O. Hes, O. Daum, T. Skalický, V. Třeška, Imaging of phaeochromocytomas and paragangliomas using ¹⁸F-FDG-PET/CT, *Czech Radiology*, 64 (2010) 259–265.
65. Y.C. Kudva, A.M. Sawka, W.F. Young, The laboratory diagnosis of adrenal pheochromocytoma: the mayo clinic experience, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88 (2003) 4533–4539.
66. V. Rufini, M.L. Calcagni, R.P. Baum, Imaging of neuroendocrine tumors, *Seminars in Nuclear Medicine*, 36 (2006) 228-247.
67. D. Valík, Požadavky na externí vyšetření, Masrykův onkologický ústav, Oddělení laboratorní medicíny (2014), Publikováno on-line, (<https://www.mou.cz/olm-pozadavky-na-externi-vysetreni/f1334>).
68. Oddělení nukleární medicíny - laboratoř imunochemické diagnostiky, FN Plzeň, Publikováno on-line (http://www.fnplzen.cz/asp/oid/analyt_detail.asp?id=135).
69. Z. Čecháček, Vyšetření s nároky na preanalytickou fázi, Publikováno on-line (<http://www.cechacek-sro.cz/laboratorni-prirucka/laborator-imunoanalyzy-a-hplc/vysetreni-s-naroky-na-preanalytickou-fazi/>)
70. X. He, M. Kozak, Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for plasma-free metanephtrines with ion-pairing turbulent flow online extraction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (2012) 3003–3010.
71. L. Micolini, G. Gerra, M. Consorti, L. Somaini, M.A. Raggi, Fast analysis of catecholamine metabolites MHPG and VMA in human plasma by HPLC with fluorescence detection and a novel SPE procedure, *Talanta*, 78 (2009) 150–155.
72. J. W. Stroes, J. Putters, H.J.M. van Rijn, An improved spectrophotometric procedure for the determination of urinary metanephtrines, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 25 (1987) 483–486.
73. A. Mishra, A. Upadhyay, A. Patra, S. Chaudhury, P. Chattopadhyay, Simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine by high performance liquid chromatography, *Scientia Pharmaceutica* 77 (2009) 367–374.

74. DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH, Instructions for use, nor- / metanephrine – ELISA, enzyme immunoassay for the quantitative determination of free normetanephrine and metanephrine in plasma, Publikováno on-line (<http://www.dld-diagnostika.de>).
75. T. Lenz, J. Zorner, C. Kirchmaier, D. Pillitteri, K. Badenhoop, C. Bartel, H. Geiger, K. Hasselbacher, U. Tuschy, J. Westermann, L. Salewski, Multicenter study on the diagnostic value of a new RIA for the detection of free plasma metanephrines in the work-up for pheochromocytoma, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1073(2006) 358–373.
76. S.E. Hattox, R.C. Murphy, Mass spektrometry and gas chromatography of trimethylsilyl derivatives of catecholamine related compounds, *Biomedical Mass Spectrometry*, 5 (1978) 338-345.
77. F.A. Muskiet, M.C. Stratingh, G.J. Stob, B.G. Wolthers, Simultaneous determination of the four major catecholamine metabolites and estimation of serotonin metabolite in urine by capillary gas chromatography of their tert-butyldimethylsilyl derivatives, *Clinical Chemistry*, 27 (1981) 223-227.
78. D.K. Crockett, E.L. Frank, W.L. Roberts, Rapid analysis of metnapehrine and normetanephrines by gas chromatography-mass spektrometry, *Clinical Chemistry*, 48 (2002) 332-337.
79. J.T. Martin, J.D. Barchas, K.F. Faull, Fused silica capillary gas chromatography/negative chemical ionization mass spektrometry for the determination of catecholamines and their o-methylated metabolites, 54 (1984) 243-250.
80. C.Canfell, S.R. Binder, H. Khayan-Bashi, Quantitation of urinary normetanephrine and metanephrine by reversed phase extraction and mass-fragmentographic analysis, *Clinical Chemistry*, 28 (1982) 1; 25-28.
81. J.D. Erhart, J. Schwartz, A gass chromatography-mass spektrometry assay of human plasma catecholamines, *Clinica Chimica Acta* 88, (1978) 71-79.
82. E.Watson, S. Wilk, J. Roboz, Derivatization and gas chromatographic determination of some biologically important acids in cerebrospinal fluis, *Analytical Biochemistry*, 59 (1974) 441-451.
83. S. Yamamoto, K. Kakuno, S. Okhara, H. Kataoka, M. Makita, Gas Chromatography of phenolic amines, 3-methoxycatecholamines, indole-amines and related amines as their N,O-ethyloxycarbonyl derivatives, *Journal of chromatography*, 194 (1980) 339-403.
84. M. Ulrychová, J. Vávrová, V. Palička, Stanovení metanefrinů v plazmě a moči metodou HPLC-ED, *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 15 (2007) 218–221.
85. W. Li, D.T. Rossi, S.T. Fountain, Development and validation of a semi-automated method for L-dopa and dopamine in rat plasma using electrospray LC/MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (2000) 325–333.
86. J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, Karolinum (2005), ISBN: 978-80-246-1146-4.
87. K. Marčaníková, B. Beňová, Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek, *Chemické Listy*, 104 (2010) 27–30.
88. A. Liu, T. Voelker, M. Meng, Simultaneous quantification of metanephrine, normetanephrine, histamine, serotonin, and 3,4-dihydroxyphenylglycol in dog plasma by LC-MS/MS, *Tandem Labs*, 13 (2013) 1-11.
89. M. Dunand, M. Donzelli, A. Rickli, C.M. Hysek, M.E. Liechti, E. Grouzmana, Analytical interference of 4-hydroxy-3-methoxymethamphetaminewith the measurement of plasma free normetanephrine by ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spektrometry, *Clinical Biochemistry*, 12 (2014) 1121–1123.

90. R. Gostelow, N. Bridger, H.M. Syme, Plasma-free metanephrine and free normetanephrine measurement for the diagnosis of pheochromocytoma in dogs, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27 (2013) 83–90.
91. S.A. Lagerstedt, D.J. O’Kane, R.J. Singh, Measurement of plasma free metanephrine and normetanephrine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma, *Clinical Chemistry*, 50 (2004) 603–611.
92. J. Gabler, C. Yuan, W. Woroniecki, H. Liu, S. Wang, A sensitive and interference-free liquid chromatography tandem mass spectrometry method for measuring metanephrines in plasma, *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, S2 (2012) 1-5.
93. N.J.K. Simpson, *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, Marcel Dekker Inc. (2000) , ISBN: 0-8247-0021-X.
94. Phenomenex, *Strata-X Polymeric SPE Information*, Publikováno on-line (<http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/X-CW,%20Weak%20Cation%20Mixed%20Mode>).
95. Biotage, *ISOLUTE Layered SPE Columns* , Publikováno on-line (<http://www.biotage.com/product-page/isolute-layered-spe-columns>).
96. B. Friedecký, L. Šprongl, J. Kratochvíla, Z. Plzák, Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, *ČSKB ČLS JEP* (2010) 1-14.
97. V. Bartoš, M. Budina, B. Friedecký, J. Kratochvíla, D. Springer, K. Šafarčík, Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích, *SEKK* (2014) 1-11.