

# Determinación de catecolaminas y sus metabolitos\*

---

\* Adaptado y traducido de Robert T. Peaston and Cyril Weinkove. Measurement of catecholamines and their metabolites. Ann Clin Biochem 2004; 41: 17-38.

## Introducción

Las catecolaminas de interés clínico –adrenalina, noradrenalina y dopamina– son importantes neurotransmisores en el sistema nervioso simpático, donde ejercen efectos metabólicos y cardiovasculares por estimulación de receptores adrenérgicos en una amplia variedad de células. La excesiva producción y liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo por una neoplasia de tejido cromafínico, tal como feocromocitoma produce en forma característica, hipertensión persistente o paroxística. Aunque es una causa rara de hipertensión, es imperativo un diagnóstico temprano para evitar las complicaciones asociadas con la excesiva liberación de catecolaminas por parte del tumor. La determinación de catecolaminas y sus metabolitos en plasma u orina es fundamental para la detección y diagnóstico de tumores de células cromafínicas.

Químicamente, las catecolaminas son monoaminas. La estructura en anillo no solamente hace que estos compuestos sean naturalmente fluorescentes sino que también los tornan sensibles a la luz y fácilmente oxidables. Los primeros métodos analíticos de estimación de catecolaminas se basaron en sus propiedades de fluorescencia (1-3).

La principal vía de degradación de las catecolaminas conocida hasta 1956 demostró la presencia de ácidos orgánicos que poseen el grupo 4-hidroxi-3-metoxi en orina humana (4) y de esta forma se demostró la importancia de la metilación de las catecolaminas en el organismo por aislamiento del metabolito ácido 4-hidroxi-3-metoxi mandélico (HMMA) (5). Otros reportes posteriores mostraron la existencia de metabolitos amino metoxilados – normetadrenalina y metadrenalina– junto con el producto final del metabolismo de dopamina, ácido homovanílico (HVA) (6) (7). Hasta hace poco tiempo las determinaciones espectrofotométricas para el análisis de los niveles urinarios de HMMA y metadrenalina total fueron frecuentemente usadas como *tests* bioquímicos para la detección de tumores de la cresta neural tales como el feocromocitoma (8) (9). Sin embargo, la introducción de la cromatografía gaseosa (GC) y de la cromatografía líquida de alta *performance* (HPLC) permitió la cuantificación de estos metabolitos de catecolaminas con un alto grado de sensibilidad y especificidad, eliminando muchos problemas asociados a las técnicas previas espectrofotométricas.

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

### BIOQUÍMICA DE LAS CATECOLAMINAS

Las tres catecolaminas dopamina, adrenalina y noradrenalina derivan de la dihidroxifenilalanina (DOPA), un ácido amino catecólico. La noradrenalina es el producto final en el sistema adrenérgico central y periférico, mientras que en la médula adrenal es posteriormente metabolizada a adrenalina.

Los principales sitios de producción de catecolaminas son el cerebro, la médula adrenal y las neuronas simpáticas. Una vez sintetizadas, las catecolaminas son almacenadas sin cambios clínicos dentro de los gránulos cromafínicos de la médula adrenal y en las neuronas postganglionales, en vesículas de almacenamiento unidas a la membrana. Dentro de estas vesículas de almacenamiento, las catecolaminas son complejadas con proteínas no difusibles (cromograninas) que sirven para inactivar y prevenir la degradación enzimática hasta la liberación por exocitosis de los contenidos de las vesículas. Aunque los tumores de células cromafínicas pueden secretar una variedad de neuropéptidos biológicamente activos (10), los productos secretorios dominantes son las catecolaminas. Con una vida media en plasma de aproximadamente de 1-2 min, las catecolaminas ejercen sus diversos efectos biológicos por unión a receptores  $\alpha$  y  $\beta$  presentes en la membrana plasmática que son conocidos como receptores adrenérgicos, clasificados de acuerdo a su afinidad por varios agonistas o antagonistas. La dopamina también estimula los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos así como también receptores dopaminérgicos, produciendo un aumento de la presión sanguínea sistólica y del flujo cardíaco.

Sólo una pequeña fracción de las catecolaminas liberadas desde la vesículas de almacenamiento se une a receptores postganglionales, ya que la mayoría es eficientemente removida por captación neuronal y extraneuronal de tal forma que sólo una pequeña fracción escapa a la circulación (11). Los antidepressivos tricíclicos y la cocaína bloquean en forma efectiva el proceso de captación neuronal. Las principales vías para el camino de las catecolaminas que entraron en la circulación involucran dos enzimas, la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT), produciendo una serie de metabolitos (12). Luego de ser captada por la neurona, la noradrenalina es inactivada por almacenamiento o desaminada oxidativamente por la MAO a 3,4-dihidroxifenilglicol antes de ser reducida y O-metilada por COMT a 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (13). La degradación extraneuronal de noradrenalina y adrenalina por COMT lleva a la formación de normetadrenalina y metadrenalina, respectivamente. Posterior desaminación y oxidación por MAO termina en la formación de HMMA, el principal producto final del metabolismo de noradrenalina y adrenalina (14) (15). El metabolismo

de la dopamina semeja estrechamente el de noradrenalina y adrenalina, con un metabolismo extraneuronal realizado por COMT y MAO que conduce a la formación de 3-metoxitiramina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y finalmente HVA.

Como las catecolaminas dietarias son extensamente conjugadas antes de alcanzar la circulación, los niveles de catecolaminas libres (no conjugadas) en plasma y orina son independientes de las influencias dietarias y reflejan con mayor seguridad la producción endógena. En el plasma, casi el 99% de la dopamina y alrededor del 60-70% de la noradrenalina y adrenalina circulantes existen como conjugados con sulfato y son excretadas junto con sus derivados O-metilados en orina como conjugados glucurónido y sulfato. En contraste, la catecolamina predominante en orina es dopamina no conjugada, de la cual una sustancial proporción es derivada de síntesis de *novó* en los túbulos renales a partir del precursor DOPA (16). A diferencia de las catecolaminas y de las metadrenalinas, HMMA y HVA no están significativamente conjugados.

### Metodología analítica

Para el análisis de catecolaminas y sus metabolitos en tejidos y fluidos biológicos se utilizan una serie de técnicas fluorimétricas, espectrofotométricas, radioenzimáticas, cromatografía GC y HPLC e inmunoensayos (17) (18) pero, con excepción de la HPLC, pocas aplicaciones han tenido amplia aceptación en el laboratorio clínico. Se ha demostrado que la HPLC con detección electroquímica (19) provee una técnica específica y sensible capaz de ser automatizada y es la más comúnmente preferida para la determinación de catecolaminas y sus metabolitos. Sin embargo, inmunoensayos recientemente desarrollados se muestran promisorios como una alternativa viable respecto a la HPLC (20). Además, la espectrometría de masa en *tandem* que puede ser combinada con sistemas de HPLC, ofrece ventajas de sensibilidad analítica y especificidad dado que la detección se basa en la masa molecular y la estructura química, propiedades únicas para cada molécula.

Aunque la HPLC combinada con fluorescencia o detección electroquímica puede proveer la sensibilidad necesaria para el análisis de catecolaminas y sus metabolitos, el paso inicial de purificación previo a la separación cromatográfica es de importancia crítica. El pretratamiento de las muestras es a menudo más simple con HPLC y detección electroquímica que con detección por fluorescencia ya que esta última generalmente requiere la formación de derivados fluorescentes estables. Sin embargo, los detectores electroquímicos son más susceptibles a fluctuaciones en la ve-

locidad de bombeo de la HPLC, resultando en un aumento de la relación señal/ruido; además, la fase móvil debe ser eléctricamente conductora restringiendo la elección de su composición.

## Análisis de HMMA y HVA urinarios

Las siguientes referencias bibliográficas resumen diversos métodos cromatográficos para la detección de estos metabolitos (21-28).

### HPLC

Con la amplia disponibilidad de equipamiento para HPLC los procedimientos para la estimación de HMMA y HVA fueron simplificados y mejoraron las técnicas de aislamiento preliminar para limitar la coextracción de interferencias. Numerosos procedimientos se han descrito que involucran extracción con solventes (29), cromatografía de partición iónica con resinas de intercambio aniónico (30) y el uso de pequeñas columnas de sílica (31)(32). Muchos de los métodos publicados pueden aislar simultáneamente HMMA y HVA a partir de la orina con muy poca alteración en las condiciones de la extracción (29-34). Sin embargo, con el advenimiento de procedimientos más específicos para la estimación de catecolaminas urinarias, la sensibilidad diagnóstica de HMMA en la detección de feocromocitoma ha sido cuestionada (35)(36). Actualmente, la determinación de HMMA es considerada clínicamente más útil cuando se usa en conjunto con el análisis de HVA en la investigación bioquímica y monitoreo del neuroblastoma (28)(37), más que en la investigación del feocromocitoma.

## Análisis de catecolaminas libres urinarias

### HPLC

Los métodos de HPLC simplificaron enormemente la estimación de las catecolaminas urinarias y permitieron que técnicas que estaban originalmente confinadas a los laboratorios de investigación se pudieran aplicar como procedimientos de rutina en laboratorios bioquímico-clínicos. Con la posibilidad de automatización, un sistema de HPLC permite el manejo de un gran número de muestras y la investigación de rutina de pacientes con hipertensión sintomática. Se han descrito diferentes métodos de HPLC para la cuantificación de catecolaminas libres urinarias, lo que indica que ninguno es ideal aún con el aumento de la especificidad analítica ofrecida por los sistemas de detección electroquímica o fluorimétrica. El aislamiento preliminar y la purificación de las catecolaminas a partir de la

orina, generalmente involucra extracción en fase sólida basada en la interacción de la función *cis*-diol del núcleo catecol con alúmina, o con resinas de intercambio iónico, o ácido bórico y sus derivados o combinaciones de estos procedimientos (38-41). La elección del procedimiento de aislamiento precromatográfico estará invariablemente determinada por el sistema de detección empleado. Si la detección es fluorimétrica, se debe prestar consideración a las interferencias producidas por drogas que posean propiedades fluorescentes, tales como alfa-metildopa (42) o isoproterenol, mientras que se ha demostrado que el labetalol interfiere en los procedimientos de HPLC que utilizan detección electroquímica (43).

Históricamente, los procedimientos descritos en las siguientes referencias constituyeron la base para muchos procedimientos de HPLC (44-48). Muchos procedimientos han usado alúmina para el aislamiento en conjunción con HPLC y detección electroquímica para el análisis de catecolaminas plasmáticas (49)(50), pero, como la alúmina aislará todos los compuestos con un núcleo catecol, la especificidad del aislamiento con alúmina a partir de muestras de orina es limitada (51). Aislamiento con alúmina de una muestra de orina a ser analizada es probablemente más conveniente para HPLC con detección de fluorescencia (52-54) que con detección electroquímica, independientemente de su uso en una columna o en el modo de extracción "batch". Sin embargo, la combinación del aislamiento con alúmina seguida de un segundo procedimiento de aislamiento tal como minicolumnas de sílica puede ayudar a resolver muchos de los problemas inherentes a una separación inicial con alúmina pero con la desventaja de costo y tiempo de preparación.

Como una alternativa a la separación con alúmina han sido usadas las resinas de intercambio catiónico débil y fuerte para el aislamiento de catecolaminas libres a partir de la orina (39)(55)(56). Las resinas de intercambio catiónico fuerte tal como las resinas Dowex tienen la desventaja de ser menos selectivas, mientras que la selectividad de los intercambiadores iónicos con ácidos carboxílicos débiles tales como BioRex 70 puede ser mejorada usando elusión con ácido bórico (58-60). En esta forma, el aislamiento inicial ocurre a través de la función amina, mientras que la elusión con ácido bórico forma un complejo de la función *cis*-diol. La combinación del aislamiento con intercambio iónico y alúmina ha sido reportada para dar menos interferencia en los cromatogramas de HPLC pero con el inconveniente de un aumento en el tiempo de preparación de la muestra (40)(60). Hay productos comerciales disponibles para el aislamiento de catecolaminas urinarias basados en minicolumnas de sílica con propiedades de intercambio catiónico fuerte y débil, pero tienen costos altos (61).

El incremento en la especificidad obtenida al utilizar el aislamiento con ácido bórico ha sido luego extendido al uso de geles de ácido fenilborónico inmovilizado y ácido bórico en fase sólida (62-66). La elución se logra rápidamente por disminución del pH, constituyendo un método simple y rápido previo al análisis por HPLC. Sin embargo, una de las desventajas previamente notada fue la variación en las propiedades de diferentes "batches" de geles (67). Este problema fue superado en un procedimiento elegante (68) que involucra la formación de un complejo con difenilborato, extracción del complejo por un par de solvente iónico-orgánico dentro de una mezcla de heptano y octanol antes de una extracción de las catecolaminas en ácido acético. Este procedimiento produce recuperaciones de hasta 100% para las tres catecolaminas y fue posteriormente refinado mediante la introducción de un paso inicial de aislamiento utilizando una columna de intercambio catiónico fuerte (69).

#### PROCEDIMIENTOS AUTOMÁTICOS

Muchas de las desventajas de los geles de ácido bórico fueron superadas por inmovilización de derivados de este ácido sobre micropartículas de sílica (70), permitiendo la preconcentración y aislamiento de catecolaminas urinarias para la detección por HPLC automatizada (71). Otras técnicas de aislamiento que utilizan alúmina o intercambio catiónico en columna de sílica ((72) (73) (74) demostraron el potencial de la automatización para el análisis de las catecolaminas urinarias.

### Análisis de normetadrenalina y metadrenalina urinarias

Estos metabolitos son excretados en orina tanto como aminos libres como conjugados con sulfato y glucurónido. Los niveles de la fracción libre representan menos del 3% del total de la excreción de metadrenalina urinaria. La normetadrenalina y metadrenalina urinarias derivan fundamentalmente del metabolismo de las catecolaminas circulantes por vías extraneuronales (75) y como tal no son significativamente influenciadas por la dieta (76). Ha sido demostrada la ventaja práctica del uso de los métodos de HPLC, permitiendo la determinación separada de normetadrenalina y metadrenalina en orina (77). Además, recientemente se ha reportado la superioridad diagnóstica que se obtiene por la medida de normetadrenalina y metadrenalina en plasma utilizando procedimientos altamente específicos y sensibles de HPLC (78).

Aunque unos pocos estudios han medido las fracciones no conjugadas en orina (79-81) se prefiere la liberación de los metabolitos conjugados. Consecuentemente, las metadrenalininas totales urinarias (libres más conjugadas) son generalmente determinadas usando un paso de hidrólisis preliminar (9) (82) (77).

#### MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Las técnicas basadas en HPLC para la determinación de metadrenalininas ofrecen un enfoque más práctico que la GC o los procedimientos fluorimétricos, ya que pueden ser utilizadas condiciones uniformes de HPLC para las catecolaminas urinarias y las metadrenalininas (56) (58). Los procedimientos de extracción de metadrenalininas originales (9) generan gran complejidad en la subsecuente HPLC, por lo tanto esto se ha mejorado mediante aislamiento selectivo empleando una amplia variedad de procesos de intercambio iónico o una combinación de estos con extracción con solventes (83-86). Varios investigadores han intentado solucionar los problemas de limitada especificidad de aislamiento por combinación del HPLC con sistemas más específicos de detección tales como la espectrometría de masa en *tandem* (LC-MS/MS) (87-89), detección por fluorescencia (90) (91) o una disposición de detectores culométricos múltiples (92). En contraste, otros investigadores adaptaron exitosamente un sistema automático para medir catecolaminas y metadrenalininas simultáneamente en muestras de hidrolizados de orina (93).

Sin embargo, ha sido desarrollado un procedimiento simple basado en una cromatografía dual en columna con intercambio catiónico y aniónico (57) (58). Los cromatogramas resultantes no muestran la complejidad asociada con otros procedimientos. Este procedimiento ha sido recientemente validado por comparación con resultados obtenidos por un método GC-MS (94). Con excepción del procedimiento automatizado ASTED (93), la determinación de normetadrenalina y metadrenalina requiere invariablemente un paso inicial de purificación previo a cualquier técnica basada en HPLC. Aún procedimientos analíticos altamente sensibles y específicos tales como LC-MS/MS (95) (96) requieren una extensa preparación de las muestras.

### Análisis de catecolaminas plasmáticas

Hay numerosos trabajos en la literatura que reportan determinaciones de catecolaminas plasmáticas con técnicas basadas en ensayos radioenzimáticos, fluorescencia o HPLC. Trabajos pioneros (97) mostraron la aplicación de las técnicas radioenzimáticas usando mé-

todos con uno o dos isótopos para producir ensayos muy sensibles que requerían pequeño volumen de muestra (50-100  $\mu\text{L}$ ). Sin embargo, los métodos son bastante complejos y tediosos requiriendo una atención minuciosa y no son adecuados para aplicar en la rutina del laboratorio clínico. Aunque las catecolaminas poseen fluorescencia natural, muchos otros compuestos y drogas presentes en el plasma tienen absorción y emisión máxima a la misma longitud de onda (98) y por lo tanto, los métodos fluorimétricos requieren técnicas de aislamiento altamente específicas. Aunque la conversión de las catecolaminas a derivados fluorescentes con triindoxiindol o etilendiamina puede aumentar la sensibilidad, la especificidad es todavía limitada debido a las interferencias de otras drogas y de componentes de las dietas (1-3). Combinando HPLC con detección por fluorescencia y usando derivatización con precolumna (99) o postcolumna (100) se puede resolver alguna de las desventajas, pero HPLC con detección amperométrica o coulométrica (HPLC-EC) es el procedimiento analítico dominante para el análisis de las catecolaminas plasmáticas. La principal ventaja de los procedimientos basados en HPLC es la versatilidad, ya que con mínimos cambios de las condiciones cromatográficas, las catecolaminas urinarias y sus metabolitos también pueden ser determinados.

El pretratamiento de las muestras de plasma para el análisis de catecolaminas involucra generalmente una extracción sobre alúmina lavada con ácido (46-50) (57) o el uso de aislamiento con ácido bórico (63-69). El principal desafío analítico reside en adquirir la sensibilidad necesaria para los bajos niveles de catecolaminas plasmáticas restringiendo la coelución de muchos compuestos endógenos y exógenos que permanecen luego de un proceso no selectivo como el aislamiento sobre alúmina (47) (69). Algunos investigadores han combinado el aislamiento sobre alúmina con resinas de intercambio catiónico en un intento para solucionar la limitada especificidad pero a expensas de menores recuperaciones (55) (101) (102), mientras que otros han descrito las ventajas de usar el pretratamiento de las muestras *on-line* o microcolumnas de ácido bórico para HPLC (diámetro interno < 1 mm) para mejorar la sensibilidad (71) (103). Aunque no es un proceso selectivo, muchos procedimientos todavía involucran el procedimiento de alúmina lavada con ácido, y con cuidadosa atención hacia la estandarización, este procedimiento puede proveer análisis confiables. Se debe prestar especial atención a las condiciones de HPLC tales como la selección de la fase móvil y el potencial de oxidación electroquímico (104) (105) que influyen significativamente la selectividad. Alteraciones simples en la concentración de los modificadores orgánicos o del contra ión del par iónico pueden producir cambios significativos en los

rendimientos de la separación cromatográfica y proveen la oportunidad de resolver problemas encontrados en la coextracción de compuestos interfirientes. Sin embargo, tales modificaciones pueden subsecuentemente alterar el comportamiento cromatográfico de otras sustancias con consecuencias impredecibles.

En una excelente revisión sobre la determinación de catecolaminas plasmáticas (106) se promueve el uso de columnas de HPLC con intercambio catiónico en lugar de las más populares de fases reversa con pares iónicos. En contraste con técnicas que involucran extracción manual se ha mostrado que el sistema Gilson ASTED automatizado puede ser fácilmente adaptado para la determinación de catecolaminas plasmáticas, proveyendo buena precisión analítica y eliminación de los pasos de extracción manual (107). Independientemente de la técnica de aislamiento seleccionada, el análisis de catecolaminas plasmáticas por HPLC-EC claramente requiere un mayor grado de atención que la determinación de catecolaminas urinarias, y deben ser validados procedimientos nuevos contra aquellos procedimientos bien establecidos. Cambiando las condiciones de HPLC, es posible comparar resultados obtenidos para cada muestra usando la misma técnica de extracción en alúmina pero empleando condiciones alternativas de HPLC tales como intercambio catiónico o fase reversa con pares iónicos. Esto puede ayudar a identificar problemas asociados con la especificidad analítica y la selectividad (57) (108).

#### ANÁLISIS DE NORMETADRENALINA Y METADRENALINA PLASMÁTICAS

Estudios recientes han clarificado los beneficios clínicos que las determinaciones fraccionadas de las metadrenalin plasmáticas ofrecen para la investigación de tumores de células cromafínicas (78) (109) (110) (111) (112). Un resultado normal indica que la presencia de un feocromocitoma es altamente improbable. La determinación de las metadrenalin plasmáticas involucra métodos radioenzimáticos o procedimientos basados en HPLC. Las metadrenalin están normalmente presentes en plasma en concentraciones menores que las de las catecolaminas y, por lo tanto, requieren procedimientos altamente específicos y sensibles (111-113) (39) (115). Posteriormente fueron introducidos mayores refinamientos a los procedimientos basados en HPLC (116) (117), incorporando el uso de resinas de intercambio iónico débiles y fuertes para el aislamiento preliminar de las metadrenalin a partir de plasma, para luego proceder a su determinación por HPLC con detección electroquímica. Debido a las bajas concentraciones de las metadrenalin no conjugadas en plasma se midieron normetadrenalina y metadrenalina total

(libre + conjugada) (116)(117). Posteriormente, se desarrolló un procedimiento analíticamente más sensible para HPLC (118) que emplea columnas descartables de intercambio catiónico sobre sílica gel y éste ha sido la base de la mayoría de los procedimientos actualmente en uso (109)(111)(112)(119). Indudablemente, el análisis de las metadrenalin plasmáticas requiere cualquier procedimiento basado en HPLC para lograr los mayores niveles de sensibilidad analítica a fin de obtener resultados confiables (120); sin embargo, con el desarrollo de técnicas inmunológicas confiables para la determinación de las metadrenalin urinarias totales, tales procedimientos pueden ofrecer una alternativa viable en el futuro (20)(121).

Actualmente, sin embargo, la pregunta en el tema se refiere no a la elección del método sino al hecho de si la medida de las metanefrin plasmáticas no conjugadas o totales representa el procedimiento bioquímico óptimo para el diagnóstico del feocromocitoma (76)(78)(112)(116)(117)(122)(123). El *clearance* de las metadrenalin conjugadas con sulfato como producto final del metabolismo de las catecolaminas depende casi enteramente de la eliminación a través del riñón. Así, las concentraciones plasmáticas elevadas de metadrenalin totales pueden deberse a una disminución de la función renal, limitando su especificidad diagnóstica (116)(117). Lenders *et al.*(78) compararon las metadrenalin totales y no conjugadas en su utilidad para el diagnóstico del feocromocitoma y concluyeron que la determinación de las concentraciones totales no ofrece ventajas sobre la determinación de la fracción no conjugada. La presencia de un tumor produce mayores incrementos en las concentraciones de normetadrenalina libre que en la de normetadrenalina total. Sin embargo, otros investigadores (112) argumentan que la mayor vida media de las metadrenalin conjugadas con sulfato minimizarían las amplias variaciones en las concentraciones plasmáticas que podrían surgir de la liberación intermitente desde un tumor. Lo que está claro es que la determinación de las metadrenalin plasmáticas tiene una sensibilidad diagnóstica superior a las de las catecolaminas plasmáticas para el diagnóstico del feocromocitoma, y por lo tanto son un marcador más confiable para detectar la presencia de ese tumor (75).

## Inmunoensayos

Se han desarrollado varios procedimientos de este tipo en el pasado (124-126), pero hay problemas asociados con la especificidad de los anticuerpos para esos haptenos de bajo peso molecular lo que ha restringido la aceptación de estas técnicas (127)(128). Como las catecolaminas y las metadrenalin no poseen suficiente capacidad inmunogénica, las técni-

cas de inmunoensayos dependen de la posibilidad de obtener anticuerpos contra los derivados N-acetilados (124-126)(129)(130). En este contexto, las catecolaminas se aíslan usando extracción sobre alúmina y ácido bórico, seguida por una metilación enzimática. A diferencia de las catecolaminas, las metadrenalin no requieren un paso de aislamiento. Se ha reportado un estudio comparativo entre los resultados de inmunoensayos para la detección de catecolaminas urinarias y las metadrenalin con los valores obtenidos por HPLC, mostrando ausencia de interferencias para un amplio rango de medicamentos (20). Utilizando un *kit* comercial (121) se compararon los resultados para las metanefrin urinarias determinadas por un enzimoimmunoensayo y se concluyó que estos *kits* pueden ser razonablemente aplicados en la detección bioquímica del feocromocitoma. Sin embargo, se investigó la posibilidad de un programa de detección de neuroblastoma en niños basado en un inmunoensayo para HVA, concluyéndose que un HPLC es esencial a fin de evitar resultados falso positivos (131). En un inmunoensayo se debe recordar que cada catecolamina individual, o cada metabolito, requiere un *kit* separado para su análisis a diferencia de los procedimientos basados en HPLC, en los cuales varios analitos pueden ser cuantificados simultáneamente dentro de una misma corrida. Sin embargo, tales *kits* pueden proveer una alternativa para HPLC (20).

## Consideraciones pre-analíticas

### TIPOS DE MUESTRAS DE ORINA

En neonatos y niños pequeños las muestras tomadas al azar han reemplazado a las muestras de 24 h debido a dificultades prácticas (37)(132). Mientras se han propuesto muestras de orina tomadas al azar para el diagnóstico del feocromocitoma en adultos (133)(134), la determinación de las catecolaminas libres y de las metadrenalin totales generalmente se realiza sobre muestras de orina de 24 h. Sin embargo, los problemas relacionados con la recolección completa de tales muestras han llevado a propuestas alternativas con otras estrategias de recolección o por corrección de volumen expresando los resultados como una relación a los valores de creatinina (97)(135)(136). Sin embargo, esto puede conducir a complicaciones posteriores porque la creatinina exhibe una amplia variabilidad biológica (137). Alternativamente, en el caso de feocromocitomas que secretan catecolaminas sólo exacerbadamente la recolección de muestras de orina al azar a continuación de tales episodios puede proveer información clínica.

Un procedimiento simple y conveniente para investigar individuos con un alto grado de sospecha clínica

de un tumor secretor de catecolaminas involucra la determinación de noradrenalina en muestras de orina de la noche (138). Dado que las catecolaminas exhiben una variación diurna en su excreción (139), la eliminación de estímulos ambientales y emocionales asociados con las variaciones, resulta en una declinación de la excreción nocturna en individuos normales. (140) (141). La eficacia de la recolección de orina de una noche para la detección de feocromocitoma fue demostrada por Peaston *et al.* (142). La secreción autónoma de catecolaminas y metadrenalinas fue evidente en todos los pacientes con feocromocitomas y provee una mejor sensibilidad diagnóstica y una mayor especificidad que la recolección de orina de 24 h. La recolección de las muestras de orina nocturna simplifica el protocolo y evita los efectos del estrés y el ejercicio sobre la excreción de catecolaminas. La investigación de pacientes con la sospecha de un tumor secretor de catecolaminas requiere más de una recolección de orina a fin de evitar la posibilidad de perder episodios esporádicos de secreción. Resultados anormales provenientes de la recolección de muestras de orina nocturna pueden ser reconfirmados con recolección de muestras de orina de 24 h.

#### ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

##### *Catecolaminas urinarias y sus metabolitos*

Estudios recientes han demostrado la necesidad de reducir el pH de la orina a menos de 3,5 (19) (74) (143-145). A pH 3.0 se ha demostrado alguna pérdida de catecolaminas (145). Otros investigadores consideran que es suficiente el agregado de 0,5 g de EDTA y metadisulfato de sodio en los recipientes de recolección para estabilizar muestras de orinas de 24 h para la determinación de catecolaminas y metadrenalinas, pudiendo guardarse las muestras durante dos semanas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o por períodos más prolongados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (146). Sin embargo, otros resultados muestran que la temperatura de almacenamiento de las muestras de orina tienen una profunda influencia sobre la estabilidad de las catecolaminas (147). Generalmente los pacientes son ambulatorios y ellos reciben instrucciones precisas para la recolección y el subsecuente almacenamiento de la orina de 24 h, pero controlar la amplia variación en las condiciones de almacenamiento es virtualmente imposible y la adición de un volumen fijo de ácido al recipiente antes de comenzar a recolectar la muestra de orina es recomendada para evitar la pérdida de catecolaminas.

Si el pH de la muestra de orina está por debajo de 3,5, las catecolaminas urinarias son estables hasta 5 días a temperatura ambiente (148) y por muchos meses a

$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pudiendo ser la orina fácilmente transportada a los centros de referencia. La experiencia también demuestra que la metadrenalina urinaria es considerablemente más estable que las catecolaminas parentales, siendo estables a temperatura ambiente hasta 7 días en muestras de orina recolectadas sin ningún preservativo ácido (94) (96) (148) (149). Así, muestras de orina que pueden no ser válidas para la estimación de catecolaminas pueden serlo para el análisis de metadrenalina.

##### *Catecolaminas plasmáticas*

La estabilidad de las catecolaminas y sus metabolitos en plasma ha sido motivo de mucha investigación (47) (98) (106) (150). Hay un cierto número de variables que deben ser consideradas cuando se recolectan muestras de plasma para la determinación de catecolaminas. Estas son: la hora del día, ya que la noradrenalina exhibe un patrón diurno; el sitio de muestreo, ya que las concentraciones de catecolaminas en sangre arterial son menores que en sangre venosa; estrés ambiental; influencia de la posición del cuerpo, ya que las concentraciones de catecolaminas plasmáticas pueden aumentar dos a tres veces desde una posición supina a una posición derecha; influencia del tabaco y de la ingesta de cafeína (150). Esto ha dado origen a una gran profusión de protocolos. Estos incluyen la adición de antioxidantes tales como ácido ascórbico (151), EDTA (152), EGTA con glutation (99) o metadisulfato de sodio (46) a la muestra de sangre heparinizada antes de la centrifugación y almacenaje del plasma a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La mayoría de los protocolos consideran en forma rigurosa la necesidad de la separación del plasma tan pronto como sea posible luego de la recolección de la muestra de sangre a fin de minimizar las pérdidas de catecolaminas. Los investigadores han concluido que las catecolaminas plasmáticas son estables sin antioxidantes en plasma hasta 6 semanas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (47) y por 1 año al menos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (106) (150). Se considera que la temperatura de almacenamiento de las muestras es muy importante (106), y que las muestras de plasma deberían ser almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . También es prudente incorporar antioxidantes tales como ácido ascórbico (151) a fin de estabilizar eluatos por 24 h a temperatura ambiente. La recolección, manipulación y preparación de las muestras de plasma para la determinación de catecolaminas debe ser cuidadosamente controlada y estandarizada para obtener resultados válidos y reproducibles. Las precauciones mínimas incluyen el uso de un catéter venoso y una posición de reposo reclinada para el paciente al menos 30 min antes de la extracción; el transporte de las muestras de sangre heparinizadas o con EDTA al laboratorio debe realizarse sobre el hielo y la centrifugación debe hacerse preferentemente a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  dentro de los 30 min, antes del almacenamiento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Metadrenalinas plasmáticas*

En contraste con las catecolaminas plasmáticas, las metadrenalinas plasmáticas son significativamente menos susceptibles a un incremento por influencias externas tales como cambio en la postura o el estrés, y las muestras de sangre pueden ser tomadas con el paciente sentado o en posición acostada (111) (112) (118-120). Esto implica que los requerimientos para los protocolos de determinación son menos exigentes que los necesarios para la determinación de catecolaminas plasmáticas. Sin embargo, todos los reportes realizados hasta la fecha han adoptado los mismos protocolos de muestreo para las metadrenalinas plasmáticas que para las catecolaminas, de acuerdo a estudios donde se ha comparado su sensibilidad y especificidad diagnóstica (109) (111) (112) (118-120). Las muestras de sangre se colectan sobre hielo y se centrifugan dentro de los 30 min para luego ser almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Consideraciones analíticas

**EXACTITUD**

Hasta el presente no existen procedimientos de referencia para el análisis de las catecolaminas y sus metabolitos. Varios métodos de GC-MS (cromatografía gaseosa-espectrometría de masa) y HPLC-MS han sido reportados para los análisis en plasma y orina (27) (28) (80) (87-89) (93) (94) (153) y, aunque no está disponible en la mayoría de los laboratorios, la MS puede proveer una fuente invaluable para validar la exactitud, de los métodos usados de rutina. Mientras la HPLC ofrece una aproximación versátil y práctica para los análisis de rutina de las catecolaminas y sus metabolitos, los procedimientos basados en HPLC también tienen sus limitaciones, por lo que se debe efectuar una apreciación crítica de los resultados a fin de evaluar potenciales fuentes de inexactitud.

**FUENTES POTENCIALES DE INEXACTITUD**

Aunque se han realizado numerosos estudios para caracterizar las posibles interferencias de los análisis de catecolaminas plasmáticas (154-156), las muestras de orina para el análisis de las catecolaminas y sus metabolitos contienen invariablemente un amplio rango de drogas antihipertensivas, convirtiendo el análisis en una tarea prácticamente imposible para lograr con muestras de orina. La interferencia por drogas puede influir significativamente en los resultados por coelusión con picos que son de interés o por alterar la recuperación de la muestra durante la etapa de preparación en los procedimientos a base de HPLC (157) (158). Particularmente sospechoso es el hallazgo de una adrenalina elevada en ausencia de una concentración aumentada de noradrenalina. Aun con sofisti-

cados procedimientos de integración en HPLC, los cromatogramas de HPLC deben ser manejados cuidadosa y críticamente si se pretende detectar compuestos que interfieren y se desea evitar las fuentes de inexactitud. Particularmente se debe prestar atención a la recuperación del estándar interno, a alteraciones en los tiempos de retención relativos de los picos de interés o de estándares internos junto con el ensanchamiento relativo de los picos y la simetría de los mismos para ayudar en la identificación de compuestos interferentes. Todos los métodos deben ser evaluados, incluyendo muestras de pacientes que están bajo tratamiento con drogas antihipertensivas y otros compuestos conocidos que causan interferencias en los métodos de determinación de catecolaminas (42) (43) (51) (157) (158). La comparación del procedimiento con otros métodos basados en diferentes principios ayuda a validar la exactitud analítica.

En ausencia de una preparación de referencia internacional, la determinación de la exactitud dependerá del uso de un material de calibración de pureza conocida, de experimentos de recuperación y de la participación en programas externos de control de calidad. Las catecolaminas y sus metabolitos están disponibles como bases libres o como sales de ácido clorhídrico o de bitartrato, y exhiben estabilidad en ácido clorhídrico diluido o ácido perclórico o sulfúrico. Actualmente hay disponibles varios programas de control de la exactitud para la calidad de los procedimientos utilizados para las catecolaminas urinarias, metadrenalinas, HVA y HMMA. Los proveedores además del material adecuado para el control de calidad interno también ofrecen todos los reactivos necesarios, estándares, *kits* de extracción y *hardware* tales como columnas de HPLC para asegurar la estandarización y la reproducibilidad si las instrucciones se siguen estrictamente.

**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EXCRECIÓN DE CATECOLAMINAS**

Aunque diversos factores fisiológicos y fisiopatológicos, tales como la actividad física, el estrés emocional, la ingesta de comidas y la hipoglucemia pueden tener un efecto significativo sobre las catecolaminas circulantes (15), tales cambios de corto plazo raramente impactan sobre la concentración de catecolaminas urinarias o sus metabolitos en muestras de 24 horas. Sin embargo, la excreción de catecolaminas exhibe una variación diurna (138-142) y las concentraciones plasmáticas pueden ser significativamente influenciadas por la postura corporal, con niveles aumentados en los individuos ambulantes. El metabolismo renal de las catecolaminas es complejo y en pacientes con insuficiencia renal o falla renal, las catecolaminas plasmáticas o las metadrenalinas pueden estar aumentadas dos a tres veces por encima de los límites de referencia en pacientes que no tienen feocromocitoma (159).



Las drogas también pueden tener una influencia significativa sobre las concentraciones de catecolaminas urinarias o plasmáticas (156-158). Estas influencias deben ser consideradas cuando se establecen los datos de referencia para las catecolaminas y sus metabolitos y los valores deben ser obtenidos de grupos de sujetos tan diversos como sea posible (160-162). Existen experiencias en el tratamiento de feocromocitomas en niños (162), mientras que algunos estudios proveen intervalos de referencia relacionados con la edad en muestras de orina tomadas al azar en niños (164-168).

## Detección por el laboratorio de tumores secretores de catecolaminas

Estos tumores, entre los que se encuentran los neuroblastomas, los feocromocitomas o paragangliomas, son tumores raros que surgen en el tejido cromafínico. Su distribución anatómica sigue estrechamente la de los sitios donde hay células cromafínicas presentes en el momento del nacimiento, tales como el sistema nervioso simpático, los ganglios autonómicos, la médula adrenal y las células paragangliares. Fundamental para el diagnóstico de estos tumores es la determinación bioquímica de las catecolaminas o sus metabolitos en plasma u orina (35) (36) (93).

### NEUROBLASTOMAS

Estos tumores se originan a partir de neuroblastos ectodérmicos en la médula adrenal o en otros sitios en los cuales hay presente tejido simpático. Es uno de los tumores malignos más comunes de la niñez, generalmente presente antes de los tres años; más comúnmente ubicado en el abdomen (60%). Generalmente se presentan como una masa asintomática, de rápido crecimiento con metástasis extendidas a los nódulos linfáticos adyacentes. Aproximadamente el 90 a 95% de los neuroblastomas están asociados a una excesiva producción de catecolaminas o sus metabolitos, excesiva sudoración, enrojecimiento, dolores de cabeza, diarreas y encefalopatía cerebelar aguda. En niños muy pequeños el tumor puede remitir espontáneamente, pero esto no sucede en niños mayores. Clínicamente, la mejor forma para la detección de estos tumores involucra la determinación de HVA, HMMA y dopamina en muestras de orina al azar. Esto, junto con la edad y el estadio, puede ayudar a determinar el pronóstico y a establecer un tratamiento.

### FEOCROMOCITOMA

La incidencia de estos tumores se ha estimado en < 0,5% de los pacientes hipertensos. El diagnóstico es

importante porque la hipertensión generalmente es curable por extirpación del tumor y, como hay una alta incidencia de complicaciones cardiovasculares asociadas con esta enfermedad, es imperativo que el diagnóstico no sea tardío ni equivocado (169) (171). Entre las características clínicas, la hipertensión es la más común, con síntomas de dolores de cabeza, excesiva sudoración y palpitaciones (171). Sin embargo, unos pocos pacientes pueden tener presión normal o, hasta en raros casos, ser hipotensos debido predominantemente a la secreción de adrenalina o dopamina (172). Un significativo número de feocromocitomas han sido descubiertos en las autopsias, demostrando que muchos pacientes han permanecido prácticamente asintomáticos durante toda su vida (173-175). En los adultos, el 90% de los feocromocitomas ocurren en la médula adrenal y aproximadamente el 10% de ellos es bilateral. Los feocromocitomas extraadrenales (paragangliomas) se presentan en células cromafínicas dentro del eje paragangliómico simpático. Muchos de estos tumores pueden ser no funcionales con ninguna evidencia bioquímica de excesos de catecolaminas en plasma u orina (176) (177). Formas hereditarias del feocromocitoma han sido descritas en asociación con la neoplasia endocrina múltiple (MEN) tipo 2, enfermedad de von Hippel-Lindau y la neurofibromatosis de von Recklinghausen. El feocromocitoma en MEN 2 está asociado con una mutación del proto-oncogen *RET* y el *screening* de familias para tales mutaciones ha mejorado el manejo clínico en pacientes con feocromocitomas heredables (169).

El diagnóstico de feocromocitoma depende de un alto índice de sospecha clínica y de la confirmación bioquímica de una secreción excesiva de catecolaminas. Recientemente, la determinación de metadrenalin plasmáticas ha sido recomendada como el procedimiento ideal para la detección y exclusión de la presencia de feocromocitomas tanto en niños como en adultos (76) (117) (178) (179). Sin embargo, actualmente la determinación de metadrenalin plasmáticas no está ampliamente disponible. Las determinaciones de catecolaminas plasmáticas tienen valor diagnóstico limitado (180-182). Una única determinación plasmática puede no revelar un feocromocitoma con secreción episódica, mientras que una muestra de orina colectada durante 24 h o por la noche provee un índice integrado de la concentración de catecolaminas. Sin embargo, el análisis en plasma puede ser el único *test* diagnóstico útil en un paciente anúrico y oligúrico (35) (36) (168) (183) (184). Cuando existen complicaciones o dificultades prácticas con estas técnicas, la concentración de catecolaminas libres urinarias suplementadas, tan frecuentemente como sea posible, con la determinación de metadrenalin urinarias fraccionadas, aumenta la probabilidad de detectar un feocromocitoma. Con una determinación inequívoca de ca-

tecolaminas urinarias altas, la determinación de las metadrenalinas fraccionadas provee una posterior confirmación bioquímica. La combinación de estas dos determinaciones puede ser útil para distinguir aumentos límites en las excreciones de catecolaminas de fuentes no tumorales o cuando hay sospecha clínica que indica la posible presencia de un feocromocitoma (185). Es importante reconocer que no hay un único procedimiento perfecto de *screening* urinario para la detección bioquímica de un feocromocitoma. El análisis de muestras repetidas de orina debe ser siempre considerado para excluir o confirmar la posible presencia de un feocromocitoma. Si la sospecha clínica es alta y la catecolaminas o las metadrenalinas son dudosas debe ser incluido un análisis posterior de muestra de orina en dos o tres ocasiones, idealmente en el tiempo en el que el paciente es sintomático.

En la mayoría de los pacientes no es necesario hacer una recomendación de restricción dietaria o de medicación antes del *screening* urinario. Sin embargo, algunas drogas como el Labetalol pueden interferir con muchas técnicas de determinación de catecolaminas y metadrenalina y debería discontinuarse durante 4-7 días antes de la repetición del análisis.

Existen diversas técnicas para la localización anatómica de los tumores. La mayoría de los pacientes se torna normotenso después de una resección exitosa del feocromocitoma, pero unos pocos permanecen hipertensos. El seguimiento clínico y bioquímico consiste en la determinación de muestras de orina varias veces durante el primer año y luego anualmente. Los feocromocitomas malignos, que pueden ocurrir aproximadamente en un 10% de los pacientes, sólo pueden ser diagnosticados en la operación cuando el tumor es localmente invasivo y no puede ser eliminado quirúrgicamente, o se presenta recurrente después de la primer operación, o se encuentra que es metastático.

## Conclusiones

Existe una plétora de procedimientos disponibles para la determinación de catecolaminas y sus metabolitos que utilizan la versatilidad de las técnicas de HPLC con fluorescencia o detección electroquímica. El mayor grado de especificidad analítica logrado con HPLC-EC ha reducido significativamente el impacto de la interferencia de drogas. Las técnicas inmunológicas han sido desarrolladas y eliminan la necesidad de tener equipamiento de HPLC, ofreciendo una alternativa viable para la detección en el laboratorio del feocromocitoma. La mayor sensibilidad y especificidad de la cromatografía líquida - espectrometría de masa en *tandem* hace posible un rápido *screening* de grandes números de muestra de orina y plasma para las determinaciones de metadrenalina, eliminando la necesidad

de emplear protocolos especializados para la recolección de las muestras. Mientras la sensibilidad y especificidad diagnóstica de las catecolaminas urinarias es suficiente para detectar la mayoría de los tumores secretores de catecolaminas, las determinaciones de metadrenalinas plasmáticas o urinarias muestran ser procedimientos bioquímicos altamente confiables para la detección del feocromocitoma. Un planteo planificado de detección bioquímica del feocromocitoma que puede tener una amplia variedad de presentaciones clínicas y de patrones secretorios, permite una estrategia optimizada usando una combinación de marcadores en la detección de estos tumores. La interpretación de los resultados bioquímicos debe ser realizada en términos de la magnitud del aumento por encima de los intervalos de referencia más que de un simple resultado aumentado. Un paciente con resultados significativamente elevados y síntomas clínicos relevantes tiene una alta probabilidad de tener un tumor secretor de catecolaminas, siendo esta probabilidad mayor que la de un paciente con los mismos síntomas pero con un aumento en el límite de la excreción de catecolamina o metadrenalina. En estos casos se debe considerar siempre la recolección de muestras repetidas de orina antes de realizar una prueba por supresión.

Recomendaciones para la detección del feocromocitoma:

- Recolecciones de orina de una noche.
- Preservación de las muestras en ácido diluido.
- Medición de normetadrenalina urinaria, excreción de catecolamina y metadrenalina por HPLC con detección electroquímica.
- Los resultados anormales tienen que estar bien por encima de los correspondientes a una población apareada por edad con tratamientos por hipertensión.
- Medidas de reserva plasmática para: pacientes anéfricos; localización del tumor cuando fallan las técnicas de *scanning* convencionales; exclusión de disfunción del sistema nervioso autónomo.

## Referencias bibliográficas

1. Lund A. Simultaneous fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline in blood. *Acta Pharmacol Toxicol* 1950; 6: 137-46.
2. Engel A, van Euler US. Diagnostic value of increased urinary output of noradrenaline and adrenaline in phaeochromocytoma. *Lancet* 1950; ii: 387.
3. Natelson S, Lugovoy JR, Pincus JB. A new fluorometric method for the determination of epinephrine in blood. *Arch Biochem Biophys* 1949; 23: 157.

4. Armstrong MD, Shaw KNF, Wall PE. The phenolic acids of human urine. *J Biol Chem* 1956; 218: 293-303.
5. Armstrong MD, McMillan A, Shaw KNF. 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. *Biochim Biophys Acta* 1957; 25: 422-3.
6. Axelrod J. O-Methylation of epinephrine and other catechols in vitro and in vivo. *Science* 1957; 126: 400-1.
7. Shaw KNF, McMillan A, Armstrong MD. The methylation of 3,4-hydroxyphenylalanine. *J Biol Chem* 1957; 226: 255-66.
8. Pisano JJ, Crout JR, Abraham D. Determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. *Clin Chim Acta* 1962; 7: 285-91.
9. Pisano JJ. A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine. *Clin Chim Acta* 1960; 5: 406-14.
10. Fonseca V, Bouloux P-M. Pheochromocytoma and paraganglioma. *Baillières Clin Endocrinol Metab* 1993; 7: 509-44.
11. Bravo EL, Tarazi RC, Gifford RW, Stewart BH. Circulating and urinary catecholamines in pheochromocytoma: diagnostic and pathophysiologic implications. *N Engl J Med* 1979; 301: 682-4.
12. Sharman DF. Catabolism of the catecholamines. *Br Med Bull* 1973; 29: 110-5.
13. Brown MJ. Simultaneous assay of noradrenaline and its deaminated metabolite, dihydroxyphenylglycol in plasma: a simplified approach to the exclusion of pheochromocytoma in patients with borderline elevation of plasma noradrenaline concentration. *Eur J Clin Invest* 1984; 14: 67-72.
14. Eisenhofer G, Rudqvist B, Aneman A. Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3009-17.
15. Kopin IJ. Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance [review]. *Pharmacol Rev* 1985; 37: 333-63.
16. Brown MJ, Alison DJ. Renal conversion of plasma DOPA to urine dopamine. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 12: 251-3.
17. Causon RC, Brown MJ. Catecholamine measurements in pheochromocytoma: a review. *Ann Clin Biochem* 1982; 19: 396-404.
18. Rosano TG, Swift TA, Hayes LW. Advances in catecholamine and metabolite measurements for the diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Chem* 1991; 37: 1854-67.
19. Winkobe C. Measurement of catecholamines and their metabolites in urine. *ACP Broadsheet No. 127. J Clin Pathol* 1991; 44: 269-75.
20. Wassell J, Reed P, Kane J, Weinkove C. Freedom from drug interference in new immunoassays for urinary catecholamines and metanephrines. *Clin Chem* 1999; 45: 2216-23.
21. Felice LJ, Kissenger PT. A modification of the Pisano method for vanillylmandelic acid using high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1977; 76: 317-20.
22. Tuchman M, Crippen PJ, Krivit W. Capillary gas-chromatography determination of urinary homovanillic acid and vanillylmandelic acid. *Clin Chem* 1983; 29: 828-31.
23. Taylor GF, Duong T, Carter NG. An improved gas chromatographic determination of urinary catecholamine metabolites. *Ann Clin Biochem* 1982; 20: 289-93.
24. Yoshida A, Yoshioka M, Sakai T, Tamura Z. A simple method for the simultaneous determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1982; 227: 161-7.
25. Soldin SJ, Hill JG. Simultaneous liquid chromatographic analysis of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid and 4-hydroxy-3-methoxy-phenylacetic acid in urine. *Clin Chem* 1980; 26: 291-4.
26. Hanai J, Kawai T, Sato Y, Takasugi N, Nishi M, Takeda T. Simple liquid chromatographic measurement of vanillylmandelic acid and homovanillic acid in urine on filter paper for mass screening of neuroblastoma in infants. *Clin Chem* 1987; 33: 2043-6.
27. Seviour JA, McGill AC, Dale G, Craft AW. Method of measurement of urinary homovanillic acid and vanillylmandelic acid by gas chromatography-mass spectrometry suitable for neuroblastoma screening. *J Chromatogr* 1988; 432: 273-7.
28. Fauler G, Leis HJ, Huber E, Schellauf C, Kerbi R, Urban C, Gleispach. Determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in neuroblastoma screening by stable isotope dilution GC-MS. *J Mass Spectrom* 1999; 32: 501-14.
29. Davidson DF. Simultaneous assay for urinary 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid, 5-hydroxy-indoleacetic acid and homovanillic acid by isocratic HPLC with ECD. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 137-43.
30. Binder SR, Sivorinovsky G. Measurement of urinary vanillylmandelic acid and homovanillic acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection following extraction by ion exchange and ion-moderated partition. *J Chromatogr* 1984; 336: 173-88.
31. Thomasson CG, Blijenberg BG, Eilvers GAM, Leijnse B. A comparative study of five different methods for the determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic (vanillylmandelic) acid by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 417-27.
32. Holly JMP, Patel N. The assay of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid in urine by HPLC with electrochemical detection using bonded-phase silica sorbents for rapid, simple and selective extraction. *Ann Clin Biochem* 1986; 23: 447-52.
33. Westerink BHC, Basker FJ, O'Hanlon JF. Use of alumina, Sephadex G10 and ion-exchange columns to purify samples for determination of epinephrine, nor-

- epinephrine, dopamine, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine. *Clin Chem* 1982; 28: 1745-8.
34. Bonfigli AR, Coppa G, Testa R, Testa I, De Sio G. Determination of vanillylmandelic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid in urine by isocratic liquid chromatography. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 57-61.
  35. Graham PE, Smythe GA, Edwards GA, Lazarus L. Laboratory diagnosis of pheochromocytoma: which analytes should we measure. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 129-34.
  36. Peaston RT, Lai LC. Biochemical detection of pheochromocytoma: should we still be measuring urinary HMAA? *J Clin Pathol* 1993; 46: 734-7.
  37. O'Meara A, Tormey W, Fitzgerald RJ, Fitzgibbon M, Kenny D. Interpretation of random urinary catecholamines and their metabolites in neuroblastoma. *Acta Paediatr* 1994; 83: 88-92.
  38. Wu AHB, Gornet TG. Preparation of urine samples for liquid chromatographic determination of catecholamines: bonded-phase phenylboronic acid, cation-exchange resin and alumina absorbents compared. *Clin Chem* 1992; 593: 185-90.
  39. Nohta H, Yamaguchi E, Ohkura Y, Watanabe H. Measurement of catecholamines, their precursor and metabolites in human urine and plasma by solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. *J Chromatogr* 1989; 493: 15-26.
  40. Foti A, Kimura S, DeQuattro V, Lee D. Liquid-chromatographic measurement of catecholamines and metabolites in plasma and urine. *Clin Chem* 1987; 33: 2209-13.
  41. Moyer TP, Jiang NS, Tyce GM, Sheps SG. Analysis of urinary catecholamines by liquid chromatography with amperometric detection: methodology and clinical interpretation of results. *Clin Chem* 1979; 25: 256-63.
  42. Minion GL, Seaton JF, Harrison TS. HPLC for urinary catecholamines and metanephrines with alpha-methyl dopa. *J Surg Res* 1983; 35: 507-14.
  43. Miano L, Kolloch R, De Quattro V. Increased catecholamine excretion after labetalol therapy: a spurious effect of drug metabolites. *Clin Chim Acta* 1979; 95: 211-7.
  44. Weil-Malherbe H, Bone AB. The chemical estimation of adrenaline-like substance. *Biochem J* 1952; 51: 311-8.
  45. Von Euler US, Lishajko F. The estimation of catecholamines in urine. *Acta Physiol Scand* 1959; 45: 122-32.
  46. Anton AH, Sayre DF. A study of factors affecting the aluminium oxide-trihydroxyindol procedure for analysis of catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1962; 138: 360-75.
  47. Boulox P-M, Perrett D, Besser GM. Methodological considerations in the determination of plasma catecholamines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 194-203.
  48. Davidson DF, Fitzpatrick J. A simple, optimised and rapid assay for urinary catecholamines by HPLC with electrochemical detection. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 297-303.
  49. Holly JMP, Makin HJL. The estimation of catecholamines in human plasma. *Anal Biochem* 1983; 128: 257-74.
  50. Hjemdahl P. Interlaboratory comparison of plasma catecholamine determination using several different methods. *Acta Physiol Scand Suppl* 1984; 527: 43-54.
  51. Goldstein DS. Modified sample preparation for high performance liquid chromatographic electrochemical assay of urinary catecholamines. *J Chromatog* 1983; 275: 174-7.
  52. Oka K, Sekiya M, Osada H, Fujita K, Kato T, Nagatsu T. Simultaneous fluorometry of urinary dopamine, norepinephrine and epinephrine compared with liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chem* 1982; 28: 646-9.
  53. Jackman GP. Differential assay for urinary catecholamines by use of liquid chromatography with fluorescence detection. *Clin Chem* 1981; 27: 1202-4.
  54. Moleman P, van Dijk J. Determination of urinary norepinephrine and epinephrine by liquid chromatography with fluorescence detection and pre-column derivatization. *Clin Chem* 1990; 36: 732-6.
  55. Gerlo E, Malfait R. High-performance liquid chromatography assay of free norepinephrine, epinephrine, dopamine, vanillylmandelic acid and homovanillic acid. *J Chromatogr* 1985; 9: 343-7.
  56. Chan YP, Siu TS. Simultaneous quantitation of catecholamines and O-methylated metabolites in urine by isocratic ion-pairing high performance liquid chromatography with amperometric detection. *J Chromatogr* 1988; 459: 251-60.
  57. Rosano TG, Whitley RJ. Catecholamines and serotonin. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3<sup>rd</sup> edn. Philadelphia: WB Saunders, 1999: 1570-600.
  58. Parker NC, Cyndy BL, Wright PW, Woodward LL, Chapman JF. Uniform chromatographic conditions for quantifying urinary catecholamines, metanephrines, vanillylmandelic acid, 5-HIAA by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chem* 1986; 32: 1473-6.
  59. Premel-Cabic A, Turcant A, Allain P. Normal reference intervals for free catecholamines and their acid metabolites in 24-hour urines from children, as determined by liquid chromatography with amperometric detection. *Clin Chem* 1986; 32: 1585-7.
  60. Degel F, Zuman P, Jandik P, Gilch G. Effect of pre-treating samples with boric acid before liquid chromatographic determination of urinary catecholamines. *Clin Chem* 1987; 33: 108-12.
  61. Huang M, Wall J, Kebra P. Improved solid-phase

- extraction and liquid chromatography with electrochemical detection of urinary catecholamines. *J Chromatogr* 1988; 452: 409-18.
62. Peaston RT. Routine determination of urinary free catecholamines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 1988; 424: 263-72.
  63. Hansen C, Agrup G, Rorsman H, Rosengren AM, Rosengren E. Chromatographic separation of catecholic amino acids and catecholamines with immobilised phenylboronic acid. *J Chromatogr* 1978; 161: 352-65.
  64. Speek AJ, Odink J, Schriver J, Scheurs WHP. High performance liquid chromatographic determination of urinary free catecholamines with electrochemical detection after purification on immobilised boric acid. *Clin Chim Acta* 1983; 128: 103-13.
  65. Higa S, Suzuki T, Hayashi A, Tsuge I, Yamamura Y. Isolation of catecholamines in biological fluids by boric acid gel. *Anal Biochem* 1977; 77: 18-23.
  66. Kagedal B, Goldstein DS. Catecholamines and their metabolites. *J Chromatogr* 1988; 429: 177-233.
  67. Hansen C, Agrup G, Rorsman H, Rosengren AM, Rosengren E. Chromatographic separation of catecholic amino acids and catecholamines on immobilised phenylboronic acid. *J Chromatogr* 1978; 161: 352-5.
  68. Smedes F, Kraak JC, Poppe H. Simple and fast solvent extraction system for selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine. *J Chromatogr* 1982; 231: 25-39.
  69. Macdonald IA, Lake DM. An Improved technique for extracting catecholamines from body fluids. *J Neurosci Methods* 1985; 13: 239-48.
  70. Hannson L, Hannson C. Boronic acid-silica; a new tool for the purification of catecholic compounds on-line with reverse-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1983; 265: 37-44.
  71. De Jong J, Point AJF, Tjaden UR, Beeksmas S, Kraak JC. Determination of catecholamines in urine and plasma by liquid chromatography after on-line sample pretreatment on small alumina or dihydroxyboryl-silica columns. *J Chromatogr* 1987; 414: 285-300.
  72. Rodriguez C, Bernard N, Julian C, Cuisinaud G, Sassard J. Routine analysis of catecholamines and metabolites in urine by liquid chromatographic column switching system. *Int J Environ Anal Chem* 1986; 25: 235-55.
  73. Panholzer TJ, Beyer J, Lichtwald K. Coupled-column liquid chromatographic analysis of catecholamines, serotonin and metabolites in human urine. *Clin Chem* 1999; 45: 262-8.
  74. Green B, Cooper JDH, Turnell DC. An automated method for the analysis of urinary catecholamines using ASTED and high pressure liquid chromatography. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 361-7.
  75. Eisenhofer G, Keiser H, Friberg P, Mezey E, Thanh-Truc H, Hiremagalur B, et al. Plasma metanephrines are markers pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumours. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2175-85.
  76. Moleman P. Effect of diet on urinary excretion of unconjugated catecholamines and some of their metabolites in healthy control subjects. *Clin Chim Acta* 1990; 189: 19-24.
  77. Shoup RE, Kissinger PT. Determination of urinary normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine by liquid chromatography with amperometric detection. *Clin Chem* 1977; 23: 1268-74.
  78. Lenders JWM, Keiser HR, Goldstein DS, Willemssen JJ, Friberg P, Jacobs M-C, Kloppenborg PWC, Thien T, Eisenhofer G. Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 1995; 123: 101-9.
  79. Buu NT, Angers M, Chevalier D, Kuchel O. A new method for the simultaneous analysis of free and sulfoconjugated normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine in human urine by HPLC with electrochemical detection. *J Lab Clin Med* 1984; 104: 425-32.
  80. Abeling NA, Van Gennip AH, Overmars H, Voute PA. Simultaneous determination of catecholamines and metanephrines by HPLC with fluorometric detection. *Clin Chim Acta* 1984; 137: 211-26.
  81. Davidson DF. Pheochromocytoma with normal catecholamines: the potential value of urinary free metadrenalines. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 557-66.
  82. Smith ERB, Weill-Malherbe H. Metanephrine and normetanephrine in human urine; method and results. *J Lab Clin Med* 1962; 60: 212-23.
  83. Johnston LV, Reese M, Nelson DH. Interference in Pisano's urinary metadrenaline assay after use of x-ray contrast media. *Clin Chem* 1972; 18: 209-11.
  84. Orsulak PJ, Kizulka P, Grab E, Schildkraut J. Determination of urinary metanephrines by radial compression liquid chromatography and electrochemical detection. *Clin Chem* 1983; 29: 305-9.
  85. Gupta RN. Improved sample preparation in determination of urinary metanephrines by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chem* 1990; 36: 538-40.
  86. Jackman GP. A simple method for the assay of urinary metanephrines using high performance liquid chromatography with fluorescent detection. *Clin Chim Acta* 1982; 120: 137-42.
  87. Canfell C, Binder SR, Khayam-Bashi H. Quantification of urinary normetanephrine and metanephrine by reverse phase extraction and mass-fragmentographic analysis. *Clin Chem* 1982; 28: 25-8.
  88. Chan EC, Ho PC. High performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for the analysis of catecholamines and metanephrines in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrometry* 2000; 14: 1959-66.
  89. Kema IP, Meiborg G, Nagel GT, Stob GJ, Muskiet FAJ. Isotope dilution ammonia chemical ionization mass fragmentographic analysis of urinary 3-O-methylated

- catecholamine metabolites. *J Chromatogr* 1993; 617: 181-9.
90. Chan EC, Wee PY, Ho PY, Ho PC. High performance liquid chromatographic assay for catecholamines and metanephrines using fluorimetric detection with precolumn 9-fluorenylmethyl-oxycarbonyl chloride derivatization. *J Chrom Biomedical Sciences* 2000; 749: 179-89.
  91. Panholzer T J, Beyer J, Lichtwald K. Coupled-column liquid chromatographic analysis of catecholamines, serotonin and metabolites in human urine. *Clin Chem* 1999; 45: 262-8.
  92. Gamache PH, Kingery ML, Acworth IN. Urinary metanephrine and normetanephrine determined without extraction by using liquid chromatography and coulometric array detection. *Clin Chem* 1993; 39: 1825-30.
  93. Stewart MF, Reed P, Weinkove C, Moriarty KJ, Ralston AJ. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: two instructive case reports. *J Clin Pathol* 1993; 46: 280-2.
  94. Willemsen JJ, Ross A, Wolthers BG, Sweep CGJ, Kema IP. Evaluation of specific high performance liquid chromatographic determinations of urinary metanephrine and normetanephrine by comparison with isotope dilution mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 722-30.
  95. Crockett DK, Frank EL, Roberts WL. Rapid analysis of metanephrine and normetanephrine in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 2002; 48: 332-7.
  96. Taylor RL, Singh RJ. Validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of urinary conjugated metanephrine and normetanephrine for screening of pheochromocytoma. *Clin Chem* 2002; 48: 533-9.
  97. Peuler JD, Johnson GA. Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of norepinephrine, epinephrine and dopamine. *Life Sci* 1977; 21: 625-36.
  98. Nyssonen K, Parvianen MT. Plasma catecholamines: laboratory aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 211-36.
  99. Mitsui A, Nohta A, Ohkura Y. High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J Chromatogr* 1985; 344: 61-7.
  100. Yui Y, Fujita T, Yamamoto T, Itokawa Y, Kawai C. Liquid-chromatographic determination of norepinephrine and epinephrine in human plasma. *Clin Chem* 1980; 26: 194.
  101. Frayn KN, Maycock PM. Sample preparation with ion-exchange resin before liquid chromatographic determination of plasma catecholamines. *Clin Chem* 1983; 29: 1426.
  102. Davis GC, Kissinger PT, Shoup RE. Strategies for determination of serum or plasma norepinephrine by reverse phase liquid chromatography. *Life Sci* 1981; 53: 156-64.
  103. Goto M, Sakurai E, Ishii D. Determination of catecholamines in human serum by micro high performance liquid chromatography with micro precolumn and dual electrochemical detection. *J Chromatogr* 1983; 275: 271-9.
  104. Bartlett WA. Effects of mobile phase composition on the chromatographic behavior of catecholamines and selected metabolites. *J Chromatogr Biomed Appl* 1989; 493: 1-14.
  105. Krstulovic AM. Investigations of catecholamine metabolism using high performance liquid chromatography: analytical methodology and clinical applications. *J Chromatogr Biomed Appl* 1982; 229: 1-34.
  106. Hjendahl P. Plasma catecholamines: analytical challenges and physiological limitations. *Baillières Clin Endocrinol Metab* 1993; 7: 307-53.
  107. Dutton J, Hodgkinson AJ, Hutchinson G, Roberts NB. Evaluation of a new method for the analysis of free catecholamines in plasma using automated sample trace enrichment with dialysis and HPLC. *Clin Chem* 1999; 45: 394-9.
  108. Eisenhofer G. [www.catecholamines.org/labprocedure/procedure/plasmacat.htm](http://www.catecholamines.org/labprocedure/procedure/plasmacat.htm).
  109. Raber W, Raffesberg R, Bischof M, Scheuba C, Niederle B, Gasic S, et al. Diagnostic efficacy of unconjugated plasma metanephrines for the detection of pheochromocytoma. *Arch Intern Med* 2000; 160: 2957-63.
  110. Eisenhofer G, Lenders JWM, Linehan WM, Walther MM, Goldstein DS, Keiser HR. Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting pheochromocytoma in Von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *N Engl J Med* 1999; 340: 1872-9.
  111. Roden M, Raffesberg W, Raber W, Bernroider E, Niederle B, Waldhäusl W, et al. Quantification of unconjugated metanephrines in human plasma without interference by acetaminophen. *Clin Chem* 2001; 47: 1061-7.
  112. Grouzmann E, Fathi M, Gillet M, de Torrenté A, Cavadas C, Brunner H, et al. Disappearance rate of catecholamines, total metanephrines and neuropeptide Y from the plasma of patients after resection of pheochromocytoma. *Clin Chem* 2001; 1075-82.
  113. Kobayashi K, De Quattro V, Bornheimer J, Kolloch R, Miano L. Plasma normetadrenaline: a biochemical marker of sympathetic nerve function in man. *Life Sci* 1980; 26: 1821-6.
  114. Foti A, Adachi M, De Quattro. The relationship of free conjugated normetadrenaline in plasma and spinal fluid of hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55: 81-6.
  115. Ishimitsu T, Hirose S. Simultaneous assay of 3,4-dihydroxyphenyl alanine, catecholamines and O-methylated metabolites in human plasma using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1985; 337: 239-48.
  116. Pagliari R, Cottet-Emard JM, Peyrin L. Determination

- of free and conjugated normetanephrine and metanephrine in human plasma by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 1991; 563: 23-36.
117. Mornex R, Peyrin L, Pagliari R, Cottet-Emard JM. Measurement plasma methoxyamines for the diagnosis of phaeochromocytoma. *Horm Res* 1991; 36: 220-6.
  118. Lenders JWM, Eisenhofer G, Armando I, Keiser HR, Goldstein DS, Kopin IJ. Determination of metanephrines in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chem* 1993; 39: 97-103.
  119. Pallant A, Mathian B, Prost L, Theodore C, Patricot MC. Determination of plasma methoxyamines. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 513-7.
  120. Eisenhofer G. [www.catecholamines.org/labprocedure/procedure/plasmametaneprines.htm](http://www.catecholamines.org/labprocedure/procedure/plasmametaneprines.htm).
  121. Wolthers BG, Kema IP, Volmer M, Wesemann R, Westermann, Manz B. Evaluation of urinary metanephrine and normetanephrine enzyme immunoassay (ELISA) kits by comparison with isotope dilution mass spectrometry. *Clin Chem* 1997; 43: 114-20.
  122. Eisenhofer G. Free or total metanephrines for the diagnosis of phaeochromocytoma: what is the difference? *Clin Chem* 2001; 47: 988-9.
  123. Bravo EL. Plasma or urinary metanephrines for the diagnosis of phaeochromocytoma? That is the question. *Ann Intern Med* 1996; 125: 331-2.
  124. Linuma K, Ikeda I, Ogihara T, Hashizume K, Kurata K, Kumahara Y. Radioimmunoassay of metanephrine and normetanephrine for diagnosis of phaeochromocytoma. *Clin Chem* 1994; 32: 1879-83.
  125. Oishi S, Sanaki M, Ohno M, Sato T. Urinary normetanephrine and metanephrine measured by radioimmunoassay for the diagnosis of phaeochromocytoma: utility of 24-hour and random 1-hour determinations. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 614-7.
  126. Murphy JF, Davies DH, Smith CJ. The development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the catecholamines adrenaline and noradrenaline. *J Immunol Methods* 1992; 154: 89-98.
  127. Mellor GW, Gallacher G. Fluorescent polarization immunoassay of urinary vanillylmandelic acid. *Clin Chem* 1990; 36: 110-2.
  128. Taran F, Frobert Y, Creminion C, Grassi J, Olichon D, Mioskowski C, et al. Competitive enzyme immunoassay with monoclonal antibody for homovanillic acid measurement in human urine samples. *Clin Chem* 1997; 43: 363-8.
  129. Manz B, Lorey M, Heyn S, Jacobs R, Krause U, Pollow K. New radioimmunoassays for epinephrine and norepinephrine in plasma and urine as well as metanephrine and normetanephrine in urine. *GIT Labor-Medizin* 1990; 5: 245-53.
  130. Knoll E, Wisser H. Problems in the development of radioimmunoassay of catecholamines. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 741-9.
  131. Kerbi R, Urban CE, Ambros PF, Lackner H, Ladenstein R, et al. Screening for neuroblastoma in late infancy by use of EIA (enzyme-linked immunoassay) method: 11500 screened in Austria. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2298-305.
  132. Fitzgibbon M, FitzGerald RJ, Tormey WP, O'Meara A, Kenny D. Reference values for urinary HMMA, HVA, noradrenaline, adrenaline and dopamine excretion in children using HPLC with electrochemical detection. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 400-4.
  133. Ito Y, Obara T, Okamoto T, Kanbe M, Tanaka R, Iihara M, et al. Efficacy of single voided urine metanephrine and normetanephrine assay for diagnosing phaeochromocytoma. *World J Surg* 1998; 22: 684-8.
  134. Oishi S. Random one-hour urine catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid assays for the diagnosis of phaeochromocytoma. *Clin Chim Acta* 1980; 103: 335-42.
  135. Sullivan JM, Soloman HS. The diagnosis of phaeochromocytoma. Overnight excretion of catecholamine metabolites. *JAMA* 1975; 231: 618-9.
  136. Heron E, Chatellier G, Billaud E, Foos E, Plouin P-F. The urinary metanephrine to creatinine ratio for the diagnosis of phaeochromocytoma. *Ann Intern Med* 1996; 125: 300-3.
  137. Gowans EMS, Fraser CG. Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance: ramifications for interpretation of results and patient care. *Ann Clin Biochem* 1988; 25: 259-63.
  138. Ganguly A, Henry DP, Yune HY, et al. Diagnosis and localization of phaeochromocytoma. Detection by measurement of urinary norepinephrine excretion during sleep, plasma norepinephrine concentration and computerized axial tomography (CT scan). *Am J Med* 1988; 84: 993-1000.
  139. Townsend MM, Smith AJ. Factors influencing the urinary excretion of catecholamines in man. *Clin Sci* 1972; 44: 252-65.
  140. Dabrowska B, Feltynowski T, Wcocial B, Szpak W, Januszcz W. Effect of removal of phaeochromocytoma on diurnal variability of blood pressure, heart rhythm, and excretion of catecholamines. *J Hum Hypertens* 1990; 4: 397-9.
  141. MacDougall IC, Isles CG, Stewart H, Inglis GC, Finalyson J, Thompson I, et al. Overnight clonidine suppression test in the diagnosis and exclusion of phaeochromocytoma. *Am J Med* 1988; 84: 993-1000.
  142. Peaston RT, Lennard TWJ, Lai LC. Overnight excretion of urinary catecholamines and metabolites in the detection of phaeochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1378-84.
  143. Boomsma F, Alberts G, van Eijk L, Man in't Veld AJ, Schalekamp MA. Optimal collection and storage conditions for catecholamine measurements in human plasma and urine. *Clin Chem* 1993; 39: 2503-8.
  144. Giles HG, Meggiorini S. Stability of catecholamines in urine. *Clin Chem* 1985; 29: 595.

145. McCreanor G, Patel D, Wright D. The effect of acid concentration on the stability of urinary free catecholamines. In: Martin SM, Halloran SP, eds. Proceedings of the ACB National Meeting 1993. London: The Association of Clinical Biochemists, 1993: 74.
146. Moleman P. Preservation of urine for assay of catecholamines and their metabolites. *Clin Chem* 1985; 31: 653-4.
147. Miki K, Sudo A. Effect of storage, time and temperature on stability of catecholamines, cortisol and creatinine. *Clin Chem* 1998; 44: 1759-61.
148. Al-Maney M, Reed P, Weinkove C. Ascorbic acid as a novel preservative for urinary catecholamines and metadrenalines. In: Martin SM, Halloran SP, eds. Proceedings of the ACB National Meeting 1999. London: The Association of Clinical Biochemists, 2001: 121.
149. Twomey PJ, Shearing CH. Stability of metadrenalines in urine from intensive care patients. In: Martin SM, Halloran SP, eds. Proceedings of the ACB National Meeting 2001. London: The Association of Clinical Biochemists, 2001: 73.
150. Goldstein DS. Sample handling and preparation for liquid chromatography and electrochemical assays for plasma catecholamines. In: Krsytulovic AM, ed. Quantitative Analysis of Catecholamines and Related Compounds. Chichester: Ellis Horwood, 1985: 126-36.
151. Hugh D, Grennan A, Abugila MA, Weinkove C. Ascorbic acid as an antioxidant in measurements of catecholamines in plasma. *Clin Chem* 1987; 33: 569-71.
152. Falconer AD, Lake D, Macdonald IA. The measurement of plasma noradrenaline by high performance liquid chromatography with electrochemical detection: an assessment of sample stability and assay reproducibility. *J Neurosci Methods* 1982; 2: 261-4.
153. Kushnir MK, Urry FM, Frank EL, Roberts WL, Shushan B. Analysis of catecholamines in urine by positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2002; 48: 323-31.
154. Eisenhower G. Analytical differences between the determination of plasma catecholamines by liquid chromatography with electrochemical detection and radioenzymatic assay. *J Chromatogr* 1986; 377: 328-2.
155. Koller M. Results for 74 substances tested for interference with the determination of plasma catecholamines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chem* 1988; 34: 947-9.
156. Bouloux P-M, Perrett O. Interference of labetalol metabolites in the determination of plasma catecholamines by HPLC with electrochemical detection. *Clin Chim Acta* 1985; 150: 111-7.
157. Feldman JM. Falsely elevated urinary excretion of catecholamines and metanephrines in patients receiving labetalol therapy. *J Clin Pharmacol* 1987; 27: 288-92.
158. Binder SR, Biaggi ME. Analysis of urinary catecholamines by high performance liquid chromatography in the presence of labetalol metabolites. *J Chromatogr* 1987; 385: 241-7.
159. Godfrey JA, Rickman OB, Williams AY, Thompson GB, Young WF. Pheochromocytoma in a patient with end stage renal disease. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 953-57.
160. Kairisto V, Koskinen P, Mattila K, Puikkonen J, Virtanen A, Kantola I, et al. Reference intervals for 24-h urinary normetanephrine, metanephrine and 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in hypertensive patients. *Clin Chem* 1992; 38: 416-20.
161. Standing S, Gardner SG, Shine B, Turner H, Wass JAH. Reference ranges for urinary metadrenalines in patient populations. *British Endocrine Society, Endocrine Abstracts* 2002; 3: P147.
162. Lake CR, Zeigler MG, Kopin IJ. Use of plasma norepinephrine for evaluation of sympathetic neural function in man. *Life Sci* 1976; 18: 1315-26.
163. Rosano TG. Liquid-chromatographic evaluation of age-related changes in the urinary excretion of free catecholamines in pediatric patients. *Clin Chem* 1984; 30: 301-2.
164. Nunez C, Ortiz-Apodaca MA. Excretion of free catecholamines by children. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 461-3.
165. Reed P, Bu'lock D, Jones A, Layton T. Reference ranges for free catecholamine/creatinine ratios in random urines from normal children aged 5 to 16 years. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 297-8.
166. Henderson MJ, Heney D, McGinlay JM, Lewis I, Bailey C. Measurement of dopamine, HVA and HMA in untimed urine samples: establishment of age related reference data in children. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 162-7.
167. Ein SH, Pullerits J, Creighton R, Balfe JW. Pediatric pheochromocytoma. A 36 year review. *Pediatr Surg Int* 1997; 12: 595-8.
168. Fitzgibbon MC, Tormey WP. Paediatric reference ranges for urinary catecholamines/metabolites and their relevance in neuroblastoma diagnosis. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 1-11.
169. Pacak K, Linehan WM, Eisenhofer G, Walther MM, Goldstein DS. Recent advances in genetics, diagnosis, localization and treatment of pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 2001; 134: 315-29.
170. Editorial. Pheochromocytoma still surprises. *Lancet* 1990; 335: 1189-90.
171. Shapiro B, Fig LM. Management of pheochromocytoma. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18: 443-81.
172. Baxter MA, Hunter P, Thompson GR, London DR. Pheochromocytoma as a cause of hypotension. *Clin Endocrinol* 1992; 37: 304-6.
173. Bravo E. Pheochromocytoma: new concepts and future trends. *Kidney Int* 1991; 40: 544-5.
174. St John Sutton MG, Sheps SG, Lie JT. Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma: review



- of a 50-year autopsy series. *Mayo Clin Proc* 1981; 56: 354-9.
175. Manger WM, Gifford RW Jr. Pheochromocytoma. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. New York: Raven Press, 1990: 2225-44.
176. Erickson D, Kudva YC, Ebersold MJ, Thompson GB, Grant CS, van Heerden JA, et al. Benign paragangliomas: clinical presentation and treatment outcomes in 236 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5210-6.
177. Peaston RT, Ibrahim IH, Woods D, Senior PA, Perros P. Clinical and biochemical findings in paragangliomas. *British Endocrine Society, Endocrine Abstracts* 2002; 3: P145.
178. Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA* 2002; 287: 1427-34.
179. Weise M, Merke DP, Pacak K. Utility of plasma free metanephrines for detecting childhood pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1955-60.
180. Gerlo EAM, Sevens C. Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in pheochromocytoma: diagnostic value in 19 cases. *Clin Chem* 1994; 40: 250-6.
181. Bravo EL, Gifford RW. Pheochromocytoma: diagnosis, localization and management. *N Engl J Med* 1984; 311: 1298-1303.
182. Plouin PF, Duclos JM, Menard J, Comoy E, Bohoun C, Alexandre JM. Biochemical tests for the diagnosis of pheochromocytoma: urinary versus plasma determinations. *BMJ* 1981; 282: 853-4.
183. Hernandez FC, Sanchez M, Alvarez A, Diaz J, Pascual R, Perez M, et al. A five year report on experience in the detection of pheochromocytoma. *Clin Biochem* 2000; 33: 649-55.
184. Grossman E, Goldstein DS, Hoffman A, Keiser HR. Glucagon and clonidine testing in the diagnosis of pheochromocytoma. *Hypertension* 1991; 17: 733-41.
185. Sawka AM, Jaeschke R, Singh RJ, Young WF Jr. A comparison of biochemical tests for pheochromocytoma: measurement of fractionated plasma metanephrines compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 553-8.