

De invloed van capsaïcine op de bepaling van totale metanefrines in urine

M. NEELE¹, A.A. AARNOUDSE¹, J. van der LINDEN² en S. KOS¹

Urine metanefrines worden veel gebruikt om catecholamine producerende tumoren op te sporen. Het gaat hierbij voornamelijk om screening van patiënten met een lage a priori kans hier op, maar met een moeilijk behandelbare hypertensie of klachten zoals flushings, palpitations en adrenale incidentalomen (1). Routine gebruik van een high-pressure liquid chromatography (HPLC) bepaling voor (Nor)-Metanefrines in urine omvat het gebruik van een interne standaard voor concentratieberekening. In onze setting wordt gebruik gemaakt van de Total Urine Metanefrine applicatie van Instruchemie, Delfzijl, NI, waarbij vanillylaminehydrochloride gebruikt wordt als interne standaard (chemische naam: 4-hydroxy-3-methoxybenzylaminehydrochloride).

De piek van de interne standaard, vanillylamine, in patiëntenmonsters bleek sporadisch verhoogd door een onbekende interferentie. Bij beoordeling bleken vooral patiënten van niet-Kaukasische afkomst gevoelig voor deze storing, welke vermoedelijk aan voeding gerelateerd is. Deze bevolkingsgroep heeft andere eetgewoontes dan de westerse bevolking. Paprika en chilipepers, i.e. capsaïcine vormen een belangrijk bestanddeel in hun voeding.

Capsaïcine is een hittebestendig alkaloïde, voornamelijk aanwezig in zaadlijsten van paprikasoorten (*Capsicum annuum*) en rode chilipepers. Capsaïcine is onderdeel van de familie capsaïcinoïdes (N-vanillyl-amides van vetzuren) (2). Daarom werd aangenomen dat capsaïcine of capsaïcinoïdes mogelijke storende factoren zijn. Onder (semi) gecontroleerde omstandigheden werd de invloed van capsaïcinoïdes op de in huis gebruikte bepaling van totale metanefrines in urine onderzocht.

Materiaal en methode

Om de invloed van capsaïcinoïdes te onderzoeken werden twee experimenten uitgevoerd.

Ten eerste is een extract van chilipeper geanalyseerd. Een open gesneden rode peper is 7 dagen in 100 ml demiwater bewaard. Deze oplossing werd na verdunning gefiltreerd over een 0,45 µm Whatman® SPARTAN® RC filter en het extract m.b.v. de HPLC applicatie van Instruchemie geanalyseerd (door Instruchemie zelf).

MaasstadLab¹ en Afdeling Interne Geneeskunde², Maasstadziekenhuis Rotterdam

Correspondentie: Dr. S. Kos, Klinisch Chemicus, Maasstad Ziekenhuis, Klinische Chemie, Maasstadweg 21, 3079 DZ Rotterdam

E-mail: KosS@maasstadziekenhuis.nl

Er werd een piek gevonden met een retentietijd gelijk aan die van de interne standaard (figuur 1).

In het tweede experiment hebben, in een pilot (april 2012), vier proefpersonen 2x24-uurs urine verzameld. De urine is verzameld van 's morgens 8.00 uur tot de volgende ochtend 8.00 uur, gedurende deze dag is een capsaïcine-rijk dieet gevolgd. Na 1 week onthouding van capsaïcine bevattende producten is opnieuw gedurende 24 uur urine verzameld voor een blanco meting, waarin de storende component niet werd aangetoond.

Het dieet bestond uit een lunch van brood met sambal van verse Spaanse pepers en een warme maaltijd van rode paprika gevuld met rijst, gehakt, Spaanse pepers, knoflook, zout en peper. Aan een vaste hoeveelheid urine werd een bekende concentratie interne standaard (vanillylaminehydrochloride) toegevoegd, vervolgens werd de urine aangezuurd tot pH 1 met 25% HCl en 30 minuten bij 100°C gehydrolyseerd. Na hydrolyse werd de urine gezuiverd over Bond ELUT SPE kolommetjes. De NMN/MN fracties werden isocratisch gescheiden m.b.v. HPLC gevolgd door fluorescentie detectie [reagentia Instruchemie Delfzijl, NI].

De concentraties NMN en MN zijn op twee manieren berekend om het effect van capsaïcinoïdes op de concentraties zichtbaar te maken. Model I toont de berekening op basis van absolute piekhoogte van de component en volgens $Y=aX+b$, met X = concentratie µmol/l en Y = piekhoogte component. Model II toont de berekening m.b.v. van ratio's en volgens $Y=aX+b$, met X = concentratie µmol/l en Y = ratio = piekhoogte component / piekhoogte IS.

Resultaten en discussie

Deze studie laat zien dat capsaïcinoïdes grote overeenkomst vertonen met de interne standaard (IS) vanillylamine, dit bleek uit analyse van een chilipeper extract en analyse van een standaard mix van NMN, MN en IS (figuur 1A en B).

Gemiddelde concentraties NMN en MN met en zonder capsaïcinoïde-rijk dieet, zijn berekend met en zonder IS. Berekening met IS (tabel 1) laat de verschillen zien voor de concentraties NMN en MN tussen dieet en geen dieet. Berekening zonder IS laat geen verschil zien voor de concentraties NMN en MN tussen dieet en geen dieet. Deze waarneming suggereert dat capsaïcinoïdes aanwezig in een dieet met de IS interfereren (figuur 1-C en D). Hoewel het uiteraard wenselijk is om deze experimenten met zuivere capsaïcine uit te voeren, is dat in dit stadium van kennis over systemische effecten van capsaïcines niet zonder risico.

Tabel 1. Invloed van wijze van berekening op de concentratie. Gemiddelde concentraties NMN en MN met en zonder capsaicine-rijk dieet, berekening met IS (model I) en berekening zonder IS (model II). Geen dieet geeft geen significant verschil tussen beide rekenmethoden (NMN $p=0,83$; MN $p=0,32$). Een capsaicinoïde-rijk dieet geeft wel een significant verschil tussen beide rekenmodellen; $p=0,04$ voor NMN en $p=0,05$ voor MN; $p \leq 0,05$ is een significant verschil (student T-test).

	Metanefrine (MN)				Nor-metanefrine (NMN)			
	na dieet	geen dieet		na dieet	geen dieet		na dieet	geen dieet
urine	model I	model II	model I	model II	model I	model II	model I	model II
1	0,55	0,32	0,43	0,44	1,70	1,00	1,44	1,44
2	0,22	0,11	0,19	0,15	0,48	0,24	0,66	0,46
3	0,34	0,30	0,35	0,36	0,94	0,83	0,90	0,92
4	0,32	0,25	0,32	0,34	0,83	0,64	0,87	0,89
gem	0,36	0,24	0,32	0,32	0,99	0,68	0,97	0,93
	$p=0,05$		$p=0,32$		$p=0,04$		$p=0,83$	

Er zijn veel verschillende soorten pepers met uiteenlopende concentratie capsaicinoïdes, 0 - 32 mg/g droog gewicht (2). Daarnaast is het erg polymorfe CYP-450 systeem deels verantwoordelijk voor het metaboliseren van capsaicinoïdes en zal leiden tot inter-individuele verschillen (3).

Capsaicine is een prototype vanilloïd receptor agonist. Vanilloïd receptor valt onder de groep van Transient Receptor Potential (TRP) ion channels (4). Deze receptoren zijn in de meeste orgaansystemen te vinden en zijn in staat onder andere op temperatuur, pH en pijn te reageren. Verschillende aandoeningen gepaard gaande met pijn (arthritis, cystitis, diabetische neuropathie) worden al lang met lokaal aangebrachte capsaicine in de vorm van crèmes, gels en pleisters behandeld om een snelle pijnverlichting te geven (5,6,7). Een hele reeks verbindingen die een agonistische of antagonistische werking op vanilloïd receptoren kunnen geven is op de markt te verkrijgen (Sigma Aldrich). Daarnaast is een hele reeks antagonistische verbindingen in verschillende fasen van klinisch onderzoek om therapeutisch (analgestisch) te worden toegepast (8). Bewustwording over de mogelijke invloed van vanilloïd receptor agonisten of antagonisten, zoals capsaicine bij de interpretatie van NMN/MN concentratie is nodig bij technieken die vanillylaminehydrochloride als interne standaard gebruiken (9,10). Hoewel bij een feochromocytoom NMN/MN concentraties minstens 2 tot 3 maal de normaalwaarden laten zien, zou theoretisch hierdoor lagere concentraties gevonden kunnen worden en een feochromocytoom als mogelijke diagnose verwerpen. Een feochromocytoom is een zeldzaamheid, maar heeft een hoge mortaliteit en zou niet gemist mogen worden.

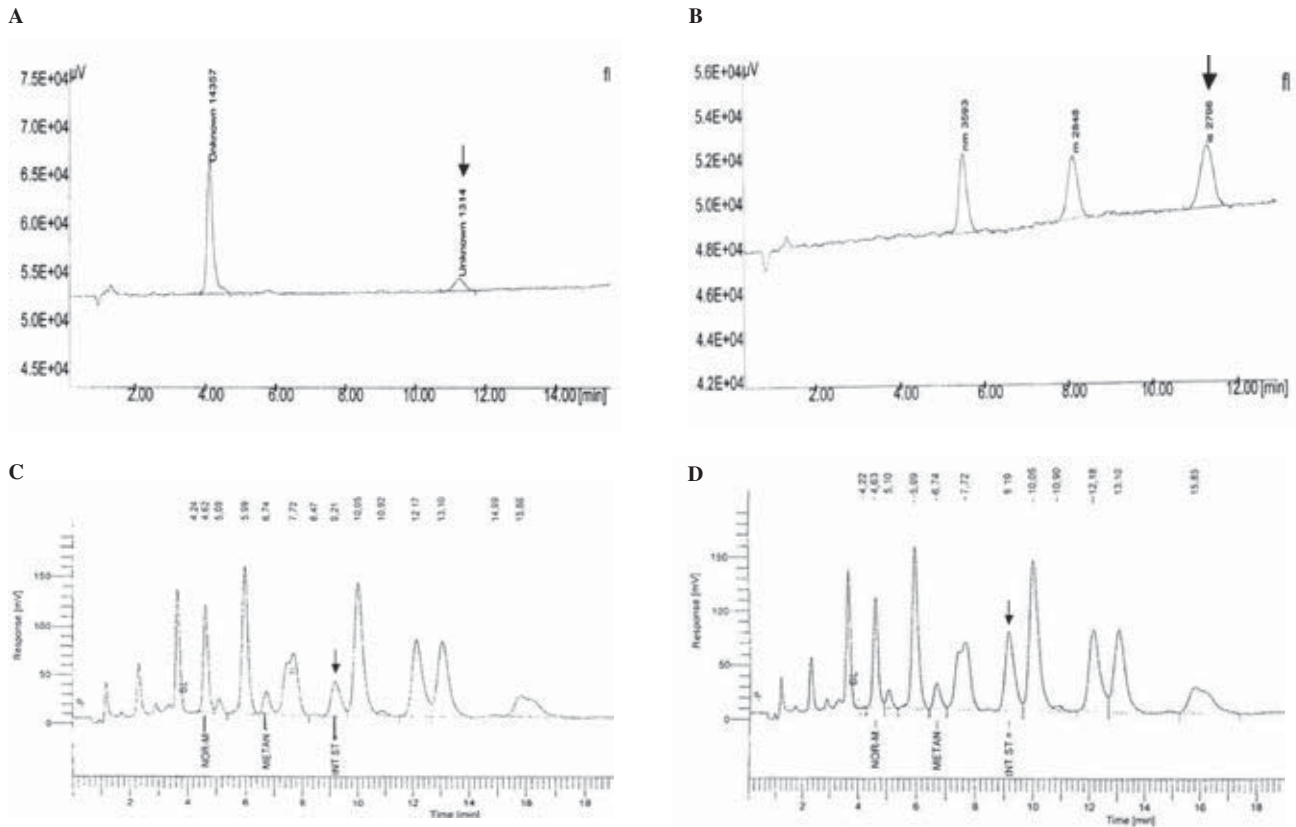
Het is duidelijk dat niet uitsluitend op basis van gelijke retentietijd gesteld mag worden dat de storende component identiek is aan de interne standaard, vanillylamine. Echter deze studie laat zien dat er vier sterke aanwijzingen zijn dat dit wel zo is. Ten eerste een provocatie met een capsaicine-rijk dieet laat een verhoging van de interne standaard zien. Ten tweede is de storende component in peperextract als vanillylamine door Instruchemie geconformeerd. Ten derde, GC-MS analyse van peperextract vertoont grote overeenkomst (>85%) met vanillylamine (data not shown). Als laatste, er is recent een publicatie in *Annals of Clinical Biochemistry* (10) verschenen welke een

vergelijkbare invloed van voedingscomponenten op de interne standaard bij Metanefrine bepaling in urine laat zien.

Concluderend, de berekening van NMN/MN concentraties in urine kan beïnvloed worden door capsaicinoïde-rijke voedingsmiddelen of andere N-vanillylamides en daardoor tot vals verlaagde resultaten leiden. Capsaicinoïdes vallen na zure hydrolyse uiteen waarbij vanillylamine vrijkomt hetgeen de concentratie van de interne standaard verhoogt. Vanwege steeds groter gebruik van capsaicinoïdes in het dagelijks leven is nader onderzoek in een gestandaardiseerde setting nodig om de impact van deze bevinding vast te stellen.

Literatuur

1. Kudwa YC, Sawka AM, Young WF. The laboratory diagnosis of adrenal pheochromocytoma: The Mayo clinic experience. *J Clin Endo Met.* 2003;88(10):4533-9.
2. González-Zamora A, Sierra-Campos EJ, Luna-Ortega G, Pérez-Morales R, Ortiz JCR, García-Hernández JL. Characterization of different capsicum varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperature. *Molecules.* 2013;18:13471-86.
3. Reilly CA, Yost GS. Metabolism of Capsaicinoids by P450 enzymes: a review of recent findings on reaction mechanisms, bio-activation and detoxification processes. *Drug Metab Rev.* 2006;38(4):685-706.
4. Clapham DR. TRP-channels as cellular sensors. *Nature.* 2003;426:517-24.
5. Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:487-517.
6. Robbins W. Clinical applications of capsaicinoids. *Clin J Pain.* 2000;16:S86-9.
7. Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain.* 2008;24:142-54.
8. Pal M, Angaru S, Kodimuthali A, Dhingra N. Vanilloid receptor antagonists: emerging class of novel anti-inflammatory agents for pain management. *Curr Pharm Des.* 2009;19:1008-26.
9. Madhavaram H, Woollard GA. Interference of urinary metanephrines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Ann Clin Biochem.* 2013;10:1-6.
10. Madhavaram H, Woollard GA. Interference from Indian diet on the internal standard in a commercial method for the measurement of urinary metanephrines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Ann Clin Biochem.* 2014;51(3):400-5.



Figuur 1. Chromatogrammen van chilipeper extract en urine van proefpersonen met en zonder capsaiçinoïde-rijk dieet, (A): peperextract beschreven zoals in materiaal en methode met storende component met RT=11,26 min; (B) mix van nor-metanefrine (NM) met RT=5,49 min, metanefrine (M) met RT= 8,13 min en IS met RT= 11,29 min; (C) urine van proefpersoon zonder capsaiçinoïde-rijk dieet: piekhoogte NMN=11653 mV, piekhoogte MN=24643 mV en piekhoogte IS=35705 mV; (D) urine van proefpersoon na het volgen van een capsaiçinoïde-rijk dieet: piekhoogte NMN=1024425 mV, piekhoogte MN=23552 mV en piekhoogte IS=73440 mV. Hierbij is duidelijk te zien dat de piek van IS hoger wordt na het volgen van een capsaiçinoïde-rijk dieet.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2014; 39: 170-173

Sporenmetalen analyse met behulp van inductief gekoppeld plasma massaspectrometrie (ICP-MS): validatie en implementatie

M. WEEINK, H.J. WANSCHERS en R.G.H.J. MAATMAN

In het kader van vervanging van de AAS is na uitgebreide inventarisatie besloten voor de aanschaf van een ICP-MS. Motivatie voor dit besluit waren de mogelijkheid om meerdere elementen in kortere tijd, tegen geringere kosten te kunnen analyseren en tevens het beschikken over meer diagnostische mogelijkheden voor eventuele toekomstige vraagstellingen. Binnen de klinische chemie is ICP-MS geen standaard methodiek, een goede reden om kennis en ervaringen tot dusver te delen.

ICP-MS is sinds de introductie in 1980 uitgegroeid tot

Klinisch Chemisch Laboratorium Medlon BV, Enschede

E-mail: r.maatman@medlon.nl

een detectie methode met een hoge gevoeligheid, een groot lineair bereik en een grote specificiteit voor het meten van metalen en metaalverbindingen. Tevens zijn de analytische mogelijkheden sterk gegroeid door de koppeling van ICP-MS met o.a. gaschromatografie, capillaire elektroforese, vloeistof chromatografie en laser ablatie (1-6).

Dit artikel beschrijft de implementatie en validatie van sporenmetalen analyses met behulp van ICP-MS zonder gekoppelde apparatuur als hierboven beschreven. Een ICP-MS bestaat uit drie delen, een deel waar ionisatie plaats vindt, de verstuiverkamer, een deel waar de ionen worden gescheiden, de massaspectrometer