

ความแตกต่างของผลการตรวจ VMA ใน Random Urine ที่มีการรักษาสภาพแบบเติมกรด 6N HCl และแบบแช่แข็ง

ภัสพิมล	มากคง*	พัฒนพงศ์	ชูส่งแสง
พิพัฒนชัย	อภิรักษ์ธัญกร	พิทยา	ตรีรัตน์
ปนัดดา	มุสิกวัฒน์	บราลี	ไชยหมาน
นุชรรัตน์	วรรณพงศ์	สายฝน	ศรีสุข
เพ็ญศิริ	ชูส่งแสง		

Different of Vanillylmandelic Acid Levels between Acidified and Frozen Random Urine.

Paspimon Makkong, Pipatchai Aphiraktanyakorn, Panudda Musigavon, Nutcharat Wannapong, Pensiri Choosongsang, Phattanapong Choosongsang, Pittaya Treerut, Baralee Chaiman, Saiphon Srisook

Clinical Chemistry Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand.

*E-mail: paspimon@gmail.com

Songkla Med J 2014;32(6):375-381

บทคัดย่อ:

Vanillylmandelic acid (VMA) เป็นเมตาบอไลต์ของฮอว์โมน catecholamines ซึ่งประกอบด้วย epinephrine และ norepinephrine ถูกขับถ่ายออกจากร่างกายทางปัสสาวะ การตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ VMA ในปัสสาวะใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วย pheochromocytoma และ neuroblastoma โดยทั่วไปจะตรวจหาความเข้มข้นของ VMA ในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง แต่พบว่ามีผู้ป่วยเด็กบางรายมีปัญหาในการเก็บปัสสาวะ จึงมีการศึกษาที่จะใช้ปัสสาวะแบบเก็บครั้งเดียว (random urine) แทนการใช้ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ VMA ใน random urine ไม่แตกต่างกับปัสสาวะที่เก็บ 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ VMA จะสลายตัวที่สภาวะต่าง จึงต้องเติมกรดลงไปปัสสาวะให้มี pH<3 เพื่อรักษาสภาพของ VMA การแช่แข็งก็อาจจะเป็นอีกวิธีหนึ่ง

หน่วยเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
 รับผิดชอบวันที่ 28 มีนาคม 2557 รับผิดชอบพิมพ์วันที่ 1 กันยายน 2557

ในการหยุดปฏิกิริยาการสลายของ VMA ผู้วิจัยและคณะ จึงได้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของ VMA ใน random urine ที่รักษาสภาพโดยการแช่แข็งและการเติมกรด 6N HCl โดยใช้กลุ่มตัวอย่าง random urine ของผู้ป่วยที่เหลือจากการส่งตรวจ VMA ที่หน่วยเคมีคลินิก โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 33 ราย แบ่งปัสสาวะเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 5 มิลลิลิตร ส่วนหนึ่งนำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) อีกส่วนเติมกรด 6N HCl 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำปัสสาวะทั้ง 2 ส่วน มาหาความเข้มข้นของ VMA โดยใช้วิธีดัดแปลงของ Gumboldt จากผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของ VMA ใน random urine ที่รักษาสภาพแบบแช่แข็งและเติมกรด 6N HCl ได้ค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เท่ากับ 23.43 (45.38) และ 24.57 (54.45) ไมโครกรัม/มิลลิกรัม creatinine ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Wilcoxon sign-Rank test พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.713$) และมีความสัมพันธ์กันดี $r=0.997$ สมการถดถอยเชิงเส้นตรง $y=1.196x-3.461$ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของ VMA ใน random urine ที่รักษาสภาพแบบแช่แข็งและเติมกรด 6N HCl มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีความสัมพันธ์กันดี

คำสำคัญ: กรด 6N HCl, แช่แข็ง, ปัสสาวะแบบเก็บครั้งเดียว, สารรักษาสภาพ, VMA

Abstract:

Vanillylmandelic acid (VMA) is one of the metabolites of catecholamines including epinephrine and norepinephrine that was excreted into the urine. Analysis of urinary concentrations of VMA was useful to the diagnose of pheochromocytoma and neuroblastoma. Generally, the measurement of VMA use urine 24-hour urine collections, but in pediatric patient, it was difficult to collection the urine sample. Therefore, the random urine was accepted because it was found that the VMA concentration in random and 24-hour urine had no statistically significant difference. VMA will decompose at alkaline conditions, therefore, to preserve the VMA concentrations, the urine should be acidified or kept frozen. The aim of the study was to compare the VMA levels in frozen and acidified random urine. We performed the study by collecting of 33 urine samples at the Clinical Chemistry Unit, Songklanagarind Hospital. The urine was aliquot 5 ml into 2 containers, one kept frozen at -20°C , and the other was acidified with 6N HCL 200 μl and stored at 4°C . Then, the urinary VMA concentration was determined by modified method of Gumboldt. The results showed that the $\bar{X}\pm\text{S.D.}$ of VMA concentration in frozen and acidified random urine were 23.43 (45.38) and 24.57 (54.45) $\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinine, respectively. The VMA concentration in frozen and acidified random urine was correlated well ($r=0.997$) and showed no statistically significant difference ($p=0.713$)

Keywords: frozen, preservative, random urine, 6N HCl acid, VMA

บทนำ

Vanillylmandelic acid (VMA) เป็นเมตาบอไลต์ของฮอร์โมน catecholamines ซึ่งประกอบด้วย epinephrine และ norepinephrine ฮอร์โมนดังกล่าวถูกสร้างจาก chromaffin cells พบมากที่สุดที่ต่อมหมวกไตชั้นใน adrenal medulla และจะถูกขับถ่ายออกจากร่างกายทางปัสสาวะ^{1,2} การตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ VMA จึงเป็นการวัดปริมาณของฮอร์โมน catecholamines ในพลาสมาเพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วย pheochromocytoma และ neuroblastoma^{3,4} รวมทั้งใช้ในการวิเคราะห์แยกสาเหตุของการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงออกจากโรคเนื้องอกของ adrenal medulla¹

โดยทั่วไปการตรวจหาความเข้มข้นของ VMA จะใช้ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เพื่อดูปริมาณของ VMA ที่หลั่งออกมาในปัสสาวะตลอด 24 ชั่วโมง จะช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยโรคดังกล่าวข้างต้นได้ การตรวจ VMA จึงใช้ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และต้องใส่กรด 6N HCl เป็นสารรักษาสภาพ^{5,6} เนื่องจาก VMA จะสลายตัวในสภาวะที่เป็นด่าง แต่พบปัญหาว่าในผู้ป่วยเด็กและผู้ใหญ่บางรายมีปัญหาในการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง⁷ และมีงานวิจัยสนับสนุนการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ VMA ในปัสสาวะแบบเก็บครั้งเดียว (random urine) กับปัสสาวะที่เก็บ 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ VMA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดี⁸⁻¹¹ สำหรับการตรวจหาความเข้มข้นของ VMA จะคงสภาพได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดและมี pH ต่ำกว่า 3^{5-7,11,12} ซึ่งการเก็บปัสสาวะแบบครั้งเดียว (random urine) จะนำปัสสาวะไปวิเคราะห์ทันทีภายใน 2 ชั่วโมง หรือถ้าไม่ตรวจทันทีจะต้องนำไปแช่แข็งเพื่อรักษาสภาพของ VMA¹³ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยที่ศึกษาการเก็บรักษาปัสสาวะแบบเก็บครั้งเดียว (random urine) ที่ใช้รักษาสภาพที่เป็นกรดเพื่อรักษาสภาพ VMA ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ VMA ในปัสสาวะแบบเก็บครั้งเดียวที่รักษาสภาพแบบแช่แข็งที่ -20 °ซ และแบบเติมกรด 6N HCl เพื่อ

ประเมินว่าการรักษาสภาพทั้ง 2 วิธี ทำให้ความเข้มข้นของ VMA มีค่าแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อนำประโยชน์จากการศึกษามาปรับปรุงวิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะแบบเก็บครั้งเดียว (random urine)

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นปัสสาวะแบบ random urine ของผู้ป่วยที่ส่งมาตรวจหาระดับ VMA ที่หน่วยเคมีคลินิกโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 33 ตัวอย่าง โดยคำนวณขนาดตัวอย่างจากความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างประชากร 2 กลุ่ม (detecting the difference between 2 population means)¹⁴ ซึ่งมีทั้งค่าปกติและผิดปกติ การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิธีการศึกษา

แบ่งปัสสาวะเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 5 มิลลิลิตร ส่วนหนึ่งนำไปแช่แข็งที่ -20 °ซ อีกส่วนเติมกรด 6N HCl จำนวน 200 ไมโครลิตร เพื่อปรับ pH < 3⁵ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บไว้ไม่เกิน 7 วัน นำปัสสาวะทั้ง 2 ส่วนมาหาความเข้มข้นของ VMA โดยใช้วิธีดัดแปลงของ Gumboldt¹⁵ กล่าวคือ VMA ในปัสสาวะจะถูกสกัดออกโดย ethyl acetate สารละลายกรดและมีเกลือ sodium chloride อิ่มตัว ต่อมาสกัด VMA ออกจาก ethyl acetate ด้วย sodium citrate buffer pH 4.0 ปรับสภาพให้เป็นต่างด้วยน้ำยา potassium carbonate pH 10.4 ในสภาพต่าง VMA จะรวมกับน้ำยา diazotized paranitroaniline ได้สารมีสี azo dry stuff สุดท้ายสกัดสารที่มีสีออกจากสารรบกวนอื่นๆ โดย normal butanol และนำมาวัด absorbance ของสีที่เกิดขึ้น ที่ 578 nm พร้อมทั้งหาค่า creatinine ของปัสสาวะ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Modular 800 โดยใช้หลักการ enzymatic method คำนวณหาความเข้มข้นของ VMA ได้จากสูตร

$$VMA \text{ (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม creatinine)} = \left[\frac{\text{Absorbance of Unknown} \times \text{concentration of standard}}{\text{Absorbance of standard}} \right] \times 1000$$

$$\text{urine creatinine (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

นำความเข้มข้นของ VMA ที่รักษาสภาพแบบเดิมกรด 6N HCl มาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบกับแบบแช่แข็งที่ -20 °ซ ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ Kolmogorov-Smirnov test พบว่ามีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (non normal distribution) จึงใช้ Wilcoxon Sign-Rank test การทดสอบในครั้งนี้ พร้อมทั้งหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) ด้วยโปรแกรมทางสถิติ Statistical Package for the Social Science for Windows (SPSS)

ศึกษาความแตกต่างทางคลินิก โดยเปรียบเทียบร้อยละความแตกต่าง (% different) ของความเข้มข้นของ VMA ที่รักษาสภาพแบบเดิมกรด 6N HCl เปรียบเทียบกับแบบแช่แข็งที่ -20 °ซ กับค่าความผิดพลาดรวมที่ยอมรับได้ (total allowable total error limit: TEa)¹⁶ และจำนวนรายของร้อยละความแตกต่างจะต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ TEa มากกว่าร้อยละ 95 โดยที่ TEa สำหรับการทดสอบ VMA คือ ±31.3% โดยคำนวณหาค่าร้อยละความแตกต่างจากสูตร % Difference = (Value_{แบบเดิมกรด 6N HCl} - Value_{แบบแช่แข็ง (-20 °ซ)}) / Value_{แบบแช่แข็ง (-20 °ซ)} x100

สารควบคุมคุณภาพ

การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ของการทดสอบจะใช้สารควบคุมคุณภาพ (control material) ที่มีช่วงค่าแตกต่างกัน 2 ระดับ โดยใช้ Urine control normal 1 lot 62281 และ Urine control abnormal 2 lot 62282 ของบริษัท ไบโอ-ราด แลบบอราทอรีส์ จำกัด และนำมาหาค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

(% Coefficient of Variation หรือ % CV) จากสูตร % CV=(standard deviation (S.D.)/mean)x100 โดยที่ค่า mean คือ ค่าเฉลี่ย ค่า S.D. หรือ standard deviation คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งหากผลการตรวจวัด % CV ที่ได้จากห้องปฏิบัติการมีค่าต่ำกว่าค่า % CV ที่ได้จากค่าคำนวณของบริษัท แสดงถึงผลการตรวจวิเคราะห์การทดสอบนั้น ๆ มีความน่าเชื่อถือ

ผลการศึกษา

การทดสอบสารควบคุมคุณภาพพบว่าอยู่ในช่วงที่กำหนดทั้งสองระดับ และค่าความแม่นยำของการทดสอบ ซึ่งดูผลจากค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนไม่เกิน 1 ใน 3 ของ TEa (ตารางที่ 1)

ความเข้มข้นของ VMA ที่ได้จากการรักษาสภาพทั้ง 2 วิธี ในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 33 ราย มีค่าต่ำสุดและสูงสุดตั้งแต่ 0.93-304 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม creatinine ซึ่งมีช่วงอายุตั้งแต่ 1-41 ปี เพศชาย 19 ราย อายุเฉลี่ย 11 ปี เพศหญิง 14 ราย อายุเฉลี่ย 16 ปี พบว่า ความเข้มข้นของ VMA ที่รักษาสภาพแบบแช่แข็งที่ -20 °ซ และแบบเดิมกรด 6N HCl มีค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เท่ากับ 23.43 (45.38) และ 24.57 (54.45) ไมโครกรัม/มิลลิกรัม creatinine ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ VMA ที่รักษาสภาพแบบแช่แข็งที่ -20 °ซ และแบบเดิมกรด 6N HCl โดยใช้ Wilcoxon Sign-Rank test พบว่าไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.713) มีความสัมพันธ์กันดี มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.997 และสมการถดถอยเชิงเส้นตรง y=1.196x-3.461 ดังรูปที่ 1 และนำมาทดสอบความแตกต่างโดยใช้เกณฑ์ไม่เกิน TEa ของการทดสอบ (รูปที่ 2)

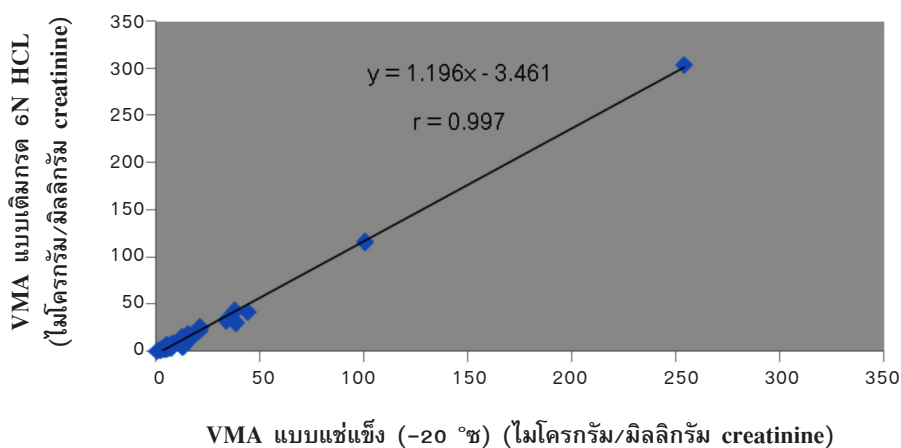
ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของสารควบคุมคุณภาพ ระดับปกติและระดับผิดปกติ

การทดสอบ	สารควบคุมคุณภาพ	บริษัท ไบโอ-ราด แลบบอราทอรีส์ จำกัด			ห้องปฏิบัติการ		
		Mean	S.D.	%CV	Mean	S.D.	%CV
VMA (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)	Urine control normal 1	3.9	1.0	25.6	3.4	0.3	8.8
	Urine control abnormal 2	15.7	2.3	14.6	15.9	1.6	10.0

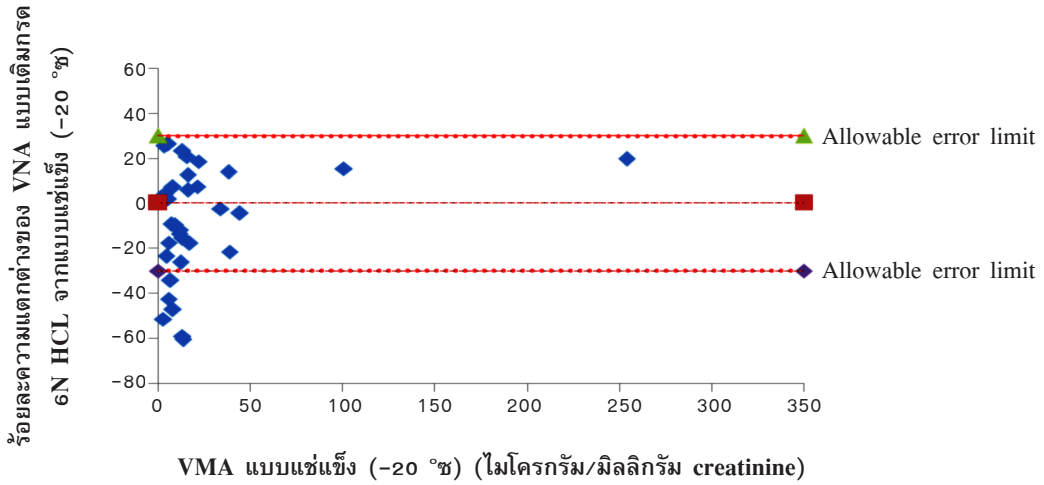
ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นของ VMA ใน random urine ที่รักษาสภาพแบบแช่แข็งที่ -20 °ซ และแบบเติมกรด 6N HCl ประกอบด้วย ช่วงค่าต่ำสุด-สูงสุด ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จำนวน 33 ราย

การรักษาสภาพ VMA	ความเข้มข้นของ VMA (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม creatinine)			Mean difference (%)	Slope	r	p-value
	Min	Max	Mean (S.D.)				
แบบแช่แข็ง (-20 °ซ)	0.93	254	23.43 (45.38)				
แบบเติมกรด 6N HCl	0.95	304	24.57 (54.45)	4.2	1.196	0.997	0.713

Min=Minimum, Max=Maximum, r=Correlation coefficient



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ VMA ที่รักษาสภาพแบบแช่แข็งที่ -20 °ซ และแบบเติมกรด 6N HCl



รูปที่ 2 กราฟแสดงความแตกต่างของความเข้มข้นของ VMA ที่รักษาสภาพแบบแช่แข็งที่ -20 °ซ และแบบเติมกรด 6N HCl

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ VMA ใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วย pheochromocytoma และ neuroblastoma^{3,4} รวมทั้งใช้ในการวิเคราะห์แยกสาเหตุของการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงออกจากโรคเนื้องอกของ adrenal medulla¹ การเลือกใช้ random urine แทนการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เป็นวิธีหนึ่งสำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาในการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เนื่องจาก random urine ทำได้โดยไม่ต้องคำนึงถึงช่วงเวลา และมีงานวิจัยสนับสนุนการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ VMA ใน random urine กับปัสสาวะ 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดี⁹⁻¹¹ สามารถใช้ทดแทนกันได้สำหรับ random urine โดยทั่วไปถ้าต้องเก็บรักษาสภาพไม่ให้ออกซิเจนหรือเก็บปัสสาวะที่เก็บแล้วจะนิยมตรวจทันทีหรือถ้าไม่ได้ตรวจทันทีให้ทำการแช่แข็ง¹³ หากจะให้เป็นไปตามวิธีมาตรฐานการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เพื่อส่งตรวจ VMA ต้องเติมกรด 6N HCl ลงไปเพื่อรักษา pH ของปัสสาวะให้คงสภาพอยู่ที่ pH ต่ำกว่า 3⁶ แต่สำหรับ random urine ยังไม่มี

คำแนะนำที่แน่ชัด และจากศึกษาของ Willemssen และคณะ¹⁷ พบว่าสามารถแช่แข็งตัวอย่างตรวจได้ภายใน 1 สัปดาห์ โดยค่าที่ได้ลดลงไม่เกินร้อยละ 10 แต่ถ้ามีการนำส่งตัวอย่างควรที่จะรักษาสภาพตัวอย่างระหว่างการเก็บ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เท่ากับ 23.43 (45.38) และ 24.57 (54.45) µg/mg creatinine ตามลำดับ และจากการศึกษาบอกได้ว่าการรักษาสภาพตัวอย่างแบบเติมกรด 6N HCl ค่าลดลงเฉลี่ยร้อยละ 4.2 และค่าไม่แตกต่างทางสถิติ

สรุป

จากผลการวิเคราะห์การรักษาสภาพความเข้มข้นของ VMA ใน random urine แบบแช่แข็งที่ -20 °ซ และแบบเติมกรด 6N HCl พบว่าให้ผลวิเคราะห์ทางสถิติที่ไม่แตกต่างกัน การเพิ่มทางเลือกในการรักษาสภาพความเข้มข้นของ VMA ขึ้นอยู่กับความสะดวกและความพร้อมที่จะเลือกเก็บรักษาสภาพของแต่ละห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำส่งปัสสาวะแบบ random urine เพื่อตรวจหา VMA

เอกสารอ้างอิง

1. Barron J. Pheochromocytoma: diagnostic challenges for biochemical screening and diagnosis. *J Clin Pathol* 2010; 63: 669 - 74.
2. Zambrano E, Reyes-Múgica M. Hormonal activity may predict aggressive behavior in neuroblastoma. *Pediatr Dev Pathol* 2002; 5: 190 - 9.
3. LaBrosse EH, Com-Nougue' C, Zucker JM, et al. Urinary excretion of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid and 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid by 288 patients with neuroblastoma and related neural crest tumors. *Cancer Res* 1980; 40: 1995 - 2001.
4. Monsaingeon M, Perel Y, Simonnet G, et al. Comparative values of catecholamines and metabolites for the diagnosis of neuroblastoma. *Eur J Pediatr* 2003; 6: 397 - 402.
5. Fischbach F, Dunning MB. A manual of laboratory and diagnostic test. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009; 264 - 6.
6. Young DS, Bermes EW, Haverstick DM. Specimen collection and other preanalytical variables. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2008; p.49.
7. Pussard E, Neveux M, Guigueno N. Reference intervals for urinary catecholamines and metabolites from birth to adulthood. *Clin Biochem* 2009; 42: 536 - 9.
8. Riddhimat R, Prabhant C, Sirisali K, et al. Comparative study of vanillylmandelic acid in random and 24-hour urine collections. *J Med Assoc Thai* 1990; 73: 239 - 43.
9. Cangemi G, Barco S, Reggiardo G, et al. Interchangeability between 24-hour collection and single spot urines for vanillylmandelic and homovanillic acid levels in the diagnosis of neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60: E170 - 2.
10. Tuchman M, Morris CL, Ramnaraine ML, et al. Value of random urinary homovanillic acid and vanillylmandelic acid levels in the diagnosis and management of patients with neuroblastoma: comparison with 24-hour urine collections. *Pediatrics* 1985; 75: 324 - 8.
11. Gregianin LJ, McGill AC, Pinheiro CM, et al. Vanilmandelic acid and homovanillic acid levels in patients with neural crest tumor: 24-hour urine collection versus random sample. *Pediatr Hematol Oncol* 1997; 14: 259 - 65.
12. Davidson DF, Hammond PJ, Murphy D, Carachi R. Age-related medical decision limits for urinary free unconjugated) metadrenalines, catecholamines and metabolites in random urine specimens from children. *Ann Clin Biochem* 2011; 48: 358 - 66.
13. Sanford KW, McPherson RA. Preanalysis. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 22nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2011: p.32 - 3.
14. Pba.ucdavis.edu. Power and sample size determination Geng's statistics book [homepage on the Internet]. Oakland: University of California; 1989 [update 2014 Jul 14; cited 2014 Jul 28]. Available from: <http://pba.ucdavis.edu/files/45003.pdf>
15. Gumboldt G. Colorimetric method for the rapid and quantitative determination of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid (vanilmandelic acid) in human urine. *Clin Chem* 1977; 23: 1949 - 50.
16. Dgrhoads.com. Allowable total error table [homepage on the Internet]. South Burlington: Data Innovations; 2011 [cited 2013 Jul 29]. Available from: <http://www.dgrhoads.com/db2004/ae2004.php>
17. Willemsen JJ, Ross HA, Lenders JW, et al. Stability of urinary fractionated metanephrines and catecholamines during collection, shipment, and storage of samples. *Clin Chem* 2007; 53: 268 - 72.