



**MÉTODO DE DOSAGEM DO ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO
NA URINA POR TÉCNICA CROMATOGRÁFICA MONODIMENSIONAL**

*WILIAN NICOLAU, EMIKO MURAMOTO, LÍCIO MARQUES DE ASSIS,
ANTONIO B. ULHÔA CINTRA, RÔMULO R. PIERONI*

PUBLICAÇÃO IEA N.º 187
Setembro — 1969

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal 11049 (Pinheiros)
CIDADE UNIVERSITÁRIA "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"
SÃO PAULO — BRASIL

MÉTODO DE DOSAGEM DO ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO NA
URINA POR TÉCNICA CROMATOGRÁFICA MONODIMENSIONAL¹

Wílian Nicolau*, Emiko Muramoto**, Lício Marques de Assis*,
Antonio B. Ulhôa Cintra***, Rômulo R. Pieroni****

Divisão de Radiobiologia
Instituto de Energia Atômica
São Paulo - Brasil

Publicação IEA Nº 187
Setembro - 1969

* Separata da REVISTA DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA, vol. 15 - Nº 5, Maio - 1969.

Comissão Nacional de Energia Nuclear

Presidente: Prof.Dr. Hervásio Guimarães de Carvalho

Universidade de São Paulo

Reitor: Prof.Dr. Miguel Reale

Instituto de Energia Atômica

Diretor: Prof.Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

Conselho Técnico-Científico do IEA

Prof.Dr. José Moura Gonçalves	}	pela USP
Prof.Dr. José Augusto Martins		
Prof.Dr. Rui Ribeiro Franco	}	pela CNEN
Prof.Dr. Theodoreto H.I. de Arruda Souto		

Divisões Didático-Científicas

Divisão de Física Nuclear -
Chefe: Prof.Dr. José Goldenberg

Divisão de Radioquímica -
Chefe: Prof.Dr. Fausto Walter de Lima

Divisão de Radiobiologia -
Chefe: Prof.Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

Divisão de Metalurgia Nuclear -
Chefe: Prof.Dr. Tharcísio D.S. Santos

Divisão de Engenharia Química -
Chefe: Lic. Alcídio Abrão

Divisão de Engenharia Nuclear -
Chefe: Eng^o Pedro Bento de Camargo

Divisão de Operação e Manutenção de Reatores -
Chefe: Eng^o Azor Camargo Penteado Filho

Divisão de Física de Reatores -
Chefe: Prof.Dr. Paulo Saraiva de Toledo

Divisão de Ensino e Formação -
Chefe: Prof.Dr. Rui Ribeiro Franco

MÉTODO DE DOSAGEM DO ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO NA
URINA POR TÉCNICA CROMATOGRÁFICA MONODIMENSIONAL¹

Wílian Nicolau*, Emiko Muramoto**, Lício Marques de Assis*,
Antonio B. Ulhôa Cintra***, Rômulo R. Pieroni****

SUMÁRIO

É descrito um método de dosagem do VMA baseado na técnica cromatográfica monodimensional. Os autores comprovam a especificidade, a boa recuperação e a alta reprodutibilidade do método. Mostram que a técnica monodimensional apresenta vantagens sobre a bidimensional, em economia de material, tempo e trabalho. Discutem as vantagens do método cromatográfico sobre os métodos discriminativos. Concluem que os índices de recuperação, reprodutibilidade e especificidade foram suficientemente bons para justificar o seu emprego na pesquisa e rotina clínicas.

Dois são os tipos principais de análise bioquímica que vêm sendo aplicados na dosagem do ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico (VMA) na urina: os métodos que utilizam a separação física dos diversos componentes fenólicos urinários e aqueles que, transformando a molécula do VMA em outro composto, utilizam reações específicas para a coloração.

Estes processamentos não são exclusivos, existindo métodos em que concomitantemente se pode encontrar a separação física do VMA associada à sua transformação molecular.

Entre os métodos baseados na modificação do molécula en-

-
1. Méthode de dosage de l'acide 3-métoxi-4-hidroxi-mandélique de l'urine, selon une techni que chromatographique monodimensionnelle / Method for dosage of 3-methoxy-4-hydroxi-mandelic acid in urine by monodimensional chromatographic technique. Apresentado para publicação em 9/1/69; aprovado em 13/3/69. Trabalho apresentado em 31/1/64 na Soc. Brasil. de Endocr. e Metabol. e em 10/12/64 no VI Congr. Brasil. dessa mesma Sociedade.
- * Méd. do Serv. de Nutr. e Dietét. do Hosp. das Clín. da Fac. de Med. da Univ. de S. Paulo e do Inst. de Energia Atômica.
- ** Auxiliar de Pesquisa do Inst. de Energia Atômica.
- *** Prof. de Med. da Univ. de S. Paulo.
- **** Diretor do Inst. de Energia Atômica, SP.

contra-se o de Sandler e Ruthven⁽¹²⁾, no qual uma oxidação é realizada em autoclave, na presença de catalisador, após o que a vanilina formada a partir do VMA é colocada na presença do indol e ácido fosfórico, produzindo-se assim um complexo corado.

A oxidação do VMA pode ser realizada na presença de periodato, com leitura espectrofotométrica ultravioleta, como no método de Crout e Pisano⁽³⁾, ou, alternativamente, como utilizam .. Sunderman e cols.⁽¹⁹⁾, com o ferrocianeto de potássio, fazendo-se colorimetria com uma modificação do método de Sandler e Ruthven⁽¹⁾.

Nos métodos que utilizam a separação física, as técnicas utilizadas são: a cromatografia bidimensional em papel, a cromatografia em camada delgada^(14,15), a cromatografia em fase gasosa⁽⁵⁾ e a eletroforese em baixa ou alta voltagem.

A simplicidade das técnicas cromatográficas fazem com que elas sejam largamente utilizadas.

A existência de muitos grupos fenólicos, não relacionados ao metabolismo das catecolaminas, na urina de indivíduos normais, faz com que seja necessária a extração preliminar destes compostos com acetato de etila em pH básico, embora muitos autores omitam esta fase de metodologia.

Na maioria das técnicas de cromatografia bidimensional, os sistemas de solventes utilizados são os do isopropanol-amônia-água (20:1:2) e os do benzeno-ácido propiônico-água (2:2:1), originalmente descrito por Armstrong⁽¹⁾. Nestes métodos de separação física, excetuando-se o de cromatografia em fase gasosa, a colorimetria é realizada pela reação do VMA com p-nitroanilina diazotada e a leitura feita em densitometria, quando houver boa separação dos compostos fenólicos. Em caso contrário, o cálculo é semi-quantitativo para as amostras analisadas.

Gödicke e col.⁽⁸⁾ descreveram a boa e específica separação do VMA em fase butanólica do sistema n-butanol-acetato de

n-butila-ácido acético da 10% (2:8:10). Estes autores, contudo, não apresentaram dados de padronização metodológica nem de aplicação clínica do método, mas puseram em evidência a sua especificidade, utilizando diversos sistemas cromatográficos.

O objetivo do presente trabalho é descrever um método de dosagem do VMA baseado em técnica cromatográfica monodimensional.

MATERIAL

- 1 - Hidróxido de sódio - N
- 2 - Ácido clorídrico - 2N
- 3 - Acetato de etila
- 4 - Cloreto de sódio
- 5 - Ácido clorídrico - 0,1N, saturado com cloreto de sódio.
- 6 - Metanol
- 7 - n-butanol
- 8 - Ácido acético
- 9 - p-nitroanilina: 500 mg são dissolvidos em 10 ml de ácido clorídrico fumegante e o volume completado a 500 ml com água bidestilada.
- 10 - Nitrito de sódio - 0,2%
- 11 - Carbonato de potássio a 10%
- 12 - p-nitroanilina diazotada: misturar 10 ml de nitrito de sódio a 0,2% com 10 ml de p-nitroanilina. Juntar lentamente 20 ml de carbonato de potássio a 10%. Usar até 2 minutos após o preparo.
- 13 - Padrão do VMA: dissolver 1 mg de padrão de VMA* em 10 ml de água bidestilada levada previamente a pH 2 com ácido clorídrico.

Todos os reativos devem ser produtos analíticos.

* D¹-methoxy-4-hydroxymandelic acid; M.A. - Mann Research Laboratories, Inc., New York 6, N.Y.

Os solventes devem ser suficientemente puros para utilização em cromatografia.

MÉTODO

Os indivíduos submetidos aos estudos abstiveram-se da ingestão de alimentos sabidamente ricos em compostos fenólicos, tais como: café, chá, chocolate, vanilina, verduras e frutas, e de qualquer medicamento por um período de 72 horas. Todos os indivíduos foram submetidos a uma dieta padrão "hipofenólica", que consistia no seguinte: desjejum: pão, manteiga e ovo; merenda: leite integral e açúcar; almoço e jantar: arroz, carne e ovo.

A urina do período de 24 horas foi colhida em frasco escuro mantido sobre gelo ou em geladeira. A preservação de uma amostra foi feita a pH 2, utilizando-se para este fim ácido clorídrico.

As análises foram realizadas em laboratório isento de vapores de substâncias que contivessem grupos fenólicos, os quais, obviamente, reagiriam com a p-nitroanilina diazotada.

A quantidade de urina tomada para a análise variou com a diurese. Para cada litro de diurese tomaram-se 2 ml de urina, transferindo-se para um tubo de tampa esmerilhada de 15 ml de capacidade.

EXTRAÇÃO

Completou-se o volume até 4 ml com água destilada e ajustou-se o pH a 8 com NaOH 1N⁽⁹⁾. Colocaram-se 4 ml de acetato de etila, agitou-se por 30 segundos, centrifugou-se rapidamente, para melhor separar as fases, desprezando-se o solvente orgânico no qual estariam as substâncias fenólicas, não ácidas, eventualmente presentes. Ajustou-se o pH da urina a 2 com ácido clorídrico 2N, saturou-se com NaCl e extraiu-se com 4, 2, 2 ml de acetato de etila. Tomaram-se os extratos em conjunto, os quais foram evaporados à tem-

peratura abaixo de 45° C, após terem sido agitados com 2 ml de ... HCl 0,1N saturado com NaCl, e a fase aquosa desprezada.

O resíduo foi dissolvido em 0,3 ml de metanol mantido a baixa temperatura (cêrca de 4° C) e 0,1 ml foi aplicado em duplicata em papel Whatman nº 1 e desenvolvido paralelamente a padrões de 2, 3 e 4 µg de VMA. Usou-se a técnica de cromatografia ascendente em sistema n-butanol-ácido acético-água (40:10:50).

Após 18 horas de desenvolvimento, deixou-se secar o cromatograma à temperatura ambiente e corou-se com p-nitroanilina diazotada. Uma hora depois, as manchas correspondentes ao VMA foram lidas em densitômetro. As áreas correspondentes aos padrões e desconhecidos foram comparadas e os valores corrigidos para as diureses respectivas.

Várias amostras podem ser desenvolvidas ao mesmo tempo em papel disposto sob a forma cilíndrica na cuba cromatográfica.

RESULTADOS

a) Especificidade

A região cromatográfica, possuindo o mesmo Rf de VMA padrão, desenvolvido paralelamente, mostrou ser constituída de um único composto quando desenvolvida em dois outros sistemas cromatográficos originariamente descritos por Armstrong e cols.⁽¹⁾, isto é, álcool isopropílico-amônia-água (8:0,2:1,8) e benzeno-ácido propiônico-água (100:70:5).

b) Recuperação

A prova de recuperação realizada em 8 amostras de urina, adicionando-se 2-5 e 10 µg de VMA padrão, mostrou que o método recupera em média 86% do composto adicionado. Testou-se a recuperação⁽²⁾ através da construção de um gráfico cartesiano, figurando no eixo das abscissas valores urinários conhecidos, aos quais foram

adicionadas quantidades variáveis de padrão, e no das ordenadas os valores recuperados. Como houve compatibilidade, calculou-se a equação de regressão e verificou-se se o coeficiente diferia ou não da unidade (gráfico 1).

A análise estatística mostrou ser altamente significativa a relação entre os dois valores; o colocado e o recuperado.

c) Reprodutibilidade

Foram realizadas 30 dosagens em amostra de uma mesma urina em dias consecutivos. A urina foi mantida a pH 2 em refrigerador. A precisão foi verificada através de cálculo do coeficiente de variabilidade. Verificou-se que este foi de $\pm 5,9\%$.

Os dados relativos aos valores obtidos e o tratamento estatístico estão resumidos na tabela I.

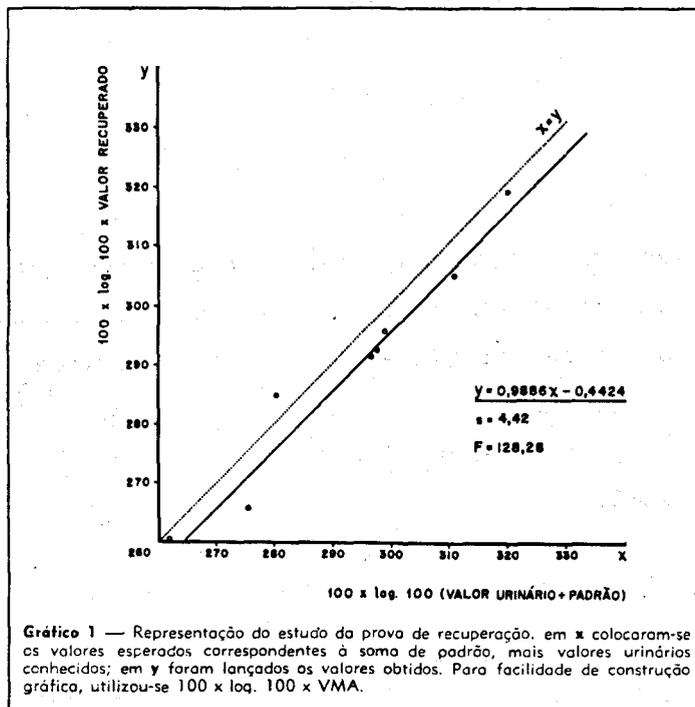


TABELA I

Reprodutibilidade. Dados relativos a 30 replicatas
de uma mesma urina feitas em dias diferentes

DOSAGEM	RESULTADO em g/ml	DOSAGEM	RESULTADO em g/ml
1	1,90	16	1,70
2	2,00	17	1,96
3	1,76	18	1,90
4	1,94	19	1,90
5	2,05	20	2,00
6	2,08	21	2,08
7	1,80	22	1,80
8	2,10	23	1,90
9	1,99	24	1,85
10	1,78	25	1,86
11	1,80	26	1,80
12	1,86	27	1,75
13	1,86	28	2,01
14	1,90	29	2,02
15	2,10	30	1,93

MÉDIA	1,91 μ g/ml
DESVIO PADRÃO (s)	0,1128
ERRO PADRÃO ($\frac{s}{\sqrt{n}}$)	0,0206
COEFICIENTE DE VARIACÃO	+ 5,9 % - 5,9 %

DISCUSSÃO

Em alguns métodos eletroforéticos e cromatográficos, a urina é colocada diretamente no papel sem utilizar a extração com acetato de etila. GÜdicke e col. (8), que descreveram um método semelhante ao nosso, não se utilizam dos processos extrativos, no que são criticados (2,11) por Sandler e Ruthven (13), que admitem esta atitude quando da avaliação do VMA em líquidos que tenham poucos compostos interferentes, como no caso do líquido.

Na metodização em pauta, a purificação da urina e dos extratos são fatores que contribuem para a boa separação do VMA.

A introdução de uma técnica de cromatografia monodimensional oferece vantagens sobre a bidimensional em economia de material, tempo e trabalho.

O sistema de solvente sob a forma ácida evita a destruição do VMA, o que não acontece nos sistemas básicos comumente utilizados. Alimentos e drogas podem interferir na metodologia. Assim, a aspirina (excretada como ácido salicílico), o chá, o café (portador de ácido caféico excretado provavelmente como vanilina) a vanilina, as sulfas, a penicilina, a banana^(17,21) e as frutas cítricas⁽¹⁸⁾ não devem ser ingeridos antes da colheita do material para a análise. Estas interferências não se limitam às análises cromatográficas, mas se estendem às separações eletroforéticas, particularmente às que utilizam tampões básicos. A boa separação eletroforética somente é conseguida em tampões de pH ácido⁽¹³⁾; o tempo de migração é porém longo, mesmo que se utilizem aparelhos de alta voltagem.

Os métodos discriminativos^(4,6,7,9,20), pretensamente rápidos, descritos por diversos autores, não resistem à análise crítica por não serem específicos e particularmente muito sensíveis à interferência de drogas e de alimentações ricas em grupos fenólicos⁽¹³⁾.

Os métodos baseados na formação de vanilina a partir do VMA, criticados em vista da comprovação de que outros ácidos aromáticos presentes na urina podem produzir aquele derivado.

O método descrito ofereceu índices adequados de recuperação, reprodutibilidade e especificidade suficiente para justificar o seu emprego na pesquisa e rotina clínicas.

RÉSUMÉ

Méthode de dosage de l'acide 3-méthoxy-hydroxi-mandélique de l'urine, selon une technique chromatographique monodimensionnelle.

Les auteurs décrivent une méthode de dosage du VMA basée sur la technique chromatographique monodimensionnelle. Ils soulignent la spécificité, la bonne récupération et la grande reproductibilité de la méthode. Ils montrent que la technique monodimensionnelle présente des avantages par rapport à la technique bidimensionnelle quant à l'économie de matériel de temps et de travail. Elle constitue également un progrès par rapport aux méthodes discriminatives. Ses caractéristiques sont de nature à en justifier l'emploi dans les travaux de recherche et dans la routine clinique.

SUMMARY

Method for dosage of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine by monodimensional chromatographic technique.

A method is described for the estimation of VMA in a 24 hr urine based on its extraction by ethyl acetate and monodimensional chromatography. The recovery, reproductibility and specificity of the method are emphasized and its advantages over bidimensional and screening methods are discussed.

REFERÊNCIAS

1. Armstrong, M.D., McMillan, A. & Shaw, K.N.F.: 3-methoxy-4-hydroxy-d-mandelic acid, a urinary metabolite of nor-epinephrine, *Biochim. biophys. Acta*, 25: 422, 1957.
2. Berstein, L. & Weatherall: *Statistics for medical and other biological students*, Edinburg and London, E. and Livingstone Ltd., 1952.
3. Crout, J.R., Pisano, J.J. & Sjoerdsma, A.: Catecholamine metabolism in pheochromocytoma, *Clin. Res.* 8: 24, 1960.
4. Georges, R.J.: A modification of Gitlow screening test for the detection of increased excretion of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid (VMA) in urine, *J. med. Lab. Technol.* 21: 126, 1964.
5. Gitlow, S.E., Wilk, S., Franklin, M., Carr, H. & Mendlowitz, M.: Quantitative determination of vanillyl mandelic acid (VMA) by gas-liquid chromatography, *Fed. Proc.* 24: 389, 1965.
6. Gitlow, S.E., Mendlowitz, N., Khassis, S., Cohen, G. & Sha, J.: The diagnosis of pheochromocytoma by determination of urinary

- 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid, J. clin. Invest. 39: 221, 1960.
7. Gitlow, S.E., Ornstein, L., Mendlowitz, M., Khassis, S. & Kruk, E.: A simple colorimetric urine test for pheochromocytoma, Amer. J. med. 28: 921, 1960.
 8. Gbdicke W. & Brosowsky, K.H.: Die Isolierung der 3-methoxy-4-hydroxymandelsäure aus dem urin unter verwendung der Keilstheifenmethod, J. Chromatog. 15: 88, 1964.
 9. Mahler, D.J. & Humoller, F.L.: A comparison of methods for determining catecholamines and 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. Clin. Chem. 8: 47, 1962.
 10. Randrup, A.: Determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic (vanilmandelic) acid by electrophoresis at low pH, Scand J. clin. Lab. Invest. 14: 262, 1962.
 11. Robinson, R., Ratcliffe, J. & Smith, P.: A screening test for pheochromocytoma, J. clin. Path. 12: 541, 1959.
 12. Sandler, M. & Ruthven, C.R.J.: Quantitative colorimetric method for estimation of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid in urine, value in diagnosis of pheochromocytoma, Lancet 2: 114, 1959.
 13. Sandler, M. & Ruthven, C.R.J.: The measurement of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid and homovanilic acid, Pharmacol. Rev. 18: 343, 1966.
 14. Schmid, E. & Henning, N.: Über den Nachweis der 3-methoxy-4-hydroxymandelsäure in Harn, Klin. Wschr. 41: 566, 1963.
 15. Schmid, E., Zicha, L., Krautheim, J. & Blumberg, J.:
Dunnschicht Chromatographische Trennungen von Substanzen des

16. Shaw, K.N.F. Mcmillan, A. & Armstrong, M.D.: The metabolism of 3,4-dihydroxyphenylalanine, *J. biol. Chem.*, 226: 255, 1957.
17. Shaw, K.N.F. & Trevarthen, J.: Exogenous sources of urinary phenol and indole acids, *Nature (Lond.)* 18: 797, 1958.
18. Stewart, I. Newhall, W.F. & Edwards, G.J.: The isolation and Udenfriend, S.: Serotonin, norepinephrine and related compounds in bananas, *Science* 127: 648, 1968.
19. Sunderman, Jr., F.W., Cleveland, P.D., Law, N.C. & Sunderman, F.W.: A method for the determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid ("vanilmandelic") for the diagnosis of pheochromocytoma, *Amer. J. clin. Path.* 34: 293, 1960.
20. Ubatuba, F. & Da Cruz, M.A.: Sobre a determinação colorimétrica do ácido vanilmandélico, 3-methoxi-4-hidroximandélico (VMA) na urina, *Arch. bras. Endocr. Metab.*, 11: 301, 1962.
21. Waalkes, T.P., Sjoerdsma, A., Creveling, C.R., Weissbach, H. & Udenfriend, S.: Serotonin, norepinephrine and related compounds in bananas, *Science*, 127: 648, 1968.