

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 18—20, Januar 1971

Eine quantitative Bestimmungsmethode von, 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (Vanillinmandelsäure) aus dem Urin

Von J. GARTZKE und E. MAJEWSKI

Aus dem Medizinisch-Diagnostischen Institut „Unter den Linden“, Berlin, Leiter: Dr. K. H. Goll

(Eingegangen am 7. Juli 1970)

Es wird eine kolorimetrische Bestimmungsmethode der Vanillinmandelsäure im Urin nach dünn-schichtchromatographischer Abtrennung an Kieselgel G mit sauren Laufmitteln durch Reaktion mit 2,6-Dichlor-4-chlor-chinonimid in Gegenwart von Pyridin als Katalysator beschrieben. Die obere Grenze des Normalwertes liegt nach unseren Erfahrungen bei 5 mg/24-Stdn.-Harn.

A quantitative method for the determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid (vanillinmandelic acid) in urine

A colorimetric method is described for the determination of urinary vanillinmandelic acid. After separation by thin layer chromatography on Kieselgel G with acidic solvents, the colour is developed by reacting the vanillinmandelic acid with 2,6-dichlor-4-chlor-quinonimide in the presence of pyridine as a catalyst. In the present work, the upper limit for the normal value was found to be 5 mg/24 hr urine.

Zur Diagnose von Phäochromocytomen gewinnt die Bestimmung der Adrenalin- und Noradrenalinmetabolite im Harn ständig an Bedeutung. Durch Tumoren an den catecholaminausscheidenden Organen wird die Sekretion von Nor- und Adrenalin erhöht, so daß es zu Blutdruckkrisen oder einer permanenten Hypertonie kommt. Es werden aber nur etwa 10% der endogenen Katecholamine unverändert im Urin ausgeschieden, 40—60% in Form des Metaboliten 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (Vanillinmandelsäure) (1).

Bei den bisherigen Bestimmungsmethoden wird die Vanillinmandelsäure elektrophoretisch (2, 3, 4), papier- (1, 5), säulen- (6, 7), gas- (8, 9) oder dünn-schicht-chromatographisch (10, 11, 12, 13) von den anderen Phenolcarbonsäuren abgetrennt. Die quantitative Bestimmung erfolgt entweder ultraviolett-spektrophotometrisch (14, 15) oder densitometrisch (16, 17) bzw. kolorimetrisch nach Kupplung mit Diazoniumsalzen (10, 11), Oxydation der Vanillinmandelsäure zu Vanillin und Reaktion mit Indol (7), Reaktion mit GIBBS Reagenz (2,6-Dichlor- oder 2,6-Dibrom-chinon-4-chlorimid) (17, 18).

Bei der von uns dünn-schichtchromatographisch angestrebten Methode entschlossen wir uns nach Vorversuchen für Kieselgel G (Merck) unter Verwendung saurer Laufmittel, die eine optimale Trennung gewährleisten. Basische Laufmittel (10) sind zur Trennung weniger geeignet. Nachteilig bei der Verwendung von Kieselgel G ist die Einschränkung der Anfärbemethoden. Während die Kupplung mit diazotiertem *p*-Nitranilin auf Celluloseplatten stark rotviolett gefärbte Vanillinmandelsäure-Banden mit guter Farbkonstanz liefert, erhält man bei gleicher Reaktion auf Kieselgel G nur rötlich bis braune Vanillinmandelsäure-Zonen. MCGREGOR (16) versuchte zur densitometrischen Auswertung diesen Mangel zu beheben, indem er die angefärbten Vanillinmandelsäure-Banden mit Dimethylsulfoxid nachbehandelte. Doch ist auch

hierbei die Farbkonstanz nach unseren Erfahrungen für densitometrische Auswertung noch nicht ausreichend.

Theoretische Betrachtungen zeigten, daß GIBBS Reagenz das Mittel der Wahl ist, wenn ein entscheidender Nachteil — der der nicht vollständigen Umsetzung — behoben wird. Von den 16 bis 24 theoretisch im Harn vorkommenden Phenolcarbonsäuren können nur noch 11 Säuren eine GIBBS-Reaktion eingehen. Sterische Hinderungen und elektromere Effekte lassen von den 11 restlichen Säuren noch 4 bis 6 eine GIBBS-Reaktion eingehen. Ein weiterer Vorteil ist, daß sich das Absorptionsspektrum der angefärbten Vanillinmandelsäure nicht mit denen der mitextrahierten Harnchromogene überlagert. Ferner wurde versucht, eine möglichst selektive Extraktion der Vanillinmandelsäure zu erreichen. Dazu ist entgegen anderen Angaben (2, 19) Äthylacetat das einzig brauchbare Extraktionsmittel.

Versuche zur Methode

Extraktion

Die von manchen Autoren (2) der Extraktion mit Essigester gleichwertig hingestellte Extraktion mit Äther liefert, wie der Vergleich der Verteilungskoeffizienten beider Systeme zeigt, nur schlechte Ausbeuten. Erst eine 6malige Extraktion von 1 Teil Harn mit jeweils 5,5 Teilen Äther lieferte eine maximale Ausbeute. Wir extrahieren 4mal mit jeweils 1,6 Teilen Essigester pro 1 Teil Harn. Überprüft wurden die Ausbeuten durch kontinuierliche Extraktion des Harns mit Äther in einem KUTSCHER-STEUDEL-Perforator.

Dünn-schichtchromatographie und Elution

Als stationäre Phase verwendeten wir Kieselgel G (Merck). Zur besseren Trennung wendeten wir die Keilstreifentechnik in Kombination mit einer Zweifachentwicklung an, doch war die Trennung mit dem ammoniakalischen Laufmittel von STROBACH (10) unbefriedigend. Wir fanden in Anlehnung an dieses Laufmittel bei Verwendung von Puffern anstelle von Ammoniak bei pH 3,8 die besten Trennungen. Wir versuchten daher das von PASTUSKA (20) angegebene Laufmittel Eisessig : Benzol : Methanol = 4 : 45 : 8 (v/v), das dann auch die besten Trennungen

Vorschrift

50 ml/24-Stdn.-Sammelharn (es kann auch entsprechend weniger genommen werden) werden mit konz. HCl auf pH 1 gebracht und mit Natriumchlorid gesättigt. Anschließend wird der Harn 4mal mit je 30 ml Essigester extrahiert (zur Phasentrennung bei Emulsionsbildung zentrifugieren), die vereinigten Essigesterextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet. Der getrocknete Essigester wird im Vakuum zur Trockne gebracht und der Rückstand in 0,4 ml 60proz. Äthanol gelöst.

Die Dünnschichtchromatographie erfolgt auf Keilstreifen an Kieselgel G (Schichtdicke 0,25 mm) als stationäre und Eisessig-Benzol-Methanol (4 + 45 + 8 v/v) als mobile Phase. Aufgetragen werden ein Vanillinmandelsäure-Standard (10 µg Vanillinmandelsäure), 2mal 0,03 ml der zu untersuchenden Probe und 1mal 0,03 ml der Probe plus Vanillinmandelsäure-Standard (als Leitchromatogramm und zur Überprüfung der gefundenen Extinktionen). Zur besseren Trennung kann eine eindimensionale Zweifachentwicklung vorgenommen werden. Die fertigentwickelte Platte wird zur Abstumpfung der Essigsäure 2–3 Min. in eine NH₃-Kammer gestellt, dann mit Boratpuffer pH 9,5 besprüht und getrocknet. Nach Besprühen mit GIBBS Sprühreagenz wird die Platte zur Farbvertiefung einige Sekunden einer NH₃-Atmosphäre ausgesetzt, die Vanillinmandelsäure-Bande abgekratzt und mit 5,4 ml Boratpuffer pH 9,5, 0,6 ml Pyridin und 0,1 ml Sprühreagenz eluiert. Nach 15 Min. langem Stehen wird 10 Min. bei 3500 U/Min. zentrifugiert, die überstehende Lösung abdekantiert, bei 620 nm und einer Schichtdicke $d = 1$ cm gegen einen Blindwert gemessen, der der Leitbahn des Standardwertes entnommen wurde. Es wird wegen der möglichen Fehlerquellen beim Besprühen der DC-Platten unbedingt die Berechnung mit

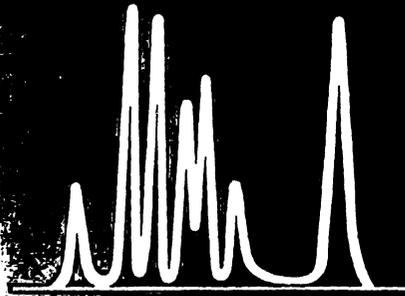
einem Standard empfohlen, da die Extinktionen des 10 µg Vanillinmandelsäure-Standards auf den Chromatogrammen maximal $\pm 20\%$ schwanken können. Beim Vergleich der gefundenen Werte der Vanillinmandelsäure-Ausscheidung nach Anfärbung mit diazotiertem *p*-Nitranilin und GIBBS Reagenz waren die Differenzen z. T. erheblich, es wurden nach Anfärbung mit GIBBS Reagenz meist weniger, und zwar durchschnittlich 25% weniger Vanillinmandelsäure gefunden als nach Anfärbung mit diazotiertem *p*-Nitranilin. Dies deutet auf eine selektivere Bestimmung der Vanillinmandelsäure mit GIBBS Reagenz hin.

Die von STROBACH (10) und anderen Autoren angegebenen Normalwerte erscheinen uns aufgrund theoretischer Überlegungen der Katecholaminausscheidung sowie deren Metabolisierungsraten zu hoch. Sie dürften maximal bei 5 mg/24-Stdn.-Harn $\pm 10\%$ mit einem Grenzbereich bis 6 mg liegen. Dies würde unseren, anhand von 33 verschiedenen Harnen, deren Werte im Normalbereich lagen, errechneten Mittelwert von 3,45 mg/24-Stdn.-Harn mit einer Standardabweichung von $s = \pm 1,27$ sowie den von PRESTON (11) angegebenen Werten etwa entsprechen. Als Maß der Streuung wird allgemein $\pm 2,3 s$ angegeben, wonach unser Mittelwert den Betrag von $3,45 \pm 2,92$ mg/24-Stdn.-Harn annimmt. In dieser Streuung ist sowohl die methodische als auch biologische enthalten. Bei Vergleichen beider Methoden legten wir für Anfärbungen mit diazotiertem *p*-Nitranilin Normalwerte von 7 mg (10) und für Anfärbungen mit GIBBS Reagenz 5 mg/24-Stdn.-Harn zugrunde. Von 8 untersuchten pathologischen Patientenharnen waren 5 Harnen nach beiden Anfärbungen pathologisch, 2 Harnen nur nach Anfärbung mit diazotiertem *p*-Nitranilin und 1 Harn nur nach Anfärbung mit GIBBS Reagenz.

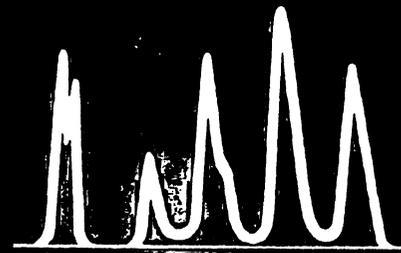
Literatur

1. GITLOW, S. E., M. MENDLOWITZ, S. KHASSIS, G. COHEN und J. SHA, *J. Clin. Invest.* 39, 221 (1960). — 2. STUDNITZ, W. v., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 12 Suppl. No. 48, 1–73 (1960). — 3. BUTLER, T. J., *Clin. Chem. New York*, 13, 488 (1967). — 4. O'GORMAN, L. P., *Clin. Chem. Acta Amsterdam*, 19, 485 (1968). — 5. DUKE, P. S. und H. B. DEMOPOULOS, *Clin. Chim. New York*, 14, 212 (1968). — 6. BAJOR, G. F. und W. G. CLARK, *J. Chromatog.* 14, 447 (1964). — 7. WYBENGA, D. und V. J. PILEGGI, *Clin. Chim. Acta Amsterdam*, 16, 147 (1967). — 8. KARONIN, F., C. R. J. RUTHVEN und M. SANDLER, *Clin. Chim. Acta Amsterdam*, 20, 427 (1968). — 9. GREER, M., T. J. SPRINKLE und C. M. WILLIAMS, *Clin. Chim. Acta Amsterdam*, 21, 247 (1968). — 10. STROBACH, H., *diese Z.* 5, 77 (1967). — 11. PRESTON, J. A., *Clin. Chem. New York*, 13, 19 (1967). — 12. DITTMANN, J. und G. LIEM, *diese Z.* 4, 265 (1968). — 13. SEGURA-CARDONA, R. und K. SOEHRING, *Med. exp.* 10, 251 (1964). — 14. DE POTTER, W. P., R. F. VOCHTEN und A. F. DE SCHAEPPDRYVER, *Experientia Basel*, 21, 482 (1965). — 15. NAKAGAWA, M. R. SHETLAR und S. H. WENDER, *Analytic. Biochem.* 7, 374 (1964). — 16. MCGREGOR, R. F., M. KHAN, D. MARRACK und M. P. SUVILLAN, *Amer. J. Clin. Pathol.* 46, 163 (1965). — 17. KÖHLER, P. und H. BAUFELD, *Ärztl. Lab.* 10, 224 (1964). — 18. SMITH, P., *West European Symp. Clin. Chem.* 2, 31, 97 (1963). — 19. FELLMAN, J. H., L. J. SEVERSON, E. H. ROBINSON und T. S. FUJITA, *Amer. J. Clin. Pathol.*, 38, 651 (1962). — 20. PASTUSKA, G., *Z. analyt. Chem.* 179, 355 (1961). — 21. DIRSCHERL, W., *diese Z.* 7, 200 (1969).

Dipl.-Chem. J. Gartzke u. E. Majewski
X 108 Berlin
Unter den Linden 40

**Verteilungs-
chromatographie**

Trennung voresterter Catecholamin-Metaboliten durch Verteilungschromatographie in 1,2-Dichloräthan/Methanol 7:3. (E. ÅNGGÅRD et al., J. Chromatog. 50 (1970) 251-259.)

Gelfiltration

Gelfiltration von Triglyceriden und Fettsäuren in Chloroform. (W. K. DOWNEY et al., J. Chromatog. 46 (1970) 120-124.)

**Adsorptions-
chromatographie**

Trennung von Östrogenen durch Adsorptionsschichtchromatographie in dest. Wasser. (H. van BAELEN et al., J. Chromatog. 30 (1967) 226-227.)

Sephadex® LH-20

trennt in organischen Lösungsmitteln und in wässrigen Lösungen

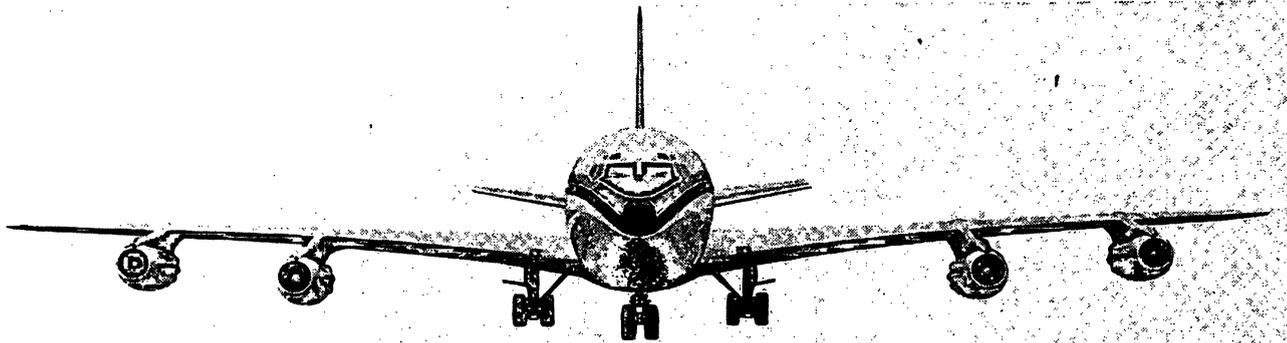
Sephadex LH-20 ist ein lipophiles Sephadex-Derivat und wird durch Hydroxypropylieren aus Sephadex G-25 gewonnen. Es wird in Perlform (Partikelgröße trocken 25-100 μ) als freifließendes Pulver geliefert, das in Wasser und polaren organischen Lösungsmitteln quillt. Der Quellgrad nimmt mit abnehmender Polarität der Lösungsmittel ab. Sephadex LH-20 ist als Molekularsieb für die Gelfiltration in organischen Lösungsmitteln entwickelt worden, es hat sich jedoch auch für andere chromatographische

Verfahren rasch durchgesetzt, die auf Verteilungs- und Adsorptionseffekten beruhen.

Sephadex LH-20 wird eingesetzt in der Fraktionierung von Polymeren, zur Trennung von Lipiden und Steroiden, zum Separieren von aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen sowie zur Lösung vieler anderer Trennprobleme.

Für das Arbeiten in Lösungsmittelsystemen haben wir spezielle lösungsmittelfeste Chromatographieröhre entwickelt.

Auf sicherem Kurs



Qualitätskontrolle im klinisch-chemischen Labor mit

Versatol[®]

Standard- und Kontrollseren

LABORDIAGNOSTICA
GÖDECKE

207/0

Vertrieb für Österreich: Pharmazeutische Fabrik
MONTAVIT GmbH
Absam
A-6060 Solbad Hall (Tirol)

Vertrieb für die Schweiz: Cosmopharm AG
CH-8040 Zürich
Zimmerlistraße 6