

COD 11003 20 determinaciones
CONSERVAR A 15-30°C
Reactivos para medir la concentración de ácido vanilmandélico Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico



## FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ácido vanilmandélico (VMA) presente en la muestra es retenido por una resina de intercambio aniónico. Una vez eliminadas las interferencias por lavado, se eluye y se cuantifica por espectrofotometría como vanilina después de una oxidación con periodato en medio básico<sup>1,2,3</sup>.

## CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- Reactivo. 1 x 25 mL. Tampón fosfato de sodio 0,6 mol/L pH 7,0, azida de sodio 15 mmol/L.
- Reactivo. 1 x 120 mL. Tampón acetato de sodio 0,2 mol/L pH 6,1, azida de sodio 15 mmol/L.
- Reactivo. 1 x 170 mL. Cloruro de sodio 2 mol/L, azida de sodio 15 mmol/L.
- Microcolumnas. 1 x 20. Contienen resina de intercambio aniónico equilibrada y azida de sodio 1,5 mmol/L.
- Reactivo. 1 x 30 mL. Carbonato de potasio 3 mol/L.

*Nocivo (Xn): R22: Nocivo por ingestión. R36/37/38: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. S22: No respirar el polvo. S26: En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.*

- Reactivo. 1 para 10 mL. Polvo de m-periodato de sodio, para 0,12 mol/L después de reconstituir.  
*Comburente (O): R8: Peligro de fuego en contacto con materias combustibles.*
- Reactivo. 1 para 10 mL. Polvo de metabisulfito de sodio, para 0,67 mol/L después de reconstituir.

*Nocivo (Xn): R22: Nocivo por ingestión. R31: En contacto con ácidos libera gases tóxicos. R41: Riesgo de lesiones oculares graves. S26: En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S39: Usen protección para los ojos/la cara. S46: En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico.*

- Patrón. 1 para 5 mL. La concentración del patrón reconstituido viene indicada en la etiqueta del vial. El valor de la concentración es trazable al Material de Referencia Certificado 925 (National Institute of Standards and Technology, USA).

## CONSERVACIÓN

Conservar a 15-30°C.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez, absorbancia del blanco de reactivo superior a 0,050 a 360 nm (cubeta de 1 cm).
- Microcolumnas: Ausencia de tampón sobre el lecho de la resina.

## REACTIVOS AUXILIARES

- Ácido clorhídrico concentrado de grado analítico.

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos (B) y (C): Añadir a los viales correspondientes 10 mL de agua destilada y agitar hasta disolución completa. Estables 5 meses a 2-8°C.

Patrón (S): Disolver en 5 mL de Reactivo 3 y añadir una gota de ácido clorhídrico concentrado. Estable 5 meses a 2-8°C.

## EQUIPO ADICIONAL

- Espectrofotómetro para lecturas a 360 nm (358-362)
- Baño termostatzable

## MUESTRAS

Orina de 24 horas recogida mediante procedimientos estándar.

Mantener a 2-8°C y utilizar antes de 24 horas. Las muestras pueden conservarse más tiempo si se ajusta el pH entre 1-2 con ácido clorhídrico concentrado (HCl) y se mantienen un máximo de 5 días a 2-8°C ó 1 mes a -20°C. Centrifugar o filtrar antes de iniciar la determinación.

## PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra:

- Pipetear en un tubo de ensayo (Nota 1):

Muestra	1,0 mL
Reactivo (1)	1,0 mL

Separación cromatográfica:

- Destapar la Microcolumna (4), romper la lengüeta inferior y bajar el filtro hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla. Dejar pasar todo el sobrenadante desechando el eluido.
- Verter el contenido del tubo (muestra tratada) en la microcolumna y desechar el eluido.
- Lavar el tubo con 2-3 mL de agua destilada y verterlo en la microcolumna. Desechar el eluido.
- Añadir a la microcolumna:

Reactivo (2)	5,0 mL	Desechar el eluido
--------------	--------	--------------------

- Colocar la microcolumna sobre un tubo de ensayo y pipetear:

Reactivo (3)	6,0 mL	Recoger el eluido
--------------	--------	-------------------

- Agitar bien el eluido para homogeneizarlo (Nota 2).

Colorimetría

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco Reactivo	Patrón	Blanco Muestra	Muestra
Eluido	—	—	1,0 mL	1,0 mL
Reactivo (3)	1,0 mL	0,9 mL	—	—
Patrón (S)	—	0,1 mL	—	—
Reactivo (A)	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL
Reactivo (B)	0,1 mL	0,1 mL	—	0,1 mL

- Agitar bien e incubar a 37°C durante 30 minutos. Añadir a continuación a cada tubo:

Reactivo (C)	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Reactivo (B)	—	—	0,1 mL	—

- Leer la absorbancia (A) del blanco de muestra, muestra y patrón frente al blanco de reactivos a 360 nm. La absorbancia es estable durante 2 horas.

## CÁLCULOS

La concentración de VMA en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{Muestra}} - A_{\text{Blanco Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times \frac{V_E}{V_M} \times \frac{V_{PC}}{V_{EC}} \times C_P \times \frac{1}{\text{Rec}} = C_{\text{Muestra}}$$

El volumen de muestra ( $V_M$ ) es 1 mL, el volumen de eluido ( $V_E$ ) es 6 mL, el volumen de eluido en la colorimetría ( $V_{EC}$ ) es 1 mL, el volumen de Patrón en la colorimetría ( $V_{PC}$ ) es 0,1 mL, la concentración del Patrón ( $C_P$ ) viene indicada en la etiqueta del vial y la media de la recuperación (Rec) es 0,825. Se deducen las siguientes fórmulas para calcular la concentración:

$$\frac{A_{\text{Muestra}} - A_{\text{Blanco Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_P \times 0,727 = C_{\text{Muestra}}$$

La cantidad de VMA en la orina de 24 horas se calcula según las siguientes fórmulas generales:

$$\frac{\text{mg/L VMA}}{\mu\text{mol/L VMA}} \times V_{\text{Orina/24 horas}} (\text{L}) = \frac{\text{mg VMA/24 horas}}{\mu\text{mol VMA/24 horas}}$$

## VALORES DE REFERENCIA

Orina<sup>a</sup>: < 13,6 mg/24-h = < 68,6 μmol/24-h

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

## CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de la Orina Control (cod. 18036 y 18037) para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

## CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Límite de detección: 1,9 mg/L = 9,7 μmol/L.
- Límite de linealidad: 300 mg/L = 1500 μmol/L. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/2 con agua destilada y repetir la medición.
- Repetibilidad (intraserie):

Concentración media	CV	n
11,2 mg/L = 56 μmol/L	5,0 %	25
43,2 mg/L = 216 μmol/L	2,5 %	25

- Reproducibilidad (interserie):

Concentración media	CV	n
11,2 mg/L = 56 μmol/L	8,6 %	25
43,2 mg/L = 216 μmol/L	8,2 %	25

- Sensibilidad: 7,50 mA·L/mg = 1,50 mA·L/μmol.
- Veracidad: En la determinación de muestras cargadas con distintas concentraciones de VMA, los resultados obtenidos no muestran diferencias sistemáticas con las concentraciones teóricas. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- Interferencias: Los ácidos Géntísico (1000 mg/L), Homogéntísico (2000 mg/L) y 5-Hidroxiindolacético (50 mg/L) no interfieren. El ácido p-Hidroximandélico (>12,5 mg/L) interfiere. Algunos alimentos, medicamentos y sustancias pueden interferir<sup>6</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

El Ácido Vanilmandélico es el producto final principal del metabolismo de las catecolaminas que se excreta en orina. Su medida refleja la producción total de adrenalina y noradrenalina.

Los valores elevados de excreción diaria de ácido vanilmandélico están asociados con los tumores de neurocromafina secretores de catecolaminas como feocromocitomas, neuroblastomas o paragangliomas<sup>4,6</sup>.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

## NOTAS

- Si la muestra se ha conservado acidificada con un exceso de ácido clorhídrico, comprobar el pH y ajustarlo entre 6,5 y 7,5 con hidróxido de sodio diluido.
- La técnica puede interrumpirse en este punto. Guardar el eluido en un tubo sellado con parafilm a 2-8°C durante un máximo de 24 horas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Wybenga D, Pileggi VJ. Quantitative determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid (VMA) in urine. *Clin Chim Acta* 1966; 16: 147-154.
- Famdon JR, Davidson HA, Johnston IDA, Wells SA. VMA excretion in patients with Pheochromocytoma. *Ann Surg* 1980; 191: 259-263.
- John J, Pisano J, Richard Crout, David Abraham. Determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. *Clin Chim Acta* 1962; 7: 277-284.
- Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
- Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 5th ed. AACCC Press, 1995.
- Friedman and Young. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 4th ed. AACCC Press, 1997.