

Chromatografická charakterizace aminokyselinových profilů vzorků moči pacientů s karcinomem prostaty

Cernei N.^{1,2}, Heger Z.^{1,2}, Veselý Š.³, Zítka O.^{1,2}, Adam V.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}

¹Ústav chemie a biochemie, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika

²Středoevropský technologický institut, VUT v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika

³Urologická klinika, 2. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a FN V Motole, V Úvalu 84, CZ-150 06 Praha 5, Česká republika

SOUHRN

Cíle studie: Cílem studie bylo vytvořit protokol pro zpracování vzorků moči pro získání aminokyselinových profilů pomocí iontově výměnné chromatografie s detekcí ve viditelném spektru (IEC/Vis) na základě tvorby komplexů aminokyselin s ninhydrinem a následné zkrácení času analýzy pro klinicky zajímavé molekuly (sarkosin či taurin), které mohou být využity jako potenciální nádorové biomarkery.

Typ studie: Metodická

Materiál a metody: Vzorky moči, odebrané pacientům s diagnostikovaným karcinomem prostaty (n = 500) byly shromážděny po dobu 1 roku a uskladňovány při teplotě -80°C. Pro vlastní analýzu aminokyselinových profilů byly vzorky připraveny kyselou hydrolyzou v mikrovlnném reaktoru. Za optimalizovaných podmínek (80 W, 120°C, 25 bar, 105 min) bylo 500 µl vzorku, smíchaného s 500 µl 35% kyseliny chlorovodíkové zhydrolyzováno na výsledný produkt, který byl následně ředěn pufrém sodíkového cyklu (0,2 mol/l NaCl, 60 mmol/l C₆H₈O₇, 1,5 mmol/l N₃Na a 0,4 % S(CH₂CH₂OH)₂). Po centrifugaci (25 000 g při 4°C, 20 min) byly vzorky neutralizovány (0,6 mol/l NaOH) a analyzovány iontově-výměnnou kapalinovou chromatografií s postkolonovou derivatizací ninhydrinem využívající optickou detekci při vlnových délkách λ = 440 a 570 nm. Pro detekci sarkosinu a taurinu byly vzorky připraveny odpařením 250 µl vzorku na dusíkové odparce (40 min, teplota dusíku 60°C, tlak 1 bar) a následně resuspendovány pufrém sodíkového cyklu (250 µl).

Výsledky a závěr: Analýzou aminokyselinových profilů (n = 500) bylo zjištěno, že lze docílit získání důležitých informací z neinvazivně odebraných vzorků moči. Použití dusíkové odparky redukuje manipulaci se vzorkem a zlepšuje opakovatelnost analýzy. Zkrácená analýza sarkosinu a taurinu ze vzorků odpařených na dusíkové odparce může sloužit jako metoda pro citlivou a nízkonákladovou analýzu klinických vzorků.

Klíčová slova: Iontově-výměnná chromatografie, Karcinom prostaty, Neinvazivní biomarkery, Sarkosin, Taurin.

SUMMARY

Cernei N., Heger Z., Veselý Š., Zítka O., Adam V., Kizek R.: Chromatographic characterization of amino acid profiles in urinary samples of patients suffering from prostate carcinoma

Objective: The aim of our study was to prepare a protocol for pre-treatment of clinical urinary samples, subsequently employed for acquirement of amino acid profiles via ion exchange chromatography with detection in visible spectrum (IEC/Vis). Further for clinically interesting biomolecules as sarcosine and taurine the optimization was carried out to shorten the analysis time.

Design: Methodological

Material and methods: Urine specimens from patients diagnosed with prostate cancer (n = 500) were collected within 1 year and stored in -80°C. Samples were processed for analysis of amino acid profiles through acidic hydrolysis in a microwave reactor. Using optimized conditions (80 W, 120°C, 25 bar, 105 min), 500 µL sample, mixed with 500 µL of 35% hydrochloric acid hydrolyzed. That resulted in product, which was subsequently diluted in buffer of sodium cycle (0.2 mol/L NaCl, 60 C₆H₈O₇ mmol/L, 1.5 mmol/L and 0.4% N₃Na S(CH₂CH₂OH)₂). After centrifugation (25000 g at 4°C, 20 min), the samples were neutralized (0.6 mol/l NaOH) and analyzed using ion-exchange liquid chromatography with post-column derivatization with ninhydrin, using the detection wavelength λ = 440 and 570 nm (IEC/Vis). For analysis of sarcosine and taurine, the samples were prepared by evaporation of 250 µL of sample employing a nitrogen evaporator (40 min, temperature 60°C. Nitrogen pressure of 1 bar) and resuspended with buffer of sodium cycle (250 µL).

Results and conclusion: The analyses of amino acid profiles offer interesting clinical information not only in non-invasively collected urinary samples, but also in other organic matrices. Employment of nitrogen evaporator for sample pre-treatment leads to reduction of manipulation with sample and its combination with shortened analyses times of sarcosine and taurine may serve as a sensitive and low-cost method for analysis of clinical specimens.

Keywords: Ion-exchange chromatography, Non-invasive biomarker, Prostate carcinoma, Sarcosine, Taurine.

Úvod

Aminokyseliny jsou jedním ze základních metabolitů a jejich biochemické dráhy jsou úzce spojeny s fyziologickými či patologickými pochody, což z nich dělá slibné indikátory změn zdravotního stavu [1]. Jakožto důležité

biomolekuly tvoří základ každé tkáně a alterace v jejich hladinách mohou indikovat rozmanité patologické stavy včetně zhoubných onemocnění či oxidativního stresu [12]. Vzhledem k potenciálu sarkosinu či taurinu jako slibných biomarkerů jsou neustále vyvíjeny nízkonákladové a citlivé metody, které by mohly být do budoucna využity

pro screeningová vyšetření. Význam má především stanovení sarkosinu a taurinu v moči pro včasné odhalení možného rozvoje maligních novotvarů prostaty.

Díky svým amfolytickým vlastnostem jsou aminokyseliny často separovány pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie na základě rozdílného náboje mezi aminokyselinou a stacionární fází. Jako iontoměnič je využit katex [2, 3], kde je hlavním faktorem určujícím retenci analytu jeho izoelektrický bod [4]. Separace aminokyselin je možná i na reverzně fázových kolonách, které však pro účinnou separaci nutně vyžadují předkolonovou derivatizaci separovaných analytů [5]. Separace aminokyselin je možná i na hydrofobně interakčních kolonách [6]. Možná je i separace pomocí kapilární elektroforézy, avšak ve srovnání s chromatografickými technikami bývá identifikace analytů obtížnější [7].

Pro detekci aminokyselin je u iontově výměnné separace využito postkolonové derivatizace ninhydrinem za definovaných podmínek při reakční teplotě 120°C. Ninhydrin reaguje s primární aminoskupinou a dává vzniknout purpurově zbarvenému komplexu (Ruhemannova červeň) (Obr. 1) [8]. Nejvyšší výnos derivatizační reakce byl popsán v detekčním rozmezí $\lambda = 400 - 800 \text{ nm}$ [2]. Další možností je fluorescenční detekce, nicméně i ta vyžaduje po separaci zařazení derivatizačního kroku [9]. Hmotnostní detekce nabízí vysokou citlivost, která je vykoupena vysokou pořizovací a provozní cenou přístroje. Problémem může být i komplexnost eluentů po separaci reálných vzorků.

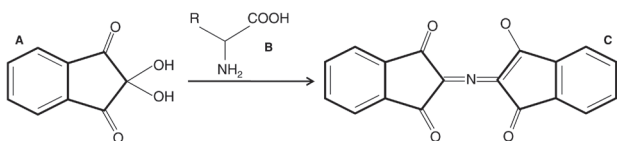


Fig. 1: Overall scheme of derivatization reaction between (A) ninhydrin and (B) amino acid, resulting in (C) Ruhemann's purple.

Cílem této práce bylo sestavit jednoduchý protokol úpravy reálných vzorků moči pro získání aminokyselinového profilu pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie s Vis detekcí. Dalším cílem byla optimalizace separačních podmínek sarkosinu a taurinu pro získání rychlé a finančně nenáročné metody pro identifikaci těchto aminokyselin.

Materiál a metody

Chemikálie

Standardy a chemikálie na přípravu pufrů byly pořízeny v 99% čistotě od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), pokud není uvedeno jinak. Methylcelosolve, ninhydrin a chlorid cínatý byly pořízeny od firmy Ingos (Praha, Česká republika).

Vzorky moči

Pro účely ověření funkčnosti optimalizovaných metod byly použity vzorky moči ($n = 500$). Soubor se skládal ze vzorků získaných od pacientů s karcinomem

prostaty ($n = 320$) a vzorky kontrolní skupiny subjektů bez diagnostikovaných malignit s definovaným zdravotním stavem ($n = 180$). Vzorky byly získány z Fakultní nemocnice v Motole v Praze a Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně a zpracovány se souhlasem etické komise (referenční číslo EK-377/13). Vzorky moči pacientů byly shromažďovány po dobu 1 roku a uskladňovány při teplotě -80°C .

Stanovení prostatického specifického antigenu (PSA)

PSA a fPSA v moči bylo analyzováno imunoenzymometrickou metodou (IEMA). Pro analýzu byl použit automatizovaný analyzátor AIA 600 II (Tosoh, Bioscience, Tokyo, Japonsko). Pro analýzu byl použit komerční kit ST AIA-PACK PSAII dle pokynů výrobce.

Příprava vzorků pro analýzu aminokyselinových profilů

Pro účely kyselé hydrolyzy v mikrovlákném reaktoru MW 3000 (Anton Paar, Graz, Rakousko) bylo odebráno 500 μl vzorku a smícháno s 500 μl 35% kyseliny chlorovodíkové. Za použití optimalizovaných mineralizačních podmínek (power: 80 W, Ramp: 15 min, Hold: 90 min, tlak: 25 bar, Rotor XF-1006) byl získán vzorek, který byl následně 10 x ředěn ředícím pufrům sodíkového cyklu (0,2 mol/l NaCl, 60 mmol/l $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 1,5 mmol/l N_3Na a 0,4 % $\text{S}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$). Po ředění byly vzorky centrifugovány při 25 000 g a 4°C po dobu 20 minut v mikrocetrufigu 5417R (Eppendorf, Hamburg, Německo), následovalo ředění 1:2 v neutralizačním roztoku (0,6 mol/l NaOH). Takto připravený vzorek byl následně analyzován pomocí IEC/Vis.

Příprava vzorků pro analýzu sarkosinu a taurinu

Vzorky moči (500 μl) byly převedeny do mikrotitrační destičky Deepwell plate 96 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) a odpařeny pomocí dusíkové odpařky (Ultra-vap 96, Porvair Sciences limited, Leatherhead, Spojené Království). Odpařené vzorky byly resuspendovány pufrům sodíkového cyklu (500 μl) a analyzovány pomocí IEC/Vis.

Iontově-výměnná kapalinová chromatografie s Vis detekcí

Separace a identifikace aminokyselin byla provedena pomocí vysokoúčinné iontově-výměnné kapalinové chromatografie s Vis detekcí (IEC/Vis) na přístroji AAA-400 (Ingos, Praha, Česká republika.). Stanovení aminokyselin pomocí derivatizačního činidla ninhydrinu je jednou z nejpoužívanějších metod. Mezi přednosti této metody patří přesnost, citlivost a velké spektrum detekovaných látek v různých maticích jako jsou krev či moč. Analyzátor aminokyselin není určen pro běžnou analýzu aminokyselin taurinu a sarkosinu. Vzorky moči pacientů byly shromažďovány po dobu 1 roku a uskladňovány při teplotě -80°C . Skleněná chromatografická kolona s vnitřním průměrem 3,7 mm a délkou 350 mm byla naplněna silným katexovým ionexem v sodíkovém cyklu s průměrnou velikostí částic 12 μm a síťením 8 % a temperována. Objem nástříkové smyčky byl 100 μl

při přesnosti nástřiku s relativní směrodatnou odchylkou (RSD) 1 %. Ninhydrin byl rozpuštěn v 75 % (v/v) metylcelosolu a v 25 % (v/v) 4 mol/l acetátovém pufru (pH 5,5). Derivizační činidlo bylo po celou dobu uchováno pod inertní atmosférou N₂ a chlazeno. Stanovení aminokyselin probíhalo dle následujících podmínek:

- Složení mobilní fáze: pufr (A) 60 mmol/l C₆H₈O₇, 20 mmol/l Na₃C₆H₅O₇, 0,2 mol/l NaCl, 1,5 mmol/l N₃Na, 0,4 % S(CH₂CH₂OH)₂, pufr (B) 50 mmol/l C₆H₈O₇, 30 mmol/l Na₃C₆H₅O₇, 0,15 mol/l NaCl, 1,5 mmol/l N₃Na, 0,4 % S(CH₂CH₂OH)₂, pufr (C) 40 mmol/l C₆H₈O₇, 40 mmol/l Na₃C₆H₅O₇, 0,3 mol/l NaCl, 1,5 mmol/l N₃Na, 0,4 % S(CH₂CH₂OH)₂, pufr (D) 90 mmol/l Na₃C₆H₅O₇, 0,9 mol/l NaCl, 30 mmol/l H₃BO₃, 1,5 mmol/l N₃Na, pufr (E) 0,2 mol/l NaOH,
- Skokový gradient mobilní fáze (průběh v čase viz Tabulka 1),
- Průtok mobilní fáze 0,25 ml/min,
- UV detekce při 570 nm (440 nm pro detekci prolinu).

a LOQ byly vypočítány jako průměr pěti nezávislých analýz jako trojnásobek (LOD, 3S/N) a desetinásobek (LOQ, 10S/N) směrodatné odchylky 50 hodnot šumu (v každé analýze) v blízkosti píku analytu. Hodnoty opakovatelnosti byly stanoveny z 10 hodnot a hodnoty mezilehlé preciznosti z 25 hodnot. Kalibrační body byly proloženy přímkou, tak aby součet čtverců odchylek byl minimální. Získané parametry přímky (úsek na ose y a směrnice) byly otestovány, zda jsou statisticky významné od nuly. Bylo zjištěno, že směrnice je statisticky významná od nuly, zatímco úsek na ose y není statisticky významný. Byl sestaven graf reziduí (závislosti velikosti reziduí na předpovídané hodnotě), který potvrdil, že zvolený regresní model je správný (body reziduí jsou rozmístěny v grafu náhodně) a nebyly odhaleny odlehlé body.

V našem případě byla pro desintegraci peptidových vazeb a získání komplexních profilů moči zapojena kyselá hydrolyza v mikrovlnném reaktoru, která ale

Table 1. Expression of gradient elution used for analyses of total amino acids profile, taurine and sarcosine.

AMK profiles			Sarcosine			Taurine		
t (min)*	T _{column} (°C)**	Buffer	t (min)*	T _{column} (°C)**	Buffer	t (min)*	T _{column} (°C)**	Buffer
0	60	A	0	60	B	0	60	A
5	60	B	5	60	B	3	60	E
33	60	C	15	60	B	8	60	A
50	60	D	20	60	E	25	60	A
66	75	D	28	60	B	-	-	-
83	80	D	37	60	B	-	-	-
88	80	E	38	60	B	-	-	-
94	80	E	42	60	B	-	-	-
100	60	A	45	60	B	-	-	-
113	60	A	-	-	-	-	-	-
114	60	A	-	-	-	-	-	-
120	60	A	-	-	-	-	-	-

* Time of start of separation step, ** temperature of column during separation step.

Popisná statistika

Statistické zpracování dat a jejich grafická interpretace byly provedeny v programech Microsoft Excel®, Microsoft Word® and Microsoft PowerPoint®. Mez detekce (3 S/N) a mez kvantifikace (10 S/N) byly vypočítány dle [10], kde N je vyjádřeno jako standardní směrodatná odchylka šumu stanoveného v oblasti signálu.

Výsledky a diskuse

Aminokyselinové profily

Stacionární fáze - katex v kombinaci se skokovým gradientem pufrů o různých pH a iontové síle nabízí vhodnou cestu pro separaci aminokyselin na základě jejich rozdílných izoelektrických bodů [11]. Z předchozích optimalizačních kroků byly získány základní analytické parametry pro 17 analyzovaných aminokyselin (Tabulka 2). Údaje v tabulce byly zaokrouhleny na jednu platnou číslici. Kalibrační křivky byly sestaveny s použitím 10 kalibračních roztoků. Parametry LOD

zásadně prodlužuje dobu celkové analýzy (doba mikrovlnné přípravy vzorku - 105 minut). Po hydrolyze je vzorek rozložen na základní aminokyseliny, z kterých je konstituován. Po kyselé hydrolyze je zásadní další ředění vzorku pomocí pufrů, stabilizující pH vzorku.

Výše zmíněným postupem byly připraveny vzorky moči, odebrané pacientům s indikovanou radikální prostatektomií. Dva vybrané chromatogramy z těchto analýz jsou znázorněny na Obr. 2. Detailnější informace (hladiny PSA a fPSA, včetně přidružených diagnóz) o pacientech jsou přiřazeny ke každému chromatogramu a pro porovnání je ukázán i vybraný chromatogram vzorku moči zdravého muže, získaný stejným postupem přípravy a analýzy.

Chromatogramy jasně ukazují na zvýšení hladiny všech aminokyselin v moči pacientů s karcinomem prostaty. Tento jev je zřejmě spojen se zvýšeným obsahem proteinů v moči, který může být důsledkem zánětlivých stavů či jiných patologií, asociovaných s nádorovými onemocněními [13]. Jako zajímavá cílová molekula se jeví především sarkosin, který jakožto neproteinogenní

Table 2. The analytical parameters of IEC/Vis analyse for 17 basic analyzed amino acids, obtained from individual analyses of each amino acid.

AMK	Linear regression	Linear dynamic range [mg/L]	R ² *	LoD** [µg/L]	LoD [nmol/inj.]	LoQ [mg/L]	LoQ [nmol/inj.]	Repeatability (n = 10) [CV %]	Intermediate measurement precision (n = 25) [CV %]
Aspartic acid	$y = 3.09x + 0.5294$	0.2 - 90	0.9803	97	0.2	0.3	0.2	2	5
Threonine	$y = 0.0802x + 0.3451$	0.2 - 100	0.979	115	0.2	0.4	0.4	4	6
Serine	$y = 5.595x + 0.2159$	0.2 - 100	0.9889	104	0.2	0.3	0.3	3	4
Glutamic acid	$y = 4.89x + 0.7758$	0.1 - 80	0.9831	82	0.1	0.3	0.3	3	4
Proline	$y = 0.0258x + 0.0511$	0.1 - 70	0.996	84	0.1	0.3	0.4	3	4
Glycine	$y = 0.065x + 0.6321$	0.1 - 90	0.9758	43	0.1	0.1	0.2	2	2
Alanine	$y = 2.675x + 0.3821$	0.1 - 90	0.9906	65	0.1	0.2	0.2	2	3
Cysteine	$y = 9.515x + 0.4944$	0.4 - 120	0.9661	153	0.4	0.5	0.5	2	3
Valine	$y = 0.008x + 0.8032$	0.1 - 90	0.9674	81	0.1	0.3	0.3	4	4
Methionine	$y = 7.075x + 0.3028$	0.1 - 80	0.9849	88	0.1	0.3	0.3	3	2
Isoleucine	$y = 0.017x + 0.1915$	0.2 - 90	0.9817	97	0.2	0.3	0.3	3	4
Leucine	$y = 4.814x + 0.5876$	0.1 - 90	0.979	86	0.1	0.3	0.3	5	4
Tyrosine	$y = 4.988 + 0.2074$	0.3 - 100	0.9849	143	0.3	0.5	0.5	5	5
Phenylalanine	$y = 0.351x + 0.7296$	0.3 - 100	0.9761	142	0.3	0.5	0.5	4	6
Histidine	$y = 1.342x + 0.2585$	0.2 - 80	0.9797	99	0.2	0.3	0.3	3	3
Lysine	$y = 3.434x + 0.5411$	0.2 - 90	0.984	97	0.2	0.3	0.3	2	3
Arginine	$y = 0.659x + 0.6926$	0.3 - 100	0.9684	137	0.3	0.5	0.3	2	3

* Regression coefficients, ** limit of detection (3 S/N), *** limit of quantification (10 S/N), **** relative standard deviation, inj. - injection - 5 µL.

aminokyselina není úzce spřízněn se zvýšeným obsahem proteinů a jeho zvýšená koncentrace v matrici je dána především přítomností patologických stavů [1].

Zkrácené analýzy sarkosinu a taurinu

Sarkosin (N-methylglycin) není obsažen v proteinech, a proto není zapotřebí kyselá hydrolyza pro jeho kvantifikaci. Díky tomu byl postup přípravy vzorků zjednodušen na pouhé odpaření 250 µl vzorku a následné resuspendování stejným objemem ředícího pufru sodíkového cyklu. Výhodou postupu je časová nenáročnost, eliminace možných chyb v přípravě často velmi cenných vzorků a šetření finančních prostředků. Při analýze sarkosinu je zásadní jeho rozlišení od hmotnostně identického alaninu (89,0932 Da) [14]. Nejčas-

těji používané metody - GC/MS [15] a LC/MS [16] nabízejí vysokou citlivost, avšak za cenu složité předúpravy vzorku a nutnosti zapojení dobře školeného a zkušeného personálu pro obsluhu. Při zavedení dobře fungujících metod jsou tyto komplikace u IEC-Vis eliminovány a finanční náklady se redukuje pouze na pořizování chemikálií, potřebných k analýzám.

Stejná příprava vzorku moči byla zvolena i pro analýzu taurinu (kyselina 2-aminoethansulfonová), který ač postrádá karboxylovou skupinu, je často řazen mezi aminokyseliny [17]. Tato sulfonová kyselina je součástí většiny živočišných tkání a hraje významnou roli v mnoha fyziologicky důležitých procesech, jako je antioxidační ochrana organismu [18], inhibice neurotransmise [19] nebo stabilizace buněčných membrán [20]. Zvý-

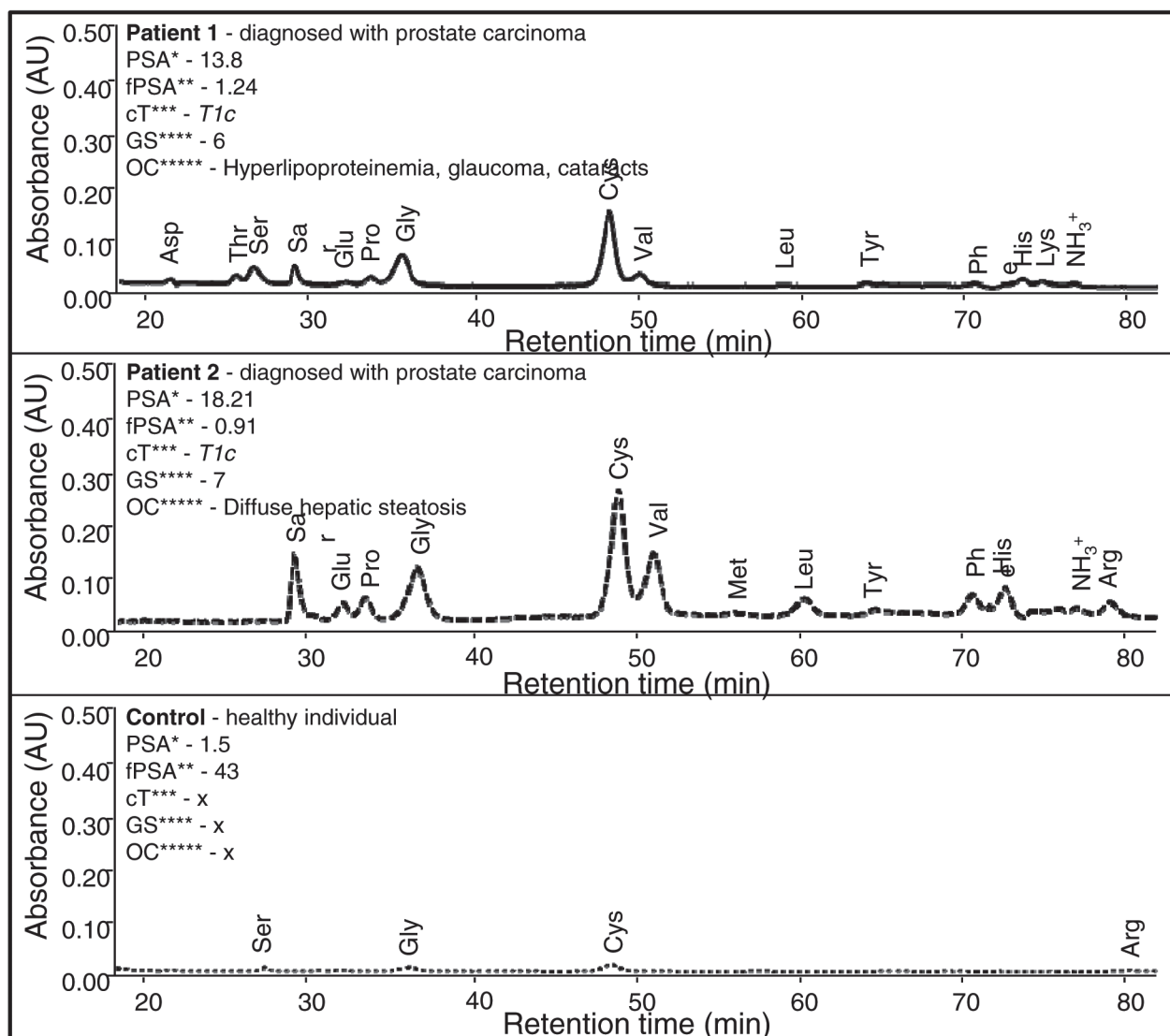


Fig. 2. Chromatograms showing total amino acid profiles of two chosen urinary samples obtained from two patients diagnosed with prostate carcinoma and one healthy individual as a control. Information belonging to each patient is inserted. Samples were subjected to acidic hydrolysis following conditions, mentioned in chapter Results and discussion and analyzed using IEC/Vis using method for determination of total amino acid profiles. * Prostatic specific antigen (ng/mL), ** free prostate specific antigen (free/total PSA ratio), *** clinical stage: T1c – tumor identified by needle biopsy, **** Gleason score, ***** Other comorbidities.

Table 3. The analytical parameters of shortened IEC/Vis analyses of taurine and sarcosine.

AMK	Linear regression	Linear dynamic range [mg/L]	R2*	LoD** [µg/L]	LoD [nmol/inj.]	LoQ [mg/L]	LoQ [nmol/inj.]	Repeatability (n = 10) [CV %]	Intermediate measurement precision (n = 25) [CV %]
Sarcosine	$y = 0.0052x + 0.0055$	0.2 - 90	0.9996	50	0.2	0.2	0.2	3	2
Taurine	$y = 0.0069x + 0.0096$	0.3 – 100	0.9980	70	0.1	0.3	0.3	3	3

* Regression coefficients, ** limit of detection (3 S/N), *** limit of quantification (10 S/N), **** relative standard deviation, inj. - injection - 5 µL.

šené hladiny taurinu v moči byly již dříve identifikovány u zánětlivých onemocnění střev [21], rozvoji nemoci z ozáření [22] či chronických onemocnění ledvin [23]. Použité metody, nejčastěji nukleární magnetická resonance (NMR) či kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (trojitý kvadrupól nebo orbitrap)

sice nabízejí vysokou citlivost, nicméně vykoupenou vysokou pořizovací a provozní cenou a značnými nároky na přípravu vzorku.

Z toho důvodu byly optimalizovány zkrácené IEC/Vis metody pro samostatné analýzy taurinu a sarkosinu. Jejich analytické parametry jsou znázorněny v Tabulce 3.

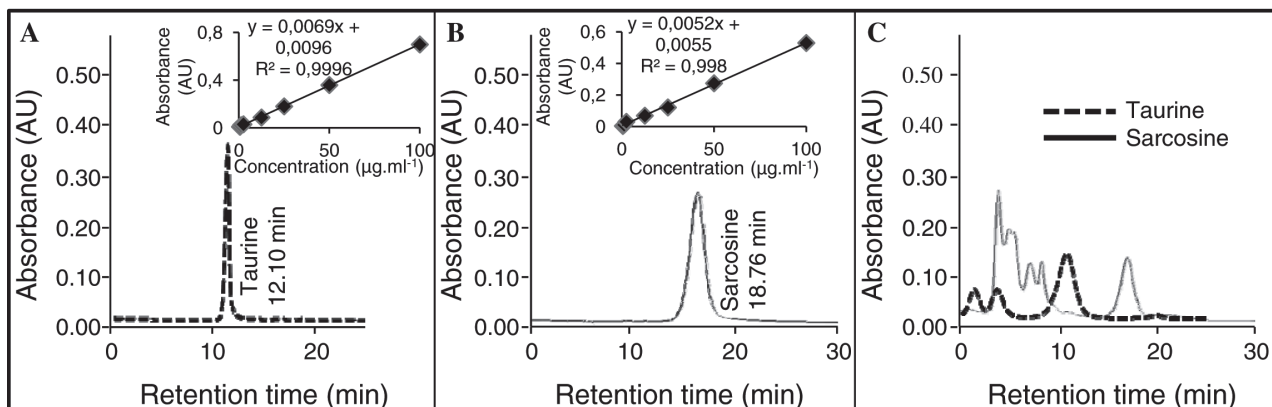


Fig. 3. Chromatograms of taurine and sarcosine, carried out using analyses, optimized for decrease of separation time of individual analytes. Chromatograms of standards of (A) taurine (10 $\mu\text{g/mL}$) and (B) sarcosine (10 $\mu\text{g/mL}$), obtained on ion-exchange chromatography with Vis detector. Inserted are shown their calibration curves (0.6 - 100 $\mu\text{g/mL}$). (C) Overlay of chromatograms of taurine and sarcosine, resulted from analysis of chosen real urinary sample, obtained by patients suffering from prostate carcinoma.

Údaje v tabulce byly zaokrouhleny na jednu platnou číslici. Analytické parametry byly získány stejným postupem jako v Tabulce 2. Kalibrační křivky byly sestaveny s použitím 10 kalibračních roztoků v pracovních rozsazích 7,8 – 1000 $\mu\text{mol/l}$ pro sarkosin a 0,8 - 800 $\mu\text{mol/l}$ pro taurin.

V porovnání s délkou analýzy aminokyselinových profilů (120 minut) byla délka analýzy samotného sarkosinu zkrácena na 45 minut, kdy eluce analytu probíhala v $t_R = 18,76$ min. U taurinu byla analýza zkrácena na 25 minut s elucí v $t_R = 12,10$ min. Záznamy z analýz standardů (10 $\mu\text{g/ml}$) těchto biologicky významných látek jsou znázorněny na Obr. 3A (taurin) a 3B (sarkosin).

Po optimalizaci byla metoda aplikována na vzorky pacientů s adenokarcinomem prostaty a po přípravě vzorku odpařením na dusíkové odparce byly získány chromatogramy sarkosinu a taurinu znázorněné na Obr. 3C, kdy byly po přepočtu na kreatinin získány hodnoty 33 $\mu\text{mol/mmol}$ kreatininu pro sarkosin a 26,5 $\mu\text{mol/mmol}$ kreatininu pro taurin.

Závěr

Prostatický specifický antigen (PSA) představuje v současnosti nejdůležitější nádorový marker nádorových onemocnění prostaty, avšak patří mezi markery, kde dochází k narušení integrity tkáně. Proto jsou hledány markery, pomocí kterých by bylo možné identifikovat karcinom prostaty pouhou analýzou moči. Jednou z látek, jejichž potenciál by se mohl v diagnostice karcinomu využít je neproteinogenní aminokyselina sarkosin. Podle několika studií je sarkosin hodnocen jako výrazně lepší marker rozvíjejících se nádorů prostaty než PSA, a proto bylo cílem této práce zavedení jednoduchého testu na hladinu sarkosinu v moči pacientů s diagnostikovaným zhoubným nádorem prostaty a zdravé kontrolní skupiny. Iontově-výměnná kapalinná chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem je spolehlivá separační technika, která je navíc relativně jednoduchá na obsluhu a díky tomu by mohly

naše optimalizované separační postupy být zavedeny do rutinní praxe. Naše výsledky ukazují možnost získání komplexních informací z moči s využitím této metody. A to ať už použitím kyselého hydrolyzy vzorku a následné IEC/Vis analýzy, anebo jednoduchým odpařením až 96 vzorků současně a následnou rychlou chromatografickou analýzou taurinu a sarkosinu. Vzhledem k neustále se zvyšujícímu zájmu o sarkosin může metoda jeho neinvazivního stanovení v moči posloužit jako screeningová, nízkonákladová metoda, využitelná pro prebiotické testování pacientů s podezřením na přítomnost karcinomu prostaty. Stejně tak stanovení taurinu v tělesných tekutinách může poskytovat důležité informace o hladinách oxidativního stresu v organismu.

Literatura

1. Heger, Z., Cernei, N., Gumulec, J. et al. Determination of common urine substances as an assay for improving prostate carcinoma diagnostics. *Oncol. Rep.* 2014, 31, p. 1846-1854.
2. Cernei, N., Zitka, O., Ryvolova, M. et al. Spectrometric and Electrochemical Analysis of Sarcosine as a Potential Prostate Carcinoma Marker. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012, 7, p. 4286-4301.
3. Zitka, O., Cernei, N., Heger, Z. et al. Microfluidic chip coupled with modified paramagnetic particles for sarcosine isolation in urine. *Electrophoresis.* 2013, 34, p. 2639-2647.
4. Wilkins, M. R., Williams, K. L. Cross-species protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: A theoretical evaluation. *J. Theor. Biol.* 1997, 186, p. 7-15.
5. Fermin, B. C., Radinsky, J. A., Kratochvil, R. J. et al. Integration of rapid derivatization and gradient elution techniques for enhanced high-performance liquid chromatography analysis of key amino acids in wheat flour. *J. Food Sci.* 2003, 68, p. 2667-2671.
6. Zitka, O., Heger, Z., Kominkova, M. et al. Preconcentration based on paramagnetic microparticles for the separation of sarcosine using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with coulometric detection. *J. Sep. Sci.* 2014, 37, p. 465-475.

7. **Ryvolova, M., Taborsky, P., Vrabel, P. et al.** Derivatization of amino acids, peptides and proteins for laser-induced fluorescence detection in capillary electrophoresis. *Chem. Listy.* 2006, 100, p. 191-195.
 8. **Fitzpatrick, W. H.** Spectrophotometric determination of amino acids by the ninhydrin reaction. *Science.* 1949, 109, p. 469-469.
 9. **Yi, P., Liu, L., Mei, H. F. et al.** Establishment of reference range of plasma amino acids for younger Chinese children by reverse phase HPLC. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2011, 24, p. 733-738.
 10. **Long, G. L., Winefordner, J. D.** Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. *Analytical Chemistry.* 1983, 55, p. 712A-724A.
 11. **Szterk, A., Roszko, M.** Simultaneous determination of free amino acids, L-carnosine, purine, pyrimidine, and nucleosides in meat by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2014, 37, p. 664-680.
 12. **Cernei, N., Heger, Z., Gumulec, J. et al.** Sarcosine as a Potential Prostate Cancer Biomarker-A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, p. 13893-13908.
 13. **Elsberger, B., Lankston, L., McMillan, D. C. et al.** Presence of tumoural C-reactive protein correlates with progressive prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2011, 14, p. 122-128.
 14. **Chen, J., Zhang, J., Zhang, W. P. et al.** Sensitive determination of the potential biomarker sarcosine for prostate cancer by LC-MS with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide derivatization. *J. Sep. Sci.* 2014, 37, p. 14-19.
 15. **Sreekumar, A., Poisson, L. M., Rajendiran, T. M. et al.** Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 2009, 457, p. 910-914.
 16. **Jiang, Y.Q., Cheng, X. L., Wang, C. A. et al.** Quantitative Determination of Sarcosine and Related Compounds in Urinary Samples by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2010, 82, p. 9022-9027.
 17. **Sochor, J., Nejd, L., Ruttkay-Nedecky, B. et al.** Investigating the influence of taurine on thiol antioxidant status in Wistar rats with a multi-analytical approach. *J. Appl. Biomed.* 2014, 12, p. 97-110
 18. **Sinha, M., Manna, P., Sil, P. C.** Taurine protects the antioxidant defense system in the erythrocytes of cadmium treated mice. *BMB Rep.* 2008, 41, p. 657-663
 19. **Olive, M. F.** Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. *Amino Acids.* 2002, 23, p. 345-357
 20. **Marcinkiewicz, J., Kontny, E.** Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids.* 2014, 46, p. 7-20
 21. **Dawiskiba, T., Deja, S., Mulak, A. et al.** Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, p. 163-174
 22. **Goudarzi, M., Weber, W., Mak, T. D. et al.** Development of Urinary Biomarkers for Internal Exposure by Cesium-137 Using a Metabolomics Approach in Mice. *Radiat. Res.* 2014, 181, p. 54-64
 23. **Posada-Ayala, M., Zubiri, I., Martin-Lorenzo, M. et al.** Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014, 85, p. 103-111
- Práce byla finančně podpořena ze zdroje BR62400000. Autoři děkují Martině Staňkové za technickou asistenci.
- Do redakce došlo 22. 7. 2014

Adresa pro korespondenci:
 Prof. Ing. René Kizek, Ph.D.
 Ústav chemie a biochemie
 Mendelova univerzita v Brně
 Zemědělská 1
 CZ-613 00 Brno
 e-mail: kizek@sci.muni.cz