

## PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

### FOTOMETRICKÁ DETEKCE AMINOKYSELINY SARKOSINU ZA VYUŽITÍ JEHO HYDROLÝZY SARKOSIN OXIDASOU

MARTINA STAŇKOVÁ<sup>a</sup>, BRANISLAV RUTTKAY-NEDECKÝ<sup>b</sup>, MICHAELA DOČEKALOVÁ<sup>a</sup>, DAGMAR UHLÍŘOVÁ<sup>a</sup>, RADKA MIKELOVÁ<sup>a</sup>, BOŽENA HOSNEDLOVÁ<sup>d</sup>, JOSEF RŮŽIČKA<sup>a</sup> a RENÉ KIZEK<sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Oddělení výzkumu a vývoje, Prevention Medicals s.r.o., Tovární 342, 742 13 Studénka, Česká republika, <sup>b</sup> Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1, 612 42 Brno, Česká republika, <sup>c</sup> Department of Biomedical and Environmental Analyses, Faculty of Pharmacy with Division of Laboratory Medicine, Wrocław Medical University, 50-556 Borowska 211, Wrocław, Poland, <sup>d</sup> CONEM Metallomics Nanomedicine Research Group (CMNRG), Biology Park Brno, Studentská 812/6, 625 00 Brno, Česká republika  
kizek@sci.muni.cz

Došlo 16.10.18, přepracováno 22.5.19, přijato 23.5.19.

Klíčová slova: kolorimetrie, zhoubné nádory prostaty, fotometrická detekce, automatizovaná analýza, sarkosin oxidasa

### Úvod

Karcinom prostaty je nejčastěji se vyskytující zhoubné nádorové onemocnění mužů<sup>1–3</sup>. Podle statistik WHO je celosvětově každý rok diagnostikováno více než 1,1 milionu nových případů a evidováno asi 307 tisíc úmrtí mužů. V Evropě je každoročně zaznamenáno asi 190 tisíc nově diagnostikovaných případů a 80 tisíc zemřelých<sup>1</sup>. Výskyt karcinomu prostaty se geograficky výrazně liší a narůstá s věkem<sup>1</sup>. Pro rychlou diagnostiku jsou hledány vhodné nádorové markery<sup>4,5</sup>. Velmi slibným kandidátem je aminokyselina sarkosin (*N*-methylglycin)<sup>6,7</sup>, která je součástí metabolických drah glycinu, serinu a threoninu. Sarkosin může vznikat methylací glycinu působením enzymu glycin *N*-methyltransferasy (EC 2.1.1.20)<sup>8</sup>. V několika pracích bylo zjištěno, že množství sarkosinu v krvi se pohybuje v jednotkách  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (cit.<sup>9,10</sup>). V případě některých onemocnění jako je sarkosinémie a glutarová acidurie typu II se vyskytují zvýšené hodnoty sarkosinu v krvi a mo-

či<sup>10</sup>. Analyzované hodnoty sarkosinu se v těchto případech mohou pohybovat v desítkách až stovkách  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Uvedená biologická relevance sarkosinu je významná, a proto je důležité hledat vhodné techniky jeho rychlé a spolehlivé detekce. Pro detekci sarkosinu se využívá řada analytických technik: fotometrie, elektrochemie, hmotnostní detekce a kapalinová chromatografie<sup>11–16</sup>. Tyto techniky umožňují jeho citlivé a selektivní stanovení<sup>17,18</sup>. Enzymatické metody jsou velmi vhodné pro automatizované stanovení kreatininu, kyseliny močové, triacylglycerolu, cholesterolu, glukosy a případně dalších analytů využívajících Trinderovy reakce. Tato reakce je založena na použití vhodného barviva (jako je aminoantipyrin a další vhodné látky) v přítomnosti peroxidu a peroxidasy. Při reakci vzniká chinoniminové barvivo, které je stanoveno fotometricky<sup>19</sup>. Aminokyseliny jsou bezbarvé a jejich přímé fotometrické stanovení je obtížné. Možností stanovení aminokyselin jsou reakce s chromoforem za vzniku barevných komplexů<sup>20</sup>. Známou reakcí aminokyselin s ninhydrinem vzniká komplex červenofialového až modrofialového zbarvení<sup>21</sup>. Absorbance produktů se měří při 570 nm (cit.<sup>22–25</sup>). Kromě něho poskytuje barevnou reakci s aminokyselinami kyselina trinitrobenzensulfonová, kdy v alkalickém prostředí vznikají žluté produkty, u kterých se měří absorbance při vlnové délce 340 nm (cit.<sup>26–28</sup>). Těchto barevných reakcí lze ke stanovení jednotlivých aminokyselin využít pouze v případě, že je nejprve provedena separace. Využívá se separačních metod na bázi kapalinové chromatografie (papírová, tenkovrstvá, vysokotlaká). Cílem této práce bylo navrhnout vysoce senzitivní automatizovatelný fotometrický detekční systém bez nutnosti separace.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Použité chemikálie v analytické čistotě (ACS) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , KCl, NaCl, NaOH, HCl, 4-aminoantipyrin, Phenol BioXtra, sodná sůl 3-(*N*-ethyl-3-methyl-anilino)propansulfonové kyseliny, sarkosin, kreatinin, hovězí sérový albumin, enzymy (křenová peroxidasa, HRP, sarkosin oxidasa, SOX, z *Bacillus* sp.).

#### Materiál

Použité jednorázové plastové špičky a mikrozkušavky byly v kvalitě RNA a DNA free (Eppendorf, Německo). Jednorázové 1 cm UV-Vis kvety byly zakoupeny od firmy VWR (USA). Jednorázové kvety do BS-300 analyzátoru byly zakoupeny od firmy Mindray (Čína) a polystyrenové mikrotitrační destičky od společnosti Gama Group a.s. (Česká republika).

### Experimentální vzorky

Syntetická moč: chlorid sodný (170 mM), chlorid draselný (80 mM), fosforečnan sodný (39 mM), močovina (300 mM), kreatinin (18 mM), hovězí sérový albumin (750  $\mu\text{M}$ )<sup>29</sup>. Lidská moč (muž, zdravý dobrovolník) byla odebrána do sterilní odběrové zkumavky firmy VWR (USA). Od subjektu zařazeného do studie byl získán písemný informovaný souhlas o využití biologického vzorku (PM2018/02). Moč měla tyto parametry: hustota moči 1,0112 g cm<sup>-3</sup>, pH 7,1, vodivost 24 mS cm<sup>-1</sup>, barva: světle žlutá, bílkovina 0,06 mM, močovina 364,5 mM, kreatinin 10,1 mM, erytrocyty nebyly detegovány.

### Přístroje a pracovní postupy

Fotometrie: chemický analyzátor BS-300 firmy Min-dray (Čína). Spektrofotometrie: pro záznam UV-Vis spekter bylo využito jednopaprskového spektrofotometru UV/Vis UV-3100PC, VWR (USA) a Infinite M 200 PRO, firmy Tecan (Švýcarsko). Voda byla upravena systémem Aqual deionizátor Elga firmy Purlab Flex (USA). Hodnoty pH a vodivost byly měřeny multimetrem Phenomenal MU 6100L firmy VWR (USA). Hustota byla stanovena digitálním refraktometrem PA201 (MISCO, USA).

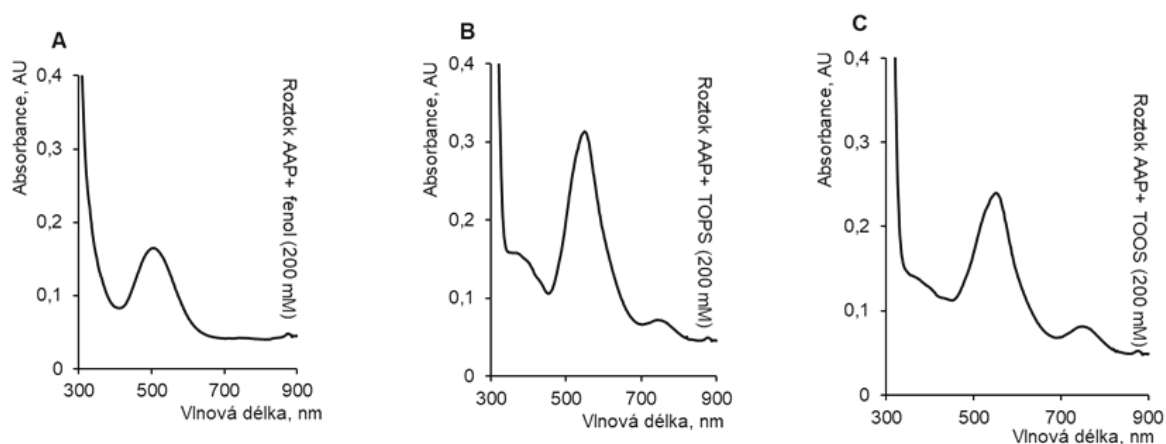
### Kontrola dat a statistická analýza

Všechna experimentální data byla evidována a ukládána do laboratorního informačního systému Qinslab<sup>30</sup>. Dostupná experimentální data byla zpracována a vyhodnocena matematicky a statisticky přímo v databázi Qinslab. Vyloučení extrémních hodnot u souborů dat bylo provedeno výpočtem v Grubbsově testu. Experimentální práce byla provedena minimálně ve třech nezávislých experimentech ( $n_1$ ). Každý vzorek v experimentech byl nejméně

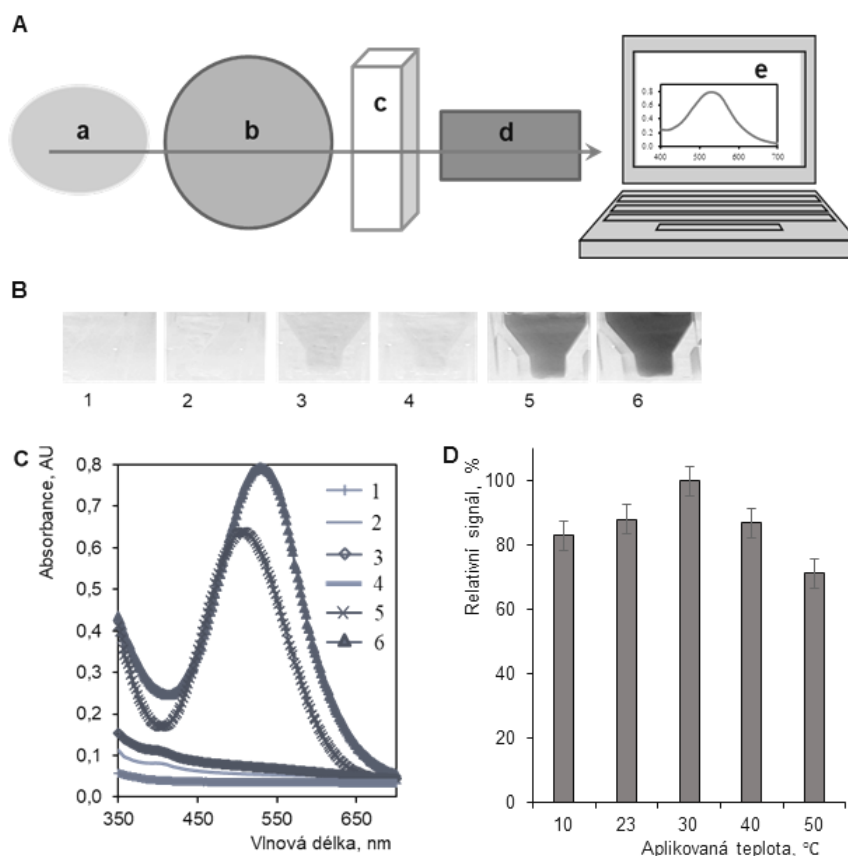
5krát analyzován ( $n_2$ ). Získaná data prezentovaná v této práci jsou uvedena jako průměrné hodnoty. Hodnoty *LOD* a *LOQ* byly určeny na hladině významnosti 95 % a zaokrouhleny<sup>31</sup>.

### Výsledky a diskuse

Nutnosti separace se lze vyhnout použitím specifické reakce, kterou může být reakce enzymatická<sup>20</sup>. Enzymatická reakce je cílená přímo na jednu specifickou aminokyselinu. Sarkosin oxidasa (EC 1.5.3.1) je specifický enzym, který oxiduje pouze aminokyselinu sarkosin za přítomnosti vody a kyslíku na glycin, za vzniku vedlejších produktů peroxidu vodíku a formaldehydu. Následně lze stanovit vzniklý peroxid vodíku za využití Trinderovy reakce<sup>3,32–34</sup>, kdy fenol reaguje s peroxidem vodíku a 4-aminoantipyrinem za katalýzy enzymem peroxidasou a vzniká 4-(*p*-benzochinon-monoimino)-fenazon detegovatelný spektrofotometricky při 510 nm (cit.<sup>3</sup>). V experimentu byl stanoven sarkosin enzymatickou metodou s použitím 4-aminoantipyrinu (4-AAP) a sodné soli 3-(*N*-ethyl-3-methylanilino)propansulfonové kyseliny (TOPS). Tuto modifikaci aplikoval Trinder při stanovení glukosy v lidské krvi<sup>34,35</sup>. Molekula sarkosinu se přemění na glycin za katalytického působení enzymu sarkosin oxidasy. Jako vedlejší produkt reakce vznikne peroxid vodíku, který následně reaguje s fenolem a činidlem. Produktem reakce je výrazně fialově zbarvený chinoniminový komplex (obr. 1 a 2) s absorpčním maximem při 546 nm. Pro ověření použitelnosti detekce sarkosinu za využití Trinderovy reakce bylo provedeno několik experimentů (obr. 1A, B, C). Získané výsledky ukazují, že v přítomnosti 4-AAP (3 mM) a TOPS (200 mM) je pozorovaný signál sarkosinu o více než 100 % vyšší než při reakci 4-AAP (3 mM) a fenolu (200 mM). Přídavek 4-AAP (3 mM) a TOOS –



Obr. 1. Trinderova reakce sarkosinu s různými činidly. Typické spektrum (A) 4-AAP (3 mM) a fenolu (200 mM); (B) 4-AAP (3 mM) a TOPS (200 mM), (C) 4-AAP (3 mM) a TOOS (200 mM), 0,2 M fosfátový pufr (pH 8,0). K jednotlivým činidlům byl přidán roztok sarkosinu (500  $\mu\text{M}$ ), 0,1 U HRP a 1 U SOX. VIS spektrum bylo měřeno po 30 minutách od počátku enzymové reakce. Další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Experimentální část

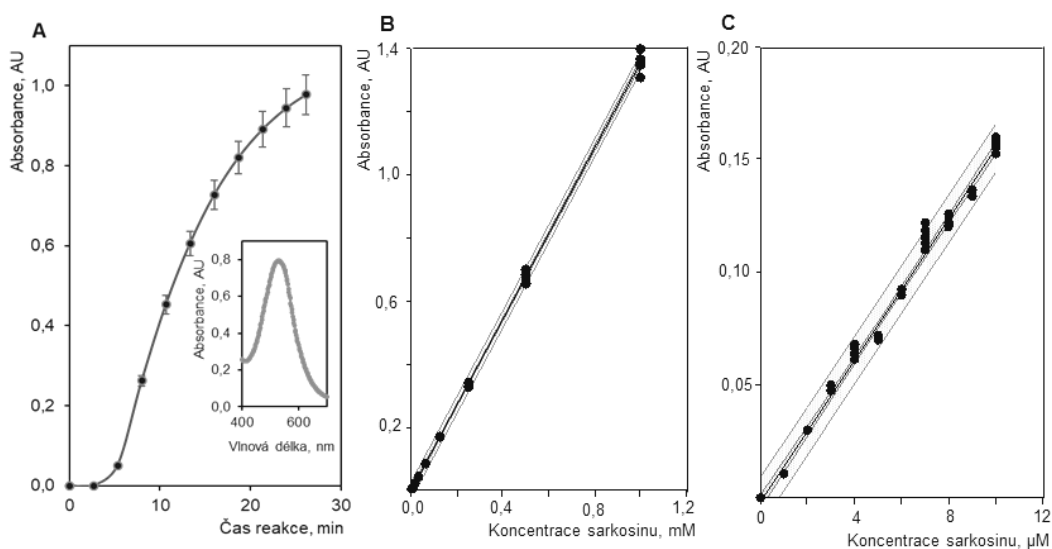


Obr. 2. **Možnosti automatizovaného fotometrického stanovení sarkosinu.** (A) Schéma automatického fotometrického analyzátoru: (a) část na vzorky, objem dávkovaného vzorku: 3–45  $\mu\text{l}$ , krok po 0,5  $\mu\text{l}$ ; (b) část obsahující reakční činidla, objem dávkovaných činidel: R1, R2, krok po 1,0  $\mu\text{l}$ ; (c) kyveta sloužící ke smísení vzorků a činidel, 5 mm optická dráha, objem 400  $\mu\text{l}$ ; (d) fotometrický detektor; (e) počítač s řídicím programem. Analyzované reakční směsi: 1 – 0,2 M fosfátový pufr (pH 8,0); 2 – roztok sarkosinu (500  $\mu\text{M}$ ) ve vodě; 3 – 0,2 M fosfátový pufr (pH 8,0) a fenol (200 mM); 4 – 0,2 M fosfátový pufr (pH 8,0) a TOPS (200 mM); 5 – 0,2 M fosfátový pufr (pH 8,0), 4-AAP (3 mM) a 200 mM fenol; 6 – 0,2 M fosfátový pufr (pH 8,0), TOPS (200 mM), 4-AAP (3 mM) a fenol (200 mM); (B) fotografie kyvet s reakční směsí: 1, 2, 3, 4, 5 a 6; (C) Vis spektrum analyzovaných reakčních směsí. (D) teplotní závislost probíhající enzymové reakce. Všechny výsledky byly vyhodnoceny po 30 min od počátku enzymové reakce, pokud není uvedeno jinak. Další podrobnosti jsou uvedeny na obr. 3 a v sekci Experimentální část

sodná sůl *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylanilin) – (200 mM) zvýšil sledovaný signál o více než 50 % než byl signál pozorovaný pouze v přítomnosti fenolu. Na základě těchto experimentálních výsledků byl pro stanovení sarkosinu zvolen reakční roztok obsahující 4-AAP a TOPS.

V dalších experimentech byl navržený postup detekce sarkosinu optimalizován pro automatický chemický analyzátor. Automatizovaný systém je schematicky znázorněn na obr. 2A. Vzorky i činidla byly odebrány dávkovací jehlou a přepraveny do kyvety, kde dochází ke smísení reakční směsi (obr. 2B). Před vlastním převedením metodiky na automatickou analýzu byly nejdříve testovány reakce SOX v různých prostředích. Ve sledované viditelné oblasti vlnových délek (350–800 nm) neposkytoval fosfátový pufr, sarkosin (500  $\mu\text{M}$ ), TOPS (200 mM) ani sub-

strát (fenol s enzymy: peroxidasa, sarkosin oxidasa) žádný signál. V případě, že byla připravena kompletní reakční směs, byly získány velmi dobré odezvy. Na obr. 2C, křivka 5, je v reakční směsi 4-AAP (3 mM) a fenol (200 mM) a na obr. 2C, křivka 6, je do reakční směsi přidán TOPS (200 mM). Přídavek TOPS do reakční směsi zlepšil sledovaný signál asi o 25 %. Absorpční maximum se mírně posunulo do červené oblasti (obr. 2C). Sarkosin (v rozmezí koncentrací 1–1000  $\mu\text{M}$ ) byl stanoven v prostředí fosfátového pufru o pH 8,0 (obr. 3). Reakční kinetická křivka je ukázána na obr. 3. Do obr. 3A je vloženo typické spektrum produktů reakce s maximem při 546 nm. Závislosti naměřených absorbancí při vlnové délce 546 nm na koncentraci sarkosinu jsou ukázány na obr. 3A a 3B a 3C. Parametry lineárních regresních rovnic pro stanovení sarkosinu v prostředí fosfátového pufru jsou uvedeny v tab. I. Získa-



Obr. 3. Stanovení sarkosinu v pufovaném prostředí. (A) typická závislost absorbance chinoniminového komplexu na čase v průběhu enzymatické reakce a vložené Vis spektrum v 15. minutě. Závislost absorbance vytvořeného chinoniminového komplexu na koncentraci sarkosinu v rozsahu 0–1000  $\mu\text{M}$  (B) a 0–10  $\mu\text{M}$  (C). Reakce probíhala v 0,2 M fosfátovém pufru (pH 8,0) za využití enzymatické reakční směsi v automatizovaném fotometrickém systému. Další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Experimentální část

Tabulka I

Parametry lineárních regresních rovnic pro stanovení sarkosinu v prostředí fosfátového pufru (0,2 M, pH 8,0). Reakční čas 30 min, další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Experimentální část

Prostředí	Rozsah koncentrací [ $\mu\text{M}$ ]	Rovnice	$LOQ$ [ $\mu\text{M}$ ]	$LOD$ [ $\mu\text{M}$ ]	$r$	$RSD$ [%]
Fosfátový pufr	0–1000	$y = 10,39x + 7,84$	21	6	0,9999	3,2
Fosfátový pufr	0–10	$y = 11,03x + 4,83$	7	2	0,9988	6,2

Počet opakování:  $n_1 = 3$  a  $n_2 = 5$ ,  $LOD$  a  $LOQ$  na hladině významnosti 95 %

né závislosti v koncentračním rozsahu (0–10  $\mu\text{M}$ ) byly striktně lineární ( $r \geq 0,99$ ) s vypočteným limitem detekce ( $LOD$ ) 2  $\mu\text{M}$  a limitem kvantifikace ( $LOQ$ ) 7  $\mu\text{M}$ . Pro sledování případných interakcí s maticí bylo provedeno stanovení sarkosinu v syntetické moči (obr. 4). Na obr. 4A

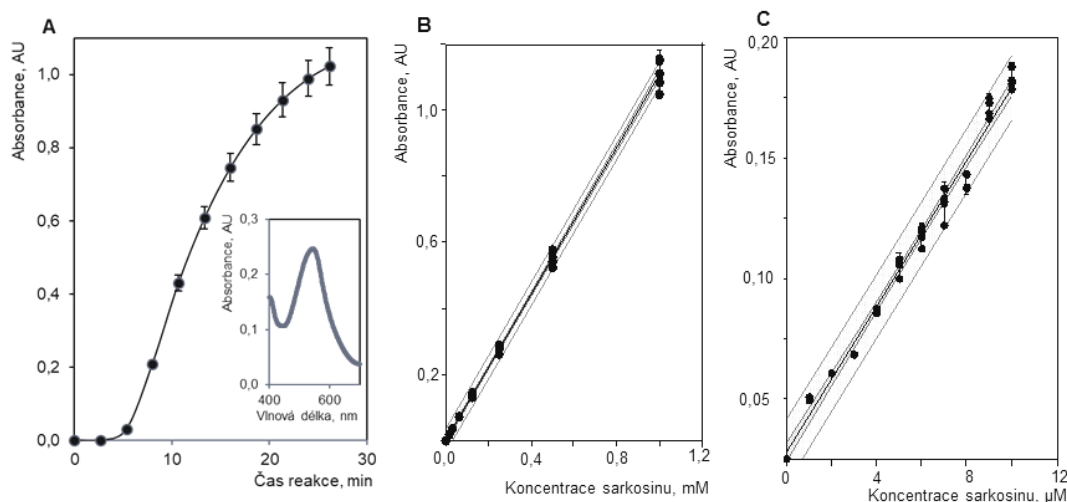
je závislost absorbance na čase odrážející kinetiku příslušné reakce – strmý růst koncentrace produktu a zpomalení reakce a posléze až její zastavení při vytvoření rovnováhy substrát-produkt. Do obr. 4A je vloženo typické spektrum s maximem při 546 nm. Závislost naměřených absorbancí

Tabulka II

Parametry lineárních regresních rovnic pro stanovení sarkosinu v prostředí syntetické moči. Reakční čas 30 minut, další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Experimentální část

Prostředí	Rozsah koncentrací [ $\mu\text{M}$ ]	Rovnice	$LOQ$ [ $\mu\text{M}$ ]	$LOD$ [ $\mu\text{M}$ ]	$r$	$RSD$ [%]
Artifiální moč	0–1000	$y = 10,24x - 28,53$	21	6	0,9999	2,3
Artifiální moč	0–10	$y = 15,79x + 1,70$	5	1	0,9970	6,6

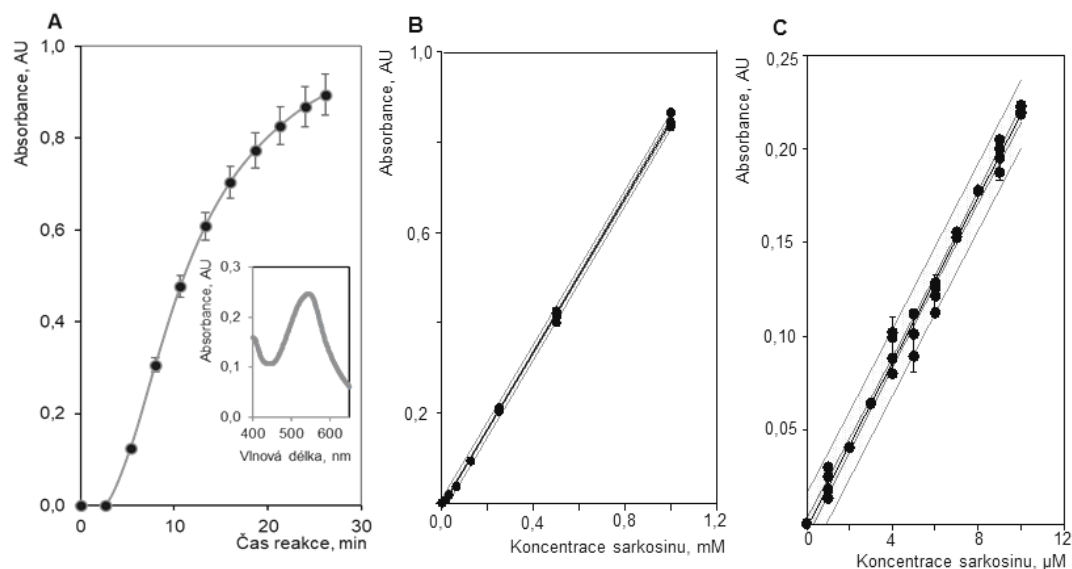
Počet opakování:  $n_1 = 3$  a  $n_2 = 5$ ,  $LOD$  a  $LOQ$  na hladině významnosti 95 %



Obr. 4. Stanovení sarkosinu v prostředí syntetické moči. (A) typická závislost absorbance chinoniminového komplexu v průběhu enzymatické reakce na čas a vložené Vis spektrum v 15. minutě. Závislost absorbance vzniklého chinoniminového komplexu na koncentraci sarkosinu v rozsahu 0–1000  $\mu\text{M}$  (B) a 0–10  $\mu\text{M}$  (C). Reakce probíhala v 0,2 M fosfátovém pufru (pH 8,0) za využití enzymatické reakční směsi v automatizovaném fotometrickém systému. Další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Experimentální část

při vlnové délce 546 nm na koncentraci sarkosinu je na obr. 4B. Parametry lineárních regresních rovnic pro stanovení sarkosinu v prostředí syntetické moči jsou uvedeny v tab. II. Získané závislosti v koncentračním rozsahu (0 až 10  $\mu\text{M}$ ) byly striktně lineární ( $r \geq 0,99$ ) s vypočteným  $LOD$  1  $\mu\text{M}$  a  $LOQ$  5  $\mu\text{M}$ . Vypočtené hodnoty  $LOD$  a  $LOQ$  jsou podobné jako při stanovení v pufovaném prostředí

(tab. I). Výsledky naznačují, že přítomné složky umělé moči neovlivňují stanovení sarkosinu. Jako reálný vzorek byla použita lidská moč (vybrané analyzované parametry jsou uvedeny v sekci Experimentální část). Stanovení sarkosinu prováděné v prostředí reálné lidské moči dokumentuje obr. 5. Sarkosin v požadovaných koncentracích byl do moči přidán před provedením reakce. Závislost absorbance



Obr. 5. Stanovení sarkosinu v prostředí reálné moči. (A) typická závislost absorbance chinoniminového komplexu v průběhu enzymatické reakce na čas a vložené VIS spektrum v 15. minutě. Závislost absorbance vytvořeného chinoniminového komplexu na koncentraci sarkosinu v rozsahu 0–1000  $\mu\text{M}$  (B) a 0–10  $\mu\text{M}$  (C). Reakce probíhala v 0,2 M fosfátovém pufru (pH 8,0) za využití enzymatické reakční směsi v automatizovaném fotometrickém systému. Další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Experimentální část

Tabulka III

Parametry lineárních regresních rovnic pro stanovení sarkosinu v prostředí modelové reálné moči. Reakční čas 30 minut, další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Experimentální část

Prostředí	Rozsah koncentrací [ $\mu\text{M}$ ]	Rovnice	$LOQ$ [ $\mu\text{M}$ ]	$LOD$ [ $\mu\text{M}$ ]	$r$	$RSD$ [%]
Reálná moč	0–1000	$y = 17,84x - 4,19$	26	8	0,9999	2,5
Reálná moč	0–60	$y = 14,48x - 0,01$	19	6	0,9967	4,9

Počet opakování:  $n_1 = 3$  a  $n_2 = 5$ ,  $LOD$  a  $LOQ$  na hladině významnosti 95 %

na čase (obr. 5A) je v porovnání s pufovaným prostředím a umělou močí méně strmá. Koncentrace produktu nejprve stoupá strmě a po dvacáté minutě dochází ke zpomalování reakce. Závislost absorbance při vlnové délce 546 nm na koncentraci sarkosinu byla lineární v rozsahu 0–1000  $\mu\text{M}$  (obr. 5B), a také při nižších koncentracích v rozsahu 0 až 10  $\mu\text{M}$  (obr. 5C). Parametry lineárních regresních rovnic pro stanovení sarkosinu v prostředí modelové reálné moči jsou uvedeny v tab. III. Získané závislosti v koncentračním rozsahu (0–10  $\mu\text{M}$ ) byly striktně lineární ( $r \geq 0,99$ ) s vypočteným  $LOD$  6  $\mu\text{M}$  a  $LOQ$  19  $\mu\text{M}$ . Získané výsledky ukazují na vliv interferentů přítomných ve vzorku moči, který vede ke zvýšení  $LOD$  a  $LOQ$ . Podobných výsledků ve vzorku moči bylo dosaženo i v práci Yamkamon a spol.<sup>20</sup>

## Závěr

V předložené práci byla navržena originální, doposud nepopsaná metodika pro stanovení aminokyseliny sarkosin za využití Trinderovy reakce. Závislost absorbance při vlnové délce 546 nm na koncentraci sarkosinu je lineární v celkovém rozsahu 0–1000  $\mu\text{M}$  ( $r \geq 0,99$ ) s  $LOD$  6  $\mu\text{M}$  a  $LOQ$  20  $\mu\text{M}$ . Navrženým postupem je možné určit obsah sarkosinu ve vzorku moči.

*Experimentální práce byla financována projektem SARKO TEST 165/2015. Autoři děkují mezinárodnímu konsorciu The European Technology Platform for Nanomedicine. Experimenty pro charakterizace materiálů byly provedeny v laboratoři Laboratory of Elemental Analysis and Structural Research, Faculty of Pharmacy with Division of Laboratory Medicine, Wrocław Medical University. Autoři práce děkují společnosti MEDESA za technickou pomoc s chemickým analyzátořem při provádění experimentů.*

## LITERATURA

1. Barbieri C. E., Chinnaiyan A. M., Lerner S. P., Swanton C., Rubin M. A.: *Eur Urol.* 71, 237 (2017).
2. Altwajjry N., Somani S., Dufes C.: *Int. J. Nanomed.* 13, 5753 (2018).
3. Trinder P.: *J. Clin. Pathol.* 22 (1969).
4. Sawyers C. L.: *Nature* 452, 548 (2008).
5. Gil J., Ramirez-Torres A., Encarnacion-Guevara S.: *J. Proteomics.* 150, 297 (2017).
6. Sreekumar A. a 25 spoluautorů: *Nature* 457, 910 (2009).
7. Cernei N., Heger Z., Gumulec J., Zitka O., Masarik M., Babula P., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R., Adam V.: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 13893 (2013).
8. Kanehisa M., Goto S.: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.* <https://www.genome.jp/kegg/kegg1.html>, staženo 29.8.2019.
9. Gkotsos G., Virgiliou C., Lagoudaki I., Sardeli C., Raikos N., Theodoridis G., Dimitriadis G.: *Metabolites* 7, 14 (2017).
10. Lee S. Y., Chan K. Y., Chan A. Y. W., Lai C. K.: *Annal. Acad. Med. Singapore.* 35, 582 (2006).
11. Cernei N., Zitka O., Ryvolova M., Adam V., Masarik M., Hubalek J., Kizek R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 4286 (2012).
12. Huang Y., Huang X. B., Huang L. P., Liu Q. C., Lei Y., Yang L. J., Huang L. Y.: *J. Sep. Sci.* 41, 3121 (2018).
13. Narwal V., Kumar P., Joon P., Pundir C. S.: *Enzyme Microb. Technol.* 113, 44 (2018).
14. Kumar P., Jaiwal R., Pundir C. S.: *Anal. Biochem.* 537, 41 (2017).
15. Josypcuk O., Berek J., Josypcuk B.: *Electroanalysis* 27, 2559 (2015).
16. Gonzalez-Solino C., Di Lorenzo M.: *Biosensors-Basel.* 8, 18 (2018).
17. Samanta S. a 14 spoluautorů: *Sci. Rep.* 7, 12 (2017).
18. Berthias F., Maatoug B., Glish G. L., Moussa F., Maitre P.: *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 29, 752 (2018).
19. Jia J., Liu G., Li S., Li J., Mao X., Yu C., Zhang M., Zhou J., Zhu J.: *Patent* CN102662013-A CN10154590. 7 (2012).
20. Yamkamon V., Phakdee B., Yainoy S., Suksrichawalit T., Tatanandana T., Sangkum P., Eiamphungporn W.: *EXCLI Journal* 17, 467 (2018).
21. Cernei N., Heger Z., Kopel P., Skladanka J., Zitka O., Adam V., Kizek R.: *Chromatographia* 77, 1451 (2014).
22. Yemm E. W., Cocking E. C., Ricketts R. E.: *Analyst* 80, 209 (1955).

23. Cessil C., Piliago F.: *Biochem. J.* 77 (1960).
24. Dent C. E.: *Biochem. J.* 43, 169 (1947).
25. Gaitonde M. K.: *Biochem. J.* 104, 627 (1967).
26. Habeeb A. F.: *Anal. Biochem.* 14, 328 (1966).
27. Mokrasch L. C.: *Anal. Biochem.* 18, 64 (1967).
28. Adler-Nissen J.: *J. Agr. Food Chem.* 27, 1256 (1979).
29. Chutipongtanate S., Thongboonkerd V.: *Anal. Biochem.* 402, 110 (2010).
30. Ruzicka J., Matousek M., Zitka O., Adam V., Kizek R.: *Užitný vzor.* 26797, 2013 (2013).
31. Hubaux A., Vos G.: *Anal. Chem.* 42, 849 (1970).
32. Jones P. F., Johnson K. E.: *Canad. J. Chem.* 51, 2860 (1973).
33. Vecera M.: *Detection and Identification of Organic Compounds*; 1. vyd., Springer, Boston 1971.
34. Wiewiorka O., Dastych M., Čermáková Z.: *Chem. Listy* 111, 186 (2017).
35. Barham D., Trinder P.: *Analyst* 97, 142 (1972).

**M. Staňková<sup>a</sup>, B. Ruttkay-Nedecký<sup>b</sup>, M. Dočekalová<sup>a</sup>, D. Uhlířová<sup>a</sup>, R. Mikelová<sup>a</sup>, B. Hosnedlová<sup>d</sup>, J. Růžicka<sup>a</sup>, and R. Kizek<sup>a,b,d</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Research and Development, Prevention Medicals s.r.o., Studénka, Czech Republic*, <sup>b</sup> *Department of Human Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic*, <sup>c</sup> *Department of Biomedical and Environmental Analyses, Faculty of Pharmacy with Division of Laboratory Medicine, Wrocław Medical University, Poland*, <sup>d</sup> *CONEM Metallomics Nanomedicine Research Group (CMNRG), Biology Park Brno, Czech Republic*): **Spectrophotometric Detection of the Amino Acid Sarcosine Using its Hydrolysis by Sarcosine Oxidase**

Prostate cancer is the most common malignant tumor in men, whose incidence significantly differs geographically and increases with age. For rapid diagnostics, new tumor markers with higher prognostic relevance are still being sought. A very promising candidate molecule is the amino acid sarcosine. The aim of this work was to design a highly sensitive photometric detection system for the sarcosine determination. An original, yet unpublished, methodology for determining the amino acid sarcosine using Trinder's reaction has been proposed. Absorbance dependence on sarcosine concentration at 546 nm is linear over a total range of 0–1000  $\mu\text{M}$  ( $r \geq 0.99$ ) with limit of detection (LOD) of 6  $\mu\text{M}$  and limit of quantification (LOQ) of 20  $\mu\text{M}$ . The suggested procedure allows to analyze the content of sarcosine in real urine specimens at micromolar concentrations.

**Keywords:** sarcosine, prostate cancer, photometric detection, automated analysis, sarcosine oxidase

#### *Acknowledgments*

*The experimental work was funded by SARKO\_TEST 165/2015. The authors thank the international consortium The European Technology Platform for Nanomedicine. Experiments for material characterization were performed in the Laboratory of Elemental Analysis and Structural Research, Faculty of Pharmacy with Division of Laboratory Medicine, Wrocław Medical University. The authors thank the company MEDESA for the technical assistance with the chemical analyzer in carrying out the experiments.*