

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ HOMO VANILOVÉ, VANILMANDLOVÉ A 5-HYDROXY-3-INDOLOCTOVÉ KYSELINY JAKO BIOMARKERŮ NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

ANNA MAKRLÍKOVÁ^{a,b}, JIŘÍ BAREK^a,
VLASTIMIL VYSKOČIL^a a TOMÁŠ NAVRÁTIL^b

^a Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2,

^b Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., Dolejškova 2155/3, 182 23 Praha 8
anna.makrlikova@natur.cuni.cz

Došlo 21.12.17, přepracováno 17.5.18, přijato 22.5.18.

Klíčová slova: homovanilová kyselina, vanilmandlová kyselina, 5-hydroxy-3-indolactová kyselina, nádorové biomarkery, voltametrie, ampérometrie, HPLC s elektrochemickou detekcí

Obsah

1. Úvod
2. Elektrochemická oxidace studovaných biomarkerů
3. Voltametrické stanovení studovaných biomarkerů
4. HPLC stanovení studovaných biomarkerů s elektrochemickou detekcí
5. Další elektrochemické metody
6. Závěr

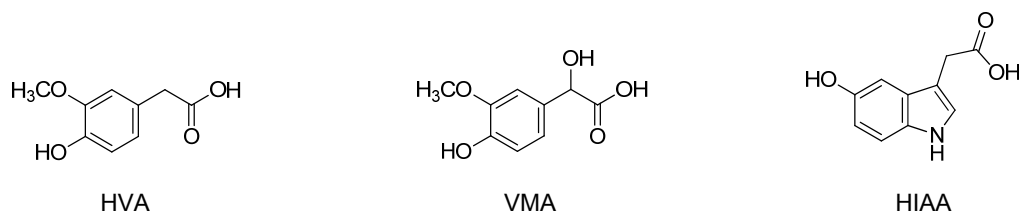
1. Úvod

Homovanilová kyselina (HVA, 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctová kyselina, CAS No 306-08-1) a vanilmandlová kyselina (VMA, 4-hydroxy-3-methoxymandlová kyselina, CAS No 55-10-7) jsou konečným produktem metabolismu katecholaminů^{1–3}. 5-Hydroxyindol-3-octová kyselina (HIAA, CAS No 54-16-0) je produktem metabolismu neurotransmiteru serotoninu⁴. Zvýšená koncentrace HVA, VMA a HIAA v moči⁵ a v krevní plasmě² může indikovat

některá onemocnění. Koncentrace HVA a VMA v tělních tekutinách je zvýšená především u nádorů typu neuroblastomu^{6,7}, feochromocytomu^{8,9} a karcinoidu^{9,10}. Kromě zmíněných nádorů mohou HVA, VMA a HIAA sloužit k predikci schizofrenie¹¹, Parkinsonovy nemoci¹², autismu¹³ a Touretteova syndromu¹⁴. Rovněž mohou signalizovat deprese¹⁵, posttraumatické stresové poruchy¹⁶ a sebevražedné chování u pacientů¹⁷. Poměr koncentrací HVA/VMA v moči novorozenců může sloužit pro včasnou diagnosu Menkesovy nemoci¹⁸. Normální koncentrace výše zmíněných organických kyselin v moči jsou 8,2–41,0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA, 11,6–28,7 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA a 17,8–58,3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro HIAA¹⁹, resp. 1,3–7,6 mg l^{-1} pro všechny tyto biomarkery²⁰.

Pro stanovení výše zmíněných biomarkerů (obr. 1) je zapotřebí citlivých a selektivních analytických technik²¹ vzhledem k jejich podobným strukturám a nízkým koncentracím v biologických tekutinách. Nejčastěji se používá HPLC s elektrochemickou detekcí (ED)^{3,22–25}, např. ampérometrickou²⁶ nebo coulometrickou²⁷, či s mimořádně citlivou fluorescenční detekcí (FD)^{28–30}. Avšak přímá fluorescenční kvantifikace katecholaminů a jejich metabolitů v reálných vzorcích je obtížně proveditelná kvůli krátkým emisním a excitačním vlnovým dĺlkám, a proto se často používá jejich derivatizace^{1,21}. Ještě citlivější a selektivnější je chemiluminiscenční detekce (CHLD)³¹ a nejcitlivější a nejselektivnější je detekce hmotnostní spektrometrií (MS)^{7,32–35}. Dalšími možnými metodami pro stanovení HVA, VMA a HIAA jsou plynová chromatografie (GC)^{36,37}, tenkovrstvá chromatografie³⁸, vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC)³⁹, imunochemické metody^{40–42} a spektrofotometrie^{8,43}. Z elektromigračních metod je vhodná kapilární elektroforéza (CZE)^{19,44} často spojená s ampérometrickou detekcí^{44,45}, micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)^{20,46} a izotachoforéza⁴⁷.

Před samotným stanovením jsou vzorky často upravovány, nejčastěji kapalinovou extrakcí^{1,9} umožňující potřebnou předběžnou separaci a prekoncentraci. Někdy lze vzorek pouze přefiltrovat a injektovat do kolony^{3,34}. Popsána je i extrakce HVA a HIAA tuhou fází na bázi dutého vlákna vodivého polypyrrolu⁴⁸.



Obr. 1. Strukturální vzorce HVA, VMA a HIAA

Výše uvedené separační a spektrometrické metody jsou však zpravidla finančně, instrumentálně i časově náročné. Proto je v poslední době věnována pozornost i využití moderních elektroanalytických metod, které jsou v řadě případů dostatečně citlivé i selektivní a přitom jsou rychlejší, jednodušší a levnější z hlediska pořizovacích i provozních nákladů. Navíc jsou snadno miniaturizovatelné a tudíž kompatibilní s přístupem označovaným jako „point-of-care analysis“, kterému je dnes věnována zvýšená pozornost. Proto je následující přehled věnován právě využití moderních elektroanalytických metod v této oblasti, přičemž pozornost je zaměřena na nejčastěji používané voltametrické a ampérometrické metody.

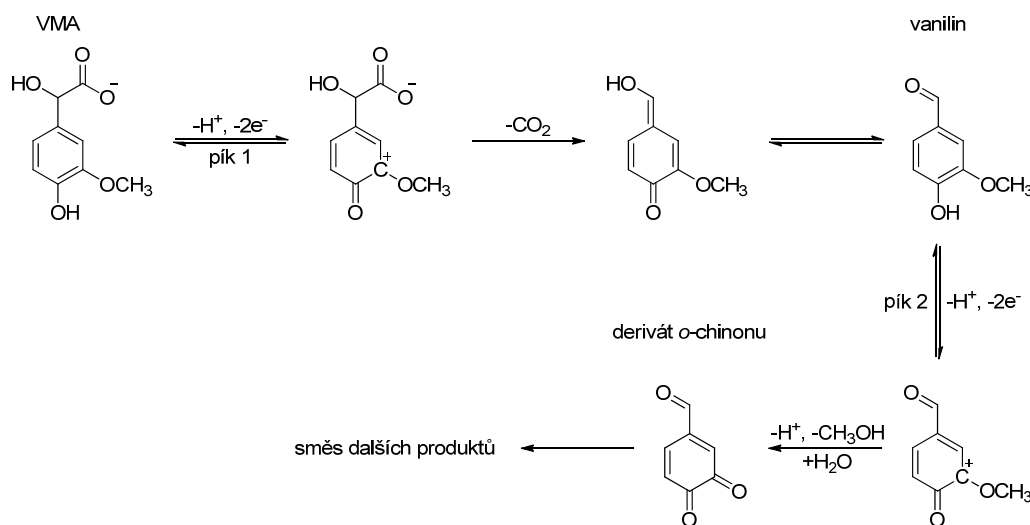
2. Elektrochemická oxidace studovaných biomarkerů

Díky $-OH$ skupině na aromatickém systému jsou uvedené biomarkery elektrochemicky aktivní a lze je relativně snadno oxidovat na nejrůznějších pevných elektrodách (viz tab. I)⁴⁹. Navzdory strukturální podobnosti HVA a VMA vykazují odlišné chování např. při voltametrii na hranami orientované (edge-plane pyrolytic graphite electrode, EPPGE) či na základní rovinou orientované (basal-plane pyrolytic graphite electrode, BPPGE) pyrolytické grafitové elektrodě nebo na elektrodě ze skelného

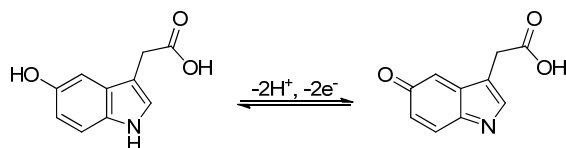
uhlíku (GCE). VMA je zde oxidována v prvním kroku na radikál-kation za výměny dvou elektronů (první pík při diferenční pulsní voltametrii (DPV)). Ten je následně dekarboxylován na vanilin, který je dále oxidován za výměny dalších dvou elektronů na odpovídající *o*-chinon (druhý pík při DPV) podléhající další elektrochemické oxidaci za vzniku směsi různých produktů (viz obr. 2).

Naproti tomu HVA poskytuje jediný DPV pík při potenciálu odpovídajícímu prvnímu píku VMA. To je vysvětlováno podstatně nižší rychlostí dekarboxylace a re-aromatizace vedoucí ke vzniku vanilinu poskytujícího druhý pík^{16,49}. Při ireverzibilní elektrochemické oxidaci HVA na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) dochází ke vzniku 4-aceto-*o*-chinonu, který tvoří reverzibilní redoxní systém s 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinou⁵⁵. Výskyt tří píků na voltamogramu u HIAA na některých elektrodo- vých materiálech může být spojen s odlišným mechanismem elektrochemické oxidace vedoucí k chinonimimové struktuře, ve které C=O vazba (vzniklá z $-OH$ skupiny na benzenovém jádře) je konjugována s C=N vazbou vzniklou v heterocyklické části molekuly⁵⁰ (viz obr. 3). Podle práce⁵² je celkový mechanismus značně složitý a jednotlivé píky odpovídají vesměs ireverzibilním krokům s přenosem jednoho elektronu a jednoho protonu ať už výchozí látky či složité směsi vzniklých meziproductů.

Poloha i výška píků diskutovaných biomarkerů při nejčastěji používané DPV závisí na pH, složení základního



Obr. 2. Elektrochemická oxidace VMA (cit.⁴⁹)



Obr. 3. Elektrochemická oxidace HIAA (cit.⁵⁰)

Tabulka I
Přehled voltametrických metod stanovení HVA, VMA a HIAA

Elektroda	Technika	Analyt	Prostředí	Vzorek	Úprava vzorku	LOD [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
EPPGE ^a MWCNT-SPE ^b	DPV	VMA	fosfátový pufr (pH 6,85)	–	–	1,7 1	49
SPCE ^c	DPV	HVA, VMA, HIAA	BR pufr (0,04 mol l ⁻¹ , pH 3,0)	–	–	0,24 (HVA) 0,06 (VMA) 0,12 (HIAA)	51
OGCE ^d	SWV	HIAA	acetátový pufr (0,2 mol l ⁻¹ , pH 2)	–	–	0,92	52
GCE ^e	CV	HIAA	fosfátový pufr (0,025 mol l ⁻¹ , pH 2)	žaludeční šťáva	centrifugace, deproteinizace	0,08	53
CFE ^f	DPV	HVA, VMA	BR pufr (0,04 mol l ⁻¹ , pH 2,0)	–	–	0,09 (HVA) 0,24 (VMA)	54
CPE ^g (modifikovaná lipidem)	CV	HVA	fosfátový pufr (pH 7,4)	extra- celulární mozková tekutina	ředění základním elektrolytem	3	55
CPE (modifikovaná kationtovými tenzidy)	CV	HVA, VMA	fosfátový pufr (0,1 mol l ⁻¹ , pH 7,5)	–	–	neuveden	56
GCE (film Alizarinové červeně S)	DPV	HVA	fosfátový pufr (0,1 mol l ⁻¹ , pH 3,0)	lidská krevní plazma	naředění	17	57
GCE (film 3-amino-5- -merkpto-1,2,4- -triazolu)	DPV	HVA	fosfátový pufr (0,2 mol l ⁻¹ , pH 7,2)	lidská krevní plazma	ředění základním elektrolytem	$9,4 \cdot 10^{-5}$	16
SPCE (modifikovaná nanočásticemi zlata)	SWV	HIAA	fosfátový pufr (pH 7,2)	lidská krevní plazma	naředění	0,022	59
GCE (modifikovaná mědí)	DPV	HVA	fosfátový pufr (0,1 mol l ⁻¹ , pH 7,2)	–	–	0,01	60
GCE s polymerním filmem (MIP ^h)	DPV	HVA	citrátový/HCl pufr (0,1 mol l ⁻¹ , pH 1,1) se 40% acetonitrilem)	–	–	0,007	61
GCE s polymerním filmem (MIP)	DPV	VMA	citrátový pufr (0,025 mol l ⁻¹ , pH 3,0)	–	–	96	62
BDDE ⁱ	DPV	HVA, VMA	fosfátový pufr (0,1 mol l ⁻¹ , pH 3,0)	–	–	0,57 (HVA) 0,41 (VMA)	64
CPE	DPV	HVA, VMA	BR pufr (0,04 mol l ⁻¹ , pH 2,0)	–	–	0,38 (HVA) 0,25 (VMA)	65

Tabulka I
pokračování

Elektroda	Technika	Analyt	Prostředí	Vzorek	Úprava vzorku	LOD [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
CPE	DPV	HVA	BR pufr (pH 2)	–	–	0,4	67
CCE ^j		VMA		–	–	5,02 (první pík) 0,92 (druhý pík)	
SPCE	DPV	HVA, VMA	BR pufr (0,04 mol l ⁻¹ , pH 3)	–	–	0,24 (HVA) 0,06 (VMA)	68
Pt elektroda	DPV	HVA, VMA	BR pufr (pH 3)	–	–	neuveđen	69

^a EPPGE – hranami orientovaná pyrolytická grafitová elektroda (edge-plane pyrolytic graphite electrode), ^b MWCNT-SPE – vícestěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (multiwalled carbon nanotubes) modifikovaná síťotisková elektroda (screen-printed electrode), ^c SPCE – síťotisková uhlíková elektroda (screen-printed carbon electrode), ^d OGCE – elektroda z oxidovaného skelného uhlíku (oxidized glassy carbon electrode), ^e GCE – elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode), ^f CFE – uhlíková filmová elektroda (carbon film electrode), ^g CPE – uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode), ^h MIP – molekulárně vtištěný polymer (molecular imprinted polymer), ⁱ BDDE – borem dopovaná diamantová elektroda, ^j CCE – uhlíková kompozitní elektroda (carbon composite electrode)

elektrolytu i na použitém elektrodo­vém materiálu a pohybuje se v širokém rozmezí od +1,2 V v případě VMA či +0,9 V v případě HVA na anodicky oxidované borem dopované diamantové elektrodě (BDDE) až po +0,6 V v případě VMA či +0,3 V v případě HVA na GCE. HIAA je pak ve většině případů oxidována při nižších potenciálech než VMA či HVA. Za určitých podmínek lze tedy získat dostatečně oddělené signály těchto analytů umožňující jejich simultánní stanovení i na nemodifikovaných elektrodách. Hledání těchto podmínek a případné aplikace voltametrických metod na reálné vzorky je předmětem většiny dále diskutovaných prací.

3. Voltametrické stanovení studovaných biomarkerů

K těmto účelům lze využít řadu nemodifikovaných i různým způsobem modifikovaných elektrod. Příkladem využití nemodifikovaných elektrod je stanovení HVA, VMA a HIAA na síťotiskových uhlíkových elektrodách (SPCE, screen-printed carbon electrode) pomocí DPV (cit.⁵¹) s LOD 0,24 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (HVA), 0,06 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (VMA) a 0,12 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (HIAA). Uvedenou metodou je možné stanovit každou kyselinu zvlášť, HVA a VMA i simultánně ve směsi. Square wave voltametrie (SWV, voltametrie čtvercových vln) na GCE při stanovení HIAA poskytuje LOD 0,9 $\mu\text{mol l}^{-1}$ i za přítomnosti některých interferentů, přičemž značná pozornost byla věnována i mechanismu elektrodo­vého děje⁵². Cyklická voltametrie (CV) na GCE byla použita i ke stanovení HIAA v lidské žaludeční šťávě⁵³ s LOD 80 nmol l^{-1} . Simultánní stanovení HVA a VMA pomocí DPV na kompozitní uhlíkové elektrodě⁵⁴ poskytlo LOD 0,3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a 0,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (1. pík

a 1,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (2. pík) pro VMA. CV na nemodifikované CPE byla použita ke sledování HVA v mozkové extracelulární tekutině. Při rychlosti skenování 0,2 V s⁻¹ a vhodné zvolených podmínkách umožňuje sledování HVA v 10s intervalech s LOD 3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.⁵⁵).

Voltametrické stanovení HVA a VMA na CPE modifikovaných *in situ* povrchově aktivními látkami (konkrétně kationtovými tenzidy)⁵⁶ vedlo k výraznému zvýšení citlivosti ve srovnání s nemodifikovanými CPE, což bylo vysvětleno na základě elektrostatických a hydrofobních interakcí. Za určitých podmínek povrchově aktivní látky stabilizují některé z elektrochemických produktů, což vysvětluje rozdílné voltametrické chování HVA a VMA a odráží se i v různých mechanismech jejich elektrochemické oxidace⁵⁶.

DPV na GCE s polymerním filmem Alizarinové červeně S při stanovení levodopy (L-DOPA) a HVA v přítomnosti askorbové kyseliny poskytla LOD 6, 17 a 30 nmol l^{-1} pro L-DOPA, HVA a askorbovou kyselinu⁵⁷. GCE potažená filmem 3-amino-5-merkpto-1,2,4-triazolu byla použita k úspěšnému simultánnímu stanovení kyseliny 3,4-dihydroxyfenylactové (DOPAC) a HVA, s LOD 66 pmol l^{-1} pro DOPAC a 94 pmol l^{-1} pro HVA (cit.¹⁶). Toto simultánní stanovení na nemodifikované GCE nebylo možné. Voltametrické stanovení HVA a VMA na anodicky oxidované BDDE, nemodifikované GCE a GCE modifikované Nafionem (Nafion/GCE) a Poly(neutralní červení) (PNR/GCE) poskytlo LOD 0,6; 0,9; 0,8 a 1,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a 0,4; 1,5; 2,4 a 1,1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA na BDDE, nemodifikované GCE, Nafion/GCE a PNR/GCE (cit.⁵⁸). SPCE na bázi grafitu modifikovaného nanočásticemi zlata poskytla při SWV stanovení dopaminu a HIAA ve vzorcích moči LOD 8 nmol l^{-1} pro dopamin a 22 nmol l^{-1} pro HIAA (cit.⁵⁹).

Voltametrický senzor pro stanovení močové kyseliny a HVA v přítomnosti askorbové kyseliny připravený nanesením vrstvy mědi na GCE (cit.⁶⁰) umožňuje stanovení 10 nmol l^{-1} HVA a kyseliny močové v přítomnosti 100 nmol l^{-1} kyseliny askorbové.

Molekulárně vtištěné polymery (MIP) jsou další možností pro stanovení biomarkerů rakoviny. Molekulární imprinting je užitečná metoda pro přípravu polymerních porézních materiálů s vysokou selektivitou pro molekulu (templát) díky paměťovému efektu. Metoda založená na porovnání stabilizačních energií předpolymerizačních aduktů mezi templátem a různými funkčními monomery⁶¹ umožnila racionální výběr nejvhodnějšího monomeru a rozpouštědla. Takto připravený voltametrický senzor pro stanovení HVA s použitím MIP jako rozpoznávacího prvku připraveného polymerací methakrylové kyseliny v prostředí toluenu poskytl LOD 7 nmol l^{-1} . Vývoj voltametrického senzoru na bázi elektrod modifikovaných akrylovými MIP pro stanovení VMA popsali Blanco-López a spol.⁶² Tenké vrstvy MIP byly připraveny rotačním nanášením směsi monomerů (templátu, methakrylové kyseliny, zesíťovacího činidla a rozpouštědla) na povrch GCE a následnou fotopolymerací. Vlastní měření bylo provedeno ve vodném citrátovém pufru ($0,025 \text{ mol l}^{-1}$, pH 3) s 10 % (v/v) acetonitrilu zajišťujícím dobrou smáčivost polymeru. LOD se pohyboval kolem $95 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$.

Stanovení HVA, VMA a HIAA pomocí voltametrie i pomocí později diskutované ampérometrie jsou věnovány i bakalářské a diplomové práce studentů z naší laboratoře. Jako příklad lze uvést stanovení HVA pomocí HPLC-ED (cit.⁶³) na koloně Phenomenex Gemini C18 s coulometrickou detekcí (ESA, 0 V, +0,075 V, +0,45 V) a mobilní fázi fosfáto-acetátový pufr, acetonitril a methanol o pH 5,35 s LOD $0,13 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ nebo simultánní stanovení HVA a VMA ve směsi pomocí DPV s anodicky oxidovanou BDDE⁶⁴ ve fosfátovém pufru ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 3,0) s výslednými LOD $0,57 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a $0,41 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA. HVA a VMA byly dále stanoveny pomocí DPV a HPLC-ED na CPE (cit.⁶⁵). DPV v Brittonově-Robinsonově (BR) pufru poskytla LOD $0,38 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a $0,25 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA. HPLC s ampérometrickou detekcí („wall-jet“ detektor, +1,1 V) s mobilní fází acetonitril-fosfáto-acetátový pufr (25:75) o pH 2,5 poskytla LOD $0,7 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a $0,2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA. Metodou standardního přídatku byly sledované biomarkery stanoveny ve zředěném vzorku moči s LOD $0,8 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a $0,5 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA. Dosazené výsledky jsou zároveň shrnuty v článku⁶⁶. Uhlíková filmová elektroda (CFE) a GCE byly použity v dizertační práci⁶⁷ pro stanovení HVA a VMA pomocí CV, DPV, voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu (LSV, linear staircase voltammetry) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). Bylo popsáno i stanovení HVA a VMA pomocí DPV na SPCE⁶⁸ v BR pufru s LOD $0,24 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a $0,06 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA. Výsledky byly spolu s dalším analytem HIAA (LOD $0,12 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) publikovány ve výše

zmíněném článku⁵¹. V další závěrečné práci⁶⁹ je pro stanovení HVA a VMA využita diferenční pulsní ampérometrie (+0,6 V, platinový tubulární detektor) s platinovou elektrodou v BR pufru a rovněž HPLC s ampérometrickou detekcí a UV detekcí (254 nm) v mobilní fázi acetonitril-BR pufr (pH 2,5).

4. HPLC stanovení studovaných biomarkerů s elektrochemickou detekcí

HPLC-ED kombinuje výhody separačních metod (zejména vyšší selektivitu) a metod elektrochemických (vysokou citlivost a skutečnost, že neruší elektrochemicky neaktivní látky). Mez detekce se zpravidla pohybuje v submikromolárním koncentračním rozmezí a při analýze biologických materiálů se tato technika často kombinuje s vhodnou metodou předběžné separace a prekoncentrace, nejčastěji pomocí kapalínové extrakce (LLE) nebo extrakce tuhou fází (SPE, pozor na stejnou zkratku používanou běžně v odborné literatuře pro síťotiskové elektrody). Nejčastěji se používá ampérometrická detekce při konstantním potenciálu vloženém na vhodnou pracovní elektrodu. Nejběžnější upořádání je tenkovrstvé (thin-layer), wall-jet či tubulární. Rozhodující zde je vhodná volba podmínek pro separaci a pro detekci, které je nutné vhodným způsobem sladit, a dále vhodná volba použitého materiálu detekční elektrody. V poslední době se stále častěji používají metody s rychlou změnou potenciálu pracovní elektrody umožňující záznam řady voltamogramů v průběhu jediného chromatografického píku a tak zvyšující výpovědní hodnotu tohoto způsobu detekce. Totéž platí o elektrochemických detektorech využívajících různé typy elektrodových polí umožňujících současný záznam chromatogramů při různých hodnotách vloženého potenciálu. Pulsní ampérometrie pak umožňuje využití různých potenciálových pulsů nejen k detekci sledovaného analytu, ale i k čištění pracovní elektrody eliminujícímu případné problémy s její pasivací. Pravděpodobně nejcitlivější je coulometrická detekce pomocí porézních elektrod či jejich polí, která však vyžaduje podstatně dražší instrumentaci. Přehled metod stanovení studovaných biomarkerů pomocí různých metod HPLC s elektrochemickou detekcí je uveden v tab. II. Z lékařského hlediska je nejzajímavější práce italských vědců⁶, kteří sledovali biomarkery neuroblastomu (HVA a VMA) pomocí HPLC-ED s využitím komerčně dostupné metody (HVA-VMA s HPLC, Bio Rad Laboratories, Milán, Itálie) po dobu sedmi let. Práce podrobně analyzuje diagnostické výsledky HVA/Cr a VMA/Cr (hodnoty HVA a VMA vztažené na množství vyloučeného kreatininu v moči) v různých stádiích onemocnění a věkových podskupinách a poskytuje mezní hodnoty, které mohou určit pacienty s neuroblastomem i pacienty s podezřením na neuroblastom a pomoci tak při vyhodnocování lékařských vyšetření.

Tabulka II
 HPLC-ED stanovení HVA, VMA a HIAA

Detekce (typ detekce, typ detektoru, parametry)	Analyt	Kolona (typ, (zrnitost v μm ; rozměry v mm))	Vzorek	Úprava vzorku	LOD [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
coul ^a , ESA, +0,4 V, +0,2 V, -0,3 V	HVA, VMA, HIAA	ODS (150 × 4,6)	moč	filtrace	$(4,3-13,1) \cdot 10^{-3}$	3
coul ^a , ESA, +0,1 V, +0,65 V, +0,7 V	HVA, VMA, HIAA	Zorbax SP-150 C8	moč	extrakce ethyl-acetátem	2,7 (HVA) 0,5 (VMA) 5,2 (HIAA)	22
amp ^b , TL-5 průtoková cela, +0,67 V	HVA, VMA, HIAA	ODS (5; 150 × 4,6)	moč	extrakce ethyl-acetátem	neuveđen	23
amp, průtoková cela, +0,6 V (HVA, VMA), +0,45 V (5-HIAA)	HVA, VMA, HIAA	Yanapak ODS-T (10; 250 × 4)	moč	centrifugace	neuveđen	70
amp, LC-12 průtoková cela, +0,72 V	HVA, VMA, HIAA	Hypersil ODS (5; 150 × 4,6)	moč	extrakce ethyl-acetátem	neuveđen	71
coul, ESA, +0,35 V, +1 V, 0 V	HVA, VMA, HIAA	Lichrospher C18 (5; 125 × 4)	moč	extrakce etherem, centrifugace	0,08 (HVA) 0,15 (VMA) 0,03 (HIAA)	9
coul, detektorové pole, +0,2 V, +0,3 V, +0,35 V, +0,4 V, +0,45 V, +0,5 V, +0,55 V, +0,6 V	HVA, VMA, HIAA	C18/iontově výměnná (150 × 4,6)	moč	centrifugace	$9,3 \cdot 10^{-3}$ (HVA) $1,21 \cdot 10^{-2}$ (VMA) $1,31 \cdot 10^{-2}$ (HIAA)	24
coul, ESA, +0,1 V, +0,22 V	HVA, VMA	Inertsil-ODS 2 (250 × 4,6)	moč	analyty eluovány z filtračního papíru, zředění	0,03 (HVA, VMA)	72
amp, LC-4B průtoková cela, +0,85 V	HVA, VMA	Hitachi Gel No. 3013-0 (250 × 4)	moč	analyty eluovány z filtračního papíru, extrakce ethyl-acetátem	neuveđen	73
amp, LC-4B, +0,9 V	HVA, VMA	Hitachi Gel 3013-0 (5; 250 × 4)	moč	extrakce z filtračního papíru	0,055 (HVA) 0,025 (VMA)	74
coul, ESA, +0,05 V, -0,175 V	HVA, VMA	Spherisorb ODS 2 (5; 250 × 4)	plasma	SPE ^c , centrifugace	$1,7 \cdot 10^{-4}$ (HVA) $3,8 \cdot 10^{-4}$ (VMA)	27
coul, ESA, +0,45 V, +0,4 V, +0,18 V	HVA, VMA	Discovery HS C18 (5; 250 × 4)	moč	SPE	0,8 (HVA) 0,4 (VMA)	75
amp, LC-17 průtoková cela, +0,8 V	VMA, HIAA	Waters 5 μm C18 Nova Pak	moč	extrakce ethyl-acetátem	10,1 (VMA) 5,2 (HIAA)	76
amp, LC-4 průtoková cela, +0,7 V	HVA, HIAA	C18 RP (300 × 3,9)	moč	hydrolýza	$1,4 \cdot 10^{-3}$ (HVA) $1,3 \cdot 10^{-3}$ (HIAA)	77
amp, LC-4A průtoková cela, +0,85 V	HVA, HIAA	Ultrasphere ODS (5; 150 × 4,6)	myší mozková tkáň	homogenizace, centrifugace	$1,37 \cdot 10^{-2}$ (HVA) $5,2 \cdot 10^{-3}$ (HIAA)	78
coul, ESA, +0,1 V, -0,2 V, +0,4 V	HVA, HIAA	C18 Hypersil (5; 150 × 4,6)	vysušené krevní skvrny a plasma	SPE	$6,6 \cdot 10^{-4}$ (HVA) $2,6 \cdot 10^{-4}$ (HIAA)	79

Tabulka II
pokračování

Detekce (typ detekce, typ detektoru, parametry)	Analyt	Kolona (typ, (zrnitost v μm ; rozměry v mm))	Vzorek	Úprava vzorku	LOD [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
amp, LC-3 průtoková cela, +0,8 V	HVA, HIAA	C18 (300 \times 3,9)	lidská a myší mozková tkáň	centrifugace	1,1 \cdot 10 ⁻² (HVA) 1,1 \cdot 10 ⁻³ (HIAA)	80
amp, tenkovrstvá průtoková cela, +0,7 V	HVA, HIAA	Luna C18 (5; 250 \times 4,6)	mozkomíšní mok	mikrodialýza	1,3 \cdot 10 ⁻³ (HVA) 6 \cdot 10 ⁻⁴ (HIAA)	12
amp, detekce pomocí rotující diskové elektrody při +0,7 V	HVA, HIAA	Polygosil C8 (5; 100 \times 3)	myší mozková tkáň	homogenizace, centrifugace	neuveđen	81
amp, tenkovrstvá průtoková cela, +0,7 V	HVA	Shim-pack VP-ODS (5; 150 \times 4,6)	moč	centrifugace	7 \cdot 10 ⁻⁴	26
coul, ESA, +0,3 V	HVA	C18 RP (5; 250 \times 4,6)	myší mozková tkáň po mikrodialýze	–	3 \cdot 10 ⁻³	82
coul, ESA, detektorové pole, +0,05 V na elektrodě 1, +0,15 V na elektrodě 2, +0,25 V na elektrodě 3, +0,35 V na elektrodě 4, +0,55 V na elektrodě 5, +0,9 V na elektrodě 6, +1 V na elektrodě 7	HVA	C18 ESA MD-150 (3; 150 \times 3)	myší mozková tkáň	homogenizace	4,7 \cdot 10 ⁻³	83
amp, TV II tenkovrstvý, +0,8 V	HVA	Polygosil C8 (5; 100 \times 3)	myší mozková tkáň	homogenizace, centrifugace	neuveđen	84
amp, průtoková cela, +0,8 V	HVA	C8 (5; 150 \times 4,6)	plasma	SPE	1,1 \cdot 10 ⁻³	85
coul, ESA, +0,1 V, -0,2 V, +0,5 V	HVA	C8 (5; 250 \times 4,6)	plasma	SPE	5,5 \cdot 10 ⁻⁴	86
coul, ESA, 0 V, 0,075 V, +0,45 V	HVA	Phenomenex Gemini C18 (150 \times 4,6)	myší mozková tkáň ^d	homogenizace, filtrace	0,13	63
coul, ESA, +0,45 V, -0,2 V	VMA	Spherisorb ODS2 (5; 100); C18 (10; 20)	moč	extrakce do vázané fáze na oxidu křemičitém	1,25 \cdot 10 ⁻²	87
amp, TL-8A průtoková cela, +1,3 V	VMA	Lichrosorb RP 18 (10; 250 \times 4,5)	moč	extrakce ethyl-acetátem, centrifugace	neuveđen	88
amp, LC-3 průtoková cela, +0,6 V	HIAA	Nucleosil C18 RP (3; 75 \times 4) Nucleosil C18 RP (5; 150 \times 4,6)	moč	–	0,5	89
amp, LC-4B průtoková cela, +0,55 V	HIAA	Biophase ODS C18 (5; 250 \times 4,6)	moč	SPE	6,28	90

Tabulka II
pokračování

Detekce (typ detekce, typ detektoru, parametry)	Analyt	Kolona (typ, (zrnitost v μm ; rozměry v mm))	Vzorek	Úprava vzorku	LOD [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
amp, LC-4A průtoková cela, +0,5 V	HIAA	Bondapak C18 (10; 240 \times 4,6)	mozkomíšní mok, plasma, moč	extrakce ethyl-acetátem, centrifugace	$4 \cdot 10^{-3}$	91
amp, průtoková cela, +0,4 V	HIAA	Luna C18 (5; 250 \times 4,6)	moč	centrifugace, filtrace	$5 \cdot 10^{-4}$	92
amp, TL-8A průtoková cela, +1 V	HIAA	Ultrasphere C18 (5; 150 \times 4,5)	moč	centrifugace	neuveđen	93
coul, ESA, +0,25 V; +0,55 V	HVA, VMA, HIAA	Hypersil C18 (5; 250 \times 4,6)	moč	–	2 (HVA) 0,3 (VMA) 1 (HIAA)	10

^acoul – coulometrická detekce, ^bamp – ampérometrická detekce, ^cSPE – extrakce tuhou fází (solid phase extraction), ^dpokus o použití této techniky v myši mozkové tkáni po mikrodialýze byl neúspěšný

5. Další elektrochemické metody

Sem lze zařadit např. některé velmi zajímavé studie možností potenciometrického stanovení těchto biomarkerů^{48,94} a dále studie jejich stanovení pomocí průtokové injekční analýzy s ampérometrickou detekcí (FIA-AD)⁹⁵.

Potenciometrie představuje jednu z nejlevnějších, nejrychlejších a tudíž v praxi nejoblíbenějších metod. Velmi zajímavou možností detekce diskutovaných protinádorových biomarkerů nabízí diplomová práce⁹⁴ popisující přípravu potenciometrických biosenzorů na bázi vodivých polymerů a PVC membrán. Na předupravený povrch elektrod na bázi vodivých polymerů byla kovalentně navázaná merkaptofenylboronová kyselina a povrch PVC membrán na bázi anexu byl modifikován chemicky generovaným polyanilinem (PANI). Takto připravená elektroda umožňuje rychlé a jednoduché přímé potenciometrické stanovení HVA, VMA i HIAA s LOD kolem 2 mmol l^{-1} . FIA umožňuje výrazné zrychlení analýz a navíc v řadě případů eliminuje problémy s pasivací pracovní elektrody, neboť produkty elektrodové reakce jsou účinně odstraňovány od povrchu elektrody tokem nosné kapaliny. Využitím FIA-AD ke stanovení studovaných biomarkerů se zabývá studie⁹⁵. Biomarkery byly stanoveny na SPCE v BR pufru ($0,04 \text{ mol l}^{-1}$, pH 2,0) v komerčně dostupné průtokové cele. Kalibrační závislosti byly proměřeny v rozsahu $0,05$ až $100 \mu\text{mol l}^{-1}$. Závislosti byly lineární a dosažené LOD byly $0,065 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA (při $+0,6 \text{ V}$), $0,053 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA (při $+0,8 \text{ V}$) a $0,033 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HIAA (při $+0,8 \text{ V}$) (počítáno z vyhodnocených výšek píků) a $0,024 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA, $0,020 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA a $0,012 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HIAA (počítáno z vyhodnocených ploch píků). Tato metoda je považována za slibnou

z hlediska rychlosti analýzy, snadné automatizace a eliminace pasivace elektrod. Vzhledem k blízkým hodnotám detekčních potenciálů nelze všechny tři biomarkery stanovit simultánně v jednom experimentu. K tomuto účelu se nabízí dosud nezkoumaná možnost využití fast scan voltametrie, pole elektrod či vhodných matematických metod používaných k rozlišení elektrochemicky podobných látek.

6. Závěr

Cílem tohoto příspěvku bylo upozornit na možnosti, výhody a omezení moderních elektroanalytických metod pro stanovení vybraných nádorových biomarkerů (jménovitě homovanilové, vanilmandlové a 5-hydroxy-3-indol-3-yl octové kyseliny) a přehledně shrnout dosud publikované voltametrické a ampérometrické metody vhodné pro stanovení zmíněných biomarkerů v biologických tekutinách. Jak již bylo uvedeno, hlavní předností elektrochemických metod je jejich rychlost, citlivost, miniaturizovatelnost a nízké pořizovací i provozní náklady. Za nevýhodu lze považovat ne vždy postačující selektivitu a problémy s pasivací pracovních elektrod ve složitých biologických maticích. A právě tímto směrem bude nutné zaměřit další výzkum. Z velkého počtu publikovaných prací o elektrochemickém stanovení diskutovaných biomarkerů lze usuzovat na jejich význam a jejich možnosti. Díky včasnému zachycení zvýšených koncentrací těchto biomarkerů v tělních tekutinách je možno léčbu nádorů zahájit včas, a zvýšit tak šanci na uzdravení pacientů.

Tento příspěvek vznikl v rámci Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV260440), za finanční podpory

Grantové agentury České republiky (J. B. děkuje projektu GAČR 15-02815S, T. N. děkuje projektu GAČR 17-03868S) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (A. M. děkuje projektu GAUK 734216).

LITERATURA

- Bicker J., Fortuna A., Gilberto A., Amícar F.: *Anal. Chim. Acta* 768, 12 (2013).
- Eisenhofer G., Kopin I. J., Goldstein D. S.: *Pharmacol. Rev.* 56, 331 (2004).
- Cao G.-M., Hoshino T.: *Chromatographia* 47, 396 (1998).
- Kema I. P., Vries E. G. E., Muskiet F. A. J.: *J. Chromatogr. B* 747, 33 (2000).
- Grouzmann E., Lamine F.: *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 713 (2013).
- Barco S., Gennai I., Reggiardo G., Galleni B., Barbagallo L., Maffia A., Viscardi E., Leonardi F., Cecinati V., Sorrentino S., Garaventa A., Conte M., Cangemi G.: *Clin. Biochem.* 47, 848 (2014).
- Sadilkova K., Dugaw K., Benjamin D., Jack R. M.: *Clin. Chim. Acta* 424, 253 (2013).
- Pisano J. J., Crout J. R., Abraham D.: *Clin. Chim. Acta* 7, 285 (1962).
- Manickum T.: *J. Chromatogr. B* 877, 4140 (2009).
- Haard P. M. M., Wienders J. P. M., Wikkerink J. B. W.: *Biomed. Chromatogr.* 2, 209 (1987).
- Davis K. L., Kahn R. S., Ko G., Davidson M.: *Am. J. Psychiatry* 148, 1474 (1991).
- Zhang W., Xie Y., Ai S., Wan F., Wang J., Jin L., Jin J.: *J. Chromatogr. B* 791, 217 (2003).
- Kaluzna-Czaplinska J., Socha E., Rynkowski J.: *Med. Sci. Monit.* 16, CR445 (2010).
- Bornstein R. A., Baker G. B.: *Psychiatry Res.* 41, 267 (1991).
- Marín-Valencia I., Serrano M., Ormazabal A., Pérez-Dueñas B., García-Cazorla A., Campistol J., Artuch R.: *Clin. Biochem.* 41, 1306 (2008).
- Revin S. B., John S. A.: *Anal. Methods* 4, 348 (2012).
- Asberg M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 29, 158 (1997).
- Lee T., Yagi M., Kusunoki N., Nagasaka M., Koda T., Matsuo K., Yokota T., Miwa A., Shibata A., Morioka I., Kodama H., Takeshima Y., Iijima K.: *Brain Dev.* 37, 114 (2015).
- García A., Heinänen M., Jiménez L. M., Barbas C.: *J. Chromatogr. A* 871, 341 (2000).
- Sirén H., Mieljolen M., Herlevi M.: *J. Chromatogr. A* 1032, 289 (2004).
- Tsunoda M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 506 (2006).
- Dutrieu J., Delmotte Y. A.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 317, 124 (1984).
- Davidson D. F.: *Ann. Clin. Biochem.* 26, 137 (1989).
- Mashige F., Ohkubo A., Matsushima Y., Takano M., Tsuchiya E., Kanazawa H., Nagata Y., Takai N., Shinozuka N., Sakuma I.: *J. Chromatogr. B* 658, 63 (1994).
- Peaston R. T., Weinkove C.: *Ann. Clin. Biochem.* 41, 17 (2004).
- Zhou Y., Yan H., Xie Q., Huang S., Liu J., Li Z., Ma M., Yao S.: *Analyst* 138, 7246 (2013).
- Unceta N., Rodriguez E., Balugera Z. G., Sampedro C., Goicolea M. A., Barrondo S., Sallés J., Barrio R. J.: *Anal. Chim. Acta* 444, 211 (2001).
- Uchikura K.: *Anal. Sci.* 6, 351 (1990).
- Mercolini L., Gerra G., Consorti M., Somaini L., Raggi M. A.: *Talanta* 78, 150 (2009).
- Kema I. P., Schellings A. M. J., Hoppenbrouwers C. J. M., Rutgers H. M., Vries E. G. E., Muskiet F. A. J.: *Clin. Chim. Acta* 221, 143 (1993).
- Holland B. J., Conlan X. A., Stavenson P. G., Tye S., Reker A., Barnett N. W., Adcock J. L., Francis P. S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 5669 (2014).
- Lionetto L., Lostia A. M., Stigliano A., Cardelli P., Simmaco M.: *Clin. Chim. Acta* 398, 53 (2008).
- González R. R., Fernández R. F., Vidal J. L. M., Frenich A. G., Pérez M. L. G.: *J. Neurosci. Methods* 198, 187 (2011).
- Manini P., Andreoli R., Cavazzini S., Bergamaschi E., Mutti A., Niessen W. M. A.: *J. Chromatogr. B* 744, 423 (2000).
- Fang L., Lv Y., Sheng X., Yao S.: *J. Chromatogr. Sci.* 50, 450 (2012).
- Monteleone M., Naccarato A., Sindona G., Tagarelli A.: *Anal. Chim. Acta* 759, 66 (2013).
- Fauler G., Leis H. J., Huber E., Schellauf C., Kerbl R., Urban C., Gleispach H.: *J. Mass Spectrom.* 32, 507 (1997).
- Korf J., Valkenburgh-Sikkema T.: *Clin. Chim. Acta* 26, 301 (1969).
- Aleman G., Gamundí A., Rosselló C., Rial R.: *Biomed. Chromatogr.* 10, 144 (1996).
- Taran F., Frobert Y., Créminon C., Grassi J., Olichon D., Mioskowski C., Pradelles P.: *Clin. Chem.* 43, 363 (1997).
- Taran F., Bernard H., Valleix A., Créminon C., Grassi J., Olichon D., Deverre J.-R., Pradelles P.: *Clin. Chim. Acta* 264, 177 (1997).
- Shi R. Z., Ho Y.-P., Yeung J. H. K., Or P. M. Y., To K. K. W., Lau M. W. M., Arumanayagam M.: *Clin. Chem.* 44, 1674 (1998).
- Woiwod A. J., Knight R.: *J. Clin. Path.* 14, 502 (1961).
- Li X., Jin W., Weng Q.: *Anal. Chim. Acta* 461, 123 (2002).
- Zhang H.-T., Li Z., Zhang J.-B., Zhang Y., Ye J.-N., Chu Q.-C., Zhang M.-J.: *Chem. Res. Chin. Univ.* 29, 850 (2013).
- Shirao M. K., Suzuki S., Kobayashi J., Nakazawa H., Mochizuki E.: *J. Chromatogr. B* 693, 463 (1997).
- Flottmann D., Hins J., Rettenmaier C., Schnell N., Kuci Z., Merkel G., Seitz G., Bruchelt G.: *Microchim. Acta* 154, 49 (2006).
- Tian T., Deng J., Xie Z., Zhao Y., Feng Z., Kang X., Gu Z.: *Analyst* 137, 1846 (2012).
- Li Q., Batchelor-McAuley C., Compton R. G.: *J.*

- Phys. Chem. B 114, 9713 (2010).
50. Deacon A. C.: *Ann. Clin. Biochem.* 31, 215 (1994).
 51. Makrlíková A., Ktena E., Economou A., Fischer J., Navrátil T., Barek J., Vyskočil V.: *Electroanalysis* 29, 146 (2017).
 52. Liu S., Chen Y., Wan P., Zhou C., Zhang S., Mo H.: *Electrochim. Acta* 216, 528 (2016).
 53. Liu Y., Jiang Y., Song W., Lu N., Zou M., Xu H., Yu Z.: *Talanta* 50, 1261 (2000).
 54. Libansky M., Zima J., Barek J., Dejmeková H.: *Monatsh. Chem.* 147, 89 (2016).
 55. Mulla I. A. L., Lowry J. P., Serra P. A., O'Neill R. D.: *Analyst* 134, 893 (2009).
 56. Blanco-López M. C., Lobo-Castañón M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tuñón-Blanco P.: *Electroanalysis* 19, 207 (2007).
 57. Hatefi-Mehrjardi A., Ghaemi N., Karimi M. A., Ghasemi M., Islami-Ramchahi S.: *Electroanalysis* 26, 2491 (2014).
 58. Baluchová S., Barek J., Tomé L. I. N., Brett C. M. A., Schwarzová-Pecková K.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 22 (2018).
 59. Gupta P., Goyal R. N., Shim Y.-B.: *Sens. Actuators, B* 213, 72 (2015).
 60. Selvaraju T., Ramaraj R.: *Electrochim. Acta* 52, 2998 (2007).
 61. Diñeiro Y., Menéndez M. I., Blanco-López M. C., Lobo-Castañón M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tuñón-Blanco P.: *Anal. Chem.* 77, 6741 (2005).
 62. Blanco-López M. C., Lobo-Castañón M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tuñón-Blanco P.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 353 (2003).
 63. Klíma V.: *Bakalářská práce*. Masarykova univerzita, Brno 2014.
 64. Baluchová S.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2015.
 65. Adámková H.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2016.
 66. Dejmeková H., Adamkova H., Barek J., Zima J.: *Monatsh. Chem.* 148, 511 (2017).
 67. Pfeifer R.: *Dizertační práce*. Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2017.
 68. Ktena E.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2014.
 69. Roumani F.: *Závěrečná zpráva programu ERASMUS*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2015.
 70. Fujita K., Maruta K., Ito S., Nagatsu T.: *Clin. Chem.* 29, 876 (1983).
 71. Joseph M. H., Kadam B. V., Risby D.: *J. Chromatogr.* 226, 361 (1981).
 72. Hanai J., Takeda T.: *Screening* 4, 91 (1995).
 73. Sato Y., Hanai J., Takasugi N., Takeda T.: *Tohoku J. Exp. Med.* 150, 169 (1986).
 74. Hanai J., Kawai T., Sato Y., Takasugi N., Nishi M., Takeda T.: *Clin. Chem.* 33, 2043 (1987).
 75. Kandár R., Žáková P.: *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* 16, 99 (2010).
 76. Parker N. C., Levtzow C. B., Wright P. W., Woodard L. L., Chapman J. F.: *Clin. Chem.* 32, 1473 (1986).
 77. Anderson G. M., Schlicht K. R., Cohen D. J.: *Anal. Biochem.* 144, 27 (1985).
 78. Saller C. F., Salama A. I.: *J. Chromatogr.* 309, 287 (1984).
 79. Saracino M. A., Gerra G., Somaini L., Colombati M., Raggi M. A.: *J. Chromatogr. A* 1217, 4808 (2010).
 80. Sperk G.: *J. Neurochem.* 38, 840 (1982).
 81. Westerink B. H. C., Basker F. J., O'Hanlon J.: *Clin. Chem.* 28, 1745 (1982).
 82. Cannazza G., Stefano A., Mosciatti B., Braghiroli D., Baraldi M., Pinnen F., Sozio P., Benatti C., Parenti C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 1079 (2005).
 83. Vaarmann A., Kask A., Mäeorg U.: *J. Chromatogr. B* 769, 145 (2002).
 84. Valkenburg C., Tjaden U., Krogt J., Leden B.: *J. Neurochem.* 39, 990 (1982).
 85. Raggi M. A., Pucci V., Sabbioni C., Furlanetto S., Gerra G.: *J. Sep. Sci.* 24, 275 (2001).
 86. Saracino M. A., Mandrioli R., Mercolini L., Ferranti A., Zaimovic A., Leonardi C., Raggi M. A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 107 (2006).
 87. Holly J. M. P., Patel N.: *Ann. Clin. Biochem.* 23, 447 (1986).
 88. Morrissey J. L., Shihabi Z. K.: *Clin. Chem.* 25, 2043 (1979).
 89. Helander A., Beck O., Wennberg M., Wikström T., Jacobsson G.: *Anal. Biochem.* 196, 170 (1991).
 90. Chou P. P., Jaynes P. K.: *J. Chromatogr.* 341, 167 (1985).
 91. Petrucci B., Bakris G., Miller T., Korpi E. R., Linoila M.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* 51, 421 (1982).
 92. Xu H., Zhang W., Wang D., Zhu W., Jin L.: *J. Chromatogr. B* 846, 14 (2007).
 93. Shihabi Z. K., Scaro J.: *Clin. Chem.* 26, 907 (1980).
 94. Krejchich T.: *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2013.
 95. Makrlíková A., Matysik F.-M., Navrátil T., Barek J., Vyskočil V.: *Proceedings of the 13th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, (Nesměrák K., Ed.), Univerzita Karlova, Praha 2017.

A. Makrlíková^{a,b}, J. Barek^a, V. Vyskočil^a, and T. Navrátil^b (^a Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague, ^bJ. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR): **Electrochemical Methods for the Determination of Homovanillic, Vanillylmandelic, and 5-Hydroxy-3-indoleacetic Acid as Cancer Biomarkers**

Homovanillic (HVA), vanillylmandelic (VMA), and 5-hydroxy-3-indoleacetic acid (HIAA) are cancer biomarkers and their abnormally high urinary levels can serve as a useful tool for prediction of neuroblastoma, pheochromocytoma, and carcinoid tumors. HVA and VMA are connected with the catecholamine metabolism,

while HIAA is related to the tryptophan metabolism. The aim of this review is to describe the electrochemical oxidation HVA, VMA, and HIAA and summarize published voltammetric and amperometric methods suitable for the determination of these biomarkers in various biological fluids.

Keywords: homovanillic acid, vanillylmandelic acid, 5-hydroxy-3-indoleacetic acid, tumor biomarkers, voltammetry, amperometry, HPLC with electrochemical detection