

Termická stabilita 5-(2-aminoethyl)dithio-2-nitrobenzoátu pro kolorimetrickou detekci inhibitorů cholinesteráz

Lukáš Matějovský^{1,2*}, Aneta Břízová³, Vladimír Pitschmann^{1,3}

¹Oritest spol. s r.o., Čerčanská 640/30, 140 00 Praha, Česká republika

²Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha, Česká republika

³Fakulta biomedicínského inženýrství, České vysoké učení technické v Praze, nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno, Česká republika

* Korespondující autor: lukas.matejovsky@vscht.cz, +420 220 444 237

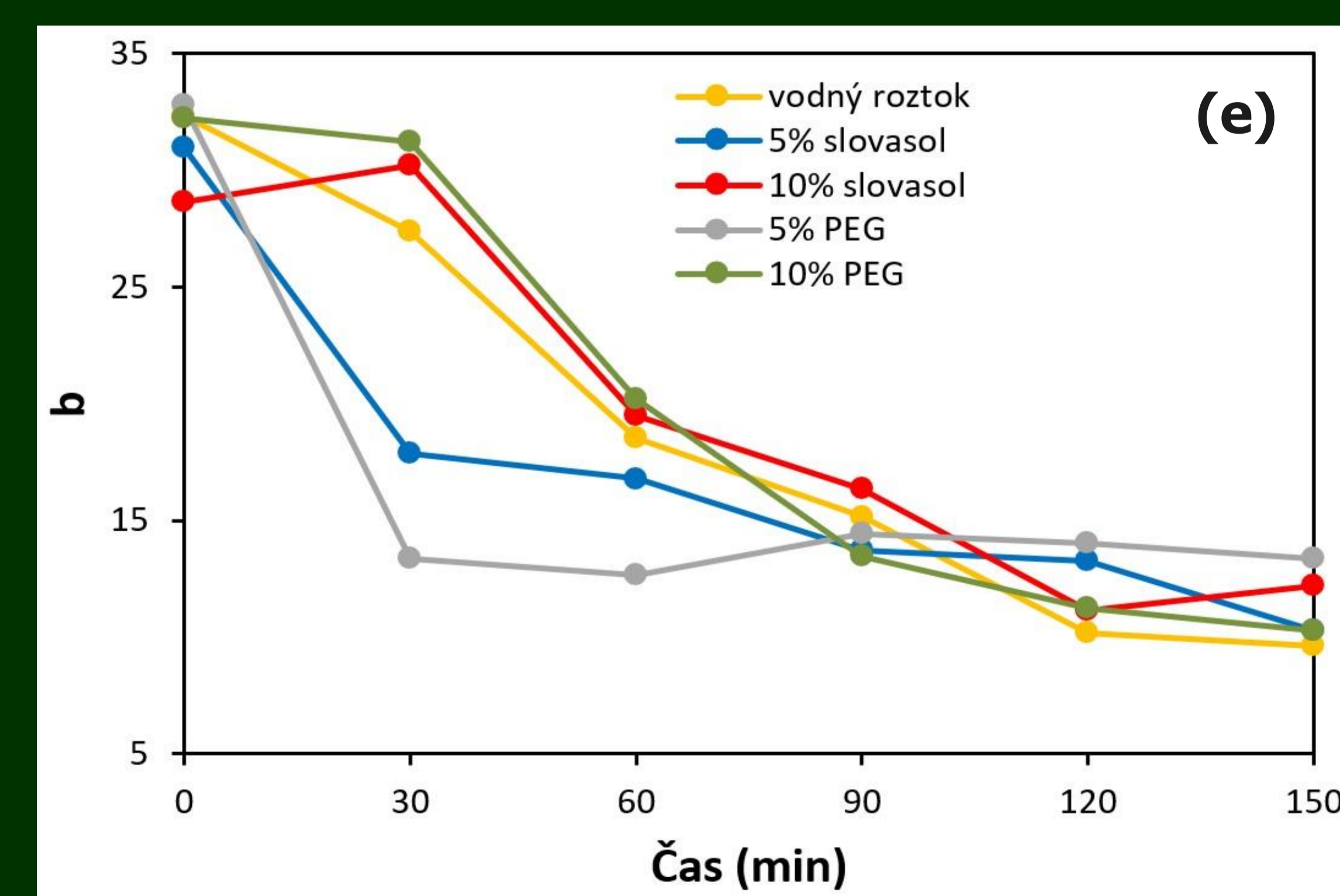
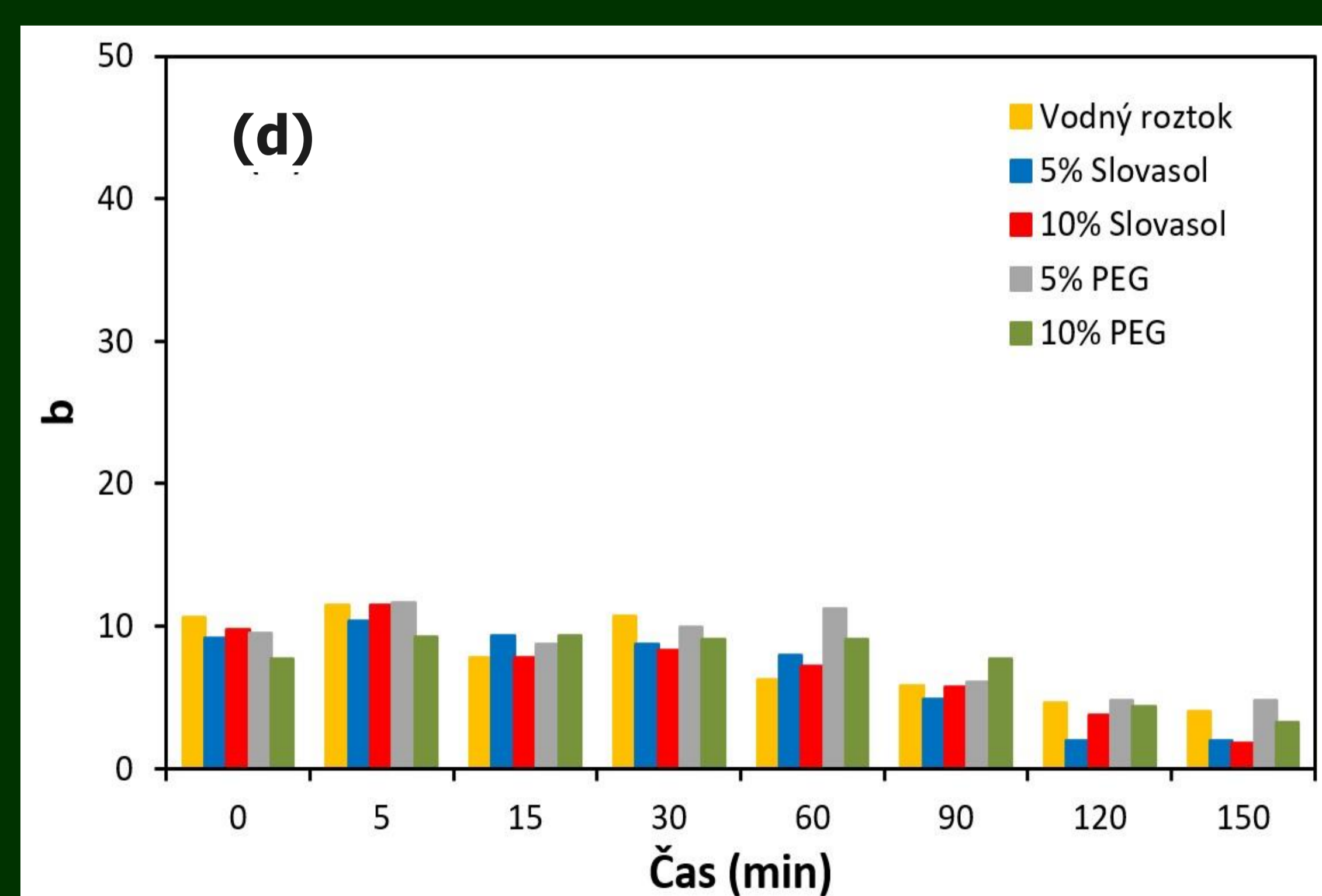
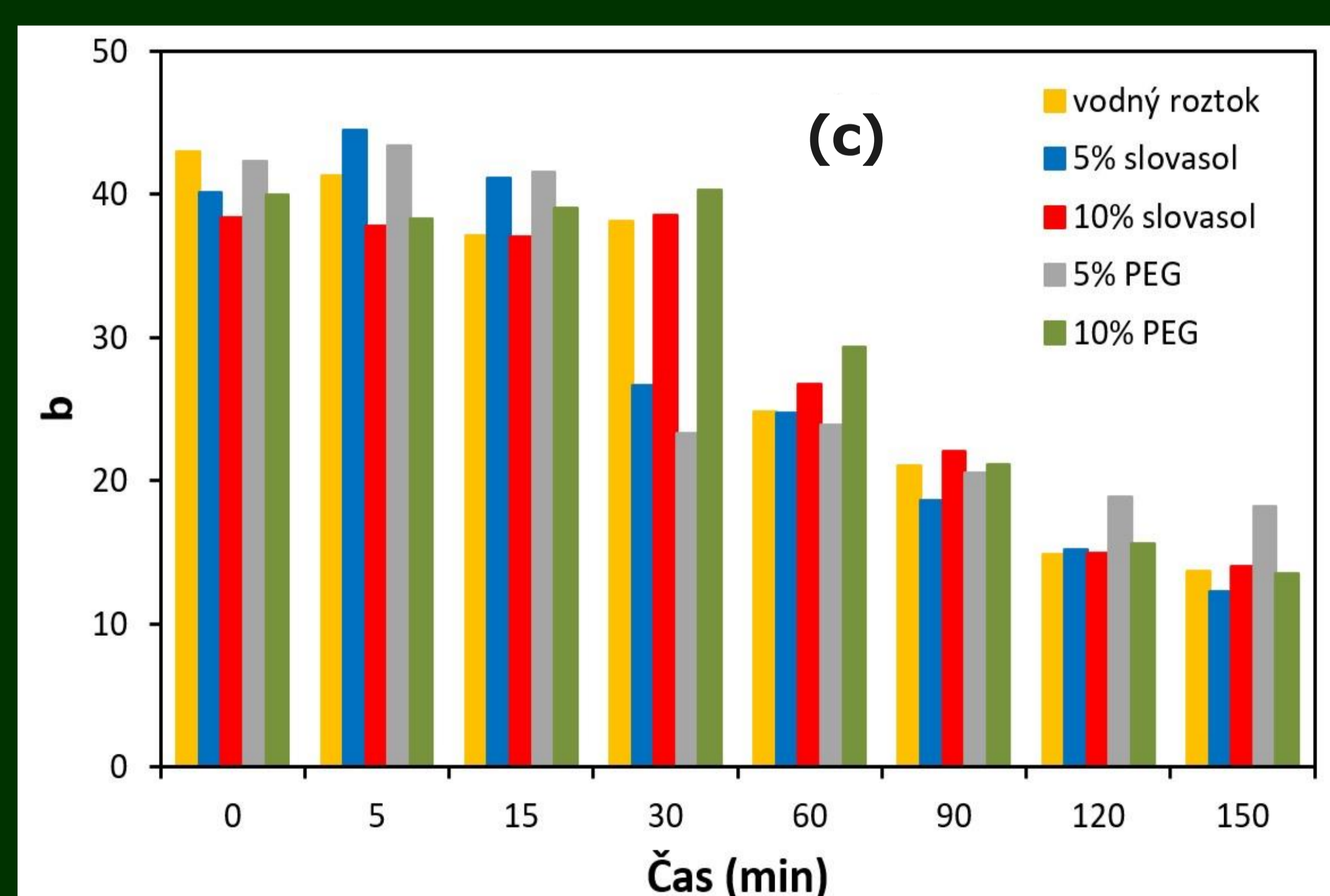
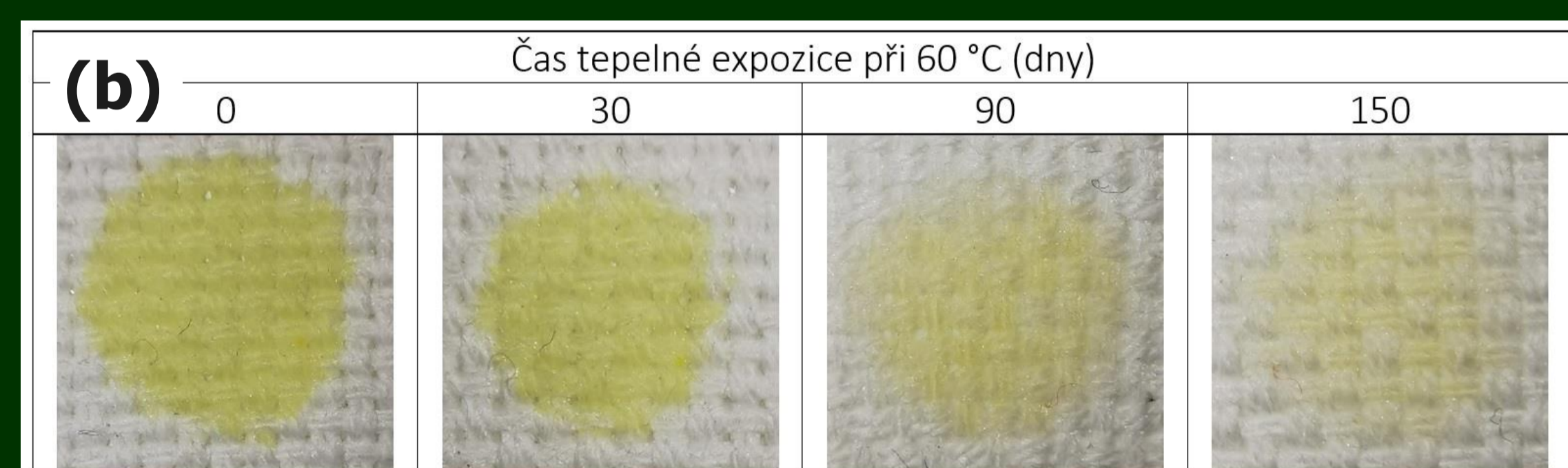
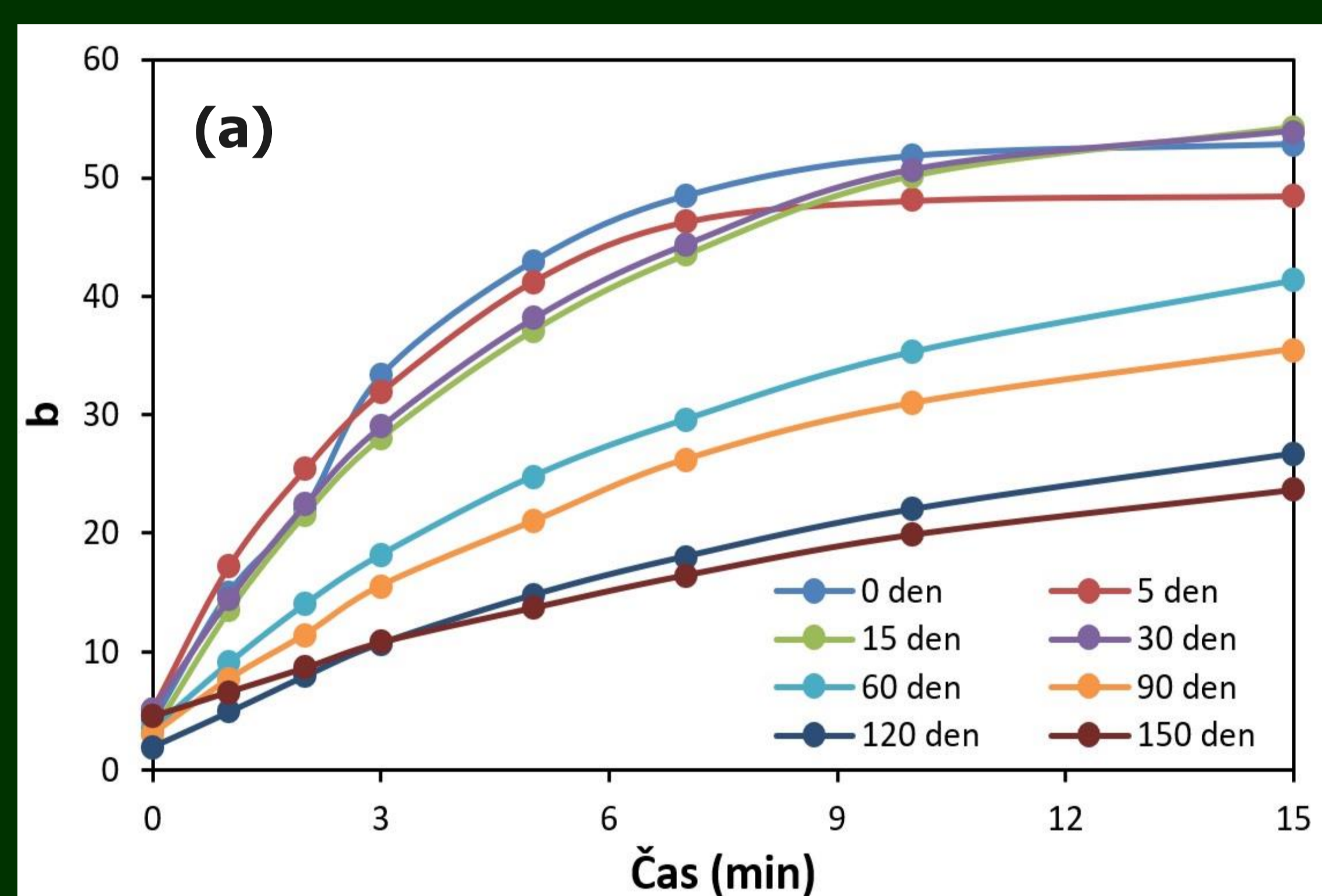
Úvod

Cholinesterázy jsou klíčové enzymy pro správnou funkci nervového systému. Inhibitory cholinesteráz, jako jsou organofosfáty a karbamáty, se řadí mezi bojové chemické látky (BCHL) s vysokou toxicitou. Rychlá a spolehlivá detekce těchto látek je zásadní pro ochranu lidského zdraví, především v terénních podmínkách válečného konfliktu či při teroristickém útoku. K tomu jsou určeny jednoduché detektory, které lze vyhodnotit na základě barevné změny pouhým okem. Příkladem může být jednoduchý moderní biosenzor DETEHIT české firmy ORITEST, který umožňuje stanovit nervově paralytické BCHL z vody, ovzduší či povrchů. DETEHIT funguje na principu cholinesterázy, vhodného substrátu uvolňujícího thiocholin a chromogenního Ellmanova činidla. Pokud není cholinesteráza inhibována, objevuje se žluté zabarvení. Vlivem přítomnosti BCHL ke žlutému zabarvení nedochází. Snahou je vyvinout variantu DETEHIT na mokré cestě, která by obsahovala ampulku s detekčním roztokem. Proto byla zrychleně testována stabilita roztoku substrátu a činidla 5-(2-aminoethyl)dithio-2-nitrobenzoátu (ADNB), které je alternativou k Ellmannovu činidlu a vykazuje vyšší odolnost vůči alkalickému prostředí (až pH 13).

Experiment

- Indikační roztok: K přípravě bylo použito destilovaná voda, chromogenní činidlo ADNB, substrátu butyrylthiocholin jodidu (BuTChI), slovasolu a polyethylenglykolu PEG E400. Připraveno bylo pět variant, které se lišily koncentrací slovasolu a PEG. Tyto roztoky byly testovány na stabilitu a jejich funkčnost byla ověřována na tkanině s imobilizovanou butyrylcholinesterázou (BuChE).
- Test stability: Indikační roztoky byly vystaveny tepelnému namáhání při teplotě 60 °C v inkubátoru po dobu 150 dnů. V pravidelných intervalech byla ověřována intenzita zabarvení slepého pokusu a funkčnost při inhibici BuChE roztokem neostigminu. Zabavení bylo stanoveno pomocí tristimulus kolorimetrie. Intenzitě žlutého zabarvení, které se objevuje po redukci ADNB, nejlépe odpovídá parametr „b“.

Výsledky



- Dynamický vývoj zabarvení slepého pokusu v čase na počátku testu stability (5 dnů) se ustaluje na vysokých hodnotách $b = 50$, a to v čase 7 min. Do 30 dnů tepelného namáhání se doba ustalování prodlužuje na 10 min, intenzita zabarvení se výrazně nemění. Nad 30 dnů dochází k poklesu intenzity zabarvení. Po 120 dnech dochází k poklesu zabarvení min. o 50 %. **(a)**
- Indikační roztok i po 90 dnech zrychleného stárnutí poskytuje uspokojivý výsledek slepého pokusu, který lze vizuálně vyhodnotit s dostatečnou přesností. **(b)**
- Za účelem zvýšení stability a smáčivosti indikačního roztoku lze vodný roztok modifikovat 10 % slovasolu a PEG, a to bez negativního ovlivnění funkce. **(c)**
- S klesající životností roztoku klesá barevná odezva slepého pokusu i odezva při inhibici neostigminem. **(c, d)** Pro přesné vyhodnocení detektoru pouhým okem je důležité, aby rozdíl mezi slepým pokusem a zabarvením při inhibici byl co nejvyšší. **(e)**
- Tento rozdíl výrazně klesá s rostoucím časem tepelného namáhání, a to vlivem poklesu koncentrace substrátu či činidla v roztoku. Indikační roztoky ve většině případů poskytují po 90 dnech dostatečný barevný rozdíl pro vyhodnocení pouhým okem. **(e)**

Závěr

Indikační roztok s ADNB vykazuje vysokou stabilitu při tepelném namáhání a je vhodný pro dlouhodobé použití v detekčních systémech pro inhibitory cholinesteráz.

Poděkování

Práce vznikla v rámci projektu bezpečnostního výzkumu Ministerstva vnitra ČR (VK01020115).