CHOLINESTERASOVÝ BIOSENZOR K DETEKCI NERVOVĚ-PARALYTICKÝCH LÁTEK

KAMILA VYMAZALOVÁ[a,b], EMIL HALÁMEK[b] a JIŘÍ KADLČÁK[a]

[a] *Vojenský výzkumný ústav, s. p., Veslařská 230, 637 00 Brno,* [b] *Univerzita obrany, Ústav ochrany proti zbraním hromadného ničení, Víta Nejedlého 691, 682 01 Vyškov vymazalova@vtuo.cz*

Došlo 2.10.14, přepracováno 23.2.16, přijato 4.3.16.

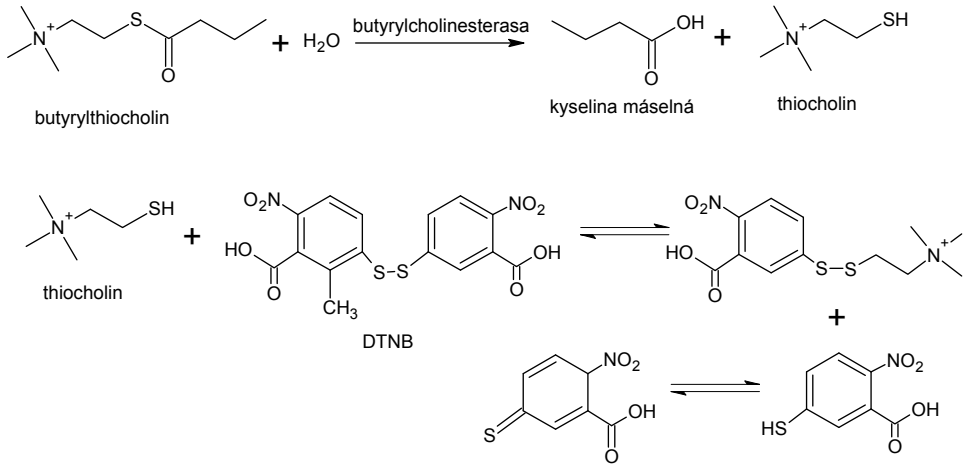
Klíčová slova: detekce, nervově-paralytické látky, biosenzor, cholinesterasová reakce

Úvod

Bojovou chemickou látku lze definovat jako toxickou chemickou látku nebo její prekurzory, které jsou určeny nebo mohou být s výhodou použity v boji a operaci s cílem vyvolat dočasné nebo trvalé ztráty živé síly protivníka[1]. Mezi jednu z nejdůležitějších a nejnebezpečnějších skupin těchto látek patří nervově-paralytické látky (NPL). Jejich účinek spočívá v zablokování přenosu nervového vzruchu v lidském těle inhibicí enzymu acetylcholinesterasy, která je za tento přenos zodpovědná. V důsledku toho dochází k nadměrnému dráždění receptorů nervových buněk a ke vzniku různých klinických příznaků (např. zúžení zornic, svalová ochablost, křeče a záškuby, bolesti hlavy, úzkost atd.)[2].

NPL reprezentují širokou skupinu organických sloučenin fosforu široce využívaných jako pesticidy a bojové chemické látky. Mnohé, relativně netoxické organofosforové sloučeniny, se využívají jako farmaka, plastifikátory, povrchově aktivní látky, rozpouštědla apod.[3,4]. NPL se vyznačují mimořádně vysokou toxicitou (koncentrace $5 \cdot 10^{-7}$ mg l^{-1} je považována za koncentraci, která již přímo neohrožuje lidské zdraví), rychlým nástupem účinku, jsou bez výrazného zápachu a do organismu pronikají všemi branami vstupu. Jejich syntéza je poměrně levná a není příliš náročná[4]. Dělí se do dvou základních skupin, které jsou označovány jako látky série G a V. Látky série G obsahují ve své struktuře typickou vazbu P-F nebo P-CN v případě tabunu. Některé jsou těkavé (nejstálejší je tabun) a poměrně rychle hydrolyzují[5]. Nejčastěji se jedná o fluoridy esterů kyseliny alkylfosfonové nebo fosforečné. Mezi sloučeniny typu G patří sarin (*O*-isopropyl methylfosfonofluoridát), soman (*O*-pinakolyl methylfosfonofluoridát), cyklosarin (*O*-cyklohexyl methylfosfonofluoridát), tabun (*O*-ethyl *N*,*N*-dimethyl fosforoamidokyanidát) [6]. Látky série V obsahují ve své struktuře obvykle typickou vazbu P-S. Jsou jen velmi málo těkavé a jsou velmi stabilní vůči hydrolýze[5]. Nejčastěji jde o estery kyseliny alkylfosfonové nebo fosforečné a *N*,*N*-dialkylaminothioalkoholu. Mezi tyto sloučeniny patří např. VX (*S*-[2-(diisopropylamino) ethyl]-*O*-ethyl methylfosfonothioát), R33 (*S*-[(2-diethylamino)ethyl]-*O*-isobutyl methylfosfonothioát) atd.[6].

Nejpoužívanější reakcí pro stanovení NPL je cholinesterasová reakce (ChR). Tato reakce je citlivější než klasické postupy a její citlivost také koreluje s toxicitou jednotlivých organofosforových inhibitorů[7]. Její podstatou je cholinesterasou (acetyl- nebo butyrylcholinesterasou) katalyzovaná hydrolýza substrátu (ester cholinu popř. thiocholinu např. butyrylthiocholin, acetylcholin atd.), při které vzniká příslušná kyselina a thiol (thiocholin nebo cholin). Vznikající thiol lze stanovit Ellmanovou metodou, jejímž



Obr. 1. **Průběh cholinesterasové reakce dle Ellmana**

principem je reakce thiolu s chromogenním Ellmanovým činidlem, tj. kyselinou 5,5´-dithiobis-2-nitrobenzoovou (DTNB), za vzniku žluté 5-sulfanyl-2-nitrobenzoové kyseliny[8,9].

U Ellmanovy modifikace cholinesterasové reakce vzniká žluté zbarvení, které je měřitelné při vlnové délce 412 nm. V přítomnosti NPL je reakce blokována, tj. nedochází ke vzniku zbarvení.

Tuto reakci lze využít v biosenzorech. Pod pojmem biosenzor se rozumí analytický přístroj, který obsahuje prvek biologického původu (biorekogniční element)[10,11]. Díky citlivosti vůči působení NPL jsou velmi vhodnou a často využívanou biorekogniční složkou biosenzorů právě cholinesterasy[12]. Cholinesterasové biosenzory byly vyvinuty jako ultra citlivé a rychlé techniky pro analýzu toxických látek při monitorování životního prostředí, vody a potravin, kontroly kvality a mají také využití v zemědělství a ve vojenských aplikacích. Tyto systémy mají potenciál doplnit nebo zcela nahradit klasické analytické metody[13]. První biosensor založený na cholinesterase inhibované NPL byl zkonstruován v roce 1962 G. Gillbaultem[14].

Námi navržený biosenzor využívá enzym butyrylcholinesterasu a celá reakce probíhá na detekční pásce. Jedná se tedy o páskový detektor.

Experimentální část

Použité chemikálie

O-Ethyl *N*,*N*-dimethyl fosforoamidokyanidát (tabun; GA; čistota 97,24 %), *O*-isopropyl methylfosfonofluoridát (sarin; GB; čistota 93,61 %), *O*-pinakolyl methylfosfonofluoridát (soman; GD; čistota 99,00 %), *O*-cyklohexyl methylfosfonofluoridát (cyclosarin; GF; čistota 98,01 %), *S*-[2-(diisopropylamino)ethyl]-*O*-ethyl methylfosfonothioát (VX; čistota 90,76 %) a *S*-[(2-diethylamino)ethyl]-*O*-isobutyl methylfosfonothioát (R33, čistota 10,39 %) byly vyrobeny na Slovensku (Zemianske Kostoľany). 5,5´-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB; čistota > 97,5 %), butyrylthiocholin jodid (BTCHI; čistota ≥ 98,0 %), $NaHCO_3$ (čistota 99,0–100,0 %), $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ (čistota 99,5 %) a KH_2PO_4 (čistota ³ 99,0 %) byl dodán firmou Sigma-Aldrich. NaOH (čistota min. 98,0 %) a H_3BO_3 (čistota min. 99,5 %) byla dodána firmou Lach-Ner. Methanol (čistota 99,8 %) byl dodán firmou Chromservis. Butyrylcholinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8., specifická aktivita 150 mkat/l) byla vyrobena ve firmě Bioveta.

Použité roztoky a jejich příprava

Fosfátový pufr: (pH 7; 0,1 M) – 11,876 g $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Dále bylo 9,078 g KH_2PO_4 rozpuštěno také v 1000 ml destilované vody. Výsledný roztok pufru byl připraven smícháním šesti dílů roztoku $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ a 4 dílů KH_2PO_4.

Borátový pufr: (pH 7; 0,05 M) – 12,48 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v destilované vodě. Poté bylo přidáno 460 ml 0,1 M NaOH a roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1000 ml. Z toho roztoku bylo odebráno 150 ml a doplněno v odměrné baňce destilovanou vodou na objem 1000 ml.

Enzym: 50 mg butyrylcholinesterasy bylo rozpuštěno ve 2 ml borátového pufru.

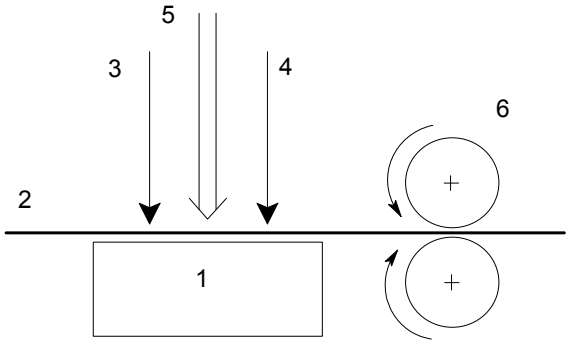
Substrát: butyrylthiocholin jodid o koncentraci 0,075 M (navážka 23,77 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody).

Činidlo: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina o koncentraci 0,01 M (navážka 39,6 mg byla spolu s 15 mg $NaHCO_3$ rozpuštěna v 10 ml fosfátového pufru).

Reakční směs: výsledná směs byla tvořena 0,1 ml substrátu, 0,5 ml reagentu a 13,3 ml borátového pufru.

Popis navrženého biosenzoru

Celý navržený měřící systém je možno rozdělit na tři základní části. První část je část pneumatická, která zabezpečuje prosávání vzorku přes detekční pásku pomocí vzorkovacího čerpadla (typ NMP 05 S firmy KNF Neuberger GmbH), při konstantním průtoku 0,3 litrů vzduchu za minutu. Další částí je část dávkovací, která zabezpečuje pomocí dávkovacího čerpadla (typ NMP 05 S firmy KNF Neuberger GmbH) dávkování jednotlivých činidel z jejich zásobníků. Nástřik pracovní kapaliny je realizován mikrodávkovači (Micro Valve SMLD 300 firmy Fritz Gyger AG). Třetí je část vyhodnocovací, která je tvořena RGB barevným senzorem od firmy Hammamatsu. Tento senzor pracuje na principu filtrace přijímaného optického signálu a jeho následné digitalizace. Optický signál je přímo závislý na vlastní analytické informaci vznikající v důsledku reakce enzymu, inhibitoru a indikátoru na detekční pásce. Páska používaná při detekci je bavlněná páska (parametry: šíře 15 ± 0,5 mm; tloušťka 0,30 mm a savost 20 mm min^{-1}) vyrobená v ČR (firma Oritest), bělená a následně impregnovaná silikagelem.



Obr. 2. **Schéma navrženého fotokolorimetrického biosenzoru;** 1 – digitální RGB senzor, 2 – bavlněná detekční páska, 3 – nástřik enzymu, 4 – nástřik činidel, 5 – prosávání vzorku, 6 – mechanismus zajišťující posun pásky v detektoru

Schéma navrženého fotokolorimetrického biosenzoru je uvedeno na obr. 2.

Algoritmus měřícího postupu

Při testování biosenzoru byly navrženy a pro reálnou konstrukci detektoru ověřeny dva různé algoritmy měření. Prvním je algoritmus označený jako mokrá varianta a druhým algoritmus suchá varianta.

Oba algoritmy se skládají ze stejných, na sebe navazujících kroků. Liší se pouze v pořadí nástřiku enzymu a prosávání vzduchu (z důvodu posouzení jejich vlivu na výsledek detekčního procesu).

a) Mokrá varianta: po založení detekční pásky dojde k jejímu mechanickému posunu. Poté je na pásku nastříknuto definované množství enzymu a přes pásku je po dobu 2 min prosáván vzduch. Po prosávání následuje minutová inkubace a dále nástřik směsi indikátoru a substrátu. Po dalších 2 min je reakce vyhodnocena. Celý měřící proces trvá 5 min.
b) Suchá varianta: po založení detekční pásky dojde k jejímu mechanickému posunu. Poté je přes pásku po dobu 2 min prosáván vzduch a dále je na pásku nastříknuto definované množství enzymu. Po nástřiku enzymu následuje minutová inkubace a dále nástřik směsi indikátoru a substrátu. Po dalších 2 min je reakce vyhodnocena. Celý měřící proces trvá 5 min.

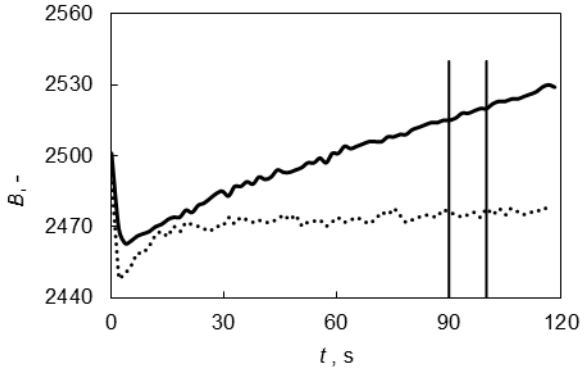
Ověření schopnosti biosenzoru detegovat nízké koncentrace NPL

Schopnost biosenzoru detegovat nízké koncentrace zájmových látek byla ověřena proměřením kalibračních závislostí jednotlivých zástupců NPL. 1 ml methanolového roztoku NPL byl v různých koncentračních úrovních nadávkován do vzorkovací části zařízení a pomocí vzorkovacího čerpadla prosáván přes pásku s enzymem butyrylcholinestrasou.

Princip vyhodnocení

Vyhodnocení je prováděno RGB senzorem, který je citlivý k červené (R), zelené (G) a modré (B) části barevného spektra. Každá barva je udána mohutností těchto tří základních barev. Při barevném přechodu žlutá-bílá, který je podstatou Ellmanovy modifikace cholinesterasové reakce, je rozhodujícím faktorem pro vyhodnocení mohutnost modré barvy (tj. hodnota signálu B). Ze získaných závislostí změny signálu B v čase pro jednotlivé koncentrace NPL byla sestrojena kalibrační křivka a z její přímkové části byla v daném časovém úseku po nástřiku směsi substrátu a činidla, aproximací naměřených dat polynomem prvního stupně, vypočítána rychlostní konstanta *k*. Tato konstanta je shodná se směrnicí regresní přímky *a* naměřené kalibrační závislosti. Na základě vypočtené rychlostní konstanty *k* lze stanovit, zda vzorek obsahuje či neobsahuje NPL (viz obr. 3).

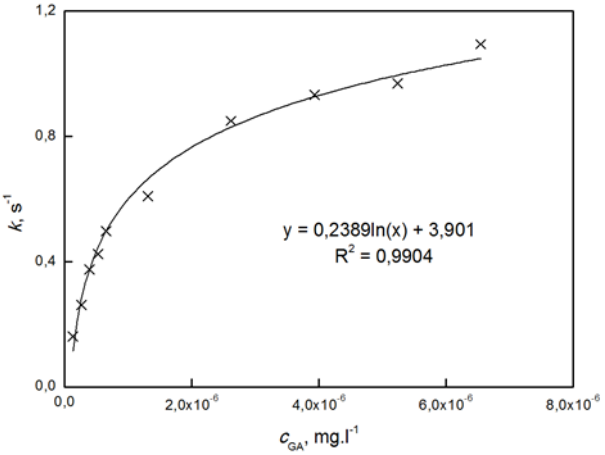
Na obr. 3 je vyznačena doba 90–100 sekund po nástřiku DTNB a substrátu, při které byla odečtena rychlostní konstanta *k*. Hodnota rychlostní konstanty *k* byla v případě proplachu rovna 0,1, v případě vzorku somanu odpovídala hodnotě 0,5.



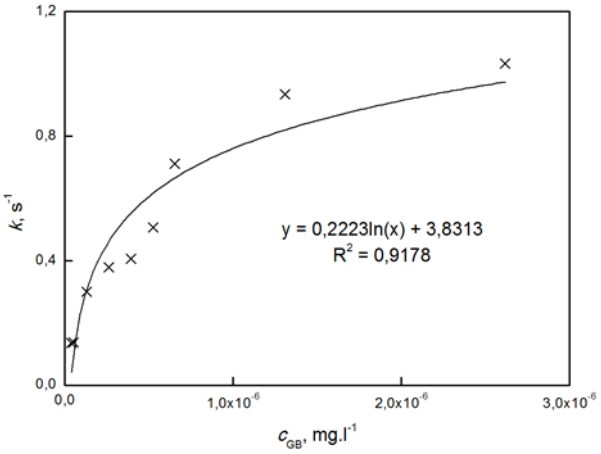
Obr. 3. **Změna hodnoty signálu B v průběhu cholinesterasové reakce pro proplach a vzorek GD, s vyznačením doby odečtu rychlostní konstanty *k***

Výsledky a diskuse

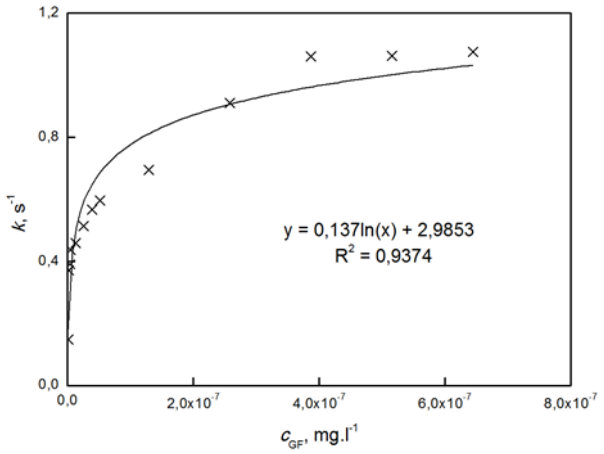
Výše popsaným způsobem byly proměřeny kalibrační závislosti pro tabun, sarin, soman, cyklosarin, látku VX a látku R33 při mokré variantě měření a pro soman a látku VX při suché variantě měření. Z lineární části kalibrační křivky byly pro jednotlivé inhibitory stanoveny hodnoty detekčního limitu (LOD), který byl vypočítán dle následujícího vztahu LOD = a + 3 x $s_{y/x}$. Jedná se tedy o koncentraci analytu, které odpovídá hodnota závisle proměnné na ose y regresní přímky, zvětšené o trojnásobek reziduální směrodatné odchylky bodů kalibrace $s_{y/x}$. K ověření repro-



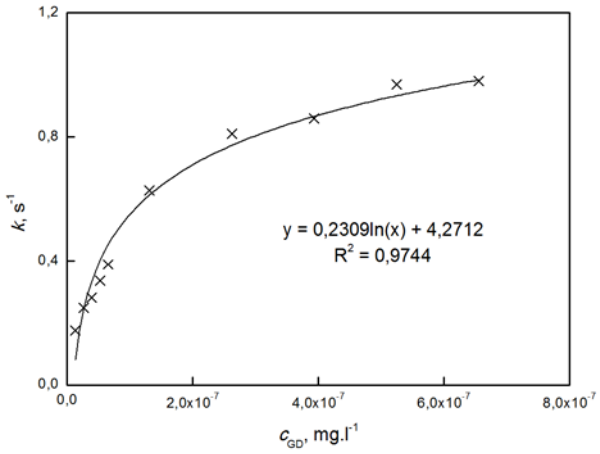
Obr. 4. **Kalibrační závislost rychlostní konstanty *k* na koncentraci tabunu v rozmezí koncentrací 1,3·10^{-7} – 6,5·10^{-6} mg l^{-1}**



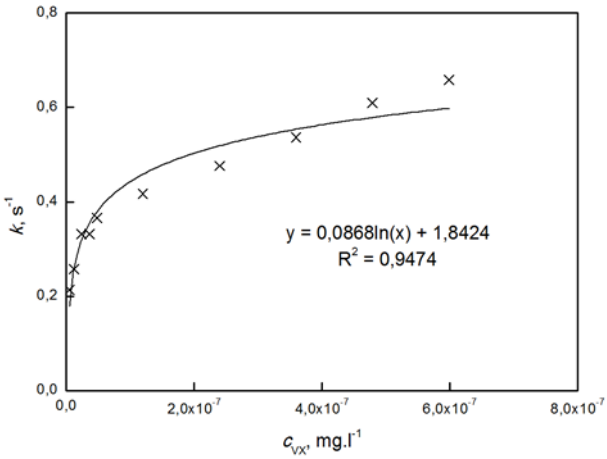
Obr. 5. **Kalibrační závislost rychlostní konstanty *k* na koncentraci sarinu v rozmezí koncentrací $3{,}9\cdot10^{-8}$ – $2{,}6\cdot10^{-6}$ mg l^{-1}**



Obr. 7. **Kalibrační závislost rychlostní konstanty *k* na koncentraci cyklosarinu v rozmezí koncentrací $1{,}3\cdot10^{-9}$ – $6{,}5\cdot10^{-7}$ mg l^{-1}**



Obr. 6. **Kalibrační závislost rychlostní konstanty *k* na koncentraci somanu v rozmezí koncentrací $1{,}3\cdot10^{-8}$ – $6{,}5\cdot10^{-7}$ mg l^{-1}**



Obr. 8. **Kalibrační závislost rychlostní konstanty *k* na koncentraci látky VX v rozmezí koncentrací $4{,}8\cdot10^{-9}$ – $6{,}0\cdot10^{-7}$ mg l^{-1}**

Tabulka I
Získané detekční limity pro jednotlivé inhibitory při různých variantách měření

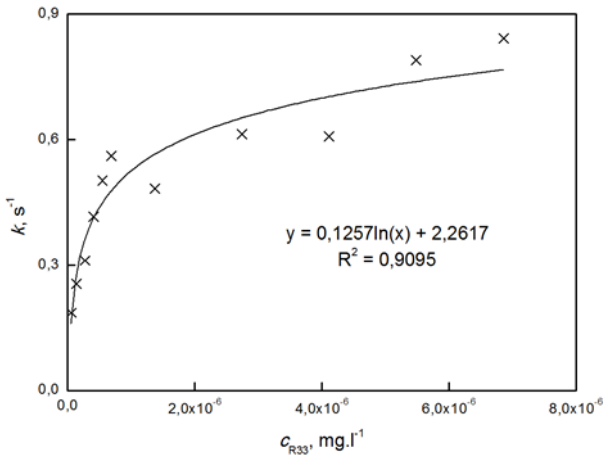
Varianta měření	Nervově-paralytická látka	Detekční limit [mg l^{-1}]
Mokrá	GA	$3{,}14\cdot10^{-7}$
	GB	$3{,}35\cdot10^{-7}$
	GD	$5{,}79\cdot10^{-8}$
	GF	$1{,}58\cdot10^{-7}$
	R33	$4{,}08\cdot10^{-7}$
	VX	$4{,}33\cdot10^{-7}$
Suchá	GD	$3{,}86\cdot10^{-8}$
	VX	$3{,}13\cdot10^{-7}$

dukovatelnosti získaných výsledků byl každý z kalibračních bodů proměřen vždy 10×.

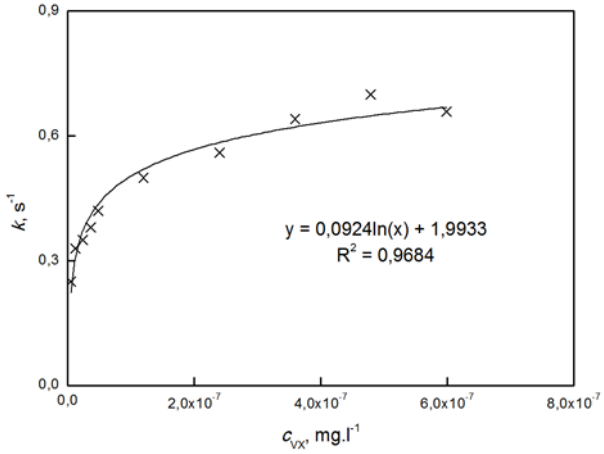
Na obr. 4 až 11 jsou zobrazeny získané kalibrační závislosti pro jednotlivé NPL.

Z tabulky I je zřejmé, že jednotlivé NPL vykazují různý inhibiční účinek vůči enzymu butyrylcholinesterase. Nejvyšší inhibiční účinek byl v případě mokré varianty pozorován u somanu, nejnižší naopak u látky VX. Rozdíl v inhibiční účinnosti je cca jeden řád. Tento poznatek se potvrdil také v případě suché varianty měření.

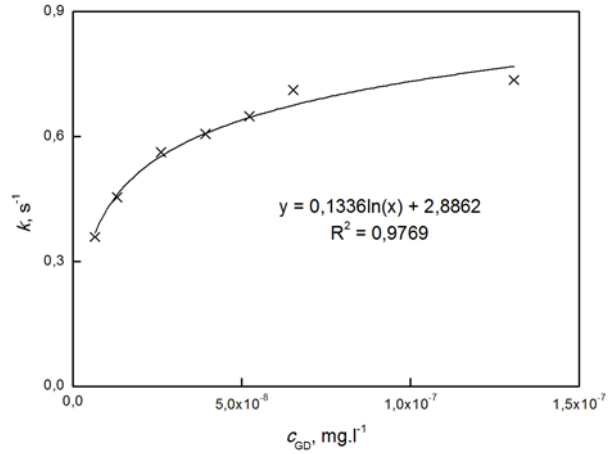
U suché varianty měření byl pro porovnání detekčního procesu testován jeden zástupce série G látek (soman) a jeden zástupce série V látek (látka VX). Při porovnání detekčních limitů daných zájmových látek získaných oběma měřícími algoritmy bylo zjištěno, že při suché variantě měření byly získány nepatrně nižší LOD.



Obr. 9. **Kalibrační závislost rychlostní konstanty *k* na koncentraci látky R33 v rozmezí koncentrací $5{,}5\cdot10^{-8}$ – $6{,}9\cdot10^{-6}$ mg l^{-1}**



Obr. 11. **Kalibrační závislost rychlostní konstanty *k* na koncentraci látky VX v rozmezí koncentrací $4{,}8\cdot10^{-9}$ – $6{,}0\cdot10^{-7}$ mg l^{-1} – suchá varianta**



Obr. 10. **Kalibrační závislost rychlostní konstanty *k* na koncentraci somanu v rozmezí koncentrací $5{,}2\cdot10^{-9}$ – $1{,}3\cdot10^{-7}$ mg l^{-1} – suchá varianta**

Závěr

Ze získaných výsledků vyplývá, že tento jednoduchý a vysoce citlivý detektor je schopen ve velmi nízkých koncentracích detegovat nejvýznamnější skupiny zavedených bojových chemických látek, to je látek fungujících na principu inhibice cholinesterasy v živém organismu. Tato skupina, reprezentovaná především látkami typu G a látkami typu V, představuje vysoké riziko vyplývající zejména z jejich toxicity, ale také z jejich fyzikálních a chemických vlastností.

Detekční limit se pohybuje v závislosti na typu inhibitoru od $5{,}79\cdot10^{-8}$ mg l^{-1} pro soman do $4{,}33\cdot10^{-7}$ mg l^{-1} pro látku VX při mokré variantě měření. Tento detekční limit je o 2–3 řády nižší než v případě použití klasických analytických metod. Při druhé variantě měření byly získány nižší detekční limity, avšak toto snížení nebylo nijak výrazné. Lze proto konstatovat, že při detekci NPL tímto navrženým detekčním prostředkem není rozhodující pořadí nástřiku enzymu a prosávání vzorku.

Velkou výhodu uvedeného detekčního prostředku představuje způsob vyhodnocení samotné biochemické reakce, který umožňuje odečet výsledku za zhoršených podmínek viditelnosti, popř. obsluhou se zhoršeným barvocitem. Další výhodou je také automatizace celého detekčního procesu.

LITERATURA

1. Halámek E., Kobliha Z.: *Přehled bojových chemických látek: Úvod do problematiky*. VVŠ PV, Vyškov 2001.
2. Patočka J. , Bajgar J., Cabal J., Fusek J., Herink J., Kassa J., Štětina R.: *Vojenská toxikologie*. Grada Publishing, a.s., Praha 2004.
3. Bajgar J.: Klin. Biochem. Metab. *13*, 40 (2005).
4. Milatovic D., Gupta R. C.; Aschner M.: Scientific. World J. *6*, 295 (2006).
5. Pumera M.: J. Chromatogr. A *1113*, 5 (2006).
6. Florus S., Dvořák T.: *Charakteristika zbraní hromadného ničení, nebezpečných škodlivin a zápalných látek (I.část) : Charakteristika zbraní hromadného ničení*. str. 51 Chemické zbraně. VVŠ PV, Vyškov 2002.
7. Halámek E., Kobliha Z., Pitschmann V.: *Analýza bojových chemických látek*, VVŠ PV, Vyškov 2007.
8. Ellman G. L., Courtney D. K., Andres V., Featherstone R. M.: Biochem. Pharmacol. *7*, 88 (1961).
9. Eyer P., Worek F., Kiderlen D., Sinko G., Stuglin A., Simeon-Rudolf V., Reiner E.: Anal. Biochem. *312*, 224 (2003).

10. Rechnitz G. A.: Electroanalysis *3*, 73 (1991).
11. Skládal P.: *Biosenzory*. Masarykova univerzita, Brno 1999.
12. Bidmanová Š., Pohanka M., Cabal J., Prokop Z., Damborský J.: Chem. Listy *104*, 302 (2010).
13. Andreescu S., Marty J.-L.: Biomolecular Eng. *23*, 1 (2006).
14. Hoskovcová M., Kobliha Z.: *Environmental Biosensors.* InTech, Croatia 2011.

K. Vymazalová[a,b], E. Halámek[b], and J. Kadlčák[a]
([a] Military Research Institute, State Enterprise, Brno, [b] University of Defence, Faculty of Economics and Management, NBC Defence Institute, Vyškov): **Cholinesterase Biosensor for Detection of Nerve Agents**

This article deals with a detection of nerve agents. A photocolorimetric biosensor was designed for the detection of this group of cholinesterase inhibitors. This biosensor utilizes the enzyme butyrylcholinesterase. Ellman´s modification of the cholinesterase reaction was used for the determination. To test the detection ability of the proposed cholinesterase detection means, tabun, sarin, soman, cyclosarin, agent VX and R33 were used. The detector was able to detect these substances in the air at very low concentrations ($5.79 \cdot 10^{-8}$ – $4.33 \cdot 10^{-7}$ mg L^{-1}, depending on the type of inhibitor).