

Nová fluorimetrická metoda stanovení submikrogramových kvant inhibitorů cholinesterázy*

J. MATOUŠEK, J. FISCHER, J. CERMAN

*Vojenská akademie A. Zápotockého,
Brno*

Je popsán vysoce citlivý způsob stanovení organických fosforových sloučenin na principu inhibice cholinesterázy za použití indoxylacetátu jako substrátu. Mírou rychlosti reakce je fluorescence enzymaticky uvolněného indoxylu.

R. J. Barnett a A. M. Seligman [1] a po nich nezávisle S. J. Holt se spolupracovníky [2, 3] rozpracovali použití některých esterů indoxylu případně substituovaného indoxylu pro lokalizaci cholinesteráz histochemickými postupy. Přitom byla za oxidativních podmínek vybarvena tkáň s přítomnou cholinesterázou vzniklým indigem nebo jeho substituentem, nejvýhodněji při použití 5-brom-4-chlorindoxylacetátu jako substrátu [4].

V létech 1959—1961 jsme zjistili, že indoxylacetát a *N*-methylindoxylacetát je možno využít jako substráty pro fluorimetrické stanovení cholinesterázy a že změna fluorescence v čase $\Delta\Phi/\Delta t$ je v počátečních podmínkách reakce mírou rychlosti enzymatické hydrolyzy [5—7]. G. G. Guilbaultem a D. N. Kramerem [8] bylo nezávisle potvrzeno, že indoxylacetát a vedle něho i resorufinbutyrát je možno použít jako fluorogenní substráty pro řadu esteráz, jako jsou cholinesteráza, lipáza, acetylcholinesteráza, acyláza a fosfatáza.

V této práci popisujeme použití indoxylacetátu jako substrátu pro vysoce citlivou a přesnou fluorimetrickou metodu stanovení stopových množství specifických organických fosforových inhibitorů cholinesteráz na principu enzymatické inhibice.

Experimentální část

Chemikálie

Indoxylacetát; připraven námi podle [9], b. t. 126 °C.

Cholinesteráza; lyofilizovaná plazma koňské krve, specifická aktivita 1,0—1,4 jednotky. (Jedna jednotka představuje 1 mg butyrylcholinjodidu, rozloženého 1 mg enzymatického preparátu za jednu hodinu při 20 °C.)

O,O-Diethyl-O-4-nitrofenylfosfát (paraoxon); Spofa.

Ostatní inhibitory vlastní syntézy.

Přístroj

Laboratorní fluorimetr jednopaprskového typu [6, 7, 10], zkonstruovaný úpravou nefelometrického nástavce Pulfrichova fotometru Zeiss (obr. 1). Zdrojem budícího světla

* Předneseno na VI. mezinárodním kongresu ochrany rostlin, Vídeň 30. 8. — 6. 9. 1967.

je luminiscenční výbojka UFO4A (Tesla), poskytující vedle několika čar ve viditelné oblasti široký pás s maximem 355 nm. K odfiltrování viditelné části spektra budícího zdroje je mezi výbojkou a kyvetou vsazen filtr UG-1 (Lange). Kyveta je zkumavkového typu s vnitřním průměrem 12 mm a obsahem 10 ml. Držák kyvety je temperován protékající vodou z ultratermostatu Höppler. Činidlem excitovaného světla je fotonásobič IP21 (Radio Corporation of America), před nějž je vzhledem k spektrální charakteristice excitovaného světla zařazen zelený filtr VG-6 (Lange). Pro indoxyl jsme našli v podmínkách reakce na přístroji CF-4 (Optica, Milano) maximum 465 nm. Elektrické schéma přístroje je na obr. 2. Pro stabilizaci proudu výbojky je použit variátor Glüwo 3—9 V, 300 mA. Fotonásobič je napájen ze stabilizovaného zdroje vysokého napětí 1 kV. Proud vznikající ve fotonásobiči je sledován mikroampérmetrem a registrován zapisovačem EZ-2 s citlivostí nastavitelnou odporovou dekádou. Pro standardní podmínky je používána citlivost při odporu 100 Ω .

Roztoky

Roztok cholinesterázy; denně čerstvě připravovaný roztok, obsahující v 1 ml 50 mg lyofilizované koňské plazmy.

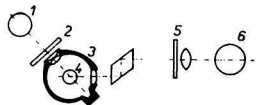
Roztok substrátu; indoxylacetát $1 \cdot 10^{-3}$ M v bezvodém ethylalkoholu (vydrží 2 týdny v lednici).

Tlumivý roztok; fosfátový tlumivý roztok podle Sørensenů o pH 7,60, připravený smísením 13 ml M/15 KH_2PO_4 a 87 ml M/15 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Pracovní postup

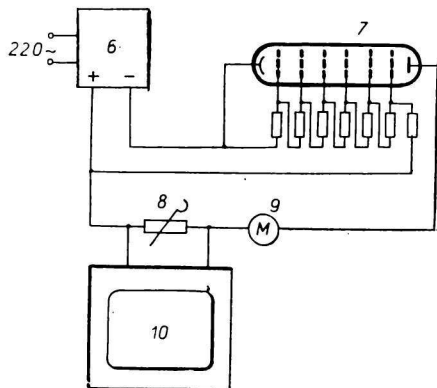
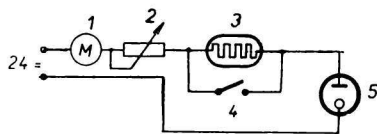
Vzorek

K 4,3 ml tlumivého roztoku se přidá 5 ml zkoumaného vzorku vody, 0,2 ml roztoku cholinesterázy a ponechá se stát 10 minut při teplotě 25 °C. Pak se přidá 0,5 ml roztoku



Obr. 1. Schema funkční části laboratorního fluorimetru.

1. výbojka; 2. filtr UG-1; 3. kyvetový prostor; 4. kyveta; 5. filtr VG-6; 6. fotonásobič.



Obr. 2. Elektrické schéma laboratorního fluorimetru.

1. miliampérmetr; 2. ochranný odpor; 3. variátor; 4. spínač; 5. výbojka; 6. zdroj vysokého napětí; 7. fotonásobič; 8. odporová dekáda; 9. mikroampérmetr; 10. zapisovač.

substrátu a po smíchání a vnesení do kyvety fluorimetru se měří inhibovaná enzymatická hydrolyza substrátu.

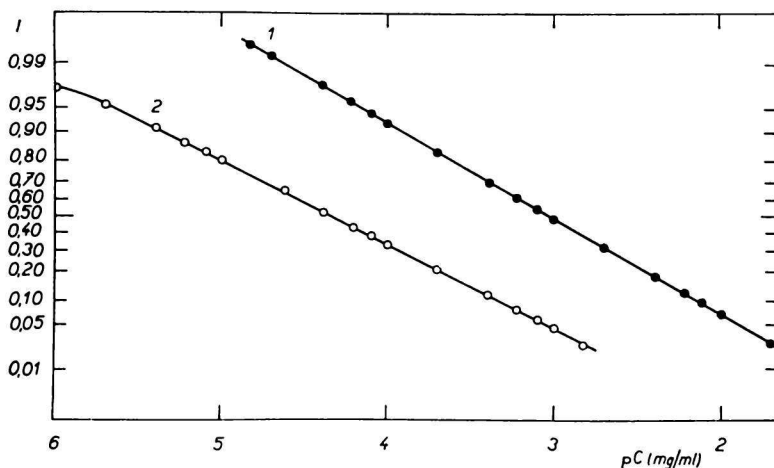
Kontrolní pokus

Postupuje se stejně, namísto 5 ml zkoumaného vzorku vody se přidává 5 ml destilované vody.

Kontrolní pokus i vzorek se měří třikrát. Pak se vyhodnotí grafické záznamy z obou pokusů zjištěním rychlosti reakce (směrnice křivky). Z porovnání rychlostí $v = \Delta\Phi/\Delta t$ (mm/min) pro kontrolní pokus v_0 a vzorek v_1 se stanoví inhibiční koeficient I :

$$I = \frac{v_1}{v_0}.$$

Podle nalezené hodnoty I se zjistí z předem pořízené kalibrační křivky odpovídající koncentrace inhibitoru ve vzorku. V kalibračním grafu se nanáší koncentrace inhibitoru v logaritmické stupnici a pro inhibiční koeficient I je vhodné použít „pravděpodobnostní“ stupnici, čímž se dosáhne linearity kalibrační křivky ve velmi širokém rozmezí inhibičního koeficientu (viz obr. 3, kde jsou koncentrace inhibitoru naneseny v hodnotách záporných logaritmů).



Obr. 3. Kalibrační křivky pro stanovení DFP a paraoxonu.

1. diisopropylfluorfosfát (DFP); 2. *O,O'*-diethyl-*O''*-4-nitrofenylfosfát (paraoxon). Je uveden záporný logaritmus koncentrace.

Příklad kalibračních křivek, které byly zjištěny popsaným postupem podle známých koncentrací inhibitorů je uveden na obr. 3 pro DFP a paraoxon. Roztoky inhibitorů byly připravovány v destilované vodě čerstvě pro každou řadu měření ze zásobních roztoků v bezvodém 2-propylalkoholu.

Ostatní údaje o samovolné a enzymatické hydrolyze substrátu byly stanoveny popsaným postupem a podle účelu bylo měněno pH, teplota, koncentrace substrátu a cholinesterázy.

Výsledky a diskuse

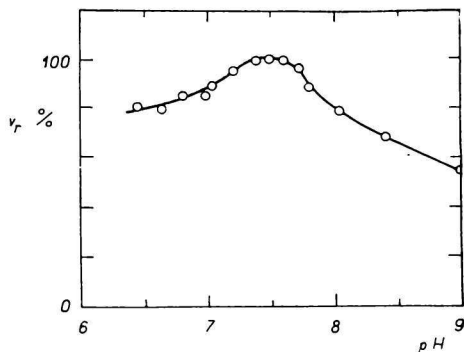
Vysoká toxicita a rychlý účinek některých organických fosforových inhibitorů cholinesterázy vyžaduje hledání velmi citlivých a přesných metod stanovení a důkazu. Popsaná metoda je pro tyto účely vhodnou modifikací enzymologického stanovení na principu inhibice cholinesterázy, dovolující stanovení jednotlivých specifických inhibitorů ve velmi nízkých koncentracích. Přehled citlivosti stanovení některých významných inhibitorů je uveden v tab. 1.

Tabulka 1

Citlivost fluorimetrického stanovení inhibitorů cholinesterázy

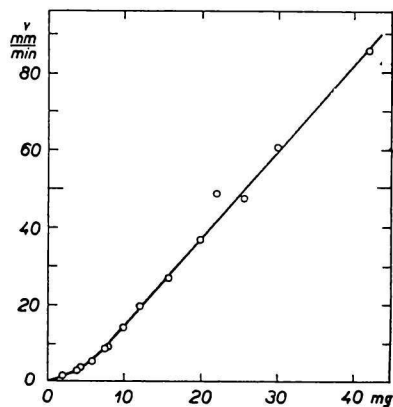
| Látka | Vzorec | Citlivost stanovení | |
|---|---|---------------------|--------------------|
| | | mg/ml | <i>M</i> |
| <i>O</i> -isopropylmethanfluorfosfonát | $(i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O})(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{F}$ | $1,4 \cdot 10^{-7}$ | $1 \cdot 10^{-9}$ |
| <i>O</i> -pinakolylmethanfluorfosfonát | $[(\text{CH}_3)_3\text{CCH}(\text{CH}_3)\text{O}](\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{F}$ | $1 \cdot 10^{-7}$ | $6 \cdot 10^{-10}$ |
| <i>O</i> -ethyl- <i>N,N</i> -dimethylamidokyanfosfát | $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})[(\text{CH}_3)_2\text{N}]\text{P}(\text{O})\text{CN}$ | $1,6 \cdot 10^{-7}$ | $1 \cdot 10^{-9}$ |
| <i>O,O'</i> -diethyl- <i>O''</i> -4-nitrofenylfosfát (paraoxon) | $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{O})(\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2)$ | $2,8 \cdot 10^{-7}$ | $1 \cdot 10^{-9}$ |
| <i>O,O'</i> -diisopropylfluorfosfát (DFP) | $(i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{F}$ | $1,6 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-7}$ |
| <i>O</i> -ethyl- <i>S</i> -2-dimethylaminoethylmethanthiofosfonát | $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})[\text{SC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ | $2 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-7}$ |

Celková doba stanovení činí 12—15 minut. Přesnost metody, zjištěná z 20 měření pro kontrolní pokus jako směrodatná odchylka od aritmetického průměru je $s = 1,5 \%$, variační koeficient $V = 3,6 \%$.



Obr. 4. Závislost rychlosti enzymatické hydrolyzy indoxylacetátu na pH.

v_r = relativní rychlost vztážená na maximální rychlost při pH 7,4—7,6, kdy $v_r = 100 \%$.



Obr. 5. Závislost rychlosti enzymatické hydrolyzy indoxylacetátu na koncentraci cholinesterázy.

Jsou uvedeny mg plazmy v pokusu (10 ml).

Пřesnost metody je srovnatelná s manometrickou metodou stanovení cholinesterázy a předčí nejpoužívanější elektrometrické metody, které na běžných pH-metrech jsou zatíženy chybou měření 5—6 % [12].

I když indoxylacetát není specifickým substrátem pro cholinesterázu, je jeho použití výhodné. Samovolná hydrolyza není v rozmezí pH 6—8 při teplotě 25 °C vůbec pozorovatelná. Optimum pH pro enzymatickou hydrolyzu je posunuto poněkud níže ve srovnání s acetylcholinem a butyrylcholinem a leží mezi 7,4—7,6, přičemž typická zvonovitá křivka závislosti enzymatické hydrolyzy substrátu (obr. 4) na pH, zjištěná popsaným postupem s použitím fosfátových tlumivých roztoků podle Sörensena při teplotě 25 °C, ukazuje poměrně ploché maximum, což je pro analytické účely výhodné. Pozoruhodná je další z analytického hlediska významná skutečnost, že v rozmezí teplot 15—35 °C se rychlost enzymatické hydrolyzy substrátu, stanovená jako $\Delta\Phi/\Delta t$, podstatně s teplotou nemění. Ze závislosti rychlosti enzymatické hydrolyzy na koncentraci substrátu jsme stanovili konstantu K_m cholinesterázy pro indoxylacetát rovnice Michaelisovy a Mentenové metodou dvojnásobného reciprokého vynesení podle H. Lineweavera a D. Burka [11]; $K_m = 6 \cdot 10^{-4}$ M. Konstanta byla stanovena při 25 °C a pH 7,60 v rozmezí koncentrací substrátu $2 \cdot 10^{-3}$ až $5 \cdot 10^{-6}$ M. Závislost rychlosti enzymatické hydrolyzy substrátu na koncentraci cholinesterázy je lineární, jak je vidět z obr. 5.

НОВЫЙ ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБМИКРОГРАММОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

И. Матосуек, И. Фишер, И. Церман

Военная академия им. А. Запотоцкого,
Брно

Описывается высокочувствительный способ определения фосфорорганических соединений на основе ингибирования холинэстеразы. В качестве субстрата был использован индоксилацетат, мерой реакции являлось изменение флуоресценции со временем $\Delta\Phi/\Delta t$. В качестве препарата холинэстеразы была использована лиофилизированная плазма лошадиной крови. Оптимальное значение pH ферментативного гидролиза 7,4—7,6 (при этом значении pH и температуре 25° спонтанный гидролиз не протекает). K_m индоксилацетата при 25° и pH 7,6 равна $6 \cdot 10^{-4}$ M. Скорость ферментативного гидролиза возрастает линейно с увеличением концентрации холинэстеразы. Средняя ошибка определения холинэстеразы $s = \pm 1,5$ %. Чувствительность определения *O*-изопропилметанфлуорфосфоната $1,4 \cdot 10^{-7}$ мг/мл; *O*-пинаколилметанфлуорфосфоната $1 \cdot 10^{-7}$ мг/мл; *O*-этил-*N,N*-диметиламиноцианфосфата $1,6 \cdot 10^{-7}$ мг/мл; *O,O'*-диизопропилфлуорфосфата $1,6 \cdot 10^{-5}$ мг/мл; *O,O'*-диэтил-*O''-n*-нитрофенилфосфата $2,8 \cdot 10^{-7}$ мг/мл; *O*-этил-*S*-2-диметиламиноэтилметантиофосфоната $2 \cdot 10^{-5}$ мг/мл. Время определения 12—15 минут.

Перевела Т. Диллингерова

A NEW FLUOROMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SUBMICROGRAM AMOUNTS OF CHOLINE ESTERASE INHIBITORS

J. Matoušek, J. Fischer, J. Cerman

The Antonín Zápotocký Military Academy,
Brno

A highly sensitive method for determining organophosphorus compounds on the base of inhibition of choline esterase is described. Indoxyl acetate is used as a substrate, the reaction index being the change in fluorescence at time $\Delta\Phi/\Delta t$. As preparation of choline esterase a lyophilised horse blood plasma was used. The optimum pH of the enzymatic hydrolysis is at 7.4–7.6 (a spontaneous hydrolysis at this pH and 25 °C does not take place). K_m of indoxyl acetate at pH 7.6 and 25 °C is $6 \cdot 10^{-4}$ M. The rate of the enzymatic hydrolysis increases linearly with concentration of choline esterase. The relative standard deviation for the choline esterase determination $s = \pm 1.5\%$. The sensitivity of determination for *O*-isopropylmethanefluorophosphate $1.4 \cdot 10^{-7}$ mg/ml; *O*-pinacolylmethanefluorophosphate $1 \cdot 10^{-7}$ mg/ml; *O*-ethyl-*N,N*-dimethylamidocyanophosphate $1.6 \cdot 10^{-7}$ mg/ml; *O,O'*-diisopropylfluorophosphate $1.6 \cdot 10^{-5}$ mg/ml; *O,O'*-diethyl-*O''-p*-nitrophenylphosphate $2.8 \cdot 10^{-7}$ mg/ml; *O*-ethyl-*S*-2-dimethylaminoethylmethanethiophosphonate $2 \cdot 10^{-5}$ mg/ml. Determination time 12–15 minutes.

Translated by Z. Votický

LITERATURA

1. Barnett R. J., Seligman A. M., *Science* **114**, 579 (1951).
2. Holt S. J., *Nature* **169**, 271 (1952); *Proc. Roy. Soc. B* **142**, 160 (1954).
3. Holt S. J., Withers R. F. J., *Nature* **170**, 1012 (1952).
4. Holt S. J., Withers R. F. J., *Proc. Roy. Soc. B* **148**, 520 (1958).
5. Fischer J., Matoušek J., Nепublikované výsledky.
6. Tomeček I., Matoušek J., *Analýza bojových otravných látek*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1961.
7. Matoušek J., Tomeček I., *Analyse synthetischer Gifte*. Deutscher Militärverlag, Berlin 1965.
8. Guilbault G. G., Kramer D. N., *Anal. Chem.* **37**, 120 (1965).
9. Arnold R. D., Nutter W. M., Stepp W. L., *J. Org. Chem.* **24**, 117 (1959).
10. Svoboda V., Dědek V., Nепublikované výsledky.
11. Lineweaver H., Burk D., *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
12. Rosival L., Vrbovský L., Selecký F. V., *Toxikológia a farmakobiodynamika organofosforových zlúčenín*, 100. Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava 1959.

Do redakcie došlo 24. 6. 1966

V revidovanej podobe 18. 7. 1967

Adresa autorů:

Doc. Ing. Jiří Matoušek, CSc., Brno, Krásného 26.

Ing. Jiří Fischer, Výzkumný ústav čistých chemikálií, n. p., Lachema, Brno, Po-
děbradova 95.

Ing. Josef Cerman, Brno, Kollárova 7.