

## HODNOCENÍ AKTIVITY REAKTIVNÍCH SORBENTŮ POMOCÍ STANDARDNÍHO FOSFATASOVÉHO TESTU

NIKOLA ZEMANOVÁ, MARTINA KUNEŠOVÁ  
a VĚRA PILAŘOVÁ

Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Fakulta životního prostředí, Králova Výchyně 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem, nicolietha@email.cz

Došlo 23.9.15, přijato 21.10.15.

Klíčová slova: alkalická fosfatasa, fosfatasa aktivita, oxidy kovů, nanočástice, reaktivní sorbenty

### Úvod

V posledních letech jsou vyvíjeny speciální materiály, tzv. reaktivní sorbenty (RS), které se vyznačují vysokou účinností při degradaci určitých nebezpečných chemických látek (NCHL). Jako reaktivní sorbenty jsou označovány nanostrukturní materiály, které jsou díky svým vlastnostem schopny NCHL nejen adsorbovat, ale i chemicky rozkládat<sup>1</sup>. Mezi nejúčinnější RS patří nanokrystalické oxidy kovů, např. oxid titaničitý, oxid ceričitý a oxidy železa. Rychlost reakce je přitom závislá zejména na velikosti a morfologii částic<sup>2</sup>.

Významnou skupinou NCHL jsou organické sloučeniny fosforu, např. organofosforečné pesticidy nebo bojové otravné látky, které mohou být reaktivními sorbenty účinně a rychle rozloženy na netoxické nebo méně toxické látky. Mechanismu degradace organofosforečných látek je velké množství, přičemž většina vědců se domnívá, že nejčastěji se uplatňuje nukleofilní substituce  $S_N2$  na centrálním atomu fosforu<sup>2,3</sup>.

V současné době je věnována pozornost i chování reaktivních sorbentů v biologických systémech a možným aplikacím v medicíně<sup>4</sup>. Např.  $CeO_2$  je testován při léčbě rakoviny<sup>5</sup> a neurodegenerativních chorob<sup>6</sup>. V literatuře je nejčastěji zmiňována jeho schopnost simulovat funkci enzymů oxidasy či peroxidasy nebo schopnost interagovat s látkami hrající důležitou roli v organismech, jako jsou nukleotidy<sup>7,8</sup>. Proto lze tedy očekávat, že oxid ceričitý bude schopen simulovat i fosfatasovou aktivitu.

### Experimentální část

Pro hodnocení fosfatasa-mimetické aktivity sorbentů byl zvolen komerčně dostupný test používaný pro stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatasy (ALP) v krevním séru (ALP-MEG L 500, Erba Lachema, Brno, ČR). Testovací souprava obsahuje dvě kapalná činidla. Prvním z nich (R1) je pufr – tzv. MEG pufr (pH 10,1 při 37 °C). Druhým činidlem (R2) je substrát – vodný roztok sodné soli 4-nitrofenylfosfátu ( $c = 102 \text{ mmol l}^{-1}$ ). Ten je v prostředí MEG pufru alkalickou fosfatasou hydrolyticky štěpen na fosfát a žlutě zbarvený 4-nitrofenol, který se stanovuje fotometricky při vlnové 420 nm. Katalytická aktivita enzymu je úměrná zvýšení koncentrace uvolněného 4-nitrofenolu v čase, které se měří kinetickým postupem nebo metodou konstantního času (enzymová reakce se v daném čase zastaví inhibitorem). Reakce může být startována substrátem (dvoureagenční metoda) nebo vzorkem (jednoureagenční metoda), v obou případech je poměr činidel R1 : R2 = 4 : 1.

Pro hodnocení fosfatasaové aktivity (FA) reaktivních sorbentů byla zvolena dvoureagenční metoda a poměr činidel R1 : R2 = 4 : 1 (4,8 ml R1 : 1,2 ml R2). Při jednobodovém testu byla používána studená činidla, při kinetickém testu byla činidla před použitím temperována na  $25 \pm 1$  °C. Do vysokých skleněných lahvíček (průměr 15 mm) o objemu 10 ml bylo navažováno 25 mg reaktivního sorbentu, ke kterému bylo přidáno činidlo R1. Po pěti minutách bylo do lahvíček nadávkováno činidlo R2 (obsah lahvíček byl po přidání činidel intenzivně promíchán). Po určité době stání (reakční čas,  $t_r$ ) při laboratorní teplotě ( $25 \pm 1$  °C) byl obsah lahvíček odstředěn (doba odstředování,  $t_o$ ) při 4000 ot/min. Poté byla ihned změřena absorbance (ABS) reakčního roztoku (reaktivita sorbentu, S) při 420 nm v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Stejným postupem byla ke každému vzorku stanovena absorbance sorbentu (tzv. slepý pokus sorbentu, BS), kdy byla místo činidla R2 použita demineralizovaná voda (DM). S každou sérií vzorků byla měřena absorbance reagenčního slepého pokusu (B). Při jednobodovém testu byl  $t_r$  30 min a  $t_o$  10 min. Při kinetických testech byla absorbance S, B i BS stanovena pro několik  $t_r$  v rozmezí 1 až 144 min a  $t_o$  bylo 5 min. Výsledky jsou vyjadřovány jako absorbance na gram reaktivního sorbentu ( $ABS \text{ g}^{-1}$ ).

Reakční roztoky byly ředěny demineralizovanou vodou (Demi Ultra 20, Goro). Absorbance byla měřena na spektrofotometru UV-VIS (Cary 50 Conc, VARIAN). Pro vyhodnocení experimentálních dat byl použit program Excel (Microsoft, USA).

Celkem bylo testováno 56 vzorků reaktivních sorbentů, které byly připraveny na Fakultě životního prostředí v Ústí nad Labem nebo v Ústavu anorganické chemie

\* Nikola Zemanová tuto práci prezentovala na soutěži o Cenu Karla Štulíka 2015 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie v Ostravě ve dnech 4. – 5. 2. 2015.

AV ČR v Řeži, a to primárně pro testování schopnosti rozkládat některé organofosforečné pesticidy a/nebo vybrané bojové chemické látky – organofosfátové nervové plyny.

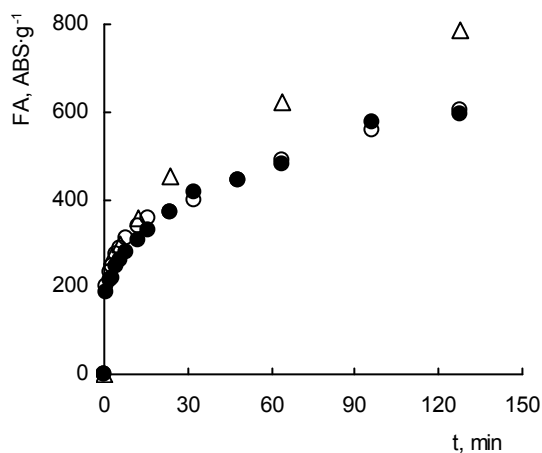
## Výsledky a diskuse

V případě hodnocení fosfatasové aktivity reaktivních sorbentů nelze měřit změnu ABS v čase způsobem obvyklým při analýzách séra, neboť RS tvoří v roztoku zákal, který ruší měření absorbance. Proto je potřeba roztok před měřením ABS odstředit. Reakci navíc nelze zastavit přidáním inhibitoru jako u biologických vzorků. Proto bylo nutné vedle určení optimálního  $t_r$  ověřit i vliv  $t_o$  a časové předlevy mezi odstředováním a měřením ABS ( $t_p$ ) na hodnotu měřené absorbance. Za tímto účelem byly provedeny dvě sady experimentů s  $t_p$  1, 10, 20, 40 a 60 min, jedna s  $t_o = 5$  min a druhá s  $t_o = 10$  min (odstředování následovalo ihned po přidání činidla R2 do lahvičky a promíchání). Z výsledků těchto experimentů, které jsou uvedeny v tab. I, je zřejmé, že i po odstředění sorbentu dochází v roztoku k rozkladu 4-nitrofenylfosfátu, a proto je nutné absorbanci roztoku měřit ihned po odstředění.

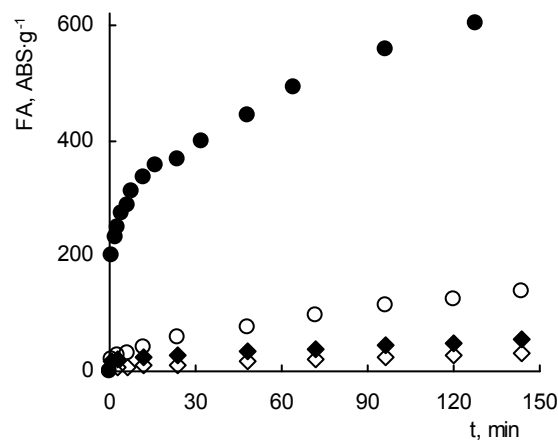
Vliv různých reakčních podmínek na stanovenou hodnotu fosfatasové aktivity RS byl studován pomocí kinetických testů s použitím reaktivního sorbentu s vysokou

aktivitou. Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny na obr. 1. Z něj je zřejmé, že rozdíl mezi stanovenými hodnotami ABS  $\text{g}^{-1}$  při stejném  $t_r$  je mezi experimenty se studenými činidly ( $\bullet$ ) a temperovanými činidly ( $\circ$ ) minimální. Avšak, průběh křivky experimentu, při kterém byla použita temperovaná činidla a sorbent byl během  $t_r$  udržován v roztoku ve vznosu mícháním ( $\Delta$  – v době  $t_r$  byl obsah v lahvičce míchán magnetickým míchadlem při 750 ot/min) je zcela odlišný. Za těchto podmínek jsou hodnoty ABS  $\text{g}^{-1}$  při všech sledovaných  $t_r$  výrazně vyšší oproti experimentům bez míchání, se zvyšujícím se  $t_r$  je pak rozdíl výraznější. Zjevnou příčinou je kontakt veškerého použitého sorbentu se substrátem během  $t_r$ . Nicméně, bez míchání se podmínky stanovení více blíží podmínkám biologických systémů, a proto byl pro oba testy zvolen postup bez míchání.

Z obr. 2, který zobrazuje časový průběh rozkladu 4-nitrofenylfosfátu za přítomnosti různých typů sorbentů s odlišnou aktivitou, je patrné, že k nejvýraznějšímu nárůstu hodnot ABS  $\text{g}^{-1}$  dochází vždy v prvních minutách reakce (experimenty byly provedeny za podmínek pracovního postupu uvedeného v experimentální části – kinetický test). Při jednobodovém testu určeném pro srovnání fosfataso-mimetické aktivity sorbentů by pak bylo ideální pracovat s co nejmenším  $t_r$ , nicméně lze předpokládat, že výsledky by byly zatíženy velkou chybou. Proto bylo 30 min zvoleno jako optimální  $t_r$  pro jednobodový test, a to



Obr. 1. Změny hodnot ABS  $\text{g}^{-1}$  v závislosti na délce reakčního času – jeden reaktivní sorbent při různých reakčních podmínkách



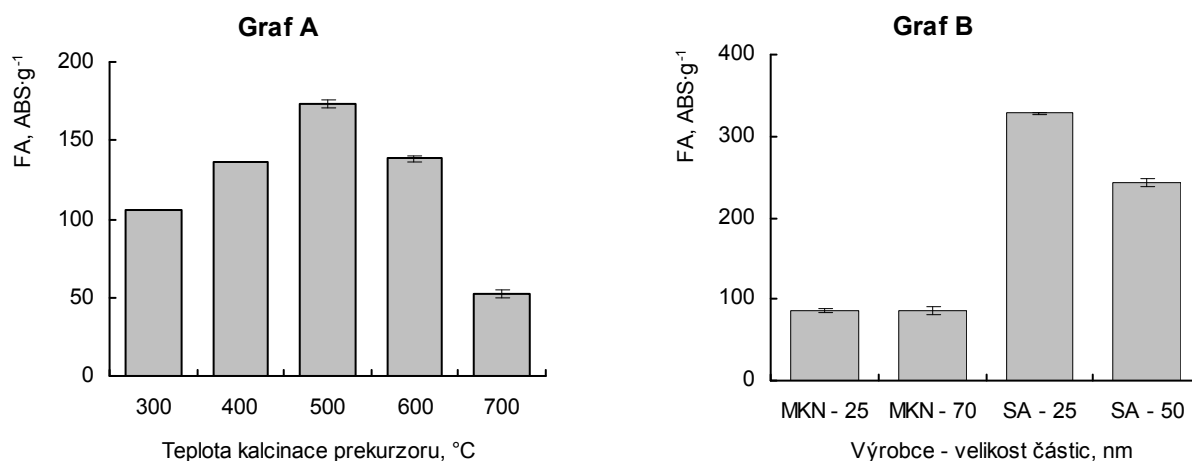
Obr. 2. Změny hodnot ABS  $\text{g}^{-1}$  v závislosti na délce reakčního času – různé reaktivní sorbenty při stejných reakčních podmínkách

Doba odstředování	Absorbance [ABS $\text{g}^{-1}$ ]				
	$t_p$ [min]				
	1	10	20	40	60
$t_o = 5$ min	188	224	285	308	368
$t_o = 10$ min	249	285	305	339	385

Tabulka II

Základní charakteristiky metody stanovení fosfataso-mimetické aktivity sorbentů

Parametr	Hodnota	Podmínky stanovení
Relativní směrodatná odchylka, %	3,50	opakovatelnost, $n = 10$ , pro vzorek s aktivitou $4,26 \text{ ABS g}^{-1}$
Relativní směrodatná odchylka, %	0,98	opakovatelnost, $n = 10$ , pro vzorek s aktivitou $195 \text{ ABS g}^{-1}$
Relativní směrodatná odchylka, % duplicitních stanovení	2,36	nezahrnuje výsledky pod mezi stanovitelnosti a odlehlé hodnoty
Mez detekce, $\text{ABS g}^{-1}$	0,45	$3 \times$ směrodatná odchylka – vzorek s aktivitou $4,26 \text{ ABS g}^{-1}$
Mez stanovitelnosti, $\text{ABS g}^{-1}$	1,49	$10 \times$ směrodatná odchylka – vzorek s aktivitou $4,26 \text{ ABS g}^{-1}$



Obr. 3. Fosfatasová aktivita vybraných reaktivních sorbentů – jednobodový test; graf A – reaktivní sorbenty typu  $\text{CeO}_2$  připravené kalcinací stejného uhličitanového prekurzoru při různých teplotách (300, 400, 500, 600 a 700  $^{\circ}\text{C}$ ), graf B – komerčně dostupný  $\text{CeO}_2$  od různých výrobců v grafu označených SA (Sigma-Aldrich, Německo) a MKN (MKNano, Kanada) s rozdílnou velikostí částic (25, 50 a 70 nm)

i s ohledem na minimální vliv teploty činidel na výsledek stanovení při tomto  $t_r$ .

Optimalizovaným postupem pro jednobodový test byla naměřena data potřebná pro vyhodnocení základních výkonnostních charakteristik metody – viz tab. II a dále byla stanovena fosfatasová aktivita 56 reaktivních sorbentů (vždy dvě paralelní stanovení).

Modifikovaný kinetický postup, při kterém je sledována změna katalytické aktivity reaktivních sorbentů v závislosti na čase (viz obr. 2), lze použít pro odhad chování testovaných materiálů z hlediska jejich fosfatasové aktivity v biologických systémech.

Jednobodový modifikovaný test je potom vhodný např. pro rychlé porovnání fosfatasové schopnosti různorodých, ale typově obdobných reaktivních sorbentů lišících se např. způsobem přípravy či fyzikálními vlastnostmi

(měrným povrchem, krystalinitou apod.). Příkladem může být porovnání fosfatasové aktivity několika vzorků oxidu ceričitého, které byly připraveny kalcinací stejného uhličitanového prekurzoru při různých teplotách, zobrazeného v grafu A na obr. 3 nebo komerčně dostupných  $\text{CeO}_2$  od různých výrobců s odlišnou velikostí částic – viz graf B na obr. 3.

## Závěr

S použitím testu ALP-MEG L 500 určeným pro stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatasy v séru lze výše uvedeným modifikovaným a optimalizovaným postupem hodnotit fosfataso-mimetickou aktivitu různých typů reaktivních sorbentů, a to jak metodou konstantního

času (jednobodový test), tak i kinetickým postupem.

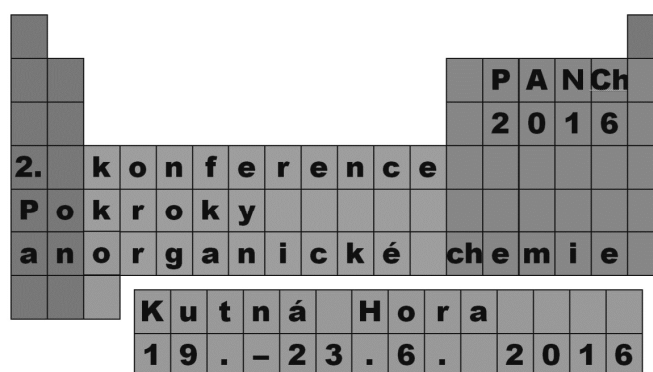
## LITERATURA

1. The Royal Society: *Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties*. London 2004.
2. Štengl V., Matys G. T., Opluštil F., Němec T.: *J. Hazard. Mater* 192, 3 (2011).
3. Janoš P., Kuráš P., Kormunda M., Šteng V., Grygar T. M., Došek M., Šťastný M., Ederer J., Pilařová V., Vrtoch L.: *J. Rare Earth* 32, 4 (2014).
4. Jenkins S. I., Roach P., Chari D. M.: *Nanomedicine (London U. K.)* 11, 77 (2014).
5. Gao Y., Chen K., Ma J.-L., Gao F.: *Onco Targets Ther* 7, 840 (2014).
6. Estevez A. Y., Erlichman J. S.: *Nanomedicine (London U. K.)* 9, 1437 (2014).
7. Asati A., Santra S., Kaittanis C., Nath S., Perez J. M.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 48, 2308 (2009).
8. Shi W., Liu X., Zhang X., Huang Y.: *Sci. Sin. Chim.* 44, 1633 (2014).

**N. Zemanová, M. Kunešová, and V. Pilařová**  
(*Faculty of Environment, J. E. Purkyně University, Ústí nad Labem*): **Evaluation of the Activity of Reactive Sorbents by Using the Standard Fhosphatase Test**

Since recently, nanoparticles of certain metal oxides (e.g. oxides of Ti, Ce, Fe), the so called reactive sorbents, have been used for absorption or for decomposition of hazardous chemicals. The present article deals with the assessment of the phosphatase-mimetic activity of reactive sorbents made for decomposition of dangerous organo-phosphorus compounds such as pesticides or nerve gases. The aim was to find a quick, simple and robust method for comparing the phosphatase activity of these reactive sorbents. For this purpose, a standard and commercially available test was selected. This test is used for determination of the catalytic concentration of alkaline phosphatase in blood serum (ALP-MEG L 500, Erba Lachema, Brno, Czech Republic). The test was modified and optimized for the evaluation of phosphatase-mimetic activity of various types of reactive sorbents under static or kinetic conditions. Both methods were validated and the analytical characteristics discussed.

Dovolujeme si pozvat všechny příznivce anorganické chemie na **2. konferenci POKROKY ANORGANICKÉ CHEMIE**, která se bude konat ve dnech **19. - 23. 6. 2016** v Kutné Hoře. Cílem toho setkání je vytvořit fórum pro prezentaci jednotlivých týmů působících ve všech oblastech anorganické chemie v České a Slovenské republice. **Uzávěrka pro zaslání abstraktů** (pro speciální číslo časopisu *Czech Chemical Society – Symposium Series*) je **15. dubna 2016**.



Další informace jsou k dispozici na www stránkách <http://www.natur.cuni.cz/panch2016>.