



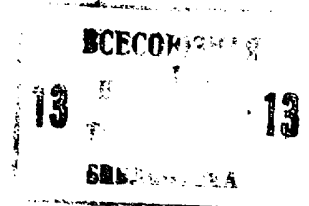
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1253439** **A3**

(51) 4 G 01 N 33/50

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- (21) 1974541/23-04
- (22) 04.12.73
- (31) P2259512.6, P2333798.6
- (32) 05.12.72, 03.07.73
- (33) DE
- (46) 23.08.86. Бюл. № 31
- (71) Берингер Маннхайм ГмбХ (DE)
- (72) Эрих Бернт, Вольфганг Грубер,
Эрих Хайд, Фритц Штэлер, Аугуст
Вильхельм Валефельд и Гюнтер
Вайманн (DE)
- (53) 547.466.07(088.8)
- (56) Clin. Clum. Acta, 31, 1971,
175-179.
- (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ γ -ГЛУТАМИЛ-
ТРАНСПЕПТИДАЗЫ
- (57) Изобретение касается аналити-
ческой химии, в частности способа

определения γ -глутамилтранспептида-
зы (ГТП), используемой для диагности-
ки заболеваний печени. Для интенсифи-
кации процесса используют другое бо-
лее растворимое замещенное γ -глта-
мил- β -анилида - γ -глутамил-3-суль-
фо (или карбокси)- β -анилид (ГА). Оп-
ределение ГТП ведут обработкой ГА
глицинолицином при добавлении чело-
веческой сыворотки. Далее определяют
изменение оптической плотности (ОП)
и скорость образования гидролизованно-
го продукта. По разности ОП в минуту,
берут средние значения и рассчитывают
показатель энзимной активности. Снижа-
ется в два раза продолжительность опре-
деления, максимальная концентрация ГА
составляет 6-8 ммоль против 2,9.

(19) **SU** (11) **1253439** **A3**

Изобретение относится к усовершенствованному способу определения γ -глутамилтранспептидазы, которая используется в клиническо-химических лабораториях для диагностики заболеваний печени.

Цель изобретения - интенсификация процесса.

Поставленная цель достигается за счет использования в качестве субстрата γ -глутамил-3-сульфо-(или карбокси) α -анилида.

Пример 1. Получение γ -глутамил- α -нитроанилид-3-карбоновой кислоты (GLU PA-3-карбоновой кислоты).

9,1 г 2-нитро-5-аминобензойной кислоты (50 мг-моль) и 14,2 ангидрида фталоилглутаминовой кислоты (55 мг-моль) растворяют в 50 мл абсолютного диоксана с добавлением 13 мл трибутиламина. Реакционную смесь кипятят в течение 2 ч при обратном потоке. После охлаждения в реакционную смесь добавляют 100 мл 2 н. аммиака и извлекают взбалтыванием выделившийся трибутиламин с эфиром. Водный раствор концентрируют досуха, растворяют в метиловом спирте и с помощью 80%-ного гидразингидрата устанавливают pH 10. Реакционный раствор выдерживают около 20 ч при комнатной температуре. При этом частично выделяется продукт, который затем фильтруют и промывают метиловым спиртом. Метанольный фильтрат концентрируют досуха и растворяют остаточное масло приблизительно в 300 мл дистиллированной воды.

Этот водный раствор хроматографируют над колонкой с 100 мл Довекс (Dowex) формиатной формой, промывают 300 мл дистиллированной воды, градуируя 2 л воды 0,5 н. раствора карбоната аммония. Элюат собирают 100 мл фракциями и исследуют методом тонкослойной хроматографии в системе бутанол: ледяная уксусная кислота: вода в соотношении 50:15:15 (проявление хроматограмм: в ультрафиолетовом свете синие пятна или после увлажнения нингидрином и последующего нагрева - коричневые пятна зон, содержащих аминокислоту). Фракции, содержащие продукт: глутаминовая кислота - α -нитроанилид-3-карбоновая кислота (значение R_f 0,25), собирают и концентрируют в вакууме досуха. Оставшийся порошок перемешивают в абсолютном спирте, фильтруют и сушат в вакууме над хлористым кальцием.

Выход 7 г γ -глутамил- α -нитроанилид-3-карбоновой кислоты, моноаммониевая соль (58% теоретического).

Ультрафиолетовый спектр: $\lambda_{\text{макс}} = 317 \text{ нм}$, $\epsilon = 11,7 \text{ см}^2/\text{моль}$ при 317 нм.

Пример 2. Применение γ -глутамил- α -нитроанилид-3-карбоновой кислоты (GLU PA-карбоновой кислоты) для определения γ -глутамилтранспептидазы (γ -GT).

При энзиматическом расщеплении высвобождается 2-нитро-5-аминобензойная кислота.

Проведение измерения.

В кювету вводят пипеткой 1 М трис-буфер, 100 мг-моль глицилглицина, pH 8,25-2,8 мл 130 мг-моль GLU PA-3-карбоновой кислоты в указанном буфере 0,2 мл, нагревают до 25°C, определение начинают при добавлении человеческой сыворотки 0,2 мл, смешивают, оптическую плотность отсчитывают при 405 нм, одновременно включают хронометр. Через 1,2 и 3 мин отсчет повторяют.

По разности оптических плотностей в минуту ($\Delta E/\text{мин}$) берут средние значения и вводят его в расчет.

Расчет ведут следующим образом.

Международная единица U является энзимной активностью, которая при 25°C переводит 1 ммоль субстрата в минуту. Это будет отнесено к 1 мл жидкости тела, например, сыворотки. Для расчета энзимной активности на мл (A) используют общую формулу

$$A = \frac{V}{\text{мин}} \cdot \frac{100}{\epsilon \cdot d \cdot V} \cdot \Delta E (\text{мУ/мл})$$

Коэффициент экстинкции (ϵ) 3-карбокси-4-нитроанилина составляет в условиях опыта при 405 нм 9,4 см²/ммоль. Толщина (d) слоя кюветы 1 см, объем используемой сыворотки (V) 0,2 мл, сумма объемов (v) 3,2 мл. Измерение затухания E осуществляется через промежутки в 1 мин. При этом

$$A = \Delta E (405 \text{ нм}) / \text{мин} \times 1702 (\text{мУ/мл}).$$

Пример 3. Получение γ -глутамил-4-нитроанилид-3-сульфоновой кислоты.

115 г анилин-4-нитро-3-сульфоновой кислоты и 150 г ангидрида фталоилглутаминовой кислоты суспендируют в 2 л абсолютного диметилформамида и затем нагревают на масляной бане до 145°C. При достижении этой температуры сус-

пензию выдерживают в течение 1 ч при 145°C и затем охлаждают. Осадок отфильтровывают и концентрируют фильтрат досуха. Маслянистый остаток растворяют в метаноле и устанавливают pH 9 80%-ной гидроокисью гидразина. Через 24 ч отсасывают образовавшиеся кристаллы и промывают небольшим количеством метилового спирта. Фильтрат сушат и при охлаждении осторожно разлагают охлажденным ацетоном. Образующийся при этом осадок отсасывают, промывают хорошо ацетоном и растворяют остаток в воде при перемешивании. Нерастворимый в воде остаток отфильтровывают и с помощью аммиака устанавливают pH раствора 7,5. Путем добавления ацетона выкристаллизовывается аммониевая соль γ -глутамил-4-нитроанилид-3-сульфоновой кислоты. Продукт очень хорошо кристаллизуется в светло-желтые кристаллики. Т.пл. = 186-187°C.

Максимум поглощения спектра при 290 нм $\epsilon = 4,57 \text{ см}^2/\text{ммоль}$.

Выход около 115-120 г, причем 15-20 г можно еще получить из кристаллизационного маточного раствора.

Общий выход около 135 г соответствует 70% теоретического.

Растворимость соединения при комнатной температуре хорошая и достигает около 160% степени превращения γ -глутамил- α -нитроанилида при одинаковых условиях.

Пример 4. Применение GLU PA-3-сульфоновой кислоты для определения γ -GT.

При энзиматическом расщеплении соединения по предлагаемому способу высвобождается α -нитроанилид-3-сульфоновая кислота.

Проведение измерения.

Пипеткой вводят в кювету 0,1 трис-буфер, 150 мг-моль шлицилглицина, pH 8,5 - 2,8 мл 130 мг-моль GLU PA-3-сульфоновой кислоты в вышеприведенном буфере 0,2 мл, нагревают до 25°C, определение начинают добавкой человеческой сыворотки 0,24 мл, перемешивают, оптическая плотность отсчитывается при 405 нм, одновременно включают хронометр. Точно через 1, 2 и 3 мин повторяют отсчет.

По разностям оптических плотностей в 1 мин ($\Delta E/\text{мин}$) находят среднее значение и вводят его в расчеты.

Расчет ведут следующим образом.

Международная единица U является энзимной активностью, которая при 25°C превращается 1 ммоль субстрата в минуту. Это будет отнесено к 1 мл жидкости тела, например сыворотки. Для расчета энзимных активностей на мл (A) используют общую формулу

$$A = \frac{V \cdot 1000}{\text{мин} \cdot \epsilon \cdot d \cdot V} \cdot \Delta E (\text{мУ/мл})$$

Коэффициент экстинкции (ϵ) α -нитроанилид-3-сульфоновой кислоты в условиях опыта при 405 нм составляет 5,45 $\text{см}^2/\text{ммоль}$. Толщина (d) слоя кюветы 1 см, объем введенной сыворотки (V) 0,2 мл, сумма объемов (v) 3,2. Измерение оптической плотности ϵ осуществляют через промежутки в 1 мин. Отсюда получают

$$A = \Delta E (405 \text{ нм}) / \text{мин} \times 2936 (\text{мУ/мл}).$$

Предлагаемый способ определения γ -глутамилтранспептидазы, предусматривающий использование в качестве субстрата γ -глутамин-3-сульфо(или карбокси)- α -анилид по сравнению с известным, где в качестве субстрата используют γ -глутамил- α -нитроанилид, позволяет значительно интенсифицировать процесс. Максимальная скорость реакции достигается при концентрации лишь в интервале 6-8 ммоль, что осуществимо лишь с субстратом согласно изобретению благодаря его хорошей растворимости. Максимально достигаемая концентрация при использовании известного субстрата составляет 2,9 ммоль, в связи с очень ограниченной его растворимостью.

В соответствии с изобретением при использовании карбоксильного производного достигают увеличение скорости реакции на 20%, а в случае производного сульфокислоты в два раза больше скорость. Это значит, что продолжительность определения может быть уменьшена вдвое.

Формула изобретения

Способ определения γ -глутамилтранспептидазы путем обработки замещенного γ -глутамил- α -анилида глицилглицином при добавлении человеческой сыворотки и измерения скорости образования гидролизованного продук-

та, отличающийся тем,
что, с целью интенсификации процесса,
в качестве замещенного μ -глутамил-
- η -анилида используют μ -глута-
мил-3-сульфо (или карбокси) - η -ани-
лид.

Приоритет по признакам:

05.12.72 исходный продукт -
-глутамил-3-карбокси-
- η -анилид.

03.07.73 исходный продукт - глута-
мин-3-сульфо- η -анилид.

Редактор О. Головач	Составитель Л. Иоффе Техред В. Кадар	Корректор С. Черни
---------------------	---	--------------------

Заказ 4634/60

Тираж 778

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4