

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

67 973

Patent dodatkowy
do patentu

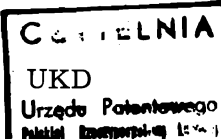
Zgłoszono: 06.IV.1968 (P 126 277)

Pierwszeństwo: 20.IV.1967 Niemiecka
Republika
Demokratyczna

Opublikowano: 25.VI.1973

Kl. 421,3/54

MKP G01n 33/16



Współtwórcy wynalazku: Reinhard Haschen, Wolfgang Farr, Dieter Reichelt, Norbert Rehfeld

Właściciel patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul (Niemiecka Republika Demokratyczna)

Sposób oznaczania enzymów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób oznaczania enzymów, szczególnie przydatnych do ilościowego, kolorymetrycznego oznaczania aryloamidazy kwasu aminokarboksyłowego w surowicy krwi.

Metody ilościowego oznaczania aryloamidazy kwasu aminokarboksyłowego, określanej często jako tak zwana leucyno-aminopeptydaza, są znane. W metodach tych jako substraty stosowane są głównie p-nitroanilid leucyny, względnie β-naftyloamid leucyny.

Wolna p-nitroanilina, wywiązująca się z p-nitroanilidu leucyny może być, dzięki własnemu żółtemu zabarwieniu, bezpośrednio oznaczona fotometrycznie. Wykrycie wolnej β-naftyloaminy, wywiązującej się z β-naftyloamidu leucyny może nastąpić wskutek reakcji wymiany z solą dwuazotową — czerwień kwasowa 3GL, naftyloetylenodwuaminą po dwuazowaniu lub reakcji wymiany z p-N-N-dwumetyloaminobenzaldehydem. Aryloamidaza kwasu aminokarboksyłowego może być również oznaczana za pomocą L-alanino-4(fenylazo)-fenyloamidu. Wolna fenylo-azofenyloamina, wywiązująca się na skutek działania enzymu, wykazuje po zakwaszeniu czerwone zabarwienie, które po odwirowaniu oznacza się kolorymetrycznie.

Te znane metody wykazują jednak wiele wad. Reagenty zawierające N-podstawioną leucynę nie są bowiem optymalne dla aryloamidazy kwasu aminokarboksyłowego, pod względem charakterystyki i czułości. Zastosowanie alanino-4(fenylazo)

2

fenyloalaniny wymaga ponadto odwirowania przed pomiarem.

Celem wynalazku jest opracowanie takiej metody oznaczania aryloamidazy kwasu aminokarboksyłowego, która z uwagi na swoją czułość wykrywania, może mieć zastosowanie w klinicznej diagnostyce przy schorzeniach wątroby, trzustki, nerek i jelit.

Stwierdzono, że aryloamidaza kwasu aminokarboksyłowego posiada zdolność rozkładania związków alaniny, takich jak hydrazyd alaniny, β-naftyloamid alaniny i p-nitroanilid alaniny, lepiej i w sposób bardziej charakterystyczny, aniżeli związki leucyny.

Sposób będący przedmiotem wynalazku charakteryzuje się tym, że badany materiał, w którym oznacza się aryloamidazę kwasu aminokarboksyłowego, traktuje się hydrazidem DL-alaniny, a odszczepioną wskutek hydrolitycznego działania aryloamidazy kwasu aminokarboksyłowego, hydrazynę poddaje się kondensacji z aromatycznym aldehydem, w szczególności p-N-N-dwumetyloaminobenzaldehydem, przy czym powstaje żółty barwnik, względnie traktuje się β-naftyloamidem DL-alaniny, a wolną β-naftyloaminę, wywiązującą się wskutek działania aryloamidazy kwasu aminokarboksyłowego, poddaje się reakcji z aldehydem aromatycznym, przy czym powstaje żółty barwnik, względnie traktuje się p-nitroanilidem L-alaniny, a odszczepioną, wskutek działania aryloamidazy kwa-

su aminokarboksylowego, p-nitroanilinę oznacza się bezpośrednio metodą kolorymetryczną. Hydrolizę związków alaniny aryloamidazą kwasu aminokarboksylowego prowadzi się w zależności od warunków inkubacji przy pH=6, 5—7, 5. W przypadku pierwszej i drugiej odmiany sposobu równocześnie z kondensacją hydrazyny względnie β-naftyloaminy, przykładowo z p-dwumetyloaminobenzaldehydem, nastawia się roztwór na kwaśne pH tak, że tworzy się pomarańczowo-czerwona sól. Przez zakwaszenie roztworu reakcja enzymatyczna zostaje przerwana. Ekstynkcję proporcjonalnych w stosunku do aktywności aryloamidazy kwasu aminokarboksylowego ilości barwnej soli, oznacza się przy długości fali 455 względnie 450 milimikronów. Sposób według wynalazku umożliwia szybkie i ilościowe oznaczanie aryloamidazy kwasu aminokarboksylowego, na przykład w surowicy krwi. Sposób ten ma ponadto tę zaletę, w stosunku do znanych metod wykrywania, że reakcja jest w daleko idącym stopniu charakterystyczna.

W stosunku do znanej metody oznaczania, w której jako substrat stosowany jest alanino-4-(fenyloazo)-fenyloamid, sposób według wynalazku daje tę korzyść, że hydrazyd alaniny daje się łatwiej syntetyzować, a więc jest ekonomiczniejszy, zaś molarny współczynnik ekstynkcji jest około 4-5 razy wyższy. Reakcja przy użyciu β-naftyloamidu alaniny jest bardziej charakterystyczna, ponieważ pod wpływem enzymu ulega on łatwiej rozkładowi. Molarny współczynnik ekstynkcji jest 5-cio krotnie wyższy. β-naftyloamid alaniny może mieć również zastosowanie w histochemii aryloamidazy kwasu aminokarboksylowego.

W przypadku oznaczania przy użyciu p-nitroanilidu alaniny, wielkość molarnego współczynnika ekstynkcji jest tego samego rzędu. Metodę można stosować jako tekst kinetyczny.

W żadnej z podanych trzech metod nie występuje zjawisko wytrącania się białka i w związku z tym nie zachodzi konieczność odwirowania przed pomiarem.

Wynalazek objaśniono bliżej trzema przykładami.

Przykład I. Hydrazyd alaniny jako reagent. 0,6 ml buforowego roztworu reagenta, składającego się z 5 części 0,6 molarnego buforu trójetanolaminowy o pH=7,15 i 1 części 224 milimolarnego wodnego roztworu hydrazidu DL-alaniny, ogrzewa się do temperatury 25°C i dodając 0,1 ml surowicy lub roztworu enzymu poddaje przez określony okres czasu inkubacji (w przypadku surowicy okres inkubacji wynosi 15 minut). Następnie dodaje się 5 ml odczynnika wywołującego zabarwienie, składającego się z 1 części roztworu zawierającego 4 g p-N-N-dwumetyloaminobenzaldehydu w 100 ml 96%-owego etanolu lub metanolu i 17 części 0,1 normalnego kwasu solnego i po upływie 30 minut, w czasie których tworzy się zabarwienie, przeprowadza się pomiar przy długości fali 455 milimikrona, w odniesieniu do odczynnika wywołującego zabarwienie. Ślepą próbę przeprowadza się w sposób analogiczny z tą tylko różnicą, że stosowany roztwór enzymu dodaje się po uprzednim dodaniu odczynnika.

Przykład II. β-naftyloamid alaniny jako reagent.

1 ml 0,75 milimolarnego roztworu β-naftyloamidu DL-alaniny w 0,05 molarnym buforze fosforanowym o pH=7,0, ogrzewa się do temperatury 25°C i dodając 0,02 ml surowicy lub roztworu enzymu poddaje przez określony czas inkubacji (w przypadku surowicy okres inkubacji wynosi 30 minut). Następnie dodaje się 2 ml 0,4 normalnego kwasu solnego i 2 ml 4%-ego metanolowego roztworu p-N-N-dwumetyloaminobenzaldehydu i po upływie 10 minut, w czasie których wytwarza się zabarwienie, przeprowadza się pomiar przy długości fali 450 milimikrona, w odniesieniu do analogicznie przeprowadzonej ślepej próby, w której jednak roztwór enzymu dodaje się po uprzednim dodaniu kwasu solnego.

Przykład III. p-nitroanilid alaniny jako reagent. 2 ml milimolarnego roztworu p-nitroanilidu alaniny w 0,05 molarnym buforze fosforanowym o pH=7,0, ogrzewa się do temperatury 25°C, dodaje się 0,1 ml surowicy lub roztworu enzymu i dokonuje pomiaru przy długości fali 405 milimikronów w odniesieniu do wody, a następnie poddaje inkubacji przez określony okres czasu (w przypadku surowicy okres inkubacji wynosi 15 minut). Następnie ponownie wykonuje się pomiar przy długości fali 405 milimikronów.

Sposób według wynalazku ma te zalety, że hydrazyd alaniny, stosowany jako reagent, jest łatwy do syntetyzowania, a sama metoda jest analogiczna do metody oznaczania aminopeptydazy leucyny, wymaga takich samych reagentów w jednakowym stężeniu, dzięki czemu może być stosowana do równoległego oznaczania aminopeptydazy leucyny. Błąd metodyczny wynosi 2,7% p-nitroanilid alaniny daje produkt rozkładu, który można bezpośrednio oznaczać. Błąd metody wynosi 4,8%. β-naftyloamid alaniny jest reagentem ulegającym rozkładowi, pod wpływem aryloamidazy kwasu aminokarboksylowego, z podwyższoną szybkością. Metoda ta obciążona jest błędem wynoszącym 2% i stanowi doskonałą mikrometodę.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oznaczania enzymów, w szczególności ilościowego kolorymetrycznego oznaczania aryloamidazy kwasu aminokarboksylowego **znamienny tym**, że podstawione przez aryloamidazę kwasu aminokarboksylowego pochodne alaniny rozszczepia się, a odszczepiony podstawnik przekształca na drodze reakcji wymiany w barwnik, który oznacza się kolorymetrycznie, względnie odszczepiony podstawnik oznacza się bezpośrednio kolorymetrycznie.

2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako charakterystyczny reagent przy ilościowym oznaczaniu aryloamidazy kwasu aminokarboksylowego metodą kolorymetryczną stosuje się hydrazyd DL-alaniny, β-naftyloamid DL-alaniny lub p-nitroanilid L-alaniny.

3. Sposób według zastrz. 1 i 2 **znamienny tym**, że hydrolizę podstawionych przez aryloamidazę kwasu aminokarboksylowego pochodnych alaniny prowadzi się ściśle przy pH=6,5 — 7,5.

4. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że barwnik oznacza się kolorymetrycznie przy pH poniżej 7.