



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 17.11.77 (P. 202204)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 27.08.79

Opis patentowy opublikowano: 10.08.1982

Int. Cl.²

G01N 31/14

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego

Twórcy wynalazku: Mieczysław Sokołowski, Barbara Iwanicka

Uprawniony z patentu: Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii, Warszawa (Polska)

Sposób wykrywania inhibitorów enzymów z grupy cholinioesteraz na podłożach chłonnych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania inhibitorów enzymów z grupy cholinioesteraz na podłożach chłonnych za pomocą reakcji enzymatycznej.

Inhibitory enzymów z grupy cholinioesteraz stanowią główny składnik czynny na przykład wielu środków ochrony roślin zwłaszcza fosforoorganicznych i także innych jak chloroorganicznych, karbaminowych. Związki te charakteryzują się wysoką toksycznością spowodowaną inhibicyjnym w stosunku do cholinioesteraz działaniem składnika czynnego. W związku z powszechnym i masowym stosowaniem pestycydów wynika konieczność szybkiej detekcji inhibitorów enzymów z grupy cholinioesteraz zarówno w miejscu ich stosowania jak i w wodach, ściekach oraz na stanowiskach pracy w zakładach produkujących te środki.

W dotychczas znanych sposobach wykrywania inhibitorów enzymów z grupy cholinioesteraz z wykorzystaniem reakcji enzymatycznej stosuje się preparaty enzymatyczne w postaci homogenizatów z tkanek zwierzęcych bogatych w cholinioesterazy np. mózg, wątroba, krew i jej składniki. Preparaty takie jako nietrwałe, niepowtarzalne pod względem składu, kłopotliwe w otrzymywaniu stanowią poważne ograniczenie zastosowania ich w metodach enzymatycznych, a stają się bardzo kłopotliwe w przypadku konieczności natychmiastowego przeprowadzenia analizy. Jako drugi odczynnik w reakcji enzymatycznej stosuje się

2

ester ulegający hydrolizie pod wpływem enzymu.

Ponieważ podstawą wizualizacji substancji na podłożu chłonny jest występowanie barwy lub fluorescencji więc w enzymatycznej metodzie detekcji substancją chromo- lub luminogenną musi być ester bądź jeden z produktów jego hydrolizy. Warunek ten ograniczał dotychczas stosowanie estrów specyficznych dla cholinioesteraz i jej pochodnych — estrów cholicy. W znanej metodzie z użyciem substratów cholinowych otrzymuje się bądź detekcję „negatywową” bądź „pozytywową”, ale w celu uzyskania „pozytywowej” używa się wskaźniki acydymetryczne, wykrywa wydzielony w reakcji kwas, co z powodu możliwości przypadkowego występowania związków o charakterze kwaśnym lub zasadowym może powodować błędy w oznaczeniu.

Powszechnie stosowanymi substratami niecholinowymi są estry naftoli, azonaftoli i pochodnych indolu. Stosowanie substratów niespecyficznych powoduje nie tylko obniżenie czułości i wydłużenie czasu reakcji, ale także powstawanie nieczytelnych „negatywowych” obrazów.

Celem rozwiązania według wynalazku jest znalezienie sposobu, który by zapewnił przeprowadzenie analizy szybko z uzyskaniem jednoznacznego wyniku badania z kontrastowym „pozytywowym” obrazem także w prymitywnych warunkach polowych. Według wynalazku sposób polega na tym, że stosuje się preparaty enzymatyczne zawierające

cholinoesterazy szczególnie preparaty fabryczne, tioestry a zwłaszcza estry tiocholiny i substancje barwne dające w reakcji z tiolem bezbarwne produkty.

Wskutek hydrolizy tioestru powstaje tioalkohol. Grupy — SH tioalkoholu reagują z substancją barwną w wyniku czego substancja barwna przekształca się w produkt bezbarwny. Sposób detekcji jest czuły, szybki i uzyskuje się „pozytywny” obraz z wyraźną kontrastową zmianą barwy; na białym tle powierzchni podłoża wytworzonym wskutek przereagowania substancji barwnej z tioalkoholem pozostają barwne plamy stanowiące miejsca inhibitorów cholinoesteraz.

Jako źródło cholinoesteraz stosuje się szczególnie preparaty fabryczne produkowane według ustalonych przepisów otrzymywania i testowania trwale w czasie o znanej aktywności i pozbawione balastu białkowego.

Jako podłoże chłonne można stosować różne materiały na przykład płytki do chromatografii cienkowarstwowej, bibułę, włókninę, taśmy tekstylne.

Jednym z warunków prawidłowego przebiegu reakcji enzymatycznej jest określone pH środowiska. Ponieważ stosowane w sposobie według wynalazku podłoża mają bardzo zróżnicowany odczyn, w związku z tym do przeprowadzenia reakcji używa się odczynników w postaci odpowiednich roztworów na przykład wodnych lub buforowych.

Sposób według wynalazku można stosować do kolorymetrycznych oznaczeń inhibitorów w roztworach, z tym, że pomiar jest kłopotliwy, ponieważ kolorymetrowanie przebiega nie wprost.

Jako tioestry stosuje się na przykład chlorki, bromki i jodki acetylo-propionyl-, butyrylo-, benzoilo-, tiocholiny i jej alkilo pochodnych.

Jako substancje barwne stosuje się na przykład związki o wzorze:

$(R)_2 N-C_6H_4-C(R_1)(OH)-C_6H_4-N(R_2)_2$, w którym R oznacza alkil, a R_1 oznacza wodór lub alkil.

Sposób detekcji według wynalazku wykonuje się w ten sposób, że podłoże spryskuje się wodnym lub buforowym roztworem preparatu cholinoesterazy o określonej aktywności. Następnie spryskuje się roztworem wodnym lub buforowym estru tiocholiny i substancji barwnej. Wkrótce ukazują się na białym tle powierzchni podłoża barwne plamy inhibitorów cholinoesteraz.

Sposób według wynalazku ilustrują przykłady wykonania.

Przykład I. Rozwinięty i wysuszony chromatogram na płycie gotowej (Art. 5553 f-my

Merck) spryskuje się roztworem cholinoesterazy z surowicy krwi końskiej (prod. Biowet Puławy) w buforze boranowym o pH 8,5 którego aktywność wynosi 20 j. a/cm². Następnie chromatogram spryskuje się roztworem wodnym zawierającym 0,5 g jodku butyrylotiocholiny i 0,012 g 4,4'-dwumetyloaminodwufenylokarbinolu w 100 ml roztworu. Po niedługim czasie ukazują się na białym tle niebieskie plamy inhibitorów cholinoesteraz.

Przykład II. Płytkę chromatograficzną f-my Merck (Art. 5737); preparat fabryczny cholinoesterazy 10 j. a/cm² w buforze boranowym pH 9; substrat — 50 mg chlorku acetylotiocholiny i 2 mg 4,4'-bis-dwumetyloaminodwufenylokarbinolu w 25 cm³ H₂O. Występują kontrastowe barwne plamy inhibitorów cholinoesteraz.

Przykład III. Płytkę chromatograficzną f-my Merck (Art. 5551); enzym — 15 j. a/cm² w buforze octanowym pH 4,2; substrat — 150 mg jodku butyrylotiocholiny i 40 mg 4,4'-bis-dwumetyloaminodwufenylokarbinolu w 25 cm³ buforu octanowego o pH 4,2 występują kontrastowe plamy.

Przykład IV. Podłoże — celuloza mikrokrystaliczna; enzym — 10 j. a/cm² w H₂O; substrat — 70 mg jodku butyrylotiocholiny i 3 mg 4,4'-bis-dwumetyloaminodwufenylokarbinolu w 25 cm³ H₂O. Występują barwne plamy.

Przykład V. Podłoże — bibuła zawierająca 30% silikażelu; enzym 5 j. a/cm² w H₂O; substrat — 50 mg jodku acetylotiocholiny i 2 mg 4,4'-bis-dwumetyloaminodwufenylokarbinolu w 25 cm³ H₂O. Występują barwne plamy.

Przykład VI. Podłoże — tlenek glinu; enzym — 20 j. a/cm² w H₂O; substrat — 100 mg jodku butyrylotiocholiny i 4 mg 4,4'-bis-dwumetyloaminodwufenylokarbinolu w 25 cm³ H₂O. 5 minut po spryskaniu roztworem substratu wkłada się płytkę na parę minut w parę kwasu octowego. Występują barwne plamy.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wykrywania inhibitorów enzymów z grupy cholinoesteraz na podłożach chłonnych za pomocą reakcji enzymatycznej polegającej na traktowaniu podłoża chłonnego preparatem enzymatycznym powodującym hydrolizę estrów, substratem będącym estrem i wskaźnikiem stopnia hydrolizy substratu, znamienny tym, że stosuje się preparaty enzymatyczne zawierające cholinoesterazy tioestry, zwłaszcza estry tiocholiny i substancje barwne dające w reakcji z powstającym tiolem bezbarwne produkty.