

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

68367

Patent dodatkowy
do patentu

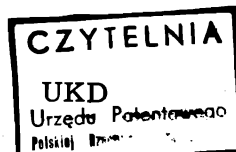
Kl. 421,3/54

Zgłoszono: 19.II.1968 (P 125 337)

Pierwszeństwo: 27.II.1967 Niemiecka
Republika
Demokratyczna

MKP G01n 33/16

Opublikowano: 10.VI.1973



Współtwórcy wynalazku: Reinhard Haschen, Wolfgang Farr, Dieter Reichelt
Właściciel patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul (Niemiecka Republika
Demokratyczna)

Sposób oznaczania enzymów

1

Wynalazek dotyczy metody oznaczania enzymów zwłaszcza do ilościowego, kolorymetrycznego oznaczania leucy-
noaminopeptydazy w plazmie i surowicy krwi.

Znane są metody ilościowego oznaczania aktywności enzymatycznej leucy-
noaminopeptydazy. W metodach tych jako reagent charakterystyczny stosowany jest amid leucyny. Wolna leucyna, wywiązując się z amidu leucyny pod działaniem leucy-
noaminopeptydazy, może być ilościowo oznaczona poprzez ilościowe oznaczenie grup karboksylowych względnie zasadowych na drodze miareczkowania.

Wywiązująca się pod działaniem enzymu wolna leucyna może również zostać oddzielona od amidu leucyny za pomocą chromatografii bibułowej i oznaczona drogą bezpośrednią, poprzez kolorymetryczne oznaczenie barwnika, tworzącego się w czasie reakcji leucyny z ninhydriną i po ustabilizowaniu go jonami Cu^{++} . Wywiązujący się z leucyno-
amidu, pod działaniem enzymu, wolny amoniak może zostać chemicznie związany z kwasem ortoborowym i oznaczony poprzez miareczkowanie kwasem. Określony enzymem przyrost azotu amonowego można mierzyć za pomocą metody ninhydrinowej.

Oprócz wymienionych metod istnieje wiele metod oznaczania leucy-
noaminopeptydazy za pomocą reagentów chromogenowych. Wolna p-nitroanilina, wywiązująca się z p-nitroanilidu leucyny pod działaniem leucy-
noaminopeptydazy, może być oznaczona bezpośrednio fotometrycznie dzięki żółtemu zabarwieniu. Wolna β -naftyloamina, wywiązująca się z β -naftyloamidu leucyny pod działaniem leucy-
noaminopeptydazy, może być oznaczona poprzez kolorymetryczne ozna-

2

czenie barwnika, powstającego w czasie reakcji β -naftylo-
aminy z solą dwuazoniową.

Te znane metody wykazują jednak wiele wad. Obok dro-
biazgowego i pracochłonnego toku postępowania jak i nie-
dostatecznej czułości, przykładowo w metodzie w której sto-
sowany jest amid leucyny, metody te są nieprzydatne do
stosowania w systemie ciągłym. Ponadto metody wykry-
wania, posługujące się reagentami chromogenowymi, wyka-
zują niedostateczną czułość, ponieważ p-nitroanilid i β -nafty-
loamid, przeważnie albo wyłącznie, hydrolizowane są po-
przez aryloamidazę kwasu aminokarboksylowego.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu oznaczania
leucy-
noaminopeptydazy, który z uwagi na czułość wykry-
wania jest przydatny w systemie ciągłym klinicznej diagno-
styki marskości wątroby. Podstawowym zadaniem wynalazku
jest znalezienie substratu, który byłby charakterystyczny dla
leucy-
noaminopeptydazy i którego produkty rozkładu można
by oznaczać w sposób łatwy i szybki, przy zachowaniu dużej
czułości metody wykrywania.

Stwierdzono, że leucy-
noaminopeptydaza posiada zdol-
ność hydrolitycznego rozkładu hydrazidu L-leucyny na
L-leucynę i hydrazynę równą, tak pod względem siły jak
i warunków, zdolności amidu L-leucyny będącego znanym
odczynnikiem charakterystycznym dla leucy-
noaminopep-
tydazy.

Sposób według wynalazku polega na tym, że badany ma-
teriał, w którym ma być oznaczona leucy-
noaminopeptydaza, traktuje się hydrazidem DL-leucyny, a odszczepioną na sku-
tek hydrolitycznego działania leucy-
noaminopeptydazy
hydrazynę kondensuje się z aromatycznym aldehydem,

przede wszystkim p-dwumetyloaminobenzaldehydem, uzyskując żółty barwnik. Hydrolizę hydrazidu DL-leucyny pod działaniem leucynoaminopeptydazy prowadzi się, w zależności od warunków procesu inkubacji, w zakresie pH = 9,0–10,2. Równocześnie ze sprzężaniem wolnej hydrazyny, tworzącej się z hydrazidu DL-leucyny pod działaniem leucynoaminopeptydazy, przykładowo z p-dwumetyloaminobenzaldehydem, roztwór nastawia się na pH poniżej 7 tak, że z powstałego, na skutek kondensacji, żółtego barwnika tworzy się pomarańczowożółta sól. Sól ta charakteryzuje się wysokim molarnym współczynnikiem absorpcji tak, że czułość wykrywania leucynoaminopeptydazy, w porównaniu z innymi znanymi metodami, jest znacznie wyższa. Równocześnie z zakwaszeniem roztworu reakcja enzymatyczna zostaje przerwana. Ekstynkcję leucynoaminopeptydazy, odpowiadającą proporcjonalnym ilościom barwnej soli, mierzy się przy maksimum absorpcji odpowiadającemu 455 milimikromom.

Sposób według wynalazku umożliwia szybkie ilościowe oznaczenie zawartości leucynoaminopeptydazy w surowicy i plazmie krwi. Ponadto sposób według wynalazku ma w stosunku do innych znanych metod tę zaletę, że jest bardzo charakterystyczny i wykazuje bardzo wysoką czułość.

Wynalazek wyjaśniony jest bliżej dwoma przykładami.

Przykład I. Metoda bez dodatkowej aktywacji. 0,5 ml buforowego roztworu substratu, składającego się z 4 części 0,2 molarnego buforu monoetanoloaminy o pH = 10,15 i 1 części 112 milimolarnego wodnego roztworu hydrazidu leucyny, termostatuje się do temperatury 25°C i poddaje przez określony czas inkubacji za pomocą 0,2 ml surowicy lub roztworu enzymu (dla surowicy okres inkubacji wynosi 60 minut). Następnie dodaje się 5 ml odczynnika wywołującego zabarwienie, składającego się z 1 części roztworu zawierającego w 100 ml 96% etanolu lub metanolu 4 g p-N-N-dwumetyloaminobenzaldehydu i 17 części 0,1 normalnego kwasu solnego i po upływie 30 minut, w czasie których wytwarza się zabarwienie, oznacza się eks-

tynkę osadów przy długości fali wynoszącej 455 milimikronów w stosunku do odczynnika wywołującego zabarwienie. Ślepą próbę wykonuje się w sposób analogiczny z tą tylko różnicą, że stosowany roztwór enzymu dodaje się dopiero po uprzednim dodaniu reagenta.

Przykład II. Metoda z aktywacją jonami Mg^{2+} . 0,3 ml buforowego roztworu aktywatora, składającego się z 5 części 0,25 molarnego buforu monoetanoloaminy o pH = 9,25 i 1 części 40 milimolarnego roztworu $MgCl_2$, poddaje się inkubacji wstępnej w temperaturze 25°C przez okres 2 godzin za pomocą 0,1 ml surowicy lub roztworu enzymu. Następnie dodaje się 0,1 ml 80 milimolarnego wodnego roztworu hydrazidu leucyny i poddaje inkubacji przez okres 30 minut w temperaturze 25°C. Po dodaniu 4,5 ml odczynnika powstaje zabarwienie. Pomiar wykonuje się w analogiczny sposób jak to opisano w przykładzie I. Ślepą próbę wykonuje się analogicznie z tą tylko różnicą, że roztwór enzymu dodaje się po uprzednim dodaniu odczynnika wywołującego zabarwienie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oznaczania enzymów, w szczególności ilościowego, kolorymetrycznego oznaczania leucynoaminopeptydazy, **znamienny tym**, że hydrazyd L-leucyny rozkłada się pod działaniem leucynoaminopeptydazy na L-leucynę i hydrazynę i następnie kondensuje się hydrazynę z aldehydem aromatycznym, a otrzymany barwnik oznacza się kolorymetrycznie.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aldehyd aromatyczny stosuje się p-N-N-dwumetyloaminobenzaldehyd.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hydrolizę hydrazidu leucyny przez leucynoaminopeptydazę prowadzi się ściśle przy pH = 9,0–10,2.

4. Sposób według zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że barwnik oznacza się kolorymetrycznie przy pH poniżej 7.