

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано в лабораторно-клинической практике.

Известны способы определения активности бромелаина - протеолитического сульфгидрильного фермента, выделенного из стеблей и плодов ананаса, основанные на расщеплении бромелаина биологических субстратов - азоказеина, азоколл, гемоглобина [Зимачева А.В., Иевлева И.Е., Фунг Хоа Хуан, Во Хонг Нянь, Мосолов В.В. Протеиназа из пролиферирующей верхушки плода ананаса//Прикл.биохимия и микробиология. -1994. - Т.30. - Вып.2. - С.215-222; Системная энзимотерапия /Под.ред.В.И.Мазурова, А.М.Лила, Ю.И.Стернина, СПб, 1995, 160 с; D. Rawan, D.J. Buttle, A.J.Barrett "The cysteine proteinase of the pineapple plant //Biochem J.-1990. -Vol. 266 -№3. - P.869-875].

Недостатками способов, в которых в качестве субстрата для определения активности бромелаина применяются азоказеин, азоколл, гемоглобин являются:

1) малая чувствительность способа: их пригодность для определения активности лишь высокоочищенных препаратов бромелаина;

2) невозможность использования способов для определения активности бромелаина, входящего в состав комбинированных ферментных коммерческих препаратов - ФЛОГЭНЗИМ, МУЛЬСАЛ, широко применяемых как лечебные средства в различных областях медицины.

Наиболее близким по технической сущности является способ определения активности бромелаина, заключающийся во взаимодействии его с биосубстратом - казеином и определении продукта его расщепления - тирозина [Иевлева Е В, Зимачева А.В. Фунг Хоа Хуан, Во Хонг Нянь, Мосолов В.В. Протеиназы из пролиферирующих верхушек плода ананаса//Прикл.биохимия и микробиология. - 1991. - Т.27. - Вып.5. - С.639-645].

Недостатком способа, принятого за прототип, является:

1) невысокая чувствительность способа, позволяющего определять активность бромелаина лишь при его концентрациях не менее 2,5 мкг;

2) непригодность способа для определения активности бромелаина, входящего в состав полиферментных смесей препаратов ФЛОГЭНЗИМ, МУЛЬСАЛ, применяемых в клиниках как противоотечные, противовоспалительные и иммуномодулирующие средства;

3) непригодность способа для определения активности бромелаина в сыворотке крови.

Изобретение направлено на разработку такого способа определения активности бромелаина, который позволит его выявить в минимальных количествах - в десятых долях (0,25 мкг) как в составе коммерческих препаратов, содержащих бромелаин, так и в его комбинации с другими протеолитическими ферментами (лечебные препараты ФЛОГЭНЗИМ, МУЛЬСАЛ), а также в сыворотке крови.

Задача состоит в том, чтобы повысить чувствительность и точность количественного определения активности бромелаина с помощью биосубстрата протамин сульфата, что позволит оценивать активность свободного бромелаина, в составе полиэнзимных лечебных препаратов и в сыворотке крови.

Реализация данного изобретения повысит точность определения активности бромелаина, что необходимо для изучения фармакинетики препарата после его перорального применения.

Для решения поставленной задачи разработан способ определения активности бромелаина, в котором, согласно изобретению, в качестве биосубстрата используется протамин сульфат, после взаимодействия с которым бромелаин отщепляет от него аргининсодержащие пептиды, количество которых служит мерой активности фермента.

Отличительной особенностью предлагаемого способа является та, что его чувствительность в 10 раз выше, чем в прототипе, что позволяет определять минимальные количества (0,25 мкг) в лечебных коммерческих препаратах и в сыворотке крови.

Заявляемый способ может быть использован при промышленной технологии получения лечебных препаратов бромелаина, оценке его активности на различных стадиях очистки, а также выяснения судьбы фермента в крови, определения времени его циркуляции в организме, что необходимо для оптимизации и повышения эффективности применения бромелаина в различных областях медицины.

Пример определения активности бромелаина с помощью заявляемого способа.

В полиэтиленовые пробирки отмеривают 0,05-0,2 мл (0,25-1,0 мкг) бромелаина, прибавляют 0,1 мл (4 мМ) цистеина в качестве активатора фермента; 0,1 мл ЭДТА (этилендиамин тетраацетата) (25 мМ). Смесь выдерживают 5 мин при температуре (20-22°С), после чего вносят 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,6 до конечного объема 0,8 мл и 0,2 мл 1% раствора протамин сульфата. Опытные пробы инкубируют в течение 10 мин при 35°С, после чего реакцию останавливают 1 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Контрольные пробы проводят аналогично, но протамин сульфат добавляют после трихлоруксусной кислоты. Опытные и контрольные пробы центрифугируют в течение 45 мин при 5000 об/мин и в 1 мл центрифугата определяют содержание аргинина по цветной реакции Сакагуши ( $E_{508}$ ). Количество отщепленного от протамин сульфата под действием бромелаина аргинина находят по калибровочной кривой (фиг.1).

Активность бромелаина

$$C = \frac{174,2 \times t \times C_1}{S}$$

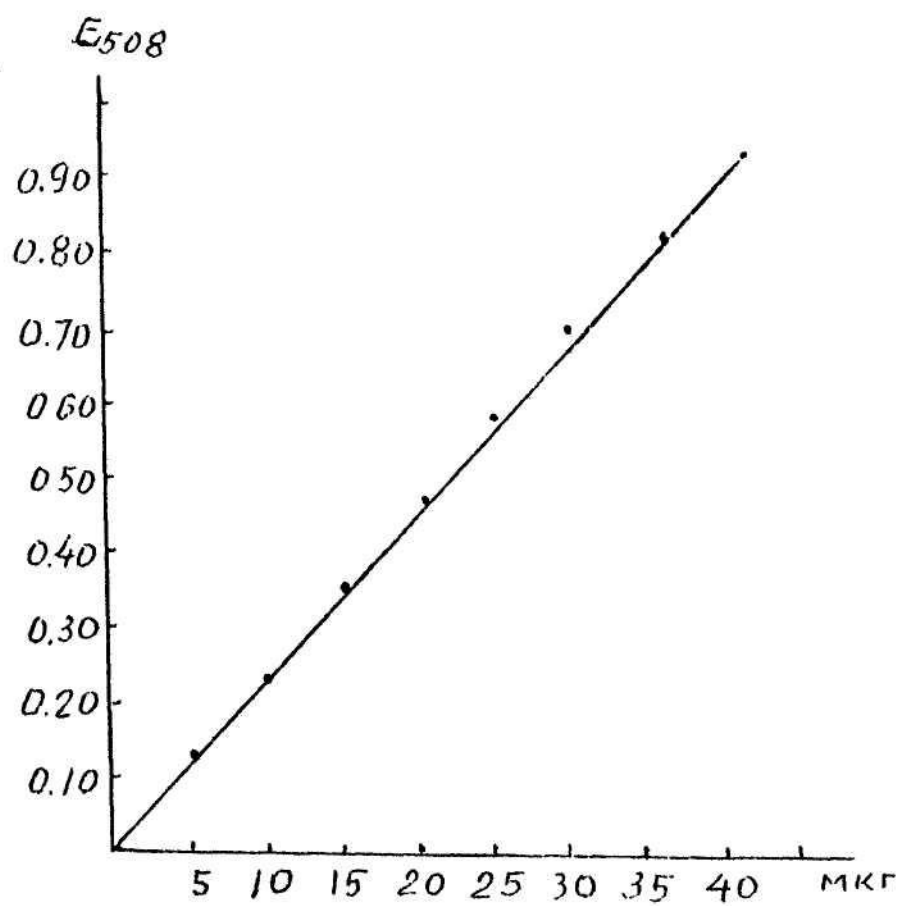
где С - количество аргинина, определяемое по калибровочной кривой, мкг,

t - время ферментативной реакции, мин;

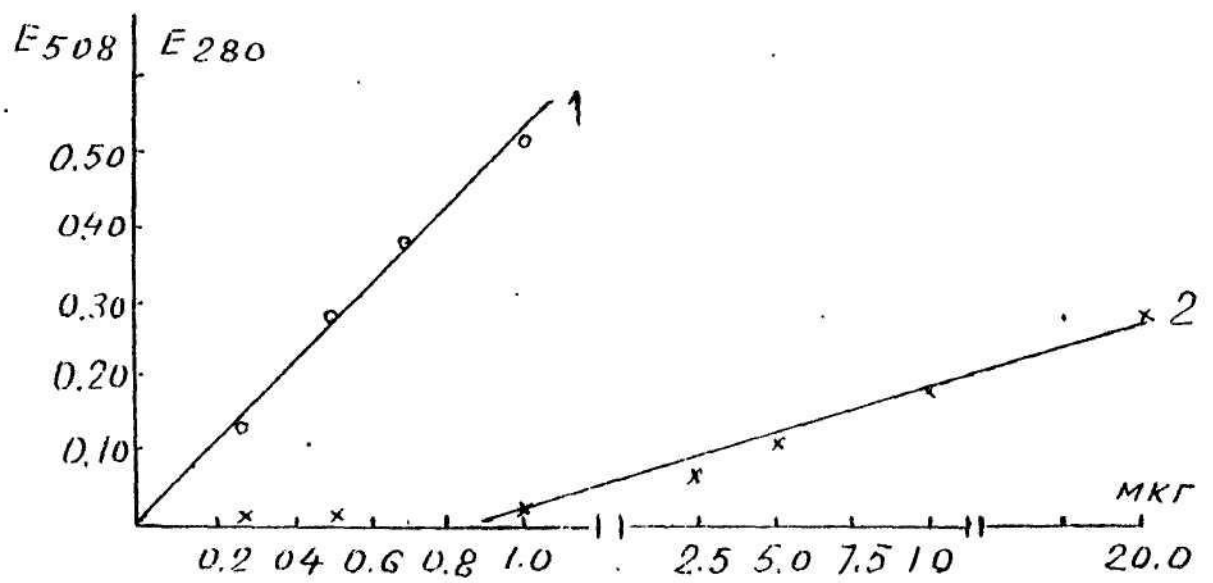
174,2 -молекулярная масса аргинина;

C<sub>1</sub> -концентрация фермента в пробе, мг.

Сравнение расщепляемости биосубстратов бромелаином в заявляемом способе и принятом за прототип показано (фиг.2), что с помощью протамин сульфата (кривая 1) можно определять 0,25-1,0 мкг бромелаина, а с помощью казеина (кривая 2) - 2,5-20 мкг фермента. Это свидетельствует о большей (в 10 раз) чувствительности заявляемого способа по сравнению с прототипом.



Фиг. I Калибровочная кривая для определения аргинина  
На оси абсцисс – количество аргинина, мкг  
На оси ординат – оптическая плотность растворов  
аргинина,  $E_{508}$



Фиг.2 Расщепляемость биосубстратов бромелаином в заявляемом способе (1) и прототипе (2)

На оси абсцисс – концентрация бромелаина, мкг

На оси ординат – оптическая плотность продуктов расщепления субстратов:  $E_{508}$  – протамин сульфата (1)

$E_{280}$  – казеина (2).