

## ÚJ HPLC ELJÁRÁS AZ ALFA-AMILÁZ AKTIVITÁS ÉS GÁTLÁS MÉRÉSÉRE

István Takács\*<sup>1,3</sup>, Anikó Pósa<sup>1</sup>, András Szekeres<sup>2</sup> Gábor Endre<sup>2</sup> Gyöngyi Gyémánt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, SZTE, TTIK, Szeged Közép fasor 52  
Magyarország*

<sup>2</sup>*Mikrobiológia Tanszék, SZTE, TTIK Szeged Közép fasor 52 Magyarország*

<sup>3</sup>*Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék Debreceni Egyetem, Debrecen Egyetem tér  
Magyarország*

\*e-mail: [taki.biotech@gmail.com](mailto:taki.biotech@gmail.com)

### Abstract

The control of the hyperglycemia is crucial in the treatment of type II diabetes and other metabolic syndromes. In these situations, the  $\alpha$ -amylases could play an important role in the increasing of the blood glucose level due the breakdown of the polysaccharides. The  $\alpha$ -amylases are the first enzymes, which take a part in the process of the releasing glucose monomers from complex polysaccharides. Therefore, the investigations of both  $\alpha$ -amylase activities and the quantity of their inhibition are important on the field of anti-diabetic drug research. Our presented research was aimed to develop a new HPLC based method for the measurement of reaction product of  $\alpha$ -amylase reaction using specially synthesized, p-nitrophenyl-labelled maltooligomer substrate. After the enzyme reaction, three product was detectable possessing the chromophore-group during the reversed-phase separation. One of them was selected to follow the enzyme kinetic of the human salivary amylase applying linear regression on the area data acquired at different time points of the reaction. Furthermore, due to the specific substrate measuring only the  $\alpha$ -amylase activity, our method could be used successfully also for the accurate measurement in the inhibition studies.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, inhibition, HPLC method, diabetes

### Bevezetés

Az  $\alpha$ -amiláz (EC.3.2.1.1) a glikozid-hidrolázok családjába tartozó, a poliszaharidok glükózegységei közötti  $\alpha$ -(1,4) glikozid kötések bontásáért felelős enzim [1]. Klinikai vonatkozásban ezen enzimaktivitás emelkedése több betegség következménye is lehet pl: hasnyálmirigy-, fültőmirigy gyulladásban. Ezekben az esetekben az  $\alpha$ -amiláz mérésének differenciál diagnosztikai szerepe is van [2]. Az  $\alpha$ -amiláz gátlásának meghatározására alkalmas módszer az újabb erre az enzimre ható gyógyszerek fejlesztésében is fontos szerepet kaphat, mert az egyes jelenleg elérhető gyógyszerek jelentős mellékhatásokkal rendelkeznek. Ezért megnőtt az olyan természetes hatóanyagok iránt az érdeklődés melyek az amilázt gátolják, de nem okoznak mellékhatásokat [3]. A humán  $\alpha$ -amilázokat, mind a nyálmirigy mind a hasnyálmirigy által termelt enzimeket alaposan tanulmányozták, mivel a cukorbetegség, és az elhízás kezelésében alkalmazott gyógyszerek kutatásában fontos szerepe van [4]. Számos amiláz inhibitor írtak le, és néhányat alkalmaznak jelenleg is a cukorbetegség kezelésében [5]. Az általunk kifejlesztett új HPLC alapú módszerrel specifikusan csak az  $\alpha$ -amiláz által hidrolizált szubsztrát mennyiségét mérjük. Szubsztrátként 2-klór-4-nitro-fenil- $\beta$ -D-maltoheptozidot (CNP-G7) használtunk. Ez a szubsztrát már elég hosszú, hogy átfedje a humán nyál amiláz (HSA) aktív helyét és a természetes szubsztráthoz hasonlóan viselkedjen. A HSA és a szubsztrát reakciója során a három felszabaduló redukáló végtermék fő

összetevője a CNP- $\beta$ -D-maltotrióz (CNP-G3) amely a szubsztrát detektálható reakciótermékeinek 50%-át teszi ki [6]. Az aglikon kromofor lehetővé teszi az UV-tartományban (302 nm) való magas érzékenységgel való detektálást, amely béta-glikozid kötéssel kapcsolódik a szénhidrát lánchoz, melyet az  $\alpha$ -amiláz nem képes hasítani. A korábbi kalorimetriás titrálási (ITC) módszerrel végzett vizsgálatok megerősítették, hogy a CNP-G7 a keményítőhöz hasonlóan hasad az enzimreakcióban [7]. A CNP-G7 szubsztrát alkalmas továbbá fotometriás amiláz meghatározásra is, ilyenkor azonban segéd enzimek alkalmazása szükséges [8,9].

### 3.0 Anyagok és módszerek

#### 3.1 CNPG-7 Szubsztrát szintézise és tisztítása

A CNP-G7 szubsztrátot kémiai szintézissel állítottuk elő [10]. A szintézis során az oligoszacharid peracetilezett származéka keletkezik, amelyből a Zemplén-féle dezacetilezéssel állítottuk elő a szabad oligoszacharidot. A további tisztítási műveleteknél 1,0 g CNP-G7-t feloldottuk 30 ml metil-alkoholban (VWR) majd 300  $\mu$ l 30% nátrium-metilátot (Merck) adtunk az oldathoz. A reakcióelegyet 0 °C-on 50 percig kevertettük majd az oldószert csökkentett nyomáson bepárooltuk és a maradékot vízben visszaoldottuk és Amberlite-H<sup>+</sup> gyanta (Sigma) hozzáadásával pH 6-ra savanyítottuk. A gyantát szűréssel távolítottuk el és a szűrletet liofilizálással szárítottuk. A terméket desztillált vízben feloldottuk és szemipreparatív HPLC segítségével választottuk el a szabad klór-nitrofeniltől. Ehhez szemipreparatív HPLC berendezést (Younglin, 6400) használtunk ami kézi mintaadagolóval UV/VIS detektorral és gáztalanítóval volt felszerelve. Állófázisként Supelcosil™ LC-18 (200 mm x 10 mm, 5  $\mu$ m) oszlopot alkalmaztunk. A mozgó fázis acetotinitril : víz (10:90) arányú keveréke volt, áramlási sebessége 5,0 ml/min. A detektálást 302 (termék) illetve 400 nm (p-nitrofenol) hullámhosszon végeztük, az injektálási térfogat 500  $\mu$ l volt. A szemipreparatív kromatográffal tisztított terméket ezután -50 °C-ra fagyasztottuk és Christ Alpha1-4 liofilizátorral fagyasztva szárítottuk 36 órát.

#### 3.2 A szubsztrát tisztaságának ellenőrzése HPLC készüléken

A tisztított CNP-G7 szubsztrát tisztaságát folyadékkromatográfiával vizsgáltuk. Az analitikai HPLC mérést (Agilent 1260 Infinity) kvaterner pumpával, degasserrel és kézi mintaadagolóval felszerelt rendszeren végeztük. A mérés UV/VIS detektorral ( $\lambda = 302$  nm) történt Genesis C-18 (150 mm x 4,6 mm, 4  $\mu$ m) oszlopon. A mozgó fázis acetonitril és víz (15:85) keveréke volt. Az áramlási sebesség 0,8 ml/perc, míg az injektált térfogat 20  $\mu$ l volt.

#### 3.3 A szubsztrát tisztaságának ellenőrzése MALDI-TOF készüléken

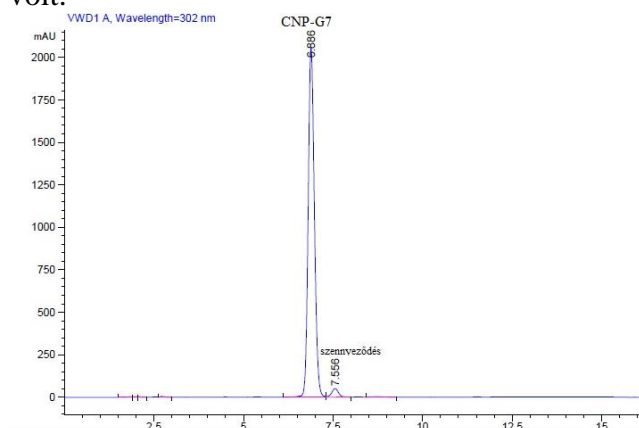
A tömegspektrometriás méréseket a MALDI-TOF (Bruker Biflex III) készülékkel végeztük, melyhez mátrixként 2,5-dihidroxibenzoésavat (2,5-DHB, Aldrich) használtunk és pozitív-ion módban mértünk. A lézerhez 19 kV, a reflektoronhoz 20 kV feszültséget alkalmaztunk. A kapott tömegspektrumok kiértékelését, a készülék X-TOF programjával végeztük.

#### 3.4 Az enzimreakció detektálása

A reakcióhoz 400  $\mu$ l 5,0 mM CNP-G7 oldatot összekeverünk 8  $\mu$ l 84 nM HSA-val és a mintát 37 ° C-on inkubáljuk. A minták vétele és az injektálás az 5., 25., 45., és a 65., percben történt. A kromatogramokat a ChemStation szoftverrel (Agilent) értékeltük.

## Eredmény és vita

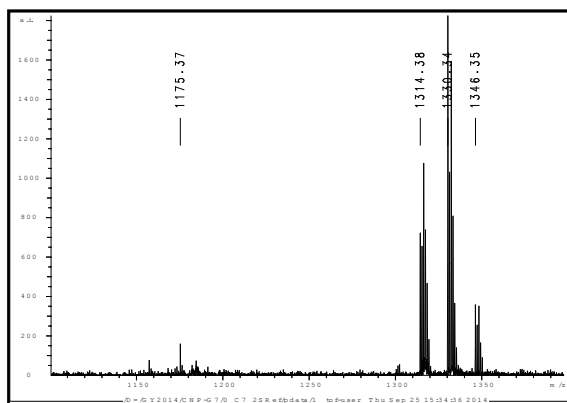
A tisztított CNP-G7 szubsztrát retenciós ideje 6.688 perc (**1. ábra**). A minta tisztasága 96,92% volt.



**1. ábra** Tisztított CNP-G7 szubsztrát HPLC kromatogramja

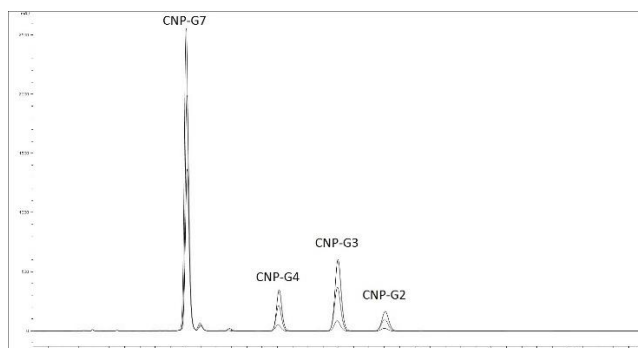
A CNP-G7 MALDI-TOF MS eredménye

A pozitív ionizációs módban felvett MALDI-TOF MS spektrumon (**2. ábra**) láthatjuk a CNP-G7 kálium és a nátrium addukt ionjait. A számított molekulatömeg a kálium addukt esetében 1346,32 Da  $[C_{48}H_{74}O_{38}NCl+K]^+$ , míg a nátrium addukt esetében 1330,34 Da  $[C_{48}H_{74}O_{38}NCl+Na]^+$  volt. Kis mennyiségű G7 oligomer is látható a spektrumokon 1175,37  $m/z$  értéknél ( $[M+Na]^+$ ), amely nem tartalmazza a krómofór csoportot.

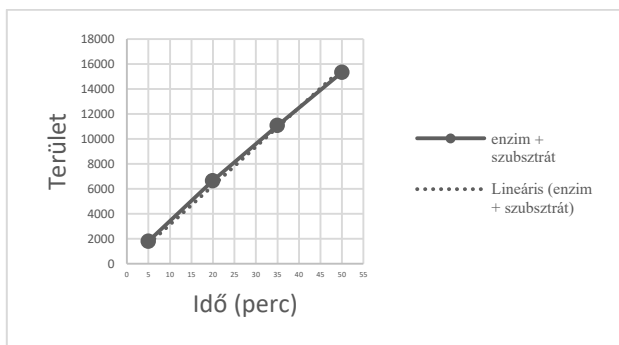


**2. ábra** CNP-G7 szubsztrát MALDI-TOF MS spektrumai

Az enzimmérésekhez a tisztított CNP-G7 szubsztrátot használtuk, amely több hatékony kötést tud létrehozni a HSA aktív centrumával ezért a kromatogramon három, különböző hosszúságú termék csúcsa is látszódik, melyek megfelelő módszerrel elválaszthatók egymástól és a szubsztráttól (**3. ábra**). Az enzimaktivitás sebességének jellemzésére a fő termék, a CNP-G3 (**4. ábra**) keletkezésének a sebességét határoztuk meg. A különböző időpontokban injektált minták kromatogramján a CNP-G3 hoz tartozó csúcs területét mértük és ábráztuk az idő függvényében.



3. ábra A különböző időpontokban injektált minták kromatogramja



4. ábra A CNP-G3 képződés reakciósebességének meghatározása a CNP-G7-HSA katalizálta hidrolízis reakcióban

A sebességet ( $v$ ) lineáris regresszióval határoztuk meg. Az egyenes egyenlete  $y=312,26x$  volt, és a korrelációs koefficiens  $R^2=0,9969$  volt.

### Megvitatás

A HPLC kétségtelenül az egyik legfontosabb analitikai módszer a vegyületek azonosítására és mennyiségi meghatározására. Ezzel párhuzamosan a HPLC-technikák használata az enzimatis reakciók tanulmányozásában jelentősen megnőtt. A HPLC alkalmazásával a komponensek elválasztása és mennyiségi meghatározása lehetséges és az adatokból a reakciók sebessége kiszámítható [11]. Mivel a szubsztrát és a három felszabaduló redukáló végtermék hasonló vegyület (maltooligomerek) és valamennyi tartalmaz kromofor csoportot. A fő termék (CNP-G3) mennyiségi meghatározása területi adatok alapján történt, és a reakciósebességeket a kinetikus görbék lineáris részéből számoltuk ki. Ezek az eredmények megerősítik HPLC-alapú kinetikai módszerek alkalmazhatóságát az  $\alpha$ -amiláz aktivitásának megbízható meghatározására. A CNP-G7 szintézisének kialakított  $\beta$ -konfiguráció megvédi a szubsztrátot az amiláz hasításától így a kromofor csoport mindvégig a szubsztráton marad specifikussá téve a meghatározást.

### Köszönetnyilvánítás

AZ Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-16-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült (Pósa Anikó, Szekeres András)

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docensnek, a szubsztrát előállításában és a MALDI-TOF MS spektrumok felvételében nyújtott segítségével.

### **Irodalomjegyzék**

- [1] Jacobsen N, Melvaer KL, Hensten-Pettersen A. Some Properties of Salivary Amylase: A Survey of the Literature and Some Observations. *J Dent Res* 1972 03/01; 2017/09;51(2):381-388.
- [2] Chapman R. Serum Amylase Estimations in Differential Diagnosis. *Br Med J* 1959 Oct 3;2(5152):602-606.
- [3] Gao J, Xu P, Wang Y, Wang Y, Hochstetter D. Combined effects of green tea extracts, green tea polyphenols or epigallocatechin gallate with acarbose on inhibition against alpha-amylase and alpha-glucosidase in vitro. *Molecules* 2013 Sep 18;18(9):11614-11623.
- [4] Copeland RA. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. : John Wiley & Sons; 2013.
- [5] Yamagishi S, Nakamura K, Takeuchi M. Inhibition of postprandial hyperglycemia by acarbose is a promising therapeutic strategy for the treatment of patients with the metabolic syndrome. *Med Hypotheses* 2005;65(1):152-154.
- [6] Kandra L, Gyemant G. Examination of the active sites of human salivary alpha-amylase (HSA). *Carbohydr Res* 2000 Nov 17;329(3):579-585.
- [7] Lehoczki G, Szabo K, Takacs I, Kandra L, Gyemant G. Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary alpha-amylase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016 Apr 6:1-6.
- [8] Gillard BK, Marksman HC, Feig SA. Direct spectrophotometric determination of alpha-amylase activity in saliva, with p-nitrophenyl alpha-maltoside as substrate. *Clin Chem* 1977 Dec;23(12):2279-2282.
- [9] Junge W, Wortmann W, Wilke B, Waldenstrom J, Kurrle-Weittenhiller A, Finke J, et al. Development and evaluation of assays for the determination of total and pancreatic amylase at 37 degrees C according to the principle recommended by the IFCC. *Clin Biochem* 2001 Nov;34(8):607-615.
- [10] Farkas E, Janossy L, Harangi J, Kandra L, Liptak A. Synthesis of chromogenic substrates of alpha-amylases on a cyclodextrin basis. *Carbohydr Res* 1997 Oct 7;303(4):407-415.
- [11] Edward F. Rossomando. HPLC in Enzymatic Analysis, Third Edition - (Methods of Biochem Analysis Vol 50) (Methods of Biochemical Analysis) 3rd Edition. 2011.