

## 高效液相色谱法测定血管紧张素转化酶抑制剂的活性

吴琼英, 马海乐, 骆琳, 吴守一

(江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

**摘要** :建立了体外直接测定血管紧张素转化酶抑制剂活性的高效液相色谱分析方法。以马尿酸-组氨酰-亮氨酸为反应底物,血管紧张素转化酶为催化剂,反应所生成的马尿酸为测定指标,未加酶抑制剂的反应为空白对照。使用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm i. d. × 150 mm, 填料粒径 5 μm) 柱温 25 °C, 流动相为乙腈-超纯水(体积比为 25 : 75, 各含 0.05% (体积分数)三氟乙酸及 0.1% (体积分数)三乙胺), 流速 0.5 mL/min, 检测波长 228 nm。在马尿酸浓度为 0.005 ~ 1.000 mmol/L 时,马尿酸浓度与其峰面积呈良好的线性关系( $r = 0.9999$ ), 最小检测限为 0.50 μmol/L, 该方法对马尿酸的回收率为 99.48% ~ 105.64%, 相对标准偏差(RSD)为 2.20% ( $n = 6$ )。该方法可适用于血管紧张素转化酶抑制剂活性的体外测定,具有操作简便、精密度和准确性高的特点,为降压药物的研制提供了方便可靠的检测手段。

**关键词** :高效液相色谱法;血管紧张素转化酶抑制剂;马尿酸

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)01-0079-03

## Determination of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Activity by High Performance Liquid Chromatography

WU Qiongying, MA Haile, LUO Lin, WU Shouyi

(College of Biology and Environment Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract** : A high performance liquid chromatographic method to determine angiotensin-converting enzyme inhibitor activity in vitro was established by using *N*-hippuryl-His-Leu tetrahydrate as the reaction substrate and hippuric acid as the reaction product. The chromatographic conditions were as follows : column, ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm i. d. × 150 mm, 5 μm); column temperature, 25 °C; mobile phase, acetonitrile-distilled water (25:75, v/v, both containing 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid and 0.1% (v/v) triethylamine); flow rate, 0.5 mL/min; detection wavelength, 228 nm. An excellent linearity over the range of 0.005 - 1.000 mmol/L ( $r = 0.9999$ ) was observed. The detection limit was 0.50 μmol/L. The recoveries of hippuric acid were 99.48% - 105.64%, with a relative standard deviation (RSD) of 2.20% ( $n = 6$ ). It is a simple, precise and reliable assay method for developing antihypertension drugs.

**Key words** : high performance liquid chromatography; angiotensin-converting enzyme inhibitor; hippuric acid

血管紧张素转化酶(angiotensin I-converting enzyme, 简称 ACE)主要参与肾素-血管紧张素-醛固酮系统的调节。ACE 催化血管紧张素 I(angiotensin I)能转变为具强效升高血压作用的物质——血管紧张素 II(angiotensin II);同时,ACE 将具降压作用的物质——舒缓激肽(bradykinin)降解,使之失去降压作用<sup>[1,2]</sup>。ACE 的这些性质在参与血压调节方面发挥着重要作用。目前用于降血压的药物,其降压原理主要是抑制 ACE 的活性。面对

高血压患者数量的不断增长,越来越多的工作者致力于血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin I-converting enzyme inhibitor, 简称 ACEI)的开发研究,而在此过程中实现抑制剂降压效果体外检测的重要途径就是测试其对 ACE 活性的抑制作用。因此,建立一种快速、简便、准确度高的检测手段是提高降压制剂研究效率的保证。

目前,对于测定 ACEI 活性的研究主要采用 3 种方法:第一种是乙酸乙酯萃取法<sup>[3]</sup>,这种方法是

收稿日期 2004-02-30

作者简介:吴琼英,女,博士研究生,研究方向为生物资源有效成分的分离与提纯。

通讯联系人:马海乐,男,博士生导师,教授, Tel (0511)5862362, E-mail: mhhl@ujs.edu.cn.

基金资助:江苏省高技术研究项目(项目编号:BG2003319)。

将反应体系的产物先用乙酸乙酯萃取,然后真空挥发去掉乙酸乙酯,再用蒸馏水溶解后在 228 nm 处紫外扫描。该方法操作步骤多,而且由于反应所生成的马尿酸和组氨酰-亮氨酸均在 228 nm 处有吸收,因而易使结果偏高;第二种是高效毛细管电泳法<sup>[4-6]</sup>。第三种是高效液相色谱法(HPLC)<sup>[7]</sup>。在初期的研究中,HPLC 的检测样品是乙酸乙酯萃取物,2002 年,Wu 等<sup>[7]</sup>提出一种改进的直接用 HPLC 测定血管紧张素转化酶催化反应的方法,但采用的洗脱方式是梯度洗脱。本文以常用的治疗高血压药物——卡托普利(Captopril)作为 ACEI,通过多次试验,得出一种直接进样、等度洗脱便能达到良好分析效果的 HPLC 测定 ACEI 活性的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与药品

Agilent-1100 高效液相色谱系统,配有自动进样器、Agilent-1100 液相色谱工作站、二极管阵列检测器(检测波长 190~700 nm),购自美国安捷伦公司;生化培养箱、取液器,购自上海金林生化试剂仪器厂;马尿酸(hippuric acid,简称 Hip),购自中国医药集团上海化学试剂公司;马尿酸-组氨酰-亮氨酸(*N*-hippuryl-His-Leu tetrahydrate,简称 HHL),购自瑞士 Fluka 公司;血管紧张素转化酶(取自兔肺,EC3.4.15.1),购自美国 Sigma 公司;卡托普利,购自美国 Sigma 公司;乙腈,HPLC 级;三乙胺、硼酸、硼砂、氯化钠均为分析纯。

### 1.2 色谱条件

ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 分析用色谱柱(4.6 mm i. d. × 150 mm,填料粒径为 5 μm),柱温 25 °C,流动相为乙腈-超纯水(体积比为 25:75,各含 0.05%(体积分数)三氟乙酸及 0.1%(体积分数)三乙胺),流速 0.5 mL/min,检测波长 228 nm,自动进样,进样量 5 μL。

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 试剂的配制

**Captopril 溶液:**按所需配制的浓度,称取适量 Captopril 样品,用 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.3,含 0.3 mol/L NaCl)溶解,再用同种缓冲液配成所需浓度的 Captopril 溶液。

**ACE 溶液:**将 1 U ACE 溶于 10 mL 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.3,含 0.3 mol/L NaCl)中即得。

**HHL 溶液:**取 HHL 适量,以 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.3,含 0.3 mol/L NaCl)溶解配成 6.5 mmol/L HHL 溶液。

**马尿酸标准液的制备:**取马尿酸标准品适量,用

双蒸水配制不同浓度的马尿酸标准液。

#### 1.3.2 反应液的制备

取不同浓度的 Captopril 溶液 10 μL,加入 5 μL ACE 溶液,在 37 °C 下保温 5 min 后加入 50 μL HHL 溶液开始反应,在 37 °C 条件下反应 30 min 后加入 85 μL 1.0 mol/L HCl 中止反应,得到反应液。

#### 1.3.3 混合液及空白样品的制备

在反应液中加入不同浓度的马尿酸标准液即得混合液。将该混合液用 0.45 μm 滤膜过滤后用于 HPLC 分析。同时用 10 μL pH 8.3 的硼酸缓冲液替代 Captopril 溶液制备反应液,作为空白对照组。

### 1.4 测定原理

三肽 HHL 在 ACE 的催化下快速地分解产生马尿酸和二肽 His-Leu(简称 HL)。当加入 ACEI 样品时,ACE 的活性受到抑制,马尿酸和二肽的生成量减少,因此可通过 HPLC 测定马尿酸的生成量来评价 ACEI 对 ACE 活性的抑制率<sup>[2-7]</sup>。计算公式为:

$$R = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, $R$ 为 ACEI 样品对 ACE 的抑制率(%); $A$ 为空白对照组中马尿酸的峰面积(mAU·s); $B$ 为添加 Captopril 组中马尿酸的峰面积(mAU·s)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测波长的确定

用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 8.3)配制 0.5 mmol/L 的 HHL 溶液,用双蒸水配制 1 mmol/L 的 Hip,然后在 190~300 nm 波长处扫描,Hip 和 HHL 的紫外吸收波谱见图 1。图 1 表明,马尿酸在 228 nm 波长处有最大吸收,HHL 在 210~250 nm 波长处有较宽的吸收峰,因此 HPLC 检测时可以采用 228 nm 作为检测波长。

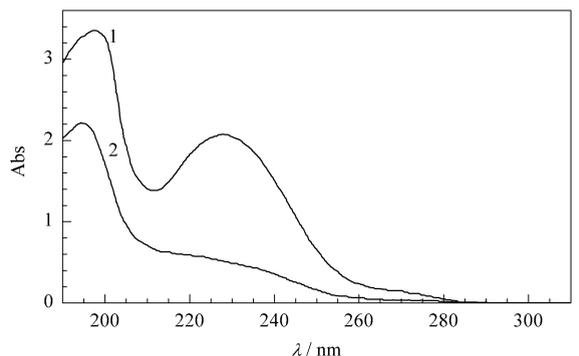


图 1 马尿酸(1)和 HHL(2)的紫外吸收波谱  
Fig.1 Ultraviolet absorbance spectra of Hip(1) and HHL(2)

### 2.2 色谱分析

在“1.2”节选定的条件下得到的色谱图如图 2

所示。由图 2 可见,马尿酸、二肽和三肽能达到良好分离,但加 Captopril 组马尿酸的峰面积比空白组马

尿酸的峰面积减小。图 2 还说明马尿酸的出峰时间保持稳定。

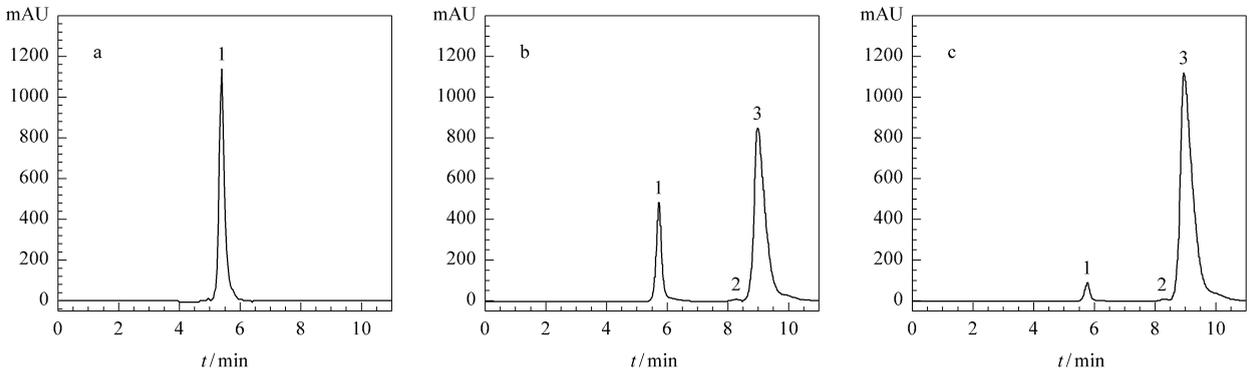


图 2 HPLC 测定 ACEI 活性的色谱图

Fig. 2 The chromatograms of ACEI activity determined by HPLC

a. standard ; b. blank sample ; c. blank sample spiked with Captopril. Mobile phase : acetonitrile-distilled water ( 25:75 , v/v ) , both containing 0.05% trifluoroacetic acid and 0.1% triethylamine ; flow rate : 0.5 mL/min ; temperature : 25 °C ; detection wavelength : 228 nm.

1. Hip ; 2. HL ; 3. HHL.

### 2.3 线性关系及检测限

取浓度为 1 mmol/L 的马尿酸标准液,再用双蒸水分别稀释成 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 mmol/L 系列浓度,经 0.45 μm 滤膜过滤后进样分析。结果马尿酸峰面积  $S$  (mAU · s) 与浓度  $C$  (mmol/L) 的线性回归方程为:  $S = 1.27231 \times 10^4 C + 3.59428$ ,  $r = 0.9999$ ,表明马尿酸浓度与峰面积具有良好的线性关系,因而样品中马尿酸的峰面积能够反映样品中马尿酸的含量,进而反映 ACEI 的抑制活性。

将标准马尿酸溶液进一步稀释发现,当其浓度为 0.50 μmol/L 时,其峰面积与浓度仍符合上述线性方程,而浓度继续降低,则所得的马尿酸峰面积逐步偏离标准曲线。因此,此法测定马尿酸的检测限为 0.50 μmol/L。

### 2.4 回收率及精密度试验

取 3 种不同浓度(见表 1 中的表注)的 Captopril 反应液,分别在 3 种浓度的反应液中各自加入两种不同浓度(见表 1)的马尿酸标准液作为混合液。分别测定反应液、混合液、马尿酸标准液中马尿酸的浓度并据此计算回收率,结果见表 1。

表 1 表明,不同浓度 Captopril 所制备的反应液中添加不同浓度的马尿酸标准液时,马尿酸的回收率为 99.48% ~ 105.64%,相对标准偏差(RSD)为 2.20% ( $n = 6$ )。

将 0.02 μmol/L Captopril 所制备的反应液中马尿酸的峰面积重复测定 5 次,其 RSD 为 1.25%,方法的精密度良好。

表 1 ACEI 样品(Captopril)反应液中马尿酸的回收率( $n = 6$ )  
Table 1 Recoveries of hippuric acid in reactions with different concentrations of Captopril ( $n = 6$ )

Reaction No. <sup>1)</sup>	Original/ (μmol/L)	Added/ (μmol/L)	Found/ (μmol/L)	Recovery/ %
1	45.051	100	148.118	103.067
2	45.051	50	95.649	101.197
3	11.807	100	111.287	99.480
4	11.807	50	64.624	105.635
5	4.755	100	105.061	100.307
6	4.755	50	56.277	103.044

1) Concentrations of the added Captopril was 0.02 μmol/L in reactions 1 and 2, 0.05 μmol/L in reactions 3 and 4, 0.10 μmol/L in reactions 5 and 6.

### 3 结论

本法中反应液直接进样,只需等度洗脱便可使 Hip、HL、HHL 达到良好分离,具有简便、快捷、精密度和准确性高的特点,为降血压药物的药效提供了方便可靠的体外检测手段。

### 参考文献:

- [1] Yamamoto N, Akino A, Takano T. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(4): 776
- [2] Nakamura Y, Masuda O, Takano T. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(3): 488
- [3] Cushman D W, Cheung H S. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637
- [4] Chang B W, Chen R L C, Huang I J, Chang H C. Analytical Biochemistry, 2001, 291: 84
- [5] Zak K, Shihabi. J Chromatogr A, 1999, 853: 185
- [6] Zhang R Z, Xu X H, Chen T B, Li L, Rao P F. Analytical Biochemistry, 2000, 280: 286
- [7] Wu J P, Aluko R E, Muir A D. J Chromatogr A, 2002, 950: 125