

高效毛细管电泳测定血管紧张素转化酶抑制剂 captopril 的活性

辛志宏, 马海乐*, 吴守一, 代春华

(江苏大学 生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 目的 建立高效毛细管电泳测定血管紧张素转化酶抑制剂 captopril 抑制活性的方法。方法 用紫外分光光度计确定了马尿酸的特征吸收波长为 228 nm。高效毛细管电泳的条件: 熔融石英毛细柱, 电泳缓冲液为 pH 8.3 的 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, 进样压力 4.8 kPa, 进样时间 3 s, 分离电压 20 kV, 检测波长 228 nm。结果 在 7 min 内使反应物和生成物完全分离, 标定了 captopril 的 IC₅₀ 值为 0.019 μmol·L⁻¹, 经过酶反应动力学判断 captopril 为竞争性抑制剂。结论 该方法准确、简便、快速, 可用于 captopril 抑制活性的分析。

关键词: 高效毛细管电泳; captopril; 血管紧张素转化酶抑制剂

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)11 - 0843 - 03

Determination of the inhibitory activity of angiotensin converting enzyme inhibitor captopril by high performance capillary electrophoresis

XIN Zhi-hong, MA Hai-le*, WU Shou-yi, DAI Chun-hua

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

Abstract: **Aim** To establish a method for determine of the inhibitory activity of angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril by high performance capillary electrophoresis. **Methods** The characteristic absorptive wavelength of hippuric acid determined by ultraviolet spectrophotometer is 228 nm. The method employed a melted capillary column, 50 mmol·L⁻¹ phosphoric acid (pH 8.3) buffer solution, inject pressure 4.8 kPa, inject time 3 s, separation voltage 20 kV and detection wavelength 228 nm. **Results** The reactant and resultant was separated completed within 7 min. IC₅₀ of captopril was 0.019 μmol·L⁻¹. Captopril is a competitive inhibitor, which was proved by enzyme reaction dynamics. **Conclusion** The method was shown to be accurate, simple and rapid and can be used for determination of the inhibitory activity of captopril.

Key words: high performance capillary electrophoresis; captopril; angiotensin-converting enzyme inhibitor

血管紧张素转化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1) 在人体血压调节过程中起重要作用, 催化血管紧张素 I 从 C 端裂解二肽形成血管紧张素 II, 同时, 钝化血管舒张剂——舒缓激肽^[1]。ACE 这种双重作用使血压升高, 如果抑制 ACE 活性则血管紧张素 II 的生成和舒缓激肽的钝化均减少, 从而达到治疗和预防高血压的目的^[2]。目前, 临床上用于治疗高血压的血管紧张素转化酶

抑制剂 (angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI) 多为合成类药物。如卡托普利 (captopril; SQ14225)、依那普利 (enalapril) 等。

对 ACEI 体外抑制活性测试常规是利用 ACE 酶解三肽——马尿酸组氨酰亮氨酸 (Hip-His-Leu, HHL) 生成的马尿酸 (hippuric acid) 和二肽 (His-Leu, HL) 来定量的, 其中多以马尿酸的生成量定量。常用的是紫外比色法^[1], 但操作繁琐。Wu^[3] 报道了萃取过程中将部分三肽 Hip-His-Leu 萃取出来与马尿酸混在一起, 而三肽在 228 nm 也有吸收, 致使分析结果偏高。HPLC 法^[3,4] 不需预处理, 操作简便, 分析时间大大缩短, 但溶剂用量大。

收稿日期: 2003-01-28.

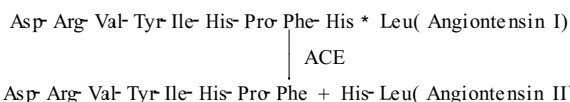
基金项目: 江苏省“青蓝工程”科研资助基金(2001012).

* 通讯作者 Tel: 86 - 511 - 8780174, Fax: 86 - 511 - 8780073,

E-mail: mhl@ujs.edu.cn, xzhfood@163.com

高效毛细管电泳 (HPCE) 是近年来发展起来的一种新型高效分离分析技术。Zhang 等^[5] 采用毛细管区带电泳法测定了 ACE 的体外活性, 建立了分析 ACE 活性的新方法, 但未将生成物 His-Leu 和底物 Hip-His-Leu 完全分离。ACE 体外活性测定方法尚无人建立, 本文在此基础上, 用 HPCE 测定 ACEI captopril 的抑制活性。

ACE 体外活性测定的有关反应式:



ACE 体外活性测定原理见图 1。由图可见, 血管紧张素 I 在 ACE 的作用下生成血管紧张素 II, 而 HHL 在 ACE 的作用下生成马尿酸及二肽 HL。因此, 通过测定 His-Leu 和马尿酸的生成量就可间接反映 ACE 的活性。当 ACE 与 ACEI 作用后, ACE 活性受到抑制, 其与 HHL 作用生成的马尿酸量减少, 测定加入抑制剂前后马尿酸的生成量可反映 ACEI 的抑制作用。

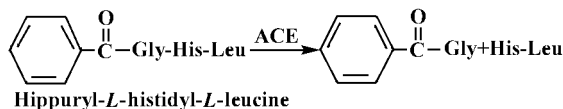


Figure 1 Principle of determination angiotension converting enzyme

材料与方 法

仪器与试剂 COULTER P/ACETM 毛细管电泳仪 (Beckman 公司); CARY 100 紫外分光光度计 (Cary 公司); ACE, HHL, 马尿酸和卡托普利均购于 Sigma 公司; 其他化学试剂为国产分析纯。

马尿酸和 HHL 的特征吸收波长 马尿酸和 HHL 特征吸收波长的测定采用紫外扫描法。用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 8.3) 分别配制 0.5 mmol·L⁻¹ HHL 和 1 mmol·L⁻¹ 马尿酸, 然后在 190~300 nm 进行扫描。

HPCE 法测定 captopril 的活性 根据 Cushman DW^[1] 方法进行并有改进。将 captopril 用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 8.3) 配成 0.01 μmol·L⁻¹ 溶液, 吸取 10 μL, 加入 ACE (1U 溶于 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 10 mL, pH 8.3 含 300 mmol·L⁻¹ NaCl 中) 5 μL, 于 37 °C 保温 5 min, 随后加入 6.5 mmol·L⁻¹ HHL (溶于和 ACE 相同的缓冲液中) 50 μL, 在 37 °C 恒温水浴中保温 30 min, 然后加入 1 mol·L⁻¹ HCL 85 μL 中止反应, 反应总体积 150 μL。同时用 pH 8.3 的磷

酸缓冲液 10 μL 作空白实验。毛细管电泳自动进样分析。电泳条件: 熔融石英毛细管柱 (57 cm × 75 μm ID), 电泳缓冲液为 pH 8.3 的 50 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (含 1 % 的 SDS), 电泳温度 25 °C, 进样压力 4.8 kPa, 进样时间 3 s, 分离电压 20 kV, 检测波长 228 nm。

由酶活定义可得:

$$V = \frac{150(\mu L) \times C_{Hip}}{30(\text{min})} = 5 \times 10^{-3} C_{Hip} \quad (1)$$

式中 V 为反应速率 (μmol·min⁻¹); C_{hip}: 为马尿酸浓度 (μmol·L⁻¹)。

Captopril 对 ACE 的抑制率用下式计算:

$$R = \frac{A - B}{A} \times 100 \% \quad (2)$$

式中 R 为 captopril 对 ACE 的抑制率; A 为对照组的马尿酸峰面积值; B 为添加 captopril 后的马尿酸峰面积值。

Captopril 的酶反应动力学 分别以 0.203, 0.406, 0.813, 1.625, 3.250 和 6.500 mmol·L⁻¹ 的 HHL 为底物 (用 S 表示), 分别添加 0.014 与 0.028 μmol·L⁻¹ 的 captopril 与 ACE 反应, 同时作对照实验, 根据反应中生成的马尿酸量按式 (1) 计算反应速度, 作 1/V 对 1/S 的双倒数图 (图 4)。

结果与讨论

1 马尿酸和 HHL 的特征吸收波长

由紫外扫描图可见, 马尿酸在 228 nm 有最大特征吸收波长, HHL 在 210~250 nm 有较宽的吸收峰, 该波长范围包括马尿酸的最大特征吸收, 因此在 HPCE 检测时可采用 228 nm 作为检测波长。

2 硼酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液电泳效果的比较

Captopril 抑制 ACE 的电泳图见图 2。首先, 参照文献 [5]。用 pH 8.3 的 50 mmol·L⁻¹ (含 1 % 的 SDS) 硼酸盐缓冲液电泳, 马尿酸和其它物质很好的分离, 但 HHL 和 HL 没有完全分离, R_s 为 0.91。改用 50 mmol·L⁻¹ pH 8.3 磷酸缓冲液 (含 1 % 的 SDS), HHL 和 HL 完全分离, R_s 为 1.88。因此采用 50 mmol·L⁻¹ pH 8.3 磷酸缓盐冲液作为电泳缓冲液。

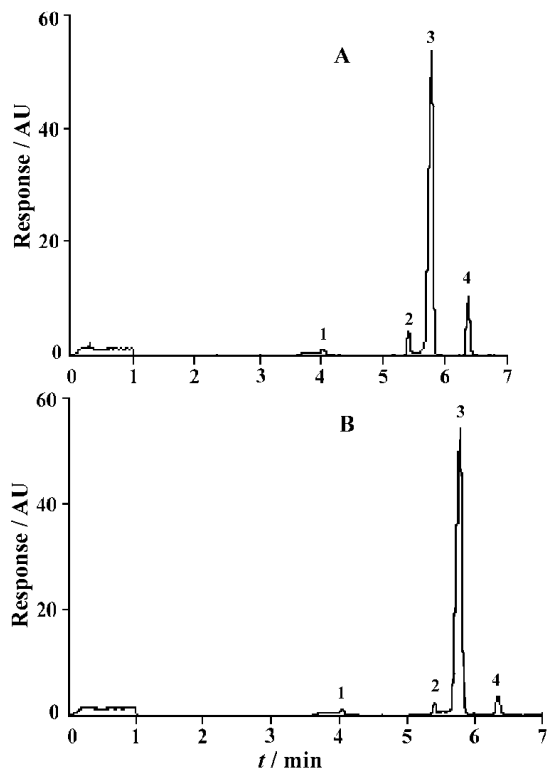
3 马尿酸浓度和峰面积的相关性

精密称取马尿酸标准品用 50 mmol·L⁻¹ pH 8.3 磷酸缓冲液配成浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的对照液, 再用相同的缓冲液稀释至所需浓度用毛细管电泳自动进样分析。以峰面积 Y 对浓度 X 进行回归分析, 所得线性回归方程为 Y = 236 629 X + 1 004, 相关系

数 $r = 0.9994$, 线性范围为: $0.01 \sim 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$), 平均回收率为 96.85% , RSD 为 2.35% ($n=6$), 检测限 $0.0056 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此可用峰面积测定马尿酸的生成量, 再由式(1)确定反应速度 V , 由式(2)确定 captopril 对 ACE 的抑制率。

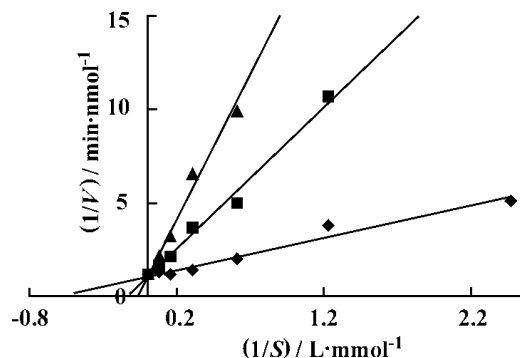
4 Captopril 对 ACE 的抑制效果

Captopril 对 ACE 的抑制效果见图 3。分别用磷酸缓冲液配制 $0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 captopril 按上述测定方法与 ACE 作用, 每个浓度平行反应 3 次, 测定反应液中马尿酸的生成量, 按式(2)测定 captopril 对 ACE 的抑制率, 根据测定结果求得 captopril 的 IC_{50} (抑制 50% ACE 活性所需抑制剂的浓度) 为 $0.019 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与 Fujita H^[6] 用紫外比色法测得结果 ($0.022 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比偏小, 可能是紫外比色法测定过程中有少量三肽 Hip-His-Leu 与马尿酸一起被萃取出, 而三肽在 228 nm 也有吸收, 致使分析结果偏高。



1: Angiotensin I-converting enzyme; 2: Hippuryl-L-histidyl-L-leucine; 3: Hippuryl-L-histidyl; 4: Hippuric acid; A: Control; B: Add captopril in the incubated mixture

Figure 2 Representative chromatograms for an actual assay mixture which contained the substrate, captopril and angiotensin I-converting enzyme incubated as explained in the text



◆Control; ■ $0.014 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ captopril; ▲ $0.028 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ captopril

Figure 3 Lineweaver-Burk double reciprocal plot for the effects of captopril concentration on the activity of angiotensin converting enzyme at different substrate levels

5 Captopril 对 ACE 的抑制反应动力学

Captopril 对酶的抑制反应动力学见图 5, 由图可见, 对照组和添加不同浓度 captopril 的 3 条线均与 Y 轴交于一点, 符合 Lineweaver-Burk 方程, 表明 captopril 为竞争性抑制剂。

该法简单、准确、快速, 除可分析 captopril 对 ACE 的抑制活性外, 也可分析其他 ACEI 对 ACE 的抑制活性, 并有可能用于筛选新的同类型药物。

References:

- [1] Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung [J]. *Biochem Pharmacol*, 1971, **20**(7): 1637 - 1648.
- [2] Cheung HS, Wang FL, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme: importance of the COOH-terminal dipeptide sequence [J]. *J Biol Chem*, 1980, **255**(2): 401 - 407.
- [3] Wu J, Aluko RE, Muir AD. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions [J]. *J Chromatogr A*, 2002, **950**(1-2): 125 - 130.
- [4] Mehanna AS, Dowling M. Liquid chromatographic determination of hippuric acid for the evaluation of ethacrynic acid as angiotensin-converting enzyme inhibitor [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, **19**(6): 967 - 973.
- [5] Zhang R, Xu X, Chen T, Li L, et al. An assay for angiotensin-converting enzyme using capillary zone electrophoresis [J]. *Anal Biochem*, 2000, **280**(2): 286 - 290.
- [6] Fujita H, Yoshikawa M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein [J]. *Immunopharmacology*, 1999, **44**(1-2): 123 - 127.