高效液相色谱测定 ACE 抑制率方法改进的研究

赵谋明，赖晨戎，崔春
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510641）

摘要：本文是在原有的高效液相色谱测血管紧张素转化酶（ACE）抑制率方法的基础上进行改进，用于测定马氏珍珠贝蛋白酶解液的 ACE 抑制率。改进的方法消除了紫外 228 nm 时样品本身在马尿酸（HA）保留时间处的吸收峰的影响。对于本身在 HA 保留时间处有吸收峰（以下称干扰峰）的样品而言，明显提高了测定精确度。本文研究了酶解液干扰峰面积随酶解时间的变化趋势，发现干扰峰面积随酶解时间增加而减小。对于自制酶酶解液，在酶解 24 h 后，其干扰峰面积减小至零。比较了马尿酰-组氨酰-亮氨酸（HHL）和 ACE 加入不同顺序对结果的影响，发现采用先加 HHL 的方法得到的 ACE 抑制率全部高于采用先加 ACE 的方法。因此，在在测定过程中，应由始至终地采用同一加入顺序，数据才具有可比性。

关键词：高效液相色谱；血管紧张素转化酶抑制率；干扰；马氏珍珠贝；酶解
文章篇号：1673-9078(2013)11-2742-2746

Improved Method for High-performance Liquid Chromatography Assay of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity

ZHAO Mou-ming, LAI Chen-rong, CUI Chun
(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A modified method for determining the inhibitory activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) from *Pinctada martensi* hydrolysate by HPLC was proposed. This method eliminated the effect of absorption peaks of some samples at the retention time of hippuric acid (HA) at 228 nm, and improved the measurement accuracy. The interfering peak area of the hydrolyzate decreased with increasing hydrolysis time. The interfering peak area of the hydrolysate by endogenous enzymes decreased to zero after 24 hours. The effects of different adding sequences of N-Hippuryl-His-Leu hydrate (HHL) and ACE on the assay were compared. Results showed that ACE inhibitory activity when HHL was added firstly was higher than those when ACE was added firstly. Therefore, in determination of ACE inhibitory activity, the same addition sequence of ACE and HHL should be adopted.

Key words: high-performance liquid chromatography; angiotensin converting enzyme inhibitory activity; interference; *Pinctada martensi*; enzymatic hydrolysis

血管紧张素转化酶（ACE）可将肾素-血管紧张素系统(RAS)中的血管紧张素Ⅰ（AngⅠ）转换为具有血管收缩作用的血管紧张素Ⅱ（AngⅡ），同时，ACE 也能将激肽释放酶-激肽系统（KKS）中的缓激肽（一种使血管舒张的多肽)失活[1]。因此，若抑制了 ACE 的活性，便可达到降血压的目的。食源性的 ACE 抑制肽具有安全性高，无副作用等的优点，具有广阔的发展空间。第一个 ACE 抑制肽是 1965 年在蛇的毒液中发现的，在这之后，它们在降血压方面的作用也逐渐被人们所认识[2]。

收稿日期：2013-04-02
基金项目：广东省科技计划项目（2012A080800014）；广东省团队项目（2011A020102005）；广东省重大科技专项（2011A080403019）
作者简介：赵谋明（1964-），男，教授，博士生导师，研究方向：食品生物技术、蛋白质化学与工程、海洋资源综合利用等

为了便于提取和鉴定食源性 ACE 抑制肽，一种简单、快速、精确的 ACE 抑制肽的体外活性检测方法是必不可少的。目前，已有几种测定方法，包括分光光度法[3]、荧光测定法[4]、放射化学法[5]，高效液相色谱法[6]和毛细管电泳法[4]等。目前应用最广泛的是在 Cushman 和 Cheung[7]建立的方法基础上改进使用高效液相色谱法，简化了测试步骤。但是，该方法对于一些在紫外 228 nm 的马尿酸的保留时间处有吸收峰的样品而言，其结果是很不准确的。

另外，对于高效液相色谱测定 ACE 抑制率的方法，研究报道有很多不同之处。如采用的缓冲液的盐浓度不同，Chiang 等人[8]和 Wu 等人[9]都是针对大豆的 ACE 抑制率的研究，但是方法中采用的硼酸钠缓冲液的盐浓度不同，得到的结果有明显差异。如反应物的加入顺序不同对实验也有重要影响。相比 Ko 等

人[10]与 Qu 等人[11]的研究报告，发现二者的 HHL 和 ACE 的加入顺序正好相反，得到的结果不同。本文一方面针对在紫外 228 nm 的马尿酸保留时间处有吸收峰的样品，建立更为精确的高效液相色谱法测定 ACE 抑制率，另一方面研究了反应物的不同加入顺序对结果的影响，以期为 ACE 抑制率的活性精准测定提供理论和方法的指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马氏珍珠贝肉、面粉，市售；曲精（沪酿 3.042 孢子粉），孢子发芽率≥80%，孢子数≥300 亿/克干基，水分≤10%石家庄市鼎鑫酿造食品科学研究所；酶制剂：胃蛋白酶，广州酶制剂公司；马尿酰-组氨酰-亮氨酸(N-Hippuryl-His-Leu hydrate，简称 HHL)、血管紧张素转化酶(angiotensin coverting enzyme，简称 ACE，取自兔肺)，美国 Sigma 公司；三氟乙酸、乙睛均为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

MJ-176NR 搅拌机，日本 Panasonic 公司；ZJP-A1230 霉菌培养箱，上海智城分析仪器制造有限公司；THZ-82A 恒温振荡器，州澳华仪器有限公司；DFT-200 手提式高速万能粉碎机，温岭市林大机械有限公司；GL-21M 高速冷冻离心机，长沙 355 湘仪离心机仪器有限公司；waters600 controller 高效液相色谱，美国 waters 公司；waters 2487 检测器，美国 waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 马氏珍珠贝肉的发酵和自制酶酶解工艺[12]

取解冻后马氏珍珠贝肉糜 4000 g，在 121 ℃加热 10 min 后得到熟贝肉。取熟贝肉添加 30%（*m/m*）面粉，接入 0.5‰(以混料后总物质重量计，*m/m*)曲精制曲，25~35 ℃培养 44 h 后得到成曲。取成曲 100 g，以 1:3.23 的料液比加去离子水摇匀，恒温 50 ℃搅拌水解，分别于 3 h、13 h、24 h 取样，并在沸水浴中灭酶 20 min，离心（6000 r/min，4 ℃，15 min），定性滤纸过滤，取滤过上清液冷冻-18 ℃保存。

1.3.2 胃蛋白酶酶解工艺

取解冻后马氏珍珠贝肉糜 4000 g，根据胃蛋白酶特性，调节 pH 值为 3、反应温度是 37 ℃，添加量为蛋白含量的 0.5%，于水浴锅中恒温搅拌 3 h，13 h，24 h，灭酶（100 ℃，20 min），离心（6000 r/min，4 ℃，15 min），定性滤纸过滤，取滤过上清液冷冻-18 ℃保存。

1.4 ACE 抑制率的测定

在 Cushman 等方法[7]基础上进行了一些修改。

方法 1（先加入 HHL）：

反应液：总反应液为 130 μL，由 30 μL 的 HHL（5 mmol/L）、10 μL 的酶解液、30 μL 的 ACE 溶液（100 mU/mL），和 60 μL 的 HCl（100 mmol/L）组成，所有溶液均是由 100 mmol/L 的硼酸钠缓冲液（含 400 mmol/L 的 NaCl，pH 8.3）配制而成。将 HHL 和酶解液加入到 0.5 mL 聚乙烯离心管中混合均匀，在 37 ℃恒温水浴锅中预热 6 min，同时 ACE 也在 37 ℃恒温水浴锅中预热 6 min，接着将二者混合均匀，37 ℃保温，30 min 后加入 HCl 终止反应。

空白：取 10 μL 的硼酸钠缓冲液代替酶解液作为空白对照组

样空白：取 30 μL 的硼酸钠缓冲液代替 ACE 溶液作为样品的空白组。

ACE 活性计算公式如下：

$$ACE\text{抑制率}/\% = \frac{a_1-(b_1-c_1)}{a_1}\times 100$$

其中(b_1-c_1)记作 d_1。

注：a_1为空白组中 HA 的峰面积；b_1为反应液组中 HA 保留时间处的峰面积；c_1为酶解液的样空白组中在 HA 保留时间附近的峰（干扰峰）面积；d_1是净 HA 峰面积。

方法 2（先加入 ACE）：

反应液：将 ACE 和 HHL 的加入顺序调换作为方法 2，即 ACE 和酶解液先在 0.5 mL 聚乙烯离心管中混合均匀，在 37 ℃恒温水浴锅中预热 6 min，同时 HHL 也在 37 ℃恒温水浴锅中预热 6 min，接着将二者混合均匀，37 ℃保温，30 min 后加入 HCl 终止反应。（所有溶液均是由 100 mmol/L 的硼酸钠缓冲液（含 400 mmol/L 的 NaCl，pH 8.3）配制而成。）

空白：取 10 μL 的硼酸钠缓冲液代替酶解液作为空白对照组。

样空白：取 30 μL 的硼酸钠缓冲液代替 ACE 溶液作为样品的空白组。

ACE 活性计算公式如下：

$$ACE\text{抑制率}/\% = \frac{a_2-(b_2-c_2)}{a_2}\times 100$$

其中(b_2-c_2)记作 d_2。

注：a_2为空白组中 HA 峰面积；b_2为反应液组中 HA 保留时间处的峰面积；c_2为酶解液的样空白组中在 HA 保留时间附

近的峰（干扰峰）面积；d_0是净 HA 峰面积。

色谱条件：柱温 25 ℃，流速 0.6 mL/min，流动相：乙睛/水(含 0.5% TFA)比例为 25/75 等度洗脱，检测波长 228 nm，自动进样．进样量 20 L。色谱柱参数：ZORBAX Eclipse XDB-C18 分析用色谱柱（4.6 mm×250mm，填料粒径为 5-Micron）。

除了方法 1 与方法 2 的比较方面的数据之外，其它数据均是采用方法 1 得到的结果。

1.5 数据处理

文中试验重复三次，采用 excel2007 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 HPLC 测定 ACE 抑制率方法的改进

目前，高效液相色谱测定 ACE 抑制率的方法基本上都是采用简单的两组实验式，即反应液组和空白组，而忽略了样品自身的空白组。这种方法对于有些样品，尤其是酶解液，很不准确的。因为有些样品在 228 nm 也会有吸收峰，而当吸收峰与 HA 的吸收峰有交集时，便会干扰测定。只有通过多测定一组样品的空白组，并扣除样品的吸收峰面积，才可以达到消除样品本身的干扰的作用。

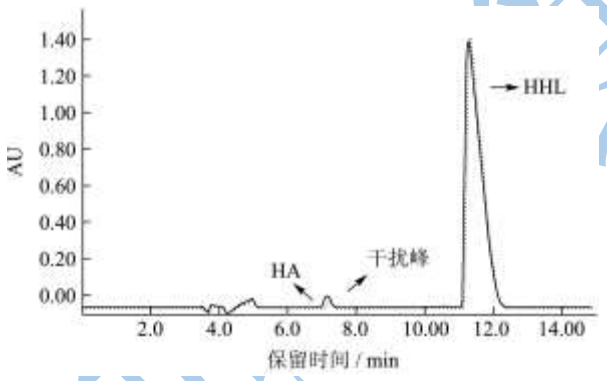


图 1 反应液 RP-HPLC 图与其对应的样空白 RP-HPLC 图重叠图

Fig.1 Overlap diagram of RP-HPLC chromatograms of reaction solution and sample control

由图 1 中可以看出，实线部分代表反应液的谱图，虚线部分代表样空白的谱图。在 HA 的保留时间附近，存在两个峰，较高的峰包含了 HA 和干扰峰，较低的峰是干扰峰。高的峰面积扣除低的峰面积才是反应液中生成 HA 的峰面积（净 HA 峰面积）。

图 1 中干扰峰的面积占总面积的 49.50%，可见，干扰峰的面积的存在对定量 HA 会产生很大的干扰。干扰峰产生的可能原因，酶解液含有大量的小肽、多肽等物质，其中的某些肽在 228 nm 处有吸收峰，且此吸收峰的保留时间正好在 HA 的附近。

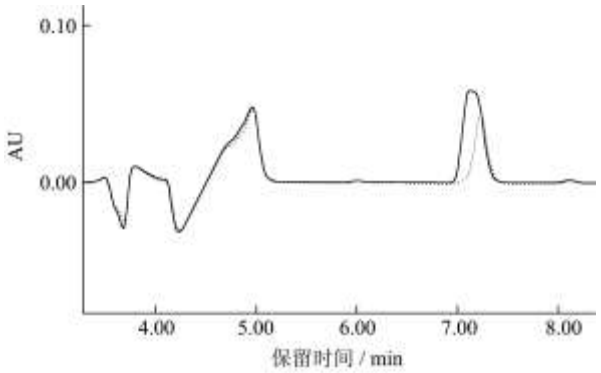


图 2 图 1 中 HA 和干扰峰的放大图

Fig.2 Enlarged diagram of the HA and interference peaks

2.2 干扰峰面积随酶解时间的变化情况

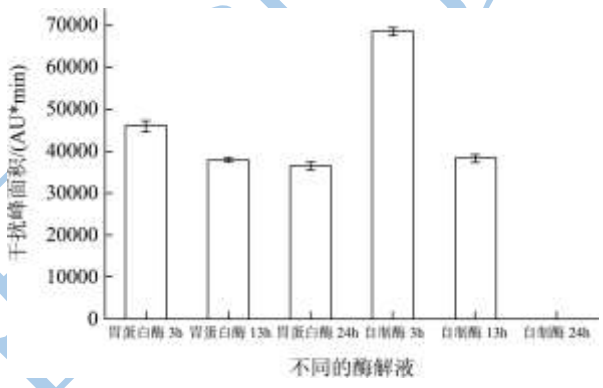


图 3 酶解液的干扰峰面积随酶解时间的变化

Fig.3 change of hydrolysate's interference peak area with hydrolysis time

由图 3 中可知，不同酶酶解的蛋白酶解液得到的干扰峰面积不同。同一种酶的酶解液，不同酶解时间段，其干扰峰面积也不同。随着酶解时间的延长，干扰峰逐渐减小。在自制酶酶解 24 h 时，干扰峰面积减小至 0。可能的原因是，干扰峰可能是某些肽类，随着酶解时间的延长，这些肽在酶的作用下逐渐被降解成氨基酸或者更小的肽[13]，导致干扰峰的面积逐渐减小。在自制酶的 24 h 酶解液中，这些肽已经被全部降解了。因此，在测定酶解液的 ACE 抑制率时，应消除每一个样品的干扰影响。因此，在测定过程中，不应以一个样品或者一类样品的干扰情况推测所有样品的干扰情况。

2.3 方法 1 与方法 2 得到的净 HA 峰面积（反应液峰面积扣除干扰峰的面积，公式中是字母 d）比较

净 HA 峰面积是指反应液中得到的 HA 保留时间

处的峰面积扣除对应的样空白中，同一保留时间处，样品本身的吸收峰面积。净 HA 峰面积反映的是，底物 HHL 与酶 ACE 的反应在受样品抑制的情况下，生成的 HA 的量。由图 4 中可以看出，对于同一种样品，方法 1 得到的净 HA 的峰面积均明显高于方法 2 的。方法 1 与方法 2 的区别是，在方法 2 中，ACE 与 HHL 反应前，ACE 预先与样品混合保温 6 min，而方法 1 则不存在此情况。方法 2 中的净 HA 峰面积之所以较低，可能是在 ACE 与样品混合保温时，样品对 ACE 进行了某种作用。有研究表明，ACE 是 Zn^{2+}依赖型羧二肽酶，包括降血压肽在内的各种 ACE 抑制剂的共同作用是与 ACE 活性部位的 Zn^{2+}结合，使之失活[14]。因此样品酶解液中的小分子肽可能是与 ACE 的 Zn^{2+}结合，使得酶活力降低。致使 ACE 与 HHL 的反应受抑制，生成 HA 少于方法 1 的。

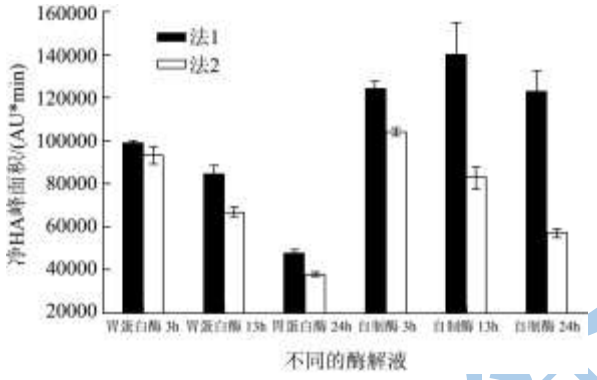


图 4 酶解液的净 HA 峰面积随酶解时间的变化

Fig.4 Change of hydrolysate's Net HApeak area with hydrolysis time

2.4 方法 1 与方法 2 得到的 ACE 抑制率的比较

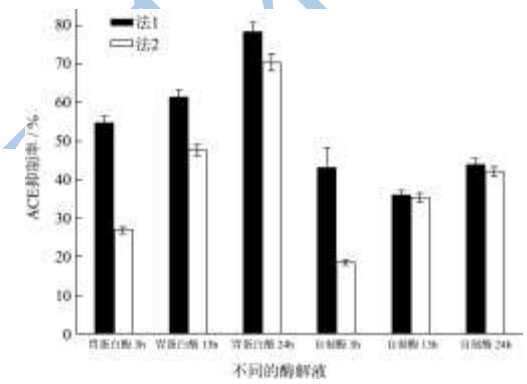


图 5 不同酶解液分别采用方法 1 和方法 2 得到的 ACE 抑制率比较

Fig.5 Comparison chart of different hydrolysate's ACE inhibitory activities obtained from method 1 and method 2

由图 5 中可知，采用方法 1 得到的 ACE 抑制率均高于方法 2 得到的 ACE 抑制率。同时，通过观察两种方法得到的空白数据（公式中是字母 a）发现，方法 1 得到的空白面积是方法 2 的 1.71 倍（$a_1/a_2 = 1.71$）。可能是因为 ACE 在含有 300 mmol/L 的 NaCl 溶液中，活性最佳[5]，在其它的 NaCl 溶液中，活性较低。二法的 ACE 均是溶解在含有 400 mmol/L NaCl 的缓冲液中，活性受到盐浓度的抑制。

之所以对于同种样品，方法 1 得到的 ACE 抑制率高于方法 2 的，可以用抑制率的计算公式去解释。已知 $a_1>a_2$，$d_1>d_2$（图 4），同时对于图 5 中的每一个样品 $(a_1/a_2)>(d_1/d_2)$（已用真实数据验证）均成立，因此 $[(a_1-d_1)/a_1]>[(a_2-d_2)/a_2]$($ACEI=(a-d)/a$)，$ACEI_1>ACEI_2$，法 1 的 ACE 抑制率大于法 2 的 ACE 抑制率。

张瑞东等人[15]与于志鹏[16]都是针对蛋清蛋白的 ACE 抑制率研究，而且二者的 ACE 抑制率测定方法基本一致，但 HHL 和 ACE 的加入顺序正好相反。分别对比二者的蛋清蛋白碱性蛋白酶酶解液的 ACE 抑制率，发现于志鹏的文章中 ACE 抑制率（采用方法 1 的加入顺序）普遍比张瑞东等人的研究报告中的 ACE 抑制率（采用方法 2 的加入顺序）高。

对于不同的酶解液而言，两种方法的差别并非是一致的。图 5 中，差别最大的是自制酶 3 h 酶解液，采用方法 1 得到的抑制率比方法 2 的高一倍多。同时，对于同一种酶，不同时间段的酶解液而言，两种方法分别测得抑制率的变化趋势大体是一致的。如对于胃蛋白酶酶解液，不论采用方法 1 还是方法 2，得到的 ACE 抑制率均是随着酶解时间的增加而增加。因此，对于选择测定方法时，不管选哪一种，只有由始至终都使用同样加入顺序，才可以真实地了解样品的变化趋势；对于不同研究报告，若采用不同的加入顺序测定得到的 ACE 抑制率之间是不具有比较性的。

3 结论

3.1 该改进的高效液相色谱法测定 ACE 抑制率方法，消除了样品在紫外 228 nm 的 HA 保留时间处的干扰影响，明显提高了测定的精确度。

3.2 对于不同的酶解液，干扰峰的面积不同。因而，应对样品逐个确定是否存在干扰的情况，测定其干扰峰的面积，以保证数据的准确性。

3.3 HHL 和 ACE 的加入顺序对测定结果有重要影响。且，应由始至终地采用同一种加入顺序，数据才具有可比性。

参考文献

[1] Robert S, Ueli B, Charlotte E, et al. ACE-inhibitory activity

and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties [J]. Dairy Sci. Technology, 2010, 90(1): 47-73

[2] Kato H, Suzuki T. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of Agkistrodon halys.Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them, potentiators B and C [J]. Biochemistry, 1971, 10(6): 972-980

[3] Ahna C B, Jeonb Y J, Kimc Y T, et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 2240-2245

[4] 于志鹏,赵文竹,刘博群,等.血管紧张素转化酶抑制肽研究进展[J].食品科学,2010,31(11):308-311
Yu Z P, Zhao W Z, Liu B Q, et al. Research Progress of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides [J]. Food Science, 2010, 31(11): 308-311

[5] Mina M Y, Ahmad A, JamshidKhan C. Structure and ACE-Inhibitory Activity of Peptides Derived from Hen Egg White Lysozyme [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2012, 18(4): 353-360

[6] Wu J P, Aluko R E, Muir A D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 950(1-2): 125-130

[7] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung [J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20(7): 1637-1648

[8] Chiang W, Tsou M, Tsai Z, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor [J]. Food Chemistry, 2006, 98(4): 725-732

[9] Wu J P, Muir A D. Isoflavone Content and Its Potential Contribution to the Antihypertensive Activity in Soybean Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides [J]. J. Agric. Food Chem., 2008, 56(21): 9899-9904

[10] Ko S C, Kang N, Kim E A, et al. A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine Chlorella ellipsoidea and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 2005-2011

[11] Qu W J, Ma H, Jia J Q, et al. Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 19(5): 1021-1026

[12] 夏克胜,赵谋明,崔春,等.马氏珍珠贝肉固体发酵制曲条件的优化[J].现代食品科技,2011,27(12):1472-1475
Xia K S, Zhao M M, Cui C, et al. Optimization of the Processing Conditions for Pinctada Martensi Koji [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(12): 1472-1475

[13] 崔春.海产低值鱼深度酶解工艺与机理研究[D].广州:华南理工大学（轻工与食品学院）博士学位论文,2005
Cui C. Study on Mechanism of extensive hydrolysis of low-valued fish [D]. Guangzhou: South China University of Technology (College of light industry and Food) Doctor's thesis, 2005

[14] 黄家音,朱禹洁,沈金玉.降血压肽研究进展[J].食品与发酵工业,2006,32(6):81-86
Huang J Y, Zhu Y J, Sheng J Y. The Progress of Study on antihypertensive peptides [J]. Food and Fermentation industries, 2006, 32(6): 81-86

[15] 张瑞东,迟玉杰,阮长青,等.酶解蛋清蛋白制备 ACE 抑制肽的工艺研究[J].食品科学,2010,31(14):1-4
Zhang R D, Chi Y J, Ruan C Q, et al. Optimization of EggWhite Protein Enzymolysis for the Preparation of ACE Inhibitory Peptides [J]. Food Science, 2010, 31(14): 1-4

[16] 于志鹏.蛋清源 ACE 抑制肽的结构鉴定及稳定性研究[D].长春:吉林大学(军需科技学院营养与功能食品研究室)硕士学位论文,2011
Yu Z P. Research on characterization and stability of Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from egg white [D]. Changchun:Jilin University(Laboratory of Natrition and Functional Food;College of Light Industry Economics and Management) master's thesis, 2011