

绍兴黄酒中 ACE 活性抑制肽的分离分析

戴 军¹, 陈尚卫¹, 谢广发³, 刘 俊², 帅桂兰², 顾小红¹, 赵光鳌²

(1 江南大学 分析测试中心, 江苏 无锡 214036; 2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036;
3 浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司, 浙江 绍兴 312000)

摘 要: 首次将绍兴黄酒中的肽类组分进行大孔吸附树脂柱层析和高效凝胶过滤色谱以及反相色谱的多步提取纯化与抑制血管紧张素转换酶 (ACE) 活性试验, 并首次利用基体辅助激光解吸电离-飞行时间串联质谱分析和液相色谱-电喷雾电离四极杆-飞行时间串联质谱联用分析鉴定出黄酒中 4 种 ACE 活性抑制肽的氨基酸序列为: VEDGGV、PST、NT 和 LY。

关键词: 黄酒; 血管紧张素转换酶; 活性肽; 氨基酸序列; 高效液相色谱; 基体辅助激光解吸电离; 串联飞行时间质谱; 电喷雾电离; 四极杆飞行时间串联质谱

中图分类号: O657.63; Q516 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)04-0074-04

Isolation and Sequence Analysis of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides in Chinese Rice Wine

DAI Jun¹, CHEN Shang-wei¹, XIE Guang-fa³, LIU Jun², SHUAI Gui-lan²,
GU Xiao-hong¹, ZHAO Guang-ao²

(1 Testing & Analysis Center of Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2 Biotechnology School of Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3 Zhejiang Guyue Longshan Shaoxing Wine Co., Ltd., Shaoxing 312000, China)

Abstract: Inhibitory peptides for angiotensin converting enzyme (ACE) were isolated from Chinese rice wine by hollow fibre ultrafiltration followed by column chromatography using AB-8 macroporous adsorption resins. Fractions of the peptides were purified on the TSK gel 2000 SWXL column using high performance gel filtration chromatography and on the symmetry C₁₈ column using semi-preparative reverse-phase high performance liquid chromatography, respectively. Their ACE inhibitory activities were then determined. Amino acid sequences of four bioactive peptides identified by MALDI-TOF-TOFMS and LC-ESI-TOFMS were VEDGGV, PST, NT and LY, respectively.

Key words: Chinese rice wine; Angiotensin converting enzyme; Bioactive peptides; Amino acid sequences; High performance liquid chromatography; Matrix-assisted laser desorption/ionization; Time-of-flight mass spectrometry; Electrospray ionization; Quadrupole-time of flight mass spectrometry

近年来, 从各种生物资源中分离出来许多具有生物活性功能的小肽。这些小肽易被肠道直接吸收, 它们不仅能提供机体生长、发育所需的营养物质与能量, 还同时在细胞生理及代谢调节上发挥重要作用, 如抑制酶活性、抗菌、降血压、调节免疫、调节神经和激素、降低胆固醇等^[1-2]。因此, 生物活性肽已成为功能性食品研究与开发的热点之一。黄酒为我国民族特产, 世界三大古酒之一, 享有“国酒”美誉。但是有关黄酒成分的研究还不够深入, 尤其是对黄酒中功能性组分的研究甚少。我们对绍兴黄酒中活性小肽及低聚糖、酚类、 γ -氨基丁酸等功能性组分进行了较系统深入的分析研究^[3-6]。本文参考其它食品中生物活性肽的提取分离方法^[7-8], 将绍兴黄酒经超滤和大孔吸附树脂柱层析得到肽的粗提物, 首次采用高效凝胶过滤色谱和反相液相色谱进一步分离纯化, 同时进行抑制血管紧张素转换酶 (ACE) 活性试验^[9-10], 并首次利用基体辅助激光解吸电离-飞行时间串联质谱 (MALDI-TOF-TOFMS) 分析和液相色谱-电喷雾电离四极杆-飞行时间串联质谱 (LC-ESI-TOFMS) 联用分析鉴定出黄酒中抑制 ACE 活性的 4 种肽的氨基酸序列。

收稿日期: 2005-10-28; 修回日期: 2006-01-03

基金项目: 浙江省经贸委 2002 年第一批省技术创新项目; 2003 年绍兴市第一批科技计划项目 (工业重点项目, 2003106)

作者简介: 戴 军 (1958-), 男, 江苏盐城人, 高级工程师, 博士研究生, Tel: 0510-85864482, E-mail: daihp@163.com

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HL-2S恒流泵, 上海沪西分析仪器厂; R-201真空旋转蒸发仪, 上海申科机械研究所; CONSEL24冷冻干燥机, BECKMAN超速离心机, 均为美国产; 超滤系统, 赛多利斯 (Sartorius) vivaflow 50; Waters600高效液相色谱仪, 美国 Waters公司; 4700 TOF/TOF蛋白组分析仪, 美国应用生物系统 (ABI)公司; QSTAR XL四极杆及飞行时间串联质谱仪, 美国应用生物系统 (ABI)公司; LC Packings纳升级毛细管液相色谱仪, 戴安公司。

95% (v/v)乙醇, 分析纯, 上海振兴化工一厂; 乙腈, 色谱纯, 德国 Merck公司; 三氟醋酸, 化学纯, 中国医药 (集团)上海化学试剂公司; 甲酸, 分析纯, 济南化学试剂厂; 大孔吸附树脂 DA201-C, 江阴市有机化工厂; 大孔吸附树脂 D4020, AB-8, 南开大学化工厂; 大孔吸附树脂 SP825, 日本三菱化学公司; 黄酒样为浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司 2000年传统工艺加饭酒。

1.2 实验方法

1.2.1 小肽的提取分离 用 2.6×80 cm的玻璃层析柱装上用乙醇浸泡 24 h后的大孔吸附树脂, 分别用 95%乙醇和纯水洗柱后, 将超滤 (截留相对分子质量大于 5 000)并除去乙醇的黄酒样上柱 30 mL, 然后分别用水和 10%乙醇各 1 000 mL, 及 20%、30%、40%、50%、90%乙醇均 500 mL梯度洗脱。流速: 上样吸附, 1 mL/min; 洗脱, 2~3 mL/min。洗脱液每 100 mL收集 1瓶, 依次编号, 对每瓶流分均以 Fehling试剂检测糖分, 并用 Folin-酚试剂及高效凝胶过滤色谱检测肽组分^[11]。

1.2.2 凝胶色谱分离分析条件 色谱柱: TSK gel 2000 SWXL 7.8 mm ID $\times$ 300 mm; 流动相: 乙腈-水-三氟醋酸 (体积比 45:55:0.1); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 25℃。

1.2.3 反相色谱制备条件 色谱柱: Symmetry C₁₈柱, 7.8 mm ID $\times$ 150 mm; 流动相: A: 乙腈-水-三氟醋酸 (体积比 5:95:0.02); B: 乙腈-水-三氟醋酸 (体积比 80:20:0.02); 洗脱梯度: 0~10 min, 100% A, 0% B; 30 min, 60% A, 40% B; 33~36 min, 0% A, 100% B; 38~42 min, 100% A, 0% B。柱温: 25℃; 流速: 2.5 mL/min; 检测波长: 220 nm。

1.2.4 抑制 ACE活性试验方法 将样液 (0.1 g/L) 10 μ L与 40 μ L 2.17 mmol/L HHL (马尿酸组氨酰亮氨酸)置于 37℃水浴 10 min, 加入 20 μ L 0.1 U/mL ACE (血管紧张素转换酶), 37℃水浴反应 30 min, 再向其中加入 80 μ L 1 mol/L HCl, 冷却至室温, 用 HPLC分析马尿酸 (HA), 计算 ACE活性。

1.2.5 马尿酸 HPLC分析条件 色谱柱: Symmetry C₁₈, 3.9 mm ID $\times$ 150 mm; 流动相: 乙腈-水-醋酸 (体积比 12:88:0.5); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 238 nm; 柱温: 40℃。

1.2.6 MALDI-TOF-TOF-MS分析条件 基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (6 g/L)与样品按 1:1 (体积比)混合, 共结晶于靶盘上, 激光波长 337 nm, 一级质谱激光强度 5 200, 谱图累加次数 2 400, CD串联质谱激光强度 5 800, 谱图累加次数 5 000。

1.2.7 LC-ESI-Q-TOF-MS分析条件 色谱: 分析柱: PepMap nano C₁₈, 0.075 mm ID $\times$ 150 mm, 3 μ m; 流动相 A: 95%水, 5%乙腈, 0.1% TFA; B: 95%乙腈, 5%水, 0.1% TFA; 洗脱梯度: 0~5 min, 100% A; 5~30 min, 100%~65% A; 30~35 min, 65%~100% A。流速: 200 nL/min。

质谱: 喷雾电压 1 500 V, 去簇电压 75 V, 聚焦电压 280 V, 辅助去簇电压 15 V。

2 结果与讨论

2.1 肽组分的提取及其活性

为将含量较低的肽从黄酒中提取分离出来, 实验分别使用 DA201-C、D4020、SP825、AB-8 4种大孔吸附树脂, 在同样的柱尺寸、洗脱条件下对黄酒样 (传统工艺酒)中肽类的进行吸附分离实验, 结果表明: 只有 AB-8对肽的吸附能力较强, 且能将肽和糖分及色素分离得较好。糖分在用水洗脱时即流出, 色素从 30%乙醇洗脱时开始出现并逐渐增多。第 15至第 25号瓶的流分, 肽含量较高且无糖分也无色素。将第 15~20号瓶 (10%乙醇洗脱的后一半)合并作为 1#流分, 21~25号瓶 (20%乙醇洗脱流分)合并作为 2#流分, 并分别浓缩、冻干后进行降血压体外活性 (ACE抑制活性)实验。结果显示: 1#粗提物的活性较高。故将 1#粗提物上高效凝胶过滤色谱 (HPGFC)分离 (图 1), 多次分段收集得到 G1、

G2、G3、G4各流分，并分别冻干后做 ACE抑制活性试验，结果表明 G3流分活性较高，因此将 G3流分上反相柱分离，其色谱分离图见图 2，按图示多次分段收集得到 6个流分，分别冻干后进行 ACE抑制活性试验，结果是：R1、R2、R3没有显著活性，R4、R5、R6活性较高，且 R5活性最强(表 1)。

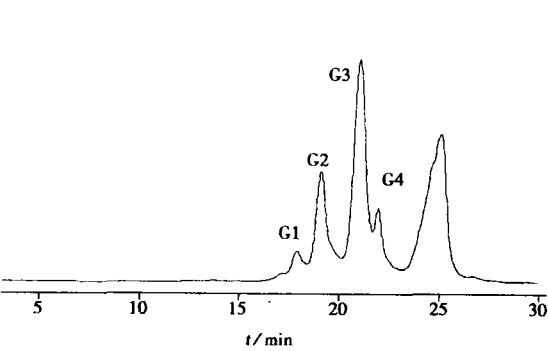


图 1 1#粗提取物的高效凝胶过滤色谱制备分离图
Fig. 1 Preparative separation of 1# crude extract on HPGFC column(TSK gel 2000SW XL)

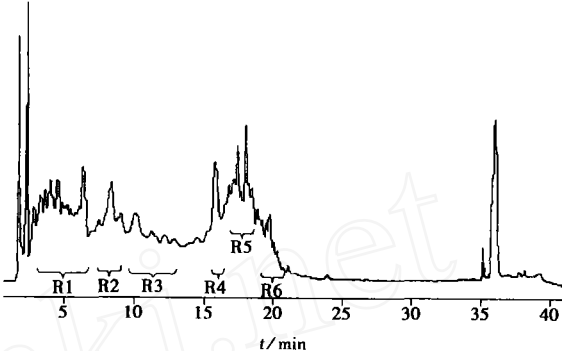


图 2 凝胶柱流分 G3 的反相制备色谱分离图
Fig. 2 Semi-preparative HPLC separation of G3 GFC fraction on symmetry C₁₈ column

2.2 活性部位肽的 LC - MS/MS分析

将反相柱上收集的活性肽流分 R5冻干后水溶，按“1.2.6”进行 MALD FTOF-TOFMS分析。由于目标化合物相对分子质量比较小，样品分析时同时分析基质，将基质的 MS图谱与基质+样品的 MS图谱进行对照，得到主要母离子分别为 575.23、304.18和 234.12，再经高能碰撞池碰碎后进行第二级 TOF分析，所得二级质谱图见图 3。由软件解谱得到 3个肽的氨基酸序列分别为：VEDG-GV、PST 和 NT，即：Val-Glu-A sp-Gly-Gly-Val，Pro-Ser-Thr，Asn-Thr。

活性肽流分 R4和 R6经 MALD FTOF-TOFMS分析，因基质干扰较大未得到确切结果，故将两者又经 LC - ESIQ-TOF-MS联用分析，所得质谱数据经软件自动 De novo分析，得到 R4中含有两个小肽，为 LY(即 Leu-Tyr)和 PST，其中 PST与 R5中的 PST为同一个肽组分，因为 R4峰和 R5峰有部分重叠，未完全分离。流分 R6由于量较少，干扰较大，没有得到比较确定的结果。

2.3 ACE活性抑制肽与工艺相关性

上述研究结果表明绍兴黄酒中含有的小肽具有显著的抑制 ACE活性，其活性肽的产生主要归因于黄酒酿制过程中所用的原料(糯米与小麦)和麦曲、酒药中特有的多种微生物和酶的作用。表 2 为 3种不同工艺条件下生产的黄酒中肽的含量，显然黄酒中肽的量与工艺有关。若适当调整工艺，提高黄酒中活性肽含量，并适度降低酒精量，即可开发更具保健养生

表 1 反相制备流分 R4~R6的 ACE抑制活性

Table 1 ACE inhibitory activity of RP - HPLC fractions R4 ~ R6

Sample	Hippuric acid amount $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	ACE inhibitory activity/%
Blank	78.62	/
R4	11.79	85
R5	7.72	90
R6	13.73	83

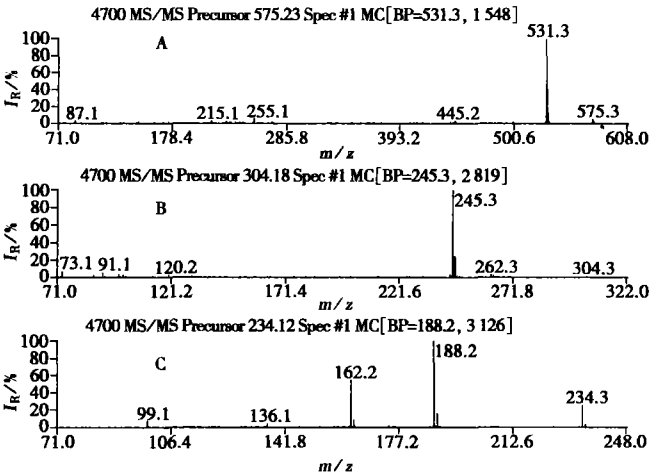


图 3 反相制备流分 R5的 MALD FTOF-TOFMS分析图谱
Fig. 3 MALD FTOF-TOFMS spectra of RP - HPLC fraction R5
A. VEDGGV; B. PST; C. NT

表 2 不同工艺黄酒中肽含量测定结果

Table 2 Peptides contents in rice wine brewed by

Process conditions	different process $\rho / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$		
	1	2	3
Total amino acid contents	17.62	22.03	17.11
Free amino acid contents	3.75	4.48	4.24
Peptide contents	13.87	17.55	12.87

功能的黄酒新品。然而，我们仅初步分析研究了几种不同工艺生产的黄酒中总肽量与工艺的相关性以及其中一种黄酒的抑制 ACE 活性肽和活性部位肽的氨基酸序列，有关工艺与不同活性肽或活性肽部位的较全面的相关性以及黄酒肽的生理活性机理还有待进一步进行大量的分析研究。

致谢：本文的质谱分析研究工作得到复旦大学张祥民教授、张婕博士和美国应用生物系统 (AB I) 中国公司于雁灵博士的热心帮助和指教，谨表衷心感谢！

参考文献：

- [1] 陈季旺, 姚惠源. 几种常见植物蛋白生物活性肽的研究概述 [J]. 中国油脂, 2003, 28(1): 37 - 40.
- [2] YOSHIIYUKI S, KEIKO W. Structure and activity of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(10): 1767 - 1771.
- [3] 谢广发, 戴 军, 赵光鳌, 等. 科学认识黄酒的保健养生功能 [J]. 中国酿造, 2004, 130: 30 - 31.
- [4] 谢广发, 戴 军, 赵光鳌, 等. 黄酒中的功能性低聚糖的检测 [J]. 中国酿造, 2005, 143: 39 - 40.
- [5] 谢广发, 戴 军, 赵光鳌, 等. 黄酒中的 γ 氨基丁酸及其功能 [J]. 中国酿造, 2005, 144: 49 - 50.
- [6] 戴 军, 谢广发, 陈尚卫, 等. 绍兴黄酒中一种 ACE 活性抑制肽的分离和鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5): 98 - 101.
- [7] DESPORTES C, CHARPENTIER M, DUTEURTRE B, et al. Liquid chromatographic fractionation of small peptides from wine[J]. J Chromatogr, A, 2000, 893: 281 - 291.
- [8] 赵 利, 王 璋, 许时婴. 大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽吸附性的研究 [J]. 食品工业科技, 2002, 23(12): 28 - 31.
- [9] ONDETTIM A, RUBIN B, CUSHMAN D W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents[J]. Science, 1977, 196: 441 - 444.
- [10] WU J P, ALUKO R E, MUR A D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions[J]. J Chromatogr, A, 2002, 950: 125 - 130.
- [11] 王 梅, 戴 军. 高效凝胶过滤色谱法测定玉米蛋白酶解产物寡肽的分子量分布 [J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(5): 25 - 27.

(上接第 73 页)

实验结果表明，自制溶胶 - 凝胶 PEG-20M 固相微萃取头对蔬菜样品中的扑草净有一定的选择性吸附作用，可用于实际蔬菜样品中残留扑草净的分离分析。

参考文献：

- [1] ZHANG Z, YANG M, PAWLISZYN J. Solid-phase microextraction[J]. Anal Chem, 1994, 66: 844.
- [2] WANG D X, CHONG S L, ABDUL M. Sol - gel column technology for single step deactivation coating and stationary-phase immobile in high-resolution capillary chromatography gas[J]. Anal Chem, 1997, 69: 4566 - 4576.
- [3] 徐 溢, 付钰洁. 固相微萃取萃取头制备技术及试验方法的进展 [J]. 色谱, 2004, 22(5): 528 - 534.
- [4] 蒋银土, 朱 岩, 郭莹莹, 等. 离子色谱法测定三嗪类除草剂 [J]. 浙江大学学报, 2001, 28(5): 533 - 536.
- [5] 仇文丽, 曾昭睿, 彭 庆, 等. 用溶胶 - 凝胶法制备 PEG-20M 固相微萃取探头 [J]. 分析科学学报, 2001, 17(3): 198 - 202.