

# 亲和色谱法筛选中药中血管紧张素转化酶抑制剂

黄燕<sup>①</sup>, 田清清<sup>②</sup>, 李谭瑶<sup>②</sup>, 陈波<sup>②</sup>, 姚守拙<sup>①②\*</sup>

① 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082;

② 湖南师范大学化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 长沙 410081

\* 通讯作者, E-mail: szyao@hnu.cn

收稿日期: 2009-06-11; 接受日期: 2009-06-21

**摘要** 以壳聚糖微球为载体、戊二醛(glutaraldehyde, GA)为交联剂对血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)进行固定化. 用固化的 ACE 作为亲和介质, 利用血管紧张素转化酶抑制剂(Angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)与 ACE 之间的亲和作用, 结合高效液相色谱对亲和前后的体系进行检测, 比较两者各组分色谱峰的差异, 以此实现快速筛选复杂体系中的 ACE 抑制剂. 应用赖诺普利(Lisinopril)、九肽抑制剂、依那普利(Enalapril)、培哚普利(Perindopril)、卡托普利(Captopril)等已上市的 ACEI 对方法进行验证, 反映方法具有高度选择性. 将方法应用于中药地龙及山楂筛选, 发现共有 5 个组分与 ACE 有亲和作用, 并且都能抑制 ACE 酶活性, 它们对酶活性抑制的 IC<sub>50</sub> 值在 0.45~4.62 μg/mL 范围. 通过对亲和方法重现性考察, 6 次测定的相对标准偏差小于 1%, 说明方法可靠. 提出的亲和色谱-色谱指纹差异法非常适合于从中药及天然产物等复杂混合物库中快速筛选靶点活性物质.

## 关键词

中药  
血管紧张素转化酶抑制剂  
筛选  
亲和色谱  
固定化酶

## 1 引言

中药的有效性毋庸置疑. 然而在近现代主流药理学中, 中药仅扮演着配角角色, 根本原因在于药效物质基础不明. 中药药效物质的阐明对于中药的质量控制、新药研发及毒性控制有着重要意义<sup>[1-4]</sup>. 在高血压治疗中, 目前已知的具降压作用的中药有 70 多种. 其中天麻、钩藤、菊花等可有效改善眩晕; 柴胡、龙胆草、地龙等可缓解急躁易怒; 山楂、五味子、柏子仁能改善心悸失眠等. 尽管作用各不相同, 但都有明确的降压作用. 探寻这些中药中的有效物质对于合理解释中药的作用机理、开发新型抗高血压药物有着明显意义.

血管紧张素转化酶(Angiotensin converting en-

zyme, ACE)是一种膜固定的二肽羧基金属蛋白酶, 在体内它能将血管紧张素 I(十肽, Ang I)水解成血管紧张素 II(八肽, Ang II), 而使得血管收缩, 引起血压升高. 目前, 血管紧张素转化酶抑制剂(Angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)是一类极为重要的高血压治疗药物. 但人工合成的 ACEI 存在一些不良反应, 如咳嗽、味觉功能紊乱及皮疹等. 因此从天然产物及中草药中筛选新的 ACEI 将为高血压的治疗提供新的药物.

酶抑制剂的筛选方法主要被划分为两类: 均相溶液酶法和固相酶法. 前者以溶液酶作为酶源, 在酶溶液中加入底物和抑制剂, 共同反应一段时间后, 通过检测溶液酶的活性, 来评估抑制剂对酶的抑制效果.

后者将酶固定化,制成酶柱或酶反应器,通过检测酶与抑制剂特异性结合的效果,来实现对酶抑制剂的筛选.目前,ACEI的筛选方法主要基于前者.

亲和色谱是利用生物分子间亲和吸附和解离来进行的一种分离方法,分离过程具有高度的生物作用定向性;近年来,该法被广泛用于药物筛选研究<sup>[1,2,5~7]</sup>,并在天然产物活性成分筛选中体现出高效的特点.在 ACE 固定化方面, Megias 等<sup>[8,9]</sup>通过交联的方法,将 ACE 固定在琼脂糖表面,以此作为亲和色谱填料,从太阳花和油菜籽的蛋白水解液中提取出 ACE 抑制肽.孙凤祥等<sup>[10]</sup>用碳二亚胺为交联剂,将 ACE 交联在壳聚糖上制成亲和色谱柱,对猪骨胶原蛋白酶解物中的 ACEI 进行分离纯化. Tang 等<sup>[11]</sup>将 ACE 固定在毛细管内壁,发展了一种在线检测 ACEI 活性的毛细管电泳法.刘宏等<sup>[12]</sup>比较了包埋法和共价结合法对固定 ACE 的影响,其结果显示采用苯甲磺酰氯法固定 ACE,酶固相化效率高,酶活性保留较好.本课题组<sup>[13]</sup>将 ACE 通过共价交联固定在壳聚糖糖珠表面,获得了良好的稳定性和重复性;高活力固定化 ACE 的研究为 ACEI 亲和色谱提供了基础.

本文在前期工作基础上,以固定化血管紧张素转换酶做为亲和介质,通过亲和和吸附截留中药提取液中部分组分,在进行提取液指纹图谱比对后,快速确定中药中对酶活性有抑制作用的组分.该方法能从复杂成分中高效挖掘与靶点相互作用的组分,是进一步纯化、分析、制备有抑制活性的目标组分等后续工作的基础.

## 2 实验部分

### 2.1 试剂及材料

ACE (兔肺, 2.0~6.0 units/mg)及马尿酸双甘肽(马尿酸甘氨酸甘氨酸, Hip-Gly-Gly, HGG)购自 Sigma 公司(美国).壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90.0\%$ )购自国药集团(上海).赖诺普利(Lisinopril)、九肽抑制剂、依那普利(Enalapril)、培哚普利(Perindopril)、卡托普利(Captopril)购自中国药品生物制品检定所(北京).色谱流动相用的溶剂均为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯.水为 Milli-Q lab(Millipore Co. 美国)制备的超纯水.实验用的地龙、山楂药材购自老百姓大药房(长沙).

### 2.2 仪器

Waters 2695 分离单元(美国, Waters 公司),包括低压梯度泵、自动进样器和柱温箱. Waters 996 二极管阵列检测器(美国, Waters 公司); Micromass ZQ 2000 质谱检测器(英国, 曼彻斯特),配有电喷雾(ESI)电离源和四级杆质量分析器; Masslynx<sup>TM</sup> 4.0 数据处理软件. Waters Prep-4000 制备色谱仪,包括 Waters 2487 双波长紫外检测器(附制备池), M<sup>32</sup> 色谱工作站(美国, Waters 公司). C<sub>18</sub> 分析色谱柱购自大连江申分离科学技术公司.

### 2.3 样品处理

地龙提取条件: 10 g 地龙粉末,用 100 mL 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲液(pH 8.3, 下同)70℃超声提取 90 min,取上清液,过膜,备用.

山楂提取条件: 10 g 山楂粉末,用 100 mL 纯水 70℃超声提取 90 min,用 80%乙醇处理去掉果胶,过滤后将滤液蒸干,用 50 mL 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲液溶解,过膜,备用.

### 2.4 酶固定化

参照文献方法<sup>[13]</sup>进行 ACE 固定.取一定量的壳聚糖珠按 1 : 10(W/V)比率加入 2.5%的 GA 溶液,室温下磁力搅拌交联 3 h.反应完毕后,去离子水洗, 0.3 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液洗,再用去离子水洗,直至清洗液中无 GA.将 ACE 酶溶液(0.1 mmol/L)按 10 : 1(V/W)比率与交联壳聚糖珠在室温下反应 1 h(磁力搅拌),然后置于 4℃冰箱中反应过夜.反应完成后,分别以去离子、缓冲液、去离子水洗,直至洗净未键合的 ACE.加入 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲液,冷藏待用.

### 2.5 亲和筛选

分别将固定 ACE 壳聚糖珠和空白壳聚糖珠湿法填充于空的不锈钢液相色谱柱中(50 mm × 4.6 mm),再分别用 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲液洗柱.取 2 份待测样品溶液分别流过 ACE 壳聚糖柱和空白壳聚糖柱(柱温: 37℃),以二极管阵列检测器监控柱后流出物,分别收集突破曲线突破点前的流出物.流出物再作 HPLC 分析,得到流出物的指纹图谱.色谱条件

如下:

地龙: A 流动相: 水(0.1%三氟乙酸), B 流动相: 乙腈(0.1%三氟乙酸); 梯度洗脱: 0~20 min, B 由 0% 线性增加至 10%; 20~25 min, B 由 10% 线性增加至 40%; 40% 维持 5 min. 检测波长: 280 nm; ODS-C<sub>18</sub> 分析色谱柱(200 mm × 4.6 mm), 流速: 1 mL/min, 进样量: 10 μL.

山楂: A 流动相: 水(0.1%三氟乙酸), B 流动相: 乙腈(0.1%三氟乙酸), 梯度洗脱: 0~5 min, B 维持在 3%; 5~10 min, B 由 3% 线性增加至 5%; 10 到 20 min, B 由 5% 线性增加至 13%; 20~30 min, B 由 13% 线性增加至 22%; 30~38 min, B 维持 22%; 38~43 min, B 由 22% 线性增加至 70%; 43~55 min, B 维持 70%; 55~60 min, B 由 70% 线性增加至 95%; 95% 维持 5 min. 检测波长: 265 nm; ODS-C<sub>18</sub> 分析色谱柱(200 mm × 4.6 mm), 流速: 1 mL/min, 进样量: 10 μL.

## 2.6 活性组分酶活性抑制率的测定

以 HGG 为 ACE 底物, 采用液相色谱-质谱法测定产物(马尿酸)的含量来评价酶的活力, 通过空白对比及目标化合物的加入对酶活力的影响来确定亲和筛选得到的目标成分的酶活性抑制能力.

具体方法如下: 2 mmol/L HGG 和兔肺 ACE(1 mU)反应, 总反应体积为 80 μL. 对照组的组成为: 40 μL HGG 4 mmol/L、20 μL 缓冲液(含 300 mmol/L NaCl 的 100 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-甲酸缓冲(pH 8.3))和 20 μL ACE(1 mU); 对应实验组的组成为: 40 μL 4 mmol/L HGG、20 μL 含目标化合物的缓冲液和 20 μL ACE(1 mU). 37℃ 恒温水浴锅中反应 8 min 后, 加 160 μL 含内标的乙腈溶液, 旋涡震荡 3~5 s, 0.45 μm 的膜过滤后, 进样 10 μL.

ACE 活性抑制率的的计算公式:

$$\text{ACE 活性抑制率(\%)} = 100 \times \left\{ \frac{([HA]_d/[IS] - [HA]_s/[IS])}{[HA]_d/[IS]} \right\},$$

式中  $[HA]_d/[IS]$  和  $[HA]_s/[IS]$  分别代表对照组和实验组中马尿酸和内标(对苯二甲酸)的浓度比值.

色谱条件: 选用 C<sub>18</sub> 分析色谱柱, 柱温设为 30℃, Waters 2487 双波长紫外检测器波长设为 228 nm. 流

动相采用 0.2 mL/min 的乙腈和 0.8 mL/min 的 0.08% 乙酸水溶液等度洗脱.

质谱条件: 流动相过色谱柱后按 3:1 分流, 以 0.25 mL/min 的流速进质谱; 用 ESI 质谱的负离子模式(ESI<sup>-</sup>)产生马尿酸及对苯二甲酸(内标)的分子离子峰  $[M-H]^-$ ; 选择离子设置为  $m/z$  178.1 和 164.9(马尿酸、对苯二甲酸  $[M-H]^-$  离子的  $m/z$  值分别为 178.1 和 164.9), 并用选择离子对马尿酸进行定量; 毛细管电压为 3500 V; 锥孔电压为 23 V; 源温度为 120℃; 脱溶剂气和锥孔气流速分别为 300 L/h, 60 L/h; 萃取电压为 5 V; RF 透镜电压为 0.5 V.

## 3 结果与讨论

### 3.1 筛选结果

ACEI 通过抑制 ACE 活性, 使 Ang II 的生成减少, 降低血管阻力, 降低血压. 其作用机理现在一般认为, ACEI 具备两个必要结构特征与酶的活性部位相结合: Zn<sup>2+</sup> 配位基团与 ACE 的 Zn<sup>2+</sup> 结合, 末端羧基与 ACE 的正电荷部位呈离子键结合. 同时, ACEI 具备辅助基团与 ACE 的其他辅助活性部位结合, 如一些酰胺里的羰基与 ACE 的供 H 部位呈氢键结合, 图 1 为 ACEI 药物卡托普利(captopril)与血管紧张素转换酶的作用机理. 正因为抑制剂与 ACE 间的多基团相互作用, 封闭了 ACE 的活性部位, 从而产生抑制作用; 因此, 通过酶对中药混合物进行亲和吸附, 可快速有效地从混合物中定向得筛选出酶抑制剂.

本文利用壳聚糖固定化 ACE 制备亲和液相色谱柱, 通过比较亲和作用前后各组分色谱峰的差异以定向筛选中药中的 ACEI 活性组分. 为考察筛选方法的可靠性, 即固化 ACE 是否可以对 ACEI 进行有效的特异性结合, 采用本方法对 ACEI 药物进行了考察,

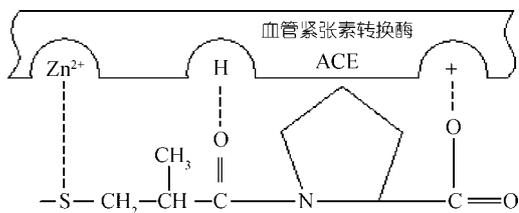


图 1 Captopril 与血管紧张素转换酶 ACE 的作用机理

结果见图 2. 从图 2(a)和(b)中可以发现 Lisinopril 及九肽抑制剂与固化 ACE 亲和后, 其对应的色谱峰明显低于空白柱, 说明固化 ACE 能对这两种 ACEI 有效截留. 而 Enalapril 和 Perindopril 与过 ACE 柱后, 相比于空白柱无明显变化(图 2(c)和(d)). Enalapril 和 Perindopril 为上市前体药, 它们进入人体后, 需经过水解作用才能生成抑制 ACE 的活性物质, 而它们本身对 ACE 没有抑制作用. 由于它们不能与固化 ACE 发生特异性结合, 其浓度与空白柱相比没有明显变化, 故实验组和对照组中其对应的色谱峰面积没有明显差异. 为考察亲和柱对复杂组分的筛选效率, 将 lisinopril, perindopril 和 captopril 三者均匀混合, 组成 ACEI 组与 ACE 柱进行亲和. 图 2(e)显示当混合组分流过 ACE 柱后, lisinopril 与 captopril 的对应色谱峰明显小于对照组, 而 perindopril 的色谱峰与对照组相比无明显变化, 表明 ACE 柱能特异性地吸附复杂组分中的 ACEI 活性物质. 上述结果说明本文采用的固化 ACE 能与 ACEI 发生特异性结合, 而不会与其他非活性物质作用. 因此本方法可以准确、有效地对溶液中的 ACEI 进行筛选.

图 3(a)和(b)为地龙及山楂样液在 ACE 酶柱亲和及空白柱处理后的指纹图谱. 从亲和吸附与空白吸附对比谱图看, 地龙提取液中保留时间为 11.7 min(1#), 13.2 min(2#)及 15.2 min(3#)的组分与酶有明显的亲和作用; 在山楂提取液中, 保留时间为 11.2 min(4#)及 12.5 min(5#)的组分也有明显的亲和作用, 这些组分是潜在的酶活性抑制剂. 经 5 次重复实验, 结果一致.

### 3.2 活性组分酶活性抑制率的测定

采用制备液相色谱法对地龙及山楂中的 1~5#组分进行制备分离, 按照 2.6 节中的方法测定得到的 1#~5#组分的酶活力抑制率, IC<sub>50</sub> 值(抑制剂对酶活力抑制率为 50%时所对应的浓度)见表 1.

从结果看, 与 ACE 有亲和作用的 5 种组分均表现出较高的酶活力抑制作用. 尽管与上市的化学合成酶抑制剂相比, 这些组分的抑制活性仍然偏低(如: Captopril 对 ACE 抑制的 IC<sub>50</sub> 值范围为 1.34 ~ 10.38 ng/mL), 但能说明中药地龙及山楂降压的机理部分

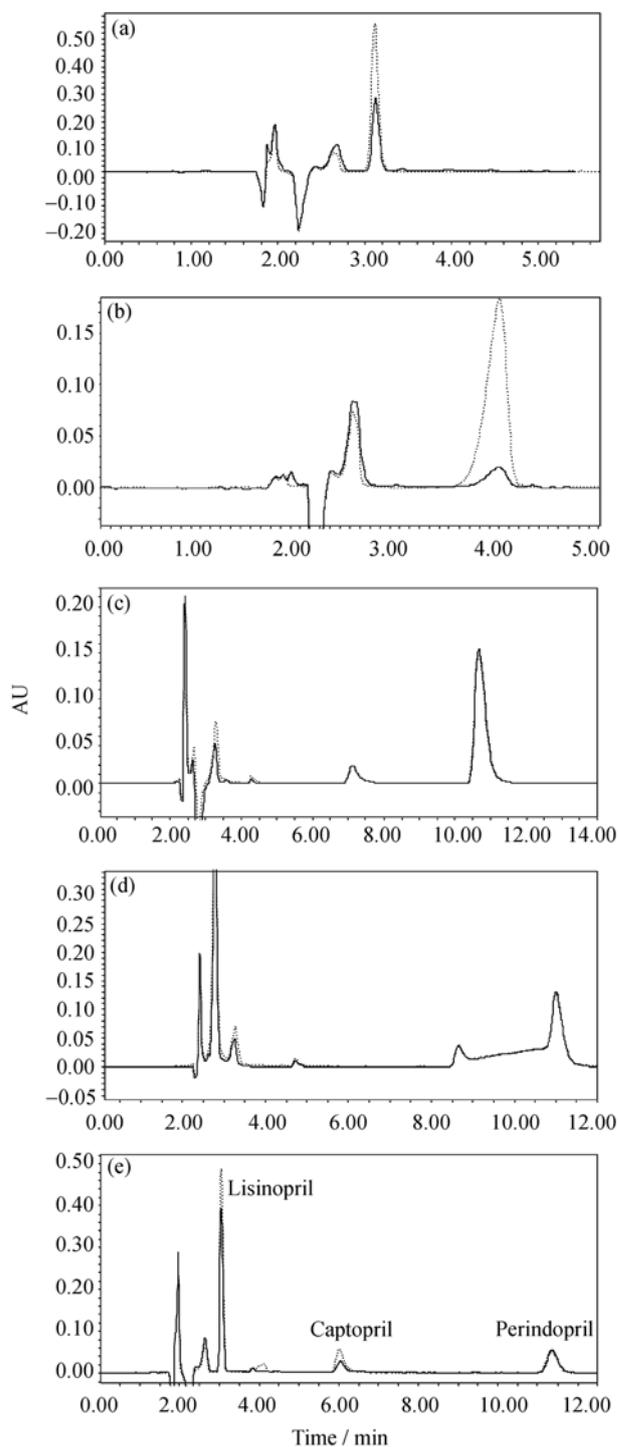


图 2 各种上市的 ACEI 药物与固化 ACE 作用后的比较谱图

药物依次为(a) Lisinopril; (b) 九肽抑制剂; (c) perindopril; (d) enalapril; (e) lisinopril, captopril 和 perindopril 混合组. 实线为固化 ACE 亲和柱组, 虚线为空白组

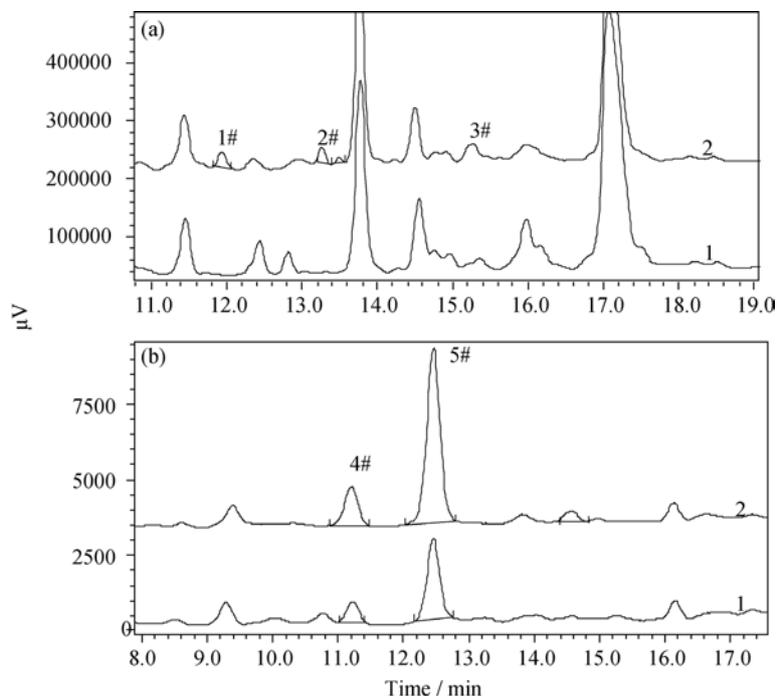


图3 地龙及山楂亲和筛选色谱图

(a) 地龙; (b) 山楂. 1 为固化 ACE 亲和柱组, 2 为空白组. 1#~5#组分为与 ACE 特异性结合的组分

表1 1#~5#组分对 ACE 的 IC<sub>50</sub> 值

组分	IC <sub>50</sub> 值 (μg/mL)
1#	1.12
2#	1.67
3#	4.62
4#	2.11
5#	0.45

包含 ACEI 作用. 这些组分的化学结构和生理功能研究正在进行中.

### 3.3 筛选重现性

由于本方法是通过比较亲和和作用前后各组分色谱峰的差异来对 ACEI 进行筛选, 亲和作用的稳定性和重现性对筛选的结果至关重要, 因此对方法的重现性进行了考察. 以浓度为 0.2 mmol/L 的 Captopril 分别过酶柱及空白柱, 重复 6 次, 峰面积结果见表 2. 结果显示, Captopril 峰面积的相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)分别为 0.90%和 0.38%. 由此可见, 在本实验条件下, 方法有很好的重现性.

表2 Captopril HPLC 检测峰面积的重现性

序号	过空白柱后 [μV·S]	过酶柱后[μV·S]
1	17890250	997425
2	17990218	999173
3	18100237	998116
4	17823562	996141
5	18078293	995763
6	17678723	996572
RSD	0.90%	0.38%

## 4 结论

本文发展了亲和色谱联用 HPLC 从中药中筛选 ACEI 的方法, 方法快速、准确, 仪器简单, 可行性高. 与目前 ACEI 的筛选方法相比具有三个方面的优势: (1) 不需要引入酶底物溶液, 实验消耗小、成本低; (2) 方法简单, 筛选速度快; (3) 可以对复杂体系中的 ACEI 进行筛选.

**致谢** 本工作得到国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB504701)和国家自然科学基金(批准号: 20875028)资助, 特此一并致谢.

## 参考文献

- 1 邹汉法, 汪海林. 生物色谱技术分离、鉴定和筛选中药活性成分. 世界科学技术-中药现代化, 2000, 2: 9—13
- 2 郑晓晖, 赵新锋, 杨荣, 王世祥, 卫引茂, 郑建斌.  $\beta$ -肾上腺素受体亲和色谱及其在苦杏仁活性成分筛选中的应用. 科学通报, 2007, 52: 2111—2115
- 3 梁逸曾, 易伦朝, 许青松. 中药现代化研究与化学计量学. 中国科学 B 辑: 化学, 2008, 38: 278—287
- 4 鄢丹, 肖小河, 金城, 董小萍. 微量量热法研究黄连中小檗碱类生物碱对金黄色葡萄球菌生长代谢的影响. 中国科学 B 辑: 化学, 2008, 38: 487—491
- 5 Ng E S M, Yang F, Kameyama A, Palcic M M, Hindsgaul O, Schriemer D C. High-throughput screening for enzyme inhibitors using frontal affinity chromatography with liquid chromatography and mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005, 77: 6125—6133
- 6 Vutukuru S, Kane R S. Surface plasmon resonance spectroscopy-based high-throughput screening of ligands for use in affinity and displacement chromatography. *Langmuir*, 2008, 24: 11784—11789
- 7 Jonker N, Kretschmer A, Kool J, Fernandez A, Kloos D, Krabbe J G, Lingeman H, Irth H. Online magnetic bead dynamic protein-affinity selection coupled to LC-MS for the screening of pharmacologically active compounds. *Anal Chem*, 2009, 81: 4263—4270
- 8 Megias C, Pedroche J, Yust M M. Affinity purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides using immobilized ACE. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 7120—7124
- 9 Megias C, Pedroche J, Mar Y M. Immobilization of angiotensin-converting enzyme on glyoxyl-agarose. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 4641—4645
- 10 孙凤祥, 王守训, 任维栋. 亲和色谱法从猪骨胶原蛋白酶解物中分离纯化血管紧张素转换酶抑制剂. 中国生化药物杂志, 2004, 6: 347—349
- 11 Tang Z M, Kang J W. Enzyme inhibitor screening by capillary electrophoresis with an on-column immobilized enzyme microreactor created by an ionic binding technique. *Anal Chem*, 2006, 78: 2514—2520
- 12 刘宏, 陈兰英. 血管紧张素转换酶的固相化与性质. 中国医学科学院学报, 2000, 6: 558—561
- 13 洪韞嘉, 李谭瑶, 陈波, 姚守拙. 壳聚糖固定化血管紧张素转化酶及其性质. 高等学校化学学报, 2009, 30: 328—331

## Screening of angiotensin converting enzyme inhibitors from traditional chinese Medicines by affinity chromatography

HUANG Yan<sup>1</sup>, TIAN QingQing<sup>2</sup>, LI TanYao<sup>2</sup>, CHEN Bo<sup>2</sup> & YAO ShouZhuo<sup>1,2\*</sup>

1. State Key Laboratory of Chem/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082, China;

2. Key Laboratory of Chemical Biology & Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

**Abstract:** An angiotensin converting enzyme (ACE) immobilized affinity chromatography was applied to screen angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) from traditional Chinese medicines (TCMs) based on the enzyme-inhibitor interaction. ACE immobilized on chitosan microspheres with glutaraldehyde (GA) as cross-linking reagent was used as stationary phase of the affinity chromatography. The components, which can be adsorbed on the immobilized ACE, were identified as the lead compounds of ACEIs. The high efficiency and selectivity of this method was confirmed by using some commercial available antihypertensive drugs, i.e., lisinopril, nonapeptides inhibitor, enalapril, perindopril and captopril, as model ACEIs. Five components from two typical TCMs with obvious ACEI activities, Pheretima (Dilong) and Fructus Crataegi (Shanzha), were screened out by affinity adsorption. All of these five components were proved with ACEI activities, and IC<sub>50</sub> values of the components ranged from 0.45 to 4.62 μg/mL. In addition, the relative standard deviation (RSD) of six repetitive determinations was lower than 1%. Thus, the proposed affinity interaction/chromatographic differences assay is suitable for rapidly screening of target active components from complicated matrix such as TCMs and natural products.

**Keywords:** TCMs, ACEIs, screening, affinity chromatography, immobilized enzyme