



本文经编委遴选,英文版将通过 ScienceDirect 全球发行。

芍药苷对血管紧张素转化酶活性的抑制作用*

□林景瑞 毕开顺 (沈阳药科大学药学院 沈阳 100106)

王灵芝 乔延江** (北京中医药大学中药信息工程中心 北京 100102)

摘要:目的:采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定了芍药苷对血管紧张素转化酶活性的影响。方法:采用 Brava BDS C18 色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm),流动相为乙腈-0.01% 甲酸水溶液(25:75),柱温为 30℃,流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 228nm。结果:马尿酸在 1.17~149μg·mL⁻¹ (r = 0.9999)范围内呈良好的线性关系;平均回收率(n=6)为 100.4%(RSD=0.88%);日内、日间精密度的 RSD 分别为 1.32%和 1.96%。芍药苷的 IC₅₀ 值为 37.47μmol·L⁻¹。结论:该法分离效果和重复性均良好,结果准确可靠,可用于马尿酸的检测,也为血管紧张素转化酶抑制剂活性测定提供了可靠的方法。

关键词: 高效液相色谱法 马尿酸 ACE 芍药苷

血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)是一类治疗高血压及心力衰竭的心血管药物^[1],临床疗效已被许多大规模随机对照临床试验证实。其降压效果相当于钙离子拮抗剂和β受体阻滞剂,适用于各期高血压。ACEI对血管紧张素转化酶(ACE)的亲合度比血管紧张素 I 或舒缓激肽强,且不易从 ACE 结合区释放,可有效地抑制 ACE 的活性,从而阻碍 ACE 催化血管紧张素 I 水解成为血管紧张素 II,以及催化舒缓激肽水解成为失活片段的两种生化反应过程,起到降压作用^[2-4]。随着现有的 ACEI 临床应用的深入,发现了许多不足及副作用^[5],因而开发新型 ACEI 具有广阔的应用前景和深远的社会效益。芍药苷具有扩张血管、抗血栓形成、抗血小板聚集和逆转低血压等作用,从而在心血管疾病方面有良好的疗效^[6],本研究

旨在探索芍药苷对 ACE 的抑制作用。目前 ACEI 活性测定方法主要是体内法和体外法^[7-8]。本文采用体外法,其原理为:ACE 在 37℃的条件下催化分解血管紧张素 I 的模拟物马尿酸-L-组氨酸-亮氨酸(HHL)产生马尿酸,该物质在 228nm 处具有特征吸收峰^[9]。

一、仪器与试剂

1. 仪器

安捷伦 1100 高效液相色谱仪 (Palo Alto, CA, USA); HHS112 型恒温振荡水浴箱 (江苏省医疗器械厂); MH-1 型微量振荡器 (江苏海门其林贝尔仪器制造); QL-901 漩涡振荡器 (江苏海门仪器厂); DeLta320pH 指示计 (梅特勒-托利多上海有限公司); SZM F124 Ice Maker (SANYO 电气公司生产);微量加样器 (德国 Eppendorf 公司); Biofuge 低温高速离心机 (德国 Heraeus 产品)。

收稿日期: 2008-12-30

修回日期: 2009-03-18

* 北京市重点实验室(JD100260652)项目:清热解毒中药有效成分发现研究,负责人:乔延江。

** 联系人: 乔延江,本刊编委,教授,博士生导师,主要研究方向:中药信息工程,中药新药研发, E-mail: yjqiao@263.net。

2. 试 药

HHL、马尿酸均购自 Sigma 公司;卡托普利、芍药苷均购自中国药品生物制品检定所;甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯)购自 Caledon 公司。

二、方法与结果

1. 标准品溶液的制备

取马尿酸约 15mg,精密称定,置 10mL 量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,摇匀,作为母液备用。倍比稀释得对照品系列溶液。

2. ACE 粗提液的制备及活力测定^[10-11]

取新鲜兔肺 100g,用冷生理盐水清洗,剔除大血管、脂肪,切成碎块,加入 300mL 蒸馏水匀浆,匀浆液过滤,离心 20min(2000rpm,4℃),保留上清液。用硫酸铵对上清液进行分级沉淀,收集 1.6~2.6mol·L⁻¹ 间的沉淀组分,溶解于 20mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液(pH=7.5)中,透析 24h,离心 20min(10000rpm,4℃),上清液即为 ACE 粗提液。

将 5μL 稀释 100 倍后的上述酶液于 37℃预热 10min,加入 40mM(终浓度)HHL,37℃温浴 30min 后,加入乙腈 100μL 终止温孵反应,14000rpm 离心 10min,取上清,进高效液相色谱仪,测定酶解产物马尿酸的含量。根据马尿酸的生成速度计算酶活力为 0.4588U·mL⁻¹。

3. 供试品溶液制备

取 40mU(终浓度)上述 ACE 酶液和 10μL 不同浓度的 ACEI 溶液于 37℃预热 10min,加入 40mM HHL(终浓度)温浴 30min 后,加入乙腈 100μL 终止温孵反应,14000rpm 离心 10min,取上清,进高效液相色谱仪,测定酶解产物马尿酸的含量。

4. 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Grace Brava BDS C18 色谱柱(4.6mm×

250mm,5μm);流动相:乙腈-0.01%甲酸水溶液(25:75),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 228nm,柱温为 30℃,进样体积为 10μL。在此条件下,理论塔板数以马尿酸计算不低于 4825,与相邻峰之间分离度均大于 3。阴性样品对样品测定无干扰。结果见图 1。

5. 标准曲线绘制

依次分别精密量取“1”制备对照品系列溶液 10μL,在“4”所述色谱条件下进样分析,以对照品峰面积对浓度(μg·mL⁻¹)回归分析,得回归方程:Y=3070X+33.11(r=0.9999,n=6)。结果表明,马尿酸在 1.17~149μg·mL⁻¹ 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

6. 精密度试验

精密吸取上述标准品溶液 10μL,在“4”所述色谱条件下连续进样 6 次,测定马尿酸峰面积,计算马尿酸峰面积 RSD 为 0.98%,表明仪器精密度良好。

7. 方法重复性试验

按“3”项下供试品溶液制备的方法操作制备供试品 6 份,在“4”所述色谱条件下进样分析,计算马尿酸峰面积 RSD 为 0.63%。

8. 回收率试验

取已知马尿酸浓度的供试品溶液,加入等体积的 64.5μg·mL⁻¹ 马尿酸对照品溶液制成混合液,制备 6 份,在“4”所述色谱条件下进样分析,计算得样品平均回收率为 100.4%(RSD=0.88%)。

9. 日内精密度和日间精密度试验

精密吸取供试品溶液 10μL,分别于 0、1、2、4、8、24 h 在“4”所述色谱条件下进样分析,计算马尿酸峰面积 RSD 为 1.32%,表明供试品溶液在 24h 内稳定。

精密吸取供试品溶液 10μL 于 5 天同一时间在“4”所述色谱条件下进样分析,计算测定马尿酸峰面

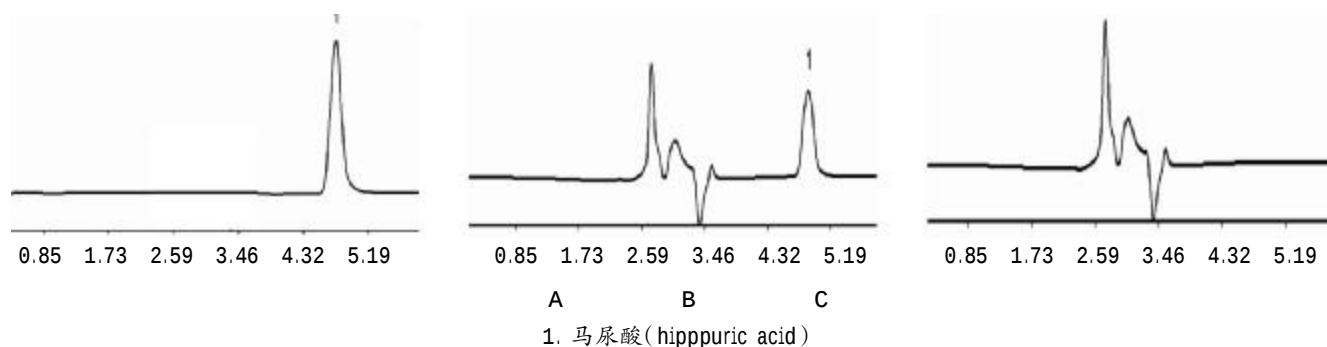


图 1 对照品(A)、样品(B)及阴性样品(C)色谱图

积 RSD 为 1.96%, 表明样品日间精密度良好。

10. 样品测定

(1) ACE 酶活性测定体系的确定。

为了确立 ACE 活性测定体系, 进行了不同浓度卡托普利对兔肺 ACE 抑制活性的测定, 结果见图 2。卡托普利作用 IC_{50} 值为 $1.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

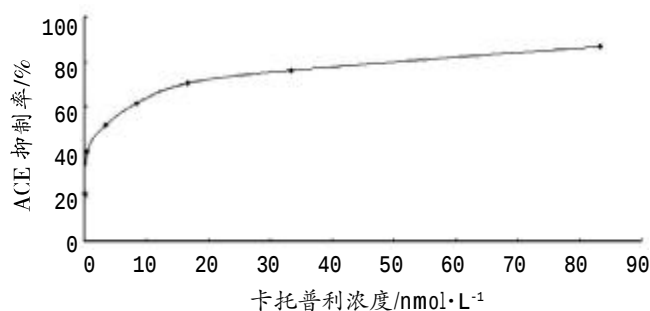


图 2 不同浓度卡托普利对兔肺 ACE 的抑制作用

(2) 芍药苷抑制血管紧张素转化酶。

为了进一步证实芍药苷是抑制 ACE 的成分, 测定了不同浓度的芍药苷对兔肺 ACE 酶活性的影响, 结果见图 3, 作用 IC_{50} 值为 $37.47 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

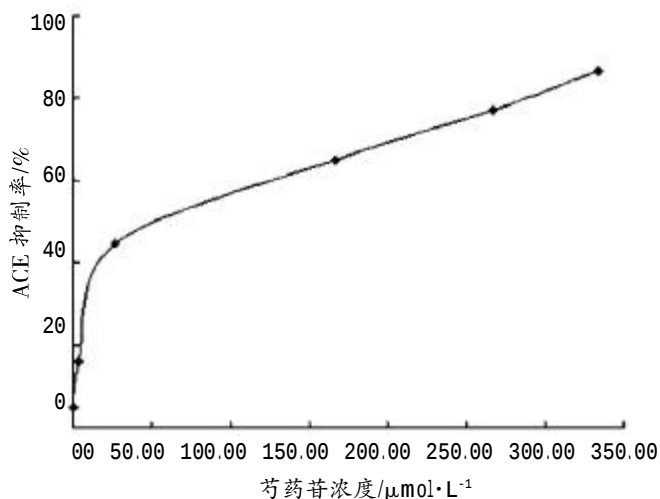


图 3 不同浓度芍药苷对兔肺 ACE 的抑制作用

三、讨 论

1. 酶源的选择

用于 ACEI 活性测定的酶源主要有两种, 一是购买进口试剂, 二是从动物体内制备。前者比较昂贵, 使大批量筛选的成本增高; 而后者价格便宜, 制备过程也相对简单, 且酶源新鲜。本实验测得的 IC_{50} 值在文献^[12]值 $0.75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ~ $22 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 说明该方法

具有一定的可行性, 可用于 ACEI 的活性的筛选。

2. 芍药苷的抑制作用

芍药苷具有扩张血管、抗血栓形成、抗血小板聚集和逆转低血压等作用。为了进一步明确作用机制, 测定不同浓度的芍药苷对兔肺 ACE 酶活性的影响, 所测得 IC_{50} 值为 $37.47 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明其对 ACE 有一定的抑制作用, 其母核有开发意义。

3. 流动相的选择

为优化实验过程, 考察了甲醇-甲酸水、乙腈-甲酸水、甲醇-醋酸水和乙腈-磷酸水溶液体系作为流动相对分离的影响, 结果表明乙腈-甲酸水溶液体系所得色谱图中色谱峰分离度和峰形均良好, 故选用乙腈-甲酸水溶液体系, 又比较了乙腈-0.01% 甲酸水和乙腈-0.5% 甲酸水溶液体系, 结果表明乙腈-0.01% 甲酸水溶液体系较好。本法色谱条件易于控制, 分析时间仅需 5min, 具有简便、重复性良好、结果准确可靠的特点, 是一种检测 ACE 抑制剂活性的有效的方法。

参考文献

- 胡娟娟, 杜冠华. 药物筛选模型研究进展. 基础医学与临床, 2001, 21 (4): 302~305.
- 张志琪, 张延妮, 田振军. 药物筛选模型和技术及其在中药活性成分研究中的应用. 中国中药杂志, 2003, 28(10): 907~910.
- 谢和辉, 苏定冯. 国际高血压治疗新药研究现状和展望. 世界临床药物, 2003, 24(5): 265~269.
- 秦大山, 刘晓, 刘国栋. 肾素-血管紧张素系统新概念. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17(8): 50~54.
- 李凯. 血管紧张素转化酶抑制剂的研究进展. 中国药理学杂志, 1989, 24 (5): 259~262.
- 吴春福. 芍药及其化学成分的药理研究概况. 中药通报, 1985, 10(6): 43~46.
- 高小平, 徐大勇, 邓义龙, 等. 从丹参中筛选血管紧张素转换酶抑制剂. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 359~362.
- 朱福, 章茂顺, 王家良, 等. 醋柳总黄酮对兔血管紧张素转换酶的抑制作用. 中国临床药理学杂志, 2000, 9(2): 95~98.
- 潘敏娟, 赵阳春, 毛水龙. 地龙对小鼠血管紧张素转换酶活性的影响. 浙江中西医结合杂志, 2006, 16(11): 667~683.
- 洪福嘉, 肖晓峰, 陈波, 等. 用 HPLC 法从中药中筛选血管紧张素转化酶抑制剂. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 728~730.
- Bin - Wha C, Richie L, I - Jen H, et al. Assays for Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity. Analytical Biochemistry, 2001, 291: 84~88.
- Vanessa V, John V, Willy V. Optimisation and validation of an angiotensin - converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. J Biochem. Biophys Methods, 2002, 51: 75~87.

Inhibitory Effects of Paeoniflorin on ACE Activity In Vitro

Lin Jingrui, Bi Kaishun

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Wang Linzhi, Qiao Yanjiang

(Research Center of TCM-information Engineering, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102 China)

This is a study attempting to develop an efficient RP-HPLC method for determining the inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE). The content of enzymolysis product hippuric acid was determined using RP-HPLC method. RP-HPLC was performed on a Brava BDS C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase consisting of 0.01% formic acid solution-acetonitrile (25:75) at 30 °C with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and a detection wavelength at 228 nm. Test results showed that the calibration curve was linear in the range of 1.17-149 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$) for hippuric acid. The average recovery ($n=6$) of hippuric acid was 100.4% (RSD=0.88%). The intra-day and inter-day RSDs were at 1.32% and 1.96% respectively. The IC₅₀ of Paeoniflorin was 37.47 μmol·L⁻¹. Enjoying a sensitive, accurate, and reliable performance with good reproducibility, the method is desirable for determining the inhibitory activity of ACE.

Keywords: RP-HPLC; ACE; Hippuric Acid; Paeoniflorin

(责任编辑:张述庆,责任译审:邹春申)