

使用超高效液相色谱 - 质谱法评价多肽药物对血管紧张素转化酶的抑制活性

LCMSMS-522

摘要： 本文建立并验证了使用岛津 LCMS-8050 测定 HHL（马尿酸 - 组氨酰 - 亮氨酸）转化底物马尿酸的分析方法。该方法在 6 min 内完成转化产物马尿酸的检测，采用外标法定量，方法定量限 0.01 μM ，线性范围 0.01-3 μM ，相关系数 0.997。通过考察低中高质控结果表明，方法精密度与重现性良好。所建方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，可满足药物对血管紧张素转化酶抑制活性评价的实验要求，为降血压类药物新药研究提供更为便捷的技术手段与研究思路。

关键词： 超高效液相色谱 - 质谱法 多肽 血管紧张素转化酶 抑制活性

血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）是一类常见的抗高血压药物，其通过抑制血管紧张素转化酶（ACE）活性，减少血管紧张素 II 的生成，导致血管舒张、血压下降。常见的 ACEI 类药物，主要包括卡托普利、培哚普利、雷米普利、贝那普利、西拉普利。

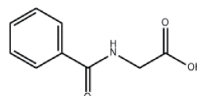
面对着当前陆地资源相对短缺、提倡建设节约型社会的今天，科学绿色、综合开发利用海洋资源成为了社会关注的焦点。近期通过合理开发，从海洋生物体海鞘中提取分离得到一种多肽修饰物即多肽 C，研究发现其具备良好的抗氧化活性，并且对胃肠道消化

酶稳定，属于一类可口服多肽，具有开发潜力。经计算机分子模拟发现，多肽 C 与 ACE 具有一定结合能力，推测其可能还具备与常规 ACEI 类药物类似的 ACE 抑制活性。因此，实验利用超高效液相色谱 - 质谱仪建立灵敏、高效的液质分析方法，并与常见 ACEI 类药物卡托普利进行对比，充分评价多肽 C 对血管紧张素转化酶的抑制作用，验证其抑制活性，以期开发多肽 C 更多的药用价值，深入探讨其药理作用，研发新型降血压药物与食品、保健品添加剂，扩大海洋资源的综合利用。

■ 实验部分

1.1 化合物信息

表 1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
马尿酸	Hippuric acid	495-69-2	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

在线脱气机：DGU-20A₅

输液泵：LC-30AD \times 2

质谱仪：LCMS-8050

自动进样器：SIL-30AC

色谱工作站：LabSolutions Version 5.99

柱温箱：CTO-30A

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18（100 mm \times 2.1 mm I.D., 2 μm ，岛津（上海）实验器材有限公司，PN:227-30001-04）

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液 B 相 -0.1% 甲酸乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：0.4 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，洗脱程序见表 2

表 2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	泵	B.Conc	10
4.00	泵	B.Conc	80
4.50	泵	B.Conc	80
4.60	泵	B.Conc	10
6.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源接口电压：-3.0 kV

加热气：空气 10.0 L/min

碰撞气：氩气

DL 温度：250°C

扫描模式：多反应监测（MRM）

延迟时间：3 ms

离子化模式：ESI(-)

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

接口温度：300°C

加热模块温度：400°C

驻留时间：47 ms

MRM 参数：见表 3

表 3 MRM 优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
马尿酸	178.00	134.05*	14.0	14.0	26.0
		77.00	14.0	17.0	14.0

注：* 表示定量离子

1.4 标准品与质控样品的配制

精密称取马尿酸标准品适量，用 1 mL 50% 甲醇水溶解配置两份 40 mM 储存液。取其中一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 μ M 的标准工作曲线。另一份储备液用 50% 甲醇溶液分别稀释成浓度为 0.02、0.2、2 μ M 的质控溶液。

1.5 样品制备

配置 25 mM 反应底物 HHL（马尿酸 - 组氨酰 - 亮氨酸）溶液：称取 HHL 适量，溶于 1 mL 硼酸钠（50 mM）缓冲液中，配得 25 mM HHL 溶液，待用。

配置 25 mU/mL ACE 硼酸钠缓冲液溶液：称取 ACE 适量，溶于 1 mL 硼酸钠（50 mM）缓冲液中，配得 25 mU/mL ACE 硼酸钠缓冲液溶液，待用。

精密称取 2.77 mg 多肽 C 和 0.87 mg 卡托普利，溶于 1 mL DMSO 中得到 4 mM 母液。将母液依次稀释，得到浓度为 0、5、10、20 μ M 样品工作液备用。

取 50 μ L 样品溶液和 50 μ L ACE 硼酸钠缓冲液溶液混合，37°C 水浴中孵育 30 min 后，加入 100 μ L HHL 溶液，37°C 水浴中继续孵育 60 min。反应液中加入 200 μ L 1M HCl 终止反应，13000 g 离心 10 min 后收集上清液，进行分析。

■ 结果与讨论

2.1 基质样品典型色谱图

按照 1.4 方法和选定的色谱条件处理并测定，得到马尿酸 MRM 色谱图，见图 1。

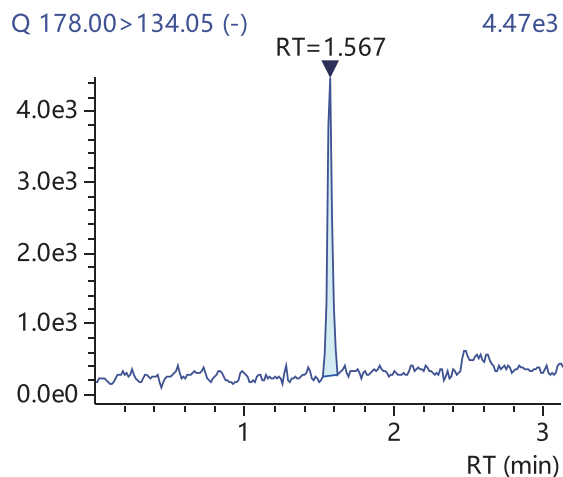


图 1 马尿酸 MRM 色谱图 (0.01 μM)

2.2 线性范围

按照 1.4 项下样品制备方法，配制为 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 μM 标准曲线，用外标法进行分析测定。以马尿酸浓度 X 为横坐标，以马尿酸峰面积 Y 为纵坐标，进行线性回归分析，线性回归方程及相关系数见图 2、表 4。结果表明马尿酸在 0.01-3 μM 的浓度范围内线性关系良好。

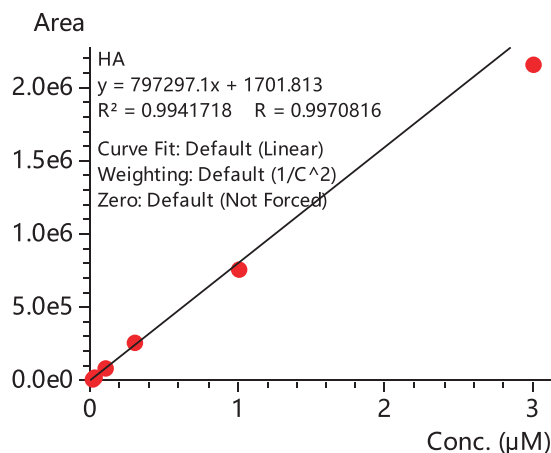


图 2 马尿酸标准曲线

表 4 马尿酸标准曲线参数 (线性回归, 权重系数为 $Y=1/C^2$)

化合物	校准曲线	线性范围 (μM)	准确度 (%)	相关系数 r
紫杉醇	$Y = 797297.1X + 1701.813$	0.01-3	90.7~108.3	0.9971

2.3 方法精密度

按照 1.4 项下样品制备方法，配制为 0.02、0.2、2 μM 的马尿酸质控样品，分别平行测量 6 次，用测得质控样品中马尿酸浓度值的 RSD% 值进行评价。结果表明，各浓度水平精密度在接受标准内，并已满足检测浓度要求。

表 5 马尿酸质控样品精密度 (n=6)

样品类型	理论浓度 (μM)	精密度 RSD%	准确度 %
LQC	0.02	2.22	100.30-106.00
MQC	0.2	0.94	105.40-108.10
HQC	2	0.79	93.00-94.90

2.4 实际样本检测结果

按照 1.5 项下操作步骤，将实验药物多肽 C 与对照药物卡多普利，分别与 ACE 溶液与 HHL 反应底物进行混合。经过 1 h 孵育后，通过检测 HHL 转化产物马尿酸的含量，对比并评价不同浓度的多肽 C 与卡托普利对 ACE 的抑制作用。结果可知，参照对照组，多肽 C 对 ACE 表现出明显的抑制作用，随多肽 C 浓度增大，抑制作用增强。此外，对比同等浓度的对照药物，多肽 C 的抑制作用比卡多普利更强，所得结果见表 6。

表 6 实际样品检测结果 (n=3)

药物浓度 (μM)	马尿酸含量 (μM)	
	多肽 C (实验组)	卡托普利 (对照组)
0	0.413	0.405
5	0.133	0.351
10	0.054	0.179
20	0.020	0.100

■ 结论

实验使用岛津 LCMS-8050 建立 HHL 转化产物马尿酸含量的检测方法，用以评价不同药物对 ACE 的抑制作用。所建方法准确、高效。通过实验结果得出，参照典型的血管紧张素转化酶抑制剂卡托普利的药理作用，多肽 C 对 ACE 也具有明显的抑制作用，并且抑制作用更强于卡托普利。由此，一定程度的验证了计算机模拟的海洋生物体提取物多肽 C 对 ACE 具有抑制作用的真实性，并发现其活性表现更强，抑制效果良好，可作为抗氧化与降血压治疗方向作为新药进行开发，拓展应用前景，为降血压药新药研发提供新的研究对象与技术手段。

岛津应用云

