

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480037089.3

[51] Int. Cl.

A23L 1/305 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月10日

[11] 公开号 CN 1893838A

[22] 申请日 2004.11.19

[21] 申请号 200480037089.3

[30] 优先权

[32] 2003.12.15 [33] EP [31] 03079075.2

[86] 国际申请 PCT/EP2004/013223 2004.11.19

[87] 国际公布 WO2005/058070 英 2005.6.30

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.12

[71] 申请人 荷兰联合利华有限公司

地址 荷兰鹿特丹

[72] 发明人 S·L·阿布拉哈姆塞

R·B·德拉伊斯马 J·沙尔克

C·J·范普拉特林克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 梁 谋

权利要求书 1 页 说明书 14 页

[54] 发明名称

具有血管紧张素转化酶抑制效应的肽

[57] 摘要

三肽 XPP 和/或其盐在制备包含所述三肽 XPP 的血管紧张素转化酶抑制剂和食品中的用途, 其中 X = C、M、S、T 或 K。

1. 三肽 XPP 和/或其盐在制备血管紧张素转化酶抑制剂中的用途，其中 X = C、M、S、T 或 K。
- 5 2. 权利要求 1 的用途，其中所述三肽是 XPP，其中 X = C、M、S 或 T。
3. 权利要求 2 的用途，其中所述三肽是 XPP，其中 X = M、S 或 T。
4. 权利要求 1-3 中任一项的用途，其中所述血管紧张素转化酶抑制剂是功能性食品。
- 10 5. 适于在人体内降低血压的食品，所述食品包含 5mg/g 或 5mg/g 以上的 XPP，其中 X = C、M、S、T、K、P 或 A。
6. 权利要求 5 的食品，其中 XPP 的量为 10mg/g 或 10mg/g 以上。
7. 权利要求 5 或 6 的食品，其中所述 XPP 为 XPP，其中 X = C、
15 M、S 或 T。
8. 权利要求 7 的食品，其中所述 XPP 是 XPP，其中 X = M、S 或 T。
9. 含 XPP 食品的制备方法，其中 X = C、M、S、T 或 K；所述方法包括下述步骤：
20 a) 酶促水解包含具有序列 XPP 的蛋白质的底物，产生水解蛋白产物；
 b) 从所述水解蛋白产物中分离出富含三肽的部分；
 c) 将得自步骤 b) 的部分干燥，得到富含三肽 XPP 的固形物；
 d) 将步骤 c) 中制备的固形物作为制备食品的配料。

具有血管紧张素转化酶抑制效应的肽

5 发明领域

本发明涉及用于制备血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂的某些肽。本发明还涉及适于 ACE 抑制的食品以及制备所述食品的方法。

发明背景

10 高血压被认为是心血管疾病(CVD)的主要危险因子之一。其调节血压的机制之一是肾素-血管紧张素系统。这是导致形成血管紧张素 II 的一个级联反应,血管紧张素 II 具有强烈的血管收缩效应并因此具有升高血压的效应。对该级联中一个关键酶即血管紧张素 I 转化酶(ACE)的抑制,会降低血管紧张素 II 的形成,因而具有降低血压的
15 效应。长期人为干预研究表明,定期摄入少量 ACE 抑制剂能降低 CVD 达 25% (Gerstein 等(2000), The Lancet 355, 253-259)。

食品中的 ACE-抑制剂是众所周知的。这类食品已经通过例如乳或乳品发酵而制备。在一项安慰剂-对照研究中,在高血压病人中显示
20 出酸奶中 VPP 和 IPP 有降低血压的效应(Hata, Y 等(1996), American Journal of Clinical Nutrition 64, 767-771)。

一种声称“适合轻度高血压人群”的市售发酵乳制品是 Calpis 酸奶,是用瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)发酵而成,由日本的 Calpis Food Industry 公司生产。另一种市售发酵乳制品是由芬兰的 Valio 公司生产的 Evolus,其声称是“欧洲第一例能降血压的功能性
25 食品”。这两种发酵乳制品都用瑞士乳杆菌菌株进行发酵。产品中含有能在体外抑制 ACE 的生物活性肽(VPP 和 IPP),这些肽是由酪蛋白水解产生的。

现有技术已知的另一种可能性是通过酶促水解乳蛋白,制备抑

制 ACE 的食品。WO 01/85984 介绍了通过使用胰蛋白酶水解酪蛋白分离物，来制备抑制 ACE 的组合物。

发明概述

5 本发明的一个目的是提供一种适于抑制 ACE 的食品。另一个目的是提供具有降压效应的此类食品。还有一个目的是提供含有高浓度 ACE-抑制剂的食品。按照本发明，通过将三肽 XPP 和/或其盐用于制备血管紧张素转化酶抑制剂，可以达到一个或多个所述目的，其中 X = C、M、S、T 或 K。

10

发明详述

在本文中采用的通用单字母代码通常用来描述氨基酸。除非另有说明，本文所用的重量百分比表示为相对于总重量的百分比。

本文中的酶应当理解为还包括不止一种酶的混合物。

15 根据本发明，我们已经发现，本发明的三肽 XPP 在人类消费后相当稳定，本发明的肽 XPP 还是有效的血管紧张素转化酶抑制剂。优选血管紧张素转化酶抑制剂是一种功能性食品。

在 XPP 中，X = C、M、S、T 或 K。优选 X = C、M、S 或 T，更优选 X = M、S 或 T。

20 本发明提供一种适于血管紧张素转化酶抑制并且在人体内降压的食品，所述食品包含 1mg/g 或 1mg/g 以上的 XPP (其中 X = C、M、S、T 或 K)，优选 25mg/g 或 25mg/g 以上的 XPP，更优选食品包含 50mg/g 或 50mg/g 以上的 XPP，甚至更优选 100mg/g 或 100mg/g 以上的 XPP，其中 X = C、M、S、T 或 K，优选 X = C、M、S 或 T，更优选 X = M、S 或 T。

25

本发明的食品定义为适于人类消费的产品，其中本发明的 XPP 作为一种配料，其用量为获得明显 ACE-抑制效应的有效量。

虽然不希望受到本文的理论束缚，但相信本发明的三肽是良好

的 ACE-抑制剂, 因为它们是:

- 在大小上相对小[长度介于 2-10 个氨基酸之间]
- 中性或带正电荷
- 不由负电荷残基组成
- 5 • 由疏水性支链氨基酸组成
- 具有 C 端脯氨酸残基。

而且据信, 对于存在的两个连续 Pro 残基, 就 XPP 而言, 因为空间上的限制, 明显抑制 ACE 释放最后两个残基。

而且还据信, 其存在或 C 端 PP (-Pro-Pro)序列, 致使该肽对人体消化酶、结合在人肠上皮细胞刷状缘膜上的肽酶和人血流中的肽酶更稳定。因此, 据信含有该肽的食物的消耗, 将导致该肽在人体内被有效吸收, 诱导对 ACE 的抑制并降低血压。

综合这些观察结果, 可以归纳为: 任何肽, 只要不是太长且由疏水性氨基酸、中性或带正电荷氨基酸组成并带有 C 端 Pro [或-Pro-Pro]序列, 从本质上说都是良好的 ACE 抑制剂。

一般而言, 该结果与观察现象相符, 抑制 ACE 的最佳 XPP 肽由中性和疏水性氨基酸组成。大的疏水性残基(例如 Trp、Tyr 和 Phe)不包括在内的原因, 是基于这一事实: 很可能这些残基与两个 Pro 残基一起, 对于配合酶的活性位点来说太大了。

20 CPP 包括在内的原因, 是基于这一事实: ACE 是含 Zn 酶, 底物与其 Zn 原子间的相互作用, 对于底物与酶的结合来说是必不可少的, Cys 的游离巯基的存在促进了这一相互作用。

已经鉴定以下蛋白(及其前体)在其蛋白质组成及其来源的一级结构中含有例如所提到的 XPP 序列:

- 25 CPP: 胶原蛋白[鸡]、肌钙蛋白[鸡]、甲状腺球蛋白[牛]
MPP: 白蛋白[豌豆、绿豆]、肌球蛋白[牛、鸡、猪、酵母]、玉米醇溶蛋白[玉米]
SPP: 胶原蛋白[鸡]、酪蛋白[牛]、豆球蛋白[豌豆、Pea Sativum].

TPP: 胶原蛋白[鸡]、麦谷蛋白[小麦]、cruceferin [油菜]、豆球蛋白[棉花]、肌球蛋白[酵母]、玉米醇溶蛋白[玉米]

TPP: 胶原蛋白[鸡]、麦谷蛋白[小麦]、cruceferin [油菜]、豆球蛋白[棉花]、肌球蛋白[酵母]、玉米醇溶蛋白[玉米]

5 KPP: 肌球蛋白[猪、鸡、酵母]、酪蛋白[猪]

这些蛋白质材料可用于例如作为底物，从这些底物可产生本发明的肽。技术人员将会知道使用已知发酵或已知酶处理(例如酶促水解)来达到这一目的。

10 通过发酵或水解条件的优化，可以最大量地产生本发明的生物活性分子 XPP。要想最大量生产，技术人员将会知道怎样调整工艺参数，例如水解时间、水解温度、酶的种类和浓度等。

优选在生产 XPP 时，XPP 的摩尔收率是高的。XPP 的摩尔收率定义为 XPP 产量的摩尔数除以水解前原料中存在的蛋白总量的 XPP 片段的摩尔数。

15 酶促水解中使用的酶可以是能有效水解含有 XPP 的底物的任何酶，产生一种或多种 XPP，其中 X = C、M、S、T 或 K。

可以按常规方法进行酶处理。其中包括将酶(或酶混合物)加入到底物中，在适于进行酶促水解的受控条件下维持所得反应混合物。要控制的条件包括温度、pH、反应时间和酶浓度。反应混合物的优选温度为 40-60℃，更优选 45-55℃，最优选约 50℃。反应混合物的 pH 优选为 5-9，更优选 6-8，最优选约 7。酶浓度为 2-10%重量(基于反应混合物的总重量)，更优选 3-10%重量，最优选 4-6%重量。反应时间(水解时间)优选为 2-50 小时，更优选 2-10 小时，最优选 4-8 小时。

25 在另一个优选的实施方案中，水解步骤可以由能引起底物水解的微生物发酵步骤来替代。

发酵罐中的材料和底物可以按常规方式混合，以便得到均质发酵介质。

优选发酵可在 25-50℃、优选 35-45℃ 进行 3-80 小时、优选 6-25 小时。

有利的是，在酶处理和任选发酵后，可以进行几个额外的工艺步骤。

5 优选按照本发明，采用包含 XPP (其中 X = C、M、S、T 或 K) 的食品制备方法包括下述步骤：

a) 酶促水解包含具有序列 XPP 的蛋白质的底物，产生水解蛋白产物；

b) 从水解蛋白产物分离富含三肽的部分；

10 c) 将得自步骤 b) 的部分干燥，得到富含三肽 XPP 的固形物；

d) 将步骤 c) 中制备的固形物作为制备食品的配料。

在酶促水解步骤 a) 后，可以进行任意的分离步骤或浓缩步骤。

可以按技术人员已知的任何方式，例如过滤、离心或色谱及其组合，进行该步骤。优选用超滤(UF)和/或纳米过滤(NF)技术来进行分离步骤。过滤步骤所用的滤膜孔径大小、以及滤膜的电荷可用于控制对三肽 XPP 的分离。使用带电荷的 UF/NF 膜进行蛋白水解产物的分级，描述于以下文献：Y. Poilot 等, Journal of Membrane Science 158 (1999) 105-114。电渗析描述于例如 WO00/42066。所述分离步骤的产物在本文中称为 ACE-部分。

20 任选可将水解产物干燥，得到富含三肽 XPP 的固形物，其中 X = C、M、S、T 或 K。可以按常规方法，例如通过喷雾干燥或冷冻干燥，进行该步骤。

干燥的制备产物在下文中称为 ACE-固体。ACE-部分和/或 ACE-固体可有利地用作食品配料。

25 本发明的食品或源自它们的食品可以通过巴氏消毒或灭菌处理。

本发明的食品可以是任何食品类型。它们除食品之外，还可包含适量的常用食品配料，例如食用香料、糖、水果、矿物质、维生

素、稳定剂、增稠剂等。

5 优选食品包含 50-200mmol/kg K^+ 和/或 15-60mmol/kg Ca^{2+} 和/或 6-25mmol/kg Mg^{2+} , 更优选 100-150mmol/kg K^+ 和/或 30-50mmol/kg Ca^{2+} 和/或 10-25mmol/kg Mg^{2+} , 最优选 110-135mmol/kg K^+ 和/或 35-45mmol/kg Ca^{2+} 和/或 13-20mmol/kg Mg^{2+} 。

优选所述食品是果汁产品、乳制品或冷冻甜点食品或涂抹食品/人造奶油。这些优选的食品类型在下文和实施例中有详细描述。

• 果汁产品

10 本发明果汁产品的实例是得自柑橘类水果(例如橙子和葡萄柚)、热带水果、香蕉、桃子、梨、草莓的汁, 其中加入 ACE-固体和/或 ACE-部分。

• 乳制品

15 本发明乳制品的实例为牛奶、含乳抹酱(dairy spread)、奶油乳酪、含乳饮品和酸奶, 其中加入 ACE-固体和/或 ACE-部分, 或者在食品制备过程中产生 XPP。食品可用作例如含乳饮品。也可加入食用香料或其它添加剂。乳制品也可通过向水或乳制品中添加 ACE-固体和/或 ACE-部分而制得。

20 酸奶类制品的组成的实例是约 50-80%重量水、0.1-15%重量 ACE-固体、0-15%重量乳清粉、0-15%重量糖(例如蔗糖)、0.01-1%重量酸奶培养物、0-20%重量水果、0.05-5%重量维生素和矿物质、0-2%重量食用香料、0-5%重量稳定剂(增稠剂或胶凝剂)。

通常一份酸奶类制品可为 50-250g, 一般为 80-200g。

25

• 冷冻甜点食品

对于本发明的目的, 术语冷冻甜点食品包括含乳的冷冻甜点例如冰淇淋、冻酸奶、含乳冰冻果汁(sherbet)、冰冻果汁(sorbet)、冻牛

奶(ice milk)和软质乳冻(frozen custard)、冰棒(water-ice)、意式冰糕(granitas)和冻果泥(frozen fruit puree)。

优选冷冻甜点中固形物(例如糖、脂肪、食用香料等)含量大于3%重量,更优选为10-70%重量,例如40-70%重量。

- 5 冰淇淋通常包含0-20%重量脂肪、0.1-20%重量ACE-固体、甜味剂、0-10%重量脱脂乳成分和任选的成分,例如乳化剂、稳定剂、防腐剂、食用香料、维生素、矿物质等,余量为水。通常冰淇淋中可搅入空气例如至膨胀度为20-400%,更准确地讲为40-200%,并且冷冻至-2℃至-200℃的温度,更准确地讲为-10℃至-30℃。冰淇淋通常包含约0.1%重量的钙。
- 10

• 其他食品

- 技术人员可以根据常识,使用适量水解酪蛋白作为食品基料或者用源自水解酪蛋白的产品(例如ACE固体)作为配料,来生产本发
- 15 明的其它食品。所述食品的实例为烘焙食品、乳制品、快餐小吃等。

- 所述食品最好是含油和水的乳剂,例如抹酱(spread)。在本文中,油水乳剂定义为包含油和水的乳剂,并且包括水包油(O/W)乳剂和油包水乳剂(W/O)以及更复杂的乳剂,例如水包油包水(W/O/W/O/W)乳剂。在本文中,油定义为包括脂肪。优选所述食品是抹酱、冷冻甜
- 20 点或酱汁。优选本发明的抹酱包含30-90%(重量)植物油。最好抹酱的pH为4.2-6.0。

实施例

实施例 1

- 25 筛选了大量肽的ACE-抑制效果(测定 IC_{50} 值)。此外,筛选了所有肽在暴露给如下所述的人血清、HUVEC、Caco-2细胞和胃肠酶期间的稳定性。

实施例1中使用的材料和方法描述如下。

细胞培养

Caco-2 细胞得自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), 第 30-40 代时用于实验。将细胞培养在 75 cm² 培养瓶(Corning Costar, Badhoevedorp, 荷兰)中。培养基由补充了 20% (v/v)胎牛血清、1% (v/v)青霉素/链霉素溶液和 1% (v/v) NEAA 的 DMEM (高葡萄糖, 含 L-谷氨酰胺)组成。将细胞维持在 37°C/加湿气氛/5% CO₂/空气中。对于稳定性实验, 将细胞接种在 12 孔细胞培养板(Costar, Badhoevedorp, 荷兰)上, 培养至少 21 天。

5

HUVEC 细胞

HUVEC 细胞得自(Cambrex Bio Science, Verviers, 比利时), 第 1-5 代时用于实验。将细胞培养在 75cm² 培养瓶(Corning Costar, Badhoevedorp, 荷兰)中。培养基(Cambrex)由补充了 2% (v/v) 胎牛血清、0.04% (v/v)氢化可的松、0.4% (v/v)含肝素的人碱性成纤维细胞生长因子、0.1% (v/v)血管内皮生长因子、0.1% (v/v)人重组胰岛素样生长因子、0.1% (v/v)抗坏血酸、0.1% (v/v)人重组表皮生长因子、0.1% (v/v)庆大霉素、两性霉素 B 和 0.1% (v/v)肝素的 EBM-2 组成。将细胞维持在 37°C/加湿气氛/5% CO₂/空气中。对于稳定性实验, 将细胞以 100.000 细胞/孔的密度接种在 12 孔板(Corning Costar, Badhoevedorp, 荷兰)上, 培养至少 2 天。

10

15

试验产物

肽混合物 1 由 VPP、IPP、IIAEK、ITP、VF、FY、KVLPPV 和 HLPLP 组成。混合物 2 由 VAP、GPR、CPP、MPP、SPP、TPP、PIP 和 PLP 组成。合成肽可从 Bachem (二肽 KPP 和 GPR)或从 University of Utrecht (M. Egmond 博士)订购。

20

将浓度为 5mg 的肽分别溶于 50µl milliQ 水或 DMSO 中。对于某些肽, 浓度按纯度来校正(60% ITP, 85% KVLPPV)。除了二肽之外,

其余肽的纯度>95%。将所有肽溶于 milli Q 水中。将 FY 溶于 DMSO 中。因为 FY 仍不溶解，所以加入一些 HCl (终浓度 0.3M)。将 VF 直接溶于 0.3M HCl 中。为了制备混合物 1，将 50 μ l 的各种肽混合在一起，加入 100 μ l milli Q 水，得到含有每种肽各 5mg 的 500 μ l 溶液(溶于 0.06M HCl 和 10% DMSO)。按照同样方法制备混合物 2，除了加入额外的 50 μ l milli Q 水之外。混合物 2 的最终组成也为每种肽各 10mg/ml。

肽的稳定性试验

10 用血清、HUVEC 和 Caco-2 细胞的稳定性试验

将肽混合物加入到人血清(Cambrex Bio Science, Verviers, 比利时)中，终浓度为 0.1 μ g 肽/L、1 μ g 肽/L 和 10 μ g 肽/L。将含有肽混合物的血清于 37 $^{\circ}$ C 孵育 0、1、2、5、10、20、60、120、240 和 360 分钟。在每个时间点，将 1.5ml 样品收集到微量离心管中。立即向样品中加入 30 μ l 10% (v/v)三氟乙酸(TFA)和 5 μ l 10 μ g UC13-IPP/10。然后将样品于 100 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟，再在 IEC Micromax RF 离心机(Boom BV Meppel)上以 10,000rpm 离心 20 分钟。上清液收集到微量离心管中，贮存于-20 $^{\circ}$ C，用于进一步分析。实验重复进行三次。

20 将细胞培养在 12 孔板中。向不含胎牛血清、但含有 20% (v/v)固相提取的胎牛血清的培养基中加入肽混合物。对于 HUVEC，将 400 μ l 含有 0.1 μ g/ml、1 μ g/ml 和 10 μ g/ml 肽的培养基加入到培养板小孔内。在孵育 0 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟和 120 分钟时，收集 3 X 130 μ l 培养基。对于 Caco-2 细胞，将 330 μ l 含有 0.1 μ g/ml、1 μ g/ml 和 10 μ g/ml 肽的培养基加入到培养板小孔内。25 在孵育 0 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、180 分钟和 360 分钟时，收集 3 X 110 μ l 培养基。实验重复进行三次，所有样品直接放置在干冰上，贮藏于-20 $^{\circ}$ C。对于肽的定量测定，将 TFA 和 UC13-IPP 加入到样品中(终浓度分别为 0.2% (v/v)和

60ng/ml)。用无细胞小孔作为对照。

ACE-抑制测定 1: 基于酶的测定(EBA)

ACE 和一种合成底物(Abz-FRK-(Dnp) P-OH)用于 ACE-抑制测定, 该测定在白色 optiplate-96 微量培养板(Packard Bioscience)上进行。该底物由 Adriana K. Carmona (Dept. of Biophysics, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Brazil)惠赠。Abz-FRK-(Dnp)P-OH 的储液在 DMSO 中制备。浓度用分光光度法进行测定, 使用摩尔消光系数 $\epsilon_{365} = 17300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。试验缓冲液的组成是含有 100mM NaCl 的 100mM tris/HCl 缓冲液(pH 7.0)。将 40 μl 样品液/试验缓冲液加入到每孔中。就对照而言, 仅加入缓冲液。样品用荧光光度计(Fluostar, BMG labtechnologies)测定 3 次。仪器首先装入 150 μl 底物(3.75 μM 的测定缓冲液), 然后每孔加入 20 μl ACE (0.00625 单位/ml)。通过在 $\lambda_{\text{ex}} = 320\text{nm}$ 和 $\lambda_{\text{em}} = 420\text{nm}$ 下测定荧光, 检测 ACE 活性, 共测定 10 轮(约 10 分钟)。将原始数据换算成斜率/秒, 并用以下方程式求出 ACE 抑制活性。

$$\text{ACE 抑制(\%)} = [1 - (S_{\text{平均}} - B_{\text{平均}}) / (C_{\text{平均}} - B_{\text{平均}})] * 100$$

式中

$S_{\text{平均}}$ = 样品(肽 + 底物 + ACE)的平均结果

$B_{\text{平均}}$ = 背景(底物)的平均结果

$C_{\text{平均}}$ = 对照(ACE + 底物)的平均结果。

ACE-抑制测定 2: 改进的 Matsui 测定

该 ACE 抑制活性测定按照以下文献的方法进行: Matsui, T.等 (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 517-518, 如下描述对其进行的改进。

表 1: Matsui ACE 抑制测定方法。将各组分加入到 1.5ml 试管中, 终体积为 120 μl 。

组分	对照 1 (μl)	对照 2 (μl)	样品 1 (μl)	样品 2 (μl)
HHL (3 mM)	75	75	75	75
H ₂ O	25	45	-	20
样品/抑制剂	-	-	25	25
ACE (0.1 U/ml)	20	-	20	-

对于每个样品, 将 75 μl 3mM 马尿酸组氨酸亮氨酸(Hip- His-Leu, Sigma chemicals Co.; 所述化学品溶于含有 200mM NaCl 的 250mM 硼酸, pH 8.3); 20 μl 0.1U/ml ACE (得自 Sigma)或 H₂O 和 25 μl 样品或 H₂O 混合在一起(见表 1)。混合物于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 加入 125 μl 0.5M HCl 30 分钟后, 加上塞子。然后加入 225 μl N-二(羟乙基)甘氨酸/NaOH 溶液 (1M NaOH:0.25M N-二(羟乙基)甘氨酸(4:6)), 接着加入 25 μl 0.1M TNBS (2,4,6-三硝基苯磺酸, Fluka, 瑞士; 溶于 0.1M Na₂HPO₄)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 分钟后, 加入 4ml 4mM Na₂SO₃/0.2M NaH₂PO₄, 用 UV/Vis 分光光度计(Shimadzu UV-1601, 带有 CPS 控制器, 荷兰)在 416 nm 处测定吸光度。

ACE 抑制 (ACEI)活性量的计算是在不含抑制剂的情况下与 ACE 转化率进行比较的抑制百分数:

$$\text{ACEI} (\%) = (((C1-C2) - (S1-S2)) / (C1-C2)) * 100 \quad (1)$$

15 式中

C1 = 不含 ACE 抑制组分的吸光度 (= 最大 ACE 活性) [AU]。

C2 = 不含 ACE 抑制组分、也不含 ACE 的吸光度(背景) [AU]。

S1 = 在 ACE 和 ACE 抑制组分存在下的吸光度[AU]。

S2 = 在 ACE 抑制组分存在下、但不含 ACE 的吸光度[AU]。

20

用 HPLC-MRM-MS 定量测定肽

所有测定都在 Waters Quattro-II 或 Quattro-Ultima 三联四级质谱仪上进行。在 Inertsil 5 ODS3 柱(150 x 2.1 mm, 装入 3 μm 颗粒

- (Chompack))上, 于 25℃ 进行 LC 分离, 用 0-50% 乙腈/0.1% (v/v) TFA 洗脱。为了进行分析, 将 5 μ l 样品注射到柱内。过柱流速为 0.2ml/min。柱后补偿总流速为 0.05ml/min, 含有 7/3 (v/v) 丙酸和 2-丙醇混合物。用 MRM 质谱、以正 ESI 模式分析梯度流出液。毛细管电压为 4 kV。
- 5 电源和雾化器温度分别为 100℃ 和 250℃。干燥和雾化器气部分别为 300 L/h 和 17 L/h。碰撞气体是氩气, 压力为 7.9 e-4 mbar。所分析肽的 MS 数据见表 2。

表 2: 所选肽的 MS 参数的描述

肽	先驱离子	锥体电压	产物离子 质量结构	碰撞能量
VPP	312.2	19	213.1 PP	18
IPP	326.2	19	213.1 PP	18
ITP	330.2	16	116.1 P	11
IIAEK	573.4	40	347.2 AEK	26
MPP	344.2	19	213.1 PP	21
SPP	300.2	18	185.1 SP	14
TPP	314.2	18	199.1 TP	16
GPR	329.2	23	175.1 PR	25
PIP	326.2	16	211.1 IP	13
PLP	326.2	16	211.1 LP	13
VF	265.1	18	72.0 V	15
FY	329.1	23	120.1 F	18
HLPLP	576.3	25	251.2 HL	20
KVLPVP	652.4	36	341.3 KVL	24
VAP	286.2	15	116.1 P	13

体外胃肠消化

通过使发酵乳蛋白或水解乳蛋白经历典型的胃和小肠条件，研究肽在人胃肠道中的稳定性。通过将 80ml 发酵乳蛋白或水解乳蛋白溶于 820ml 含有 2.0g NaCl、2.9g 胃蛋白酶和 0.45g 来自米根霉(*Rhizopus oryzae*)的 Amano 脂肪酶 F-AP15 的水中，模拟胃条件。将该液体用 HCl 调至 pH 3.5，用浆搅拌(50rpm)并保持在 37℃ 达 60 分钟。然后，通过将 9g 胰酶制剂和 125mg 胆汁提取物加入到人工胃液中，用 NaHCO₃ 调整 pH 至 6.8，模拟肠条件。人工肠液用浆搅拌(50 rpm)并保持在 37℃ 达 120 分钟。在体外胃肠消化期间的不同时间点，收集样品。收集后，将样品在 95℃ 直接加热 30 分钟，然后贮藏于 -20℃。

实施例 1 的结果见表 3。

表 3: 经 LC-MS 测定, 肽在暴露给人血清、HUVEC、Caco-2 细胞和胃肠蛋白酶(GI 条件)期间的稳定性

肽	血清	HUVEC	Caco-2	GI 条件	IC ₅₀ Matsui (μM)	IC ₅₀ EBA (μM)
VPP	+/-	+	-	+	3	20
IPP	+/-	+	-	+	2	12
ITP	-	-	-	ND	10	30
HAEK	-	-	-	+/-	>20	20
VF	+/-	-	+/-	ND	10	>100
FY	+	-	+/-	ND	10	20
HLPLP	+/-	+	+	+	17	15
KVLPVP	-	-	-	ND	2	5
VAP	-	-	-	ND	1	4
GPR	-	+	-	ND	ND	ND
KPP	ND	ND	ND	ND	50	>50
CPP	ND	ND	ND	ND	4	5
MPP	+/-	+	-	ND	7	10
SPP	+/-	+	+	ND	>50	75
TPP	+/-	+	+	ND	15	35
PIP	-	+/-	-	ND	ND	>50
PLP	-	+/-	-	ND	ND	>50

表 3 中所用符号的注解:

+ = 稳定

5 - = 被细胞或血清快速降解

+/- = 被细胞或血清缓慢降解

ND = 未测定

10 表 3 中的结果表明, 所有 XPP (其中 X = C、M、S、T 或 K)都是中等至良好的 ACE-抑制剂(低 IC₅₀ 值)。而且与其它被测肽相比, 这些肽在经历人血清时表现出缓慢降解, 而在经历 HUVEC、Caco-2 和胃肠酶时, 它们相对稳定。