蛋白质组学研究的分析技术新进展

陈执中（复旦大学药学院，上海 200032）

摘要：目的　综述近几年发展起来的蛋白质组学研究的分析技术及其应用进展。方法　根据近年有关文献对二维凝胶电泳和质谱结合的分析技术，毛细管等电点聚焦-傅里叶转换离子回旋加速共振质谱法及酵母双杂交方法的蛋白质-蛋白质相互作用综合分析进行了讨论。结果与结论　这几种分析技术在蛋白质鉴定和蛋白质功能分析及蛋白质-蛋白质相互作用等蛋白质组学研究方面有广阔的应用前景。

关键词：蛋白质组学研究；二维凝胶电泳-质谱法 毛细管等电点聚焦-傅里叶转换离子回旋加速共振质谱法；酵母双杂交法

2000 年 4 月 9～12 日在加拿大温哥华召开了 2000 年国际人类基因组会议，提出人类基因组今后发展的研究领域和前沿课题。人类基因组计划（human genome project，HGP）在基因组作图和序列框架图方面已取得了很大的进展。随着 HGP 的突破性发展，开始对功能基因组学包括蛋白质组学掀起了研究的热潮，有关蛋白质组学研究的分析技术也有了新的进展。

1　蛋白质组学的研究领域

蛋白质组学（proteomics）是蛋白质的规模化研究，从蛋白质水平和生命本质层次上研究和发现生命活动的规律和重要生理、病理现象的本质，揭示基因活性的动态表达。蛋白质水平的分析不仅为生物分子体系提供最有效的实时分析模式而且也获得在 DNA 和 RNA 水平上不易获得的信息。蛋白质的规模化分析将大大有助于我们在后基因组时代了解基因功能。

蛋白质组学可分为三个主要领域：①蛋白质的微特性供蛋白质的规模化鉴定和它们的后翻译修饰；②“差异显示”蛋白质组学供蛋白质水平与疾病在广泛范围的有力应用比较；③应用特定的分析技术如质谱法或酵母双杂交系统研究蛋白质-蛋白质相互作用。

2　二维凝胶电泳和质谱结合的分析技术

二维凝胶电泳法（two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis，2D-PAGE）。虽然早在 20 世纪 70 年代即由 O′Farrell[1] 建立并用于蛋白质的分离，但直至 20 世纪 90 年代才用于蛋白质组学的研究[2～4]。

Henzel 等[5] 提出应用“肽-质量图谱”（peptide-mass mapping）进行蛋白质的鉴定。大肠杆菌（*Escherichia Coli*）细胞表达人生长激素经溶胞后进行二维凝胶电泳，然后从凝胶电泳斑点在原位还原、烷基化及胰蛋白酶酶解，用基质辅助激光解吸-离子化质谱法（MALDI-MS）进行测定。本方法应用于粗大肠杆菌提取物二维凝胶电泳 10 个斑点的分析，从超过 91 000 蛋白质序列数据库，鉴定了其氨基酸序列，微微克分子（picomole）以下可以测定。10 个斑点的 N-末端氨基酸序列分析结果见表 1。

1997 年 Jensen 等[6] 及 1999 年 Berndt 等[7] 分别提出了应用模糊逻辑学反馈对照的 MALDI 质谱自动分析和从蛋白质的 MALDI 质谱的肽指纹谱进行可靠的自动蛋白质鉴定。

2000 年 Pandey 等[8] 报道了应用二维凝胶电泳和质谱的结合与生物信息学建立的方法以进行差异显示蛋白质组学研究。取由两种不同状态（状态 A 及状态 B）来源的细胞（或组织）经蛋白质溶解后，粗的蛋白质混合物用于“第一向”凝胶片基于等电点以分离蛋白质，此凝胶片经还原和烷基化反应后用于“第二向”十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）蛋白质变性并基于分子大小而进行分离。然后，此凝胶经固定，蛋白质以银染显色。银染比考马斯蓝染色更为灵敏且适合

需要全本请访问 www.ertongbook.com

表 1　1～10 斑点的 *N*-末端序列分析

斑点号	最初的得率/pmol	蛋白质	*N*-末端序列	斑点号	最初的得率/pmol	蛋白质	*N*-末端序列
1	2.5	半胱氨酸合酶 A	SKIFEDNS	7	2.0	Mr60000chaperonin	AAKDVKFGN
2	1.1	苹果酸脱氢酶	MKVAVLGAAGGIGQAL	8	4.2	生长激素	FPTIPL
3	1.2	胱氨酸脱胺酶	MHPRFQTAFAQLADNLQ	9	0.5	Mr60000 延伸因子	GITINTSHVEYDTXT
4	2.8	嘌呤核苷磷酸化酶	AIPHINAEMGDFADVVLMPG	10	11.8	Mr10000chaperonin	MNIRPLHDRVIVKRKEVE
5	3.5	生长激素	FPTIPL		4.6	未倒转的应激因子	AYKHILIAVDLSPESKVE
6	1.0	尿苷磷酸化酶	SKSDVFHLGLTKNDLQG				

于用质谱分析。染色后所得的蛋白质斑点记录并进行定量。图象分析（image analysis）可用岛津公司的岛津二波长飞点扫描仪 CS-9000 或新型号的扫描仪进行扫描。然后切下重要的斑点进行质谱分析。

生物质谱分析发展迅速，主要的有基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱（matrrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometrg，MALDI-TOF-MS）及基质辅助激光解吸离子化四倍飞行时间质谱法（matrrix-assisted laser desorption ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometrg，MALDI-Q_9TOF-MS）。关于 MALDI-TOF-MS 的原理及其在基因工程药物分析和在基因表达结构与功能关系研究中的应用，2000 年笔者曾作了综述[9]。

2000 年 Sherchenko 等[10]报告了蛋白质在 1×10^{-15} 克分子水平经一维或二维凝胶电泳分离后用 MALDI-Q_9TOF 质谱仪进行鉴定。相对分子质量（Mr）为 90000 及 42000 的酵母蛋白曾被鉴定。

3　毛细管等电点聚焦-傅里叶转换离子回旋加速共振质谱法

蛋白质组是对细胞的状态异常灵敏且所含的蛋白质具有充分依赖于细胞周期阶段。细胞差异，对环境条件（营养、温度、重压等）的反应或疾病状况。所以蛋白质组的研究在好的规定条件下可以提供一个更好了解复合生物过程和蛋白质功能的论断。

1999 年 Jensen 等[11]提出了应用更快速、较灵敏和精确的细胞组分的特性测定方法，毛细管等电点聚焦-傅里叶转换离子回旋加速共振质谱法（capillarg isoelectric focusing-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry，CIEF-FTICR 质谱法）进行大肠杆菌（*Escherichia Coli*）模式系统蛋白质组的测定。

4　酵母双杂交系统的蛋白质-蛋白质相互作用综合分析

蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction）的重要任务在于细胞的结构和功能性组织的各个方面。对它们全面描述是了解细胞所必需的。酵母双杂交系统（yeast two-hybrid system）可以达到这个目的。

2000 年 Ito 等[12]提出酵母生长的蛋白质-蛋白质相互作用图，用综合系统测定酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的蛋白质间所有可能结合的双杂交相互作用。

同年 Uetz 等[13]报告了酿酒酵母蛋白质-蛋白质相互作用的综合分析。用规模化的酵母双杂交筛选鉴定酿酒酵母蛋白质-蛋白质相互作用。构建了约 6000 酵母转化细胞的蛋白质阵列，每一转化细胞表达的开放读码 open reading frames，ORF_s）作为一种隔合至活化领域。此阵列对 192 酵母蛋白质用简单的和自动的程序进行筛选，由其阵列位置上鉴定阳性反应。用高通量筛选程序筛选近全部 6000 预期的酵母蛋白质。酵母双杂交体系用 ORF_s，隔合至 GAL4 的 DNA-结合或活化领域，当两个（ORF_s 在细胞核中相互作用进行蛋白质编码，结果增加报道基因的转录作用。

5　展　望

二维凝胶电泳和质谱结合的分析技术、毛细管等电点聚焦-傅里叶转换离子回旋加速共振质谱

法及酵母双杂交的蛋白质-蛋白质相互作用综合分析为蛋白质组学的研究提供了有力的分析方法。目前蛋白质组学研究的有关技术正在进一步发展中。

美国大学每日科学新闻网站 2001 年 4 月 24 日题为"蛋白质化学使人类进一步了解细胞蛋白质"的文章，报道了宾夕法尼亚大学医学院的研究人员发明了蛋白质化学时代的一项新技术——TT 核糖核酸聚合酶增强免疫检测技术(immuno-detection amplified by TTRNA polymerase, IDAT)是一种灵敏度非常高的检测单种蛋白质的技术，并能在自动程序条件下监测数以百计或千计的分子。

我们相信，随着新的分析技术和检测技术的出现和应用将为蛋白质组学的研究开拓更广阔的前景。

参考文献

[1] O'Farrell PH. High resolution two-demensional electro phoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, 250: 4007.

[2] Wilkins M R, Williams K L, Apple R D, *et al*. Proteoms Research: New Frontiers in Functional Genomics 1 - 243, Springe, Berlin, 1997.

[3] Wilkins M R. From Proteins to Proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio Technology*, 1996, 14: 61.

[4] Celis J. Human 2DPAGE databases for proteome analysis in health and disease: http//biobase. dk/cgi-bin/celis. *FEBS Lett*, 1996, 298: 129.

[5] Henzel W J, Billeci T M, Stults J T, *et al*. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databasses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(11): 5011.

[6] Jensen ON, Mortensen P, Vorm O, *et al*. Automation of matrix assisted laster desorption/ionization mass spectrometry using fuzzy logic feedback control. *Anal Chem*, 1997, 69: 1706.

[7] Berndt P, Hobohm U, Langen H. Reliable automatic protein identification from matrix-assited laster desorption/ioni zation mass spectrometric peptide fingerprints. *Electro phoresis*, 1999, 20: 3521.

[8] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405(6788): 837.

[9] 陈执中. 基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱法在生化和基因工程药物分析研究中的应用进展药物生物技术，2000, 7(2): 122.

[10] Shevchenko Andrej, Loboda A, Shevchenko Anna, et al. MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proleomic research. *Anal Chem*, 2000, 72(9): 2132.

[11] Jensen P K, Pasa-Tolec L, Anderson G A. Probing proteomes using capillary isoelectric focusing-electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem*. 1999, 71(11). 2076.

[12] Ito T, Tashiro K, Muta S, *et al*. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: a comprehensive system to examine two-hybrid interactioos in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(3): 1143.

[13] Uetz P, Giot L, Cagney g, *et al*. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cere-visiae. *Nature*, 2000, 403(6770): 623.

【作者简介】陈执中，主任药师、教授。现任复旦大学药学院兼职教授、和泰生物技术公司高级顾问。《药学生物技术》、《自由基生命科学进展》等 3 种医药杂志编委。出版药物分析专著 8 本，发表论文 80 余篇。1992 年起享受国务院突出贡献特殊津贴。

人血液和头发中微量铜分析方法进展

刘丽鹤，李好枝（沈阳药科大学药学院药物分析教研室，辽宁沈阳 110016）

摘要：目的　综述近年来国内外有关人血液和头发中铜的分析方法。方法　引用文献 26 篇。结果和结论　体内铜的分析方法日趋成熟，包括有分光光度法、色谱法、电化学法和催化动力学法等，可为研究工作和实际应用提供

参考。

关键词 人血液 头发 铜 分析方法

铜为人体必需微量元素，与人类健康关系密切。美国[1]推荐人体铜的日需要量——安全摄入量(SADDI)为 成人 2～3 mg;婴儿 5～10 mg。体内铜缺乏或铜积累过多均会导致各种疾病。如，铜含量过低会引起 Menke 氏病，缺铜性贫血，冠心病，动脉粥样硬化等心血管疾病以及免疫力下降。铜含量过高会引起铜中毒，肝豆状核变性。研究还发现多种肿瘤癌症患者体内铜含量及铜锌比值均升高[2]。因此，体内微量元素铜的测定具有十分重要的临床意义，利于疾病的诊断和预防。近些年来，随着科学技术的发展，体内铜的分析方法日趋成熟。本文综述近年来分光光度法、色谱法、电化学法和催化动力学法等，为研究工作和实际应用提供参考。

1 分光光度法

1.1 原子吸收光度法(AAS)

AAS 仍然是测定体内铜的最基本的方法，包括火焰原子吸收光度法（FAAS),石墨炉原子吸收光度法(GFAAS),电热原子吸收光度法(ETAAS),氢化发生原子吸收光度法（HGAAS),蒸气发生原子吸收光度法(VGAAS)等。

1.1.1 火焰原子吸收光度法(FAAS) 金 鑫 等[3]采用流动注射在线预分离富集 FAAS 测定人发中的铜，可以显著提高火焰原子吸收的灵敏度，且具有洗脱体积小，富集倍率高及干扰小的优点。在 0.3 mol·L^{-1}硝酸介质中，铜离子在编织反应器中与 Ni^{2+}-DDTC 产生共沉淀，并被收集在编织器内壁上，用甲基异丁酮在线洗脱沉淀物，引入火焰原子化器中，在波长324.8 nm,灯电流 6 mA,空气 乙炔焰下测定。当富集时间为 40 s 时,40 μg·L^{-1}铜 10 次测定的相对标准偏差为 3.0%,灵敏度提高 60倍,检出限为 0.2 μg·L^{-1}。本法测定标准含铜量为（23.0±1.4）μg·g^{-1}的头发样品 GBW－09109,测定值为 22.8 μg·g^{-1}和 23.0 μg·g^{-1}.

1.1.2 蒸气发生原子吸收法(VGAAS) 周 焕 英 等[4]建立了流动注射 VGAAS 测定人发铜的方法。使含有微量邻菲咯啉的头发样品溶液与硼氢化钠溶液汇合并反应生成蒸气态物质，在 Ar 载气下随反应液进入气液分离器分离，并进入石英管原子化器在 1000℃下检测。本法用邻菲咯啉作增敏剂，大大提高硼氢化钠还原体系中铜的蒸气态物质发生效率，灵敏度在原来的基础上提高近十倍,铜的检测限为 1.8 μg·L^{-1},相对标准偏差为 2.6%。此法测定的基体干扰小,分析速度快,精密度高，用于测定头发标准样品中的铜〔标准值为(23.0±1.4)μg·g^{-1}〕,测得值为(23.6±0.3)μg·g^{-1},结果满意。

1.1.3 超声波电解－原子吸收法 Bermejo-Barrera 等[5]用超声波酸电解法来提取人发中 Ca,Cu,Fe,Mg,Mn 和 Zn 元素,考察了 HNO_3, HCl, H_2O_2 浓度,超声时间,超声电解槽温度和头发粒径等 7 种因素对酸电解提取过程的影响，确立最佳实验条件。然后用火焰原子吸收法测定 Ca,Cu,Fe,Mg 和 Zn 含量,铜离子测定波长 324.8 nm。用电热原子吸收法测定 Mn 含量。本法测定两种头发标准样品 IAEA－085 和 NIES No.13 中上述元素，测定结果与参考值一致。

1.2 电感耦合等离子发射光谱法 ICP-AES)

ICP－AES 是用电感耦合等离子进行样品的激发，气化和原子化，再与原子发射光谱相结合，根据特征谱线的强度来确定含量，具有灵敏度高，稳定性好等特点。

Pomazal 等[6]用空间排斥高效液相色谱（SEC－HPLC) 和 ICP－AES 联用来测定血浆和红细胞中与蛋白结合的 Cu, Fe, Mg 和 Zn。取 100～250 μL 血浆（或红细胞）注入 Fractogel EMD BioSEC650(S) 柱,分离除去非金属结合蛋白,柱温 30℃,流动相为 0.3 mol·L^{-1}NaOH-0.02 mol·

L^{-1}磷酸盐缓冲液(pH6.8)(1 $mL \cdot min^{-1}$),在 324,694 nm 下 ICP-AES 法测定 Cu。Cu 的检测限为 30 $ng \cdot mL^{-1}$,本法成功用于测定红细胞中 Cu/Zn-SOD 酶。

1.3 电感耦合质谱法(ICP-MS)

1.3.1 ICP-MS Inagaki等[7]用 ICP-MS 测定血清中 Zn和 Cu 与蛋白质的结合物。取 1 mL血清加入 0.4 g 树脂 Chelex-100(已用 1 $mol \cdot L^{-1}$pH7.4 的醋酸铵处理)。振摇 1 min,放置 5 h,然后离心分离。取上层溶液 0.1 mL 用 2 mL 0.1 $mol \cdot L^{-1}HNO_3$ 稀释,用 10 $ng \cdot mL^{-1}$ 铑作内标物,ICP-MS测定 Zn和 Cu 与蛋白质的紧密结合物 (即巨球蛋白 -Zn 和血浆铜蓝蛋白 -Cu),分别为 m/z66和 m/z65。用 总 Zn和 Cu 的测定值减去 Zn 和 Cu 与蛋白质紧密结合物的值,即为 Zn 和 Cu 与蛋白质疏松结合物的值(如白蛋白 -Zn 和白蛋白 -Cu)。其中总的 Zn 和 Cu 的值是将上述血清样品用 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ HNO_3 稀释 20倍后,再用 ICP-MS测定获得。观测到血浆铜蓝蛋白 -Cu的线性范围为 513~880 $ng \cdot mL^{-1}$ (占全部铜含量的 90.6%~99.7%),日内和日间精密度分别为 1%和4%($n=3$).

1.3.2 双源 ICP-MS法 Muniz 等[8]建立了用双源 ICP-MS 仪来测定人血清中微量和超微量元素。血清样品用去离子水稀释(1+4),加入 Sc,Ga,Y 和 Tl 作内标,一级体系 $m/\Delta m=300$ 用于测定 Rb,Sr,Mo,Cd,Pb 和 U,二级体系 $m/\Delta m=3000$ 用于测定低浓度的 Al,Ca,Cr,Mn,Fe,Co,Cu,Zn 和 Se 本法适用于健康志愿者和尿毒症患者血清中多种微量元素的测定。

1.3.3 放射性同位素稀释 ICP-MS Muniz 等[9]进一步研究了用放射性同位素稀释的双源 ICP-MS 法测定人血清中铁铜锌。血清中加入^{57}Fe,^{65}Cu,^{67}Zn 标准物,用去离子水稀释(1+19),质谱法分别测定同位素比值$^{57}Fe/^{56}Fe$,$^{65}Cu/^{63}Cu$和$^{67}Zn/^{64}Zn$,用于计算 Fe,Cu 和 Zn 含量。为获得理想的精密度,分析时间应小于 6 min。内标物为 50 $\mu g \cdot L^{-1}$ 时,同位素比值的相对精密度分别为 0.7%,0.2%和 0.8‰ 本法已成功用于测定 21 例健康志愿者血清中铁、铜、锌。

1.4 荧光光度法(Fluor)

1.4.1 荧光光度法 王占玲等[10]发现在强碱性介质中,硫胺素可被 Cu(Ⅱ)氧化成强荧光物硫色素,据此建立了荧光法测定人发中铜。取预处理后人发样品溶液于 25 mL 比色管中,加入 2 mL 0.05% 的硫胺素溶液和 2 mL 1.25 $mol \cdot L^{-1}$ 的 NaOH 溶液,用水稀释至刻度,摇匀后放置 0.5 h,在激发波长和发射波长分别为 370 nm,440 nm 处测定荧光强度。铜含量与荧光强度呈线性关系。本法检出限为 0.25 $\mu g \cdot L^{-1}$。

1.4.2 荧光熄灭法 付佩玉等[11]研究了 pH6.2~8.2 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲体系中,非离子表面活性剂 Triton-X100 存在下,二溴羟基苯基荧光酮(DBH-PF)有较强荧光,由于 Cu(Ⅱ)与 DBH-PF形成 1:2 红色三元配合物而使荧光熄灭,建立了荧光熄灭法测定铜的新方法。荧光强度的减弱量与 Cu(Ⅱ)含量在 0~80 $\mu g \cdot L^{-1}$范围内呈线性关系($\lambda_{ex}=530$ nm,$\lambda_{em}=560$ nm) ,检测限为 0.2 $\mu g \cdot L^{-1}$。Al(Ⅲ),Fe(Ⅲ),Ti(Ⅳ)的干扰,可用氟化钠,苦杏仁酸掩蔽。方法灵敏度高,选择性好,快速简便,可用于人发中微量铜的测定,回收率在 98.5%~101.0% 之间,*RSD* 小于 3.9%。

1.4.3 全反射 X-射线荧光法(TR-XRF) Marco等[12]用钴为内标物的 TR-XRF 法测定血清中痕量 Fe,Cu,Zn,Se,Pt 和脑组织匀浆中的 Cu 和 Zn。将全血在 2 400 $r \cdot min^{-1}$离心 15 min 获得血清,在装有高聚焦的钼阳极 X-射线管,晶体单色器(含有苯二酸盐的单晶钛)和 30 mm^2 Si(Li)检测器的全反射 X-射线荧光系统上测定。测定结果与以钴或钒为内标物的 FAAS 或流动注射 AAS 一致。

1.5 分光光度法(SP)

分光光度法灵敏度通常比较低,不适于体内微量铜测定,但随着新显色剂的出现,表面活性剂对显色反应的增溶增敏作用及新型全自动紫外分光光度计的问世,其灵敏度、选择性和分析速度有

需要全本请访问 www.ertongbook.com

了很大提高。

1.5.1 胶束增溶分光光度法 陈敏等[13]以 5-溴-(二乙基氨基)-2-(2-吡啶偶氮)苯酚(5-Br-PADAP)作显色剂,以 Triton-100 作增溶增敏稳定剂,用双波长标准加入组合法同时测定血清中的微量 Fe 和 Cu,测定波长 595 nm 和 505nm。该法即可消除共有物干扰,改善选择性,又不降低灵敏度,且不需加掩蔽剂。Cu(Ⅱ)的线性范围为 0～5.5 $\mu g \cdot 10\ mL^{-1}$,血清中 Cu(Ⅱ)平均回收率为 100.4%($n=3$)。

1.5.2 计算分光光度法 王咏梅等[14]基于 Beer 定律和吸光度加和性原理,用解多元线形方程组的方法同时测定人发中的锌、铜、铁。测定时在 25 mL 量瓶中加入 5-Br-PADAP 乙醇溶液,经消化定容后的样品溶液和 2.0 mL 缓冲溶液,定容,显色 30 min,以试剂为空白参比扫描吸收光谱。测量数据输入计算机处理。多元线性回归测得发样中 Cu(Ⅱ)回收率为 102.4%和 100.7%。

1.5.3 内标分光光度法 由于血清等生物样品成分复杂,常需进行分离,富集等预处理,造成测定结果不稳定,内标法能很好解决这一问题。但内标法多用于色谱分析,Wrobel 等[15]研究了将内标法用于紫外可见光度法来测定血清中铜。4,7-联苯-2,9-二甲基-1,10-邻二氮杂菲是分光光度法测定铜离子的敏感试剂。血清样品用 150 μL $CHCl_3$ 提取后,加入铜试剂和内标物溴苯酚蓝分别在 477 和 602 nm 下测定铜配合物和内标物的吸光度,利用吸光度比值来测定铜浓度,线性范围为 0～2 $mg \cdot L^{-1}$,精密度为 2.2%($n=6$)血清中铜测定结果与 ET-AAS 一致。

2 色谱法

2.1 高效液相色谱法(HPLC)

Almeida 等[16]用 HPLC 测定人发中过金属元素。取 1～2 g 头发洗净 110℃干燥过夜。从中取出 0.5 g 加入 4 mL 浓 HNO_3 和 1 mL 浓 $HClO_4$ 微波消化。冷却后加入 20 mL 流动相溶解,然后在含有十六烷基磺酸钠的 Nova-Pak C_{18} 柱上分析。流动相为 pH3.1 的酒石酸-NaOH(1∶20)(1 $mL \cdot min^{-1}$),用 4-(2-偶氮吡啶)-间苯二酚柱后衍生,在 520 nm 下测定。Cu 的线性范围为 16～375 $\mu g\ g^{-1}$。

2.2 离子色谱法(IC-HPLC)

Lane 等[17]用离子色谱法测定血浆中的铜和锌。取 1 mL 血浆加入 3 mL 70% HNO_3 微波消化,用 10 mL 水溶解,从中取出 25 μL 在装有 Dionex HPLC-CG5 保护柱的 Dionex HPlC-CS5 阳离子交换柱上分析,流动相为 50 $mmol \cdot L^{-1}$ 氢氧化锂(pH4.8)(1 $mL \cdot min^{-1}$),用 4-(2-偶氮吡啶)-间苯二酚柱后衍生,在 520 nm 下测定。以 0.6 $mg \cdot L^{-1}$ 钴作内标物,标准加入法测定血浆中 Cu 的检测限为 0.09 $mg \cdot L^{-1}$,测定结果与 ICP-AES 法一致。

2.3 离子对色谱法(IP-HPLC)

Chung 等[18]研究了铜(Ⅱ)-1-氧杂-4,7,10,13-四氮环癸烷配合物的色谱保留行为,建立了间接紫外检测的 IP-HPLC 测定血清中铜。间接紫外检测是基于在流动相中加入具有紫外吸收的物质萘磺酸钠,来测定无紫外吸收的铜离子配合物。色谱柱为 μBondapak CN 柱,流动相为乙腈溶液($MeCN : H_2O = 20:80$),含有离子对试剂十二烷基硫酸钠(SDS)和检测试剂萘磺酸钠。取 10 μL 血清加入三氯乙酸沉淀去蛋白,离心后取上层清液进样,用标准加入法在 254 nm 下测定血清含铜量为 1.02 $\mu g \cdot mL^{-1}$,测定结果与 FIA 一致。

3 电化学法

3.1 溶出法

溶出法是在合适的某一恒定电压下,使铜离子先在电极上析出,随后再用电学方法或化学方法使析出物铜溶解下来,根据溶解时的电流-电压或电流-时间曲线定性定量分析。

3.1.1 阳极溶出伏安法(ASV) Aydin 等[19]用 ASV 测定血中的铅、铜、硒。将全血(或血清)用 $HClO_4$-HNO_3-H_2SO_4(5:5:2)消化。以 Ag/AgCl 为参比电极，用镀有汞膜的玻碳电极在 -0.30 V 电解，静置溶出 40 s，以 50 mV·s^{-1} 的速度扫描。得到浓度在 0.55～0.64 μg·L^{-1} 范围内的铜的回收率为 101.0%(n=7)，RSD 为 1%～2%。测定两个患者血中铜浓度分别为 (0.403±0.039) mg·L^{-1}和(1.087±0.160)mg·L^{-1}.

3.1.2 同位镀汞微分电位溶出法 针对玻碳电极在含有大量有机质的底液下高速旋转，汞膜易被污染，测定结果不稳定现象，傅晖蓉等[20]用同位镀汞微分电位溶出法测定全血中铜含量。取 30 μL 经抗凝的全血，加入 6 mL 2%盐酸，100 μL 0.01 mol·mL^{-1}氯化高汞和 50 μL 5%重铬酸钾，在 -0.90 V 搅拌电解 60 s，静止 30 s，用标准加入法测定血铜含量。血铜浓度在 0.17～2.70 mg·L^{-1} 范围内线性良好(r=0.9992)，检出限为 0.01 mg·L^{-1}。

3.1.3 超声阳极溶出伏安法(sono-SWASV) Hardcastle 等[21]首次采用超声波促进铜溶出而测定全血中的铜。在玻碳电极表面加上一个声电转换器，将 10%的全血溶液加入到 0.1 mol·L^{-1} HNO_3 中，ASV 测定。方法灵敏简便，即不需要复杂的预处理也不用汞电极，已成功用于马的溶血血液的铜含量测定。

3.2 极谱法(Pol)

3.2.1 络合物极谱法 和彦苓等[22]发现在 pH9.5 四硼酸钠体系中铜与丁二酮肟产生一灵敏的络合吸附极谱谱波，峰电位在 -0.47 V(vs. SCE)，峰电位与铜浓度在 0～0.5 mg·L^{-1}范围内线性良好。在示波极谱仪上使用阴极化导数档，起始电位 -0.2 V 测定人发中的铜，相对标准偏差小于 3.5%，回收率在 97.0%～102.0%之间。

3.2.2 催化极谱法 王力生等[23]发现在 pH4.1 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中，孔雀绿在-0.62 V (vs. SCE) 处产生灵敏的示波极谱阴极波，铜在加热条件下对次亚磷酸钠还原孔雀绿这一缓慢反应表现出强烈催化作用，建立了以孔雀绿为指示组分，示波极谱法为检测手段的测定铜的方法。铜浓度在 5～50 ng·mL^{-1}与 $\log I_0/I$ 呈良好线性关系，检测限为 2.5 ng·mL^{-1}。本法测得人发中痕量铜的回收率在 106.0%～109.0%之间。

4 催化动力学法

催化动力学法是利用铜可催化一些反应，而反应速度与铜浓度在一定范围内呈线性关系，从而测定铜具有仪器简单，操作简便，灵敏度高等优点，日益受到人们重视。

4.1 催化显色光度法

龙文清[24]利用 Cu^{2+}和 Fe^{3+}对硫代硫酸钠诱导的氧化钾生成单质碘有较强的催化作用，同时测定 Cu^{2+}和 Fe^{3+}。测定时取适量经预处理后的头发样品溶液于 25 mL 比色管，分别加入碘化钾溶液 2 mL，硫代硫酸钠溶液 2.5 mL，淀粉溶液 2 mL 作为指示剂)及氟化钠溶液 2 mL(用于掩蔽 Fe^{3+}，用水稀释至刻度。加入过硫酸铵溶液 1.5 mL，同时启动秒表，至溶液出现蓝色停表即为诱导期 t，同时作试剂空白测 t_0。铜离子浓度在 0～7.5 μg·mL^{-1}与 t_0/t 呈良好线性，检测限 1.9 ng·mL^{-1}.

4.2 催化褪色光度法

郑琦等[25]利用铜能催化抗坏血酸还原 DBN(即 2-[(2-胂酸苯)偶氮]-7-(2,6-二溴-4-硝基苯)偶氮-1,8-二羟基-3,6-萘二磺酸)褪色，催化褪色速度在一定条件下与溶液中铜浓度成正比，建立了催化褪色光度法测定铜。在波长 544 nm 下测定，得到铜浓度在 0～0.12 μg·10 mL^{-1} 范围内与 $\log A_0/A$ 呈线性关系 r=0.998 2)，检出限 3.45×10^{-10} g·mL^{-1}，可用于人发中铜含量测定，回收率在 99.4%～102.6%之间。

4.3 负催化分光光度法

乔占奎等[26]研究了铜在水和乙醇介质中对 H_2O_2 氧化甲基红的褪色反应的负催化作用，测定头发中铜。取适量经预处理后的头发样品溶液，加入 H_2O_2(30%)1 mL,乙醇 9 mL,甲基红 0.5 mmol·L^{-1}(含 50%乙醇)4.0 mL,稀至 25 mL，同时作试剂空白。置于(85±0.5)℃恒温水浴中,15 min,流水冷却使反应停止。于 520 nm 处,以水为参比,测空白液和样品液吸光度 A_0 和 A,铜量在 0.4～6.0 ng·mL^{-1} 内与 ΔA 呈线性关系。人发铜平均回收率为 100.7%。

除以上提到的方法外，还有人用离子选择电极法，化学发光法，中子活化分析法等来测定体内微量铜。其中中子活化法（INAA)具有不必制备样品,可进行活体分析,对受检者进行无伤害的示踪试验的优点。1998 年 Verkbovodov PO还开发了用 X-射线荧光法测定微量无素的程序软件 VERBA-XRF 软件,可同时测定样品中 50 种元素。

总之，近年来测定体内痕量铜的方法取得了很大进步，随着新型显色剂的出现，微电子技术的发展，分析仪器和微机联用，以及新的分析数据处理方法的出现，测定体内微量元素铜的方法和技术必将得到更快的发展。

参考文献

[1] 王夔,唐任寰主编.生命科学中的微量元素.第 2 版.北京：中国计量出版社，1996:515～561.

[2] 刘春萍,何邦平,蔡龙荣,等.血清锌铜含量和铜蓝蛋白活性变化对肝癌诊断价值的研究.微量无素与健康研究，2000,17(2):17.

[3] 金鑫,刘劲松,陈恒武,等.流动注射在线共沉沉预富集火焰原子吸收法测定痕量铜.理化检验-化学分册,1998,34(6):246.

[4] 周焕英,徐淑坤,方肇伦.流动注射蒸气发生原子吸收光谱法测定痕量铜.光谱学与光谱分析,2000,20(4):525.

[5] Bermejo-Barrera P, Muniz-Naveiro O, Moreda-Pineiro A, *et al*. Experimental designs in the optimization of ultrasonic bath-acid-leaching procedures for the determination of trace elements in human hair samples by atomic absorption spectrometry. *Forensic Sci Int*, 2000, 107(1～3):105

[6] Pomazal K, Prohaska C, Steffan I, *et al*. Determination of copper, iron, manganese and zinc in blood fractions by SEC-HPLC-ICP-AES coupling. *Analyst*, 1999, 124(5):657.

[7] Lane E, Holden AJ, Coward RA. Determination of copper and zinc in blood plasma by ion chromatography using a cobalt internal standard. *Analyst*, 1999, 124(3):245.

[8] Muniz CS, Marchante-Gayon JMAlonson JIG, *et al*. Multi-elemental trace analysis of human seurm by double-focusing ICP-MS. *J Anal At Spectrom*, 1999, 14(2):193.

[9] Muniz CS, Gayon JMM, Alonso JIG, *et al*. Accurate determination of ion, copper and zinc in human serum by isotope dilution analysis using double focusing ICP-MS. *J Anal At Spectrom*, 1999, 14(9):1505.

[10] 王占玲,李健中,张竹云.荧光光度法测定痕量铜的研究.分析化学,1994,22(5):472.

[11] 付佩玉,曹伟,高红亮.二溴羟基苯基荧光酮荧光熄灭法测定铜.光谱学与光谱分析,2000,20(1):99.

[12] Marco LM, Greaves ED, Alvarado J, Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluroescence spectrometry applying Compton peak standardization. *Spectrochim Acta Part B*, 1999, 54(10):1469.

[13] 陈敏,高晓钦,谢吉民,等.双波长标准加入组合法同时测定人体血清中微量 Fe和 Cu.微量元素与健康研究，1999,16(4):59.

[14] 王咏梅,林朝阳,李克安,等.计算光度法同时测定人发中的锌铜铁.分析试验室,1995,14(3):18.

[15] Wrobel Kazimierz, Wrobel Katarzyma, Gruz-Jimenez G, *et al*. Application of internal standard for micro extraction-spectrophotometric determination of copper in serum and in natural water. *Anal Chim Acta*. 1999, 387(2):217.

[16] Almeida AA, Jun X, Lima JLFC. Determination of transition metals! in human hair by high-performance liquid chromatography using sodium hexadecanesulfonate coated columns. *Talanta*. 1999, 50(2):253.

[17] Inagaki K, Mikuriya N, Morita S, *et al*. Sepciation of protein-binding zinc and copper in human blood serum by chelating resin pretreatment and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst*, 2000, 125(1):197.

[18] Chung Y, Kim B, Hwang J, *et al*. Ion-pair high-performance liquid chromatographi retention behavior of copper (Ⅱ)-1-Oxa-4,7,10,13-tetraazacyclopentadecane complex. *Microclem J*, 1999, 62(3):336.

[19] *Aydin H, Oruc O. Anodic-stripping-voltammetric determination of total lead, copper and selenium in whole blood and serum. Fresenius' J Anal Chem*, 1997, 358(7~8): 859.
[20] 傅晖蓉,黄盈煜,胡桂莲全血中 Cu 含量的同位镀汞微分电位溶出法测定.微量元素与健康研究,2000,17(4):68.
[21] Hardcastle JL, Muratt GG, Compton RC. Sonoelectroanalysis : ultrasonically failatated liberation and determination of copper in whole blood. *Electroanalysis*, 2000, 12(8): 559.
[22] 和彦苓,张艾华,谈旭吟.单扫描示波极谱法测定人发中铜.理化检验·化学分册,1999,35(5):226.
[23] 王力生,蒋志良,覃诚真.铜的催化反应-示波极谱分析.理化检验-化学分册,1995,31(1):27.
[24] 龙文清.催化光度法同时测定铜和铁.理化实验·化学分册,2001,37(1):12.
[25] 郑琦,蔡汝秀,梅冬.铜催化 DBN偶氮胂的褪色反应特性及应用.分析试验室,1997,16(4):50.
[26] 乔占奎,侯淑清负催化吸光光度法测定头发中铜.理化检验·化学分册,1995,31(2):105.

柱切换技术在 HPLC 测定生物样品中的应用

李瑛琦，李好枝，于治国，陆文超（沈阳药科大学药物分析教研室，辽宁沈阳 110015）

摘要 **目的** 介绍柱切换技术在 HPLC测定生物样品中的应用。**方法** 根据近年文献报道，对柱切换技术在生物样品直接进样、简单处理后进样、手性分离、在线衍生化等方面的应用归纳总结。**结果与结论** 柱切换 HPLC技术的应用适合于生物样品的测定，有广阔的发展前景。

关键词 柱切换技术 生物样品测定 高效液相色谱法

多维色谱法在现代分析中的应用日渐普及，其中高效液相色谱-高效液相色谱的联用（也称为柱切换 column-switching technique）自 20 世纪 70 年代问世以来，经过 30 年的发展，现已广泛应用于环境保护、农药残留监测、食品检验、生化分析、体内药物分析等众多领域。

简单地说，柱切换高效液相色谱技术，就是利用多通切换阀，改变色谱柱与色谱柱，进样器与色谱柱，色谱柱与检测器之间的连接，及改变流动相走向和流动相系统，从而使洗脱液在一个特定的时间内从一级柱进入二级柱的技术。因达到不同分离目标的色谱柱之间用切换阀来连接，因此而得名。

早在 1988 年 Ramsteinerk 等[1]已对柱切换技术的切换转移方式作了综述。近年来，该项技术有了长足的发展，柱切换的模式可根据不同的实验目的和条件自行设计，可使用单泵双柱、双泵双柱及多泵多柱等类型。应该说，柱切换技术的开发和应用拓展了 HPLC 的使用空间。

柱切换技术的主要优点是 ①增加了色谱峰的分辨率和选择性；②在线净化、富集微量组分，使样品预处理简化；③可进行区带切割和再循环；④节约分析时间，适用于临床药物监测；⑤样品用量少，一般几百微升即可。现对柱切换技术在 HPLC测定生物样品中的应用简要介绍如下。

1 生物样品直接进样

生物样品(如血浆、血清等)常富含蛋白质，一般不可用传统的 HPLC 直接进样，因为蛋白质与流动相有机溶剂发生作用，使色谱柱堵塞变质[2]。但若偶联一个特殊的净化柱，将被分析物萃取出来，并除去大分子基质物质，即可完成如萃取、分馏复杂生物样品的作用。许多实验室为达到此目的而在一级柱(预柱)中填充一种特殊的填料，称为 RAM(restricted access material)限制进入物质或 RAS(restricted access sorbent)限制进入吸着剂。RAM 家族外表面有甘油基丙基二醇基团作为电中性的亲水配基，内表面有正烷基醚作为疏水相。常用的 RAM 是 Alkyl-diol-silica(ADS) 烷基二醇硅[3~5]。除了 RAM 家族之外，表面涂渍蛋白的 C_2[6~7]，C_4[8]，C_8[9] 及非极性的 C_{18}[10]也可以作为预柱填料。它们之间的区别是：长链烃填料较短链烃填料夺取蛋白中结合药物的能力强一些，但

其保留杂质也相应多一些，需用更强的清洗剂或洗脱剂来除去外来杂质，因此在选择时要加以考察[6]。

生物样品只需经离心而不需其它任何预处理即可直接进样。蛋白质及其它内源性杂质（通常极性较大）由于亲水性外表面和受孔径大小控制，被直接洗脱下来；而被分析物在洗脱至分析柱之前被吸附在孔隙中，得到净化和浓缩，然后切换至与分析柱相联接，以分析流动相将被测组分从预柱冲至分析柱，进行再分离测定。

样品在预柱上的净化、富集过程有人称之为在线固相萃取。如果药物具有高蛋白结合率和与内表面低的亲和性，为了提高回收率可以通过以下两种方法：降低蛋白结合率和增加药物与颗粒内表面的亲和性。①降低蛋白结合率的方法：a.增加一种替代物（与被分析物结构相似）与药物竞争并将其从血浆蛋白质中置换出来；b.通过改变 pH 值来改变蛋白质的构象，降低它与药物的亲和性；c.稀释样品。②增加药物与颗粒内表面的亲和性的方法：a.向萃取流动相中加入离子对试剂；b.调节 pH 值；c.改变有机调节剂的浓度。总之，萃取流动相要使药物与亲水内表面有很好的结合性，并且与血浆蛋白质相容，因此选择适当的缓冲盐、pH 值、有机调节剂的种类和浓度至关重要。有人发现在接近生理 pH(即中性左右)时，很适合除去血清蛋白质，并且可以降低有机溶剂在萃取流动相中的浓度。例如：异丙醇浓度通常低于 5%，乙腈、甲醇浓度往往限定在 10%以下。降低至 pH值 7 以下，即在酸性条件下，有利于固相填料夺取蛋白结合药物。并发现在萃取流动相中适当加入磷酸缓冲盐，可增加萃取流动相与血清蛋白质的相容性，也有人用醋酸缓冲盐来达此目的。

用作固相萃取用的一级柱柱长一般为 5～15 cm，填料颗粒 5～10 μm，为保证柱压不致升得过高，有时也可采用 25～40 μm 较粗的粒径。为保护萃取柱和分析柱，在自动进样与萃取柱间通常装有一个 2 μm 的在线滤膜以除去生物样品中颗粒和分子量大的内源性杂质。

在除蛋白后，蛋白质与一些内源性杂质已被冲洗进入废液接收容器，但不可避免在预柱中会有一些残留，因此对预柱清洗是保证预柱保留能力和分析重现性及延长柱寿命的重要步骤。再生清洗液可采用醋酸、三氯醋酸[11]、四氢呋喃[12]、100% 乙腈[13]、七氟丁酸酐[14]等具有溶解蛋白能力的物质。

直接进样法特别适合于那些对光、热不稳定的物质，例如：Retinoids[15]。此法可避免在样品预处理过程中诱导产生异构体，并可避免暴露于空气中及被玻璃器皿的吸附。Retinoid 蛋白结合率高达 99.9% 因此在进样前要加入一些有机调节剂以使药物易于游离出来，并提高回收率。Retinoid在接触钢体时易产生吸附，因此在色谱柱内表面需涂敷 PEEK(poly ether ether ketone)。另外，RAM 不适合 Retinoid，因为小孔径颗粒易造成柱压过高，所以选择 C_{18}(37～53 μm)作为预柱填料，0.05% 三氟醋酸-乙腈(8.5:1.5) 作为一级流动相来冲洗干扰物。

2 样品经处理后进样

生物样品中被测组分浓度通常很低，并且通常含有蛋白质，前处理过程相当繁杂、费时，采用柱切换技术可显著简化样品前处理过程。通常用以下两种方法。

2.1 在样品中加入适当的蛋白沉淀剂(三氯醋酸、甲醇、乙腈等)去蛋白，将上清液大容量进样，在以水为主的一级流动相洗脱下，干扰物被洗掉而被测组分在预柱保留，实现净化浓缩，然后切换六通阀，用另一种流动相将组分全部地或部分地冲进分析柱进行再分离。例如：Wyss 等[16]测定血浆中的一种受体阻断剂 Ro63-1908。先用乙醇除去血浆中蛋白，然后取 1.4 mL 进样，为了不至于因乙醇浓度过高而使被测组分和内标物从预柱被洗脱下来，可用进样溶液由另外的泵在线稀释后进样。1%醋酸-乙醇(100:2)作为工作流动相，使被测组分和内标物在预柱预浓缩。因为预柱（Purospher RP-18 column）具有非封端固定相，对铵有特殊的选择性，用 30% 乙腈可将被测组分和内标选

择性地洗脱下来，并转移到分析柱上，定量限为 1 ng·mL^{-1}，线性范围 1～1 000 ng·mL^{-1}，而 Fieger[17]用饱和硫酸铵沉淀血浆蛋白后进样，也能达到同样效果。

2.2 生物样品先经过固相萃取再用柱切换系统来分析。例如：Zhong 等[18]用固相萃取和柱切换 HPLC 来测定人脑脊液和血浆中的治疗艾滋病药物 Indinavir，进而测定 HIV 阳性患者 Indinavir 的脑脊液透过率。用一个强的阳离子交换柱（SCXbenzenesulfonic acid）从 1 mL 脑脊液或血浆（用 1 mL50 mmol·mL^{-1} 枸橼酸溶液缓冲，pH2.5）中分离 Indinavir 和内标物。固相萃取柱依次用 1 mL 甲醇，2 mL 水，1 mL50 mmol·mL^{-1} 枸橼酸溶液清洗并平衡。药物及被分析物经减压上柱，用 2 mL 水，2 mL 乙腈-水(1:1)(只限于血浆)，1 mL 甲醇依次清洗除去内源性物质。被测物可用 2 mL 氨水-甲醇(1:50)洗脱下来，然后离心并蒸干，再溶解进样到柱切换系统中去。同样的样品处理方法见血浆中法莫替丁的测定[19]。

生物样品亦可经酶水解，固相萃取处理后再进样[13~14,20]。酶水解的目的是将药物从其葡萄糖醛酸或硫酸缀合物中释放出来。

3 手性分离

具有手性中心的药物其对映异构体的立体选择性亲和力、清除过程、与蛋白质的结合、代谢过程、药物相互作用等方面均有所不同，因此在临床上常用作两种具有不同药代药动性质的药物，通常需要进行对映异构体选择性分离和测定。立体选择性分析通常有两种方法：一种是间接地用手性衍生化试剂衍生对映异构体，使之成为非对映异构体；另一种是直接用手性固定相或手性流动相和非手性色谱联用直接分离对映异构体[21]。

3.1 Walters 等[22]改进的对映体选择性方法，用固相萃取，手性衍生化和柱切换技术测定血浆中的 Reboxetine。该化合物有两个手性中心(R,R)(S,S)，是外消旋体混合物。对映体在用(+)-1-(9-fluorenyl)ethylchloroformate[(+)-FLEC] 衍生化后进样到柱切换系统中。在硅胶柱（预柱）上 Reboxetine 和内标物的衍生化物可获得很好的分离，再把 Reboxetine 的衍生化物峰通过柱切换切割转移到 OD-H 柱上，分离非对映异构体。因为一些基质和(或)(+)-FLEC 物质干扰分析，因此增加一个 CN 柱与 OD-H 手性柱顺序连接，使药物峰从干扰峰中分离出来。

因为有些药物缺少易被衍生化的官能团，并且对具有易衍生化官能团的药物来说，衍生化过程也相当繁琐、费时，手性固定相的发展允许对映体直接进样而不需事先衍生化。目前，手性分离中常使用的是 Chiralcel OD 柱，并且多用作与非手性硅胶柱相偶联，实现非手性-手性柱切换，使药物不经衍生化而直接进样。Metoprolol 的对映体测定方法中所使用的柱切换系统为：一级柱：硅胶柱(250 mm×4.6 mm)二级柱：Chiralcel OD柱(250 mm×4.6 mm)[23]。

4 在线衍生化

体内药物分析中，为了提高某些化合物的检测灵敏度（如氨基糖苷类、激素、氨基酸、脂肪酸等），往往需要将药物衍生化。采用柱切换技术可以使衍生化在线完成，并且得到很好的精密度。最具代表性的是 Haginaka 等的一种在线氨基酸衍生化的方法[24]。

5 另外的几点说明

5.1 离子对色谱法的应用

普通高效液相色谱法有些也同样适用于柱切换高效液相色谱技术，例如：离子对色谱法。Hermansson 等[10]分析血浆/血清中的阿替洛尔、普萘洛尔和布洛芬时，一级流动相以辛烷磺酸钠为反离子与阿替洛尔和普萘洛尔形成离子对。反离子改变分离（萃取）效能是由于在分析柱前端富集浓缩效应。样品带前端形成的反离子带使样品带中前边的被测组分保留强于后边的，因此样品以窄带进入分析柱，有效地克服了峰展宽现象。在测定甾体硫酸酯时，Tayawa 等[25]向预流动相中加入

需要全本请访问 www.ertongbook.com

5 mmol·L^{-1}四丁基铵(TBA)反离子。因为甾体硫酸酯在中性溶液中带负电荷，加入 TBA 形成离子对,从而与血清中蛋白质分离,并在富集柱上浓缩、富集。

5.2 微柱和半微柱的使用

微柱和半微柱具有高灵敏度,低流动相消耗的优点,可用于柱切换技术中,但其装样量小,因此要用装有一个小的死体积阀门的柱切换系统来解决此问题。这种柱的柱长为 1～3 cm,填料粒径多为 5 μm[25～26]。

5.3 各种特殊键合相的应用[27]

氰基键合相极性比硅胶弱，其优点是：在梯度洗脱或流动相组成改变时平衡快，对双键异构体或含有不等量的双键数的化合物有更好的分离能力[10,18,22]。

氨基键合相与硅胶键合相也不同。 Si-OH 柱显酸性，而-NH_2 是显碱性的。-NH_2 具有强的氢键结合能力,对甾体强心苷类化合物有较好的正相分离作用，还与糖分子的羟基存在选择性作用[25]。

柱切换技术以其简便快捷，灵敏度高等优点，为高效液相色谱法测定生物样品开拓了广阔的空间。随着柱切换技术的进一步发展改进,HPLC 在生物样品分析方面的应用前景日益广阔。

参考文献

[1] Ramsteiner KA. Systematic approach to column switching. *J Chromatogr*, 1988, 456(1): 3.

[2] 朱彭龄,王多加,屈莹.直接进样分析用固定相. 中国药学杂志,1994,29(3):129.

[3] Breda M, Basilao G, Fonte G, *et al*. Determination of 4-demethoxy-3′-demin-3′-aziridinyl-4′-methylsulphonyldaunorubicin and its 13-hydroxy metabolite by direct injection of human plasma into a column-switching system with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, 1999, 854(1+2): 81.

[4] Kubalec P, Brandstetrova E. Determination of propafenone and main metaboliet 5-hydroxy propafenone in human serum with directinjection into a column-switching chromatographic system. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1999, 726(1+2): 211.

[5] Mangani F, Luck G, Fraudeau C, *et al*. On-line column-switching high-performance liquid chromatography analysis of cardiovascular drugs in serum with automated sample clean-up and zone-cutting technique to perform chiral separation. *J Chromatogr A*, 1997, 762(1+2): 235.

[6] Coe RA, Decesare LS, Lee JW. Quantitation of efletirizine in human plasma and urine using automated solid-phase extraction and column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1999, 730(2): 239.

[7] Pascaual JA, Sanagustin J. Fully automated analytical method for codeine quantification in human plasma using on-line solid-phase extraction and column-switching high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1999, 724(2): 295.

[8] Iwata T, Hirose T, Yamaguchi M. Direct determination of estriol 3-and 16-glucuronides in pregnancy urine by high-perfrmance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1997, 695(2): 201

[9] Lee HS, Kim K, Kim JH, *et al*. On-line sample preparation of paraquat in human serum samples using high-perfrmance liquid chromatography sith column switching. *J Chromatogr B: Bilmed Sci Appl*, 1998, 716(1+2): 371

[10] Hermamsson J, Grahn A, Hermansson I. Direct injection of large volumes of plasma/serum on a new bioconpatible extraction column for the determination of atenolo, propranolo, and ibuprofen Mechanisms for the improvement of chromatographic performance [J]. *J C hromatogr A*, 1998, 797(1+2): 251.

[11] Weimann A, Gustav, Bojesen. Analysis of tetracyclines in raw urine by column-switching high-perfrmance liquid chromatography and tandam mass spectrometry . *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1999, 721(1): 47.

[12] Ochiai H, Uchiyama N, Takano T, *et al*. Determination of montelukast sodium in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1998, 713(2): 409.

[13] Nielsen SE, Dragsted LO. Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for determination of apigenin and acaaetin in human urine with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1998, 713(1): 379.

[14] James IT, Perrett D. Automated on-line solid-phase extraction and high-perpormence liquid chromatographic ananlysis of total and free pyridinium crosslinks in serum. *J Chromatogr A*, 1998, 798(1+2): 159

[15] Gundersen ThE, Lundanes E, Blomhoff R. Qauantitative high-performance liquid chromatographic determination of retinoids in human serum using on-line solid-phase extraction and coumn switching. Determination of 9-cis-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoic acid, 4-oxo-all-trans-retinoic acid. *J Chromatogr B: Biomd Sci Appl*, 1997, 691: 43.

[16] Wyss R, Buchieli F, Philipp W. Determination of the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor NR213 subunit blocker Ro63-1908 in rat, cynomolgus monkey and human plasma by high-performance liquid chromatography with column-switching and fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2000, 870(1+2): 189.

[17] Fieger BH, Schussler G. Determination of clindamycin in human plasma by HPLC using coupled columns. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1999, 724(2): 281.

[18] Zhong L, Yeh KC. Determination of indinavir in human cerebrospinal fluid and plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with column switching. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1999, 734(1): 63.

[19] Zhong L, Yeh KC. Determination of famotidine in human plasma by high-performance liquid chromatography with column-switching. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 16(6): 1051.

[20] Nielsen SE, Dragsted LO. Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for the determination of quercetin in human urine with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1998, 797(1+2): 81.

[21] Zagrobeluy J, Matuszewski BK, Kline W F, *et al*. Separation of the four stereo isomers of a potent inhibitor(L-694,458) of human leukocyte elastase and its determination in human plasma using achiral/chiral chromatography with column switching. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 17(6): 1057.

[22] Walters R, Buist SC. Improved enantio-selective method for the determination if the enantiomers of reboxetine in plasma by solid-phase extraction chiral derivatization and column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescenec detection Rodney. *J Chromatogr A*, 1998, 828(1+2): 167.

[23] Kim KH, Kim HJ, Kong J. Determination of metoprolol enantiomers in human urine by coupled achiral-chiral chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 22(2): 377.

[24] Hagknaka J, Kakai J. Automayed precolumn derivatization of amino acid with or th-phthaladehyde using a hollow-fibre membrane reactor. *J Chromatogr*, 1990, 502(2): 317.

[25] Tagawa N, Tsuruta H, Fujinami A, *et al*. Prevention of co-elution of steroid sulfaet with serum proteins from pre-column in column-switching HPLC system. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(11): 1211.

[26] Makoto T, Kinugo K. Sensitive semi-microcolumn high-performance liquid chromatographic method for the determinatioo of DU-6681, the active parent drug of a new oral carapenen antibiotic, DZ-2640 in human plasma and urine using a column-switching system as sample clean-up procedure. *J chromatogr B*, 1997, 724(1): 73.

[27] 卢佩章,张玉奎,梁鑫淼,等.高效液相色谱法及其专家系统.沈阳:辽宁科学技术出版社.1990:150.

探索中药生物效应鉴定法新路，实现中药质量研究规范化

王秀坤，李家实（北京中医药大学中药鉴定室，北京 100029）

摘要 **目的** 探索中药生物效应鉴定法新路，实现中药质量研究标准化、规范化。**方法** 在中医药理论指导下，以中药的归经、功能主治为线索，采用高效液相、液-质联用、气-质联用等现代分离分析手段和放射性配体-受体结合分析法研究中药活性成分对机体生物分子（受体）的作用。**结果与结论** 方法的表征体现为有效成分含量或有效成分半数有效浓度 EC_{50}值、半效抑制浓度 IC_{50}值、表观解离常数 Ki 值。意在搞清中药的组成成分，结构性质、体内活性、药效，从微观分子层次上阐明中药作用的机制和物质基础，使中药鉴定学科直接服务于临床、服务于现代中药新药的研制与开发。方法集先进性、科学性、标准化、规范化融为一体。

关键词：中药生物效应鉴定；受体理论和实验技术；中药质量和疗效评价

实现中药研究现代化，首先要吸收现代先进的科学技术和方法，提高自身科技含量，其次要恰当地采纳国际统一的评价标准，才有可能使中药走向世界。中药有着几千年的应用历史，疗效较可

靠是其优势，古典中医药著作中所载的中药主治和疗效，都是在人体宏观上所表现出来的效应，这些整体效应的分子基础就是中药活性成分对机体生物分子（受体、递质、酶等）的作用[1]。中药鉴定学发展到今天，应赋予新的学科内涵以适应现代中医药学发展的需要，应该为确保中药的质量和药效提供科学的、规范的监测方法和手段。在中医药理论指导下，以中药的归经、功能主治为线索，通过高效液相、液-质联用、气-质联用等现代分离分析手段和放射性配体-受体结合分析法研究中药活性成分对机体生物分子的作用，在此基础上建立国际承认的中药质量评价、控制方法，方法的表征体现为有效成分含量或有效成分半数有效浓度 EC_{50}值、半效抑制浓度 IC_{50}值、表观解离常数 Ki 值，可走出一条中药生物效应鉴定法新路。中药生物效应鉴定法的任务是搞清中药的组成成分，结构性质、体内活性、药效，从微观分子层次上阐明中药作用的机制和物质基础，使中药鉴定学科直接服务于临床、服务于现代中药新药的研制与开发。

20 世纪 60 年代，两项重要研究进展为受体研究带来了生机。一是在合成放射性同位素标记的激素之后，建立了放射免疫分析法，并在此基础上发展成放射性配体结合分析法（radioligand bingding assay, RLBA），为受体研究提供了新手段。二是 sutherland 在研究肾上腺素升高血糖作用机制时，发现环腺苷酸（cAMP）在激素与诱发的效应间充当信使，提出了第二信使学说，为研究配体-受体相互作用的信号转导机制开辟了新的途径。目前放射性配体-受体结合技术普遍用于受体研究，意义有两点：①恰当地使用标记或非标记高效特异性配体，巧妙地利用受体-配体相互作用的某些特点，能够更确切地检定受体及其亚型。可以对组织中受体及其亚型的分布及性质作细致分析，以便指导临床用药。②受体现已被证实为是许多特异性药物的关键作用机制。受体结合药理模型因其高度灵敏、专一、快速、微量经济等特点，可用于中药毒性成分、有效成分的检测、作用机制探讨、构效关系研究、有效成分的边缘效应预测，有利于建立标准化、规范化的中药质控方法，有利于开发、研制高效、特异性临床新药。

1 中药生物效应鉴定法的理论基础[2~4]

受体研究是一个正在迅速发展的领域，是当今生命科学中最活跃的领域之一。这无疑与方法学的进展密切相关，除了药理学技术和放射性配基结合法外，现代生物学研究的一些新技术，如亲和层析、等电聚焦电泳、重组 DNA、位点导向突变、单克隆抗体、Patch-clamp 技术等已被广泛应用于受体研究，受体现已被证实为是许多特异性药物的关键作用机制。受体结合药理模型因其高度灵敏、专一、快速、微量经济等特点，在中草药活性成分和毒性成分检测、有效成分作用机制探讨、体内活性强弱判断、构效关系研究、边缘效应预测及新药研制开发等方面已得到有效的应用。有理由相信，受体学理论和实验方法将加速中药鉴定现代化的实现，可为中药鉴定学科直接服务于临床、服务于现代中药新药的研制与开发，提供强有力的技术支撑。

1.1 受体的概念与性质

受体是细胞在进化过程中形成的细胞蛋白组分，能识别周围环境中某种微量化学物质，首先与之结合，并通过中介的信息转导与放大系统，触发随后的生理反应或药理效应。具有 3 个相关联的功能：①识别和结合，对相应配体（能与受体特异性结合的物质，ligand）有极高的识别能力和高度亲和力（多数配体在 1 pmol～1 nmol·L^{-1}浓度时即引起药理反应），要求结构互补。②转导信号，受体对配体的反应之所以如此灵敏，主要靠后续的信号转导系统的放大、分化、整合，如细胞内第二信使（定义为激动剂与细胞膜表面受体相互作用所产生的化学信号，它能作用于一种或几种细胞内组分，始动相应的细胞反应。细胞内受体是通过调节基因的转录产生生物效应）。③产生相应的生物效应。

受体的命名常根据能与之选择性相结合的递质（当神经冲动到达神经末梢时，在突触部位从神

经末梢释放出的化学传递物）或药物而定。

从受体与配体结合角度看，受体应具备以下特征：①立体选择性 要求结构互补。②饱和性 某一特定受体在某一特定细胞的数目应有一定的浓度，当浓度递增的配体与之相互作用时，应能观察到在达某一浓度时，结合达到平衡，表现出配体结合的饱和性。③可逆性 受体与配体间作用，以氢键、离子键、范得华力等非共价键维系，一般是可逆的。已被结合的配体可被高亲和力或高浓度的其它配体所置换。④高亲和力：亲和力越高，专一性越强，有人建议结合配体的解离常数 K_D 应在 $10^{-9}\sim10^{-12}$ mol·L^{-1} 范围。受体分子在细胞中含量很低，1mg 组织一般只含 10fmol 左右，受体都有其内源性配体。

1.2 受体的分类

根据受体的结构、信号转导过程、效应性质、受体位置等特点，大致分以下 4 类（有人依据受体位置建议分为 2 类：即膜受体和细胞内受体）。①含离子通道受体：又称配体闸门离子通道受体。存在于快速反应的细胞膜上，由单一肽链反复 4 次穿透细胞膜形成 1 个亚基，并由 4～5 个亚基组成穿透细胞膜的离子通道，受体被激动时，离子通道开放，使细胞膜去极化或超极化，引起兴奋或抑制效应。如烟碱型乙酰胆碱受体，氨基酸类受体。②G 蛋白偶联受体：这类受体最多，数十种神经递质及激素的受体需要 G 蛋白（鸟苷酸结合调节蛋白的简称）介导其细胞作用。作用机制上，均需要通过第二甚至第三信使，才能始动级联反应，产生最终生物效应。结构上都为单一肽链形成 7 个 α-螺旋来回穿透细胞膜，胞内有 G 蛋白结合区。如阿片类、肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺、M-型乙酰胆碱、嘌呤类、前列腺素类及一些多肽激素等的受体。③具有氨酸激酶活性的受体：这一类膜受体由 3 个部分组成，细胞外有与配体结合区，中段穿透细胞膜，细胞内区段有氨酸激酶活性，配体与受体结合后，该酶受到激活。其功能是加速蛋白合成，产生细胞生长分化等效应。如胰岛素、胰岛素样生长因子、上皮生长因子、血小板生长因子及某些淋巴因子受体。④细胞内受体：甲状腺素、甾体激素类受体属于这一类。

1.3 配体的内在活性 (intrinsic activity)

能与受体特异结合的物质，称配体或配基。①激动剂 (agonist) 能激活受体的配体。②拮抗剂 (antagonist) 能阻断受体活性的配体。

配体与受体结合产生效应不仅要有亲和力，还要有内在活性（α 表示）。2 个配体亲和力相等时，其效应强度取决于内在活性强弱。完全激动剂内在活性等于 1，完全拮抗剂内在活性等于 0，部分激动剂内在活性大于 0，小于 1。

1.4 受体作用的基本理论

受体作用的基本理论包括受体与配体及受体与效应器 2 个互相联系而又有区别的方面。首先要回答的问题是受体与配体（有效成分）通过怎样的方式相互作用，分子机制是怎样的。

1.4.1 受体与配体的相互作用 占领理论 (Clarck, A J 20 世纪 30 年代提出)，理论要点是：(A)受体与配体间相互作用是可逆的，过程是简单的双分子过程；解离是单分子过程。(B) 受体是独立的，1 个受体被占领不影响其他受体亲和力。(C)生物效应与被占领受体的量成正比，结合与效应间呈线形关系，当全部受体被占领，就会产生最大生物效应。(D) 配体只以游离的和与受体结合的 2 种状态存在，配体不被代谢，也不与其他受体相结合，与受体结合的配体只占总配体的极少部分，当反应达平衡时，游离配体浓度近似于总配体浓度。根据 Clarck 理论，受体与配体的相互作用，遵守质量作用定律。

R + L = RL→E(E 代表效应)，RL 为受体-配体复合体，依据质量作用定律，达平衡时，有 $K_D=$

$\frac{[R][L]}{[RL]}$(K_D平衡解离常数)$[R]$、$[L]$和$[RL]$分别代表游离受体、游离配体和结合配体的浓度。因为受体总浓度 $R_T=[R]+[RL]$,代入上式并经推导得$\frac{[RL]}{[R_T]}=\frac{[L]}{K_D+[L]}$,此为受体动力学基本公式。

由于只有 RL才发挥效应,故效应的相对强弱与 RL相对结合量成比例,即$\frac{E}{E_{max}}=\frac{[RL]}{[R_T]}=\frac{[L]}{K_D+[L]}$,按此公式,以 E 为纵坐标,log[L]为横坐标作图,则得典型的 S 形量效曲线,当[L]=0,效应为 0;当[L]= K_D 时,[RL]/[R_T]=50%,即 EC_{50}值 当[L]≫K_D时,[RL]/[R_T]=100%,达最大效能。

将上述动力学基本公式加以推导改变,可将 S形量效曲线改变为直线关系,使计算更为方便而准确。经推导可得公式$\frac{[LR]}{[L]}=\frac{[R_T]-[LR]}{K_D}$,以 [LR]/[L]为纵坐标,[LR]为横坐标作图,斜率为 $-1/K_D$,与横坐标交点为[R_T]。此图是目前受体研究中最为常用的 Scatchard图。当待测样品(中药有效成分)与标记配体(对照品)同时做饱和实验时,从此图中可得到关于有效成分的 4 种信息:①曲线在横坐标上的截距为最大结合量 B_{max},可求得受体最大结合量。②曲线斜率为 $-1/K_D$,可计算出有效成分的平衡解离常数。③曲线形状可反映与有效成分结合的受体是单一亲和力受体(图为直线)还是两种以上亲和力受体(图为曲线)。④B_{max}值不变为与对照品竞争性抑制,变化为非竞争性抑制。这对了解中药有效成分的药动学性质和特征,阐明其作用机制极有价值。

两态(two-state)或变构(allosteric)理论(Monod 等 1965～1966 年提出)理论要点是 受体在正常情况下具有 2 种处于平衡的构象,活化态[R]和非活化态[T],二者均有结合配体的立体选择性部位。当特定配体与它们相结合后,会改变 2 种状态间的平衡,增加对配体呈高亲和力状态的浓度,同时改变了对其它分子的亲和力。该理论可被用来解释有效成分的体内活性,解释受体与配体间的相互作用,尤其在配体作用下离子通道开放与关闭的机制。为什么化学结构类似的药物作用于同一受体,有的是激动剂,有的是拮抗剂,还有的是部分激动剂?这些学说容易理解,但需要进一步实验证实)。没有刺激时,组织或细胞中受体 R＝T 处于动态平衡,平衡常数 (变构常数)A＝[R]/[T]。[R],[T]分别代表两状态浓度,在激动剂或拮抗剂作用下,平衡发生变化,移动方向取决于配体的亲和力。引人参数:$M=K_{RL}/K_{TL}$,K_{RI} 和 K_{TL}分别代表配体对 R 和 T 两态的解离常数,反应配体对 R或 T两态的选择性(解离常数越大,亲和力越小)。激动剂:只对 R态受体有较大亲和力,结合后充分发挥药理作用。部分激动剂 对 R 和 T 两态都有亲和力,但对R 的亲和力大于对 T 的亲和力,所以只有部分受体被激活而发挥较小的药理作用。拮抗剂:对 R 和 T 两态亲和力相等,且能牢固结合,保持静息时两种受体状态的平衡。拮抗剂不能激活受体,但能阻断激动剂作用。竞争拮抗剂:与激动剂互相竞争受体结合部位,结合是可逆的,提高剂量比,能克服拮抗作用。非竞争拮抗剂:①与受体牢固结合,分解很慢或是不可逆转,使能与配体结合的受体数量减少。②可阻断受体与效应器间某一中介反应环节,使受体效应功能容量减少。反激动剂(超拮抗剂):个别药物对 T亲和力大于对 R 的亲和力,结合后引起与激动剂相反的效应。

1.4.2 受体-效应器的相互作用 受体与激动剂结合后所产生的信号,是如何传递到效应器的,又是如何引起生物效应的,根据受体在细胞中的定位,可分为膜表面受体和细胞内受体两大类。其中除类固醇激素和甲状腺激素等的受体存在于胞质和核中,并通过调节基因的转录而产生生物效应(基因调节学说)外,绝大多数膜表面受体是通过细胞内产生另一个信使分子起作用的(第二信使学说)。

第二信使学说(Sutherland 在研究肾上腺素和胰高血糖素的作用机制时提出的）的要点是：①激素（配体）作为第一信使，可以被靶细胞膜上具有立体结构选择性的受体识别并结合。②所形成的受体-配体复合物能激活定位于细胞膜中的腺苷酸环化酶(AC)。③已被激活的 AC，在 Mg^{2+} 存在下，能催化由 ATP 生成 cAMP 的反应，以增加细胞内 cAMP 的浓度。④以 cAMP 为第二信使（简单地说，第二信使是激动剂与细胞膜表面受体相互作用所产生的化学信号，它能作用于一种或几种胞内组分，始动相应的细胞反应)。通过激活依赖于 cAMP 的蛋白激酶(cAMPdPK)，或称蛋白激酶 A(protein kinase A)，始动级联反应，产生最终的生物效应。最早发现的第二信使是 cAMP，现知道有许多物质(如 cAMP、cGMP、Ca^{2+}、IP_3 等）参与细胞内信号传导，是一个非常复杂的系统，也有许多问题尚待阐明。

中药活性成分可理解为是第一信使，而第二信使学说对阐明活性成分的作用机制，有极好的应用价值。现已得到有效的应用。

2 实验技术[2~4]

2.1 受体结合饱和实验技术

2.1.1 基本原理 将用放射性同位素(^3H 和 ^{125}I)标记的配基（受体激动剂或拮抗剂）与含有受体的组织、细胞、细胞制剂(膜蛋白或胞液)或纯化的受体蛋白，在适宜的条件下一起孵育，使受体与配体充分结合，形成复合体。设法除去未被结合的游离标记物，测其放射性，即可供计算或作图用。根据受体动力学基本公式，经推导得 $\frac{B}{F} = -\frac{B}{K_D} + \frac{B_{max}}{K_D}$，此公式即为结合饱和实验中常用的 Scatchard 公式。B 为已结合配体浓度，F 为游离配体浓度。由此公式可求得平衡解离常数 K_D 和最大结合量 B_{max}。

2.1.2 结合饱和实验的主要步骤 ①将浓度递增的放射性配基与浓度固定的细胞或组织制剂共同反应。②将已结合的配体与游离者分开（膜表面受体多用抽滤法）。③选择合适的测量系统，进行放射性测量。④计算和作图。

2.1.3 受体蛋白的含量测定 Lowry 法(J Biol Chem, 1951; 193: 265~273）或双缩脲法等比色法测定。

2.1.4 Scatchard 图 以 B(为已结合配体浓度)为横坐标，B/F(为游离配体浓度)为纵坐标作图即得 Scatchard 图。具体计算方法是：

B=特异性结合值／蛋白含量 = {[DPM × 1/2.2 × 1 000 × 比放射性 × 0.5(1) nmol] × 1 000 pmol}/mg = pmol/g protein

F = DPM × 1/2.2 × 1000 × 比放射性 × 0.5(1) nmol

通过 Scatchard 图可知：①曲线在横坐标上的截距为最大结合量 B_{max}。②曲线斜率为 $-1/K_D$。③曲线形状可反映是单一亲和力受体(直线)还是 2 种以上亲和力受体。④当待测样品与标记配体同时做饱和实验时，B_{max} 值不变为竞争性抑制，变化为非竞争性抑制。

2.2 受体结合竞争实验技术

2.2.1 基本原理 结合竞争实验是以不同浓度的结构不同的非标记配体(中药有效成分)，与含量定量受体蛋白和标记配体(有效对照品)的体系共同反应，以观察它们对标记配体(对照品)结合的抑制作用——即判断待测样品的有效性，抑制作用的强弱可用 IC_{50} 值（即有效成分使对照品与受体最大结合量下降一半时所需有效成分的浓度）来衡量。再结合饱和实验技术求得的 K_D 值，便可进一步计算出有效成分与受体相互作用的表观平衡解离常数。

$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [L]/K_D}$，$K_i$ 为非标记配体与受体相互作用的平衡解离常数，IC_{50} 为使标记配体与受体

需要全本请访问 www.ertongbook.com