

# 沙丁胺醇与红细胞膜表面 $\beta_2$ 肾上腺素受体结合量的高效液相色谱法测定

蒋心惠, 杨俊卿, 周岐新

(重庆医科大学 药学院, 重庆 400016)

**摘要:** 建立了同时检测红细胞混悬液中沙丁胺醇 (SA) 与普萘洛尔 (PR) 含量的高效液相色谱法, 并用于红细胞膜  $\beta_2$  受体-配体结合实验研究。药物与红细胞悬液保温反应 1 h 后, 以 1 500 r/min 离心 5 min, 将试样中游离 SA 和 PR 与含大分子的受体-药物复合物的红细胞分离, 以 Hypersil C<sub>18</sub> 柱为分析柱, 10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (含 0.2% 三乙胺, pH 5.1) - 甲醇 (体积比 17:83) 为流动相; 于激发波长 284 nm, 发射波长 323 nm 处检测。SA 在 4.0~48.0  $\mu\text{g/L}$  范围内线性关系良好, 相关系数为 0.998 9, PR 在 2.0~12.0 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.999 8, SA 与 PR 的 RSD 分别为 0.85%、0.79%; 检出限分别为 0.18 0.30  $\mu\text{g/L}$ 。测定结果表明, SA 的非特异结合和特异结合量均随着 SA 加入量的增加而增大。该方法可以用于药物和受体相互作用的研究。

**关键词:** 沙丁胺醇; 普萘洛尔; 红细胞膜;  $\beta_2$ -肾上腺素受体; 高效液相色谱

中图分类号: O657.72 TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)08-0837-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.08.016

## Determination of Salbutamol Binding Capacity with $\beta_2$ -Adrenergic Receptor in Avian Erythrocyte Membrane by HPLC

JANG Xin-hui YANG Jun-qing ZHOU Qi-xin

(Pharmacy School Chongqing Medical University Chongqing 400016 China)

**Abstract** An effective high performance liquid chromatographic method was developed for the simultaneous determination of salbutamol (SA) and propranolol (PR) in erythrocyte suspensions in order to investigate SA binding to  $\beta_2$  receptor. Free SA and PR were separated from erythrocyte through 5 minutes centrifugation with a speed of 1 500 r/min after SA and PR reacting with membrane receptor existing on the surface of erythrocytes for 1 hour. The analysis of SA and PR was performed on a hypersil C<sub>18</sub> column with 10 mmol/L potassium dihydrogen phosphate solution containing 0.2% triethylamine (pH 5.1) - methanol (17:83 by volume) as mobile phase. The fluorescence detector was selected with 284 nm as excitation wavelength and 323 nm as emission wavelength. The calibration curves were linear in the range of 4.0-48.0  $\mu\text{g/L}$  for SA with a correlation coefficient of 0.998 9 and 2.0-12.0 mg/L for PR with a correlation coefficient of 0.999 8. The relative standard deviations of SA and PR were 0.85% and 0.79%, respectively, and the limits of detection (LODs) were 0.18  $\mu\text{g/L}$  and 0.30  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The results indicated that the non-specific binding and specific binding capacities of salbutamol to  $\beta_2$  receptor increased with the increase of SA concentration. The method was suitable for the investigation of the interaction between drugs and receptors.

**Key words** salbutamol (SA); propranolol (PR); erythrocyte membranes;  $\beta_2$ -adrenergic receptor; high performance liquid chromatography

受体是存在于细胞膜、细胞浆或细胞核上的大分子化合物 (如蛋白质、核酸、脂质等), 能与特异性配体 (如药物、递质、激素、内源性活性物质等) 结合并产生药理学效应。与受体结合的特异性物质

收稿日期: 2010-02-04 修回日期: 2010-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572353)

第一作者: 蒋心惠 (1971-), 女, 重庆丰都人, 副教授, 博士研究生

通讯作者: 周岐新, Tel: 023-68485070, E-mail: cqzhouqx@yahoo.com.cn

称为配体或配基,受体上能与配体相结合的活性基团称为受点或位点。配体与受体结合是药物发挥临床疗效的基本条件。药物与受体的亲和力一般可用受体-配体反应的平衡解离常数( $K_D$ )表示, $K_D$ 越小,亲和力越大,临床所用剂量越小。肾上腺素受体属于膜受体,存在于细胞膜上,红细胞膜表面存在含量丰富的肾上腺素能 $\beta_2$ 受体<sup>[1]</sup>。硫酸沙丁胺醇是特异性的肾上腺素能 $\beta_2$ 受体激动剂,盐酸普萘洛尔为非选择性肾上腺素能 $\beta_2$ 受体的阻断剂,与 $\beta_2$ 受体的亲和力较沙丁胺醇(SA)更高。硫酸沙丁胺醇和盐酸普萘洛尔的结构如图1所示。

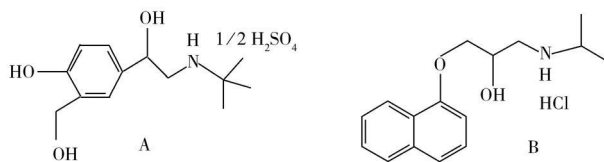


图 1 硫酸沙丁胺醇(A)与盐酸普萘洛尔(B)的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of salbutamol sulfate(A) and propranolol hydrochloride(B)

受体和配体结合实验的研究方法是基于 Clark 提出的受体占领学说而设计的离体制备量-效曲线法<sup>[2-3]</sup>和放射性配体结合实验法<sup>[4-5]</sup>。采用分子生物学技术和光谱分析与分子结构分析等技术建立的转激活实验和计算机软件模拟是近年采用较多的研究受体-配体相互作用的方法<sup>[6-8]</sup>。上述方法虽各有优点,但在实际应用中存在诸多缺陷:或污染环境和有害健康,或生物误差大和过高估计药物对受体的亲和力,或成本、技术条件要求高,或理论数据与药物和受体的实际结合情况差别较大,不能充分反映药物发挥临床疗效的分子生物学基础。因此建立考察受体和配体之间相互作用的新技术和新方法具有重要意义。

为此,本文以易于分离的鸡红细胞膜 $\beta_2$ 受体和具有专一激动该受体的 SA 为工具药,尝试了兼具分离与分析功能的高效液相色谱法进行受体和配体结合实验结果的检测。通过考察普萘洛尔(PR)存在的情况下药物-受体反应达到平衡时游离药物 SA 的含量,获得 SA 与 $\beta_2$ 受体的特异结合量;再将无 PR 存在时测得的游离 SA 量减去特异结合量即得 SA 的非特异结合量。计算公式为 $B_s = C_1 - C_2$ ,  $B_{ns} = C_2 - B_0$ 。其中, $C_1$ 为有 PR 时游离 SA 的含量, $C_2$ 为无 PR 时游离 SA 的含量, $B_s$ 为 SA 的特异结合量, $B_{ns}$ 为 SA 的非特异结合量。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

硫酸沙丁胺醇和盐酸普萘洛尔标准品(中国药品生物制品检定所),分别以超纯水配成 1.0 g/L 的储备液,临用时根据需要以生理盐水逐级稀释为标准工作液。甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配备有四元梯度泵、自动进样器、荧光检测器和紫外检测器;Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(大连伊利特分析仪器有限公司);pHS-3C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);AL204 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 $10^{-4}$  g);WHY-2 型恒温振荡器(江苏金坛市环宇科学仪器厂);WKY III-250 微量可调移液器(上海求精生化试剂仪器有限公司);MilliQ 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

### 1.2 样品的制备

取用生理盐水混悬的红细胞 0.2 mL(含红细胞 $1.2 \times 10^{10}$  个)置于 2 mL 的 EP 管中,分别准确加入 100 mg/L 的 PR 标准工作液 100  $\mu$ L 与系列浓度的 SA 标准工作液 100  $\mu$ L,或者单独加入系列浓度的 SA 标准工作液。所有 EP 管内补加生理盐水至总体积为 0.5 mL。旋混均匀,将此混悬液置于 37  $^{\circ}$ C 水浴振荡保温反应 1 h 取出,1 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液 0.2 mL,于此上清液中加入等体积的甲醇,混悬均匀,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液待测。

### 1.3 色谱条件

Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 10  $\mu$ m);流动相为 10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(其中含 0.2% 三乙胺,磷酸调 pH 5.1)-甲醇(体积比 17:83),流速为 1.0 mL/min,检测器为荧光检测器,检测波长为激发波长 284 nm,发射波长 323 nm,柱温 30  $^{\circ}$ C;进样量 5  $\mu$ L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相的选择

由于普萘洛尔和沙丁胺醇均含有胺基, 显弱碱性, 目前报道的此类药物的色谱分离方法以离子对色谱法为主<sup>[9-16]</sup>。由于离子对试剂价格较贵, 且对色谱柱的损伤较大。通过反复试验, 考察了不加入三乙胺, 而改变磷酸盐缓冲液 pH 值时样品的分离情况。实验结果表明, 随着 pH 值增大, 色谱峰稍有所改善, 但色谱峰峰形不对称, 加入少量的扫尾剂三乙胺后, 峰形得到明显改善。

### 2.2 检测器的选择

在紫外波长 276 nm 处检测。样品测定时, 空白红细胞样品在 SA 色谱峰附近有一干扰峰, 调节流动相的比例无法将其与 SA 基线分离。若使其与 SA 达基线分离, 且 PR 不被洗脱, 则 SA 的保留时间太长, 采样时间在 30 min 以上, 效率较低。改用荧光检测器后, 检测的灵敏度提高了 100 倍 (定量下限低至 1.0  $\mu\text{g/L}$ ); 同时空白红细胞样品中的杂质峰无荧光吸收, 不干扰 SA 的检测; 整个采样时间只需 12 min, 色谱分离谱图见图 2。

### 2.3 离心速率的选择

受体与配体 (药物) 的结合属于可逆反应, 离心速率过高 (大于 3 000 r/min) 会使已经结合形成的受体-配体复合物中的药物再次解离, 同时使红细胞破裂。而离心速率太慢 (小于 1 000 r/min) 时, 上清液与受体-配体复合物之间无法完全分离, 导致测定结果不准确。因此, 本文选择的最佳速率为 1 500 r/min。

### 2.4 净化条件的选择

药物与细胞膜受体结合形成的复合物为生物大分子物质, 易溶于水, 在甲醇等有机溶剂中易变性沉淀。本文采用的反相高效液相色谱法的流动相中使用甲醇, 若未将水溶性的大分子物质分离除去, 当样品注入色谱柱后, 大分子的物质会被甲醇沉淀而堵塞色谱柱, 导致柱压升高而无法进行正常的色谱分离操作; 因此, 净化条件的优劣对测定结果有较大影响。通过反复预试验, 得到样品的最佳净化条件为: 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴恒温振荡反应 1 h 后, 1 500 r/min 离心的上清液与甲醇等体积混合, 13 000 r/min 高速离心 10 min 后取上清液进样测定, 色谱分离效果好, 柱压稳定。

### 2.5 加热反应时间对配体受体结合的影响

为测定药物与其特异受体的结合特性, 采用正常人体温 37  $^{\circ}\text{C}$  为反应温度, 其达到平衡所需要的时间通过药物与受体的结合程度 (即含有红细胞的生理盐水中游离药物的浓度变化) 来体现。实验结果表明, 加热时间为 15、30、60、90 min 时, 游离药物 (即 SA) 的峰面积分别为 45 549、42 387、40 776、40 653。可见, SA 与红细胞膜受体的结合反应随着水浴加热时间的延长而增加, 但加热到 60 min 后反应达平衡, 再延长加热时间, 结合率无明显增加, 所以本实验选用加热 60 min 作为沙丁胺醇与红细胞膜受体的

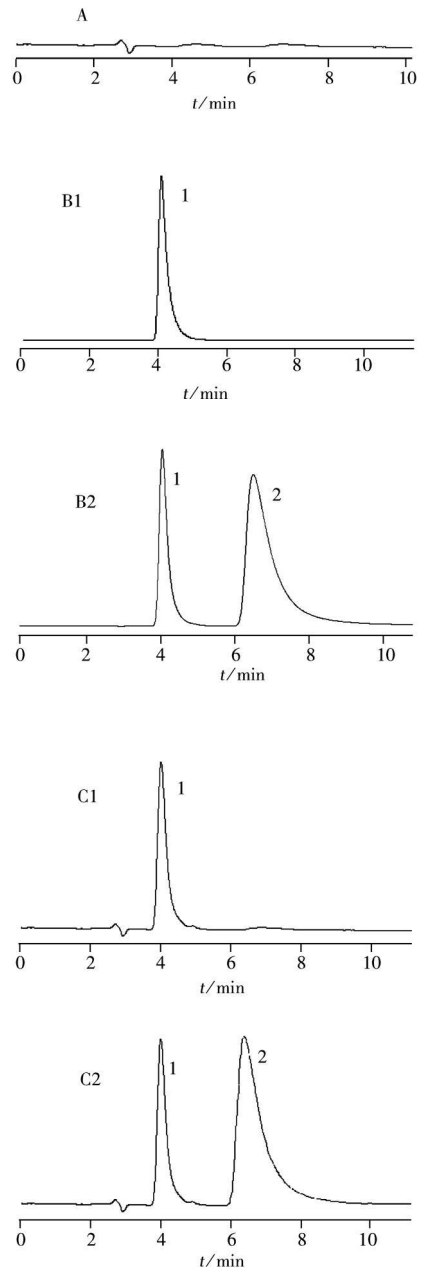


图 2 空白红细胞样品、对照品及加标红细胞样品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of blank erythrocyte, standards and spiked blank erythrocyte. A. blank erythrocyte; B1 SA standard; B2 SA and PR standard; C1 SA after added in blank erythrocyte; C2 SA and PR after added in blank erythrocyte. 1 SA, 2 PR

反应平衡时间。

### 2.6 方法的线性范围、检出限与重复性

于生理盐水中分别加入不同浓度的 SA 和 PR 标准工作液, 制得样品中 SA 浓度为 4.0 8.0 16.0 20.0 24.0 48.0 μg/L 的系列溶液和 PR 质量浓度为 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0 12.0 mg/L 的系列溶液, 分别进样测定, 以峰面积 (y) 对质量浓度 (x) 进行线性回归, 得到 SA 与 PR 的线性范围分别为 4.0~48.0 μg/L, 2.0~12.0 mg/L; 线性方程分别为  $y = 14.03x - 227.4$   $r = 0.9989$   $y = 828.4x + 440.7$   $r = 0.9998$  以  $S/N = 3$  测定检出限 (LOD), SA 与 PR 的检出限分别为 0.18 0.30 μg/L。另分别于生理盐水中加入 SA 或 PR, 使终质量浓度分别为 16.0 μg/L 和 6.0 mg/L, 各平行处理 6 份, 进样测定, 计算峰面积的 RSD 分别为 0.85% 和 0.79%。

### 2.7 沙丁胺醇与细胞膜受体的特异性结合

取系列浓度的 SA 溶液各 100 μL, 分别加入到 0.2 mL 用生理盐水混悬的红细胞 (含红细胞  $1.2 \times 10^{10}$  个) EP 管中, 各浓度的样品平行处理 6 份, 其中 3 份同时加入 100 μL 100 mg/L 的 PR, 所有反应管均补加生理盐水到反应液总体积为 0.5 mL, 旋混 30 s 后, 将反应液置于 37 °C 水浴振荡恒温反应 1 h 取出, 1 500 r/min 离心 5 min, 吸取上清液 0.2 mL, 于此上清液中加入 0.2 mL 甲醇, 混悬均匀, 静置 10 min 后 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 μL 进样测定。样品测定结果见表 1。从表 1 可知, SA 的非特异性结合与特异性结合均随着加入量的增加而增大。

### 3 结 论

本文以 Clark 配体与受体竞争性结合理论为指导, 采用高效液相色谱荧光法检测了沙丁胺醇与红细胞膜 β<sub>2</sub> 受体的结合情况。针对沙丁胺醇和普萘洛尔存在于红细胞膜悬液的特殊环境, 对色谱分离条件、样品净化条件、膜用量进行优化, 测定了红细胞样品中游离沙丁胺醇与普萘洛尔的含量。结果表明, 沙丁胺醇的非特异和特异结合量均随着沙丁胺醇加入量的增加而增大。由此可见, 高效液相色谱法配合合适的分离条件可以用于药物和受体相互作用的研究。

表 1 SA 与红细胞膜特异与非特异结合测定结果

Table 1 Analytical results of salbutamol(SA) binding with erythrocyte membranes receptor

| Added SA /μg | Found     |           | $B_s$ /μg | $B_{ns}$ /μg |
|--------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
|              | $C_1$ /μg | $C_2$ /μg |           |              |
| 1.2          | 0.976     | 0.926     | 0.050     | 0.876        |
| 1.8          | 1.432     | 1.379     | 0.053     | 1.326        |
| 3.0          | 2.433     | 2.195     | 0.238     | 1.957        |
| 6.0          | 5.207     | 4.675     | 0.532     | 4.143        |
| 12.0         | 10.506    | 9.299     | 1.207     | 8.092        |

$C_1$ : free of SA with PR existed,  $C_2$ : free of SA without PR existed  $B_s$ : specific binding  $B_{ns}$ : non-specific binding

#### 参考文献:

[1] VAUQUELN G, BOTTARIS SFROSBERG A D. Inactivation of beta adrenergic receptors by N-ethylmaleimide: permissive role of beta adrenergic agents in relation to adenylyl cyclase activation [J]. Mol Pharmcol, 1980, 17(2): 163-171.

[2] YUM KO K, FEANYI JA. β-Adrenergic receptors in rabbit liver plasma membranes: Predominance of beta 2 receptors and mediation of adrenergic regulation of hepatic glycogenolysis [J]. J Biol Chem, 1983, 258(7): 4364-4371.

[3] ARIENSE J, VAN ROSSUM JM. pD<sub>50</sub>, pA<sub>50</sub> and pD<sub>x</sub> values in the analysis of pharmacodynamics [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1957, 110(2/3): 275-299.

[4] WAUD D R. On the measurement of the affinity of partial agonists for receptors [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1969, 170(1): 117-122.

[5] YAMAMURA H, IENNA S J, KUCHAR M J, EDITORS. In neurotransmitter receptor binding [M]. New York: Raven press, 1978, 57-90.

[6] JONG L A, UGES D R, FRANKE J P, BISCHOFFER. Receptor ligand binding assays: technologies and applications [J]. J Chromatogr B, 2005, 829(1/2): 1-25.

[7] BECK V, REIFER E, JUNGBAUER A. Androgen receptor transactivation assay using green fluorescent protein as a reporter [J]. Anal Biochem, 2008, 373(2): 263-271.

[8] 王公轲, 闫长领, 卢秀敏, 陈得军, 卢雁. 盐酸环丙沙星与胰蛋白酶相互作用的光谱和分子模拟研究 [J]. 化学学报, 2009, 67(17): 1967-1972.

(下转第 845 页)

- [ 6 ] 陈晋明, 王世平, 陈敏. 反相高效液相色谱法检测虾青素 [ J ]. 化学分析计量学, 2006, 15(2): 27- 29.
- [ 7 ] 应国清, 王晓艳, 沈寅初. 高效液相色谱法分析检测虾青素 [ J ]. 食品与发酵工业, 2001, 27(11): 43- 44.
- [ 8 ] 张华, 杨鑫, 马莹, 董爱英, 张春英. 固相萃取 - 反相高效液相色谱法同时测定饲料中的角黄素和虾青素 [ J ]. 色谱, 2008, 26(3): 392- 394.
- [ 9 ] 陈晓飞, 严小军. 红球藻虾青素含量测定方法的探讨 [ J ]. 宁波大学学报: 理工版, 2007, 20(4): 441- 445.
- [ 10 ] 陈勇, 李德发, 陆文清, 朴香淑, 杨文军, 惠柏棣, 韩雅珊. 测定雨生红球藻中虾青素及其它色素含量的高效液相色谱法 [ J ]. 分析测试学报, 2003, 22(4): 29- 32.
- [ 11 ] YUAN J P, CHEN F. Purification of *trans*-astaxanthin from a high-yield astaxanthin ester producing strain of the microalgae *Haematococcus pluvialis* [ J ]. Food Chem, 2000, 68(4): 443- 448.
- [ 12 ] U. S Food and Drug Administration. Analysis of total astaxanthin in algae meal prepared from *Haematococcus pluvialis* Aquasearch [ R ]. 1999, 150- 155.
- [ 13 ] PAT B, ROBERT D, STEVEN A, DAVID T J. The cleavage of camtenoid esters by cholesterol esterase [ J ]. Comp Biochem Physiol B, 1982, 72(1): 157- 160.
- [ 14 ] FU JI Chemical Industry CO., LTD, Japan. Spectrophotometric and HPLC analysis method for determination astaxanthin content in AstaREAL-P2AF\* [ S ]. 1918, 1- 18.
- [ 15 ] 余孔捷, 钱疆, 杨方, 黄杰, 李耀平, 李捷, 蔡春平. 高效液相色谱法测定动物源性食品中角黄素、虾青素的研究 [ J ]. 食品与发酵工业, 2008, 30(4): 145- 148.
- [ 16 ] 王灵昭, 邓家权. 微波法提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究 [ J ]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 96- 100.
- [ 17 ] 周湘池, 刘必谦, 曾庆国, 蒋霞敏. 雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 破壁方法对虾青素提取率的影响 [ J ]. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 424- 429.

(上接第 840 页)

- [ 9 ] 李嘉宾, 夏霖, 陈亚东.  $\alpha$ 1A-亚型肾上腺素受体拮抗剂 3D 药效团模型的研究 [ J ]. 化学学报, 2007, 65(16): 1621- 1630.
- [ 10 ] 颜鸣, 郭涛, 周俭平, 隋因. 硫酸沙丁胺醇脉冲片含量及有关物质的高效液相色谱法 [ J ]. 解放军药学学报, 2009, 25(1): 73- 76.
- [ 11 ] 秦永平, 邹远高, 梁茂植, 余勤. 柱切换 - 荧光检测反相高效液相色谱法测定血浆中特布他林浓度 [ J ]. 分析化学, 2004, 32(9): 1216- 1218.
- [ 12 ] 蒋心惠, 周岐新. 高效液相色谱法测定硫酸特布他林与红细胞膜表面  $\beta_2$ -肾上腺素受体结合量 [ J ]. 分析化学, 2010, 38(3): 377- 380.
- [ 13 ] 邵建强, 矢崎广久. 反相离子对 HPLC 法测定硫酸沙丁胺醇片含量的研究 [ J ]. 天津药学, 1995, 7(3): 54- 56.
- [ 14 ] 戴华, 袁智能, 黄志强, 陈新焕. 饲料中盐酸克伦特罗、沙丁胺醇的高效液相色谱测定 [ J ]. 分析测试学报, 2003, 22(3): 57- 59.
- [ 15 ] 范理, 王彤, 田静, 高生, 苏晓鸥, 郑君杰. 固相萃取 - GC - MS 法测定饲料中的沙丁胺醇 [ J ]. 分析测试学报, 2004, 23(S): 244- 248.
- [ 16 ] 孔莹, 邱月明, 李鹏, 沈建忠. 固相萃取 / 气相色谱 - 质谱同时测定猪肉中 4 种  $\beta$  激动剂类药物残留量 [ J ]. 分析测试学报, 2006, 25(2): 63- 66.