

圆二色光谱及其在药物研究方面的应用^①

于海英 程秀民^② 王晓坤

(山东大学药学院分析测试中心 115# 济南市文化西路 44 号 250012)

摘 要 对圆二色光谱技术在手性化合物分析中的应用进展进行综述, 简单介绍了圆二色光谱的原理和特点, 着重阐述了圆二色光谱在药物研究领域中的应用, 初步探讨了 HPLC-CD 联用在该领域的应用。

关键词 圆二色光谱, 药物研究, 应用。

中图分类号: O433.5⁺9

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2007)05-0877-09

1 前言

药物与我们的日常生活息息相关, 无论是生产者还是使用者都十分关心药物的质量问题。手性作为化合物的本质属性之一, 必然在药物分子中有所体现, 成为药物分子呈现多种现象的源泉。在药物学上, 具有立体异构的药物分子在体内与受体也通常以立体选择性的方式相互作用, 因而两种对映体往往表现出不同的药理活性; 或者其中一种有活性, 而另一种无活性甚至有毒。因此对映异构体的分析在药物研究方面具有重要意义。近年来国内外学者建立了许多分离纯化手性物质的方法, 以色谱法居多, 但因手性固定相、手性流动相、分析条件、分析步骤、外来干扰等的限制, 方法的应用性不强。而圆二色光谱作为一种光谱分析法, 对手性分子的测定具有专属性, 更加适合于手性药物的分析研究, 目前已被广泛应用于蛋白质构象研究、酶动力学、光学活性物质纯度测量、手性药物定量分析等领域。本文就其在医药研究方面的应用做进一步的论述。

2 圆二色光谱仪(CD)的基本原理

一束平面偏振光可以看成是相同频率和振幅的左、右圆偏振光的迭加, 当平面偏振光通过在紫外区有吸收峰的旋光介质时, 它所包含的左旋和右旋圆偏振光分量不仅传播速度不同(因折射率不同), 而且强度也不同, 称为圆二色性。圆二色性与波长有关, 以偏振光的吸光度差 ΔA 为纵坐标, 波长 λ 为横坐标做图, 便得到圆二色光谱图。手性物质的圆二色性常有两种表现形式: 一种是以 ΔA 表示, $\Delta A = A_L - A_R$; 另一种是以摩尔椭圆度 $[\theta]$ 表示, $[\theta] = 3300 \cdot \Delta \epsilon = 3300 \cdot [\epsilon_L - \epsilon_R]$ 。常以摩尔椭圆度 $[\theta]$ 代替吸光度差 ΔA 。

化合物是否有圆二色性取决于其结构中是否有发色团以及该发色团是否受不对称环境的影响。一般来说, 化合物 CD 图谱中的正峰或负峰与其紫外-可见图谱中的吸收峰的峰位是一致的。目前, 普通的研究型圆二色光谱仪的检测范围一般在 180—700nm 之间。特殊的 CD 仪可检测到更宽的范围, 大约在 130—1600nm, 延伸到近红外甚至红外区^[1]。

① 基金项目: 国家支撑计划(Na. 2006BA106A 01-05)

② 联系人, 电话: (0531) 88380526; E-mail: minn@sdu.edu.cn

作者简介: 于海英(1982—), 女, 山东省文登市人, 硕士研究生, 主要从事中草药有效成份提取、中药色谱分析工作。

收稿日期: 2007-07-10; 接受日期: 2007-07-23

圆二色光谱仪的结构(如图 1)类似旋光光度计,由光源、单色器、起偏镜、光电调节器、样品池、检测器组成。起偏镜将单色光生成直线偏振光,而光电调节器将直线偏振光转化成左右圆偏振光。左右圆偏振光以极快的速度交替通过样品池,样品对左右圆偏振光吸收的差值即可被检测器检测到。

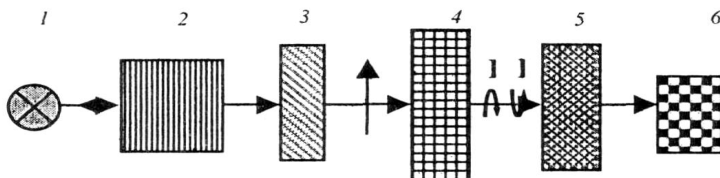


图 1 CD 仪结构简图

1——光源; 2——单色器; 3——起偏镜; 4——光电调节器; 5——样品池; 6——检测器。

圆二色值的正负改变称为 Cotton 效应。常造成 Cotton 效应的结构因素大致有 3 种: (1) 有固定的手性发色团产生的, 如不共面的取代联苯化合物; (2) 原发色团是对称的, 但处于手性环境中而被歪曲, 如环己酮中邻位有取代时; (3) 有分子轨道不相互交叠的发色团偶极相互作用产生的^[2,3]。某一化合物有无圆二色性, 要看其是否具备以上三点中的任意一点。

与其他仪器相比圆二色光谱仪有着独特的优点。首先, 圆二色光谱仪仅对特定结构的物质有反应, 因此对于组成复杂的体系, 圆二色光谱仪比紫外分光光度计选择性高, 干扰少, 可用于药物和食品添加剂中的光学活性物质的测定。其次, 在目前的热门研究领域蛋白质组学中, 圆二色光谱仪也占有一席之地。X 射线晶体衍射法是目前确定蛋白质构象最准确的方法, 但对蛋白等生物大分子物质, 其结构复杂且为柔性, 得到所需的晶体结构较为困难, 相比之下, 圆二色光谱是研究稀溶液中蛋白质构象的一种快速、简单、相对准确的方法, 样品较易获得^[4]。另外, 圆二色光谱对溶液中蛋白质、核酸等大分子的立体结构变化高度灵敏, 能检测到立体化学的微小变化^[5]。可见, 圆二色光谱仪在医药领域有着广泛的应用前景。

3 蛋白质的圆二色性

蛋白质是由氨基酸通过肽键连接而成的具有特定结构的生物大分子, 同时也是具有多个手性中心的分子。蛋白质一般有一级结构、二级结构、三级结构和四级结构几个结构层次。在蛋白质或多肽中, 主要的光活性基团是肽键、芳香氨基酸残基及二硫桥键^[6]。当平面圆偏振光通过这些光活性的生色基团时, 光活性中心对平面圆偏振光中的左、右圆偏振光的吸收不相同, 产生吸收差值, 由于这种吸收差的存在, 造成了偏振光矢量的振幅差, 圆偏振光变成了椭圆偏振光, 这就是蛋白质的圆二色性^[4,7]。

蛋白质的 CD 光谱一般分为两个波长范围, 即 178—250nm 的远紫外区和 250—320nm 的近紫外区。远紫外区的 CD 光谱反映了肽键的圆二色性^[8,9], 主要是由 C—N 键的 $n \rightarrow \pi$ 和 C=O 键的 $\pi \rightarrow \pi$ 跃迁引起的。而近紫外圆二色作为一种灵敏的光谱探针, 可反映蛋白质中芳香氨基酸残基、二硫键微环境的变化, 但该区要求样品的浓度大, 约高出远紫外区样品浓度 1—2 个数量级^[6,10]。在蛋白质或多肽的规则二级结构中, 肽键是高度有规律排列的, 排列的方向性决定了肽键能级跃迁的分裂情况。因此, 具有不同二级结构的蛋白质或多肽所产生 CD 谱带的位置、吸收的强弱都不相同。根据所测得蛋白质或多肽的远紫外 CD 谱, 能反映出蛋白质或多肽链二级结构的信息。

药物与蛋白结合后必然导致蛋白的空间结构发生改变, 这种改变可能是微小的, 也可能是巨大的。圆二色光谱仪的检测灵敏度远高于紫外, 因此, 不论是微小的变化还是巨大的变化, 其都能检测

出来。结构变化的直观表现就是圆二色光谱图,若结构变化较大,则谱图上所表现出的Cotton效应将变化明显,可以直接对比反应前后图谱的差异来判断反应是否进行;若药物结合后对蛋白的结构影响较小,比较图谱无法得出明显的差异,可以利用软件计算 α -螺旋、 β -折叠、转角及不规则卷曲的百分含量,比较数值得出结论。

目前使用的蛋白拟合软件较多,如SELCON、CDSSTR、CONTIN、K2D、PEPFIT、CDNN等^[4, 11-15],图谱必须转化为正确的格式才可以导入软件中,并且要设定好相关参数,软件即会计算出 α -螺旋、 β -折叠及转角的百分含量。尽管上述几种软件所采用的算法不同,但其所算出的结果仍具有可比性。以多种软件同时处理CD图谱,结果更可靠。随着X射线晶体衍射与核磁共振技术的提高,越来越多的蛋白质的精确构象得到测定,为CD数据的拟合提供了更精确的数据库^[11, 16, 17]。

4 研究药物的作用机理

药物作用的体内靶点多为蛋白质等大分子物质,而药物与蛋白结合后必然引起蛋白构象的改变,反应前后的CD光谱图也必然发生改变。无论药物自身有无手性,只要发生反应就可以观测到。通过分析研究CD光谱图的差异,可以揭示药物的作用机理。

4.1 研究手性药物各对映异构体与蛋白等生物大分子的亲和力

众所周知,在药物化学和生物化学中手性药物各异构体在作用机理、体内代谢和药理作用等方面都存在差异。因此对手性药物各异构体的作用机理等方面的研究意义重大,这方面的工作国外进行地较多。Ohta等^[18]利用CD研究正反式顺铂与人血清白蛋白(HSA)的结合情况。实验结果表明,反式顺铂与HSA结合后,导致 α -螺旋的含量由原来的50.5%降低到30.6%。进一步实验表明,这种改变是由于金属结合蛋白后切断了部分二硫键所导致的。同步对比实验表明,反式顺铂较顺式顺铂更容易结合并切断二硫键。Hwangbo等^[19]采用相同的方法研究R和S构型的氧氟沙星分别与合成的多聚核苷酸pb(A-T),pb(G-C),pb(C-D)的作用。最终所得的CD图谱表明,R-氧氟沙星仅与pb(G-C)作用明显,而S-氧氟沙星与三者作用皆很强,这说明核苷酸对S-氧氟沙星的立体选择性强。该实验结果也有力地证明了S-氧氟沙星的药效强于R-氧氟沙星这一已存在的结论。

4.2 研究药物与蛋白等的相互作用

药物进入体内与体内各种蛋白的相互作用直接影响着药物的分布、游离浓度、代谢、稳定性、毒性等,因此研究药物与体内蛋白的相互作用对指导药物设计和临床用药意义重大^[20]。在这方面的研究中CD也占据着一席之地,目前已有许多文献报道^[21-25]。Sjoeholm等^[21]利用CD法研究了52种镇静、镇痛和抗抑郁药物与人血清白蛋白-I的作用机理。观察记录了在0.1mol/L KCl, pH 7.4和25—27℃下药物与HSA-I的连接情况。大部分药物结合HSA-I后,能够诱导产生强烈的Cotton效应,但是乙酰苯胺和阿司匹林没有该现象。讨论了HSA结合药物所必须的结构特征及结合位点。平面环结构以及强的电子云密度是其所必须的。Kandagal等人^[22]综合运用圆二色光谱法、荧光光谱法、紫外-可见光谱法研究盐酸塞多平与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。分别测定了空白牛血清白蛋白及结合药物后的牛血清白蛋白的CD图谱,计算表明蛋白与药物结合后,构型发生了明显的改变。 α -螺旋的含量由作用前的60.87%降至反应后的25.21%。 α -螺旋含量的巨大变化反映了药物与BSA主要肽段的氨基酸残基作用,破坏了部分氢键,导致上述结果的出现。氟尿嘧啶是广泛应用的抗癌药物,但是该药物体内半衰期短,严重影响药物的疗效。Bertucci等人^[23]利用CD、UV、NMR等技术研究氟尿嘧啶与人血清白蛋白的作用机理,试图在弄清机理的基础上改善药物的疗效。CD研究表明该药物仅与人血清白蛋白的I区(香豆素结合区)有立体特异性粘合作用,而与II区(苯并二氮卓类结合区)无作用,该结论与¹H-NMR测定结果一致。实验者建议在服用氟尿嘧啶

时尽量避免同时服用其他竞争性结合血清白蛋白的药物,以延长其代谢时间,增强药效。上述各例都是在主体分子自身有圆二色性的条件下进行的,但是研究发现圆二色性是可以诱导产生的。如主体分子未结合客体分子之前只有紫外吸收,在某段区域没有圆二色性,且客体分子也不存在圆二色性,即二者在作用之前都不存在不对称结构。然而当二者结合后,结构发生改变产生了镜像不对称结构,即诱导产生了圆二色性^[26]。该方法与上述几人的研究方法有所区别。祁超等^[24]以诱导圆二色的方法研究抗体——卟啉的作用机理。单克隆抗体、卟啉分别在 350—450nm 的区域内都无 CD 光谱,但是二者相结合后在该区域内出现诱导的 CD 光谱,且遵守朗伯-比耳定律,说明光谱的变化不是由聚集现象产生的。实验者以过量的单克隆抗体 M b A c 作对照实验,结果在该区域内未出现 CD 光谱。由此可得出结论:抗体与卟啉的结合是专一的。

另外,在药物与蛋白作用的同时,往往需要金属离子的协同作用,使蛋白的结构调整到最易结合药物的状态。金属离子与蛋白结合后,蛋白的二级结构与三级结构都会发生微小的变化,CD 可以很好的观测出这种变化,这些年该方面的报道已有不少文献^[10, 27-28]。

5 蛋白类药物的质量控制

CD 拥有测样速度快、对样品的要求低、受干扰小等优点,更加适用于蛋白类药物的质量控制。

5.1 蛋白稳定性的研究

蛋白类药物多不稳定,易受环境因素如温度、pH 和浓度等的影响。基于 CD 对蛋白构象反应灵敏的优点,可以利用 CD 来考察影响药物稳定性的外部因素,寻找最佳的储存、使用条件。这方面的研究也有不少报道,但考察的因素各不相同^[29-35]。如史新昌等人^[29]研究了温度、蛋白浓度对重组人干扰素- $\alpha 2a$ (rh IFN - $\alpha 2a$) CD 图谱的影响,进一步研究二因素对 rh IFN - $\alpha 2a$ 各二级结构(α -螺旋、 β -折叠、转角、不规则卷曲)比例的影响。实验结果表明,温度在 5—60℃之间变化时,二级结构相对稳定, α -螺旋比例在 50%—65% 间变化, β -折叠比例在 10%—25% 间变化,转角比例在 5%—20% 间变化,而不规则卷曲比例在 5%—20% 间变化。实验者还分别测定了 rh IFN - $\alpha 2a$ 的 9 个稀释浓度下的 CD 谱图,9 张图谱形状相似,均呈现两个倒峰,软件拟合计算结果提示浓度在 1.5—0.006mg/mL 范围内相对稳定。生化类药物由于稳定性差多采用低压冷冻干燥法储存,但是 Taschner 等人^[30]研究发现该法降低了抗体 MMA 383 体内的药效,其药效仅在 10%—20% 间,而未经低压冷冻处理的样品其药效在 80%—100% 间。CD 测定温度对其稳定性的影响表明,在室温下两样品的二级结构没有差别,皆含有 29% 的 β -折叠、14% 的 α -螺旋,其余的为转角和不规则卷曲;当温度由 25℃升到 50℃时,二者变化也基本相同;但是,当温度由 25℃降至 11℃时,在 236nm 区域处出现差别,经冷冻干燥的样品的图形变化比未经冷冻干燥的小。这部分的变化主要由肽键引起的,因此实验者认为低压冷冻干燥降低了该抗体的柔性,这可能导致体内药效的降低。Jovanovi'c 等^[31]以 CD 法研究超临界流体(SCF)干燥过程中辅料对溶菌酶活性及二级结构的影响。分别测定溶菌酶水溶液、分别加蔗糖和海藻糖经 SCF 处理后再溶解的样品,三者的 CD 图谱无差别,证明辅料蔗糖或海藻糖在超临界流体干燥过程中有保护溶菌酶活性和其二级结构的作用。

5.2 蛋白结构确证

CD 被广泛用于蛋白二级结构确证的研究中,不同厂家生产的仪器都带有用于结构分析的软件,可以有效的计算出 α -螺旋、 β -折叠、转角、不规则卷曲的比例。其中图谱中的 208nm 和 222nm 处是 α -螺旋的特征吸收峰,该部分的算法较成熟,实验者可以通过公式粗略的计算 α -螺旋的含量:

$$f_{\alpha} = - ([\theta]_{208} + 4000) / 29000$$

其中 f_{α} —— α -螺旋所占分量,即 α -螺旋所含的氨基酸残基与整个蛋白质氨基酸残基数的百分比。上

式中的常数是根据实验推出的经验值^[4]。由于该方法只考虑了 α -螺旋在单波长的贡献,而忽略了蛋白质中其他三种结构的贡献,所以只能粗略的计算 α -螺旋的含量,要得到精确的数值还是要借助软件。图2所示为英国A PL公司chirascan型CD仪所测的溶菌酶的CD图谱,在208nm及220nm处分别出现 α -螺旋的特征峰,表1中数据为软件CDNN处理所得的二级结构信息。

目前,国内外的研究焦点多集中在对蛋白二级结构的确证^[15, 16, 36, 37],对三、四级结构的构型研究较少,有待于各方面技术的进一步发展。沈岚等^[36]以CD仪分析蛋白激酶B的PH结构域的二级结构,图谱经软件数据处理后计算得出 α -螺旋、 β -折叠、不规则卷曲的比例分别是1.7%、80.5%、17.8%,实验者所测定的结果与部分已知的PH结构域具有相似的结构。Thiago等人^[15]分别以CD法和分子动力学法考察人C-肽的结构,CD实验结果表明该肽不存在无规则卷曲片段,但是存在着一个局部稳定的结构,该结果与分子动力学实验结果一致。

CD用于结构确证还有待于其数据处理软件的进一步提高。Sreerama等人^[16]以5种变性的且结构已知的蛋白为模版,通过研究该5种蛋白的CD图谱与其结构的关系,进一步改进了SELCON软件,使其更加适用于变性的、不规则卷曲含量多的蛋白二级结构的分析。另一方面,CD并不能提供结构方面的完整信息,仍然需要与X衍射、核磁共振等技术联合运用,才能完整的表达蛋白、多肽等的结构信息。CD在解决蛋白质的四级结构方面仍有困难,即使与其他仪器联合应用也只能用于分析四级结构与二三级结构间的相互关系^[6]。

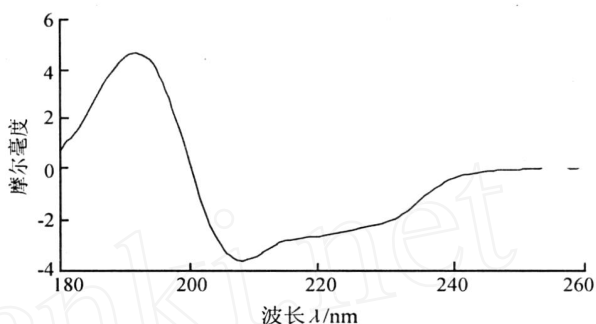


图2 溶菌酶CD图谱(1mg/mL)

表1 溶菌酶二级结构分析结果

(%)

	180—260nm	185—260nm	190—260nm	195—260nm	200—260nm	205—260nm	210—260nm
α -螺旋	32.20	32.40	32.40	32.20	31.30	33.50	30.40
反向平行	11.80	11.50	12.00	11.00	9.50	7.90	9.10
平行	8.00	7.90	7.90	8.30	8.80	9.00	9.40
β -转角	17.90	17.80	17.70	17.40	17.60	16.70	17.40
无规卷曲	27.60	27.90	27.70	29.00	31.30	33.00	35.10
总计	97.60	97.60	97.70	97.90	98.50	100.10	101.50

6 手性化合物绝对构型测定

圆二色光谱是与化合物的光学活性相关的光谱,可以提供许多分子的结构信息,用于手性分子的结构测定,判断分子的绝对构型。目前,CD多用于植物药的绝对构型测定^[38-43]。早在20世纪70年代,Gaffield^[38]就以CD研究二氢黄酮的立体构型。试验结果表明,在330nm左右出现 $n \rightarrow \pi$ 跃迁产生的正Cotton效应且在280—290nm间出现 $\pi \rightarrow \pi$ 跃迁产生的负Cotton效应的二氢黄酮,其立体构型为(2R, 3R)。随着CD的广泛应用,黄酮类化合物立体构型的研究也不断的深入^[39-41]。另外,Slade等人^[42]就近年来CD在黄酮类化合物立体构型研究中取得的成果进行了概括总结,为黄酮类化合物立体构型的确定提供了准确而丰富的数据。Ferreira等人^[43]则利用CD确定了18种黄酮-3, 4-二醇及其衍生物的绝对构型。当然,CD在该方面的贡献也有赖于NMR、MS、IR等的协同作用。

7 手性药物的含量测定

手性药物的含量测定多需要HPLC与CD的联用,CD检测器的选择性高,可以排除基质、添加

剂等的干扰,另外由于手性药物在临床中的广泛应用,高效液相色谱圆二色检测器技术为今后确保用药的安全性将发挥越来越重要的作用。随着 HPLC 圆二色检测器技术的进一步发展,它将成为药用光学纯对映体、手性化合物代谢、对映体纯度的测定等研究领域重要检测手段。关于 CD 作为 HPLC 的检测器 Kott^[44] 和 Bobbitt^[45] 等都分别做过阐述。高效液相色谱圆二色检测技术经过 20 多年的发展,已经成为一种实用的手性化合物分析方法^[44-46],然而由于其灵敏度相对较低,在残留分析上受到限制,同时仪器比较昂贵,其应用还没有引起人们的足够重视,我国目前在此领域的研究还比较少。

圆二色检测器与液相色谱联用其最大的优点是可以实现非手性条件下对映体百分含量的测定。当圆二色检测器与液相色谱联用时,一般来讲,对于单一对映体,在色谱图中可能出现正峰或负峰,而外消旋体不出峰。如果对映体含量不同,则色谱图上表现出的是占优势百分含量对映体的信号峰。对映体纯度的测定,需要与紫外-可见光检测器串联使用,同时测出圆二色光谱信号(ΔA)和紫外吸收信号(A),其比率称为各向异性因子($g = \Delta A / A$),仪器可以直接测出 g 值。

对映异构体相对过剩率 ee ^[45]

$$ee = (C_R - C_S) / (C_R + C_S); \quad (1)$$

$$C_{\text{总}} = C_R + C_S; \quad (2)$$

$$A = \epsilon \cdot C_{\text{总}} \cdot L; \quad (3)$$

$$\Delta A = \Delta \epsilon \cdot CL = (\epsilon_R - \epsilon_S) \cdot CL; \quad (4)$$

$$\Delta A = A_L - A_D = (\epsilon_R \cdot C_{RL} + \epsilon_S \cdot C_{SL}) - (\epsilon_R \cdot C_{RL} + \epsilon_S \cdot C_{SL}); \quad (5)$$

$$g = \Delta A / A \quad (6)$$

将(3)、(5)代入(6)中,整理得

$$g = 1/2 \epsilon [(\epsilon_R - \epsilon_S - \epsilon_R + \epsilon_S) \cdot ee + (\epsilon_R + \epsilon_S - \epsilon_R - \epsilon_S)]$$

由此可知,在一定条件下,各向异性因子与化合物浓度无关,与对映体纯度呈线性关系^[47,48]。该方法适合于非手性高效液相色谱条件下,不拆分异构体而对手性物质各异构体的纯度进行分析测定^[49]。近年来,国内外对此方法皆有研究,例如陈胜文、Williams 等都利用该方法解决实验中的问题,方法相同但是解决问题的方向却各不相同。陈胜文等人^[47]采用该规律在非手性高效液相色谱条件下测定了农药甲霜灵对映异构体的纯度,同时以手性柱分离检测的结果作对比。两种方法所测的对映异构体相对过剩率 ee 非常接近,二者的相对标准差小于 3%。说明该方法具有高的准确性。Williams 等人^[46]以该方法研究新型抗 HIV 药 DM P961S 构型的体内代谢,其目的是研究体内过程是否发生消旋作用。当 $ee = 0$ 时(即 S 构型和 R 构型的百分比为 50:50), $g = \Delta A / A = 0$ 。通过测定体内样品的 $\Delta A / A$ 值,由校准曲线求出 S 构型的百分含量。实验结果表明该药物体内代谢过程并没有发生消旋反应。同时以手性柱 HPLC-CD 经典方法验证该实验方法的准确性,两种方法做出的结果一致。Lorin 等^[50]也做过类似的研究,充分说明了该方法用于对映异构体药物研究的可行性。该方法克服了手性药物必须经手性分离才能测定含量的困难,既适合手性药物的含量测定,也适合药物体内代谢方面的研究,在药物分析领域具有良好的发展前景。

8 总结

CD 及 HPLC-CD 在手性化合物及手性药物分析中起着重要作用,特别是对蛋白质的分析。但是目前国内拥有该仪器的单位较少,仪器的优势尚未得到国内研究人员的充分认识,严重影响了该方法的应用。并且,现有的计算软件尚不能很好满足科研工作需求,还有待于进一步的完善。随着对该仪器认识水平的提高、软件技术的完善以及仪器的不断引进,该项技术将会得到更广泛的应

用。

参考文献

- [1] Nafie L A. Circular Polarization Spectroscopy of Chiral Molecules[J]. *Journal of Molecular Structure*, 1995, **347**: 83—100
- [2] 常建华, 董绮功. 波谱原理及解析[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2005. 391.
- [3] Bertucci C, Salvadori P, Guimaraes L F L. Determination of Optical Purity by High-Performance Liquid Chromatography Upon Non-Chiral Stationary Phases With Dual Circular Dichroism/Absorption Detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, **666** (1—2): 535—539
- [4] 沈星灿, 梁宏, 何锡文等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展[J]. *分析化学*, 2004, **32**(3): 388—394
- [5] Král V, Pataridis S, Setnicka V et al. New Chiral Porphyrin-Brucine Gelator Characterized by Methods of Circular Dichroism[J]. *Tetrahedron*, 2005, **61**(23): 5499—5506
- [6] Kelly SM, Price N C. The Application of Circular Dichroism to Studies of Protein Folding and Unfolding[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1997, **1338**(2): 161—185
- [7] Liu H N, Webster T J. Nanomedicine for Implants: A Review of Studies and Necessary Experimental Tools[J]. *Biomaterials*, 2007, **28**(2): 354—369
- [8] 王琴梅, 滕伟, 张静夏等. 聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯嵌段共聚物的圆二色光谱分析[J]. *分析试验室*, 2006, **25**(8): 112—115
- [9] 沈琼, 黄滨, 邵嘉亮等. 运用圆二色谱研究酶与化合物相互作用的机理[J]. *中山大学学报*, 2006, **45**(4): 62—64
- [10] Shen X C, Liang H, Guo J H et al. Studies on the Interaction between Ag^+ and Human Serum Albumin[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, **95**(2—3): 124—130
- [11] Sreeram N, Woody R W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set[J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, **287**(2): 252—260
- [12] Souza E S, Hirata I Y, Juliano L et al. End-to-End Distance Distribution in Bradykinin Observed by Förster Resonance Energy Transfer[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2000, **1474**(2): 251—261
- [13] Sultan N A M, Kenoth R, Swamy J. Purification, Physicochemical Characterization, Saccharide Specificity, and Chemical Modification of a Gal/GaNAc Specific Lectin from the Seeds of *Trichosanthes dioica*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, **432** (2): 212—221
- [14] Kumar A R, Hegde S S, Ganesh K N et al. Structural Changes Enhance the Activity of Chainin Xylanase in Low Urea Concentrations[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 2003, **1645**(2): 164—171
- [15] Mares-Guia T R, Maigret B, Martins N F et al. Molecular Dynamics and Circular Dichroism Studies of Human and Rat C-Peptides[J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2006, **25**(4): 532—542
- [16] Sreeram N, Venyaninov S Y, Woody R W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis[J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, **287**(2): 243—251
- [17] Venyaninov S Y, Baikalov I A, Shen Z M et al. Circular Dichroic Analysis of Denatured Proteins: Inclusion of Denatured Proteins in the Reference Set[J]. *Analytical Biochemistry*, 1993, **214**(1): 17—24
- [18] Ohta N, Chen D N, Ito S et al. Effect of Trans-Diamminedichloroplatinum (II) on Human Serum Albumin: Conformational Changes Through Partial Disulfide Bond Cleavage[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995, **118**(1): 85—93
- [19] Hwangbo H J, Yun B H, Cha J S et al. Enantioselective Binding of S- and R-Ofloxacin to Various Synthetic Polynucleotides[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, **18**(2): 197—203
- [20] Hu Y J, Liu Y, Shen X S et al. Studies on the Interaction between 1-Hexylcarbamoyl-5-Fluorouracil and Bovine Serum Albumin[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2005, **738**(1—3): 143—147
- [21] Sjöholm I, Sjödin T. Binding of Drugs to Human Serum Albumin—I. Circular Dichroism Studies on the Binding of Some Analgesics, Sedatives and Antidepressive Agents[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1972, **21**(22): 3041—3050
- [22] Kandagal P B, Seetharamappa J, Ashoka S et al. Study of the Interaction Between Doxepin Hydrochloride and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Techniques[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, **39**(4—5): 234—239
- [23] Bertucci C, Ascoli G, Uccelli-Barretta G et al. The Binding of 5-Fluorouracil to Native and Modified Human Serum Albumin: UV,

- CD, and ^1H and ^{19}F NMR Investigation[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1995, **13**(9): 1087—1093
- [24] 祁超, 李伟国, 张玉静等. 圆二色谱和紫外可见光谱研究抗体-咪唑的相互作用[J]. *分析化学*, 2002, **30**(5): 601—604
- [25] Shaikh SM T, Seetharamappa J, Ashoka S *et al*. A Study of the Interaction Between Bromopyrogallol Red and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Methods[J]. *Dyes and Pigments*, 2007, **73**(2): 211—216
- [26] Kirk W, Klimtchuk E. Photophysics of ANS. III: Circular Dichroism of ANS and Anilinonaphthalene in HFABP[J]. *Biophysical Chemistry*, 2007, **125**(1): 24—31.
- [27] Nagatoshiki S, Tanaka Y, Tsumoto K. Circular Dichroism Spectra Demonstrate Formation of the Thrombin-Binding DNA Aptamer G-Quadruplex Under Stabilizing-Cation-Deficient Conditions[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **352**(3): 812—817.
- [28] Li HM, Zhao YW, Guo Y *et al*. Mutagenesis, Biochemical, and Biophysical Characterization of Mycoplasma Arthritis-Derived Mitogen[J]. *Molecular Immunology*, 2007, **44**(5): 763—773
- [29] 史新昌, 饶春明, 裴德宁等. 重组人干扰素- $\alpha 2\text{a}$ (IFN- $\alpha 2\text{a}$) 的圆二色谱分析[J]. *药物分析杂志*, 2005, **25**(10): 1169—1172
- [30] Taschner N, Müller SA, Lumella VR *et al*. Modulation of Antigenicity related to Changes in Antibody Flexibility Upon Lyophilization[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **310**(1): 169—179
- [31] Jovanović N, Bouchard A, Hofland GW *et al*. Distinct Effects of Sucrose and Trehalose on Protein Stability During Supercritical Fluid Drying and Freeze-Drying[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, **27**(4): 336—345
- [32] Güşeren I, Güney D, Bruce BD *et al*. Structural and Functional Changes in Ultrasonicated Bovine Serum Albumin Solutions[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2007, **14**(2): 173—183
- [33] Luykx DMAM, Casteleijn MG, Jiskoot W *et al*. Physicochemical Studies on the Stability of Influenza Haemagglutinin in Vaccine Bulk Material[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, **23**(1): 65—75
- [34] Soenderkaer S, Carpenter JF, Weert M *et al*. Effects of Sucrose on rFvIIa Aggregation and Methionine Oxidation[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, **21**(5): 597—606
- [35] Gangnard S, Zuev Y, Gaudin JC *et al*. Modifications of the Charges at the N-Terminus of Bovine κ -Casein: Consequences on Its Structure and Its Micellisation[J]. *Food Hydrocolloids*, 2007, **21**(2): 180—190
- [36] 沈岚, 季少平, 刘新平等. 蛋白激酶B的PH结构域可溶性表达与纯化及其二级结构分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**(3): 383—387.
- [37] Hu TH, Krezel AM, Li CX *et al*. Structural Studies of Human Naked2: A Biologically Active Intrinsically Unstructured Protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **350**(4): 911—915
- [38] Gaffield W. Circular Dichroism, Optical Rotatory Dispersion and Absolute Configuration of Flavanones, 3-Hydroxyflavanones and Their Glycosides Determination of a Glycone Chirality in Flavanone Glycosides[J]. *Tetrahedron*, 1970, **26**(17): 4093—4108
- [39] Duddeck H, Snatzke G, Yemul SS. ^{13}C NMR and CD of some 3, 8- ^2B iflavonoids from *Garcinia* Species and of Related Flavanones[J]. *Phytochemistry*, 1978, **17**(8): 1369—1373
- [40] Gaffield W, Besson E, Chopin J. Effect of Conformation and Configuration of Arabinose Residues on the Circular Dichroism of C-Glycosylflavones[J]. *Phytochemistry*, 1984, **23**(6): 1317—1322
- [41] Augustys JAN, Bezuidenhout BCB, Swanepoel A *et al*. Enantioselective Synthesis of Flavonoids Part 2. Poly-Oxygenated α -Hydroxydihydrochalcones and Circular Dichroic Assessment of Their Absolute Configuration[J]. *Tetrahedron*, 1990, **46**(12): 4429—4442
- [42] Slade D, Ferreira D, Marais JPJ. Circular Dichroism, A Powerful Tool for the Assessment of Absolute Configuration of Flavonoids[J]. *Phytochemistry*, 2005, **66**(18): 2177—2215
- [43] Ferreira D, Marais JPJ, Slade D *et al*. Circular Dichroic Properties of Flavan-3, 4-Diols[J]. *Journal of Natural Products*, 2004, **67**: 175—178
- [44] Kott L, Holzheuer WB, Wong MM *et al*. An Evaluation of Four Commercial HPLC Chiral Detectors: A Comparison of Three Polarimeters and a Circular Dichroism Detector[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, **43**(1): 57—65
- [45] Bobbitt DR, Linder SW. Recent Advances in Chiral Detection for High Performance Liquid Chromatography[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2001, **20**(3): 111—123
- [46] Williams RC, Edwards JF, Joshi AS *et al*. Chiral Analysis of Drug Substance in Clinical Plasma Extracts using a Chiral HPLC with Circular Dichroism Detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, **25**: 501—509

- [47] 陈胜文, 林坤德, 席萌等. 高效液相色谱-圆二色检测法分析甲霜灵的对映体纯度[J]. 分析化学, 2006, 34(4): 525—528
- [48] Drake A F, Grould J M, Mason S F. Simultaneous Monitoring of Light Absorption and Optical Activity in the Liquid Chromatography of Chiral Substance[J]. *Journal of Chromatography A*, 1980, 202(2): 239—245
- [49] 田芹, 毕承路, 任丽萍. 高效液相色谱圆二色检测技术在手性化合物分析中的应用[J]. 分析化学, 2006, 34(3): 427—432
- [50] Lorin M, Delé R, Ribet J P et al. Validation of a Method Using an Achiral Liquid Chromatography Sorbent and a Circular Dichroism Detector Analysis of the Efaroxan Enantiomers[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1141(2): 244—250

Circular Dichroism and its Applications in Pharmaceutical Studies

YU Hai-Ying CHENG Xiu-Min WANG Xiao-Kun

(College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, P. R. China)

Abstract The principle and properties of CD were described, and the applications of CD in the pharmaceutical studies was reviewed in detail, as well as the tandem of HPLC and CD and the applications in this field.

Key words Circular Dichroism, Pharmaceutical Studies, Application.

招聘启事

本刊招聘编辑 1 名

因工作需要, 本刊招聘编辑 1 名, 条件如下:

- 1 大学化学或物理学本科(含以上, 包括同等学力)毕业, 成绩良好;
- 2 身体健康, 不吸烟, 不喝烈性酒; 对人诚实、守信、和善;
- 3 工作认真负责, 任劳任怨, 不计较报酬(本刊给予月薪为 1200—2000 元, 提供住房), 勤奋, 节俭, 热爱科学, 愿为《光谱实验室》期刊事业奋斗不息;
- 4 不限户口, 性别, 年龄, 民族, 党派, 信仰, 是否有残疾(身残志坚者优先)等。

有意者, 请将本人简历及学历复印件寄至北京市学院南路 76 号 35 楼 204 室《光谱实验室》编辑部, 邮编: 100081; 电邮: gsys@263.net, 勿访。

《光谱实验室》编辑部