

药物与蛋白质相互作用研究方法的进展

姜 虹^{1,2}, 安普利¹, 蒋 晔^{1*}

(1. 河北医科大学药学院分析化学教研室, 石家庄 050017; 2. 白求恩医学院训练部仪器中心, 石家庄 050081)

[摘要] 药物和蛋白质的相互作用是生命科学研究的重要领域, 本文综述了近 5 年相关研究的技术和方法, 包括光谱分析法、平衡透析法、超滤法、微透析法、毛细管电泳法、核磁共振、X 射线晶体衍射技术、电化学法、亲和层析法、迎头分析法、液相色谱法等。目前研究表明往往需多种方法联合使用才能阐明特定药物与其靶蛋白的相互作用。

[关键词] 药物; 蛋白质; 相互作用

[中图分类号] R 96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0662-05

Drug and protein interactions: progress of research methods

JIANG Hong^{1,2}, AN Pu-li¹, JIANG Ye^{1*} (1. Department of Analytical Chemistry, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Equipment Center of Department of Training, Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081)

[ABSTRACT] Interaction between drug and protein is a major research field of life science. This article reviews the methods used in related research in the past 5 years, including spectroscopy, equilibrium dialysis, ultrafiltration, microdialysis method, capillary electrophoresis, NMR, X-ray diffraction, electrochemical, affinity chromatography, HPFA, HPLC, etc. It has been showed that combined usages of several technologies are always needed to elucidate an interaction between drug and protein.

[KEY WORDS] drugs; proteins; interaction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(6): 662-666]

蛋白质是生物体内最重要的一类生物大分子, 药物进入人体后需要通过血浆的储运才能发生药理作用, 血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白。影响药物在体内分布的因素很多, 其中药物与血浆蛋白的结合率是决定药物在体内分布的重要因素。

因此研究药物(大多数是有机小分子)与蛋白质间的相互作用有助于全面认识药物的作用机制(药效)和不良反应, 也有助于对传统药物的药效和不良反应进行评估以及对于新药的开发和研制。本文对药物与蛋白质相互作用的研究方法及相关的结果进行了综述。

1 波谱分析法

1.1 光谱分析法 光谱分析是研究药物和蛋白质相互作用的一种简单有效的方法。这种方法充分利用蛋白质结构中的部分氨基酸残基在结合小分子以后结构的变化, 并通过不同波长的光进行检测。从化学的角度来看, 对血清白蛋白与药物结合反应的研究主要指结合位置、结合数与结合常数、作用力等的测定。根据检测方法和仪器的差异可将光谱分析分为荧光光谱法、紫外光谱法、红外光谱法、拉曼光谱法等。

1.1.1 紫外光谱法 紫外光谱法利用的是蛋白质中的某些芳香氨基酸如色氨酸、苯丙氨酸等在紫外区存在吸收峰的特点, 根据吸收峰的变化情况来确定蛋白质与其他物质(小分子药物)的相互作用情况, 这对于研究一些药物的作用机制具有一定的意义。何梅等^[1]使用紫外光谱法研究了大黄素、大黄酸和大黄酚与牛血清白蛋白的相互作用, 测定了它们与

牛血清白蛋白相互作用的结合常数(K)分别是 1.47×10^5 、 5.00×10^5 、 1.18×10^4 , 该方法准确、简单, 拓展了紫外可见光谱法的应用范围。

1.1.2 荧光光谱法 该方法主要用于研究药物小分子、离子、甚至小肽与蛋白质的相互作用。它利用的是药物与蛋白质相互作用后, 所引起药物自身荧光光谱或蛋白质自身荧光(内源荧光)光谱以及同步荧光光谱的变化, 如荧光强度和偏振度的改变、新荧光峰的出现等。这些变化可以提供药物与蛋白质结合的信息。

(1) 药物分子与血清白蛋白(SA)的相互作用: 血清白蛋白作为血液中含有最多的蛋白质, 在体内发挥着重要的运输作用, 因此研究它与药物分子的相互作用对认识药物的运输、药理作用的发挥和药物代谢具有巨大意义。白蛋白中含有 2 个重要的芳香族氨基酸——酪氨酸和色氨酸, 其中的色氨酸残基常作为检测的目标, 如色氨酸残基位于疏水性介质中时, $\lambda_{\max} = 331 \text{ nm}$; 部分位于疏水性介质中时, $\lambda_{\max} = 341 \text{ nm}$; 完全暴露于水相时, $\lambda_{\max} = 351 \text{ nm}$ 。据此可判断蛋白质构象的变化。

国内学者^[2-14]使用荧光光谱法研究了药物与白蛋白在水溶液中的相互作用, 包括药物与蛋白质作用的结合常数、结合数、结合部位、以及作用力类型等, 通过同步荧光光谱技术还可以了解药物分子对蛋白质构象的影响, 如表 1。

[作者简介] 姜 虹, 硕士生, 实验师。

* Corresponding author. E-mail: jiangye@hebmu.edu.cn

表 1 荧光光谱法测定药物分子与白蛋白的相互作用

Tab 1 Interactions between drugs and proteins by fluorescence

Drug	Binding constant K (L/mol)	Binding sites	Actions distance (l/nm)	Reference
Pefloxacin mesylate	7.3×10^4	1	2.82	[2]
Rufloxacin hydrochloride	9.3×10^4	1	2.93	[2]
Ofloxacin	0.48×10^5	0.72	2.94	[3]
Levofloxacin(1)	0.53×10^5	0.74	2.85	[3]
Enoxacin	8.02×10^4	1	2.52	[4]
Levofloxacin(2)	3.37×10^6	1	4.41	[5]
Prulifloxacin	1.05×10^5	1	5.59	[6]
Esculin	1.71×10^4	1	2.37	[7]
Aesculetin	8.71×10^4	1	2.67	[7]
Bromophenol red	4.725×10^5	1	2.11	[8]
Aureomycin	2.09×10^5	1.75	1.67	[9]
Levofloxacin Mesylate	2.742×10^4	1	1.933	[10]
Colchicine	1.92×10^5	1	3.63	[11]
Clenbuterol	2.84×10^3	5.65	1.69	[12]
Thiouracil	1.35×10^5	1	0.95	[13]
Azathioprine	2.80×10^6	1.3	2.59	[14]

(2)药物分子与其他蛋白质的相互作用:虽然目前研究主要针对血清白蛋白,对于其他蛋白质的研究报道较少,但是考察不同蛋白质和药物之间的相互作用机制,对于更全面地了解药物的转运和代谢过程、蛋白质结构与功能之间的关系以及生物大分子与药物小分子之间相互作用的化学本质都是十分必要的。杨培慧等^[15]使用荧光光谱法研究了胆红素与血红蛋白的相互作用,结果发现胆红素可以不同程度地淬灭血红蛋白中色氨酸的荧光。商志才等^[16]使用荧光光谱研究了氧氟沙星与牛乳铁蛋白的相互作用,应用光谱技术对生理条件下牛乳铁蛋白和氧氟沙星之间的结合反应和能量转移效率进行了讨论。

1.1.3 红外光谱法 红外光谱法通过肽链上的肽键中羰基振动而引起的红外光谱变化,主要反映二级结构——α-螺旋和β-折叠的空间变化,对于研究相互作用的空间部位具有重要作用,是进行结构分析和测定的重要方法。常希俊等^[17]应用红外光谱法研究了镉(Ⅲ)和钛(Ⅳ)与血红蛋白的相互作用,结果表明血红蛋白与金属的相互作用主要发生在氨基酸残基和肽键的 N 和 O 原子上,并且可引起血红蛋白骨架的部分变化。北京大学王亚俐等^[18]使用红外光谱法测定了苯甲酸钠和牛血清白蛋白的关系,证明两者可以发生相互作用,并且测定了牛血清白蛋白中 α-螺旋和 β-结构的百分含量。这些研究都是通过蛋白质分子的二级结构的变化来说明蛋白质与药物分子之间发生了相互作用。

1.1.4 多种光谱法联用 在实际应用中,将多种光谱方法联用可得到更多的小分子和蛋白质相互作用的信息。谢孟峡等^[19]使用红外光谱和荧光光谱联用方法研究了β-1,2,3,4,6-五-O-倍酰-D-葡萄糖与人血清白蛋白的相互作用,确定了白蛋白上存在的两个结合位点及其结合常数,并且发现了白蛋白结合底物后其结构可由 α-螺旋向 β-转角和无规则结构转变。这是红外光谱和荧光光谱的有效结合:红外光谱用以定量地描述蛋白质与配体作用后蛋白质二级结构的变化,

在此基础上结合荧光光谱研究了蛋白质在不同环境下二级结构的变化及药物与蛋白质相互作用的机制。石燕等^[20]运用紫外光谱法求出了伊红和牛血清白蛋白(BSA)的结合数和结合常数,并且又应用荧光淬灭法研究了两者的相互作用,初步探讨了其反应机制,通过同步荧光光谱讨论了伊红对蛋白质构象的影响。

通过对多种经典光谱法进行改进和联合,可使其应用范围更加广泛。这些方法在高通量药物筛选中也发挥了重要的作用,如时间分辨荧光分析法(TRF)、荧光共振能量传递分析法(FRET)、时间分辨荧光能量传递分析方法(TRET)等,特别是 FRET 在研究药物与蛋白质相互作用中显示出巨大的应用潜力。FRET 是一种荧光物质进行荧光能量转移的现象,只有当荧光分子受到激发、分子间距小于 10 nm 时,才发生这种能量转移。使用 FRET 可以观察 G 蛋白的结构变化,当激素或神经递质等与 G 蛋白发生相互作用时荧光减少,因而可以在细胞内部活体定位,检测药物与蛋白质相互作用^[21]。TRF 用于结构相似而荧光光谱严重重叠的双组分混合物,如果光谱重叠的几种物质的荧光寿命有一定差值,可不经预分离而直接定量测定。

此外,蛋白质芯片技术作为荧光技术的扩展,在研究药物分子与蛋白质相互作用中也有巨大优势。随着蛋白质计划的实施,大量有特定功能的蛋白质被发现,因此针对这些蛋白质功能的研究和药物的筛选是当前生命科学研究中的一项主要内容。研究者^[22]使用蛋白质芯片研究了 G 蛋白偶联受体中的神经紧张素 I 型受体、肾上腺素受体 β_{1,2} α_{2A} 与相应配体的结合情况,并计算出了结合常数;还研究了整合素与其受体的相互作用并且筛选了整合素的拮抗剂,这些拮抗剂将成为药物筛选的重要对象^[23]。Ghanouni 等^[24]使用荧光标记特定蛋白芯片上的受体,然后检测不同药物分子与受体之间的相互作用,还使用蛋白芯片研究了细胞内信号转导过程中相互作用的蛋白并且对蛋白质发挥功能的结构域进行

了初步的探索,为进一步了解药物-蛋白质相互作用奠定了基础^[25]。蛋白芯片使得高通量研究药物与蛋白质的相互作用得以实现,因此在药物筛选和开发过程中有广泛的应用。

光谱法是研究药物与蛋白质相互作用的不可缺少的工具,其优点是操作简便,成本较低,但它仅可以判断是否存在相互作用,而且只对部分氨基酸残基或官能团有效,无法对蛋白质整体结构进行研究,因此在药物改进方面缺少指导意义,并且许多方法都需要进一步发展和完善或联合应用。

1.2 核磁共振(NMR) 这是一种通过观察蛋白质空间结构在加入药物小分子前后的变化情况来确定与蛋白质的相互作用的方法^[26]。这种方法目前已经广泛应用来研究蛋白质与小分子的相互作用,其优点是从蛋白质整体结构上来研究其与药物的作用机制,使我们对药物的具体作用机制能有更为详细的理解。

Hoffman等^[27]使用二维NMR研究了W7(一种钙调素拮抗剂)与心肌肌钙蛋白C(cardiac troponin C,cTnC)的相互作用,研究表明W7可以和TnC的疏水袋状结构结合并阻止其活化,为开发效果更好的心脏保护用药提供了理论依据。Yu等^[28]使用NMR研究了charybdotoxin与钾离子通道复合物的结构,阐明了charybdotoxin最终导致钾离子通道关闭的分子机制,为相关药物筛选提供了重要的实验支持。Hung等^[29]使用多维NMR技术研究了肝素与蛋白质相互作用的具体机制。

将质谱法和核磁共振法联用,还能对药物-蛋白的结合作用进行多层次、全方位研究,可同时获得配体的亲和势、化学计量学及结构相关信息^[30]。

尽管NMR在研究蛋白质和小分子过程中具有很多优点,但此法不适宜定量研究结合参数。目前尚存在一些问题:一个是准确度,这方面主要涉及化学计量学、分子建模技术等相关学科的有机融合;另一个是效率,得到的实验数据通常需要约1个月的时间来解析^[30]。还有其实验费用较高,且需要相关专业人员来辅助完成,因此,仅在需要阐明具体药物的作用机制时选用。

1.3 X射线晶体衍射技术 X射线晶体衍射技术在阐明蛋白质结构,特别是跨膜蛋白质结构方面有不可替代的作用。它通过将蛋白质和与其相互作用的小分子共结晶,获得复合物的三维立体结构,从而获得两者相互作用的具体机制,如在CIC型钾通道的研究中,应用X射线晶体衍射阐明了离子通道的门控机制,同时也了解了小分子对通道的影响过程^[31]。该方法在单纯研究蛋白质与小分子相互作用时较少使用,多用来测定晶体蛋白质的分子结构。

2 平衡透析法

平衡透析是确定游离药物浓度最常用的方法,此方法是一种较好的热力学方法。但这个方法有一定的误差,Gibbs-Donan效应就是影响因素之一。20世纪90年代初,Same等^[32]用微渗析法测定与药物结合的白蛋白,该法可以测定结合白蛋白和游离药物浓度。目前已有有人用微量渗析法与高效液相色谱结合起来测定药物与蛋白质的相互作用,效果更好。

3 电化学法

采用电化学法研究药物分子与蛋白质的相互作用,虽然在一定程度上受药物分子电活性的限制,但是对于一些吸收光谱比较弱,无法用光谱法等其他方法来研究的药物分子与蛋白质分子的相互作用时却有可能采用。邬春华等^[33]使用电化学方法确定大黄酸与血清白蛋白形成了一种非电活性的化合物。孙伟等^[34]发现在pH 4.2的Britton-Robinson缓冲液中,茜素红S(ARS)与牛血清白蛋白(BSA)可以形成一种红色的非电活性的超分子复合物,复合物的形成使ARS的还原峰电流下降,峰电流的下降值同所加的BSA浓度在一定范围内($8.0 \times 10^{-8} \sim 1.2 \times 10^{-6}$ mol/L)呈线性关系。

4 色谱分析法

4.1 毛细管电泳法(CE) 目前将CE应用于测定药物与蛋白质结合常数的研究日益增多,如用于药物分析及分离以及研究人血清铁传递蛋白与药物对映体间的立体选择性相互作用^[35],用于鉴定血浆中的萘普生、萘普生-蛋白结合物和萘普生-赖氨酸对药物靶制剂生物分析^[36]。

4.2 亲和层析法 亲和层析法也是研究药物和蛋白质相互作用的重要方法,它主要通过使用特异性的蛋白质或药物小分子作为配基来寻找可以和其专一性结合的物质。如以人血清白蛋白为固定相,通过液相色谱法(同时和质谱联用)分析了对乙酰氨基酚、葡萄糖、奎宁、水杨酸等多种常用药物与血清蛋白的相互作用,结果与使用超速离心法一致^[37]。并通过这种方法研究了抗惊厥和癫痫药——2-丙基戊酸钠对其他药物与蛋白质的相互作用过程的影响^[38],这种竞争性作用可使其他药物的结合常数下降。

亲和层析法也无法确定蛋白质的整体结构,仍需要与其他方法共同使用。但它可用以筛选理想的药物,将目标蛋白标记在层析柱的填料上,可用于筛选与其相互作用的小分子物质,最后和质谱联用还可以得到与靶蛋白相互作用的药物的一些基本结构特征。只是目前尚无法得到小分子与蛋白质相互作用的具体机制。

4.3 高效前沿分析(HPFA) HPFA又称迎头分析法,是一种在药物与蛋白结合平衡中能同时测定游离药物浓度和总药物浓度的一种新的色谱方法。利用高效液相色谱(HPLC)和高效毛细管电泳(HPCE)系统可以有效地进行HPFA。它的优点是通过测定峰高和峰面积得到游离药物浓度和总药物浓度,同时能了解药物与蛋白结合情况并测得生物利用度等药动学参数^[39]。国内学者^[40]使用高效液相色谱-迎头分析法联用,分析了糖尿病治疗药物格列美脲与人血清白蛋白的相互作用,并计算出含有两类结合位点及相应的结合平衡常数,此方法操作简便,适用于高亲和势的疏水性药物-血浆蛋白结合作用的分析。氯氮平是用于治疗某些难治性精神分裂症的药物,周大炜等^[41]采用毛细管电泳-迎头分析模式体外实验测得血清白蛋白HSA溶液、人血浆、兔血清和血浆样品中游离氯氮平的浓度,结果表明氯氮平与人血清白蛋白结合很少,但在人血浆、兔血清和血浆中有较强结合。并认为此方法特别适合用于只能获得微量生物样品

情况下的蛋白结合作用的研究。Hattori 等^[42]使用前沿分析法研究了多聚阴离子与蛋白的相互作用,结果表明二者之间完全靠静电相互作用,而不依赖于它们的分子结构。此外,他还使用前沿分析法测定了血清白蛋白与肝素的相互作用,并获得了理想的结果^[43]。HPFA 是一种新的色谱方法,尚有许多工作有待完善,如需要合理选择柱及填料、洗脱平台区域的出现和大体积的样品量。但随着毛细管电泳技术的发展,HPFA 方法和它的联合应用是有潜力的临床检测方法^[44-45]。

4. 4 高效液相色谱法-质谱联用 色谱和质谱联用是当前生命科学研究领域常用的一种方法,它通过将色谱的分离能和质谱的性质鉴定相结合来研究蛋白质,在蛋白质与小分子相互作用的研究中获得了许多应用。国外已经使用质谱方法确定了第二代具有感光性的药物 Foscan 与血浆蛋白质相互作用时的具体状态(是单聚体还是二聚体),从而更清楚地认识了二者的相互作用^[46]。研究者采用高效液相色谱法与质谱法联用认识到有 2 个特异的蛋白片段参与了光亲和配体(photoaffinity ligands, PALs)与细胞色素 P450 的相互作用^[47]。

4. 5 高效液相色谱法-荧光光谱法联用 高效液相色谱在药物分析中有着十分广泛的应用,荧光检测又有较强的专一性和更高的灵敏度,结合后作为一种快速、简便而且经济的方法常用于临床药代动力学分析。张雪辉等^[48]在检测中药材中黄曲霉毒素时,比较研究了免疫亲和柱(IAC)净化高效液相色谱法柱后溴化衍生荧光法检测黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的含量与溴化荧光光度法(SFB 法)检测黄曲霉毒素总量的方法,并同时用这两种方法检测了 39 种中药中黄曲霉毒素的含量。顾世芬等^[49]用高效液相色谱法-荧光光谱法测定人血浆中卡维地洛浓度,在 1.56~100 ng/ml 浓度范围内呈线性关系, $r=0.998\ 8$,最低检测浓度 1.56 ng/ml,平均提取回收率为 76.49%,并且对流动相的选择、提取溶剂的选择、药代动力学参数等进行了讨论。

在上面几种关于药物和蛋白质相互作用的研究方法中,任何一种都不是孤立的。研究一种特别有应用潜力的药物,往往需要几种方法的联合,如使用亲和层析进行药物筛选,光谱法初步得出结合信息,核磁共振和 X 射线晶体衍射技术研究其具体结合机制等。如一种新合成的分子式为 EuL₃·TPPO·(H₂O)₂ 的固体发光材料,是由硝酸铕、2-噻吩乙醛酸(HL)和三苯基氧化膦(TPPO)形成的三元配合物。该配合物通过红外光谱和核磁共振联合应用确定分子式,再用荧光激发光谱和发射光谱进行进一步分析^[50]。王群等^[51]利用荧光光谱法和圆二色谱法研究了重组内皮抑素与中药有效成分芦荟大黄素的相互作用,求得两者的结合常数。实验结果表明,芦荟大黄素能增强重组内皮抑素的抗血管生成活性,使其对新生血管的抑制作用提高 50%。

研究多种药物与血浆蛋白(主要是白蛋白)的结合,是药物动力学及临床药理学的内容。但对药物与蛋白质相互作用的了解可为探讨人类疾病机制,诊断、预防疾病,制药和新药开发提供重要的理论基础。这类研究涉及诸如生物学、化学、物理学及计算机等多学科,因此加强各学科之间的协作

必将促进这一研究领域的发展。

[参 考 文 献]

[1] 何 梅,夏之宁,阴永光,等. 紫外光谱研究中药大黄有效成分与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2004,21:429-432.

[2] 刘永明,李桂芝. 荧光法研究喹诺酮类抗菌药物和蛋白质的相互作用[J]. 化学研究与应用,2005,17:46-48.

[3] 易 帅,吴 军,郭 明,等. 氧氟沙星和左氧沙星与人血清白蛋白的相互作用研究[J]. 浙江大学学报(理学版),2004,31:314-321.

[4] 刘永明,李桂芝. 荧光猝灭法研究依诺沙星和蛋白质的相互作用[J]. 应用化学,2004,21:621-624.

[5] 严 琳,严拯宇,邵秀芬,等. 左氧氟沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 中国药科大学学报,2004,35:456-459.

[6] 陈昌云,李小华,许 飞,等. 普利沙星与牛血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J]. 南京师大学报(自然科学版),2006,29:62-65.

[7] 刘保生,赵长容,张红医,等. 秦皮甲素、秦皮乙素与血清白蛋白的相互作用[J]. 分析科学学报,2005,21:17-19.

[8] 孙艳梅,刘保生,张红医,等. 苯酚磺酞类酸性染料与牛血清白蛋白的结合反应[J]. 河北大学学报(自然科学版),2004,24:619-623.

[9] 易平贵,俞庆森,商志才,等. 牛血清白蛋白与金霉素结合反应的机制研究[J]. 化学物理学报,2003,16:420-424.

[10] 陈晓波,康栋国,李 崧,等. 利复星与人血清白蛋白作用的荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析,2005,25:1451-1455.

[11] 刘永明,李桂芝,孙希芬. 荧光法研究秋水仙碱和牛血清白蛋白的相互结合作用[J]. 分析化学研究报告,2004,32:615-618.

[12] 潘祖亭,马 勇,王 巍. 荧光光谱法研究克仑特罗与蛋白质的结合作用[J]. 分析试验室,2004,23:5-8.

[13] 谭 亮,谢青季,姚守拙. 荧光法研究抗甲亢药物硫脲嘧啶与蛋白质的相互结合作用[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2003,26:59-63.

[14] 原华平,关洪亮,顾 青,等. 硫唑嘌呤与牛血清白蛋白相互作用的热力学研究[J]. 分析试验室,2006,25:81-85.

[15] 杨培慧,郑志雯,蔡继业. 胆红素与血红蛋白分子作用的发光光谱分析[J]. 发光学报,2004,24:247-251.

[16] 商志才,范成平,郭 明,等. 荧光法研究氧氟沙星与牛乳铁蛋白的相互结合作用[J]. 物理化学学报,2004,20:864-867.

[17] 常希俊,杨 芳,张 莉,等. 牛血红蛋白与镉(Ⅲ)、钪(Ⅳ)的相互作用[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2004,40:62-66.

[18] 王亚刚,王海芳. 光谱法研究苯甲酸钠与牛血清白蛋白的作用[J]. 北京大学学报(自然科学版),2002,38:159-163.

[19] 谢孟峡,蒋 敏,李 崧,等. β -1,2,3,4,6-五-O-倍酰-D-葡萄糖与人血清白蛋白的相互作用研究[J]. 化学学报,2004,62:1460-1466.

[20] 石 燕,欧阳萌,郑炎炎. 伊红和牛血清白蛋白相互作用[J]. 南昌大学学报(理科版),2004,28:400-404.

[21] 孙学刚,张丽华,姜 勇. FRET 的理论基础及应用[J]. 中国病理生理杂志,2004,20:1721-1724.

[22] Ye F, Anthony G F, Lahiri J. G protein-coupled receptor microarrays[J]. Chem Bio Chem, 2002,3:987-991.

- [23] Lee Y, Kang D K, Chang S I, et al. High-throughput screening of novel peptide inhibitors of an integrin receptor from the hexapeptide library by using a protein microarray chip[J]. J Biomol Screen, 2004, 9: 687-694.
- [24] Ghanouni P, Steenhuis J J, Farrens D L, et al. Agonist-induced conformational changes in the G protein-coupled domain of the adrenergic receptor[J]. PNAS, 2001, 98: 5997-6002.
- [25] Stoevesandt O, Elbs M, Kohler K, et al. Peptide microarrays for the detection of molecular interactions in cellular signal transduction[J]. Proteomics, 2005, 5: 2010-2017.
- [26] 夏 斌, 金长文. 生物大分子结构及动力学的核磁共振研究[J]. 现代仪器, 2002, 4: 1-5.
- [27] Hoffman R M, Li M X, Sykes B D. The binding of w7, an inhibitor of striated muscle contraction, to cardiac troponin C[J]. Biochemistry, 2005, 44: 15750-15759.
- [28] Yu L, Sun C, Song D, et al. Nuclear magnetic resonance structural studies of a potassium channel-charybdotoxin complex[J]. Biochemistry, 2005, 44: 15834-15841.
- [29] Hung K W, Kumar T K, Kathir K M, et al. Solution structure of the ligand binding domain of the fibroblast growth factor receptor: role of heparin in the activation of the receptor[J]. Biochemistry, 2005, 44: 15787-15798.
- [30] 周大伟, 李乐道, 李发美. 药物-蛋白结合作用的分析方法研究[J]. 色谱, 2004, 22: 116-120.
- [31] Dutzler R, Campbell E B, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in CIC chloride channels[J]. Science, 2003, 300: 108-112.
- [32] Sarre S, Van Belle K, Smolders I, et al. The use of microdialysis for the determination of plasma protein binding of drugs[J]. J Pharm Biomed Anal, 1992, 10: 735-739.
- [33] 郭春华, 吕元琦, 袁倬斌. 大黄酸与牛血清白蛋白相互作用的电化学研究[J]. 分析测试学报, 2004, 23: 73-75.
- [34] 孙 伟, 焦 奎, 刘晓云. 电化学法研究蛋白质和茜素红 S 的相互作用[J]. 分析化学, 2002, 30: 312-314.
- [35] Hattori T, Kimura K, Seyrek E, et al. Binding of bovine serum albumin to heparin determined by turbidimetric titration and frontal analysis continuous capillary electrophoresis[J]. Anal Biochem, 2001, 295: 158-167.
- [36] Schmid M G, Kilar F, Gubitz G. Stereoselective interaction of drug enantiomers with human serum transferring in capillary zone electrophoresis (II) [J]. Electrophoresis, 1998, 19: 282-287.
- [37] Cheng Y, Ho E, Subramanyam B, et al. Measurements of drug protein binding by using immobilized human serum albumin liquid chromatography mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 809: 67-73.
- [38] Bertucci C, Andrisano V, Gotti R, et al. Use of an immobilised human serum albumin HPLC column as a probe of drug protein interactions: the reversible binding of valproate[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 768: 147-155.
- [39] 赵燕燕, 杨更亮, 李海英, 等. 高效前沿分析的发展及在药物-蛋白结合研究中的应用[J]. 中国新药杂志, 2003, 12: 171-174.
- [40] 周大伟, 王怀锋, 李发美. 格列美脲蛋白结合作用的高效液相色谱-迎头分析法[J]. 药学报, 2005, 40: 39-42.
- [41] 周大伟, 李发美. 毛细管电泳-迎头分析法测定血清或血浆中氯氮平的游离浓度[J]. 化学学报, 2004, 62: 1256-1259.
- [42] Hattori T, Bat-Aldar S, Kato R, et al. Characterization of polyanion-protein complexes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis and small angle neutron scattering: effect of polyanion flexibility[J]. Anal Biochem, 2005, 342: 229-236.
- [43] Albrecht C, Reichen J, Visser J, et al. Differentiation between naproxen, naproxen-protein conjugates, and naproxen-lysine in plasma *via* micellar electrokinetic capillary chromatography-a new approach in the bioanalysis of drug targeting preparations[J]. Clin Chem, 1997, 43: 2083-2090.
- [44] Ostergaard J, Schou C, Larsen C, et al. Effect of dextran as a run buffer additive in drug-protein binding studies using capillary electrophoresis frontal analysis[J]. Anal Chem, 2003, 75: 207-214.
- [45] Martinez-Pla J J, Martinez-Gomez M A, Martin-Biosca Y. High-throughput capillary electrophoresis frontal analysis method for the study of drug interactions with human serum albumin at near-physiological conditions [J]. Electrophoresis, 2004, 25: 3176-3185.
- [46] Sasnouski S, Zorin V, khludeyev I, et al. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1725: 394-402.
- [47] Wen B, Doneanu C E, Gartner C A, et al. Fluorescent photoaffinity labeling of cytochrome P450 3A₄ by lapachenole: identification of modification sites by mass spectrometry[J]. Biochemistry, 2005, 44: 1833-1845.
- [48] 张雪辉, 陈建民. 高效液相色谱法与荧光光度法检测中药材中黄曲霉毒素的比较[J]. 药学报, 2004, 39: 99-100.
- [49] 顾世芬, 肖 宙, 代宗顺. HPLC-荧光法测定人血浆中卡维地洛浓度及其药动学研究[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35: 54-56.
- [50] 于 斌, 孙 波, 赵 莹, 等. 2-噻吩乙醛酸-三苯基氧化膦-铜配合物的合成、结构表征及荧光性能的研究[J]. 中国稀土学报, 2004, 22: 887-890.
- [51] 王 群, 石 晶, 张 焕, 等. 荧光光谱和圆二色谱研究重组内皮抑素与芦荟大黄素的相互作用[J]. 分析化学研究报告, 2005, 33: 909-912.

[收稿日期] 2007-03-08

[修回日期] 2007-05-09

[本文编辑] 尹 茶