

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00058

· 论 著 ·

用 α_{1A} -肾上腺素受体色谱研究哌嗪类化合物的生物亲和作用

王宏飞, 杨晴来, 左正龙, 申旭霁, 赵新锋, 郑晓晖*

西北大学中草药现代化工程研究中心, 西安 710069

[摘要] **目的** 用 α_{1A} -肾上腺素受体(α_{1A} -AR)色谱法研究哌嗪类化合物与 α_{1A} -AR 的生物亲和作用。**方法** 采用亲和层析色谱法从家兔心脏组织中纯化得到 α_{1A} -AR, 以大孔硅胶为载体, 采用温和的化学偶联方法, 将 α_{1A} -AR 通过共价键均匀地固载在大孔硅胶表面, 用盐酸特拉唑嗪、去甲肾上腺素、坦索罗辛、间羟胺和乌拉地尔表征 α_{1A} -AR 色谱柱的保留特性; 化学合成 6 种哌嗪类化合物, 并用该色谱模型研究其与 α_{1A} -AR 之间的相互作用关系。**结果** 所合成哌嗪类化合物与 α_{1A} -AR 之间有生物亲和作用, 其亲和力大小为: 化合物 3 > 化合物 4 > 化合物 1 > 化合物 2 > 化合物 5 > 化合物 6。**结论** α_{1A} -AR 色谱法是一种特异、可靠的生物亲和色谱方法, 可用于药物活性的初步研究。

[关键词] 肾上腺素能 α_1 受体; 哌嗪类; 亲和色谱法; 生物亲和作用

[中图分类号] R 917.74 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)01-0058-04

α_{1A} -Adrenoceptor chromatography in studying biological affinity of piperazine compounds

WANG Hong-fei, YANG Qing-lai, ZUO Zheng-long, SHEN Xu-ji, ZHAO Xin-feng, ZHENG Xiao-hui*

Research Center of Chinese Herbal Medicine Modernization, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To use α_{1A} -AR (α_{1A} -adrenoceptor) chromatography for studying the biological affinity of piperazine compounds. **Methods** Affinity chromatography was used to purify α_{1A} -AR obtained from rabbit heart. α_{1A} -AR was immobilized on macroporous silica through the covalent bond by mild chemical coupling methods. The retention characteristics of α_{1A} -AR column were investigated with terazosin, norepinephrine, tamsulosin, metaraminol, and urapidil. Six piperazine compounds were synthesized, and the interactions between the compounds and α_{1A} -AR were investigated by the chromatographic model. **Results** Biological affinity was found between the synthesized piperazine compounds and α_{1A} -AR, with the order of affinity intensities being compound 3 > compound 4 > compound 1 > compound 2 > compound 5 > compound 6. **Conclusion** α_{1A} -AR chromatography is a specific and reliable biological affinity chromatography and can be used for preliminary study of drug activity.

[Key words] adrenoceptor α_1 ; piperazines; affinity chromatography; biological affinity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1):58-61]

受体是细胞膜上特殊的蛋白质, 肾上腺素能受体是受体家族中最重要的部分^[1], 分为 α 受体和 β 受体, 这 2 个受体又细分为若干亚型。根据解剖定位、生理功能以及对激动剂和拮抗剂的亲和力的差异, α 受体分为 α_1 、 α_2 2 个亚型。 α_1 -肾上腺素受体(α_1 -adrenoceptor, α_1 -AR)是 G 蛋白偶联的 7 次跨膜受体蛋白家族的成员之一, 广泛分布于血管平滑肌和心肌等组织, 主要介导血管平滑肌的收缩, 是治疗心脑血管疾病药物发挥药效的主要靶点之一。根据该受体与激动剂和拮抗剂亲和力的不同, 确定 α_1 -AR 包括 α_{1A} 、 α_{1B} 及 α_{1D} -AR。 α_{1A} -AR 主要分布在细胞内, 在成纤维细胞及血管平滑肌细胞表面也有一定分布。

哌嗪环是药物化学研究中常用的一类氮杂环, 它的引入可有效地调节药物的理化性质, 改善药物的药动学性质; 还可通过形成多个氢键或离子键, 提高药物的生物活性。哌嗪类化合物与抗抑郁药物的主要结构相连所得到的新型化合物, 可能对抑郁症的治疗起效更快^[2]。因此在众多药物的研发中常引入哌嗪环, 呈现出广泛的生物活性, 从而受到人们的广泛关注。本研究采用亲和色谱法从家兔心脏组织中纯化得到了 α_{1A} -AR, 建立了 α_{1A} -AR 亲和色谱方法, 并用其研究所合成的哌嗪类化合物与 α_{1A} -AR 的生物亲和作用。

1 材料、仪器和试剂

核磁共振用 Varian VXR-400 仪; 红外光谱用

[收稿日期] 2010-07-17 [接受日期] 2010-12-12

[基金项目] 国家自然科学基金(20875074/b0501)。Supported by National Natural Science Foundation of China(20875074/b0501)。

[作者简介] 王宏飞, 硕士生。E-mail: wanghf268@126.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 029-88302686, E-mail: zhengxh@nwu.edu.cn

Nicolet 5700 FT-IR 仪;元素分析仪用 Finnigan Flash1112 Series EA;85-2 数显恒温加热磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司);二氯甲烷、三氯甲烷(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);碳酸氢钠、无水硫酸钠(分析纯,天津市天力化学试剂有限公司);2-哌嗪基-4-氨基-6,7-二甲氧基喹唑啉(化学纯,重庆威尔德-浩瑞医药化工有限公司);2-呋喃甲酸(化学纯,上海晶纯试剂有限公司);2-四氢呋喃甲酸(化学纯,杭州科邦特化工有限公司);2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(化学纯,济南鲁利化工有限公司);4-甲基吗啉(化学纯,国药集团化学试剂有限公司)。

ZZXT-A 装柱机(大连依利特分析仪器有限公司);BT01-100 型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)。6B-琼脂糖微球(西安交大保赛生物技术股份有限公司,BS-050824), γ -氨丙基三乙氧基硅烷(湖北德邦化工新材料有限公司)。羰基二咪唑、亮抑蛋白酶肽、大豆胰蛋白酶抑制剂、脱氧胆酸钠、EDTA 均购自 Sigma 公司,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 α_{1A} -AR 亲和色谱方法的建立

2.1.1 α_{1A} -AR 粗品的制备 取家兔心脏组织,参考文献[3-4]的方法制备含有溶脱 α_{1A} -AR 的洗脱液, -70°C 冻存备用。

2.1.2 α_{1A} -AR 的纯化 参考文献[5]的方法合成 100 ml 用于纯化 α_{1A} -AR 的亲和层析树脂,然后装柱,用 200 ml 100 mmol/L NaCl、10.0 mmol/L Tris-HCl、2.0 mmol/L EDTA、0.1% 的脱氧胆酸钠组成的溶液(pH 7.2)平衡柱子。将待纯化的 α_{1A} -AR 粗膜溶液上样, 4°C , 先用缓冲溶液(500 mmol/L NaCl, 50.0 mmol/L Tris-HCl, 2.0 mmol/L EDTA, 1.0% 的脱氧胆酸钠, pH 7.2)洗涤。将柱温恢复到室温,用 200 ml 含特拉唑嗪的缓冲溶液线性洗脱,特拉唑嗪的浓度为 0~80.0 $\mu\text{mol/L}$ 。收集目标洗脱液。用 Sephadex G50 尺寸排阻柱除去收集液中游离的特拉唑嗪,即得含 α_{1A} -AR 的洗脱液,冷冻浓缩至 2.5 ml, -70°C 冻存。

2.1.3 α_{1A} -AR 亲和色谱固定相的合成和装柱 参考文献[4]的方法,制备氨丙基硅胶,再用羰基二咪唑活化。取 1.0 g 活化硅胶,加入 α_{1A} -AR 洗脱液和磷酸盐缓冲溶液(pH 7.2),室温下搅拌 2 h。抽滤,硅胶用缓冲液洗涤多次后,转移至 1% 甘氨酸乙酯溶液中反应 30 min。最后用缓冲溶液洗涤,得到 α_{1A} -AR 亲和色谱固定相。以 5.0 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 7.2)为匀浆液和顶替剂,在 4.0×10^7 Pa 的压力下装填色谱柱(50 mm \times 2.1 mm)。

2.1.4 色谱柱保留特性研究 以 10.0 mmol/L Tris-HCl、1.0 mmol/L EDTA 和 1.0 mmol/L NaCl 组成的溶液(pH 7.2)为流动相,在流速为 0.5 ml/min 的条件下,分别测定盐酸特拉唑嗪、去甲肾上腺素、坦索罗辛、间羟胺、乌拉地尔在氨丙基硅胶和 α_{1A} -AR 色谱柱上的保留时间 t_R 及柱系统死时间 t_0 , 通过公式计算容量因子: $k' = (t_R - t_0) / t_0$, 判断色谱柱的活性。

2.1.5 哌嗪化合物的保留时间测定 以 2.1.4 项下条件分别测定各化合物在 α_{1A} -AR 亲和色谱柱上的保留时间。

2.1.6 哌嗪化合物的结合常数测定 设定柱温为 20°C , 采用前沿色谱法测定配体-受体的结合常数。以 2.1.4 项下的流动相为 A 液,用 A 液配制而成的喹唑啉等溶液为 B 液,首先用 A 液平衡色谱柱 60 min,然后由仪器自动控制 A、B 液按系列比例混合,以 0.5 ml/min 流速通过色谱柱,直至流出液的紫外吸收达到平台值,记录突破时间,计算曲线达到拐点时的体积。同法以 NaNO_2 溶液测定色谱系统的死体积。利用 Scatchard 公式计算结合常数 K_a 。

2.2 哌嗪化合物的合成

2.2.1 1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-喹唑啉基)哌嗪的合成(1) 取 2-氯-4-氨基-6,7-二甲氧基喹唑啉 1.2 g 溶于 20.0 ml 1,4-二氧六环中,搅拌滴入到含 0.86 g 无水哌嗪、0.8 ml DMF 的 80 ml 1,4-二氧六环溶液中, 110°C 回流 3 h, TLC 检测反应进程。反应后,用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 至微碱性,用三氯甲烷萃取 3 次,倒掉水层,将有机层用饱和 NaCl 水溶液洗至中性,再用无水硫酸钠干燥过夜,减压蒸干,得白色粉末 1.8 g。经柱层析纯化得白色粉末 1.2 g。产率: 83.0%。经 IR、 ^1H NMR 表征: 白色固体, ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 7.40(s, 1H, Ar-H), 6.72(s, 1H, Ar-H), 3.83(s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.79(s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.63~2.70(t, 8H, $-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2$), 3.31(brs, 2H, $-\text{NH}_2$), 2.51(t, 1H, $-\text{NH}-$); IR (KBr) ν : 3 321, 3 230, 1 630, 1 634, 1 583, 1 517, 1 552, 1 487, 1 378, 1 278, 1 100 cm^{-1} ; MS(m/z): 290.2 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 。

2.2.2 1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-喹唑啉基)-4-乙酰基哌嗪的合成(2) 取 1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-喹唑啉基)-哌嗪 1.45 g 溶于 100 ml 1,4-二氧六环中,再搅拌滴入含 0.36 ml 乙酰氯的 10 ml 1,4-二氧六环溶液,室温搅拌 24 h。TLC 检测反应进程。反应后,处理同 2.2.1,得白色粉末 1.82 g,以二氯甲烷:甲醇=5:1 为洗脱剂,经柱层析纯化得白色粉末 1.45 g。产率: 87.3%。经 IR、 ^1H NMR 表征: 白色固体, ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 8.12(brs, 2H, $-\text{NH}_2$), 7.54(s, 1H, Ar-H), 7.12(s, 1H, Ar-H), 3.98(s, 3H,

-OCH₃), 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 3.88~3.76 (s, 8H, -CH₂-N-CH₂), 2.17 (s, 3H, -CH₃); IR (KBr) ν : 3 178, 2 926, 1 631, 1 596, 1 531, 1 438, 1 297, 1 254, 1 110 cm⁻¹; MS (*m/z*): 332.1[M+H]⁺.

2.2.3 1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-喹唑啉基)-4-[(2,3-二氢-1,4-苯并二 烷-2-基)羰基]哌嗪的合成(3)

在50 ml三颈瓶中,取1.10 ml苯并二 烷甲酸溶于30 ml甲苯中,加入0.8 ml SOCl₂,加热回流1 h,反应后,旋转蒸发去除溶剂,将所得2 g产物直接溶于20 ml 1,4-二氧六环中,再滴加到含2.89 g 1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-喹唑啉基)-哌嗪、0.8 ml DMF的100 ml 1,4-二氧六环溶液中,常温下搅拌反应24 h^[6]。反应后,处理同2.2.1,得固体粉末4 g。以二氯甲烷:甲醇=20:1为洗脱剂,经柱层析纯化得固体粉末3.25 g。产率:72.1%。经IR、¹HNMR表征:白色固体,¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz): 6.97~6.79 (m, 6H, Ar-H), 5.19 (brs, 2H, -NH₂), 4.90 (t, 1H, -OCHCH₂), 4.53 (d, *J*=11.92 Hz, 1H, -OCHCH₂), 4.37 (d, *J*=11.81 Hz, 1H, -OCHCH₂), 4.05 (t, 2H, -CH₂NCH₂), 3.98 (s, 3H, -OCH₃), 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 3.87 (t, 2H, -CH₂ NCH₂), 3.75 (t, 2H, -CH₂NCH₂), 3.61 (t, 2H, -CH₂ NCH₂); IR (KBr) ν : 3 343, 3 226, 2 926, 1 634, 1 560, 1 495, 1 430, 1 373, 1 239, 1 173, 1 100 cm⁻¹; MS(*m/z*): 452.6[M+H]⁺.

2.2.4 1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-喹唑啉基)-4-(4-醛基-苯甲酰基)哌嗪的合成(4) 依照2.2.3项下合成1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-喹唑啉基)-4-(4-醛基-苯甲酰基)哌嗪,反应后得黄色粉末2.1 g。经柱层析纯化得固体粉末1.8 g。产率:83.6%。经IR、¹HNMR表征:黄色固体,¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz): 10.08 (s, 1H, -CHO), 8.01~6.73 (s, 6H, Ar-H), 7.16 (s, 2H, -NH₂), 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 3.72~3.33 (s, 8H, -CH₂-N-CH₂); IR (KBr) ν : 3 478, 3 355, 2 980, 2 934, 1 715, 1 609, 1 519, 1 449, 1 104 cm⁻¹; MS(*m/z*): 422.7[M+H]⁺.

2.2.5 1-(2-呋喃甲酰基)哌嗪合成(5) 在100 ml三颈瓶中,加入2.24 g呋喃糠酸和0.22 g对甲苯磺酸,用80 ml甲醇将其溶解,85℃回流5 h,反应后将产物直接蒸干,用乙酸乙酯溶解后,再用饱和NaHCO₃溶液洗3次,取其有机层,用无水硫酸钠干燥过夜,减压蒸干,得黄色液体2.2 g。将所得黄色液体用25 ml 1,4-二氧六环溶解后,滴加到含1.72 g无水哌嗪、10 ml甲醇钠饱和溶液的120 ml 1,4-二氧六环溶液中,110℃回流3.0 h^[7], TLC检测反应进程。反应后,用1 mol/L的HCl溶液调pH至微碱性,再直接蒸干,三氯甲烷溶解后,用无水硫酸钠干燥过夜,减压蒸干,得黄色液体3.85

g。以二氯甲烷:甲醇=15:1为洗脱剂,经柱层析纯化得黄色液体2.86 g。产率:79.4%。经IR、¹HNMR表征:黄色液体,¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.49 (d, *J*=3.33 Mz, 1H, -O-CH=), 6.99 (d, *J*=3.32 Hz, 1H, -C=CH-), 6.48 (dd, *J*₁=1.60 Hz, *J*₂=1.62 Hz, 1H, -CH=), 4.98 (brs, 1H, -NH-), 3.77 (t, 4H, -N-CH₂-), 3.70 (t, 4H, -N-CH₂-); IR (KBr) ν : 3 135, 3 108, 1 604, 1 565, 1 482, 1 430, 1 273, 1 178, 1 008 cm⁻¹; MS(*m/z*): 181.9[M+H]⁺.

2.2.6 1-(2-呋喃甲酰基)-4-乙酰基哌嗪的合成(6) 取1-(2-呋喃甲酰基)哌嗪1.45 g溶于50 ml 1,4-二氧六环中,再搅拌滴入含0.36 ml乙酰氯的10 ml 1,4-二氧六环溶液,室温搅拌24 h。TLC检测反应进程。反应后处理同2.2.1。经柱层析纯化得白色粉末1.2 g。产率67.0%。经IR、¹HNMR表征:淡黄色粉末,¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.51 (s, 1H, -O-CH=), 7.06 (d, *J*=2.33 Hz, 1H, =CH-), 6.51 (d, *J*=2.35 Hz, 1H, -CH=C), 3.70 (t, 4H, -N-CH₂-), 3.57 (t, 4H, -N-CH₂-), 2.51 (s, 3H, -CH₃); IR (KBr) ν : 3 142, 3 092, 1 675, 1 582, 1 485, 1 441, 1 280, 1 172, 1 005 cm⁻¹; MS(*m/z*): 223.3[M+H]⁺.

2.3 亲和色谱固定相的保留结果 分别测定阳性工具药在氨丙基硅胶柱和 α_{1A} -AR色谱柱上的保留特征,测定结果分别见表1、表2。NaNO₂溶液测定系统死时间为1.745 min。

表1中,工具药的容量因子值接近于0,说明样品在固定相中保留时间很短,未键合 α_{1A} -AR的氨丙基硅胶固定相对上述药物的结合能力很弱。

表1 阳性工具药在氨丙基硅胶柱上的保留特征

Tab 1 Retention characteristics of positive tool for drug on aminopropyl silica gel column

Reference drug	Retention time <i>t</i> /min	Capacity factor
Terazosin	2.392	0.371
Noradrenaline	1.955	0.120
Tamsulosin	2.083	0.194
Metaraminol	1.903	0.091
Urapidil	2.032	0.164

表2中,工具药在 α_{1A} -AR生物色谱柱上容量因子均大于1,且在数值上存在明显差异。阳性工具药在 α_{1A} -AR生物色谱柱上的保留主要由受体-配体的特异亲和作用产生,同时结合非特异性研究排除了硅胶的非特异吸附作用。此外,同时测定了 β -AR阳性工具药盐酸普萘洛尔、硫酸沙丁胺醇在该色谱柱上的保留特征,结果显示无保留。因此,得出结论:

色谱固定相对上述阳性工具药产生结合作用, 并且对于不同药物的结合能力有所差异, α_{1A} -AR 生物色谱柱具备特异性识别并结合其阳性药物的能力。

表 2 阳性工具药在 α_{1A} -AR 色谱柱上的保留特征
Tab 2 Retention characteristics of positive tool for drug on α_{1A} -AR chromatographic column

Reference drug	Retention time <i>t</i> /min	Capacity factor
Terazosin	7.860	3.504
Noradrenaline	11.465	5.570
Tamsulosin	12.334	6.068
Metaraminol	9.605	4.504
Urapidil	7.453	3.271

α_{1A} -AR: α_{1A} -adrenoceptor

测定合成化合物在 α_{1A} -AR 色谱柱上的保留特征, 结果见表 3。上述化合物在 α_{1A} -AR 生物色谱柱上的容量因子均大于 1, 说明其与 α_{1A} -AR 有结合作用。

2.4 α_{1A} -AR 与各化合物的生物亲和作用 为了保证配体与所制备固定相的作用主要为生物亲和作用, 本研究在流动相中加入 Tris、EDTA 和 NaCl 等试剂, 用于消除配体与固定相上残留氨基和硅羟基之间的静

电作用。用前沿色谱技术研究配体与受体的亲和作用, 依据 Scatchard 公式获得配体与受体的结合常数及结合位点数: $\frac{1}{m_{Lapp}} = \frac{1}{m_{Ltot} \times ka \times [A]} + \frac{1}{m_{Ltot}}$ 。 m_{Lapp} 代表受体对配体的吸附量, m_{Ltot} 代表结合位点数, $[A]$ 表示流动相中待分析物质的摩尔浓度, Ka 为受体与配体之间的结合常数。分别用前沿色谱法分析各化合物, 记录前沿色谱图。根据 Scatchard 作图法, 并计算出各化合物的线性相关系数及结合位点数和结合常数, 结果见表 4。

表 3 哌嗪化合物在 α_{1A} -AR 色谱柱上的保留特征
Tab 3 Retention characteristics of piperazine compounds on α_{1A} -AR chromatographic column

Compound	Retention time <i>t</i> /min	Capacity factor
Compound 1	11.227	5.434
Compound 2	6.485	2.716
Compound 3	23.878	12.684
Compound 4	9.869	4.656
Compound 5	3.813	1.185
Compound 6	3.721	1.132

α_{1A} -AR: α_{1A} -adrenoceptor

表 4 哌嗪化合物结合位点数及结合常数

Tab 4 Binding sites and binding constants of piperazine compounds

Compound	Regression equation	Correlation coefficient	Binding sites $\times 10^{-6}$ $c_B/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Association constant $\times 10^4$ $(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
Compound 1	$y = 104.27x + 1.0704 \times 10^6$	0.9997	0.934	1.027
Compound 2	$y = 136.04x + 0.7799 \times 10^6$	0.9995	1.282	0.573
Compound 3	$y = 44.509x + 0.9689 \times 10^6$	0.9958	1.032	2.177
Compound 4	$y = 79.050x + 1.5052 \times 10^6$	0.9977	0.664	1.904
Compound 5	$y = 237.95x + 0.3325 \times 10^5$	0.9998	3.008	0.140
Compound 6	$y = 253.61x + 0.3420 \times 10^5$	0.9999	2.924	0.135

3 结论

本研究用亲和色谱法从家兔心脏组织中纯化得到了 α_{1A} -AR, 然后选择温和的化学方法将其通过共价键均匀地固载于大孔硅胶表面, 用阳性工具药特拉唑嗪、去甲肾上腺素、坦索罗辛、间羟胺、乌拉地尔表征了 α_{1A} -AR 色谱柱的亲和特性, 从而建立了 α_{1A} -AR 亲和色谱方法, 并用该色谱模型研究了所合成哌嗪化合物与 α_{1A} -AR 之间的相互作用关系, 结果显示所合成化合物与 α_{1A} -AR 之间有特异性结合作用, 并且对于不同化合物结合能力有所差异。

α_{1A} -AR 色谱法具有稳定性好和选择性强的特点, 可用于配体化合物的初步生物活性研究。

[参考文献]

[1] 邓晓宇, 邓福杰. 肾上腺素能受体的临床研究进展[J]. 山东医

药, 2010, 50:109-110.

- [2] 郭磊, 章文军, 杨静. N-甲基-2-(4-取代哌嗪)-N-[3-(萘氧基)-3-(2-噻吩基)丙基]乙酰胺衍生物的设计与合成[J]. 合成化学, 2010, 18:210-212.
- [3] 吕宝彰, 卢建, 安明榜. 受体学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000:236-239.
- [4] Reinhard G, Jim F W, Loc B. Large-scale expression and purification of a G-protein-coupled receptor for structure determination—an overview[J]. J Struct Funct Gen, 2005, 6:159-163.
- [5] 封顺, 邹汉法, 王吉德, 张强, 陈小明, 郭明. 亚叶酸钙消旋体在牛血清白蛋白手性柱上的拆分[J]. 药物分析杂志, 2002, 22:389-392.
- [6] Bolognesi M L, Marucci G. Analogues of prazosin that bear a benextramine-related polyamine backbone exhibit different Antagonism toward α_1 -Adrenoreceptor subtypes[J]. J Med Chem, 2001, 44:362-371.
- [7] Chou W C, Tan C W, Chen S F, Ku H. One-pot neat reactions of carboxylic esters and alkylenediamines for efficient preparation of N-alkylenediamines[J]. J Org Chem, 1998, 63:10015-10017.

[本文编辑] 尹茶