

CCR5膜外一、二环模拟短肽对二甲苯致小鼠耳肿胀抑制作用的研究

郑慧敏^{1,2}, 郭葆玉¹ (1 第二军医大学药学院生化药学教研室, 上海 200433 2 武警上海总队医院药局, 上海 201103)

[摘要] 目的 研究与 CC趋化因子受体 5(CC chemokine receptor 5, CCR5)第一、二膜外攀特异结合的模拟肽, 对二甲苯致小鼠耳肿胀抑制作用。方法 用噬菌体随机 7肽库筛选与 CCR5特异结合的多肽序列, 建立二甲苯致小鼠耳肿胀模型; 合成 4段氨基酸序列分别为 STFTTTL(SL)、TPITQLL(TL)、SLPLPKP(SP)、QTSSAAL(QL)的 CCR5模拟肽, 将 4段短肽分别腹腔内注射至耳肿胀模型小鼠, 以阿司匹林为抗炎药效学实验的阳性对照药。分别通过称重小鼠左、右耳片和将小鼠耳片 HE 染色的方法, 观察 4段 CCR5模拟肽对二甲苯致小鼠耳肿胀模型小鼠的抗炎活性。结果 左、右耳片通过称重, HE染色后, 发现 4段 CCR5模拟肽均能显著抑制二甲苯致小鼠耳肿胀模型小鼠耳朵水肿、充血和炎性细胞的浸润。抑制率分别为 53.4%、47.3%、31.3%、25.2%, 效果显著($P < 0.05$)。结论 合成的 4段 CCR5模拟肽具有对二甲苯致耳肿胀模型小鼠明显的抑制作用, 提示 CCR5可能在二甲苯致耳肿胀模型小鼠的发病进程中发挥着重要的作用。

[关键词] CC趋化因子受体 5 模拟肽; 耳肿胀

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)01-0107-05

Study on inhibition of mimic peptides binding specifically with the first and second extra-cellular domain of CC chemokine receptor 5 on mice ear engorgement induced by dimethyl benzene

ZHENG Huimin^{1,2}, GUO Baoyu¹ (1 Department of Biochemical Pharmacy School of Pharmacy, Second Military Medical University Shanghai 200433 China 2 Department of Pharmacy, Shanghai General Hospital of Arm Police Forces Shanghai 201103 China)

[Abstract] **Objective** To study the inhibition of mimic peptides binding specifically with the first and second extra-cellular domain of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) on mice ear engorgement induced by dimethyl benzene. **Methods** Phage display peptide library was used to screen peptide sequence bonding specifically with CCR5 then the model of mice ear engorgement was established and the four mimic peptides whose amino acid sequence are respectively STFTTTL (SL), TPITQLL (TL), SLPLPKP (SP), QTSSAAL (QL) was synthesized, and the four peptides was injected into abdominal cavity of the ear engorgement model mice, take aspirin as the positive control of anti-inflammatory pharmacodynamics experiment. The left and the right mice ear tissue were obtained and weighted HE stained, the four peptides was investigated the anti-inflammatory activity to mice ear engorgement induced by dimethyl benzene. **Results** After the left and the right mice ear tissue were weighted and HE stained, we find the four CCR5 mimic peptides had suppressed significantly mice ear engorgement induced by dimethyl benzene hydrops and infiltrating of the inflammatory cells. The inhibition ratio is respectively 53.4%, 47.3%, 31.3%, 25.2% that effect is significant ($P < 0.05$). **Conclusion** All of the four short peptides respectively take the evident suppressing role on mice ear engorgement induced by dimethyl benzene. Thus this study indicated CCR5 may play a important role in the course of mice ear engorgement induced by dimethyl benzene.

[Key words] CCR5; mimic peptide; mice ear engorgement

CC趋化因子及其受体是一种超基因蛋白家族, 参与细胞的免疫调节和炎症过程^[1]。近年来研究发现, 趋化因子及其受体对淋巴细胞趋化到其炎症部位起着关键作用。此外, 趋化因子对 CD4 细胞亚群有选择作用。Th1 和 Th2 细胞表面表达不同种类的趋化因子受体, 并对不同的趋化因子产生反应, 如 Th1 细胞活化后主要表达趋化因子受体 CCR5 和 CXCR3, Th2 细胞活化

后主要表达 CCR3、CCR4 和 CCR8。因此, 趋化因子受体可以作为 Th1 和 Th2 细胞的表面标志^[2]。CCR5 是趋化因子 RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)、MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1)、MIP-1 β 的受体的特异性结合位点。本研究针对探讨 CCR5 膜外第一、二环模拟肽对二甲苯致小鼠耳肿胀的抗炎作用。模拟肽是任意一个被设计并执行肽功能的化合物, 一个生物活性模拟肽具有与细胞因子、病毒或其它生物分子拮抗、刺激或是调节天然配体的生理活性的功能。通常情况下模拟肽有两大来源: 一类是对肽进行结构改造, 但同时不改变蛋白质

[作者简介] 郑慧敏 (1980-), 女, 药师, 硕士研究生, E-mail: zhm121@126.com.

[通讯作者] 郭葆玉, Tel: (021) 81871330, E-mail: byguo1632000@yahoo.com.cn.

的本质基础、药效团及其所需要的三维分布。另一个来源是噬菌体表面展示技术,是将随机多肽文库表达于噬菌体的表面,并通过亲和筛选的方法找到目的基因及其表达的肽段。该技术在抗原表位分析、蛋白质与蛋白质之间相互作用、疫苗的研制和多肽药物的开发等方面都显示了独特的优势。模拟肽成为近年来研究拮抗剂的热点,本实验利用噬菌体展示肽库技术,从噬菌体 7 肽库中,以亲和筛选方法筛选高度亲和 CCR5 第一和第二膜外羧基氨基酸序列的特异性结合的模拟短肽,以此来研究对二甲苯致小鼠耳肿胀的抑制作用。

1 实验材料

1.1 主要材料及试剂 Ph.D.-7TM (噬菌体表面展示肽库试剂盒) 购自 BiLabs 公司。与 CCR5 第一、二膜外羧基特异的氨基酸序列合成模拟肽由上海吉尔生化公司合成。它们的序列分别为 STFTTTL (SL)、TPIITQLL (TL)、SLPLPKP (SP)、QTSSAAL (QL)。阿司匹林 (阿斯利康制药有限公司, 批号: 0810003), 二甲苯 (上海试剂一厂)。

1.2 实验动物及分组 健康雄性昆明种小鼠 70 只 [上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (沪) 2007-0005], 小鼠体重 18~20 g 随机分为 7 组, 每组 10 只。

2 方法

2.1 亲和淘选 参照 Ph.D.-7TM 噬菌体展示肽库使用手册进行。筛选过程中各步骤均无菌操作。用 pH 8.6 的 NaHCO₃ 包被液将 ST11、TT11 分别稀释为 100 μg/ml 加入 96 微孔板中, 150 μl/孔, 4℃ 轻微震荡, 孵育过夜。倒掉每板中的包被液, 板倒置在干净的纸巾上用力拍甩以除去残余溶液。每孔加满封阻液, 4℃ 作用至少 1 h 除去封阻液。再用 TBST (TBS+0.1% Tween-20) 缓冲液快速洗板 6 次。从原始库中取出 10 μl 与 100 μl TBST 混合后, 分别加入 ST11、TT11 包被的微孔内, 100 μl/孔, 共 12 孔, 室温温和摇动 60 min, 倾倒除去未结合的噬菌体, 用 TBST 缓冲液洗板 10 次, 加入非特异性缓冲液 0.2 M 甘氨酸 (glycine) (pH 2.2), 1 mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA) 来分离已结合的分子: 温和摇动 20 min 收集洗脱液, 然后加入 180 μl 1 M Tris-HCl (pH 9.1) 中和上述洗脱液^[5,6]。取 1 μl 测定洗脱物的滴度。剩余洗脱物加入 20 ml ER2738 培养物中 (菌体应处于对数前期), 37℃ 剧烈摇动培养 4~5 h 将扩增培养物经聚乙二醇 (PEG) /NaCl 浓缩纯化后进行噬菌体滴度测定, 并进行下一轮淘选。如此进行 3 轮淘选。

2.2 噬菌体滴度测定 将待测噬菌体进行系列稀释, 取 10 μl 噬菌体与 200 μl 对数生长期的 ER2738 菌液混匀, 室温放置 5 min; 将上述混合的噬菌体-菌液与 3 ml 顶层琼脂混匀, 并加入异丙基硫代半乳糖苷 (isopropylthio-β-D-galactoside, IPTG) 和 β-半乳糖苷酶的显色底物 (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, X-gal) 混匀, 立即铺到 37℃ 预热的 LB 平板上, 室温放置约 5 min, 凝固后放入 37℃ 培养箱中培养过夜, 计数蓝色噬菌斑数, 乘以稀释倍数, 即得每 10 μl 原液的噬菌体滴度。

2.3 噬菌体的浓缩纯化 将培养物 4℃、1.1 × 10⁶ g 离心 10 min, 上清液转入另一离心管中在 4℃、1.1 × 10⁶ g 离心。将上清的上部 80% 转入一新鲜离心管, 加入 1/6 体积的 PEG/NaCl 让噬菌体 4℃ 沉淀过夜。4℃、1.1 × 10⁶ g 离心 PEG 沉淀 15 min 倒掉上清液, 再短暂 4℃、1.1 × 10⁶ g 离心, 吸去残留上清液。沉淀物重悬于 1 ml TBS 中, 4℃、1.1 × 10⁶ g 离心 5 min 使残余细胞沉淀。上清液转入另一新鲜微量离心管中, 用 1/6 体积的 PEG/NaCl 再沉淀。冰上孵育 60 min, 4℃、1.1 × 10⁶ g 离心 10 min 弃上清, 再短暂 4℃、1.1 × 10⁶ g 离心, 吸去残余上清。沉淀物重悬于 200 μl TBS, 0.02% NaN₃ 中。4℃、1.1 × 10⁶ g 离心 1 min 沉淀任何残余的不溶物, 上清即为纯化的噬菌体。第三轮筛选后随机选取 20 个克隆进行如上纯化。用于 ELISA 测定。

2.4 ELISA 法鉴定特异短肽的结合活性 ST11、TT11 分别作为包被抗原: 取 100 μl/ml 包被聚乙烯反应板, 4℃ 孵育过夜。加入浓缩纯化的 1~20 号噬菌体 (TBST 1:1000 稀释), 37℃ 反应 1 h, TBST 洗板 6 次, 加入 HRP 标记的抗 M13 抗体 (在封阻液中 1:5000 稀释), 37℃ 反应 1 h, TBST 洗板 6 次, 加入显色底物液 ABTS-双氧水 (H₂O₂), 37℃、10 min 加入终止液, 测 405 nm 吸光度。

2.5 噬菌体单链 DNA 的提取和序列测定 参照噬菌体展示肽库说明书中的方法提取噬菌体单链 DNA, DNA 序列测定由上海基康生物公司完成, 根据插入的 DNA 序列得到与 ST11、TT11 结合的 7 肽氨基酸序列。

2.6 模拟肽注射液制备及给予小鼠腹腔注射 噬菌体表面结合 CCR5 多肽氨基酸序列经上海吉尔生化公司合成后, 用 PBS 将其稀释成 2.5 mg/ml 分别给予注射 SP、QL、SL、TL, 1 次/d 每次 200 μl。

2.7 小鼠耳肿胀实验 各组分别在致炎前 7 d 腹腔注射给药。对照组给同体积的生理盐水, 阿司匹林灌胃给药 7 d 剂量为 0.47 g/kg, 末次给药 1 h 后, 立即右耳前后两面涂 100% 二甲苯 300 μl/只致

炎,左耳为对照,间隔 1 h后将小鼠颈椎脱臼致死,沿耳廓基线剪下两耳,用直径为 7 mm 的打孔器分别在左、右耳同一位置打下圆耳片,用电子天平称耳片重量,立即投入预先配好的固定液中(10% 福尔马林)。以左右耳重量之差为其肿胀度(mg),根据公式计算鼠耳廓肿胀度和肿胀抑制率^[3,4]。

肿胀抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照组平均肿胀度} - \text{给药组平均肿胀度}}{\text{对照组平均肿胀度}}$$

各组肿胀度与空白对照组比较,作组间 *t* 检验。

2.8 数据分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,作 *t* 检验。

3 结果与分析

3.1 亲和筛选与 CCR5 特异结合的噬菌体 经过 3 轮筛选,噬菌体投入产出比逐渐升高,说明与 CCR5 亲和的噬菌体富集明显(表 1)。从表 1 中可以看出第 2 轮筛选产出率明显提高。

3.2 噬菌体阳性克隆的序列测定 分别挑选与 CCR5 第一、二膜外襻特异结合的 10 个阳性克隆提取单链 DNA,进行 DNA 序列测定并推导这些 DNA 序列编码的氨基酸残基,即为噬菌体的 7 肽序列(表 2)。

表 1 第一、二膜外襻筛选后噬菌体克隆的富集率

轮数	第一膜外襻			第二膜外襻		
	投入量 (pfu)	回收量 (pfu)	回收率	投入量 (pfu)	回收量 (pfu)	回收率
1	2.0×10^{11}	3.3×10^3	1.65×10^{-8}	2.0×10^{11}	3.7×10^3	1.85×10^{-8}
2	2.0×10^{11}	6.6×10^5	3.30×10^{-6}	2.0×10^{11}	6.5×10^5	3.25×10^{-6}
3	2.0×10^{11}	2.7×10^8	1.35×10^{-3}	2.0×10^{11}	2.4×10^8	1.20×10^{-3}

表 2 阳性克隆的氨基酸序列

阳性克隆	重复次数	多肽序列
4, 12	2	SLPLPKP
5, 8, 14	3	SFTTTL
9	1	HQGPWDE
10, 13, 16, 18	4	QTSSAAL
22~32	10	TPITQLL

3.3 抑肿作用的评价 对二甲苯致小鼠耳肿胀的抑制作用以耳肿胀度、肿胀抑制率进行评价,结果如表 2 所示,发现 CCR5 模拟肽各组小鼠因二甲苯所致的耳急性炎性肿胀的程度均低于空白对照组,抑制率分别为 53.4%、47.3%、31.3%、25.2%。说明筛选的与 CCR5 特异性结合的模拟肽能显著抑制二甲苯致小鼠耳肿胀,提示 CCR5 可能在小鼠耳肿胀进程中发挥着及其重要的作用。

表 3 CCR5 模拟肽对二甲苯致小鼠耳肿胀作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

组别	动物数 (n)	肿胀度 (mg)	抑制率 (%)
模型	10	13.1 ± 2.6	0
SP	10	6.1 ± 0.4 ¹⁾	53.4
SL	10	6.9 ± 1.5 ¹⁾	47.3
QL	10	9.8 ± 2.1 ¹⁾	25.2
TL	10	9.0 ± 2.7 ¹⁾	31.3
阿司匹林	10	5.3 ± 4.1 ¹⁾	59.5

¹⁾ *P* < 0.05, 与对照组比

由表 3 可见,模拟肽 SP、SL 组的抗炎疗效,仅次于阿司匹林的抗炎效果;而模拟肽 TL、QL 的抗炎效果依次降低,但也起到了一定的抗炎疗效。

3.4 HE 染色观察小鼠耳朵病理学改变 在 H-E 染色的切片的电镜下可以看到正常小鼠耳朵组织间隙很窄,有完整的连成一片的窄细的横纹肌纤维组织,而经二甲苯致炎的小鼠耳朵组织中有明显的水肿,间隙增宽,横纹肌纤维离散断裂,血管充血、扩张,有慢性炎细胞(以淋巴细胞、单核细胞为主)的浸润,而经口服了阿司匹林的二甲苯致炎鼠耳,可以看出水肿不明显,横纹肌纤维未断裂,血管扩张也不明显,只有微量的炎性细胞的浸润。注射了合成七肽的二甲苯致炎鼠耳,水肿和横纹肌纤维断裂的现象都较轻,只有微量的炎性细胞的浸润,说明合成七肽在治疗二甲苯致小鼠耳肿胀过程中表现出了一定的抗炎效果。

4 讨论

本研究结果表明,4 段 CCR5 短肽片段能模拟大蛋白的功能,在治疗二甲苯致小鼠耳肿胀过程中均具有显著的抗炎效果,其抑制率分别为 53.4%、47.3%、31.3%、25.2%,效果显著 (*P* < 0.05)。以此可以说明与 CCR5 竞争结合的模拟肽在治疗二甲苯致小鼠耳肿胀过程中发挥着重要的作用。

CCR5 与其特异性配体 RANTES、MIP-1、MIP-1β 结合后,激活 G 蛋白并最终引起细胞内 Ca^{2+} 浓度上升,蛋白激酶 C 的活化,表现为白细胞的趋化性及炎症反应等各种生理功能。与 CCR5 膜外第一、二环特异结合的模拟肽可能阻断了 CCR5 及其配体的结合来抑制白细胞向炎症部位的游走,减轻了炎性细胞对细胞的浸润,从而减轻了组织的变性和坏

死^[7]。可见与 CCR5特异性结合的模拟肽参与炎症早期的渗出和肿胀有明显的拮抗的作用,具体表现在经过 4段短肽治疗过的小鼠耳朵与小鼠耳肿胀模型相比水肿都比较轻,细胞水肿间隙明显变窄,横纹肌断裂现象不明显,炎细胞数量明显减少,小血管扩张充血现象也得到了很大的改善。本研究为炎症的靶向治疗提供了新的候选分子,并为进一步开发及

研制抗炎多肽药物奠定了坚实的实验学基础。本研究提示与 CCR5膜外第一、二环特异结合的模拟肽可能模拟了 CCR5配体的结合表位,以往的研究:“趋化因子及其受体被视做抗炎因子的主要靶分子”在本实验中得到了很好的验证。因此趋化因子的选择性抑制剂在炎症治疗方面可以作为一种潜在的治疗炎症的策略^[5 6]。

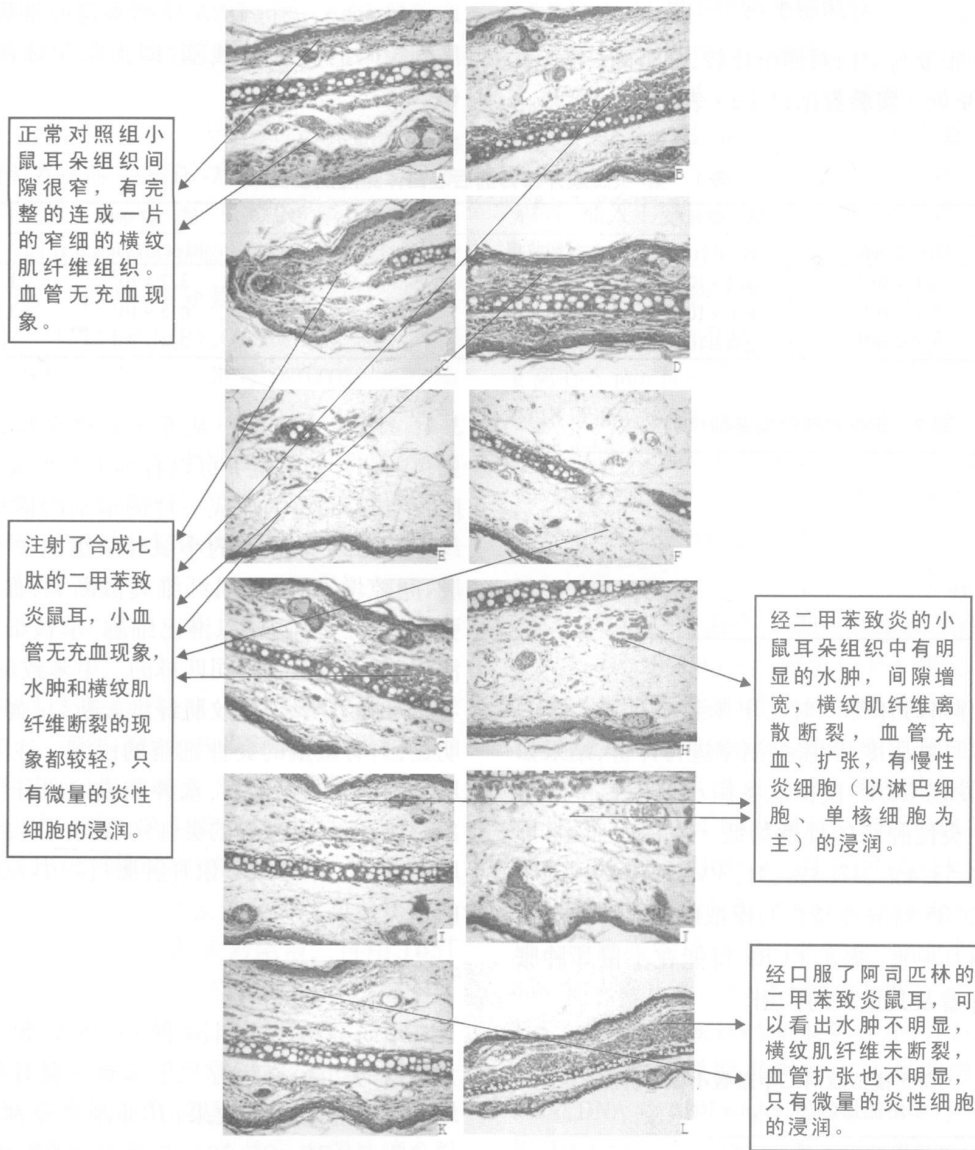


图 1 小鼠耳朵组织的病理检查结果

A正常对照组; B、C-模拟肽 SP组; D-模拟肽 SL组; E、F-模拟肽 QL组; G-模拟肽 TL组; H、J耳肿胀模型组; K、L-阿司匹林组(其中 K为高倍镜、L为低倍镜)

【参考文献】

[1] Emabelle R, Anthony LD, Sandra CVC. A Synthetic Peptide Fragment Derived from RANTES is a Potent Inhibitor of HIV-1 Infectivity Despite a Surprising Lack of CCR5 Receptor Affinity

[J]. Letters in Peptide Science 2003(10): 637

[2] 刘焜,陈家伟,杨金奎,等.趋化因子受体 CCR5 CCR3在 1型糖尿病患者中的表达 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004 20 (5): 428

[3] 田振国.通腑宁颗粒对二甲苯引起小鼠耳肿胀模型影响的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2007 34(10): 1494.

[4] 范玉玲, 崔福德, 杨明世, 等. 齐墩果酸和齐酞酸钠对二甲苯引起的小鼠耳肿胀抑制作用的研究 [J]. 中医药研究, 2004, 18(6): 37.

[5] RICHARD P, MacDERMOTT. Chemokines in the Inflammatory Bowel Diseases [J]. Journal of Clinical Immunology, 1999, 19(5): 266

[6] Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis [J]. Inflammation Research, 2004, 53: 585

[7] Loescher P, Uguccioni M, Bordoli L, et al. CCR5 is characteristic of Th1 Lymphocytes [J]. Nature, 1998, 391: 344.

[收稿日期] 2009-09-23
[修回日期] 2009-11-10

(上接第 96页)

【参考文献】

[1] 刘会臣. 手性药物的药代动力学立体选择性及其影响因素研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2003, 19(5): 380

[2] 罗明可. 现代色谱法在手性药物拆分中的应用进展 [J]. 福建医药杂志, 2004, 26(5): 156.

[3] 申睿, 谢剑炜. 手性选择剂及其在手性药物分离分析中的应用进展 [J]. 国外医学·药学分册, 2005, 32(6): 413.

[4] Bhushan R, Gupta D. HPLC resolution of thioridazine enantiomers from pharmaceutical dosage form using cyclodextrin-based chiral stationary phase [J]. Chromatogr B, 2006, 837(1-2): 133.

[5] 徐颖, 邓小燕, 李树刚, 等. β -环糊精手性流动相添加剂法拆分佐匹克隆对映体 [J]. 药学进展, 2006, 30(9): 418.

[6] Shengli Ma, Sheny Shen, Nizar Haddad. Chromatographic and spectroscopic studies on the chiral recognition of sulfated β -cyclodextrin as chiral mobile phase additive. Enantiomeric separation next term of a chiral amine [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(8): 1232.

[7] Takahisa E, Engel KH. 2, 3-Di-O-methoxyethyl-6-O-tert-butylidimethylsilyl- β -cyclodextrin: a new class of cyclodextrin derivatives for gas chromatographic separation of enantiomers [J]. Chromatogr A, 2005, 1063(1-2): 181.

[8] Wang DX, Abdul M. Separation of Enantiomers of a Chiral Lactone on SolGel G as Chromatography Capillary Columns of Poly(methylsiloxane) Stationary Phase with Pendant Permethylated β -Cyclodextrin [J]. Chin J Anal Chem, 2007, 35(3): 360.

[9] 周美杨, 凌云, 申刚义, 等. 新型噻吩杂环衍生化 β -环糊精手性固定相合成及其气相色谱分离性能 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(3): 493.

[10] 侯经国, 王柱命, 何天稀, 等. 毛果芸香碱对映体的毛细管电泳手性分离 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(1): 64.

[11] 陈德英, 陈玉英, 戴荣继, 等. 毛细管区带电泳法拆分盐酸舍曲林对映体 [J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(5): 440.

[12] 黄碧云, 赵鑫, 袁牧, 等. 苯磺酸氨氯地平对映体的高效毛细管电泳手性分离 [J]. 药学进展, 2009, 33(5): 222.

[13] Mohanty A, Dey J. A giant vesicle forming single tailed chiral surfactant for enantioseparation by micellar electrokinetic chromatography [J]. Chem Commun, 2003, 12: 1384.

[14] Mohanty A, Dey J. Vesicles as pseudostationary phase for enantiomer separation by capillary electrophoresis [J]. Chromatogr A, 2005, 1070: 185.

[15] Dey J, Mohanty A, Roy S, et al. Cationic vesicles as chiral selector for enantioseparations of nonsteroidal antiinflammatory drugs by micellar electrokinetic chromatography [J]. Chromatogr A, 2004, 1048(1): 127.

[16] 黄宗玉, 杜加秋, 蔡文. 高效毛细管电泳法测定酒石酸托特罗定中左旋对映体杂质 [J]. 药物分析杂志, 2001, 21(5): 351.

[17] 赵卫, 杭太俊, 葛萍. 罗哌卡因对映异构体的三甲基- β -环糊精 HPLC 手性拆分研究 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(10): 1183.

[18] Lin B, Shi ZG, Zhang HJ, et al. Perphenylcarbamoylated β -cyclodextrin bonded-silica particles as chiral stationary phase for enantioseparation by pressure assisted capillary electrochromatography [J]. ELECTROPHORESIS, 2006, 27(15): 3057.

[19] Grigorean G, Cong X, Lebrilla CB. Chiral analyses of peptides by ion molecule reactions [J]. Int J Mass Spectrom, 2004, 23(3): 71.

[20] 于湛, 闫存玉, 宋凤瑞, 等. 七-(2, 6-二-O-甲基)- β -环糊精对薄荷醇对映体手性识别的电喷雾质谱研究 [J]. 分析化学, 2006, 34(5): 671.

[21] 张敏, 史真, 白银娟, 等. 环糊精对 (R)、(S)-2-丁醇手性分子识别的电喷雾电离质谱研究 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(5): 56.

[22] Claudia D, Diana VR, Fabio P, et al. Enantiomeric separation of baclofen by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry with sulfolobutylether- β -cyclodextrin as chiral selector in partial filling mode [J]. Journal of Chromatography B, 2008, 875(1), 280.

[23] Wang RQ, Ong TT, Ng SC. Synthesis of cationic β -cyclodextrin derivatives and their applications as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography [J]. Chromatogr A, 2008, 1203(2): 185.

[24] Kasai HF, Tsubuki M, Takahashi K, et al. Separation of stereoisomers of several furan derivatives by capillary gas chromatography mass spectrometry, supercritical fluid chromatography and liquid chromatography using chiral stationary phases [J]. Chromatogr A, 2002, 977(1): 125.

[25] 李伟, 谢剑炜, 翟言强, 等. D、L-色氨酸对映体的环糊精手性识别荧光定量分析 [J]. 军事医学科学院院刊, 2002, (2): 20.

[收稿日期] 2009-12-24
[修回日期] 2010-02-19