بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه - گروه شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد - گرایش شیمی فیزیک

عنوان:

بررسی شیمی فیزیکی ساختار و بر هم کنش HSA با داروهای آملودیپین و پروپرانولل در حضور و غیاب میدان مغناطیسی

استا د راهنما:

دکتر محمد رضا حسین دخت

اساتید مشاور:

دکتر جمشید خان چمنی

محمود بحرالعلوم

نگارش:

زینب روحبخش زائری

بهمن ۱۳۸۷

انجام این پروژه با کمک صندوق حمایت از پژوهشگران کشور میسر شده است که بدین وسیله تشکر خود را اعلام می دارم.

بدین وسیله از پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه فردوسی نیز که کمکی در پیش برد این پروژه داشتند قدر دانی می گردد.

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

با نهایت تشکر و قدردانی از

استاد راهنمای عزیزم **آقای دکتر حسین دخت** که در تمام مدت تحصیل دانشگاهی و انجام پروژه با روی باز و حسن خلق خود مشکلاتم را پاسخگو بوده و با ارائه راهنمایی های ارزنده خود، راهگشایم بوده اند،

استاد مشاورگرامی **آقای بحرالعلوم** که همیشه از راهنمایی ها و حمایت هایشان بهره های زیادی بردم،

استاد مشاور محترم **آقای دکتر چمنی** که با لطف فراوان خود کمک های زیادی در انجام پروژه و نگارش پایان نامه ارائه نمو ده اند،

و نیز **آقای دکتر طیاری** و **آقای دکتر آسوده** که زحمت مطالعه و داوری این پروژه را به عهده داشتند.

و در آخر از تمام دوستان خوبم که در این مدت با هم دوران خوبی را گذرانده‌ایم، به ویژه **خانم جوان** که همیشه از راهنمایی های خوبشان استفاده کردم،

و همچنین از برادر خوبم، **مهدی**، که همیشه کمک حال من بوده است، سپاسگزارم.

چکیده:

هدف از این پروژه، مطالعه ی بر هم کنش بین دو دارو، آملودیپین و پروپرانولل، با HSA در شرایط بافر زیستی (pH ۷/٤) در غیاب و حضور میدان مغناطیسی (۳ و ۵۲ میلی تسلا)، با استفاده از روشهای طیف سنجی UV-Vis، فلورسانس و دو رنگ نمایی دورانی (CD) بود.

با استفاده از اطلاعات طیف سنجی UV-Vis و استفاده از معادله ی هیل، ثابت پیوندی (K)، ظرفیت پیوندی (g) و ثابت هیل برای بر هم کنش هر دو دارو محاسبه شدند. نتایج نشان دادند که پارامترهای پیوندی در غیاب و حضور میدان مغناطیسی متفاوت بودند.

طیف های فلورسانس HSA در حضور آملودیپین نشان دادند که شدت فلورسانس کاهش پیدا کرد، در نتیجه این دارو به عنوان یک خاموش کننده ی فلورسانس عمل می کند؛ در حالیکه، در حضور پروپرانولل، شدت فلورسانس افزایش می یابد. میدان مغناطیسی نیز در هر دو مورد، باعث افزایش شدت فلورسانس شد.

طیف CD نشان داد که ساختار دوم پروتئین در حضور هر دو داروی آملودیپین و پروپرانولل تغییر می کند. به این صورت که، که آملودیپین و پروپرانولل به ترتیب افزایش و کاهش درصد مارپیچ آلفا را در ساختار HSA القا کردند. کاربرد میدان مغناطیسی در این مورد نیز، باعث یک تغییر کوچک در طیف CD شد.

کلید واژه: آملودیپین؛ پروپرانولل؛ HSA؛ طیف سنجی UV-Vis؛ طیف سنجی فلورسانس؛ طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی؛ میدان مغناطیسی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱ سرم آلبومین انسانی (HSA) ۲

۱-۱-۱ ساختمان HSA ۲

۱-۱-۲ اتصال لیگاندهای مختلف به HSA ٤

۱-۲ پیوند شدن لیگاند به ماکروملکول ٦

۱-۲-۱ پیوند شدن لیگاند به ماکروملکول دارای یک مجموعه جایگاه یکسان و مستقل ۷

۱-۲-۲ پیوند شدن لیگاند به ماکروملکول دارای چندین مجموعه از جایگاه های مستقل ۸

۱-۲-۳ پیوند شدن لیگاند به ماکروملکول با چندین جایگاه یکسان و وابسته ۹

۱-۲-٤ تشخیص نوع برهم کنش لیگاند به ماکروملکول برای یک دسته جایگاه ۹

۱-۳ معرفی داروها ۱۱

۱-۳-۱ آملودیپین (باسیلات) ۱۱

۱-۳-۱-۱ مکانیسم عمل آملودیپین ۱۲

۱-۳-۲ پروپرانولل ۱۳

۱-۳-۲-۱ مکانیسم عمل پروپرانولل ۱٤

۱-٤ میدان مغناطیسی ۱۵

۱-٤-۱ میدان مغناطیسی زمین ۱٦

۱-٤-۲ تأثیر مغناطیسی بر روی سیستم های زیستی ۱۷

۱-٤-۳ میدانهای مغناطیسی ساکن ۱۹

۱-٤-۳-۱ میدان مغناطیسی ساکن ضعیف ۱۹
۱-٤-۳-۲ میدان مغناطیسی ساکن متوسط ۲۰
۱-٤-۳-۳ میدان مغناطیسی ساکن قوی و فوق قوی ۲۱

فصل دوم: بخش تجربی

۲-۱ وسایل و دستگاه ها ۲٤
۲-۲ مواد مورد استفاده ۲٤
۲-۳ روشها ۲۵
۲-۳-۱ طیف سنجی جذبی مرئی- فرابنفش (UV-Vis) ۲۵
۲-۳-۱-۱ تعیین ضریب جذب HSA ۲۵
۲-۳-۱-۲ تعیین ضریب جذب داروی آزاد ۲۵
۲-۳-۱-۳ تعیین ضریب جذب داروی اتصال یافته به HSA ۲٦
۲-۳-۱-٤ بدست آوردن کمیت های ترمودینامیکی اتصال دارو به HSA ۲٦
۲-۳-۱-۵ اثر میدان مغناطیسی در مطالعات طیف سنجی UV ۲٦
۲-۳-۲ طیف سنجی فلورسانس ۲۷
۲-۳-۲-۱ مطالعه برهم کنش داروی آملودیپین و HSA ۲۷
۲-۳-۲-۲ مطالعه برهم کنش داروی پروپرانولل و HSA ۲۷
۲-۳-۲-۳ اثر میدان مغناطیسی در طیف سنجی فلورسانس ۲۷
۲-۳-۳ طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) ۲۸
۲-۳-۳-۱ مطالعه برهم کنش دارو و HSA ۲۸
۲-۳-۳-۲ اثر میدان مغناطیسی در طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ۲۸

فصل سوم: بحث و نتیجه گیری

۳-۱ اسپکتروسکوپی جذبی در ناحیه مرئی و فرابنفش (UV-Vis) ۳۰

۳-۱-۱ محاسبه‌ی ضریب جذب HSA در غیاب و حضور میدان مغناطیسی ۳۰

۳-۱-۲ بررسی اتصال داروی آملودیپین به HSA ۳۳

۳-۱-۳ بررسی اتصال داروی پروپرانولل به HSA ٤٥

۳-۲ طیف سنجی فلورسانس ٥٦

۳-۲-۱ مطالعه برهم کنش داروی آملودیپین و HSA ٥٦

۳-۲-۲ مطالعه برهم کنش داروی پروپرانولل و HSA ٥٩

۳-۳ طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) ٦٢

۳-۳-۱ مطالعه برهم کنش داروی آملودیپین و HSA ٦٣

۳-۲-۲ مطالعه برهم کنش داروی پروپرانولل و HSA ٦٧

۳-٤ نتیجه گیری کلی ۷۱

۳-٤-۱ بررسی اتصال داروها به HSA ۷۱

۳-٤-۲ تأثیر میدان مغناطیسی بر روی اتصال داروها به HSA ۷۱

۳-٥ پیشنهادات ۷۲

فهرست شکل ها و نمودارها

شکل ۱-۱- ساختار HSA ۳

شکل ۱-۲- نمودار اسکاچارد برای n جایگاه مستقل و یکسان ۸

شکل ۱-۳- آملودیپین باسیلات ۱۱

شکل ۱-٤- پروپرانولل ۱۳

شکل ۱-۵- میدان مغناطیسی زمین ۱۷

شکل۳-۱- طیف HSA با غلظت های مختلف ۳۰

شکل ۳-۲- نمودار کالیبراسیون HSA در طول موج ۲۷۸ نانومتر ۳۱

شکل ۳-۳- مقایسه نمودارهای کالیبراسیون HSA در میدان های مختلف ۳۱

شکل ۳-٤ - طیف آملودیپین با غلظت های مختلف ۳۳

شکل ۳-۵- نمودار کالیبراسیون آملودیپین در طول موج ۲۳۹ نانومتر ۳٤

شکل ۳-٦- مقایسه جذب آملودیپین در طول موج ۲۳۹ نانومتر در میدانهای مختلف ۳٤

شکل ۳-۷- نمودار کالیبراسیون آملودیپین در طول موج ۳٦۵ نانومتر ۳۵

شکل ۳-۸ - مقایسه جذب آملودیپین در طول موج ۳٦۵ نانومتر در میدانهای مختلف ۳۵

شکل ۳-۹ - نمودار ۱/A بر حسب ۱/P برای آملودیپین در طول موج nm ۲۳۹ ..... ۳۸

شکل ۳-۱۰ - اثر افزایش آملودیپین بر طیف HSA ٤۰

شکل ۳-۱۱- جذب پروتئین HSA درطول موج nm ۲۳۹ در حضور غلظت های مختلف آملودیپین، در غیاب و حضور میدان های مختلف ٤۰

شکل ۳-۱۲- ایزوترم پیوندی آملودیپین ٤۱

شکل ۳-۱۳- ایزوترم ها ی پیوندی برهم کنش آملودیپین با HSA در میدان های مختلف ٤۱

شکل ۳-۱٤- نمودار اسکارچارد برهم کنش آملودیپین با HSA..... ٤۲
شکل ۳-۱۵– نمودارهای اسکاچارد برهم کنش آملودیپین با HSA در میدانهای مختلف ٤۲
شکل ۳-۱٦– نمودار هیل برهم کنش آملودیپین با HSA ٤۳
شکل ۳-۱۷- طیف پراپرونولل با غلظت های مختلف ٤۵
شکل ۳-۱۸- نمودار کالیبراسیون پروپرانولل در طول موج ۲۱٤ نانومتر..... ٤٦
شکل ۳-۱۹- مقایسه جذب پروپرانولل در طول موج ۲۱٤ نانومتر در میدان های مختلف..... ٤٦
شکل ۳-۲۰- نمودار کالیبراسیون پروپرانولل در طول موج ۲۸۹ نانومتر..... ٤۷
شکل ۳-۲۱- مقایسه جذب پروپرانولل در طول موج ۲۸۹ نانومتر در میدان های مختلف..... ٤۷
شکل ۳-۲۲- نمودار کالیبراسیون پروپرانولل در طول موج ۳۱۹ نانومتر..... ٤۸
شکل ۳-۲۳- مقایسه جذب پروپرانولل در طول موج ۳۱۹ نانومتر در میدان های مختلف..... ٤۸
شکل ۳-۲٤- نمودار ۱/A بر حسب ۱/P برای پروپرانولل در طول موج ۲۸۹ nm..... ٤۹
شکل ۳-۲۵- اثر افزایش پروپرانولل بر طیف HSA..... ۵۱
شکل ۳-۲٦- جذب ۲۸۹ nm پروتئین HSA در حضور غلظت های مختلف پرپرانولل، در غیاب و حضور میدان های مختلف ۵۱
شکل ۳-۲۷- ایزوترم پیوندی پروپرانولل..... ۵۲
شکل ۳-۲۸- مقایسه ی ایزوترم های پیوندی برهم کنش پروپرانولل با HSA در میدان های مختلف... ۵۲
شکل ۳-۲۹- نمودار اسکارچارد برهم کنش پروپرانولل با HSA..... ۵۳
شکل ۳-۳۰– نمودارهای اسکاچارد برهم کنش پروپرانولل با HSA در میدان های مختلف..... ۵۳
شکل ۳-۳۱– نمودار هیل برهم کنش پروپرانولل HSA ۵٤
شکل ۳-۳۲- اثر آملودیپین بر روی طیف فلورسانس HSA..... ۵٦

شکل ۳-۳٤- شدت فلورسانس HSA در طول موج ۳٤۰ nm در حضور غلظت های مختلف آملودیپین، در غیاب و حضور میدان های مختلف ۵۷
شکل ۳-۳۵- اثر پروپرانولل برطیف فلورسانس HSA ۵۹
شکل ۳-۳۷- شدت فلورسانس HSA در طول موج ۳٤۰ nm در حضور غلظت های مختلف پروپرانولل در غیاب و حضور میدان های مختلف ٦۱
شکل ۳-۳۸- اثر افزایش آملودیپین بر طیف دو رنگ نمایی دورانی HSA ٦۳
شکل ۳-۳۹- اثرافزایش آملودیپین بر طیفHSA در طول موج ۲۲۰ nm ٦٤
شکل ۳-٤۰- اثرافزایش آملودیپین بر طیف HSA در طول موج ۲۲۰ nm در میدان های مختلف ٦٤
شکل ۳-٤۱- اثر افزایش پروپرانولل بر طیف دو رنگ نمایی HSA ٦۷
شکل ۳-٤۲- اثر افزایش پروپرانولل بر طیف HSA در طول موج ۲۲۰ nm ٦۸
شکل ۳-٤۳- اثر افزایش پروپرانولل بر طیف HSA در طول موج ۲۲۰ nm در میدان های مختلف ٦۸

فهرست جدول ها

جدول ۳-۱- مقادیر ضریب جذب مولی HSA در طول موج ۲۷۸ نانومتر در میدانهای مختلف ۳۲

جدول ۳-۲- مقادیر ضریب جذب مولی آملودیپین آزاد در طول موج های ۲۳۹ و ۳٦٥ نانومتر در میـدان های مختلف ۳٦

جدول ۳-۳- مقادیر ضریب جذب مولی آملودیپین اتصال یافته در طول موجهای ۲۳۹ و ۳٦٥ نـانومتر در میدانهای مختلف ۳۸

جدول ۳-٤- ثابت های پیوندی آملودیپین در طول موجهای ۲۳۹ نانومتر در میدان های مختلف..... ٤٤

جدول ۳-٥- مقادیر ضریب جذب مولی پروپرانولل آزاد در طول موج هـای ۲۱٤ و ۲۸۹ و ۳۱۹ نـانومتر در میدان های مختلف ٤۹

جدول ۳-٦- مقادیر ضریب جذب مولی پروپرانولل اتصال یافتـه در طـول موجهـای ۲۱٤ و ۲۸۹ و ۳۱۹ نانومتر در میدان های مختلف..... ٥۰

جدول ۳-۷- ثابت های پیوندی پروپرانولل در طول موج nm ۲۸۹ نانومتر در میدان های مختلف. ٥٥

جدول۳-۸- درصد ساختارهای HSA، پس از افزایش حجم های متفاوتی از آملودیپین ٦٥

جدول ۳-۹-درصد ساختارهای HSA، پس از افزایش حجم های متفاوتی از آملودیپین، در حضور میدان ۳ mT..... ٦٥

جدول ۳-۱۰- درصد ساختارهای HSA، پس از افزایش حجم هـای متفـاوتی از آملـودیپین، در حـضور میدان ٥۲ mT..... ٦٦

جدول ۳-۱۱- درصد ساختارهای HSA، پس از افزایش حجم های متفاوتی ازپروپرانولل..... ٦۹

جدول ۳-۱۲- درصد ساختارهای HSA، پس از افزایش حجم هـای متفـاوتی ازپروپرانولـل، در حـضور میدان ۳ mT..... ٦۹

جدول ۳-۱۳- درصد ساختارهای HSA، پس از افزایش حجم هـای متفـاوتی ازپروپرانولـل، در حـضور میدان ۵۲ mT ۷۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱ سرم آلبومین انسانی (HSA)

سرم آلبومین انسانی (HSA)، با غلظت۰/٦۳ میلی مولار فراوان ترین پروتئین در پلاسمای خون است که در کبد تولید می شود [۱]. HSA از ۵۸۵ آمینو اسید منفرد با جرم ملکولی ٦٦٤۱۱ $g\ mol^{-1}$ تشکیل شده است. که اعمال زیستی زیادی از جمله تنظیم فشار اسمزی کلوئید و انتقال لیگاندهای مختلف را در سیستم گردش خون عهده دار است [۲]. HSA نقش مهمی در حمل و استقرار[۱] گستره وسیعی از مواد داخلی و خارجی مثل اسیدهای چرب، هورمون ها و داروها بر عهده دارد [۵ و ٤ و۳]. در نتیجه دانستن تمایل یک لیگاند برای اتصال به HSA اهمیت زیادی دارد.

۱-۱-۱ ساختمان HSA

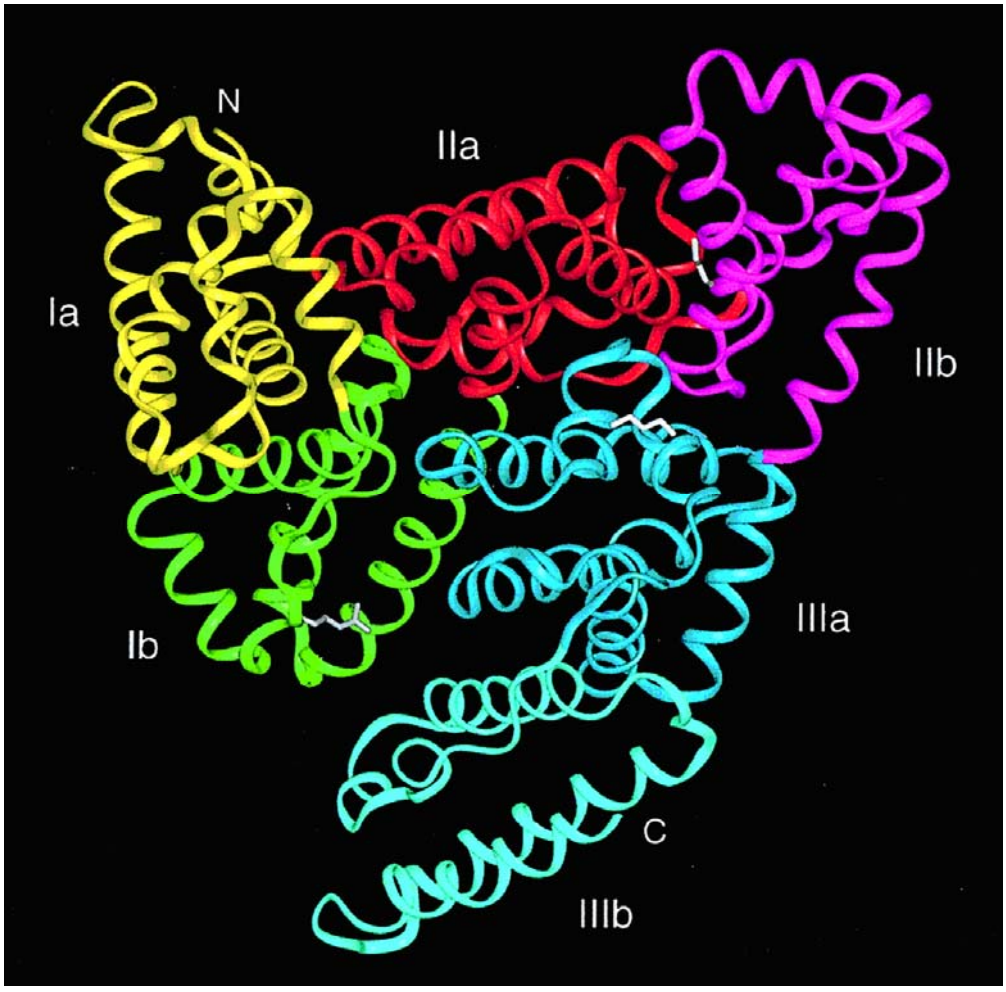
ساختار سه بعدی HSA بوسیله ی کریستالوگرافی اشعه ایکس تعیین شده است [۳]. با توجه به ساختار کریستالی HSA یک ملکول نامتقارن قلبی شکل با پهنای ۸ نانومتر، ضخامت ۳ نانومتر و ارتفاع ٦/۹ نانومتر که تقریباً می توان سطح مقطع آن را به صورت یک مثلث متساوی الاضلاع فرض کرد [٦].

این پروتئین کروی از سه دامنه مارپیچی آلفا مشابه (I, II, III) تشکیل شده است، که هر دامنه به دو زیر دامنه (A و B) تقسیم می شود [۷ و ۳].

مکان های اصلی پیوند شدن لیگاند روی HSA در حفره های آبگریزی در زیر مجموعه های IA و IIA هستند، که به ترتیب مربوط به جایگاه I و جایگاه II می شوند. جایگاه I با بیشتر ملکول های خنثی، آبگریزی، حجیم و هتروسیکلی با یک بار منفی بوسیله برهم کنش هیدروفوبی قوی پیوند می دهد

۱. Deposition

(برای مثال بیلی روبین و فنیل بوتازون). جایگاه II اساساً بوسیله ی برهم کنش های دو قطبی – دو قطبی، واندروالسی و یا پیوندهای هیدروژنی با خیلی از کربوکسیلیک اسیدهای آروماتیک با یک بار منفی در یک انتهای ملکول پیوند می شود (مثلاً ایبوپروفن و دیازپام) [۱۰ و ۹ و ۸]. بیشتر ترکیبات به یکی از این دو جایگاه پیوندی اصلی پیوند می شوند [۹]. HSA شامل یک تک باقیمانده تریپتوفان در موقعیت ۲۱٤ در دامنه IIA است که فلورسانس ذاتی آن به لیگاندهای پیوند شده ی مجاورحساس است [۱۱ و ۱۲].



شکل ۱-۱- ساختار HSA

۱-۱-۲ اتصال لیگاندهای مختلف به HSA

بسیاری از داروها و ملکول های کوچک (لیگاندها) به طور برگشت پذیری بـه آلبـومین و دیگـر اجـزای سرم پیوند می شوند که نقش حامل دارند [۱۳].

اتصال لیگاندهای مختلف به HSA، مانند پاک کننده[۱] های کاتیونی [١٤]، پاک کننده هـای آنیـونی [١٥ و ١٦]، اسیدهای آلیفاتیک [١٧]، نانو ذرات [١٨]، فلزات مختلفی از قبیـل روی [١٩]، کـادمیم [١٩] ، مـس [٢٠] ، کبالت [٢١]، نقره، نیکل، منگنز[٢٢]، ویتامین های مختلفی مثل ویتامین B١٢ [٢٣]، آمینـو اسـیدها [٢٤] و ... با روشهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است.

HSA معمولاً به عنوان یک پروتئین مدل برای توصیف کمپلکس پروتئین – دارو مورد استفاده قرار می گیرد [٢٧ و ٢٦ و ٢٥].

اطلاعات برهم کنش دارو و HSA ما را در فهم بهتر جذب و توزیع دارو کمک می کند. بنابراین مطالعـه روی این جنبه می تواند اطلاعاتی از لحاظ ساختاری فراهم کند که اثر بخشی مهم داروهـا را تعیـین مـی کند و یک حوزه ی تحقیقاتی مهم در شیمی، علوم زیستی و پزشکی بوجود آورده است[٢٨ و ٣].

تمایل داروها به پروتئین به طور مستقیم روی غلظت دارو در جایگاه پیوندی و مـدت زمـان مـؤثر بـودن دارو و مقدارشان در اعمال زیستی در سیستم زنده مؤثر می باشد [٢٩ و ٢٥].

به این دلیل که حرکت داروها در پلاسما و رسیدن به بافت هدف بوسیله ی پیوند شدن بـه HSA انجـام می شود، HSA در جذب، پخش، متابولیسم و دفع داروها شرکت دارد. پیونـد قـوی مـی توانـد غلظـت داروهای آزاد در پلاسما را کاهش دهد، در حالیکه پیوند ضعیف منجر به یک نیمه عمر کوتـاه یـا توزیـع ضعیف شود [١٠].

---

١. Surfactant

وقتی که داروهای به HSA پیوند می شوند به طور همزمان انواع مختلفی از برهم کنش ها بین داروها و HSA ممکن است اتفاق بیافتد، که پیوند شدن متعاون[۱]، غیر متعاون[۲] و پیوند شدن رقابتی[۳] مثال هایی از این بر هم کنش هاست [۹].

به منظور درک بهتر برهم کنش های مختلف بین داروها و HSA، میزان تمایل و جایگاه قرارگرفتن داروها روی HSA باید تعیین شود. روش های مختلفی برای بررسی پیوند شدن داروها به آلبومین گزارش شده است، مثل دیالیز تعادلی [۳۰]، اولترافیلتراسیون [۳۱]، میکرواستخراج فاز جامد [۳۲]، اسپکتروسکوپی فلورسانس [۳۳]، الکتروفورز مویینه [۳٤] و روش های کروماتوگرافی [۳۵]. مکان پیوند شدن داروها روی HSA معمولاً با استفاده از جایگزینی رقابتی ردیاب های فلورسانس مطالعه می شود [۳۸ و ۳۷ و ۳٦].

برهم کنش HSA با داروهای ضد سرطان [٤۰ و ۳۹]، داروهای ضد فشار خون [٤۱]، فلاونویدها [٤۲]، اسیدهای آلیفاتیک [۱۷]، داروهای ضد قارچ و ضد آلرژی [٤۳]، اکسازپام [٤٤]، ایبوپروفن و دیازپام [۹ و ۸] و آسپرین [٤۵] و .... به روش های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است.

۱. Co-operative
۲. Anti co-operative
۳. Competitive

۱-۲ پیوند شدن لیگاند به ماکروملکول

مطالعه پیوند شدن ملکول ها و یون های کوچک به ماکروملکول ها به منظور درک طبیعت انتقال و توزیع این گونه ها در سیستم های زیستی به این دلیل حائز اهمیت است که این قبیل برهم کنش ها نقش کلیدی در فرآیندهای انتقال و پخش ایفا می کنند. پیوند شدن لیگاند به ماکروملکول از نوع غیر کووالان می باشد [٤٦].

پیوند شدن، انواع مختلفی دارد. مثلاً یک ماکروملکول ممکن است فقط یک گروه شامل یک یا چند جایگاه پیوندی و یا چندین گروه پیوندی داشته باشد. جایگاه های پیوندی ممکن است یکسان و یا غیر یکسان، مستقل و یا وابسته باشند. در مورد جایگاه های وابسته، پر شدن یک جایگاه توسط یک لیگاند تمایل جایگاه های دیگر را برای پذیرش لیگاندها تغییر می دهد. برای درک نقش سیستم های بیوشیمیایی، نیاز است که تعداد جایگاه ها، میل پذیرش لیگاند آنها و میزان برهم کنش بین آن ها را بدانیم.

چندین روش اسپکتروفوتومتری به ویژه فلورسانس، CD، FT-IR، رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR) و UV-Vis برای بررسی پیوند شدن ملکول های کوچک به ماکروملکول و توضیح تغییرات کونفورماسیونی آنها مورد استفاده قرار می گیرد [٤٨ و ٤٧ و ٤٢]. چند تکنیک دیگر نیز مانند الکتروفورز مویینه و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) [٤٩] برای مطالعه شیوه پیوند شدن و ثابت های پیوندی مورد استفاده قرار می گیرد. از میان این روش ها فلورسانس، FT-IR و CD به دلیل حساسیت، انتخابگری و سهولت آن ها به صورت گسترده تری مورد استفاده قرار می گیرند.