

# 不同取代羟基黄酮类化合物与血清白蛋白的相互作用分析

董念<sup>1</sup>, 曹淑红<sup>2</sup>, 陈晓青<sup>1</sup>, 蒋新宇<sup>1</sup>

(1. 中南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410083; 2. 盐城工学院  
化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224051)

**摘要:** 采用荧光光谱法研究了 3 种具有不同取代羟基的黄酮类化合物芹菜素、染料木素和高良姜素与牛血清白蛋白 (BSA) 之间的相互作用, 测定了 3 种黄酮化合物与 BSA 的结合常数和结合位点, 并分析了它们对 BSA 的荧光猝灭过程及其之间的相互作用类型, 同时利用同步荧光和紫外吸收光谱探讨了它们对 BSA 构象的影响。结果表明, 3 种黄酮类化合物分子中的羟基数目以及位置对各化合物与 BSA 的作用有重要影响, 导致水溶液中这 3 种黄酮类化合物与 BSA 发生相互作用的强弱不同, 其作用力顺序为芹菜素 > 高良姜素 > 染料木素。

**关键词:** 荧光光谱; 紫外吸收光谱; 芹菜素; 染料木素; 高良姜素; 牛血清白蛋白; 取代羟基

**中图分类号:** Q512.1; O657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2009)01-0049-06

## Effect of Hydroxyl Substituent on the Interactions between Three Flavonoids and Bovine Serum Albumin

DONG Nian<sup>1</sup>, CAO Shu-hong<sup>2</sup>, CHEN Xiao-qing<sup>1</sup>, JIANG Xin-yu<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China; 2. School of Chemical and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China)

**Abstract** Fluorescence spectroscopy was used to investigate the interactions of bovine serum albumin (BSA) with flavonoids apigenin (Api), genistein (Gen) and galangin (Gal). The fluorescence quenching mechanism of BSA by each compound was studied. The binding constant and binding site number were also measured. The result indicated that BSA was reacted with each compound by hydrophobic force and static quenching mode. The influence of Api, Gen and Gal on the conformation of BSA was investigated using synchronous fluorescence and UV absorption spectroscopy. The interaction strength order of the compounds and BSA was as follows: Api > Gal > Gen, which indicated that the number and site of substituted hydroxyl in each molecule played an important role in the interaction of these compounds with BSA.

**Key words** fluorescence spectroscopy; UV absorption spectroscopy; apigenin; genistein; galangin; bovine serum albumin; substituted hydroxyl

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白, 药物进入血浆后与血清白蛋白结合, 再被运送到身体各部位而发挥药效<sup>[1]</sup>。因此, 考察药物分子与血清白蛋白的作用对了解药物的转运和代谢过程、阐明药物小分子与生物大分子相互作用的本质、蛋白质结构与其功能间的关系具有重要意义, 相关研究引起了人们的广泛关注<sup>[2]</sup>。由于牛血清白蛋白 (BSA) 与人血清白蛋白 (HSA) 具有相似的序列和构型, BSA 成为研究药物与蛋白相互作用的首选底物<sup>[3]</sup>。

黄酮类化合物存在于多种植物的组织中, 具有广泛的药物活性<sup>[4]</sup>。芹菜素即 5, 7, 4'-三羟基黄酮 (apigenin, Api), 具有抗肿瘤、抗氧化、降血脂、保护中枢神经系统等作用<sup>[5]</sup>。高良姜素即 3, 5, 7-三羟基黄酮 (galangin, Gal), 具有抗肿瘤、抗炎抗菌、局部麻醉等重要作用<sup>[6]</sup>。染料木素即 5, 7, 4'-三羟基异黄酮 (genistein, Gen), 具有抗癌、预防血管疾病的作用, 还具有雌性激素及抗雌激素的功

收稿日期: 2008-06-28 修回日期: 2008-07-25

基金项目: 江苏省高校自然科学基金研究项目 (06KJB150120); 国家自然科学基金资助项目 (20775092-B05102)

第一作者: 董念 (1984-), 女, 湖南永州人, 硕士研究生

通讯作者: 曹淑红, Tel: 0515-88298130, E-mail: jvchen@ycit.edu.cn

效<sup>[7-8]</sup>。分子生物学的许多研究表明, 黄酮类化合物发挥药效的目标靶分子为蛋白质, 药物活性的实质在于其与靶向分子之间的弱相互作用力, 而其活性的高低取决于它们与靶向分子间的作用方式及亲和力大小<sup>[9]</sup>。也有报道指出<sup>[10]</sup>, 黄酮类化合物母核上的羟基数目及其位置对其活性有重要影响, 但影响的本质很少有人研究。本文采用光谱法对 3 种母核上羟基数目相同但取代位置不同的黄酮类化合物 Api Gen 和 Gal 与 BSA 的相互作用进行了研究, 并探讨了其与 BSA 的作用规律。3 种黄酮类化合物的分子结构式如图 1 所示。

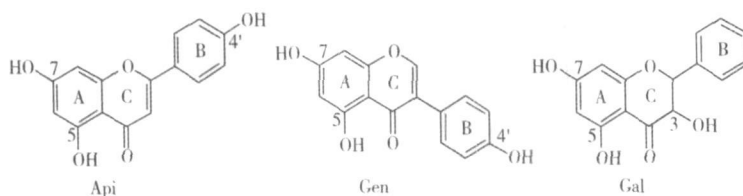


图 1 芹菜素、染料木素和高良姜素的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of Api Gen and Gal

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

FP-6500型荧光光谱仪(日本分光公司, 带恒温装置); UV-2450型紫外分光光度计(日本岛津公司, 带恒温装置); pHS-3C型精密 pH 计(上海分析仪器厂)。

牛血清白蛋白(BSA, Sigma公司, 第 V 组分, 相对分子质量: 68 000), 用 Tris 缓冲溶液配制成  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液; Tris-HCl 缓冲溶液:  $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 7.4), 含浓度为  $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl; Api Gen 和 Gal(上海友思生物技术有限公司, 纯度大于 9%) 分别溶于甲醇和水(体积比 1:1) 的混合溶液中, 均配制成  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液。所有试剂均为分析纯, 实验用水均为二次去离子水。

### 1.2 实验方法

用微量移液枪分别取适量的 Api Gen 及 Gal 溶液加入盛有 1.00 mL BSA 溶液的 10 mL 容量瓶中, 用水定容, 分别于 290 K、300 K、310 K 水浴中温育 1 h, 设置电压 420 V, 固定发射波长为 280 nm, 在 290~450 nm 范围内扫描各溶液的荧光光谱。

分别固定  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  及  $60 \text{ nm}$ , 记录上述黄酮化合物与 BSA 混合溶液的同步荧光光谱。

以水为参比, 在 250~400 nm 范围内, 分别扫描同浓度的上述黄酮化合物溶液和黄酮化合物与 BSA 混合溶液的紫外光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 芹菜素、染料木素与高良姜素对 BSA 荧光光谱的影响

BSA 分子中含有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基, 可产生内源荧光, 其中色氨酸的荧光强度最强, 对微环境的变化也最敏感<sup>[11]</sup>。Api Gen 和 Gal 三种黄酮化合物在水溶液中几乎不发射荧光。如图 2 所示, 在一定浓度的 BSA 溶液中, 随着 Api Gen 和 Gal 的分别加入, BSA 的荧光强度有规律地降低, 同时, Api 和 Gal 的加入还导致 BSA 的特征发射波长产生了微弱蓝移, 而 Gen 却使其发生微弱红移。该结果表明, 这 3 种黄酮化合物均与 BSA 发生了相互作用, 可能生成了黄酮-BSA 加合物或络合物, 并使 BSA 分子中能够产生内源荧光的某种氨基酸残基的微环境发生了变化<sup>[12]</sup>。

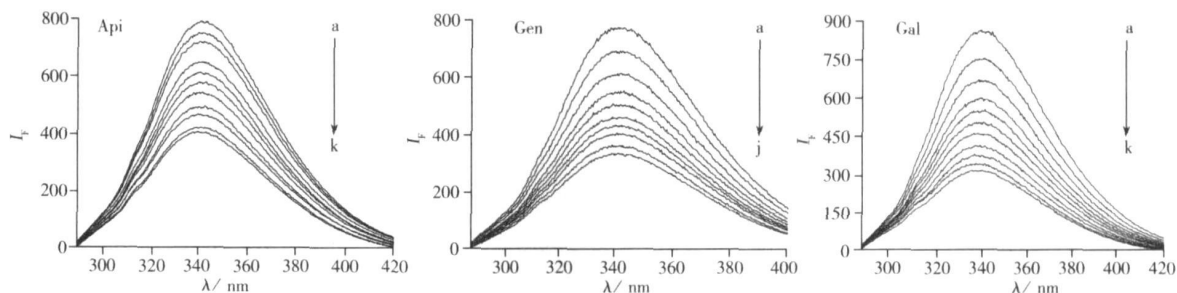


图 2 芹菜素、染料木素和高良姜素对 BSA 荧光光谱的影响

Fig 2 Effect of Apj Gen and Gal on the fluorescence of BSA

concentration of BSA:  $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Apj Gen Gal  $1.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; a-j 0-20  
40 60 80 100 120 140 160 180  $\mu\text{L}$ ; k: 200  $\mu\text{L}$ ;  $T = 310 \text{K}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{nm}$

## 2.2 芹菜素、染料木素及高良姜素导致的 BSA 荧光猝灭类型

上述实验表明, 3种结构相似的黄酮化合物 Apj Gen和 Gal均可导致 BSA 的荧光猝灭。一般情况下, 荧光猝灭可分为静态猝灭和动态猝灭。动态和静态猝灭作用可分别用动态猝灭结合常数  $K_{\text{sv}}$  和静态结合常数来表示, 这两个常数反映了荧光物质与猝灭剂之间相互作用的程度和猝灭作用的性质。对于动态猝灭过程, 猝灭剂对荧光分子的荧光猝灭效率遵循 Stern-Volmer 方程<sup>[13]</sup>:  $I_f^0/I_f = 1 + K_q \tau_0 c_0 = 1 + K_{\text{sv}} c_0$ , 式中  $I_f^0$  和  $I_f$  分别为未加入和加入猝灭剂后荧光物质的荧光强度,  $K_q$  为双分子猝灭过程的速率常数,  $\tau_0$  是无猝灭剂时荧光物质的平均荧光寿命,  $K_{\text{sv}}$  是动态猝灭常数,  $c_0$  是猝灭剂的浓度。

静态猝灭过程可描述为<sup>[14]</sup>:  $I_f^0/I_f = 1 + K c_0$ , 式中  $K$  为基态复合物的结合常数。

固定 BSA 浓度为  $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 分别向定量 BSA 溶液中加入不同浓度的 Apj Gen或 Gal 分别在 290和 310 K下扫描混合溶液的荧光光谱, 并记录 BSA 特征发射波长 340 nm 处的荧光强度, 根据 Stern-Volmer 方程绘制 BSA 的荧光猝灭曲线。结果表明, 对于 Apj Gen和 Gal 在 290和 310 K下, BSA 的 Stern-Volmer 曲线均呈现良好的线性关系。生物大分子的荧光寿命一般约为  $1 \times 10^{-8} \text{s}$ <sup>[15]</sup>, 猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为  $2 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[16]</sup>。由表 1 可知, Apj Gen和 Gal对 BSA 的荧光猝灭常数都远远大于  $2 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 且  $K_{\text{sv}}$  值随着温度的升高而减小。由此说明, 这 3个化合物对 BSA 的荧光猝灭可能是因与 BSA 结合形成了新的基态复合物而引起的静态猝灭过程。

表 1 芹菜素、染料木素和高良姜素与 BSA 作用的猝灭参数

Table 1 Fluorescence quenching parameters of BSA in the presence of Apj Gen and Gal

Flavonoid	T/K	$K_{\text{sv}} / (10^5 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q / (10^{13} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	r
Apj	310	1.02	1.02	0.994
	290	1.38	1.38	0.998
Gal	310	8.02	8.02	0.996
	290	11.1	11.1	0.995
Gen	310	1.49	1.49	0.998
	290	1.70	1.70	0.998

## 2.3 芹菜素、染料木素及高良姜素与 BSA 的结合模式

猝灭剂导致荧光物质的荧光猝灭, 说明猝灭剂与荧光物质发生了结合。对于具有荧光的生物大分子, 设每个分子上有  $n$  个独立的相同结合位点, 对于静态猝灭过程, 则其荧光强度与猝灭剂的浓度 ( $c_0$ )、结合常数 ( $K_a$ ) 及结合位点数 ( $n$ ) 之间遵循关系式<sup>[17]</sup>:  $\lg[(I_f^0 - I_f)/I_f] = \lg K_a + n \lg c_0$ , 利用上述实验数据, 以  $\lg[(I_f^0 - I_f)/I_f]$  对  $\lg c_0$  作图, 可得到  $K_a$  和  $n$  (表 2)。结果表明, Apj Gen和 Gal与 BSA 之间的结合力很强, 其中  $K_a(\text{Apj}) > K_a(\text{Gal}) > K_a(\text{Gen})$ 。随着  $K_a$  的增大, 结合位点数  $n$  也相应增大。外来物质和生物体内蛋白质等大分子间的结合力主要有疏水作用力、范德华力、静电引力和氢键等。根据结合反应前后热力学参数焓变  $\Delta H^\times$  和熵变  $\Delta S^\times$  的相对大小, 可以判断外来物质与蛋白质间的主要作用力类型。当  $\Delta H^\times > 0$ ,  $\Delta S^\times > 0$  时, 疏水作用力占主导; 当  $\Delta H^\times < 0$ ,  $\Delta S^\times > 0$  时, 认为是静电作用的结果; 而当  $\Delta H^\times < 0$ ,  $\Delta S^\times < 0$  时, 则主要是范德华力和氢键发挥作用<sup>[18]</sup>。根据 van't Hoff 及热

力学第一定律, 利用上述所得的  $K_a$  值计算 Api Gen和 Gal与 BSA 作用的热力学参数, 结果见表 2。可以看出, Api Gen和 Gal与 BSA 结合反应的  $\Delta G^\times < 0$  说明反应可自发进行;  $\Delta H^\times > 0$   $\Delta S^\times > 0$  说明它们之间的结合以疏水作用力为主导。

表 2 芹菜素、染料木素和高良姜素与 BSA 作用的结合常数、结合位点数和热力学参数

Table 2 Binding constants binding site number and thermodynamic parameters of interaction of BSA with Api Gen and Gal

Flavonoids	T/K	$K_a/(L \cdot mol^{-1})$	$n$	$r$	$\Delta G^\times/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta H^\times/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S^\times/(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$
Api	310	$2.14 \times 10^6$	1.27	0.997	-67.99	37.58	0.34
	290	$8.91 \times 10^5$	1.17	0.999	-67.99	34.17	0.34
Gal	310	$1.27 \times 10^6$	1.14	0.998	-28.75	36.21	0.21
	290	$7.94 \times 10^5$	1.11	0.998	-28.75	34.11	0.20
Gen	310	$6.92 \times 10^5$	1.04	0.998	-28.66	34.68	0.20
	290	$4.19 \times 10^5$	1.01	0.999	-28.66	32.64	0.20

## 2.4 芹菜素、染料木素及高良姜素对 BSA 构象的影响

2.4.1 同步荧光 同步荧光具有光谱简化、灵敏度高和选择性好等优点<sup>[19]</sup>。通过选择合适的波长差可在普通荧光光谱上相互重叠的荧光峰分开。对于蛋白质的同步荧光光谱, 当  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  时仅表现为酪氨酸残基的荧光, 当  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  时则表现为色氨酸残基的荧光<sup>[20]</sup>。因具有荧光的氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的极性相关, 故通过对改变发射波长所产生的结果进行分析, 可以判断蛋白质构象的变化<sup>[21]</sup>。固定 BSA 的浓度, 逐渐增大 Api Gen或 Gal的浓度, 分别扫描 BSA 在  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  时的同步荧光光谱图, 如图 3 所示。结果表明, 随着 Api Gen或 Gal浓度的增加, BSA 分子中酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光均被猝灭, 其中色氨酸残基的荧光被猝灭程度比酪氨酸残基大。同时, Gen使 BSA 的色氨酸特征荧光峰发生了微弱的红移, 表明该残基所处环境的疏水性降低, 蛋白质变得疏松。Api和 Gal使 BSA 的色氨酸特征荧光峰发生了微弱的蓝移, 表明该残基所处环境的疏水性增加, 蛋白质变得紧密<sup>[22]</sup>。可见, Api Gen和 Gal与 BSA 的作用可能是通过与色氨酸残基的结合而实现的。

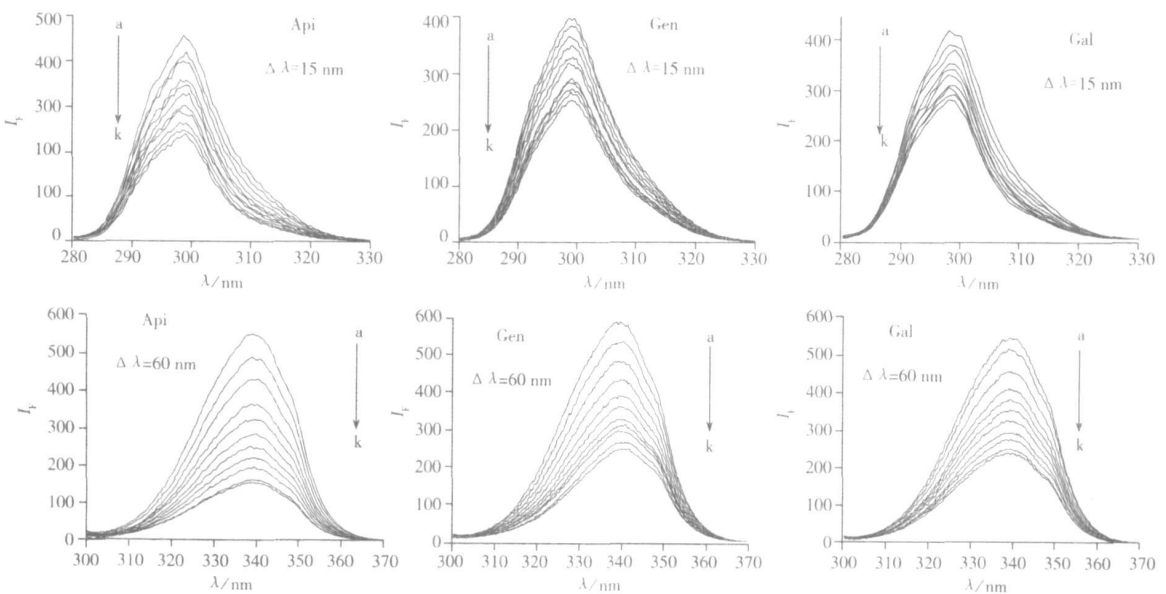


图 3 芹菜素、染料木素和高良姜素作用下 BSA 的同步荧光光谱

Fig. 3 Synchronous fluorescence spectra of BSA ( $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the presence of increasing Api Gen and Gal concentration of Api Gen and Gal ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; a-k 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200  $\mu\text{L}$  of Api Gen or Gal;  $T = 310 \text{ K}$ )

2.4.2 紫外吸收光谱 黄酮类化合物的紫外吸收光谱一般有 2 个主要吸收带, 分别为吸收带 I (300~400 nm) 和吸收带 II (240~300 nm), 它们分别相当于桂皮酰的吸收峰和苯甲酰的吸收峰<sup>[23]</sup>。图 4 分别是 Api Gen和 Gal及加入 BSA 后的紫外吸收光谱。从图 4 可知, Api Gen和 Gal的紫外吸收出现在吸收带 II 范围内。随着 BSA 的加入, Api和 Gal的紫外吸收强度降低, 且发生蓝移, 表明 Api和 Gal可能

使 BSA 的主链结构发生了变化, 螺旋结构变得紧密。而 Gen 与 BSA 作用后使其紫外吸收光谱发生红移, 可能导致 BSA 的结构变得疏松, 使肽骨架上电子的激发能降低<sup>[24]</sup>。

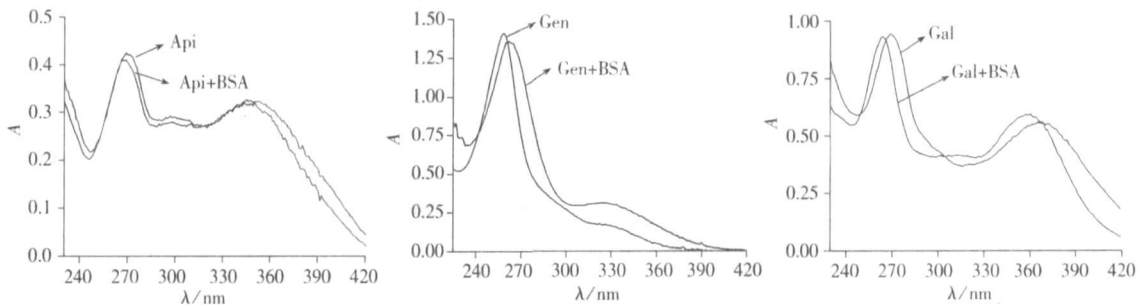


图 4 芹菜素、染料木素和高良姜素及其与 BSA 混合溶液的紫外吸收光谱

Fig. 4 UV spectra of Api, Gen or Gal in the presence of BSA  
concentrations of Api, Gen, Gal and BSA were  $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively

## 2.5 芹菜素、染料木素与高良姜素的分子结构及其与 BSA 结合的关系

BSA 由 3 个结构域组成, 每个结构域含有 2 个亚结构域并构成疏水腔, 其中亚结构域 II A 和 IIIA 是大多数小分子化合物的结合位点<sup>[25]</sup>。黄酮类化合物因具有较大的芳香共轭体系, 电荷分布在共轭体系的环上, 使其具有较强的疏水性, 因而这类化合物容易以疏水作用力与 BSA 结合, 插入 BSA 分子内部的疏水区域, 一般会结合在 II A 位点。Api, Gen 和 Gal 均为三羟基黄酮类化合物, 其中, 有 2 个羟基位于化合物分子 A 环的相同位点上。Api 的另一个羟基位于 B 环的 4' 位; Gen 的另一个羟基位于 B 环的 4' 位, 属异黄酮; 而 Gal 的第 3 个羟基位于 C 环的 3 位上。C 环为缺电子环, Gal 的第 3 个羟基容易脱质子而形成极性较强的离子, 但该脱质子产物易发生酮醇式结构互变, 加之 2 位为取代苯基, 从而又大大降低了 Gal 的极性。对于 Api 和 Gal, 由于疏水作用是发生在 2 个非极性分子间的作用力, 所以相对 B4'-OH 取代来说, C3-OH 取代会降低分子的疏水性, 不利于分子与 BSA 结合, 这与文献报道<sup>[26]</sup>的 C3-OH 降低黄酮的抗氧化活性一致。对于 Api 和 Gen, 羟基苯基分别位于 C 环的 2 和 3 位, 使得 B 环上的羟基具有不同的性质。其中, 线性分子 Gen 的羟基苯基位于 C 环上羰基的邻位, 因电子共轭效应使得 B 环上羟基的酸性相对增强, 从而增大了该分子的极性。由此可以推测, 上述 3 个化合物的分子极性大小顺序为  $\text{Gen} > \text{Gal} > \text{Api}$ , 分子的极性与其亲疏水性直接相关, 一般地, 化合物分子的极性越小, 其疏水性就越强。上述计算得到的 3 种化合物与 BSA 的结合常数  $K_a$  的顺序与疏水性大小顺序一致, 进一步说明这 3 种化合物与 BSA 的作用主要受疏水作用力控制。

## 3 结论

对具有不同取代羟基的黄酮类化合物芹菜素 (Api)、高良姜素 (Gal) 和染料木素 (Gen) 与牛血清白蛋白 (BSA) 相互作用过程中的结合常数、结合位点、热力学参数的测定及作用过程进行了分析, 结果表明, 3 种化合物与 BSA 之间的相互作用为疏水作用模式; 在 3 种化合物作用下, BSA 的荧光产生静态猝灭; 3 种黄酮类化合物与 BSA 的作用强弱顺序为:  $\text{Api} > \text{Gal} > \text{Gen}$ , 利用同步荧光和紫外吸收光谱探讨了它们对 BSA 构象的影响。因药物分子与 BSA 的结合强度与其药效有关, 在这 3 个化合物中, Gen 与 BSA 的结合能力最小, 可能使得该化合物相对于 Gal 和 Api 具有较差的药物活性。本文结果可为深入研究黄酮化合物与蛋白的作用机理、探索药物分子构效关系提供有价值的信息。

## 参考文献:

- [1] 何俊, 于俊生, 徐珊珊, 等. 环丙沙星与牛血清蛋白的相互作用 [J]. 药学学报, 2001, 36(7): 549-551.
- [2] RAW EL HM, MEIDTNER K, KROLL J. Binding of selected phenolic compounds to proteins [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(10): 4228-4235.
- [3] PETERST J. Serum albumin [J]. Adv Protein Chem, 1985, 37(4): 161-245.
- [4] WANG Yanqing, ZHANG Hongneij, ZHANG Gencheng, et al. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study [J]. J Lum in, 2007, 126(1): 211-218.
- [5] YANO S, UMEDA D, MAEDA N, et al. Dietary apigenin suppresses IgE and inflammatory cytokines production in

- C57BL/6N mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(14): 5203–5207.
- [6] 吕伟, 蒋伶俐. 高良姜的化学成分及药理作用[J]. *中国药业*, 2006, 15(3): 19–20
- [7] SOUZA N D, SKONBERG D J, CAMBRE M E, et al. Influence of dietary genistein levels on tissue genistein deposition and on the physical, chemical, and sensory quality of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(9): 3631–3636
- [8] RAYNAL N J, MOMPALER L, CHARBONNEAU M, et al. Antileukemic activity of genistein, a major isoflavone present in soy products[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(1): 3–7.
- [9] PYLE A M, MORRIT, BARTON J K. Probing microstructures in double-helical DNA with chiral metal complexes: recognition of changes in base-pair propeller twisting in solution[J]. *J Am Chem Soc*, 1990, 112(25): 9432–9434
- [10] K M J D, LIU Liping, GUO Weinan, et al. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion[J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17(3): 165–177.
- [11] 易贵平, 俞庆森, 商志才, 等. 氧氟沙星与牛血清白蛋白相互作用机制[J]. *药科学报*, 2000, 35(10): 774–777.
- [12] TIAN Jianniao, LIU Jiaqin, TIAN Xuan, et al. Study of the interaction of kaempferol with bovine serum albumin[J]. *J Mol Struct*, 2004, 691(1): 197–202
- [13] WU Tuoqi, WU Qin, GUAN Shanyue, et al. Binding of the environment pollutant naphthol to bovine serum albumin[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(6): 1899–1906
- [14] VAUGHAN W M, WEBER G. Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water: a dynamic probe of the microenvironment[J]. *Biochem*, 1970, 9(3): 9464–9473
- [15] CHEN Jun, JIANG Xinyu, CHEN Xiaoping, et al. Effect of temperature on metronidazole-BSA interaction: multi-spectroscopic method[J]. *J Mol Struct*, 2007, 836: 162–169
- [16] SHAIKH S M T, SEETHARAMAPPA J, KANDAGAL P B, et al. In vitro study on the binding of anti-coagulant vitamin to bovine serum albumin and the influence of toxic ions and common ions on binding[J]. *Int J Biol Macromol*, 2007, 41(1): 81–86
- [17] 冯喜增, 金瑞祥, 曲芸, 等. 各种离子对血卟啉与牛血清白蛋白相互结合反应的影响研究[J]. *高等学校化学学报*, 1996, 17(6): 866–869
- [18] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096–3102
- [19] 吴晓红, 周家宏, 顾晓天, 等. 竹红菌甲素与肌红蛋白和血红蛋白相互作用的同步荧光光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(12): 2287–2290
- [20] 周秋华, 王彦卿, 张红梅, 等. 吡虫啉与牛血红蛋白相互作用的光谱研究[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(3): 368–372
- [21] JIANG Chongqiu, GAO Mingxia, HE Jikang. Study of the interaction between terazosin and serum albumin synchronous fluorescence determination of terazosin[J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 452(2): 185–189
- [22] ATHINA P, REBECCA J, RICHARD A F. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(1): 158–163
- [23] 李云霞, 索全伶, 贺文智, 等. 黄芩有效成分的紫外-可见吸收光谱表征[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(1): 131–134
- [24] MONTIS, MANET I, MANOLIE, et al. Gaining an insight into the photoreactivity of a drug in a protein environment: A case study on nalidixic acid and serum albumin[J]. *J Phys Chem: B*, 2008, 112(18): 5742–5754
- [25] JISHA V S, ARUN K T, RAMAIAH D. Site-selective binding and dual mode recognition of serum albumin by a squaraine dye[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(18): 6024–6025
- [26] HODNICK W E, KUNG F S, ROETTER W J. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: A structure-activity study[J]. *J Biochem Pharmacol*, 1986, 35(14): 2345–2357.