

基于荧光光谱的硫酸阿托品拮抗中乌头碱毒性的机制研究

崔力剑¹, 王建明², 霍坤², 黄芸^{2*}, 窦玉红¹, 王鑫国¹

1. 河北医科大学中医学院, 河北 石家庄 050091

2. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017

摘要: **目的** 研究模拟生理条件下中乌头碱(MA)与牛血清白蛋白(BSA)的键合作用, 以及硫酸阿托品(AS)对其相互作用的影响。**方法** 主要采用荧光光谱法及紫外吸收光谱法进行研究。**结果** MA对BSA有较强的荧光猝灭作用, 猝灭机制为动态猝灭。MA与BSA表观结合常数(K_b)和结合位点数(n)均随着温度升高而增大, 二者之间的相互作用力类型主要为疏水作用, 结合距离为4.44 nm, 该反应是自发进行的。同步荧光光谱图的信息表明MA对蛋白微环境有影响。AS使MA和BSA的 K_b 和 n 均减小; 抑制MA对BSA构象的改变。**结论** MA与BSA能发生相互作用, AS与MA间存在竞争作用, 能够增加游离型MA浓度, 通过减少MA在生物体内的积累, 加快代谢, 发挥解毒作用。

关键词: 中乌头碱; 硫酸阿托品; 牛血清白蛋白; 荧光猝灭; 解毒作用

中图分类号: R969.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1355-06

Atropine sulfate against toxicity of mesaconitine by fluorescence spectra

CUI Li-jian¹, WANG Jian-ming², HUO Kun², HUANG Yun², DOU Yu-hong¹, WANG Xin-guo¹

1. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China

2. College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To study the bonding of mesaconitine (MA) with bovine serum albumin (BSA) and the effect of atropine sulfate (AS) on its interaction. **Methods** Ultraviolet absorption and fluorescence spectra were used. **Results** MA had strong fluorescence quenching effect on BSA via a dynamic quenching procedure. The apparent bonding constant (K_b) and the number of bonding sites (n) of MA and BSA were increased with temperature rising. The predominant intermolecular forces between MA and BSA were hydrophobic interactions, which could make the MA-BSA bonding stabilized and the combined distance was 4.44 nm. The negative value of free energy change was taken as an evidence for the spontaneity of MA-BSA bonding. The synchronous fluorescence spectra indicated that protein microenvironment was changed by MA. AS decreased K_b and n , and inhibited the conformation change of BSA. **Conclusion** AS could act competitively with MA in bonding to BSA and increase the content of free MA. AS could accelerate the metabolism for detoxification by reducing accumulation in body.

Key words: mesaconitine (MA); atropine sulfate (AS); bovine serum albumin (BSA); fluorescence quenching; detoxification

中乌头碱(亦称新乌头碱, mesaconitine, MA)为二萜双酯型生物碱, 具有强心、抗炎、镇痛、抗癫痫等多种药理作用^[1-3], 但对心脏和中枢神经系统有较强的毒性^[4], 治疗量与致死量接近^[5]。硫酸阿托品(atropine sulfate, AS)可通过阻断心肌细胞膜上M胆碱受体, 解除迷走神经对心脏的抑制^[6]而发挥拮抗MA的作用, 其解毒功效已有多项报道^[6-7]。

血清白蛋白(serum albumin, SA)是血液中重要的载体蛋白, 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为SA家族的多肽链蛋白质, 是常用模型蛋白之一。晶体研究表明BSA具有3个结构域, 每个结构域又存在两个凹形彼此以槽口相对的亚结构域所形成的圆筒状疏水腔^[8]。药物分子主要通过进入疏水腔与蛋白质发生非特异结合^[9-10]。

收稿日期: 2012-02-24

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(20070410868); 河北省自然科学基金资助项目(08B033, C2009001061); 河北省卫生厅重点课题计划资助项目(20100241)

作者简介: 崔力剑(1974—), 男, 河北晋州人, 主要从事天然药物活性成分及质量标准研究。

Tel/Fax: (0311)86265284 E-mail: cuilijianzy@126.com

*通讯作者 黄芸 Tel/Fax: (0311)86265628 E-mail: hy9317536@126.com

蛋白结合率高的药物在体内消除慢,作用维持时间长。已有研究表明,某些成分会影响药物分子与BSA结合,从而对药效产生不同程度的影响^[9,11]。本实验采用荧光光谱及紫外光谱研究生理 pH 条件下 MA 与 BSA 的相互作用,并考察 AS 对 MA 与 BSA 结合的影响,有助于进一步了解 AS 对 MA 解毒作用的分子机制、MA 的代谢过程以及其生理活性。

1 仪器与材料

PE LS—50B 荧光分光光度计,美国 Perkin Elmer 股份有限公司; TU—1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;雷磁 pHs—3C 型酸度计,上海雷磁仪器厂;一恒 CU600 恒温水浴箱,上海一恒科学仪器有限公司; Sartorius BS223S 电子天平,德国赛多利斯有限公司; HF PWUV 超纯水系统,香港利康生物医疗科技控股有限公司。

Tris (Sigma) 缓冲溶液为 0.05 mol/L, pH 7.4 的 Tris-HCl (含 0.05 mol/L NaCl); BSA (Sigma) 用上述缓冲溶液配制成 1.0×10^{-6} mol/L 的储备液; MA (中国药品生物制品检定所,批号 110799-200404) 和 AS [史瑞可(上海)生物有限公司,批号 100040-200510] 分别用 50% 甲醇配制成 5.0×10^{-3} mol/L 的储备液;实验用水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 荧光光谱和紫外光谱测定

向一系列 5 mL 比色管中分别加入 1.0×10^{-6} mol/L 的 BSA 溶液 3.00 mL,用微量进样器再加入一定量的 5.0×10^{-3} mol/L 的 MA 溶液,用缓冲溶液

定容至 3.03 mL。同法制备含 MA 的 BSA 溶液加入不同浓度的 AS 12 μ L。超声 1 min,温浴 5 min,充分反应,在一定温度下测定体系的荧光光谱。

荧光光谱测定条件:激发波长(λ_{ex})为 280 nm,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm,比色皿厚度为 1 cm。一定温度下,记录 300~420 nm 内发射光谱。同步荧光光谱测定: $\Delta\lambda=60$ nm ($\Delta\lambda=\lambda_{\text{em}}-\lambda_{\text{ex}}$, λ_{em} 为发射波长),记录 300~420 nm 内发射光谱。三维荧光光谱测定:激发光波长 250 nm,扫描次数 15 次,步长 5 nm,记录发射波长 280~420 nm。

紫外光谱测定条件:记录 MA (1.0×10^{-6} mol/L) 在 300~420 nm 内的 UV-Vis 吸收光谱。

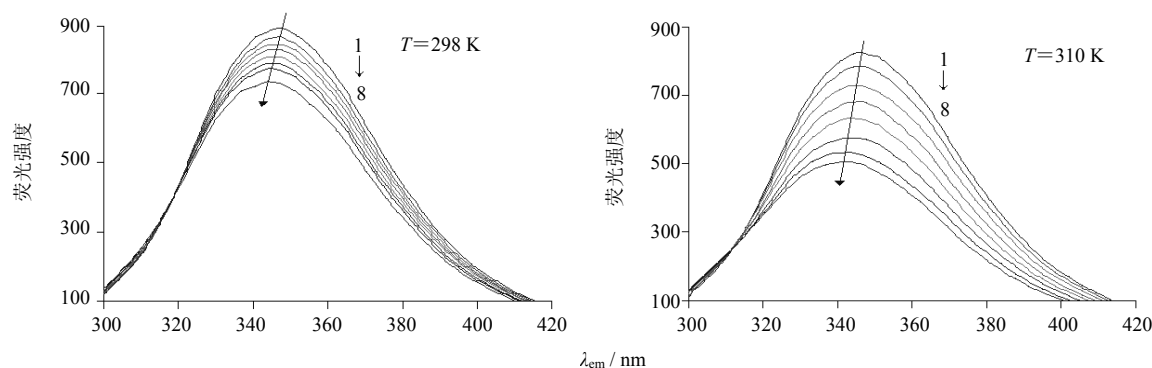
2.2 MA 与 BSA 的作用

2.2.1 MA 对 BSA 荧光光谱的影响 BSA 的荧光主要由色氨酸残基贡献^[9]。色氨酸残基周围微环境发生改变时,其荧光会发生相应的红移或蓝移^[12]。以 λ_{ex} 280 nm 为激发光,分别扫描 BSA 和 MA 的荧光光谱,发现 MA 不会对 BSA 最大荧光波长产生干扰。但由于 MA 在 BSA 的 λ_{ex} 、 λ_{em} 均有一定吸收,猝灭过程存在“内滤光效应”^[13],用公式进行校正。本实验计算所用的荧光强度均为校正“内滤光”后的荧光值。

$$F_c = F_a \times e^{(A_1 + A_2)/2} \quad (1)$$

F_c 和 F_a 分别代表校正后和观察到的荧光强度, A_1 和 A_2 是 MA 在 λ_{ex} 和 λ_{em} 处的吸光度

按上述实验方法,固定 BSA 浓度,随着体系中 MA 浓度增加,BSA 内源性荧光有规律地产生猝灭,且 BSA 荧光发射峰发生一定程度蓝移,见图 1。荧光猝灭与蓝移程度均随温度升高而增大,表明 MA 与 BSA 结合,并导致色氨酸残基所处微环境极性降



1→8: $C_{\text{BSA}}=1.0 \times 10^{-6}$ mol·L⁻¹; $C_{\text{MA}}=0, 3.3 \times 10^{-6}, 6.7 \times 10^{-6}, 1.00 \times 10^{-5}, 1.33 \times 10^{-5}, 1.67 \times 10^{-5}, 2.00 \times 10^{-5}, 2.33 \times 10^{-5}$ mol·L⁻¹

图1 MA 对 BSA 的荧光猝灭光谱

Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of BSA by MA

低, 疏水性增加^[9,13]。

2.2.2 荧光猝灭类型及作用力的确定 荧光猝灭过程的本质就是与发光过程相互竞争而缩短发光分子激发态寿命的过程, 可分为动态猝灭和静态猝灭 2 种^[9-10,13]。假设该猝灭过程为动态猝灭, 用 Stern-Volmer 方程处理荧光猝灭数据。

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

F_0 与 F 为 MA 加入前后 BSA 的荧光强度; K_q 为猝灭速率常数; τ_0 为不存在猝灭剂时荧光分子的平均寿命; K_{sv} 为猝灭常数; $[Q]$ 为 MA 浓度

动态猝灭主要依赖于分子扩散, 温度越高扩散系数越大, 猝灭常数随着温度的升高而升高。而对于静态猝灭, 温度越高基态络合物稳定性越差, 则猝灭常数越小^[13]。由图 2 及表 1 可知, 所选浓度内, 曲线斜率随温度升高增大, 即随温度升高猝灭常数呈增加趋势, 表明 MA 通过动态猝灭机制导致 BSA 荧光猝灭。

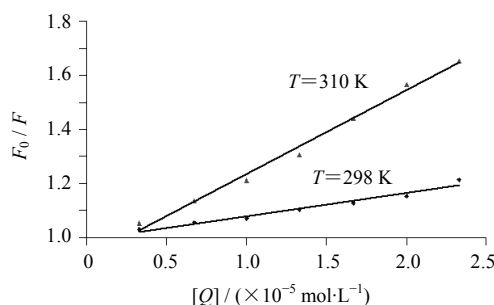


图 2 MA 对 BSA 猝灭的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 2 Stern-Volmer plots for quenching of BSA by MA

表 1 不同温度下 Stern-Volmer 猝灭常数和热力学参数

Table 1 Stern-Volmer quenching constant (K_{sv}) and thermodynamic parameters at different temperatures

T/K	$K_{sv}/$ ($L \cdot mol^{-1}$)	R	$\Delta G /$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)	$\Delta H /$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)	$\Delta S /$ ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
298	8.53×10^3	0.982 2	-22.43	82.67	352.68
310	3.14×10^4	0.995 7	-26.66		

药物小分子与蛋白质之间主要通过疏水力、静电引力、氢键和范德华力等相互靠近并发生作用。用 Van't Hoff 公式^[9]可以计算出反应有关热力学参数, 见表 1。结果表明 MA 与 BSA 结合反应是由焓、熵驱动的高温反应自发过程。根据有机小分子作用力种类与热力学函数关系理论^[14], 推测 MA 与 BSA 结合以疏水作用力为主。

2.2.3 MA 与 BSA 作用参数计算 在动态猝灭过程

中, 荧光强度与猝灭剂的关系可由 BSA 分子和 MA 分子之间表观结合常数表达式推导出^[15]。假设一个激发态 BSA 分子有 n 个等同且相互独立位点可结合 MA 分子, 其表观结合常数 (K_b) 用下式计算。

$$K_b = [PQ_n]/[P][Q]^n \quad (3)$$

若在反应过程中 BSA 总浓度为 $[P]_0$, $[P]$ 为 BSA 游离浓度。

当 $[Q] \gg [P]_0$ 时, 猝灭剂起始浓度代替其平衡浓度, 且在动态猝灭中, 体系荧光强度 F 与其游离荧光体浓度成正比, 得到以下公式。

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K_b + n \lg[Q] \quad (4)$$

n 为结合位点数

按照式 (4) 以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg[Q]$ 绘制曲线, 即可得到 n 和 K_b , 见表 2。可得出 K_b 、 n 随着温度升高渐渐变大。进一步证明 MA 对 BSA 荧光猝灭过程为动态猝灭, 即碰撞猝灭。当温度升高时, 增加了分子间有效碰撞数目, 导致 n 变大; 同时加剧了电子能量转移, 增强了 MA 与 BSA 分子间相互作用, K_b 也随之升高。

表 2 不同温度下表观结合常数 (K_b) 和结合位点数 (n)

Table 2 K_b and n at different temperatures

T/K	$K_b / (L \cdot mol^{-1})$	n	R
298	5.05×10^3	0.959 0	0.991 4
310	7.96×10^5	1.311 9	0.999 3

2.2.4 MA 与 BSA 能量转移机制及结合距离 当 MA 与 BSA 相互作用时, 可以发生内部或外部能量转移作用。对于外部能量转移, 利用 Förster's 偶极-偶极非辐射能量转移原理, 可求出 MA 和 BSA 的作用距离。能量转移效率 (E) 与转移效率为 50% 时的临界能量转移距离 (R_0) 及结合距离 (r) 符合以下关系^[16]。

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) = 1 - F/F_0 \quad (5)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 \cdot \Phi \cdot n^{-4} \cdot J \quad (6)$$

K^2 为偶极空间取向因子 (取 2/3), Φ 为色氨酸残基量子产率 (取 0.15), n 为介质折射指数 (取 1.336), J 是 BSA 荧光发射光谱与 MA 紫外吸收光谱重叠积分

进一步由式 (7) 求出 J 值。

$$J = \sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \sum F(\lambda) d\lambda \quad (7)$$

$F(\lambda)$ 为 BSA 在波长 λ 处荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 为 MA 在 λ 处摩尔吸光系数, $d\lambda$ 为波长分割距离

图 3 为 BSA 与 MA 摩尔比为 1:1 时, MA 吸收光谱与 BSA 荧光发射光谱重叠图。通过式 (5)、(6)、(7) 求出 MA 与 BSA 的 r 为 4.44 nm, 符合能

量转移条件。说明二者发生作用时足够靠近 ($r < 7$ nm), BSA 分子激发态能量通过非辐射能量转移过程损失。

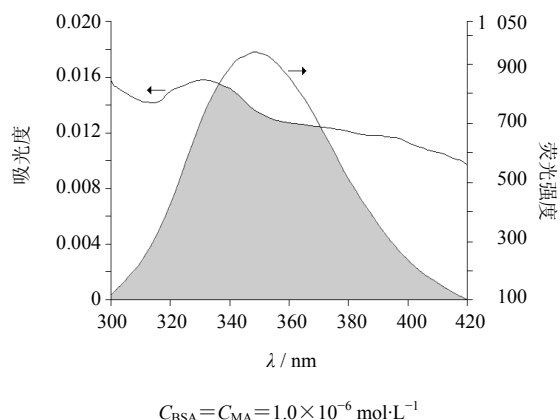
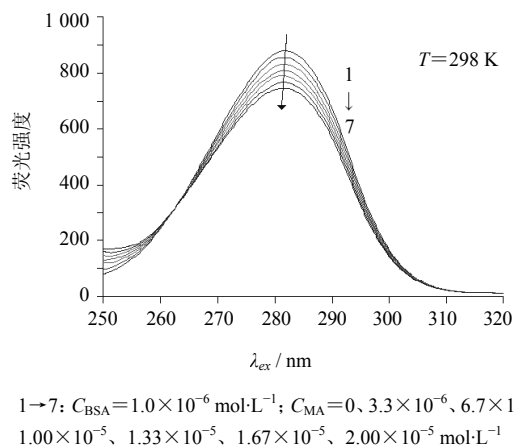


图3 MA紫外光谱与BSA荧光发射光谱的叠加图

Fig. 3 Overlap of UV spectrum of MA with fluorescence emission spectrum of BSA

2.2.5 MA对BSA构象的影响 同步荧光光谱具有简化光谱、窄化谱带和减小光谱重叠等优点, 常用来探讨蛋白质构象变化。BSA 中最强荧光发射波长对附近微环境变化很敏感, 在疏水环境中最大波长约为 332 nm, 暴露在水相中为 352 nm^[17]。由于色氨酸残基荧光强度较大, 故扫描 $\Delta\lambda$ 为 60 nm 时 MA 与 BSA 作用的同步荧光光谱图, 见图 4。从 BSA 最大荧光波长来看, 色氨酸位于疏水腔中。从图中可看出, 随着 MA 浓度增加, 对 BSA 中色氨酸残基荧光猝灭作用逐渐加强, 并使 BSA 最大发射波长发生轻微蓝移, 表明 MA 使色氨酸残基所处环境的极性减弱, 疏水性增强, BSA 结构变得更加紧密。



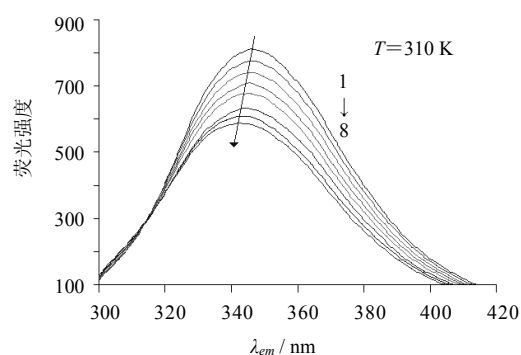
1→7: $C_{BSA} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{MA} = 0, 3.3 \times 10^{-6}, 6.7 \times 10^{-6}, 1.00 \times 10^{-5}, 1.33 \times 10^{-5}, 1.67 \times 10^{-5}, 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图4 MA对BSA的同步荧光光谱

Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of BSA by MA

2.3 AS存在下MA与BSA作用的变化

2.3.1 AS对MA-BSA体系作用参数的影响 本实验在模拟人体生理 pH 环境条件下, 考察了 AS 对 MA 与 BSA 结合的影响, 见图 5。结果表明, 在 310 K, 加入 AS 使 MA 与 BSA 的 K_b 和 n 均减小, 分别为 $K_b = 5.13 \times 10^4$; $n = 1.1043$ 。

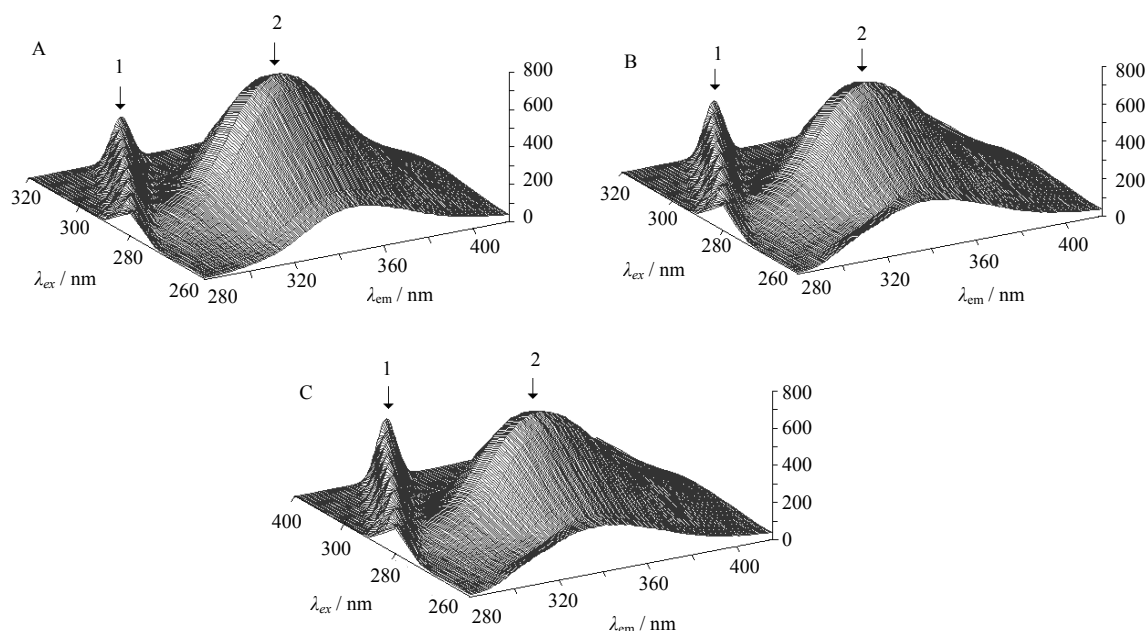


1→8: $C_{BSA} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{AS} = 6.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{MA} = 0, 3.3 \times 10^{-6}, 6.7 \times 10^{-6}, 1.00 \times 10^{-5}, 1.33 \times 10^{-5}, 1.67 \times 10^{-5}, 2.00 \times 10^{-5}, 2.33 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图5 在AS影响下MA与BSA作用的荧光猝灭光谱

Fig. 5 Fluorescence quenching spectra of BSA with MA influenced by AS

2.3.2 AS对MA与BSA作用的三维荧光光谱影响 三维荧光光谱能够提供研究对象更多信息, 更有利于研究蛋白质构象变化特征。图 6 与表 3 分别为加入 MA、AS-MA 前后 BSA 微环境变化的三维荧光光谱和对应的荧光参数。图 6 中峰 1 是瑞利散射峰 ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$), 加入 MA、AS-MA 后体系散射强度增加, 可能是由于形成 BSA-MA、BSA-AS-MA 复合物使 BSA 直径增大, 散射效应增强。峰 2 ($\lambda_{ex} = 280$ nm) 荧光峰主要是色氨酸残基所贡献, 因为 BSA 在 280 nm 处激发时, 酪氨酸、苯丙氨酸残基的荧光可忽略不计^[9]。MA、AS-MA 加入前后峰 2 强度也发生了明显变化。BSA-MA、BSA-AS-MA 体系峰 2 荧光强度较 BSA 体系分别降低了 69.9 和 97.3, 荧光峰强度比为 1 : 0.90 : 0.86; 荧光发射峰位置分别蓝移了约 4 nm 和 2 nm, 见表 3。结果表明 MA 分子与 BSA 相互作用引起内部疏水性氨基酸残基微环境极性变化, 疏水腔有所收缩, 使 BSA 大分子更趋向于折叠态, 而 AS 可抑制 MA 对 BSA 构象改变; 这可能是 AS 存在时可置换出部分与 BSA 结合的 MA, 使体系中真正与 BSA 结合的 MA 数量减少所致。



$C_{BSA}=1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{MA}=1.17 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{AS}=1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T=298 \text{ K}$

图 6 BSA (A)、BSA-MA (B) 与 BSA-AS-MA (C) 体系的三维荧光图谱

Fig. 6 Three-dimensional fluorescence spectra of BSA (A), BSA-MA (B), and BSA-AS-MA (C) systems

表 3 BSA、BSA-MA、BSA-AS-MA 的三维荧光光谱的特征参数

Table 3 Characteristic parameters of three-dimensional fluorescence spectra of BSA, BSA-MA, and BSA-AS-MA systems

峰号	BSA			BSA-MA			BSA-AS-MA		
	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$	$\Delta\lambda / \text{nm}$	F	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$	$\Delta\lambda / \text{nm}$	F	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$	$\Delta\lambda / \text{nm}$	F
1	320 / 320	0	235.9	320 / 320	0	292.1	320 / 320	0	327.7
2	280 / 347.2	67.2	719.7	280 / 343.7	63.7	649.8	280 / 345.1	65.1	622.4

3 讨论

在生理溶液 (pH 7.4) 中, MA 与 BSA 通过疏水作用力相作用, 反应是由焓、熵驱动的高温反应自发过程。加入 AS 使 MA 与 BSA 的 K_b 和 n 均减小, 初步推测是 AS 与 MA 对 BSA 竞争结合所致, 即 AS 通过降低 MA 与 BSA 结合程度, 提高游离 MA 浓度。因 MA 代谢迅速^[5], 血液中浓度增加有利于 MA 代谢排出体外, 从而发挥解毒作用。

BSA 分子中, 药物分子主要结合位点是 site I 和 site II, site I 结合的药物通常是电荷位于分子中央的环状结构阴离子, 而电荷位于分子末端链状分子通常结合在 site II 位点^[9]。MA 是二萜双酯型生物碱, 在分子结构中具有苯环和碱性 N 原子, 其中 N 原子位于六元环上。从实验结果上看, MA 在 BSA 上只有一个结合位点, 结合在 site I 的可能性较大。AS 分子结构中同样具有苯环和碱性 N 原子, 其中 N 原子所处化学环境与 MA 相似, 故它们应竞争结

合同一个位点。site I 主要位于疏水腔内, 当分子进入疏水腔后, 疏水性结构苯环主要与疏水腔中芳香族氨基酸残基相互作用, 碱性基团 N 原子等与 BSA 主肽链上羰基、氨基之间发生相互作用, 这些作用将协同影响蛋白质主链原有体系, 导致 BSA 分子中部分肽链结构变化, 转化为较为紧凑的二级结构。在疏水腔口处主要是一些带电荷的氨基酸残基, AS 通过其自身电荷易于靠近疏水腔而进入其内部与 BSA 发生有效结合, 从而导致 MA 与 BSA 的 K_b 下降, 体系中游离状态 MA 浓度增加。这也与临床上采用 AS 抢救乌头碱类生物碱中毒表现一致, 即在给 AS 后, 暂时会使毒性反应增强; 随着 MA 分子快速代谢, 毒性反应也会迅速消除。

参考文献

- [1] Singhuber J, Zhu M, Prinz S, et al. Aconitum in traditional Chinese medicine—a valuable drug or an unpredictable risk [J]. *Ethnopharmacology*, 2009, 126(1):

- 18-30.
- [2] Ameri A. Inhibition of stimulus-triggered and spontaneous epileptiform activity in rat hippocampal slices by the Aconitum alkaloid mesaconitine [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 342(2/3): 183-191.
- [3] Ameri A, Seitz U. Effects of mesaconitine on [^3H] noradrenaline uptake and neuronal excitability in rat hippocampus [J]. *Exp Brain Res*, 1998, 121(4): 451-456.
- [4] 由凤鸣, 刘 军, 李文军. 细胞膜吸附/LC-MS 分析附子中对兔心肌具毒效作用的成分 [J]. 华西药杂志, 2010, 25(4): 414-415.
- [5] 陈苹苹, 赵 宁, 徐秀玲, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法分析新乌头碱在大鼠尿液中的代谢产物 [J]. 药科学报, 2010, 45(8): 1043-1047.
- [6] 江 岩. 乌头碱类中药中毒18例急救护理体会 [J]. 西南军医, 2005, 7(1): 70-71.
- [7] Lin C C, Chan T Y K, Deng J F. Clinical features and management of herb-induced aconitine poisoning [J]. *Toxicology*, 2004, 43(5): 574-579.
- [8] Huang B X, Kim H, Dass C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15(8): 1237-1247.
- [9] 黄 芸, 崔力剑, 陈 晨, 等. 黄芩素及黄芩苷与牛血清白蛋白相互结合作用比较研究及葡萄糖的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 754-758.
- [10] 黄 芸, 崔力剑, 窦玉红, 等. 阿司匹林与人血清白蛋白的相互作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(9): 1192-1195.
- [11] 闫 华, 杨健国, 梁华定, 等. 肉桂酸与牛血清白蛋白相互作用及酒精的影响 [J]. 物理化学学报, 2008, 24(3): 543-546.
- [12] Wang Y Q, Zhang H M, Zhou Q H. Investigation of the interaction between pentachlorophenol and human serum albumin using spectral methods [J]. *J Mol Struct*, 2009, 932(1): 31-37.
- [13] 黄 芸, 崔力剑, 王建明, 等. 光谱法研究槲皮苷与人血清白蛋白的相互作用 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 676-679.
- [14] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [15] 杨曼曼, 杨 频, 张立伟. 荧光法研究咖啡酸类药物与白蛋白的作用 [J]. 科学通报, 1994, 39(1): 31-35.
- [16] 陈 晨, 王建明, 崔力剑, 等. 中药功能因子芦丁与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 河北中医药学报, 2010, 25(4): 30-31.
- [17] Lilianna T L. Paclitaxel-HSA interaction binding sites on HSA molecule [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(12): 3269-3275.