

齐多夫定及其乙酸酯与牛血清白蛋白相互作用的光谱学研究

布热比亚·亚合普¹, 吐尔洪·买买提^{1*}, 尤努斯江·吐拉洪¹, 佐拉木·买买提²,
克帕亚木·买买提¹, 阿布都热合曼·吐尔逊¹, 赵忠奎³

(1. 新疆大学化学化工学院, 石油天然气教育部重点实验室, 乌鲁木齐 830046;

2. 新疆维吾尔自治区人民医院急救中心, 乌鲁木齐 830001;

3. 大连理工大学化工学院, 辽宁 大连 116024)

[摘要] **目的:**在模拟人体生理条件下(pH 7.4),分别评价了齐多夫定及其乙酸酯(AZT-Es)与牛血清白蛋白(BSA)的结合常数、结合位点数、结合类型、共存金属离子对结合的影响。**方法:**在不同温度下运用荧光猝灭光谱法,同步荧光光谱和紫外光谱法,研究 AZT, AZT-Es 分别与 BSA 的相互作用,利用 Stern-Volmer 方程处理实验数据,得到结合常数,结合位点。**结果:**在温度为 289~310 K 时,AZT 对 BSA 的荧光猝灭机理以静态猝灭为主;AZT-Es 对 BSA 的荧光猝灭机制低温下为静态猝灭,高温下静态和动态猝灭共同作用;上两种体系的结合力主要为疏水作用,以摩尔比约 1:1 结合;同步荧光光谱显示,AZT-Es 的加入使 BSA 的酪氨酸残基和色氨酸残基构象同时发生了变化,与 BSA 残基所处环境的疏水性降低;在 298 K 时共存 Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} 等金属离子对两种体系结合常数的影响微乎其微。**结论:**不同温度条件下 AZT, AZT-Es 对 BSA 的荧光猝灭机理不同;两种体系的结合力为疏水作用;金属离子对两种体系结合常数的影响不大。

[关键词] 牛血清白蛋白; 齐多夫定; 乙酸酯; 荧光光谱; 同步荧光

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0095-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140095

Spectrophotometric Study on the Interaction of Zidovudine and Its Acetate Ester with Bovine Serum Albumin

Burabiye · Yakup¹, Turghun · Muhammad^{1*}, Yunusjan · Turahun¹, Zorem · Muhammad²,
Kipayem · Muhammad¹, Abdurahman · Tursun¹, ZHAO Zhong-kui³

(1. College of Chemistry & Chemical Engineering, Xinjiang University, Key laboratory of Oil and Gas Fine Chemicals, Educational Ministry of China, Urumqi 830046, China; 2. Emergency Center of the People's Hospital, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830001, China; 3. Department of Catalysis Chemistry and Engineering, School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

[Abstract] **Objective:** The interaction of zidovudine and zidovudine acetate ester (AZT-Es), with bovine serum albumin (BSA) has been investigated under physiological conditions. The binding constants, binding sites, binding type and effect of coexisting ions on the binding were studied. **Method:** The interaction of AZT and AZT-Es, with bovine serum albumin (BSA) has been studied by fluorescence quenching, synchronous fluorescence spectroscopy and ultraviolet spectrophotometry at different temperatures. The Stern-Volmer formula was used to process the experiment date. The binding constant and number of binding sites were obtained. **Result:** The interaction of AZT with BSA is mainly static quenching at temperature range of 289-310 K, while interaction of AZT-Es with BSA is dominate by the static quenching at lower temperature, and turned to be combination of static and dynamic quenching at higher temperature. The binding is mainly driven by the hydrophobic interaction for both

[收稿日期] 20131009(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21065011);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2011211A015);石油天然气精细化工重点实验室开放课题项目(XJDX0908-2011-10)

[第一作者] 布热比亚·亚合普, 硕士, 从事分子印迹、光谱分析研究, Tel: 15160885825, E-mail: rabiya115@126.com

[通讯作者] * 吐尔洪·买买提, 从事分子印迹、光纤传感、荧光免疫分析研究, Tel: 13669929903, E-mail: turghunm@gmail.com

two systems and they bound at a molar ratio of 1:1. The synchronous spectra showed that with increasing AZT-Es contents, the conformations of BSA tyrosyl and tryptophan residues were changed, and the hydrophobicity of the environment around the residues were decreased. The effects of coexisting metal ions on the binding constants of two systems are negligible. **Conclusion:** The interaction of AZT and AZT-Es with BSA are different quenching mechanism at different temperature. The binding is mainly driven by the hydrophobic interaction for both two systems. The effects of coexisting metal ions on the binding constants of two systems are negligible.

[**Key words**] bovine serum albumin, zidovudine, acetate ester, fluorescence spectroscopy, synchronous fluorescence

齐多夫定(AZT)是第一个通过美国食品和药物管理局批准的抗艾滋病药物^[1]。AZT通过阻断病毒RNA基因的逆转录,阻止病毒双链DNA的形成,使病毒失去复制模板,降低复制率^[2]。虽然其疗效已证明,但其细胞毒性、不理想的药理学方面的特性构成也是其较突出的问题^[3]。前体药物是在体内进行代谢或激活并在作用部位上尽可能释放或产生活性药物的衍生物。目前在各种制药配方领域中广泛应用^[4]。酯化物是前体药物研究中的重要化合物,具有理想的特性,在体外表现出很好的化学稳定性,这些特征使它们能够保持足够的保质期。为了增强艾滋病有效治疗中的化疗药物的属性,合成一系列齐多夫定前体药物,文献报道^[5]AZT中的5'-OH酯化后,其药物活性,生物利用度等有了改善。Solyev等合成了一系列新的5'-O氨基甲酸酯AZT前药,在狗体内其对生物介质中的稳定性,抗-HIV性质,药代动力学参数进行评价。该前体药物在细胞培养中显示中等的抗HIV活性。半衰期($t_{1/2}$)释放时间比AZT或磷酸酯AZT长两三倍,急性毒性比AZT较少^[6]。杜丽娜等设计了两亲性AZT前药-胆固醇基磷酸酯齐多夫定(CPZ),形成纳米级自组装体,考察体外抗人免疫缺陷病毒(HIV)作用,为其治疗艾滋病提供实验依据^[7]。M. Lewandowska研究与齐多夫定结构相似的具有潜在抗癌特性的AddFU新型磷酸酯前药,评价了颈椎(HeLa),口腔(KB),乳腺(MCF-7)等3种肿瘤细胞株的细胞毒活性^[8]。Yiguang Jin等制备了新颖的前体药物(OFZG),该药结合了两种药物(AZT和5-FU)在一个分子中,形成稳定的纳米自组装体,随后探讨它们体外和体内的行为,增强体内外的抗癌效能^[9]。

本研究合成了新的前体药齐多夫定5'-位酯化物,即齐多夫定乙酸酯(AZT-Es)^[10],通过荧光光度法和紫外光谱法研究了AZT, AZT-Es分别与BSA的相互作用,得到猝灭常数,结合常数以及结合位点

数,根据热力学参数确定了其相互作用类型,并用同步荧光法研究了AZT-Es对BSA构象的影响。在此基础上,进一步研究金属离子对结合作用影响。试图从分子水平了解蛋白质与小分子间相互作用机制,为生命科学研究提供有用的信息。

1 材料

970CRT型荧光分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),恒温池支架(日本岛津公司),UV-1800型紫外分光光度计(日本岛津公司),KQ-5200B型超声波清洗剂(昆山市超声仪器有限公司)。

牛血清白蛋白(BSA,北京奥博生物技术有限公司),齐多夫定(AZT,杭州大阳化工有限公司),齐多夫定乙酸酯(AZT-Es,自制,纯度>97%)^[5],三羟甲基氨基甲烷(Tris)均为分析纯,实验用水为二次去离子水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制及色谱条件 以Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.4, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl维持溶液的离子强度)为溶剂配制 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA溶液, $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AZT-Es溶液, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Me^{2+} 溶液(Me^{2+} 分别为 Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} 等金属离子)备用。分别在16, 23, 30, 37℃条件下,激发波长296 nm,狭缝宽度为20 nm/30 nm,在200~400 nm测定荧光光谱。同时在 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60$ 扫描AZT-Es和BSA的同步荧光光谱。室温下分别扫描了240~350 nm的BSA溶液和AZT-Es及其两者混合溶液的紫外吸收光谱。

2.2 荧光猝灭机制的确定

2.2.1 AZT-Es-BSA体系的紫外光谱 紫外吸收光谱是探索结构变化的非常简单的方法^[6]。蛋白质含有色氨酸和酪氨酸等氨基酸残基对光有吸收作用,此外肽键对光也有强烈的吸收作用^[7]。图1可以看出,BSA约在278 nm处有吸收峰,AZT-Es与BSA相互作用后吸收峰明显增强,出现红移现象。

复合体系的紫外吸收峰高比AZT-Es,BSA的要

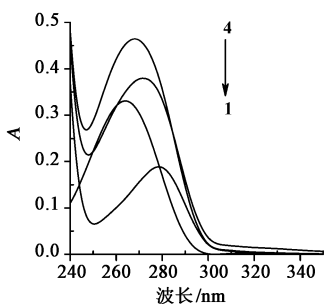
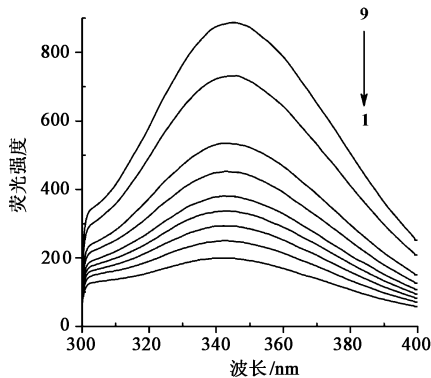


图1 AZT-Es与BSA的紫外吸收光谱

高,而比二者的加和(曲线4)要小。这显著的变化说明AZT-Es与BSA之间产生了复合物,与紫外光谱的结论相一致。

2.2.2 AZT-Es-BSA的荧光光谱 蛋白质的荧光猝灭可用于研究药物与蛋白质的结合信息^[8]。当激发光为296 nm时AZT-Es在300~400 nm间无荧光。荧光内过滤效应是荧光分析中的一个内在误差来源,从图1可知,AZT-Es及其BSA复合物在激发光处几乎没有吸收,可以排除没有第一内过滤荧光猝灭现象。由图2所示,室温下,固定BSA的量,不断增加AZT-Es的浓度时,BSA的内源荧光呈有规律的降低,BSA的最大发射峰出现了蓝移(从345.7 nm到342.9 nm),这反映BSA中荧光团周围的微环境随着AZT-Es的加入发生了改变,构象发生了变化^[9]。文献报道^[10],AZT对BSA荧光有猝灭作用,BSA的发射波长在346 nm附近。



1. BSA; 2. AZT-Es; 3. AZT-Es-BSA; 4. AZT-Es + BSA

图2 AZT-Es与BSA的荧光光谱

2.2.3 荧光猝灭与温度的关系 荧光猝灭过程通常可以分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭遵循Stern-Volmer猝灭方程:

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

式中: F_0 和 F 分别表示不存在和存在猝灭剂时荧光物质的荧光强度; K_{sv} 为动态猝灭常数; K_q 为动态荧光猝灭速率常数; $[Q]$ 为猝灭剂的浓度; τ_0 为无

猝灭剂时荧光物质的平均寿命, $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}^{[11]}$ 。将以上过程按动态猝灭过程处理,以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图,得到不同温度下的Stern-Volmer(图3), K_{sv} 的计算结果见表1。

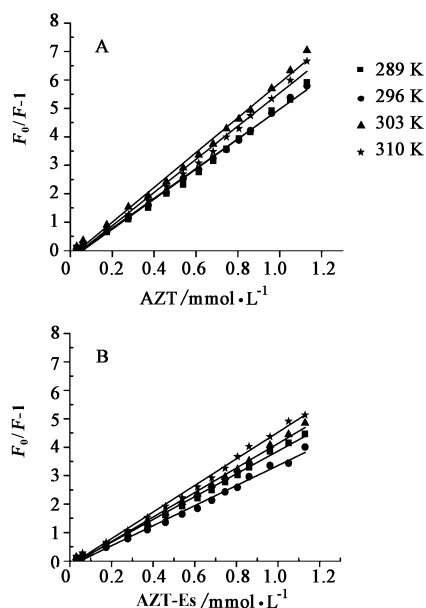


图3 AZT-BSA(A)与AZT-Es-BSA(B)体系的Stern-Volmer

一般情况下,根据猝灭常数随温度的变化,可以区分为动态猝灭和静态猝灭。对于动态猝灭,随着温度的升高,电子的转移加剧,使荧光物质的猝灭常数也增大,而对静态猝灭则温度升高将降低复合物的稳定性,使猝灭常数减小^[12]。从图3和表1可知,在289~296 K内,AZT,AZT-Es对BSA的猝灭常数变化不大,斜率基本上重叠,属于形成复合物所引起的静态猝灭;而在296~310 K内,AZT-Es对BSA的猝灭常数随着温度的升高而升高,具有动态猝灭特征。AZT对BSA的猝灭常数随着温度先升高后降低,仍然表现静态猝灭特征。大于类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数值为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{[13]}$,两种体系对BSA的猝灭过程速率,远远大于扩散控制动态碰撞引起的。故初步判断,在低温下,AZT-Es对BSA的猝灭作用机制以静态猝灭为主,随着温度的升高逐渐转变为静态猝灭和动态猝灭共同作用的混合猝灭^[14]。而在289~310 K内AZT对BSA的猝灭过程为静态猝灭。

2.2.4 结合常数及结合位点数的确定 小分子药物与蛋白质生物大分子上的任一一位点发生作用时,体系中发生作用的小分子与未发生作用的小分子之间处于一种平衡状态,这种平衡关系可以用下面的

方程来描述^[15]：

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K_b + n \lg[Q] \quad (2)$$

式中： n 为结合位点数； K_b 为表观结合常数。

pH 7.4 时，在 345 nm 处，绘制 4 个不同温度下的 $\lg[(F_0 - F)/F] \sim \lg[Q]$ 曲线，得到结合常数 K_b 和结合位点 n ，结果列于表 1。

表 1 不同温度下两种体系的猝灭常数、结合参数以及热力学参数

体系	T/K	$K_{sv}/(\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	$K_b/(\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$
AZT-Es-BSA	289	4.006	1.046	3.784	-19.97	4.930	85.56
	296	3.526	1.135	3.371	-19.98		
	303	4.311	1.165	4.193	-21.01		
	310	4.676	0.995	4.335	-21.09		
AZT-BSA	289	5.281	1.156	4.966	-20.44	7.710	97.45
	296	5.232	1.186	5.099	-21		
	303	6.121	1.052	5.789	-21.82		
	310	5.835	0.998	6.163	-21.93		

由表 1 可知，AZT-Es 与 BSA 作用的结合常数 K_b 随着温度的升高先降低后升高，可能 296 K 左右在其构象发生了改变。AZT 与 BSA 作用的结合常数 K_b 在高温内急剧增大。两个体系的平均结合位点数分别为 1.08 和 1.09。可以看出 1 mol BSA 约分别与 1 mol AZT, 1 mol AZT-Es 分子结合。

2.3 热力学性质及作用力的确定 药物与蛋白质间的作用力属于分子间的弱相互作用，包括氢键力、范德华力、静电引力和疏水作用力。根据反应前后热力学焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小，可判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型： $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 为疏水作用力； $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 为氢键力和范德华力； $\Delta H \approx 0, \Delta S > 0$ 为静电力^[16]。当温度变化不大时，反应的焓变 ΔH 可以看成是一个常数。根据以下热力学参数方程，可以求得 $\Delta H, \Delta S$ ^[17]。

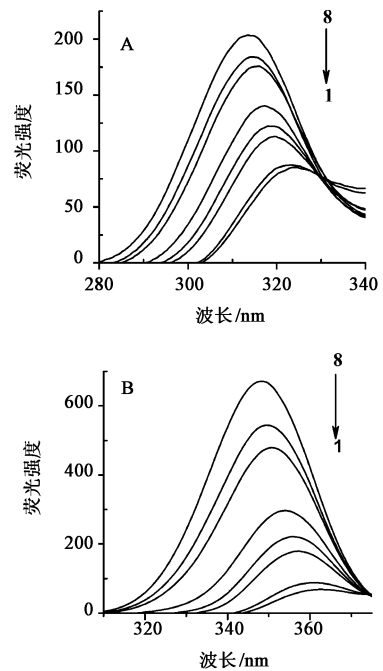
$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

由于两种体系的 $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ ，表明疏水作用力是结合反应的主要驱动力，且 $\Delta G < 0$ ，有利于反应的自发进行，AZT-BSA 与 AZT-Es-BSA 体系中的结合是自发进行的。

2.4 AZT-Es-BSA 的同步荧光分析 血清蛋白能够发出荧光是因为存在 3 种芳香族氨基酸：色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。这些氨基酸的结构不同，造成荧光强度也不同，其比值为 100:9:0.5，因此大多数情况下，可以认为蛋白质所显示的荧光主要来自色氨酸残基的贡献^[18]。当 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时，所得同步荧光光谱只显示酪氨酸残基的特征荧光； $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时，所得同步荧光光谱只显示色氨酸残基的特征荧光^[19]。从图 4(A) 中可以看出，当 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时，随着药物质量浓度的增加，不仅 BSA 的荧光强度降低，而且蛋白质中酪氨酸残基的最大发射波长产生

了红移，即从 314 nm 处移到了 327 nm 处。图 4(B) 当 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时，同样蛋白质中色氨酸残基最大发射波长发生红移，即从 347 nm 处移到 360 nm 处。说明 AZT-Es 的加入使 BSA 的两种构象同时发生了变化，酪氨酸残基和色氨酸残基所处环境的疏水性降低，亲水性增强。BSA 内部的疏水结构有所瓦解，BSA 的结构变得疏松。



8→1 (A) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; $C_{\text{BSA}}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,
 $C_{\text{AZT-Es}} (10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 0.61, 1.7, 2.7, 3.7, 4.6, 10.5, 11.3
8→1 (B) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$; $C_{\text{BSA}}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,
 $C_{\text{AZT-Es}} (10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 0.61, 1.7, 2.7, 3.7, 4.6, 8.6, 11.3

图 4 BSA 与 AZT-Es 复合体系的同步荧光光谱

2.5 各体系中金属离子对结合常数的影响 研究体内各主要金属离子对药物与白蛋白结合的影响，有助于了解药物在体内的状态和药理作用，并且可以为临床用药提供科学依据。在实验条件下 (pH

7.4, 298 K), 考察了 Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} 等金属离子对 AZT-BSA 和 AZT-Es-BSA 结合常数的影响, 结果见表 2。

表 2 金属离子对两种体系结合常数的影响 (298 K)

体系	$K_{sv}/(\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$		R^2	
	AZT	AZT-Es	AZT	AZT-Es
BSA	5.50	4.13	0.995	0.996
BSA- Ca^{2+}	5.99	4.79	0.992	0.992
BSA- Zn^{2+}	5.13	4.61	0.996	0.997
BSA- Cu^{2+}	5.85	4.59	0.995	0.995
BSA- Mg^{2+}	5.99	4.39	0.997	0.997
BSA- Pb^{2+}	5.44	4.48	0.997	0.997

从表 2 中可以看出, 在室温下实验所加的各金属离子对 AZT-BSA 与 AZT-Es-BSA 的结合过程的影响很小。说明这些金属离子不参与 BSA 的结合过程。这有助于药物在血清蛋白中存储和运输。

3 结论

本文运用荧光猝灭和紫外光谱法研究了齐多夫定及其乙酸盐 (AZT-Es) 与牛血清白蛋白 (BSA) 的结合常数、结合位点数、结合类型、共存金属离子对结合的影响。研究表明, AZT, AZT-Es 均与 BSA 自发地发生结合反应, 能猝灭 BSA 的内源荧光, 形成了新的复合物。AZT-BSA 荧光猝灭机制为静态猝灭; AZT-Es-BSA 荧光猝灭机制为低温下静态, 高温下为动态和静态共同作用的混合猝灭机制; 两种体系都疏水作用力为主导, 以摩尔比约 1:1 结合。AZT-Es 能使 BSA 构象发生明显变化, 而共存金属离子对 AZT-BSA 与 AZT-Es-BSA 的复合常数影响很小。AZT-Es 将是一种非常有发展前景的新的抗 HIV 药物, 可为寻找更有效的、更安全的抗 HIV 药物提供有价值的信息。

[参考文献]

- [1] De Clercq E. Anti-HIV drugs; 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV [J]. *Int Antimicrob Ag*, 2009, 33(4):307.
- [2] Kumar V R, Reddy B, Kumar B R, et al. High throughput LC-MS-MS method for simultaneous determination of zidovudine, lamivudine and nevirapine in human plasma [J]. *Chromatogr B*, 2013, 921/922:9.
- [3] Gajbhiya V, Ganesh N, Barva J, et al. Synthesis, characterization and targeting potential of zidovudine loaded sialic acid conjugated-mannosylated poly(propyleneimine) dendrimers [J]. *Eur Pharm Sci*, 2013, 48(4/5):668.
- [4] Quevedo M A, Briñón M C. *In vitro* and *in vivo* pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine [J]. *Antivir Res*, 2009, 83(2):103.
- [5] Turghun Muhammad, Zohre Nur, Piletska E V, et al.

- Rational design of molecularly imprinted polymer; the choice of cross-linker [J]. *Analyst*, 2012, 137(11):2623.
- [6] Yue Y Y, Chen X G, Qin J, et al. A study of the binding of C. I. Direct Yellow 9 to human serum albumin using optical spectroscopy and molecular modeling [J]. *Dyes Pigments*, 2008, 79(2):176.
- [7] 卢秀敏, 陈得军, 王公轲, 等. 诺氟沙星与卵清蛋白相互作用的研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(1):236.
- [8] Eftimk M, Ghiron C A. Exposure of tryptophanyl residues in proteins quantitative determination by fluorescence quenching studies [J]. *Biochemistry*, 1976, 15(3):672.
- [9] 周能, 梁逸曾, 王平, 等. 荷花碱与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. *分析化学*, 2008, 36(8):1066.
- [10] 邵爽, 邱瑾. 头孢地嗪钠与牛血清白蛋白相互作用研究 [J]. *物理化学学报*, 2009, 25(7):1342.
- [11] Ding F, Huang J L, Juan L, et al. A study of the binding of C. I. Mordant Red 3 with bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy [J]. *Dyes Pigments*, 2009, 82(1):65.
- [12] Zhang M F, Fu L, Wang J, et al. Spectroscopic and electrochemical studies on the interaction of an inclusion complex of β -cyclodextrin/fullerene with bovine serum albumin in aqueous solution [J]. *Photochem Photobiol A*, 2012, 228(1):28.
- [13] Green N J B, Pimblott S M, Tachiya M. Generalizations of the Stern-Volmer Relation [J]. *Phys Chem*, 1993, 97(1):196.
- [14] 孙坤, 张爱平, 王锐利, 等. 荧光光谱法研究青蒿素类抗疟与 CYP2B6m 酶的相互作用 [J]. *分析测试学报*, 2011, 30(7):750.
- [15] Sandhya B, Hegde A H, Kalanur S, et al. Interaction of triprolidine hydrochloride with serum albumins: Thermodynamic and binding characteristics, and influence of site probes [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(5):1180.
- [16] Maruyama T, Lin C C, Yamasaki K T, et al. Interaction of triprolidine hydrochloride with serum albumins: Thermodynamic and binding characteristics, and influence of site probes [J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45(5):1017.
- [17] Ware W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process [J]. *Phys Chem*, 1962, 66:455.
- [18] 柳全文, 徐慧, 李桂华, 等. 咖啡酸与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱法研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31(1):24.
- [19] Jayabharathi J, Thanikachalam V, Perumal M V. A study on the binding interaction between the imidazole derivative and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *Lumin*, 2012, 132(3):707.

[责任编辑 顾雪竹]