

苦味酸与牛血清蛋白相互作用的 光谱研究

王安萍¹, 曾建忠¹, 殷帅文¹, 张国文²

(1. 井冈山大学生命科学学院, 江西吉安 343009;

2. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

摘要:运用荧光和紫外光谱法并结合分子模拟技术研究了人体生理条件下苦味酸(Picric acid, 简称 PA)与牛血清白蛋白(BSA)的结合作用。实验结果表明,苦味酸对 BSA 的荧光猝灭作用较强,该猝灭属于生成复合物的静态猝灭。根据实验结果求得了不同温度下苦味酸与牛血清白蛋白结合作用的结合位点数和结合常数。根据 van't Hoff 方程计算出的热力学参数,确定它们之间的相互作用力由以氢键和范德华力为主转变为以疏水作用力为主。根据 Foster 非辐射能量转移理论,求得苦味酸在距色氨酸残基距离 3.14nm 的位置与 BSA 结合。三种探针竞争标记药物实验表明,苦味酸主要结合在 BSA 上 site I 位点,分子模拟证实了该结合位点。同步荧光光谱结果表明苦味酸的加入使 BSA 的构象发生了变化。

关键词:苦味酸,牛血清白蛋白,荧光猝灭,结合位点,热力学参数,分子模拟

Interaction between picric acid and bovine serum albumin by fluorescence spectrometry

WANG An-ping¹, ZENG Jian-zhong¹, YIN Shuai-wen¹, ZHANG Guo-wen²

(1. School of Life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an 343009, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The interaction between picric acid (PA) and bovine serum albumin (BSA) was studied at the physiological pH by fluorescence and (UV-vis) absorption spectroscopy, coupled with molecular modeling approach. The experimental results showed that there was a strong fluorescence quenching of BSA by PA. The probable quenching mechanism of fluorescence of BSA by PA was a static quenching by forming the BSA-PA complex. The binding constant and the number of binding sites of PA with BSA at different temperatures were obtained by fluorescence quenching method. According to the van't Hoff equation, the thermodynamic parameters were calculated, which suggested that the binding pattern was considered from reflection of hydrogen bond and vanderWaals forces to hydrophobic interaction. The binding locality was an area 3.14nm away from tryptophan residue in BSA based on the Foster theory of non-radiation energy transfer. Three competitive sitemarkers revealed that PA was mainly located in the region of site I, molecular docking studies confirmed the binding site. Moreover, the results of synchronous fluorescence spectra demonstrated that the conformation of BSA was changed in the presence of PA.

Key words: picric acid; bovine serum albumin; fluorescence quenching; binding site; thermodynamic parameters; molecular modeling

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)23-0068-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.23.005

苦味酸(缩写为 PA),学名 2,4,6-三硝基苯酚,是一种黄色针状或块状结晶物,主要用在制造炸药、农业上用的杀菌剂及除霉剂、医药治疗上用的杀菌剂及收敛剂等。随着石油化工、有机合成和焦化工

业等化工企业的发展,生产中产生的含苦味酸的有害废水易造成水源污染,对人体健康造成了一定的危害^[1-2]。目前对苦味酸的研究主要集中在测定方法的研究^[3-4],而通过研究苦味酸与血清白蛋白的相互作用,确定苦味酸这种环境污染与生物大分子的结合参数以及评价它的生态毒性鲜有报道。血清白蛋白(BSA)是血浆中最丰富的蛋白质之一,在血液中它主要起维持渗透压作用、pH 缓冲作用、载体作用等,由于它可与多种阳离子、阴离子和其他小分

收稿日期: 2014-03-10

作者简介: 王安萍(1971-),女,硕士,讲师,研究方向:生物药物分析。

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(JZ09018);江西省科技支撑项目资助(20112BBF6001)。

子物质结合,因此研究它和污染物的相互作用以及揭示污染物的毒性作用机理具有重要意义。

本文在模拟人体生理条件下,以 BSA 为蛋白模型,利用荧光和紫外光谱并结合分子模拟技术研究了苦味酸与 BSA 的相互作用,这将为从生物大分子水平上研究苦味酸对牛血清白蛋白结构功能性质的影响以及苦味酸的毒性提供重要信息。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

苦味酸 广东台山化工厂产品;用无水乙醇配制成浓度为 $1.11 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液;牛血清白蛋白(北京华美生物工程有限公司产品)标准溶液:用 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液(其中含有 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)配制成浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,溶液配好保存于 4°C 的冰箱中备用;其他试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

UV2450 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司;F-4500 型荧光光度计 日本日立公司;pHS-3C 型酸度计 上海雷磁仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光光谱和荧光猝灭方式的测定 将浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液准确移取 3mL 至石英荧光池中,以 280nm 为激发波长,扫描其荧光光谱后,再在其中加入一定量的苦味酸溶液,混合均匀并静置 4min,然后测定体系的荧光光谱。荧光光谱仪同时扫描激发和发射波长间波长差分别为 $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ (分别代表酪氨酸残基的荧光和色氨酸残基的荧光^[5])上述溶液体系的同步荧光光谱,荧光激发和发射狭缝分别为 2.5nm 和 5nm。位点竞争实验是采用曙红 Y、布洛芬和洋地黄毒苷 3 种结合位点探针,固定 BSA 和该三种探针的浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,向体系中连续加入一定的苦味酸溶液,记录 298K 时 290~500nm 波长范围下体系的荧光发射光谱。

荧光猝灭一般有动态猝灭作用和静态猝灭作用,以及由它们引起的动态猝灭和静态猝灭同时发生的复合猝灭作用^[6]。为了判断猝灭方式,一般来说可以首先将荧光猝灭数据通过如下 Stern-Volmer 方程处理分析:

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

上式中 F_0 和 F 分别为猝灭剂和荧光体作用前后的荧光强度,通过 F_0/F 对猝灭剂浓度 $[Q]$ 作图并计算出不同温度下的猝灭常数。

1.2.2 紫外-可见光谱的测定 准确移取 $1.6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液 3mL 至石英比色皿中,扫描 190~350nm 范围紫外光谱,然后连续加入一定的苦味酸溶液,混合后放置 4min,并测定相应游离浓度的苦味酸的紫外吸收光谱。通过紫外可见吸收光谱法考察蛋白质的紫外吸收特征峰的变化,可判断荧光猝灭方式。一般在蛋白质的紫外吸收光谱中,210nm 处的峰是肽键的强吸收峰,代表螺旋结构。蛋白质构象如果发生改变,则氨基酸残基的紫外吸收光谱随之发生改变^[7]。

1.2.3 结合常数、结合距离和作用力方式的确定 有机小分子与生物大分子的任何一个位点发生作用时,可以用下面方程表述它们之间的平衡关系^[8]:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q] \quad \text{式(2)}$$

式中: K_A 为反应的结合常数, n 是结合位点数,根据上式求得小分子猝灭剂与大分子 BSA 作用的 K_A 和 n 。

据 Foster 能量转移理论,当供体的荧光发射光谱与受体的紫外吸收光谱有一定的重叠,而且此二者之间的最大距离小于 7nm 内时,在它们中将会发生非辐射能量转移现象,进而使荧光体荧光猝灭^[9]。一般认为,发生能量转移的效率 E 的计算公式为 $1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$,当能量转移效率 E 为 50% 时,临界距离 R_0 可以通过公式 $R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi_0 J$ 获得,摩尔浓度比为 1:1 时供体的荧光光谱与受体的吸收光谱的重叠积分面积 J 的计算公式为 $\sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda$ 。

药物与蛋白质之间的相互作用力主要包括氢键、范德华力、疏水作用力和静电引力等。在温度变化不大的情况下,根据热力学参数与作用力间的关系^[10]:体系的焓变和熵变可以通过 van't Hoff 方程得出:

$$\lg K_A = \frac{-\Delta H}{2.303RT} + \frac{\Delta S}{2.303R} \quad \text{式(3)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{式(4)}$$

式中: K_A 是相应温度下的结合常数, R 是气体常数;

1.2.4 分子模拟研究 采用 Autodock 4.2 软件结合 Lamarckian Genetic Algorithm 算法进行处理分析。由 Sybyl \times 1.1 (USA) 软件绘制苦味酸 3D 结构,然后在 MMFF94 力场使用 MMFF94 电荷将其能量最小化。BSA 的晶体结构(编码是 3V03)来自 Protein Data Bank 数据库(www.rcsb.org)^[11]。

2 结果与讨论

2.1 苦味酸对 BSA 的荧光猝灭机制

BSA 分子中的酪氨酸、色氨酸等氨基酸残基能够产生荧光,因而 BSA 是内源性荧光物质,主要表现在色氨酸残基。图 1 为 298K 时不同浓度的苦味酸与 BSA 反应后测得的 BSA 内源荧光光谱。随着苦味酸浓度增加,BSA 的荧光被猝灭,荧光强度有规律地降低,降低的幅度越来越小,峰位也由 351nm 位蓝移到 344nm,这些现象表明苦味酸和 BSA 产生了结合作用,使色氨酸残基周围的微环境发生改变,且结合产物趋向饱和并使结合反应速度逐渐下降直至达到平衡状态^[12]。

根据 Stern-Volmer 方程(1)计算结果表明(图 2 和表 1),在不同温度下,猝灭速率常数 K_q 均为 10^{13} 数量级,远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,同时猝灭常数 K_{sv} 总体上随温度升高有降低趋势,因此推测苦味酸对 BSA 的猝灭主要为形成复合物的静态猝灭。但是苦味酸对 BSA 的荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线并非呈直

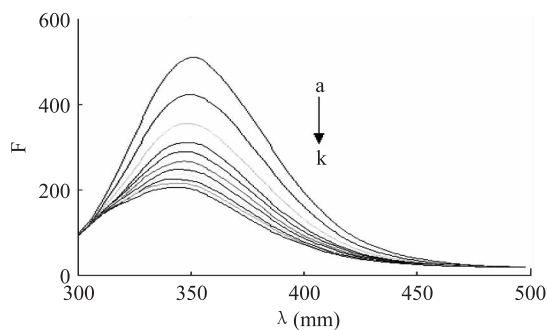


图1 不同浓度的苦味酸对 BSA 荧光猝灭图 T = 298K

Fig.1 Effect of Picric acid at different concentration on fluorescence spectra of BSA

注: $C_{BSA} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $CPA (\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$,
Curves a→k: 0, 0.33, 0.66, 0.99, 1.33,
1.66, 2.00, 2.33, 2.66, 3.00, 3.33。

线,而是向 x 轴方向弯曲,产生这种现象的原因可能是因为苦味酸达到一定浓度后,其与 BSA 的结合反应达到平衡,苦味酸浓度的进一步增加使 BSA 的荧光猝灭变得不明显^[6,13-14]。

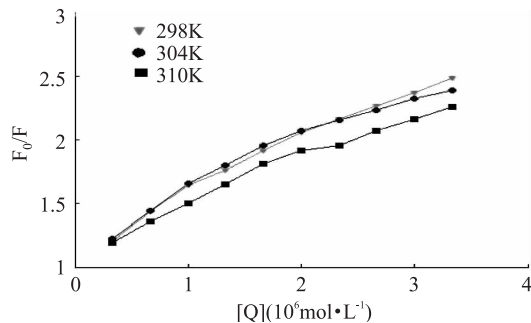


图2 苦味酸对 BSA 荧光猝灭的 Stern - Volmer 图

Fig.2 The Stern - Volmer plots for the quenching of BSA by Picric acid at different temperatures

注: $C_{BSA} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 苦味酸对 BSA 紫外-可见吸收光谱的影响

为了进一步证实苦味酸对 BSA 的猝灭可能主要是由复合物的组成引起的这一结论,对 BSA、BSA-苦味酸和苦味酸进行了紫外-可见光谱测定(图3)。从图中可以看出,随着苦味酸浓度的增加,游离的 BSA 在 210nm 处的强吸收峰下降并产生显著红移,说明苦味酸的加入使 BSA 构象发生变化^[7]。苦味酸与 BSA 发生了相互作用,产生了复合物,也进一步证明荧光猝灭机理为静态猝灭^[15]。

2.3 体系的结合常数和结合位点数

表1 不同温度下苦味酸与 BSA 作用的猝灭常数、速率常数、结合常数及热力学参数

Table1 K_{sv} 、 K_q 、 K_A and thermodynamic parameters of BSA-Picric acid system at different temperatures

T(K)	K_{sv} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	K_q ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$)	R^a	K_A ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	n	R^b	ΔH ($\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS ($\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔG ($\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
298	4.09×10^5	4.09×10^{13}	0.9908	5.46×10^4	0.8292	0.9944			-27.82
304	3.77×10^5	3.77×10^{13}	0.9795	2.81×10^4	0.7786	0.9918	-83.39	-0.19	-26.30
310	3.48×10^5	3.48×10^{13}	0.9896	3.98×10^4	0.8178	0.9967	45.78	0.23	-26.76

注:表中 R^a 、 R^b 分别表示不同温度时猝灭常数和结合常数的线性相关系数。

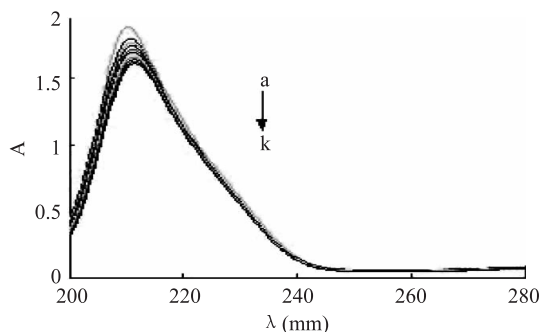


图3 不同浓度的苦味酸对 BSA 紫外吸收光谱的影响

Fig.3 Effect of Picric acid at different concentration on UV absorption spectra of BSA

注: $C_{BSA} = 1.6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $CPA (\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$,
Curves a→k: 0, 0.37, 0.74, 1.11, 1.48,
1.85, 2.22, 2.59, 2.96, 3.33。

通过小分子与生物大分子平衡关系方程(2)计算 n 约为 1(表1),说明苦味酸与 BSA 的作用位点只有 1 个色氨酸残基与药物相结合,因静态猝灭形成的配合物比例为 1:1,这也在一定程度上证明了苦味酸对 BSA 的猝灭反应主要是以静态猝灭为主的;另外还可以看出结合常数 K_A 和结合位点 n 随着温度的升高先下降再增加,这可能是苦味酸与 BSA 形成的复合物先是随着温度升高稳定性下降,而当其与 BSA 的结合达到平衡时,由于相互作用方式的改变又可能增强了苦味酸与 BSA 之间的结合能力,使 K_A 增大。

2.4 热力学参数和作用力类型

根据热力学参数与作用力间的关系方程式计算如表1所示,吉布斯自由能变 ΔG 都小于 0,说明该反应是一个自由能降低的自发过程;在 298K 到 304K 时,因为 $\Delta H < 0$,所以苦味酸与 BSA 的结合是放热反应,根据热力学有关理论可知升高温度将不利于此反应向生成复合物的方向进行,静态猝灭结合常数 K_A 减小,再由 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$,判断此过程苦味酸与 BSA 的之间的作用力主要是氢键和范德华力;在 304K 到 310K 时, $\Delta H > 0$,这表明在温度变化过程中反应吸热,升温有利于此反应的进行,静态猝灭结合常数 K_A 增大,生成的复合物稳定性增加,再由 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$,判断此过程苦味酸与 BSA 相互间的作用力已由氢键和范德华力转变为疏水作用力。

2.5 苦味酸与 BSA 之间的结合距离

据 Foster 能量转移理论,苦味酸紫外吸收光谱与 BSA 的荧光光谱存在明显的重叠(图4),说明苦味酸

与 BSA 之间可能发生了非辐射能量转移。经计算,重叠积分面积 J 为 $2.23 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 临界距离 R_0 为 2.92nm, 能量转移效率 E 为 0.391, 于是苦味酸与色氨酸残基间的结合距离 r 为 3.14nm。即在 pH7.4、298K 条件下苦味酸与色氨酸残基之间的结合距离 r 小于 7nm, 说明苦味酸与 BSA 之间是可以发生有效的能量转移的。同时可以看出 r 大于 R_0 , 这进一步表明苦味酸对 BSA 内源荧光的猝灭主要由静态猝灭引起的而非能量转移引起的。

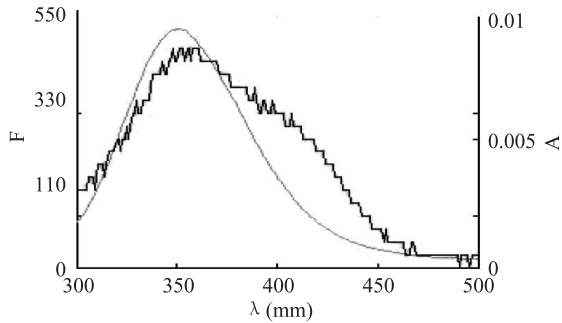


图4 BSA 的荧光发射光谱(a)和苦味酸的紫外吸收光谱(b)的重叠光谱

Fig.4 Overlapping between the fluorescence emission spectra of BSA(a) and UV absorption spectra of Picric acid(b)

注: $C_{\text{BSA}} = C_{\text{PA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 苦味酸在 BSA 上结合位点的确定

药物在 BSA 上主要有 2 个结合位点, 这两个结合位点分别位于亚域 II A 和 III A 的疏水腔中, 分别把这两个位点称之为 site I 和 site II。研究发现曙红 Y (eosin Y) 与 BSA 结合于 site I^[16], 布洛芬 (ibuprofen) 与 BSA 结合于 site II^[17]。此外, 研究还发现洋地黄毒苷 (digitoxin) 在 BSA 上的结合位点并不在 site I 和 site II 位, 于是将其在 BSA 上的结合位点定义为 site III。因此, 本实验通过苦味酸与上述该三种标记药物的竞争实验, 确定苦味酸在 BSA 上的结合位点。从实验结果可知, 曙红 Y 的加入显著地降低了苦味酸与 BSA 反应的结合常数(表 2), 而布洛芬或洋地黄毒苷对其影响较小, 说明苦味酸与曙红 Y 竞争结合 BSA 中的同一位点, 也就是说苦味酸在 BSA 上的结合位点主要在 BSA 的亚域 II A 上 (site I 位)。

表 2 苦味酸-BSA 体系位点竞争实验的结合常数

Table 2 Binding constants of site marker competitive experiments in BSA-Picric acid system

T/K	Site maker	$K_A (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	R
298	Blank	5.46×10^4	0.8292	0.9944
	Ibuprofen	1.10×10^5	0.8845	0.9956
	Digitoxin	6.01×10^4	0.8294	0.9958
	Eosin Y	1.19×10^4	0.7461	0.9825

2.7 苦味酸对 BSA 构象的影响

BSA 同步荧光光谱中, 不论 BSA 表现出的是酪氨酸荧光还是色氨酸荧光, 其同步荧光最大发射波长的改变都表明氨基酸残基周围的极性发生了变

化, 如最大发射波长发生蓝移则说明生色团疏水结构变紧密, 肽链的伸展程度变小, 使其周围微环境的极性减小, 疏水性增加; 反之如发生红移则生色团疏水结构和极性的变化相反^[18]。

图 5a 和图 5b 分别是 298K 时, 波长差 $\Delta\lambda$ 为 15nm 和 60nm 时 BSA 的同步荧光光谱, 从图中可以看出, 当固定 BSA 的浓度逐渐增加苦味酸的浓度时, 随着苦味酸浓度的增大, 酪氨酸残基和色氨酸残基的同步荧光同时被猝灭。其中酪氨酸残基荧光表现为在加入的苦味酸浓度等于及大于 $2.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时强度不再下降, 同时其荧光最大发射波长还略为蓝移, 这可能是由于苦味酸浓度增加到一定程度后, 体系中的苦味酸与 BSA 结合反应至平衡状态, 且苦味酸的加入使酪氨酸残基所在生色团结构略变紧密, 所处微环境的极性稍有减小所致; 相比之下, 色氨酸残基的荧光降低比酪氨酸残基更显著, 说明苦味酸与牛血清蛋白的结合位点更接近于色氨酸残基, 苦味酸主要与 BSA 中的色氨酸残基形成复合物; 色氨酸残基荧光最大发射波长也发生了蓝移, 且在 240nm 附近产生一个新的峰, 并随苦味酸浓度增大而逐渐上升红移, 说明苦味酸改变了色氨酸残基周围极性以及生色团疏水结构。

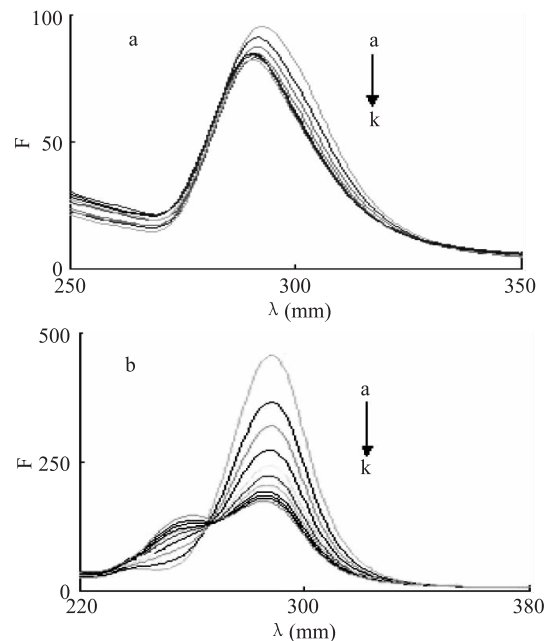


图 5 不同浓度的苦味酸对 BSA 同步荧光光谱的影响

Fig.5 The synchronous fluorescence spectra of BSA in the presence of Picric acid

注: a: $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$; b: $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$; $C_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{PA}} (\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$, Curves a→k: 0, 0.33, 0.66, 0.99, 1.33, 1.66, 2.00, 2.33, 2.66, 3.00, 3.33; T = 298K。

2.8 分子模拟

分子模拟能够从分子水平上探究小分子物质与蛋白质之间的结合位点和结合模式。根据能量最佳原理获得苦味酸与 BSA 的分子对接图(图 6), 从图 6 可以看出, 苦味酸分子嵌入 BSA 的亚域 II A 疏水空腔中 (site I 位), 该结果与荧光位点探针竞争实验结

果一致。苦味酸分子被 Gln195, Lys242, Leu237, Arg256, Arg198, His241, Val240 及 Trp213 等残基包围,表明苦味酸与 BSA 发生了疏水作用,另外 BSA 中的 Arg217 和 Gln195 与苦味酸中羰基和磺酰基上的氧原子有氢键形成,长度分别为 2.595 和 2.082,结合分子模拟与热力学分析的结果,可推断苦味酸与 BSA 分子之间的相互作用力既有氢键又有疏水作用力。

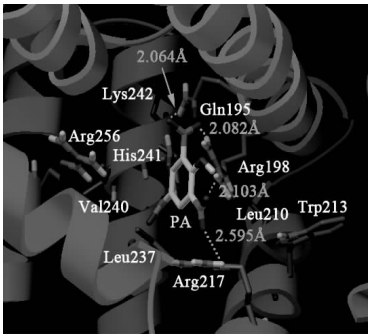


图6 苦味酸与 BSA 相互作用的分子对接图

Fig.6 Picture of molecular docking between Picric acid and BSA

3 结论

本实验通过荧光、紫外光谱对苦味酸和 BSA 的相互作用进行研究可知,苦味酸对 BSA 内源性荧光具有生成复合物的静态猝灭作用,当结合产物趋向饱和时,反应速度逐渐下降至平衡状态时,猝灭变的不明显;在 298K 到 304K 时,苦味酸与 BSA 的之间的作用力主要是以氢键和范德华力为主,在 304K 到 310K 时,苦味酸与 BSA 结合的作用力转变为以疏水作用力为主,体系为自发的热力学反应;结合位点数近似为 1,结合位点位于 BSA 的亚域 II A 上 (site I 位) 处,分子模拟结果进一步验证结合位点;苦味酸与 BSA 相互结合时的作用距离为 3.14nm,之间可以发生有效的能量转移;苦味酸主要与 BSA 中的色氨酸残基形成复合物,它的加入使 BSA 构象发生明显改变,在一定程度上会影响牛血清白蛋白相关的功能,进而显示出一定的毒性。

参考文献

- [1] 孙维生.苦味酸安全管理[N].中国化工报,2005-03-07(005).
[2] 江放明,戴斐,谭爱喜,等.高效液相色谱法测定烟水药剂中的苦味酸[J].光谱实验室,2011,28(3):1142-1145.

(上接第 67 页)

- [25] Yuan B, Ren J Y, Zhao M M, *et al.* Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high - pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate[J]. LWT-Food Science and Technology, 2012, 46(2): 453-459.
[26] Kim H J, Decker E A, McClements D J. Role of post adsorption conformation changes of β -lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH[J]. Langmuir, 2002, 18(20): 7577-7583.
[27] Spector S, Wang M, Carp S A, *et al.* Rational modification of

- [3] 倪刘建,杨文武,李江,等.气相色谱法测定水中的苦味酸[J].中国环境监测,2009,25(5):47-49.
[4] 刘辉利,鲜啟鸣,邹惠仙,等.水中苦味酸的测定[J].环境污染与防治,2005,27(2):145-147.
[5] 吴汉东,史雪岩,李永丹.荧光光谱法研究辛硫磷与牛血清白蛋白的相互作用[J].分析实验室,2009,28(3):15-18.
[6] 许金钧,王尊本.荧光分析法[M].北京:科学出版社,2006:35-122.
[7] 曹书霞,赵玉芬.分子吸收光谱在生物大分子研究中的应用[J].光谱学与光谱分析,2004,24(10):1197-1200.
[8] Hu Y J, Liu Y, Wang J B, *et al.* Study of the interaction between monoammonium glycyrrhizinate and bovine serum albumin[J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 36(4): 915-919.
[9] Forster T, Sinanogly O. Modern Quantum Chemistry [M]. New York: Academic Press, 1966: 93.
[10] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions; forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102.
[11] Tabassum S, Al-asbahy W M, Afzal M, *et al.* Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with Human Serum Albumin (HAS): spectroscopic and molecular docking investigations [J]. J Photochem Photobiol, B, 2012, 114: 132-139.
[12] 谢娜,吴汉东,刘奇志,等.氯与牛血清白蛋白的相互作用[J].光谱实验室,2011,28(5):2158-2162.
[13] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, seconded [M]. New York: Plenum Press, 1999: 237-265.
[14] 马纪,刘媛,谢孟峡.三种异黄酮类药物与不同异构体人血清白蛋白的作用机制研究[J].光谱学与光谱分析, 2012, 32(1): 1-6.
[15] 倪永年,张秋兰.光谱法结合 MCR-ALS 研究盐酸克伦特罗与牛血清白蛋白的相互作用[J].南昌大学学报:理科版, 2010, 34(2): 150-155.
[16] Niy L Q, Kokot S. Spectrophotometric study of the interaction between chlorotetracycline and bovine serum albumin using Eosin Y as site marker with the aid of chemometrics [J]. Spectrochimica Acta A, 2011, 78(1): 443-448.
[17] Ding F, Diao J X, Sun Y, *et al.* Bioevaluation of Human Serum Albumin - Hesperidin Bioconjugate; Insight into Protein Vector Function and Conformation [J]. Agric Food Chem, 2012, 60(29): 7218-7228.
[18] 潘祖亭,马勇,王巍.荧光光谱法研究克伦特罗与蛋白质的结合作用[J].分析实验室,2004,23(1):5-8.

- protein stability by the mutation of charged surface residues [J]. Biochemistry, 2009, 39(5): 872-879.
[28] Cromwell M E M, Hilario E, Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing [J]. The AAPS Journal, 2006, 8(3): 572-579.
[29] Huang Y, Hua Y, Qiu A. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation [J]. Food Research International, 2006, 39(2): 240-249.
[30] Schmitt C, Bovay C, Rouvet M, *et al.* Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: Physicochemical, interfacial, and foaming properties [J]. Langmuir, 2007, 23(8): 4155-4166.