

赵旭红, 夏彩芬, 周紫薇, 等. 花青素对牛血清白蛋白的光谱特性及构象的影响 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 57-62. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060126

ZHAO Xuhong, XIA Caifen, ZHOU Ziwei, et al. Effects of Anthocyanins on Spectral Properties and Conformation of Bovine Serum Albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 57-62. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060126

· 研究与探讨 ·

花青素对牛血清白蛋白的光谱特性 及构象的影响

赵旭红, 夏彩芬*, 周紫薇, 庄文丽, 郭梅英

(湖北工程学院化学与材料科学学院, 湖北孝感 432000)

摘要:为研究模拟生理条件下花青素(ACN)对牛血清白蛋白(BSA)的光谱特性及对 BSA 功能构象的影响, 本文采用荧光光谱法判定 ACN 对 BSA 的猝灭方式、结合位点数、结合位点、结合作用力类型以及是否发生非辐射能量转移; 利用紫外-可见吸收光谱法、圆二色谱法、傅里叶红外吸收光谱法进一步表征了 BSA 构象变化。结果表明, 在 ACN 的作用下, BSA 内源荧光被有规律的猝灭, 猝灭机制主要为形成 ACN-BSA 复合物的静态猝灭和非辐射能量转移。猝灭过程是自发进行的, 结合位点数约为 1, 结合位点位于 BSA 亚结构域的 site I, 并使得 BSA 二级结构中 α -螺旋含量减少了 3.1%。ACN 对 BSA 有较强的结合能力, 并能使 BSA 构象发生变化。

关键词:花青素, 牛血清白蛋白, 荧光光谱, 圆二色谱

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)07-0057-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060126

Effects of Anthocyanins on Spectral Properties and Conformation of Bovine Serum Albumin

ZHAO Xuhong, XIA Caifen*, ZHOU Ziwei, ZHUANG Wenli, GUO Meiyong

(College of Chemistry and Materials Science, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, China)

Abstract: The effect of spectral properties and conformation of bovine serum albumin (BSA) by anthocyanin (ACN) was studied under simulated physiological conditions. Fluorescence spectroscopy was used to determine the quenching mode, number of binding sites, binding force type and non - radiative energy transfer between ACN and BSA. And BSA conformational changes were characterized by means of UV-Vis absorption spectrometry, circular dichroism spectroscopy and Fourier infrared absorption spectroscopy. The results showed that BSA endogenous fluorescence was quenched regularly with ACN, and the quenching mechanism was static quenching of ACN-BSA complex and non - radiative energy transfer. The quenching process was spontaneous by hydrophobic force, and the binding-site number was about 1. Furthermore, the binding sites were located in site 1 in the subdomain of BSA, and the α -helix of BSA was reduced by 3.1% in the presence of ACN. The interaction of ACN and BSA is strong, which causes a conformational change of BSA.

Key words: anthocyanins; bovine serum albumin; fluorescence spectrometry; circular dichroism spectroscopy

花青素(Anthocyanin, ACN)是一类水溶性天然色素, 属黄酮类化合物, 主要来源于萝卜、爬山虎、紫薯、葡萄、板栗等植物中^[1-3]。花青素是天然抗氧化剂, 具有强效抗氧化性, 可与生物体内其他分子相互

作用而产生抗氧化等功效, 减少自由基对人体细胞的伤害, 起到抗氧化及抗衰老的作用, 从而保护人体免疫系统^[4-7]。有研究表明, 花青素有抑菌活性, 能影响肠道微生物菌群, 可以抑制部分肠道病原菌数量, 增

收稿日期: 2020-06-11

基金项目: 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划(T201816); 国家自然科学基金项目(21503075)。

作者简介: 赵旭红(1998-), 女, 本科, 研究方向: 生物光化学, E-mail: 1640230437@qq.com。

* 通信作者: 夏彩芬(1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物质资源利用, E-mail: xintong7903@126.com。

加双歧杆菌和乳酸杆菌等益生菌的数目,增强肠道屏障功能,花青素基于天然色素和抗氧化性这两个特性,在医药、食品及化妆品工业均有所应用^[5,7-10]。

牛血清白蛋白(BSA)常用作小分子药物研究的作用靶标,同时基于 BSA 中三个发射荧光氨基酸残基(色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸),ACN 与 BSA 结合,能减缓 BSA 的氧化进程,从而起到保护 BSA 的作用^[11]。为了进一步研究 ACN 与 BSA 作用机理及对 BSA 功能构象的影响,本文采用荧光光谱法、紫外-可见光吸收法、圆二色谱法、傅利叶红外光谱法等联用的方式分析了 ACN 与 BSA 相互作用过程中的光谱变化情况,获取 BSA 荧光强度、发射峰、吸收峰特征等指标。通过理论模型对这些指标参数的分析,计算得到结合常数、结合位点数、结合距离等信息,从而阐明 ACN 与 BSA 相互作用的机理及对 BSA 功能结构的影响,为 ACN 在医药、食品及化妆品工业的发展提供可靠的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

花青素(anthocyanin, ACN) 分析纯,大连美仑生物技术有限公司,实验中浓度为 4×10^{-3} mol/L;牛血清白蛋白(BSA) Sigma 公司;华法林 分析纯,山东西亚化学工业有限公司;布洛芬 分析纯,上海萨恩化学技术有限公司;实验用水 均为超纯水。

FLS920 荧光光谱仪 英国爱丁堡仪器有限公司;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;Chirascan 圆二色光谱仪

英国应用光物理公司;Nicolet-380 傅利叶红外光谱仪 美国热电高力公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 BSA 溶液:将 BSA($M_r=66430$)溶于 PBS 缓冲溶液中,配制成浓度为 1×10^{-3} mol/L 的 BSA 储备液,保存于 4°C 冰箱备用,使用时根据需以 PBS 稀释至所需浓度;ACN 溶液:用无水乙醇配成本体浓度为 4×10^{-3} mol/L 的 ACN 储备液^[2-3]。

1.2.2 荧光光谱 荧光实验中设置比色皿内 BSA 溶液终浓度为 1×10^{-5} mol/L, ACN 溶液本体浓度为 4×10^{-3} mol/L。各荧光实验中滴入的 ACN 含量呈浓度梯度增加^[2]。

1.2.2.1 变温荧光 设置 ACN 与 BSA 浓度比为 0:1(a)、1:1(b)、2:1(c)、3:1(d)、4:1(e)、5:1(f)、6:1(g)、7:1(h)、8:1(i)。在激发波长 280 nm 和狭缝 3 nm 条件下,分别扫描 298、304 和 310 K 时,ACN-BSA 体系的荧光光谱,波长范围为 300~500 nm^[2]。

1.2.2.2 同步荧光 设置 ACN 与 BSA 浓度比为 0:1(a)、1:1(b)、2:1(c)、3:1(d)、4:1(e)、5:1(f)、6:1(g)、7:1(h)、8:1(i)。固定 $\Delta\lambda=15$ nm 和 $\Delta\lambda=60$ nm,在激发波长 280 nm、狭缝宽度 3 nm 和发射波长 340 nm、狭缝宽度 5 nm 的条件下,扫描 250~400 nm

范围内 BSA 和 ACN 溶剂体系的同步荧光光谱^[2,6]。

1.2.2.3 位点竞争 设置 ACN 与 BSA 混合后的浓度比例分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1。选用两种位点竞争剂布洛芬和华法林,固定激发波长为 280 nm,在 298 K 的条件下分别测定不同探针下的荧光光谱^[12]。

1.2.3 紫外-可见吸收光谱 据文献 [3] 报道,ACN 加入会导致 BSA 在 280 nm 处吸光度下降,经过重复实验,本研究中设置紫外光谱实验中 BSA 浓度为 1×10^{-5} mol/L(a), ACN 与 BSA 混合后的浓度比例分别为 1:1(b)、2:1(c)、3:1(d)、4:1(e)、5:1(f)、6:1(g)。固定扫描区间为 190~400 nm,测定在 298 K 条件下的紫外-可见吸收光谱。

1.2.4 圆二色谱 BSA 终浓度为 5×10^{-6} mol/L(a), ACN 和 BSA 混合液浓度比分别为 1:1(b)和 2:1(c),固定波长在 180~260 nm 之间,在持续通氮气的条件下,分别测定 298 K 时不同溶剂体系的圆二色谱图^[12]。

1.2.5 红外光谱 BSA 终浓度为 1×10^{-5} mol/L, BSA 与 ACN 混合体系的浓度比为 1:6。固定扫描区间为 2000~1600 cm^{-1} ,利用液膜法分别测定不同溶剂体系的红外光谱^[2]。

1.3 数据处理

本文运用 Origin 2018、OMNIC 8.0、CDNN 等软件处理实验数据,获得 ACN 与 BSA 相互作用的机理及热力学特征。根据热力学公式计算得到 ACN 与 BSA 之间的热力学常数。

2 结果与分析

2.1 荧光光谱分析

2.1.1 变温荧光分析

2.1.1.1 ACN 对 BSA 猝灭方式的判定 荧光猝灭类型分为动态猝灭和静态猝灭,可以依据体系对温度的变化趋势来判断动态和静态猝灭^[12],动态猝灭常数随着温度的增大而增大,而静态猝灭常数随着温度的增大而减小。假设 ACN 对 BSA 的荧光猝灭为静态猝灭,则该猝灭服从 Stern-Volmer 方程^[13-15]:

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

式(1)中: F_0 、 F 为未加入和已加入 ACN 时 BSA 的荧光强度; $[Q]$ 为 ACN 的摩尔浓度; K_{sv} 为猝灭常数; K_q 为猝灭速率常数; τ_0 为无 ACN 存在时荧光分子的平均寿命,一般 τ_0 约为 10^{-8} s^[16]。

作出 $F_0/F-[Q]$ 关系图并计算出不同温度下的静态猝灭常数 K_{sv} ,结果如图 1 和表 1。随着 ACN 的加入,BSA 荧光强度减小,BSA 的最大发射波长发生微小蓝移,表明 ACN 对 BSA 的内源荧光有明显的猝灭作用,说明 ACN 与 BSA 发生了结合作用使其构象发生改变。随着温度的升高,猝灭常数 K_{sv} 减小,表明 ACN 与 BSA 的荧光猝灭类型属于静态

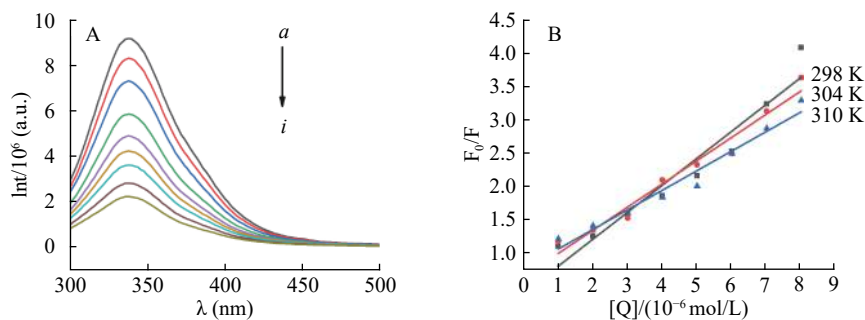


图 1 ACN 与 BSA 作用的荧光猝灭图(A, 298 K)和 Stern-Volmer 曲线(B)

Fig.1 Fluorescence spectra (A, 298 K) and Stern-Volmer curve(B) of interaction between ACN and BSA

表 1 不同温度下 ACN 与 BSA 作用的
Stern-Volmer 猝灭常数Table 1 Stern-Volmer quenching constants of interaction
between ACN and BSA at different temperatures

T(K)	$F_0/F=1+K_{sv}[Q]$	K_{sv} (L/mol)	K_q (L/mol/s)
298	$F_0/F=0.40[Q]+0.41$	4.40×10^5	4.04×10^7
304	$F_0/F=0.35[Q]+0.65$	3.48×10^5	3.48×10^7
310	$F_0/F=0.29[Q]+0.77$	2.94×10^5	2.94×10^7

猝灭。

2.1.1.2 ACN 对 BSA 结合常数和结合位点数的计算

在蛋白质和小分子相互作用的过程中,结合常数用来表示二者结合的强度,结合位点数表示二者结合时数量之比。可由式(1)得^[17]:

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

式(2)中: F_0 、 F 分别为未加入和已加入 ACN 时 BSA 的荧光强度; $[Q]$ 为 ACN 的浓度; K_a 为结合常数; n 为结合位点数。

作出 $\lg[(F_0-F)/F]-\lg[Q]$ 关系图并计算出不同温度下的结合常数 K_a 和结合位点数 n , 结果如图 2 和表 2 所示。 K_a 随温度升高呈下降趋势, 表明 ACN 和 BSA 结合能力不断降低; n 值从 1.12 增至 1.61, 总体趋近于 1, 表明 ACN 在 BSA 上主要有一个结合位点。

2.1.1.3 ACN 对 BSA 结合作用力的判定 静态猝灭反应的焓变 ΔH 、熵变 ΔS 和吉布斯自由能变 ΔG 可

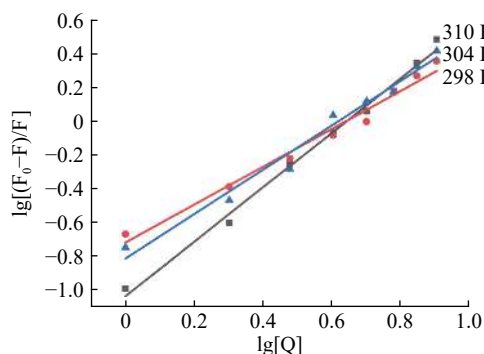


图 2 不同温度下 ACN 与 BSA 作用的结合常数拟合图

Fig.2 Fitting diagram of binding constants of interaction
between ACN and BSA at different temperatures表 2 不同温度下 ACN 与 BSA 作用的结合常数 K_a
和结合位点数 n Table 2 The binding constants K_a and the number of
binding sites n for the interaction between ACN
and BSA at different temperatures

T(K)	$\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_a + n \lg [Q]$	K_a (L/mol)	n
298	$\lg[(F_0-F)/F]=1.12[Q]-0.71$	0.19	1.12
304	$\lg[(F_0-F)/F]=1.31[Q]-0.80$	0.16	1.31
310	$\lg[(F_0-F)/F]=1.61[Q]-1.02$	0.10	1.61

通过不同温度下 ACN 与 BSA 作用的静态猝灭常数 K_{sv} 求出。假设该反应的焓变 ΔH 不随温度的改变而改变, 故热力学参数可采用以下方程计算^[18]:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{式 (3)}$$

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

式(3)中: R 为气体摩尔常数, $8.31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; K_a 为结合常数。

结合 Ross 和 Subramanian 利用小分子与蛋白质反应的热力学参数的变化判断其作用力类型的规律^[19-20], 由表 3 可知, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时结合作用力是疏水作用力, 即 ACN 进入 BSA 的疏水空腔内部是利用疏水作用力完成的, 进而形成较稳定的配合物。结合猝灭反应的 $\Delta G < 0$ 和 $\Delta H > 0$, 说明该反应自发正向进行。

表 3 ACN 与 BSA 相互作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of the interaction between
ACN and BSA

温度(K)	$\Delta G(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S(\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$
298	-31.98	18.74	170.20
304	-32.25	18.74	167.73
310	-32.45	18.74	165.13

2.1.1.4 ACN 与 BSA 结合距离的计算 根据 Forster 偶极-偶极非辐射能量转移机理及下列关系式^[11]:

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

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \phi J \quad \text{式 (6)}$$

$$J = \sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda \quad \text{式 (7)}$$

式(5)中: F_0 是荧光发射强度, F 是荧光发射体与荧光受体浓度比为 1:1 时的荧光强度, R_0 为临界转移能量距离, r 为花青素与 BSA 结合时结合位置处 BSA 分子中荧光发射基团之间的距离; 式(6)中, K 、 N 、 ϕ 、 J 分别表示偶极空间取向因子、介质的折射常数、BSA 的荧光量子产率、BSA 的荧光发射谱与花青素的吸收光谱的重叠积分; 式(7)中: $F(\lambda)$ 是 BSA 在波长 λ 处的荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 是花青素在波长 λ 处的摩尔吸光系数。

在进行非辐射能量转移效率及结合距离的计算时, J 值是通过实验浓度条件下猝灭剂 ACN 紫外谱和荧光体 BSA 的荧光谱重叠获得(如图 3 中阴影部分面积)。根据 Forster 能量转移理论公式可以确定, K^2 、 N^{-4} 、 ϕ 分别取 1.5、1.36、0.15, ACN 与 BSA 间的能量转移效率 E 为 9.43%, 转移效率为 50% 时的临界距离 R_0 为 1 nm, ACN 与 BSA 的结合距离为 1 nm, 小于 7 nm, 说明二者发生了非辐射能量转移^[21]。

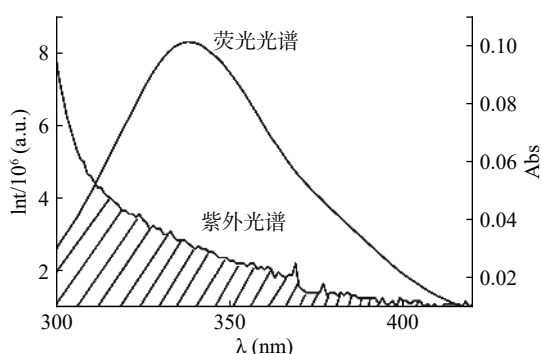


图3 BSA 的荧光光谱与 ACN 的紫外吸收光谱重叠图
Fig.3 Overlapping absorbance spectra of ACN and fluorescence spectra of BSA

2.1.2 同步荧光分析 BSA 分子中的酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸能产生荧光, 但 BSA 的荧光强度主要取决于色氨酸残基。蛋白质的荧光强度与其氨基酸残基所处环境的极性密切相关, 在蛋白质的同步荧光光谱中, $\Delta\lambda=15$ nm 表示的是酪氨酸残基的光谱性质, $\Delta\lambda=60$ nm 表示的是色氨酸残基的光谱性质^[6]。由图 4 可知, 随着 ACN 浓度的增加, BSA 荧光强度均下降, 酪氨酸的荧光发射峰的位置红移了 2 nm, 色氨酸的荧光发射峰的位置蓝移了 6 nm, 表明 ACN 受到酪氨酸残基的影响作用很小, 主要受到色氨酸残基的影响, 则 ACN 与 BSA 的结合位点主要是色氨酸残基。

2.1.3 位点竞争分析 朱国飞等^[21]通过研究发现, 布洛芬和华法林的结合位点主要是 site II 和 site I, 本实验分别采用布洛芬和华法林作为位点竞争探针, 进一步确定 ACN 在 BSA 上的结合位点。

由式(2)计算得知, 无位点探针时结合常数为 0.13, 加入布洛芬后结合常数为 0.084, 加入华法林后

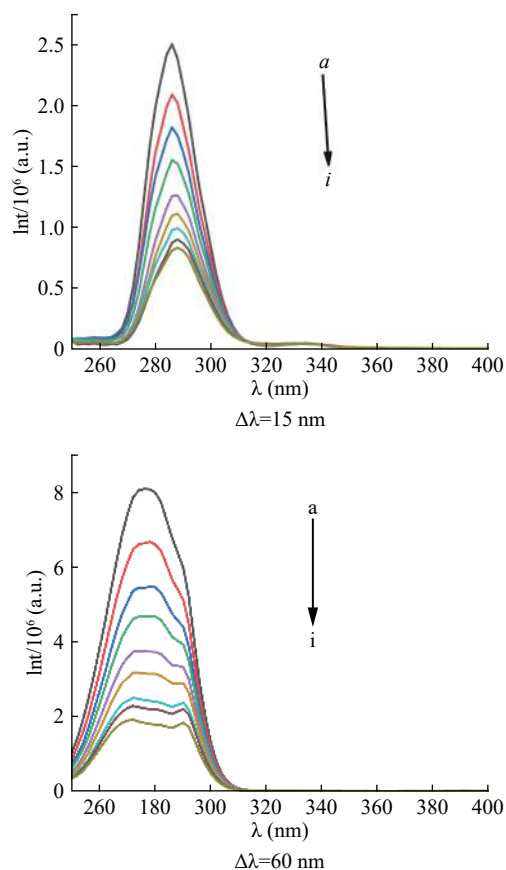


图4 ACN 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱
Fig.4 Synchronous fluorescence spectroscopy of the interaction between CAN and BSA

结合常数为 0.062。结合图 5 可知, 加入华法林后结合常数降低的幅度比加入布洛芬的大, 说明华法林探针对 ACN 与 BSA 作用的影响效果更强, 表明 ACN 与 BSA 结合位点是在 site I。

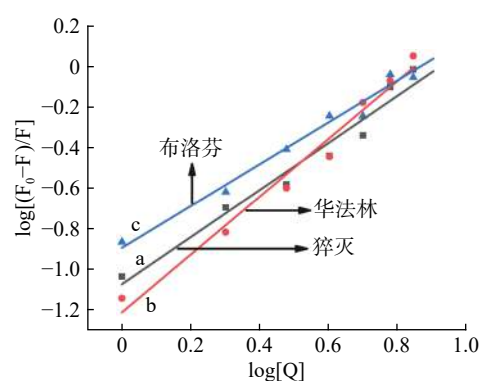


图5 在不同探针下 ACN 与 BSA 相互作用图
Fig.5 Interaction diagram of ACN and BSA under different probes

2.2 紫外-可见吸收光谱分析

在小分子与蛋白质相互作用的研究中, 紫外-可见吸收光谱是常用的研究方法。BSA 与不同浓度的 ACN 作用后的紫外吸收光谱图如图 6 所示。

由图 6 可知, 278 nm 处的吸收峰是由 BSA 分子上的色氨酸和酪氨酸残基的芳杂环 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起

的^[22-23],随着 ACN 浓度的增加,BSA 在 278 nm 处的吸收峰强度降低,同时伴随着微小红移,表明 ACN 的加入使 BSA 的构象发生了变化,进一步证明了 ACN 和 BSA 的作用类型以静态猝灭为主。

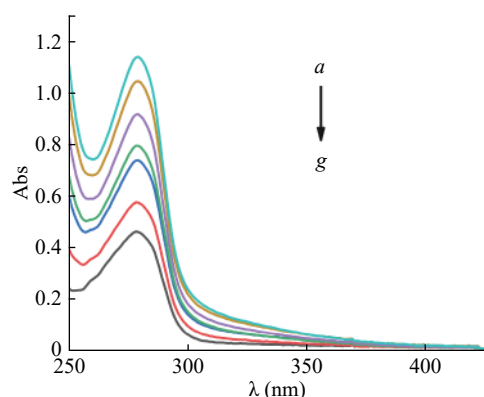


图 6 BSA 与 ACN 相互作用的紫外-可见吸收光谱
Fig.6 UV-Vis absorption spectra of interaction between BSA and ACN

2.3 圆二色谱分析

为进一步研究 ACN 对 BSA 构象的影响,运用圆二色谱进行分析,ACN 与 BSA 作用结果如图 7 所示。

由图 7 可知,BSA 分子在 208 和 222 nm 处具有负峰,这是 α -螺旋结构的特征吸收峰^[23],随着加入 ACN 浓度的升高,这两处的负峰所表示的摩尔椭圆率降低,表明 ACN 与 BSA 结合破坏了其分子内氢键^[24],根据仪器自带的 CDNN 计算软件可知,随着 ACN 浓度的增大, α -螺旋含量降低了 3.1%, β -折叠含量增加了 0.6%,疏水性降低,无规则卷曲含量降低了 1.0%,推测 ACN 的加入使 BSA 分子的生理结构发生了改变,所以发生了猝灭现象。

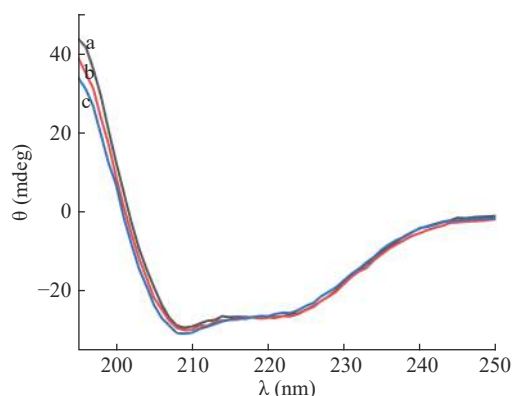


图 7 ACN 与 BSA 作用的圆二色谱图
Fig.7 Circular dichroic diagram of ACN and BSA

2.4 红外光谱分析

红外光谱可以明确提供蛋白质各二级结构含量的详细数据,因而被广泛应用于蛋白质结构研究。与蛋白质二级结构密切相关的有酰胺 I 带(1600~1700 cm^{-1})和酰胺 II 带(1500~1600 cm^{-1})^[25-27]。酰胺 I 带主要由 C=O 键伸缩振动引起,而酰胺 II 带由

C-N 的伸缩振动和 N-H 的弯曲振动造成,其中酰胺 I 带的研究价值更高^[28]。

由于 C=O 双键的存在,ACN 与 BSA 中都含有酰胺 I 带。由图 8 可知,加入 ACN 后,BSA 的酰胺 I 带由 1636.4 cm^{-1} 蓝移到 1637.3 cm^{-1} ,酰胺 II 带改变不明显。所以随着 ACN 浓度增加,酰胺 I 带的改变更明显,进一步证明 ACN 与 BSA 发生相互作用并对 BSA 的二级结构产生了影响。

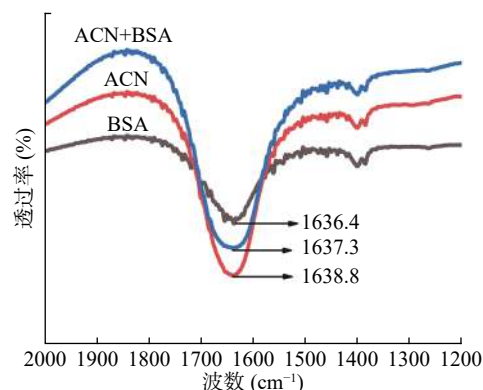


图 8 ACN 对 BSA 红外光谱的影响
Fig.8 Influence of ACN on BSA by infrared spectrum

3 结论

本实验在模拟生理环境的情况下,研究 ACN 与 BSA 结合机理及对 BSA 生理功能的影响。结果表明:ACN 对 BSA 的猝灭类型是静态猝灭,计算得到的热力学参数说明二者间作用力类型是疏水作用力,反应过程自发进行。ACN 与 BSA 结合位点数为 1,位于 site I,此位点更接近于色氨酸残基,ACN 的加入引起 BSA 中酪氨酸残基、色氨酸残基所处的环境极性增强,从而改变了 BSA 的二级结构,使 BSA 的功能构象发生变化。本研究为 ACN 在医药、食品及化妆品工业的发展提供了可靠的科学依据和实际参考价值。然而,本研究仅对 ACN 与 BSA 的作用机理进行了探讨,ACN 的稳定性及吸收效果还需进一步研究。

参考文献

- [1] 王兵亚,连秀仪,杨琛擘,等.夏黑葡萄花青素抗氧化活性及对 D-半乳糖衰老模型小鼠的保护作用[J].食品工业科技,2020,32(3):22-26.
- [2] 姚惠芳,景浩.茛菪素越橘花青素与牛血清白蛋白的相互作用[J].食品科学,2013,34(23):6-10.
- [3] 周瑞,董学艳,景浩.不同溶液中牛血清白蛋白与花青素相互作用特征及抗氧化性[J].食品科学,2013,34(15):11-16.
- [4] 扶晓菲,鄢明辉,游春革.原花青素生理功能及其与肠道微生物相互作用的研究进展[J].食品工业科技,2020,41(10):350-357.
- [5] 崔灵敏,谢笔钧,孙智达.果胶与莲原花青素复合物理化性质及体外抑菌活性研究[J].食品工业科技,2020,41(16):60-66,80.
- [6] 王晨,谢岩黎,范亭亭.花青素与小麦蛋白相互作用及对蛋白质结构的影响[J].食品科学,2019,40(20):60-66.

- [7] 曾茜茜, 雷琳, 赵国华, 等. 花青素加工贮藏稳定性的改善及应用研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(11): 269-275.
- [8] 郭亚琳, 刘瑞祥, 曹有福, 等. 花青素的提取及其在食品中的应用研究[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(25): 19-21.
- [9] 彭斌, 李红艳, 邓泽元. 食品中花青素在热加工中的降解及其机制研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(10): 3851-3858.
- [10] 江连洲, 陈思, 李杨, 等. 大豆分离蛋白-花青素复合物的制备及其蛋白结构与功能性质分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(10): 20-27.
- [11] 高义霞, 杨艳, 周向军. 3种不同溶剂中根皮苷与牛血红蛋白的相互作用及抗氧化性[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(19): 78-84.
- [12] 郭清莲, 潘凌立, 杨立云, 等. 姜黄素和去甲氧基姜黄素与牛血清白蛋白相互作用热力学行为[J]. *科学通报*, 2016, 61(28-29): 3137-3145.
- [13] 金艳红, 陈会明, 何小英. 荧光光谱法研究酸性大红 3R 与牛血清白蛋白的结合作用[J]. *南昌大学学报*, 2009, 33(4): 205-209.
- [14] 赵潇俊, 夏利华, 王孟可, 等. 荧光淬灭法考察小檗碱及衍生物与牛血清蛋白作用[J]. *药物生物技术*, 2018, 25(3): 206-209.
- [15] Yue Y Y, Sun Y Y, Dong Q, et al. Interaction of human serum albumin with novelimidazole derivatives studied by spectroscopy and molecular docking[J]. *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 2016, 31(2): 671-681.
- [16] Zhang G W, Ma Y D, Wang L, et al. Multispectroscopic studies on the interaction of maltol a food additive with bovine serum albumin[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133: 264-270.
- [17] 王秀文, 王颖莉, 于茜, 等. 采用荧光光谱法研究 DDAF 与 BSA 的相互作用[J]. *中国测试*, 2019, 45(7): 80-86.
- [18] 武嘉, 杨晓蕊, 王娜, 等. 荧光光谱法研究芥子碱与人血清蛋白的相互作用[J]. *大连大学学报*, 2013, 34(3): 58-61.
- [19] 宋盼, 杨水兰, 周通, 等. 甘氨酸-N,N-双(亚甲基磷酸)及其 Eu(III) 配合物与 BSA 的作用机制[J]. *中国稀土学报*, 2016, 34(5): 566-578.
- [20] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [21] 朱国飞, 滕腾, 邓斌. 分子对接模拟与光谱法研究没食子酸丙酯和牛血清白蛋白的相互作用[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(18): 158-164, 191.
- [22] 薛燕斌, 乔华, 李波, 等. 光谱法研究高良姜素与人血清白蛋白的相互作用[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(18): 65-68, 73.
- [23] 杨美玲, 高琦宽, 宋玉民. 苦参碱 Fe(III) 化合物的合成及其与 HSA 相互作用的光谱研究[J]. *化学研究与应用*, 2014, 26(10): 1551-1556.
- [24] 尚永辉, 李华, 孙家娟. 荧光光谱法研究原花青素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *分析科学学报*, 2011, 27(2): 179-182.
- [25] Zhang M, Li F, 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]. *Journal of Photochemical and Photobiology A: Chemistry*, 2012, 1(15): 28-37.
- [26] 李道金. 荧光, 同步荧光, 三维荧光和圆二色谱法研究头孢吡肟盐酸盐与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 36(4): 58-68.
- [27] 武玉洁, 王丽欣, 封卓帆, 等. 大米蛋白质酰胺Ⅲ带三级红外光谱研究[J]. *湖南文理学院学报(自然科学版)*, 2020, 32(1): 12-16.
- [28] 武小明, 李丽慧, 霍嘉颖, 等. 降龙涎二醇与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(5): 124-130.