

高良姜素与牛血清白蛋白作用的光谱研究

乔华¹, 薛燕斌², 葛琳³, 孙体健^{1*}¹山西医科大学基础医学院; ²山西医科大学药学院; ³中国科学院山西煤炭化学研究所 分析测试中心, 太原 030001

摘要: 采用荧光猝灭、同步荧光、三维荧光和圆二色谱, 研究高良姜素与牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用。结果表明: 高良姜素对 BSA 有较强的荧光猝灭作用, 且为静态猝灭, 并计算出不同温度下二者的结合常数(K_a)与结合位点数(n)分别为 9.33×10^6 L/mol、1.17(290.15 K), 2.34×10^6 L/mol、1.09(296.15 K), 4.57×10^5 L/mol、1.01(303.15 K), 1.02×10^5 L/mol、0.99(310.15 K)。由热力学参数确定它们之间的作用力主要是氢键和范德华力, 利用竞争结合实验推断高良姜素的结合位点为 BSA 疏水空腔的 Site I。同步荧光、三维荧光和圆二色谱显示高良姜素与 BSA 作用时更靠近色氨酸残基, 使其周围的疏水性减弱, 而对蛋白 α -螺旋结构影响较小。

关键词: 高良姜素; 牛血清白蛋白; 同步荧光光谱; 三维荧光光谱; 圆二色谱

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.001

Spectroscopic Analysis of Interaction between Galangin and Bovine Serum Albumin

QIAO Hua¹, XUE Yan-bin², GE Lin³, SUN Ti-jian^{1*}¹School of Basic Medicine, Shanxi Medical University; ²College of Pharmacy, Shanxi Medical University;³Analytical Instrumentation Center, Institute of Coal Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Taiyuan 030001, China

Abstract: The interaction between galangin and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence quenching, synchronous fluorescence, three-dimensional fluorescence and circular dichroism spectra. The results suggested that galangin had a strong ability to quench the BSA fluorescence in a static mode. The binding constants (K_a) and site numbers (n) obtained at different temperatures were 9.33×10^6 L/mol, 1.17 (290.15 K); 2.34×10^6 L/mol, 1.09 (296.15 K); 4.57×10^5 L/mol, 1.01 (303.15 K); 1.02×10^5 L/mol, 0.99 (310.15 K), respectively. According to the thermodynamic parameters, hydrogen bond and van Edward force played dominant roles in the interaction between galangin and BSA. While the competitive binding analysis showed that the binding location of galangin to BSA is the Site I of the hydrophobic pocket. Spectra of synchronous fluorescence, three-dimensional fluorescence and circular dichroism revealed that galangin interacted with tryptophan residues in BSA more strongly than with tyrosine residues, and the vicinity of tryptophan residues was less hydrophobic. However, conformational changes of α -helix were slighter.

Key words: galangin; bovine serum albumin; synchronous fluorescence spectra; three-dimensional fluorescence spectra; circular dichroism spectra

高良姜 *Alpinia officinarum* Hance, 是一种热带多年生姜科植物, 药食同源。高良姜素是从高良姜中提取的有效成分, 是一种天然黄酮醇类化合物^[1], 具有抗氧化^[2]、抗肿瘤^[3]等多种生理活性^[4], 可望开发为药物或保健品应用于临床。血清白蛋白是血液中含有最丰富的载体蛋白, 参与外源性物质在体内的运送、分布、代谢及消除等过程, 是生命活性物

质发挥生物效应的重要载体和靶向分子^[5]。目前, 关于天然活性物质与血清白蛋白相互作用的研究已有大量文献记载^[6,7], 但对于高良姜素与蛋白相互作用的机理研究鲜有报道。本工作以牛血清白蛋白(BSA)为血清白蛋白模型^[8], 采用荧光猝灭法研究高良姜素与 BSA 的结合作用, 计算出结合反应的结合常数、结合位点数、结合热力学参数及结合位点, 并用同步荧光光谱、三维荧光光谱和圆二色谱考察了 BSA 在高良姜素作用下构象的变化, 为阐明高良姜素在人体内的储存方式、传输机制及药理作用等提供重要信息。

收稿日期: 2017-02-20 接受日期: 2017-04-19

基金项目: 山西省自然科学基金(2015011024)

* 通信作者 Tel: 86-351-4135645; E-mail: suntijian@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高良姜素标准品(萨恩化学技术有限公司,批号:EE230130),用10%乙醇溶液配制 1.0×10^{-4} mol/L储备液,保存于4℃冰箱中备用;牛血清白蛋白(BSA,北京索莱宝科技有限公司),用pH7.4磷酸盐缓冲溶液(简称PBS溶液)配制 3.0×10^{-5} mol/L储备液,保存于4℃冰箱中备用;其它试剂均为分析纯;实验用水为Milli-Q超纯水。

1.2 仪器设备

Cary Eclipse 荧光光谱仪(美国 Varian 公司); MOS 500 圆二色光谱仪(法国 Bio-Logic 公司); pHs-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 荧光光谱

在10 mL比色管中,依次加入1.0 mL BSA 储备液,适量 PBS 溶液,再加入不同体积高良姜素储备液,并补充适当体积10%乙醇溶液(以使各溶液中乙醇含量相同),配制系列浓度的高良姜素-BSA 溶液。激发和发射狭缝宽度为5 nm,在最佳激发波长下,在选定的发射波长范围内,测量待测溶液的荧光光谱,扫描步长1 nm。

同步荧光光谱测定条件:激发光和发射光波长差($\Delta\lambda$)分别固定在 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm,扫描步长1 nm。

三维荧光光谱测定条件:Cary Eclipse 荧光光谱仪的光源为氙弧灯;激发光波长范围为200~500 nm;发射光波长范围为200~500 nm;激发和发射狭缝宽度为5 nm;激发光波长扫描间隔为5 nm;扫描步长1 nm,扫描光谱仪自动校正。采用 Cary Eclipse 软件进行数据分析。

1.3.2 圆二色谱

室温下,利用 MOS 500 圆二色光谱仪测定各样品在200~250 nm 波长范围的圆二色谱,比色皿厚度为1 cm,扫描速度60 nm/min。

2 结果与分析

2.1 高良姜素对 BSA 的猝灭机理研究

2.1.1 高良姜素与 BSA 作用的荧光猝灭光谱

BSA 分子中色氨酸和酪氨酸残基会吸收紫外光并发射荧光,因此可以利用蛋白分子内源性荧光的变化,考察高良姜素与 BSA 的结合作用。

配制 3.0×10^{-6} mol/L BSA 的 PBS 溶液及含不同浓度高良姜素的 PBS 溶液,在最佳激发波长280 nm 下,测量各溶液在300~450 nm 波长范围的荧光光谱,结果如图1所以。

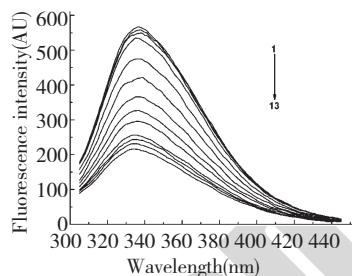


图1 不同浓度高良姜素对 BSA 荧光光谱的影响

Fig. 1 Effect of galangin on fluorescence spectra of BSA
注:BSA 浓度为 3.0×10^{-6} mol/L;曲线1~13 表示高良姜素浓度分别为 $0, 0.6 \times 10^{-6}, 0.8 \times 10^{-6}, 1.0 \times 10^{-6}, 2.0 \times 10^{-6}, 3.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 5.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 7.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 9.0 \times 10^{-6}, 10.0 \times 10^{-6}$ mol/L;温度为290.15 K。图3同。

Note:The concentration of BSA was 3.0×10^{-6} mol/L; Curves 1-13 represented the concentrations of galangin were $0, 0.6 \times 10^{-6}, 0.8 \times 10^{-6}, 1.0 \times 10^{-6}, 2.0 \times 10^{-6}, 3.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 5.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 7.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 9.0 \times 10^{-6}$ and 10.0×10^{-6} mol/L, respectively. Temperature was 290.15 K. Same as Fig. 3.

由图1可以看出,当高良姜素的浓度增大时,BSA 的荧光峰由337 nm 蓝移到334 nm 且荧光强度降低,说明 BSA 与高良姜素之间发生了结合作用,引起表面氨基酸残基周围疏水性能的改变及本身构象的变化。

2.1.2 高良姜素对 BSA 的荧光猝灭机理

为了进一步阐明高良姜素对 BSA 的荧光猝灭机理,用 Stern - Volmer 方程^[9]对测定数据进行分析:

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

式中: F_0 和 F 分别是未加入和加入高良姜素时

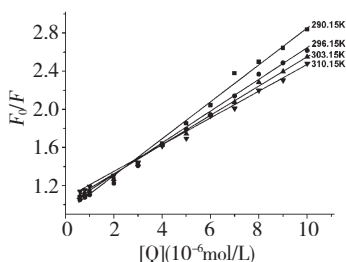


图2 高良姜素与 BSA 作用的 Stern-Volmer 图

Fig. 2 Stern-Volmer plots of the interaction between galangin and BSA

表1 不同温度下高良姜素与 BSA 作用的猝灭常数 K_{sv}

Table 1 Quenching constants for the interaction of galangin with BSA at different temperatures

温度 Temperature (K)	Stern-Volmer 方程 Stern-Volmer equations	动态猝灭常数 Dynamic quenching constants, K_{sv} (L/mol)	相关系数 Correlation coefficients, r	双分子猝灭速率常数 Bimolecular quenching rate constants, K_q [L/(mol · s)]
290.15	$F_0/F = 1.94 \times 10^5 [Q] + 0.9133$	1.94×10^5	0.9972	1.94×10^{13}
296.15	$F_0/F = 1.73 \times 10^5 [Q] + 0.9231$	1.73×10^5	0.9986	1.73×10^{13}
303.15	$F_0/F = 1.59 \times 10^5 [Q] + 0.9795$	1.59×10^5	0.9991	1.59×10^{13}
310.15	$F_0/F = 1.43 \times 10^5 [Q] + 1.0359$	1.43×10^5	0.9985	1.43×10^{13}

BSA 的荧光强度; K_{sv} 为动态猝灭常数; $[Q]$ 为高良姜素的浓度; K_q 为双分子猝灭速率常数; τ_0 为猝灭体不存在时荧光分子平均寿命。

作出 $F_0/F - [Q]$ 关系图并计算出不同温度下的动态猝灭常数, 结果见图 2 和表 1。由图 2 和表 1 可知, 猝灭常数 K_{sv} 随着温度的升高而减小, 表明猝灭机理为静态猝灭过程。

为验证猝灭类型, 依据方程(1)计算出 K_q 值(表 1 所示)。由于生物大分子荧光寿命约为 10^{-8} s, 290.15 K 时, K_q 计算值为 1.94×10^{13} L/(mol · s)。而各类猝灭剂与生物分子的最大碰撞猝灭速率常数为 2.0×10^{10} L/(mol · s), 表明高良姜素对 BSA 的猝灭过程常数大于扩散控制的速率常数。所以高良

姜素对 BSA 的猝灭属静态猝灭, 即高良姜素与 BSA 在基态时形成了复合物, 并且生成的高良姜素-BSA 复合物不发光, 结果是高良姜素-BSA 复合物与未反应的 BSA 竞争吸收激发光降低了 BSA 的荧光强度。

2.1.3 结合常数和结合位点数

静态猝灭的结合常数 K_a 由修正的 Stern - Volmer 方程^[7]计算而得:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

式中: F_0 和 F 分别是未加入和加入高良姜素时 BSA 的荧光强度; K_a 为结合常数; n 为结合位点数; $[Q]$ 为高良姜素的浓度; 计算结果列于表 2。

表2 不同温度下高良姜素与 BSA 作用的结合常数 K_a 和结合位点数 n Table 2 Binding constants (K_a) and site numbers (n) for the interaction of galangin with BSA at different temperatures

T/K	修正的 Stern-Volmer 方程 Modified Stern-Volmer equations	结合常数 Binding constants, K_a (L/mol)	结合位点数 Number of binding sites, n	r
290.15	$\log((F_0 - F)/F) = 6.97 + 1.17 \log [Q]$	9.33×10^6	1.17	0.9983
296.15	$\log((F_0 - F)/F) = 6.37 + 1.09 \log [Q]$	2.34×10^6	1.09	0.9976
303.15	$\log((F_0 - F)/F) = 5.66 + 1.01 \log [Q]$	4.57×10^5	1.01	0.9984
310.15	$\log((F_0 - F)/F) = 5.01 + 0.99 \log [Q]$	1.02×10^5	0.99	0.9981

表 2 结果表明, K_a 随温度升高逐渐减小, 说明温度升高时高良姜素与 BSA 形成复合物的稳定性降低。同时, 表 2 表明 n 都在 1 附近, 说明高良姜素与 BSA 结合时是 1:1 结合; 但随温度升高, n 逐渐减小, 说明温度升高, 高良姜素与 BSA 结合程度降低。

2.1.4 高良姜素与 BSA 的结合作用力研究

为了考察高良姜素与 BSA 的结合作用力, 可以通过计算结合的热力学常数进行预测。在温度变化不大时, 可以近似认为反应的焓变 (ΔH) 为常数, 根据热力学参数间的关系式(3-5)^[10]:

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

$$\Delta G = - RT \ln K_a \quad (4)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (5)$$

分别计算得到 ΔH , 熵变 (ΔS) 和吉布斯自由能变 (ΔG)。式中: K_a 为结合常数; R 为气体摩尔常数; ΔH 、 ΔS 及 ΔG 计算结果见表 3。

依据 Ross 与 Subramanian 利用小分子与生物大分子反应的热力学参数的变化判断其作用力类型的规律^[11], 即当 $\Delta S > 0$, $\Delta H > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta S < 0$, $\Delta H < 0$ 为氢键和范德华力; 当 $\Delta S > 0$, $\Delta H < 0$ 时为静电作用力。表 3 显示, 高良姜素与 BSA 结合时氢键和范德华力起主要作用。

表3 不同温度下高良姜素与BSA作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters for the interaction of galangin with BSA at different temperatures

T (K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (kJ/mol)
290.15	-169.3	-269.1	-34.4
296.15		-268.6	-33.2
303.15		-269.2	-31.6
310.15		-269.9	-30.5

2.1.5 高良姜素与BSA的结合位点

BSA的空间结构有三个结构域I-III,每个结构域又包括A、B两个亚结构域。BSA的两个结合位点位于该分子中与疏水腔相关的II A、III A亚结构域,分别称为结合位点I(Site I)、结合位点II(Site II),且研究发现华法林和布洛芬与这两个位点特异性结合^[12]。后续研究表明洋地黄毒苷和BSA分子中有别于Site I和Site II的位点特异结合,该位点称为Site III^[13]。

本工作以华法林、布洛芬和洋地黄毒苷为标记药物,通过竞争取代试验确定高良姜素与BSA的结合部位。配制相同浓度的BSA与标记药物的PBS溶液,利用荧光滴定法考察高良姜素与标记药物对

BSA竞争结合情况,所得数据用修正的Stern-Volmer方程处理,结果发现,当华法林存在时高良姜素与BSA的 K_a 为 2.81×10^5 L/mol,较没有华法林时的 9.33×10^6 L/mol明显降低,而布洛芬和洋地黄毒苷存在时 K_a 分别为 10.2×10^6 和 3.24×10^6 L/mol,变化很小,说明华法林与高良姜素竞争同一个位点,即高良姜素与BSA在Site I(II A)发生作用。

2.2 高良姜素对BSA构象的影响

2.2.1 同步荧光光谱

同步荧光光谱能够提供蛋白分子中酪氨酸残基和色氨酸残基的特征信息。当 $\Delta\lambda = 15$ nm时,只反映酪氨酸残基的荧光;当 $\Delta\lambda = 60$ nm时,仅反映色氨酸残基的荧光^[14],实验结果如图3所示。

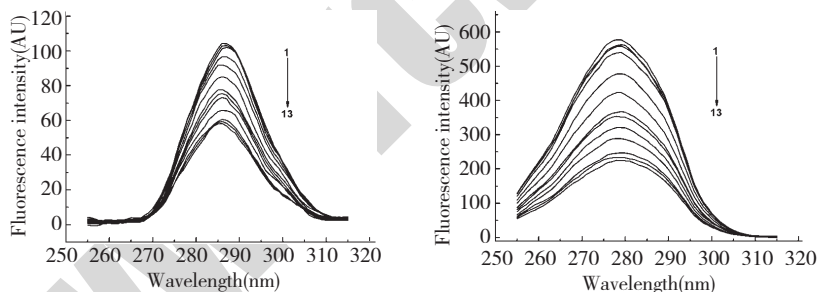


图3 不同浓度高良姜素对BSA同步荧光光谱的影响

Fig. 3 Effect of galangin on synchronous fluorescence spectra of BSA

图3显示,加入高良姜素,BSA的同步荧光峰位置和强度都发生改变。其中,酪氨酸残基荧光发射峰由287 nm蓝移至285 nm,色氨酸残基发射峰由278 nm红移至280 nm,说明酪氨酸残基周围的疏水性增加而色氨酸残基周围的疏水性降低。同时,两种氨基酸残基发射的荧光峰强度降低,但降低的幅度不同,说明两种残基与高良姜素的作用程度不同。高良姜素对BSA同步荧光的猝灭百分率由公式(6)^[14]计算:

$$R_{SFQ} = 1 - \frac{F_{SF}}{F_{SFO}} \quad (6)$$

式中: F_{SFO} 和 F_{SF} 分别为未加入和加入高良姜素

时的同步荧光强度。计算结果如图4所示。

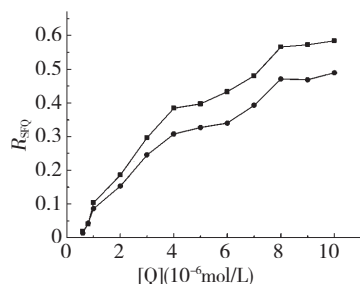


图4 高良姜素对BSA同步荧光光谱的猝灭百分率

Fig. 4 Quenching percentage of galangin on synchronous fluorescence intensity of BSA

由图 4 可知,随高良姜素浓度增大,酪氨酸和色氨酸残基的荧光强度都逐渐减小,同一浓度时,色氨酸残基荧光强度降低幅度较酪氨酸残基的降低幅度更大,表明高良姜素与 BSA 作用时更靠近色氨酸残基。

2.2.2 三维荧光光谱

三维荧光光谱是以激发波长、发射波长和荧光

强度为坐标的三维空间图谱,能更加全面地展现样品的荧光信息,有利于综合考查样品的组分分布和构型变化,通常用等高线图的形式描述^[15]。高良姜素与 BSA 作用的三维荧光光谱如图 5 和表 4 所示。

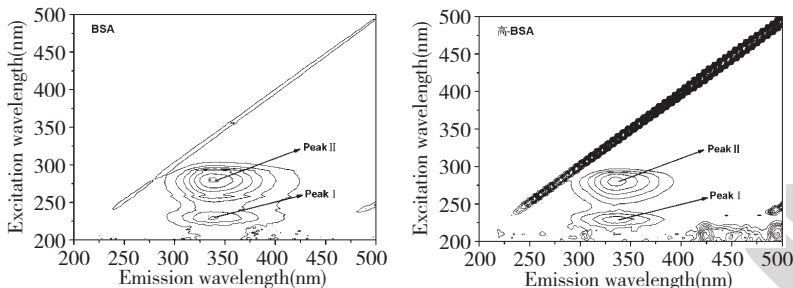


图 5 BSA 及高良姜素-BSA 的三维荧光图谱

Fig. 5 Three-dimensional fluorescence spectra of BSA and galangin-BSA

表 4 高良姜素对 BSA 三维荧光特征峰的影响

Table 4 Effect of galangin on the three-dimensional fluorescence characteristic peaks of BSA

样品 Sample	Peak I			Peak II		
	$\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$	F	$1-F/F_0$	$\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$	F	$1-F/F_0$
BSA	230.0/339.0	368.9 ± 1.2	- ^a	280.0/338.0	602.1 ± 1.5	- ^a
高-BSA	230.0/337.0	342.2 ± 1.3	$7.23 \pm 0.2\%$	280.0/335.0	243.2 ± 1.4	$59.6 \pm 0.3\%$

注:^a未计算;高-BSA 为高良姜素与 BSA 作用体系;BSA 浓度为 3.0×10^{-6} mol/L;高良姜素浓度为 10.0×10^{-6} mol/L。

图 5 看出,BSA 的三维荧光光谱中有两个荧光峰,峰 I 反映 BSA 的多肽骨架结构,峰 II 反映酪氨酸和色氨酸残基的疏水微环境^[16]。表 4 显示,当加入高良姜素时,BSA 的峰 I 蓝移 2 nm,强度降低了 7.23%,说明高良姜素影响 BSA 的骨架结构,但影响不大,与后续圆二色谱研究结果相符。峰 II 发生位移,从 338 nm 蓝移至 335 nm,强度降低了 59.6%,说明高良姜素与 BSA 结合时,对酪氨酸和

色氨酸残基的疏水微环境影响较大。

2.2.3 圆二色谱

圆二色谱是一种简单而有效地评价蛋白质构象的方法^[17]。高良姜素与 BSA 作用的圆二色谱如图 6 所示。

由图 6 可以看出,BSA 在 212 nm 和 220 nm 有两个负峰,是其 α -螺旋结构的特征表现。当加入高良姜素时,BSA 的 CD 值减小(靠近 0 刻线),且 212 nm 峰蓝移约 2 nm,表明 BSA 的 α -螺旋度降低。蛋白的 α -螺旋度可通过公式(7-8)^[17]计算:

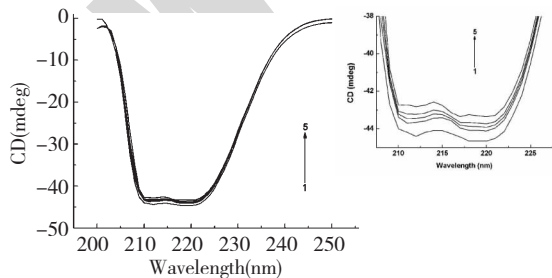


图 6 高良姜素对 BSA 圆二色谱的影响

Fig. 6 Effect of galangin on circular dichroism spectra of BSA

注:BSA 浓度为 3.0×10^{-6} mol/L;曲线 1~5 表示高良姜素浓度分别为 $0, 1.0 \times 10^{-6}, 3.0 \times 10^{-6}, 5.0 \times 10^{-6}, 10 \times 10^{-6}$ mol/L;温度为 290.15 K。

$$MRE = \frac{\text{observed } CD(mdeg)}{c_p nl \times 10} \quad (7)$$

$$\alpha - helix(\%) = \frac{-MRE_{210} - 4000}{33000 - 4000} \quad (8)$$

式中: MRE 为蛋白的平均椭圆率; c_p 为蛋白浓度, n 为氨基酸残基数目, l 为光径;结合和未结合 BSA 的 α -螺旋度由 212 nm 处的 MRE 值计算。

由计算结果可知,BSA 中 α -螺旋结构百分率为 51.9%,随着高良姜素浓度由 1×10^{-6} mol/L 增加至

3、5、 10×10^{-6} mol/L, α -螺旋结构的含量依次降低为 50.8%、50.4%、50.1%、49.5%, 表明高良姜素与 BSA 结合时改变了 BSA 的二级结构, 但改变幅度不大, 说明 BSA 骨架结构变化很小。

3 结论

上述研究结果表明, 高良姜素与 BSA 之间通过范德华力和氢键产生了较强的结合作用, 结合常数在 10^6 数量级, 结合位点数约为 1, 结合位点为 Site I。高良姜素对 BSA 荧光猝灭过程是形成复合物的静态猝灭, 在形成复合物时更靠近色氨酸残基。高良姜素与 BSA 结合对蛋白表面疏水残基的微环境影响较大, 对其骨架影响较小, 因而蛋白的构象变化不大。

参考文献

- Huang HZ, Chen AY, Rojanasakul Y, *et al.* Dietary compounds galangin and myricetin suppress ovarian cancer cell angiogenesis. *J Func Foods*, 2015, 15:464-475.
- Kim YR, Kim MA, Cho HJ, *et al.* Galangin prevents aminoglycoside-induced ototoxicity by decreasing mitochondrial production of reactive oxygen species in mouse cochlear cultures. *Toxicol Lett*, 2016, 245:78-85.
- Xu YF (许奕夫), Yao X (姚鑫). Inhibitory effect and mechanism of galangin on breast cancer metastasis. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2016, 47:1731-1738.
- Zhang XG (张旭光), Yin H (尹航), Chen F (陈峰), *et al.* Advances in study of pharmacological activities of galangin. *Mod Chin Med (中国现代中药)*, 2016, 18:1532-1536.
- Paul BK, Samanta A, Guchhait N. Exploring hydrophobic subdomain IIA of the protein bovine serum albumin in the native, intermediate, unfolded, and refolded states by a small fluorescence molecular reporter. *J Phys Chem B*, 2010, 114:6183-6196.
- Huang HC (黄汉昌), Jiang ZF (姜招峰). The UV-Vis spectrum analysis on the interaction between rutin and human serum albumin. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2011, 23:476-481.
- Yao HF (姚惠芳), Jing H (景浩). Spectroscopic analysis of interaction between bovine serum albumin and anthocyanin. *Food Sci (食品科学)*, 2013, 34:6-10.
- Zhao LX, Liu J, Zhang LL, *et al.* Self-assembly properties, aggregation behavior and prospective application for sustained drug delivery of a drug-participating cationic system. *Int J Pharm*, 2013, 452:108-115.
- Zhang GW, Ma YD, Wang L, *et al.* Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. *Food Chem*, 2012, 133:264-270.
- Rasoulzadeh F, Najarpour H, Naseri A, *et al.* Fluorescence quenching study of quercetin interaction with bovine milk xanthine oxidase. *Spectrochim Acta A*, 2009, 72:190-193.
- Li DJ, Zhu JF, Jin J, *et al.* Studies on the binding of nevedensin to human serum albumin by molecular spectroscopy and modeling. *J Mol Struct*, 2007, 846:34-41.
- Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*, 1976, 12:1052-1061.
- Sjoholm I, Ekman B, Kober A, *et al.* Binding of drugs to human serum albumin; XI The specificity of three binding sites as studied with albumin immobilized in microparticles. *Mol Pharmacol*, 1979, 16:767-777.
- Wang ZQ, Li JS, Wang J, *et al.* Spectrometry researches on interaction and sonodynamic damage of riboflavin (RF) to bovine serum albumin (BSA). *Spectrochim Acta A*, 2012, 87:1-10.
- Qiao H, Zhang SW, Wang W. Fluorescence spectroscopic and viscosity studies of hydrogen bonding in Chinese Fenjiu. *J Biosci Bioeng*, 2013, 115:405-411.
- Li T, Cheng ZJ, Cao LJ, *et al.* Comparison of interactions between three food colorants and BSA. *Food Chem*, 2016, 194:740-748.
- Shahabadi N, Maghsudi M, Rouhani S. Study on the interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by spectroscopic techniques. *Food Chem*, 2012, 135:1836-1841.