

芍药苷、马钱苷与牛血清白蛋白相互作用的研究*

温海燕¹, 章弘扬¹, 王月荣¹, 张秀瑾², 胡坪^{1**}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 华东理工大学化工学院, 上海 200237)

摘要 目的: 研究中药活性小分子芍药苷、马钱苷与牛血清白蛋白 (BSA) 之间的相互作用机制。方法: 采用荧光光谱法、同步荧光光谱法和紫外光谱法测定芍药苷和马钱苷与 BSA 的结合常数与结合位点数, 根据热力学方程计算作用力类型。结果: 2 种苷类化合物与 BSA 的静态结合常数分别为 3.56×10^4 和 $9.06 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 作用位点数 n 分别为 0.624 和 0.853 猝灭作用主要属于静态猝灭。热力学参数表明该结合过程是一个熵增的自发过程。结论: 芍药苷与马钱苷和 BSA 的结合作用力均为疏水力, 两化合物可以嵌插到 BSA 疏水腔内, 与 BSA 形成复合物。

关键词: 芍药苷; 马钱苷; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 紫外光谱; 相互作用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)01-0006-06

Investigation of the interaction between bovine serum albumin with paeoniflorin and loganin*

WEN Hai-yan¹, ZHANG Hong-yang¹, WANG Yue-rong¹, ZHANG Xu-jin², HU Ping^{1**}

(1. College of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

(2. College of Chemical Industry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract **Objective** To study the interaction of paeoniflorin and loganin with bovine serum albumin (BSA) in buffer solutions. **Methods** Fluorescence spectroscopy, UV-vis spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy were used to characterize the interaction between BSA with paeoniflorin and loganin. The binding constants (K_{LB}) and the number of binding sites (n) were obtained at different temperatures respectively, the binding forces were calculated via the thermodynamic equation. **Results** K_{LB} of paeoniflorin-BSA and loganin-BSA were 3.56×10^4 ($n = 0.624$) and $9.06 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($n = 0.853$), respectively. The fluorescence quenching of BSA caused by paeoniflorin or loganin was a static quenching process. Thermodynamic parameters showed that binding process of paeoniflorin and loganin with BSA was a spontaneous interaction procedure in which entropy increased while Gibbs free energy decreased. **Conclusion** Paeoniflorin and loganin can be intercalated into the hydrophobic pockets of BSA by hydrophobic force.

Key words paeoniflorin; loganin; bovine serum albumin; fluorescence spectroscopy; UV-vis spectroscopy; interaction

血清白蛋白是血浆中最丰富的载体蛋白, 蛋白大分子与药物相互作用时会发生在相对稳定的结合部位, 并伴随着一定程度的空间构象变化^[1~3]。而药物进入人体必须通过血浆的储运才能到达受体部位并产生药效, 因此研究药物分子与蛋白的相互作用有利于从分子水平了解药物的作用机理。采用荧光光谱等方法研究药物与牛血清白蛋白 (BSA) 的相

互结合作用已有报道^[4~6], 这对于理解 BSA 的运输作用机制, 以及对新药的设计具有指导意义。

芍药苷 (paeoniflorin) 是一种双环单萜苷类化合物, 具有抗炎、保肝、镇痛、镇静、免疫调节等药理活性^[7], 为中药牡丹皮、白芍、赤芍等的活性成分之一。马钱苷 (loganin) 是一种环烯醚萜苷类化合物, 具有降血糖、增强免疫、抗炎、抗休克、利尿、降压等

* 国家科技支撑项目 (2006BAI08B03-07) 资助

** 通讯作者 Tel: (021) 64252844; E-mail: huping@ecust.edu.cn

作用^[8-10],在山茱萸等中药材中含量较高。目前国内未见牛血清白蛋白与芍药苷、马钱苷相互作用的研究报道。

本文采用荧光猝灭法、同步荧光光谱法和紫外光谱法研究了生理条件下芍药苷和马钱苷与牛血清白蛋白的相互作用,通过计算 2 种苷类分子与 BSA 的热力学参数,推测芍药苷和马钱苷与 BSA 的相互作用机理。本研究对于阐明芍药苷与马钱苷在人体内的运输及作用机制具有重要意义。

1 仪器和试剂

Cary eclipse 型荧光分光光度计(美国瓦里安公司), TU-1810 型紫外可见分光光度计(北京普析仪器有限公司), XS205 DualRange 分析天平(美国梅特勒托利多公司), PHS-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂), 移液枪(20 μ L), 81-2 恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂)。

牛血清白蛋白(Signa 纯度 $\geq 98\%$), 相对分子质量为 6.60×10^4 。BSA 标准储备液的配制: 准确称取 BSA 6.60 mg 用去离子水溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 即得 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。化学对照品芍药苷、马钱苷(中国药品生物制品检定所)用乙醇分别配制成 $1.662 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.332 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液, 水为去离子水。其他试剂均为国产分析纯。

2 试验方法

于 10 mL 量瓶中依次加入 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液 2 mL, pH = 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液 2 mL, BSA 标准储备液 2 mL, 用去离子水稀释至刻度, 摇匀。取该溶液 2 mL 置于 1 cm 的荧光比色皿中, 以 280 nm 为激发波长, 激发光谱狭缝与发射光谱狭缝宽度为 5 nm, 在 300~500 nm 范围内扫描荧光发射光谱。逐次将马钱苷储备液(或芍药苷储备液)加入比色皿中, 置 25 $^{\circ}\text{C}$ 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中(内置微型磁力搅拌器)搅拌 5 min 以 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 测定其同步荧光光谱(激发光栅及发射光栅狭缝宽均为 5 nm), 同时对该溶液的紫外光谱进行测定。由于加入药物的累加体积远小于荧光池中溶液的原始体积, 故实验中忽略加入的药物体积对浓度的影响。

3 结果与讨论

3.1 2 种物质对 BSA 荧光光谱和紫外光谱的影响

蛋白质的天然荧光及其变化在一定程度上反映了蛋白质分子中荧光发色团本身及周围微环境的变化, 因此可以通过荧光光谱的变化推测小分子与蛋

白质相互作用的机制。图 1 为 25 $^{\circ}\text{C}$ 温度下 BSA 和 BSA-芍药苷复合物的荧光猝灭光谱。由图可知, 芍药苷的加入没有导致新荧光峰的产生, 且随着溶液中芍药苷浓度的增加, BSA 的内源性荧光强度有规律地降低, 峰位置和峰形基本保持不变; 相同条件下马钱苷对 BSA 的荧光猝灭作用与芍药苷类似(见图 2)。可见, 芍药苷或马钱苷与 BSA 间存在相互作用, 并引起蛋白质微环境及构象的改变。

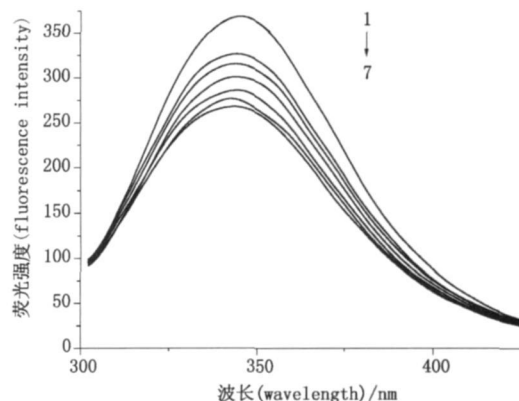


图 1 芍药苷对 BSA 的荧光猝灭光谱图

Fig 1 Fluorescence quenching spectrum of BSA with paeoniflorin as quencher added

$C_{\text{paeoniflorin}}$ of curves 1 ~ 7 / $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00

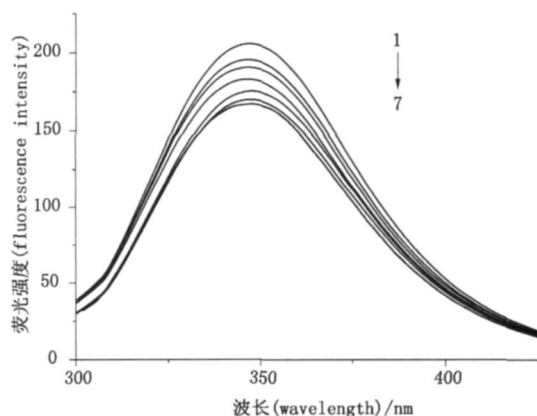


图 2 马钱苷对 BSA 的荧光猝灭光谱图

Fig 2 Fluorescence quenching spectrum of BSA with loganin as quencher added

C_{loganin} of curves 1 ~ 7 / $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00

图 3 为芍药苷、BSA 和 BSA-芍药苷复合物的紫外吸收光谱图。由图可见, 随着小分子药物浓度的增加, 溶液吸收峰(280 nm)的吸收度增大, 且谱图的形状发生了一定的改变, 说明小分子与 BSA 之间发生了相互作用。在 BSA 中加入芍药苷后, 吸收峰位置蓝移, 蓝移的发生说明体系的疏水性增加。

相同条件下马钱苷对 BSA 的紫外吸收光谱的影响参见图 4,可以看出,马钱苷对 BSA 的作用与芍药苷类似。以上结果验证了芍药苷或马钱苷和 BSA 的基态分子之间的相互作用。

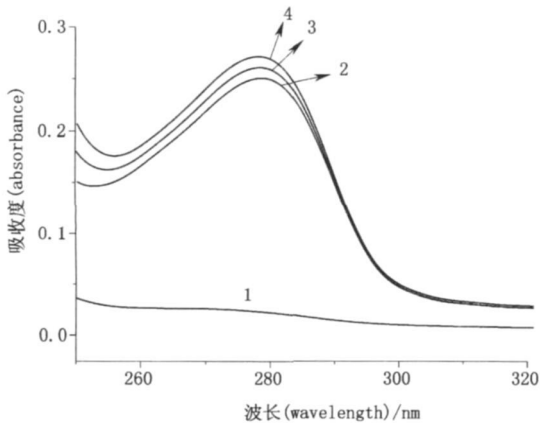


图 3 芍药苷(1)、BSA(2)以及 BSA-芍药苷(3,4)紫外光谱图
Fig 3 UV absorbance spectrum of paeoniflorin(1), BSA(2) and BSA-paeoniflorin(3,4)
 $C_{BSA} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $C_{\text{paeoniflorin}}(\text{curve } 3) = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 $C_{\text{paeoniflorin}}(\text{curve } 4) = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

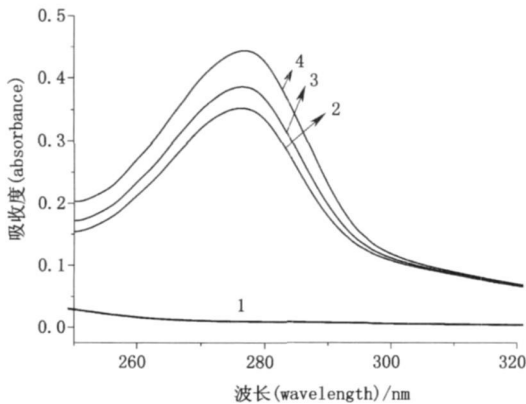


图 4 马钱苷(1)、BSA(2)、以及 BSA-马钱苷(3,4)的紫外光谱图
Fig 4 UV absorbance spectrum of loganin(1), BSA(2) and BSA-loganin(3,4)
 $C_{BSA} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $C_{\text{loganin}}(\text{curve } 3) = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 $C_{\text{loganin}}(\text{curve } 4) = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3 2 芍药苷、马钱苷对 BSA 的荧光猝灭机理

荧光猝灭作用因猝灭机制不同可分为动态猝灭、静态猝灭和发生非辐射能量转移。根据结合常数 K_{SV} 可判断静态猝灭还是动态猝灭作用。动态猝灭依赖于扩散, 升高温度导致扩散加快, 因此 K_{SV} 将随着温度的升高而增大; 若是静态猝灭, 升高温度会导致配合物稳定性降低, 因此 K_{SV} 将随温度的升高而减小^[11]。由于动态猝灭只影响到荧光分子的激发态, 因而并不改变荧光物质的吸收光谱; 而在静态猝灭中, 基态配合物的生成往往会导致荧光物质吸收光谱的改变。

若芍药苷和马钱苷对 BSA 的荧光猝灭为动态猝灭, 则作用过程应遵循 Stern-Volmer 方程^[12]:

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

其中, F 为有猝灭剂时 BSA 的荧光强度, F_0 为无猝灭剂时 BSA 的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂浓度, K_{SV} 为动态猝灭常数, K_q 为动态荧光猝灭速率常数, τ_0 为无猝灭剂时荧光分子的平均寿命, 生物大分子的荧光平均寿命约为 10^{-8} s ^[13]。根据 Stern-Volmer 方程, 以猝灭剂浓度 $[Q]$ 为横坐标, 以 F_0/F 为纵坐标, 绘制猝灭剂浓度对 F_0/F 的曲线, 即可求出动态猝灭常数 K_{SV} 。

分别测定了 25℃ 和 37℃ 下芍药苷和马钱苷对 BSA 荧光的动态猝灭常数, 不同温度下的猝灭常数及相关参数列于表 1, 相关系数表明 Stern-Volmer 猝灭曲线有良好的线性关系。根据文献 [13], 各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数约为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 而表 1 的结果显示, 芍药苷和马钱苷对 BSA 的荧光猝灭速率常数都远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数, 且动态猝灭常数随着温度的升高而减小, 由此可以初步推断芍药苷与马钱苷对 BSA 的荧光猝灭类型为静态猝灭。

表 1 芍药苷、马钱苷对 BSA 的 Stern-Volmer 回归方程及反应常数

Tab 1 Stern-Volmer equations of BSA quenched by paeoniflorin and loganin

化合物 (compound)	T/℃	回归方程 (linear equations)	$K_{SV} / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$K_q / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
芍药苷 (paeoniflorin)	25	$F_0/F = 5.21 \times 10^3 X + 1.07 (r = 0.9963)$	5.21×10^3	5.21×10^{11}
	37	$F_0/F = 5.09 \times 10^3 X + 1.08 (r = 0.9934)$	5.09×10^3	5.09×10^{11}
马钱苷 (loganin)	25	$F_0/F = 3.84 \times 10^3 X + 1.02 (r = 0.9917)$	3.84×10^3	3.84×10^{11}
	37	$F_0/F = 2.83 \times 10^3 X + 1.03 (r = 0.9975)$	2.83×10^3	2.83×10^{11}

3.3 芍药苷、马钱苷与 BSA 的结合常数 K_{LB}

对于静态猝灭方式, 可以用 Lineweaver-Burk 方程计算静态猝灭结合常数 $K_{LB}^{[14]}$:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (2)$$

以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作双倒数图, 由该直线的斜率和 F_0 值, 求得芍药苷、马钱苷与 BSA 的结合平衡常数如表 2 所示。

表 2 芍药苷、马钱苷对 BSA 的结合常数

Tab 2 The binding constants of BSA with paeoniflorin and loganin

化合物 (compound)	$T / ^\circ\text{C}$	$(F_0 - F)^{-1} - [Q]^{-1}$ equation	$K_{LB} / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
芍药苷 (paeoniflorin)	25	$(F_0 - F)^{-1} = -1.29 \times 10^{-7} X + 0.11 (r = 0.9891)$	3.56×10^4
	37	$(F_0 - F)^{-1} = -1.26 \times 10^{-7} X + 0.09 (r = 0.9768)$	3.78×10^4
马钱苷 (loganin)	25	$(F_0 - F)^{-1} = -1.35 \times 10^{-7} X + 0.02 (r = 0.9923)$	9.06×10^4
	37	$(F_0 - F)^{-1} = -1.29 \times 10^{-7} X + 0.09 (r = 0.9771)$	9.68×10^4

由表 2 可知, 2 种温度下的 K_{LB} 值相差很小, 说明芍药苷、马钱苷与 BSA 之间的结合受温度变化的影响较小。2 种苷类化合物与 BSA 的结合常数较大, 因此可以在体内被蛋白质所储存、转运。

3.4 芍药苷、马钱苷与 BSA 的结合位点数 n

药物小分子与蛋白质生物大分子之间的相互作用一般采用位点结合模型来描述^[15]:

$$\lg[(F_0 - F) / F] = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

式中 n 为此反应的结合位点, K_A 为荧光猝灭反应的平衡常数。以 $\lg[(F_0 - F) / F]$ 对 $\lg [Q]$ 作双对数图, 由该直线的斜率, 求得芍药苷、马钱苷与 BSA 的结合位点数, 即与 BSA 的摩尔比, 如表 3 所示。可知, 芍药苷与马钱苷和 BSA 结合时约存在 1 个单独的结合位点, 即大约 1 个芍药苷分子或 1 个马钱苷分子与 1 个 BSA 分子结合形成配合物。

表 3 芍药苷、马钱苷对 BSA 的结合位点数

Tab 3 The numbers of the binding sites of BSA with paeoniflorin and loganin

化合物 (compound)	$T / ^\circ\text{C}$	$\lg[(F_0 - F) / F] - \lg [Q]$ equation	n
芍药苷 (paeoniflorin)	25	$\lg[(F_0 - F) / F] = 0.624X + 2.198 (r = 0.9784)$	0.624
	37	$\lg[(F_0 - F) / F] = 0.605X + 2.129 (r = 0.9891)$	0.605
马钱苷 (loganin)	25	$\lg[(F_0 - F) / F] = 0.853X + 2.982 (r = 0.9856)$	0.853
	37	$\lg[(F_0 - F) / F] = 0.611X + 2.688 (r = 0.9834)$	0.611

3.5 芍药苷、马钱苷与 BSA 的作用力类型

药物与生物大分子之间的作用力包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等, 药物不同, 与蛋白质作用力类型也不同。在配合物的形成过程中, 其热力学关系为^[15]:

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

$$\Delta H = RT_2 \ln(K_2 / K_1) / (T_2 - T_1) \quad (5)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (6)$$

式中 ΔG 为反应的标准摩尔吉布斯自由能变, ΔH 为焓变, ΔS 为熵变。当温度变化不大时, 结合反应的焓变 ΔH 可看成常数, 根据热力学公式可以得到结合反应的 ΔG 、 ΔH 、 ΔS 等热力学函数的变化值。根据不同温度下 BSA-芍药苷、BSA-马钱苷

体系的猝灭常数, 计算得到的相关热力学参数列于表 4 中。由表中数据可知, BSA-芍药苷、BSA-马钱苷体系的 ΔH 和 ΔS 均大于 0, 因此可以推测芍药苷、马钱苷与 BSA 分子间主要存在疏水作用力^[16]。蛋白质的空间结构含有 3 个结构域, 每个结构域又存在 2 个呈凹形的亚结构域, 彼此以槽口相对的方式形成 3 个圆筒状疏水腔^[17], 芍药苷和马钱苷可能以嵌插的方式结合到 BSA 的疏水腔内。2 种化合物与 BSA 结合的 $\Delta G < 0$ 表明是一个自由能降低的分子作用过程, 芍药苷与马钱苷可以自发地嵌插到 BSA 分子的疏水腔内部, 并引发 BSA 分子构象的改变。

表 4 不同温度下 BSA-芍药苷, BSA-马钱苷体系的热力学常数

Tab 4 Thermodynamic parameters for the reaction of paeoniflorin and loganin with BSA at different temperatures values

化合物 (compound)	T / °C	$\Delta H /$ (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta S /$ (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	$\Delta G /$ (kJ·mol ⁻¹)
芍药苷 (paeoniflorin)	25	4.09	103.51	-20.96
	37		103.51	-22.06
马钱苷 (loganin)	25	43.96	210.43	-18.54
	37		210.43	-21.27

3.6 芍药苷、马钱苷对 BSA 构象的影响

采用同步荧光光谱法进行了芍药苷、马钱苷对 BSA 构象影响的研究。当 $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) =

15 nm 时, 主要表现的是蛋白质中酪氨酸的荧光光谱; $\Delta\lambda = 60$ nm 时表现的主要是色氨酸的光谱特征。蛋白质中氨基酸残基的最大荧光发射波长与其所处环境的极性有关, 最大发射波长红移, 表明此残基所处环境极性增加, 疏水性降低, 蛋白结构变疏松, 反之亦然, 故由此变化可判断蛋白质构象变化^[18]。

图 5 为加入不同浓度芍药苷后 BSA 的同步荧光图。由图 5 可知, 当 BSA 浓度固定时, 随着芍药苷浓度的增加, BSA 的荧光强度逐渐降低。图 5-A 的最大发射波长略有蓝移, 而图 5-B 几乎没有变化, 表明色氨酸残基所处环境极性下降, 疏水性增加, 蛋白结构变紧密。图 6 为马钱苷与 BSA 作用的同步荧光光谱图。马钱苷对 BSA 构象的影响与芍药苷相似(图 6)。

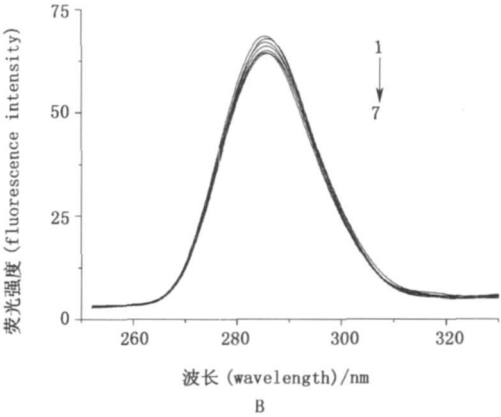
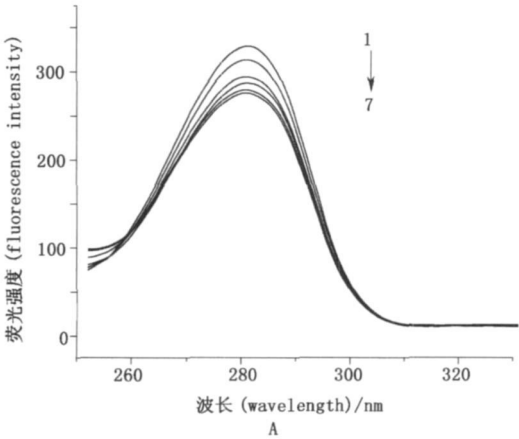


图 5 芍药苷与 BSA 的同步荧光光谱

Fig 5 Synchronous fluorescence spectra of BSA and paeoniflorin

A. $\Delta\lambda = 60$ nm B. $\Delta\lambda = 15$ nm

$C_{\text{paeoniflorin}}$ of curves 1 ~ 7 / $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 $C_{\text{BSA}} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $C_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

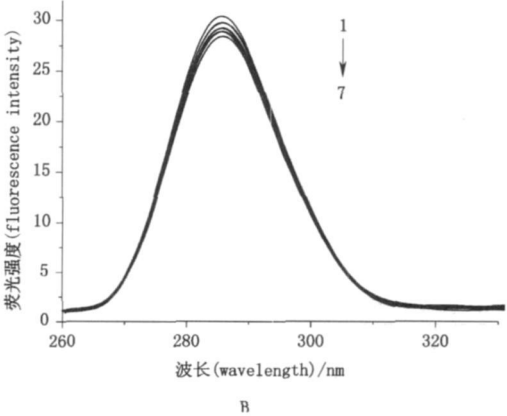
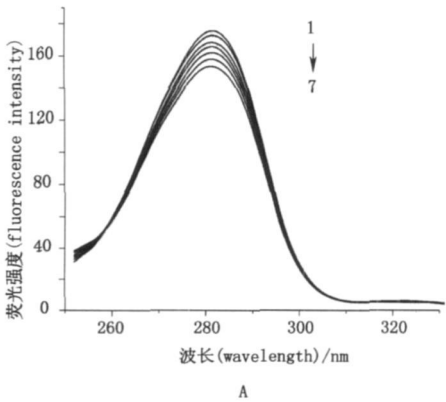


图 6 马钱苷与 BSA 的同步荧光光谱

Fig 6 Synchronous fluorescence spectra of BSA and loganin

A. $\Delta\lambda = 60$ nm B. $\Delta\lambda = 15$ nm

C_{loganin} of curves 1 ~ 7 / $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 $C_{\text{BSA}} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $C_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

4 结论

芍药苷与马钱苷和 BSA 的相互作用研究表明, 芍药苷与马钱苷和 BSA 有一定的结合作用, 且结合作用力均为疏水力, 两化合物可以嵌插到 BSA 内部与 BSA 形成复合物。因此芍药苷和马钱苷可以被白蛋白储存、运输, 并通过血液循环到达作用部位。

参考文献

- 1 LU Yong-ming(刘永明), LI Gui-zhi(李桂芝), SUN Xi-fen(孙希芬). Fluorescence characteristics of nifloxacin based on charge transfer reaction(盐酸芦氟沙星荷移反应及荧光光谱性质). *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004, 32(5): 615
- 2 YAN Zheng-yu(严拯宇), SHAO Xi-fen(邵秀芬), JIANG Xin-min(姜新民), *et al* Studies on the reaction of babfloxacin with bovine serum albumin(巴洛沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究). *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1494
- 3 Peschke M, Verkerk UH, Kiebarth P. Features of the ES mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent protein complexes and the determination of the association constant by the titration method. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15(10): 1424
- 4 Kathiravan A, Renganathan R, Anandan S. Interaction of colloidal AgTlO₂ nanoparticles with bovine serum albumin. *Polyhedron*, 2009, 28: 157
- 5 Gao Di Tian Y, Liang FH, *et al*. Investigation on the pH-dependent binding of Eosin Y and bovine serum albumin by spectral methods. *J Lum in*, 2007, 127(2): 515
- 6 Zhou B Qi Z, Xiao Q, *et al*. Interaction of loratadine with serum albumins studied by fluorescence quenching method. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(5): 743
- 7 YANG Zu-yi(杨祖贻), PEI Jin(裴瑾), LU Rong-min(刘荣敏), *et al*. Study on dependability between syndrome of blood deficiency and blood drug level of paeoniflorin(血虚证与芍药苷血药浓度相关性研究). *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2005, 20(9): 531
- 8 Mathad VT, Raj K, Bhaduri AP, *et al*. Studies on the profile of immunostimulant activities of modified iridoid glycosides. *Bioorg Med Chem*, 1998, 6(5): 605
- 9 WANG Tian-shan(王天山), PAN Yang(潘扬), YIN Fei(殷飞), *et al*. Effect of loganin and synephrine on rabbit model with severe hemorrhagic shock(马钱素与辛弗林对家兔重症失血性休克模型的作用). *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1999, 15(6): 345
- 10 GUO Li-li(郭丽丽), ZHOU Yong(周勇), WANG Xu-dan(王旭丹), *et al*. Effects of the extract of the fruit of *Comus officinalis* on rat splenic lymphocytic proliferation(山茱萸分离提取物对脾淋巴细胞增殖的影响). *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2001, 24(3): 38
- 11 CHEN Guo-zhen(陈国珍), HUANG Xian-zhi(黄贤智), XU Jin-gou(许金钩), *et al*. Fluorescence Analysis(荧光分析法). 2nd Ed(第二版). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1990, 201
- 12 Dewey TG. Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press, 1991, 1
- 13 Lakowicz JR, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*, 1973, 12(21): 4161
- 14 YANG Pin(杨频), GAO Fei(高非). The Principles of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学原理). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2002, 493
- 15 HU Yan-jun, LIU Yi, WANG Jia-bq, *et al*. Study of the interaction between monoammonium glycylthiazinate and bovine serum albumin. *J Pharm Biomed*, 2004, 36(4): 915
- 16 Ross DP, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096
- 17 ZHANG Guo-wen(张国文), QUE Qing-min(阙青民), PAN Jun-hui(潘军辉). Studies on the interaction between puerarin and bovine serum albumin(葛根素与牛血清白蛋白相互作用的研究). *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析), 2007, 27(9): 1784
- 18 WU Han-dong(吴汉东), SHI Xue-yan(史雪岩), LIANG Pei(梁沛). Study of the interaction between esfenvalerate and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy(顺式氰戊菊酯与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究). *Chin J Spectrosc Lab*(光谱实验室), 2008, 25(4): 694

(本文于 2009 年 3 月 9 日收到)