

# 胶毒素与 BSA 的相互作用

陈俊杰 杨梅 张连茹\* 郑忠辉 宋思扬

(厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361005)

**摘要:** 应用荧光、圆二色和紫外—可见吸收等波谱法研究胶毒素与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。荧光光谱实验结果表明胶毒素主要靠疏水作用与 BSA 结合, 而对其内源荧光产生猝灭作用, 其猝灭方式为静态猝灭, 胶毒素与 BSA 的结合常数为  $7.2 \times 10^3$  L/mol。圆二色光谱检测发现, 随着胶毒素浓度的增加, BSA 的 $\alpha$ -螺旋数量也增加, 当胶毒素浓度为 BSA 浓度的 100 倍时, BSA 的 $\alpha$ -螺旋增加 40.1%, 表明胶毒素与 BSA 的结合改变了 BSA 的空间构象。

**关键词:** 胶毒素, 荧光光谱, 圆二色光谱, 紫外—可见吸收光谱

## Study on the Interaction of Gliotoxin with BSA

CHEN Jun-Jie YANG Mei ZHANG Lian-Ru\* ZHENG Zhong-Hui  
SONG Si-Yang

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract:** The interaction between Gliotoxin and bovine serum albumin (BSA) was studied by the fluorescence, Circular Dichroism (CD) and ultraviolet visible (UV-Vis) techniques. The fluorescent experiment showed that the intrinsic fluorescence of BSA was quenched by the binding of gliotoxin in a static quenching procedure, with an association constant of  $7.2 \times 10^3$  L/mol and in hydrophobic forces. And the CD spectrum revealed that gliotoxin effected the conformation of BSA by increased the mass of  $\alpha$ -helix.

**Keywords:** Gliotoxin, Fluorescent spectrum, CD spectrum, UV-Vis spectrum

胶毒素(Gliotoxin)又名胶霉毒素, 是真菌代谢产物 Epipolythiodioxopiperazine (ETP)家族中的一员, 最早从 *Gliocladium fimbriatum* 分离得到, 并因此得名。体外实验表明胶毒素有很强的抗菌、抗病毒作用, 呈现出较好的药用前景<sup>[1]</sup>。但是随后的临床实验发现胶毒素通过抑制抗原呈递、介导巨噬细胞凋亡或抑制转录因子-NF- $\kappa$ B 等途径而对人的免疫系统有很强的抑制作用<sup>[2]</sup>, 从而限制了其在临床方面的应用。胶毒素广泛存在于里氏木霉, 青霉, 烟曲霉和白色念珠菌等致病真菌或环境微生物的次生代谢产

物中, 因而研究胶毒素在血液中与占血液蛋白总数一半以上的血清蛋白的相互作用, 对于了解真菌毒素在血液中的毒性以及在血液中的运输等方面, 具有重要的作用。

胶毒素具有独特的二硫键, 其结构如图 1 所示。

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白, 具有储运内源性代谢产物和外源性药物小分子(离子)等重要生理功能, 参与许多重要的生命过程。血液中的白蛋白主要起维持渗透压、pH 缓冲、载体和营养作用。在动物细胞无血清培养中, 添加白蛋

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA09Z410)

\* 通讯作者: Tel: 86-592-2181722; 信箱: ru898@xmu.edu.cn

收稿日期: 2008-12-02; 接受日期: 2009-03-20

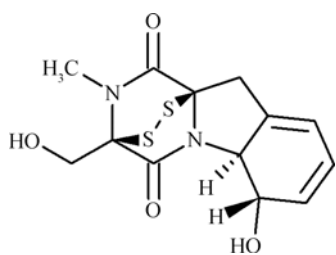


图1 胶毒素的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of Gliotoxin

白可起到生理和机械保护等作用。早期对牛血清白蛋白 BSA 的结构、组成、理化特性及其功能,尤其是 BSA 与配体的结合作用进行了广泛的研究<sup>[3]</sup>, BSA 是由近 600 个氨基酸残基组成的多肽链,在 pH 值介于 5 到 7 之间时,BSA 中的半胱氨酸可以形成 17 对二硫键,一个巯基基团。对脂肪酸、血红素、胆红素和一些带负电荷的芳香小分子化合物具有较高的亲和力。其研究方法以光谱法为主。光谱法是研究生物大分子,特别是蛋白质与各种有机小分子、离子和无机化合物相互作用的重要手段。本文通过荧光光谱法,圆二色光谱法及紫外可见吸收光谱法分别研究了牛血清白蛋白(BSA)与胶毒素的相互作用,为了解真菌毒素在血液中的行为,和进一步研究胶毒素分子与其它功能蛋白质间的相互作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

CARY ECLIPSE 型荧光分光光度计(Varian, USA), JASCO-810 型圆二色光谱仪(Tokyo, Japan), CARY 50-BIO 型紫外可见分光光度计(Varian, Australia)。Millipore 超纯水系统(Millipore)。胶毒素(厦门大学微生物药物实验室制备),牛血清白蛋白 BSA (Sigma, USA); 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 荧光光谱实验:** 荧光光谱实验分别在 298K, 303K 和 310K 3 个温度下进行。BSA 溶于  $0.1 \times 10^{-3}$  mol/L 的 PBS(pH 7.4)中<sup>[4]</sup>, 浓度为  $5 \times 10^{-6}$  mol/L。胶毒素溶于 DMSO 中,使用时用 PBS 稀释至终浓度  $5 \times 10^{-3}$  mol/L。激发波长为 295 nm,狭缝宽度为 5 nm。

**1.2.2 圆二色光谱实验:** 圆二色实验在 298K 下进行,BSA 浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L,溶于  $0.01 \times 10^{-3}$  mol/L 的 PBS (pH 7.4)中<sup>[5]</sup>。胶毒素溶于乙腈中,浓度为

$10 \times 10^{-3}$  mol/L。扫描范围 200 nm~300 nm。

**1.2.3 紫外—可见吸收光谱实验:** 紫外—可见光谱实验在 298K 下进行,BSA 溶于  $0.1 \times 10^{-3}$  mol/L 的 PBS (pH 7.4)中,浓度为  $10 \times 10^{-3}$  mol/L。胶毒素溶于乙腈中,浓度为  $10 \times 10^{-3}$  mol/L。扫描范围 250 nm~300 nm。

## 2 实验结果

### 2.1 胶毒素与 BSA 相互作用的荧光光谱

**2.1.1 荧光猝灭机制:** 蛋白质有两种主要的荧光发射基团,即色氨酸残基和酪氨酸残基。BSA 含有 2 个色氨酸残基,这两个色氨酸残基位于两个不同的结构域,结构域 II A 的 214 位和结构域 I B 的 135 位。而对于同一种蛋白,当激发波长为 280 nm 时可同时激发色氨酸和酪氨酸残基;激发波长为 295 nm,只激发色氨酸残基。实验选择激发波长为 295 nm,考察胶毒素对 BSA 内源荧光的猝灭情况<sup>[6]</sup>(图 2)。从图 2a 可以看出,在 BSA 浓度保持恒定的情况下,随

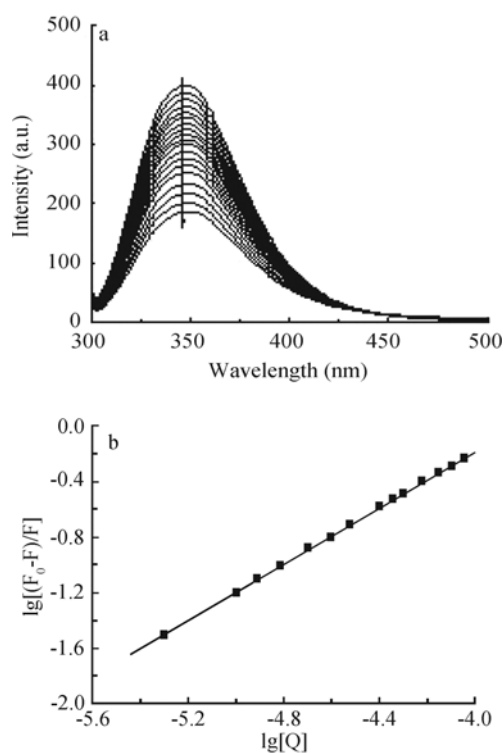


图2 胶毒素对 BSA 荧光猝灭的影响

Fig. 2 The influence on quenching spectra of BSA which caused by Gliotoxin

注: a: BSA 的荧光猝灭图; b:  $\lg\{F_0-F\}/F$  vs  $\lg[Q]$ 图。温度为 298K, BSA 浓度为  $5 \times 10^{-6}$  mol/L, BSA 与胶毒素的浓度比例从 1:1 变化至 1:36。

Note: a: The fluorescence quenching spectra of BSA with Gliotoxin; b: Plot of  $\lg\{F_0-F\}/F$  vs  $\lg[Q]$ .  $C_{BSA}=5 \times 10^{-6}$  mol/L, the ratio of Gliotoxin between BSA was from 1:1 to 1:36 at temperature 298K.

着胶毒素浓度的增加, BSA 的内源性荧光发生有规律的猝灭。BSA 内源荧光的猝灭表明胶毒素与 BSA 之间均存在相互作用。

荧光猝灭过程通常有动态猝灭和静态猝灭两类。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间所发生的相互作用过程, 而静态猝灭则是猝灭剂和荧光物质形成了稳定的复合物而引起的猝灭。

假定胶毒素对 BSA 荧光猝灭过程是动态猝灭, 其作用遵循 Stern-Volmer 方程<sup>[7-10]</sup>。

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

式中  $F_0$  是 BSA 溶液的荧光强度,  $F$  是加入胶毒素后 BSA 溶液的荧光强度,  $[Q]$  是体系中胶毒素的总浓度,  $K_{SV}$  是 Stern-Volmer 猝灭常数, 且由下式定义:

$$K_{SV} = K_q \tau_0 \quad (2)$$

$K_q$  是由扩散过程控制的碰撞动态猝灭速率常数  $[L/(mol \cdot S)]$ 。 $\tau_0$  生物大分子内源性荧光寿命值为  $10^{-8} s$ <sup>[9]</sup>。在 298K、303K、310K 三种不同温度下, 根据(1)式以  $F_0/F$  对  $[Q]$  的关系作图(图 3), 由直线的斜率得出 Stern-Volmer 猝灭常数分别为  $6.5 \times 10^3 L/mol$ ,  $6.2 \times 10^3 L/mol$  和  $5.7 \times 10^3 L/mol$ 。由(2)式得到碰撞动态猝灭速率常数分别为  $6.5 \times 10^{11} L/(mol \cdot S)$ ,  $6.2 \times 10^{11} L/(mol \cdot S)$  和  $5.7 \times 10^{11} L/(mol \cdot S)$ 。由于各类猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞动态猝灭常数为  $2.0 \times 10^{10} L/(mol \cdot S)$ <sup>[9]</sup>, 而在以上 3 个温度下, 胶毒素对 BSA 的碰撞动态猝灭常数皆大于  $2.0 \times 10^{10} L/(mol \cdot S)$ , 这说明胶毒素对 BSA 的荧光猝灭不是由于分子间碰撞所致的动态猝灭, 而是由于形成复合物引起的静态猝灭。另外随着温度的升高胶毒素与 BSA 结合的碰撞动态猝灭常数下降, 即稳定性逐渐下降, 这也表明动态碰撞不是引起 BSA 荧光猝灭的主要原因, 而是由于药物和蛋白形成了复合物, 从而引起了静态猝灭<sup>[10,11]</sup>。

**2.1.2 胶毒素与 BSA 的表观结合常数、结合位点数  $n$  及作用力类型判断:** 荧光静态猝灭作用是指荧光分子与荧光猝灭剂之间借助分子间力, 彼此结合形成复合物, 从而导致荧光分子荧光强度减弱, 此现象可以应用于结合常数及位点数的推断<sup>[12]</sup>。由动态猝灭公式(3)可以知道, 在一定浓度范围内化合物的浓度与蛋白荧光强度有如下关系:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q_t] \quad (3)$$

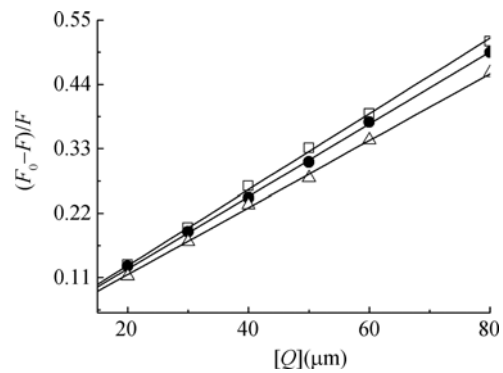


图 3 胶毒素与 BSA 结合的 Stern-Volmer 线性图

Fig. 3 Stern-Volmer plot for the binding of Gliotoxin with BSA

注: 温度为 298K(□), 303K(●), 310K(△).

Note: Temperature were 298K(□), 303K(●), 310K(△).

$\lg \left[ \frac{F_0 - F}{F} \right]$  对  $\lg [Q_t]$  作图(图 2b), 经过线性回归求得

胶毒素与 BSA 的结合常数  $K_A$  及结合位点数  $n$ (表 2)。

有机小分子和蛋白质等生物大分子间的结合力主要有疏水作用、氢键、范德华力和静电引力等<sup>[13]</sup>。胶毒素与 BSA 结合, 其热力学参数之间的关系符合下列公式:

$$\lg K_A = -\frac{\Delta H^\theta}{2.303RT} + \frac{\Delta S^\theta}{2.303R} \quad (4)$$

$$\Delta G^\theta = \Delta H^\theta - T\Delta S^\theta \quad (5)$$

其  $K_A$  是不同温度下对应的结合常数,  $\Delta H^\theta$  与  $\Delta S^\theta$  是焓变与熵变, 在温度变化范围不大的情况下可以认为是一个稳定的常数,  $\Delta G^\theta$  是吉布斯自由能, 是判断一个反应是否能自发进行的标准。  $R$  是热力学气体常数, 取值为  $8.314 (mol \cdot K)/J$ ,  $T$  是热力学温度。通过式(4), (5)可以求出热力学常数的变化, 结果见表 1。

在一定的温度和压力下, 小分子化合物与蛋白质的结合反应能否自发进行取决于体系的吉布斯自由能变化  $\Delta G^\theta$ ,  $\Delta G^\theta < 0$  有利于反应的自发进行。BSA 与胶毒素结合的自由能小于零, 反应自发进行, 并且随着温度递增而增强。Ross 等根据反应前后热力学焓变  $\Delta H^\theta$  和熵变  $\Delta G^\theta$  的相对大小, 判断化合物与蛋白质之间的主要作用力类型。  $\Delta H^\theta > 0$ ,  $\Delta S^\theta > 0$  为疏水作用力;  $\Delta H^\theta < 0$ ,  $\Delta S^\theta < 0$  为氢键和范德华力;  $\Delta H^\theta < 0$ ,  $\Delta S^\theta > 0$  为静电引力<sup>[14]</sup>。由表 1 的结果表明  $\Delta H^\theta > 0$ ,  $\Delta S^\theta > 0$ , BSA 与胶毒素的结合以疏水作用为主。

**2.1.3 胶毒素与 BSA 之间的距离:** 蛋白质的内源荧光主要是色氨酸发出的。当荧光分子与受体分子之

表1 BSA与胶毒素相互作用的热力学参数  
Table 1 The thermodynamic parameters for the binding between Gliotoxin and BSA

T(K)	$K_A$ (L/mol)	$n$	$R^2$	$\Delta G^\theta$ (kJ/mol)	$\Delta H^\theta$ (kJ/mol)	$\Delta S^\theta$ [J/(mol·K)]
298	$7.2 \times 10^3$	1.0100	0.9996	-22.12	19.28	138.94
303	$8.2 \times 10^3$	1.0256	0.9987	-22.81		
310	$10.5 \times 10^3$	1.0583	0.9981	-23.79		

间最大距离小于7 nm时,在荧光能量的供体和受体分子之间可以发生电子激发能的无辐射转移,而这种能量转移是以供体的荧光发射光谱和受体吸收光谱之间有适当的光谱重叠为条件的。根据Förster无辐射能量转移理论<sup>[15]</sup>,能量转移效率 $E$ 与供体—受体间距离 $r$ 及临界能量转移距离 $R_0$ 有下列关系式:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (6)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} k^2 N^{-4} \Phi J \quad (7)$$

(6)式中 $F_0$ 为荧光发射体的荧光强度, $F$ 为当荧光发射体浓度与受体分子浓度达到1:1时的荧光强度。(7)式中 $k^2$ 为偶极空间取向因子, $N$ 为介质折射常数, $\Phi$ 为BSA的荧光量子产率, $J$ 为供体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分。

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda} \quad (8)$$

(8)式中 $F(\lambda)$ 是BSA在波长 $\lambda$ 处的荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 是荧光接受体在波长 $\lambda$ 处的摩尔吸光系数。

当BSA与胶毒素浓度均为 $5 \times 10^{-6}$  mol/L时,相同条件下分别测定BSA的荧光光谱及胶毒素的紫外—可见吸收光谱,将两光谱重叠如图4,并利用(8)式计算重叠面积 $J$ 。

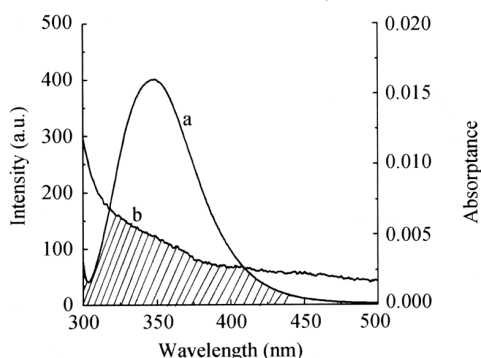


图4 相同浓度下( $5 \times 10^{-6}$  mol/L),BSA荧光图谱与胶毒素紫外—可见吸收谱的叠加  
Fig. 4 The overlap of the fluorescence spectrum of BSA (a) and the absorbance spectrum of Gliotoxin (b) [C(BSA)=C(Gliotoxin)= $5 \times 10^{-6}$  mol/L]

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

根据(8)式求得BSA荧光光谱与胶毒素的紫外—可见吸收光谱的积分面积 $J$ 为 $1.413 \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$ 。已知色氨酸残基量子效率 $\Phi=0.15$ , $N$ 取水和有机物的平均值1.366,取向因子 $K^2$ 取供体与受体各向随机分布的平均值 $2/3$ ,通过(6)式和(7)式计算得出在298K,BSA的色氨酸残基与胶毒素的荧光共振能量转移的效率 $E$ 及作用距离 $r$ 分别为3.01%和2.4 nm。

## 2.2 胶毒素对BSA圆二色谱的影响

蛋白质是具有光学活性的物质,因此通过圆二色谱(CD)可分析溶液中胶毒素诱导BSA构象的改变,结果如图5所示。

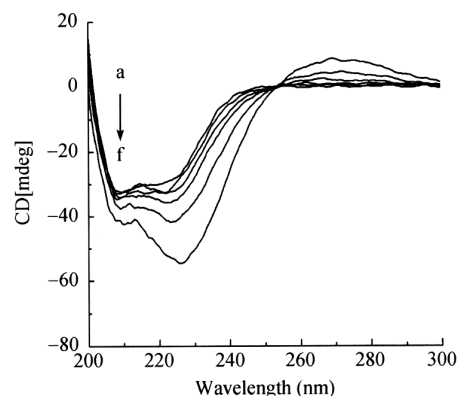


图5 pH 7.2的 $10 \times 10^{-3}$  mol/L PBS体系中,胶毒素对BSA圆二色谱的影响

Fig. 5 The CD spectra of the BSA in the absence (a) and presence (b-f) Gliotoxin are performed in  $10 \times 10^{-3}$  mol/L phosphate buffer of pH 7.2 at room temperature. BSA concentration was fixed at  $1 \times 10^{-6}$  mol/L

注:其中BSA浓度为 $1 \times 10^{-6}$  mol/L,胶毒素的浓度分别为0 (a),  $6.7 \times 10^{-6}$  mol/L (b),  $13.4 \times 10^{-6}$  mol/L (c),  $26.8 \times 10^{-6}$  mol/L (d),  $53.6 \times 10^{-6}$  mol/L (e),  $106.2 \times 10^{-6}$  mol/L (f)。

Note: In BSA-Gliotoxin system, Gliotoxin concentration were 0 (a),  $6.7 \times 10^{-6}$  mol/L (b),  $13.4 \times 10^{-6}$  mol/L (c),  $26.8 \times 10^{-6}$  mol/L (d),  $53.6 \times 10^{-6}$  mol/L (e),  $106.2 \times 10^{-6}$  mol/L (f), respectively.

由图5可以看出,BSA的圆二色谱在胶毒素的作用下,发生了改变。通过公式(9),可以计算出 $\alpha$ -螺旋的变化<sup>[16]</sup>。

$$\alpha\text{-helical (\%)} = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100\% \quad (9)$$

这里的 $MRE$ 是摩尔椭圆度,可以通过下面公式

(10)换算, 4000 指的是 $\beta$ -折叠及随机碰撞引起 *MRE* 的变化值。33000 是纯 $\alpha$ -螺旋结构的 *MRE* 值。

$$MRE_{208} = \frac{\text{observedCD(mdeg)}}{C_p n l \times 10} \quad (10)$$

$C_p$  是 BSA 的浓度,  $n$  是 BSA 的氨基酸残基数,  $l$  是比色皿的光路直径, 单位为 cm。将 208 nm 处的读值代入公式, BSA 在  $106.2 \times 10^{-6}$  mol/L 浓度的胶毒素作用下,  $\alpha$ -螺旋结构从原来的 24.92% 上升至 34.90%, 变化率为 40.05%。

此外, 紫外—可见吸收光谱的方法分析胶毒素与 BSA 的相互作用的结果表明, 随着胶毒素浓度的增加, BSA 在 280 nm 附近的特征峰明显增强, 即 BSA 分子中色氨酸和酪氨酸残基在胶毒素作用下, 芳香杂环发生了 $\pi$ - $\pi$ 跃迁, 从而导致 280 nm 附近的吸收峰强度增加<sup>[17]</sup>, 表明胶毒素与 BSA 发生了相互作用。在静态猝灭中, 基态复合物的生成往往会导致荧光物质吸收光谱的改变。BSA 与胶毒素在相互作用中形成了复合物, 导致荧光静态猝灭的发生, 从而引起 BSA 的荧光光谱、CD 以及吸收光谱的改变。

本文同时使用荧光光谱、圆二色光谱和紫外—可见吸收光谱法研究胶毒素与 BSA 的相互作用。判断胶毒素对 BSA 的荧光猝灭作用属于静态猝灭, 即胶毒素与 BSA 之间形成了复合物。通过考察 BSA 的荧光光谱与胶毒素的紫外光谱, 得出胶毒素与 BSA 二者间的距离是 2.4 nm, 说明二者之间发生了非辐射的共振能量转移, 其荧光共振能量转移效率为 3.0%。不同温度的热力学参数计算结果表明, 胶毒素与 BSA 间的反应是熵驱动下自发进行(自由能为负值)的反应, 胶毒素与 BSA 分子间的作用力以疏水作用为主(熵增, 焓增)。圆二色光谱从另一个侧面反应了胶毒素作用后 BSA 的二级结构, 尤其是 $\alpha$ -螺旋数量的变化。胶毒素与 BSA 二者在 298 K 时的结合常数仅为  $7.2 \times 10^3$  L/mol, 远远小于配体与受体之间特异性结合的结合常数( $10^7 \sim 10^{14}$  L/mol), 说明二者的结合属于非特异性结合。二者间较弱的相互作用有利于胶毒素在血液中的运输。本研究采用波谱学的方法对胶毒素分子与 BSA 间的相互作用进行了研究, 并取得了一些有意义的结果, 该结果对了解胶毒素分子与血清蛋白质的相互作用, 进而了解其在血液中的行为具有重要的意义。

## 参 考 文 献

[1] Didier VP. Research of center for biological function. *Nitrobiology*, 1992, 802–1805.

- [2] 黄行许, 黄有国. 巨噬细胞凋亡及其调控. 生物化学与生物物理进展, 2004, 27(2): 139–142.
- [3] 成建华, 刘 淼, 周西柳, 等. 美他环素与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究. 吉林大学学报, 2007, 45(3): 486–492.
- [4] Ranjan N, Nilmoni S, Rintu B. Probing the interaction of ellagic acid with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 2007, 152–158.
- [5] Dzmityr S, Magdalena J. Serum albumins have five sites for binding of cationic dendrimers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 946–951.
- [6] 梁彦秋, 刘婷婷, 费洪博. 荧光光谱和紫外光谱法研究 Cu(II), Cd(I)与血清白蛋白的作用. 分析科学学报, 2007, 23(3): 303–306.
- [7] 冯尚源, 陈 荣, 杨文琴. 血卟啉衍生物与血红蛋白相互作用的光谱特性研究. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(11): 2279–2282.
- [8] 王彦卿, 张红梅, 张根成. 硅钨杂多酸与牛血红蛋白相互作用的研究. 无机化学学报, 2006, 22(5): 895–899.
- [9] 张国文, 邹 敏, 阙青民. 盐酸洛美沙星与人血清白蛋白相互作用的荧光光谱. 南昌大学学报, 2006, 30(3): 244–247.
- [10] 曹玺琪, 杜黎明. 噪美辛与牛血清白蛋白结合作用的研究. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(5): 973–977.
- [11] 赵 锦, 王 志, 吴秋华. 应用荧光光谱法和紫外光谱法研究士的宁与牛血清白蛋白的相互作用. 药学学报, 2006, 41(7): 666–670.
- [12] 盛良全, 童红武, 张淑萍. 烟碱与人血清蛋白相互作用的光谱研究. 分析化学, 2006, Z1: 203–206.
- [13] 苏 忠, 秦 川, 谢孟峡. 罗布麻活性成分与人血清白蛋白结合的光谱学研究. 化学学报, 2007, 65(4): 329–336.
- [14] 李林尉, 王冬冬, 孙德志. 抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶与人血清白蛋白相互作用的热力学研究. 化学学报, 2007, 65(27): 2853–2857.
- [15] Fengling Cui, Qiangzhai Zhang, Yinghua Yan. Study of characterization and application on the binding between 5-iodouridine with HSA by spectroscopic and modeling. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 73(3): 464–472.
- [16] Kandagal PB, Ashpka S. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41(2): 393–399.
- [17] 曹书霞, 赵玉芬. 分子吸收光谱在生物大分子研究中的应用. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(10): 1197–1201.