

3-[2-(5-溴-噻吩基)]-1-苯基-2-丙烯酮 与牛血清白蛋白的相互作用*

王会镇¹, 雷琴¹, 张弛翔¹, 姚小军², 陈绍玲², 刘家琴¹, 王琰¹

1. 西华大学理学院, 四川 成都 610039
2. 兰州大学化学化工学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: 通过苯乙酮和5-溴噻吩-2-甲醛合成了3-[2-(5-溴-噻吩基)]-1-苯基-2-丙烯酮(BTPPO)。使用光谱法和分子对接模拟研究了BTPPO与牛血清白蛋白(BSA, bovine serum albumin)的作用过程。同时, 研究了金属离子(Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+})对BTPPO与BSA相互作用的影响。结果表明: BTPPO与BSA的作用主要是静态荧光淬灭过程, 两者之间的结合以疏水和静电作用为主, 结合常数(K_b)为 10^4 左右。根据Förster理论, 可以计算得BTPPO和BSA的共振能量转移距离小于7 nm。另外, 在280 nm和295 nm激发波长下蛋白质的荧光淬灭实验表明: BTPPO与BSA的主要结合位点是BSA的亚结构域II A (site I)。金属离子(Pb^{2+} 除外)的存在可能会影响BTPPO荧光淬灭效果。分子对接模拟结果表明: BTPPO是通过疏水和极性作用嵌入BSA分子的亚结构域II A (site I)的疏水腔内的。

关键词: 3-[2-(5-溴-噻吩基)]-1-苯基-2-丙烯酮(BTPPO); 牛血清白蛋白(BSA, bovine serum albumin); 结合机理; 荧光; 分子对接

中图分类号: O657.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2021)06-0121-07

The interaction of 3-[2-(5-Bromo-thienyl)]-1-phenyl-2-propenone with bovine serum albumin

WANG Huizhen¹, LEI Qin¹, ZHANG Chixiang¹, YAO Xiaojun²,
CHEN Shaoling², LIU Jiaqin¹, WANG Yan¹

1. School of Science, Xihua University, Chengdu 610039, China
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: 3-[2-(5-Bromo-thienyl)]-1-phenyl-2-propenone (BTPPO) was synthesized from acetophenone and 5-bromothiophene-2-carbaldehyde. The spectrometric and molecular docking were employed to investigate the binding mechanism of BTPPO to bovine serum albumin (BSA), and the effects of metal ions (Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+}) on the BTPPO-BSA binding system were also discussed. The spectrometric experiment results showed that the binding reaction of BTPPO to BSA was based on the static fluorescence-quenching process with hydrophobic and electrostatic forces, and the binding constant (K_b) was about 10^4 . Based on the Förster theory, the binding distance (r) between

* 收稿日期: 2020-06-25 录用日期: 2020-08-21 网络首发日期: 2021-04-23
基金项目: 教育部春晖计划(191630); 四川省教育厅项目(18ZB0571); 西华大学高性能计算四川省重点实验室资助项目(szjj2016-053)
作者简介: 王会镇(1988年生), 男; 研究方向: 有机合成化学; E-mail: 578527840@qq.com
通信作者: 刘家琴(1967年生), 女; 研究方向: 分析化学; E-mail: liujq2015@126.com

BTPPO and BSA was less than 7 nm. Comparing the quenching of protein fluorescence excited at 280 nm and 295 nm, it was shown that the primary BTPPO binding site was located in the sub-domain IIA (siteI) of BSA. The presence of metal ions (except Pb^{2+}) may influence the BTPPO efficacy. The molecule docking results illustrated that BTPPO can bind with the sub-domain IIA of BSA in which hydrophobic and polar interactions are the key acting force.

Key words: 3-[2-(5-Bromo-thienyl)]-1-phenyl-2-propenone (BTPPO); bovine serum albumin (BSA); binding mechanism; fluorescence; molecule docking

血清白蛋白在生命活动中起着非常重要的作用,与生命体内环境的变化密切相关^[1]。近几十年来,药物与血清白蛋白的相互作用引起了研究者的高度关注^[2-4]。本研究的内容有助于探究影响药物治疗效果的结构特征,对新药的研发及设计具有很好的指导意义。由于牛血清白蛋白(BSA)和人血清白蛋白(HSA)在结构上具有相似性,因此BSA已被广泛用于研究蛋白质与药物相互作用机理^[5]。查尔酮可作为类黄酮和异黄酮的前体,广泛存在于可食用植物中,且已被证明具有多种药理活性^[6-7]。3-[2-(5-溴-2-噻吩基)]-1-苯基-2-丙烯酮(BTPPO,图1)是一种带有噻吩基团的新型查耳酮衍生物,其与BSA的相互作用机理尚未得到深入研究。

本文中,我们在模拟生理环境下,使用光谱分析法研究了BTPPO与BSA的相互作用以及几种金属离子的影响。研究了淬灭机理,结合力类型以及BTPPO对BSA构象的影响。得到了结合常数、结合位点和结合距离等数据。此外,还使用分子对接模拟研究了BTPPO和BSA之间的相互作用。以上研究有助于阐明BTPPO与BSA相互作用的机制,并为进一步研究药物作用机制奠定基础。

1 实验过程

1.1 原料

牛血清白蛋白(组分V, $\varphi=99\%$, Sigma公司)溶于Tris-HCl ($pH=7.40$)缓冲溶液中制成 $1.54 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液; BTPPO为实验室合成,溶于Tris-HCl缓冲溶液中制成 $4.53 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液; Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^{+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} 金属离子溶

于Tris-HCl缓冲溶液制成浓度为 $4.53 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。实验用水为二次蒸馏水。

1.2 仪器

荧光分光光度计(F-4600, 日立, 日本); 紫外可见分光光度计(CARY 100, 安捷伦, 美国); 数字式pH计(pHS-25, 雷磁, 上海)。

1.3 实验方法

1.3.1 BTPPO的合成 将5 mmol苯乙酮溶于10 mL乙醇中,加入5 mL $w=10\%$ 的氢氧化钠溶液,之后加入5 mmol 5-溴-噻吩-2-甲醛,室温下搅拌8 h。反应结束后,加入200 mL去离子水,之后用盐酸调节pH值为6.8~7.2。过滤得沉淀,之后用乙醇重结晶得白色固体产物,产率:80%。合成路线如图1所示。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.0 (d, $J=3.9$ Hz, 1H), 7.1 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.2 (d, $J=15.3$ Hz, 1H), 7.5 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.6 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.8 (d, $J=15.3$ Hz, 1H), 8.0 (d, $J=7.5$ Hz, 1H)。

1.3.2 光谱研究方法 在紫外-可见光谱(UV-vis)的测试中,设定光谱测量范围为200~400 nm。在荧光光谱测试中,设定激发波长为280 nm,发射光谱扫描范围为300~450 nm。激发和发射狭缝的宽度均设定为5 nm。具体方法为:移取 $1.54 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的BSA母液3 mL于石英比色皿中,测定其发射光谱,然后用微量进样器逐次加入 $4.53 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的BTPPO母液进行荧光滴定。所有实验均在3个不同的温度(293、310、318 K)下进行。然后将激发和发射波长间隔($\Delta\lambda$)设置为15 nm和60 nm,进行同步荧光光谱测量。

通过以下公式进行了荧光强度值的校正以消

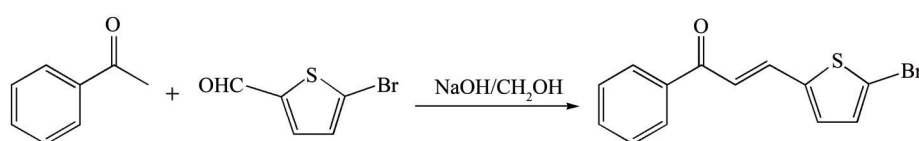


图1 BTPPO的合成路线
Fig. 1 Synthesis of BTPPO

除内部滤镜效果的影响^[8]

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} \cdot \exp\left[\frac{A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}}{2}\right], \quad (1)$$

其中 F_{cor} 和 F_{obs} 分别是荧光强度校正值和测量值; A_{ex} 和 A_{em} 分别是 BTPPO-BSA 体系在激发和发射波长下的吸光度。

1.3.3 分子对接模拟 首先使用 Schrödinger 2009 软件中的 2D Sketcher 构建了 BTPPO 的分子结构模型。然后在 OPLS-2005 力场中使用 LigPrep 连接酶对 BTPPO 进行预处理, 并计算出化合物低能量状态下的 3D 构象异构体^[9-10]。使用 Epik 技术^[11] 在 7.0 ± 2.0 的 pH 值下进行了离子化状态分布。从蛋白质数据库 (PDB ID 代码 4OR0)^[12] 检索到 BSA 的 3D 晶体结构用于分子对接模拟。使用蛋白质制备向导去除结晶水分子的影响并进行氢原子的添加。使用 OPLS-2005 力场进行部分电荷的分配^[10], 同时进行质子化状态分配。当均方根偏差 (RMSD) 达到最大值 0.30 时, 终止最小化。使用 Glide^[13] 在标准精度 (SP) 下进行分子对接模拟。在对接计算的初始阶段生成了 500 个位姿, 从中选择了 100 个最佳位姿, 通过 1 000 步共轭梯度最小化算法来进行最低能量优化。所有的分子对接模拟过程均使用 Schrödinger 2009 软件进行。

2 结果与讨论

2.1 紫外光谱

紫外吸收光谱见图 2, 其中曲线 1 是 BTPPO-BSA 体系的紫外吸收光谱, 曲线 2 是 BSA 的紫外吸收图谱。对比曲线 1 和曲线 2 可以看出: BTPPO 与 BSA 的结合导致吸光度的显著下降, 最大吸收波长从 198 nm 红移至 208 nm, 这表明 BSA 和 BTPPO 之间形成了复合物^[14]。

2.2 荧光光谱

BTPPO 对 BSA 荧光发射光谱的影响见图 3, 可以看出: 当激发波长为 280 nm 时, BSA 的荧光强度值随着 BTPPO 浓度的增加而逐渐降低, 这是因为 BTPPO 可以与 BSA 结合形成 BTPPO-BSA 复合物, 从而导致荧光淬灭^[15]。另外, 随着 BTPPO 浓度的增加, 荧光具有蓝移现象, 这是由荧光发色团周围微环境的极性降低引起的^[16]。

采用同步荧光光谱法在 $\Delta\lambda=15$ nm 和 $\Delta\lambda=60$ nm 条件下研究了 BTPPO 对 BSA 构象的影响, 结果见图 4。由图 4 可见, 随着 BTPPO 浓度的增加, BSA 中酪氨酸 (Tyr) 和色氨酸 (Trp) 残基的荧光强度逐渐降低。同时, 最大发射波长没有出现明显的

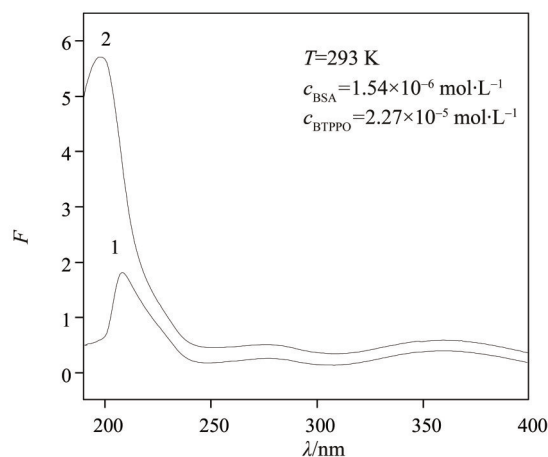


图2 BTPPO和BSA作用的紫外光谱图

1: BTPPO-BSA 的紫外吸收图谱;

2: BSA 的紫外吸收图谱。

Fig. 2 UV of BTPPO-BSA and BSA

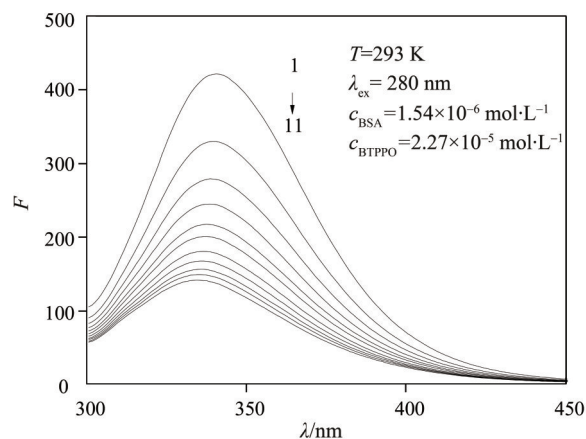


图3 BTPPO与BSA相互作用的荧光光谱图

1~11的 $c_{\text{BTPPO}}/(10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 分别为 0, 0.45, 0.91, 1.36, 1.81, 2.27, 2.72, 3.17, 3.63, 4.08, 4.53。

Fig. 3 Fluorescence spectra of BSA-BTPPO system

位移, 表明 BTPPO 不会对 BSA 的结构产生明显的影响^[17]。

2.3 结合位点

为了确定 BSA 的酪氨酸 (Tyr) 和色氨酸 (Trp) 残基是否都与 BTPPO 发生了作用, 在激发波长为 280 和 295 nm 时测量了 BTPPO 存在时 BSA 的荧光光谱, 结果见图 5。由图可见, 在激发波长为 280 nm 和 295 nm 时的 BSA 荧光淬灭曲线没有重叠, 并且激发波长为 280 nm 时的荧光淬灭程度略微强于激发波长为 295 nm 时。这表明酪氨酸 (Tyr) 和色氨酸 (Trp) 残基都参与了反应, 同时也表明 BTPPO 主要结合在 BSA 的亚结构域 II A (site I) 处^[18]。

2.4 结合常数和淬灭机理

BTPPO 对 BSA 的淬灭机理可通过修正后的

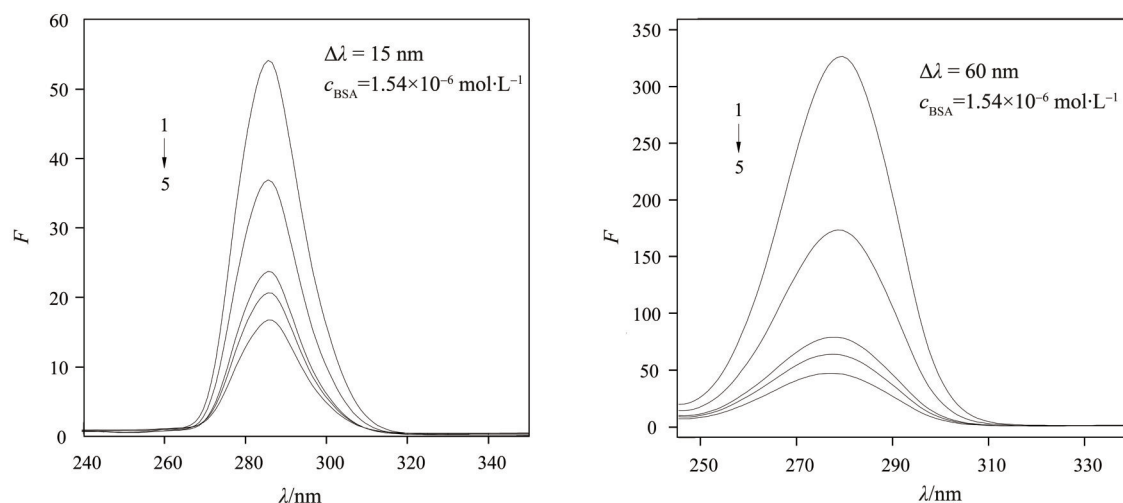


图4 BTPPO与BSA相互作用的同步荧光光谱图

1~5的 $c_{\text{BTPPO}}/(10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 分别为 0, 0.45, 1.36, 2.27, 3.17。

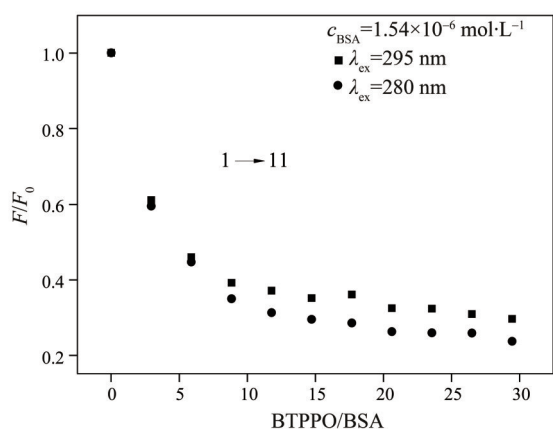
Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of BSA-BTPPO ($T=293 \text{ K}$)

图5 BTPPO对BSA的荧光淬灭曲线

1~11的 $c_{\text{BTPPO}}/(10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 分别为 0, 0.45, 0.91, 1.36, 1.81, 2.27, 2.72, 3.17, 3.63, 4.08, 4.53。

Fig. 5 Fluorescence quenching curves of BTPPO-BSA

Stern-Volmer方程^[8]推断

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f} + \frac{1}{K f [Q]}, \quad (2)$$

式中 F_0 和 F 分别是不存在和存在淬灭剂时蛋白质的荧光强度。 f 是淬灭剂可接近的初始荧光物质的分数, K 是淬灭常数。 f^{-1} 和 $(Kf)^{-1}$ 分别是 $F_0/(F_0 - F)$ 对

$1/[Q]$ 做曲线的截距和斜率。计算结果见表1。

从计算结果可以看出, BTPPO与BSA之间存在很强的相互作用, 并且荧光淬灭常数随温度的升高而降低, 这表明BTPPO对BSA为静态淬灭过程^[8]。

2.5 结合力

BTPPO与BSA相互作用的结合力数据及热力学参数可以通过公式(3)和(4)计算得到

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

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S, \quad (4)$$

其中 T 为实验温度, K 为相应温度下的结合常数, R 为气体常数。根据热力学参数的大小, 可以推算得到药物-蛋白质结合过程中的结合力^[19-21]。

BTPPO-BSA体系的 ΔG , ΔH 和 ΔS 值如表1所示。 $\Delta G < 0$ 说明结合过程是自发进行的。 $\Delta S > 0$, $\Delta H < 0$ 说明BTPPO和BSA之间的结合方式主要是静电作用和疏水作用。

2.6 结合距离

供体与受体的结合距离可以通过Förster理论计算得到^[22]。能量传递效率 E 可以通过以下公式

表1 BTPPO与BSA的结合常数和热力学参数

Table 1 Binding constants and thermodynamic parameters for the binding of BTPPO to BSA

温度/K	$K/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
293	7.879	-27.4		
310	4.969	-27.7	16.2	-22.7
318	3.724	-27.9		

求得

$$E = 1 - \left(\frac{F}{F_0} \right) = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, \quad (5)$$

其中 r 是供体和受体之间的距离。 R_0 是传输效能为 50% 时的距离, 可以通过以下公式求得

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

其中 K^2 是偶极子的空间取向因子, N 是介质的折射率, ϕ 是不存在受体时供体的量子产率。 K^2 、 N 和 ϕ 分别取 2/3、1.336 和 0.15。供体和受体之间的重叠面积可以通过下式求得

$$J = \frac{F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4\Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda}, \quad (7)$$

其中 $F(\lambda)$ 和 $\varepsilon(\lambda)$ 分别是激发波长为 λ 时 BSA 的荧光强度和 BTPPO 的吸光度。通过公式 (5) ~ (7) 可以分别求得 J 、 E 和 R_0 的值, 进而求得 r 的值。

BTPPO 的紫外吸收图谱与 BSA 的荧光发射图谱积分面积 (A) 见图 6。由图 6 可见, BTPPO 的加入对 BSA 中色氨酸残基的荧光产生淬灭效应。图 6 重叠部分的积分面积为 $1.19 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。进而求得 $R_0 = 1.68 \text{ nm}$, $r = 2.52 \text{ nm}$ 。供体和受体之间的距离小于 7 nm, 说明 BTPPO 与 BSA 之间可以发生能量转移。

2.7 金属离子的影响

在生命体内, 金属离子的存在可能会影响药物与蛋白质的相互作用^[23]。通过荧光光谱法研究了金属离子 (Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+}) 对 BTPPO 与

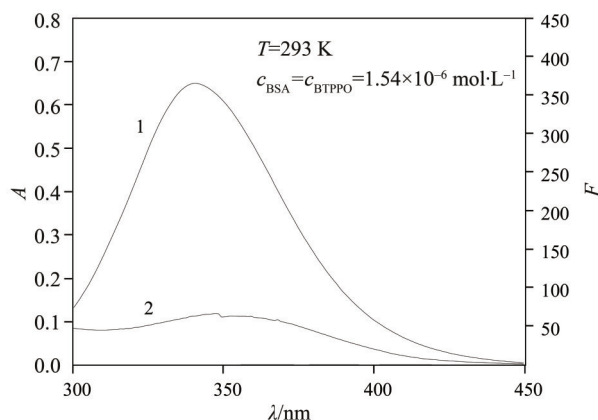


图6 BTPPO的紫外图谱与BSA的荧光图谱的重叠图

1: BTPPO的紫外吸收图谱; 2: BSA的荧光发射图谱。

Fig. 6 Overlap of the fluorescence emission spectrum of BSA

BSA 相互作用的影响。通过公式 (2) 求得结合常数, 结果见表 2。

由表 2 可以看出: 金属离子 (Co^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+}) 的存在使得结合常数降低, 这是由于金属离子与 BTPPO 之间的竞争行为所致。离子-蛋白质复合体的形成会影响蛋白质的结构进而抑制 BTPPO 与 BSA 的结合^[24], 并且缩短 BTPPO 在血清白蛋白中的停留时间。与此相反, Pb^{2+} 存在时 BTPPO-BSA 的结合常数会增加, 这是因为体系中 Pb^{2+} , BTPPO 和 BSA 可以共存, Pb^{2+} 与 BSA 通过金属离子桥形成 Pb^{2+} -BSA 前体, 进而与 BTPPO 结合形成 BTPPO- Pb^{2+} -BSA 复合物。

表2 金属离子对 BTPPO-BSA 体系结合常数的影响

Table 2 Binding constants of BTPPO-BSA system in the presence of metal ions

体系	结合常数/($10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	相关系数
BSA+BTPPO	1.99	0.998 9
BSA+BTPPO+ Cu^{2+}	1.98	0.999 1
BSA+BTPPO+ Co^{2+}	1.49	0.999 2
BSA+BTPPO+ Pb^{2+}	2.58	0.999 6
BSA+BTPPO+ Ag^+	1.85	0.999 2
BSA+BTPPO+ Hg^{2+}	1.68	0.999 6
BSA+BTPPO+ Cd^{2+}	1.01	0.999 5

3 分子对接

通过分子对接模拟研究了 BTPPO 与 BSA 的作用方式。从图 7 可以看出, BTPPO 与 BSA 的结合位点是在 BSA 的亚结构域 II A (site I) 上。分子对接模

拟的结果: 结合自由能是 $-27.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 说明结合过程是自发的, 作用方式主要是通过疏水和极化作用。在 BTPPO-BSA 体系中, BTPPO 的疏水基团主要是与 BSA 的 Leu386, Ile387, Leu429, Val432, Gly433, Cys436, Thr448 和 Leu452 位点

进行作用。极化基团主要是与 I Asn390, Arg409, Ser488 和 Ala489 位点进行作用。

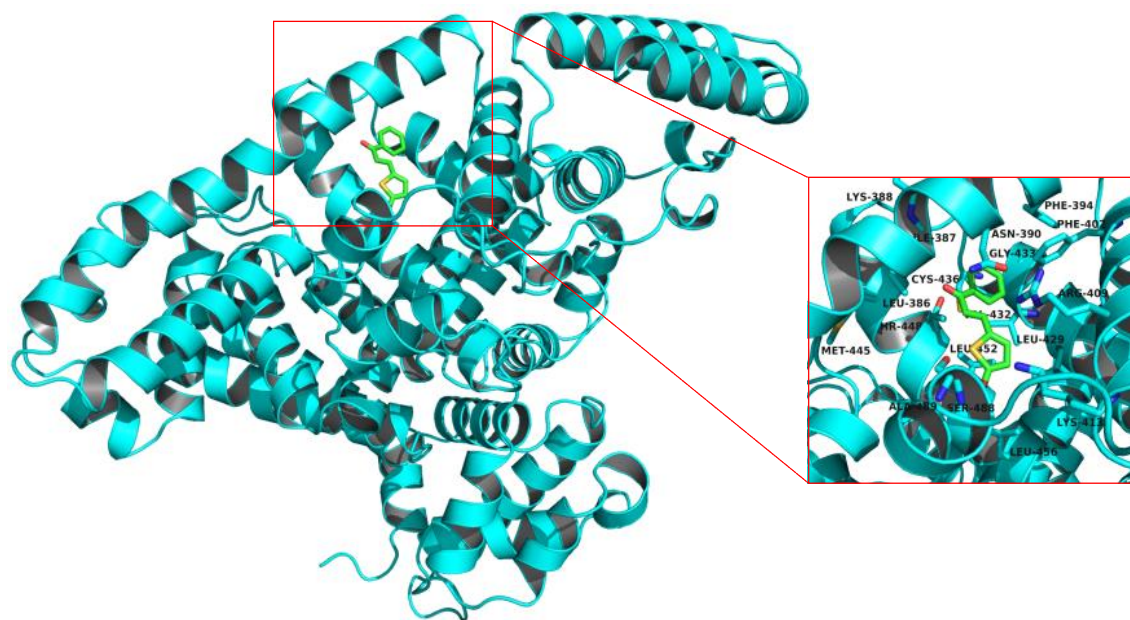


图7 BTPPO-BSA 的分子对接模拟
BSA用卡通模型表示, 结合位点的关键残基用柱状模型表示。

Fig. 7 The docking results of BTPPO-BSA system

4 结 论

本文合成了小分子BTPPO并进行了结构表征。通过荧光光谱法和分子对接模拟研究了BTPPO与BSA的相互作用, 并研究了金属离子对作用过程的影响。荧光分析结果表明BTPPO对BSA的淬灭是

因为形成了BTPPO-BSA复合物, 结合常数为 10^4 左右。BTPPO分子通过疏水作用和静电作用嵌入BSA的疏水腔, 且优先与BSA的II A子域(site I)结合。结合距离小于7 nm, 表明存在非辐射能量转移。

参考文献:

- [1] KRATZ F. Albumin as a drug carrier: Design of pro-drugs drug conjugates and nanoparticles [J]. *J Controlled Release*, 2008, 132: 171-183.
- [2] ABASSI P, ABASSI F, YARI F, et al. Study on the interaction of sulforaphane with human and bovine serum albumins [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, 122: 61-67.
- [3] TIAN Z Y, ZANG F L, LUO W, et al. Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA) [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, 142: 103-109.
- [4] EMIT M D, BYADAGI K S, NANDIBEWOOR S T, et al. Multi-spectral characterization & effect of metal ions on the binding of bovine serum albumin upon interaction with a lincosamide antibiotic drug [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, 138: 324-330.
- [5] CARTER D C, HO J X. Structure of serum albumin [J]. *Advances in Protein Chemistry*, 1994, 45: 153-203.
- [6] NOWAKOWSKA Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 42: 125-137.
- [7] DUCKI S. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones [J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2009, 9: 336-347.
- [8] LAKOWICZ J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- [9] LIGPREP, version 2.3, Schrödinger, LLC [CP]. New York, 2009.
- [10] KAMINSKI G A, FRIESNER R A, JORGENSEN W

- L, et al. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105: 6474-6487.
- [11] EPIK, version 2.0, Schrödinger, LLC [CP]. New York, 2009.
- [12] BUJACZ A, ZIELINSKI K, SEKULA B. Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen [J]. *Proteins*, 2014, 82: 2199-2208.
- [13] GLIDE, version 5.5, Schrödinger, LLC [CP]. New York, 2009.
- [14] ZHANG Y N, YANG L L, ZHOU P, et al. Fluorescent emission of coumaric aldehyde molecule enhanced by dihydrogen phosphate [J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2011, 32(9): 962-967.
- [15] SHU Y, XUE W W, XU X Y, et al. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique [J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 31-37.
- [16] LI X R, CHEN D J, WANG G K, et al. Study of interaction between human serum albumin and three antioxidants: Ascorbic acid, α -tocopherol, and proanthocyanidins [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 70: 22-36.
- [17] BI S Y, PANG B, WANG T J, et al. Investigation on the interactions of clenbuterol to bovine serum albumin and lysozyme by molecular fluorescence technique [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 120: 456-461.
- [18] EFTINK M R, GHIRON C A. Fluorescence quenching of indole and model micelle systems [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1976, 80: 486-493.
- [19] NEMÉTHY G, SCHERAGA H A. Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. I. A model for the thermodynamic properties of liquid water [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1962, 66: 1773-1789.
- [20] TIMASHEFF S N. In proteins of biological fluids [M]. Oxford: Pergamon Press, 1972.
- [21] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability biochemistry [J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096-3102.
- [22] FÖRSTER T, SINANOGLU O. Modern quantum chemistry [M]. New York: Academic Press, 1965.
- [23] ZHANG G C, WANG Y Q, ZHANG H M, et al. Human serum albumin interaction with paraquat studied using spectroscopic methods [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 87: 23-29.
- [24] DING F, PAN H, LI Z Y, et al. Spectroscopic studies on the binding of barbital to bovine serum albumin [J]. *Journal of Luminescence*, 2009, 129: 650-655.

(责任编辑 张冰)