笃斯越橘花青素与牛血清白蛋白的相互作用

姚惠芳，景 浩*
(中国农业大学食品科学与营养工程学院，植物源功能食品北京市重点实验室，北京 100083)

摘 要：采用荧光光谱、紫外-可见光谱和红外光谱法，研究笃斯越橘中花青素与牛血清白蛋白之间的相互作用。结果表明：花青素对牛血清白蛋白有较强的荧光猝灭作用且为静态猝灭，并计算得出不同温度下其结合常数(K_A)与结合位点数(n)分别为：2.218×10^4、1.084(298K)，1.770×10^4、1.065(306K)，1.706×10^4、1.086(310K)。由热力学参数确定它们之间的作用力主要是静电引力，并根据Förster能量转移理论求得其结合距离为2.1nm。同步荧光光谱显示花青素主要与牛血清白蛋白中色氨酸残基发生相互作用，使其周围的疏水性增加。傅里叶变换红外光谱表明花青素可引起牛血清白蛋白的构象发生改变，使α-螺旋结构改变。

关键词：花青素；牛血清白蛋白；荧光光谱；紫外-可见光谱；傅里叶变换红外光谱

Spectroscopic Analysis of Interaction between Bovine Serum Albumin and Anthocyanin

YAO Hui-fang，JING Hao*
(Beijing Key Laboratory of Functional Food from Plant Resources, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract：The interaction between anthocyanin and bovine serum albumin (BSA) was studied by UV-Vis, fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The results suggested that anthocyanin 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 2.218×10^4, 1.084 (298 K); 1.770×10^4, 1.065 (306 K) and 1.706×10^4, 1.086 (310 K), respectively. According to the thermodynamic parameters, electrostatic forces played a dominant role in the interaction between anthocyanin and BSA. The distance between donor and acceptor in anthocyanin-BSA complex was calculated as 2.1 nm, based on the equations from Förster nonradiative energy transfer theory. The synchronous fluorescence spectra revealed that anthocyanin interacted with tryptophan residues in BSA, and the vicinity of tryptophan residues was more hydrophobic. The FT-IR spectra revealed that conformational changes of BSA were caused by anthocyanin, thus leading to structural changes of α-helix.

Key words：anthocyanin；bovine serum albumin；fluorescence spectroscopy；UV-Vis spectroscopy；Fourier transform infrared spectroscopy

中图分类号：TS201.4 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)23-0006-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323002

牛血清白蛋白(bovine serum albumin，BSA)是球蛋白，几乎所有的亲水基团都分布在分子外表面，形成亲水的分子外壳，而疏水的基团则包埋在分子内部，形成疏水空腔。BSA是由583个氨基酸组成的单链蛋白，C端为丙氨酸残基，N端为天冬氨酸残基，含有35个半胱氨酸残基，仅34位有一个巯基，其余都为二硫键。BSA的二级结构主要为α-螺旋，除此以外还有β-折叠、转角以及无规则卷曲等。BSA分子的高级结构包括3个结构相似的功能域(结构域Ⅰ、结构域Ⅱ、结构域Ⅲ)，每个结构域又包含两个亚结构域A和B，分别叫做ⅠA、ⅠB、ⅡA、ⅡB、ⅢA和ⅢB。BSA分子中含有两个色氨酸残基，134位色氨酸残基位于分子的表面，处于IA亚域；212位色氨酸残基位于BSA分子的内部，处于IIA亚域[1]。BSA是血浆中含量最丰富的载体蛋白，具有良好的生物相容性，能够与广泛的内源物质(如代谢产物等)和外源物质(如药物等)进行可逆性的非共价结合[2]。李满秀等[3]以BSA为载体，研究其与金丝桃苷相互作用，发现金丝桃苷对BSA的荧光猝灭类型是静态猝灭，可以引起BSA的构象

收稿日期：2012-09-14
基金项目：国家自然科学基金项目(31171676)
作者简介：姚惠芳(1987—)，女，硕士研究生，研究方向为蛋白与天然活性小分子物质的相互作用和应用。
E-mail：yaohuifang_1987@163.com
*通信作者：景浩(1957—)，男，教授，博士，研究方向为分子营养与食品安全。E-mail：haojing@cau.edu.cn

变化。尚永辉等[4]以BSA为载体，研究其与木犀草素、芹菜素和葛根素相互作用的机理，发现三者与BSA之间的结合是通过非辐射能量转移而促使蛋白质的荧光猝灭，它们之间的作用力主要是静电引力。方茹等[5]以BSA为载体，研究其与槲皮素相互作用，发现槲皮素与BSA之间由于氢键和疏水相互作用发生自发结合，并且能够形成以槲皮素为芯材的纳米颗粒。以上研究表明，BSA可以与脂溶性的小分子结合，结合方式有静电引力、氢键和疏水相互作用等。但BSA与水溶性的小分子结合方式的探讨未见报道。

花青素具有抗氧化[6]、抗肿瘤[7]、抗癌[8]等生物活性，近年来受到广泛关注。花青素(anthocyanin，Acn)是黄酮化合物中常见的一类，是2-苯基苯并吡喃型阳离子结构的衍生物，由于取代基的数量和种类的不同可形成不同种的花青素。常见的6类包括天竺葵色素、矢车菊色素、飞燕草色素、牵牛花色素、芍药色素和锦葵色素。它们均易溶于水和乙醇，在pH≤3的酸性条件下稳定，在碱性条件下易分解[9]。花青素的氧化稳定性较差，其活泼的酚羟基很容易被氧化成醌[5]。花青素与蛋白大分子的结合，可以减缓自身氧化进程，从而实现被保护的目的。Zheng等[10]在pH8.0和80℃加热60min的加速降解体系中，乳清蛋白与笃斯越橘中花青素提取物(bog bilberry anthocyanin extract，BBAE)相互作用可以有效阻止BBAE吸光度及其$ABTS^{+}$·清除率的降低($P<0.05$)。用乳清蛋白与蓝莓花青素提取物相互作用，使蓝莓花青素提取物的降解率明显降低[11-12]。虽然花青素与乳清蛋白相互作用的研究已有一些报道，但对于花青素与BSA相互作用的机理研究则未见报道。

本研究运用紫外-可见光谱(UV-Vis)、荧光光谱、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)，详细研究了笃斯越橘中的花青素与BSA相互作用的光谱特征，用Stern-Volmer和双对数方程处理荧光光谱数据，深入分析花青素与BSA的结合机理，结合方式，以及对BSA构象的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛血清白蛋白(BSA，albumin bovine V，第5组分，纯度大于98%，分子质量67200D，Cat. No.: A-0332) 美国Amresco公司进口分装；笃斯越橘花青素(提取物中花青素含量为25%；进一步经过XAD-7树脂柱分离纯化，除去蛋白质和多糖，得到的笃斯越橘花青素纯化物，花青素含量为35%，其中矢车菊素-3-葡萄糖苷占总花青素含量的78.1%) 大兴安岭华野生物工程有限公司；其他试剂均为国产分析纯；所用水为去离子水。

1.2 仪器与设备

F-7000型荧光光度计 日本Hitachi公司；Spectrum 100 FT-IR型傅里叶变换红外光谱仪 美国Perkin Elmer公司；UV-1800型紫外-可见分光光度计 上海美普达仪器有限公司；PHS-3C^{+}型酸度计 成都市纪方舟科技有限公司；XB 220A型电子天平 德国Precisa Gravimetrics AG公司；QL-901型涡流振荡器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司；LGJ-10B型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液配制

牛血清白蛋白用0.1mol/L的NaCl缓冲液(pH7.4)配成1.5×10^{-4}mol/L的储备液，将制备好的储备液保存于4℃的冰箱中备用；花青素用去离子水(pH 6.3)配成1.5×10^{-2} mol/L的储备液(为了计算方便，统一使用笃斯越橘中含量最高的矢车菊素-3-葡萄糖苷的分子质量449.2D作为花青素的近似分子质量进行处理)。实验中所用的花青素溶液都是现用现配的，且在4h内完成测试。前期实验结果表明，在pH7.4时，花青素的降解在4h内少于15%。

1.3.2 紫外光谱测定

先将花青素储备液用去离子水稀释成1.5×10^{-3}mol/L的工作液。在15mL离心管中，加入1mL BSA储备溶液，再加入不同量的花青素工作液，配制BSA与花青素的浓度比是1:0、1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、1:12的溶液，加0.1mol/L的NaCl缓冲液(pH7.4)定容至10mL。用涡流振荡器混匀，室温下静置待用。用1.5×10^{-5}mol/L的BSA作为空白，在230～380nm范围内扫描紫外吸收光谱。

1.3.3 荧光光谱测定

先将花青素储备液用去离子水稀释成1.5×10^{-3}mol/L的工作液。在15mL离心管中，加入1mL BSA储备溶液，再加入不同量的花青素工作液，配制BSA与花青素的浓度比是1:0、1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、1:12，加0.1mol/L的NaCl缓冲液(pH7.4)定容至10mL。用涡流振荡器混匀。分别在25℃(298K)、33℃(306K)和37℃(310K)水浴箱中保持恒温，用1.5×10^{-5}mol/L 的BSA作为空白，准确移取3.0mL上述溶液于石英荧光池中，测定样品的荧光光谱，条件如下：激发波长为280nm，激发狭缝为2.5nm，发射狭缝为5nm。样品的同步荧光光谱测定条件如下：室温下，分别固定$\Delta\lambda$=15nm和$\Delta\lambda$=60nm。

1.3.4 傅里叶变换红外光谱测定

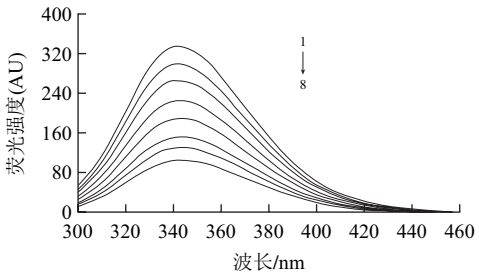
将BSA溶液和BSA与花青素的样品混合溶液(BSA浓度为1.5×10^{-5}mol/L 的溶液，花青素浓度为1.5×10^{-5}mol/L)冷冻干燥，将冻干粉末放在干燥器中(室温)待测。取2.2mg样品粉末与200mg KBr研细均匀后，置于模具中，用5×10^{7}～10×10^{7}Pa压力在油压机上压成薄片，在32cm^{-1}的分辨率条件下扫描32次，450～4000cm^{-1}的波数范围内扫描红外光谱。

2 结果与分析

2.1 花青素与牛血清白蛋白相互作用的荧光

2.1.1 花青素与牛血清白蛋相互作用的荧光猝灭光谱

蛋白分子中的色氨酸和酪氨酸均有荧光产生，其中色氨酸的最大发射波长在340nm左右，酪氨酸的最大发射波长在304nm。在激发波长为280nm时，BSA的最大发射波长为343nm，在304nm没有荧光峰形成。酪氨酸的荧光较弱，其荧光变化很难观察到；色氨酸荧光很强，因此本研究着重观察色氨酸的荧光变化。由图1可知，随着花青素浓度的增大，BSA荧光光谱发生了两方面的改变，荧光峰位移和荧光猝灭。荧光峰从343nm蓝移到342nm，这说明色氨酸区域变得更加疏水，荧光发生了猝灭，说明BSA分子中色氨酸残基空间位置发生了改变。花青素是水溶性的，可以与亲水的侧链残基相互作用，因此可以进一步推断是BSA分子中位于表面的色氨酸残基位置发生了改变[13]。



BSA浓度为1.5×10^{-5}mol/L；曲线1～8表示花青素浓度分别为0、1.5×10^{-5}、3.0×10^{-5}、6.0×10^{-5}、9.0×10^{-5}、12.0×10^{-5}、15.0×10^{-5}、18.0×10^{-5}mol/L；温度是298K。图6同。

图1 不同浓度的花青素对BSA荧光光谱的影响

Fig.1 Effect of anthocyanin concentration on fluorescence emission spectra of BSA

2.1.2 花青素与牛血清白蛋白相互作用的荧光猝灭机理与结合常数

为了进一步阐明花青素对BSA荧光猝灭机理，用Stem-Volmer方程对荧光数据进行分析：

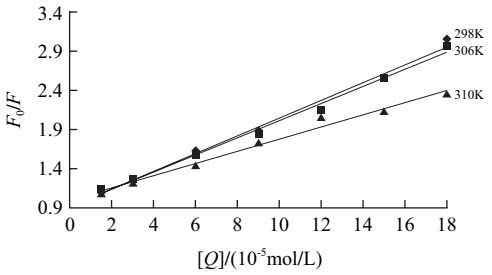
$$F_0/F=1+K_{SV}[Q] \quad (1)$$

式中：F_0和F分别是未加入和加入花青素时BSA的荧光强度；K_{SV}为动态猝灭常数；[Q]为花青素的浓度。

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。

由表1可知，动态猝灭常数K_{SV}值随着温度的升高而减小，表明此荧光猝灭机理为静态猝灭过程。

区分静态猝灭和动态猝灭的另一种方法是考察荧光体的吸收光谱。动态猝灭仅仅影响荧光体的激发态，而不影响荧光谱的吸收光谱。基态配合物的形成会引起荧光体的吸收光谱的变化。在pH7.4的NaCl缓冲液条件下，测定花青素的紫外吸收曲线(曲线Acn)以及花青素和BSA等物质的量混合物与BSA的紫外吸收差谱(曲线[BSA+Acn]-BSA)，发现两曲线有很大的差别(图3)，说明花青素与BSA作用生成了新的复合物，进一步证实荧光猝灭机理为静态猝灭[14]。



BSA浓度为1.5×10^{-5}mol/L。

图2 花青素与BSA作用的Stern-Volmer图

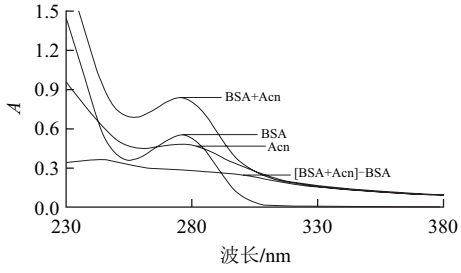
Fig.2 Stern-Volmer graph of BSA interacting with anthocyanin at different temperatures

表1 不同温度下花青素与BSA作用的猝灭常数K_{SV}

Table 1 Quenching constants of BSA interacting with anthocyanin at different temperatures

温度/K	Stern-Volmer方程(F_0/F=1+K_{SV}[Q])	动态猝灭常数K_{SV}/(L/mol)	相关系数r
298	F_0/F=0.913+1.13×10^4[Q]	1.13×10^4	0.9920
306	F_0/F=0.920+1.09×10^4[Q]	1.09×10^4	0.9960
310	F_0/F=0.998+7.70×10^3[Q]	7.70×10^3	0.9940

注：BSA浓度为1.5×10^{-5}mol/L。



BSA浓度为1.5×10^{-5}mol/L；花青素浓度为1.5×10^{-5}mol/L。

图3 BSA-花青素体系与BSA的紫外吸收差谱图

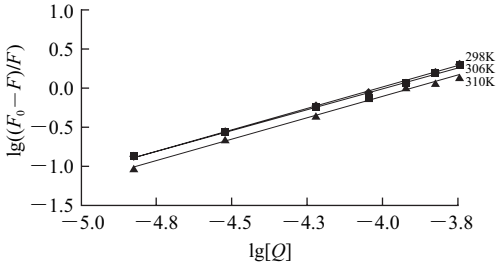
Fig.3 UV-Vis absorption spectra of BSA and BSA-anthocyanin systems

对于静态猝灭其结合常数K_A、结合位点数n[15]可由公式(2)确定。

$$\lg((F_0-F)/F)=\lg K_A+n\lg[Q] \quad (2)$$

式中：F_0和F分别是未加入和加入花青素时BSA的荧光强度；K_A为结合常数/(L/mol)；n为结合位点数；[Q]为花青素的浓度/(mol/L)。

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，结果见图4和表2。求得各自的结合常数(K_A)与结合位点数(n)分别为：2.218×10^4、1.084 (298K)，1.770×10^4、1.065(306K)，1.706×10^4、1.086 (310K)。



BSA浓度为1.5×10^{-5}mol/L；花青素浓度分别为0、1.5×10^{-5}、3.0×10^{-5}、6.0×10^{-5}、9.0×10^{-5}、12.0×10^{-5}、15.0×10^{-5}、18.0×10^{-5}mol/L。

图 4 BSA-花青素体系的lg((*F*$_0$−*F*)/*F*)对lg[*Q*]图

Fig.4 Plots of lg((*F*$_0$−*F*)/*F*)vs. lg [*Q*] for BSA-anthocyanin system at different temperatures

表 2 不同温度下花青素与BSA作用的结合位点数n和结合常数KA

Table 2 N and K_A of BSA-anthocyanin system at different temperatures

温度/K	双对数方程(lg((*F*$_0$−*F*)/*F*)=lg*K*$_A$+*n*lg[*Q*])	结合常数*K*$_A$/(L/mol)	结合位点数*n*	相关系数*r*
298	lg ((*F*$_0$−*F*)/*F*)=4.346+1.084lg [*Q*]	2.218×10^4	1.084	0.9980
306	lg ((*F*$_0$−*F*)/*F*)=4.248+1.065lg [*Q*]	1.770×10^4	1.065	0.9965
310	lg ((*F*$_0$−*F*)/*F*)=4.232+1.086lg [*Q*]	1.706×10^4	1.086	0.9970

注：BSA 浓度为 1.5×10^{-5}mol/L；花青素浓度分别为 0、1.5×10^{-5}、3.0×10^{-5}、6.0×10^{-5}、9.0×10^{-5}、12.0×10^{-5}、15.0×10^{-5}、18.0×10^{-5}mol/L。

2.1.3 花青素与牛血清白蛋白相互作用的热力学参数和作用力

在温度变化不大时，可以近似认为反应的Δ*H*为一常数。根据热力学参数之间的关系式：

$$\ln (K_2/K_1)=[1/T_1-1/T_2]\,\Delta H/R \quad (3)$$

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

可以分别求得焓变Δ*H*、熵变Δ*S*和吉布斯自由能Δ*G*(表3)。根据Ross等[16]总结出判断生物大分子与小分子结合力性质和生物大分子自身结合力性质的热力学规律，以小分子与生物大分子反应的热力学参数的变化判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型的规律。即当Δ*S*＞0，Δ*H*＞0为典型的疏水作用力；Δ*S*＜0，Δ*H*＜0为氢键和范德华力；当Δ*S*＞0，Δ*H*＜0时，主要存在静电相互作用。花青素与BSA的结合是一个熵增加、自由能降低的自发过程(Δ*G*＜0)，花青素与BSA结合反应的Δ*S*＞0，Δ*H*＜0可以认为花青素与BSA分子间主要表现为静电引力。

表 3 不同温度下花青素与BSA作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamics parameters of BSA-anthocyanin system at different temperatures

温度/K	焓变Δ*H*/(kJ/mol)	熵变Δ*S*/(J/mol)	吉布斯自由能Δ*G*/(kJ/mol)
298	−15.15	83.147	−24.793
306	−15.15	81.321	−24.884
310	−15.15	81.016	−25.115

2.1.4 花青素与牛血清白蛋白相互作用的结合距离

根据Förster偶极-偶极非辐射能量转移理论，当供体蛋白的荧光发射光谱与受体花青素的吸收光谱有一定程度的重叠，且二者间的最大距离小于7nm的范围内时，将会发生非辐射能量转移现象，从而使荧光体荧光猝灭[17]。能量转移效率为：

$$E=1-F/F_0=R_0^6/(R_0^6+r_0^6) \quad (5)$$

式中：F_0和F分别是BSA和花青素-BSA(浓度比1:1)的荧光发射峰强度；R_0为能量转移效率E=50%时的临界距离/nm；r_0是供体偶极中心与受体偶极中心之间的距离/nm，其中：

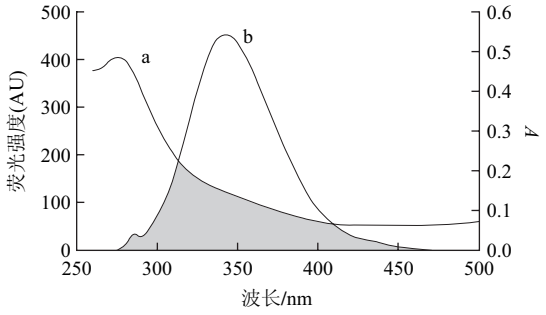
$$R_0^6=8.8\times10^{-25}K^2N^{-4}\Phi J \quad (6)$$

式中：K^2为偶极空间取向因子(取供体蛋白质-受体小分子各向随机分布的平均值K^2=2/3)；N为介质的折射指数(取水和有机物的平均值N=1.36)；Φ为供体BSA的荧光量子产率；J为供体BSA荧光光谱与受体花青素吸收光谱的重叠积分，其表达式为：

$$J=\frac{\int_0^\infty F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4\mathrm{d}\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda)\mathrm{d}\lambda} \quad (7)$$

式中：$F(\lambda)$为荧光供体在波长λ处的荧光强度；$\varepsilon(\lambda)$为受体在波长λ处的摩尔吸光系数。

图5表明，花青素的吸收光谱和BSA的荧光光谱具有一定程度的重叠，因此花青素和BSA之间可能发生Förster偶极-偶极非辐射能量转移。根据公式可以求得花青素与BSA的重叠积分J=5.81×10^{-15}cm^3/mol，R_0=2.2nm，E=0.57。可得花青素和BSA之间的结合距离r_0=2.1nm。由于r_0＜7nm，且0.5R_0＜r_0＜1.5R_0，因此可以推断花青素和BSA之间存在有Förster偶极-偶极非辐射能量转移，能量转移可能是荧光猝灭的重要原因之一，表明花青素的部分片段能够插入BSA分子内部。



BSA浓度为1.5×10^{-5}mol/L；花青素浓度为1.5×10^{-5}mol/L。

图 5 花青素的吸收光谱(a)和BSA的荧光光谱(b)

Fig.5 UV-Vis absorption spectrum of anthocyanin (a) and fluorescence emission spectrum of BSA (b)

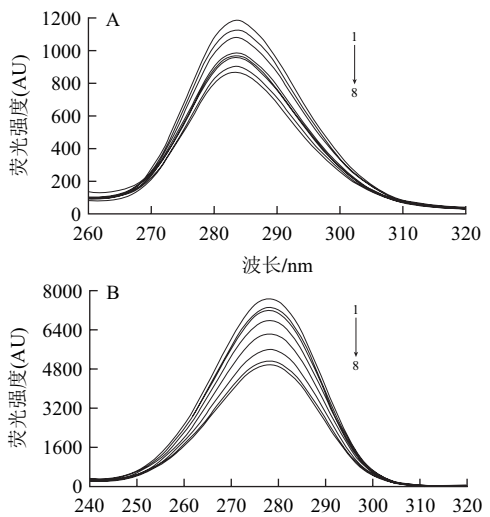
2.2 花青素对牛血清白蛋白构象的影响

2.2.1 同步荧光光谱

同步荧光光谱的变化可研究蛋白质构象，近年来越来越广泛地被应用在小分子和生物大分子的相互作用的研究领域中。芳香氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境极性有关，由发射波长的改变可判断BSA中芳香氨基酸

残基所处微环境的变化。Δλ=15nm和Δλ=60nm的同步荧光光谱分别显示蛋白质中酪氨酸残基和色氨酸残基的光谱性质。

图6为花青素和BSA相互作用的同步荧光光谱。结果表明：酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光均随花青素浓度的增加而逐渐被猝灭，在猝灭过程中酪氨酸残基的荧光峰波长无明显移动(图6A)，表明花青素对酪氨酸残基微环境构象的改变不大；而色氨酸荧光峰波长发生了蓝移，从280nm蓝移至278nm(图6B)，表明色氨酸残基所处的微环境疏水性增加，亲水性降低。并且色氨酸残基荧光猝灭程度比酪氨酸残基更显著，表明结合位点更接近于色氨酸残基。

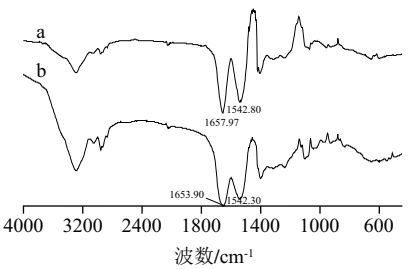


A. Δλ=15nm；B. Δλ=60nm。

图 6 不同浓度花青素存在下BSA的同步荧光光谱

Fig.6 Synchronous scanning fluorescence spectra of BSA-anthocyanin system at different anthocyanin concentrations

2.2.2 傅里叶变换红外光谱



BSA浓度为1.5×10^{-5}mol/L；曲线a、b花青素浓度分别为0、1.5×10^{-5}mol/L。

图 7 BSA-花青素(a)和BSA(b)的傅里叶红外变换光谱图

Fig.7 Fourier transform infrared spectra of BSA-anthocyanin (a) and BSA (b)

蛋白质构象的变化可以进一步通过红外光谱来考察。傅里叶变换红外光谱技术是研究氢键的强有力手段。蛋白的二级结构与其分子内形成的氢键紧密相关。蛋白质在红外区有若干特征吸收带，主要有酰胺I带(1600～1700cm^{-1})和酰胺II带(1500～1600cm^{-1})。酰胺I带主要是由蛋白骨架肽链C＝O的伸缩振动引起的，酰胺II带则包含了C－N的伸缩振动和N－H的弯曲振动。其中酰胺I带对于研究蛋白质二级结构最有价值。目前认为α-螺旋位于1650～1658cm^{-1}，β结构位于1620～1640cm^{-1}及1675cm^{-1}[18]。由图7可知，花青素的加入引起牛血清白蛋白的酰胺I带从1653.90cm^{-1}红移到1657.97cm^{-1}，而酰胺II带基本没有移动。红外光谱的变化说明花青素引起了BSA α-螺旋结构的改变。花青素和BSA形成复合物，导致肽链上羰基氢键网的重排，最终引起α-螺旋二级结构的改变。α-螺旋二级结构的改变可能部分归因于BSA结构发生部分变化，因此花青素造成BSA构象的变化。

3 结 论

笃斯越橘花青素与BSA之间有较强的相互作用，静电引力是其主要作用力。依据Förster的偶极-偶极非辐射能量转移理论，表明花青素的部分片断能够插入BSA分子内部，以静态猝灭和非辐射能量转移的方式导致BSA内源荧光减弱。同步荧光光谱和傅里叶变换红外光谱表明花青素对BSA的构象有影响，使其α-螺旋结构改变。

参考文献：

[1] HUANG B X, KIM H Y. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry[J]. Journal of America Society for Mass Spectrometry, 2004, 15: 1237-1247.
[2] 黄芸, 崔力剑, 陈晨, 等. 黄芩素及黄芩苷与牛血清白蛋白结合作用比较研究及葡萄糖的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 754-758.
[3] 李满秀, 窦艳枝. 金丝桃苷与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 分析试验室, 2011, 30(5): 46-49.
[4] 尚永辉, 李华, 孙家娟. 荧光光谱法研究木犀草素、芹菜素或葛根素与牛血清白蛋白的相互作用机理[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, 47(2): 186-190.
[5] 方茹, 冷小京, 吴夏, 等. 三种蛋白和黄酮结合物中氢键与黄酮稳定性相关性分析研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(1): 108-112.
[6] WANG B C, HE R, LI Z M. The stability and antioxidant activity of anthocyanins from blueberry[J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48: 42-49.
[7] JING P, BOMSER J A, SCHWARTZ S J, et al. Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(20): 9391-9398.
[8] BOBE G, WANG B, SEERAM N P, et al. Dietary anthocyanin-rich tart cherry extract inhibits intestinal tumorigenesis in APC^{Min} mice fed suboptimal levels of sulindac[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54: 9322-9328.
[9] BORKOWSKI T, SZYMUSIAK H, GLISZCZYNSKA-SWIGLO A, et al. Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(14): 5526-5534.
[10] ZHENG N, BUCHELI P, JING H. Effects of casein-and whey protein-dextran conjugates on the stability of bog bilberry anthocyanin extract[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2009, 44: 1452-1458.
[11] BETZ M, KULOZIK U. Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels[J]. International Dairy Journal, 2011, 21: 703-710.
[12] OIDTMANN J, SCHANTZ M, MADER K, et al. Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encpsulation systems[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2011. DOI:10.1021/jf2047515. Publication Date (Web): 19 Dec 2011.
[13] TIAN J, ZHAO Y, LIU X, et al. A steady-state and time-resolved fluorescence,circular dichroism study on the binding of myricetin to bovine serum albumin[J]. Luminescence, 2009, 24: 386-393.
[14] CHEN C, MA M, ZHANG J, et al. Spectroscopic investigation of the interaction of bovine serum albumin with a novel cardiac agent V-09 [J]. Spectroscopy, 2008, 22(1): 43-50.
[15] GONG A, ZHU X, HU Y, et al. A fluorescence spectroscopic study of the interaction between episteride and bovine serum albumin and its analytical application[J]. Talanta, 2007, 73(4): 668-673.
[16] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102.
[17] KALYAN S G, BIJAYA K S, SWAGATA D. Spectrophotometric studies on the interaction between (-)-epigallocatechin gallate and lysozyme[J]. Chemical Physics Letters, 2008, 452(1/3): 193-197.
[18] 由建裘, 谢余寰, 赵彦春, 等. 光谱法研究迷迭香酸和牛血清白蛋白的相互作用[J]. 化学试剂, 2010, 32(4): 311-314.