

doi: 10.3788/gzxb20154410.1030004

依巴斯汀与牛血清蛋白相互作用的荧光光谱研究

陆从文¹, 兰秀凤¹, 张林², 陈霞¹

(1 南京航空航天大学 理学院, 南京 211106)

(2 河海大学 理学院, 南京 211100)

摘 要:在 PH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 利用荧光光谱研究了在依巴斯汀存在下牛血清蛋白的荧光猝灭特征. 通过实验得到三个温度(298 K, 305 K, 312 K)下的猝灭光谱曲线组, 根据 Stern-Volmer 方程计算各相应温度下的猝灭常数发现: 依巴斯汀对牛血清蛋白的荧光猝灭机制属于静态猝灭. 通过对依巴斯汀-牛血清蛋白体系的热力学参数的计算得出依巴斯汀与牛血清蛋白间的相互作用力类型为疏水作用力. 通过拟合双对数方程计算出在以上三个温度下结合常数分别为 $3.27 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $4.11 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $7.59 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合位点数为 0.98、1.02、1.08. 依据 Förster 非辐射能量转移理论计算出荧光供能体(牛血清蛋白)与受能体(依巴斯汀)之间的结合距离为 2.8 nm, 利用同步荧光光谱及三维荧光光谱技术分析了依巴斯汀对牛血清蛋白构象的影响.

关键词:牛血清蛋白; 依巴斯汀; 荧光光谱; 相互作用; 蛋白质构象

中图分类号: O657.31

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2015)10-1030004-6

Interaction between Ebastine and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy

LU Cong-wen¹, LAN Xiu-feng¹, ZHANG Lin², CHEN Xia¹

(1 Nanjing University of Aeronautics & Astronautics, Nanjing 211106, China)

(2 Hohai University, Nanjing 211100, China)

Abstract: In the Phosphate Buffer Saline buffer solution at PH 7.4, the fluorescence quenching characteristics of Bovine Serum Albumin when Ebastine existed were studied by Fluorescence spectra. After experiments, three quenching spectral curve groups were obtained under corresponding temperatures (298K, 305K, 312K). According to the Stern-Volmer equation, the quenching constants were calculated and then it was concluded: the quenching was belonged to static quenching mechanism. By calculating the thermodynamic parameters of the Ebastine-Bovine Serum Albumin system, it was shown that the binding power between Bovine Serum Albumin and Ebastine was mainly the hydrophobic force. By fitting the double logarithmic equation, the binding constants K_A between Bovine Serum Albumin and Ebastine at three temperatures were obtained to be $3.27 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $4.11 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $7.59 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. The number of binding sites were 0.98, 1.02, 1.08. The binding distance between the donor (Bovine Serum Albumin) and the acceptor (Ebastine) was determined based on the Förster's non-radiation energy transfer theory and it turned out to be 2.8 nm. The effect of Ebastine on the conformation of Bovine Serum Albumin was analysed by synchronous fluorescence spectra and three-dimensional fluorescence spectra.

Key words: Bovine serum albumin; Ebastine; Fluorescence spectroscopy; Interaction; Protein conformation

OCIS Codes: 300.6170; 300.6540; 170.0170; 170.6280

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(No. NS2015080)、国家自然科学基金青年基金(No. 61205201)资助

第一作者: 陆从文(1991-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物光信息检测. Email: 478519054@qq.com

导师(通讯作者): 兰秀凤(1976-), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向为生物光信息检测. Email: orchidxf@nuaa.edu.cn

收稿日期: 2015-06-16; 录用日期: 2015-07-27

0 引言

血清蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质,人血清蛋白(Human Serum Albumin, HSA)在人体血液中有运输储藏各种氨基酸、脂肪酸及金属离子的作用.牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)有着与 HSA 相似的结构及性质,而价格上要经济很多,被广泛运用于替代 HSA 的生化研究中.

研究各种小分子、离子与血清蛋白相互作用这一方向涉及物理学、化学、生命科学等多个学科,因此近些年来研究人员对这一领域的研究从未间断,实验方法及理论均在逐步完善.1949年,Scatchard^[1]提出了用于计算小分子配体与生物大分子相互作用的结合常数和结合位点数的模型.1971年,Lloyd^[2]提出将同步荧光光谱用于研究荧光功能团附近微环境的变化.2010年,Matei等^[3]采用稳态荧光光谱技术、同步荧光光谱和圆二色谱技术研究了人血清白蛋白和山奈酚的相互作用.2014年,胡晓熙等^[4]通过荧光光谱、紫外可见吸收光谱研究了含铈稀土荧光聚合物与牛血清蛋白的相互作用机理.

依巴斯汀(Ebastine, Ebast)是一种强效、长效、高选择的组胺 H1 受体阻断剂^[5],并且对中枢神经系统的胆碱能受体没有拮抗作用,可有效治疗过敏性鼻炎及慢性荨麻疹.已有药代动力学研究表明服用 Ebast 2~4 h后血药浓度达到峰值, Ebast 与蛋白高度结合.然而深入研究 Ebast 与血清蛋白之间具体结合特征的文章尚未见报道.本文分别测量了荧光淬灭光谱、同步荧光光谱、三维荧光光谱,辅以紫外可见吸收光谱,从不同角度研究了 Ebast 与 BSA 相互作用的荧光光谱特征,在分子水平上提供了一些可供参考的数据,对理解 Ebast 的药理毒理有一定参考价值.

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

实验仪器为:LS-55 荧光磷光分光光度计(美国 PE 公司),UV-2600 紫外分光光度计(日本岛津公司),FA-2004 万分之一天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),10 μL 、100 μL 、1 000 μL 微量移液器(德国 Eppendorf 公司).

实验试剂为:牛血清蛋白(98%, Sigma 公司),依巴斯汀(西班牙 Almirall 公司),PBS(磷酸二氢钠)、无水乙醇、氯化钠均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水.

1.2 实验方法

1.2.1 荧光淬灭光谱测定

设置光电倍增管电压为 760 V,入射狭缝宽度为 5 nm,出射光狭缝宽度为 5 nm,激发波长为 285 nm,扫

描范围为 250 nm~450 nm,扫描速度为 300 nm/min.

取 34 mg 牛血清蛋白结晶加入 25 mL PBS (Phosphate Buffer Saline)缓冲液配置 2×10^{-5} mol/L 储备液(BSA 分子质量以 68000 计算),称取 25 mg Ebast,先加入 1 mL 无水乙醇待 Ebast 充分溶解加缓冲液定容至 Ebast 浓度为 1.5×10^{-3} mol/L.依次向 2×10^{-6} mol/L 的 BSA 溶液中加入 5 μL Ebast 缓冲液并分别在 298 K, 305 K, 312 K 温度下测量激发波长在 285 nm 的荧光发射光谱.所选取的实验温度须保证牛血清蛋白活性,还需维持体系的 PH 值,用氯化钠维持体系离子强度,模拟人体生理环境进行实验.

1.2.2 同步荧光光谱测定

设定激发波长起始波长为 250 nm,扫描间隔为 2 nm,298 K 温度下分别测定 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm 时的同步荧光光谱.

1.2.3 三维荧光光谱测定

设定激发波长起始波长 200 nm,发射波长扫描范围 200~450 nm,扫描条数 30,扫描间隔 5 nm,扫描速度 300 nm/min.

2 实验结果与讨论

2.1 荧光淬灭机制的确定

蛋白质中含有诸多种类的氨基酸残基,其中色氨酸、酪氨酸使得蛋白质具有很强的内源性荧光.小分子与蛋白质分子相互作用时影响氨基酸残基外部微环境就会使荧光强度发生不同程度的减弱,图 1 曲线 1~8 中, $c_{\text{BSA}} = 2 \times 10^{-6}$ mol/L; $c_{\text{Ebast}} (10^{-1}$ mol/L) = 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 可以看出随着依巴斯汀浓度的增加,体系的荧光强度呈现有规律的降低.

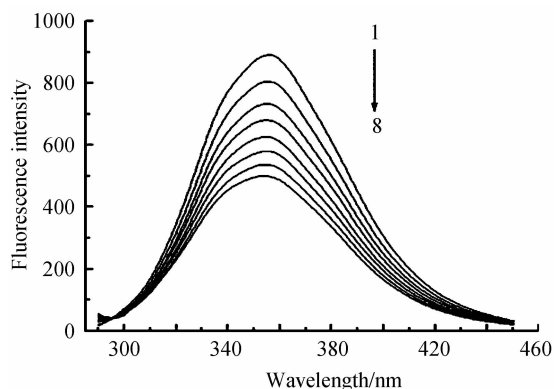


图 1 Ebast-BSA 体系的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of BSA-Ebast system

荧光淬灭机制可分为动态淬灭和静态淬灭^[6],动态淬灭是淬灭剂分子与激发态的荧光分子发生碰撞而导致荧光分子荧光强度降低的现象,而静态淬灭则是因为淬灭剂分子与荧光分子结合形成复合物而导致荧光强度降低.依据 Stern-Volmer 方程

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

式中, F_0 为猝灭剂加入前体系的荧光强度, F 为存在猝灭剂之后体系的荧光强度; K_q 是猝灭过程的速率常数; τ_0 是体系中不存在猝灭剂时荧光物质分子的平均寿命, 对生物大分子而言, $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}^{[7]}$; $[Q]$ 是猝灭剂浓度; K_{sv} 是动态猝灭常数, 是判断荧光猝灭机制的重要参量. 当 K_{sv} 随温度升高而减小时说明 BSA 与猝灭剂形成了复合物, 温度升高导致复合物稳定性降低, 是典型的荧光静态猝灭, 反之若 K_{sv} 随温度升高而增大, 则说明只是由于分子碰撞加剧导致的荧光猝灭, 即猝灭机制是动态猝灭.

由图 2 及表 1 可知, 随着温度的升高, Ebast-BSA 体系的 K_{sv} 逐渐减小; 并且一般猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率^[8] 约为 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 但是表 1 中 K_q 均远远大于这个值, 故可初步判断 Ebast

对 BSA 的荧光猝灭机制为静态猝灭, 而非动态猝灭.

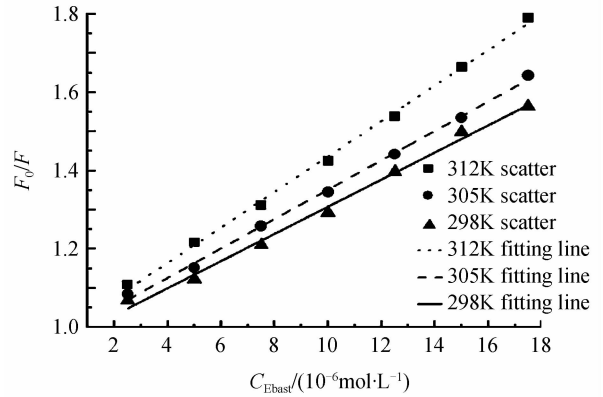


图 2 不同温度下的 Stern-Volmer 曲线
Fig. 2 The plot of Stern-Volmer at different temperatures

表 1 不同温度下 BSA-Ebast 系统的猝灭常数及其拟合方程

Table 1 The quenching constants of BSA-Ebast system and its fitting equation

T(K)	$K_{sv}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	Fitting equation	R^2
298	4.52×10^4	4.52×10^{12}	$F_0/F = 0.98 + 4.52 \times 10^4 C_{\text{Ebast}}$	0.997 4
305	3.75×10^4	3.75×10^{12}	$F_0/F = 0.98 + 3.75 \times 10^4 C_{\text{Ebast}}$	0.997 4
312	3.46×10^4	3.46×10^{12}	$F_0/F = 0.96 + 3.46 \times 10^4 C_{\text{Ebast}}$	0.993 2

2.2 结合常数及结合位点及作用力类型的确定

Stern-Volmer 方程虽然可以很好地判断荧光猝灭机制, 但不能直观地反映分子结合过程中数量上的配比关系. 因此, 需要建立其他模型. 修正后的 Stern-Volmer 方程和 Lineweaver-Burk 双倒数方程在分析分子间相互作用的研究中有着广泛的应用. 但是两者的应用需要满足的条件是: 小分子与生物大分子以 1 : 1

结合. 而实际的情况是生物大分子可能有 n 个与小分子结合的位置, 是以 $n : 1$ 的形式结合. 所以本实验优先选用双对数模型, 即

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

式中, $[Q]$ 是小分子药物的浓度, F, F_0 分别是药物加入前后时体系的荧光强度. 图 3 为 298 K、305 K、312 K 这三个温度下的双对数拟合曲线.

表 2 结合常数和热力学参量

Table 2 The binding constants and the thermodynamic parameters

T/K	$K_A/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	$\Delta H/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
298	3.27×10^4	0.98		-25.77	242.19
305	4.11×10^4	1.02	46.44	-26.95	240.50
312	7.59×10^4	1.08		-29.16	242.19

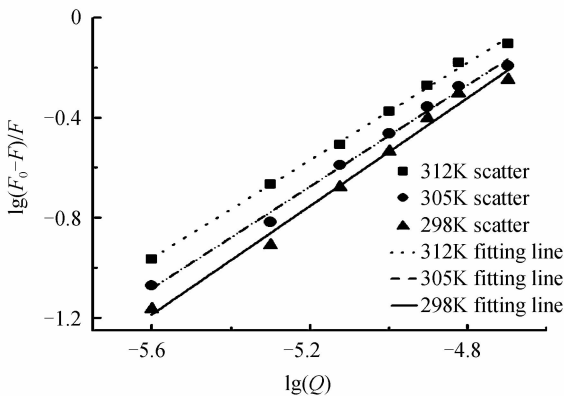


图 3 不同温度下 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 曲线

Fig. 3 The plot of $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log(Q)$ at different temperatures

于 1, 这表明 BSA 与 Ebast 有一类结合位点. BSA 中参与结合的色氨酸残基可能是 Trp-134 或 Trp-212. Trp-134 嵌入亚域 IIB 并且更临近亲水环境, 而 Trp-212 嵌入在亚域 IIA 更临近疏水性环^[9]. 从 n 的值, 可以推断 Ebast 最有可能的结合的位点位于亚域 IIA.

小分子与生物大分子相互作用的作用力主要有氢键、疏水作用力、范德瓦尔斯力、静电作用力. Ross^[10] 等在大量实验的基础上总结了判断小分子药物与生物大分子的作用力性质的热力学规律: 当 $\Delta S > 0, \Delta H > 0$ 时, 结合力为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 时, 结合力为氢键和范德瓦耳斯力; 当 $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 时, 结合力为静电作用力. 由表 2 可以判断 Ebast 与 BSA 的相互作用力为疏水作用力. $\Delta G < 0$, 表明 Ebast 与 BSA 的作用过程是一个熵增加、吉布斯自由能降低的

从表 2 中可以得出 n 值在各个实验温度下均约等

自发过程.

2.3 结合距离的确定

Förster 非辐射能量转移理论^[11]指出,发射荧光的供能体与受能体的距离不超过 7 nm 时会发生非辐射能量转移,导致供能体荧光猝灭.非辐射转移效率 E 、供受体之间的距离 r 、临界能量转移距离 R_0 . 满足关系为

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)} \quad (3)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} (JK^2\Phi n^{-4}) \quad (4)$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad (5)$$

式中, R_0 是能量转移率为 50% 时的临界距离; K^2 为偶极空间的取向因子,数值常取荧光供能体和受体的随机分布平均值 $2/3$ ^[12]; Φ 为蛋白质中色氨酸残基的荧光量子效率,取常数 0.118; n 是介质折射指数,数值常取有机物和水的均值 1.336; J 为药物的吸收光谱与蛋白质的荧光发射光谱之间的重叠积分(图 4 中阴影部分,其中曲线 a 以左侧纵坐标轴为准,表示荧光强度,曲线 b 以右侧纵坐标轴为准,表示淬灭剂的吸光度); $F(\lambda)$ 为荧光供能体(主要为 BSA 色氨酸残基)在波长 λ 处的荧光强度; $\epsilon(\lambda)$ 是受体(小分子药物)在波长 λ 处的摩尔吸光系数. 为求得结合距离首先需要计算重叠面积,采用矩形分割法不同大小的 $\Delta\lambda$ 会影响最终结果,然而只要选取适当的 $\Delta\lambda$ 值,误差仍可控制在允许范围内. 为保证实验的真实性和可重复性,采用实验中的采样间隔 $\Delta\lambda = 0.5 \text{ nm}$ 计算重叠积分 J . 经计算重叠积分 $J = 1.20479 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合距离 $r = 2.8 \text{ nm}$.

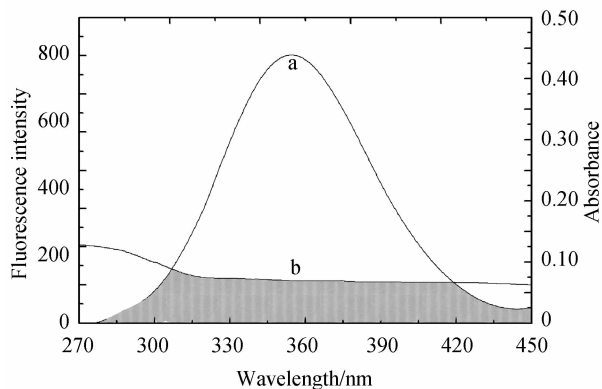


图 4 BSA 的荧光发射光谱

Fig. 4 The fluorescence spectrum of BSA and the absorption spectrum of Ebast where $c_{\text{BSA}} = c_{\text{Ebast}} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

2.4 同步荧光光谱研究 Ebast 对 BSA 构象的影响

同步荧光光谱具有灵敏度高、光谱简单、光谱窄、光谱重叠少等特点,可以反映荧光基团外部微环境变化特征. $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时同步荧光光谱图能够反映酪氨酸残基光谱特征; $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时同步荧光光谱能够反

映色氨酸残基光谱特征^[13].

图 5 给出了 Ebast 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱,其中,曲线 1~11 中: $c_{\text{BSA}} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c_{\text{Ebast}} (10^{-6} \text{ mol/L}) = 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25$. 由图 5 (a) 可以看出随着 Ebast 浓度增加, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱峰值不断减小,但是峰位位置并未移动;而 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱图 5 (b) 峰位位置发生了明显的红移,红移量约为 5nm. 这表明 Ebast 没有影响酪氨酸残基附近的微环境,而对色氨酸残基附近微环境产生影响. 而 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱峰位红移则说明 Ebast 使 BSA 色氨酸残基附近疏水腔内疏水环境的极性增大,并且使得肽链的伸展程度有所增加^[14].

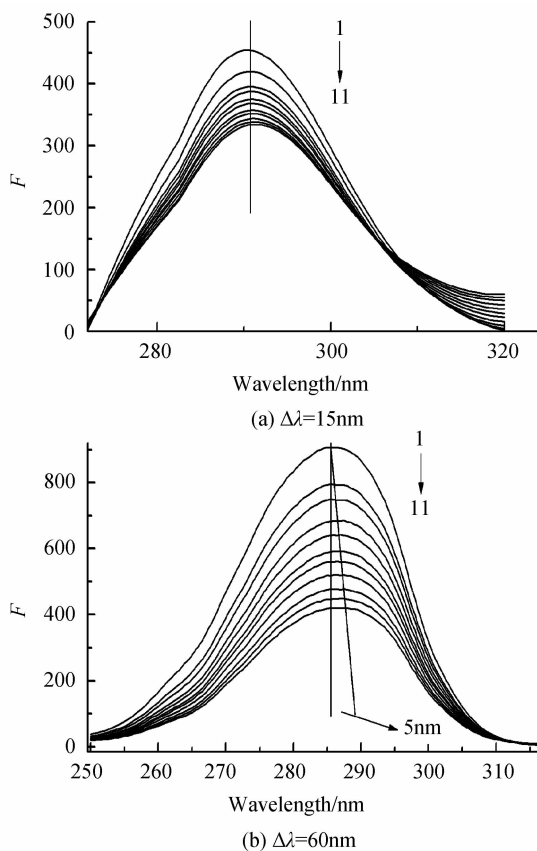


图 5 同步荧光光谱

Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra

2.5 三维荧光光谱研究 Ebast 对 BSA 的荧光猝灭作用

三维荧光光谱技术是将激发波长,荧光发射波长,荧光强度以三维的形式一一对应地显示在光谱图中. 三维荧光光谱不仅包含有一般意义上的荧光光谱(荧光发射光谱)的全部信息,而且包含了不同发射波长下的全部荧光激发光谱. 因此,三维荧光光谱较普通意义的二维荧光光谱信息更加完整、特征峰更加明显、数据可选择性强等优点.

依照实验方法,测得了 Ebast-BSA 体系的三维荧光光谱(如图 6(a)、(b)所示)并绘制出了该体系荧光强

度三维等高线图(如图 6(c)、(d)所示)的变化。图 6(a)及 6(b)中激发波长 λ_{ex} 处于 230 nm 位置的 peak2 是由于蛋白质中多肽链 C=O 结构的 $\pi-\pi^*$ 跃迁^[15],而 285 nm 处的 peak1 是 BSA 中色氨酸残基的荧光光谱特征。当 $\lambda_{em} = \lambda_{ex}$ 时三维荧光光谱图中两个“驼峰”旁高耸的尖峰是瑞利散射峰,它对应着图 6(c)及 6(d)中类

似铅笔形状的两条黑线。从 BSA 体系及 Ebast-BSA 体系的对比可以看出瑞利散射峰有着明显的升高,而 peak1 和 peak2 的峰值却呈现明显的降低,经计算 peak1 降低了 26.7%,peak2 降低了 24.6%,两者降低的程度相当。

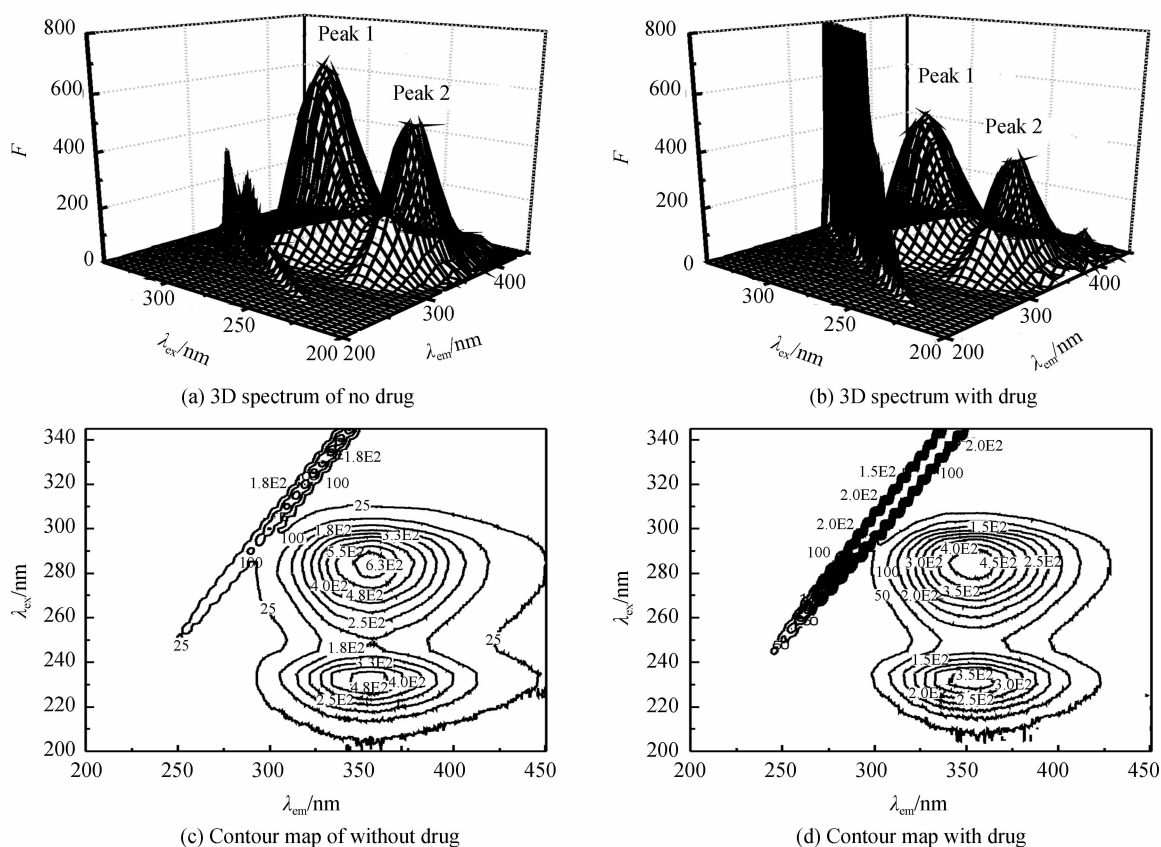


图 6 三维荧光光谱图及三维荧光等高线图

Fig. 6 Three-dimensional fluorescence spectra and the contour map of three-dimensional fluorescence

3 结论

利用荧光光谱技术实现了对 Ebast-BSA 系统相互作用机制、作用力类型的定性分析,研究结果表明 Ebast 对 BSA 的荧光猝灭机制为静态猝灭,两者的结合作用力为典型的疏水作用力,同步荧光光谱显示 Ebast 使 BSA 色氨酸残基所处微环境发生变化。依据双对数模型定量计算出不同温度下的结合位点以及结合常数,根据 Förster 非辐射能量转移理论计算出结合距离为 2.8 nm。

参考文献

[1] SCATCHARD G. The attractions of proteins for small molecules and ions[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1949, **51**(5): 660-672.
 [2] LLOYD J B F. Synchronized excitation of fluorescence emission spectra[J]. *Nature Physical Science*, 1971, **231**: 64-65.
 [3] MATEI I, HILLEBRAND M. Interaction of kaempferol with human serum albumin; A fluorescence and circular dichroism

study [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, **51**(3): 768-773.

[4] HU Xiao-xi, WANG Yun. Spectroscopic study on mechanism of interaction between rare earth fluorescent copolymer and protein[J]. *Materials Review*, 2014, **28**(2): 19-22.
 胡晓熙, 王芸. 稀土荧光共聚物与蛋白质作用机理的光谱研究[J]. *材料导报*, 2014, **28**(2): 19-22.
 [5] LIN Qiong, YANG Wei-feng, CHEN Shuang. Improved determination method of related substances in ebastine and ebastine tablets[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2015, **32**(4): 489-492.
 林琼, 杨伟峰, 陈爽. 依巴斯汀原料药及其片剂有关物质测定方法的改进[J]. *中国现代应用药学*, 2015, **32**(4): 489-492.
 [6] ANGER P, BHARADWAJ P, NOVOTNY L. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence[J]. *Physical Review Letters*, 2006, **96**(11): 113002.
 [7] WANG Qi-sui, ZHANG-Xiao-lei, ZHOU Xiao-lan, et al. Interaction of different thiol-capped CdTe quantum dots with bovine serum albumin[J]. *Journal of Luminescence*, 2012, **132**(7): 1695-1700.
 [8] TAO Hui-lin, LI Shu-huai, XU Ming-ze, et al. Study on the interaction of kaempferide with bovine serum albumin;

- comparison of tachiya model and stern-volmer equation[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2013, **32**(2): 186-192.
- 陶慧林, 黎舒怀, 徐铭泽, 等. 山奈素与牛血清蛋白相互作用: Tachiya 模型与 Stern-Volmer 方程的对比研究[J]. 分析测试学报, 2013, **32**(2): 186-192.
- [9] SULKOWSKI A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2002, **614**(1): 227-232.
- [10] ROSS D P, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions; forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, **20**(11): 3096-3102.
- [11] FÖRSTER T, SINAOGLU O. Modern quantum chemistry [M]. New York: Academic press, 1996: 93.
- [12] QU Ling-bo, BAI Xi-xi, RAN Yu, *et al.* Spectroscopic comparison of the interactions of camptothecin with lysozyme and catalase[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, **31**(6): 644-650.
- 屈凌波, 白希希, 冉瑜, 等. 光谱法比较喜树碱与溶菌酶、过氧化氢酶的相互作用[J]. 分析测试学报, 2012, **31**(6): 644-650.
- [13] GONGDON R W, MUTH G W, SPLITTGERBER A G. The binding interaction of coomassie blue with proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 1993, **213**(2): 407-413.
- [14] CHENG Z J, ZHANG Y T. Spectroscopic investigation on interaction of the bioactive component dl-tetrahydropalmatine to bovine serum albumin [J]. *Journal of Molecular Structure-theochem*, 2008, **876**(1): 308-312.
- [15] HU Xiao-li, SHU-Ya, LIU Jia-qin. Fluorescence studies of interaction between flavonol p-coumaroylglucoside tiliroside and bovine serum albumin[J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2010, **77**(2): 533-548.