

## 研究报告

## 基于毛细管电泳的双酚E与血清白蛋白行为成像

贺木易<sup>1</sup>, 边煜<sup>1,2</sup>, 杨敏莉<sup>1</sup>, 凌云<sup>1</sup>, 刘通<sup>1</sup>, 张峰<sup>1</sup>

(1. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所, 北京 100176; 2. 中国医科大学药学院, 辽宁 沈阳 110122)

**摘要:** **目的** 建立双酚E(BPE)与血清白蛋白相互作用快速评价方法,为双酚类化合物毒理效应研究提供有益参考。**方法** 使用毛细管电泳仪,应用外标 Hummel-Dreyer(HD)法,测定了体外环境中 BPE 与血清白蛋白相互作用电泳图。采用非线性方程、Scatchard 方程和 Klotz 方程三种函数形式分析实验数据,获得体系的相互作用参数。**结果** 三种不同函数形式所得到的拟合参数具有较高的一致性。BPE 与血清白蛋白结合比约为 2,相互作用参数表明牛血清白蛋白及人血清白蛋白的结合反应存在相似的结合位点数,且结合稳定。不同白蛋白与 BPE 的相互作用相似,均为非共价相互作用。**结论** 外标 HD 法作为一种简便有效的方法可以快速评价蛋白质-污染物相互作用相关问题。BPE 与不同血清白蛋白具有相似的温和相互作用,这提示双酚类化合物在人体中和牛中可能具有类似的污染分布规律。

**关键词:** 毛细管电泳; 双酚E; 血清白蛋白; 相互作用

**中图分类号:** R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2022)04-0637-06

**DOI:** 10.13590/j.cjfh.2022.04.001

### Rapid evaluation of the interaction between bisphenol E and serum albumin by capillary electrophoresis

HE Muyi<sup>1</sup>, BIAN Yu<sup>1,2</sup>, YANG Minli<sup>1</sup>, LING Yun<sup>1</sup>, LIU Tong<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;

2. School of Pharmacy, China Medical University, Liaoning Shenyang 110122, China)

**Abstract: Objective** The interaction between bisphenol E(BPE) and serum albumin was analyzed to provide a useful reference for the rapid evaluation of the toxicological effect of bisphenols. **Methods** Electropherograms of serum albumin with BPE under physiological conditions *in vitro* were determined using external calibration Hummel-Dreyer (HD) method by capillary electrophoresis. To obtain the interaction parameters, the experimental data were analyzed by three functional forms: Nonlinear equation, Scatchard equation and Klotz equation. **Results** Three form functions were fitted with the interaction parameters. The binding ratio of BPE and serum albumin was about 2. The interaction parameters showed that two kinds of serum albumin had the same number of binding sites, and the binding between different albumin and BPE were both non-covalent interactions. **Conclusion** As a simple and effective method, external calibration HD method could be used to analyze the protein pollutant interaction in the food safety field. BPE showed similar moderate interaction with different serum albumin, which suggested that bisphenol compounds had similar pollution distribution regularity in human body and cattle.

**Key words:** Capillary electrophoresis; bisphenol E; serum albumin; interaction

环境内分泌干扰物可以通过多种途径,如污染水源、食物或透皮吸收进入机体,干扰内分泌激素的合成、释放和转运等生理过程,进而影响内分泌

系统功能,破坏人体内环境的协调和稳定<sup>[1]</sup>。双酚类物质(如双酚 A、双酚 E、双酚 F、壬基酚等)是环境内分泌干扰物中的典型代表,广泛存在于日常生活中,严重影响人及野生动物的健康和安全<sup>[2]</sup>,因此近年来受到了越来越多的关注。

作为双酚化合物中的典型代表,双酚 E (Bisphenol E, BPE)是一种常见的化工原料,是生产聚碳酸酯塑料和环氧树脂的单体。BPE 分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>,分子结构见图 1 所示。有文献表明,BPE 对大型水蚤的半最大效应浓度(EC<sub>50</sub>)为 18 mg/L

收稿日期:2022-02-11

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1603500);中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2020JK003)

作者简介:贺木易 男 助理研究员 研究方向为分析化学

E-mail: muyihemoe@163.com

通信作者:张峰 男 研究员 研究方向为食品安全

E-mail: fengzhang@126.com

(48 h),其急性毒性和雌激素活性与双酚 A(Bisphenol A, BPA)相当<sup>[3]</sup>。快速评价污染物毒性效应,对于食品安全监管至关重要。BPE 的结构类似物进入人体后会通过血液传输,并作用于特定靶器官产生毒性<sup>[4]</sup>。因此,研究 BPE 与载体蛋白质分子间相互作用对于了解 BPE 的体内分布过程与生物毒性具有重要意义。此外,研究小分子与蛋白质之间的相互作用对于双酚类或结构类似物的毒理学研究具有参考价值。

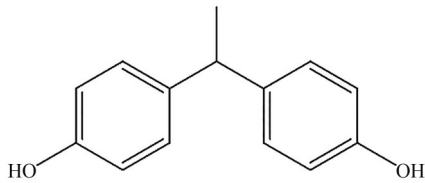


图1 4,4'-亚乙基双苯酚(双酚E)分子结构式

Figure 1 Structure formula of 4,4'- ethylidenebisphenol

作为研究最广泛的一类模式蛋白质,血清白蛋白是循环系统中含量最丰富的蛋白质之一。血清白蛋白可以作为内源性和外源性物质的运输载体,其与药物相互作用的研究将有助于更好地了解药物在体内的吸收和分布过程<sup>[5]</sup>。人血清白蛋白(Human serum albumins, HSA)和牛血清白蛋白(Bovine serum albumins, BSA)是同源蛋白,其差异在于 HSA 只含有一个色氨酸(Trp-214)残基,而 BSA 包含有两个色氨酸残基(Trp-212 和 Trp-134)<sup>[6]</sup>。血清白蛋白与各类小分子之间的相互作用已经被广泛研究<sup>[7-8]</sup>,但应用毛细管电泳技术研究双酚类物质与白蛋白的相互作用尚未被报道。作为一种简便、高效、低成本的分析技术,毛细管电泳对于生物大分子的研究具有较高优势。

本文采用外标 Hummel-Dreyer(HD)毛细管电泳法研究了血清白蛋白(BSA/HSA)与 BPE 的相互作用,得到了 BPE 与 BSA/HSA 的结合参数并进行比较。实验结果可为 BPE 的生物毒性作用机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与材料

CESI 8000 Plus 毛细管电泳仪(AB SCIEX 公司,美国),XP105 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),未涂层熔融石英毛细管柱(60 cm×50 μm,有效长度 50 cm,Polymicro Technologies,美国),数控超声清洗器(KQ-500DE,昆山市超声仪器有限公司),Eppendorf 移液器(德国艾本德公司),雷磁 PHS-3C 型 pH 计(上海仪电科学仪器有限公司),默克 Milli-Q 纯水仪,津腾微孔滤膜(0.22 μm)。

BSA(≥98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, 美国), HSA(≥90%, Sigma-Aldrich, St. Louis, 美国), BPE(>98%, Tokyo Chemical Industry, 日本), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O(≥99%, 广东西陇化工有限公司), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O(≥99%, 国药集团化学试剂有限公司),蒸馏水,甲醇(色谱纯, MeOH, Thermo Fisher Scientific)。

### 1.2 CE 运行缓冲液及样品溶液的配制

用蒸馏水配制 0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 溶液(A)和 0.2 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 溶液(B),取 40.5 mL 溶液 A 与 9.5 mL 溶液 B 定容于 500 mL 容量瓶中,即配成 pH=7.4 的 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液。

称取 0.2143 g BPE,溶解于甲醇中,获得 1 mol/L BPE 母液。准确移取不同体积的 BPE 母液,用 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液稀释至所需浓度(1×10<sup>-5</sup>, 2×10<sup>-5</sup>, 4×10<sup>-5</sup>, 6×10<sup>-5</sup>, 8×10<sup>-5</sup>, 10×10<sup>-5</sup>, 20×10<sup>-5</sup> mol/L),即配成不同浓度的运行缓冲液,将缓冲液用微孔滤膜过滤,并超声脱气 5 min 备用。

以 pH=7.4 的磷酸缓冲液配制 1×10<sup>-5</sup> mol/L BSA 和 1×10<sup>-5</sup> mol/L HSA 溶液,用微孔滤膜过滤溶液,并超声脱气 1 min 备用。

### 1.3 BPE-BSA/HSA 相互作用分析方法的建立

实验前用 1 mol/L 的 NaOH 溶液活化毛细管 60 min。在每次运行测定程序前,用 0.1 mol/L NaOH 及蒸馏水,运行缓冲液分别冲洗毛细管 3 min。在给定 BPE 浓度条件下分两次进样,一次血清白蛋白样品,一次为空白磷酸盐缓冲液,根据两次进样所得的实验数据来分析 BPE 与 BSA/HSA 的相互作用。以含有不同浓度的 BPE(1×10<sup>-5</sup>, 2×10<sup>-5</sup>, 4×10<sup>-5</sup>, 6×10<sup>-5</sup>, 8×10<sup>-5</sup>, 10×10<sup>-5</sup>, 20×10<sup>-5</sup> mol/L)为背景电解质,以空白磷酸缓冲液为空白测试样,以仅含 BSA/HSA(1×10<sup>-5</sup> mol/L)的磷酸缓冲液为样品进样,进行外标 HD 方法测试。电泳条件:柱温, 25 °C;压力进样, 0.5 psi, 5 s;分离电压, 25 kV;分离时间, 10 min;检测波长, 214 nm。

## 2 结果

### 2.1 Hummel-Dreyer 法<sup>[9]</sup>分析原理简述

毛细管电泳技术研究 BSA/HSA 与 BPE 分子相互作用时,假设 BPE 与血清白蛋白的结合作用是非共价结合,且是可逆平衡过程,即:



式中:P 代表 BSA/HSA, D 代表 BPE, D<sub>n</sub>P 为 BSA/HSA-BPE 复合物。

为测定生物分子与配体相互作用结合常数,采用经过改进的 HD 法<sup>[10-13]</sup>。外标 HD 法通常采用含有一定浓度的配体作为运行缓冲液,样品为空白缓

冲液中含量已知的蛋白质。进样后,相互作用并快速达到平衡的蛋白质分子将带走缓冲液中已结合的配体分子,导致该段缓冲液中局部配体浓度减小,即为未结合配体(或称游离配体)。在电泳分离后,性质差异较大的组分得到分离,如果以配体浓度作为检测信号,游离蛋白质以及结合配体复合物将表现为一个正峰,而局部配体浓度减小的缓冲液表现为负峰,此过程如图 2 所示。通常情况下,结合配体复合物所代表的正峰和负峰的面积相等,本文测量负峰面积用于计算配体对蛋白的结合参数。

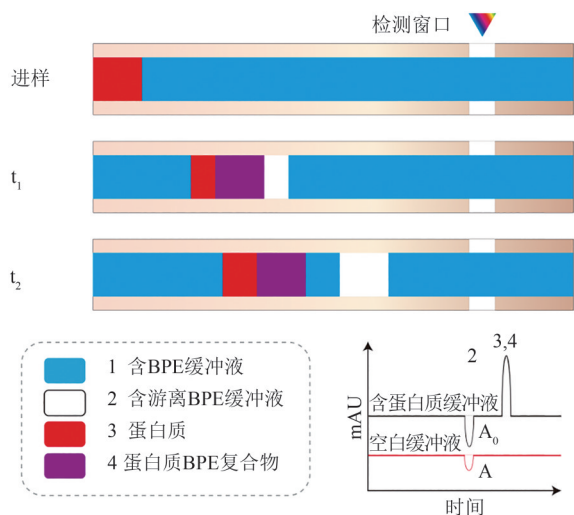


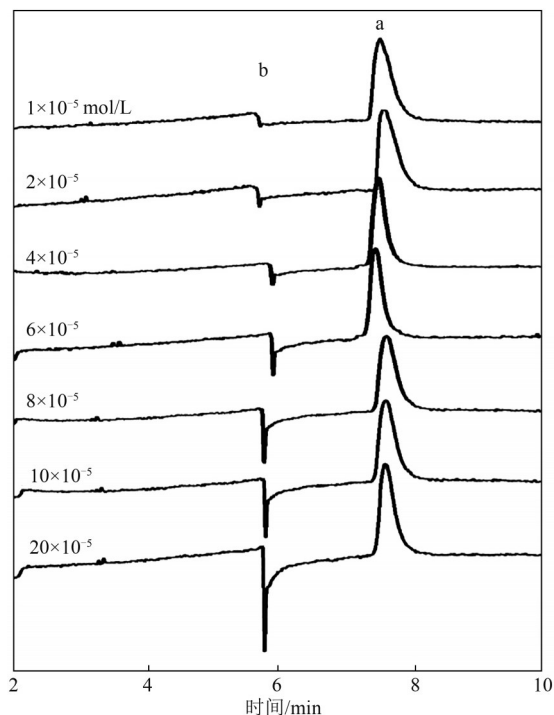
图 2 外标 HD 法分析相互作用原理图

Figure 2 Schematic diagram of interaction analysis by external calibration Hummel-Dreyer method

由于在整个电泳过程中,配体的浓度保持不变,蛋白结合配体的量为一定常数,所以这种方法是一种比较准确地测定平衡条件下生物大分子-配体结合参数的方法,特别是对于亲和性较小的相互作用体系,较其他方法准确。该方法的另一个优点是其所需要的蛋白样品量较小,这使得某些难于获得的生物样品相互作用分析成为可能。另一方面,由于需要配制一系列含不同浓度配体的运行缓冲液,此方法的工作量较大。在一些情况下,由于蛋白质与其复合物常常难以实现基线分离,采用正峰响应强度进行计算可能影响分析的准确性,故通常采用负峰计算。配体在大分子上的结合量随着缓冲液中配体浓度的增加而增大,直至达到饱和,即最大结合容量,此时配体浓度增加不再影响配体的结合量。

### 2.2 BPE与血清白蛋白相互作用电泳分析

用外标 HD 法对 BPE 与 BSA 相互作用进行分析,电泳结果见图 3。图 3 中出现 2 个峰,分别为 a 峰和 b 峰。a 峰是 BSA 和 BPE-BSA 复合物的紫外



注:a:BSA及其复合物;b:BPE

图 3 外标 HD 法分析双酚 E 与 BSA 相互作用电泳图

Figure 3 Electropherograms of BSA with bisphenol E using external calibration Hummel-Dreyer method

吸收峰,为正峰,随着 BPE 浓度的增大,a 峰呈上升趋势,说明 BPE 与 BSA 发生了结合,形成了复合物。b 峰为 BPE 的紫外吸收峰,为负峰,随着结合配基浓度的增大,b 峰的紫外吸收逐渐下降。BPE 出峰在 BSA 出峰的前面,这是因为在本实验条件下,BPE、BSA 和 BPE-BSA 复合物溶质分子都带负电荷,其电泳方向与电渗方向相反。由于电渗速率大于溶质电泳速度,且 BPE 的荷质比小于 BSA 与 BSA-BPE 复合物的荷质比,受到电泳作用小,故 BPE 的迁移速率大于 BSA 与 BPE-BSA 复合物,出峰于 BSA 以及复合物之前。另一方面,由于 BSA 与 BPE-BSA 复合物的荷质比相近,在目前实验条件下无法实现基线分离,所以会出现一个展宽的正峰。负峰 b 为溶液区段中 BPE 浓度低于背景缓冲液中 BPE 浓度的部分,即为结合 BPE。用相同条件外标 HD 法对 BPE 与 HSA 相互作用进行分析,电泳结果见图 4,其结果与 BSA 电泳现象相似。

### 2.3 相互作用结合参数分析

以不含白蛋白的缓冲液为样品,以一系列不同浓度( $2 \times 10^{-5} \sim 20 \times 10^{-5}$  mol/L)的 BPE 标准品缓冲液为运行缓冲液,在相同条件下电泳,得到无相互作用时 BPE 标准品电泳图,以峰面积响应强度对浓度进行线性回归,得到良好的线性关系。拟合方程为  $y=122x-21.993$ ,  $R^2$  数值为 0.9926,表明方法的可靠性较好(图 5)。

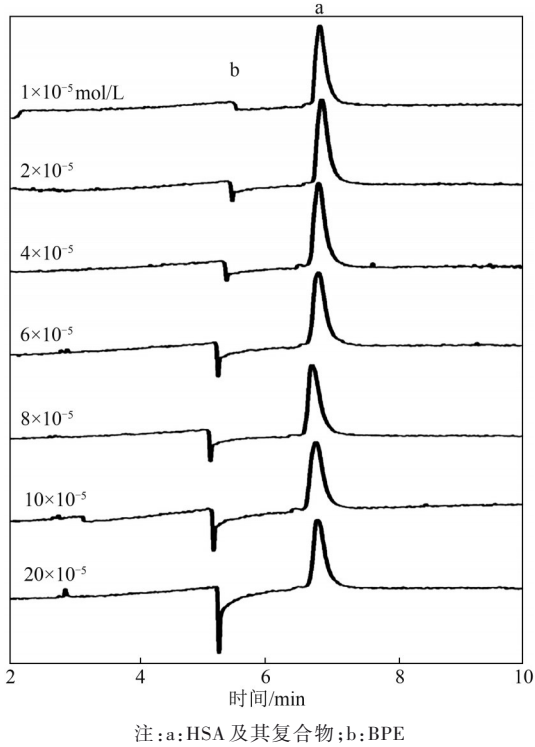


图4 外标HD法分析双酚E与HSA相互作用电泳图  
Figure 4 Electropherograms of HSA with bisphenol E using external calibration Hummel-Dreyer method

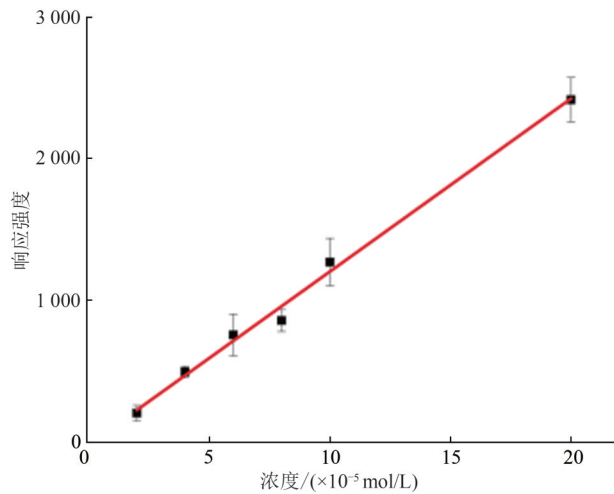


图5 无蛋白质进样电泳峰面积校正拟合曲线  
Figure 5 Linear fitting curve of peak intensity without protein interaction

假设蛋白质与配体分子的结合是理想状态,其平衡关系可以用如下多级平衡方程式表示:

表1 不同方程形式拟合BSA/HSA与BPE的相互作用参数

Table 1 Fitting parameters of BSA/HSA with BPE by different equations

蛋白质	方程形式	$K/(L/mol)$	$n$	拟合结果	$R^2$
BSA	非线性方程	25 781.526	3.23	$y=83\ 302.69x/(1+25\ 781.526x)$	0.829
	Scatchard方程	12 483.841	4.42	$y=-12\ 483.841x+55\ 237.237$	0.425
	Klotz方程	12 853.561	4.34	$y=1/4.335\ 37+x/55\ 724.945$	0.952
HSA	非线性方程	13 919.336	4.31	$y=60\ 040.22x/(1+13\ 919.336x)$	0.897
	Scatchard方程	10 513.425	5.02	$y=-10\ 513.425x+52\ 740.840$	0.441
	Klotz方程	15 474.148	3.96	$y=1/3.961\ 95+x/61\ 307.8$	0.840

注:非线性方程, $y:R, x:C_f$ ; Scatchard方程, $y:R/C_f, x:R$ ; Klotz方程, $y:1/R, x:1/C_f$

$$R = \frac{C_b}{C_p} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i C_f}{1 + K_i C_f} \quad (2)$$

式中: $R$ 可定义为结合比, $C_b$ 是结合小分子浓度, $C_p$ 是蛋白质浓度, $m$ 为结合位点总类数, $n_i$ 为第*i*类位点数, $K_i$ 为第*i*类位点的结合常数, $C_f$ 是游离小分子浓度。

在外标HD方法中结合配体浓度 $C_b$ 和结合比 $R$ 可由峰面积或峰高经过校正求算(原理见图2)。

$$C_b = \frac{A_0 - A}{A} C_{\text{buffer}} \quad (3)$$

式中, $A_0$ 为以蛋白质进样时负峰b响应值, $A$ 为以空白缓冲液进样时负峰b响应值。

经过计算,不同BPE浓度下测得 $R$ 数值绘制于图6a中,不同BSA浓度下均值为 $1.97 \pm 0.66$ ,不同HSA浓度下均值为 $2.06 \pm 0.82$ 。 $R$ 数值在2上下浮动,可认为此溶液条件下,体系结合比约为2,此结果与一些气相分子间相互作用数据相一致<sup>[14]</sup>。

测得实验数据可进一步通过拟合,得到BPE-BSA相互作用的结合参数。分别采用非线性方程,Scatchard方程和Klotz方程三种形式拟合实验数据。 $C_f$ 与 $R$ 呈非线性关系,若小分子与所有结合位点的亲和力相同( $m=1$ ),式(2)可变形为 $C_f$ 与 $R$ 的非线性方程:

$$R = \frac{C_f}{\frac{1}{nK_B} + \frac{C_f}{n}} \quad (4)$$

可将式(4)简化为 $R$ 与 $R/C_f$ 的线性方程:

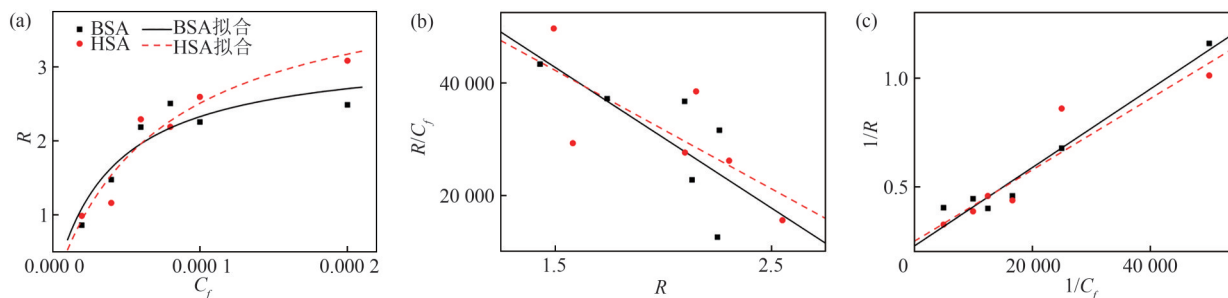
$$\frac{R}{C_f} = -K_B R + nK_B \quad (5)$$

式(5)是Scatchard方程形式<sup>[15]</sup>。根据斜率和截距即可直接求出结合常数 $K_B$ 和结合位点数 $n$ 。Klotz提出了相互作用的Klotz线性方程式<sup>[16]</sup>:

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nK_B C_f} \quad (6)$$

分别采用上面3种不同方程式拟合实验数据,求得 $K$ 和 $n$ ,结果列于表1中,将测量数据与三种方程式拟合曲线进行比较,绘制于图6中。经过对比拟合结果发现式(4)和式(6)的拟合优度高于式(5)的拟合优度。





注:(a)非线性方程;(b)Scatchard方程;(c)Klotz方程

图6 数据拟合结果

Figure 6 The results of data fitting

非线性方程形式是在原始表达式基础上经过简化得到的一种函数形式,分别对  $R$  与  $C_f$  进行拟合,其中只有  $R$  为测量值。这种形式虽然复杂,但对原始数据的处理过程较少,计算引入的误差较小,拟合优度较高。如图 6(a)所示,拟合得到的曲线物理意义明确且较为直观。在低浓度时,两种蛋白质的结合比  $R$  较为一致,随着浓度提高,结合差异逐渐显现,结合表 1 可知,最终的  $n$  拟合结果相差 1。这种差异可能是函数本身的复杂形式所引起的拟合误差所导致的。

在非线性方程形式基础上经过恒等变形得到的 Scatchard 方程以  $R/C_f$  和  $R$  数值进行拟合,函数具有线性形式,方程形式复杂程度大大降低,这有助于降低拟合过程引入的误差。另一方面, $R/C_f$  和  $R$  都是测定值计算得到的,尤其是  $C_f$  数值很小,除以“小数”将进一步放大由原始数据测量引入的误差。如图 6(b)所示,在此试验中,这种由数据处理导致的波动严重影响了方程的整体拟合优度,但  $K_B$  和  $n$  可以直接读数获得,且数量级与拟合数据相近,因此两种白蛋白的拟合参数结果较为相近。

另一种文献中常用 Klotz 方程形式采用测量值的倒数  $1/R$  和  $1/C_f$  进行拟合,这样可以缓解一部分由数据换算引入的计算误差,但函数形式仍然较为复杂。如图 6c 所示,在试验浓度范围下,拟合数据基本为线性,因此降低了非线性拟合引起的误差,整体的拟合优度较高,同时两种白蛋白拟合参数较为近似。可认为是三种形式中较好的一种,但是此函数拟合曲线物理意义不明确。综上,三种拟合形式各有优劣,在扩展到其他体系研究时,仍需综合考量。

分析表 1 可知,BSA 与 BPE 的结合位点数约为 4,而 HSA 的位点数也约为 4,这种相似性来源于蛋白质氨基酸序列的同源性,表明不同血清白蛋白与 BPE 具有类似的相互作用位点。 $K$  值数量级为  $10^4$  L/mol,说明此反应可以快速达到平衡<sup>[17]</sup>,但 BPE 与血清白蛋白之间存在的结合作用强度较弱。

由于外标 HD 法是 BPE 标准品与蛋白质纯品在毛细管中进行结合反应,理论上适用于快速结合反应。外标 HD 法测得  $K$  值小于其他方法测得  $K$  数值<sup>[18]</sup>,但在同一个数量级,证明 CE 方法具有可靠性。

### 3 结论

本实验用外标 HD 法研究了 BPE 与血清白蛋白的相互作用。采用非线性方程、Scatchard 方程和 Klotz 方程三种函数形式分析实验数据,三种形式各有优劣,但拟合结果相似(结合位点数值相似)。结果表明,BPE 与血清白蛋白结合比约为 2,相互作用参数表明两种血清白蛋白的结合反应存在相同的结合位点数,且结合稳定。BPE 与不同血清白蛋白具有相似的温和相互作用,这提示双酚类化合物在人体中和牛体内可能具有类似的污染分布过程。而外标 HD 方法作为一种简便有效的方法可以快速分析食品安全领域的蛋白质-污染物相互作用相关问题。

### 参考文献

[ 1 ] CUNHA S C, FERNANDES J O. Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS)[J]. *Talanta*, 2010, 83(1): 117-125.

[ 2 ] DIAMANTI-KANDARAKIS E, BOURGUIGNON J P, GIUDICE L C, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement[J]. *Endocrine Reviews*, 2009, 30(4): 293-342.

[ 3 ] CHEN M Y, IKE M, FUJITA M. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols[J]. *Environmental Toxicology*, 2002, 17(1): 80-86.

[ 4 ] COBELLIS L, COLACURCI N, TRABUCCO E, et al. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women[J]. *Biomedical Chromatography*, 2009, 23(11): 1186-1190.

[ 5 ] CUI F L, CUI Y R, LUO H X, et al. Interaction of apt with bsa or hsa[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(18): 2201-2207.

[ 6 ] HAN X L, TIAN F F, GE Y S, et al. Spectroscopic, structural and thermodynamic properties of chlorpyrifos bound to serum

- albumin: A comparative study between BSA and HSA[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012, 109: 1-11.
- [ 8 ] 顾奕, 郭明, 吕达, 等. 毛细管电泳法考察全氟辛酸与人血清白蛋白的相互作用[J]. *色谱*, 2018, 36(1): 69-77.
- GU Y, GUO M, LV D, et al. Investigation on the interaction between pentadecafluorooctanoic acid and human serum albumin by capillary electrophoresis[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2018, 36(1): 69-77.
- [ 9 ] HUMMEL J P, DREYER W J. Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1962, 63(3): 530-532.
- [ 10 ] BERGER G, GIRAULT G. Macromolecule-ligand binding studied by the Hummel and Dreyer method: Current state of the methodology[J]. *Journal of Chromatography B*, 2003, 797(1-2): 51-61.
- [ 11 ] BUSCH M H A, CARELS L B, BOELENS H F M, et al. Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, 777(2): 311-328.
- [ 12 ] KRAAK J C, BUSCH S, POPPE H. Study of protein-drug binding using capillary zone electrophoresis [J]. *Journal of Chromatography A*, 1992, 608(1-2): 257-264.
- [ 13 ] SEBILLE B, THUAUD N, TILLEMENT J P. Study of binding of low-molecular-weight lignd to biological macromolecules by high-performance liquid chromatography: Evaluation of binding parameters for two drugs bound to human serum albumin[J]. *Journal of Chromatography A*, 1978, 167: 159-170.
- [ 14 ] MA Q, BAI H, WANG C, et al. Investigation of noncovalent interactions between hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bovine serum albumin using electrospray ionization mobility-mass spectrometry[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2014, 357: 34-44.
- [ 15 ] SCATCHARD G. The attractions of proteins for small molecules and ions [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1949, 51(4): 660-672.
- [ 16 ] KLOTZ I M, HUNSTON D L. Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites[J]. *Biochemistry*, 1971, 10(16): 3065-3069.
- [ 17 ] HEEGAARD N H H, NISSEN M H, CHEN D D Y. Applications of on-line weak affinity interactions in free solution capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(6): 815-822.
- [ 18 ] YANG H, HUANG Y, LIU J, et al. Binding modes of environmental endocrine disruptors to human serum albumin: insights from STD-NMR, ITC, spectroscopic and molecular docking studies [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11126.