

研究报告

膳食黄酮类化合物与牛血清蛋白的 分子结构亲和力关系

赵金尧^{1,2*}, 任凤莲¹

(1. 中南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410083; 2. 湖南省产商品质量监督检验院, 湖南 长沙 410007)

摘要: 用荧光滴定法研究了食用黄酮类化合物的分子结构及其与牛血清蛋白间的亲和力关系。研究证明食用黄酮类化合物与牛血清蛋白的结合过程在很大程度上受黄酮结构的影响, 类黄酮中羟基的甲基化使其与牛血清蛋白的亲和力增长1~794倍。环A、B、C的羟基化作用对类黄酮与牛血清蛋白的亲和力也有很大影响, 糖基化作用因共轭位置和糖种类的不同而使类黄酮与牛血清蛋白的结合力降低1~2个数量级。C2=C3双键的加氢化作用使结合能力稍有减弱。与非聚合型儿茶酚和邻苯二酚型儿茶酚相比, 聚合儿茶酚和邻苯三酚型儿茶酚与牛血清蛋白的亲和力更强。分配系数升高时, 类黄酮与牛血清蛋白的亲和力增强; 氢键的电子供体和受体数目增多时, 类黄酮与牛血清蛋白的亲和力降低, 表明疏水力是影响其相互结合作用的主要因素。

关键词: 结构亲和力; 黄酮类化合物; 牛血清蛋白; 蛋白结合; 荧光滴定法

中图分类号: O657.3; O629.73 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2012)03-0241-06

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2012.03.001

Molecular Structure-affinity Relationship of Dietary Flavonoids with Bovine Serum Albumin

ZHAO Jin-yao^{1,2*}, REN Feng-lian¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China;

2. Hunan Province Produce Commodity Quality Supervision Testing Institute, Changsha 410007, China)

Abstract: The relationships between molecular structures of dietary flavonoids and their affinities for bovine serum albumin (BSA) were investigated by fluorescence titration analysis. The results indicated that the binding process with BSA was significantly affected by the molecular structures of flavonoids. The methylation of hydroxyl groups in flavonoids could enhance their binding affinities for BSA by 1 to 794 times. Hydroxylation on rings of A, B and C also strongly influenced the affinities for BSA. The glycosylation weakened the affinities for BSA by 1-2 orders of magnitude depending on the conjugation site and the class of sugar moiety. The hydrogenation of the C2=C3 double bond slightly decreased the binding affinities. The galloylated catechins and pyrogallol-type catechins exhibited higher binding affinities for BSA than the non-galloylated catechins and catechol-type catechins, respectively. The affinities for BSA increased with the increase of partition coefficients and decreased with the increase of hydrogen bond donor and acceptor numbers of flavonoids, which suggested that the binding interaction was mainly caused by hydrophobic forces.

Key words: structure-affinity; flavonoids; BSA; protein binding; fluorescence titration

膳食类黄酮化合物是水果、蔬菜、坚果、茶叶等植物性食物中最重要的多酚化合物^[1-3], 此类化合物因其抗氧化特性而广受关注^[4-6]。不同种黄酮类化合物的结构差别在于C环的化学特性和A、B环上的羟基数目与分布情况^[7]。一些黄酮基团如2,3-双键、4-氧基和3-羟基及A环上的5,7-二羟基是具有抗氧化作用的重要基团^[8]。黄酮类化合物上羟基的结构排布以及环A、B上的电子共振对其抗

收稿日期: 2011-09-17; 修回日期: 2011-11-22

* 通讯作者: 赵金尧, 博士, 高级工程师, 研究方向: 生物大分子与天然产物的相互作用, Tel: 13975804874, E-mail: zjy_19721213@yahoo.com.cn

氧化性和生物活性有重要作用^[9]。

近年来,黄酮类化合物与蛋白质的相互作用备受关注^[10-15],但大部分报道主要关注结合的过程及参数,仅少数研究关注分子结构亲和力关系。对黄酮类化合物的结构(如羟基化、糖苷化、甲基化、同分异构化和手性异构化等)及其物理化学性质对黄酮与血浆载体蛋白相互作用影响的研究甚少。如黄酮醇 B 环多羟基对电子共振和转移及其抗氧化能力起重要作用,然而黄酮醇上 B 环羟基对其与血清蛋白作用的影响尚不清楚。又如天然的生物类黄酮多以糖苷形式存在于植物中,在人体内经酶水解成黄酮苷元后才能发挥其药效作用,黄酮苷元比黄酮苷更易被人体吸收。然而黄酮羟基的糖苷化对其与血清蛋白作用的影响尚不清楚。本课题组研究了异黄酮 A 环^[16]、黄酮醇 B 环^[17]羟基化作用的影响以及黄酮类化合物糖化作用对其与牛血清蛋白之间相互作用的关系^[18-19],近期内还对体外环境中黄酮类化合物与人血清蛋白的分子亲和力关系进行了研究^[20-21]。然而,膳食黄酮类化合物的结构与牛血清蛋白的亲和力关系仍不完全明确,以往的研究中将适量的黄酮类化合物溶液与牛血清蛋白混合,在 300.15 K 的环境中温室培养 2 h,并将溶液用于荧光分析。本文采用的荧光滴定法使用痕量注射器,根据比对实验,两种方法所测得的结合常数明显不同。本文对 32 种黄酮类化合物的分子结构及其与牛血清蛋白的亲和力的关系进行了考察。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

JASCO FP-6500 荧光光度计(日本),科尔·帕摩 PHS-3C 型 pH 计。牛血清蛋白(纯度 99%)、7-羟基黄酮(纯度 99.5%)均购自美国西格玛公司。鹰嘴豆芽素 A、染料木黄酮、葛根素、邻苯二酚(化学纯)、表儿茶素(分析纯)、木犀草素(纯度 99.0%)均购自上海阿拉丁试剂有限公司。黄酮、白杨黄素、黄芩素(99.5%)均购自日本 Wako 化学工业公司。山奈素、山奈酚、橘皮素、川陈皮素、杨梅黄素、大豆甙元、黄芩苷、汉黄芩素、山奈苷、高良姜素、染料木甙、表儿茶素、表儿茶素没食子酸、表儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯、鸢尾黄素均购自上海通天公司。黄酮类化合物溶液分别由黄酮类固体溶于甲醇中制得。含 0.10 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲溶液(0.20 mol/L, pH 7.4)用于保持溶液的 pH 值和离子强度。牛血清蛋白溶液(1.0×10^{-5} mol/L)由 Tris-HCl 缓冲溶液制得并储存于冰箱中备用。除特别注明外,其余试剂和溶剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 荧光光谱

在水浴保温下,由瓦里安·克雷/E 型荧光光度计完成荧光分析。将牛血清蛋白样品与黄酮类化合物混合,经 280 nm 波长光激发后,记录 310~450 nm 范围内的荧光。荧光分析实验条件为:石英比色皿(光程 1 cm),狭缝宽度 5 nm,扫速 240 nm/min,激发电压 400 V,每个样品重复扫描 3 次。滴定由手工操作痕量进样器完成。每次滴定均记录 1.0×10^{-5} mol/L 牛血清蛋白的荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 稳定常数及结合位点数

考察了黄酮类化合物与牛血清蛋白相互作用的光谱图,图 1 为山奈素与牛血清蛋白的荧光光谱,其它黄酮类化合物与牛血清蛋白的荧光光谱图变化趋势与此图类似。

由图 1 可见,牛血清蛋白的荧光强度在黄酮类化合物浓度增加的情况下极大地减弱,说明牛血清蛋白与黄酮类化合物发生了结合,其结合的稳定常数可由双对数方程计算获得^[16-21]:

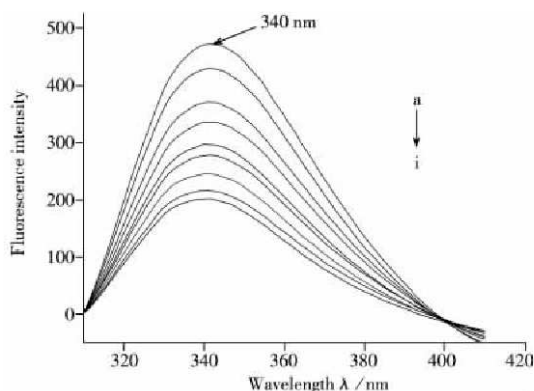


图 1 300.15 K 时山奈素对牛血清蛋白荧光光谱的猝灭效应

Fig. 1 Quenching effect of kaempferol on BSA fluorescence spectra at 300.15 K

$\lambda_{ex} = 280$ nm; concentration of BSA: 10.00 $\mu\text{mol/L}$; concentration of kaempferol (a-i): 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 $\mu\text{mol/L}$

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K_a + n \lg [Q] \tag{1}$$

其中， F_0 和 F 分别代表不含和含有黄酮类化合物时牛血清蛋白的荧光强度， K_a 代表稳定常数， n 代表结合位点数， $[Q]$ 代表黄酮类化合物的浓度。

根据公式(1) 计算得到的结果见表 1。 $\lg K_a$ 的值与结合位点数 n 的数值有良好的线性关系， $n=0.141\ 2\ \lg K_a+0.321\ 7$ ， $r^2=0.980\ 1$ ，因此式(1) 可用于研究黄酮类化合物与牛血清蛋白之间的相互关系^[22-23]。

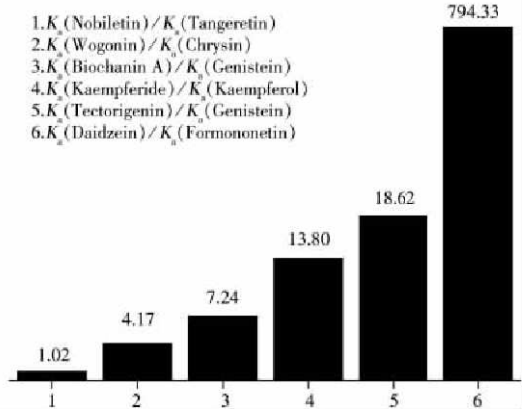


图2 羟基甲基化对黄酮与牛血清蛋白相互作用的影响
Fig. 2 Effect of methoxyl group on the affinity of the flavonoids with BSA

表1 不同类黄酮化合物的结构及其与 BSA 在体外的亲和力
Table 1 Chemical structures of 33 flavonoids and their affinities for BSA *in vitro*

Subclass	Name	Substitutions			lgK _a	n
		—OH	—OCH ₃	Others		
Flavones	Flavone				4.79	1.032
	7-OH flavone	7			6.10	1.252
	Chrysin	5, 7			4.82	0.982
	Baicalein	5, 6, 7			5.59	1.097
	Baicalin	5, 6		7-β-D-Glucuronide	4.87	1.020
	Apigenin	5, 7, 4'			5.69	1.106
	Luteolin	5, 7, 3', 4'			5.65	1.111
	Wogonin	5, 7	8		5.44	1.090
	Tangeretin		5, 6, 7, 8, 4'		4.76	0.975
	Nobiletin		5, 6, 7, 8, 4', 5'		4.77	0.968
Flavonols	Kaempferide	3, 5, 7	4'		5.21	1.043
	Kaempferol	3, 5, 7, 4'			4.89	1.221
	Kaempferitrin	5, 4'		3, 7-Dirhamnoside	5.09	1.082
	Fisetin	3, 7, 3', 4'			5.64	1.084
	Quercetin	3, 5, 7, 3', 4'			5.39	1.059
	Myricetin	3, 5, 7, 3', 4', 5'			5.57	1.137
	Galangin	3, 5, 7			5.39	1.078
	Rutin	5, 7, 3', 4'		3-α-L-Rham-1,6-D-Glc	5.06	1.056
	Daidzein	7, 4'			3.23	0.765
	Genistein	5, 7, 4'			4.14	0.898
Isoflavones	Genistin	5, 4'		7-Glucoside	3.27	0.807
	Biochanin A	5, 7	4'		5.00	1.005
	Tectorigenin	5, 7, 4'	6		5.41	1.087
	Puerarin	7, 4'		8-C-Glucose	3.73	0.88
	Formononetin	7	4'		2.14	0.81
	Naringenin	5, 7, 4'			5.02	1.033
Flavanone	Naringin	5, 4'		7-Neohesperidose	3.55	0.814
	Dihydromyricetin	3, 5, 7, 3', 4', 5'			4.85	1.024
Flavanonol	GCG	5, 7, 3', 4', 5'		3-Gallate	4.36	0.961
	EGCG(2, 3-cis)	5, 7, 3', 4', 5'		3-Gallate	6.24	1.201
	ECG(2, 3-cis)	5, 7, 4', 5'		3-Gallate	6.81	1.272
	EC(2, 3-cis)	3, 5, 7, 4', 5'				
	EGC(2, 3-cis)	3, 5, 7, 3', 4', 5'				
	C(2, 3-trans)	3, 5, 7, 4', 5'				

2.2 羟基甲基化对黄酮化合物与牛血清蛋白结合力的影响

研究了膳食类黄酮化合物中羟基甲基化对黄酮与牛血清蛋白结合力的影响(见图2)。结果表明，黄酮类化合物中羟基的甲基化显著增强了其与牛血清蛋白的结合力，增强倍数约为1~794倍。其中大

豆甾元与牛血清蛋白的结合力超过芒柄花黄素 794 倍以上。川陈皮素与牛血清蛋白的结合力仅略高于桔皮素,表明黄酮类化合物的甲基化增强了其运送能力,并导致了更强的吸收性和生物活性。有研究显示黄酮类化合物羟基的甲基化可极大地增强其肠道吸收和代谢稳定性^[24-25]。Walle 等^[26]的研究也表明黄酮类化合物的甲基化是增强代谢稳定性及运送能力的有效途径。Courts 等^[27]推断碳苷阿斯帕丁在活的有机体中发生了甲基化和葡萄糖醛酸化。黄酮类化合物的甲基化可减少毒副作用的发现也提高了甲基化黄酮的医疗实用性^[25]。

2.3 羟基化对黄酮类化合物与牛血清蛋白结合力的影响

在体外环境下,考察了黄酮类化合物的羟基化对其与牛血清蛋白结合力的影响(见表 2)。根据前期研究^[20]:引入黄酮 A 环上的最佳羟基数目为 1,例如 7-羟基黄酮(即只包含 1 个羟基)与人血红蛋白的结合能力最强。这一结论也适用于牛血清蛋白。然而,当更多的羟基被引入黄酮的 C-5、C-6、C-7 或者同时引入上述 3 个位点时,黄酮与牛血清蛋白的结合力减弱。黄酮与牛血清蛋白的结合力随着 B 环上羟基数目的增多而降低。4'位上的羟基化也可大大提高黄酮与牛血清蛋白的结合力,如芹菜素(5, 7, 4'位连接羟基)与牛血清蛋白的结合力是白杨黄素(5, 7 位连接羟基)的 7.41 倍。

黄酮醇是植物中常见的重要黄酮类化合物。本文研究发现,黄酮醇 5 位上的羟基化作用使其与牛血清蛋白的结合力增强 1.78 倍。异黄酮 A 环上的羟基化对其与牛血清蛋白的结合力有更明显的影响,如染料木黄酮与牛血清蛋白的结合力约为大豆甾元的 8 倍,芒柄花黄素与牛血清蛋白的结合力约为鹰嘴豆芽素 A 的 13.49 倍。由此可见,黄酮类化合物 A、B、C 环的羟基化极大地影响其与牛血清蛋白的结合力。

表 2 体外环境下黄酮羟基化对其与牛血清蛋白结合力的影响
Table 2 Effect of hydroxylation of flavonoids on the affinities for BSA *in vitro*

Class	Ring	Position	Example	Effect (times)
Flavone	A	7 H→OH	Flavone→7-OH flavone	↑ 20.42
		5 H→OH	7-OH flavone→Chrysin	↓ 19.05
		6 H→OH	Chrysin→Baicalein	↑ 5.89
	B	4'H→OH	Chrysin→Apigenin	↑ 7.41
		3'H→OH	Apigenin→Luteolin	No effect
	C	3 H→OH	Chrysin→Galangin	↑ 3.72
			Apigenin→Kaempferol	↓ 3.02
			Luteolin→Quercetin	↓ 1.82
			Fisetin→Kaempferol	↓ 1.78
Flavonol	A	5 H→OH		
	B	3'H→OH	Kaempferol→Quercetin	↑ 1.51
		4'H→OH	Galangin→Kaempferol	↓ 1.51
		5'H→OH	Quercetin→Myricetin	↑ 1.51
Isoflavone	A	5 H→OH	Daidzein→Genistein	↑ 8.13
			Formononetin→Biochanin A	↓ 13.49

2.4 黄酮类化合物异构体与牛血清蛋白结合力的比较

已有研究比较了黄酮类化合物异构体(芹菜素、黄芩素、染料木黄酮和木犀草素、山奈酚)与牛血清蛋白的结合力^[28]。依据表 1,黄酮类化合物异构体与牛血清蛋白结合常数的大小顺序如下:芹菜素 > 黄芩素 > 木犀草素和染料木黄酮 > 山奈酚,上述结果与所得数据一致。

2.5 糖基化作用对黄酮类化合物与牛血清蛋白结合力的影响

自然界中膳食黄酮类化合物通常以 β -糖苷的形式存在。尽管有 4'位被糖基化的例子,但主要以 3-和 7-O-糖苷的形式存在(见表 1)。由于受不同种类和数目的糖基化作用影响,导致黄酮类化合物与牛血清蛋白的结合力降低 1~3 倍^[19](见图 3)。糖基化作用使黄酮类化合物与牛血清蛋白的结合力降低 1~2 倍。在与牛血清蛋白的结合力方面,柚苷是柚皮苷的 29.51 倍,但山奈酚仅是山奈苷的 1.32 倍。染料木黄酮的糖基化使其与牛血清蛋白的结合力降低了 7.41 倍。以上所有情况中,糖基团的位置均在黄酮类化合物的 3 或 7 位。糖基化导致黄酮类化合物与牛血清蛋白的结合力降低可能是由于非平面结构。在羟基被糖基团取代后,产生空间位阻,从而降低与牛血清蛋白的结合力^[19]。另一方面,与大豆甾元相比,葛根素(大豆黄酮-8-C-葡萄糖)与牛血红蛋白的结合力增强了 3.16 倍。

2.6 膳食黄酮类化合物 C2=C3 双键的氢化作用对其与牛血清蛋白结合力的影响

C2=C3 双键和 4-O 键对于黄酮类化合物与牛血清蛋白的结合力有重要影响。黄酮类化合物中 C2=C3 的氢化作用增强了其与牛血清蛋白的结合力。由表 1 所列出的结合常数对数值,可推算出芹菜甙元和杨梅素与牛血清蛋白的结合力分别是柚皮素和二氢杨梅素的 4.68 和 5.25 倍。膳食类黄酮化合物上 C2=C3 双键的氢化作用可使其与牛血清蛋白的结合力增强 2~4 倍。原因可能是由于 C2=C3 双键增强了连接环 B 和环 C 的 p 共轭,使得两个环的平面接近性增强^[29],从而更易进入蛋白质分子的疏水结构。

2.7 分配系数与牛血清蛋白结合力之间的关系

化合物的亲油性以分配系数为指标。对于黄酮类化合物,分配系数与稳定常数有一定的关系(未列出)。在 Origin7.5 中应用的线性回归方程为 $X\log P_3 = 0.3049 + 0.2858 \lg K_a$ ($r = 0.2179$),此时,黄酮类化合物的亲油性同其与牛血清蛋白的结合常数呈现明显的正相关性,这表明黄酮类化合物与牛血清蛋白的结合作用部分为疏水作用。牛血清蛋白包含大量的—NH、—OH 和—COOH 基团,表明其为极强的极性分子。

进一步研究了氢键对黄酮类化合物和牛血清蛋白结合的影响。黄酮类化合物氢键受体/给体数目(N)^[30]及其与牛血清蛋白结合力之间的关系见图 4。结果显示,黄酮类化合物含有的氢键受体/给体数目增多时,其与牛血清蛋白的结合力明显降低。此结果支持上文中的结论,即疏水作用是连接黄酮类化合物与牛血清蛋白的主要作用力。

2.8 拓扑极性表面积与黄酮小分子与牛血清蛋白结合力的关系

拓扑极性表面积(TPSA)由分子中极性原子的表面积之和得到。拓扑极性表面积是描述药物的吸收性,即包括药物的肠道吸收性、生物活性、Caco-2 渗透性、血脑屏障渗透性的重要指标。Fernandes 等^[31]应用拓扑极性表面积分析了药物相关蛋白 1(MRP1/ABCC1)的传输特性,发现具有较高拓扑极性表面积的药物比低拓扑极性表面积的药物有更高的传输特性。本文探讨了拓扑极性表面积与牛血清蛋白结合力之间的关系,拓扑极性表面积由 PubChem 公共化学数据库获得。黄酮类化合物的拓扑极性表面积与其结合稳定常数有关。当黄酮类化合物的结合稳定常数增加时,其拓扑极性表面积降低。拓扑极性表面积低的黄酮类化合物结合紧密,而拓扑极性表面积高的黄酮类化合物则结合松散。在 Origin 7.5 中得到的线性回归方程为 $TPSA = 167.9437 - 9.3568 \lg K_a$ ($r = 0.1383$)。

3 结论

本文系统研究了黄酮化合物的羟基化、羟基甲基化、双键氢化、糖基化、异构化等对其与牛血清蛋白相互作用力的影响。结果表明,黄酮化合物与牛血清蛋白的结合力常数大小与黄酮母核上的取代基位置、种类、数目密切相关。研究了黄酮化合物的亲油性、拓扑极性表面积与牛血清蛋白的相互作用影响,表明黄酮化合物与牛血清蛋白的结合力类型主要是疏水作用。

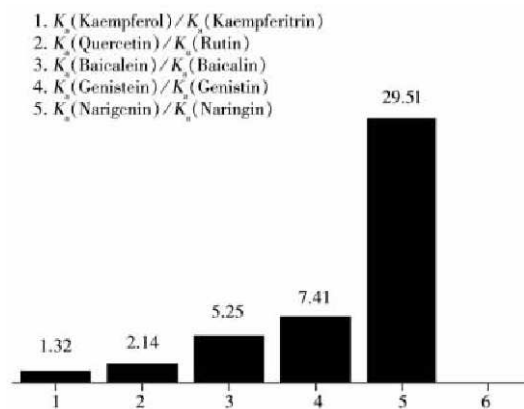


图3 糖基化作用减弱了黄酮与牛血清蛋白的亲和力

Fig. 3 Glycosylation decreasing the affinity of the flavonoids for BSA

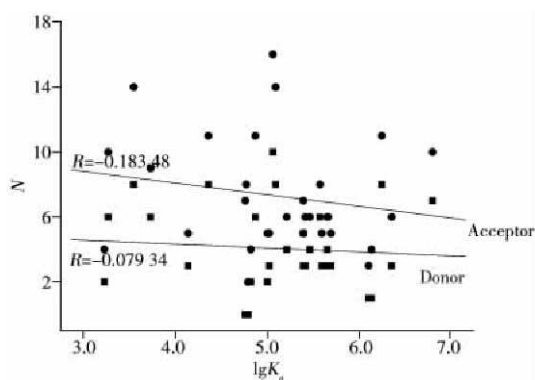


图4 氢键供体和受体数目与黄酮对牛血清蛋白亲和力的关系

Fig. 4 Relationship of hydrogen bond acceptor/donor number of flavonoids (n) with affinities for BSA

参考文献:

- [1] Wang T T Y, Schoene N W, Kim Y S, Mizuno C S, Rimando A M. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, 54: 335 – 344.
- [2] Glauert H P, Calfee – Mason K, Stemm D N, Tharappel J C, Spear B T. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, 54(7): 875 – 896.
- [3] Zhou S Y, Yang R T, Teng Z H, Zhang B L, Hu Y Z, Yang Z F. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, 54: 4572 – 4579.
- [4] Weng Y L, Liao H F, Li A F Y, Chang J C, Chiou R Y Y. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, 54: 259 – 267.
- [5] Sepehr E, Cooke G M, Robertson P, Gilani G S. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, 53: S16 – S26.
- [6] Ahn M R, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Ohta T. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, 53: 643 – 651.
- [7] Courts F L, Williamson G. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, 53: 1104 – 1111.
- [8] Woodman O L, Meeker W F, Boujaoude M. *J. Cardiovasc. Pharm.*, **2005**, 46: 302 – 309.
- [9] Heijnen C G M, Haenen G R M M, van Acker F A A, van der Vijgh W J F, Bast A. *Toxicol. Vitro*, **2001**, 15: 3 – 6.
- [10] Matei I, Hillebrand M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 51: 768 – 773.
- [11] Jurasekova Z, Marconi G, Sanchez – Cortes S, Torreggiai A. *Biopolymers*, **2009**, 91: 917 – 927.
- [12] Xiao J B, Chen J W, Cao H, Ren F L, Yang C S, Chen Y, Xu M. *J. Photochem. Photobiol. A*, **2007**, 191: 222 – 227.
- [13] Xiao J B, Shi J, Cao H, Wu S D, Ren F L, Xu M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 45: 609 – 615.
- [14] Xiao J, Chen X, Zhang L, Talbot S G, Li G C, Xu M. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56: 910 – 915.
- [15] Xiao J B, Chen X Q, Jiang X Y, Hilczer M, Tachiya M. *J. Fluoresc.*, **2008**, 18: 671 – 678.
- [16] Zhao J Y, Ren F L. *Spectrochim. Acta A*, **2009**, 72: 682 – 685.
- [17] Xiao J B, Suzuki M, Jiang X Y, Chen X Q, Yamamoto K, Ren F L, Xu M. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56: 2350 – 2356.
- [18] Cao H, Wu D H, Wang H X, Xu M. *Spectrochim. Acta A*, **2009**, 73: 972 – 975.
- [19] Xiao J B, Cao H, Wang Y F, Zhao J Y, Wei X L. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57: 6642 – 6648.
- [20] Xiao J B, Cao H, Wang Y F, Yamamoto K, Wei X L. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, 54: S253 – S260.
- [21] Xiao J B, Chen T T, Cao H, Chen L S, Yang F. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, 55(9): 1375 – 1390.
- [22] Berezhkovskiy L M. *J. Pharm. Sci.*, **2007**, 96: 249 – 257.
- [23] Xiao J B, Chen X Q, Jiang X Y, Hilczer M, Tachiya M. *J. Fluoresc.*, **2008**, 18: 671 – 678.
- [24] Wen X, Walle T. *Drug Metab. Dispos.*, **2006**, 34: 1786 – 1792.
- [25] Walle T. *Int. J. Mol. Sci.*, **2009**, 10: 5002 – 5019.
- [26] Walle T. *Mol. Pharm.*, **2007**, 4: 826 – 832.
- [27] Courts F L, Williamson G. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, 53: 1104 – 1111.
- [28] Cao H, Liu Q, Shi J, Xiao J B, Xu M. *Anal. Lett.*, **2008**, 41: 521 – 532.
- [29] Edenharder R, von Petersdorff I, Rauscher R. *Mutat. Res.*, **1993**, 287: 261 – 274.
- [30] PubChem Public Chemical Database. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [31] Fernandes J, Gattass C R. *J. Med. Chem.*, **2009**, 52: 1214 – 1218.