施凯欣, 李丽, 郭妍, 等. 牛血清白蛋白与柚皮素相互作用及对柚皮素稳定性的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(10): 107−119. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050226
SHI Kaixin, LI Li, GUO Yan, et al. Interaction of Bovine Serum Albumin with Naringenin and Its Effect on the Stability of Naringenin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(10): 107−119. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050226

·研究与探讨·

牛血清白蛋白与柚皮素相互作用及对柚皮素稳定性的影响

施凯欣[1], 李　丽[1], 郭　妍[1,*], 郭怡琳[1], 仝晋昌[1], 刘柏平[2,3,*], 徐建国[1,*]
（1.山西师范大学食品科学学院, 山西太原 030031;
2.华南农业大学材料与能源学院, 广东广州 510630;
3.华南农业大学教育部生物材料与能源重点实验室, 广东广州 510630）

摘　要: 为了研究牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）与柚皮素（naringenin，Nar）的相互作用机制及对 Nar 稳定性的影响。本文首先采用多光谱法研究了 BSA 与 Nar 的猝灭机制、结合常数、结合位点，然后利用分子动力学模拟研究了两者的结合自由能、关键残基、结合模式和相互作用，最后利用反溶剂法制备了 Nar/BSA 纳米颗粒并测定了抗氧化活性和体外释放特性。结果表明，Nar 可以有效猝灭 BSA 的内源荧光，猝灭机制为静态猝灭。Nar 主要通过氢键和疏水相互作用与 BSA 形成稳定复合物，结合常数和结合自由能分别为 1.7×10^4 L/mol 和 −14.78 kcal/mol。相互作用改变了 BSA 的二级结构，α-螺旋含量由 79.39% 变化为 77.67%。Nar 与 BSA 的结合位点数约为 1 且结合在位点Ⅰ，其中残基 Arg208、Ala212、Leu326 和 Gly327 与 Nar 结合最紧密。此外，贮藏第 6 d，浓度为 40 μg/mL 时，Nar/BSA 纳米颗粒和 Nar 的 DPPH 自由基清除率分别为 11.42% 和 9.30%。体外释放 61 h 后，Nar/BSA 纳米颗粒和 Nar 在模拟胃液中的累计释放率分别为 62% 和 79%，在模拟肠液中的累计释放率分别为 86% 和 89%。由此表明，BSA 与 Nar 能够稳定结合且 BSA 包封显著提高了 Nar 的抗氧化活性并对 Nar 在模拟胃肠液中起到一定的缓释作用。

关键词: 柚皮素, 牛血清白蛋白, 光谱法, 分子动力学模拟, 互作机制
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)10−0107−13
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050226
本文网刊:

Interaction of Bovine Serum Albumin with Naringenin and Its Effect on the Stability of Naringenin

SHI Kaixin[1], LI Li[1], GUO Yan[1,*], GUO Yilin[1], TONG Jinchang[1], LIU Boping[2,3,*], XU Jianguo[1,*]
（1.College of Food Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030031, China;
2.College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510630, China;
3.Key Laboratory for Bio-based Materials and Energy of Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510630, China）

Abstract: To investigate the interaction mechanism between bovine serum albumin (BSA) and naringenin (Nar), as well as the impact on the stability of Nar, multi-spectroscopic techniques were initially utilized to study the quenching mechanism, binding constant, and binding site of the BSA-Nar complex. Subsequently, molecular dynamics simulations were conducted to explore the binding free energy, key residues, binding modes, and interactions. Finally, Nar/BSA nanoparticles (Nar/BSA

收稿日期: 2025−05−26
基金项目: 山西省基础研究计划项目（202203021212392）; 山西师范大学自然科学基金（020820250003）。
作者简介: 施凯欣（2004−）, 女, 本科, 研究方向: 功能因子及功能食品研究, E-mail: 2230030122@sxnu.edu.cn。
*** 通信作者:** 郭妍（1992−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 功能因子及功能食品研究, E-mail: guoyan@sxnu.edu.cn。
刘柏平（1966−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 计算生物学, E-mail: boping@scau.edu.cn。
徐建国（1971−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品研究与活性评价, E-mail: xjg71@163.com。

NPs) were prepared, and the antioxidant activity and *in vitro* release properties were examined. The findings indicated that Nar could quench the intrinsic fluorescence of BSA through a static quenching mechanism. The BSA-Nar complex was primarily formed via hydrogen bonding and hydrophobic interactions, with a binding constant of 1.7×10^4 L/mol and a binding free energy of -14.78 kcal/mol. The secondary structure of BSA was altered, with the α-helix content decreasing from 79.39% to 77.67%. There was approximately one binding site between BSA and Nar, and Nar binds to site I of BSA. Key residues Arg208, Ala212, Leu326, and Gly327 significantly contributed to the binding. Furthermore, after six days of storage, when the concentration was 40 μg/mL, the DPPH free radical scavenging rates of Nar/BSA NPs and Nar were 11.42% and 9.30%, respectively. Following 61 hours of simulated gastric fluid digestion, the release rates of Nar/BSA NPs and Nar were 62% and 79%, respectively. The corresponding release rates in simulated intestinal fluids were 86% and 89%, respectively. These results demonstrate that BSA can stably bind with Nar, and the antioxidant activity of Nar is significantly enhanced upon encapsulation with BSA. Additionally, the release rates of Nar in simulated gastric and intestinal fluids are slowed when encapsulated within BSA.

Key words: naringenin (Nar); bovine serum albumin (BSA); spectroscopy; molecular dynamics simulation; interaction mechanism

柚皮素(Naringenin, Nar)是广泛存在于柑橘类水果(如葡萄柚、柠檬等)中的一种天然黄烷酮类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种生理功能[1]。Nar 进入人体后,能够通过减少氧化应激、调控基因表达保护人体的肠胃、肝脏和心血管等免受外来物质侵害,在功能食品领域具有较高的研究价值和应用前景[2]。然而,Nar 水溶性差,生物利用度较低等特点限制了其广泛应用。因此,利用有效的载体提高 Nar 溶解度和稳定性,从而提高其生物利用度具有非常重要的意义。

牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)被广泛用于构建高效递送体系,具有较好的配体结合特性和生物降解性,在体内代谢过程中不会产生有害物质。BSA 由 583 个氨基酸组成,共有 3 个同源结构域,分别为 Domain Ⅰ、Domain Ⅱ和 Domain Ⅲ。每个结构域可分为两个亚结构域 A 和 B。其中,亚结构域 IIA(位点 I)和 IIIA(位点 II)是多酚类化合物在 BSA 上的主要结合位点[3]。近年来,已有研究者利用多光谱与分子对接相结合的方法研究了 BSA 与多酚类化合物的相互作用,结果表明姜辣素、山奈酚和羟基酪醇与 BSA 形成了稳定的复合物,且姜辣素结合在 BSA 的亚结构域 II,羟基酪醇结合在亚结构域 IIA 和 IIB 之间[4−6]。重要的是,BSA 与多酚类化合物的结合有助于提高其稳定性和生物利用度[7]。

然而,上述研究主要集中于静态相互作用。分子动力学模拟能够模拟蛋白的运动轨迹,从而反映蛋白构象在原子水平的变化,是研究分子间相互作用的重要工具[8−9]。因此,多光谱与分子动力学模拟相结合可以提供更全面的相互作用信息。然而,多光谱与分子动力学模拟相结合研究 BSA 与 Nar 之间相互作用机制的研究较少,且 BSA 能否有效负载 Nar 并提高其稳定性有待进一步探究。

本研究首先通过紫外可见吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱分析 Nar 与 BSA 之间的猝灭机制、结合常数和结合位点。然后进行 100 ns 的分子动力学模拟,分析两者间的结合自由能、关键残基、接触数、结合模式和相互作用。最后制备 Nar/BSA 纳米颗粒(Nar/BSA NPs),并探究 BSA 对 Nar 抗氧化活性和体外释放特性的影响。以期为 BSA 有效负载 Nar 提供理论基础,为拓宽 Nar 在功能食品领域的应用范围提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛血清白蛋白(纯度≥98%,无脂肪酸)、柚皮素(纯度≥98%,HPLC) 上海源叶生物科技有限公司;DMSO(纯度≥99.8%) 安徽泽升科技有限公司;2,4,6-三(2-吡啶基)-1,3,5-三嗪(TPTZ)、二苯基肼自由基(DPPH) 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 上海麦克林生化科技有限公司;所用试剂均为分析纯;实验用水为蒸馏水。

UB-7 pH 计 德国赛多利斯科学仪器有限公司;TU-1901 双光束紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;F98 荧光分光光度计 上海棱光技术有限公司;J-815 圆二色谱仪 日本 JASCO 公司;LGJ-30F 真空冷冻干燥机 河南信陵仪器设备有限公司;Nano ZSE 纳米粒度仪 马尔文派纳利提克公司;JS94Zeta 电位仪 上海中晨数字技术设备有限公司;傅里叶红外光谱仪 Bruker(布鲁克)公司;SpectraMax M2 多功能酶标仪 美国 Molecular Devices 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外可见吸收光谱测定 向 BSA 溶液中加入不同体积的 Nar 溶液,使得体系中 BSA 浓度为 5.0×10^{-6} mol/L,Nar 浓度为 0、1.5、3、4.5、6、7.5、9×10^{-5} mol/L。充分混匀后室温静置 40 min,以 PBS 缓冲液为参比,扫描样品液在 190~400 nm 区间的紫外可见吸收光谱[10]。

1.2.2 荧光光谱测定 将 BSA 溶液与不同体积的 Nar 溶液充分混合,使得体系中 BSA 浓度为 1×10^{-6} mol/L,Nar 浓度为 0、2.5、5、7.5、10、12.5、15、

17.5、20 ×10^{-6} mol/L。在 298、304、310 K 温度条件下静置 40 min，使用 F98 荧光分光光度计记录各样品液 300~500 nm 区间的荧光发射光谱图[10−12]。激发波长为 280 nm，激发和发射狭缝均为 5 nm，增益为 900 V，样品光谱均扣除了 PBS 缓冲液背景。通过内滤光校正公式(1)对数据进行校正，并使用校正后数据作图。

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{(A_{ex}+A_{em})}{2}} \quad \text{式（1）}$$

其中，F_{obs} 与 F_{corr} 分别是校正前后的荧光强度；A_{ex} 与 A_{em} 分别是激发和发射波长下对应浓度 Nar 溶液的吸光度。

采用 Stern-Volmer 方程(2)计算猝灭常数以确定猝灭机制。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad \text{式（2）}$$

其中，F_0 和 F 分别为无 Nar 和 Nar 存在时 BSA 的荧光强度；[Q] 为 Nar 的浓度；K_{SV} 和 K_q 分别为猝灭常数和猝灭速率常数；τ_0 为生物大分子猝灭平均寿命 10^{-8} s。

采用 Stern-Volmer 方程(3)计算 Nar 与 BSA 相互作用的结合常数(K_a)和结合位点数(n)：

$$\lg\frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n\lg[Q] \quad \text{式（3）}$$

1.2.3　时间分辨荧光光谱测定　将 BSA 溶液与等体积的 Nar 溶液充分混合，使得体系中 BSA 浓度为 5×10^{-5} mol/L，Nar 浓度为 2×10^{-5} mol/L。在室温条件下静置 15 min，使用 Edinburgh FLS1000 稳态/瞬态荧光光谱仪(PL)记录各样品液的荧光衰减曲线[13]。激发和发射波长分别为 280 nm 和 350 nm。使用 Fluoracle 软件对荧光衰减曲线进行拟合获得荧光寿命值，所得数据通过 χ^2 值进行评估。采用公式(4)计算平均荧光寿命(τ)：

$$\langle\tau\rangle = f_1\tau_1 + f_2\tau_2 \quad \text{式（4）}$$

其中，$\langle\tau\rangle$表示平均寿命，ns；τ_i 和 f_i 分别代表不同组分在衰减过程中的寿命(ns)和前指数因子。

1.2.4　同步荧光光谱测定　同步荧光光谱样品液制备参照 1.2.2。在 298 K 温度下，使用 F98 荧光分光光度计记录样品液$\Delta\lambda$($\Delta\lambda=\lambda_{em}-\lambda_{ex}$)为 15 和 60 nm 时的荧光光谱数据。激发和发射狭缝均为 20 nm，增益为 750 V，样品光谱均扣除了 PBS 缓冲液背景[14−15]。

1.2.5　三维荧光光谱测定　将 BSA 溶液与不同体积的 Nar 溶液充分混合，使得体系中 BSA 浓度为 1×10^{-6} mol/L，Nar 浓度为 0、12.5、17.5、22.5×10^{-6} mol/L。298 K 静置 40 min 后，使用 F98 荧光分光光度计扫描样品液的三维荧光光谱。激发和发射波长范围均为 200~400 nm，激发波长扫描间隔为 5 nm，激发和发射狭缝分别为 10 nm 和 5 nm，增益为 800 V，扫描速率为 3000 nm/min[16]。

1.2.6　位点竞争实验　选用华法林、布洛芬分别作为 BSA 结合位点 I 和位点 II 的探针试剂。将 BSA(1×10^{-6} mol/L)和 Nar(2×10^{-6} mol/L)的混合液在室温下静置 40 min，每次分别向 BSA-Nar 混合液中加入 10 μL 华法林和布洛芬溶液(2.0×10^{-6}~2.0×10^{-5} mol/L)。采用 F98 荧光分光光度计记录激发波长为 280 nm 和发射波长为 300~500 nm 下各混合液的荧光光谱[6]。激发和发射狭缝为 5 nm，增益为 750 V，样品光谱均扣除了 PBS 缓冲液的背景光谱。采用公式(5)计算探针置换率：

$$\text{探针置换率}\ (\%) = \frac{F_2}{F_1} \times 100 \quad \text{式（5）}$$

其中，F_1 和 F_2 分别是未添加和添加探针试剂时 BSA-Nar 混合液的荧光强度。

1.2.7　圆二色谱测定　将 BSA 溶液与不同体积的 Nar 溶液充分混合，使得体系中 BSA 浓度为 0.75×10^{-6} mol/L，Nar 浓度为 0、6 和 15 ×10^{-6} mol/L，室温静置 40 min。在恒定充氮条件下，采用 Jasco J-815 圆二色光谱仪记录各样品液的圆二色谱[17]。波长扫描范围为 190~400 nm，扫描间隔为 0.5 nm、扫描速度为 100 nm/min。样品光谱均扣除了 PBS 缓冲液背景光谱，浓度为 15×10^{-6} mol/L Nar 的光谱作为对照。利用 Dichr-Web 网址进行 SELCON3 程序分析，用平均残基摩尔椭圆率计算 BSA 二级结构 α-螺旋、β-折叠、β-转角、无规则卷曲的含量。

1.2.8　分子对接　运用 AutoDock Vina 软件进行分子对接，BSA 的晶体结构(PDB ID: 4OR0)下载于 PDB 数据库，Nar(CID: 445972)的三维结构下载于 Pubchem 数据库。运用 AutoDock Tools 工具对 BSA 和 Nar 结构预处理并生成 pdbqt 文件，盒子大小设为 36 Å×36 Å×28 Å，格点间距设为 1 Å，其他参数均为默认值。选择结合亲和力最强的对接构象作为分子动力学模拟的初始结构，利用 PyMOL 软件可视化对接结果。

1.2.9　分子动力学模拟　利用 GROMACS 2016.4 软件进行分子动力学模拟，分别采用 Amber ff99SB[18] 和 GAFF[19] 参数化 BSA 和 Nar。将 Nar-BSA 复合物置于立方体溶剂盒子中，体系原子到盒子边缘的最小距离设为 10 Å，随后加入 Na^+和 Cl^-以中和体系电荷。接着采用最陡下降法和共轭梯度法进行能量最小化，以消除不良相互作用和原子碰撞。之后依次进行 1 ns NVT 和 NPT 平衡，使用 V-rescale 和 Parrinello-Rahma 方法分别将体系温度和压力控制在 300 K 和 1 atm。最后进行 100 ns 分子动力学模拟，并将轨迹以 1.0 ps 为时间间隔保存用于后续分析。短程非键相互作用截断值设为 10 Å，采用 Particle Mesh Ewald 算法计算长程静电相互作用，使用 LINCS 算法约束氢原子。使用 mindist 程序计算

BSA 与 Nar 的分子间接触数，利用 VMD 1.9.3 计算 Nar-BSA 体系的氢键占有率。

1.2.10 结合自由能计算 采用分子力学泊松-玻尔兹曼表面积法（molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area, MM-PBSA）计算 Nar-BSA 体系的结合自由能（ΔG）[20]。从 50~100 ns 平衡轨迹中采集 500 帧构象用于计算 ΔG，公式如下：

$$\Delta G = G_{complex} - (G_{protein} + G_{ligand}) \quad 式（6）$$

$$\Delta G = \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad 式（7）$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{vdw} + \Delta E_{ele} \quad 式（8）$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta E_{PB} + \Delta E_{SA} \quad 式（9）$$

$$\Delta G = \Delta E_{vdw} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{PB} + \Delta E_{SA} \quad 式（10）$$

其中，$G_{complex}$、$G_{protein}$ 和 G_{ligand} 分别为 Nar-BSA、BSA 和 Nar 的自由能；ΔG 为气相结合能（ΔE_{MM}）、溶剂化结合能（ΔG_{sol}）和熵贡献（−TΔS）之和；ΔE_{MM} 为范德华相互作用能（ΔE_{vdw}）和静电相互作用能（ΔE_{ele}）之和；ΔG_{sol} 可分解为极性溶剂化自由能（ΔE_{PB}）和非极性溶剂化自由能（ΔE_{SA}）；TΔS 是熵变对结合自由能的影响，由于熵变计算耗时较长，因此忽略不计。为得到对 Nar 结合有重要贡献的残基，对结合自由能进行分解，将能量小于−1 kcal/mol 的残基视为关键残基。

1.2.11 Nar/BSA NPs 的制备 将 BSA 溶于蒸馏水，使其浓度为 0.4×10^{-3} mol/L，室温下 800 r/min 磁力搅拌 2 h 以便充分水化。将 Nar 溶于无水乙醇，得到浓度为 2.4×10^{-3} mol/L 溶液。以体积比 5∶1 将 Nar 溶液以 2 mL/min 速度滴入 BSA 溶液，继续磁力搅拌 3 h，离心得到上清液（10000 r/min，15 min），旋蒸除去乙醇，−20 ℃ 预冻 12 h，真空冷冻干燥 24 h 得到 Nar/BSA NPs[21]。以体积比 5∶1 加入无水乙醇，其他操作与 Nar/BSA NPs 相同，制备 BSA 纳米颗粒（BSA NPs）。

1.2.12 载药量与包封率的测定 将 5 mg Nar/BSA NPs 溶于蒸馏水，涡旋 30 s 至完全溶解，用体积比为 10∶1 的乙酸乙酯和无水乙醇提取剂提取，超声 20 min，涡旋 30 s 重复 3 次，离心得到上清液（10000 r/min，15 min）[22]。稀释至所需浓度，测定 289 nm 处吸光度，代入标准曲线（y=0.0768x+0.0263，R^2=0.9953）计算 Nar 含量。包封率和载药量计算如公式（11）和公式（12）所示：

$$载药量(mg/g) = \frac{Nar/BSA\ NPs\ 中\ Nar\ 的质量}{Nar/BSA\ NPs\ 质量} \quad 式（11）$$

$$包封率(\%) = \frac{Nar/BSA\ NPs\ 中\ Nar\ 的质量}{初始加入\ Nar\ 的质量}\times100 \quad 式（12）$$

1.2.13 粒径、分散系数及 Zeta 电位的测定 将 Nar/BSA NPs 和 BSA NPs 溶于蒸馏水，制备成浓度为 100 μg/mL 的分散液，使用 Zeta sizer Nano ZSE 粒度仪记录样品的平均粒径和分散系数，用 Zeta JS94 电位仪测定 Zeta 电位[23]。

1.2.14 傅里叶红外光谱 将 1 mg Nar/BSA NPs 和 BSA NPs 与 100 mg 溴化钾粉末混合，将混合物充分研磨并用压片机压成透明薄片，使用傅里叶红外光谱仪记录 4000~400 cm^{-1} 区间的红外光谱。扫描次数为 32 次，分辨率为 4 cm^{-1}，样品光谱均扣除溴化钾的背景光谱[24]。

1.2.15 抗氧化活性的测定 将适量 Nar 和 Nar/BSA NPs 溶于蒸馏水，涡旋 1 min，磁力搅拌 2 h，12000 r/min 离心 15 min，得到上清液。稀释至样品液中 Nar 含量相同，并将 BSA NPs 设为对照组。将 Nar、Nar/BSA NPs、BSA NPs 溶液储存于具塞试管中，室温保存 6 d。每 24 h 抽取少量样品进行自由基清除活性和铁离子还原能力测定，评估储存时间内 Nar 和 Nar/BSA NPs 的抗氧化活性[25−26]。具体步骤：将 100 μL 样品溶液（40 μg/mL）与 100 μL DPPH 溶液充分混合，避光反应 30 min，在 517 nm 处测定吸光度并使用公式（13）计算 DPPH 自由基清除率。

$$DPPH自由基清除率(\%) = \left[\frac{A_1 - (A_2 - A_0)}{A_1}\right]\times100 \quad 式（13）$$

其中，A_2 为样品组的吸光度；A_1 为对照组的吸光度；A_0 为空白组的吸光度。

将 100 μL 样品溶液（25 μg/mL）与 100 μL ABTS 溶液充分混合，避光反应 6 min，在 734 nm 处测定吸光度，使用公式（14）计算 $ABTS^+$ 自由基清除率。

$$ABTS^+自由基清除率(\%) = \left[\frac{A_1 - (A_2 - A_0)}{A_1}\right]\times100 \quad 式（14）$$

其中，A_2 为样品组的吸光度；A_1 为对照组的吸光度；A_0 为空白组的吸光度。

将 180 μL 样品溶液（1 mg/mL）与 30 μL FRAP 工作液充分混合，37 ℃ 避光反应 30 min，测定 593 nm 处吸光度，铁离子还原能力以 Fe^{2+} 的毫摩尔数当量（mmol/L）表示。

1.2.16 体外模拟消化实验 采用静态模型进行 Nar 和 Nar/BSA NPs 的体外模拟消化实验[27]。将 2.0 g 氯化钠溶于 7.0 mL 12 mol/L 盐酸，加入 2.5% 吐温 80，蒸馏水定容至 1 L 以制备模拟胃液（pH=1.2）。向 6.8 g 磷酸二氢钾和 0.89 g NaOH 中加入 2.5% 吐温 80，蒸馏水定容至 1 L，使 pH 为 6.8 以得到模拟肠液。将 Nar 和 Nar/BSA NPs（含 2 mg Nar）分别溶于 2 mL 37 ℃ 释放介质，置于 Mw 为 8000~14000 Da 的透析袋，将透析袋完全浸没于 50 mL 模拟胃液和肠液，放入 37 ℃ 空气振荡器（100 r/min）进

行 61 h 体外模拟消化实验，定时取样 1 mL，并立即补充等温等体积新鲜介质以保持模拟消化条件。用紫外分光光度计测定 289 nm 处的吸光度，代入胃、肠液标准曲线计算 Nar 含量，累计释放率计算如公式(15)所示。

$$E_r(\%) = \frac{V_e\sum_1^{n-1} C_i + C_n V_0}{m_{drug}} \times 100 \qquad 式（15）$$

其中，E_r 为累计释放率(%)；V_e 为 PBS 的置换体积(mL)；V_0 为释放介质总体积(mL)；C_i 为第 i 次置换取样时释放液的浓度(mg/mL)；m_{drug} 为纳米颗粒载药总质量(mg)；n 为置换 PBS 的次数。

1.3　数据处理

所有实验重复三次，结果以平均值±标准差表示。利用 Origin 2018 软件作图，利用 SPSS 25.0 软件进行方差分析，P<0.05 表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　紫外可见吸收光谱分析

BSA 的紫外可见吸收光谱在 280 nm 附近有特征吸收峰，该峰由 BSA 芳香族氨基酸苯环的电子转移(π-π^*跃迁)产生，如酪氨酸(tyrosine, Tyr)、色氨酸(tryptophan, Trp)和苯丙氨酸(Phenylalanine, Phe)[28]。通过分析紫外光谱特征吸收峰强度和位移变化可以了解 Nar 对 BSA 构象的影响。BSA 与不同浓度 Nar 的紫外吸收光谱如图 1 所示。由图 1 可知，Nar 的吸收峰位于 322 nm 处。随着 Nar 浓度增加，

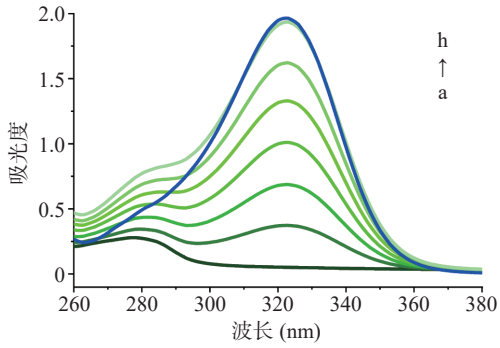


图 1　Nar 与 BSA 相互作用的紫外光谱

Fig.1　UV spectrum of the interaction between Nar and BSA

注：a→g 表示混合液中 Nar 的浓度为 0~9×10^{-5} mol/L，h 表示最大浓度的 Nar 溶液(9×10^{-5} mol/L)。

BSA 在 280 nm 处的特征吸收峰强度增加并伴随轻微红移，表明 BSA-Nar 复合物的形成。二者的结合使得 BSA 结构趋于舒展，内部的芳香族氨基酸暴露出来。刘丽莉等[29]发现 4 种植物多酚与牛血清白蛋白相互作用导致牛血清白蛋白的紫外吸收峰的峰值与峰位发生改变，本研究结果与之类似。

2.2　荧光光谱分析

荧光光谱被广泛用于多酚类化合物与蛋白质相互作用机理研究。BSA 的内源荧光主要由 Trp、Tyr、Phe 产生，并会与多酚类化合物相互作用猝灭[30]。在 298、304、310 K 温度下，BSA 与不同浓度 Nar 的内源荧光光谱如图 2 所示。由图 2 可知，BSA 在 340 nm 处有一个特征荧光发射峰，荧光强度随 Nar 浓度增加不断下降，并分别伴随 8、4 和 7 nm 红移。表明 Nar 与 BSA 发生了相互作用，使 BSA 亲水性增加，与紫外光谱结果一致。梁鑫富等[31]研究了柠檬苦素与牛血清白蛋白的荧光光谱，发现随着柠檬苦素的加入牛血清白蛋白的荧光强度逐渐降低。

2.3　猝灭机制与结合常数分析

由于 Nar 可以猝灭 BSA 的内源荧光，因此对猝灭机制进行了分析。猝灭机制一般分为动态猝灭和静态猝灭，前者与蛋白质荧光团和猝灭剂之间的碰撞有关，后者则是由复合物的形成引起[32]。Nar 与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 曲线如图 3 所示。由图 3 可知，在所测浓度下，[Q] 与 F/F_0 呈线性相关，表明猝灭机制为静态或动态单一猝灭类型。不同温度下，Nar 与 BSA 相互作用的猝灭常数、结合常数和结合位点数如表 1 所示。由表 1 可知，温度为 298 K 时，K_{sv} 值为 4.13×10^4 L/mol，且随着温度的升高逐渐降低，但变化不显著。然而，三个温度下的 K_q 值均大于最大动态猝灭常数(2.0×10^{10} L/mol)[33]，表明 Nar 猝灭 BSA 的机制为静态猝灭。

采用双对数曲线计算了 Nar 与 BSA 的结合常数 K_a 和结合位点数 n，分别对应斜率和截距，结果见表 1。由表 1 可知，不同温度下 Nar 与 BSA 的 K_a 和 n 值分别为 0.17×10^5 L/mol(0.92)、1.47×10^5 L/mol(1.13)和 3.65×10^5 L/mol(1.20)，表明 Nar 与 BSA 之间只存在 1 个结合位点。胡夏恬等[34]的研究表明，

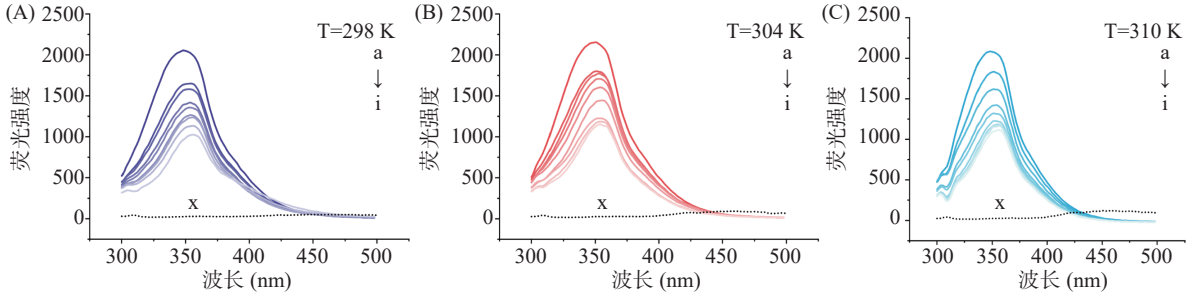


图 2　298 K(A)、304 K(B)、310 K(C)下不同浓度 Nar 与 BSA 相互作用的荧光光谱

Fig.2　Fluorescence spectra of the interaction between different concentrations of Nar and BSA at 298 K (A), 304 K (B) and 310 K (C)

注：a→i 表示混合液中 Nar 的浓度为 0~20×10^{-6} mol/L；x 表示最大浓度的 Nar 溶液(2×10^{-5} mol/L)。

表 1 不同温度下 Nar 与 BSA 的猝灭常数、结合常数和结合位点数

Table 1 Quenching constant, binding constant and number of binding sites between Nar and BSA

T(K)	K_{sv}(×10⁴ L/mol)	K_q(×10¹² L/mol/s)	R^2	K_a(×10⁵ L/mol)	n	R^2
298	4.13±0.03	4.13±0.03	0.98±0.01	0.17±0.02	0.92±0.01	0.98±0.00
304	4.10±0.03	4.1±0.03	0.94±0.01	1.47±0.41	1.13±0.08	0.91±0.01
310	4.00±0.02	4.00±0.02	0.93±0.00	3.65±1.12	1.20±0.04	0.95±0.00

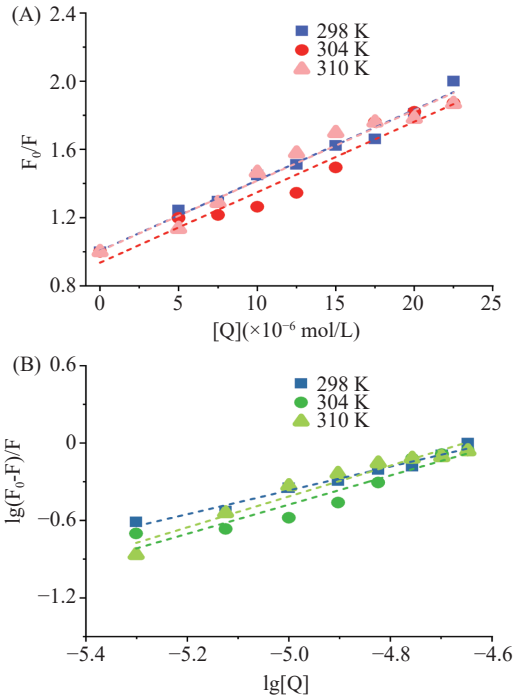


图 3 不同温度下 Nar 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图(A)和双对数图(B)

Fig.3 Stern-Volmer diagram (A) and double-log diagram (B) of fluorescence quenching of BSA by Nar at different temperatures

298 K 温度下苦丁皂苷与牛血清白蛋白的结合常数为 5.74×10² L/mol，小于本研究结果，说明 Nar 与 BSA 之间的结合亲和力较强。

2.4 时间分辨荧光光谱分析

时间分辨荧光光谱可用来验证猝灭机制。蛋白与多酚结合过程中平均荧光寿命(τ)的显著变化表明存在动态猝灭机制，而稳定的荧光寿命值则对应静态猝灭机制[35]。如图 4 所示，BSA 的时间分辨荧光光谱呈双指数分布，且 Nar 对 BSA 光谱的影响不大，

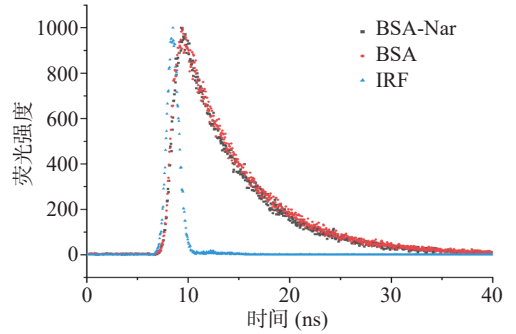


图 4 BSA, Nar 和 BSA-Nar 的荧光衰减曲线

Fig.4 Fluorescence decay curves of BSA, Nar and BSA-Nar

谱图几乎重合。f_i、τ_i、χ^2 和 τ 的结果见表 2。由表 2 可知，χ^2 值均小于 1.3，说明曲线拟合良好。此外，BSA 的 τ 值为 6.45 ns，加入 Nar 后的 τ 值为 6.08 ns，说明平均荧光寿命未发生显著变化，即 τ_0/τ~1[36]。由此推测 Nar 猝灭 BSA 的机制为静态猝灭，这与荧光光谱结果一致。

表 2 Nar 和 BSA-Nar 的荧光寿命衰减参数

Table 2 Fluorescence life time decay parameters of Nar and BSA-Nar

样品	τ_1(ns)	τ_2(ns)	f_1	f_2	<τ>(ns)	χ^2
BSA	6.1956	23.7479	0.9854	0.0146	6.45186358	1.0757
BSA-Nar	5.0177	7.1379	0.501	0.499	6.0756798	0.9777

2.5 同步荧光光谱分析

同步荧光光谱可用来表征 Nar 对 BSA 的 Tyr($\Delta\lambda$=15 nm)和 Trp($\Delta\lambda$=60 nm)微环境的影响[37]。由图 5 可知，随着 Nar 浓度增加，Tyr 和 Trp 荧光均发生不同程度的猝灭，表明 Nar 结合在 Tyr 和 Trp 附近。此外，Tyr 和 Trp 的特征吸收峰分别发生蓝移和红移，表明 Tyr 周围微环境的疏水性增强，Trp 周围

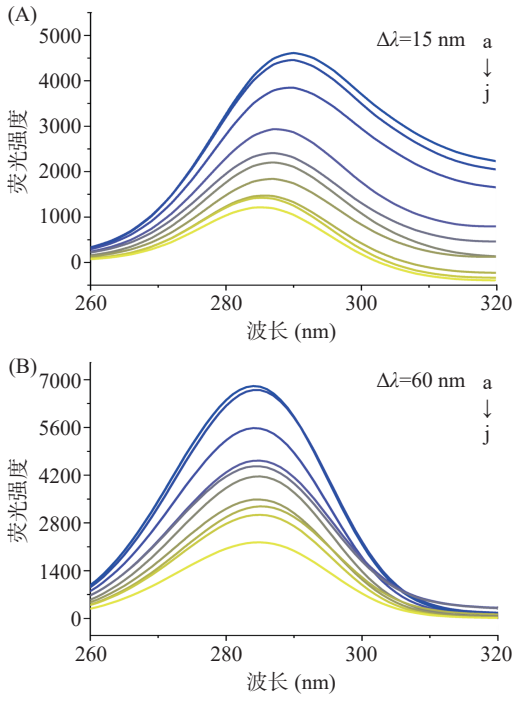


图 5 Nar 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱

Fig.5 Synchronous fluorescence spectra of the interaction between Nar and BSA

注：a→j 表示混合液中 Nar 的浓度为 0~22.5×10⁻⁶ mol/L。

的亲水性增强。相比于 Tyr，同浓度 Nar 对 Trp 的荧光猝灭程度更大，说明 Nar 与 BSA 的结合更靠近 Trp，这与薛燕斌等[38] 对高良姜素与人血清白蛋白相互作用的研究结果类似。

2.6　三维荧光光谱分析

三维荧光光谱能够同时表征 Tyr 和 Trp 周围微环境的变化[39]。图 6 为加入不同浓度 Nar 后 BSA 的三维荧光光谱。表 3 为 BSA 与不同浓度 Nar 混合液三维荧光的特征信息。由图 6 和表 3 可知，峰 a(λ_{ex}=λ_{em})为瑞利散射峰，峰 1 为 BSA 的特征荧光吸收峰(λ_{ex}=285 nm，λ_{em}=352 nm)，主要反映 Trp 和 Tyr 的光谱特征。随着 Nar 浓度增加，荧光吸收峰强度逐渐减弱，且发射波长峰位置发生了轻微红移(3 nm)，说明 Nar 与 BSA 相互作用改变了 Tyr 和 Trp 周围微环境的极性，最终导致蛋白构象发生改变。该结果进一步验证了紫外光谱和荧光光谱的结果。

表 3　BSA 和 Nar-BSA 的三维荧光的特征信息

Table 3　Characteristic parameters of BSA and Nar-BSA obtained from 3D fluorescence experiments

Nar(μmol/L)	峰	峰位置 [λ_{ex}/λ_{em}(nm/nm)]	荧光强度
0	a	400/400	8360
	1	285/352	1839
12.5	a	400/400	9935
	1	285/354	955.5
17.5	a	400/400	9951
	1	285/357	806.7
22.5	a	400/400	10000
	1	285/355	631

2.7　结合位点分析

BSA 主要有两个配体结合位点，一是位于亚结构域 IIA 的位点 I，另一个是位于亚结构域 IIIA 的位点 II[40]。华法林和布洛芬分别特异结合在 BSA 的位点 I 和位点 II。为了确定 Nar 在 BSA 上的结合位点，分别以华法林和布洛芬为荧光探针进行了位点竞争实验。由图 7 可知，随着标记物浓度的增加，华法林的置换率下降至 82%，而布洛芬仅下降到 93%，相比之下，布洛芬对 BSA 与 Nar 的相互作用几乎无干扰作用。这表明华法林对 BSA 与 Nar 结合位点的竞争强于布洛芬。由此推断，Nar 可能结合在位点 I，该结果将通过分子动力学模拟进行验证。

2.8　圆二色谱分析

圆二色谱法可以定量分析蛋白质的二级结构。由图 8 可知，BSA 的圆二色谱在 208 nm 和 220 nm 处显示两个负峰，是 α-螺旋的特征峰[41]。不同浓度的 Nar 对峰形基本无影响，但导致峰强度减弱。经 SELCON3 程序计算所得 BSA 二级结构含量结果如表 4 所示。由表 4 可知，BSA 的二级结构组成为 79.39% α-螺旋，0.20% β-折叠，5.59% β-转角和 14.82% 无规则卷曲。加入浓度为 0.15×10^{-6} mol/L 的 Nar 后，α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲含量分别为 77.67%、0.77%、5.97% 和 15.50%。说明 BSA 的 α-螺旋部分转变为 β-折叠、β-转角和无规则

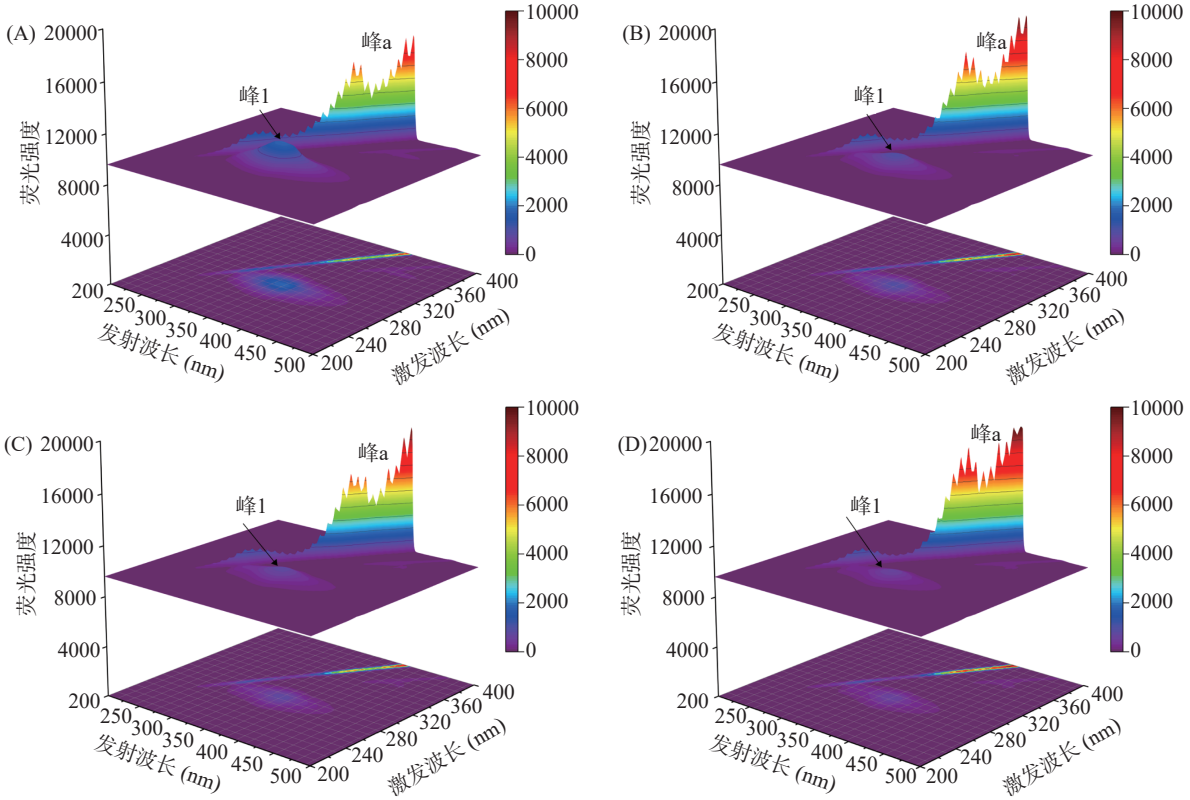


图 6　Nar 与 BSA 相互作用的三维荧光光谱

Fig.6　Three-dimensional fluorescence spectra of the interaction between Nar and BSA

注：A~D 分别为 Nar 浓度为 0、12.5、17.5、22.5 μmol/L 的光谱。

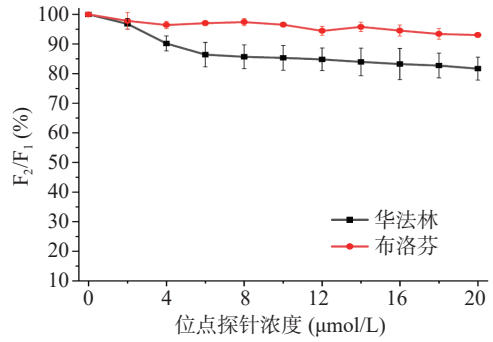


图 7 华法林和布洛芬对 BSA-Nar 荧光强度的影响

Fig.7 Effects of warfarin and ibuprofen on the fluorescence spectra of BSA-Nar

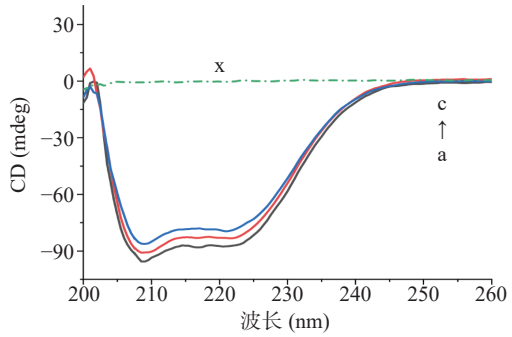


图 8 Nar 与 BSA 相互作用的圆二色谱

Fig.8 Circular dichroism spectra of the interaction between Nar and BSA

注: a→c 表示混合液中 Nar 的浓度为 0~1.5×10^{-5} mol/L; x 为 Nar 的圆二色谱。

表 4 BSA 与 Nar 相互作用的二级结构含量

Table 4 Secondary structure content of the interaction between BSA and Nar

多酚	浓度 (×10^{-6} mol/L)	α-螺旋(%)	β-折叠(%)	β-转角(%)	无规则卷曲 (%)
Nar	0	79.39	0.20	5.59	14.82
	6	77.81	0.77	6.05	15.37
	15	77.67	0.77	5.97	15.50

卷曲, Nar 与 BSA 结合一定程度上改变了 BSA 的内部氢键网络, 这与王靖蕊等[42] 的研究结果类似。

2.9 RMSD 分析

RMSD 能反映模拟过程中蛋白结构与初始构象的平均偏差, 是衡量体系稳定性的重要指标[43]。本研究选取 Nar 附近 20 Å残基用于 RMSD 计算以考察 Nar-BSA 体系在分子动力学模拟过程中的稳定性。选取与 Nar-BSA 体系相同的残基计算 BSA 体系 RMSD, 结果见图 9。由图 9 可知, Nar-BSA 体系的 RMSD 值基本恒定在 2.5 Å。而 BSA 体系 5~55 ns 的 RMSD 值波动在 3.4 Å附近, 55~70 ns 的 RMSD 值高达 4 Å。由此可见, Nar-BSA 比 BSA 体系更稳定, 可能是因为 Nar 结合提高了 BSA 的结构稳定性。

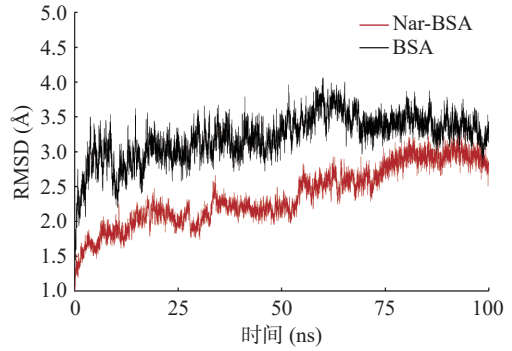


图 9 BSA 和 Nar-BSA 体系在模拟过程中的 RMSD

Fig.9 RMSD of the BSA and Nar-BSA systems during simulations

2.10 RMSF 分析

RMSF 主要用于表征蛋白构象的柔性, 反映氨基酸残基的波动程度[44]。RMSF 越大, BSA 柔性越强, 反之 BSA 刚性越强。由图 10 可知, BSA 与 Nar-BSA 体系 RMSF 值的变化趋势类似, 但整体来看 Nar-BSA 体系的 RMSF 值小于 BSA 体系, 如残基 Glu229 的 RMSF 值分别为 1.53 Å和 2.76 Å, 与 RMSD 结果一致。

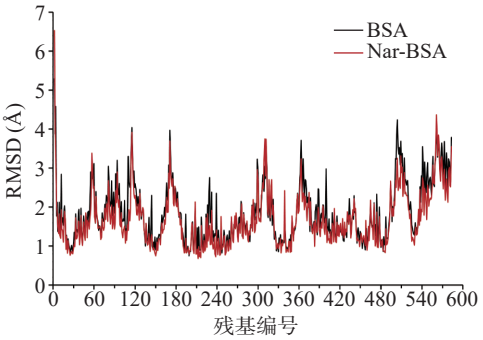


图 10 BSA 和 Nar-BSA 体系在模拟过程中的 RMSF

Fig.10 RMSF of the BSA and Nar-BSA systems during simulations

2.11 结合自由能分析

结合自由能是评估蛋白质与多酚之间结合亲和力的关键指标。本研究采用 MM-PBSA 方法计算了 Nar-BSA 体系 50~100 ns 稳定轨迹的 ΔG, 结果为−14.78 kcal/mol, 略低于 BSA-Que 体系[45]。说明复合物可以自发形成且 Nar 与 BSA 的结合亲和力较强。此外, 对相互作用成分的能量贡献进行了详细解析。$\Delta E_{polar,total}$ 和 $\Delta E_{nonpolar,total}$ 分别为 21.68±3.44 和−36.46±1.12 kcal/mol, 说明总非极性能有利于结合, 而总极性能不利于结合。两者可进一步分解为 $\Delta E_{ele}+\Delta E_{PB}$ 和 $\Delta E_{vdw}+\Delta E_{SA}$, 分别为−15.61、37.29、−33.01 和−3.45 kcal/mol, 说明范德华作用能和非极性溶剂化有利于结合。静电作用能也有利于结合, 但被极性溶剂化能抵消。Nar-BSA 体系的静电作用能强于 BSA-Que 体系, 这可能与 Nar 结构中更多的羟基有关[45]。总的来说, 总非极性相互作用是 Nar 与 BSA 结合过程中的主要驱动力。

2.12 结合能分解

将结合自由能分解以得到对 Nar 结合起关键

作用的残基，本文将能量贡献小于−1 kcal/mol 的残基视为关键残基[46]。由图 11 可知，关键残基为 Arg208、Ala212、Leu326 和 Gly327。其中 Leu326 的能量贡献最大，为−1.67 kcal/mol。Arg208、Ala212 和 Gly327 的能量贡献分别为−1.31、−1.42 和−1.09 kcal/mol，推测 Nar 结合在芳香族氨基酸 Trp213 附近，验证了同步荧光光谱结果。Val215 和 Leu330 也参与了 Nar 结合，能量贡献分别为−0.84 和−0.89 kcal/mol。

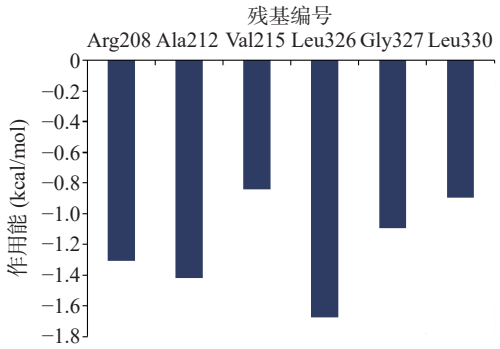


图 11　Nar-BSA 体系的残基结合能分解

Fig.11　Residue binding free energy decomposition of the Nar-BSA system

2.13　接触数分析

为了在结构层面确定 Nar 的结合区域，计算了 Nar-BSA 体系的分子间接触数，将接触数大于 10 的残基视为重要残基[47]。由图 12 可知，重要残基为 Arg208、Lys211、Val215、Phe227、Thr231、Val234、Asp323、Leu326、Leu330，其中 Arg208 和 Lys211 与 Nar 结合最紧密，接触数均为 22。Leu326 的贡献次之，与 Nar 的平均接触数为 19。Val215、Phe227、Thr231、Val234、Leu326 和 Leu330 的接触数贡献分别为 13、10、13、11、19 和 16，这与结合自由能结果类似。

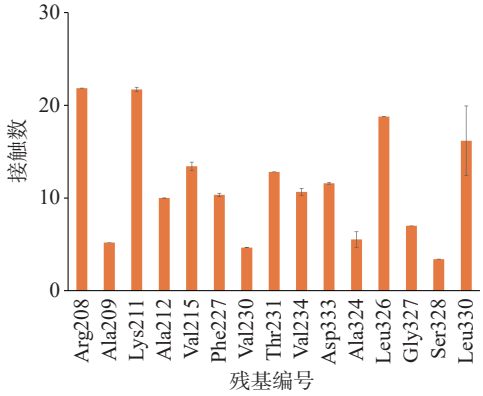


图 12　BSA 和 Nar 之间的平均接触数

Fig.12　Average contact numbers between BSA and Nar

2.14　相互作用分析

接下来分析 Nar 与 BSA 之间的相互作用，首先计算了 Nar-BSA 体系在分子动力学模拟过程中氢键占有率。氢键是维持蛋白结构稳定性的主要作用力[44]。Nar 的 O4 原子易与极性氨基酸 Thr231 形成氢键，占有率为 86.16%。Nar 的 O3 原子与极性氨基酸 Glu353 的 OE1 和 OE2 原子分别形成了占有率为 40.52% 和 35.34% 的氢键。Nar 与 BSA 的结合模式见图 13，Nar 被残基 Leu326、Val215、Glu353、Lys211 和 Thr231 的侧链包围，其中 Leu326 和 Val215 与 Nar 形成了紧密的疏水相互作用。说明氢键和疏水相互作用是维持 Nar-BSA 复合物稳定的主要作用力。

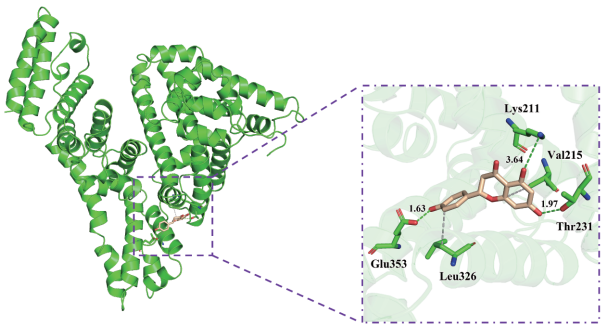


图 13　Nar-BSA 体系的结合模式

Fig.13　Binding mode of the Nar-BSA system

注：氢键和疏水相互作用分别表示为绿色和灰色虚线。

2.15　载药量、包封率、粒径和 Zeta 电位分析

载药量和包封率是评价纳米颗粒包封性能的重要指标。Nar/BSA NPs 的包封率为 87.13%，高于大豆分离蛋白-叶黄素纳米颗粒的包封率[48]。Nar/BSA NPs 的载药量为 41.27 mg/g，与玉米醇溶蛋白-海藻酸钠对姜黄素的载药量基本相当(43.4 mg/g)[49]。说明 BSA 是负载 Nar 的良好载体，用 BSA 包封 Nar 可能是提高其活性的有效手段。

BSA NPs 和 Nar/BSA NPs 的平均粒径、分散系数和 Zeta 电位如表 5 所示。BSA NPs 平均粒径为 126.13±5.87 nm，加入 Nar 后纳米颗粒的粒径为 582.73±98.91 nm，这可能是因为 Nar 结合使得 BSA 疏水区域暴露，表面电荷被剥夺，静电排斥效应减小，颗粒尺寸变大[50]。分散系数代表粒径分布的均匀性，

表 5　BSA NPs 和 Nar/BSA NPs 的平均粒径、分散系数和 Zeta 电位

Table 5　Average particle size, polydispersity index and Zeta potential of BSA NPs and Nar /BSA NPs

样品	平均粒径(nm)	分散系数	Zeta电位(mV)
BSA NPs	126.13±5.87^{a}	0.28±0.04^{a}	−64.64±15.72^{b}
Nar/BSA NPs	582.73±98.91^{b}	0.61±0.13^{b}	−28.92±3.24^{a}

注：不同小写英文字母表示同列数据差异显著，P<0.05。

分散系数越低表示粒径大小越均匀。Nar/BSA NPs 的分散系数为 0.61±0.13，说明纳米颗粒分布较为均匀。Nar/BSA NPs 的 Zeta 电位为−28.92±3.24 mV，绝对值接近 30 mV，说明制备的 Nar/BSA NPs 稳定性较好，这与两者间的疏水和范德华力有关[51−52]。

2.16 傅里叶红外光谱

Nar、BSA NPs 和 Nar/BSA NPs 的红外光谱如图 14 所示。BSA 的特征吸收带主要有酰胺 I 带（1600~1700 cm^{-1}）、酰胺 II 带（1500~1600 cm^{-1}）和 O-H 伸缩振动（3300~3400 cm^{-1}）[53]。由图 14 可知，相比于 BSA NPs，Nar/BSA NPs 特征吸收带的强度和位置均发生了变化。酰胺 I 带和酰胺 II 带分别由 1655.3 和 1538.4 cm^{-1} 移动至 1648.3 和 1523.8 cm^{-1}，O-H 伸缩振动由 3291.6 cm^{-1} 移动至 3285.4 cm^{-1}，这可能是由于氢键和疏水相互作用参与了 BSA 与 Nar 的结合[53]。Nar 在 1463 和 1082 cm^{-1} 处的特征吸收带分别代表 O-H 弯曲和 C-O 伸缩[54]。然而，Nar/BSA NPs 的光谱中不存在 Nar 的这些特征吸收带，表明 Nar 成功包封于 BSA 纳米颗粒中。

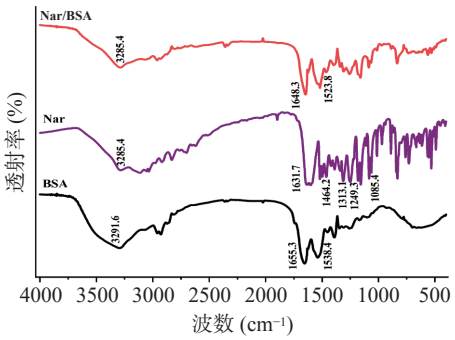


图 14 Nar、BSA NPs 和 Nar/BSA NPs 的红外光谱

Fig.14 FTIR spectra of Nar, BSA NPs and Nar/BSA NPs

2.17 抗氧化活性分析

Nar 由于酚羟基的存在具有较强的抗氧化活性[55]。为了评估 BSA 对 Nar 抗氧化活性的影响，测定了 DPPH、$ABTS^+$自由基清除活性和铁离子还原能力。Nar、BSA NPs 和 Nar/BSA NPs 的 DPPH 自由基清除活性如图 15（A）所示。由图 15（A）可知，随着贮藏时间增加，各样品 DPPH 自由基清除活性均下降，这可能是由于样品的降解造成的。然而，Nar/BSA NPs DPPH 自由基清除活性始终大于游离 Nar。贮藏第 6 d，Nar 和 Nar/BSA NPs 的 DPPH 自由基清除率分别为 9.30% 和 11.42%，这可能是 BSA 包封提高了 Nar 的水溶性[56]。此外，BSA 可能对 Nar 活性基团起到一定保护作用。

$ABTS^+$自由基清除活性结果与 DPPH 自由基结果整体趋势相似（图 15（B））。贮藏 4 d 后，游离 Nar 的 $ABTS^+$自由基清除活性强于 Nar/BSA NPs，可能是由于 Nar 的活性基团被掩盖[21]。铁离子还原能力结果如图 15（C）所示。由图 15（C）可知，Nar/BSA NPs 的铁离子还原能力强于游离 Nar。此外，Nar/BSA NPs 前期的铁离子还原能力大于游离 Nar 和 BSA NPs 的理论相加值，说明 BSA 包封对 Nar 抗氧化能力有增效作用。铁离子还原能力与自由基清除结果略有差异，可能是由于铁离子空间位阻小，更易与 Nar/BSA NPs 相互作用[57]。因此三种方法联用可以综合评估 BSA 对 Nar 抗氧化活性的影响。

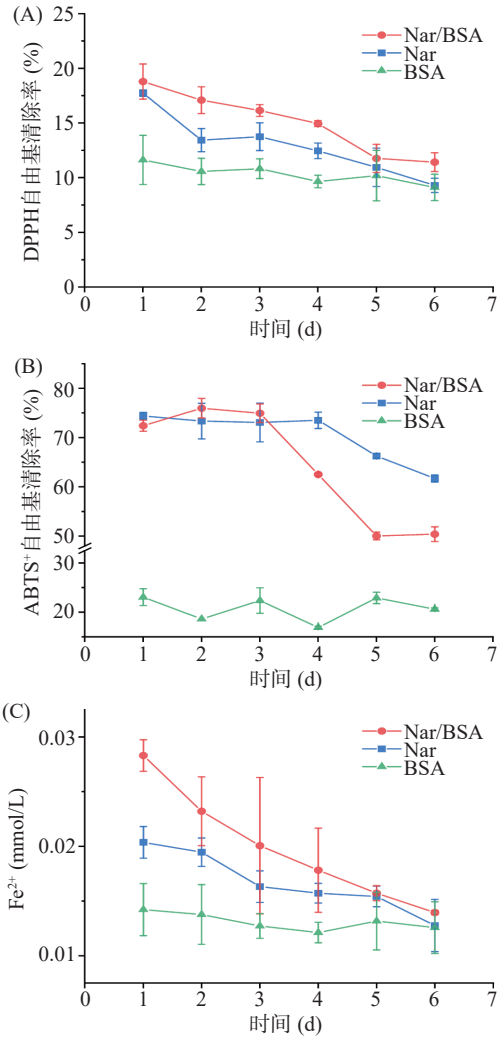


图 15 BSA、Nar 和 Nar/BSA NPs 的 DPPH 自由基清除活性（A）、$ABTS^+$自由基清除活性（B）和铁离子还原能力（C）

Fig.15 DPPH radical scavenging activity (A), $ABTS^+$ radical scavenging activity (B) and ferric ion reducing antioxidant power (C) of BSA, Nar and Nar/BSA NPs

2.18 体外消化释放特性

通过测定游离 Nar 和 Nar/BSA NPs 的胃肠道释放特性评估其生物可及性[58]。如图 16 所示，前 3 h Nar 在两种介质中的释放速度相近，3 h 后差异明显，在模拟肠液中累积释放率较高，35 h 后释放率趋于平衡。继续释放 26 h，Nar 在模拟胃液和肠液的累积释放率分别为 79% 和 89%。然而，Nar/BSA NPs 在模拟胃液和肠液的累积释放率分别为 62% 和 86%，说明 BSA 包封对 Nar 产生了较好的缓释效果，提高了 Nar 的生物可及性。此外，Nar/BSA NPs 在模拟肠液的释放率高于胃液，有利于 Nar 的吸收利用。

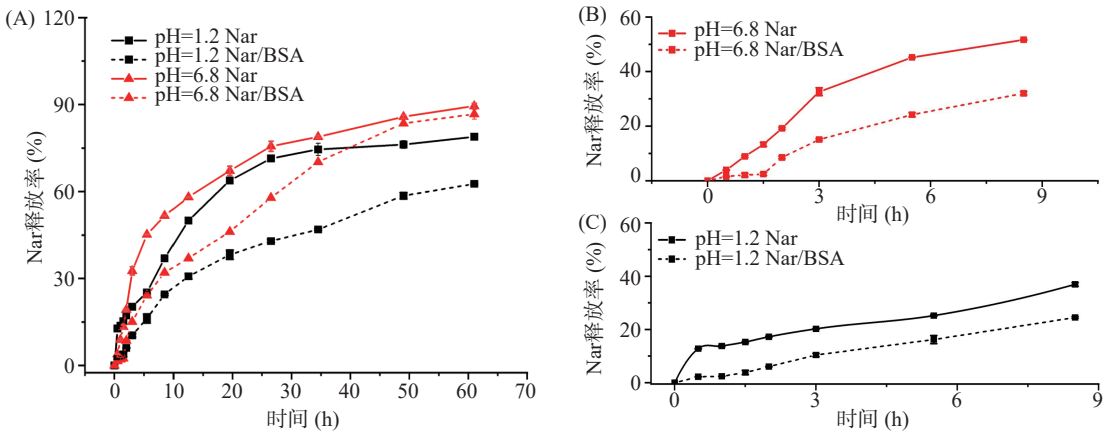


图 16　Nar 和 Nar/BSA NPs 的体外释放曲线

Fig.16　Release curves of Nar and Nar/BSA NPs *in vitro*

注：A 为样品在 61 h 内的释放曲线；B~C 为图 A 局部放大图。

3　结论

本文通过多光谱法和分子动力学模拟研究了 BSA 与 Nar 的相互作用机制，并探讨了 BSA 对 Nar 抗氧化活性和体外释放特性的影响。紫外光谱结果表明，Nar 导致 BSA 的特征吸收峰发生了轻微的红移。荧光光谱和时间分辨荧光光谱结果表明，Nar 导致 BSA 的内源荧光发生猝灭，猝灭类型为静态猝灭。Nar 在 BSA 上只有 1 个结合位点且结合常数为 1.7×10^4 L/mol。同步荧光光谱结果表明，Nar 的结合改变了 BSA 中 Tyr 和 Trp 的微环境，且对 Trp 的荧光猝灭效率大于 Tyr。位点竞争结果表明，Nar 结合在 BSA 的位点Ⅰ。分子动力学模拟验证了多光谱实验结果，表明 Nar 与 BSA 的结合自由能为 −14.78 kcal/mol，主要作用力为氢键和疏水相互作用，与 Nar 结合最紧密的残基为 Arg208、Ala212、Leu326 和 Gly327。此外，BSA 包封提高了 Nar 的抗氧化活性，且对 Nar 在模拟胃肠液中的释放起到一定缓释作用。本研究为 BSA 有效负载 Nar 提供了思路，为 Nar 应用于功能食品领域提供了理论基础。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] CHEN J, QIN X, CHEN M, et al. Biological activities, molecular mechanisms, and clinical application of naringin in metabolic syndrome[J]. Pharmacological Research, 2024, 202: 107124.

[2] UÇAR K, GÖKTAŞ Z. Biological activities of naringenin: A narrative review based on in *vitro* and *in vivo* studies[J]. Nutrition Research, 2023, 119: 43−55.

[3] AMEEN F, SIDDIQUI S, JAHAN I, et al. A detailed insight into the interaction of memantine with bovine serum albumin: A spectroscopic and computational approach[J]. Journal of Molecular Liquids, 2020, 303: 112671.

[4] LÜ Y, LIANG Q, LI Y, et al. Study of the binding mechanism between hydroxytyrosol and bovine serum albumin using multispectral and molecular docking[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122: 107072.

[5] MA R H, WANG W, HOU C P, et al. Structural characterization and stability of glycated bovine serum albumin-kaempferol nanocomplexes[J]. Food Chemistry, 2023, 415: 135778.

[6] ZHONG L, WANG R, WEN Q H, et al. The interaction between bovine serum albumin and [6]-, [8]- and [10]-gingerol: An effective strategy to improve the solubility and stability of gingerol [J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131280.

[7] 朱国飞, 滕腾, 邓斌. 分子对接模拟与光谱法研究没食子酸丙酯和牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 158−164,191. [ZHU G F, TENG T, DENG B. Study on the interaction between propyl gallate and bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy and molecular docking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(18): 158−164,191.]

[8] TUCKERMAN M E, MARTYNA G J. Understanding modern molecular dynamics: Techniques and applications[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2000, 104(2): 159−178.

[9] ZHANG Y, TAN H, ZHAO J X, et al. Structural change from homogenous structure to staging in benzoic acid intercalated LDH: experimental and molecular dynamics simulation insights[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2012, 14(25): 9067−9075.

[10] YU X, CAI X, LUO L, et al. Influence of tea polyphenol and bovine serum albumin on tea cream formation by multiple spectroscopy methods and molecular docking[J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127432.

[11] NASIRI F, DEHGHAN G, SHAGHAGHI M, et al. Probing the interaction between 7-geranyloxycoumarin and bovine serum albumin: Spectroscopic analyzing and molecular docking study[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, 254: 119664.

[12] 胡婷, 耿勤, 付敏, 等. 多光谱学与分子模拟技术表征甜菜苷与乳清蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 86−94. [HU T, GENG Q, FU M, et al. The interaction between betanin and whey protein: Based on multi-spectroscopy and molecular simulation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 86−94.]

[13] ZHANG X, LU Y, ZHAO R, et al. Study on simultaneous binding of resveratrol and curcumin to *β*-lactoglobulin: Multi-spectroscopic, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107331.

[14] MALEKI S, DEHGHAN G, SADEGHI L, et al. Surface plas-

mon resonance, fluorescence, and molecular docking studies of bovine serum albumin interactions with natural coumarin diversin [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 230: 118063.

[15] 吕艳芳, 梁倩倩, 郭雨晴, 等. 分子对接和光谱法研究原儿茶醛和阿魏酸与牛血清白蛋白的互作机理[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 24−31. [LÜ Y F, LIANG Q Q, GUO Y Q, et al. Studying interactions of protocatechuic aldehyde and ferulic acid with bovine serum albumin by molecular docking and spectroscopy[J]. Food Science, 2022, 42(14): 24−31.]

[16] SUI X, SUN H, QI B, et al. Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 871−878.

[17] HAN P, AN N, YANG L, et al. Molecular dynamics simulation of the interactions between sesamol and myosin combined with spectroscopy and molecular docking studies[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 131: 107801.

[18] HORNAK V, ABEL R, OKUR A, et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2006, 65(3): 712−725.

[19] WANG J, WOLF R M, CALDWELL J W, et al. Development and testing of a general amber force field[J]. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25(9): 1157−1174.

[20] KUZMANIC A, ZAGROVIC B. Determination of ensemble-average pairwise root mean-square deviation from experimental B-factors[J]. Biophysical Journal, 2010, 98(5): 861−871.

[21] 刘曼丽, 钟金锋, 刘雄, 等. 牛血清白蛋白与辛烯基琥珀酸淀粉酯糖基化产物改善谷维素的理化性质和生物可及度[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(24): 166−171. [LIU M L, ZHONG J F, LIU X, et al. Improving the physicochemical property and bioavailability of γ-oryzanol by theglycosylation product of bovine serum albumin and octenylsuccinate anhydride starch[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(24): 166−171.]

[22] LI H, SONG J, LIU C, et al. Corn starch/β-Cyclodextrin composite nanoparticles for encapsulation of tea polyphenol and development of oral targeted delivery systems with pH-responsive properties[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 151: 109823.

[23] 刘建垒, 邢效娟, 周瑞, 等. 牛血清白蛋白与槲皮素及花青素相互作用方式及其纳米颗粒特征的比较[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 7−13. [LIU J L, XING X J, ZHOU R, et al. Interaction modes and nanoparticle characteristics of bovine serum albumin with quercetin and anthocyanin[J]. Food Science, 2017, 38(5): 7−13.]

[24] 张会敏, 刘国宸, 任李宁, 等. 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷与牛血清白蛋白相互作用及对蛋白性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(11): 199−207. [ZHANG H M, LIU G C, REN L N, et al. Interaction of cyanidin-3-O-glucoside with bovine serumalbumin and its effect on protein properties[J]. Food and Fermentation Industry, 2025, 51(11): 199−207.]

[25] JU M, ZHU G, HUANG G, et al. A novel pickering emulsion produced using soy protein-anthocyanin complex nanoparticles[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 99: 105329.

[26] YANG J, ZHAO Y, SHAN B, et al. Study on the interaction and functional properties of *Dolichos lablab* L. protein-tea polyphenols complexes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 250: 126006.

[27] SALEHIABAR M, NOSRATI H, JAVANI E, et al. Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin as controlled release carrier for curcumin delivery[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 83−89.

[28] NEHRU S, VEERALAKSHMI S, KALAISELVAM S, et al. Protein binding and antioxidant studies of diimine based emissive surfactant–ruthenium(II) complexes[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020, 39(5): 1535−1546.

[29] 刘丽莉, 于影, 苏克楠, 等. 植物多酚-牛血清白蛋白相互作用及对蛋白质结构的影响[J]. 农业工程学报, 2023, 39(13): 290−298. [LIU L L, YU Y, SU K N, et al. Polyphenol-bovine serum albumininteraction and its influenceon protein structure[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2023, 39(13): 290−298.]

[30] GU J, LIU H, HUANG X, et al. Investigation of the separate and simultaneous bindings of warfarin and fenofibrate to bovine serum albumin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 236: 123978.

[31] 梁鑫富, 董庆亮. 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 37−44. [LIANG X F, DONG Q L. Spectroscopic method combined with molecular docking techniqueto study the interaction of limonin with bovine serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 37−44.]

[32] PARAMAGURU G, KATHIRAVAN A, SELVARAJ S, et al. Interaction of anthraquinone dyes with lysozyme: Evidences from spectroscopic and docking studies[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 175(1−3): 985−991.

[33] WARE W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: An experimental study of the diffusion process[J]. Journal of Physical Chemistry, 1962, 66(3): 455−458.

[34] 胡夏恬, 倪帅帅, 焦安妮, 等. 苦丁皂苷 L、苦丁皂苷 N 与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 55−60. [HU X T, NI S S, JIAO A N, et al. Study on the interaction between *Kudinoside* L, *Kudinoside* N and bovine serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 55−60.]

[35] DUAN R, WU D, TANG L, et al. Interactions of the cis and trans states of an azobenzene photoswitch with lysozyme induced by red and blue light[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 229: 117965.

[36] SWAIN B C, SUBADINI S, ROUT J, et al. Biophysical study on complex formation between β-Lactoglobulin and vitamin B12[J]. Food Chemistry, 2020, 312: 126064.

[37] 苏贤坤, 孙振春, 杨慧, 等. 光谱法与计算机辅助研究 α-西柏三烯二醇与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 1−10. [SU X K, SUN Z C, YANG H, et al. Multispectroscopic and computational study of the interaction between α-cembrenediol and bovine serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(11): 1−10.]

[38] 薛燕斌, 乔华, 李波, 等. 光谱法研究高良姜素与人血清白蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(18): 65−68,73. [XUE Y B, QIAO H, LI B, et al. Spectroscopic analysis of interactionbetween galangin and human serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(18): 65−68,73.]

[39] 步营, 周洋, 韩梦琳, 等. 没食子酸对蓝鳍金枪鱼肌肉品质及肌红蛋白构象的影响[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(6): 79−90. [BU Y, ZHOU Y, HAN M L, et al. Effect of gallic acid on muscle quality and myoglobin conformation in bluefin tuna[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(6): 79−90.]

[40] SHI J H, PAN D Q, WANG X X, et al. Characterizing the

binding interaction between antimalarial artemether（AMT）and bovine serum albumin（BSA）: Spectroscopic and molecular docking methods[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2016, 162: 14−23.
[41] 焦安妮, 于敏, 关玥, 等. 大叶冬青皂苷与牛血清蛋白的相互作用研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 8−14. [JIAO A N, YU M, GUAN Y, et al. Study on the interaction between the saponins of *Ilex latifolia* thunb and bovine serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 8−14.]
[42] 王靖蕊, 彭佳敏, 代成, 等. 基于光谱和分子模拟研究半乳甘露聚糖和人血清白蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 42−49. [WANG J R, PENG J M, DAI C, et al. Study on the interaction mechanism between galactomannan and human serum albumin by spectroscopy and molecular docking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 42−49.]
[43] 李镜浩, 梁展鸿, 肖更生, 等. 分子动力学模拟分析超高压对固液两态多酚氧化酶稳定性的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(16): 33−44. [LI J H, LIANG Z H, XIAO G S, et al. Effect of ultra-high pressure on the stability of polyphenol oxidase in the solid and liquid states analyzed by molecular dynamics simulation[J]. Food Science, 2024, 45(16): 33−44.]
[44] 陈阴竹, 李琴, 胡凯弟, 等. C 端替换提高酚酸脱羧酶 BJ6PAD 的底物催化活性及其分子动力学模拟[J]. 食品科学, 2025, 46(10): 95−107. [CHEN Y Z, LI Q, HU K D, et al. C-terminal substitution for enhanced catalytic activity of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis* J6 and its molecular dynamics simulation[J]. Food Science, 2025, 46(10): 95−107.]
[45] GUO Y, TONG J, GUO Y, et al. Interaction, stability and bioaccessibility of bovine serum albumin-quercetin/myricetin complexes: Multi-spectroscopy and molecular dynamics simulation studies[J]. Food Hydrocolloids, 2025, 160: 110836.
[46] YLILAURI M, PENTIKäINEN O T. MMGBSA as a tool to understand the binding affinities of filamin–peptide interactions[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2013, 53(10): 2626−2633.
[47] SALIMI A, LI H, LEE J Y. Molecular insight into the early stage of amyloid-β(1-42) Homodimers aggregation influenced by histidine tautomerism[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184: 887−897.
[48] 张欣, 孙敬蒙, 贾珍珍, 等. 叶黄素复合纳米颗粒的制备工艺优化及其稳定性和抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(16): 102−113. [ZHANG X, SUN J M, JIA Z Z, et al. Optimization of lutein complex nanoparticle preparation processand analysis of stability and antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(16): 102−113.]
[49] 翁玲, 张彦慧, 张若宁, 等. 玉米醇溶蛋白-海藻酸钠纳米颗粒的制备及其负载姜黄素的研究[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(3): 25−34. [WENG L, ZHANG Y H, ZHANG R N, et al. Preparation of zein sodium alginate nanoparticles and their loading-with curcumin[J]. China Food Additives, 2024, 35(3): 25−34.]
[50] LIU J, JIANG L, ZHANG Y, et al. Binding behaviors and structural characteristics of ternary complexes of β-lactoglobulin, curcumin, and fatty acids[J]. RSC Advances, 2017, 7(73): 45960−45967.
[51] LIU Y, YANG J, ZHAO Z, et al. Formation and characterization of natural polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2012, 379(1): 130−140.
[52] PéREZ O E, DAVID-BIRMAN T, KESSELMAN E, et al. Milk protein–vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on *in vitro* gastro-duodenal proteolysis[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38: 40−47.
[53] KALIRAJAN R, MURALIDHARAN V, JUBIE S, et al. Synthesis of some novel pyrazole-substituted 9-anilinoacridine derivatives and evaluation for their antioxidant and cytotoxic activities[J]. Journal of Heterocyclic Chemistry, 2012, 49(4): 748−754.
[54] RABHA B, BHARADWAJ K K, BORO N, et al. Cheilocostus speciosus extract-assisted naringenin-encapsulated poly-ε-caprolactone nanoparticles: Evaluation of anti-proliferative activities[J]. Green Chemistry, 2021, 23(19): 7701−7711.
[55] CHOWDHURY A, GORAIN B, MITRA MAZUMDER P. Recent advancements in drug delivery system of flavonoids with a special emphasis on the flavanone naringenin: exploring their application in wound healing and associated processes[J]. Inflammopharmacology, 2024, 33(1): 69−90.
[56] WANG M, FU Y, CHEN G, et al. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan and tea polyphenols coating on zein nanoparticles to encapsulate β-carotene by anti-solvent precipitation method[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 577−587.
[57] RUMPF J, BURGER R, SCHULZE M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233: 123470.
[58] 宋亚楠, 朱玲, 张晖, 等. 4 种白藜芦醇蛋白纳米颗粒的生物可及性研究[J]. 中国食品学报, 2025, 25(1): 103−112. [SONG Y N, ZHU L, ZHANG H, et al. Studies on bioavailability of four resveratrol protein nanoparticles[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(1): 103−112.]