

生化与药用试剂

谷胱甘肽对丁基化羟基甲苯与牛血清白蛋白作用机制影响的
光谱研究

吴雨彤, 王俊茜, 赵刚*

(渤海大学 化学与材料工程学院, 辽宁 锦州 121013)

摘要:丁基化羟基甲苯(BHT)是一种合成酚类抗氧化剂,也是一种潜在的内分泌干扰物。采用荧光光谱法、紫外光谱法和时间分辨荧光光谱法等表征方法,研究了BHT与牛血清白蛋白(BSA)的结合机制,以及谷胱甘肽(GSH)对二者相互作用的影响。BHT主要通过疏水作用与BSA形成较为稳定的复合物($K_b = 1.11 \times 10^4$ L/mol),并改变了BSA的二级结构。但GSH会改变BHT与BSA的作用力类型,降低BHT与BSA的结合常数($K_b = 2.11 \times 10^3$ L/mol),抑制BHT与BSA的结合,增大二者的结合距离,并且在一定程度上削弱BHT对BSA二级结构的改变。不过,BHT对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH 自由基)的清除能力不受GSH共存的影响。

关键词:丁基化羟基甲苯;牛血清白蛋白;谷胱甘肽;结合机制;光谱法

中图分类号:O657 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)08-0019-06

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0053

Spectral Study on the Effect of Glutathione on the Interaction between Butylated Hydroxytoluene and Bovine Serum Albumin WU Yu-tong, WANG Jun-qian, ZHAO Gang* (College of Chemistry and Materials Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: Butylated hydroxytoluene (BHT) is a synthetic phenolic antioxidant, and also a potential endocrine disruptor. The binding mechanism of BHT to bovine serum albumin (BSA) and the effect of glutathione (GSH) on the interaction were investigated by fluorescence spectroscopy, UV spectroscopy and time-resolved fluorescence spectroscopy. BHT formed stable complex with BSA mainly through hydrophobic interaction ($K_b = 1.11 \times 10^4$ L/mol), and changed the secondary structure of BSA. However, GSH changed the binding forces of BHT and BSA ($K_b = 2.11 \times 10^3$ L/mol), reduced the binding constants, inhibited the binding, increased the binding distance of them, and weakened the changes of BSA secondary structure by BHT in some extent. Fortunately, BHT's ability to scavenge 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals remained unaffected by GSH coexistence.

Key words: butylated hydroxytoluene; bovine serum albumin; glutathione; binding mechanism; spectrometry

食品生产中常使用抗氧化剂以防止或延缓食品氧化、提高食品的稳定性以及延长贮存期。BHT是一种合成酚类抗氧化剂,可以通过降低氧化和减少食品中脂肪的酸败来防止食品风味和颜色的变化^[1]。BHT常被用于高脂糕点、食用油、罐头食品、婴儿糖果和肉制品等食品中,以保持和稳定新鲜度、营养成分、风味和颜色^[2]。然而,过量摄入BHT会损害人类的肝脏、肺等器官^[3],导致身体和肝脏畸形、DNA损伤、荷尔蒙破坏和氧化应激^[4],被认为是潜在的肿瘤促进剂、致癌物和内分泌干扰物^[5]。目前,美国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)设定的BHT每日可接受摄入量(ADI)为0~0.125 mg/kg^[6]。

前期研究结果显示,与BHT结构相似的抗氧化剂BHA被肠道吸收进入血液,与血清白蛋白

(SA)结合^[7],并改变其结构,甚至可能会影响其正常的生理功能。SA是脊椎动物循环系统中的主要运输蛋白^[8],在内源性物质和外源性物质的吸收、分布、代谢等生理活动中起重要作用。Al-Shabib等^[9]证明BHT对SA具有较强的亲和力,并改变其二级结构。然而,如何减小BHT对蛋白质毒性的影响尚不清楚。GSH是细胞中最常见

收稿日期:2024-01-22;网络首发日期:2024-05-15

基金项目:渤海大学博士启动项目(0522BS028-02/05013)。

作者简介:吴雨彤(2005-),女,辽宁锦州人,本科生,主要研究方向为分析化学。

通讯作者:赵刚, E-mail: bhdxfhx@163.com。

引用本文:吴雨彤, 王俊茜, 赵刚. 谷胱甘肽对丁基化羟基甲苯与牛血清白蛋白作用机制影响的光谱研究[J]. 化学试剂, 2024, 46(8): 19-24.

的非蛋白硫醇,它通过附着在药物上或与药物相互作用,以防止蛋白质或 DNA 免受氧化损伤,维持免疫功能,以及帮助 DNA 修复^[10]。例如,用 GSH 作肝脏中的保护剂,以防止危险或致癌物的危害^[11]。GSH 已被证明可以减缓 3,4',5-三溴糖酰苯胺和 HSA 的结合^[12]。GSH 在抑制 BHT 对大鼠肝脏和小鼠肺的某些毒性作用方面也发挥着重要作用^[13]。本文从结合亲和力、结合作用力、BSA 构象影响等方面,对比研究了 GSH 对 BHT 和 BSA 结合过程的影响,为了解酚类抗氧化剂对 SA 的干扰机制以及合成抗氧化剂的合理使用等提供参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

F-380 型荧光分光光度计(天津港东科技股份有限公司);UV-2800 型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);FLS1000 型稳态和瞬态荧光光谱仪(英国爱丁堡仪器有限公司)。

牛血清白蛋白(BSA,北京索莱宝科技有限公司);丁基化羟基甲苯(BHT,天津大茂化学试剂厂);谷氨酸(GSH,上海毕得医药科技有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、华法林钠(WAR)、布洛芬(IBU)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光光谱的测定

BHT 与 BSA 的相互作用:用 Tris-HCl 缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 7.40, 0.15 mol/L NaCl)配制 1.0×10^{-6} mol/L BSA 溶液,分别在 298、303、310 K 的 3 个温度下,用 1.0×10^{-3} mol/L BHT 溶液连续滴定 BSA 溶液 6 次,每次 10 μ L,测定荧光光谱。

GSH 对 BHT 与 BSA 相互作用的影响:分别在 298、303、310 K 温度下,将 1.0×10^{-6} mol/L BSA 溶液和 3.0×10^{-6} mol/L GSH 溶液充分混匀,用 1.0×10^{-3} mol/L BHT 溶液连续滴定 6 次,每次 10 μ L,测定荧光光谱。 $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 300 \sim 500$ nm,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm。用 BHT 在激发波长和发射波长处的吸光度(A_{ex} 和 A_{em}),根据公式(1)^[14]对测得的荧光强度(F_{obs})进行修正,得到校正荧光强度(F_{cor}),以消除内滤荧光的影响。

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} \times e^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2} \quad (1)$$

1.2.2 紫外光谱的测定

BHT 与 BSA 的相互作用:用 1.0×10^{-3} mol/L BHT 溶液连续滴定 1.0×10^{-6} mol/L BSA 溶液 6 次,每次 10 μ L,测定紫外光谱。

GSH 对 BHT 与 BSA 相互作用的影响:将 1.0×10^{-6} mol/L BSA 溶液和 3.0×10^{-6} mol/L GSH 溶液充分混匀,用 1.0×10^{-3} mol/L BHT 溶液连续滴定 6 次,每次 10 μ L,测定紫外光谱。以 Tris-HCl 缓冲溶液和相应浓度的 BHT 做参比,在 200 ~ 300 nm 范围内记录紫外光谱。

1.2.3 三维荧光光谱的测定

分别测定 1.0×10^{-6} mol/L BSA 溶液; 1.0×10^{-6} mol/L BSA 溶液和 3.0×10^{-6} mol/L GSH 溶液混合溶液;以及 1.0×10^{-6} mol/L BSA 溶液、 3.0×10^{-6} mol/L GSH 溶液和 1.0×10^{-5} mol/L BHT 溶液混合溶液的三维荧光光谱。激发波长 200 ~ 500 nm,增量 5 nm;发射波长 200 ~ 550 nm,增量 2 nm。

1.2.4 时间分辨荧光光谱的测定

分别测定 1.0×10^{-5} mol/L BSA 溶液; 1.0×10^{-5} mol/L BSA 溶液和 3.0×10^{-5} mol/L GSH 溶液混合溶液;以及 1.0×10^{-5} mol/L BSA 溶液、 3.0×10^{-5} mol/L GSH 溶液和 1.0×10^{-4} mol/L BHT 溶液混合溶液的时间分辨荧光光谱。激发波长和发射波长分别设置为 295、350 nm,用仪器自带软件分析数据,计算 BSA 的荧光寿命,并用 χ^2 值评估拟合。

1.2.5 位点竞争实验

将 1.0×10^{-6} mol/L BSA 溶液和 1.0×10^{-6} mol/L 布洛芬/华法林溶液充分混匀,再用 1.0×10^{-3} mol/L BHT 溶液连续滴定 6 次,每次 10 μ L。激发波长 280 nm,发射波长 300 ~ 500 nm,记录荧光光谱。

1.2.6 DPPH 自由基清除实验

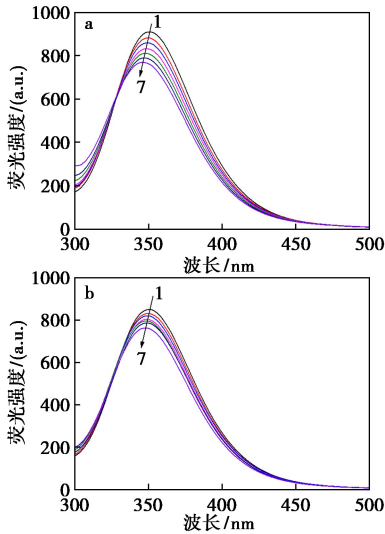
用无水乙醇配制 1.0×10^{-4} mol/L DPPH 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光储存,每周新鲜制备。将 3 mL DPPH 分别与不同浓度的 BHT 溶液或 BHT-GSH ($n(\text{BHT}) : n(\text{GSH}) = 1 : 1$) 溶液混合均匀,避光反应 30 min,记录 517 nm 处的吸光度^[15]。

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭法

荧光猝灭法用来研究 BHT 与 BSA 的相互作用机制。图 1 显示了 BHT 对 BSA 荧光光谱的猝

灭情况以及 GSH 存在时的猝灭情况。BSA 在 351 nm 有较强荧光发射峰,其强度随 BHT 浓度的增加而减小,浓度为 1.96×10^{-5} mol/L 的 BHT 使其



$c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L; 1→7 代表 $c_{\text{BHT}} = 0, 3.3, 6.6, 9.9, 13.1, 16.3, 19.6 \times 10^{-6}$ mol/L; $c_{\text{GSH}} = 3.0 \times 10^{-6}$ mol/L
a. BHT-BSA; b. BHT(BSA-GSH)

图 1 GSH 对 BSA 与 BHT 荧光光谱的影响

Fig.1 Effect of GSH on fluorescence spectra of BSA and BHT

猝灭 15.5%, 并且发生 6 nm 的蓝移, 这说明 BHT 与 BSA 发生了相互作用, 并且诱导氨基酸残基微环境极性的减小^[16]。然而, 当 GSH 存在时, BHT 对 BSA 的荧光猝灭减小至 10.2%, 位移也减小至 2 nm, 表明 GSH 会影响 BHT 对 BSA 的荧光猝灭, 以及减弱 BHT 对 BSA 微环境极性的影响。

BHT 对 BSA 的荧光猝灭机制可能是静态猝灭(复合物形成)或动态猝灭(分子碰撞)。根据 Stern-Volmer 方程(2)^[17]:

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

由 F_0 (与 BHT 作用前 BSA 的荧光强度)、 F (与 BHT 作用后 BSA 的荧光强度)、 τ_0 (BSA 平均荧光寿命) 和 Q (BHT 浓度) 计算 Stern-Volmer 猝灭常数 K_{SV} 和双分子动态猝灭速率常数 k_q , 列于表 1。一般来说, 温度升高, 复合物在静态猝灭时稳定性降低, K_{SV} 减小; 而动态猝灭时分子碰撞效率增大, K_{SV} 增大^[18]。BHT 与 BSA 作用的 K_{SV} 值随温度的升高而减小, 并且 $k_q > 2.0 \times 10^{10}$ L/(mol·s) (配体对 SA 的最大扩散碰撞猝灭常数), 表明形成 BHT-BSA 复合物的静态猝灭是 BSA 荧光猝灭的主要原因。三元体系中, GSH 使 BHT 与 BSA 作用的 K_{SV} 值减小, 但荧光猝灭机制没变。

表 1 BHT 与 BSA 相互作用的常数

Tab.1 Interaction constants of BHT and BSA

	T/K	$K_{SV}/$ (L·mol ⁻¹)	$k_q/$ (L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹)	$K_b/$ (L·mol ⁻¹)	n	$\Delta H/$ (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta S/$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	$\Delta G/$ (kJ·mol ⁻¹)
BHT-BSA	298	9.85×10^3	1.64×10^{12}	1.11×10^4	1.01			-23.23
	303	7.38×10^3	1.23×10^{12}	2.01×10^4	1.09	64.21	293.45	-24.70
	310	5.37×10^3	8.95×10^{11}	3.08×10^4	1.16			-26.75
BHT-(BSA-GSH)	298	5.58×10^3	9.30×10^{11}	2.11×10^3	0.91			-19.05
	303	4.99×10^3	8.32×10^{11}	1.41×10^3	0.88	-73.55	-182.87	-18.14
	310	4.59×10^3	7.65×10^{11}	6.77×10^2	0.81			-16.86

2.2 结合常数和结合位点

BHT 与 BSA 的结合常数 K_b 和结合位点数 n 可以利用双对数方程(3)计算^[19]。

$$\log[(F_0 - F)/F] = n \log[Q] + \log K_b \quad (3)$$

BHT 与 BSA 的 K_b 和 n 值(表 1)分别为 10^4 L/mol, 1, 表明 BHT 在 BSA 的一个结合位点上, 以中等强度的亲和力相结合形成复合物。当 GSH 存在时, BHT 与 BSA 的 K_b 随温度的升高而减小至 $10^2 \sim 10^3$ L/mol, 表明 GSH 削弱了 BHT 与 BSA 的结合, 即 GSH 可能阻碍了 BHT 与 BSA 之间的相互作用。一般而言, K_b 值越大说明结合亲和力越强, 这可能意味着 BHT 不会被快速代谢, 在体内就会产生积累, 而 GSH 对 BHT 与 BSA 结

合的抑制作用, 可能会加快 BHT 的代谢, 使其不会被过多积累。

2.3 热力学参数和作用力类型

BHT 与 BSA 结合的作用力可以根据热力学参数的符号和大小推断, 由 Van't Hoff 方程(4)和公式(5)^[20] 计算焓变 ΔH 、熵变 ΔS 、自由能 ΔG , 见表 1。

$$\ln K_b = \Delta H/RT + \Delta S/R \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

$\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 、 $\Delta G < 0$, 表明 BHT 与 BSA 主要通过疏水作用自发形成复合物。然而外源性物质与蛋白质的相互作用往往涉及多种作用力。从分子结构来看, BHT 具有的羟基使其易与 BSA 形成

氢键。因此,BHT 与 BSA 的结合可能是疏水和氢键共同作用的结果。当 GSH 存在时, ΔH 与 ΔS 均变为负值,其原因可能是 GSH 与 BHT 竞争与 BSA 的结合位点,导致 BHT 与 BSA 的相互作用力减弱或改变;BHT 和 GSH 之间相互作用,影响了 BHT 与 BSA 的结合方式;GSH 加剧了 BHT 对 BSA 构象的改变,影响了 BHT 与 BSA 的作用力类型;GSH 诱导 BSA 的构象变化,间接影响了 BHT 与 BSA 的结合和相互作用。

2.4 能量转移和作用距离

BHT 与 BSA 的作用距离可以根据 Förster 非辐射能量转移理论^[21],计算 BSA 和 BHT 之间的光谱重叠积分 J 、能量转移效率 E 、临界距离 R_0 和作用距离 r 列于表 2。BHT 与 BSA 的 $r < 7$ nm,说明极有可能发生了从 BSA 到 BHT 的能量转移。当 GSH 存在时,BSA 与 BHT 之间的 E 值减小, r 值增大,说明 GSH 增大了 BHT 与 BSA 之间的结合距离,阻碍了二者的相互作用,这可能也是 GSH 减小了 BHT 对 BSA 荧光猝灭程度的原因。

表 2 BSA 与 BHT 作用的 J 、 E 、 R_0 、 r 值

Tab.2 Values of J , E , R_0 , r of BSA and BHT

体系	$J/(\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})$	$E/\%$	R_0/nm	r/nm
BHT-BSA	8.38×10^{-15}	3.44	2.38	4.15
BHT-(BSA-GSH)	8.37×10^{-15}	2.19	2.38	4.48

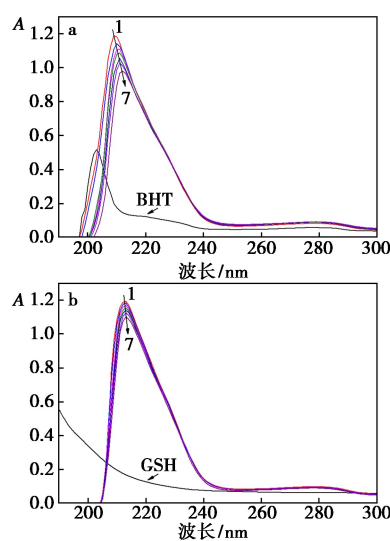
2.5 BHT 对 BSA 构象的改变以及 GSH 的影响

2.5.1 紫外吸收光谱

紫外吸收光谱可用来研究 BHT 对 BSA 构象的影响。BSA 在 210、278 nm 两个特征吸收峰(图 2)分别反映了 BSA 肽链构象以及微环境的极性^[22]。BSA 在 210 nm 的较强吸收峰,其吸光度随 BHT 浓度的增加而减小,当 BHT 浓度为 1.96×10^{-5} mol/L 时,BSA 的吸光度减小了 17.5%,并伴随有 3 nm 红移,表明 BHT 诱导 BSA 的肽链结构改变。其原因主要是 BHT-BSA 复合物的形成,这一结论从 BHT 吸收光谱与 BHT-BSA 复合物吸收光谱的差异上也可以得到验证。当 GSH 存在时,相同浓度的 BHT 使 BSA 的吸光度减小了 7.6%,并且没有发生明显的位移,这说明 GSH 可能会抑制 BHT 对 BSA 二级结构的改变。BSA 在 278 nm 处的吸收峰较弱,未能从紫外光谱上观察到 BHT 对 BSA 微环境极性的影响。

2.5.2 三维荧光光谱

三维荧光光谱可用于进一步研究 BHT 对 BSA 构象的改变。BSA 表现出两个特征荧光峰,



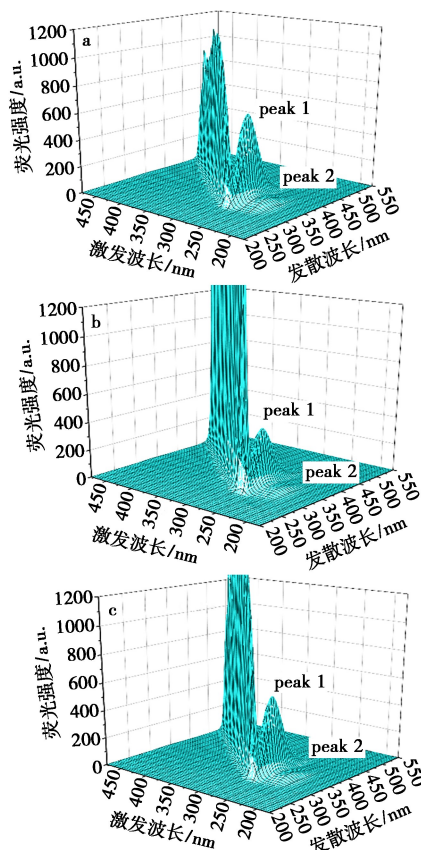
$c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L; 1→7 代表 $c_{\text{BHT}} = 0, 3, 3, 6, 6, 9, 9,$

13, 1, 16, 3, 19, 6×10^{-6} mol/L; $c_{\text{GSH}} = 3.0 \times 10^{-6}$ mol/L

a. BHT-BSA; b. BHT-(BSA-GSH)

图 2 GSH 对 BSA 与 BHT 紫外光谱的影响

Fig.2 Effect of GSH on ultraviolet spectra of BSA and BHT



峰 1 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 275/344$ nm); 峰 2 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 240/342$ nm)

a. BSA; b. BSA-BHT; c. BHT-(BSA-GSH)

图 3 GSH 对 BSA 与 BHT 三维荧光光谱的影响

Fig.3 Effect of GSH on three-dimensional fluorescence spectra of BSA and BHT

峰 1 和峰 2 分别反映氨基酸残基的特征和多肽链主干结构的特征^[23]。如图 3 所示,BHT 使 BSA 峰 1 的荧光猝灭约 35.3%,蓝移 4 nm;峰 2 的荧光猝灭约 34.9%,蓝移 2 nm,说明 BHT 诱导 BSA 的二级结构和氨基酸残基微环境改变。当 GSH 存在时,BHT 仍会猝灭峰 1 和峰 2 的荧光强度,但荧光猝灭率分别减少至 13.5%和 20.1%,且不再发生位移,表明 GSH 削弱 BHT 对 BSA 二级结构和氨基酸残基微环境的改变,这与紫外和荧光光谱的实验一致。

2.6 时间分辨荧光光谱

时间分辨荧光光谱法用于测定 BHT 对 BSA 荧光寿命的影响^[24]。如图 4 所示,BHT 使 BSA 的荧光寿命从 6.37 ns 减小为 5.95 ns,而加入 GSH 后,BSA 的荧光寿命又变回至 6.14 ns。加入 GSH 前后,BSA 荧光寿命的变化再次验证了 GSH 具有抑制 BHT 与 BSA 结合的作用。

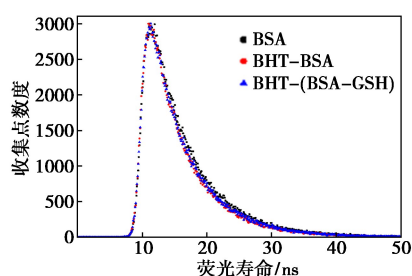


图 4 GSH 对 BSA 与 BHT 时间分辨荧光光谱的影响

Fig.4 Effect of GSH on time-resolved fluorescence spectra of BSA and BHT

2.7 位点竞争

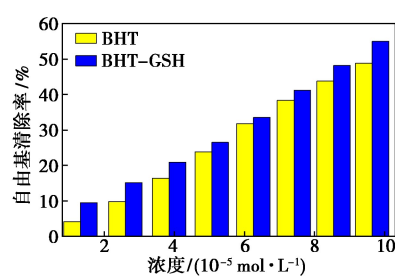
BSA 的 II A 和 III A 亚结构域(位点 I 和位点 II)可以结合大多数配体^[25]。华法林和布洛芬常被用于位点 I 和位点 II 的标记物。由双对数方程(3)计算在华法林和布洛芬存在时,BHT 与 BSA 的 K_b 分别为 6.08×10^3 、 5.06×10^2 L/mol,可见布洛芬显著降低了 BHT 与 BSA 的 K_b 值,表明 BHT 与布洛芬在同一位点竞争结合 BSA,即 BHT 结合在 BSA 的位点 II。

2.8 BHT 对 DPPH 的清除

BHT 对 DPPH 自由基的清除能力能够反映 BHT 的抗氧化能力。由图 5 可见,当 GSH 存在时,BHT 清除 DPPH 自由基的能力不会降低且略有增强,表明 GSH 不仅不会降低 BHT 的抗氧化活性,并且具有协同抗氧化的作用^[26]。

3 结论

GSH 会影响 BHT 与 BSA 结合,主要表现在



$c_{\text{DPPH}} = 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L, $c_{\text{BHT/BHT-GSH}} = 0, 0.7, 1.3, 2.0, 2.6, 3.2, 3.8, 4.5 \times 10^{-5}$ mol/L

图 5 GSH 对 BHT 清除 DPPH 自由基的影响

Fig.5 Effect of GSH on DPPH radical scavenging by BHT

减弱了 BHT 与 BSA 的结合亲和力,改变了二者结合作用力。GSH 对 BHT 与 BSA 结合过程的抑制,可能会减少 BHT 在血液中的积累,缩短 BHT 在血浆中的半衰期,减小其对人体健康的威胁。紫外吸收光谱、三维荧光光谱和时间分辨荧光光谱分别从不同角度验证了 GSH 可以抑制 BHT 对 BSA 二级结构及氨基酸微环境的改变,在一定程度上稳定 BSA 结构。综上推测,GSH 可能是一种能降低 BHT 对运输蛋白毒性的有效保护剂。

参考文献:

- [1] RADHA A, JASWAL N, THAKUR K K, et al. A review on interaction of different preservatives with plasma proteins [J]. *Mater. Today; Proc.*, 2021, **37**: 2 446-2 452.
- [2] DASSARMA B, NANDI D K, GANGOPADHYAY S, et al. Hepatoprotective effect of food preservatives (butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat [J]. *Toxicol. Rep.*, 2018, **5**: 31-37.
- [3] WILSON B G, BAHNA S L. Adverse reactions to food additives [J]. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2005, **95**(6): 499-507.
- [4] ACHAR J C, NAM G, JING J, et al. Microbubble ozonation of the antioxidant butylated hydroxytoluene: Degradation kinetics and toxicity reduction [J]. *Environ. Res.*, 2020, **186**: 109 496.
- [5] YANG X X, SONG W T, LIU N, et al. Synthetic phenolic antioxidants cause perturbation in steroidogenesis in vitro and in vivo [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2018, **52**(2): 850-858.
- [6] LANIGAN R S, YAMARIK T A. Final report on the safety assessment of BHT [J]. *Int. J. Toxicol.*, 2002, **21**: 91-94.
- [7] GU J L, ZHENG S Y, HUANG X Y, et al. Exploring the mode of binding between butylated hydroxyanisole with

- bovine serum albumin; Multispectroscopic and molecular docking study [J]. *Food Chem.*, 2021, **357**: 129-771.
- [8] YUAN S J, ZHANG Y Y, LIU J X, et al. Structure-affinity relationship of the binding of phenolic acids and their derivatives to bovine serum albumin [J]. *Food Chem.*, 2019, **278**: 77-83.
- [9] AL-SHABIB N A, KHAN J M, ALI M S, et al. Exploring the mode of binding between food additive “butylated hydroxytoluene (BHT)” and human serum albumin: Spectroscopic as well as molecular docking study [J]. *J. Mol. Liq.*, 2017, **230**: 557-564.
- [10] SINHA R, SINHA I, CALCAGNOTTO A, et al. Oral supplementation with liposomal glutathione elevates body stores of glutathione and markers of immune function [J]. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2018, **72**(1): 105-111.
- [11] KOSOWER N S, KOSOWER E M. The glutathione status of cells [J]. *Int. Rev. Cytol.*, 1978, **54**: 109-160.
- [12] VRIES H, HENEGOUWEN G M J B. The influence of glutathione on the photoreaction of 3,4',5-tribromosalicyl-anilide alone and in the presence of serum albumin [J]. *Pharm. Weekbl.*, 1981, **3**(1): 1 570-1 574.
- [13] THOMPSON D C, CHA Y N, TRUSH M A. The peroxidase-dependent activation of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene (BHT) to reactive intermediates: Formation of BHT-quinone methide via a chemical-chemical interaction [J]. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**(7): 3 957-3 965.
- [14] HUANG F W, CHEN C. Insights into the interaction between the kusaginin and bovine serum albumin; Multispectroscopic techniques and computational approaches [J]. *J. Mol. Recognit.*, 2023, **36**(3): 3 003.
- [15] 冉玲, 黄琰, 曾红棱, 等. 酚酸与谷胱甘肽的抗氧化活性及联合抗氧化作用 [J]. *现代食品科技*, 2020, **36**(3): 48-55.
- [16] RAO H J, QI W, SU R X, et al. Mechanistic and conformational studies on the interaction of human serum albumin with rhodamine B by NMR, spectroscopic and molecular modeling methods [J]. *J. Mol. Liq.*, 2020, **316**: 113-889.
- [17] 袁涛, 覃姣兰, 黄如川, 等. 8-羟基喹啉衍生物镍(II)配合物的合成、晶体结构、抗肿瘤活性及其与 BSA 作用研究 [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(5): 51-58.
- [18] ZHOU Z S, HU X, HONG X Y, et al. Interaction characterization of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde with human serum albumin: Binding characteristics, conformational change and mechanism [J]. *J. Mol. Liq.*, 2020, **297**: 111-835.
- [19] KOORAVAND M, ASADPOUR S, HADDADI H, et al. An insight into the interaction between malachite green oxalate with human serum albumin: Molecular dynamic simulation and spectroscopic approaches [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2021, **407**: 124-878.
- [20] CHAVES O A, ACUNHA T V, LGLESIAS B A, et al. Effect of peripheral platinum(II) bipyridyl complexes on the interaction of tetra-cationic porphyrins with human serum albumin [J]. *J. Mol. Liq.*, 2020, **301**: 112-466.
- [21] KOU S B, LIN Z Y, WANG B L, et al. Evaluation of the binding behavior of olmutinib (HM61713) with model transport protein: Insights from spectroscopic and molecular docking studies [J]. *J. Mol. Struct.*, 2021, **1 224**: 129-024.
- [22] WANG B L, KOU S B, LIN Z Y, et al. Investigation on the binding behavior between BSA and lenvatinib with the help of various spectroscopic and in silico methods [J]. *J. Mol. Struct.*, 2020, **1 204**: 127-521.
- [23] WANG W L, GAO D H, ZHENG Q C, et al. Interactions of isoorientin and its semi-synthetic analogs with human serum albumin [J]. *Bioorg. Chem.*, 2021, **116**: 105-319.
- [24] SASMAL M, ISLAM A S M, BHOWMICK R, et al. Site-selective interaction of human serum albumin with 4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole modified olanzapine derivative and effect of β -cyclodextrin on binding: In the light of spectroscopy and molecular docking [J]. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2019, **2**(8): 3 551-3 561.
- [25] LI D H, LIU Y J, LIU Y X, et al. Effects of different fatty acid ligands on the host-guest interaction of astaxanthin-bovine serum albumin: Thermodynamical analysis, binding site identification, and in vivo antioxidant evaluation [J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, **134**: 108-112.
- [26] ZHANG Y Y, WU S M, QIN Y H, et al. Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure-affinity relationships and effects on antioxidant activity [J]. *Food Chem.*, 2018, **240**: 1 072-1 080.