DOI:10.12441/spyswjs.20250915002 [文章编号] 1673-1689(2026)04-0018-10

DHA氧化产物对牛血清白蛋白的修饰作用及其对蛋白质结构的影响

王景怡[1] 张志文[1] 吴 华[2] 肖俊松[1*]

(1. 北京工商大学食品与健康学院,北京 100048; 2. 北京工商大学轻工科学与工程学院,北京 100048)

摘要:【目的】探讨二十二碳六烯酸(DHA)氧化衍生的2-烯醛和二烯醛对牛血清白蛋白(BSA)的共价修饰作用及其对蛋白质结构的影响。**【方法】**采用超高效液相色谱-串联质谱联用技术(UPLC-MS/MS)分析醛类-蛋白质加合物形成情况,通过2,4-二硝基苯肼(DNPH)比色法测定蛋白质羰基化水平,并利用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)和紫外可见吸收光谱分析蛋白质二级结构变化。**【结果】**二烯醛与BSA中组氨酸和赖氨酸残基形成的加合物显著多于2-烯醛;随着醛类浓度的升高,BSA羰基化水平显著上升;醛类修饰导致BSA的α螺旋结构减少、β折叠结构增加,紫外可见吸收光谱显示增色效应,表明蛋白质发生解折叠及分子间交联。**【结论】**DHA氧化衍生的醛类可通过共价修饰诱导BSA结构紊乱和氧化损伤,该研究为提升多不饱和脂肪酸制剂中蛋白质载体的氧化稳定性提供了理论依据,对于解析富含多不饱和脂肪酸食品在加工贮藏过程中的品质劣变机制具有重要参考价值,并为开发抑制蛋白质氧化、延长食品货架期的策略提供了数据支持。

关键词:DHA氧化产物;氨基酸修饰;FT-IR;UPLC-MS/MS

Modification of Bovine Serum Albumin by DHA Oxidation Products and Its Impact on Protein Structure

WANG Jingyi[1] *ZHANG Zhiwen*[1] *WU Hua*[2] *XIAO Junsong*[1*]

(1. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. School of Light Industry Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: [**Objective**] To explore the covalent modification effects of 2-enal and dienal derived from the oxidation of docosahexaenoic acid (DHA) on bovine serum albumin (BSA) and their influences on the protein structure. [**Method**] The formation of aldehyde-protein adducts was analyzed by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The level of protein carbonylation was determined by 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) colorimetry. The changes in protein secondary structure were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and ultraviolet-visible absorption spectroscopy. [**Result**] The adducts formed by dienal with histidine and lysine residues in BSA were significantly more than those formed by 2-enal. With the increase in aldehyde concentration, the carbonylation level of BSA rose significantly. Aldehyde modification led to reduced α helices and increased β folds of BSA. The ultraviolet-visible absorption spectrum showed a hyperchromic effect, indicating that the protein underwent unfolding and intermolecular cross-linking. [**Conclusion**] The aldehydes derived from the oxidation of DHA can induce structural disorder and oxidative damage of BSA through covalent modification. This study provides a theoretical basis for improving the

基金项目:北京市自然科学基金项目(2202014,6212002)。

通信作者:肖俊松(1980—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品功能成分及膳食因素诱导的代谢综合征的相关机制研究。E-mail:xiaojs@th.btbu.edu.cn

收稿日期:2025-09-15 **修回日期:**2025-10-08

oxidative stability of protein carriers in polyunsaturated fatty acid preparations and has important reference value for understanding the quality deterioration mechanism of foods rich in polyunsaturated fatty acids during processing and storage. In addition, it provides data support for the development of strategies to inhibit protein oxidation and extend the shelf life of food.

Keywords: DHA oxidation product; amino acid modification; FT-IR; UPLC-MS/MS

蛋白质的氧化修饰是生物体内重要的化学过程，在氧化应激条件下尤为显著。这种修饰可导致蛋白质结构和功能的改变，进而影响其生理作用。DHA是一种重要的ω-3多不饱和脂肪酸，在维护神经发育、视网膜功能和心血管健康中不可或缺，因此广泛应用于营养补充剂和药物制剂领域[1]。DHA在氧化过程中衍生的活性醛类（如2-烯醛和二烯醛）能通过迈克尔加成或席夫碱反应，共价修饰蛋白质中的亲核氨基酸（如赖氨酸、组氨酸等）残基，从而改变蛋白质的结构与功能。

在乳制品、肉制品、富含不饱和脂肪酸的乳化饮料及微胶囊化鱼油等产品中，脂质氧化与蛋白质修饰常同时发生[2]。这不仅会导致蛋白质功能性质（如溶解度、乳化性、凝胶性）下降，影响产品质构，还会引发非酶褐变、产生不良风味、降低营养价值，甚至可能生成潜在有害物质，是影响食品品质与安全的关键问题之一[3-4]。因此，探究DHA氧化产物对载体蛋白的修饰机制，对食品工业控制氧化劣变、提升产品稳定性具有重要的现实意义。

BSA作为一种重要的载体蛋白，因良好的生物相容性和易于修饰的特性，被广泛应用于药物递送、生物材料构建和生物医学研究[5]。然而，在含多不饱和脂肪酸的复杂制剂体系中，BSA易受到脂质氧化产物的攻击，发生共价修饰，导致其结构稳定性和功能完整性下降，目前相关修饰机制及结构影响尚未系统阐明[6]。修饰反应主要通过2种机制进行：第一种为迈克尔加成（Michael addition），即α,β-不饱和醛（如2-烯醛）的碳碳双键与亲核氨基酸的基团（如组氨酸的咪唑基或半胱氨酸的巯基）发生共轭加成[7]；第二种为席夫碱反应（Schiff base formation），即醛基与赖氨酸的ε-氨基缩合形成亚胺键（C═N），这一过程在二烯醛修饰中尤为常见[8]。这些修饰反应可引起蛋白质羰基化、聚集及构象变化，进而影响其生物学功能。

目前，对DHA氧化衍生物与载体蛋白间相互作用机制的研究仍不够深入，尤其是在不同结构醛类修饰特异性、修饰产物定量分析及对蛋白质功能特性影响等方面尚存争议。因此，系统研究DHA氧化产物对BSA的共价修饰行为，明确其修饰类型、位点及对结构的影响，不仅具有理论价值，而且对提高蛋白质载体在食品氧化环境中的稳定性、指导抗氧化剂应用、优化DHA制剂配方也具有重要的实践意义。

作者旨在系统考察DHA氧化过程中产生的2类代表性醛类物质（2-烯醛和二烯醛）对BSA的共价修饰作用，采用了多种分析技术，如羰基质量摩尔浓度测定用于量化蛋白质氧化损伤程度[9-10]，UPLC-MS/MS用于鉴定赖氨酸和组氨酸残基上的特异性修饰产物[11]，FT-IR用于分析蛋白质二级结构的构象变化[12]。通过这些方法的联合应用，从分子水平揭示不同醛类物质对BSA修饰的活性差异及其潜在机制，为理解氧化应激条件下蛋白质的修饰机制提供数据支撑，并为开发针对性的蛋白质载体保护策略、推动BSA载体广泛应用在富含多不饱和脂肪酸的生物医学制剂中提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Nε-乙酰基-*L*-赖氨酸：分析纯，上海优宁维生物科技股份有限公司；甲醇：分析纯，美国Sigma公司；乙醇：分析纯，北京化学工业集团有限责任公司；乙酸乙酯：分析纯，天津市津东天正精细化学试剂厂；盐酸：分析纯，天津市申泰化学试剂有限公司；盐酸胍（分析纯）、三氯乙酸（纯度99%）、BSA（纯度98%）、（*E*）-2-戊烯醛（纯度95%）、（*E*）-2-己烯醛（纯度98%）、（*E*）-2-庚烯醛（纯度95%）、（*E*，*E*）-2，4-己二烯醛（纯度95%）、氰基硼氢化钠（纯度95%）、（*E*，*E*）-2，4-庚二烯醛（纯度90%）、4-羟基-2-壬烯醛（纯度90%）、DNPH（纯度98%）：上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

精密电子天平：JJ6000A型，美国双杰集团有限公司；迷你涡旋混合器：YQDL017型，北京鼎国

昌盛生物技术有限公司；高速离心机：1-14K 型，美国 Sigma 公司；超声波清洗器：KQ-100E 型，上海精密仪器仪表有限公司；氮吹仪：UGC-12M 型，北京优晟联合科技有限公司；UPLC-MS/MS：ACQUITY 型，美国 Waters 公司；紫外-可见分光光度计：TU-1900 型，北京普析通用仪器有限责任公司；FT-IR 仪：Nicolet iS20 型，美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 醛-BSA 复合物的制备

将 *Nε*-乙酰基-*L*-赖氨酸标准品用超纯水配制成质量浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 μg/mL 的标准曲线工作液，过膜上样。将 BSA 溶解于 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液（pH 7.4），使蛋白质质量浓度为 10 mg/mL。将（*E*）-2-戊烯醛、（*E*）-2-己烯醛、（*E*）-2-庚烯醛、（*E*，*E*）-2，4-己二烯醛、（*E*，*E*）-2，4-庚二烯醛分别配制成浓度为 1 mol/L 的储备液。使用前，将上述储备液分别用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液（pH 7.4）稀释至终浓度为 5、10、25、50 mmol/L。将 480 μL 配制好的不同浓度的醛类物质分别与 500 μL 配制好的 BSA 溶液置于棕色液相小瓶混匀，在黑暗环境下 37 ℃ 孵育 6 h。

1.3.2 醛-BSA 复合物中氨基酸加合物的测定

加合物的分析步骤见图 1。反应结束后，将棕色液相小瓶置于冰水浴中停止反应。加入 50 μL 氰基硼氢化钠（溶于 5 mol/L NaOH 溶液），在 37 ℃ 孵育 1 h 还原醛-BSA 复合物。在冰上用约 500 μL 质量分数 20% 的三氯乙酸处理 1 h，以沉淀羰基修饰后的 BSA。在 4 ℃、5 000 *g* 下离心 10 min，将沉淀转移至水解管中，氮吹排除样品中的空气，加入 2 mL 6 mol/L 的 HCl，在 110 ℃ 下水解约 20 h，将蛋白质水解液转移至平皿中进行冷冻干燥。将冻干后的样品重新溶于 1 mL 乙醇中，过 0.22 μm 有机微孔滤膜，采用 UPLC-MS/MS 检测。

采用 Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱

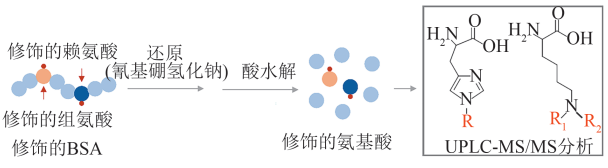


图 1 加合物分析步骤

Fig. 1 Analysis steps for adducts

系统，与 Xevo TQS 三重四极杆质谱仪联用进行分析。色谱柱：Waters BEH C18 柱（100 mm×2.1 mm×1.7 μm）；流动相 A 为体积分数 0.1% 甲酸水溶液，流动相 B 为甲醇；流量 0.30 mL/min；进样量 5 μL。洗脱梯度如下：0 min，流动相 A 体积分数为 80%；5 min，流动相 A 体积分数为 80%；10 min，流动相 A 体积分数为 90%。质谱条件如下：选择多反应监测（MRM）正离子模式，使用氮气作为雾化气体，离子源温度 120 ℃，去溶剂气温度 350 ℃，锥电压 25 V，碰撞能量 25 eV，去溶剂化气体流量 700 L/h，锥孔气体流量 50 L/h，碰撞气体为氩气。

BSA 中的组氨酸和赖氨酸残基是脂质过氧化衍生的醛共价修饰的 2 个代表性目标。醛与赖氨酸形成的加合物（迈克尔加成型、席夫碱）在 *m*/*z*=84 处具有共同的特征碎片离子，醛与组氨酸形成的加合物（迈克尔加成型）在 *m*/*z*=110 处具有共同的特征碎片离子[13]。因此，作者对这 2 种氨基酸的糖基化修饰产物进行了定量分析，定量离子对见表 1。

表 1 产物定量离子对

Table 1 Quantitative ion pairs of the products

编号	加合物名称	*m*/*z*	
		Q1	Q3
1	组氨酸-反-2-戊烯醛	240.28	110
2	组氨酸-反-2-己烯醛	254.30	110
3	组氨酸-反-2-庚烯醛	268.29	110
4	组氨酸-反，反-2，4-己二烯醛	252.29	110
5	组氨酸-反，反-2，4-庚二烯醛	265.29	110
6	赖氨酸-反-2-戊烯醛	231.31	84
7	赖氨酸-反-2-己烯醛	245.33	84
8	赖氨酸-反-2-庚烯醛	259.32	84
9	赖氨酸-反，反-2，4-己二烯醛	243.32	84
10	赖氨酸-反，反-2，4-庚二烯醛	257.32	84
11	赖氨酸-反-2-戊烯醛	213.31	84
12	赖氨酸-反-2-己烯醛	227.33	84
13	赖氨酸-反-2-庚烯醛	241.32	84
14	赖氨酸-反，反-2，4-己二烯醛	225.32	84
15	赖氨酸-反，反-2，4-庚二烯醛	239.32	84

1.3.3 醛-BSA 复合物中羰基的测定

在 50 mL 离心管中加入 10 mL 配制好的 10 mg/mL BSA 溶液和 9.6 mL 不同浓度（5、10、25、50 mmol/L）的醛类物质，置于黑暗环境中于 37 ℃ 反应 6 h。同时制备不加醛类物质的空白对照，反

应结束后将离心管置于冰水浴中停止反应。在冰上用10 mL质量分数为20%的三氯乙酸处理1 h以沉淀羰基修饰后的BSA，在4 ℃、5 000 *g*下离心10 min后冷冻干燥。取适量氧化修饰后的BSA冻干粉末溶解于0.01 mol/L磷酸盐缓冲溶液（pH 7.4）中，使蛋白质质量浓度约为2 mg/mL。用100 mL 2 mol/L的盐酸溶液溶解0.198 g的DNPH，得到10 mmol/L的DNPH盐酸溶液，现用现配。

取400 μL上述溶解好的蛋白质溶液于2 mL离心管中，加入800 μL 10 mmol/L的DNPH盐酸溶液混匀，并设空白对照，即不含DNPH的2 mol/L HCl溶液，于黑暗环境下孵育2 h后，加入400 μL质量分数为20%的三氯乙酸溶液沉淀蛋白质，混匀后静置0.5 h，然后在4 ℃、10 000 r/min离心20 min，弃去上清液，将沉淀加到1 mL乙醇-乙酸乙酯（乙醇与乙酸乙酯的体积分数均为50%）混合溶液中，同样条件下离心洗涤沉淀3次，最后将得到的沉淀溶解在1 mL 6 mol/L的盐酸胍溶液中，在370 nm处测定吸光度。羰基质量摩尔浓度按照式（1）计算。

$$n=\frac{A}{C}\times\frac{1}{K\times b}\times 1\,000 \tag{1}$$

式中：

n——羰基质量摩尔浓度，nmol/mg；

A——370 nm波长下的吸光度；

K——摩尔消光系数，22 000 mol/（L·cm）；

b——光径，cm；

C——蛋白质质量浓度，mg/mL。

1.3.4　醛-BSA复合物蛋白质二级结构的测定

参考Qiao等[14]的方法进行FT-IR的测定，并稍加修改。利用FT-IR仪对冷冻干燥后的醛-BSA复合物粉末进行测定，称取复合物样品约1 mg，干燥的溴化钾150 mg，将两者混合后用研钵研磨成均匀粉末，压片机压片0.5~1.0 min，取出进行FT-IR的测定。具体参数如下：光谱扫描范围4 000~400 cm^{-1}，分辨率4 cm^{-1}，扫描次数16次。利用Peakfit软件，通过自去卷积、二阶导数求导和曲线拟合等方法计算蛋白质二级结构的占比。

1.3.5　紫外可见吸收光谱的测定

用0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（pH 7.0）配制得到0.2 mg/mL的醛-蛋白质复合物溶液体系，加到光程长度为10 mm的石英比色皿中。在240~600 nm处利用紫外-可见分光光度计对BSA溶液和醛-BSA复合物溶液进行测定。

1.3.6　数据统计与分析

首先通过Excel 2019进行数据初步整理，随后采用SPSS 26.0进行统计学分析。使用One-way ANOVA方法对多组数据进行显著性检验，当$P<0.05$时认为差异具有显著性。采用Origin Pro 2021软件绘制图表。

2　结果与讨论

2.1　醛-BSA复合物的颜色变化

经氰基硼氢化钠还原、蛋白质沉淀及离心处理后，获得了不同醛类物质修饰的BSA复合物沉淀，见图2。所有测试浓度的5种醛-BSA复合物均有明显褐变现象。当BSA受到相同类型的醛类物质修饰时，醛类物质浓度越高，修饰后产物的褐变效应越明显；在相同的反应浓度下，随着链长增加，烯醛类物质修饰后的BSA颜色逐渐变浅。整体而言，（*E*）-2-戊烯醛-BSA的颜色较深，其次是（*E*）-2-己烯醛-BSA，最浅的是（*E*）-2-庚烯醛-BSA。在2种二烯醛类物质中也观察到了类似趋势：（*E*，*E*）-2，4-己二烯醛-BSA比（*E*，*E*）-2，4-庚二烯醛-BSA颜色略深。这可能是因为链长较短的不饱和醛类物质受到的空间位阻效应较小，更容易



a　b　c　d　e　a　b　c　d　e　a　b　c　d　e　a　b　c　d　e

(a) 5 mmol/L　(b) 10 mmol/L　(c) 25 mmol/L　(d) 50 mmol/L

a—（*E*）-2-戊烯醛-BSA；b—（*E*）-2-己烯醛-BSA；c—（*E*）-2-庚烯醛-BSA；d—（*E*，*E*）-2，4-己二烯醛-BSA；e—（*E*，*E*）-2，4-庚二烯醛-BSA。

图2　醛-BSA复合物的颜色变化

Fig. 2　Color changes of aldehyde-BSA complexes

进入蛋白质结构中并与其暴露在外的氨基酸残基共价修饰[15-16]。与 3 种 2-烯醛类物质修饰的 BSA 相比，2 种二烯醛类物质修饰后 BSA 的褐变程度更显著。

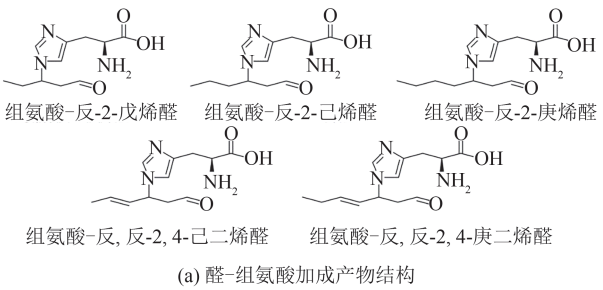
2.2 醛-BSA 复合物的定量分析

组氨酸和赖氨酸是 BSA 中的亲核氨基酸残基，容易被脂质过氧化衍生的亲电体修饰。组氨酸对这些醛类物质显示出特异性反应，而赖氨酸是这些醛类物质的普遍靶标，可以产生多种类型的加合物[17-18]。采用 *Nε*-乙酰基-*L*-赖氨酸标准品作为外标，计算醛-BSA 复合物中检测到的氨基酸加合物质量浓度。*Nε*-乙酰基-*L*-赖氨酸标准品的标准曲线和决定系数（R^2）分别为 y=287 464x−85 846 和 0.991 6。标准曲线的 R^2 大于 0.99，表明在一定的质量浓度范围内线性关系良好，可用于计算氨基酸加合产物的质量浓度。

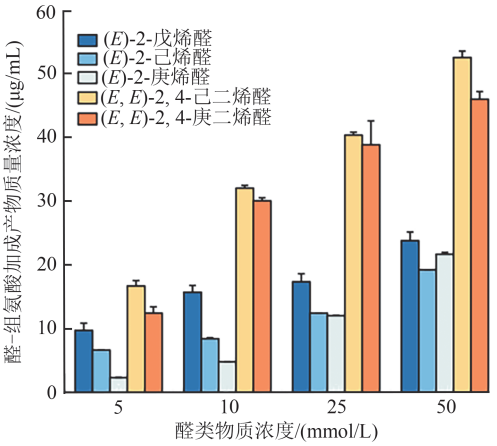
在组氨酸加合物的分析中，5 种醛类物质均通过迈克尔加成反应与组氨酸结合，图 3（a）展示了 5 种醛类物质在其 C═C 双键位置对 BSA 中组氨酸上的咪唑氮原子发生迈克尔加成反应后形成的加合物结构。值得注意的是，二烯醛类物质的加合物生成量显著高于相应的 2-烯醛（P<0.05），且这种差异随着醛类物质浓度的增加而更加明显，见图 3（b）。这一现象可以从分子结构的角度得到解释：二烯醛分子中的共轭双键体系使 β 位碳原子具有更高的电子密度，因而更易受到亲核试剂的攻击，表现出更强的反应活性。这一发现与 Li 等[19]的研究结果相吻合，他们同样观察到二烯醛对蛋白质氨基酸残基的修饰活性高于单烯醛。

对于赖氨酸残基的修饰，作者发现了更为复杂的反应途径。醛类分子中的 α，β-不饱和键与赖氨酸分子上的游离氨基发生了迈克尔加成反应，见图 4（a）。无论是 2-烯醛还是二烯醛，它们对赖氨酸修饰过程中所产生的加成产物质量浓度都相对较高，随着反应中醛类物质浓度的提升，所形成的迈克尔加成产物总量也显著上升（P<0.05），定量分析结果见图 4（b）。

赖氨酸除了可以发生迈克尔加成反应外，还可以通过游离氨基进攻醛的羰基基团上带有正电荷的碳原子，完成亲核加成反应，形成 α-羟基胺类中间化合物，然后进一步脱水形成席夫碱[20]。如图 5 所示，检测到了 5 种醛类物质修饰 BSA 中的赖



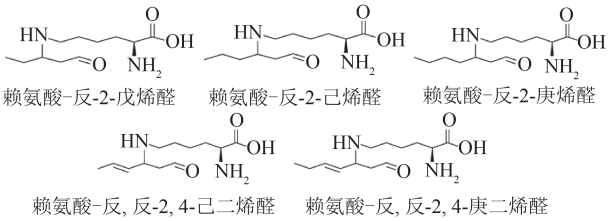
(a) 醛−组氨酸加成产物结构



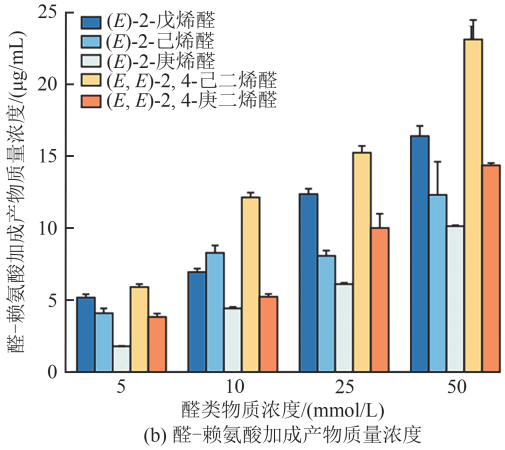
(b) 醛−组氨酸加成产物质量浓度

图 3 5 种醛类物质分别与 BSA 中组氨酸形成的迈克尔加成产物结构及质量浓度

Fig. 3 Structure and mass concentrations of Michael addition products formed by 5 aldehydes with histidine residue in BSA



(a) 醛−赖氨酸加成产物结构

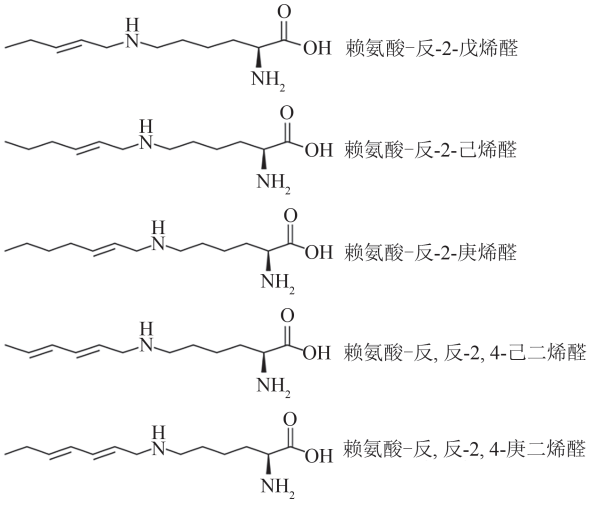


(b) 醛−赖氨酸加成产物质量浓度

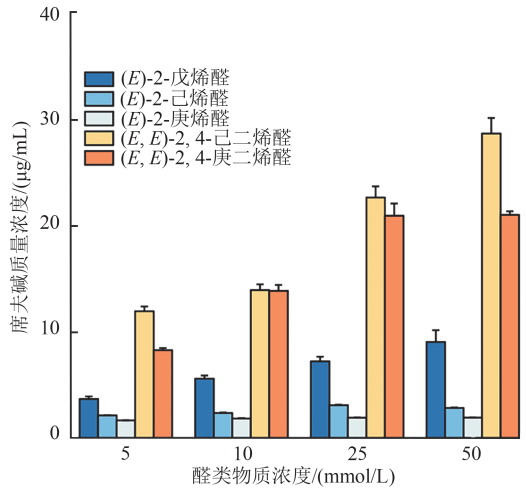
图 4 5 种醛类物质分别与 BSA 中赖氨酸形成的迈克尔加成产物结构及质量浓度

Fig. 4 Structure and mass concentrations of Michael addition products formed by 5 aldehydes with lysine residue in BSA

氨酸后形成的席夫碱。定量结果显示，相较于3种2-烯醛类物质，(*E*,*E*)-2,4-己二烯醛和(*E*,*E*)-2,4-庚二烯醛更易与BSA中的赖氨酸残基形成席夫碱，这可能是由于不同结构的醛类物质在蛋白质修饰过程中的相对活性存在差异所致。



(a) 5种醛类物质分别与BSA中赖氨酸形成的席夫碱结构



(b) 5种醛类物质分别与BSA中赖氨酸形成的席夫碱质量浓度

图5　5种醛类物质分别与BSA中赖氨酸形成的席夫碱结构及其质量浓度

Fig. 5　Structure and mass concentrations of Schiff bases formed by 5 aldehydes with lysine residue in BSA

2.3　蛋白质羰基质量摩尔浓度分析

采用DNPH比色法测定了修饰后BSA的蛋白质羰基质量摩尔浓度。如图6所示，随着醛类物质浓度的增加，BSA的蛋白质羰基质量摩尔浓度显著上升，表明氧化损伤加剧。在37 ℃与50 mmol/L的(*E*)-2-戊烯醛、(*E*)-2-己烯醛、(*E*)-2-庚烯醛、(*E*,*E*)-2,4-己二烯醛和(*E*,*E*)-2,4-庚二烯醛孵育6 h后，观察到BSA中的羰基质量摩尔浓度分别比对照组增加58.54、55.17、51.09、49.68、47.34 nmol/mg，这一变化趋势与Li等[19]用丙二醛、(*E*,*E*)-2,4-庚二烯醛和(*E*)-2-庚烯醛介导BSA修饰的结果一致。羰基的显著增加表明，所有测试醛类物质均能有效诱导BSA发生氧化损伤，且该过程具有明显的浓度依赖性。值得注意的是，在相同浓度条件下，短链2-烯醛（如(*E*)-2-戊烯醛）所致羰基化程度普遍高于长链二烯醛，这可能与其分子体积较小、空间位阻较低有关，因而更易接近并修饰蛋白质靶点。该结果与前述加合物分析中短链醛反应活性更高的结论一致，进一步印证了醛类物质分子结构对其蛋白质修饰能力及所致氧化损伤程度的显著影响。

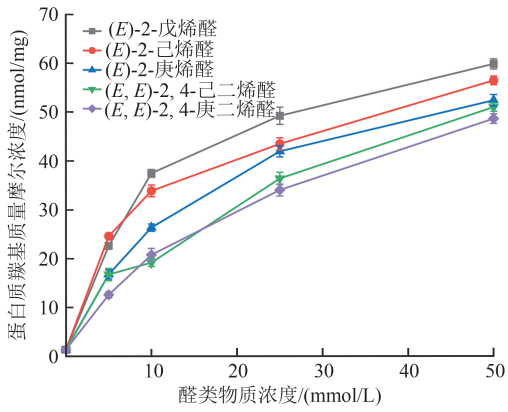


图6　5种醛类物质分别对BSA进行共价修饰后蛋白质羰基质量摩尔浓度的变化

Fig. 6　Changes in protein carbonyl molality of BSA after covalent modification with 5 different aldehydes

2.4　FT-IR分析

通过FT-IR技术系统研究了5种醛类物质修饰对BSA二级结构的影响，BSA和醛-BSA复合物在中红外波长区域的光谱图见图7(a)。未修饰的BSA在3 300 cm^{-1}处显示出典型的宽吸收峰，这归因于O—H和N—H键的伸缩振动形成的分子间氢键[21]。在1 800~1 400 cm^{-1}的特征区域，所有醛-BSA复合物中均观察到酰胺I带（主要来自C═O伸缩振动）和酰胺II带（主要来自N—H弯曲振动和C—N伸缩振动）的吸收峰。

值得注意的是，醛类修饰导致BSA的酰胺I带吸收峰从1 658.4 cm^{-1}位移至1 663.3 cm^{-1}，同时酰胺II带从1 538.9 cm^{-1}位移至1 543.7 cm^{-1}。这些位移表明醛类物质与BSA分子中的C═O、N—H

和C—N发生了相互作用，可能通过形成氢键影响了蛋白质的二级结构[22]。此外，与未修饰的BSA相比，醛-BSA复合物的酰胺带吸收强度明显减弱，这直接证明了醛类共价修饰对BSA二级结构产生了实质性改变，见图7(b)[23]。

通过对酰胺I带(1 700~1 600 cm^{-1})的精细解析[24]，定量评估了不同醛类物质修饰对BSA二级结构组成的影响，见表2。未修饰BSA的二级结构组成为：α螺旋占比7.14%、β折叠占比43.95%、β转角占比39.51%、无规卷曲占比9.40%。经过醛类物质修饰后，所有处理组均表现出α螺旋结构的完全消失和β折叠结构的显著增加(60.31%~86.78%)，而α螺旋占比的降低有助于β折叠和无规卷曲二级结构的形成[25]。其中，3种2-烯醛修饰后的β折叠占比(84.97%~86.78%)明显高于2种二烯醛(60.31%~65.05%)，而二烯醛处理组保留了较多的β转角结构(26.10%~31.64%)[26]。这些结构变化表明，醛类修饰使BSA的二级结构趋于松散无序，这与Ince等[27]的结果相吻合，随着己醛浓度增大，配体与蛋白质的络合作用引起了β转角和α螺旋结构的相应减少。这些变化表明在不饱和醛的存在下，BSA的二级结构变得松散无序，更容易暴露于溶剂中。

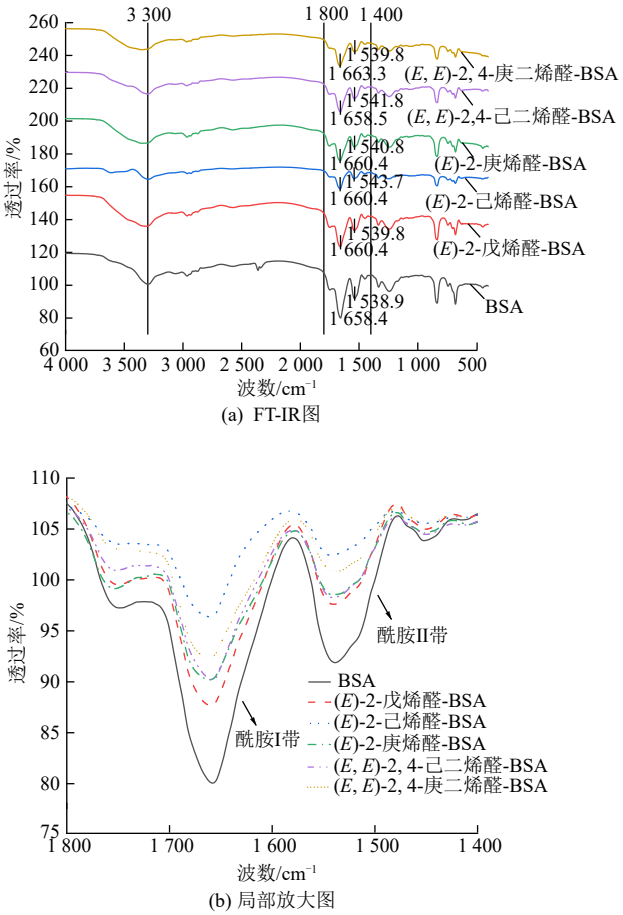


图7　5种醛类物质分别与BSA反应后产物的FT-IR图

Fig. 7　Fourier transform infrared spectra of the products after the reactions of 5 aldehydes with BSA

值得注意的是，不同醛类物质诱导的结构变化程度存在明显差异。2-烯醛类物质((*E*)-2-戊烯醛、(*E*)-2-己烯醛和(*E*)-2-庚烯醛)诱导β折叠增加更为显著，而二烯醛类物质((*E*,*E*)-2,4-己二烯醛和(*E*,*E*)-2,4-庚二烯醛)则保留了相对较多的天然构象。这种差异可能与不同醛类分子的反应活性和修饰位点选择性有关，也反映了醛类分子结构对其诱导蛋白质构象变化能力的重要影响。这些结果为研究氧化应激条件下蛋白质结构损伤的分子机制提供了基础。

2.5　紫外可见吸收光谱分析

紫外可见吸收光谱是一种深入了解蛋白质和其他化合物之间分子间相互作用的通用方法。37 ℃反应6 h后，BSA、(*E*)-2-戊烯醛-BSA、(*E*)-2-己烯醛-BSA、(*E*)-2-庚烯醛-BSA、(*E*,*E*)-2,4-己二烯醛-BSA以及(*E*,*E*)-2,4-庚二烯醛-BSA的变化

表2　5种醛类物质与BSA互作后酰胺I带二级结构组成占比

Table 2　Composition ratios of the secondary structural elements of amide I bands after interactions of 5 aldehydes with BSA

产物	β折叠占比/%	无规卷曲占比/%	α螺旋占比/%	β转角占比/%
BSA	43.95±1.24^{d}	9.40±0.16^{a}	7.14±0.25	39.51±0.41^{a}
(*E*)-2-戊烯醛-BSA	86.78±0.43^{a}	7.55±0.19^{b}	0	5.67±0.22^{e}
(*E*)-2-己烯醛-BSA	86.69±0.21^{a}	8.95±0.25^{a}	0	4.36±0.39^{f}
(*E*)-2-庚烯醛-BSA	84.97±0.48^{a}	7.89±0.26^{b}	0	7.14±0.21^{d}
(*E*,*E*)-2,4-己二烯醛-BSA	60.31±0.70^{c}	8.05±0.19^{b}	0	31.64±0.40^{b}
(*E*,*E*)-2,4-庚二烯醛-BSA	65.05±0.46^{b}	8.85±0.14^{a}	0	26.10±0.37^{c}

注：同列不同字母代表组间差异显著(P<0.05)。

见图8。BSA溶液的吸收峰在280 nm左右，这可能是芳香氨基酸残基（Trp、Tyr和Phe）π-π*跃迁的结果[28]。随着不饱和醛浓度的增大，BSA的紫外吸收峰强度随之递增。这些结果表明，5种不饱和醛均与溶液中的BSA发生了相互作用，导致蛋白质结构展开，使显色性芳香氨基酸残基暴露。

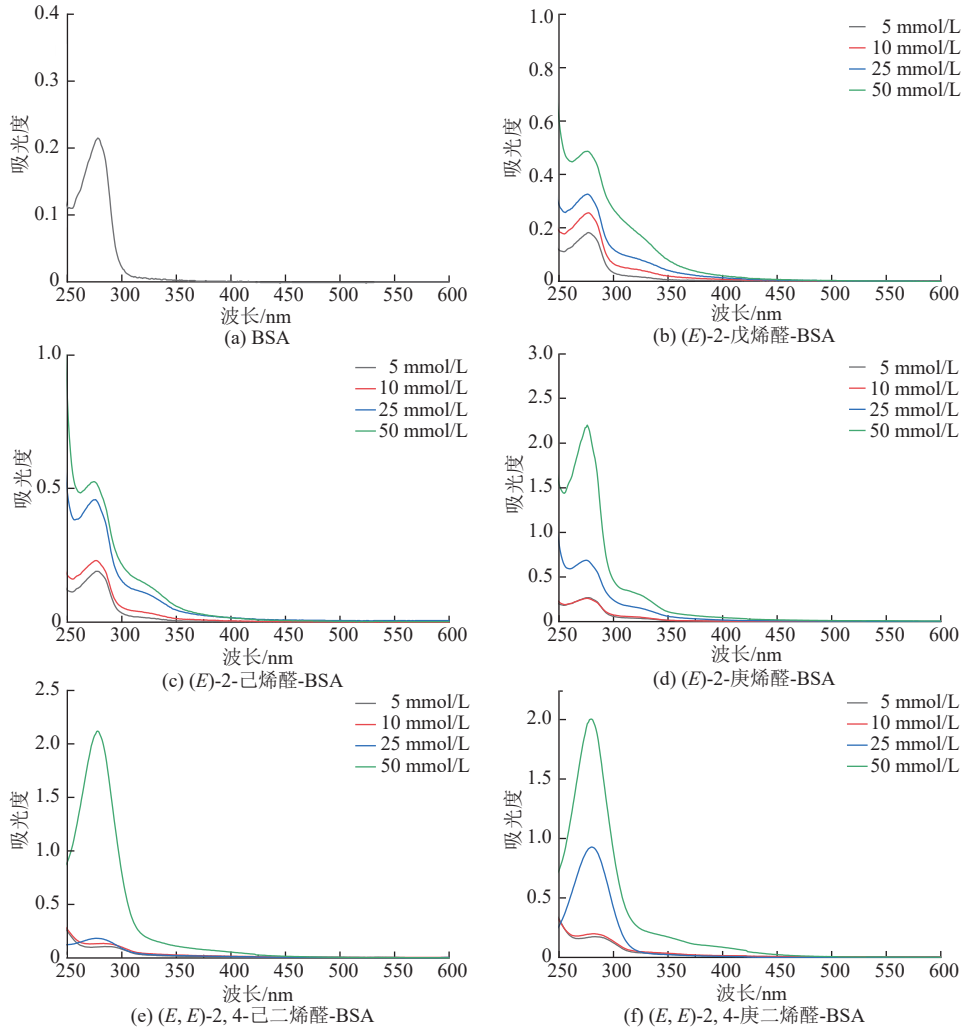


图8　5种醛类物质分别与BSA反应后产物的紫外可见吸收光谱图

Fig. 8　Ultraviolet-visible absorption spectra of the products after the reactions of 5 aldehydes with BSA

3种2-烯醛和2种二烯醛与BSA反应后，紫外可见吸收光谱中观察到了轻微的差异。其中，衍生自（*E*）-2-戊烯醛、（*E*）-2-己烯醛和（*E*）-2-庚烯醛的BSA的紫外可见吸收光谱呈现出相似的特征。在280 nm及300~350 nm处观察到2个吸收峰的最大值增加，尽管300~350 nm处吸光度的增加相对较小。这表明BSA蛋白质结构中引入了新的发色团，在300~350 nm产生了额外的吸光度。（*E*）-2-庚烯醛-BSA复合物的吸光度增加程度最大，其次是（*E*）-2-己烯醛-BSA，（*E*）-2-戊烯醛-BSA最弱。而甲基乙二醛和葡萄糖衍生的BSA中具有类似的紫外可见吸收光谱特征，有研究者推测这是蛋白质交联的结果，生成了具有argpyrimidine和pentosidine结构的晚期糖基化终末产物[29-30]。

3　结论

作者考察了DHA氧化衍生的2类代表性醛类物质（2-烯醛和二烯醛）对BSA的共价修饰作用及其结构影响。采用氰基硼氢化钠还原、酸水解结合UPLC-MS/MS分析，在BSA的组氨酸残基上检测到迈克尔加成产物，同时在赖氨酸残基上检测到迈克尔加成和席夫碱加合物。加合物质量浓度随醛浓度增加而升高，且二烯醛表现出比2-烯醛更高的反应活性。FT-IR和紫外可见吸收光谱分

析表明，醛类修饰导致BSA的α螺旋结构减少、β折叠结构增加，二级结构趋于松散无序，并伴有明显的增色效应及潜在分子交联。通过测定羰基质量摩尔浓度进一步证实了氧化损伤的累积效应。上述结果系统揭示了DHA氧化产物通过共价修饰诱导BSA构象变化的分子机制。此外，建立的多技术联合分析策略（UPLC-MS/MS、FT-IR、DNPH法）可为复杂体系中蛋白质氧化修饰研究提供方法学参考，揭示了不饱和醛类介导的蛋白质氧化是导致富含多不饱和脂肪酸食品品质退化的重要途径。研究结果表明，通过监测特定加合物（如组氨酸-二烯醛加合物）或羰基质量摩尔浓度，可以更加精准地评估食品的氧化程度。此外，短链烯醛更高的反应活性提示在食品配方设计中，需特别关注源自短链脂肪酸氧化的危害。

为提升以BSA或其他蛋白质为功能成分或载体的食品体系（如乳化型饮料）的氧化稳定性，建议采取以下策略：1）控制食品加工与贮藏环境，通过真空/充氮包装、降低贮存温度等方式抑制脂质氧化；2）添加天然抗氧化剂，如维生素E或多酚类物质，阻断脂质过氧化链式反应；3）对蛋白质载体进行预处理，采用糖基化等修饰手段屏蔽易受攻击的氨基酸残基，或选用氧化稳定性更高的替代蛋白；4）建立氧化监测体系，以羰基或特定加合物为指标，实现产品质量控制。综上所述，作者探讨了蛋白质氧化修饰机制，为优化富含多不饱和脂肪酸的制剂稳定性提供了切实可行的技术方案。

目前醛类修饰的具体位点尚未进行肽段水平鉴定，修饰后BSA的生物学功能（如结合能力、抗氧化性）变化也未作评估。后续研究可结合蛋白质组学技术对修饰位点进行精准解析，并进一步考察修饰对BSA功能特性及体内代谢行为的影响，为DHA制剂中蛋白质载体的合理设计与稳定性调控进行更全面的分析。

参考文献

[1] LAURITZEN L，BRAMBILLA P，MAZZOCCHI A，et al. DHA effects in brain development and function [J]. Nutrients，2016，8（1）：6.

[2] 梅俊，许振琨，郁慧洁，等. 冷链物流中海水鱼的腐败机制及保鲜技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41（7）：84-99.
MEI J，XU Z K，YU H J，et al. Research progress on spoilage mechanism and preservation technology of marine fish in cold chain logistics[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41（7）：84-99.（in Chinese）

[3] GENG L X，LIU K L，ZHANG H Y. Lipid oxidation in foods and its implications on proteins [J]. Frontiers in Nutrition，2023，10：1192199.

[4] LU F S H，BRUHEIM I，JACOBSEN C. Maillard reaction and lipid peroxidation contribute to non-enzymatic browning in krill-based products：a model study on proposed mechanisms [J]. European Journal of Lipid Science and Technology，2015，117（4）：421-430.

[5] XU X H，HU J Y，XUE H Q，et al. Applications of human and bovine serum albumins in biomedical engineering：a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2023，253：126914.

[6] WENG S L，HUANG K Y，KAUNANG F J，et al. Investigation and identification of protein carbonylation sites based on position-specific amino acid composition and physicochemical features[J]. BMC Bioinformatics，2017，18（Suppl 3）：66.

[7] SAUERLAND M，MERTES R，MOROZZI C，et al. Kinetic assessment of Michael addition reactions of alpha，beta-unsaturated carbonyl compounds to amino acid and protein thiols [J]. Free Radical Biology & Medicine，2021，169：1-11.

[8] MOANTA A. Classification，synthesis，isomerism，and spectral characterization of schiff bases[J]. Mini-Reviews in Organic Chemistry，2025，22（7）：718-737.

[9] AKAGAWA M. Protein carbonylation：molecular mechanisms，biological implications，and analytical approaches [J]. Free Radical Research，2021，55（4）：307-320.

[10] SONG Y R，KIM J K，LEE H S，et al. Serum levels of protein carbonyl，a marker of oxidative stress，are associated with overhydration，sarcopenia and mortality in hemodialysis patients[J]. BMC Nephrology，2020，21（1）：281.

[11] CHEN Z B，LIN F Y，YE X M，et al. Simultaneous determination of five essential amino acids in plasma of hyperlipidemic subjects by UPLC-MS/MS[J]. Lipids in Health and Disease，2020，19（1）：52.

[12] FEVZIOGLU M，OZTURK O K，HAMAKER B R，et al. Quantitative approach to study secondary structure of proteins by FT-IR spectroscopy，using a model wheat gluten system [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，164：2753-2760.

[13] SHIBATA T，SHIMIZU K，HIRANO K，et al. Adductome-based identification of biomarkers for lipid peroxidation[J]. Journal of Biological Chemistry，2017，

292(20)：8223-8235.

[14] QIAO X，YANG L，GU J Y，et al. Kinetic interactions of nano complexes between astaxanthin esters with different molecular structures and β-lactoglobulin [J]. Food Chemistry，2021，335：127633.

[15] WU K，SUN W，LI D C，et al. Inhibition of amyloid nucleation by steric hindrance [J]. The Journal of Physical Chemistry B，2022，126(48)：10045-10054.

[16] NIU H，CHEN X W，FU X，et al. Pectin-stabilized emulsions：structure-emulsification relationships，covalent and non-covalent modifications，and future trends [J]. Trends in Food Science & Technology，2025，159：104986.

[17] YOSHITAKE J，SHIBATA T，SHIMAYAMA C，et al. 2-Alkenal modification of hemoglobin：identification of a novel hemoglobin-specific alkanoic acid-histidine adduct [J]. Redox Biology，2019，23：101115.

[18] POURNAMDARI M，SAADI A，ELLIS E，et al. Development of a derivatisation method for the analysis of aldehyde modified amino acid residues in proteins by Fourier transform mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta，2009，633(2)：216-222.

[19] LI W J，GAO H Y，MU H L，et al. Three different active aldehydes induce the production of advanced lipoxidation end products upon incubation with bovine serum albumin [J]. European Journal of Lipid Science and Technology，2015，117(9)：1432-1443.

[20] UCHIDA K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification[J]. Amino Acids，2003，25(3)：249-257.

[21] GUO G P，TIAN H F，WU Q X. Influence of pH on the structure and properties of soy protein/montmorillonite nanocomposite prepared by aqueous solution intercalating [J]. Applied Clay Science，2019，171：14-19.

[22] YANG Y X，WANG Q M，LEI L，et al. Molecular interaction of soybean glycinin and β-conglycinin with (－)-epigallocatechin gallate induced by pH changes[J]. Food Hydrocolloids，2020，108：106010.

[23] CHESNE S，RONDEAU P，ARMENTA S，et al. Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells[J]. Biochimie，2006，88(10)：1467-1477.

[24] WANG Y，XIE Y，WANG A D，et al. Insights into interactions between food polyphenols and proteins：an updated overview [J]. Journal of Food Processing and Preservation，2022，46(5)：e16597.

[25] FENG Z，XIA F，JIANG Z T. The effect of β-sheet secondary structure on all-β proteins by molecular dynamics simulations[J]. Molecules，2024，29(13)：2967.

[26] SHARMA S，WARSI M S，ABIDI M，et al. Crotonaldehyde induced structural alterations in low-density lipoprotein：immunogenicity of the modified protein in experimental animals and auto-antibodies generation in various cancers[J]. Spectrochimica Acta. Part A，Molecular and Biomolecular Spectroscopy，2024，304：123332.

[27] INCE C，CONDICT L，ASHTON J，et al. Molecular characterisation of interactions between β-lactoglobulin and hexanal-An off flavour compound [J]. Food Hydrocolloids，2024，146：109260.

[28] CALINSKY R，LEVY Y. Aromatic residues in proteins：re-evaluating the geometry and energetics of π-π，cation-π，and CH-π interactions [J]. The Journal of Physical Chemistry B，2024，128(36)：8687-8700.

[29] LIU F G，MA C C，MCCLEMENTS D J，et al. A comparative study of covalent and non-covalent interactions between zein and polyphenols in ethanol-water solution[J]. Food Hydrocolloids，2017，63：625-634.

[30] CZUBINSKI J，DWIECKI K. A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions[J]. International Journal of Food Science & Technology，2017，52(3)：573-585.