

# 微波固相合成技术及其在多肽（氨基酸）金属螯合物合成中的应用

李玉珍, 肖怀秋

(湖南化工职业技术学院制药与生物工程学院, 湖南株洲 412000)

**摘要:** 多肽(氨基酸)金属螯合物是一种新型金属营养补充剂,具有吸收利用率高,代谢过程能耗低,转运速度快和不易被饱和等优点,而且多肽可作为金属元素配体通过小肽转运系统进入肠黏膜细胞,稳定性高,并可减少金属间拮抗作用,具有很好的应用前景。微波固相合成技术作为一种新型多肽(氨基酸)金属螯合技术,相比传统液相合成法,具有反应速度快、反应效率高、能耗低、工艺操作简单、污染少和无废液产生等优点,广泛应用于多肽(氨基酸)金属配位螯合物的合成中。本文从微波固相合成的机理、影响因素、金属螯合物鉴别及其在多肽(氨基酸)金属螯合物合成中的应用等方面进行了系统综述,并对微波固相合成技术的应用提出了一些建议,以期微波固相合成技术多肽(氨基酸)金属螯合物合成中的应用起到良好的推动作用。

**关键词:** 微波固相合成技术; 金属螯合物; 多肽; 氨基酸; 营养强化剂

文章篇号: 1673-9078(2017)2-262-269

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.040

## Microwave Solid-phase Synthesis Technique and Its Application in the Synthesis of Polypeptide (Amino Acid)-Metal Chelates

LI Yu-zhen, XIAO Huai-qiu

(Pharmaceutical and Bioengineering Academy, Hunan Vocational Technical College of Chemical and industrial Technology, Zhuzhou 412000, China)

**Abstract:** Polypeptide (amino acid)-metal chelates are a new-type metal nutritional supplement with the advantages of high absorption and utilization ratios, low energy consumption during metabolism, and fast transport speed, as well as their inability to be easily saturated. Additionally, polypeptides can serve as metal element ligands to enter intestinal mucosal cells through small peptide transport systems. Polypeptide (amino acid)-metal chelates are highly stable and can reduce the antagonism among metal ions, showing good application prospects. Compared to traditional liquid-phase synthesis, microwave solid-phase synthesis is a new polypeptide (amino acid)-metal complex synthesis technique with the advantages of fast reaction rate, high reaction efficiency, low energy consumption, simple process operation, low level of pollution, and no waste liquid production, and has been utilized widely in the synthesis of polypeptide (amino acid)-metal chelates. In this paper, the principles, applications, and factors affecting microwave solid-phase synthesis of polypeptide (amino acid)-metal chelates and their identification were systematically reviewed. Meanwhile, some suggestions for the development of microwave solid-phase synthesis technique were made, in order to promote the application of the technique in the synthesis of polypeptide (amino acid)-metal chelates.

**Key words:** microwave solid-phase synthesis technique; metal chelates; polypeptide; amino acid; nutritional supplements

许多神经退行性疾病与机体金属阳离子(如  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  等)不足或金属蛋白结构缺陷有重大关系<sup>[1]</sup>,临床上逐步通过药物或食物途径进行补充。目前,主要以无机盐或简单有机酸盐进行金属营养元素的补

收稿日期: 2016-02-26

基金项目: 湖南教育厅科学研究项目(16C0550); 湖南省高校科研项目(12C1049); 湖南化工职业技术学院院级课题(HNHY2015002)

作者简介: 李玉珍(1981-),女,讲师,主要从事蛋白质生物化学方面的教学与研究工作

通讯作者: 肖怀秋(1981-),男,副教授

充,但存在稳定性差、胃肠刺激大、易受肠内容物干扰、生物利用率低、价格高和存在一定毒副作用等缺陷,补充效果不理想<sup>[2]</sup>。以多肽(或氨基酸)为载体进行金属离子螯合并作为营养补充剂具有良好的发展前景<sup>[3-5]</sup>,特别是以多肽为载体。多肽片段一级结构含有大量螯合金属离子的有效部位,且经金属螯合后,在消化吸收性能、营养和生理效果等方面有更好优越性<sup>[6]</sup>。金属螯合肽利用小肽配位体转运系统进行转运(非金属转运系统吸收),具有耗能低、转运速度快和不易被饱和等优点<sup>[7]</sup>,有利于促进金属营养元素的吸

收利用。金属螯合肽还能抑制小肠刷状缘细胞上肽酶的水解活性,防止多肽水解,有助于完整多肽作为金属元素配体通过小肽转运系统进入肠黏膜细胞,提高了稳定性<sup>[8]</sup>,在胃肠道中,金属与多肽配位体结合形成脂溶性的络合物有机表面,吸收并透过肠黏膜细胞的类脂屏障转运入细胞,可减少金属元素间的拮抗作用<sup>[6]</sup>。

金属螯合物合成是配位化学研究的主要领域之一,也是金属元素营养补充剂研究的热点。传统金属螯合物合成是在液相合成条件下完成的,螯合物在反应溶剂中有一定溶解度,但当螯合物溶解性较差时,特别是生成极难溶沉淀时,螯合物纯化和结构表征将变得十分困难,固相合成技术可解决传统液相合成的不足<sup>[9]</sup>。固相合成法是指反应初始物中至少有一个组分是固相的固-固、固-液或固-气合成反应。大多数物质由带正、负电荷的偶极子组成,当微波电磁场方向高速改变时,偶极子取向排列也随之高速变化,分子间相互碰撞机率增加并在短时间内使物质升温<sup>[10]</sup>。相比传统液相合成法,微波固相合成能降低反应活化能( $E_a$ ),增加反应物分子碰撞频率,提高反应速率和效率,降低反应能耗,简化合成工艺,具有合成效率高、废液排放少、环境友好以及生产成本低等优点<sup>[11-13]</sup>,因此,研究人员开始尝试将该技术用于多肽(氨基酸)金属螯合物的合成研究中,并取得了良好效果<sup>[1,8]</sup>。微波固相合成技术也逐步作为金属营养强化剂合成新方法也受到广泛的关注<sup>[8,11]</sup>。

本文从微波固相合成机理、影响因素、金属螯合物鉴别方法等方面进行了综述,并对其应用及发展提出一些拙见,使微波固相合成技术在多肽(氨基酸)金属配位螯合物中的应用得到更好的了解,从而更广泛的应用到多肽(氨基酸)金属配位螯合物的应用研究中。

## 1 微波固相合成机理及影响因素

### 1.1 微波固相合成机理

固相反应属非均相反应,固相条件下其原子或离子扩散比气相、液相要慢的多,需在高温条件下才能进行,因此,固相反应需辅以其它加热手段,如微波加热。石嵩如等<sup>[14]</sup>发现,在微波效应存在条件下,处于微波场中物质内部的电磁场分布对离子扩散和固相反应过程有影响,认为微波加热能产生离子扩散增强效应,使反应物离子通过涨落获得大于势垒的能量穿过产物层,并进行浓度差扩散,在扩散过程中与生成物层的空位形成相关对,在交变微波电磁作用下,相关对不断改变取向,进一步产生浓度梯度,从而推动

离子的扩散。当微波场处于合适位置时,反应体系焓最低,增强了分子碰撞机率,反应物中部分分子吸收微波辐射提供的能量被激活,提高了反应效率<sup>[15]</sup>。

在多肽(氨基酸)一级结构中可能存在一个或多个可配位螯合金属离子的位点,如羧基氧原子、咪唑基氮原子以及巯基硫原子等,具有较强给电子能力,易与金属离子发生配位螯合<sup>[16,17]</sup>。多肽分子与金属离子形成配合物时,除N-端氨基和C-端羧基,以及氨基酸侧链的某些基团可供配位之外,肽链中的羰基和亚氨基也可以参与金属配合。配位螯合后可有效影响其二级结构并调控其生物学活性。不同的配位化合物与多肽的结合,具有各自特殊的氨基酸偏好<sup>[20]</sup>。多肽(氨基酸)金属配位螯合一般遵循“软硬酸碱理论”。如巯基属软碱,易与 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Hg}^{2+}$ 等软酸金属离子配位螯合;硬碱羧基的Asp或Glu易与硬酸金属离子(如 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 等)配位螯合;组氨酸咪唑基可与各类软、硬金属离子形成很强配位键<sup>[18]</sup>,如 $\text{Zn}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 等<sup>[19-21]</sup>。

多肽(氨基酸)金属螯合物的合成与结构稳定性受金属离子类型、多肽(氨基酸)结构、配位螯合环及合成工艺条件参数等因素的重要影响。配位原子与金属离子能形成结构独特的环状稳定结构<sup>[22]</sup>,以五元环或六元环较为常见<sup>[23,24]</sup>。刘昌盛<sup>[23]</sup>等对蛋氨酸铜螯合物微波固相合成的形成机制进行了分析,认为 $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ 与蛋氨酸微波固相合成蛋氨酸铜属取代反应,在微波辐射下,蛋氨酸和水分子吸收微波能量,电离出 $\text{H}^+$ , $\text{H}^+$ 进攻 $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ 酸根离子,使酸根中的O原子与 $\text{Cu}^{2+}$ 配位键减弱,最终断裂,酸根溢出配位内层形成Frenks缺陷或Schottky缺陷,之后蛋氨酸的N原子和O原子与 $\text{Cu}^{2+}$ 形成新的配位键(图1)。李亮<sup>[24]</sup>等通过借助红外光谱(IR)和化学元素法对蛋氨酸与 $\text{Fe}^{2+}$ 微波固相螯合机理进行分析并推断螯合物结构为五元环结构(图1)。

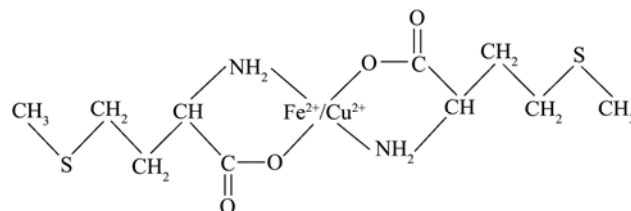


图1 蛋氨酸铜(或亚铁)螯合物结构

Fig.1 Chemical structure of methionine-copper ion (or ferrous ion) chelate

张怡<sup>[25]</sup>等以蛋氨酸和六水氯化铬为原料,采用微波固相合成技术合成蛋氨酸铬并对合成机理进行分析。研究发现,螯合物为五元环稳定结构,铬与蛋氨

酸配比为 1:3, 其可能结构如图 2。

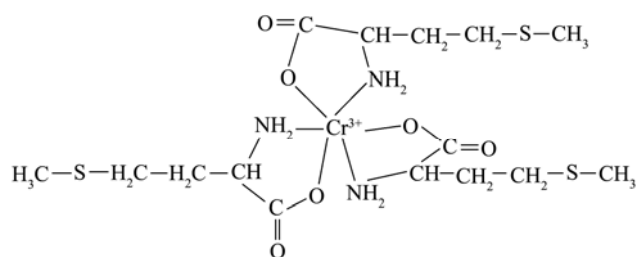


图 2 蛋氨酸铬螯合物的结构

Fig.2 Chemical structure of chromium-methionine chelate

## 1.2 微波固相合成影响因素

### 1.2.1 多肽(氨基酸)与金属螯合剂配比

多肽(氨基酸)与金属螯合剂配比是指多肽(氨基酸)配位体与金属离子的比例。配比太小不能形成稳定的环状螯合结构, 配比过高会造成多肽(氨基酸)过剩, 增加生产成本<sup>[26]</sup>。陈新峰<sup>[27]</sup>等利用微波固相合成技术制备毛虾肽钙螯合物时发现, 毛虾肽与乳酸钙质量比为 2:1 时螯合率最大; 刘玲<sup>[28]</sup>等在微波固相合成 L-瓜氨酸锌螯合物时发现, L-瓜氨酸与乙酸锌配比为 2:1 时螯合物结构稳定且瓜氨酸利用充分; 张怡<sup>[25]</sup>等在蛋氨酸铬微波固相合成时发现, 蛋氨酸与铬配比为 3:1 时螯合率最高; 张娜<sup>[29]</sup>等在赖氨酸锰螯合物微波固相合成工艺优化时发现, 赖氨酸与硫酸锰摩尔比为 2:1 时螯合率最高; 卢昊<sup>[26]</sup>等在优化分析配体比对谷氨酸锌螯合影响时发现, 当配体物质量比为 1.2:1 时, 螯合率达到最大; 胡亮<sup>[30]</sup>等发现, 配体摩尔为 2:1 时蛋氨酸锌螯合率最大; 胡立新<sup>[31]</sup>等研究发现, 当赖氨酸和二水醋酸锌为摩尔比为 1:1 时, 赖氨酸锌螯合率最高; 李亮<sup>[24]</sup>等利用微波固相合成蛋氨酸亚铁螯合物时发现, 蛋氨酸与亚铁配比为 2:1 时最佳。

### 1.2.2 微波辐射时间与辐射功率

微波辐射时间过短, 多肽(氨基酸)金属螯合率较低, 若过长则易造成反应体系中温度过高, 热量无法快速释放导致产物分解<sup>[31]</sup>。在微波固相合成多肽(氨基酸)金属螯合物时, 适当提高微波辐射功率可增强微波穿透强度, 提高反应速率<sup>[32]</sup>, 通过合理配置微波辐射功率和辐射时间可起到事半功倍的效果。张怡<sup>[25]</sup>等在微波固相合成蛋氨酸铬螯合剂时发现, 当配体摩尔比为 3:1, 微波功率为 600 W 时, 辐射时间为 150 s 时, 螯合率最高 (82.1%); 卢昊<sup>[26]</sup>等认为, 在谷氨酸锌螯合时, 在微波功率为 500 W 时, 微波辐射 150 s 最有利于金属配位螯合; 陈新峰<sup>[27]</sup>等利用微波固相合成毛虾肽螯合钙时发现, 当毛虾肽与乳酸钙质量比为 2.5:1, 微波功率为 420 W, 螯合时间为 73 s 时,

钙螯合率达到最高 (82.09%); 刘玲<sup>[28]</sup>等在优化分析 L-瓜氨酸锌合成工艺时发现, 当微波辐射功率为 300 W 时, 微波辐射时间为 4 min 时螯合率最大 (91.1%); 张娜<sup>[29]</sup>等在赖氨酸螯合锰微波固相合成工艺优化分析时发现, 当微波功率为 500 W 时微波辐射 4 min 时, 螯合率达最大 (73.15%)。

### 1.2.3 引发剂

在微波固相合成反应中, 选择极性与非极性耦合的混合溶剂可提高微波能吸收并能降低  $E_a$ , 提高螯合率。微波固相合成中, 加入微量引发剂不仅可加快反应速度, 还可减轻产物焦糊和分解等情况出现<sup>[27]</sup>。引发剂量只影响反应初速度, 不影响反应平衡点, 最常用引发剂是水<sup>[26,27]</sup>, 乙醇、乙酸和甲醇等极性溶剂也可作为引发剂<sup>[33]</sup>。陈新峰<sup>[27]</sup>等以水作为微波固相合成引发剂, 引发剂用量为 50  $\mu\text{L}$  时螯合率最高; 张娜<sup>[29]</sup>等在赖氨酸螯合锰的试验研究中发现, 以水为引发剂, 添加量为 4 mL 时螯合率达最大; 卢昊<sup>[26]</sup>等考察引发剂用量对谷氨酸锌螯合影响时发现, 引发剂量为 13 mL 时螯合率最高 (80.11%); 张怡<sup>[25]</sup>等在微波固相合成蛋氨酸螯合铬时, 以水为引发剂, 当引发剂用量为 20 mL 时螯合率最大; 刘玲<sup>[28]</sup>等在微波固相合成 L-瓜氨酸锌螯合物时, 以水作为引发剂, 其最佳添加量为 5%; 胡亮<sup>[30]</sup>等在微波固相合成蛋氨酸锌时, 以水作为引发剂, 最佳添加量为 12%。

### 1.2.4 脱酸剂

微波固相合成多肽(氨基酸)金属螯合物时常以醋酸金属盐为反应物, 具有反应速度快和产率高等优点<sup>[33]</sup>, 然而, 在金属螯合反应过程中, 虽然乙酸挥发使螯合反应顺利进行, 但乙酸具有较高的偶极极化率, 若不及时除去易造成反应物局部受热过大, 引起产物焦糊和分解, 特别是在以强酸盐为金属螯合剂时, 副产物产生的高沸点酸必需要除去, 否则会造成产物和氨基酸的严重分解<sup>[30]</sup>。为减少酸对螯合反应的影响需进行脱酸处理, 常见的脱酸剂有碱和白炭黑等<sup>[24,28]</sup>。李亮<sup>[24]</sup>等在微波固相合成蛋氨酸亚铁时, 考虑到化学脱酸剂大都为碱性试剂, 可加速  $\text{Fe}^{2+}$  氧化生成  $\text{Fe}^{3+}$ , 因此选用白炭黑作为物理脱酸剂, 具有附能力强、脱酸效率高、不与蛋氨酸和硫酸亚铁反应、对螯合物稳定性无负面影响等优点, 而且白炭黑是微波低耗损物质, 微波辐射下不易形成“微波过热点”, 且不溶于水, 不影响产物精制; 刘玲<sup>[28]</sup>等以碳酸钠作为瓜氨酸锌螯合物合成反应的脱酸剂, 研究发现, 碳酸钠对产物稳定性无负面影响, 且易于洗涤除去, 不影响产物提取; 胡亮<sup>[30]</sup>等以氯化锌为原料制备蛋氨酸锌螯合物时, 由于反应副产物是强酸, 有较高偶极极化率, 以碳酸钠

作为脱酸剂,迅速中和了反应过程中产生的副产物酸,调节反应体系的酸碱度,有利于反应的正向进行。

### 1.2.5 反应物粒度

从理论上讲,反应物粒度越小越能增加反应物质接触频率,提高螯合率,但太小颗粒度又会增加原料加工时间和成本,因此应选择合适反应物粒度<sup>[31]</sup>。李亮<sup>[24]</sup>和胡亮<sup>[30]</sup>等研究发现,反应物粒度减小有利于提高氨基酸与金属的螯合率。当反应物粒度在 140 目时,反应螯合率较优;胡立新<sup>[31]</sup>等在微波固相合成赖氨酸锌螯合物时发现,二水醋酸锌粒度对螯合率有显著影响,以 120 目较为适宜。

## 2 微波固相合成产物的鉴别方法

### 2.1 红外光谱法

多肽(氨基酸)未螯合金属原子之前,其结构上的氨基(-NH<sub>2</sub>)和羧基(-COOH)由于伸缩振动会有特征性的吸收峰,当氨基和羧基与金属螯合后,会使原有的氨基和羧基特征性吸收峰发生位移。因此,通过特征性吸收峰的位移可以鉴别多肽(氨基酸)是否与金属离子成功螯合。此外,对于水合螯合物,在某一特征波长处有配位水分子的面内和面外摇摆振动峰 $\gamma$ (H<sub>2</sub>O)和 $\omega$ (H<sub>2</sub>O)。若这一特征峰消失,表明配位化合物是无水配合物<sup>[25,28,31]</sup>。刘玲<sup>[28]</sup>在微波固相合成 L-瓜氨酸锌产物鉴别分析时发现,氨基和羧基伸缩振动产生的 3361 cm<sup>-1</sup>和 1674 cm<sup>-1</sup>特征性分别位移至 3398 cm<sup>-1</sup>和 1654 cm<sup>-1</sup>,此外,在 500 cm<sup>-1</sup>处也没有发现配位水分子的面内和面外摇摆振动峰,2113 cm<sup>-1</sup>处的 $\alpha$ -NH<sub>3</sub>特征性吸收峰也消失,因此,可确证 L-瓜氨酸与锌有效螯合;张怡<sup>[25]</sup>对比分析了蛋白氨基酸纯品与蛋氨酸铬螯合物 IR 图谱发现,1740 cm<sup>-1</sup>附近无吸收峰说明氨基酸螯合物中不存在游离羧基,Met 和 Cr 配位后 $\nu$ (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)吸收带由 2945 cm<sup>-1</sup>处发生了转移,分别在 3430 cm<sup>-1</sup>和 3244 cm<sup>-1</sup>两处出现 $\nu_{as}$ (NH<sub>2</sub>)和 $\nu_s$ (NH<sub>2</sub>)吸收峰,说明配位成功。此外,在螯合物 IR 图谱中,1107 cm<sup>-1</sup>处产生了 C-N 中强吸收峰,3400 cm<sup>-1</sup>附近有宽吸收峰,而 1690 cm<sup>-1</sup>未出现水的变形振动带,在 500 cm<sup>-1</sup>附近没有出现配位水分子的面内和面外摇摆振动峰,说明产物中没有配位水分子的存在,2095 cm<sup>-1</sup>的 $\alpha$ -NH<sub>3</sub>特征吸收峰螯合后消失;胡立新<sup>[22]</sup>等对比分析了赖氨酸和赖氨酸锌配合物 IR 谱图发现,螯合物 3774.46 cm<sup>-1</sup>处有吸收带,说明含水,在 500 cm<sup>-1</sup>处未出现水的面内和面外摇摆振动峰,1690 cm<sup>-1</sup>处未出现水的变形振动,说明所含的是结晶水,相对赖氨酸 IR 光谱,1342.42 cm<sup>-1</sup>附近的 C-O 伸缩振动吸

收带和 1402.64 cm<sup>-1</sup>处的 O-H 变形振动分别红移了 8.8 cm<sup>-1</sup>和 5 cm<sup>-1</sup>,3416.03 cm<sup>-1</sup>附近中等强度 N-H 伸缩振动吸收带和 1538.54 cm<sup>-1</sup>峰形较尖锐的 N-H 变形振动吸收带分别紫移了 57.26 cm<sup>-1</sup>和 5.93 cm<sup>-1</sup>,同时在 1020.55 cm<sup>-1</sup>处产生了 C-N 键中强吸收峰,说明 Zn<sup>2+</sup>与 N、O 原子形成了配位键并以内盐形式螯合。

### 2.2 紫外光谱法

陈新峰<sup>[27]</sup>对微波固相合成的毛虾肽螯合钙产物进行了紫外鉴别,毛虾肽在 200~230 nm 和 280 nm 附近有较强的肽键和酪氨酸残基特征性吸收峰,螯合后,由于毛虾肽和钙螯合后相应原子的价电子发生跃迁,使 270 nm 处的吸收峰发生红移,因此,毛虾肽和乳酸钙之间发生了配位反应。

### 2.3 热重分析-差热分析法和电感耦合等离子

#### 体-光电发射光谱元素分析

胡立新<sup>[22]</sup>等对微波固相合成的赖氨酸锌螯合物进行了热重分析-差热分析法(TG-DTA)和电感耦合等离子体-光电发射光谱(ICP-OES)元素分析以确证螯合物结构。TG-DTA 分析发现,螯合物中吸附水和结晶水含量约为 9.54%、赖氨酸含量为 39.09%、COO<sup>-</sup>含量为 31.50%,与理论值均比较接近。ICP-OES 元素分析发现,螯合物中 Zn 元素含量为 18.03%。结合红外分析结果,推断螯合物结构为 Zn[CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>CHCOOH]·(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O。钟国清<sup>[35]</sup>对甘氨酸钙螯合物进行了 TG-DTA 分析发现,螯合物 DTA 曲线 132 °C 处有吸热峰,且 TG 曲线上有失重现象,失重率为 8.65%,此为螯合物失水过程,说明有结晶水存在。DTA 曲线 268 °C 处有吸热峰,但 TG 曲线上相应位置处失重不明显,此为螯合物的溶解吸热峰。在 340 °C、425 °C 和 478 °C 有 3 个连续放热峰,表明螯合物的氧化分解是逐级完成的。680 °C 失重恒定,残余质量为原螯合物的 27.56%,与理论计算值 27.20% 一致。

### 2.4 x-ray 粉末衍射分析

钟国清<sup>[34]</sup>对甘氨酸钙螯合物进行了 X 射线衍射(XRD)分析,螯合物 XRD 谱本底小,衍射峰尖锐,晶型很好,衍射角(2 $\theta$ )、晶面间距(d)和相对强度(I/I<sub>0</sub>)均与甘氨酸明显不同。螯合物中甘氨酸晶面间距为 0.3518 nm 的主强峰消失,次强峰 0.2305 nm 和 0.3050 nm 也消失,而在 0.8067 nm、0.3353 nm 和 0.3752 nm 处出现新的主强峰和次强峰,说明螯合物

的生成改变了原组分的晶体结构,使主强峰和次强峰发生了位移。

### 3 微波固相合成技术在多肽(氨基酸)金属螯合物制备中的应用

当微波辐射到物质上时,会产生电子极化、界面极化、原子极化和偶极转向极化等作用,可使带电粒子发生旋转或迁移,特别是偶极转向极化,该作用是物质加热的物理基础。微波辐射加热效果还与反应物数量、物质粒径以及反应介质热容等有关。与传统液相合成相比,微波固相合成更具优势,广泛应用于多肽(氨基酸)金属螯合反应中。张俊敏<sup>[35]</sup>等以鳕鱼皮胶原蛋白肽和硫酸锌为原料,利用微波固相合成技术研究了微波辐射时间、微波功率、胶原蛋白肽和硫酸锌质量比等因素对鳕鱼皮胶原蛋白肽锌螯合物合成的影响,并基于二次正交旋转组合试验和响应面分析法对合成工艺进行优化分析,优化条件下鳕鱼皮胶原蛋白肽锌螯合物的螯合率为29.34%;陈新峰<sup>[27]</sup>等以毛虾肽为载体,以乳酸钙为钙螯合剂,在单因素试验基础上利用 Box-Behnken 响应面优化技术对微波固相合成毛虾肽螯合钙工艺进行了优化分析,获得了最优合成工艺参数,钙螯合率达到82.09%;刘玲<sup>[28]</sup>等以 L-瓜氨酸和乙酸锌为原料,在固体状态下,通过微波辐射合成 L-瓜氨酸锌螯合物并利用单因素试验与正交试验对螯合物合成参数进行了优化分析,优化条件下平均螯合率达到91.1%,产物经红外光谱确证为螯合结构;张怡<sup>[25]</sup>等以蛋氨酸和六水氯化铬为原料,研究了微波固相合成蛋氨酸螯合铬的工艺条件并进行产物结构与理化性状分析,以水作为引发剂,在优化条件下,产率和螯合率分别达到56.7%和82.1%,产品纯度为91%,螯合物结构稳定;张娜<sup>[29]</sup>等以赖氨酸为载体,以硫酸锰为螯合金属源,采用微波固相合成技术合成赖氨酸锰并进行了优化分析,优化条件下螯合率达到73.15%;卢昊<sup>[26]</sup>以谷氨酸钠和氧化锌为原料,研究了在固体状态下通过微波辐射快速合成谷氨酸锌的工艺条件。优化条件下螯合率为83.02%,产物经 IR 鉴定为内络盐;胡亮<sup>[30]</sup>等以氯化锌和蛋氨酸为原料,利用微波固相技术合成了蛋氨酸锌螯合物,螯合物经红外光谱和元素分析,确定蛋白氨酸锌的组成为  $Zn(\text{Met})_2$ 。胡立新<sup>[31]</sup>等以赖氨酸和二水醋酸锌为原料,采用微波固相合成技术合成了赖氨酸锌螯合物,并对合成工艺进行了优化分析,同时,利用 IR、TG-DTA 和 ICP-OES 对产物进行了表征;钟国清<sup>[35]</sup>等以甘氨酸和氧化钙为原料,利用微波固相合成技术合成了甘氨

酸钙螯合物并对合成工艺进行了优化,同时利用元素分析、IR、TG-DTA 以及 x-ray 对螯合物进行了表征,确认其组成为  $[\text{Ca}(\text{Gly})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;刘昌盛<sup>[23]</sup>等以蛋氨酸和乙酸铜为原料,研究了微波固相合成技术制备蛋氨酸铜螯合物工艺并对工艺进行了优化分析;李亮<sup>[24]</sup>以硫酸亚铁、蛋氨酸为原料对蛋氨酸亚铁螯合物微波固相合成工艺进行研究,并对产物进行了红外光谱及元素分析;刘昌盛<sup>[36]</sup>等以蛋氨酸和醋酸锌为原料,利用微波固相合成技术进行蛋氨酸锌螯合物的合成并对工艺进行了优化分析,并用红外光谱对产物结构进行了分析;蒋才武<sup>[37]</sup>等以乙酸锌和甘氨酸为原料,在微波辐射条件下,通过固相反应一步合成了甘氨酸锌,并经电导率、红外光谱、紫外光谱及元素分析表征了产物;贾殿赠<sup>[32]</sup>等在微波辐射条件下研究了过渡金属醋酸盐与甘氨酸配体之间的固相配位反应,研究发现,微波固相合成化学反应速率提高了数十倍甚至数百倍。

## 4 展望

多肽(氨基酸)金属配位螯合主要以液相合成为主,螯合产物在水或溶剂中有一定溶解性,但对溶解度非常小的螯合物,传统液相合成法就存在一定瓶颈,且产物纯化及表征也比较困难<sup>[38]</sup>。因此,近年来,人们试图找寻并利用新的合成方法来合成多肽(氨基酸)金属螯合物。微波固相合成技术可以解决液相合成法的不足,并在多肽(氨基酸)金属螯合物的合成中得到了一定的应用,但也存在一些不足。笔者建议,微波固相合成在多肽(氨基酸)金属螯合物的合成过程中,应注意以下几个方面:

### 4.1 微波固相合成装置的改良

目前,微波固相合成大多以家用微波炉进行,家用微波炉一般多采用多模加热技术,微波场分布有较大不确定性。通常,被加热物料体积只占微波炉腔体一部分,为了更好的进行微波固相反应,需对微波反应装置进行改良,以满足反应的需要。微波固相反应器应具备的条件有<sup>[39]</sup>:(1)能精准调控固相合成工艺参数,如微波辐射温度、反应压力及输出功率等。能稳定地放大同一反应,加热均匀,炉内空腔温差小;(2)反应装置连接完善的软件系统,使反应过程控制简单快捷,而且可以自主设定反应的参数并能自动完成反应;(3)采用单微波技术,微波以单一模式进入反应腔室,形成高密度、能量均衡且稳定的微波电磁场,进一步改善反应物间的界面更新速率,提高微波场的密度和均匀性,保持较高的螯合率和高纯度<sup>[40]</sup>;(4)反应在密室内完成,且反应装置外配置萃取回流

装备, 内有内置搅拌设备, 反应物不污染环境, 符合环境保护的要求。Yang G<sup>[41]</sup>等对微波反应器进行了改进, 其改进后的微波固相反应器结构如图3所示, 通过改进, 大大提高了微波固相反应效率。

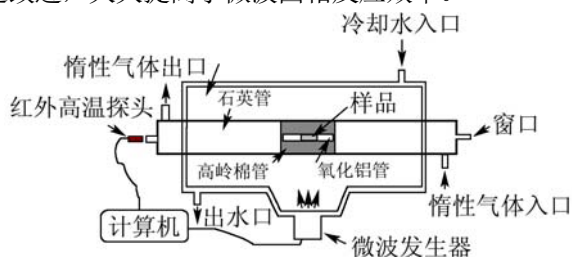


图3 微波固相反应器结构

Fig.3 Diagram of the microwave solid-phase synthesis system

李亮<sup>[24]</sup>等为了减少微波固相反应过程中酸对反应的影响, 也对微波固相合成装置进行了改良, 优化了传统微波固相合成反应的敞开体系和物料处于静态状态等不足。改良后的微波固相反应装置如图4所示。

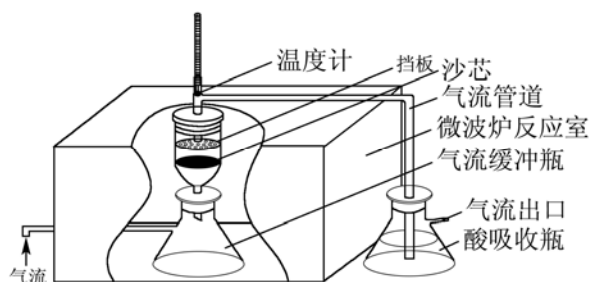


图4 微波固相反应器改良装置结构图

Fig.4 Improved structure device for microwave solid-phase reaction

## 4.2 引发剂的合理选择

在微波固相催化时, 反应物吸收能量的多寡与快慢与反应初始物的分子极性有关, 极性分子由于分子内电荷分布不均衡, 在微波场中快速吸收微波电磁辐射的能量, 通过分子偶极作用以每秒数亿次高速旋转, 分子偶极矩越大, 加热越快, 非极性分子由于在微波电磁场中无法高速旋转, 因此, 微波对其反应作用较弱<sup>[42]</sup>。但由于极性分子吸收微波电磁能量后, 可通过分子碰撞转移到非极性分子上, 而且, 在微波固相合成反应中, 极性与非极性耦合的混合溶剂能降低反应活化能 ( $E_a$ ), 有利于提高多肽(氨基酸)金属螯合率<sup>[43]</sup>, 但值得注意的是, 引发剂溶剂极性太强不利于产物合成, 应选择极性适中的引发剂, 除用水作为微波固相合成引发剂外, 乙醇、乙酸和甲醇等极性溶剂也可作为引发剂<sup>[33]</sup>。

## 4.3 合成工艺的优化

由于多肽(氨基酸)与金属螯合微波固相反应受

配比、微波辐射功率、微波辐射时间、引发剂、脱酸剂和反应物粒度等因素的综合影响, 是一个复杂的灰色体系。为解析各因素影响规律和获得最优合成工艺参数, 可利用试验优化方法对微波固相合成工艺进行优化, 如正交设计和响应面优化技术等, 特别是响应面优化技术。该技术是一种寻求多因素系统中最优试验条件的数理统计方法, 可用于受多个变量影响的复杂灰色体系的优化分析, 常用于多变量非线性复杂体系的优化和交互作用影响的分析, 通过构建全局函数可实现快速建模和缩短优化时间并能提高应用可信度。如刘玲<sup>[28]</sup>等利用单因素试验与正交试验对L-瓜氨酸锌螯合物合成参数进行了优化分析, 在优化条件下, 平均螯合率达到91.1%; 张俊敏<sup>[36]</sup>等利用在单因素试验基础上利用Box-Behnken响应面优化技术对微波固相合成毛虾肽螯合钙工艺进行了优化分析, 获得了最优合成工艺参数。

## 参考文献

- [1] Faller P, C Hureau, P Dorlet, et al. Methods and techniques to study the bioinorganic chemistry of metal-peptide complexes linked to neurodegenerative diseases [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2012, 256(19): 2381-2396
- [2] Aldosary B M, M E Sutter, M Schwartz, et al. Methods and techniques to study the bioinorganic chemistry of metal-peptide complexes linked to neurodegenerative diseases [J]. Clinical Toxicology, 2012, 50(1): 57-64
- [3] Udenigwe C C, R E Aluko. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(1): 11-24
- [4] Friedman M, C E Levin. Nutritional and medicinal aspects of d-amino acids [J]. Amino Acids, 2012, 42(5): 1553-1582
- [5] 汪学荣,周玲,阚建全,等.猪血多肽亚铁螯合盐的急性毒性及30 d 喂养实验研究[J].食品工业科技,2012,1:366-369  
WANG Xue-rong, ZHOU Ling, KAN Jian-quan, et al. Study on acute toxicity and thirty days feeding test of the chelated salt of pig blood polypeptide ferrite [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 1: 366-369
- [6] Rohloff C M, G Chen, Z Ding, et al. Complexation of metal ions with polypeptides: US, 20140088013 [P], 2014-03-27. <http://www.freepatentsonline.com/y2014/0088013.html>
- [7] 方细娟,曾庆祝,战宇,等.多肽-金属元素配合物的研究进展及发展前景[J].食品工业科技,2012,33(4):413-416  
FANG Xi-juan, ZENG Qing-zhu, ZHAN Yu, et al. Review on the development and application of peptide-element complexes [J]. Science and Technology of Food Industry,

- 2012, 33(4): 413-416
- [8] 齐永芬,唐朝枢.生物活性多肽结构和功能的多样性[J].生理科学进展,2013,44(3):162-163  
QI Yong-fen, TANG Zhao-shu. Bioactive polypeptide structure and function diversity [J]. Progress in Physiological Sciences, 2013, 44(3): 162-163
- [9] 徐锁平.铜钴镍锌锰螯合物的微波固相合成及其抑菌活性研究[D].徐州:中国矿业大学,2013  
XU Suo-ping. Study on the microwave solid state synthesis and antibacterial activities of Cu, Co, Ni, Zn, Mn complexes [D]. Xuzhou: China University of Mining and Technology, 2013
- [10] Surati M A, S Jauhari, K Desai. A brief review: microwave assisted organic reaction [J]. Archives of Applied Science Research, 2012, 4(1): 645-661
- [11] Kappe C O, A Stadler, D Dallinger. Microwaves in organic and medicinal chemistry [M]. John Wiley & Sons, 2012
- [12] Masuda K, H Ooyama, K Shikano, et al. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis of neurosecretory protein GL composed of 80 amino acid residues [J]. Journal of Peptide Science, 2015, 21(6): 454-460
- [13] B Vaidhyanathan, M Ganguli, K J Rao. Fast solid state synthesis of metal vanadates and chalcogenides using microwave irradiation [J]. Materials Research Bulletin, 1995, 30(9): 1173-1177
- [14] 石蔼如,贾云发.微波固相反应的扩散增强机理[J].青岛大学学报(自然科学版),1998,1:64-67  
SHI Ai-ru, JIA Yun-fa. Mechanism of enhanced diffusion in microwave solid state reaction [J]. Journal of Qingdao University (Science Edition), 1998, 1: 64-67
- [15] Booske J H, Cooper R F, Dobson I. Mechanisms for nonthermal effects on ionic mobility during microwave processing of crystalline solids [J]. J. Mat. Res., 1992, 7(2): 495-501
- [16] I Domanic, M Sikic, S Tomic. Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino- acid residues involved in the coordination [J]. Acta Crystallographica Section D, 2008, 64(3): 257-263
- [17] Aimee J Gamele, Anna F A Peacock. De novo design of peptide scaffolds as novel preorganized ligands for metal-ion coordination [J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1216: 211-231
- [18] H Schmidbaur, H G Classen, J Helbig. Aspartic and glutamic acid as ligands to alkali and alkaline-earth metals: structural chemistry as related to magnesium therapy [J]. Angewandte Chemie International Edition, 1990, 29(10): 1090-1103
- [19] M Reza Ghadiri, A Katharina Fernholz. Peptide architecture. Design of stable. alpha-helical metallopeptides via a novel exchange-inert ruthenium (III) complex [J]. Journal of the American Chemical Society, 1990, 112(26): 9633-9635
- [20] 马晓川,费浩.金属配位在多肽与蛋白质研究中的应用[J].化学进展,2016,28(2/3):184-192  
MA Xiao-chuan, FEI Hao. The use of metal coordination in peptide and protein research [J]. Process in Chemistry, 2016, 28(2/3): 184-192
- [21] A F A Peacock, V L Pecoraro. Natural and artificial proteins containing cadmium [J]. Metal Ions in Life Sciences, 2013, 11(11): 303-37
- [22] Yadav N, N Bhojak. Microwave assisted synthesis spectral and antibacterial investigations on Co (II) complexes with amide ligands [J]. International Journal of Engineering and Science, 2013, 2(2): 166-8
- [23] 刘昌盛,黄凤洪,乐国伟.微波固相合成蛋氨酸铜的初步研究[J].食品工业科技,2004,25(2):124-125  
LIU Chang-sheng, HUANG Feng-hong, LE Guo-wei. Preliminary investigation on the synthesis of methionine-copper by microwave solid-state synthesis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 25(2): 124-125
- [24] 李亮,施用晖,乐国伟.微波固相合成蛋氨酸亚铁的工艺研究[J].中国粮油学报,2014,19(3):74-77  
LI Liang, SHI Yong-hui, LE Guo-wei. Study on the synthesis conditions of methionine chelated iron(II) by solid state reaction under microwave irradiation [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 19(3): 74-77
- [25] 张怡,王春维,张昆,等.微波固相法合成蛋氨酸螯合铬及其品质分析[J].饲料与畜牧,2012,2:22-26  
ZHANG Yi, WANG Chun-wei, ZHANG Kun, et al. Study on the synthesis of CrMet with methionine and chromic chloride by solid state reaction under microwave irradiation and product analysis [J]. Feed and Animal Husbandry, 2012, 2: 22-26
- [26] 卢昊,王春维,张怡,等.微波固相合成谷氨酸锌的工艺研究[J].中国粮油学报,2010,25(2):121-125  
LU Hao, WANG Chun-wei, ZHANG Yi, et al. Synthesis of sodium glutamine by solid state reaction under microwave irradiation [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(2): 121-125
- [27] 陈新峰,张治国,王君虹,等.响应面法优化微波固相合成毛虾肽螯合钙工艺[J].浙江农业学报,2015,27(8):1473-1478  
CHEN Xin-feng, ZHANG Zhi-guo, WANG Jun-hong, et al.

- Optimization of microwave solid-state synthesis for acetate peptide chelating calcium with response surface method [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2015, 27(8): 1473-1478
- [28] 刘玲,冯振,燕南,等.微波固相合成 L-瓜氨酸锌螯合物的研究[J].食品工业科技,2014,35(8):283-285  
LIU ling, FENG Zhen, YAN Nan, et al. Study on the synthesis of L-citrulline chelated zinc by microwave in solid state [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(8): 283-285
- [29] 张娜,周民杰,阎建辉.微波固相合成赖氨酸螯合锰的研究[J].湖南理工学院学报:自然科学版,2011,24(2):59-61  
ZHANG Na, ZHOU Min-jie, YAN Jian-hui. Microwave assisted solid state reaction synthesis of lysine complexes of Mn(II) [J]. *Journal of Hunan Institute of Science and Technology (Natural Sciences)*, 2011, 24(2): 59-61
- [30] 胡亮,乐国伟,施用晖.微波固相合成蛋氨酸锌工艺的研究[J].食品工业科技,2007,28(1):193-195  
HU Liang, LE Guo-wei, SHI Yong-hui. Study on the synthesis technology of methionine chelated  $Zn^{2+}$  [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(1): 193-195
- [31] 胡立新,占稳,张婷.微波固相合成赖氨酸锌配合物[J].化学与生物工程,2007,24(10):25-27  
HU Li-xin, ZHAN Wen, ZHANG Ting. Microwave assisted solid state reaction synthesis of lysine complexes of Zinc [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2007, 24(10): 25-27
- [32] 贾殿赠,杨立新,夏熙,等.微波技术在固相配位化学反应中的应用研究(I)-Co(II)、Ni(II)、Cu(II)配合物在微波条件下固相合成[J].高等学校化学学报,1997,18(9):1432-1435  
JIA Dian-zeng, YANG Li-xin, XIA Xi, et al. Studies on application of microwave heating techniques for the solid state reaction of coordination compounds(I)-synthesis of Co(II), Ni(II), Cu(II) complexes by solid state reactions under microwave [J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 1997, 18(9): 1432-1435
- [33] 李亮.微波固相合成氨基酸亚铁螯合物的研究[D].无锡:江南大学,2004  
LI Liang. Studies on the synthesis of amino acids chelated iron(II) under microwave radiation in solid state [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2004
- [34] 钟国清.甘氨酸钙螯合物的微波固相合成与表征[J].合成化学,2004,12(6):591-594  
ZHONG Guo-qing. Synthesis and characterization of the complex of bisglycinate calcium by solid phase reaction under microwave irradiation [J]. *Chinese Journal of Synthetic Chemistry*, 2004, 12(6): 591-594
- [35] 张俊敏,乐辉,陈忻,等.响应面法优化微波固相合成鳕鱼皮胶原蛋白肽锌螯合物的工艺[J].广东农业科学,2011,22: 87-90  
ZHANG Jun-min, YUE Hui, CHEN Xin, et al. Microwave-assisted solid-state synthesis for cod-skin collagen peptide chelated zinc compound by response surface methodology [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 22: 87-90
- [36] 刘昌盛,乐国伟,施用晖.微波固相合成蛋氨酸锌[J].饲料工业,2003,24(6):10-11  
LIU Chang-sheng, LE Guo-wei, SHI Yong-hui. Study on the microwave synthesis technology of methionine zinc [J]. *Feed Industry*, 2003, 24(6): 10-11
- [37] 蒋才武,陈灵.微波辐射下苯氧乙酸锌,甘氨酸锌的固相合成及表征[J].广西科学,1999,6(3):193-196  
JIANG Cai-wu, CHEN Ling. Solid phase synthesis and characterization of  $Zn(ArOCH_2COO)_2 \cdot H_2O$  and  $Zn(Gly)_2 \cdot 2H_2O$  under microwave [J]. *Guangxi Science*, 1999, 6(3): 193-196
- [38] Mine Y, E Li-Chan, B Jiang. Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals [M]. John Wiley & Sons, 2011
- [39] Schmink J R, C M Kormos, W G Devine, et al. Exploring the scope for scale-up of organic chemistry using a large batch microwave reactor [J]. *Organic Process Research & Development*, 2010, 14(1): 205-214
- [40] Jiang Juan, Fang Dan-hua, Lu Chao, et al. Solid-state reaction mechanism and microwave dielectric properties of  $CaTiO_3-LaAlO_3$  ceramics [J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2015, 638: 443-447
- [41] Yang G, H Liu, H Ji, et al. Microwave solid-state synthesis and electrochemical properties of carbon-free  $Li_3V_2(PO_4)_3$  as cathode materials for lithium batteries [J]. *Electrochimica Acta*, 2010, 55(8): 2951-2957
- [42] Singh V, Kumar P, Sanghi R. Use of microwave irradiation in the grafting modification of the polysaccharides-A review [J]. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(2): 340-364
- [43] Pedersen S L, A P Tofteng, L Malik, et al. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(5): 1826-1844