

宽体金线蛭多肽-锌螯合物的制备及其结构表征

Preparation and structure characterization of whitmania pigra polypeptide-zinc chelates

曾庆瑞^{1,2} 钱文举¹ 王梦藩¹

ZENG Qing-rui^{1,2} QIAN Wen-ju¹ WANG Meng-fan¹

周宇¹ 陈媛媛¹ 韩曜平¹

ZHOU Yu¹ CHEN Yuan-yuan¹ HAN Yao-ping¹

(1. 常熟理工学院, 江苏 苏州 215500; 2. 中国矿业大学, 江苏 徐州 221000)

(1. Changshu Institute of Technology, Suzhou, Jiangsu 215500, China;

2. China University of Mining & Technology, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

摘要:以宽体金线蛭组织为蛋白源,用木瓜蛋白酶和风味蛋白酶组成的复合酶对宽体金线蛭组织进行酶解,然后将酶解得到的多肽与硫酸锌在不同条件下进行反应,经过硫化钠定性测定,制备出一种多肽-锌螯合物。运用紫外、红外、荧光、X 衍射分析技术对多肽和多肽-锌螯合物的结构进行初步研究分析。结果表明:反应体系 pH、多肽与锌的质量比、多肽浓度对宽体金线蛭多肽与七水合硫酸锌的螯合反应具有重要影响;通过对多肽和多肽-锌螯合物的紫外、红外、荧光、X 衍射图谱对比分析,发现两者的图谱明显改变,说明多肽加锌螯合后结构产生了显著变化;最后根据多肽与多肽-锌螯合物的红外光谱图和多肽金属螯合物的一些结构特性,推断出宽体金线蛭多肽-锌螯合物的一种可能结构。

关键词:宽体金线蛭;多肽;锌;螯合物;结构

Abstract:Peptides were prepared form enzymatic hydrolysis of whitmania pigra protein by composite enzyme(papain and flavorzyme) and then made to react with zinc sulfate heptahydrate under certain conditions to produce polypeptide-zinc chelates that qualitative analysis by sodium sulfide method. The structure of polypeptide-zinc chelates was preliminary research by UV, IR, Fluorescence, X diffraction analysis technology to polypeptide and polypeptide-zinc chelates. The results show that the pH of the reaction system, the mass ratio of polypeptide and zinc, the concentration of whitmania pigra polypeptide have a great influence on the reaction of whitmania pigra peptides and zinc sulfate heptahydrate; By comparing analysis the ul-

traviolet, infrared, fluorescence, X diffraction's spectras of whitmania pigra polypeptides and polypeptide-zinc chelates, significant changes we found between the spectras, indicating the polypeptide structure produced a significant change after chelation reaction by adding zinc; Finally, according to the polypeptide and polypeptide-zinc chelate's infrared spectrums and structure characteristic of metal-polypeptide chelates, a possible structure of whitmania pigra peptides-zinc chelates have been inferred.

Keywords: whitmania pigra; peptide; zinc; chelaes; structure

宽体金线蛭在动物学分类中属于环节动物门蛭纲蛭目黄蛭科金线蛭属,俗称蚂蝗,广泛分布于中国各地区的湖泊、池塘以及水田中。宽体金线蛭不同于医蛭,不吸血,主要吸食水中的浮游生物、螺蛳等为生。研究^[1]表明宽体金线蛭含有一种具有抗凝血作用的水蛭素,因此其在治疗血栓类疾病方面被广泛应用。宽体金线蛭中除了水蛭素外,还含有丰富的蛋白质,粗蛋白的含量达其干重的 78.11%,与大多数鱼类相当^[2]。一些制药厂家提炼宽体金线蛭中的水蛭素后,将剩余宽体金线蛭组织作为药渣丢弃处理,造成了大量蛋白质的浪费。

锌作为一种人体微量元素,当人体缺锌后,会导致细胞免疫功能低下,疾病的易感性增加^[3]。研究^[4]表明,有机锌在生物体内具有不同于无机锌的吸收机制,有机锌与无机锌相比具有对胃肠道的刺激小,且口服吸收利用率高的优势。多肽-锌螯合物作为有机锌型补锌剂,除了具有良好的补锌效果和安全性外,有些还具有抗菌抗氧化等生物活性^[5],在食品和化妆品领域具有很大的应用潜力。

虽然近年来人们对多肽金属螯合物的制备工艺进行了大量的研究,但对制备出的多肽金属螯合物的结构特性却少

基金项目:苏州市科技计划项目(编号:SYN201303)

作者简介:曾庆瑞,男,中国矿业大学在读硕士研究生。

通讯作者:韩曜平(1963-),男,常熟理工学院教授,南京农业大学博士。E-mail:hanyaop@163.com

收稿日期:2015-11-03

有研究。由于具有生物活性物质的结构与其活性具有紧密联系,因此对多肽-锌螯合物结构特性的研究很有必要。本试验拟以宽体金钱蛭为蛋白源对宽体金钱蛭多肽螯合物的制备和结构特性进行一系列的研究,旨在为企业产生良好的社会效益和经济效益,也为多肽金属螯合物构效关系的研究提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

宽体金钱蛭:吴江市明星产业种养殖中心;

风味蛋白酶(16 000 U/g)、木瓜蛋白酶(>1 000 U/mg):

上海奥宇生物科技有限公司;

水和茛三酮:分析纯,上海强顺化学试剂有限公司;

双硫脲:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

氢氧化钠、盐酸、无水乙醇、七水合硫酸锌:水和茛三酮:

分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司;

硫化钠:分析纯,上海展云化工有限公司;

EDTA:分析纯,上海奥宇生物科技有限公司;

二甲酚橙:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

台式 pH 计:PHSJ-4A 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

电子天平:XB623 型,上海精科天美科学仪器有限公司;

台式高速冷冻离心机:H2100R 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

冷冻干燥机:LGI-10 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

傅立叶红外光谱仪:NicoletIS10 型,美国 Thermo 公司;

荧光分光光度计:F-7000 型,日本日立公司;

X 射线衍射仪:D/Max 2500v/pc 型,日本 Rigaku 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 宽体金钱蛭多肽的制备 将一定重量的宽体金钱蛭放入-80℃冰箱冻死,冻死的宽体金钱蛭与去离子水按 1:10(g/mL)混合,用组织破碎器破碎匀浆。将匀浆液置于恒温水浴磁力搅拌器中,调节温度至 46℃,pH 至 6.0。按 8 000 U/g 样品的比例加入木瓜蛋白酶和风味蛋白酶(活力比为 1:1)组成的复合酶催化水解反应^[6],反应 5 h 后在沸水浴中灭酶 15 min,以 5 000 r/min 离心 20 min,弃去沉淀后将上清液冷冻干燥,制得宽体金钱蛭多肽冻干粉粗品。

1.2.2 多肽-锌螯合物的制备 多肽与金属离子的螯合率受反应体系的 pH、温度、多肽的浓度、多肽与金属离子的配比、反应时间等多种因素影响^[7-8]。研究^[9]表明,多肽与金属离子在常温下就能快速地进行螯合反应,温度和反应时间对反应的螯合率影响有限,所以本试验选取反应温度 40℃,反应时间 60 min 作为固定反应条件,研究反应 pH、多肽与锌离子配比、多肽浓度对反应螯合率的影响。称取一定量的多肽

冻干粉,溶于去离子水中,配成一定浓度的多肽溶液,在水浴中加热到 40℃后加入一定比例的七水硫酸锌,搅拌反应 1 h,反应过程中维持一定的 pH。螯合反应液加入 5 倍体积的无水乙醇,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液收集沉淀。将醇沉获得的沉淀用 80%的乙醇反复离心洗涤数次,离心上清液分别加入少量双硫脲和茛三酮试剂^[10]来检测游离锌离子和多肽,待上清液无颜色反应后,将所得沉淀物冷冻干燥。

1.2.3 多肽-锌螯合物的定性检测 采用硫化钠法^[11]对多肽与七水合硫酸锌的产物进行定性分析。称取少量制备的多肽与七水合硫酸锌产物冻干粉溶于去离子水,滴加 5 滴茛三酮试剂,在电炉上煮沸 3 min,观察是否有颜色反应。另称适量的多肽与七水合硫酸锌产物溶于蒸馏水,加入过量硫化钠,静置 5 min,若有沉淀产生,将溶液于 5 000 r/min 下离心 5 min,取上清液。在上清液里滴加 5 滴茛三酮试剂,在电炉上煮沸 3 min,观察是否有颜色反应。

1.2.4 宽体金钱蛭多肽-锌螯合率和得率的测定 采用 EDTA 络合滴定法^[12],测定不同反应条件下制备的多肽-锌螯合物的螯合率和得率。

$$A = \frac{V_1}{V_0} \times 100\%, \quad (1)$$

$$B = \frac{W_1}{W_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

A——多肽-锌螯合物的螯合率,%;

V₁——滴定螯合态锌离子所消耗的 EDTA 溶液体积,mL;

V₂——滴定总锌离子所消耗的 EDTA 溶液体积,mL;

B——多肽-锌螯合物的得率,%;

W₁——反应物的总重量,mg;

W₂——反应生成的多肽-锌螯合物的重量,mg。

1.2.5 宽体金钱蛭多肽-锌螯合物的结构表征

(1) 紫外光谱分析:将制备的多肽-锌螯合物冻干粉溶于去离子水中,制得 2 mg/mL 的多肽-锌螯合物溶液,8 000 r/min 下离心 20 min,取上清液,在 190~350 nm 的波长范围用紫外分光光度计进行光谱扫描。在相同条件下对参与螯合的多肽进行扫描,作为分析对照。

(2) 红外光谱分析:称取 2 mg 左右的多肽-锌螯合物的冻干粉,加入 300 mg 左右的色谱级干燥 KBr,在玛瑙研钵中进行研磨。取少量研磨后的粉末压片,用红外光谱仪在 4 000~500 cm⁻¹ 区间内扫描。在相同条件下对参与螯合的多肽进行扫描,作为分析对照。

(3) 荧光光谱分析:取适量的多肽-锌螯合物,加入蒸馏水溶解,配制成 2 mg/mL 浓度的样品溶液。以蒸馏水为对照,设置荧光分光光度计的激发波长为 280 nm,在室温下测定样品在 290~520 nm 波长范围内的发射光谱。在相同条件下对参与螯合的多肽进行扫描,作为分析对照。

(4) X 射线衍射分析:取少量的多肽-锌螯合物样品,用研钵将样品磨成直径在 10 μm 以下的均匀粉末。将样品放

入样品槽中,小心的压成一个十分平整的试片,设置加速电压 40 kV,扫描范围(2 θ)5°~90°,扫描速度 4°/min,对样品进行分析。在相同条件下对参与螯合的多肽进行扫描,作为分析对照。

2 结果与分析

2.1 多肽螯合物的制备

2.1.1 多肽-锌螯合物的定性分析 由于金属硫化物的稳定常数大于多肽金属螯合物^[13],所以硫化钠可以很容易地将多肽-锌螯合物中的锌置换出来,生成更稳定的硫化锌沉淀,同时生成进行反应的多肽。通过检测游离多肽及观察沉淀的生成,就能对多肽与锌的反应产物进行定性鉴定。由表 1 可知,多肽与七水合硫酸锌的反应产物没有游离的多肽,而当加入硫化钠后,生成了絮状沉淀,在沉淀溶液离心上清液中检测到了游离多肽。根据上述试验现象结果,表明多肽与七水合硫酸锌反应制备出了高纯度的多肽-锌螯合物。

表 1 多肽-锌螯合物的定性分析

Table 1 Qualitative analysis of polypeptide-zinc chelates

步骤	现象	结果
a 多肽与锌离子的反应产物加去离子水溶解,滴加 5 滴茚三酮试剂,在电炉上煮沸 3 min	溶液颜色不变化	反应产物中无游离多肽
b 多肽与锌离子的反应产物加去离子水溶解,加入过量硫化钠,搅拌后静置 5 min	有絮状沉淀生成	硫化物沉淀
c 将上步沉淀溶液离心,取上清液,滴加 5 滴茚三酮试剂,在电炉上煮沸 3 min	溶液变成蓝紫色	有游离多肽

2.1.2 反应 pH 对螯合反应的影响 在反应温度 40 °C,反应时间 60 min,多肽与锌离子的质量比 3 : 2,多肽浓度为 15 mg/mL 的条件下,不同反应 pH 对螯合反应的影响见图 1。由图 1 可知, pH 对多肽与锌离子的螯合有较大影响,当反应 pH 过酸或过碱时螯合率均下降。这可能是在偏酸条件下, H⁺ 与金属离子竞争多肽的螯合点,在偏碱的条件下金属离子优先和 OH⁻ 反应形成沉淀,均会降低多肽与金属离子的螯合率^[14]。在 pH 6.5 时螯合率达到最大值,这可能是

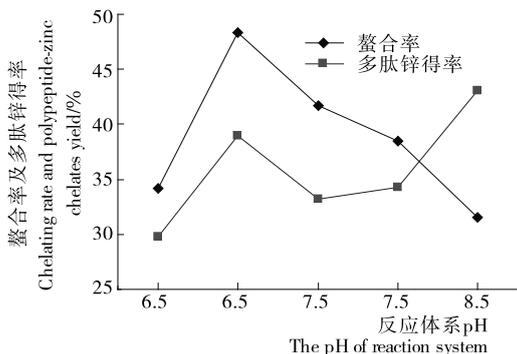


图 1 反应 pH 对螯合反应的影响

Figure 1 Effect of pH on chelating reaction

pH 6.5 接近螯合多肽的等电点,这时螯合多肽受溶液酸碱性的影响较小,能够提供充分的供电子基团,从而有利于与锌通过配位键形成螯合物^[15]。特别要注意的是,当 pH 为 8 时,从图 1 上看到多肽-锌螯合物得率大幅提升,其实此时的螯合产物中混有大量 Zn(OH)₂,造成了多肽-锌螯合物得率升高的假象。

2.1.3 多肽浓度对螯合反应的影响 在反应温度 40 °C,反应时间 60 min,多肽与锌离子的质量比 3 : 2, pH 6.5 的条件下,不同多肽浓度对螯合反应的影响见图 2。由图 2 可知,在一定浓度范围内,随着多肽浓度的增加,螯合率和产率均增加,当多肽浓度高于 25 mg/mL 时,螯合率和产率均减小。这可能是,随着多肽浓度的增大,增加了多肽与锌离子碰撞反应的机会,从而使反应的螯合率及产物得率都有显著增加。然而当多肽浓度过大,致使多肽的溶解度降低,反而导致反应螯合率及产物得率的下降^[16]。

2.1.4 多肽与锌离子的质量比对螯合反应的影响 在反应温度 40 °C,反应时间 60 min, pH 6.5,多肽浓度 25 mg/mL 的条件下,不同多肽与锌离子的质量比对螯合反应的影响见图 3。由图 3 可知,最初随着多肽与锌离子的质量比的增加,螯合率和产率随之增加,当达到 2 : 1 时,反应的螯合率及产物得率达到最大值,当多肽与锌离子的质量比继续增大后螯合率和得率都有所下降。这可能是多肽与锌离子的质量比过小,不利于生成稳定的多肽-锌螯合物,造成螯合率及产物得率较小;质量比过大,过量未反应的多肽造成反应产物得率的下降^[17]。

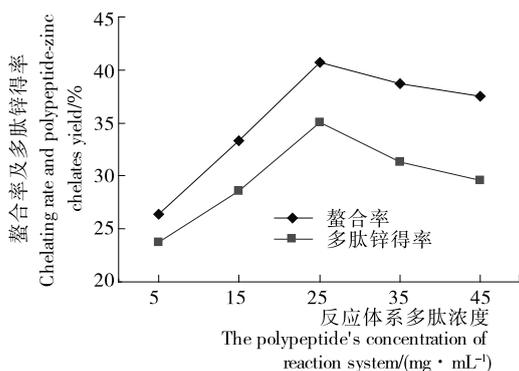


图 2 多肽浓度对螯合反应的影响

Figure 2 Effect of polypeptide's concentration on chelating reaction

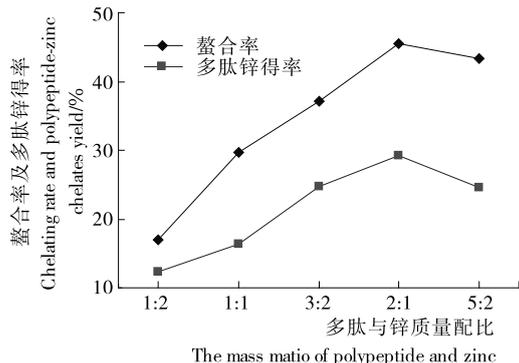


图 3 多肽与锌离子的质量比对反应的影响

Figure 3 Effect of the mass ratio of polypeptide and zinc on chelating reaction

2.2 多肽-锌螯合物的结构表征

2.2.1 多肽-锌螯合物的紫外光谱分析 由图4可知,加锌螯合前多肽溶液的最大吸光度在208.2 nm,加锌螯合产物的最大吸光度为217.0 nm,两者相差8.8 nm,产生了红移,说明锌离子与多肽中的肽键发生了反应。当锌离子与多肽中的肽键进行螯合后,改变了多肽中一些基团的结构,引起基团原子价电子的跃迁变化,从而使物质的最大吸光度产生了位移^[18]。另外,多肽的加锌螯合产物的残留蛋白特征峰(280 nm左右)有明显的下降,这说明锌离子与小肽的结合能力大于与大分子蛋白的结合能力。

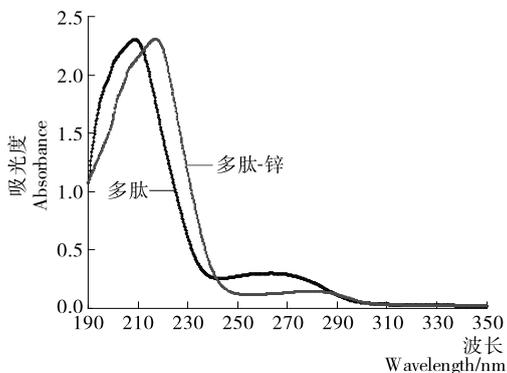


图4 多肽-锌螯合物与多肽的紫外光谱对比分析
Figure 4 UV contrast analysis of polypeptide-zinc chelates and peptides

2.2.2 多肽-锌螯合物的红外光谱分析 多肽中含有羰基、氨基、羧基等一些基团,这些基团在红外光谱图中都有属于自己的特征峰。当多肽与金属离子进行反应后,这些基团的特征峰可能会产生不同程度的位移。图5中多肽的 -NH_2 的吸收峰在 $3388.03, 1659.98 \text{ cm}^{-1}$ 属于酰胺I带的 C=O 吸收峰; 1592.10 cm^{-1} 属于酰胺II带的 -NH 吸收峰; -COO^- 吸收峰在 1399.22 cm^{-1} ^[19]。对比多肽、多肽-锌的红外光谱图可以很清晰的看到 -NH_2 的吸收峰移到了更高波数的 3449.55 cm^{-1} ,酰胺I带的 C=O 吸收峰移至低波数的 1629.10 cm^{-1} ,酰胺II带的 -NH 吸收峰基本消失, -COO^- 的吸收峰移至低波数的 1389.21 cm^{-1} ,这说明多肽上的氨基、羧基以及肽键都参与了与锌的螯合反应^[20]。另外,多肽-锌螯合产物的红外光谱图在 1115.06 cm^{-1} 新增了

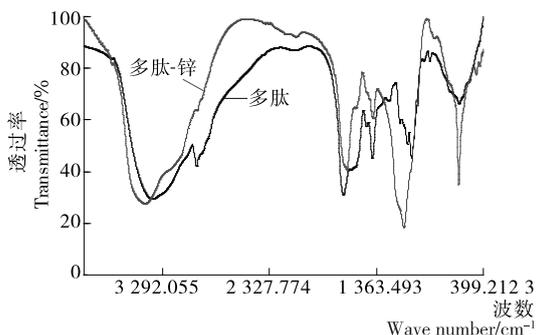


图5 多肽-锌螯合物与多肽的红外光谱对比分析
Figure 5 IR contrast analysis of polypeptide-zinc chelates and peptides

一个强的 PtNH_2 单吸收峰,这更进一步证明了锌与多肽中的氨基发生了螯合反应^[21]。

2.2.3 多肽-锌螯合物的荧光光谱分析 多肽分子中只有色氨酸、络氨酸、苯丙氨酸残基能够发射荧光,并且这3种氨基酸残基具有不同的荧光发射光谱。选用280 nm的激发波长时,色氨酸、络氨酸、苯丙氨酸的最大发射波长分别在348, 303, 282 nm处^[22]。当多肽分子与一些金属离子进行螯合后,可能改变多肽分子中一些荧光生色基团的结构,从而改变多肽的荧光特性,因此可以利用加入金属离子反应前后多肽荧光光谱图的变化来证明多肽是否与金属离子发生了反应。由图6可知,多肽加入锌离子反应前后的荧光光谱图有较大差异,多肽的荧光光谱由一个强峰变成了一个弱的双峰,这证明锌离子与多肽分子发生了反应,从而改变了多肽原来的结构。

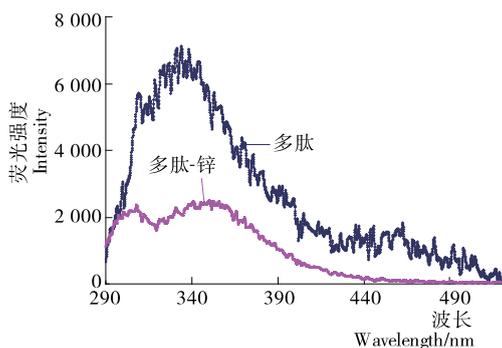


图6 多肽-锌螯合物与多肽的荧光光谱对比分析
Figure 6 Fluorescence spectroscopy contrast analysis of polypeptide-zinc chelates and peptides

2.2.4 多肽-锌螯合物的X射线衍射光谱分析 由图7可知,宽体金线蛭多肽加入锌离子生成多肽-锌螯合物的X射线衍射图谱与反应前多肽的有很大的差别。由于宽体金线蛭蛋白酶解多肽比较复杂,所得的多肽是一种非晶体型物质,所以多肽的X射线衍射图谱没有出现尖锐的衍射峰。多肽-锌螯合物的X射线衍射图谱具有多个典型晶体的比较尖锐的衍射峰,同时也存在着几个弱的弥散型衍射峰。这表明多肽在螯合锌离子后,自身的结构发生了较大的改变,由结晶结构和无定型结构两部分组成,结晶度较螯合前有大幅提高^[23]。

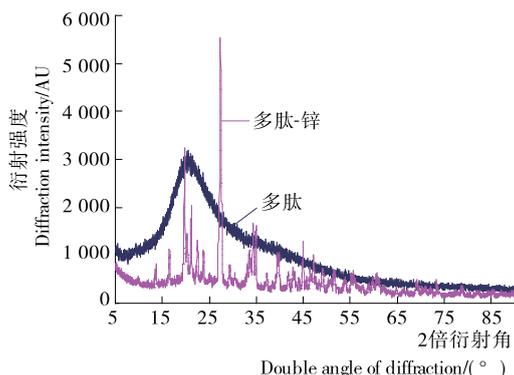


图7 多肽与多肽-锌螯合物的XRD光谱对比分析
Figure 7 XRD contrast analysis of polypeptide-zinc chelates and peptides

2.3 宽体金线蛭多肽-锌螯合物结构式推测

比较宽体金线蛭多肽与其多肽-锌螯合物发现,多肽中的 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COO}^-$ 以及酰胺 I 带和 II 带的特征吸收峰都发生了较为明显的移动和变化,这表明多肽中氨基、羧基以及肽键上的氮原子都参与了与锌离子的螯合反应。另外,多肽-锌螯合产物的红外光谱新增了一个强的 PtNH_2 单吸收峰,也表明锌离子与氨基中的氮原子发生了螯合反应。通过复合酶解法获得的多肽直接与锌离子螯合制备而成的多肽-锌成分比较复杂,综合考虑到多肽金属螯合物一些结构特性^[24-25],再根据多肽螯合物的红外光谱图,以二肽螯合锌为例推测出了宽体金线蛭多肽-锌螯合物一种可能的结构通式(见图 8)。

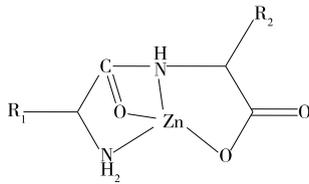


图 8 宽体金线蛭多肽-锌螯合物结构式

Figure 8 The structural formula of whitmania pigra polypeptide-zinc

3 结论

通过对宽体金线蛭酶解多肽与七水合硫酸锌反应产物的定性试验,检测出该反应产物为一种多肽-锌螯合物。宽体金线蛭酶解多肽与七水合硫酸锌的螯合反应的单因素试验表明,反应体系 pH、多肽浓度、多肽与锌的质量比对反应螯合率具有重要影响。比较宽体金线蛭多肽螯合锌离子前后的紫外光谱图,发现多肽的特征峰在螯合锌离子后发生了较为明显的红移,表明多肽中的肽键与锌离子发生了反应。宽体金线蛭多肽在螯合锌离子之后的荧光光谱图比螯合之前具有很大差异,这表明在螯合锌离子后,多肽的结构有很大改变,锌离子对多肽产生一定程度的荧光猝灭效应。通过分析宽体金线蛭多肽-锌螯合物的 X 衍射图谱,发现这种多肽-锌螯合物已经具有一些规则晶体的特征,相比多肽的结晶度有很大程度的提升。最后根据加锌螯合前后的多肽红外光谱图谱特征峰变化,以及多肽金属螯合物的结构特性,推测出了一个宽体金线蛭多肽-锌螯合物可能的结构通式。由于制备的多肽-锌螯合物成分比较复杂,所以后续需要对制备的多肽-锌螯合物进行分离纯化,然后对其具体结构以及生物活性做更深入的研究。

参考文献

[1] 万明,唐仕欢,游云,等.宽体金线蛭鲜品和干品提取物体外抗凝血活性研究[J].中南民族大学学报:自然科学版,2012,31(1):47-50.

[2] 吕丹,黄旭雄,孙岳松,等.微山湖产宽体金线蛭生化组成的分析[J].大连海洋大学学报,2011,26(3):281-286.

[3] 张军.微量元素与人体健康[J].实用预防医学,2006,11(5):

1 070-1 071.

[4] 张丽萍,张新国.微量元素锌营养剂的研究进展[J].微量元素与健康研究,2004,21(6):62-64.

[5] 曾庆祝,陈陆欣.多肽-锌配合物的生物功能活性及安全性[J].现代食品科技,2013,29(8):2 035-2 039.

[6] 韦汉昌,韦善清,何建华.动物蛋白水解复合酶的研究[J].化工技术与开发,2011,40(10):5-7.

[7] 金文刚,吴海涛,朱薇薇,等.响应面优化虾夷扇贝生殖腺多肽- Ca^{2+} 螯合物制备工艺[J].食品科学,2013,34(16):11-16.

[8] 霍健聪,郑尚贵,谢超.多肽亚铁螯合物制备及抑菌活性研究[J].食品与机械,2009,25(1):86-89.

[9] 丁利君,危雪如.罗非鱼蛋白酶解液的多肽与钙复合物的制备及其抑菌分析[J].食品科学,2009,30(20):198-202.

[10] 付文雯.牛骨胶原多肽螯合钙的制备及其结构表征[D].武汉:华中农业大学,2010:1-73.

[11] 俞园园.类人胶原蛋白-铜螯合物的制备及相关性质研究[J].化学与生物工程,2013,30(7):29-32.

[12] 赵洪雷,徐永霞,杨杰,等.低值鱼小肽螯合锌的制备工艺研究[J].食品科技,2009,34(9):117-119.

[13] 刘丽莉.牛骨降解菌的筛选及其发酵制备胶原多肽螯合钙的研究[D].武汉:华中农业大学,2010:1-195.

[14] 高菲,王维有,鲁军,等.海洋鱼骨胶原原肽钙螯合物的制备及红外光谱表征[J].中国海洋大学学报:自然科学版,2015,45(1):47-54.

[15] 邱冬玲,胡长利,崔建云.丝素肽与锌螯合工艺条件的研究[J].食品研究与开发,2008,29(7):38-42.

[16] 汪学荣,郑炯,阙建全.猪血多肽铁螯合盐的制备工艺[J].食品与发酵工业,2010,36(6):89-93.

[17] 高红梅,桑宏庆,李淑贤.小麦肽-锌螯合物的制备[J].饮料工业,2013,16(7):23-26.

[18] Yu Yuan-yuan, Fan Dai-di. Characterization of the complex of humanlike collagen with calcium[J]. Biological Trace Element Research, 2012, 145(1): 33-38.

[19] 范小娜,李蕾,余磊.稀土-蛋白质配合物合成及其傅立叶红外光谱分析[J].赣南医学院学报,2001,21(2):107-110.

[20] 祝德义,李彦春,靳丽强.胶原多肽与钙结合性能的研究[J].中国皮革,2005,34(3):26-29.

[21] 段秀,杨成涛,孙云,等.罗非鱼皮胶原蛋白肽亚铁螯合修饰及螯合物性质的研究[J].食品工业科技,2014,35(18):157-160.

[22] 尹燕霞,向本琼,佟丽.荧光光谱法在蛋白质研究中的应用[J].实验技术与管理,2010,27(2):33-36,40.

[23] Jin Yong-guo, Fu Wen-wen, Ma Mei-hu. Preparation and structure characterization of soluble bone collagen peptide chelating calcium[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(50): 10 204-10 211.

[24] Guo L, Hou H, Li B, et al. Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(5/6): 988-993.

[25] Robert C D, Nicolas P, Giel B, et al. Metal ion binding to peptides: Oxygen or nitrogen sites? [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2012, 330-332: 71-77.