

蜂毒肽衍生物的固相合成与表征

张翔, 黄磊, 宫玉坤, 陈维晟, 柯莹莹, 汪燕, 王爱东
(黄山学院化学化工学院, 黄山 245041)

摘要: 蜂毒肽 (Melittin) 是蜜蜂毒素的主要活性衍生多肽, 由 26 个氨基酸残基组成, 具有抗炎、抗菌等多种生物活性。本研究采用 Fmoc 固相合成策略 (SPPS), 用全自动多肽合成仪合成蜂毒肽, 以 Rink Amide MBHA 树脂为载体、HBTU/DIEA 为缩合体系, 由 C 端至 N 端逐次偶联氨基酸合成蜂毒肽, 通过 Kaiser 试验与四氯苯醌试验监测脱保护及缩合反应进程。对 Fmoc 脱除条件进行系统优化, 确定适宜的反应温度与时间; 采用 TFA 混合裂解液将多肽从树脂上切割, 经乙醚沉淀、洗涤、冷冻干燥获得粗肽。建立蜂毒肽高效液相色谱标准曲线, 实现对目标产物的准确定量。产物经高效液相色谱 (HPLC)、傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 等表征, 纯度良好、结构与蜂毒肽一致, 同时 ABTS+ 抗氧化实验表明, 制备的蜂毒肽具有明显自由基清除能力, 活性随浓度升高而增强。本研究建立了稳定可行的蜂毒肽固相合成与检测方法, 为其结构修饰与活性研究提供实验依据。

关键词: 蜂毒肽; 固相合成; Kaiser 试验; Fmoc 策略; 结构表征

中图分类号: O629.72

Solid-phase synthesis and characterization of melittin derivatives

ZHANG Xiang, HUANG Lei, GONG Yukun, CHEN Weisheng, KE Yingying,
WANG Yan, WANG Aidong

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Huangshan University, huangshan 245041)

Abstract: Melittin is the main biologically active polypeptide derived from bee venom, composed of 26 amino acid residues. It possesses multiple biological activities including anti-inflammatory and antibacterial effects. In this study, the Fmoc solid-phase peptide synthesis (SPPS) strategy was adopted, and melittin was synthesized by an automatic peptide synthesizer. With Rink Amide MBHA resin as the carrier and HBTU/DIEA as the condensation system, amino acids were coupled sequentially from the C-terminus to the N-terminus to synthesize melittin. The Kaiser test and chloranil test were used to monitor the progress of deprotection and condensation reactions. The Fmoc deprotection conditions were systematically optimized to determine the optimal reaction temperature and duration. A mixed trifluoroacetic acid (TFA) cleavage solution was used to cleave the polypeptide from the resin, and crude melittin was obtained via diethyl ether precipitation, washing and freeze-drying. A high-performance liquid chromatography (HPLC) standard curve of melittin was established to achieve accurate quantification of the target product. The product was characterized by HPLC and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), which verified its high purity and structural consistency with natural melittin. Meanwhile, ABTS⁺ antioxidant assay results demonstrated that the prepared melittin exhibited significant free radical scavenging activity in a concentration-dependent manner. This study established a stable and feasible method for the solid-phase synthesis and detection of melittin, providing an experimental basis for its structural modification and further bioactivity research.

Key words: Melittin; solid-phase peptide synthesis; Kaiser test; Fmoc strategy; structural characterization

0 引言

蜂毒肽是蜜蜂毒素的核心活性多肽, 由 26 个氨基酸组成, 占蜂毒干重 40%~60%, 具

基金项目: 全国大学生创新创业项目 (202410375062)

作者简介: 张翔 (2003-), 男

通信联系人: 王爱东 (1968-), 女, 教授, 主要研究方向: 制药工程. E-mail: wad0103@qq.com

备抗炎、抗菌、抗氧化及抗肿瘤等多种药理活性，在生物医药领域具有重要开发价值^[1-2]。但天然蜂毒肽存在溶血副作用强、细胞毒性大、体内易降解、稳定性差等缺陷^[3,6]，且天然提取成本高、纯度低，难以满足规模化制备与临床应用需求^[4]。

50 多肽固相合成技术是获取高纯度多肽的主流方法，其中 Fmoc 固相合成策略因反应条件温和、无需使用强腐蚀性氢氟酸、副产物少、便于自动化操作，已成为长链多肽合成的优选方案^[7-8]。目前蜂毒肽的固相合成仍存在脱保护条件不明确、偶联效率不稳定、产物纯度与定量方法不完善等问题，制约其高效制备与结构优化研究^[9-10]。

本研究以蜂毒肽为目标分子，采用 Fmoc 固相合成法与全自动多肽合成仪开展合成工作，旨在建立稳定、高效、可重复的蜂毒肽实验室制备工艺；系统优化 Fmoc 脱保护的温55 度与时间参数，明确最佳反应条件；建立 HPLC 定量标准曲线，实现产物准确定量^[4]；通过 HPLC、傅里叶红外光谱对产物进行纯度与结构表征，并采用 ABTS⁺法评价其抗氧化活性^[5]。最终为蜂毒肽的结构修饰、活性改良及药用制剂开发提供可靠的实验方法与技术支撑^[2-3]。

1 蜂毒肽及多肽固相合成研究现状

60 在自然界中，诸如蜘蛛、蝎子、蛇、蜜蜂等生物能够产生具有毒性的分泌物-毒液，这些毒液通常用于使捕食对象或掠食者丧失行动能力，甚至直接将其杀灭。此类毒液一般含有具有药理活性的成分，涵盖一些酶和肽，具备极高的研究价值。

蜂毒是由蜜蜂腹腔内腺体合成的毒素，是一种包含多种生物活性物质的混合物。其中的肽类物质包括蜂毒肽（Melittin）、蜂毒明肽（Apamin）等，此外还含有其他酶类和胺类65 等成分。

1.1 天然蜜蜂毒素的简介

蜂毒肽（Melittin）作为蜜蜂毒素的主要活性衍生多肽成分，在蜂毒干重中所占比例达40% - 60%，是一种线性阳离子两性多肽，由 26 个氨基酸残基组成，分子量为 2847.5 Da。蜂毒肽分子呈 α -螺旋结构，N端区域以疏水性氨基酸为主，C端区域则富含亲水性氨基酸，整体携带 6 个正电荷结构式，3D模拟结构图见图 1-2。70

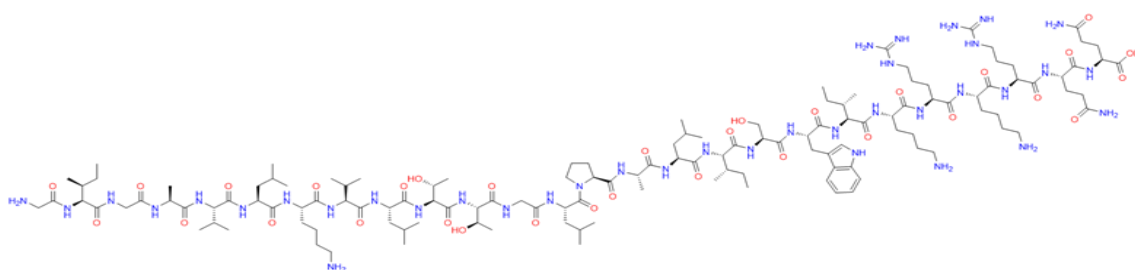
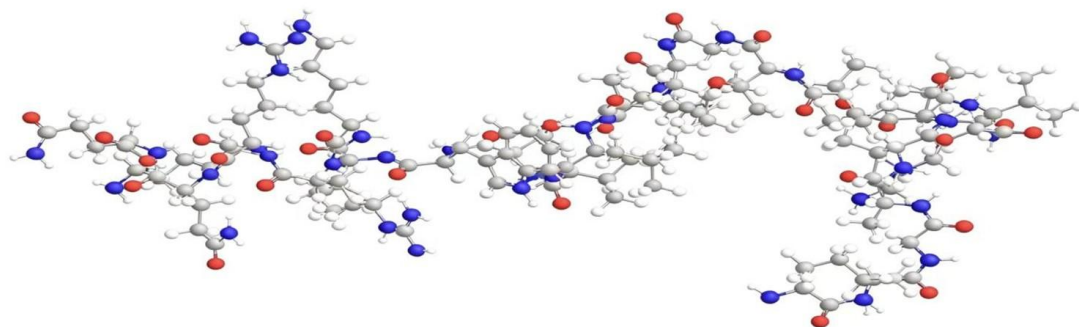


图 1-1 蜂毒肽的结构式

(NH₂-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-COOH)



75

图 1-1 蜂毒肽的 3D模拟结构图

1.2 天然蜜蜂毒素蜂毒肽研究现状

蜂毒肽是蜂毒中关键的阳离子两性多肽，具有抗炎、镇痛、抗菌、抗病毒及抗肿瘤等多种生物活性，作用机制独特、药用潜力突出。但天然蜂毒肽存在明显缺陷，溶血副作用强、细胞毒性大、体内稳定性差、易被酶降解，极大限制了其临床应用与制剂开发。现阶段研究主要围绕蜂毒肽结构改造与功能优化展开，通过氨基酸定点突变、末端化学修饰、杂合肽构建及靶向偶联等方式设计衍生物，在保留生物活性的同时，有效降低毒副作用、提升作用特异性。此外，脂质体、纳米微球、聚合物载体等递送技术不断发展，可实现药物缓释与靶向富集，进一步改善体内利用度。

85

1.3 多肽固相合成技术及其发展现状

1963年，Merrifield首创固相肽合成（SPPS）技术，并因此荣获1984年诺贝尔化学奖。固相合成法可分为叔丁氧羰基（Boc）法和9-芴甲氧羰基（Fmoc）法两大类。Fmoc法避免了强腐蚀性氢氟酸的使用，副产物更少，产率更高，且可通过紫外监测Fmoc基团实现反应过程监控，更适于自动化生产。

90

Fmoc固相合成中，氨基酸 α -氨基受Fmoc保护，侧链采用相应保护基团。在固相合成仪中每轮缩合包括脱保护、洗涤、活化、偶联及再次洗涤等步骤，过量试剂可通过过滤去除，大幅节省反应时间与纯化成本。然而，传统SPPS在合成长序列多肽时面临耦合效率低、副反应多等挑战，尤其是序列中含色氨酸（Trp）等易氧化残基时，需优化工艺参数以提高合成效率。多肽固相合成基本步骤示意图 1-3。

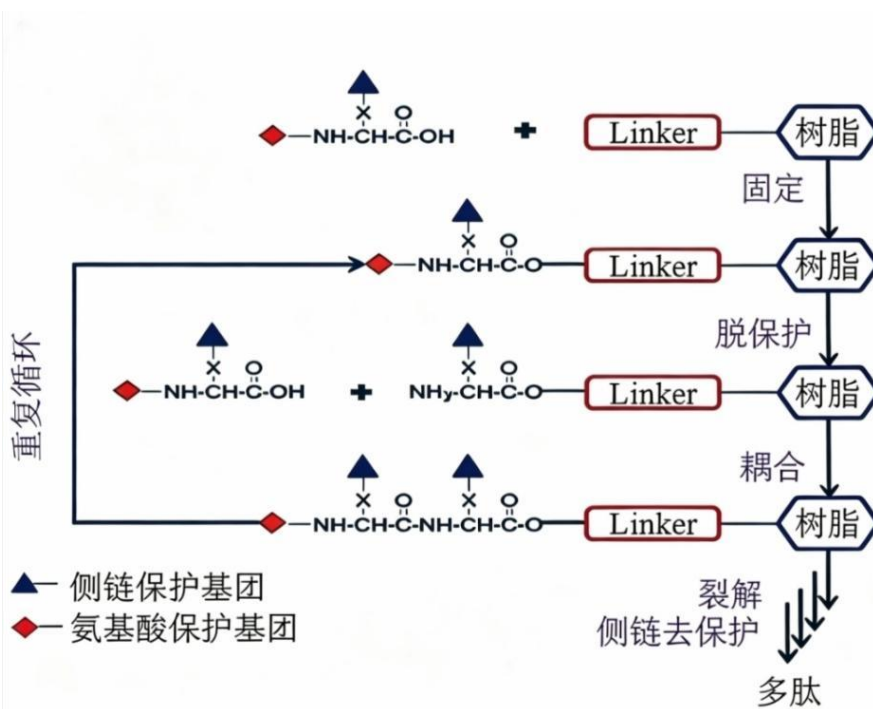


图 1-2 多肽固相合成基本步骤示意图

2 蜂毒肽固相合成及表征

2.1 主要试剂仪器规格及生产厂家

实验所需试剂及产地:

表 2-1 合成所用主要试剂规格及生产厂家

试剂名称	级别	生产厂家
Fmoc-AA-OH	99%	上海易恩化学技术有限公司
HBTU	99%	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
N,N-二异丙基乙胺 (DIEA)	99%	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)	AR	上海易恩化学技术有限公司
二氯甲烷 (DCM)	99.5%	上海麦克林生化科技股份有限公司
哌啶	AR	天津市大茂化学试剂厂
三氟乙酸 (TFA)	99%	上海贤鼎生物科技有限公司
茚三酮	98%	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
苯酚	AR	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醚	AR	天津市大茂化学试剂厂
乙腈	HPLC	天津彪仕奇科技发展有限公司
四氯苯醌	98%	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
L-还原性谷胱甘肽	98%	上海麦克林生化科技股份有限公司

蜂毒肽固相合成及表征所需仪器型号及产地:

表 2-2 合成所需仪器型号及生产厂家

仪器名称	型号	生产厂家
多肽合成仪	CSBio II	美国CSBio公司
紫外光谱仪	P8	上海美谱达仪器有限公司
超纯水机	HK-IV-10	合肥宏科仪器有限公司
低温冷冻干燥机	FD-1A-80+	博医康(北京)仪器有限公司
组合式离心浓缩系统	ZL3-1K	湖南可成仪器设备有限公司
磁力搅拌器	CCLH CLASSIC	上海小聪科技有限公司
高效液相色谱	LC-16	岛津企业管理(中国)有限公司
傅里叶红外变换光谱	M8GD2501	天津港东科技发展有限公司
电子分析天平	AUY220	日本岛津有限公司
循环水式多用真空泵	SHZ-DIII	巩义市予华仪器有限责任公司

105 蜂毒肽固相合成部分试剂缩写:

表 2-3 试剂缩写和试剂全称

试剂缩写	试剂全称
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DCM	二氯甲烷
HBTU	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
TFA	三氟乙酸
茚三酮	苯并戊三酮
DPPH	1,1-二苯基-2-苦基肼自由基
TEA	三乙胺
TIS	三异丙基硅烷

蜂毒肽固相合成所用树脂物理性质及产地:

表 2-4 树脂的性质及其生产厂家

树脂名称	树脂物理性质	树脂的取代度	生产厂家
Rink Amide MBHA 树脂	白色不透明球状颗粒	0.3-0.8 mmol/g	上海麦克林生化科技股份有限公司

2.2 Fmoc 固相合成蜂毒肽的基本流程

2.2.1 树脂的活化

115 首先，精确称取 0.8g 的树脂，将其装入固相合成管内。接着，向合成管中注入适量 DMF (N,N-二甲基甲酰胺) 试剂，在浸泡过程中，通过固相合成仪氮气鼓泡为 2 小时，可以适当延长鼓泡的时间，达到对树脂充分且均匀溶胀，并确保其充分活化的目的。可配合采用氮气鼓泡的方式，促进树脂溶胀。浸泡完成后，彻底抽除合成管内残留的有机溶剂，并将已活化的树脂置于干燥环境备用。

2.2.2 树脂上 Fmoc 保护基团的脱除处理

120 首先配制以 DMF 为溶剂的体积分数为 20% 的哌啶脱保护溶液。将该溶液加入已装有活化树脂的合成管中，并将合成管放入固相合成仪，启动脱保护反应。为彻底去除 Fmoc 保护基团，采用两步脱保护法：第一次反应持续 5min，第二次反应持续 10min，期间采用氮气鼓泡和适当提高温度的方法使其充分反应。待反应结束后，完全抽干反应液，随后使用 DMF 对树脂进行多次彻底洗涤，以去除任何可能残留的脱保护试剂。

125 2.2.3 Kaiser 试剂和四氯苯醌试剂显色试剂的配制及脱保护效果监测

Kaiser 试剂是目前应用最为广泛的检测方法，可以清楚的显示游离胺的存在；由于不能检测二级胺，蜂毒肽分子中含有脯氨酸，故采用四氯苯醌试剂来检测脱保护的效果。

Kaiser 试剂的配制方法如下：

130 试剂 A: 1.25g 茚三酮溶解到 25mL 的无水乙醇中

试剂 B: 16g 苯酚溶解到 4 mL 的无水乙醇中

二者分别充分摇晃至完全溶解，并将配制好的试剂避光保存以备使用。

135 脱保护效果检测：在完成首次脱保护及多次 DMF 洗涤后，使用毛细管吸取少量树脂样品，转移至小型离心管中。向离心管中依次滴加约 1 毫升 KaiserA 和 KaiserB 试剂，充分振荡混合均匀。将离心管置于已加热的水浴烧杯中，加热 1 至 2min 后观察树脂颜色变化。若树脂转变为明显的红棕色，则判定 Fmoc 保护基脱除完全；若树脂颜色未发生明显变化，则说明脱保护不完全，需重新执行脱保护步骤。

140 Kaiser 试剂显色原理：茚三酮首先脱水与氨基缩合得到亚胺，因此只有氨或伯胺才能发生此步反应，随后亚胺脱羧后异构化为另一种形式的亚胺，水解后释放出出一分子伯胺和一分子醛。伯胺进一步与茚三酮发生缩合得到二聚的亚胺衍生物从而显色。对于二级胺，我们可以选择后面将要提到的四氯苯醌来显色。

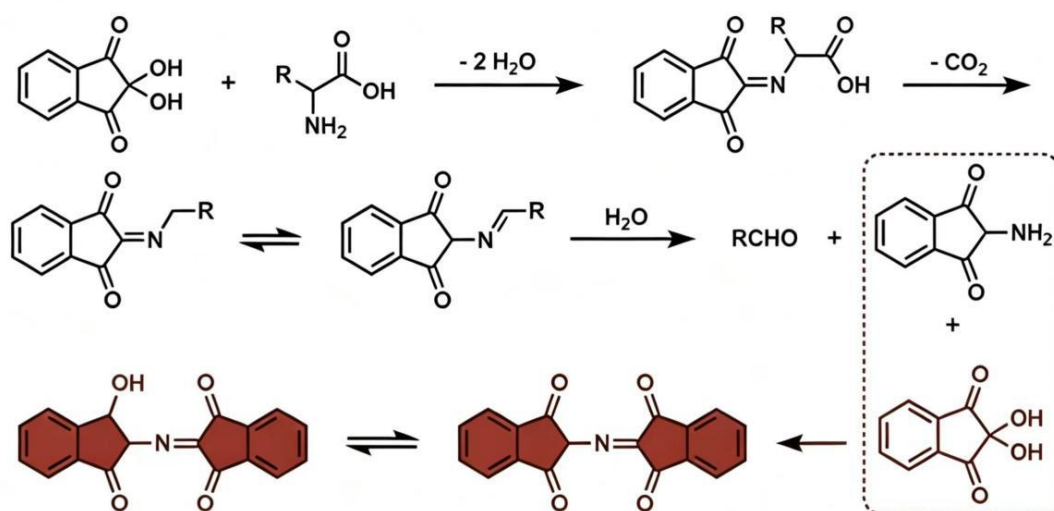


图 2-1 Kaiser 试剂显色原理

四氯苯醌试剂的配置方法：2g 四氯苯醌溶于 98mL 的 DMF 试剂中。

四氯苯醌试剂主要用于检测二级胺(R₂NH),在本实验中主要用于检测脯氨酸。

145 完成上述的脱保护及 DMF 洗涤后，取少量树脂于小型离心管中，一般树脂的量以铺满试管底部一层为宜，之后加入上述配制好的四氯苯醌试剂两滴，室温下放置 5-10min，如果树脂显蓝绿色说明则判定 Fmoc 保护基脱除完全，若树脂颜色未发生明显变化，则说明脱保护不完全，需重新执行脱保护步骤。

2.2.4 氨基酸缩合反应过程

150 氨基酸的氨基与另一个氨基酸的羧基难以自发形成酰胺键（肽键）。若要形成酰胺键（肽键），需将氨基酸的羧基转化为活性状态。此时，另一种氨基酸的氨基作为亲核试剂，通过进攻已活化的羧基引发偶联反应。故而，在开展氨基酸的缩合反应之前，需要对氨基酸进行活化处理。

155 称取缩合试剂 HBTU 试剂 21.2374g，加入 DMF 溶液中充分溶解定容至于 100mL 容量瓶中。

160 依据蜂毒肽的序列由 C 端至 N 端的顺序，精确称取相应的 Fmoc 保护氨基酸并加入 HBTU 溶液进行超声溶解，加入适量的活化试剂 DIEPA（N,N-二异丙基乙胺）进行活化 3-7min，将活化完全的氨基酸溶液加入固相合成管中，进入固相合成管中，完成后启动固相合成仪，在氮气持续鼓泡及合适温度下开始进行缩合反应。为提升缩合效率，采用两次缩合策略，每次缩合反应时间均设置为 30min，以确保氨基酸的缩合反应完全，反应机理参考图 2-2。

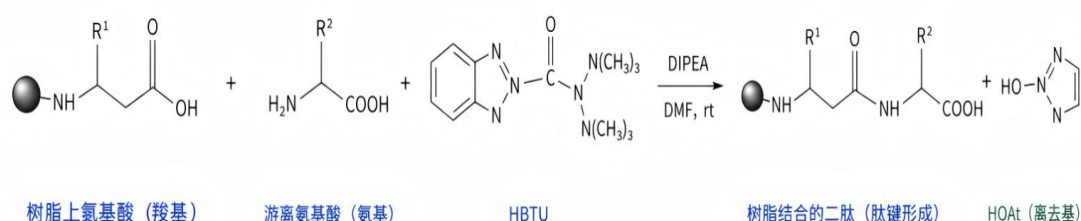


图 2-2 氨基酸缩合基本原理

2.2.5 氨基酸缩合效果的 Kaiser 检测

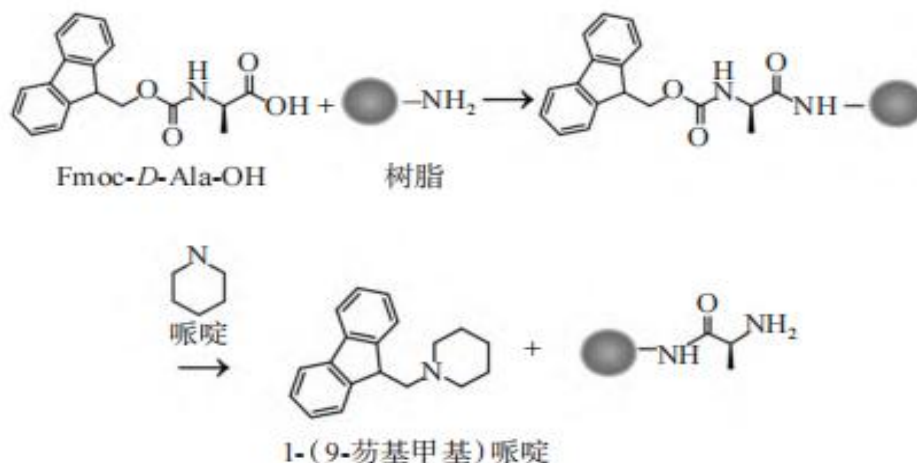
165 在进行初次氨基酸缩合反应完成后，需要立即取出固相合成树脂，并使用 Kaiser 检测法来对反应的进行程度进行评估，该检测的具体操作步骤与前述的脱除 Fmoc 保护基过程保持一致。若观察到树脂的颜色维持原有色泽而未发生任何变化，这可以明确地证明氨基酸缩合反应已经充分且完全地进行，表明氨基酸已成功连接到树脂载体上；反之，如果树脂仍然呈现明显的红棕色，则有证明缩合反应未能达到预期的完全偶联效果，此时必须针对同一氨基酸重复进行一次缩合反应操作。后续的合成步骤只有在 Kaiser 检测结果确认树脂颜色不再变化、符合预期的完全反应标准之后，才能安全、有效地继续进行。

170

2.2.6 首个偶联氨基酸的 Fmoc 保护基脱除步骤

175 将预先以 DMF 为溶剂配制完成的 20% 哌啶溶液，加入到固相合成反应管中，并将装载有反应混合物的合成管稳妥放置于固相合成仪的指定反应位置内，随后启动仪器，进行脱保护反应步骤，该过程需在持续通入氮气 (N₂) 鼓泡条件下进行。

180 Fmoc (9-芴甲氧羰基) 作为一种对碱性环境敏感的保护基团，相关反应机理可参考图 2-3，在本步骤中，被用于保护树脂上已通过缩合反应连接的氨基酸的 α-氨基。针对 Fmoc 保护基的移除，同样采用了经典的两步脱保护法予以实施：第一阶段反应持续进行 6min，第二阶段则延长至 10min，以确保保护基被彻底、高效地裂解。脱保护步骤完成后，随即使用足量的 DMF 试剂对树脂进行两次充分洗涤，目的在于完全清除残留的脱保护试剂及其他副产物，保证后续反应的纯净度。为了验证脱保护效果，确保固相载体上首个氨基酸的活性氨基位点已充分暴露且具备反应活性，可采用 Kaiser 试剂检测法进行定性分析。该确认步骤为后续肽链通过逐步偶联策略实现定向延伸，提供了反应基础与活性前提。



185

图 2-3 脱除 Fmoc 的反应机理

2.2.7 多肽链的逐步延伸与循环操作

在后续合成过程中，需要按照序列重复执行四个标准化的循环步骤：“Fmoc 保护基团的化学脱除反应→Kaiser 脱除反应效果检测验证→新的 Fmoc 保护氨基酸的缩合反应→Kaiser 缩合反应效果检测验证”。通过这样一轮又一轮的循环操作，多肽链从最初的 C 端（羧基端）起始，按照预定顺序精确地向 N 端（氨基端）逐个添加氨基酸单元，从而实现肽链的逐步、定向延伸。当最后一个氨基酸的缩合步骤完成时，其氨基上的 Fmoc 保护基团在此阶段将暂时予以保留，而不立即脱除。对这一特定 Fmoc 基团的最终脱除操作，计划安排在整个合成完成的肽链准备从固相树脂载体上进行最终裂解之前、临近裂解反应的

190

195

2.2.8 全自动多肽合成仪操作程序

(1) 脱保护的程序见表 2-5

表 2-5 脱保护程序

序号	步骤	说明
1	R2-PIP-RV	反应器加入 PIP
2	Pause	暂停
3	Bubble-RV-Top	顶部鼓泡
4	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
5	Pause	暂停
6	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
7	Drain-RV-PW-S1	反应器排出到废液缸
8	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
9	R2-PIP-RV	反应器加入 PIP

续表 2-5 脱保护程序

10	Pause	暂停
11	Bubble-RV-Top	顶部鼓泡
12	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
13	Pause	暂停
14	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
15	Drain-RV-PW-S1	反应器排出到废液缸
16	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
17	R1-DMF-RV	反应器加入 DMF
18	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
19	Drain-RV-PW-S1	反应器排出到废液缸
20	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
21	R1-DMF-RV	反应器加入 DMF
22	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
23	Drain-RV-PW-S1	反应器排出到废液缸
24	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
25	R1-DMF-RV-Top-PW	DMF 转移反应器再从顶部排出
26	Drain-RV-PW-Time	反应器排出到废液缸
27	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
28	Pause	暂停
29	R1-DMF-RV	反应器加入 DMF
30	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
31	Drain-RV-PW-Time	反应器排出到废液缸
32	R1-DMF-RV	反应器加入 DMF
33	Bubble-RV-Bottom	底部鼓泡
34	Drain-RV-PW-Time	反应器排出到废液缸
35	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
36	R1-DMF-RV	反应器加入 DMF
37	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
38	Drain-RV-PW-S1	反应器排出到废液缸
39	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸

(2) 缩合的步骤见表 2-6

表 2-6 缩合的步骤

序号	步骤	说明
49	Bubble-RV-Top	顶部鼓泡
50	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
51	R1-DMF-AAx	DMF 转移到氨基酸管
52	AAx-MV	氨基酸转移到混合器
53	Transfer-MV-TV	将混合器液体转移到预热器
54	Transfer-TV-PW	将预热器液体转移到废液管
55	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
56	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
57	Pause	暂停
58	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
59	R1-DMF-AAx	DMF 转移到氨基酸管
60	AAx-MV	氨基酸转移到混合器
61	Transfer-MV-TV	将混合器液体转移到预热器
62	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
63	Pause	暂停
64	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
65	Pause	暂停
66	Drain-RV-PW-Time	反应器排出到废液缸
67	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
68	Transfer-TV-RV	将混合器液体转移到反应器
69	Bubble/Mix-RV	顶部鼓泡
70	R1-DMF-MV	DMF 转移到混合器
71	Transfer-MV-TV	将混合器液体转移到预热器
72	Drain-RV-PW-Time	反应器排出到废液缸
73	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
74	Transfer-TV-RV	将混合器液体转移到预热器
75	Drain-RV-PW-Time	反应器排出到废液缸
76	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸
77	R1-DMF-TV	DMF 转移到预热器
78	Transfer-TV-RV	将混合器液体转移到预热器
79	Drain-RV-PW-S1	反应器排出到废液缸
80	Transfer-PW-W	转移废液到废液缸

2.2.9 肽链从树脂上的裂解

为高效从固相合成树脂获取目标多肽产品，需先通过化学裂解方式将合成完成的多肽链从树脂载体上彻底切割下来。具体步骤如下：首先，严格按照 TFA（三氟乙酸）：苯酚：去离子水：TIPS（三异丙基硅烷）体积比 88：5：5：2 精确配制约 5 mL 裂解液混合溶液，作用见表 2-7。配制完成的裂解液应立即置于冷冻室进行预冷，预冷时间不少于 20min，以确保裂解液温度适宜，为后续裂解反应营造合适的低温环境。

在进行肽链切割前，需对含多肽的树脂进行系统预处理：用 DCM（二氯甲烷）反复冲洗树脂五次，这一系列洗涤操作具有重要意义：一方面，可有效降低树脂温度，避免后续加入裂解液时因剧烈裂解反应产生大量热量导致局部过热；若不控制这种放热现象，可能引发关键化学键意外断裂或使多肽发生不可逆变性失活。另一方面，DCM 沸点极低，易挥发，洗涤后可迅速从树脂中移除，减少残留溶剂对后续反应的干扰。

洗涤步骤完成后，利用真空泵抽滤装置对树脂进行抽滤处理，抽滤时间控制在 3-5min，旨在彻底去除树脂中残留液体，使树脂颗粒充分干燥，为后续裂解反应提供干燥的反应基质。随后，将预先冷冻至低温的裂解液小心加入装有干燥树脂的多肽合成管中，立即将合成管转移至设定好温度的恒温摇床内，在持续温和振荡条件下，使裂解反应持续进行 2.5 至 3 小时，确保多肽链从树脂上完全裂解并进入溶液相。整个多肽链从固相载体合成到最终切割获取样品的完整流程可参考以下流程示意图 2-4。

表 2-7 切割液各组分作用

组分	核心作用
三氟乙酸 (TFA)	切割肽-树脂连接键，脱除氨基酸侧链保护基
苯酚	自由基清除，抑制氨基酸侧链氧化、减少副反应
去离子水	淬灭活性中间体，抑制降解副反应
三异丙基硅烷 (TIPS)	强还原性清除剂，抑制副反应

225

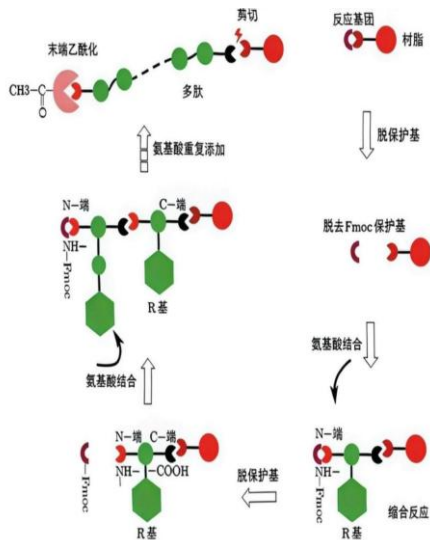


图 2-4 多肽合成裂解图

2.2.10 裂解液的富集

230 经过一段时间反应时长后，配置好的裂解液充分发挥作用，成功地将目标多肽链从其树脂上裂解并溶解。此时，含有目标多肽产物的裂解液混合物留存于合成反应管内。随后，将该合成管内的裂解液混合体系转移并收集至三颈烧瓶中，以开展浓缩富集处理。采用向三颈瓶中的裂解液持续通入高纯度氮气的方式，促使裂解液中的主要挥发性成分三氟乙酸（TFA）有效排出体系。整个氮气吹扫与富集操作过程需精持续时间通常维持在 6 至 10min。在此期间，裂解液中绝大部分的 TFA 溶剂得以挥发去除，而其中的多肽产物及其他非挥发性或低挥发性组分则得以保留。最终，在三颈瓶底部获得显著浓缩的产物溶液，其体积大幅缩减，仅余约 1 毫升到 2 毫升富含多肽的浓缩裂解液，为后续的纯化或分析步骤做好准备。

2.2.11 多肽的沉淀

240 向已制备好的约 1 至 2 毫升多肽裂解液内，加入经过预冷的无水乙醚 30 到 40 毫升。低温无水乙醚能强化和加速后续的沉淀过程，使多肽物质能够更高效、更完全地从溶液中析出。多肽本身在乙醚中溶解度极低，因此在加入乙醚后，多肽会迅速形成沉淀；与此同时，裂解液中原有的三异丙基硅烷（TIPS）以及苯酚这两种有机试剂则会充分溶解于所加入的无水乙醚中，从而实现与多肽的有效分离。接下来，我们将混合溶液小心转移至一个容量为 50 毫升的离心管内，然后将该离心管平稳放置于离心机中，配平后，设置转速为 245 8000 转/min，离心时间为 5min，进行高速离心。离心结束后，仔细移除并弃去离心管中的上层无水乙醚溶液，此时管底即可观察到析出的多肽沉淀物，至此便完成了对多肽的第一次清洗操作。

250 随后，向首次清洗后得到的多肽沉淀中再次加入适量无水乙醚，并利用超声波清洗机对沉淀进行充分震荡和破碎处理，以使沉淀重新分散并进一步去除可能夹带的有机残留物。接着，再次将离心管置入离心机，按照相同的条件（8000 rpm/min，5 min）进行离心分离，离心后移除乙醚液，获得经过二次清洗的多肽沉淀，为了确保尽可能彻底地去除多肽沉淀中可能残留的大部分有机试剂，需要严格重复上述清洗步骤三次。通过清洗流程，即可高效地将多肽沉淀物与裂解体系中的有机试剂分离开来，从而获得较为纯净的多肽产物。

2.2.12 多肽的冻干

255 将含有多肽的离心管移至通风橱内，在室温条件下静置使无水乙醚自然挥发完全。随后，向离心管中加入一定体积的浓度为 0.1% 三氟乙酸（TFA）的乙腈溶液，乙腈以及 TFA 的作用，有效破坏多肽分子间或分子内可能存在的疏水相互作用。接下来，需再加入适量含 0.1% TFA 的去离子水，以充分溶解经过乙腈处理后的多肽，形成均一的多肽水溶液。

260 待多肽完全溶解后，将离心管小心放入冰箱中进行冷冻，使其内部液体完全凝固为固体状态。此后，需将已凝固的含多肽样品的离心管管口使用洁净的无屑滤纸进行封扎，以

隔离外界环境，防止可能的污染或水分进入。随后，将封装好的样品迅速转移至冷冻干燥机内，开始进行冷冻干燥操作。整个冻干程序需要持续约 48 至 52 小时，最终使得多肽样品中的水分被完全去除，从而获得干燥的、呈疏松粉末状或片状的粗制多肽产物。

265 需要注意的是，在将样品从冰箱取出并转移至冻干机的整个操作过程中，动作必须迅速连贯，从而有效防止已经冷冻固化的多肽样品在因温度回升而部分融化成液体，影响后续冻干效率与最终产物形态。

2.3 蜂毒肽固相合成的产率计算

2.3.1 树脂取代度测定

270 (1) Fmoc -哌啶制备

在 10 mL 离心管中精确称取 31.13 mg (0.1 mmol) Fmoc-Ala-OH，加入 5 mL 含 20% 哌啶的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液，充分搅拌 30min。过滤去除悬浮物质，避免其对紫外检测结果产生干扰，残留物质用 DMF 洗涤三次，每次 3 mL，以保障紫外检测结果的精确性。将滤液与所有洗涤液置于 25 mL 容量瓶中混合，并用 DMF 定容至刻度，即得到浓度为 4.0 mmol/L 的储备溶液。

275

(2) 最大吸收波长测定及选择

将 Fmoc -哌啶和哌啶在 200~400 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描，以测定最佳吸收波长，呈现出紫外吸收光谱图，可通过浓度-吸收法确定相应的最大消光系数。

(3) 标准曲线测定

280 在 10 mL 离心管内准确称取 31.13 mg (0.1 mmol) Fmoc - Ala - OH (311.3 Da)，添加 5 mL 含 20% 哌啶的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。充分搅拌使其反应 30 min。进行过滤操作，滤渣用 DMF 洗涤三次，每次用量为 3 mL。将滤液与洗涤液合并于 25 mL 容量瓶中，用 DMF 定容至刻度，以此作为储备液，其浓度为 4 mmol/L。

285

将上述储备液用 DMF 稀释成浓度分别为 1 mmol/L、0.8 mmol/L、0.6 mmol/L、0.4 mmol/L、0.2 mmol/L 的一系列不同浓度溶液，并测定各溶液的紫外吸收。

290

(4) 准确称取 0.05 g 的 Rink Amide MBHA 树脂样品，将其置于一支洁净的离心管中。随后，向离心管内加入 5.0 mL 质量分数为 20% 的哌啶溶液，在室温条件下持续搅拌反应 30min，以确保脱保护反应充分进行。反应结束后，对混合物进行抽滤分离，收集所得的固体滤渣。用 DMF 溶剂对该滤渣进行充分洗涤，此洗涤操作重复三次，每次均使用精确量取的 3.0 mL DMF。将所有过滤步骤中收集得到的滤液，以及三次洗涤过程中产生的全部洗涤液，一并转移合并到一个 50.0 mL 的洁净容量瓶中。最后，向该容量瓶中逐滴加入 DMF 溶剂，并缓缓摇匀，直至液面精确地达到容量瓶的 50.0 mL，从而完成样品的精确定容。

2.3.2 蜂毒肽含量测定

$$\text{理论肽增重 (g)} = \text{保护肽分子量} \times \text{树脂取代度} \times \text{原料树脂重量} \quad (2-1)$$

295

$$\text{肽收率} = \frac{\text{实测保护肽树脂总重量}(g) - \text{原料树脂重量}}{\text{理论肽增重}(g)} \times 100\%$$

(2-2)

2.4 脱保护反应条件的选择

2.4.1 样品溶液的制备

300

取 0.01 mol Rink Amide MBHA 树脂树脂加至 30 mL DMF 中, 在室温下通入氮气溶胀 30 min; 用含体积分数为 20% 哌啶的 DMF 溶液 100 mL, 对 Fmoc 基团在室温下进行脱保护 20 min; 取反应体系中的少量树脂进行茚三酮显色反应, 检查 Fmoc 基团是否脱除。将 31.13 mg (0.1 mmol) Fmoc - Ala - OH (311.3 Da) 溶于 HBTU 溶液并加入适量的 DIEA 试剂, 制备成反应液。将反应液与上述树脂混合, 在室温下通入氮气充分反应 1h, 经茚三酮显色反应检验反应是否完成。反应完成后用大量 DMF 洗涤树脂并在室温下减压干燥, 得到树脂样品。

305

将上述树脂样品与 1 mL 含 20% 哌啶的 DMF 溶液混合, 在 30 °C 下水浴搅拌反应 3 min, 过滤树脂后得到样品溶液。过滤后的树脂用 1 mL DMF 洗涤。

2.4.2 不同反应温度

310

按照上述方法合成树脂样品后, 分别在 25, 30, 35, 40, 45 °C 的温度下, 与哌啶反应一定时间制备样品溶液, 测定其吸光度, 每组平行测定 3 次, 结果见图 3-3。

2.4.3 不同反应时间

按照上述方法合成树脂样品后, 在一定的温度条件下制备样品溶液, 分别在反应 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 min 后测定吸光度, 每组平行测定 3 次, 结果见图 3-4。

2.5 蜂毒肽标准曲线的建立

315

选用本实验固相合成、分离纯化并冷冻干燥制备的蜂毒肽粉末作为自制对照品。实验全程统一使用含 0.1% 三氟乙酸的水-乙腈混合溶液作为溶解与稀释溶剂, 保证标准溶液与待测样品基质环境完全一致, 尽可能消除基质效应对色谱检测的干扰。配制系列梯度浓度标准工作液, 采用 HPLC 法进行测定, 以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

(1) 自制对照品纯度校正

320

取少量蜂毒肽冻干品, 采用高效液相色谱峰面积归一化法测定其色谱纯度。后续溶液配制与浓度计算中, 以样品称量质量结合纯度折算蜂毒肽实际有效质量, 完成浓度校正, 保障定量结果准确可靠。

(2) 标准储备母液配制

325

精密称取干燥至恒重的蜂毒肽冻干粉末 110.00 mg, 置于 10 mL 容量瓶中; 加入适量稀释溶剂, 涡旋振荡至粉末完全溶解, 室温静置稳定后, 加稀释溶剂定容至刻度, 充分混匀, 配制得到质量浓度为 11 mg/mL 的蜂毒肽标准储备液, 密封避光、现配现用。

(3) 系列标准工作液配制

以 11 mg/mL 储备液为基础, 采用同体系溶剂逐级稀释, 分别配制质量浓度为 3、5、7、9、11mg/mL 的一系列标准工作溶液。

330 (4) 样品前处理与色谱检测

所有标准溶液在相同条件下短暂离心, 经 0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤后待测。固定高效液相色谱检测条件, 依次进样分析, 每组溶液平行进样 2 次, 记录蜂毒肽特征色谱峰峰面积, 取平行样品峰面积平均值。

(5) 线性回归拟合

335 以蜂毒肽校正后质量浓度为横坐标 X(mg/mL), 对应平均峰面积为纵坐标 Y, 进行线性回归分析, 拟合得到回归方程与相关系数 R^2 , 完成标准曲线绘制, 评价其线性范围与线性关系。

2.6 ABTS+法测定蜂毒肽抗氧化性

340 蜂毒肽具有良好抗氧化性, 因此对蜂毒肽抗氧化活性进行进一步研究。研究步骤如下:

ABTS 测定溶液: 准确称取 ABTS 200.0 mg 与过硫酸钾 34.4 mg, 加入 50 mL 蒸馏水充分溶解并混匀, 于室温下避光静置 24 小时制备母液。随后用 95% 乙醇将母液稀释, 使体系在 734 nm 波长处的吸光度控制在 0.70 ± 0.02 , 即得 ABTS 工作液。

345 谷胱甘肽母液: 称取 L-还原型谷胱甘肽 50 mg, 加适量水溶解后定容至 5mL, 配制得到 10.0mg/mL 母液。用蒸馏水将母液稀释不同倍数, 得到 0.2mg/mL、0.22mg/mL、0.24mg/mL、0.26mg/mL、0.28mg/mL 的一系列谷胱甘肽溶液。

蜂毒肽母液: 称取蜂毒肽 50 mg, 加适量水溶解后定容至 5 mL。配制得到 10.0mg/mL 母液。用蒸馏水将母液稀释不同倍数, 得到 0.2mg/mL、0.22mg/mL、0.24mg/mL、0.26mg/mL、0.28mg/mL 的一系列蜂毒肽溶液。

350 谷胱甘肽溶液测定 ABTS+自由基清除率方法按照 GB/T 39100-2020, 多肽抗氧化性测定 ABTS 法测定。

ABTS+自由基清除率 P 按下式计算处理:

$$P = \left(\frac{A_b - A_s}{A_b} \right) \times 100\%$$

使谷胱甘肽溶液对 ABTS+自由基清除率在 35%-65%, 线性方程 $R^2 \geq 0.9500$ 。

2.7 蜂毒肽结构表征

2.7.1 高效液相色谱表征蜂毒肽的纯度

分析型 RP-HPLC 使用 C18 反相柱 (4.6 \times 250 mm, 5 μm 粒径), 流速为 1 mL/min。分别使用 214nm 和 220nm 监测整个分析和纯化过程, 有机相: 乙腈溶液 (含 0.1% TFA) 梯度为 5%-40%-30min-40%-90%-60min; 水相: RO 水 (含 0.1% TFA)。

360

2.7.2 傅里叶变换红外光谱用于表征蜂毒肽分子的结构特征

采用溴化钾压片法红外光谱表征工作。选取溴化钾与实验制备所得蜂毒肽，使其质量比例为 100:1，进行研磨、压片、上样操作，进行谱图扫描与谱图转换，最后得到并保存数据。

3 结果与讨论

365

3.1 树脂取代度测定

哌啶和 Fmoc-哌啶的紫外吸收光谱见图 3-1。图中分别显示了哌啶和 Fmoc-哌啶加合物的最大紫外吸收峰，并根据浓度-吸收关系得出了相应的消光系数。它们分别是：265 nm ($\epsilon=197.5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)；298nm ($\epsilon=52.5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。316nm ($\epsilon=90.0 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

370

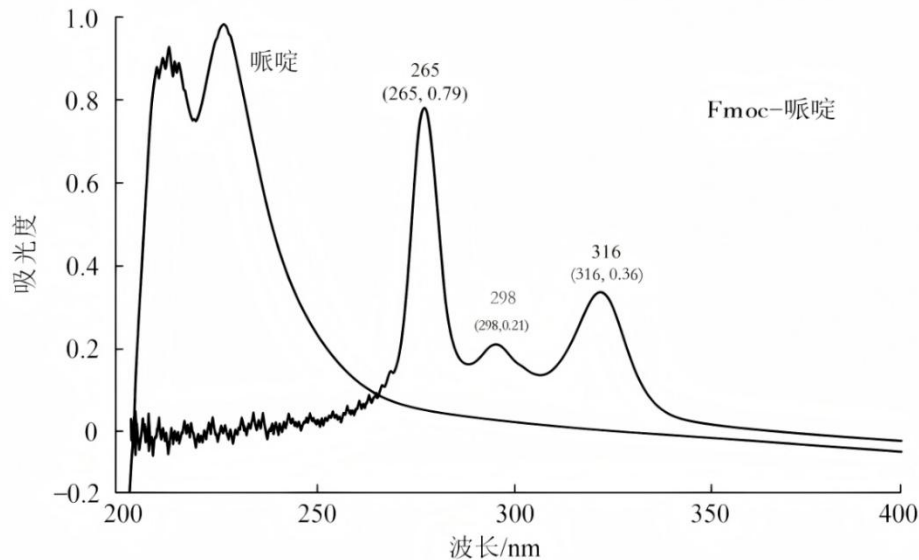


图 3-1 Fmoc-哌啶和哌啶的紫外吸收光谱图

375

由图 3-1 可知，Fmoc-哌啶的最大吸收峰在 265,298,316 nm 处，在 265nm 处该化合物的紫外吸收最强，但哌啶在此处也有一定的紫外吸收。考虑到在试验操作中，需要对样品溶液进行稀释，再测定紫外吸光度，为了减少操作对测量结果的影响，最终选择哌啶吸收相对较低的 316nm 为样品溶液的检测波长。

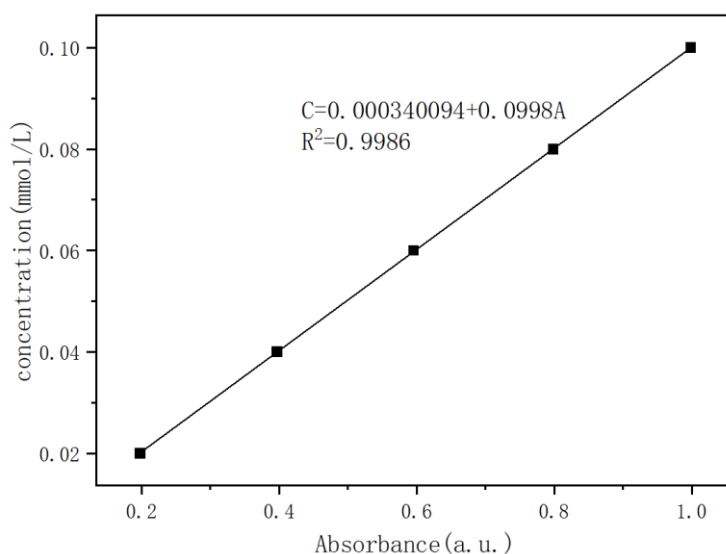


图 3-2 定量 Fmoc-哌啉的标准曲线

380 Fmoc-哌啉的标准曲线（图 3-2）中，Fmoc-哌啉加合物的浓度在 5×10^{-3} -0.1 mmol/L 范围内的浓度和吸光度符合朗伯比尔定律。其关系式为：

$$C=0.000340094+0.0988A$$

树脂取代度的测定结果见表 3-1，测得的树脂取代度在企业给定的范围内，进一步佐证了本方法的准确性。同时也为固相合成蜂毒肽产率的计算提供了基础数据。

表 3-1 树脂取代度的测定

树脂	取代度/（mmol/g）	
	厂家	实验确定取代度
Rink Amide MBHA 树脂	0.3-0.8	0.48

385 3.2 蜂毒肽含量测定

将表 3-1 树脂取代度测定的结果带入式 2-1，2-2 计算得：

理论肽增重（g）=保护肽分子量×树脂取代度×原料树脂重量

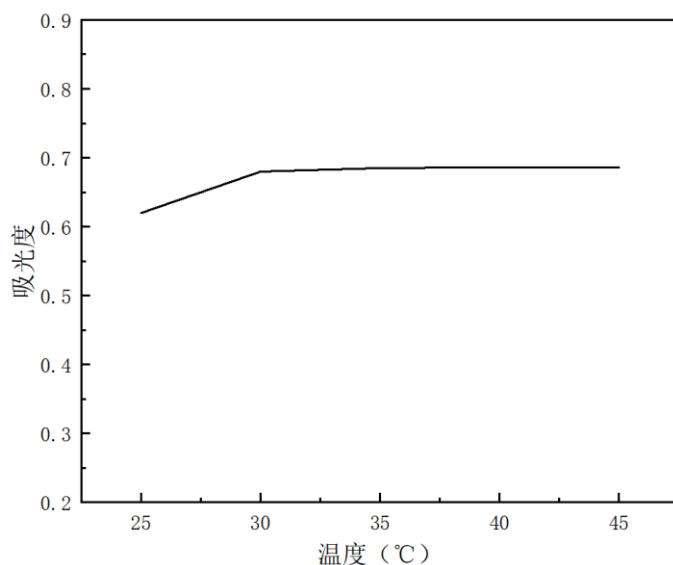
$$=9.13075\text{g}/\text{mmol} \times 0.48\text{mmol}/\text{g} \times 0.5\text{g} = 2.19138\text{g}$$

$$\text{多肽收率} = \frac{\text{实际保护多肽树脂总质量 (g)} - \text{原来树脂总质量 (g)}}{\text{理论多肽增重 (g)}} \times 100\%$$

$$= \frac{2.1164 - 0.8}{2.19138} \times 100\% = 60.07\%$$

390 3.3 反应条件的选择结果

(1) 反应温度



395

图 3-3 温度对脱保护反应的影响

实验结果如图 3-3 显示, 在温度处于较低水平时, 反应温度的变动对脱保护效果具有显著影响。在温度达到 30°C 之前, 随着反应温度的升高, 吸光度呈现明显的增长趋势, 而在温度超过 30°C 之后, 吸光度趋于稳定。由此可推断, 适当提高脱保护反应的温度, 使其略高于室温, 有助于加速反应进程。因此, 我们在实验时可选定 30°C 作为脱保护反应的温度。

400

(2) 反应时间

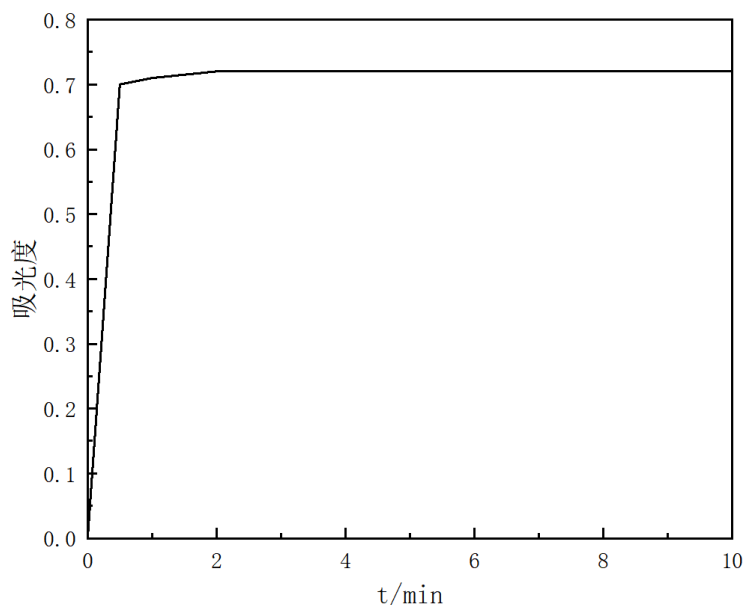


图 3-4 反应时间对脱保护反应的影响

405

实验结果如图 3-4 所示, 在一定温度条件下, 反应前 2 min 吸光度随时间大幅度增加, 2 min 后吸光度趋于平稳, 说明 2 min 时反应已达到平衡。但为保证脱保护反应完全

结束，减少测定误差，试验选择 3 min 作为反应时间。

3.4 高效液相色谱表征蜂毒肽的纯度结果分析

分析型 RP-HPLC 使用 C18 反相柱 (4.6×250 mm, 5 μm 粒径)，流速为 1 mL/min。分
 410 别使用 214nm 和 220nm 监测整个分析和纯化过程，有机相：乙腈溶液（含 0.1%TFA）梯
 度为 5%-40%-30min-40%-90%-60min；水相：RO 水（含 0.1%TFA）测定固相合成产物的
 纯度。

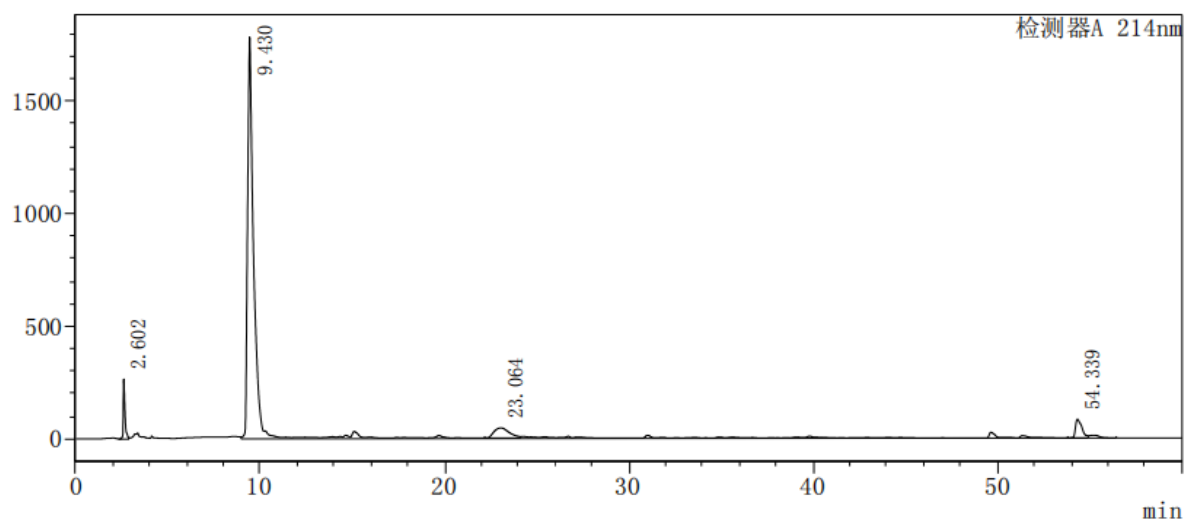


图 3-5 214nm 下多肽高效液相色谱图

415 从图 3-5 可以看出蜂毒肽的纯度较高。在 9.430min 时有很强的紫外吸收，此时纯度达
 87.790%。

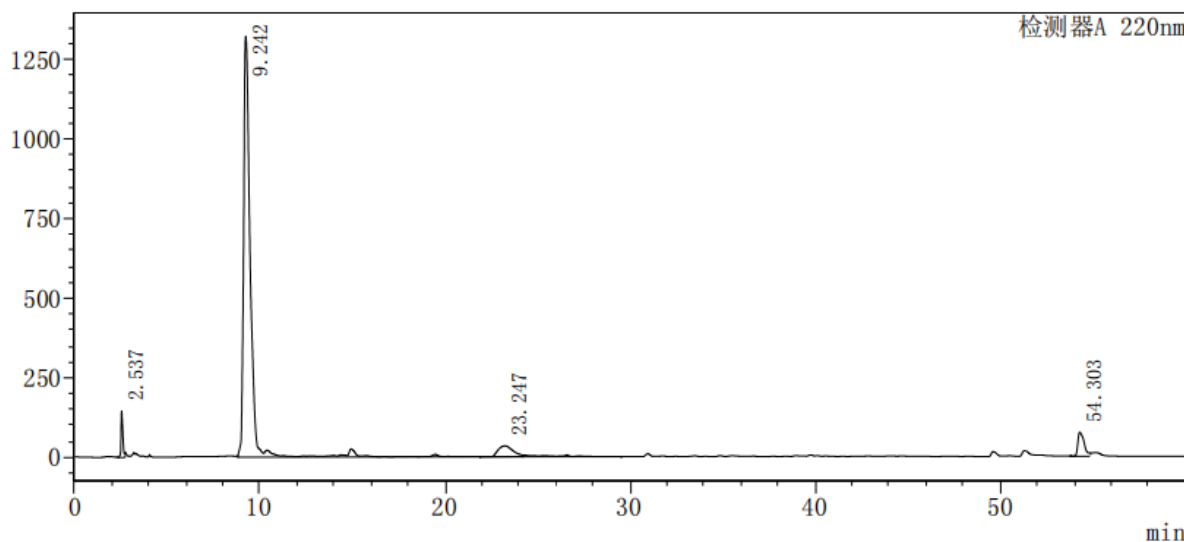


图 3-6 220nm 下多肽高效液相色谱图

420 从图 3-6 可以看出蜂毒肽的纯度较高。在 9.430min 时有很强的紫外吸收，此时纯度达
 87.354%。

3.5 傅里叶红外光谱表征蜂毒肽分子结果分析

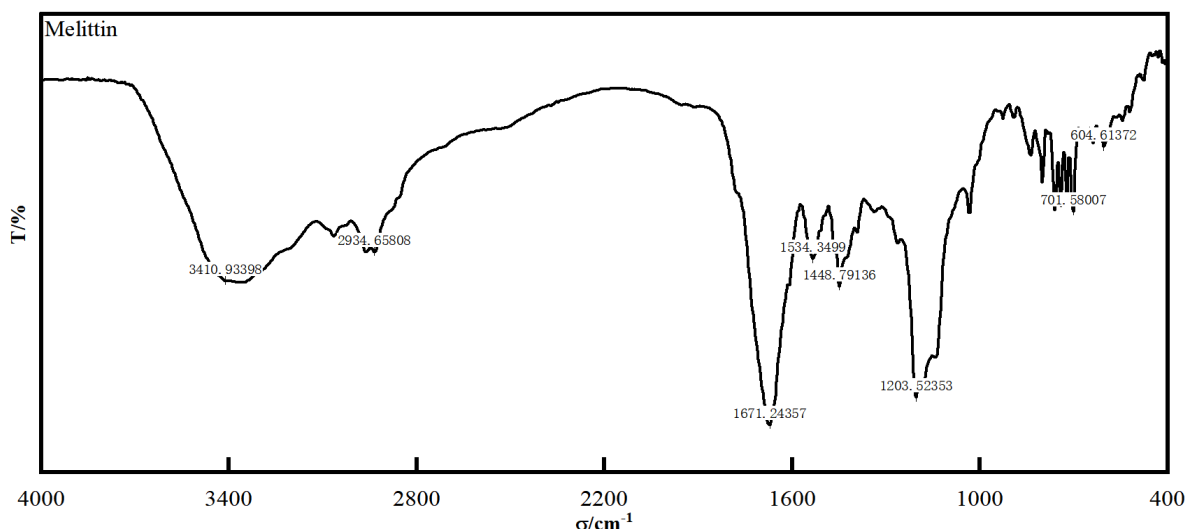


图 3-7 多肽红外光谱图

蜂毒肽的红外吸收光谱如图 3-7 所示。蜂毒肽分子于 3410.93 cm^{-1} 处存在一个强吸收峰，
 425 此为酰胺 I 波段中 O - H 伸缩振动引发的红外吸收。在 2934.66 cm^{-1} 处有一个弱吸收峰，该
 峰是由 C - H 的不对称伸缩振动导致的红外吸收。酰胺 I 波段中 1671.24 cm^{-1} 处的吸收峰是
 由 C = O 的伸缩振动形成的 α 螺旋结构所致。酰胺 II 波段中 1534.35 cm^{-1} 和 1448.79 cm^{-1} 处
 的吸收峰为 C - H 伸缩振动引发的红外吸收。酰胺 III 波段中 1203 cm^{-1} 处的吸收峰是 C = O
 430 弯曲振动与 C - N 伸缩振动共同引起的红外吸收。综上所述，可推断该物质中存在较多的酰
 胺基团。

3.6 蜂毒肽标准曲线的结果

以 11 mg/mL 储备液为基础，采用同体系溶剂逐级稀释，分别配制质量浓度为 3、5、7、
 9、11mg/mL 的标准工作溶液，得到下面标准曲线如图 3-8。

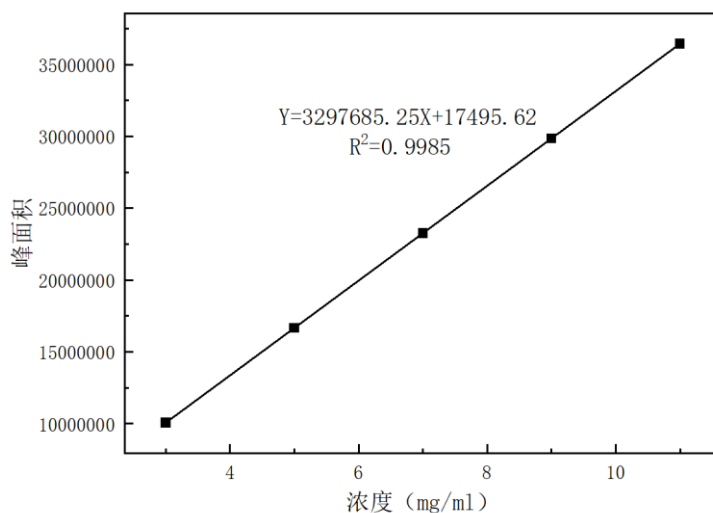


图 3-8 蜂毒肽标准曲线

435

440 通过精确校正的蜂毒肽质量浓度数据作为横坐标 X (单位: mg/mL), 以其对应测得的平均色谱峰面积作为纵坐标 Y, 进行线性回归分析, 拟合得到回归方程: $Y = 3297685.25X + 17495.62$ 。该方程的相关系数 R 达 0.9985, 显示出极强的线性关联度。基于此方程完成了标准曲线的绘制。分析结果表明, 在所研究的 3 mg/mL 至 11 mg/mL 浓度区间内, 蜂毒肽的色谱峰面积与其浓度之间呈现出优异的线性关系。该相关系数完全符合定量分析的精度要求, 证明了此标准曲线可靠、有效, 可以用于后续实际样品的准确定量检测分析。

3.7 ABTS⁺法测定蜂毒肽分子的抗氧化活性结果分析

L-还原性谷胱甘肽具有较强的抗氧化活性, 常用来多肽抗氧化活性测定实验对照组, L-还原性谷胱甘肽及蜂毒肽分子对 ABTS⁺自由基的清除率见表 3-2

445 表 3-2 蜂毒肽分子对 ABTS⁺自由基的清除率

多肽浓度 (mg/mL)	0.20	0.22	0.24	0.26	0.28
谷胱甘肽对 ABTS ⁺ 自由基的清除率 (%)	37.16	38.99	41.13	43.40	45.96
蜂毒肽对 ABTS ⁺ 自由基的清除率 (%)	34.61	36.17	37.87	39.57	41.42

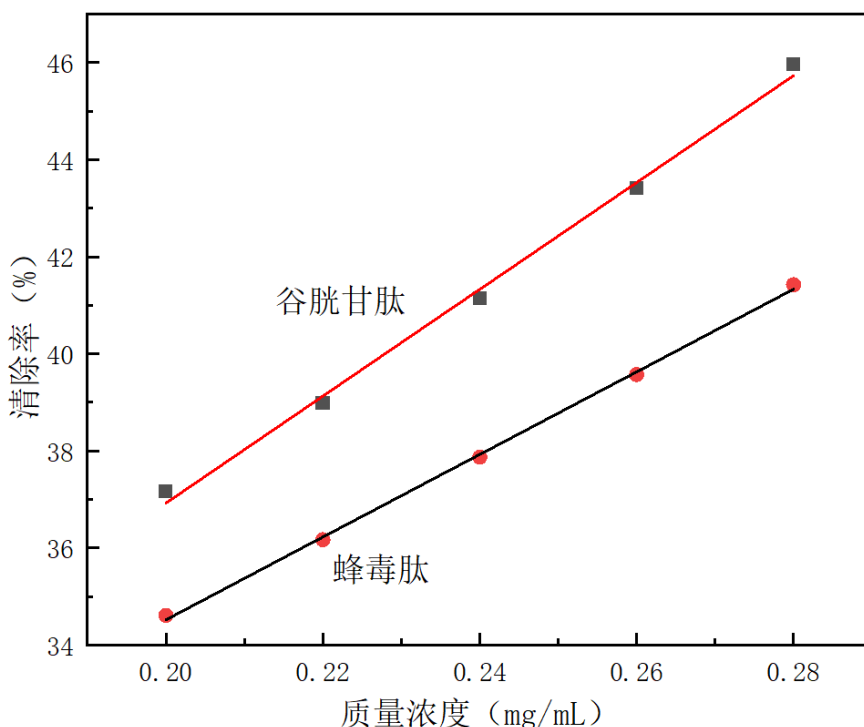


图 3-9 ABTS⁺法谷胱甘肽及蜂毒肽自由基清除率标准曲线

450 ABTS⁺法谷胱甘肽标准曲线图 3-9 所示。经线性拟合可知, 在 0.20 - 0.28 mg/mL 浓度区间内, 谷胱甘肽溶液浓度与其清除率 (35% - 65%) 呈线性关系, 线性方程的决定系数 $R^2 = 0.9963$ 。当蜂毒肽浓度为 0.28 mg/mL 时, ABTS⁺自由基清除率可达 41.42%。

3 结论

455 本文给出了 Fmoc 固相合成法,借助全自动多肽合成仪完成蜜蜂毒素衍生多肽—蜂毒肽的全合成,通过优化关键实验条件,建立了稳定、可重复的实验室制备流程。实验确定 30 °C、3 min 为 Fmoc 基团脱保护的最优条件,配合两次缩合反应与 Kaiser、四氯苯醌双重显色监测,有效保证氨基酸偶联完全,降低缺失肽等副产物生成。以 TFA、苯酚、水、三异丙基硅烷混合液为裂解体系,经乙醚沉淀、洗涤与冷冻干燥处理,顺利获得蜂毒肽粗品。

460 结构与纯度检测结果显示,制备所得蜂毒肽的红外光谱特征峰与天然蜂毒肽吻合,酰胺键、 α -螺旋等特征结构清晰可辨;高效液相色谱检测表明,产物主峰纯度达 87% 以上,分离效果良好。同时建立的蜂毒肽 HPLC 标准曲线线性关系优异,可用于样品准确定量。ABTS⁺抗氧化实验证实,合成蜂毒肽具有明显的自由基清除能力,且清除效果随浓度升高而增强,具备良好的生物活性。

465 本文所用合成路线操作简便、反应条件温和、重现性好,成功实现蜂毒肽的高效制备,为后续开展蜂毒肽结构修饰、活性优化及药用制剂研究提供了可靠的方法参考与实验基础。

致谢

470 感谢全国大学生创新创业项目 202410375062 的支持。

[参考文献] (References)

- 475 [1] 王欣雨,赵磊磊,耿明阳,等.蜂毒的主要成分及药理作用研究进展[J].中国蜂业,2024,75(01):50-52.
- [2] 苗会娟,徐艳梅,张媛,等.反相高效液相色谱法快速测定注射用蜂毒中蜂毒肽[J].化学分析计量,2026,35(01):105-110.
- [3] 丁靖,赵昱,任成,等.胡蜂蜂毒肽的固相合成[J].合成化学,2020,28(02):128-132.
- [4] 王潇,王凯君,杜一平,等.基于对 9-芴甲氧羰基测定的多肽固相合成中树脂偶联率的定量分析[J].理化检验-化学分册,2026,62(03):275-280.
- 480 [5] 全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387).多肽抗氧化性测定 DPPH 和 ABTS 法:GB/T 39100-2020[S].中国标准出版社,2020.
- [6] Li Y, Chen L, Zhang H, et al. Design, synthesis and anticancer activity of novel melittin derivatives[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2023, 257:115468.
- [7] Kim S H, Park J H, Lee S J. Efficient Fmoc solid-phase synthesis of melittin with improved purity and yield[J]. Journal of Peptide Science, 2022, 28(6):e3345.
- 485 [8] Brown A K, Wilson M R. Solid-phase peptide synthesis strategies for long-chain cationic peptides[J]. Molecules, 2021, 26(12):3622.
- [9] Garcia R, Martinez J, Lopez C. Structural characterization and antioxidant activity of synthetic melittin[J]. Antioxidants, 2024, 13(2):315
- 490 [10] Miller S T, Davis N J. Automated solid-phase synthesis and purification of melittin[J]. Journal of Chromatography B, 2025, 1227:123890.