

猪骨蛋白酶解制取多肽钙的研究综述

安广杰, 胡加松, 王章存, 赵学伟

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 综述了猪骨的酶法处理及骨胶原多肽钙合成、结构表征、螯合机理等方面的研究成果, 指出目前有关猪骨蛋白酶解制取多肽钙的研究多集中在合成方面, 对于多肽与钙的具体螯合机理研究只是简单地通过产物表征反推配位机理, 不能真正反应出螯合过程的每步变化, 有待进一步深化。

关键词: 猪骨; 酶解; 多肽; 多肽螯合钙; 螯合机理

中图分类号: TS201.2 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-476X.2013.06.007

Review of preparation polypeptide calcium from pig bones protease solution

AN Guang-jie, HU Jia-song, WANG Zhang-cun, ZHAO Xue-wei

(College of Food and Bioengineering Zhengzhou University of Light Industry Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The research achievements of pig bones treatment with enzymes and collagen polypeptide calcium synthesis, structure characterization and calcium chelating mechanism were reviewed. At present, most studies have focused on the synthesis of polypeptide calcium with enzymatic pig bones; the specific calcium chelating peptide characterization process simply reverse illation the mechanism to explore more complex by the product, but can not really reflect each process change of chelation. It needs further exploration and research.

Key words: pig bone; enzymatic hydrolysis; poly peptide; poly peptide chelation calcium; chelation mechanism

0 引言

据《2012年国民经济和社会发展统计公报》统计, 2012年中国年肉类总产量达 8.384×10^{10} kg, 按比例将产生近 8×10^9 kg的动物骨骼, 其中当作下脚料丢弃的骨骼就占1/10。因诸多因素限制, 大多动物食品加工副产物都未能得到有效的开发和利用。这既浪费了具有天然营养成分的丰富资源, 又会因骨骼处理问题严重污染环境。骨骼是一种天然复杂的有机体, 主要包括骨基质(胶原与胶原蛋白)和骨矿物质(羟基磷酸钙与羟基磷酸镁)。猪的骨骼中有

67%是以羟基磷酸钙为主的矿物质, 其余是骨胶原。磷酸盐对钙的结合能力取决于其分子结构, 而不是磷酸盐中的有机或无机分子^[1]。骨骼的生成首先是形成胶原(I、II型胶原)和基质网, 然后钙、磷以羟基磷酸钙盐的形式沉积在基质网空隙中。

骨胶原多肽通过胶原蛋白降解可得, 它不仅在抗氧化和衰老、抗高血压方面有明显作用, 而且能够预防和治疗骨质疏松和骨关节炎、胃溃疡等疾病, 另外还能促进皮肤胶原的代谢和矿物质吸收等。多肽的加工特性良好, 营养吸收特性比氨基酸或胶原蛋白更佳。鲜猪骨中的骨胶原蛋白含量很

收稿日期: 2013-07-08

作者简介: 安广杰(1974—), 女, 河南省漯河市人, 郑州轻工业学院副教授, 主要研究方向为食品添加剂。

高,若直接食用不能被很好地吸收利用,但若经酶解处理成多肽,则具有了良好的吸收性,从而有助于提高其营养价值^[2]。

钙是人正常生理活动不可缺少的元素,参与机体的多种生理活动。缺钙易引起很多疾病,使得人体进入亚健康状态^[3],所以补钙成为人们长期的热点话题。无机型钙生物学效价低,有机钙盐溶解度大、易溶失且价格高,为了克服这些缺点,逐渐出现钙的氨基酸螯合物。氨基酸螯合钙具有易被吸收、使用安全、成本低、氨基酸和钙能同时补充的优点,成为首选补钙产品。研究发现多肽螯合钙具有特殊的螯合体制和转运机制,相比氨基酸螯合钙更易被吸收且吸收速度更快^[4],所以有一定生物功能性的多肽螯合钙发展空间更广。

猪骨中存在大量的胶原蛋白和钙,若将骨中的胶原蛋白与钙都利用起来制备特殊的补钙试剂——多肽螯合钙,既可提供人体每天所必需的氨基酸,又能补充机体所需要的钙离子,同时过多骨资源造成的环境污染问题也会得到相应解决。本文拟对猪骨蛋白酶解制取多肽钙进行综述,以期有助于进一步的科学研究及产品开发。

1 猪骨蛋白的酶解

猪骨中胶原蛋白的降解主要采用化学法和酶法。化学法反应条件剧烈,对生成的氨基酸破坏性较大,且可能生成有毒物质,越来越多的降解选择较温和的降解技术——酶法水解骨胶原蛋白。胶原蛋白酶法水解反应条件温和、用时短、无污染、产品的营养价值高,产物以胶原多肽和左旋型游离氨基酸为主,易被人体消化吸收,因而利用酶处理胶原蛋白逐渐受到了人们的重视^[5]。

1.1 猪骨蛋白酶解的常用酶

蛋白酶主要有3种:动物蛋白酶(如胰蛋白酶)、植物蛋白酶(如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶)和微生物蛋白酶(如碱性和中性蛋白酶)。在酶法水解胶原蛋白研究中以碱性蛋白酶居多^[6]。木瓜蛋白酶用于降解大分子的胶原蛋白时只会切掉原端肽而保留三股螺旋区域。从胶原蛋白肽分子量来看,动物蛋白酶酶解得到的胶原蛋白肽的分子量范围比植物型蛋白酶酶解的更广,原因有可能是这2种蛋白酶的酶切位点不同造成的^[7]。

1.2 骨骼酶解研究现状

大多酶解骨骼的工艺是,鲜骨经捣碎、脱脂后

进行酶解,然后灭酶干燥得到产品,最后进行指标检测^[8]。李彦春等^[9]用分步酶解法处理牛皮边角废料制备多肽,发现水解方式及酶种类对水解产物分子量的分布影响较大,分子量分布呈间断状态集中在某些分子量处。张根生等^[10]用碱性蛋白酶和风味蛋白酶分别酶解火鸡骨制备胶原蛋白液,确定碱性蛋白酶水解的条件更优。李帆等^[11]以水解度并参照固形物溶出率为指标水解牦牛骨蛋白,比较3种酶处理效果,结果表明木瓜蛋白酶最适宜。付刚^[12]对比木瓜蛋白酶和中性蛋白酶的酶解效果,确定后者酶解猪骨效果最佳,制得的产品具有比谷胱甘肽略好的羟基自由基清除能力,且表现出抗氧化性功能。安广杰等^[13]用 *Neutrase* 蛋白酶制备水解明胶,产物的主要分子量为5~20 kDa,这也充分说明酶处理得到的产物主要集中在某些分子量处。杜云建等^[14]使用复合蛋白酶处理草鱼鱼鳞,得到产物的羟自由基清除率最高为99.24%最佳酶解工艺。付文雯等^[15]用新鲜牛骨为原料,首先用胃蛋白酶酶解得到骨胶原蛋白,继续加入中性蛋白酶,水解得到较小分子量的胶原多肽。孟欢等^[16]采用木瓜蛋白酶降解明胶制备多肽,得到的产物分子量低,非常符合护发调理剂的分子量要求。洪惠等^[17]使用碱性蛋白酶制备骨胶原多肽,发现产物具有良好的溶解性、热稳定性和乳化性。

2 多肽螯合钙的研究

多肽螯合钙是一种多肽和钙离子通过配位离子键结合或者吸附作用形成的络合物^[5],其稳定常数大于氨基酸钙,这既有利于微量元素以螯合物形式完整地运转吸收,又可在需要时随时将 Ca^{2+} 释放。多肽与金属离子的螯合过程中,多肽的氮端氨基和碳端羧基及氨基酸侧链的部分基团会参与配位,同时在肽链中的—CO—和—NH—亦可能参与配位,故和氨基酸与微量元素螯合效果相比,多肽与微量元素在配合率及稳定性方面可能会更高。

多肽螯合钙的吸收依靠人体的小肽转运系统,它具有快速转换、低耗能、不易饱和等较多优点,人体大部分氨基酸获得都靠此系统。完整的多肽与矿物质配位后通过转运机制进入黏膜细胞,不但提升了多肽利用率,还促使金属离子在消化道、胃及小肠中离解^[18]。

2.1 多肽钙的合成研究

大多数的多肽螯合钙都是以胶原多肽为原料,选

用一定的钙源进行螯合制备产物.杨燊等^[19]通过木瓜蛋白酶和风味蛋白酶水解南海低价值鱼蛋白制备多肽,然后再与氯化钙进行螯合反应制取多肽钙.张晓霞等^[20]采用碱法水解黑鱼鱼鳞制备多肽,然后对钙螯合进行修饰得到螯合的最佳制备条件,发现螯合产物在 pH = 1.0 时的溶解度最大.郑炯等^[21]用猪血多肽与铁盐反应制备多肽螯合铁,结果表明最适作为螯合反应的铁源是氯化亚铁.

赵妍嫣等^[22]利用乳酸菌酶解猪骨粉,得到的发酵浓缩液与胶原多肽液螯合,通过单因素和响应面试验确定螯合的最佳条件.洪惠等^[17]以鲮鱼骨为原料采用碱性蛋白酶制备胶原多肽螯合钙.桑亚新等^[23]采用扇贝壳为原料,使用 95% 乙醇进行沉淀得到胶原螯合钙产物.X. L. Bao 等^[24]通过透析凝胶色谱和傅里叶红外色谱 FT-IR 分析大豆多肽钙的结构,发现在不同条件下所得的多肽分子量大小不同,与钙结合能力有明显差异,与钙结合最好的多肽液分子量为 14.4 ku,并且其结合效果与羧基含量呈线性关系,结合位点最可能位于天冬氨酸和谷氨酸的羧基上.许多研究表明^[13-25-26],螯合性能较好的多肽都具备特殊的氨基酸组成特征,甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和羟脯氨酸含量较高.W. K. Jung 等^[27]在醋酸中直接用胃蛋白酶处理长尾鳕的废弃物,所得多肽钙易溶解,结构与肌动蛋白很相似.

不同分子量为主的胶原多肽与金属的结合能力也不同.刘丽莉^[28]发现发酵液经超滤膜逐步分离得到的不同分子量的多肽液,在螯合骨钙的能力上相差很大.>10 kDa 的高分子量多肽液螯合钙的能力低,而 2~4 kDa 范围分子量的胶原多肽螯合率高达 41.23%,明显高于其他分子量的多肽液,易卓林等^[29]利用噬菌体随机十二肽库和金属亲和层析对 4 种重金属进行结合肽筛选,发现多肽与 Ni^{2+} 的结合能力较强,结合力最强的多肽序列为 HASNRVH-HHHLV.此方法可寻找出与钙结合能力较好的胶原多肽链,进而提高多肽的利用率.

2.2 多肽螯合钙的结构表征

多肽螯合钙是二价钙离子与多肽形成具有环状结构的螯合物.祝德义等^[30]对多肽的氨基和羧基进行修饰,发现经过乙酰化的胶原多肽与钙的结合量变大,而酯化后恰巧相反,表明在胶原多肽与钙的结合中羧基起主要作用.多肽钙的结构较复杂,既有钙与氨基及羧基的配位作用,也有钙离子与多

肽中羧基的离子作用,另外胶原多肽对钙还具有吸附作用.

对氨基酸和钙配位反应的研究^[31-32]认为:属于硬酸的 Ca^{2+} 易与氨基酸的羧基和氨基发生配位作用,不易和氮原子作用.但 pH > 6.5 时,因质子化后氨基解离作用可与钙离子形成五元配合物,其中包括氧、氮等参与配位的原子.胶原多肽在波长 200~230 nm 之间有较强的吸收,这是胶原多肽的肽键和羧基的特征峰,而与钙结合后因内部电子的跃迁变化使得所吸收光的波长也相应发生变化,其整体吸收峰正移,且在 203 nm 处出现了新吸收峰^[28].多肽与钙具备螯合能力,主要因为与氨基、羧基、羟基或其他基团作用^[33-34],可使用 X 射线光电子能谱分析 XPS^[35-36]测定氧和氮元素的电子能变化来确定是否发生这些作用.

在胶原多肽液中大量存在氨基酸残基之间的酰胺键,也有少量的末端或侧链氨基和羧基,因此在红外光谱中必然有氨基的伸缩振动、变角振动和羧基的伸缩振动等吸收峰,与 Ca^{2+} 结合后必然引起其吸收峰位的变化^[5].当 Ca^{2+} 加入后氨基的伸缩振动吸收峰正移,且变强变宽,酰胺 I 带负移且吸收峰变强变尖;同时 C=O 面内的摇摆吸收峰和 N-H 的收缩振动峰消失,也证明胶原多肽的氨基和羧基都与 Ca^{2+} 进行了配位作用^[37].

2.3 多肽与钙的螯合机理

2.3.1 吸附反应机理 蛋白质是一种含多肽的大分子,在酸性介质中肽键结合氢离子成为亲水基团,其侧链的疏水基团聚集成为疏水核,形成类似于阳离子表面活性剂的带电胶束,其正电荷均匀分布在表面,容易吸引大量负电核的酸性染料,对金属的络合产生增敏作用^[38].这是因为胶原多肽是胶原蛋白的水解产物,具有一定的乳化性^[39],而且多肽的等电点大多在 4.8~5.0 左右的缘故^[9],其对金属离子的吸附形式主要有离子交换、表面配位、静电吸附、无机微沉、淀粉道吸附和氧化还原等^[40].

2.3.2 配位反应机理 卢业玉等^[41]研究发现,因为 Zn(II) 的配位不饱和,在 pH = 2.8 时蛋白质容易带电,易与锌试剂中的磷酸基相互作用,同样锌试剂可与蛋白质肽键的氮和氧产生配位键作用,形成类似五元环结构的多元型络合物.因二价锌离子存在,改变锌试剂与蛋白质的电荷相互作用机制,继续进行混配络合反应,使产物更加稳定,吸光度明显提高,最终得到蛋白质的肽键氮和氧带电胶粒

及其形成的亲水外相和疏水内相微胶囊,它们是络合反应的主要部位.张朝平等^[42]在中性条件下研究 Ag^+ 和 Cu^{2+} 与血清蛋白和血红蛋白的作用,证明胱氨酸残基以及肽键端基氮和氧与 Ag^+ 和 Cu^{2+} 络合显色;在偏碱性条件下($\text{pH} = 11.40$)溴邻苯三酚红与血清白蛋白作用时,试剂与产物都不稳定而且慢慢氧化变色.祝德义等^[30]通过对胶原多肽进行化学修饰,发现胶原多肽与钙的结合反应中 $-\text{COO}-$ 起到至关重要的作用. $-\text{COO}-$ 基团与金属离子的结合有4种模型^[43-44]:单齿、多齿、桥接双齿、虚桥接双齿,如图1所示.当金属离子仅仅与羧基一侧的氧原子结合,结构就是如图1a)的单齿模型.在双齿模型中金属离子与羧基的2个氧原子平行结合.桥接双齿模型中,每一个金属离子分别与羧基一侧的氧原子进行结合.在另外一种非常特殊的虚桥接双齿结合模型中,羧基的2个氧原子一侧与金属离子结合另一侧与一个水分子结合^[43,45].胶原多肽结合钙前后的紫外光谱分析发现,羧基和肽键的特征吸收峰整体发生了红移,而且在203 nm处出现了一个新的吸收峰,证明发生了配合反应.另外,通过红外的酰胺带波数的变化比较可推测出胶原多肽的氨基和羧基参与了与钙离子的配位反应的结论.

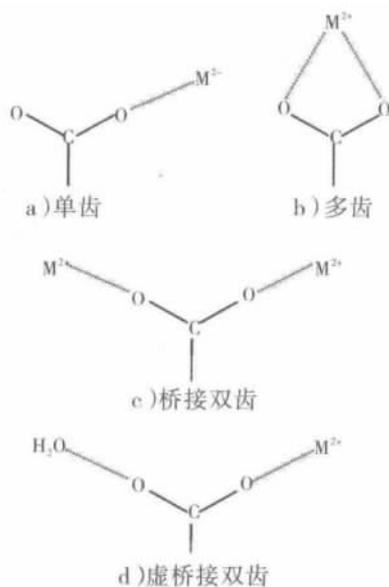


图1 羧基基团与金属离子结合的4种模型

2.3.3 微相分散机理 分散机理认为,某种试剂分子分散进入蛋白质微相中,达到某一临界浓度以上后便产生新的吸收峰.例如 $\text{pH} = 2.0$ 时,蛋白质的亚胺基与四苯基卟啉四磺酸的一 SO_3^- 相互作用,在422 nm处有更多的四苯基卟啉四磺酸分子进入蛋

白质的微相中,当超过临界限度后,便在488 nm处产生一个新吸收峰^[46].采用扫描电镜(SEM)对胶原多肽钙表面进行观察,可清晰地看到有氯化钙分子的结晶吸附在胶原多肽分子表面^[12,28,30].

3 结论与展望

猪骨酶解制备出的多肽属于多种肽的混合物,促使目前对于多肽与钙的合成工艺研究较多,而对具体的整合机理研究不够深入.对于多肽与钙的整合机理,由于多肽本身所具备的特殊性导致研究具有极大困难,目前也有很多学者使用红外色谱、紫外色谱、扫描电镜、原子能量色谱等仪器分析方法研究,总结表征结果反向推理出3大整合机理:吸附反应机理、配位反应机理和微相分散机理,没有学者像有机反应一样使用如元素示踪法等一些可直接判断分析反应过程的方法,这与猪骨胶原水解后产物的天然混合物存在形式有关.多肽对钙有很大吸附,具体吸附和微相分散的程度和过程研究较少,需要在这方面加大研究.另外猪骨胶原多肽整合钙的功能性及应用性也有待研究开发.

参考文献:

- [1] Rerat A. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids [J]. *Brit J Nutr*, 1988, 60: 121.
- [2] 唐传核, 杨晓泉. 食物蛋白质来源的水解物或多肽的现状与进展(1) 营养吸收特性、国内外现状以及生产工艺 [J]. *中国食品添加剂* 2003(S1): 288.
- [3] 萧家捷. 缺钙与补钙 [J]. *中国食物与营养*, 1997(2): 32.
- [4] Hara H, R Funabiki, M Iwata, et al. Protein absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions [J]. *J Nutr*, 1984, 114: 1122.
- [5] 付文雯, 马美湖, 蔡朝霞. 牛骨蛋白酶解制取肽钙的研究进展 [J]. *食品与发酵科技* 2009, 45(1): 1.
- [6] 宋晓燕, 高彦祥, 袁芳. 水解胶原蛋白的研究进展 [J]. *中国食物与营养* 2008(2): 32.
- [7] 蒋哲, 王勤, 邱凌, 等. 鲨鱼皮胶原蛋白肽成分分析 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版* 2006, 45: 169.
- [8] 甘桂珍, 何建忠. 酶法水解提取骨骼蛋白的实验研究 [J]. *广西轻工业* 2007, 23(12): 11.
- [9] 李彦春, 祝德义, 侯立杰, 等. 酶解胶原蛋白多肽的制备与分析 [J]. *中国皮革* 2004, 33(3): 22.
- [10] 张根生, 岳晓霞, 叶敬昊, 等. 火鸡骨胶原多肽口服液的研究 [J]. *食品科学* 2005, 26(8): 563.

- [11] 李帆, 贾冬英, 姚开, 等. 牦牛骨蛋白的酶解条件研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(4): 7.
- [12] 付刚. 猪骨胶原多肽的制备及其抗氧化性的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.
- [13] 安广杰, 徐清萍. *Neutrase* 蛋白酶降解骨胶原蛋白制备水解明胶[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 172.
- [14] 杜云建, 赵玉巧, 李念念. 酶解法制备草鱼鱼鳞多肽及其清除羟自由基的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 168.
- [15] 付文雯, 马美湖, 蔡朝霞, 等. 牛骨蛋白分步酶解制取胶原多肽螯合钙的研究[J]. 食品工业, 2010(1): 1.
- [16] 孟欢, 罗儒显. 木瓜蛋白酶水解明胶制备多肽的工艺研究[J]. 广东化工, 2010, 37(1): 36.
- [17] 洪惠, 罗永康, 吕元萌, 等. 酶法制备鱼骨胶原多肽螯合钙的研究[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(1): 149.
- [18] 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.
- [19] 杨燊, 邓尚贵, 秦小明. 低值鱼蛋白多肽-钙螯合物的制备和抗氧、抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 202.
- [20] 张晓霞, 刘盛取, 李国英. 碱法水解黑鱼鱼鳞及制备多肽螯合钙工艺的研究[J]. 食品科技, 2010(12): 130.
- [21] 郑炯, 汪学荣, 阚建全. 猪血多肽螯合铁的制备工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010(2): 261.
- [22] 赵妍嫣, 胡林林, 姜绍通. 猪骨粉制备胶原多肽螯合钙工艺优化[J]. 农业工程学报, 2011, 27(S2): 277.
- [23] 桑亚新, 王昌禄, 王苏, 等. 利用扇贝壳制备胶原螯合钙的研究[J]. 中国食品学报, 2012(5): 49.
- [24] Bao X L, Lv Y, Yang B, et al. A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(3): 117.
- [25] 郭媛. II, X型胶原与钙离子的相互作用[J]. 科学通报, 1996(4): 18.
- [26] 陆剑锋. 斑点叉鱼鲷鱼胶原多肽螯合钙的制备及其特征[J]. 水产学报, 2012, 36(2): 314.
- [27] Jung W K, Kim S K. Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysis of hoki (*Johnius belengerii*) frame [J]. Eur Food Res Technol, 2007, 224: 763.
- [28] 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.
- [29] 易卓林, 佟鑫, 马春燕, 等. Ni^{2+} 高效结合肽的筛选与作
- 用研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 745.
- [30] 祝德义, 李彦春, 靳丽强, 等. 胶原多肽与钙结合性能的研究[J]. 中国皮革, 2005, 34(3): 26.
- [31] 赵淑富, 王增林, 刘启民, 等. 生理条件下锌、钙离子与氨基酸配位作用的研究[J]. 高等学校化学学报, 1995(6): 847.
- [32] 高峰, 徐光, 李霞. 生理条件下稀土及钙锌离子与 L-Pro 配位作用的研究[J]. 泰安师专学报, 1997(5): 59.
- [33] 庞煜霞, 邱学青, 杨东杰, 等. 木质素磺酸钙的络合性能研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(4): 28.
- [34] 曾绍汉, 阮湘元, 蔡明招. 谷胱甘肽与金属离子相互作用研究进展[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(7): 23.
- [35] 季军晖. 壳聚糖吸附铜离子机理的 XPS 研究[J]. 应用化学, 2000, 17(1): 115.
- [36] 欧阳明, 丁纯梅, 肖莎, 等. 壳聚糖及锌离子模板壳聚糖膜与锌离子反应的动力学及机理探讨[J]. 化学世界, 2006, 47(7): 388.
- [37] 范小娜, 李蕾, 余磊. 稀土-蛋白质配合物合成及其傅里叶红外光谱分析[J]. 赣南医学院学报, 2001, 21(2): 107.
- [38] 罗宗铭, 方岩雄, 张焜, 等. 蛋白质及核酸多元络合反应及机理的研究进展[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2002, 46(2): 55.
- [39] 贾东英, 王文贤, 姚开, 等. 胶原蛋白多肽功能特性的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(6): 21.
- [40] 孔宪慧. 含银废水中银离子及银的配位离子的吸附与解吸研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2005.
- [41] 卢业玉, 罗宗铭, 张焜, 等. $Zn(II)$ -锌试剂络合物与蛋白质的显色反应及其应用研究[J]. 理化检验(化学分册), 2001, 37(7): 30.
- [42] 张朝平, 夏敏. 蛋白质银(I)-铜(II)络合物的生成及其紫外与红外光谱[J]. 光谱学与光谱分析, 1996, 16(5): 43.
- [43] Deacon G B, Phillips R J. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylate complexes and the type of carboxylate coordination [J]. Coord Chem Rev, 1980, 33: 227.
- [44] Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds (Part B) [M]. New York: Wiley, 1997: 57-62.
- [45] Tackett J E. FT-IR characterization of metal acetates in aqueous-solution [J]. Appl Spectrosc, 1989, 43: 483.
- [46] Li N, Tong S Y. Spectrophotometer study of the interaction of tetraphenyl-porphyrin tetrasulfonate (TPPS4) with protein [J]. Talanta, 1994, 41(10): 1657.