

脱铁乳铁蛋白铬络合物制备方法的研究

吴 扬, 胡志和*, 杨柏标

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘 要: 以乳铁蛋白(lactoferrin, LF)和六水三氯化铬为主要原料制备脱铁乳铁蛋白铬, 确定脱铁乳铁蛋白与 Cr^{3+} 络合的条件, 并对络合物采用红外吸收光谱进行表征。结果表明: 乳铁蛋白经醋酸调 pH 值到 2.25 或经柠檬酸调 pH 值到 2.50 后, 均能使 Fe^{3+} 游离出来; 脱铁乳铁蛋白与 Cr^{3+} 络合的条件为: 温度 $60\sim 70^\circ\text{C}$, $\text{pH} 7.0\sim 7.6$, 脱铁乳铁蛋白与六水三氯化铬物质的量的浓度比 1:2, 搅拌时间 2h 以上。

关键词: 乳铁蛋白; 三氯化铬; 脱铁乳铁蛋白铬; 红外吸收光谱

Preparation of Apotransferrin-Chromium Complex

WU Yang, HU Zhi-he*, YANG Bo-biao

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science,

Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Apotransferrin was prepared from lactoferrin using acetic acid or citric acid, and the apotransferrin prepared using acetic acid was employed to prepare apotransferrin-chromium complex. The effects of acetic acid and citric acid on the apotransferrin preparation were compared by determining product yield and analyzing chemical structure by means of UV and IR absorption spectroscopy. The preparation conditions of apotransferrin-chromium complex were investigated by one-factor-at-a-time experiments, and the product was characterized. Fe^{3+} could be effectively dissociated from lactoferrin by adjusting pH to 2.25 using acetic acid or to 2.50 using citric acid. Compared to citric acid, the use of acetic acid yielded more apotransferrin, but the apotransferrin products prepared using the two reagents had the same functional groups. The optimal complex conditions of apotransferrin with Cr^{3+} were as follows: $60\sim 70^\circ\text{C}$, $\text{pH} 7.0\sim 7.6$, molar ratio of apolactoferrin to chromium trichloride 1:2, and stirring duration more than 2 h.

Key words: lactoferrin; chromium trichloride; apotransferrin-chromium complex; infrared absorption spectrum

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0076-05

铬(Cr)是人体必需微量元素, Cr^{3+} 作为葡萄糖耐受因子(GTF)的活性成分协同胰岛素发挥作用, 对糖、脂肪、蛋白质和核酸的代谢起着重要作用^[1]。许多研究发现, 人体缺铬会导致糖代谢紊乱, 胰岛素靶细胞的敏感性减弱、胰岛素受体数目减少、亲和力降低, 从而导致糖尿病的发生, 而补铬后会改善这些相关表现^[2]。铬又是人体组织中随年龄增长而含量下降的唯一金属元素, 且与糖尿病关系密切^[3], 这就要求人在整个生长过程中进行铬的补充。目前已有研究报道^[4]: 铬的吸收与其化学形式密切相关, 无机铬难以被吸收, 吸收率仅为 1%~3%; 有机铬较易被吸收, 其吸收率为 10%~25%, 可见有机铬是一种有应用前景的铬补充剂。

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种铁结合性糖蛋白, 现已证实 LF 具有许多独特的生物学功能^[5-6], 如: 增强铁的传递和吸收、广谱的抗菌性、免疫作用、抗氧化作用、促进肠道菌群的平衡以及作为生长因子具有抗炎、抗病毒、抗癌作用等。长期食用添加乳铁蛋白的食品有助于维持健康的肠道微生物菌群, 增强免疫力。乳铁蛋白铬作为一种新型的营养强化剂, 把具有多种生物学功能的乳铁蛋白和微量元素铬(Cr^{3+})有机的结合起来, 增强了二者的协同作用。因此, 乳铁蛋白铬可用于开发新型的保健食品, 在食品、生化、医药、化妆品等行业中, 具有广阔的应用和开发前景。本实验拟就脱铁乳铁蛋白铬的制备方法和络合情况进行研

收稿日期: 2008-10-16

基金项目: 天津市重点科技支撑项目(07ZCKFNC00200)

作者简介: 吴扬(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为专用功能性食品。E-mail: vipwuyang@yahoo.cn

* 通讯作者: 胡志和(1962—), 男, 教授, 研究方向为专用功能食品研究与开发。E-mail: hzihe@tjcu.edu.cn

究,以确定脱铁乳铁蛋白铬的络合条件和络合后物质结构的变化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳铁蛋白 Tatua 乳制品合作有限公司。

冰醋酸、柠檬酸、醋酸钠、柠檬酸钠、5-磺基水杨酸、六水三氯化铬、氢氧化钠以及碳酸氢钠均为分析纯;水为去离子水。

1.2 仪器与设备

HWS24 型恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司; S-3C 型精密 pH 计 天津盛邦科仪器; LGJ-10 型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂; 2100 型紫外分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司; 2501PC 紫外光谱仪 日本岛津公司; 983G 红外光谱仪 美国 PE 公司; FA1104N 电子天平; 透析带(截留分子量范围 6000~8000u) 北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 脱铁乳铁蛋白的制备和表征

使用醋酸和柠檬酸,分别使乳铁蛋白中结合的铁离子游离出来。

制备脱铁乳铁蛋白的方法:称取 10g 乳铁蛋白,用去离子水溶解;加入 25% 醋酸溶液,乳铁蛋白-醋酸溶液由砖红色变成淡黄色,用 pH 计检测乳铁蛋白-醋酸溶液的 pH 值,并配制此 pH 值下的醋酸透析液。把调节好 pH 值的乳铁蛋白-醋酸溶液在搅拌的条件下透析,直到透析液中检测不到 Fe^{3+} ,脱铁后的乳铁蛋白溶液变得澄清;继续用去离子水透析,直到除去溶液中的醋酸根离子。然后冷冻干燥,得到淡白色粉末。称其质量,计算出产品的得率,分别用红外光谱仪和紫外光谱仪对产品进行表征。

$$\text{产品得率(\%)} = \frac{\text{脱铁乳铁蛋白质量}}{\text{乳铁蛋白质量}} \times 100$$

透析液中 Fe^{3+} 的检测方法:磺基水杨酸法。取 5ml 醋酸透析液于 50ml 容量瓶内,加入 10% 磺基水杨酸溶液 2.5ml,用 pH5 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液稀释到刻度,摇匀,反应 10min。用 25% 的醋酸溶液 5ml 做空白,测定 A_{460} 值,如果透析液中不存在 Fe^{3+} ,则 A_{460} 值为零。

按上述步骤用柠檬酸游离乳铁蛋白中的 Fe^{3+} 。比较两种酸制备脱铁乳铁蛋白的 pH 值、产率、红外吸收光谱图和紫外吸收光谱图。

1.3.2 络合条件的确定

铬与脱铁乳铁蛋白的络合情况受 pH 值、温度、浓度比三个因素的影响,下面通过改变单一因素的方法,

找出适宜络合的 pH 值、温度和物质的量浓度比。

1.3.2.1 温度对脱铁乳铁蛋白铬络合物的影响

称取 5 份脱铁乳铁蛋白,各 0.5g,用去离子水溶解;分别加入过量的六水三氯化铬 0.02g,用 NaHCO_3 调节溶液 pH 值到 7.0 后,在温度为 70、65、60、55、50℃ 的恒温水浴锅内(考虑到脱铁乳铁蛋白的变性温度 72℃),搅拌络合 2h,观察溶液颜色变化。同法,用六水三氯化铬溶液作为对照,观察其颜色变化。

1.3.2.2 pH 值对脱铁乳铁蛋白铬络合物的影响

称取 9 份脱铁乳铁蛋白,各 0.5g,用去离子水溶解;分别加入过量的六水三氯化铬 0.02g,用 NaHCO_3 调节各溶液 pH 值为 7.6、7.4、7.2、7.0、6.8、6.6、6.4、6.2、6.0。在 60~70℃ 的恒温水浴锅内搅拌络合 2h,观察溶液颜色变化。同法,用六水三氯化铬溶液作为对照,观察其颜色变化。

1.3.2.3 铬与脱铁乳铁蛋白物质的量的浓度比对络合物的影响

称取 4 份脱铁乳铁蛋白,各 0.5g,用去离子水溶解;按脱铁乳铁蛋白与铬物质的量的浓度比 1:1、1:2、1:3、1:4 分别加入 0.004、0.008、0.012、0.016g 六水三氯化铬。用 NaOH 调节溶液 pH 值到 7.0,在 60~70℃ 恒温水浴锅内搅拌络合 2h,观察溶液颜色的变化;并通过红外吸收光谱图进一步确定其络合情况。

1.3.2.4 NaOH、 NaHCO_3 对脱铁乳铁蛋白铬络合物的影响

称取 2 份脱铁乳铁蛋白,各 0.5g,用去离子水溶解;分别加入过量的六水三氯化铬 0.02g。分别用 NaOH、 NaHCO_3 调节溶液 pH 值到 7.0,在 60~70℃ 恒温水浴锅内搅拌络合 2h,观察溶液颜色的变化。同法,用六水三氯化铬溶液作为对照,观察其颜色变化。

1.3.3 脱铁乳铁蛋白铬络合物的制备与表征

称取 2g 脱铁乳铁蛋白,用去离子水溶解;加入 0.08g 六水三氯化铬;用 NaHCO_3 调节溶液 pH 值到 7.0,在 60~70℃ 恒温水浴锅内搅拌络合 2h。透析,以去离子水为透析液把过量的氯化铬透析出去;冷冻干燥,得到纯的脱铁乳铁蛋白铬粉末。分别用红外光谱仪和紫外光谱仪对络合后的物质进行表征。

比较乳铁蛋白、脱铁乳铁蛋白、脱铁乳铁蛋白铬的红外和紫外吸收光谱图,分析物质结构的变化。

2 结果与分析

2.1 不同酸对乳铁蛋白脱铁的影响

按照 1.3.1 节的方法,比较两种酸对乳铁蛋白脱铁的 pH 值和产品得率、红外吸收光谱图和紫外吸收光谱

图, 并与乳铁蛋白的红外吸收光谱图和紫外吸收光谱图比较, 结果如表 1 所示。

表 1 不同酸脱铁所需的 pH 值和产品产率

Table 1 pH adjustment for apotransferrin preparation using acetic acid or citric acid and yield of product

酸的种类	调节的 pH 值	产品得率(%)
醋酸	2.25	73.9
柠檬酸	2.50	60.8

从表 1 可知, 要使乳铁蛋白中的 Fe^{3+} 游离出来, 需要用 25% 醋酸调 pH 值到 2.25, 需要用 25% 柠檬酸调 pH 值到 2.50, 柠檬酸对乳铁蛋白敏感性较高, 但目前并没有这方面的相关研究。用醋酸脱铁得到产品得率为 73.9%, 用柠檬酸脱铁得到产品得率为 60.8%, 醋酸脱铁较柠檬酸脱铁产品得率稍高。但两种酸脱铁所得产品得率均不高, 究其原因可能是乳铁蛋白长期处于低酸性条件下, 引起蛋白质部分水解, 使得氨基酸肽链水解为小分子的短肽, 从透析袋中透析出来。

两种产品的紫外吸收光谱图分别如图 1、2 所示, 并与乳铁蛋白紫外吸收光谱图(图 3)比较。

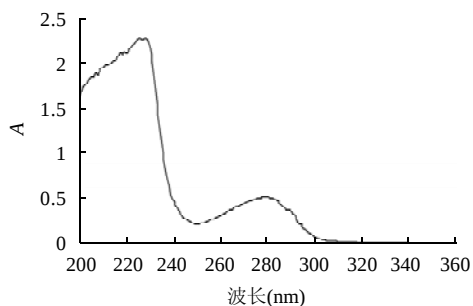


图 1 醋酸脱铁后的乳铁蛋白紫外吸收光谱图

Fig.1 UV absorption spectrum of apotransferrin prepared using acetic acid

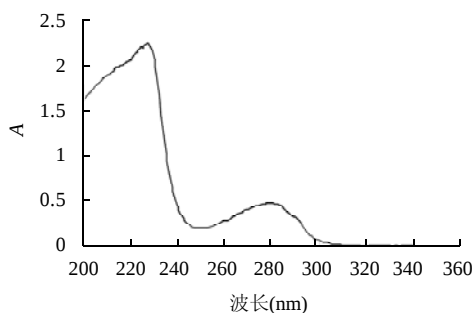


图 2 柠檬酸脱铁后的乳铁蛋白紫外吸收光谱图

Fig.2 UV absorption spectrum of apotransferrin prepared using citric acid

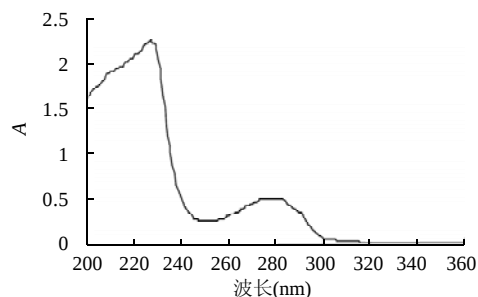


图 3 乳铁蛋白紫外吸收光谱图

Fig.3 UV absorption spectrum of lactoferrin

图 1、2 相比较, 两个图谱基本一致, 在波长 295 nm 和 245 nm 处都有强吸收; 图 1、2 与图 3 相比较, 三个图谱基本一致, 最大吸收峰一样, 可能是因为金属离子的结合不能引起乳铁蛋白分子内官能团中电子的跃迁, 因此金属离子的结合不能引起吸收峰的偏移, 这与 Sun、Li^[7-8]研究的金属离子与运铁蛋白类蛋白结合的特征吸收峰相一致。因此, 不能用紫外吸收光谱图作为乳铁蛋白脱铁与否的判断标准。但从溶液的颜色变化可以初步判断 Fe^{3+} 已经游离出来。

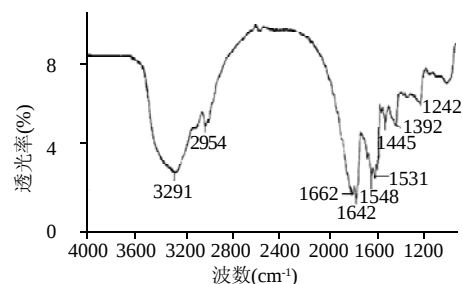


图 4 醋酸脱铁后的乳铁蛋白红外吸收光谱图

Fig.4 IR absorption spectrum of apotransferrin prepared using acetic acid

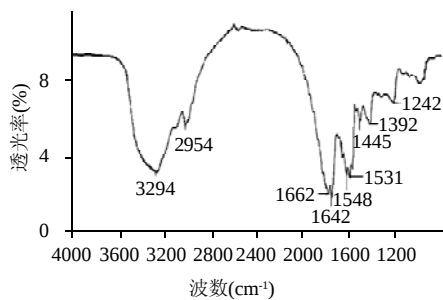


图 5 柠檬酸脱铁后的乳铁蛋白红外吸收光谱图

Fig.5 IR absorption spectrum of apotransferrin prepared using citric acid

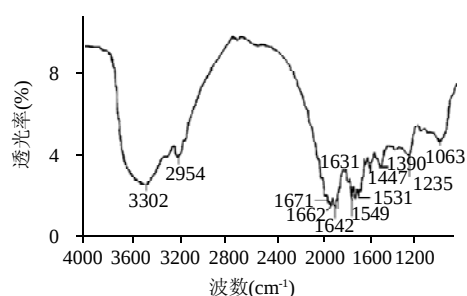


图6 乳铁蛋白红外吸收光谱图

Fig.6 IR absorption spectrum of lactoferrin

比较两种产品的红外吸收光谱图, 分别如图4、5所示, 并与乳铁蛋白的红外吸收光谱图(图6)比较。

分别比较图4和图6、图5和图6, 图谱基本一致; 但图4在 3000cm^{-1} 处和 $1680\sim 1620\text{cm}^{-1}$ 处与图4、图5存在差异。在 3000cm^{-1} 处, 图4比图4、5多了 10cm^{-1} 单位的偏移, 经查找有关文献证明, 此区域为基团 $-\text{NH}$ —特征吸收峰; 在 $1680\sim 1620\text{cm}^{-1}$ 范围内, 图6比图4、5多了 1671cm^{-1} 和 1631cm^{-1} 两个特征吸收峰, 有关文献证明, 此区域为基团 $-\text{C}=\text{O}$ 特征吸收峰。并通过颜色的变化, 可以初步断定两种蛋白质中 Fe^{3+} 已经游离出来。经过反复的实验证明, 图谱的重现性较好, 因此可以用红外吸收光谱图作为乳铁蛋白脱铁与否的判断标准; 并且两种酸都可以使乳铁蛋白中结合的 Fe^{3+} 游离出来。再比较图4和图5, 两个图谱基本一致, 最大特征吸收峰基本相同, 证明两种物质含有相同的官能团; 但两种物质是否同一种物质, 还需进一步研究证明。本实验采用醋酸脱铁后的脱铁乳铁蛋白进行后续实验。

2.2 络合温度的选择

由表2可知, 脱铁乳铁蛋白与铬络合需要在一定温度条件下进行, 当温度低于 50°C 时, 脱铁乳铁蛋白始终不能与铬络合。只有当温度高于 65°C 时, 脱铁乳铁蛋白才能与铬特异性结合, 生成脱铁乳铁蛋白络合物。进一步通过三氯化铬溶液做对照, 证明脱铁乳铁蛋白铬在络合过程中颜色的变化不是由三氯化铬引起的, 而是脱铁乳铁蛋白铬络合过程中所特有的。

2.3 络合pH值的选择

由表3可知, 当脱铁乳铁蛋白溶液pH值小于6.0时, 虽然溶液能变成蓝绿色, 但脱铁乳铁蛋白并不能与铬稳定地结合。只有当溶液环境pH值大于6.0时, Cr^{3+} 才能与脱铁乳铁蛋白牢固结合, 形成稳定的络合物。通过对照实验证明, 三氯化铬溶液在不同pH值下颜色和脱铁乳铁蛋白铬溶液颜色均不同, 脱铁乳铁蛋白铬形成络合物过程中颜色的变化不是由三氯化铬引起的, 而是脱铁乳铁蛋白络合过程所特有的。

2.4 物质的量的浓度比的选择

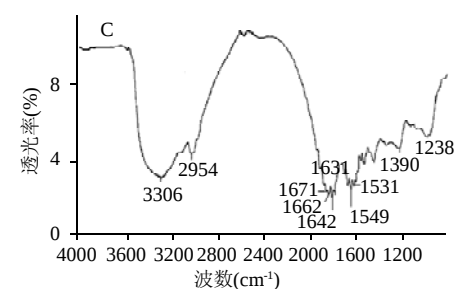
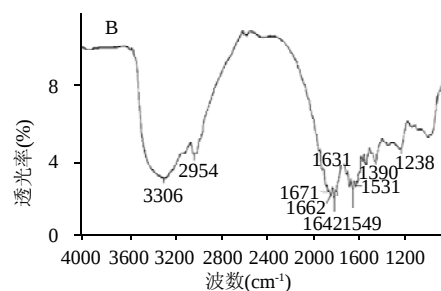
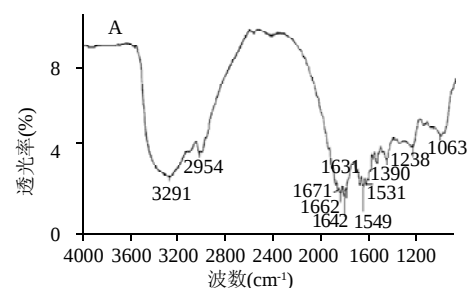


表2 温度对脱铁乳铁蛋白铬络合的影响

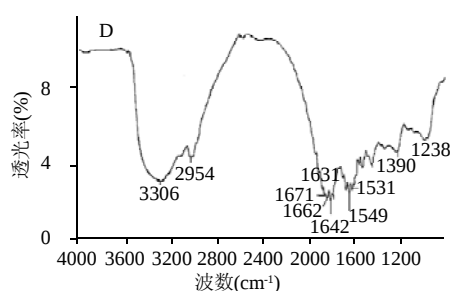
Table 2 Effects of temperature on complexation of apotransferrin with Cr^{3+}

温度($^\circ\text{C}$)	65	60	55	50	45	40
脱铁乳铁蛋白和三氯化铬溶液	青绿→蓝绿浑浊→墨绿	青绿→蓝绿浑浊→墨绿	青绿→蓝绿浑浊→墨绿	青绿→蓝绿浑浊→墨绿	青绿→深绿浑浊→青绿澄清	青绿→绿色浑浊→绿色澄清
三氯化铬溶液	深绿→青绿→浅蓝→蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→青绿→浅蓝→蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→青绿→浅蓝→蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→青绿→浅蓝→蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→草绿→蓝色→蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→草绿→蓝色→蓝色浑浊→静置后沉淀

表3 不同pH值对脱铁乳铁蛋白铬络合的影响

Table 3 Effects of medium pH on complexation of apotransferrin with Cr^{3+}

pH	7.6	7.4	7.2	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5
脱铁乳铁蛋白和三氯化铬溶液	青绿→蓝绿 浑浊→墨绿	青绿→蓝绿浑浊 →墨绿	青绿→蓝绿浑浊 →墨绿	青绿→蓝绿浑浊 →墨绿	青绿→蓝绿浑浊 →墨绿	青绿→蓝绿浑浊 →墨绿	青绿→淡蓝绿 →绿色澄清	青绿→淡蓝绿 →绿色澄清	青绿→淡蓝绿 →绿色澄清
三氯化铬溶液	深绿→青绿→浅蓝→ 蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→青绿→浅蓝→ 蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→青绿→浅蓝→ 蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→青绿→浅蓝→ 蓝色浑浊→静置后沉淀	深绿→浅蓝→蓝色絮 状浑浊→静置后沉淀	深绿→浅蓝→蓝色絮 状浑浊→静置后沉淀	深绿→浅蓝→蓝色絮 状浑浊→静置后沉淀	深绿→ 青绿澄清	深绿→ 草绿澄清



A、B、C、D 中脱铁乳铁蛋白与铬的物质的量的浓度比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4。

图 7 脱铁乳铁蛋白铬红外吸收光谱图

Fig.7 IR absorption spectrum of apotransferrin-chromium complex with the molar ratio of 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4

比较图 7A 和图 7B 可知, 在 3000cm^{-1} 处二者特征吸收峰不同, 图 7A 最大吸收峰为 3291cm^{-1} , 图 7B 最大吸收峰为 3306cm^{-1} , 说明铬与脱铁乳铁蛋白物质的量的浓度比不同时会影响产物的红外吸收光谱图, 但具体的影响机理尚不清楚。比较图 7B、7C、7D 可知, 三个红外吸收光谱图基本一致, 说明一个脱铁乳铁蛋白分子结合两个 Cr^{3+} 后达到饱和状态, 饱和的脱铁乳铁蛋白不会再与过量的 Cr^{3+} 结合, 且脱铁乳铁蛋白与 Cr^{3+} 结合稳定。

2.5 调节 pH 值所用碱的选择

按照 1.3.2.4 节的方法, 分别用 NaOH 和 NaHCO_3 调节溶液 pH 值, 溶液都从青绿→蓝绿沉淀→墨绿澄清, 但用碱调节三氯化铬溶液, 却从青绿→草绿→颜色变淡→青绿浑浊→浑浊增多→静置后分层, 说明其颜色变化是脱铁乳铁蛋白铬络合过程中所特有的。由此, 证明脱铁乳铁蛋白与 Cr^{3+} 络合只与其所在的 pH 环境有关, 而与选择的碱无关。

2.6 脱铁乳铁蛋白铬络合物的表征

比较脱铁乳铁蛋白、乳铁蛋白、脱铁乳铁蛋白铬的红外吸收光谱图, 如图 4、6、7D 所示。

脱铁乳铁蛋白、乳铁蛋白、脱铁乳铁蛋白铬的红外吸收光谱图基本一致, 但在 3300cm^{-1} 波数范围内的特征吸收峰却存在差别, 脱铁乳铁蛋白的最大吸收峰为 3302cm^{-1} , 脱铁乳铁蛋白的最大吸收峰为 3291cm^{-1} , 乳铁蛋白铬的最大吸收峰则为 3306cm^{-1} , 经查找有关文献[9]、[10]证实, 此区域为基团 $-\text{NH}-$ 的特征吸收频率。因为金属离子络合的缘故, 引起了基团 $-\text{NH}-$ 电子重新排布, 影响了基团内电子伸缩振动, 从而影响了该基团的特征吸收峰。实验同时证明了, Fe^{3+} 和 Cr^{3+} 对基团的影响是一致的。

进一步分析比较三种物质在 $1800\sim 1400\text{cm}^{-1}$ 波数范围内的谱图。可知, 乳铁蛋白和脱铁乳铁蛋白铬在此区域吸收光谱图一致, 但与脱铁后的乳铁蛋白吸收光谱图却有所不同。乳铁蛋白和脱铁乳铁蛋白铬在 1671cm^{-1} 和 1631cm^{-1} 有强吸收峰, 但脱铁乳铁蛋白没有, 经查找有

文献[9]~[11]证实, 此区域为 $-\text{C}=\text{O}$ 基团的特征吸收频率。 Fe^{3+} 和 Cr^{3+} 与乳铁蛋白的结合, 引起了该基团内电子的伸缩振动, 从而引起了吸收峰频率的改变。

经反复实验证明, 乳铁蛋白、脱铁乳铁蛋白、脱铁乳铁蛋白铬红外吸收光谱图的重现性较好, 其特征吸收峰的产生和特征吸收峰的偏移并不是偶然, 因此可以把红外吸收光谱图作为乳铁蛋白脱铁及铬与脱铁乳铁蛋白络合与否的一个判断依据。

3 结 论

3.1 醋酸调节溶液 pH 值为 2.25, 柠檬酸调节溶液 pH 值为 2.50 后, Fe^{3+} 可从乳铁蛋白中游离出来, 脱铁后的乳铁蛋白溶液变得澄清。

3.2 脱铁乳铁蛋白与铬离子络合的最佳条件为: pH7.0~7.6, 温度为 $60\sim 70^\circ\text{C}$, 脱铁乳铁蛋白与六水三氯化铬物质的量的浓度比 1:2, 搅拌时间在 2h 以上, 络合过程中溶液颜色先由青绿色变成蓝绿色, 最后变成墨绿色而达到稳定。

3.3 Cr^{3+} 和脱铁乳铁蛋白络合机制与 Fe^{3+} 不同, 络合中并不需要 HCO_3^- 的参与, 只与络合时的 pH 值有关; 一个乳铁蛋白分子可以结合两个 Cr^{3+} 。

3.4 通过比较产物的红外吸收光谱图不仅可以判断乳铁蛋白是否已经脱铁, 还可以判断脱铁乳铁蛋白与铬的络合情况。

参考文献:

- [1] VINCENT J B. Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes[J]. Nutr Rev, 2000, 58(3): 67-71.
- [2] CEFALU W T, HU F B. Role of chromium in human health and in diabetes[J]. Diabetes Care, 2004, 27(11): 2741-2746.
- [3] PREES H G, ANDERSON R A. Chromium update: examining recent literature[J]. J. Nutr Opin Clin Nutr Metab Care, 1998, 1(6): 509.
- [4] 郝素娥. 新型添加剂: 有机铬[J]. 精细与专业化学品, 2000(6): 17-18.
- [5] WAARTS B L, WILSCHUT J, ANEKE O J, et al. Antiviral activity of human lactoferrin: inhibition of alphavirus interaction with heparin sulfate [J]. Virology, 2005, 333(2): 284-292.
- [6] DAPSANSE V, DEFER M C, FOLLEZOU J Y, et al. Differential pattern of circulating nitro derivatives of lactoferrin and antilactoferrin antibodies in HIV type 1 and HIV type 2 infections[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001, 17(11): 1041-1045.
- [7] SUN H, LI H, SADLER P J, et al. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow Colostrum and milk[J]. Biochem, 1967, 6(11): 3393-3396.
- [8] LI H, SADLER P J, SUN H J, et al. Structure of human lactoferrin crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution [J]. J Mol Biol, 1989, 209: 711-734.
- [9] 朱明华. 仪器分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 266-318.
- [10] 常建华, 董倚功. 波普原理及解析[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 10-55.
- [11] 孟令芝, 龚淑, 何永柄. 有机波谱分析[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2003: 194-241.