

L-羟脯氨酸-Zn(II)的配合机制及其抗氧化性研究 Coordination Mechanism and Antioxidant Activity of L- hydroxyproline Zinc(II)

左瑞雅^{1*} 周小华¹ 杜首英²

ZUO Rui-Ya^{1*} , ZHOU Xiao-Hua¹ and DU Shou-Ying²

1 重庆大学化学化工学院 重庆 400044

2 南风化工集团股份有限公司 运城 044000

1 College of Chemistry and Chemical Engineering , Chongqing University , Chongqing 400044

2 NanFeng Chemical Industry Group Co. , Ltd. YunCheng 044000

摘 要 以 L-羟脯氨酸(Hyp)和 ZnSO₄ 制备 Hyp-Zn(II)配合物,研究其配合机制及抗氧化能力。与 L-羟脯氨酸相比,配合物在 1100cm⁻¹处出现了一新的红外吸收峰,说明 L-羟脯氨酸与 Zn(II)发生了配位作用,配合物的差热-热重图与 L-羟脯氨酸相比,在 290℃和 375℃的吸热峰消失了,确证 L-羟脯氨酸与 Zn(II)发生了配位作用,配合物核磁共振图中 3.5~3.9ppm 的羧基氢和羟基氢的信号峰的消失,表明 L-羟脯氨酸与 Zn(II)发生配合的位置是 L-羟脯氨酸的 α 碳的羧基或 γ 碳的羟基氧;从配合物的原子力显微形貌相图可见数个 L-羟脯氨酸围绕 Zn(II)形成的配合结构。透析实验结果证实 L-羟脯氨酸与 Zn(II)配合的比例为 4:1(mol/mol)。上述测定和表征表明所形成配合物的分子式为 Zn(Hyp)₄·H₂O。(Hyp)₄-Zn(II)配合物抑制 Zn(II)产生的羟基自由基,抑制百分比为 75.5%,其总抗氧化能力为 80.167u/mL,抗超氧阴离子活力为 53.19u/mL。

关键词 L-羟脯氨酸, ZnSO₄, 原子力显微镜

中图分类号 0629.711 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0704-06

Abstract The coordination compound of L-hydroxyproline(Hyp)-Zn(II) was synthesized with Hyp and zinc sulfate as raw materials in water medium, coordination Synthesizing Mechanism and Antioxidant Activity of Hyp-Zn(II) coordination compound has been researched. Compared with Hyp, the infrared spectrogram of Hyp-Zn(II) coordination compound emerge a new absorption peak at 1100cm⁻¹. Conclusion could be obtained that there exists a coordination effect between Hyp and ZnSO₄; TG and DSC curve of Hyp and Hyp-Zn(II) coordination compound were analysed. Compared with Hyp, the peak of Hyp-Zn(II) disappear at 290℃ and 375℃. This phenomenon confirmed the front conclusion; At the NMR graph of Hyp-Zn(II) coordination compound, the disappearance of the α-carboxyl-hydrogen and α-hydroxyl- hydrogen's peak at 3.5~3.9ppm could indicate that combination's position of Hyp is α-carboxyl and α-hydroxyl; Structure of Hyp-Zn(II) coordination compound were exosyndrome by the Atomic Force microscopy. It is showed that centr-atom Zn(II) was surrounded by several Hyp at Hyp-Zn(II) coordination compound's phase diagram; The proportion of Hyp-Zn(II) coordination compound was determined by dialysis experiment, the proportion is 4:1; Above-mentioned determination and exosyndrome indicated that the molecular formula of Hyp-Zn(II) coordination compound is Zn(Hyp)₄·H₂O. The results indicated that the Hyp-Zn(II) coordination compound can inhibit hydroxyl

free radicals of Zn(II), and the Percentage of Inhibition is 75.5%; the total antioxidant activities of Hyp-Zn(II) coordination compound is 80.167 u/mL, the anti-superoxide activities of Hyp-Zn(II) coordination compound is 53.19 u/mL.

Key words L-hydroxyproline, ZnSO₄, atomic force microscopy

Zn 是 DNA 聚合酶、胶原酶等多种酶的辅助因子,广泛参与 DNA、RNA、蛋白质的代谢^[1],具有促进生长发育、改善味觉及神经系统功能、防止感染并促进伤口愈合^[2]的功能,是人和动物必需的微量元素^[3],锌过量会产生中毒现象^[4],造成人体胃部不适、恶心、眩晕等。

氨基酸的自由氨基、羧基等均可参与具有空轨道的金属离子配位键形成,从而掩蔽金属离子,氨基酸金属离子配合物因其独特的配合结构,具有双重营养作用,不同的吸收机制^[5],可以被肠道迅速吸收利用,在食品工业、化妆品广泛应用。

胶原蛋白是人体最丰富的高抗张蛋白质,具有营养、修复、保湿、亲和性和伸缩性,可提高免疫力、促进伤口愈合、使皮肤光滑、弹性、滋润。L-羟脯氨酸(Pro-OH)是胶原蛋白的特征组分之一,含量约为9%。在体内羟基脯氨酸由脯氨酸酰羟化酶羟化而成,其游离的4-羟基能清除超氧自由基和羟基自由基,目前主要以双软脂酰羟基脯氨酸形式应用于抗衰老化妆品,也可以当作抗氧化剂而添加到食品和化妆品中,周燕^[6]等报道,在角质细胞的体外培养过程中添加抗氧化剂可在一定程度上提高角质细胞的克隆形成率,减缓细胞衰老速率,有利于延长细胞的寿命。

L-羟脯氨酸的游离羟基基具有孤对电子,可与具有空轨道的金属离子形成配位键,而胶原酶也含有Zn(II),因此,L-羟脯氨酸可能与淬灭金属离子导致的自由基氧化及胶原酶活性有关。高峰等^[7]以L-羟脯氨酸和氯化锌制备配合物,仅研究了其配位数。因此,有必要进一步研究L-羟脯氨酸金属配合物的配位机制及抗氧化性质。本文以L-羟脯氨酸和ZnSO₄·7H₂O为原料,制备L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物,研究其配位机制及抗氧化能力,旨在为科学应用L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物提供必要的生物无机配位化学支持。

1 实验

1.1 主要仪器和试剂

仪器:550 II 型红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;DTG-6H 差热分析仪,日本 SHIMADZU 公司;AFM.

IPC-208B 原子力显微镜 (AFM),重庆大学恒瑞公司;pHS-2C 型精密酸度计,上海雷磁仪器厂;722S 可见分光光度计,上海精密仪器厂;CL-4 型恒温加热磁力搅拌器,郑州市长城科工贸有限公司;透析袋(截留分子量为 100D),上海绿鸟科技有限公司;SHA-C 水浴恒温振荡器,江苏金坛市亿通电子有限公司;FA1004N 电子天平,上海天平仪器厂;FD-1 冷冻干燥机,北京德天佑科技发展有限公司;JNM-MY60F 核磁共振仪(NMR),日本理学公司。

试剂:L-羟脯氨酸、L-脯氨酸,生化试剂,上海源聚生物科技有限公司;氘代氯仿(3% TMS)A.R.,北京化工厂;ZnSO₄·7H₂O, NH₄Cl, NaCl A.R.,重庆北碚化学试剂厂;EDTA-Na₂ A.R.,成都金山化工试剂厂;总抗氧化能力测定试剂盒,超氧阴离子测定试剂盒,羟基自由基测定试剂盒,科研试剂,南京建成生物工程研究所;其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物制备:称取 13.1g (0.1mol) L-羟脯氨酸,用双蒸水或超纯水溶解,配制成浓度为 1 mol/L 的溶液,备用。称取 11.48g (0.4mol) ZnSO₄·7H₂O,用双蒸水或超纯水溶解,配制成 Zn(II)浓度为 1mol/L 的溶液,备用。分别吸取定量 L-羟脯氨酸溶液和 ZnSO₄ 溶液,混合后在 60℃ 下搅拌反应 1h,获得 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物溶液,备用。将该配合物溶液置于 FD-1 冷冻干燥机中进行冷冻干燥,获得 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物冻干粉,备用。

1.2.2 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物的红外光谱^[8]:分别取 1.2.1 制备的 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物溶液、同浓度 L-羟脯氨酸和 Zn(II)溶液,用 550 II 型红外光谱仪测定其红外光谱。测定结果见图 3。

1.2.3 差热分析:取 1.2.1 制备的 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物溶液,用 FD-1 冷冻干燥机在 -58℃、40Pa 下冷冻干燥 24h,得到 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物的冻干粉,备用。取少量 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物冻干粉、L-羟脯氨酸粉末和 ZnSO₄·7H₂O,分别在 DTG-6H 差热分析仪上进行差热分析测定。结果见图 4。

1.2.4 ¹H 核磁共振实验^[9]:取少量 L-羟脯氨酸-Zn

(II) 配合物冻干粉及 L-羟脯氨酸粉末, 于 2 mL 氘代氯仿 (CDCl_3) 中充分溶解, 然后用 60 MHz 核磁共振仪测试, 获得核磁共振 H 谱图, 结果见图 5。

1.2.5 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物的透析实验(配合比): 取定量 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物溶液及同浓度 ZnSO_4 溶液, 装入截留分子量为 100D 的透析袋中, 在 200 r/min 磁力搅拌下透析, 透析装置见图 1。定时取样, 用 EDTA 络合滴定法^[10] 测定透过液中的 Zn(II) 浓度并换算成 Zn(II) 透析量。以时间为横坐标, Zn(II) 透析量为纵坐标作图, 绘制透析曲线。以平衡时透析袋内 Zn(II) 和 L-羟脯氨酸的量为基准, 计算 L-羟脯氨酸-Zn(II) 的配位比。

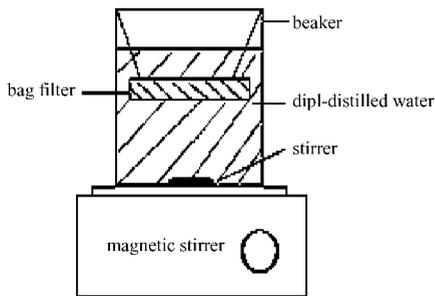


图 1 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物透析装置

Fig.1 Equipment for the dialysis of Hyp-Zn(II) coordination compound

1.2.6 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物原子力显微形貌观察: 取 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物溶液、同浓度 L-羟脯氨酸溶液和 ZnSO_4 溶液, 分别稀释 300 倍后各点样于清洁金箔上, 60°C 干燥, 用 AFM-IPC-208B 原子力显微镜 (AFM) 观察测定其分子形貌^[11]。

1.2.7 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物总抗氧化能力^[12] 测定: 配制不同比例的 L-羟脯氨酸:Zn(II) 的样品溶液, 用南京建成生物工程研究所生产的总抗氧化能力试剂盒分别测定其总抗氧化能力。

1.2.8 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物抗超氧阴离子活力测定: 配制不同比例的 L-羟脯氨酸:Zn(II) 的样品溶液, 用超氧阴离子试剂盒分别测定其抑制超氧阴离子的能力。

1.2.9 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物产生(抑制)羟基自由基能力的测定: 配制不同比例的 L-羟脯氨酸:Zn(II) 的样品溶液, 用羟基自由基试剂盒分别测定其抑制产生羟基自由基的能力。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

L-羟脯氨酸(图 2) 的红外光谱(图 3 中 b 所示)

在 $1000\text{cm}^{-1} \sim 1700\text{cm}^{-1}$ 内出现了 6 个吸收峰, 分别是氨基(g)、羧基(a)、羟基(d)、亚甲基(e)等基团的特征峰; L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物的红外光谱(如图 3 中 a 所示)中也出现了这 6 个吸收峰, 但在 1100cm^{-1} 处出现了一个强度比较大的新的吸收峰, 且 L-羟脯氨酸中羧基阴离子在 1650cm^{-1} 的反对称伸缩振动吸收峰在配合物中移至 1640cm^{-1} , 在 1400cm^{-1} 的对称伸缩振动吸收峰在配合物中移至 1405cm^{-1} , 说明羟脯氨酸和 Zn(II) 之间发生了一定的作用。

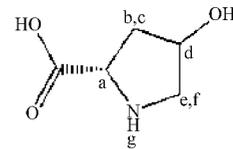


图 2 L-羟脯氨酸的结构

Fig.2 Structure of Hyp

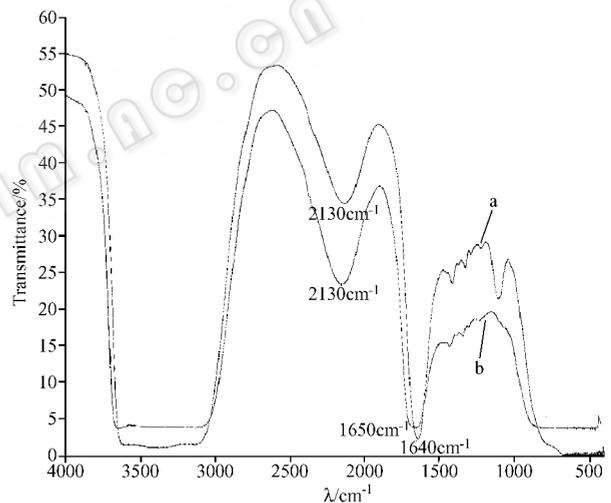


图 3 配合物 a 和 L-羟脯氨酸 b 的红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectra of Hyp-Zn(II) coordination compound (a) and Hyp (b)

2.2 差热分析

以 Al_2O_3 为参比物测定, 升温速度为 $10^\circ\text{C}/\text{min}$, 得到 L-羟脯氨酸(图 4a)、L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物(图 4b) 和 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (未列出) 的热重-差热图。

L-羟脯氨酸在 290°C 和 375°C 处分别有吸热峰, 应该是 L-羟脯氨酸内的羧基和氨基之间的离子键的断裂、L-羟脯氨酸分子间的氢键的断裂的吸热峰。L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物在 131.65°C 有一吸热峰, 同时有失重现象, 是配合物的失水过程, 失水量为 6.79%, 相当于 2 分子水失重, 与理论计算结果 6.14% 一致, 说明配合物中存在结晶水。在 255.13°C 有一强的吸热峰, 失重恒定, 残余量 59.19%, 理论值 59.35% 吻合, 得出最终分解产物为 ZnO 。同时

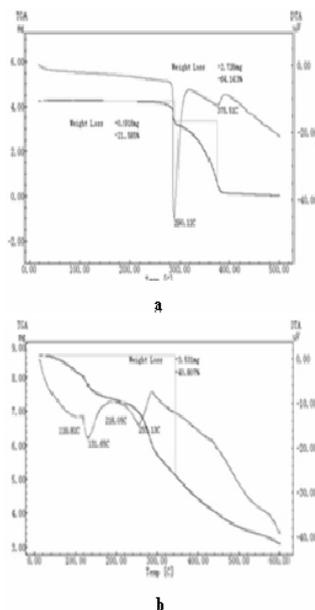


图4 L-羟脯氨酸(a)和配合物(b)的热重-差热图

Fig. 4 TG and DSC curves of Hyp (a) and Hyp-Zr(II) coordination compound (b)

配合物的差热图和 L-羟脯氨酸的差热图有很大的区别, L-羟脯氨酸在 290.1°C、375.5°C 处的吸热峰消失了, 是因为 L-羟脯氨酸和 Zr(II) 发生了稳定的配位作用, 导致 L-羟脯氨酸中羧基和氨基之间的离子键以及分子间的氢键消失, 所以在 290.1°C、375.5°C 处不再发生键的断裂, 所以没有出现吸热峰。这就证明了 Zr(II) 与 L-羟脯氨酸发生了配位作用, 生成了配位化合物。

2.3 ^1H -核磁共振分析

L-羟脯氨酸中各峰的归属如下: $\delta = 1.2 \sim 1.7\text{ppm}$ 的峰是 L-羟脯氨酸中 b, c, e, f 的混合信号峰, $\delta = 7.3 \sim 7.5\text{ppm}$ 的峰是 L-羟脯氨酸中 g 的信号峰。配合物的核磁图(图 5 中 b 所示)也存在这两个信号峰, $\delta = 3.5 \sim 3.9\text{ppm}$ 是 L-羟脯氨酸中 a, d 的混合峰, 配合物中没有这个信号峰。说明发生配位作用以后, L-羟脯氨酸上的 α 碳(a)和 δ 碳(d)上的 H 电子云发生了变化, 证明 Zr(II) 和 L-羟脯氨酸之间的配合作用可能发生在 α 碳(a)上的羧基或 δ 碳(d)的羟基上面, 也可能与两个都发生作用。

2.4 L-羟脯氨酸- Zn^{2+} 配合比的测定

Zr(II) 分子量为 65D, 可透过截留分子量为 100D 的透析膜, SO_4^{2-} 分子量为 98D, 体积也较大, 通过的速度慢; 而 L-羟脯氨酸-Zr(II) 的配合物、L-脯氨酸-Zr(II) 配合物分子量远大于 100D, 不能通过透析膜。从图 6 可以看出, ZnSO_4 溶液(a)透析 25h 达到平衡, L-脯氨酸-Zr(II) 混合物(b)透析 38h 达平

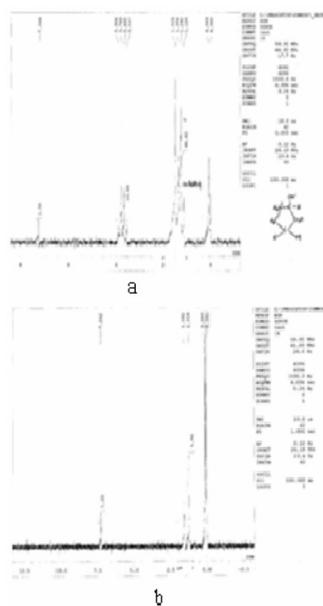


图5 L-羟脯氨酸(a)和配合物(b)的核磁共振图

Fig. 5 ^1H -NMR spectra of Hyp (a) and Hyp-Zr(II) coordination compound (b)

衡, 而 L-羟脯氨酸-Zr(II) 配合物(c) 则需 50h 达到平衡。说明 L-脯氨酸与 Zr(II) 之间也有一定的化学键的作用, 使 Zr(II) 透吸速度减小; L-羟脯氨酸与 Zr(II) 之间的配位键的作用, 增大了 Zr(II) 透过膜的阻力, 而 L-脯氨酸与 Zr(II) 之间的作用力比 L-羟脯氨酸较弱, 说明羟基在 L-羟脯氨酸与 Zr(II) 形成配位键时, 也起到一定的作用。

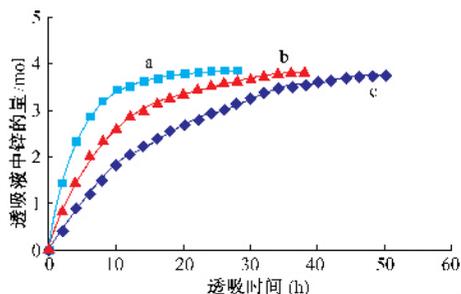


图6 Zr(II)(a)、L-脯氨酸-Zr(II)(b)、L-羟脯氨酸-Zr(II)(c)的透析图

Fig. 6 Dialysis diagram of zinc sulfate (a), L-proline-Zr(II) (b), Hyp-Zr(II) (c)

Zr(II) 的正电荷既可与羟脯氨酸的游离羧基形成可解离的离子键, 其外层的四个空轨道又可分别与 L-羟脯氨酸的羧基形成配位键。Zr(II) 受到成键羧基和羟基的双重限制, 前者增大 Zr(II) 透过膜的阻力, 延长达到平衡的时间; 后者掩盖 Zr(II) 稳定性强, Zr(II) 很难重新游离, 因而不能透析过膜。因此达到透析平衡时, 透析内液中残存的 L-羟脯氨酸和 Zr(II) 应为两者的配位化合物。计算结果得出, 透析平衡时内液中残存的量分别为 0.8mmol 和

0.2mmol,两者的比例为 4:1,所以得出 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物的配比为 4:1。

2.5 原子力显微扫描

对羟脯氨酸原溶液和 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物溶液进行了原子力显微镜扫描,得到了这两种样品的原子力相图(如图 7),从原子角度证明了 L-羟脯氨酸和 Zn(II)发生配位作用。

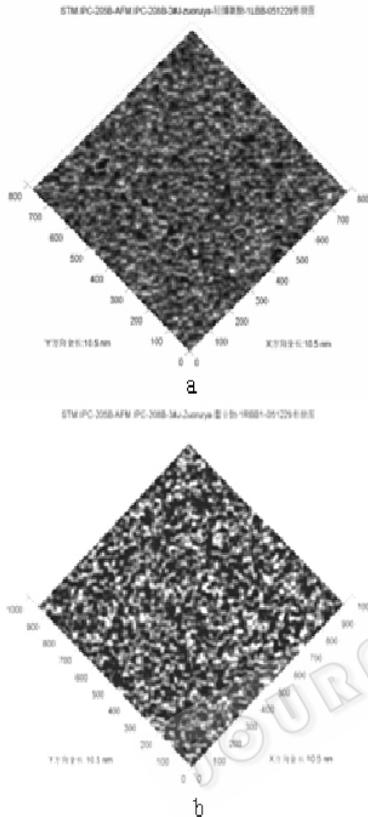


图 7 L-羟脯氨酸(a)和 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物(b)的 AFM 形貌图

Fig.7 AFM images of Hyp (a) and Hyp-Zn(II) coordination compound (b)

可以看出, L-羟脯氨酸的形貌图中,有大量的五元环。这是 L-羟脯氨酸自身的五元环结构,配合物中也有大量的五元环,但大部分的五元环围绕一个原子形成一个大的配位结构。这种中心原子半径约为 0.23 ~ 0.24nm,而 Zn(II)的半径大小为 0.267nm 左右,就说明这种配位结构是几个 L-羟脯氨酸和一个 Zn(II)形成的配合结构。这就从原子角度看到了 L-羟脯氨酸和 Zn(II)之间发生的配位作用^[12]。

通过对 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物各种表征,得出 L-羟脯氨酸和 Zn(II)之间有配位作用,且配位比是 4:1。其中羧基、羟基与 Zn(II)发生稳定的配位,同时未发生配合的羧基与羟基增大位阻,防止周围其他分子的进攻,增大这种配合结构的稳定性。因此,推测出配合物的结构图如图 8 所示。

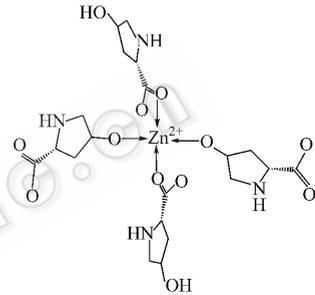


图 8 配合物的分子结构

Fig. 8 Molecular structure of Hyp-Zn(II) coordination compound

2.6 总抗氧化能力的测定

L-羟脯氨酸有一定的抗氧化功能,本实验分别对 ZnSO₄、L-羟脯氨酸、L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物进行总抗氧化能力的测定。经过对各样品测定管吸光度的测定,计算出各个样品的总抗氧化能力,如表 1 所示。

表 1 总抗氧化能力值

Table 1 Value of total antioxidant capacity

Sample	Whole blood	ZnSO ₄	Hyp	Hyp-Zn(II) compound
Capacity of antioxidant (u/mL whole blood)	61.667	27.133	101.133	80.167

可以看出,加入 ZnSO₄ 使全血的总抗氧化能力减小,说明 ZnSO₄ 没有抗氧化能力,而羟脯氨酸和 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物都有一定的总抗氧化能力,但配合物的总抗氧化能力小于 L-羟脯氨酸的,这是因为发生抗氧化作用的基团——羧基参与配位

键,使得 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物抗氧化能力比起 L-羟脯氨酸有所减弱。

2.7 抗超氧阴离子活力的测定

抗超氧阴离子测定结果如表 2 所示。

表 2 不同比例的 L-羟脯氨酸-Zn(II)样品的抗超氧阴离子 OD 值

Table 2 OD value of antisuperoxide anion with different sample proportion

Hyp/Zn(II) mol/mol	1:5	1:2	1:1	2:1	4:1	5:1	1:0
Capacity of antisuperoxide anion (u/mL whole blood)	11.06	25.69	35.25	45.72	53.19	58.27	59.16

超氧阴离子对身体损害的具体形式是其质子形式 $\text{HOO}\cdot$, L-羟脯氨酸上的羟基氧和羧基氧都有较强的吸引质子的能力,使 $\text{HOO}\cdot$ 失去质子,以不活泼的形式存在,从而达到抗超氧阴离子的效果。L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物的抗超氧阴离子活力比 L-羟脯氨酸的小,而且活力随着羟基脯氨酸的减少而减小,这是因为 L-羟脯氨酸的羧基氧和羟基氧参与配位和掩蔽作用,吸引质子的能力减小,使超氧阴离子能大量的以 $\text{HOO}\cdot$ 形式存在,但在同时减弱了 Zn(II) 的氧化作用。所以,对 L-羟脯氨酸-Zn(II) 配合物整体而言,还是具有一定的抗超氧化物阴离子的活力。

2.8 L-羟脯氨酸-Zn(II)配合物产生(抑制)羟基自由基的能力

测定不同比例 L-羟脯氨酸与 Zn(II)组成的样品溶液产生羟基自由基的能力,将测定结果绘制成图(图9)。

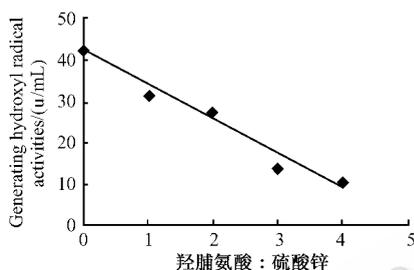


图9 不同比例 L-羟脯氨酸 Zn(II)产生羟基自由基的能力

Fig. 9 Generating hydroxyl radical activities of Hyp-Zn(II) coordination compound with different proportion

Zn(II)属于过渡金属元素,在体内能够使 H_2O_2 等通过 Fenton 反应在体内产生 $\text{OH}\cdot$,但随着 L-羟脯氨酸的增加,其产生羟基自由基的能力逐渐减弱(如图9)。与抗超氧阴离子的原理一样,是因为 L-羟脯氨酸与 Zn(II)的配合作用,使 Zn(II)不能发挥作用,从而减少 Zn(II)产生羟基自由基的能力。

通过对 L-羟脯氨酸和配合物的一系列的测定,可以得出,配合物有一定的抗氧化能力,相对单独的羟脯氨酸抗氧化能力有所减少,是因为与 Zn(II)发生配位作用,使 Zn(II)不能发挥氧化作用,从而起到抗衰老的作用。

3 结论

L-羟脯氨酸和 Zn(II)可以发生配合作用生成

更有利于生物体吸收的氨基酸金属配合物,配合比例为 4:1,且这种配合物有一定的抗氧化能力,能够起到抗衰老的作用,可以添加到食品和化妆品中,成为优良的补充氨基酸和微量元素的营养物质,有很好的市场前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhao HF(赵汉芳). Metabolism of zinc and tri-major material. *Studies of Trace Elements and Health(微量元素与健康研究)*, 1996, **13**(2): 63-64.
- [2] Zhong GQ(钟国清). Synthesis and characterization of the complex of bisglycinato zinc(II) monohydrate. *Fine Chemicals(精细化工)*, 2001, **18**(7): 391-393.
- [3] Jeremy M Berg, Yigong Shi. The galvsnizations of Biology A growing app reciation for the roles of zinc. *Science*, 1996, **271**: 1080-1085.
- [4] Yokoyama M, Koh J, Choi DW. Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. *Neuro Science Letters*, 1986, **71**: 351-355.
- [5] Ashmead HD, Jeppsen RB. Enhanced tissue metabolism of minerals chelated to amino acids. *Ber. Bundesforschungsanst. Emaehr*, 1993, BFE-R-93-0. Bioavailability '93. Pt. 2. 63-67.
- [6] Zhou Y(周燕), Ou AI(欧阳安力), Hua R(华平), et al. The effect of antioxidants on the *in vitro* life-span of keratinocyte. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2002, **18**(5): 630-633.
- [7] Gao F(高峰), Niu CL(牛春吉), Meng SL(孟淑兰), et al. Studys on the coodnation of rare earth(III) Ca(II) and Zn(II) with L-hydroxyproline under the physiological condition. *Chemical Research and Application(化学研究与应用)*, 1997, **9**(3): 298-301.
- [8] Xie JX(谢晶曦), Chang JB(常俊标), Wang XM(王绪明). *Application of Infrared Spectrum at Organic Chemistry and Medicinal Chemistry*, Revised Edition. Beijing: Science Press(科学出版社), 2001, pp. 175-182.
- [9] Zhu HW(朱淮武). *Spectra Analysis of Polar Molecule*. Beijing: Chemical Industry Press(化工出版社), 2005. 196-201.
- [10] Analytical Chemical Research Team of East China University of Science and Technology. *Analytical Chemistry*, Quartus Edition. Beijing: Higher Education Press(高等教育出版社), 1993, pp. 216-218.
- [11] Yang XH(杨学恒), Chen HB(陈红兵), Fei DG(费德国), et al. Design and application of a high-resolution AFM. *China Mechanical Engineering(中国机械工程)*, 2004, **15**(21): 1909-1911.
- [12] Chen HR(陈惠萍). Detecting method of active oxygen. *Journal of south China University of Tropical Agriculture(华南热带农业大学学报)*, 2000, **6**(2): 14-17.