

L-茶氨酸对 α -淀粉酶和胰蛋白酶的抑制作用

Inhibitory effects of L-theanine on α -amylase and trypsin

袁冬寅¹ 龙 军² 龚志华¹ 林 玲¹

YUAN Dong-yin¹ LONG Jun² GONG Zhi-hua¹ LIN Ling¹

周 阳¹ 彭影琦¹ 肖文军^{1,3}

ZHOU Yang¹ PENG Ying-qi¹ XIAO Wen-jun^{1,3}

(1. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 常德市柳叶湖旅游度假区七里桥街道办事处, 湖南 常德 415000; 3. 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410128)

(1. Key Laboratory of Tea Science of Educational Ministration, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Qili Bridge Subdistrict Office, Willow Lake Resort, Changde City, Changde, Hunan 415000, China; 3. Hunan Collaborative Innovation Center for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:以 L-茶氨酸为原料,通过建立最佳酶促反应体系,采用非连续测定和作图法研究了 L-茶氨酸对 α -淀粉酶、胰蛋白酶的抑制作用及其动力学特征,为 L-茶氨酸的深层开发利用提供参考。结果表明,L-茶氨酸对 α -淀粉酶和胰蛋白酶的抑制效果均与其质量浓度呈正比,在底物质量浓度1%、体系添加顺序为酶与抑制剂在37℃预热5 min后加入底物的条件下,L-茶氨酸抑制 α -淀粉酶的最优条件为 α -淀粉酶质量浓度0.018 mg/mL、反应时间3 min, IC_{50} 为26.078 mg/mL,当酶量为18 518.52 U时, α -淀粉酶的 K_m 为2.247 mg/mL;在底物质量浓度1%、体系添加顺序为胰蛋白酶与抑制剂在40℃预热5 min后加入底物的条件下,L-茶氨酸抑制胰蛋白酶的最优条件为胰蛋白酶质量浓度0.252 mg/mL、反应时间15 min, IC_{50} 为196.299 mg/mL,当酶量为1 055 931 U时,胰蛋白酶的 K_m 为5.189 mg/mL。说明 L-茶氨酸对 α -淀粉酶和胰蛋白酶均有一定的抑制作用,且抑制 α -淀粉酶的效果较好。

关键词:L-茶氨酸; α -淀粉酶;胰蛋白酶;抑制作用;糖脂代谢

Abstract: The inhibitory effects of L-theanine on the activities of α -amylase and trypsin were studied by establishing the best reaction system and adopting research method on graph in order to provide reference for the deep development of L-theanine. The results showed that the inhibitory

effects of L-theanine on both enzyme activities were positively associated with its concentration. IC_{50} (26.078 mg/mL) of L-theanine on the activities of α -amylase was achieved by prewarming enzyme at a concentration of 0.018 mg/mL in the presence of L-theanine at 37℃ for 5 min before addition of 1% starch and allowing reaction to proceed for 3 min. K_m of α -amylase was 2.247 mg/mL on the premise that the enzyme amount was 18 518.52 U. L-theanine exhibited the half inhibition on trypsin (196.299 mg/mL) by prewarming their mixture at 40℃ for 5 min followed by addition of 1% casein as the substrate and permitting the reaction for 15 min. When the amount of enzyme was 1 055 931 U, K_m of trypsin was 5.189 mg/mL. Statistics results showed that the inhibitory effect of L-theanine on the activity of α -amylase was superior than that of trypsin.

Keywords: L-theanine; α -amylase; trypsin; inhibitory effect; glucose and lipid metabolism

L-茶氨酸(N-乙基- γ -L-谷氨酰胺)是茶叶中特有的一种非蛋白质氨基酸,属酰胺类化合物^[1],具有降血压^[2]、提高记忆力^[3-4]、安神镇静^[5]、保护脑神经细胞^[6]、调节免疫^[7]、辅助抗肿瘤^[8]、减肥降脂^[9]等多种生物活性,广泛应用于医疗、保健、食品等领域^[10]。 α -淀粉酶、胰蛋白酶是与机体糖脂代谢密切相关的两种酶^[11-12],其中, α -淀粉酶是水解淀粉和糖原的酶类总称,是一种淀粉内切酶,其作用方式是在淀粉分子内部随机切开 α -1,4糖苷键,并生成糊精和还原糖^[13-14];胰蛋白酶是动物胰脏的主要蛋白质水解酶^[15],能将蛋白质分解成氨基酸,供人体吸收利用^[16]。然而,目前尚未见 L-茶氨酸抑制 α -淀粉酶、胰蛋白酶生物活性研究的相关报道。为

基金项目:湖南省科技厅重点研发计划(编号:2016NK2102)

作者简介:袁冬寅,女,湖南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:肖文军(1969—),男,湖南农业大学教授,博导。

E-mail: xiaowenjun88@sina.com

收稿日期:2017-05-04

探索 *L*-茶氨酸体外调节糖脂代谢的生物活性,本研究以 *L*-茶氨酸为原料,通过建立最佳酶促反应体系,采用非连续测定和作图法研究 *L*-茶氨酸对 α -淀粉酶、胰蛋白酶的抑制作用及其动力学特征,以期为 *L*-茶氨酸的深层开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

L-茶氨酸:纯度 $\geq 98\%$,德国 Sigma 试剂公司;
 α -淀粉酶(Lot.RM3018Y359):4 U/mg,上海瑞永生物科技有限公司;

胰蛋白酶(批号 20160216):50 U/mg,国药集团化学试剂有限公司;

可溶性淀粉、干酪素、碳酸钠、四水酒石酸钾钠、三氯乙酸、福林酚:国产分析纯。

1.2 仪器与设备

精密电子天平:Mettler AE240 型,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;

pH 计:PHS22C 型,上海雷磁仪器厂;
数显恒温水浴锅:HH 型,上海精宏实验设备有限公司;
紫外分光光度计:UV-2550 型,日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 葡萄糖标准曲线制作 配制 2 mg/mL 的葡萄糖标准液,分别吸取 0.00,0.05,0.10,0.15,0.20,0.25,0.30 mL 置于 10 mL 容量瓶中,在 37 ℃ 水浴锅中预热 5 min 后,各加入 0.5 mL DNS 溶液混合,沸水浴 5 min,冷却,加水定容至 10 mL,用分光光度计于 540 nm 测吸光值。以不加葡萄糖溶液为空白对照组。求得葡萄糖的标准曲线为 $y = 12.046x + 0.0227$ ($R^2 = 0.999$)。

1.3.2 α -淀粉酶最适酶促反应条件筛选

(1) 酶质量浓度确定:配制质量浓度分别为 0.006, 0.010,0.014,0.018,0.022,0.026,0.030 mg/mL 的 α -淀粉酶溶液,分别置于 7 支试管中,在 37 ℃ 条件下与底物溶液混匀进行反应,于 540 nm 处测吸光值,选择最佳酶质量浓度。

(2) 反应时间及酶量确定:采用最佳酶质量浓度,按表 1 顺序添加试剂,测定反应初始速率。由于建立动力学方程最重要的是确定酶量与反应时间,以确保酶初始速率达到最大,即当底物浓度足够大时,反应速率趋于极限值,几乎不再随底物浓度的增加而改变,符合零级反应特征;酶量过高或过低都不适宜建立酶反应动力学方程。因此,选择的酶量须

表 1 酶量确定

Table 1 Choosing the amount of enzyme

样品编号	1%底物/mL	酶量/U
1	0.2	17 869.00
2	0.2	18 518.52
3	0.2	18 842.60
4	0.2	18 274.39
5	0.2	18 895.93

保证每分钟反应体系在 540 nm 处的吸光值变化为 0.03~0.25^[17]。酶反应开始时,立即计时,每隔 1 min,加入 DNS 溶液终止反应,于 540 nm 处测吸光值,筛选最佳反应时间和最佳酶量。

(3) 酶促反应动力学方程的建立:采用最佳反应时间和最佳酶量,保持酶质量浓度不变,分别在 0.6%,0.8%,1.0%,1.2%,1.4%,1.6%的底物浓度下,于 540 nm 处测吸光值,并计算出酶促反应的初始速率,按双倒数法作图($V_{\max} = 1/\text{纵截距}$, $K_m = \text{斜率} \times V_{\max}$)与米氏方程($1/V = K_m/V_{\max} \times 1/[S] + 1/V_{\max}$),求出 K_m 和 $V_{\max}$ 。

(4) 底物、酶、抑制剂添加顺序确定:采用最佳反应时间,将可溶性淀粉、 α -淀粉酶、*L*-茶氨酸按如下 3 种顺序添加:① 3 种物质先各自在 37 ℃ 水浴锅中预热 5 min,再同时加入试管中反应;② 先将可溶性淀粉与 *L*-茶氨酸置于试管中,在 37 ℃ 水浴锅中预热 5 min,再加入 α -淀粉酶反应;③ 先将 α -淀粉酶与 *L*-茶氨酸置于试管中,在 37 ℃ 水浴锅中预热 5 min,再加入可溶性淀粉反应。比较 3 种方式的抑制率,选择最佳添加顺序。

1.3.3 最优酶促反应条件下 *L*-茶氨酸对 α -淀粉酶的抑制效果 采用最佳添加顺序,在 9 支试管中分别加入 α -淀粉酶与质量浓度为 2,10,15,20,25,30,35,40,45 mg/mL 的 *L*-氨基酸,摇匀,在 37 ℃ 水浴锅中预热 5 min,加底物反应 3 min 后,立即加入 DNS 溶液,沸水浴 5 min,冷却,稀释。背景对照为底物溶液与抑制剂,空白对照为煮沸的酶液,在 540 nm 处测吸光值。抑制活性按式(1)计算,其中 *A* 值均为 540 nm 处的吸光值。

1.3.4 酪氨酸标准曲线制作 配制质量浓度为 1 mg/mL 的酪氨酸,用时再稀释 10 倍得 0.1 mg/mL 的酪氨酸标准溶液。按表 2 顺序添加试剂,混合,放入 40 ℃ 水浴保温 20 min 后,冷却至室温,于 660 nm 比色。1 号试管为空白对照组。求得酪氨酸的标准曲线为 $y = 0.0638x + 0.0207$ ($R^2 = 0.9981$)。

表 2 酪氨酸标准曲线试剂加入顺序

Table 2 Sequence of reagents used for preparation of

tyrosine standard curve				mL
样品编号	标准酪氨酸	去离子水	Na ₂ CO ₃	福林酚试剂
1	0.0	1.0	5.0	1.0
2	0.2	0.8	5.0	1.0
3	0.4	0.6	5.0	1.0
4	0.6	0.4	5.0	1.0
5	0.8	0.2	5.0	1.0
6	1.0	0.0	5.0	1.0

1.3.5 胰蛋白酶最适酶促反应条件筛选

(1) 酶质量浓度确定:配制质量浓度分别为 0.042, 0.084,0.126,0.168,0.210,0.252,0.294 mg/mL 的胰蛋白酶溶液置于 7 支试管中,在 40 ℃ 条件下与底物混匀进行反应,于 660 nm 处测定吸光值,选择合适的酶质量浓度。

(2) 反应时间确定:在 40 ℃ 的水浴条件下,于 6 支试管

中分别加入最佳质量浓度的胰蛋白酶溶液与底物反应，于 660 nm 处测不同反应时间(5,10,15,20,25,30 min)下的吸光值，并计算出酪氨酸的生成量，选择最适酶促反应时间。

(3) 酶促反应动力学方程的建立：经预试验，确定进行酶促反应动力学常数测定的酶量为 1 055 931 U，反应时间为 3 min，保持酶质量浓度不变，在不同的底物浓度(0.4%，0.6%，0.8%，1%，1.2%，1.4%)下，于 660 nm 处测吸光值，并计算出酶促反应的初始速率，按双倒数法作图($V_{\max} = 1/\text{纵截距}$ ， $K_m = \text{斜率} \times V_{\max}$)与米氏方程($1/V = K_m/V_{\max} \times 1/[S] + 1/V_{\max}$)，求出 K_m 和 $V_{\max}$ 。

(4) 底物、酶、抑制剂添加顺序确定：采用最佳反应时间，将干酪素、胰蛋白酶、*L*-茶氨酸按如下 3 种顺序添加：① 3 种物质先各自在 40 ℃ 的水浴中预热 5 min，再同时加入试管中反应；② 先将干酪素与 *L*-茶氨酸置于试管中，在 40 ℃ 的水浴中预热 5 min，再加入胰蛋白酶反应；③ 先将胰蛋白酶与 *L*-茶氨酸置于试管中，在 40 ℃ 的水浴中预热 5 min，再加入干酪素反应。比较 3 种方式的抑制率，选择最佳添加顺序。

1.3.6 最优酶促反应条件下 *L*-茶氨酸对胰蛋白酶的抑制效果 采用最佳添加顺序，在 5 支试管中分别加入胰蛋白酶与质量浓度分别为 2,50,100,150,200 mg/mL 的 *L*-氨基酸，混匀，在 40 ℃ 水浴中预热 5 min，再加入底物反应 15 min 后，立即加入 TCA 溶液终止反应，3 500 r/min 离心 10 min，取上清液，加碳酸钠和福林酚，40 ℃ 水浴保温 20 min，冷却，于 660 nm 处测定吸光值。背景对照为底物溶液与抑制剂，空白组为失活的酶液。抑制率按式(1)计算，其中 A 值均为 660 nm 处的吸光值。

1.3.7 色度测定

(1) 不同浓度的葡萄糖色度：采用紫外分光光度计测定，用吸光值 A_{540} 来表示。

(2) 不同浓度的酪氨酸色度：采用紫外分光光度计测定，用吸光值 A_{660} 来表示。

1.3.8 检测及统计方法

(1) 抑制率：按式(1)计算抑制率。

$$I = \left(1 - \frac{A_3 - A_4}{A_1 - A_2}\right) \times 100\% , \tag{1}$$

式中：

I ——抑制率，%；

A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 ——分别为无抑制组、空白组、加抑制组和背景对照组的吸光值。

(2) α -淀粉酶活力测定：采用 Berndeld 法^[18]。

(3) 胰蛋白酶活力测定：采用 Lowry 蛋白质测定法^[19]。

(4) 统计方法：数据利用 Excel 2013 处理， IC_{50} 利用 SPSS 软件中的 Profit 分析方法计算得出。

2 结果与分析

2.1 α -淀粉酶最适酶促反应条件筛选

2.1.1 酶质量浓度确定 由图 1 可知，在一定范围内，随着酶质量浓度的增加，吸光值增大。 α -淀粉酶质量浓度在 0.01~0.018 mg/mL 时，有较好的线性关系，吸光值与酶质

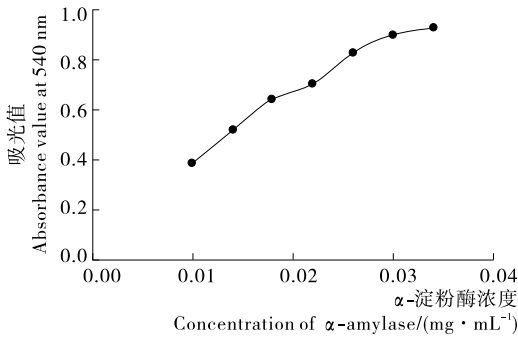


图 1 α -淀粉酶质量浓度对酶活性的影响
Figure 1 Effect of α -amylase concentration on the enzymatic activity

量浓度呈正比。 α -淀粉酶质量浓度在 0.01~0.022 mg/mL 时，反应速率随酶质量浓度的增加而逐渐减慢，最终将达到平衡。为使酶促反应速率保持最大， α -淀粉酶质量浓度宜选择 0.018 mg/mL。

2.1.2 反应时间与酶量确定 由图 2 可知，反应时间在 3 min 内，线性反应速度随着酶量的增加而增大。比较不同酶量的反应时间，发现所有的酶反应进程曲线在 3 min 内，均有较好的线性关系，因此选择 3 min 内测得的速度为反应初始速率。参照刘睿等^[17]的研究方法，比较反应初速率，确定以酶量 18 518.52 U、反应时间 3 min 进行酶反应动力学研究。

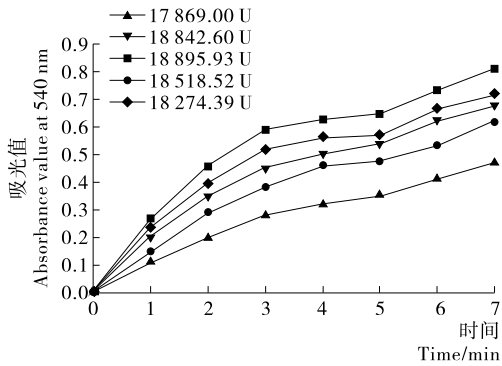


图 2 α -淀粉酶不同酶量的反应进程曲线
Figure 2 Curves of reaction process of α -amylase

2.1.3 酶促反应动力学方程的建立 由图 3 可知，拟合曲线方程为 $y = 12.304x + 5.4748$ ， $R^2 = 0.9934$ ，求得 $V_{\max} = 0.183 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ ， $K_m = 2.247 \text{ mg/mL}$ 。

2.1.4 底物、酶、*L*-茶氨酸添加顺序确定 由图 4 可知，添加顺序为①、②、③的抑制率分别为 18.6%，16.8%，20.6%，但 3 种添加顺序的差异不显著($P > 0.05$)，其中顺序③的抑制率相对最高，比顺序②的抑制率高出 3.8%，因此选顺序③作为酶促反应体系的添加顺序，与刘雯等^[20]建立的抑制剂添加顺序一致。

2.2 最优酶促反应条件下 *L*-茶氨酸对 α -淀粉酶的抑制效果

由图 5 可知，*L*-茶氨酸对 α -淀粉酶的抑制效果随 *L*-茶氨酸质量浓度的增大而增加；当 *L*-茶氨酸质量浓度高于 25 mg/mL 时，抑制率的增长速度加快。当 *L*-茶氨酸质量浓

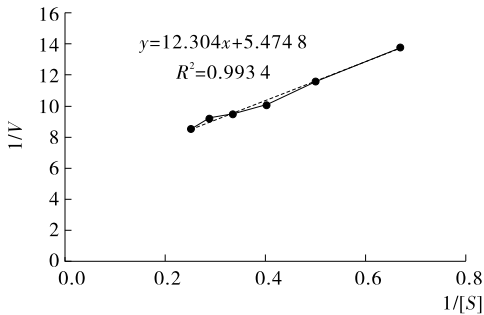


图3 α-淀粉酶的米氏方程曲线

Figure 3 Michaelis-Menten equation of α-amylase

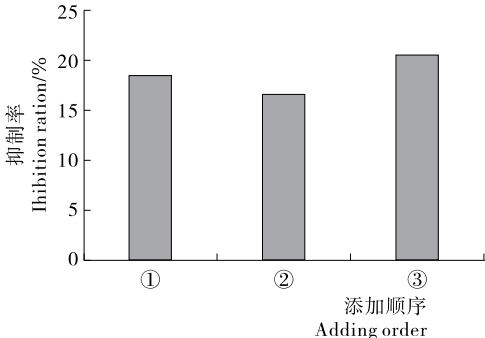


图4 不同添加顺序对α-淀粉酶抑制作用的影响

Figure 4 Effect of addition sequence of reactants on α-amylase inhibition

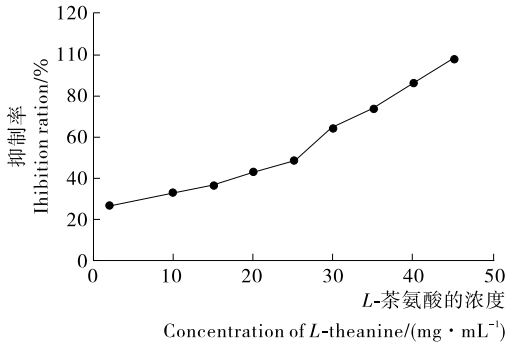


图5 不同质量浓度L-茶氨酸对α-淀粉酶的抑制效果

Figure 5 Inhibitory effect of L-theanine on the activity of α-amylase

度到达 45 mg/mL 时,抑制率为 97.9%。经计算,L-茶氨酸对 α-淀粉酶的 IC_{50} 为 26.078 mg/mL。

2.3 胰蛋白酶最适酶促反应条件筛选

2.3.1 酶质量浓度确定 由图 6 可知,吸光值随胰蛋白酶质量浓度的增加而增大且最终趋于平稳,当酶质量浓度达到 0.252 mg/mL 时,吸光值已达最大值,说明胰蛋白酶与底物基本反应完全。因此选择酶质量浓度 0.252 mg/mL 较为合适。

2.3.2 酶促反应时间确定 由图 7 可知,酶促反应时间在 0~15 min 时,产物的含量随时间的延长而增多。在反应 15 min 后,吸光值趋于稳定,产物含量的增长速率变慢,说明胰蛋白酶与底物基本完全反应。因此,反应时间选择 15 min

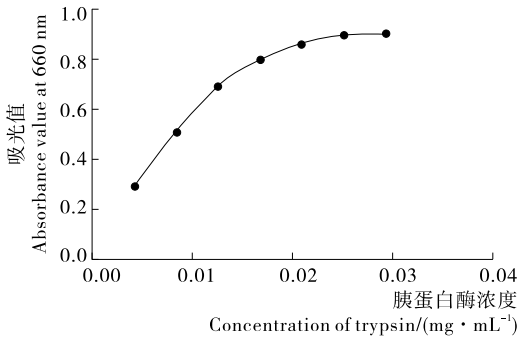


图6 胰蛋白酶质量浓度对酶活性的影响

Figure 6 Effect on trypsin concentration on its activity

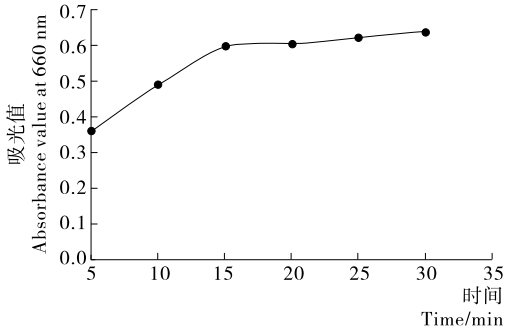


图7 最佳反应时间的筛选

Figure 7 Selection of optimal reaction time

较为合适。
2.3.3 酶反应动力学方程的建立 由图 8 可知,拟合曲线方程为 $y = 49.783x + 9.5931$, $R^2 = 0.9940$,求得 $V_{max} = 0.104$ mg/(mL · min), $K_m = 5.189$ mg/mL。

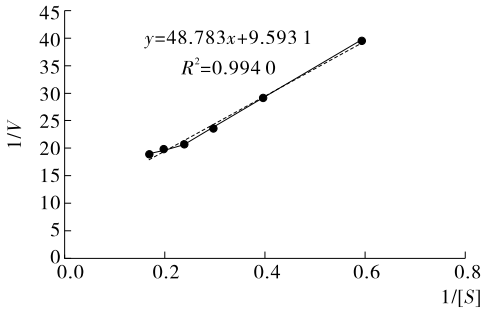


图8 胰蛋白酶的米氏方程曲线

Figure 8 Michaelis-Menten equation of trypsin

2.3.4 底物、酶、L-茶氨酸添加顺序确定 由图 9 可知,添加顺序为①、②、③的抑制率分别为 14.24%,13.57%,13.90%,抑制率结果与秦昱等^[12]抑制剂添加顺序结果一致,且 3 种添加顺序的差异不显著($P>0.05$),为了避免底物的干扰并降低试验操作的难度,故选择顺序③作为酶促反应体系的添加顺序。

2.4 最优酶促反应条件下 L-茶氨酸对胰蛋白酶的抑制效果

由图 10 可知,在试验设定的质量浓度范围内,L-茶氨酸对胰蛋白酶活性的抑制呈量效关系,抑制效果随质量浓度的增大而增加。经计算,L-茶氨酸对胰蛋白酶的 IC_{50} 为 196.299 mg/mL。

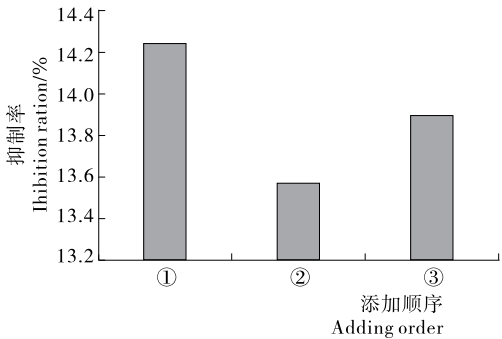


图 9 反应体系添加顺序对胰蛋白酶抑制效果的影响
Figure 9 Effect of addition sequence of reactants on trypsin inhibition

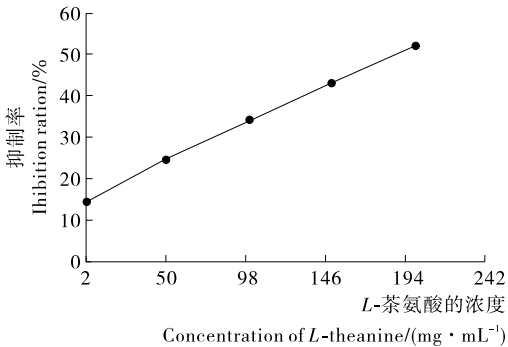


图 10 不同质量浓度 *L*-茶氨酸对胰蛋白酶抑制作用
Figure 10 Inhibitory effect of *L*-theanine at various concentrations on the activity of trypsin

3 结论

研究表明,*L*-茶氨酸对 α -淀粉酶、胰蛋白酶均有一定的抑制作用,其半抑制浓度分别为 26.078,196.299 mg/mL。 α -淀粉酶在酶量为 18 518.52 U、反应时间为 3 min 时得 K_m 为 2.247 mg/mL。胰蛋白酶在酶量为 1 055 931 U,反应时间为 3 min 时得 K_m 为 5.189 mg/mL。本试验对 *L*-茶氨酸体外抑制这两种酶的作用进行了初步研究,为进一步探讨 *L*-茶氨酸对 α -淀粉酶、胰蛋白酶的抑制类型及其调节糖脂代谢的作用机制提供依据,为其功能产品的开发利用提供了参考。

参考文献

[1] 火东晓,陈继华,张石蕊,等. *L*-茶氨酸对脂多糖诱导的巨噬细胞炎症细胞因子分泌的影响[J]. 营养学报, 2014, 36(5): 499-501.

[2] 刘洋,李颂,王春玲. 茶氨酸健康功效研究进展[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(17): 211-213.

[3] GASHIRA N, ISHIGAMI N, PU Feng-ling, et al. Theanine prevents memory impairment induced by repeated cerebral ischemia in rats[J]. Phytotherapy Research, 2007, 22(1): 65-68.

[4] YAMADA T, TERASHIMA T, HONMA H, et al. Effects of theanine, a unique amino acid in tea leaves, on memory in a rat behavioral test[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,

2008, 72(5): 1 356-1 359.

[5] 吕毅,郭雪飞,倪捷儿,等. 茶氨酸的生理作用及合成[J]. 茶叶科学, 2003, 23(1): 1-5.

[6] 王庆利,张力军,吴明春,等. 茶氨酸对脑缺血损伤大鼠自由基代谢的影响[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(11): 1 898-1 900.

[7] BUKOWSKI J F, PERCIVAL S S. *L*-Theanine intervention enhances human gamma delta T lymphocyte function[J]. Nutrition Reviews, 2008, 66(2): 96-102.

[8] 莫贵艳,李敏,胡成平,等. 茶氨酸对内皮细胞生长及肺癌血管生成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(20): 2 043-2 046.

[9] 茶山和敏,村松敬一郎. 茶の機能[M]. 东京: 学会出版センター, 2002: 205-209.

[10] 童海鸥,李成舰,颜琼炯,等. *L*-茶氨酸对断乳大鼠血清及肝脏氨基酸谱的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 247-251.

[11] 张冬英,邵宛芳,刘仲华,等. 普洱茶功能成分单体降糖降脂作用研究[J]. 茶叶科学, 2009, 29(1): 41-46.

[12] 秦昱,邵元元,熊硕,等. 没食子酸对猪胰 α -淀粉酶、胰蛋白酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 41-45.

[13] 丁阳平,张曦,周洁,等. 没食子酸及其衍生物对作用机制研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 167-169.

[14] 张丽娜. 水蓊花对胰脂肪酶和 α -淀粉酶抑制活性及作用机制初步探讨[D]. 上海: 华东理工大学, 2012: 7-8.

[15] 黄卓烈,陈小丽,巫光宏,等. 超声波对胰蛋白酶活力影响的机理研究[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): 230-234.

[16] 王荣春,孙建华,何述东,等. 胰蛋白酶抑制剂的结构与功能研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 364-366.

[17] 刘睿,潘思铁,刘亮,等. 高粱原花青素对 α -淀粉酶活力抑制动力学的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 189-192.

[18] 施特阿尔巴赫 B. 酶的测定方法[M]. 钱喜渊,译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 37-41.

[19] 杨同成. 柴胡皂甙提取物对胰蛋白酶抑制作用[J]. 福建中医药, 1990, 20(6): 44-45.

[20] 刘雯,裴晓丹,雷芳,等. 茶碱对胰 α -淀粉酶的抑制类型及光谱性质[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2): 298-301.