

• 研究论文 •

均苯三酰胺桥联三环糊精/ Zn^{2+} /金刚烷衍生物三元超分子体系的合成 及其羧肽酶 A 模拟研究

陈 湧 迟 恒 刘 育*

(南开大学化学系 元素有机化学国家重点实验室 天津 300071)

摘要 合成了一种均苯三酰胺基桥联三(β -环糊精) **1** 及其锌(II)配合物 **2**, 进而通过与金刚烷衍生物的包结配位作用制备了三种均苯三酰胺桥联三环糊精/ Zn^{2+} /金刚烷衍生物 **4~6**. 利用茚三酮显色实验和圆二色谱研究了其作为羧肽酶 A 模拟物对牛血清白蛋白水解反应的酶促性能和不同 pH 下的变构能力, 推测了可能的酶促反应机理. 结果表明 **1**/ Zn^{2+} /金刚烷-1-乙酸三元超分子体系在中性条件显示出高达 $10.43 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 的酶活力.

关键词 桥联三环糊精; 金刚烷衍生物; 三元超分子体系; 羧肽酶 A; 模拟酶

Synthesis and Carboxypeptidase A Mimic of Supramolecular Triads Formed by Benzene-1,3,5-tricarboxylamido-bridged Tri(β -cyclodextrin), Zn^{2+} and Admantane Derivatives

CHEN, Yong CHI, Heng LIU, Yu*

(Department of Chemistry, State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract A benzene-1,3,5-tricarboxylamido-bridged tri(β -cyclodextrin) and its Zn^{2+} complex **2** are synthesized. Inclusion complexations of **2** with adamantane derivatives give three supramolecular triads formed by tri(β -cyclodextrin), Zn^{2+} and adamantane derivatives. Their carboxypeptidase activities and conformational mutating abilities under different pH were explored by ninhydrin colorimetric and circular dichroism spectrometric studies, and the possible mechanism was discussed. The results show that the **1**/ Zn^{2+} /1-adamantane-acetic acid system gave the highest enzymatic activity up to $10.43 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ at a neutral condition.

Keywords bridged tri(β -cyclodextrin); adamantane derivative; supramolecular triad; carboxypeptidase A; enzyme mimic

环糊精是由 6~8 个 D-吡喃葡萄糖单元以 α -1,4 糖苷键首尾相连而成的环状低聚糖, 其独特的“外亲水、内疏水”的空腔结构能够选择性地结合客体分子形成主客体或超分子配合物, 因而作为分子识别的受体和人工酶模型被广泛应用于科学技术的许多领域^[1-2]. 近年来, 环糊精超分子体系的模拟酶研究日益受到人们的关注^[3-7]. Breslow 等^[8]用环糊精-卟啉共轭体的锰配合物模拟了氧化还原酶体系, 对尺寸适合于桥联环糊精空腔

的底物分子显示了高选择性. 计亮年等^[9]将胍基修饰环糊精作为 CuZnSOD 酶的模拟物, 其 SOD 酶活性达到了天然酶的 40%. 刘俊秋、沈家骢等^[10,11]研究了硒杂和碲杂环糊精对谷胱甘肽过氧化物酶体系的模拟作用. 我们^[12]曾合成了一系列水溶性有机硒修饰环糊精作为超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的模拟物, 其 SOD 和 GPX 酶活性分别达到 $121\sim 330 \text{ U/mg}$ 和 $0.34\sim 0.86 \text{ U}/\mu\text{mol}$. 本文合成了一种均苯三酰胺基桥联

* E-mail: yuliu@nankai.edu.cn; Tel.: 022-23503625; Fax: 022-23503625.

Received June 14, 2007; revised July 31, 2007; accepted September 6, 2007.

国家自然科学基金(Nos. 20421202, 20572052)及天津市科技计划(No. 06YFJMJC04400)资助项目.

三(β -环糊精)及其锌(II)配合物, 进而通过其与金刚烷衍生物的包结配位作用制备了三种均苯三酰胺桥联三环糊精/ Zn^{2+} /金刚烷衍生物超分子体系(图 1). 利用茚三酮显色实验和圆二色谱研究了其作为羧肽酶 A 模拟物对牛血清白蛋白水解反应的酶促性能和最佳 pH 值, 并推测了可能的酶促反应机理. 这一研究将有助于我们深入了解主-客体间的协同结合和多重识别等作用对超分子体系, 尤其是基于环糊精的超分子体系, 模拟水解酶^[13]的贡献.

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

甲氧基保护 *L*(+)-组氨酸、均苯三酰氯、金刚烷-1-乙酸、牛血清白蛋白(BSA)、二环己基碳二亚胺(DCC)为 Acros 产品, 未经纯化直接使用. 单-[6-(乙二胺基)-6-脱氧]- β -环糊精根据文献^[14]合成. *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)用氢化钙干燥 2 d 后减压蒸出备用. 高氯酸锌、10 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)、水合茚三酮试剂按文献方法制备^[5].

电导率在 DDS-307 电导率仪上测定. 紫外光谱和圆二色光谱分别在 Shimadzu UV-2401PC 紫外-可见光谱仪和 JASCO J-720S 圆二色谱仪上测定, 所使用样品池为常规 10 mm×10 mm×40 mm 矩形石英池, 测定温度由循环冷凝水控制在(25.0±0.1) °C.

1.2 均苯三酰胺基桥联三(β -环糊精) (1)的合成

在 100 mL 圆底瓶中加入干燥的 30 mL DMF 和 1.2 g 单-[6-(乙二胺基)-6-脱氧]- β -环糊精, 氮气保护下在冰浴中滴入溶有 0.08 g 均苯三酰氯的 5 mL DMF 溶液和 5 mL 三乙胺. 反应混合物在冰浴中搅拌 2 d, 然后在室温下反应 2 d. 减压蒸除溶剂, 残留物用少量水溶解后滴入 150 mL 丙酮中析出沉淀. 重复此操作二次. 所得沉淀用 Sephadex G-25 凝胶色谱柱分离(蒸馏水作为洗脱剂)得到 0.15 g 产品, 产率 12%. UV-Vis λ_{max} (H_2O) (log ϵ): 273 (2.82) nm; ¹H NMR (D_2O , TMS, 300 MHz) δ : 2.54~2.95 (m, 12H, NHCH_2), 3.34~3.79 (m, 126H, β -CD's C-2H, C-3H, C-4H, C-5H, C-6H), 4.85~4.87 (m, 21H, β -CD's C-1H), 7.15~7.20 (m, 3H, aromatic H); ESI-MS m/z (%): 3689 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100). Anal. calcd for $\text{C}_{141}\text{H}_{228}\text{O}_{105}\text{N}_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$: C 41.10, H 6.75, N 2.04; found C 40.71, H 6.74, N 2.26.

1.3 均苯三酰胺基桥联三(β -环糊精)锌(II)配合物(2)的合成

将 **1** 的水溶液滴入到稍过量的高氯酸锌水溶液中, 再加入几滴氯仿. 该体系在 5 °C 下反应 2 d 后, 减压浓

缩溶液, 所得沉淀用少量的乙醇和乙醚洗涤, 真空干燥后得到淡黄色的固体 **2**, 产率 47%. ¹H NMR (D_2O , TMS, 300 MHz) δ : 2.74~3.25 (m, 12H, NHCH_2), 3.34~3.79 (m, 126H, β -CD's C-2H, C-3H, C-4H, C-5H, C-6H), 4.85~4.87 (m, 21H, β -CD's C-1H), 7.15~7.20 (m, 3H, aromatic H); UV/Vis λ_{max} (H_2O) (log ϵ): 273 (2.34) nm. Anal. calcd for $\text{C}_{141}\text{H}_{228}\text{O}_{105}\text{N}_6 \cdot \text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$: C 41.30, H 6.00, N 2.04; found C 40.95, H 6.32, N 2.06.

1.4 金刚烷乙酰基组氨酸甲酯(3)的合成

金刚烷-1-乙酸(0.3 g, 1 mmol)和 HOBt (0.3 g, 2 mmol)溶于最少量的 CH_2Cl_2 , 冰浴搅拌 20 min 后加入甲氧基保护组氨酸的 CH_2Cl_2 溶液 30 mL (0.4 g, 2 mmol), 氮气保护下于 30 min 内滴加冷的 DCC CH_2Cl_2 溶液 5 mL (0.6 g, 3 mmol), 维持冰浴 2 h 至沉淀不再增加. 室温搅拌 24 h 后过滤, 然后以 1 mol/L 碳酸氢钠水溶液(约 10 mL)洗去 HOBt, 重复上述操作两次, 有机相旋干后以 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=9:1$ 溶液重结晶, 得黄色片状晶体, 真空干燥得产品 0.3 g, 产率 85%. ¹H NMR (CDCl_3 , TMS, 300 MHz) δ : 1.5~2.0 (m, 15H, CH_2 and CH of adamantane skeleton), 2.3~2.4 (m, 2H, CH_2COO), 3.0~3.4 (m, 2H, CH_2 of His residue), 3.5~3.8 (m, 3H, COOCH_3), 3.9~4.1 (m, 1H, CH of His residue), 6.5~6.9 (m, 1H, aromatic H of His residue), 7.2~7.4 (m, 1H, aromatic H of His residue); ESI-MS m/z (%): 346 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100). Anal. calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_3$: C 66.06, H 7.88, N 12.16; found C 66.04, H 7.69, N 12.64.

1.5 三元超分子体系(4)的合成

将金刚烷-1-乙酸(1.1 mmol, 27 mL)的甲醇溶液逐渐滴入到配合物 **2** (1 mmol, 3 mL)的水溶液中, 40 °C 下搅拌反应 5 h. 减压浓缩后过滤收集沉淀, 水重结晶后真空干燥得白色粉末, 产率 25%. ¹H NMR (D_2O , TMS, 300 MHz) δ : 1.53~2.11 (m, 15H, CH_2 and CH of adamantane skeleton), 2.44~2.51 (m, 2H, CH_2COO), 2.74~3.25 (m, 12H, NHCH_2), 3.49~3.90 (m, 126H, β -CD's C-2H, C-3H, C-4H, C-5H, C-6H), 4.99~5.00 (m, 21H, β -CD's C-1H), 7.15~8.20 (m, 3H, aromatic H). Anal. calcd for $\text{C}_{153}\text{H}_{246}\text{O}_{107}\text{N}_6 \cdot \text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$: C 45.61, H 6.56, N 2.09; found C 46.10, H 6.62, N 2.33.

1.6 三元超分子体系(5)的合成

三元超分子体系 **5** 按照上述方法使用配合物 **2** (1 mmol, 3 mL)的水溶液和甲氧基保护组氨酸金刚烷-1-乙酸 **3** (1.1 mmol, 27 mL)的甲醇溶液反应制备, 产率 22%. ¹H NMR (D_2O , TMS, 300 MHz) δ : 1.53~2.11 (m, 15H, CH_2 and CH of adamantane skeleton), 2.44~2.51 (m, 2H,

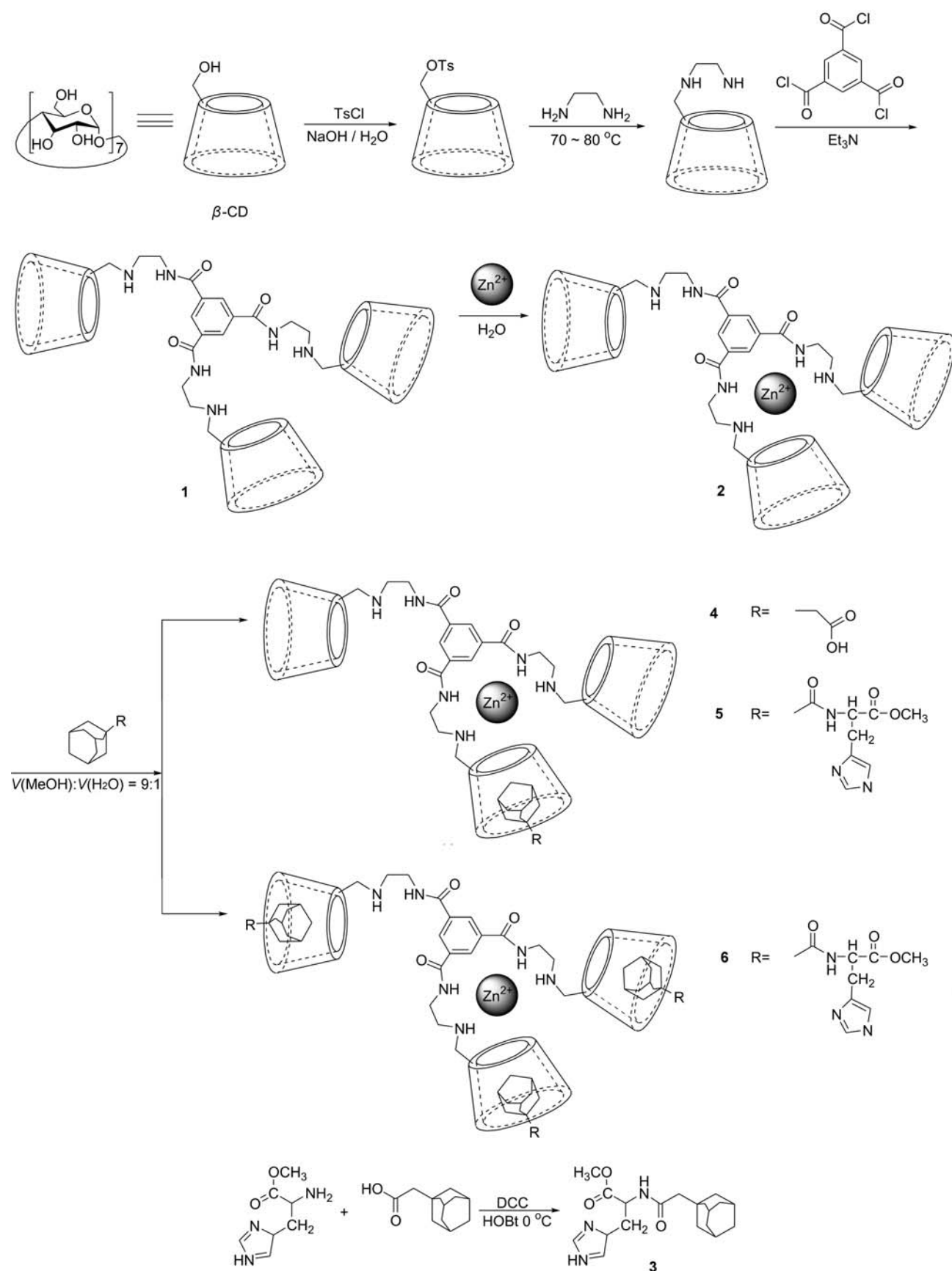


图 1 化合物 1~6 的合成路线

Figure 1 Synthetic routes of 1~6

CH₂COO), 2.74~3.25 (m, 12H, NHCH₂), 3.49~3.90 (m, 126H, β -CD's C-2H, C-3H, C-4H, C-5H, C-6H), 4.99~5.00 (m, 21H, β -CD's C-1H), 7.15~8.20 (m, 5H, aromatic H of phenyl linker and His residue). Anal. calcd for C₁₆₀H₂₅₅O₁₀₈N₉•Zn(ClO₄)₂•6H₂O: C 43.61, H 6.11, N 2.86; found C 43.60, H 6.52, N 3.03.

1.7 三元超分子体系(6)的合成

三元超分子体系 **6** 按照上述方法用配合物 **2** (1 mmol, 3 mL)的水溶液和过量甲氧基保护组氨酰金刚烷-1-乙酸 **3** (10 mmol, 27 mL)的甲醇溶液反应制备, 产率 32%. ¹H NMR (D₂O, TMS, 300 MHz) δ : 1.53~2.11 (m, 45H, CH₂ and CH of admantane skeleton), 2.44~2.51 (m, 6H, CH₂COO), 2.74~3.25 (m, 12H, NHCH₂), 3.49~3.90 (m, 126H, β -CD's C-2H, C-3H, C-4H, C-5H, C-6H), 4.99~5.00 (m, 21H, β -CD's C-1H), 7.15~8.20 (m, 9H, aromatic H of phenyl linker and His residue). Anal. calcd for C₁₉₈H₃₀₉O₁₂₂N₁₅•Zn(ClO₄)₂•6H₂O: C 46.63, H 6.35, N 4.12; found C 45.60, H 6.72, N 3.85.

1.8 圆二色谱

分别在 pH=6.2, 7.1, 8.9 时进行酶促水解反应, 在 10 mg/mL BSA Tris-HCl 缓冲溶液中加入三元超分子体系 **3** (终浓度为 5 mg/mL), 以 10 mg/mL BSA 溶液作为空白. 样品溶液在 37 °C 保温 16 h, 用 1 mmol/L EDTA 掩蔽活性中心后加热至 90 °C 终止反应. 降温至 25 °C 静置 30 min, 离心后取上层清液用于圆二色谱测量.

2 结果与讨论

2.1 均苯三酰胺桥联三环糊精(II)配合物及三元超分子体系的合成与表征

采用核磁共振和电导滴定的方法研究了均苯三酰胺桥联三环糊精 **1** 与 Zn²⁺ 离子的配位行为. 在向加入 **1** 的 D₂O 溶液中加入 Zn(ClO₄)₂ 后, 其 ¹H NMR 光谱中化学位移 δ 2~3 之间的乙二胺亚甲基信号向低场方向移动, 表明乙二胺链上的氮原子与离子 Zn²⁺ 发生了配位作用. 此外, 在金属离子与环糊精主体配位后, 其运动受到束缚, 从而导致电导率的下降. 因此, 我们通过检测 **1**/Zn²⁺ 体系的电导率变化测定了 **1** 与 Zn²⁺ 离子在水溶液中的配位化学计量比. 如图 2 所示, 随不同浓度的均苯三酰胺桥联三环糊精 **1** 的加入, Zn(ClO₄)₂ 的电导率呈先下降后上升的变化趋势, 并在 [1]/[Zn(ClO₄)₂]=1 处给出最低点, 表明 **1** 与 Zn²⁺ 在水溶液中形成化学计量为 1:1 的配合物.

许多研究表明, β -环糊精的空腔可以与金刚烷基团形成稳定的包结配合物^[16-19]. 本文中, 我们采用了核磁

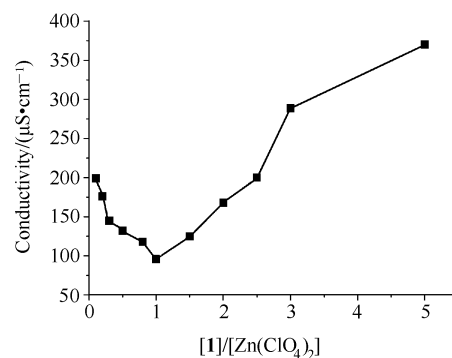


图 2 25 °C 时桥联三环糊精 **1** 存在下 Zn(ClO₄)₂ (0.4 mmol/L) 的电导率变化

Figure 2 Conductivity of Zn(ClO₄)₂ (0.4 mmol/L) in the presence of **1** solution at 25 °C

光谱研究了 **1**/Zn²⁺ 配合物与金刚烷衍生物的包结配位作用. 由于其较低的水溶性, 使用的金刚烷衍生物在 D₂O 中不能显示核磁信号. 然而, **4**~**6** 的 ¹H NMR 光谱 (D₂O 为溶剂) 在化学位移 δ 1~2 之间显示出明显的金刚烷亚甲基和次甲基的信号, 证明了 **1**/Zn²⁺ 配合物中的一个或几个环糊精空腔与金刚烷衍生物包结配位形成了三元超分子体系. 通过比较环糊精 C-1 质子与金刚烷基团质子的积分面积可以确定三元超分子体系 **4**~**6** 中 **1**/Zn²⁺ 配合物与金刚烷衍生物的包结配位比分别为 1:1, 1:1 和 1:3. 由此我们可以推断, 对于三元超分子体系 **4** 和 **5**, **1**/Zn²⁺ 配合物中只有一个环糊精空腔被金刚烷基团所占据, 而对于三元超分子体系 **6**, **1**/Zn²⁺ 配合物中三个环糊精空腔都被金刚烷基团占据.

2.2 酶活力测定及机理分析

采用茚三酮显色法测定羧肽酶 A 活力^[20]. 在 10 mg/mL BSA (Tris-HCl 缓冲, pH=7.1) 溶液中分别加入三元超分子体系 **4**~**6** (终浓度为 5 mg/mL), 以 10 mg/mL BSA 溶液作为空白. 样品溶液在 37 °C 保温 1 h, 用 1 mmol/L EDTA 掩蔽活性中心后加热至 90 °C 终止反应. 降温至 25 °C 静置 30 min, 离心后取上层清液用于茚三酮反应. UV-vis 测定 570 nm 处吸光度值, 羧肽酶 A 酶活力以 $\Delta A_{570} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ 表示, 定义在 37 °C 下 1 h 后吸光度 A_{570} 变化 0.1 为一个酶活力单位 U^[21]. 从表 1 可以看出, 三元超分子体系 **4** 显示出高达 10.43 U·mg⁻¹ 的酶活力, 分别为 **5** 和 **6** 的 3.6 倍和 15 倍, 而三元超分子体系 **6** 几乎不表现酶促性质. 根据羧肽酶 A 催化水解的锌-羰基机理^[22], 我们推测三元超分子体系 **4** 催化 BSA 水解的机理如下: 首先, 蛋白质的芳基侧基进入三元超分子体系的一个未占据环糊精空腔中, 从而使三元超分子体系定位在蛋白质分子附近. 然后, 蛋白质分子中的肽键羰基碳原子通过 1 个插入的水分子与金刚烷乙酸的羧基

以氢键连结, 从而活化了羰基. 最后, 活化的羰基代替水分子与 Zn^{2+} 配位. 这一配位过程使羰基极化, 使得羰基碳原子容易接受亲核进攻发生水解. 通过比较三元超分子体系 4~6 的结构特征我们发现, 三元超分子体系 6 中的环糊精空腔全部被金刚烷占据, 不能结合蛋白质的芳基侧基来固定活性中心, 因此显示出很低的酶活性. 而对于三元超分子体系 5 而言, 虽然环糊精空腔与蛋白质芳基侧基的结合使 Zn^{2+} 中心靠近蛋白质分子从而有利于 Zn^{2+} 与肽键的作用. 但 5 的金刚烷衍生物部分没有自由的羧基, 无法进一步对肽键羰基进行活化, 因此给出了明显低于三元超分子体系 4 的酶活性.

表 1 三元超分子体系 4~6 对 BSA 的水解酶活力(pH 7.1)

Table 1 Carboxypeptidase activities of 4~6 at pH 7.1

	酶活力/(U·mg ⁻¹)
4	10.43
5	2.89
6	0.70

2.3 圆二色谱实验

圆二色谱是检测生物大分子二级结构的有效工具, 在生物化学上有许多重要应用, 例如可以通过圆二色谱估算蛋白质二级结构中 α -螺旋、 β -折叠及其他结构形式的含量. 本文用圆二色谱法测定了不同 pH 下三元超分子体系 4~6 催化 BSA 水解产物中 α -螺旋的含量.

从图 3 可以看出, BSA 的圆二色谱在 210 和 225 nm 处有特征吸收. 根据公式 $f_{\alpha} = -([\theta]_{210} + 4000)/29000$ 可以计算 α -螺旋的含量^[23]. 计算结果如表 2 所示.

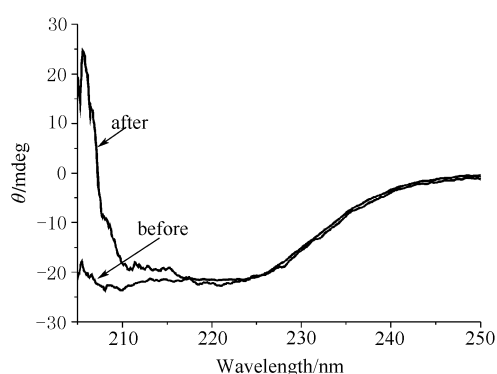


图 3 pH=7.1 时三元超分子体系 4 催化 BSA 水解反应前后的圆二色谱([BSA]=10 mg/mL, [4]= 2×10^{-4} mol/L, 反应时间 16 h)

Figure 3 Circular dichroism spectra of BSA (10 mg/mL) before and after hydrolyzation by 4 (2×10^{-4} mol/L) for 16 h in Tris-HCl buffer at pH 7.1

表 2 不同 pH 下三元超分子体系 4~6 催化 BSA 水解产物中 α -螺旋的含量

Table 2 Content of α -Helix in BSA before and after hydrolyzation by 4~6 at different pH

	pH 6.2	pH 7.1	pH 8.9
BSA	64.8	67.1	59.0
4 催化水解 16 h 后的 BSA	55.6	16.9	26.6
5 催化水解 16 h 后的 BSA	63.5	65.0	57.2
6 催化水解 16 h 后的 BSA	64.0	63.9	55.6

从表 2 可以看出, 在一定的 pH 范围内, 三元超分子体系 4 均能引发 BSA 构象的显著变化. 在近中性环境中三元超分子体系 4 对 α -螺旋的破坏能力较强, 微碱性环境中次之, 微酸性环境最弱. 而三元超分子体系 4, 5 在三种 pH 值下均给出了对 α -螺旋较弱的破坏能力.

3 结论

设计了三种羧肽酶 A 的模拟物, 其中均苯三酰胺桥联三环糊精/ Zn^{2+} /金刚烷-1-乙酸三元超分子体系 4 显示出高的催化 BSA 水解反应的酶活力. 进一步的研究表明 4 中环糊精空腔和金刚烷的羧基均参与了酶促反应. 圆二色谱实验表明 4 在近中性条件下给出对蛋白质最大的变构能力.

References

- 1 *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3, Cyclodextrins*, Eds: Szejtli, J.; Osa, T., Pergamon Press, Oxford, UK, 1996.
- 2 *Supramolecular Chemistry Molecular Recognition and Assembly of Synthetic Receptors*, Eds: Liu, Y.; You, C.-C.; Zhang, H.-Y., Nankai University Press, Tianjin, 2001 (in Chinese).
(刘育, 尤长城, 张衡益编著, 超分子化学——合成受体的分子识别与组装, 南开大学出版社, 天津, 2001.)
- 3 Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1997.
- 4 Liu, Y.; Chen, Y. *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 681.
- 5 Cao, F.; Ren, Y.; Hua, W.-Y.; Ma, K.-F.; Guo, Y.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2002**, 22(11), 827 (in Chinese).
(操锋, 任勇, 华维一, 马坤芳, 郭寅龙, 有机化学, **2002**, 22(11), 827.)
- 6 Shen, J.-R.; Sun, X.-M.; Lei, Z.-L.; Yang, K.-H.; Ding, Z.-G. *Acta Chim. Sinica* **1998**, 56(4), 391 (in Chinese).
(沈静茹, 孙小梅, 雷灼霖, 杨奎红, 丁志刚, 化学学报, **1998**, 56(4), 391.)
- 7 Dai, R.-J.; Tong, B.; Tang, L.; Deng, Y.-L.; Fu, R.-N. *Acta Chim. Sinica* **2006**, 64(12), 1248 (in Chinese).
(戴荣继, 佟斌, 唐力, 邓玉林, 傅若农, 化学学报, **2006**, 64(12), 1248.)

- 8 Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11678.
- 9 Fu, H.; Zhou, Y.-H.; Chen, W.-L.; Zhuo-ga, D.-Q.; Tong, M.-L.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4924.
- 10 Ren, X.; Liu, J.; Luo, G.; Zhang, Y.; Luo, Y.; Yan, G.; Shen, J. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 682.
- 11 Dong, Z.; Liu, J.; Mao, S.; Huang, X.; Yang, B.; Ren, X.; Luo, G.; Shen, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16395.
- 12 Liu, Y.; Li, B.; Li, L.; Zhang, H.-Y. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 9.
- 13 Xiang, Q.-Y.; Yu, X.-Q.; You, J.-S.; Yan, Q.-S.; Xie, R.-G. *Chem. Res. Appl.* **1999**, *11*(1), 605 (in Chinese).
(向清样, 余孝其, 游劲松, 闫乾顺, 谢如刚, 化学研究与应用, **1999**, *11*(1), 605.)
- 14 Chen, Y.; Han, N.; Yang, H.; Liu, Y. *Acta Chim. Sinica* **2007**, *65*(11), 1076 (in Chinese).
(陈湧, 韩宁, 杨华, 刘育, 化学学报, **2007**, *65*(11), 1076.)
- 15 *Principles and Techniques of Plant Physiology and Biochemistry Experiments*, Eds.: Wang, X.-K., Higher Education Press, Beijing, **2002** (in Chinese).
(王学奎等编著, 植物生理生化实验原理和技术, 高等教育出版社, 北京, **2002**.)
- 16 Bender, M. L.; Komiyama, M. *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, New York, **1978**.
- 17 Komiyama, M.; Bender, M. L. *The Chemistry of Enzyme Action*, Ed.: Page, M. I., Elsevier, New York, **1984**, Chapter 14.
- 18 Bergeron, R. J. *Inclusion Compounds*, Vol 3, Academic Press, New York, **1984**, Chapter 12.
- 19 Rebek, J. Jr. *Acc. Chem. Res.* **1984**, *17*, 258.
- 20 Zhu, G.-L.; Deng, X.-W.; Zuo, W.-N. *Plant Physiol. Commun.* **1983**, *1*, 16 (in Chinese).
(朱广廉, 邓兴旺, 左卫能, 植物生理学通讯, **1983**, *1*, 16.)
- 21 Dugas, H. In *Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action*, Ed.: Cantor, C. R., Springer-Verlag, New York, **1998**.
- 22 Weston, J. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2151.
- 23 *Lehninger Principles of Biochemistry*, Ed.: Lehninger, A. L., Worth Publisher, New York, **2000**.

(A0706145 CHEN, J. X.)