

# 青稞脂肪氧化酶的活性测定

刘小娇,白 婷,王姗姗,文华英,朱明霞,张玉红\*

(西藏自治区农牧科学院农产品开发与食品科学研究所,西藏 拉萨 850000)

**摘要:**为明确青稞 LOX 活性测定的适宜条件,采用紫外分光光度法测定青稞 LOX 活性并对测定的适宜条件进行探讨。结果表明,青稞 LOX 活性测定的最佳条件为:检测时间 2 min,青稞全粉添加量 2.5 g,粗酶提取缓冲液为磷酸缓冲液 pH 7.0(0.05 mol/L),冰浴搅拌时间 30 min,亚油酸底物浓度 4 mmol/L,反应体系缓冲液为硼酸-硼砂缓冲液 pH 8.0(0.05 mol/L),粗酶液添加量为 50  $\mu$ l。此方法的 3 组重复性实验 RSD 值均小于 5%,稳定性好,可广泛使用。

**关键词:**青稞;脂肪氧化酶;活性测定;紫外分光光度法

中图分类号:R151.2 文献标识码:A

## Spectrophotometric Method for Determining Activity of Lipoygenase in Highland Barley

LIU Xiao-jiao, BAI Ting, WANG Shan-shan, WEN Hua-ying, ZHU Ming-xia, ZHANG Yu-hong\*

(Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Food Science Institute, Tibet Lasa 850000, China)

**Abstract:**In order to ascertain the suitable conditions for the determination of lipoygenase activity in Highland barley, the activity of lipoygenase in Highland barley was determined by ultraviolet spectrophotometry and the measured conditions were discussed. The results showed the optimal reaction conditions as follows: The optimal reaction time was 2 min; The addition amount of highland barley powder was 2.5 g; The crude enzyme extraction buffer was phosphoric buffer pH 7.0(0.05 mol/L); The ice bath stirring time was 30 min; Linoleic acid was 4 mmol; The reaction system buffer was boric acid-borax buffer of pH 8(0.05 mol/L); And the crude enzyme addition amount was 50  $\mu$ l. The results of the precision test showed that the RSD was all less than 5%, which was stable and could be widely used.

**Key words:**Highland barley; Lipoygenase; Activity determination; UV spectrophotometry

青稞是西藏高原特色农作物,随着青稞的储藏产量日渐增大,储藏周期也随着增长。研究表明新收获的谷物在贮藏期间会发生后熟和陈化,其在脱皮和粉碎的谷物粉中表现更加明显,贮藏初期,谷物粉的食用品质逐步改善<sup>[1]</sup>,但随着贮藏时间延长,谷物粉陈化导致其食用品质下降<sup>[2-3]</sup>,脂质降解是谷物粮食储藏期间变质,产生陈味劣变的主要内在原因,脂肪氧化酶(LOX)参与脂质降解,是影响谷物储藏特性的重要因素之一<sup>[4-6]</sup>。脂肪氧化酶(LOX)在动植物界广泛存在<sup>[7]</sup>,LOX 能导致谷物

发生氧化变臭,即不饱和脂肪酸与氧化反应形成不理想的风味和气味,并且影响食品原料的功能<sup>[8]</sup>。目前,LOX 活性的检测方法主要有紫外分光光度法<sup>[9-10]</sup>、显色法<sup>[11]</sup>、单克隆抗体检测法<sup>[12]</sup>、氧电极法<sup>[13]</sup>、量压法<sup>[14]</sup>、Northern 印迹法<sup>[15]</sup>、阴离子交换高压液相色谱和快速蛋白液相色谱分析检测法<sup>[16]</sup>。其中最为简易和常用的方法是紫外分光光度法,其原理为:LOX 能使催化底物亚油酸氧化形成具有共轭双键的过氧化氢衍生物,在 234 nm 波长处有吸收峰,峰高度与酶活性呈显著正相关,通过吸光度可以推算出 LOX 活性<sup>[17]</sup>。目前,相对于大豆、花生和小麦,青稞 LOX 活性的测定研究鲜有报道。鉴于此,采用紫外分光光度法对青稞 LOX 活性的测定条件进行了探讨,并重点对原料的添加量、底物浓度、粗提时间、粗提缓冲液 pH、粗酶液添加量、反应缓冲液 pH 等进行了详细分析,旨在为准确快速测定青稞

收稿日期:2020-05-06

基金项目:不同灭酶处理对青稞 LOX 活性及品质影响研究[XZ 2018ZRG-53(Z)];特色农产品加工技术与产品开发(XZ201901NA04)

作者简介:刘小娇(1984-),女,助理研究员,主要从事农产品加工与营养研究,E-mail:314621492@qq.com。

LOX 活性提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

藏青 2000、十水合四硼酸钠(国药 AR)、无水磷酸氢二钠(国药 AR)、无水磷酸二氢钠(国药 AR)、硼酸(国药 AR)、氢氧化钠(国药 AR)、磷酸二氢钾(国药 AR)、磷酸氢二钾(国药 AR)、氢氧化钠(国药 AR)、吐温 20、亚油酸(纯度 $\geq 99\%$ )。

### 1.2 实验仪器

电热风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)、实验室旋风式粉碎磨(FS-II 托普云农)、紫外可见分光光度计(UV1700PC 上海奥析科学仪器有限公司)、多头磁力搅拌器(JB-12)、电热恒温水浴锅(HWS-28 上海齐欣科学仪器有限公司)、超声波清洗机(XZ-10 宁波新芝生物科技股份有限公司)、冷冻离心机(TGL-16MS 卢湘仪)、pH 酸度计(pH400, Alalis)。

## 2 实验方法

### 2.1 青稞 LOX 活性测定

参照大麦脂肪氧化酶的测定方法<sup>[18]</sup>进行测定。

**2.1.1 粗酶液的提取** 取适量青稞样品用实验室旋风式粉碎磨粉碎,过 40 目筛。准确称取 2.0 g 青稞粉末样品于预冷的烧杯,加入 20 mL 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液,冰浴磁力搅拌 30 min。在 4℃ 下以 10 000 r/min 转速离心 10 min,上清液用 0.45  $\mu\text{m}$  膜过滤,取滤液作为粗酶提取液,5℃ 冷藏备用,现用现提。

**2.1.2 底物的配制** 准确称取 700 mg 吐温 20 与等量的亚油酸,加入 5 mL 蒸馏水,超声处理至溶液呈乳浊状。再加入 5.5 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液,超声处理至溶液澄清,将澄清液定容至 25 mL,即得 100 mmol/L 底物储备液。测定前用纯水稀释底物储备液,得到 5 mmol/L 底物工作液,5℃ 冷藏备用,现用现配。

**2.1.3 LOX 活性的测定** 本实验采用 3.25 mL 反应体系。测定前,将备用的底物工作液、粗酶提取液以及 0.05 mol/L pH 8.0 硼酸-硼砂缓冲液在 25℃ 下保温 10 min。向石英比色皿中依次加入 200  $\mu\text{L}$  5 mmol/L 亚油酸底物工作液和 3 mL 缓冲液,用硼酸-硼砂缓冲液作空白,于 234 nm 下调零。取出样品比色皿,迅速加入 50  $\mu\text{L}$  粗酶提取液并开始计时,上下颠倒混匀,15 s 后进行该波长下时间段的扫描,记录 2 min 内 OD 值的变化。

**2.1.4 LOX 活性的计算** 在室温(25℃)和 0.05 mol/L pH 8.0 硼酸-硼砂缓冲液条件下,以每分钟光密度变化( $OD_{234\text{nm}}$  变化)1 为 1 U 来表示 LOX 活性的大小。单位质量样品中,绝对干物质所含有的酶活性,以“U/g,干”表示,计算公式:

$$\text{LOX 活性}(\text{U} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\Delta OD_{234\text{nm}} \times V_2}{\Delta t \times V_1} \times \frac{V_0}{m}$$

式中:  $\Delta t$  为反应时间, min;  $V_1$  为粗酶提取液添加量, mL;  $V_2$  为反应体系总体积, mL;  $V_0$  为粗酶提取液总体积, mL;  $m$  为样品质量, g;  $\Delta OD_{234\text{nm}}$  为 234 nm 下  $\Delta t$  时间内光密度值的变化。

### 2.2 青稞 LOX 活性检测方法的优化试验

**2.2.1 粗酶液提取优化试验** 在检测青稞脂肪氧化酶试验中,青稞全麦粉用量,底物亚油酸浓度,提取温度,冰浴抽提时间缓冲液 pH 值等,每个因素对试验结果都有影响。①青稞全粉使用量的确定。取 50 mL 烧杯若干,分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 g 的全麦粉组成提取体系,每杯加入 20 mL 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液,用封口膜封口,组成提取体系,冰浴磁力搅拌 30 min。在 4℃ 下以 10 000 r/min 转速离心 10 min,上清液用滤纸过滤,取滤液作为粗酶提取液,检测样品上清液的 LOX 活性。②底物亚油酸浓度的确定。取 50 mL 烧杯若干,每杯加入 2.0 g 全麦粉和 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液,用封口膜封口,组成提取体系。将该提取体系分别置于亚油酸浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mmol/L 的底物中进行反应,测定其 LOX 活性。提取液处理方法同上。③粗酶液冰浴提取时长的确定。取 50 mL 烧杯若干,每杯加入 2.0 g 全麦粉和 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液,用封口膜封口,组成提取体系。分别浸提 20、30、40、50、60 min 测定每提取体系的上清液 LOX 活性。提取液处理方法同上。④粗酶液提取体系缓冲液 pH 值的确定。取 50 mL 烧杯若干,每杯加入 2.0 g 全麦粉后分别加入 20 mL 0.05 mol/L pH 分别为 5、6、7、8、9 的磷酸缓冲液,测定每提取体系的上清液 LOX 活性。提取液处理方法同上。

**2.2.2 正交试验** 由于检测青稞 LOX 受底物浓度、全麦粉用量、缓冲液 pH 值、冰浴提取时间 4 个因素的影响,而以上所做的试验都是单因素实验,为了全面考察这 4 个因素的影响,本实验设计了四因素三水平正交试验(表 1)进行活性检测。

**2.2.3 反应条件的优化试验** 在确定粗酶液最佳提取条件后,对反应体系的条件进行优化。①反应时间与 OD 值变化的关系。将反应体系时间设置为

表 1 四因素三水平正交实验  $L_9(3^4)$

Table 1 Four factors and three levels orthogonal test  $L_9(3^4)$

试验号	底物浓度 (mmol/L)	全麦粉用量 (g)	pH 值	提取时间 (min)
1	2	2.0	6	30
2	2	2.5	7	40
3	2	3.0	8	50
4	3	2.0	7	50
5	3	2.5	8	30
6	3	3.0	6	40
7	4	2.0	8	40
8	4	2.5	6	50
9	4	3.0	7	30

20 min。记录每分钟的 OD 变化值,研究反应时间与 OD 值变化的关系。②反应 pH 对 LOX 活性的影响。选用 0.05 mol/L pH 值分别为 4~9 的缓冲液作为反应体系中的测定缓冲液,研究不同缓冲液 pH 值对 LOX 活性的影响。其中 4、5 为醋酸-醋酸钠缓冲液,6、7 为磷酸缓冲液,8、9 为硼酸-硼砂缓冲液。缓冲液在进行 LOX 活性的测定前,需在 25℃ 下保温 10 min。③粗酶提取液添加量对 LOX 活性的影响。

在反应体系中分别加入 20、30、40、50、60、70  $\mu$ l 粗酶液,反应体系总体积为 3.25 mL,测 LOX 活性(表 2)。

3 结果与分析

3.1 粗酶液提取优化试验

3.1.1 青稞全粉添加量对 LOX 活性的影响 在青稞 LOX 提取过程中,全粉的使用量间接决定了提取液中 LOX 的浓度,进而影响 LOX 活性。全粉使用量过低,则提取液中 LOX 量不足,酶活性较低;全麦粉使用量过高,则使提取液过于黏稠,也不利于

LOX 的提取。

由图 1 可知,随着青稞全粉用量的增加 LOX 活性先增加再降低。青稞全粉添加量在 2.0~3.0 g, LOX 活性较高,都在 100 U/g(干)以上,当全粉添加量为 2.5 g 时 LOX 活性达到最大,而后随着全粉用量的增加 LOX 活性缓慢下降,但始终是正值,没有失活现象。因此认为青稞全粉用量为 2.5 g 较为适宜。

3.1.2 底物浓度对 LOX 活性的影响 检测青稞 LOX 活性时一定要适宜的底物和充分的氧参与,底物亚油酸浓度过低则反应速度过快不易检测,底物亚油酸浓度过高则会抑制 LOX 活性。

由图 2 可知,随着亚油酸底物浓度的增加 LOX 活性先上升再下降。当底物浓度为 3 mmol/L 时, LOX 活性为 114.70 U/g(干)达到最高值,相对活性为 100%,变化趋于平缓,随着底物浓度的继续增加 LOX 活性逐渐降低。由于脂肪氧化酶受到底物的抑制作用,检测青稞 LOX 活性时亚油酸底物浓度不宜太高,认为亚油酸底物浓度为 3 mmol/L 较为适宜。

3.1.3 粗酶液提取时间对 LOX 活性的影响 青稞

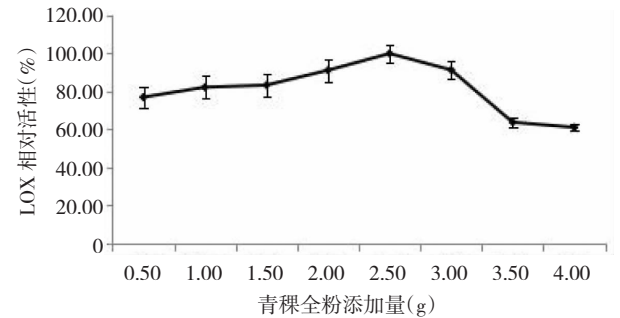


图 1 青稞全粉添加量与 LOX 相对活性的关系

Fig. 1 Relationship between LOX relative activity and the addition of highland barley powder

表 2 反应体系中缓冲液、底物工作液、粗酶液添加量

Table 2 Amount of buffer, substrate and crude enzyme added in the reaction system

缓冲液 (mL)	底物工作液 ( $\mu$ l)	粗酶液添加量 ( $\mu$ l)
3.03	200	20
3.02	200	30
3.01	200	40
3.00	200	50
2.99	200	60
2.98	200	70

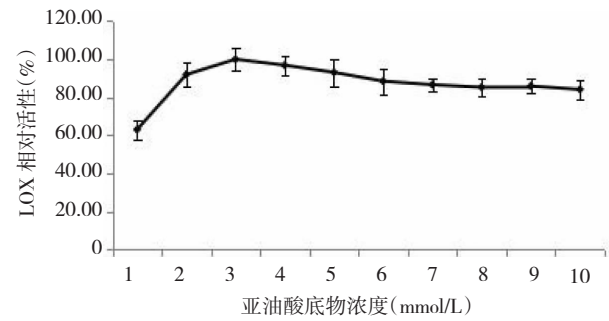


图 2 亚油酸底物浓度与 lox 相对活性的关系

Fig.2 Relationship between LOX relative activity and the concentration of linoleic acid substrate

LOX 在冰浴搅拌提取过程中,随着时间的延长,酶蛋白的浸出量逐渐增加,提取液的酶活性也随之提高,但随着提取时间的继续增加,提取液的酶活性随之下降,可能是因为酶蛋白在溶液状态下构象不稳定,随着时间延长,酶蛋白发生变性,从而造成酶活性的损失<sup>[19]</sup>。

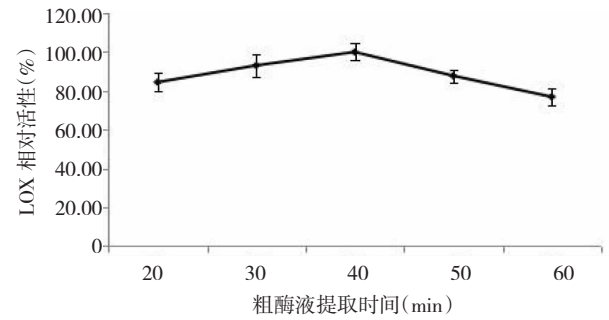


图 3 粗酶液提取时间与 LOX 相对活性的关系

Fig.3 Relationship between LOX relative activity and extraction time of crude enzyme

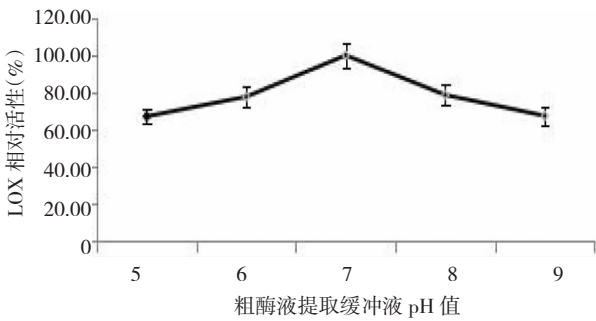


图 4 粗酶液提取缓冲液 pH 值与 LOX 相对活性的关系

Fig.4 Relationship between LOX relative activity and pH of crude enzyme extraction buffer

由图 3 可知,随着提取时间的增加 LOX 活性先升再降。当冰浴提取时间为 40 min 时,测得的青稞 LOX 活性达到最高,为 117.78 U/g(干),相对活性为 100%,随着冰浴提取时间越长,LOX 活性却随之下降,但都是正值,说明没有失去活性。由此可以确定,测定 LOX 活性的较适宜的粗酶液提取时间为 40 min。

3.1.4 粗酶液提取缓冲液 pH 值对 LOX 活性的影响 不同的 pH 对酶的构象稳定性有较大的影响,不适宜的 pH 会引起酶蛋白的变性、聚集、沉淀等,从而导致酶活性不可逆的丧失<sup>[20]</sup>。

由图 4 可知,青稞 LOX 在 pH5~9 之间均有活性,随着 pH 值的升高,酶活性有上升的趋势,当 pH 为 7 时出现最高峰,此时脂肪氧化酶的活性最高,之后随着 pH 值升高,LOX 酶活性呈下降趋势,可见 LOX 提取过程中,采用 pH 7 的缓冲体系,能更好地维持 LOX 蛋白的稳定性,从而降低损耗,提高得率,

表 3 青稞 LOX 活性  $L_9(3^4)$  正交试验极差分析

Table 3 Range analysis table of  $L_9(3^4)$  orthogonal test for LOX activity of highland barley

试验号	底物浓度 (mmol/L)	全麦粉用量 (g)	pH 值	提取时间 (min)	LOX 活性
1	2	2.0	6	30	25.55
2	2	2.5	7	40	49.48
3	2	3.0	8	50	34.10
4	3	2.0	7	50	34.82
5	3	2.5	8	30	63.30
6	3	3.0	6	40	32.28
7	4	2.0	8	40	38.11
8	4	2.5	6	50	31.86
9	4	3.0	7	30	72.29
K1	109.13	98.48	89.69	161.15	
K2	130.40	144.64	156.59	119.87	
K3	142.26	138.67	135.51	100.77	
R	11.04	15.39	22.30	20.13	



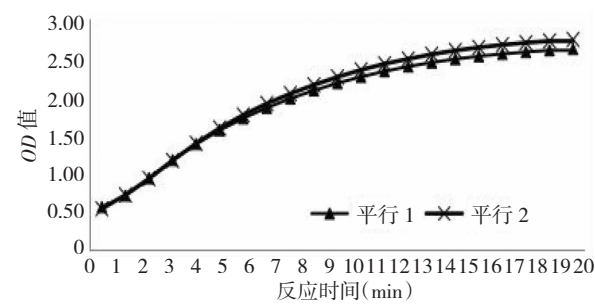


图 5 反应时间与 OD 值的关系

Fig. 5 Relationship between reaction time and OD value

有利于目标蛋白的捕获。

3.2 正交试验

为研究青稞 LOX 检测方法的较优实验条件,根据单因素试验结果,选取了 3 个水平,采用  $L_9(3^4)$  正交表进行正交试验(表 3)。

从单因素直观分析来看,青稞 LOX 活性的测定均为 2 号试验酶活性最高,为 A2B2C2D2。根据极差分析法可以得出 LOX 活性最优的试验条件为 A3B2C2D1,即亚油酸底物浓度为 4 mmol,青稞全粉用量为 2.5 g, pH 值为 7,冰浴搅拌提取时间为 30 min。而且根据极差 R 值看出 4 个因素对酶活性的影响的主次顺序为缓冲液的 pH 值影响最大,其次是冰浴提取时间,然后是全麦粉用量,最后是亚油酸底物浓度。

3.3 反应条件的优化试验

在确定粗酶液最佳提取条件后,对反应体系的条件进行优化。

3.3.1 LOX 最适反应时间的确定 按照最佳提取条件提取粗酶液后,对 LOX 活性进行测定,测定 20 min 内 OD 值的变化情况。

由图 5 可知,反应初期,OD 值随时间的延长呈明显的上升趋势。超过 4 min 后,上升趋势减缓;9 min 后 OD 值基本上不再发生变化。在反应开始后的 2 min 内,平行 1 与平行 2 的  $R^2$  分别为 0.9984 和 0.9979,表明反应开始后的 2 min 内的 OD 值与反应

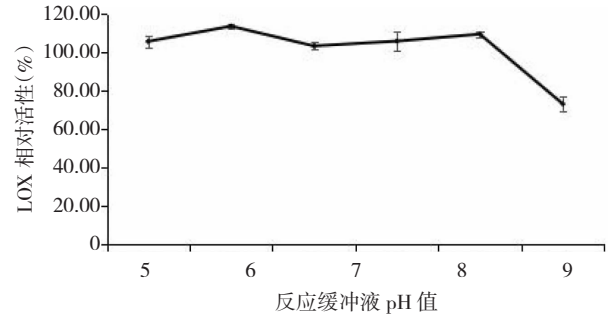


图 6 反应缓冲液 pH 值与 LOX 活性的关系

Fig. 6 Relationship between pH of reaction buffer and LOX activity

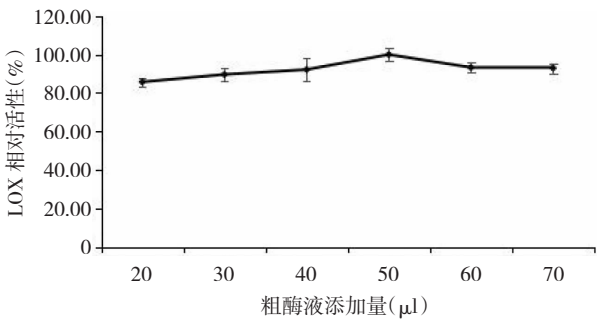


图 7 粗酶液添加量与 LOX 相对活性的关系

Fig. 7 Relationship between LOX relative activity and addition of crude enzyme

时间的线性相关良好。OD 值在短时间内变化迅速,因此要求实验人员操作熟练,准确把握好测定时间。由此得出,测定 LOX 活性的反应时间应控制在 2 min。

3.3.2 最适反应缓冲液 pH 值的确定 从图 6 可知,pH 4~9 有 2 个峰值,当 pH 4~5 变化幅度较大,相对不稳定;而 pH 6~8 的变化幅度较小且 LOX 活性相对较高,因此可以确定测定 LOX 活性的最适反应缓冲液 pH 值为 8.0。

3.3.3 最适粗酶提取液添加量的确定 从图 7 可以看出,粗酶液添加量在 20~50 μl, LOX 相对活性呈不断上升的趋势,当酶液添加量为 50 μl 时, LOX 活性最高,此后随着粗酶液量的继续增加, LOX 活性不再上升,当酶液添加量为 70 μl 时, LOX 相对活性降至 92.96 %。由此可以得出酶液添加量过少 LOX 活性较低,酶液添加量过多反而会抑制 LOX 活性,所以最适粗酶液添加量为 50 μl。

4 结 论

通过以上实验结果得出藏青 2000 LOX 活性最

表 4 藏青 2000 品种 LOX 活性

Table 4 LOX activity of Zangqing 2000

实验次数	藏青 2000 品种 LOX 活性[U/g(干)]		
	第 1 次	第 2 次	第 3 次
平行 1	115.23	102.96	111.07
平行 2	117.31	100.05	108.99
平行 3	115.86	105.66	103.17
平行 4	111.49	106.5	102.96
平行 5	106.7	105.66	100.88
平行 6	115.23	107.33	106.7
平均值	113.64	104.69	105.63
标准差	3.56	2.47	3.60
重复性 RSD(%)	3.14	2.36	3.41

佳测定件为:青稞全粉添加量为 2.5 g,提取粗酶缓冲液为磷酸缓冲液 pH 7.0,冰浴搅拌时间为 30 min,亚油酸底物浓度为 4 mmol,反应体系缓冲液为硼酸-硼砂缓冲液(pH 8),粗酶液添加量为 50  $\mu$ l,测量时间为 2 min。采用最佳测定条件测进行 3 次重复实验得到藏青 2000 品种的 LOX 活性为 107.99 U/g(干),如表 4 所示。根据上述条件测定该方法的 RSD 均小于 5%,表明该方法适于青稞脂肪氧化酶的测定。由于 LOX 的活性不稳定极易变化,测定易受到实验者操作影响,所以用该方法测定时必须熟练快速操作,减少误差。

### 参考文献:

- [1]路茜玉. 粮油储藏学[M]. 北京:中国财政经济出版社,2004.
- [2]谢宏. 稻米储藏陈化作用机理及调控的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2007.
- [3]Wang Linfeng, Flores Rolando A. The effects of storage on flour quality and baking performance[J]. Food Reviews International, 1999,15(2): 215-234.
- [4]Takano K. Advances in Chemistry and Technology in Japan[J]. Cereal Foods World, 1993, 38: 695-698.
- [5]王丽群,孟庆虹,张志宏,等. 稻米中脂肪氧化酶分布及其在贮藏期间的变化[J]. 食品与机械,2016(32):103-105.
- [6]温雪瓶,马浩然,严俊波,等. 谷物粉贮藏过程中主要成分的变化规律及其相关性分析[J]. 粮食与油脂,2016(29):49-52.
- [7]Salzmman V. Pentane formation during the anaerobic reactions of reticulocyte lipoxygenase: Comparison with lipoxygenases from soybeans and green pea seeds[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1984, 795(3): 535-542.
- [8]李兴军. 谷物脂氧合酶的生理生化特性[J]. 粮食科技与经济, 2011,36(3):34-37,41.
- [9]Siddiqi A M, Al-Obaidy H M. Properties of broad bean lipoxygenase[J]. Journal of Food Science, 1981, 46(2): 622-625.
- [10]侯美玲,苗华荣,陈静,等. 花生种子脂肪氧化酶的活性测定研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(32):14033-14035.
- [11]Hammond E G, Duvick D N, Fehr W R, et al. Rapid screening techniques for lipoxygenases in soybean seeds[J]. Crop Sci,1992, 32(3): 820-821.
- [12]Suzuki Y, Higo K, Hagiwara K, et al. Production and use of monoclonal-antibodies against rice embryo lipoxygenase-3[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry,1992,56(4): 678-679.
- [13]Galliard T, Phillips D R. Lipoxygenase from potato tubers[J]. Biochemical Journal,1971,124(2): 431-438.
- [14]钟芳,王璋,许时婴. 3种脂肪氧合酶酶活测定方法[J]. 无锡轻工大学学报,2001,20(1):77-78,91.
- [15]Start W G, Ma Y, Polacco J C, et al. Two soybean seed lipoxygenase nulls accumulate reduced levels of lipoxygenase transcripts[J]. Plant Mol Boil,1986(7): 11-23.
- [16]Ramadoss C S, Axelrod B. High-performance liquid chromatography separation of lipoxygenase isozymes in crude soybean extracts[J]. Annul Biochem, 1982, 127(1):25-31.
- [17]Schewe T, Weisner R, Rapoport S. Methods in enzymology[M]. New York:Academic Press, 1981: 430-441.
- [18]王涵斌,王德良,林智平,等. 大麦中脂肪酸氧化酶的活性[J]. 食品与发酵工业,2013,39(11):124-128.
- [19]顾明超. 小麦籽粒 LOX 活性的检测方法及其在种子形成发育和萌发期间的变化[D]. 合肥:安徽农业大学,2013.
- [20]向文斌,罗发兴,邵亚明. 分离纯化对蛋白质活性的影响[J]. 生命的化学,2003,23(3):238-239.