

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180084

## 新月弯孢霉 CICC40301 催化 4-烯-3-酮甾体 化合物羟基化反应产物的鉴定

李慧杰<sup>1</sup>, 李明<sup>1</sup>, 金鹏<sup>2</sup>, 郭文丽<sup>2</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 王正祥<sup>2</sup>, 刘晓光<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457)

**摘要:** 丝状真菌是工业上甾体微生物羟基化反应菌种的主要来源. 本文首次报道新月弯孢霉(*Curvularia lunata*) 转化孕酮、雄甾-4-烯-3,17-二酮和睾酮及其对应产物. 利用高效液相色谱(HPLC)和核磁共振方法分析了相应的主要转化产物, 鉴定结果为:C17 $\alpha$ -羟基孕酮、C14 $\alpha$ -羟基 4AD、C15-羟基睾酮, 其中新月弯孢霉 CICC40301 转化孕酮生成的产物 C17 $\alpha$ -羟基孕酮是用于合成氢化可的松等多种甾体药物的重要中间体, C14 $\alpha$ -羟基 4AD 是合成抗肿瘤化合物 C14 $\alpha$ -羟基-3,6,17 三酮的关键前体.

**关键词:** 新月弯孢霉; 孕酮; 睾酮; 雄甾-4-烯-3,17-二酮

中图分类号: Q781 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2019)05-0035-04

## Identification of Hydroxylation Products of 4-alkene-3-one Steroids Catalyzed by *Curvularia lunata* CICC40301

LI Huijie<sup>1</sup>, LI Ming<sup>1</sup>, JIN Peng<sup>2</sup>, GUO Wenli<sup>2</sup>, WANG Xue<sup>1</sup>,  
WANG Zhengxiang<sup>2</sup>, LIU Xiaoguang<sup>2</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology,  
Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Filamentous fungi are the main source of industrial strains for steroid hydroxylation reaction. This paper reports for the first time on the transformation of progesterone, androst-4-ene-3,17-dione and testosterone catalyzed by *Curvularia lunata* and their major transformation products. The transformation products, characterized with high performance liquid chromatography (HPLC) and nuclear magnetic resonance (NMR) method, were identified to be C17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, C14 $\alpha$ -hydroxy-4AD and C15-hydroxytestosterone. 17 $\alpha$ -OH-progesterone is an important intermediate for the synthesis of hydrocortisone and other steroidal drugs; 14 $\alpha$ -hydroxy-4-androstene-3,17-dione is a key precursor for the production of 14 $\alpha$ -hydroxy-4-androstene-3,6,17-trione, an antitumor agent.

**Key words:** *Curvularia lunata*; progesterone; testosterone; 4-androstene-3,17-dione

甾体化合物具有广泛的药理和生理活性, 在抗炎、抗肿瘤、调节性功能和生育控制等方面具有极其重要的作用<sup>[1-2]</sup>. 天然的甾体化合物往往药理活性较低, 在甾体药物的特定位点引入羟基可以显著提高其药理与生理活性<sup>[3-4]</sup>. 甾体化合物结构复杂且含有多个非对称中心, 用化学合成法在甾体化合物的关键位

点引入氧原子非常困难, 涉及多步复杂的保护和去保护反应, 如在黄体酮的 C11 $\alpha$ -羟基引入羟基需要 9 步化学反应, 而利用黑根霉(*Rhizopus nigricans*) 转化可以一步完成 C11 $\alpha$ -羟化反应生成 C11 $\alpha$ -羟基黄体酮, 得率达到 85%<sup>[5]</sup>. 由于微生物转化具有特异性强、效率高、污染低等优点, 已广泛应用于甾体药物羟基化

收稿日期: 2018-03-23; 修回日期: 2018-07-04

基金项目: 天津市高等学校创新团队培养计划资助项目(TD12-5002)

作者简介: 李慧杰(1973—), 女, 山西长治人, 硕士研究生; 通信作者: 刘晓光, 教授, liu\_xg@tust.edu.cn

修饰<sup>[6-8]</sup>.

目前已报道的具有甾体转化活性的微生物多达 1 500 种,但成功应用于工业生产的菌株并不多<sup>[4,6]</sup>. 进一步研究开发工业生产菌种对于改进甾体生物转化效率和拓宽微生物催化在甾体工业中的应用范围具有重要意义. 丝状真菌新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) 在工业上用于 C11 $\beta$  羟化 Reichstein S 化合物 (RS), 生产具有抗炎活性的氢化可的松<sup>[9]</sup>. C17 $\alpha$ -羟基孕酮是合成氢化可的松、泼尼松龙、地塞米松等多种甾体药物的一个关键中间体<sup>[10]</sup>, 而 C14 $\alpha$ -羟基 4AD 是合成抗肿瘤化合物 C14 $\alpha$ -羟基-3, 6, 17 三酮的关键前体<sup>[11]</sup>. 作者在研究新月弯孢霉的甾体底物转化的过程中发现新月弯孢霉菌株 CICC40301 不能转化 RS, 但对孕酮、甾酮、雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (4AD) 都有明显的转化活性, 通过 HPLC、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 方法确认其相应的主要转化产物为 C17 $\alpha$ -羟基孕酮、C15-羟基甾酮和 C14 $\alpha$ -羟基 4AD.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) CICC40301 为本实验室保存菌株.

#### 1.1.2 试 剂

甲醇、石油醚、二氯甲烷、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、乙腈, 二甲基亚砜-*d*<sub>6</sub> (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 国药集团化学试剂有限公司; 薄层层析硅胶板, 烟台德信生物科技有限公司.

#### 1.1.3 甾体化合物

孕酮、甾酮和雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (4AD) 均由北京紫竹药业有限公司提供.

#### 1.1.4 培 养 基

PDA 培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 琼脂粉 20, 115 °C 灭菌 20 min.

YPD 培养基 (g/L): 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 葡萄糖 20, 115 °C 灭菌 20 min.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 新月弯孢霉的培养及孢子悬浮液的制备

将新月弯孢霉 CICC40301 孢子接种于 PDA 斜面培养基, 28 °C 恒温培养 2~4 d. 待孢子成熟后, 将长有新月弯孢霉孢子的 PDA 斜面用无菌水洗下分生孢子, 血球计数板计数, 再用无菌水调节孢子悬液至

浓度为 10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup>, 备用.

#### 1.2.2 新月弯孢霉 CICC40301 菌丝的培养

吸取 1 mL 浓度为 10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup> 的孢子悬液接入 50 mL 的 YPD 液体培养基中, 放入恒温摇床 180 r/min、28 °C 培养至 36 h.

#### 1.2.3 底物的转化

将新月弯孢霉培养 36 h 后, 将甾体底物孕酮、甾酮和 4AD 通过球磨机研磨, 使其颗粒直径为 10~15  $\mu$ m. 投入甾体底物使其终质量浓度为 2 g/L, 并添加 1% 的 N, N-二甲基酰胺 (DMF) 作为助溶剂, 28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h 后取样.

#### 1.2.4 高效液相色谱检测分析

取甾体底物孕酮、甾酮和 4AD 及其对应的转化产物样品加入到 1.5 mL EP 管中, 加入 600  $\mu$ L 80% 乙腈完全溶解后, 经 0.22  $\mu$ m 膜过滤至液相小瓶中, 备用.

色谱条件: 色谱柱为 C18 柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 乙腈-水 (体积比为 80 : 20) 为流动相, 流量 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 10  $\mu$ L, 采用紫外检测器, 检测波长 240 nm. 本方法中所用乙腈为色谱纯, 水为去离子水经过滤超声处理.

#### 1.2.5 核磁共振检测分析

样品处理: 取 100 mL 底物发酵液中的 30 mL 于 50 mL 离心管, 用 6 mL 乙酸乙酯萃取, 剧烈震荡, 使其与发酵液充分混合, 12 000 r/min 离心 5 min, 分别萃取 3 次, 合并有机相.

产物制备: 取有机相在层析板上点样. 在展开前用展开剂饱和层析缸 30 min. 将点有样品的硅胶板放入装有展开剂的层析缸中加盖、密封, 待展开剂前沿快到顶端时, 取出点样板后烘干. 采用紫外检测仪观察层析斑点的颜色和大小. 孕酮转化产物的展开剂为 *V*(氯仿) : *V*(丙酮) : *V*(乙酸乙酯) = 5.5 : 3.5 : 1; 4AD、甾酮转化产物的展开剂为 *V*(二氯甲烷) : *V*(石油醚) : *V*(甲醇) : *V*(水) = 385 : 60 : 30 : 2.

通过刮板得到产物, 加二氯甲烷和甲醇混合液 (二氯甲烷与甲醇体积比为 5 : 1) 10 mL 溶解, 混匀. 将得到的溶液加入到 50 mL 的圆底烧瓶中, 旋转蒸发除去二氯甲烷和甲醇得到产物, 之后向产物中加入 DMSO 将其溶解, 将溶解的溶液加入到核磁管中进行检测分析.

核磁共振条件: <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 谱分别用 400 MHz 和 101 MHz 记录, 布鲁克 Ascend 400 系列核磁共振仪使用 DMSO-*d*<sub>6</sub> 作为溶剂.

## 2 结果与分析

### 2.1 新月弯孢霉孕酮转化产物的分析

#### 2.1.1 孕酮转化产物 HPLC 分析

通过刮板分离得到转化产物, HPLC 分析(图 1)显示, 孕酮底物出峰时间为 6.760 min, 孕酮两种转化产物的出峰时间分别为 3.032 min 和 3.686 min, 其中一种孕酮转化产物纯化之后的出峰时间为 3.029 min, 并且其转化率为 22.2%.

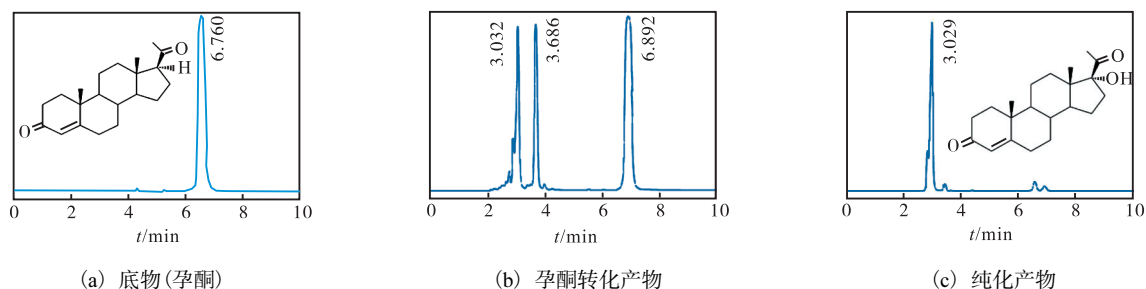


图 1 新月弯孢霉 CICC40301 孕酮转化产物的 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC analysis of the progesterone transformation product catalyzed by *Curvularia lunata* CICC40301

#### 2.1.3 孕酮转化产物确认

根据孕酮转化产物的  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 结果, 碳谱中 C17 的化学位移从孕酮的 63.23 变为 83.60, 后者与文献报道 C17-羟基孕酮的碳谱数据一致<sup>[12]</sup>, 氢谱的特征峰 ( $\text{H}_4 = 5.623$ ,  $\text{H}_{18} = 0.657$ ,  $\text{H}_{19} = 1.139$ ) 的化学位移值与文献报道 C17-羟基孕酮的氢谱数据基本一致<sup>[13]</sup>, 鉴于孕酮母核的 C17 $\alpha$ -H 被 OH 取代, 故产物确认为 C17 $\alpha$ -羟基孕酮.

#### 2.1.2 孕酮转化产物表征

$^1\text{H}$  NMR (400, MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  5.623 (s, 1H, C-4H), 4.011 (s, 1H, OH), 0.657 (s, 3H, H-18), 1.139 (s, 3H, H-19).  $^{13}\text{C}$  NMR (101, MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  210.37 (C-20), 198.54 (C-3), 171.63 (C-5), 123.40 (C-4), 83.60 (C-17), 59.57 (C-14), 48.15 (C-9), 46.26 (C-13), 38.64 (C-10), 38.30 (C-12), 35.80 (C-8), 34.12 (C-1), 32.35 (C-2), 32.30 (C-6), 31.62 (C-7), 30.83 (C-21), 27.44 (C-15), 21.52 (C-16), 20.31 (C-11), 17.17 (C-19), 17.17 (C-18).

### 2.2 新月弯孢霉雄甾-4-烯-3, 17-二酮(4AD)转化产物的分析

#### 2.2.1 雄甾-4-烯-3, 17-二酮(4AD)转化产物 HPLC 分析

通过刮板分离得到转化产物, HPLC 分析(图 2)显示, 4AD 底物出峰时间为 4.434 min, 4AD 两种转化产物的出峰时间分别为 2.781 min 和 3.059 min, 其中一种 4AD 转化产物纯化后的出峰时间为 3.059 min, 并且其转化率为 45.1%.

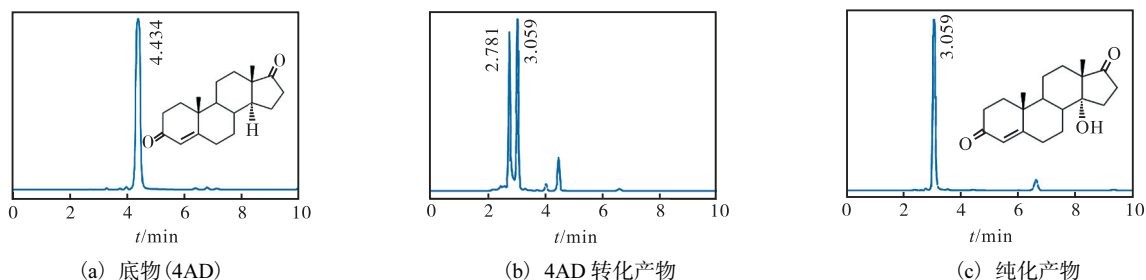


图 2 新月弯孢霉 CICC40301 4AD 转化产物的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of the 4AD transformation product catalyzed by *Curvularia lunata* CICC40301

#### 2.2.2 雄甾-4-烯-3, 17-二酮(4AD)转化产物表征

$^1\text{H}$  NMR (400, MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  5.641 (s, 1H, C-4H), 4.304 (s, 1H, OH), 0.921 (s, 3H, H-18), 1.150 (s, 3H, H-19).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  218.03 (C-17), 197.98 (C-3), 170.82 (C-5), 123.02 (C-4), 78.93 (C-14), 52.09 (C-13), 46.41 (C-9), 38.20

(C-10), 37.35 (C-12), 35.27 (C-1), 33.62 (C-2), 32.78 (C-6), 31.63 (C-7), 28.89 (C-8), 25.43 (C-15), 24.51 (C-16), 18.82 (C-11), 17.12 (C-19), 16.82 (C-18).

#### 2.2.3 4AD 转化产物确认

根据 4AD 转化产物的  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 结果, 碳谱中 C14 的化学位移从 4AD 的 51.67 变为

78.93, 后者与文献报道 C14-羟基 4AD 的碳谱数据一致<sup>[12]</sup>, 氢谱的特征峰 ( $H_4 = 5.641$ ,  $H_{18} = 0.921$ ,  $H_{19} = 1.150$ ) 的化学位移值与文献报道 C14-羟基 4AD 的氢谱数据基本一致<sup>[13]</sup>, 鉴于 4AD 母核的 C14 $\alpha$ -H 被 OH 取代, 故产物确认为 C14 $\alpha$ -4AD.

## 2.3 新月弯孢霉睾酮转化产物的分析

### 2.3.1 睾酮转化产物 HPLC 分析

通过刮板分离得到转化产物, HPLC 分析(图 3)显示, 睾酮底物出峰时间为 4.007 min, 睾酮转化产物的出峰时间为 2.772 min, 纯化的睾酮转化产物出峰时间为 2.890 min, 并且其转化率为 88.2%.

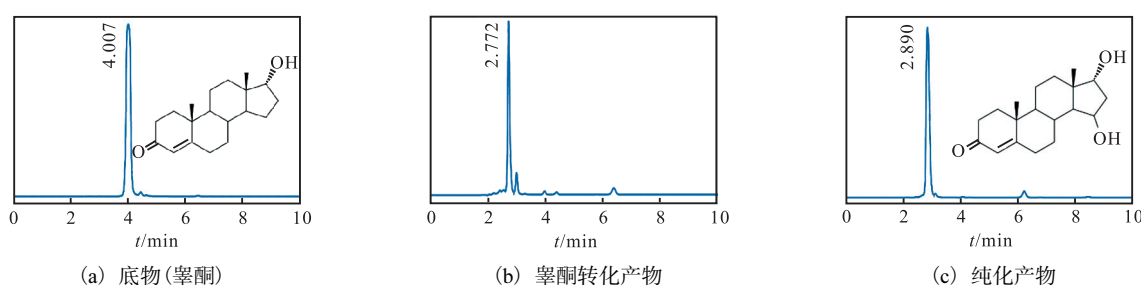


图 3 新月弯孢霉 CICC40301 睾酮转化产物的 HPLC 分析

Fig. 3 HPLC analysis of the testosterone transformation product catalyzed by *Curvularia lunata* CICC40301

### 2.3.3 睾酮转化产物确认

根据睾酮转化产物的  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 结果, 碳谱中 C15 的化学位移从睾酮的 27.43 变为 77.32, 与文献报道 C15-羟基睾酮的碳谱数据一致<sup>[12]</sup>, 氢谱的特征峰 ( $H_4 = 5.609$ ,  $H_{18} = 0.759$ ,  $H_{19} = 1.143$ ) 的化学位移值与文献报道的 C15-羟基睾酮氢谱数据基本一致<sup>[13]</sup>, 故产物确认为 C15-羟基睾酮.

## 3 结论

新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) CICC40301 能够转化甾体底物孕酮、雄甾-4-烯-3, 17-二酮和睾酮, 利用高效液相色谱 (HPLC) 和核磁共振方法分析鉴定了相应的主要转化产物, 结果为: C17 $\alpha$ -羟基孕酮、C14 $\alpha$ -羟基 4AD、C15-羟基睾酮. 转化产物 C17 $\alpha$ -羟基孕酮是用于合成氢化可的松等多种甾体药物的重要中间体, C14 $\alpha$ -羟基 4AD 是合成抗肿瘤化合物 C14 $\alpha$ -羟基-3, 6, 17 三酮的关键前体.

### 参考文献:

- [1] Hogg J A. Steroids, the steroid community and Upjohn in perspective: A profile of innovation[J]. Steroids, 1992, 57(12): 593-616.
- [2] Mahato S B, Garai S. Advances in microbial steroid bio-

### 2.3.2 睾酮转化产物表征

$^1\text{H}$  NMR (400, MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ 5.609 (s, 1H, C-H4), 4.240 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz, OH), 4.227 (m, 1H, H-15), 0.759 (s, 3H, H-18), 1.143 (s, 3H, H-19).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ 198.56 (C-3), 171.91 (C-5), 123.32 (C-4), 81.74 (C-17), 77.32 (C-15), 46.99 (C-9), 46.79 (C-14), 39.07 (C-13), 38.75 (C-10), 35.83 (C-1), 34.15 (C-2), 32.37 (C-6), 32.03 (C-7), 29.84 (C-8), 28.86 (C-12), 26.53 (C-16), 19.98 (C-11), 17.21 (C-19), 15.33 (C-18).

transformation[J]. Steroids, 1997, 62(4): 332-345.

- [3] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(6): 688-705.
- [4] Bhatti H N, Khera R A. Biological transformations of steroidal compounds: A review[J]. Steroids, 2012, 77(12): 1267-1290.
- [5] Murray H C, Peterson D H. Oxygenation of steroids by Mucorales fungi: US2875132A[P]. 1953-12-04.
- [6] Donova M V, Egorova O V. Microbial steroid transformations: Current state and prospects[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2012, 94(6): 1423-1447.
- [7] Borges K B, Borges W S, Durán-Patrón R, et al. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts[J]. Tetrahedron Asymmetry, 2009, 20(4): 385-397.
- [8] Nassiri-Koopaei N, Faramarzi M A. Recent developments in the fungal transformation of steroids[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2015, 33(1): 1-28.
- [9] 卢文玉, 陈洋成, 郭亚文, 等. 氢化可的松高产菌株新月弯孢霉的选育[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 26-29.
- [10] 国家医药管理总局. 全国原料药生产工艺汇编[M]. (下转第 44 页)

母对营养物质的竞争性利用,使酵母的生长代谢受到一定抑制,从而大大降低高级醇的生成量。可见通过调节大曲用量,协调传统大曲中的微生物与酿酒酵母的相互作用,可以有效地降低液态法大曲酒中高级醇的含量。

### 3 结 语

从酿酒原料、酵母菌、酿造用酶(糖化酶、酸性蛋白酶)和大曲用量等多个因素的发酵实验结果看,以粳高粱为原料、酿酒酵母 A-2 为菌种,在酵母接种量  $6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 、糖化酶用量 60 U/g、酸性蛋白酶用量 4 U/g、大曲用量 40% 的条件下,高级醇含量为  $(207.73 \pm 1.03) \text{ mg/L}$ ,相比初始发酵条件下的高级醇含量  $(434.62 \pm 4.06 \text{ mg/L})$  下降了 52.18%,但同时淀粉出酒率下降了 24.58%。由此说明采用传统大曲与纯种培养的酿酒酵母和商品酶制剂协同糖化发酵,可有效降低液态法白酒高级醇含量高的问题,这为液态法白酒品质的提高开辟了新的方法。但是,在白酒实际生产中,应综合考虑出酒率、高级醇含量、产品质量以及生产成本等因素,确定合理大曲用量,将高级醇含量控制在合适的范围。除大曲用量外,酵母菌种是影响液态法白酒高级醇含量的又一重要因素。本研究用菌种均为生产上使用的工业菌株,若采用现代分子生物技术对酿酒酵母的高级醇代谢进行改造,即可实现在大曲用量较少的情况下生成适量的高级醇,达到优质高产的目的,这将是我们的下一步研究的重点。

#### 参考文献:

- [1] 曾朝珍,张永茂,康三江,等. 发酵酒中高级醇的研究进展[J]. 中国酿造,2015,34(5):11-15.
- [2] 谢方安. 谈白酒香气成分和作用[J]. 酿酒,2006,33(5):52-55.
- [3] 刘秀强. 啤酒酿造过程中高级醇的控制[J]. 啤酒科技,2007(2):35.
- [4] Derrick S, Large P J. Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(11):2783-2792.
- [5] Mangas J J, Cabranes C, Moreno J, et al. Influence of cider-making technology on cider taste[J]. LWT Food Science and Technology, 1994, 27(6):583-586.
- [6] 王旭亮,陈耀,李红,等. 多种微生物共存下的空间位阻效应——固态法白酒风味丰富性及其与液态法白酒风味差异的原因分析[J]. 酿酒科技,2016(1):1-9.
- [7] 吴登军. 对固态法白酒和液态法白酒中微量成分的分析研究[J]. 山东食品发酵,2003(2):40.
- [8] 陈峻. 提高液态法白酒质量的工艺技术[J]. 食品科学,1992,13(9):31-35.
- [9] 张昊,陈亮,王继富,等. 液态发酵法白酒生产技术的研究[J]. 中国石油和化工标准与质量,2013,33(24):82.
- [10] 肖冬光,赵树欣,陈叶福. 白酒生产技术[M]. 北京:化学工业出版社,2011:201.
- [11] 牟建楼,王颀,张伟,等. 乙醇的测定方法综述[J]. 酿酒,2006,33(2):46-48.
- [12] 余尚华,刘沛龙. 白酒中总酯测定方法的研究[J]. 酿酒,1982(4):33-37.
- [13] 李雪梅,杨俊慧,张利群,等. 还原糖测定方法的比较[J]. 山东科学,2008,21(2):18-20.
- [14] 唐取来,李晶晶,李玲玲,等. 新型液态发酵生产米香型白酒的研究(I)——酶制剂在液态发酵米香型白酒中的应用[J]. 酿酒科技,2015(9):8-11.
- [15] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京:化学工业出版社,2012:237-238.
- [16] 邱增钰,王亚平,李博艺,等. 温度对高温大曲液态培养菌过程菌群结构的影响[J]. 中国酿造,2017,36(5):30-35.

责任编辑:郎婧

(上接第38页)

上海:中国医药工业出版社,1980:600-601.

- [11] Yoagioka H, Asada S, Fujita S. Process for producing  $6\beta, 14\alpha$ -dihydroxy-4-androstene-3,17-dione amid  $14\alpha$ -hydroxy-4-androstene-3,6,17-trione from 4-androstene-3,17-dione using *Myrothecium* sp. ferm bp-4432: US5378611A[P]. 1992-11-27.
- [12] Yildirim K, Kuru A. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus candidus*[J]. Journal of Chemical Research, 2015, 39(9):546-549.
- [13] Kirk D N, Toms H C, Douglas C, et al. A survey of the high-field  $^1\text{H}$  NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds[J]. Journal of the Chemical Society Perkin Transactions, 1990(9):1567-1594.

责任编辑:郎婧