

# 大黄酸对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制机理分析及分子模拟

刘华<sup>1</sup>, 李仕祥<sup>2,3</sup>, 钟业俊<sup>2</sup>, 吴丹<sup>3</sup>

(1. 江西科技师范大学生命科学学院, 江西南昌 330047) (2. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330013) (3. 江西省食品药品监督管理局, 江西南昌 330029)

**摘要:** 本文应用紫外、荧光、圆二色谱和分子模拟等手段, 分析测定了大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用、抑制类型和抑制动力学常数, 探讨了大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶二级结构的影响, 并通过分子模拟软件对大黄酸和  $\alpha$ -淀粉酶进行分子对接。结果表明, 大黄酸是一种可逆的竞争型  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂, 其半抑制率  $IC_{50}$  为  $0.43 \pm 0.02$  mM, 抑制常数  $K_i$  为  $0.35 \pm 0.03$  mM; 进一步的圆二色谱分析表明, 大黄酸能使  $\alpha$ -淀粉酶二级结构含量的变化 ( $\alpha$ -螺旋含量由 12.22% 逐渐增加到 22.72%,  $\beta$ -折叠含量由 43.24% 逐渐降低到 36.43%), 这意味着大黄酸能够诱导  $\alpha$ -淀粉酶的构象发生部分改变; 螯合钙离子实验证实了大黄酸能够螯合活性中心的钙离子; 分子模拟结果也表明, 大黄酸能够优先结合到  $\alpha$ -淀粉酶的活性中心, 并与催化基团 TRP59 和 TYR62 发生相互作用, 形成氢键和  $\pi$ - $\pi$  效应, 进而与淀粉竞争活性中心, 从而降低了  $\alpha$ -淀粉酶的催化活性。

**关键词:** 大黄酸;  $\alpha$ -淀粉酶; 抑制作用; 二级结构; 分子模拟

文章编号: 1673-9078(2015)2-47-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.009

## Inhibitory Mechanism of Rhein on $\alpha$ -Amylase and Its Molecular Simulation

LIU Hua<sup>1</sup>, LI Shi-xiang<sup>2,3</sup>, ZHONG Ye-jun<sup>2</sup>, WU Dan<sup>3</sup>

(1. School of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330047, China)

(2. The National Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330013, China)

(3. The Food and Drug Administration of Jiangxi Province, Nanchang 330029, China)

**Abstract:** The inhibitory effect (including inhibitory mechanism, type and kinetic parameters) of rhein on  $\alpha$ -amylase and the effect on  $\alpha$ -amylase secondary structure were investigated by UV, fluorescence, and circular dichroism spectrometry, while molecular docking of rhein and  $\alpha$ -amylase was conducted by molecular simulation. The results showed that rhein was a reversible and competitive inhibitor to  $\alpha$ -amylase. The half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) and inhibition constant ( $K_i$ ) were  $0.43 \pm 0.02$  mM and  $0.35 \pm 0.03$  mM, respectively. Circular dichroism spectra analysis revealed that rhein could alter the content of secondary structure in  $\alpha$ -amylase (gradual increase of  $\alpha$ -helix content from 12.22% to 22.72% and gradual decrease of  $\beta$ -sheet from 43.24% to 36.43%), indicating that rhein could induce partial conformational changes in  $\alpha$ -amylase. Chelating calcium ions experiment indicated that rhein combined with calcium ions at the  $\alpha$ -amylase active site. Moreover, the results of molecular simulation indicated that rhein had a binding preference for the  $\alpha$ -amylase active site, interacting with the catalytic groups TRP59 and TYR62 by forming hydrogen bonds and  $\pi$ - $\pi$  interaction. Furthermore, rhein competed with starch, consequently reducing the catalytic activity of  $\alpha$ -amylase.

**Key words:** rhein;  $\alpha$ -amylase; inhibitory effect; secondary structure; molecular simulation

$\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -amylase)也称  $\alpha$ -1, 4-D-葡聚糖水解酶, 催化 3 个或 3 个以上含  $\alpha$ -1, 4-D-糖苷键的 D-葡萄糖多聚物的水解<sup>[1]</sup>, 生成  $\alpha$ -糊精和葡萄糖等还原糖, 其广泛分布于动物、植物和微生物中, 它占了整个酶制剂市场份额的 25% 左右<sup>[2]</sup>; 国内外研究机构对  $\alpha$ -淀粉酶

收稿日期: 2014-06-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360205)

作者简介: 刘华(1982-), 男, 博士, 讲师, 主要从事天然活性物质的研究与开发

通讯作者: 钟业俊(1982-), 男, 博士, 讲师, 主要从事食物资源的开发与利用研究

及影响其活性的条件给予了极大关注<sup>[3-4]</sup>。 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂是属于糖(苷)水解酶抑制剂中的一种, 它能有效地抑制肠道内唾液及胰淀粉酶的活性, 阻碍食物中碳水化合物水解和消化, 减少糖分的摄取, 降低血糖和血脂含量水平, 进食后不产生高血糖症, 从而使胰岛素分泌减少, 脂肪合成降低, 体重减轻<sup>[5]</sup>。因此, 在医药行业中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂被广泛用于预防和治疗糖尿病、高血脂等疾病。且抑制剂的研究对象主要集中在真菌、细菌及植物提取物几个方面。

大黄酸(Rhein, 图 1)是蒽醌衍生物之一, 广泛分布于大黄, 何首乌和虎杖等蓼科植物中, 具有抗肿瘤

瘤、抗感染、抗菌调节肾功能等药理活性<sup>[6]</sup>；研究发现，大黄酸有减少蛋白尿的排泄，抑制细胞外基质的产生以及减轻肾小球硬化等作用，可明显改善遗传性糖尿病小鼠的肾损伤<sup>[7]</sup>，同时发现，大黄酸还通过减轻肾脏肥大，改善胰岛素敏感性纠正脂质代谢紊乱及血液流变学指征紊乱等，有效防治 2 型糖尿病肾病<sup>[8]</sup>。

大黄长期在中国传统经典医学中被认为是一种有降糖作用的中草药，其水提液具有  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性的事实已见报道<sup>[9]</sup>，但其作用机制以及活性组分的详情尚不清楚。本课题主要以大黄中的主要成分大黄酸为抑制剂，通过体外酶抑制实验以及分子模拟，大黄酸抑制  $\alpha$ -淀粉酶作用并系统深入研究了其对  $\alpha$ -淀粉酶的相关抑制动力学，并通过分子模拟分析其结合机制，并最终获取大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制机理，以期为其在保健食品和医药领域的更有效应用提供有益的参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

仪器：UV-2450 型紫外-可见分光光度计，日本岛津公司；pHS-3C 型酸度计，上海雷磁仪器厂；MOS 450 型圆二色谱仪，法国 Bio-Logic 公司。

试剂： $\alpha$ -淀粉酶（Porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase, PPA）、可溶性淀粉、大黄酸（分析纯，阿拉丁试剂）；阿卡波糖，Sigma 公司。所有溶液均用去离子水配制，并用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)以保持 pH 6.8 的生理条件。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大黄酸对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用

按酶活性测定方法 Bernfeld 法<sup>[10]</sup>测定，稍作修改。取不同浓度的大黄酸 0.05 mL 和 0.02 mL PPA 溶液(0.3 U/mL)混匀在 PBS 缓冲溶液中，在 37 °C 水浴 20 min，加 1 mL 1%可溶性淀粉继续水浴 10min 加入 1ml DNS 显色剂，混匀后沸水浴 5 min，冷却到室温，定容至 25 mL，在 540 nm 处测定吸光值，根据以下公式计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = (\Delta Abs_{540(\text{空白})} - \Delta Abs_{540(\text{样品})}) / \Delta Abs_{540(\text{空白})} \times 100\%$$

进一步了解大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制是否是可逆的，我们在测定体系中，固定底物的浓度，测定不同  $\alpha$ -淀粉酶和大黄酸浓度下的 OD 值，并根据酶浓度对 OD 值的影响来判断大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶可逆的抑制作用效应。

#### 1.2.2 大黄酸对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制动力学研究

固定  $\alpha$ -淀粉酶的加入量，改变底物的浓度，测定在不同大黄酸浓度下的催化活力。以酶反应的最大初速度的倒数对底物浓度的倒数作图，以 Lineweaver-Burk 双倒数作图，可以判断大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用类型，并求得抑制常数  $K_i$ 。

#### 1.2.3 圆二色光谱的测定

将不同浓度的大黄酸加入到  $\alpha$ -淀粉酶的溶液中，混合均匀，以 pH 6.8 的磷酸盐(0.1 mol/L)缓冲液做空白，在 37 °C 下测定样品溶液的圆二色光谱。应用在线 Dichroweb 软件计算出  $\alpha$ -淀粉酶与大黄酸结合前后的二级结构含量。

#### 1.2.4 大黄酸螯合钙离子实验

钙离子螯合实验参照 Saiga 等<sup>[11]</sup>的方法，在 pH6.8 的磷酸盐(50 mmol/L)缓冲体系中，4 mM 邻苯二酚紫，5  $\mu\text{g/mL}$   $\text{CuSO}_4$ ，和不同浓度的大黄酸溶液，用紫外分光光度计在 632 nm 处测定吸光值，并根据下列公式，求出大黄酸对金属钙离子的螯合能力。

$$\% \text{ Chelating Activity} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

#### 1.2.5 分子对接实验

利用 AUTODOCK4.0 分子模拟软件<sup>[12]</sup>对大黄酸和  $\alpha$ -淀粉酶进行分子对接； $\alpha$ -淀粉酶(PDB:1DHK)从 RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>)<sup>[13]</sup>获取，大黄酸三维分子晶体由 Sybyl1.1 (Tripos Inc., St. Louis, USA)软件画出。分子对接前对配体大黄酸和受体  $\alpha$ -淀粉酶进行结构和能量优化(去水，加氢和加电)，设定 autogrid box 参数 90 Å×90 Å×90 Å，grid spacing 设置为 0.375 Å；选择 autodock 计算方法为 Lamarckian genetic algorithm (LGA)，其他参数默认设置，对接 100 次，输出结果分析应用 PyMol 软件。

### 1.3 数据分析

活性抑制、抑制动力学实验以及二级结构测定均重复三次 (n=3)，采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理，结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大黄酸对 $\alpha$ -淀粉酶的活性抑制

图 2 显示，随着大黄酸浓度的增加 (0~1.0 mM)，抑制率在不断升高，随后大黄酸的浓度达继续增加，对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制能力的趋于平缓，这表明大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用具有浓度依赖性；解析其半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.43±0.02 mM，与阳性对照阿卡波糖相比 (IC<sub>50</sub>为 0.12±0.01 mM)，这意味着大黄酸对  $\alpha$ -

淀粉酶的抑制是明显的。

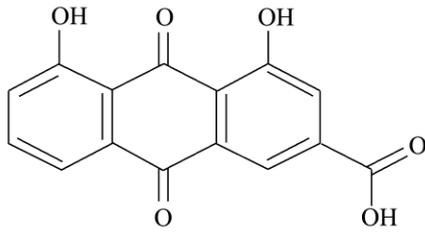


图1 大黄酸的分子结构式

Fig.1 Molecular structure of rhein

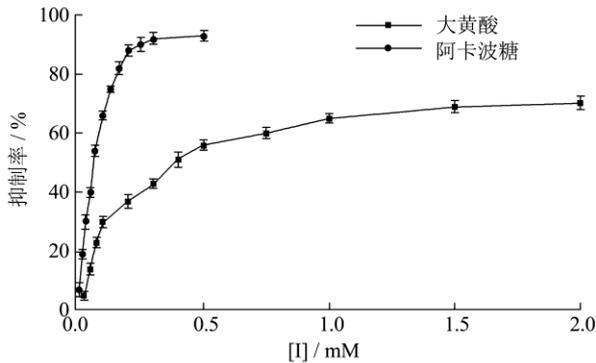


图2 大黄酸对 α-淀粉酶的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of rhein on α-amylase

注: c(α-淀粉酶)=20 μL, c(淀粉)=1 mg/mL, (n=3)。

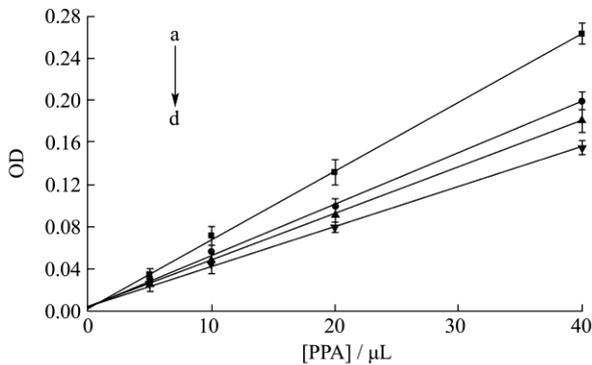


图3 大黄酸对 α-淀粉酶的抑制类型

Fig.3 Inhibitory type of rhein on α-amylase

注: c(淀粉)=1 mg/mL, c(大黄酸)/(mM), a~d: 0, 0.5, 1.0, 2.0, (n=3)。

由图3可知, 在含不同浓度的大黄酸的测活体系中, OD值对α-淀粉酶作图得到一组通过原点的直线, 且随着大黄酸浓度的增加直线的斜率不断降低, 这意味着大黄酸的浓度的增加使酶的活力受到抑制, 并不是通过减少有效酶量引起酶活力下降, 这表明大黄酸对α-淀粉酶的抑制作用是可逆的过程<sup>[14]</sup>。

## 2.2 大黄酸对 α-淀粉酶抑制动力学研究

通过 Lineweaver-Burk 双倒数方程作图, 求得和比较酶催化反应的动力学参数表观米氏常数(K<sub>mapp</sub>)和最大反应速率(V<sub>max</sub>), Lineweaver-Burk 双倒数图

(图4)是相交于纵坐标的一组直线, 这表明体系中 V<sub>max</sub> 保持不变, 而 K<sub>mapp</sub> 逐渐增大, 这是典型的竞争性抑制作用类型<sup>[15]</sup>。这表明大黄酸可能会结合到 α-淀粉酶的活性中心区域并与周围的氨基酸残基发生相互作用, 一方面会与底物竞争活性位点, 另一面会诱导酶的结构发生变化是酶自身的催化活性降低。在此基础上, 通过二级曲线方程  $K_m^{app} = \frac{K_m I}{K_i} + K_m$ ,

求得抑制常数 K<sub>i</sub>=0.35±0.03 mM。

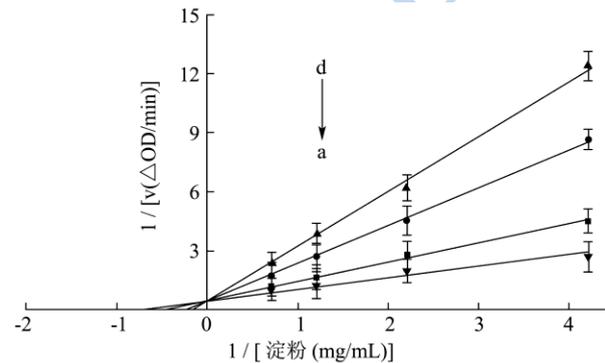


图4 大黄酸抑制 α-淀粉酶的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.4 Lineweaver-Burk plot for inhibition of rhein on α-amylase

注: c(α-淀粉酶)=20 μL, c(大黄酸)/(mM), a~d: 0, 0.5, 1, 2, (n=3)。

## 2.3 大黄酸对 α-淀粉酶二级结构的影响

大黄酸能够竞争性的抑制 α-淀粉酶的活性, 这可能是由于引起酶的结构变化而导致的; 应用在线 Dichroweb 软件计算出 α-淀粉酶与大黄酸结合前后的二级结构含量, 所得结果列于表1中。从表中可以看出游离 α-淀粉酶的 α-螺旋含量为 12.22%, β-折叠含量为 43.24%, 当向 α-淀粉酶中加入大黄酸的浓度达到 2.0 mM 时, α-螺旋含量增加到 22.72%, β-折叠含量降低到 36.43%, 这表明大黄酸诱导 α-淀粉酶构象发生了部分变化, 并且随着 α-螺旋含量的不断增加, α-淀粉酶的结构变得紧密而不利于酶形成活性中心, 致使酶催化淀粉的活力下降<sup>[16]</sup>。

表 1 大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶的二级结构的影响

Table 1 The effects of rhein on the contents of secondary structures of  $\alpha$ -amylase

大黄酸 /mM	$\alpha$ -螺旋 /%	$\beta$ -折叠 /%	$\beta$ -转角 /%	无规则卷曲 /%
0	12.22±1.21	43.24±1.79	20.25±0.58	25.32±0.54
0.5	16.51±0.32	39.29±1.12	20.93±0.48	23.23±1.18
1.0	19.28±0.63	37.12±0.45	21.74±0.72	21.88±0.64
2.0	22.72±1.08	36.43±1.32	21.62±0.79	19.27±0.93

### 2.4 大黄酸对金属钙离子的螯合作用

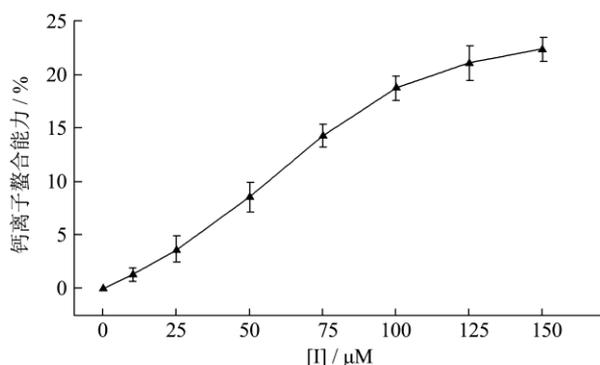


图 5 大黄酸对金属钙离子的螯合作用

Fig.5 Effects of rhein on calcium ion chelation

抑制动力学实验已经验证了大黄酸是一种竞争性  $\alpha$ -淀粉酶的抑制剂，二级结构分析表明大黄酸诱导  $\alpha$ -淀粉酶构象改变而不利于形成活性中心，为了进一步探讨大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制机理，确定其是否与  $\alpha$ -淀粉酶的活性中心钙离子相结合，我们进行了金属钙离子螯合实验。如图 5 所示，随着大黄酸浓度的不断增加，螯合金属钙离子的能力不断增强，但未出现缓慢增加的现象，这可能是由于大黄酸与  $\alpha$ -淀粉酶的活性位点钙离子结合过程中，酶分子的空间位阻导致的。表明大黄酸能够结合到  $\alpha$ -淀粉酶的活性中心，与底物竞争活性位点，最终达到抑制的作用。

### 2.5 大黄酸与 $\alpha$ -淀粉酶的分子对接

从 100 次运行结果中，选取了对接区域最多的和能量最低的位点作为研究对象，也是大黄酸与  $\alpha$ -淀粉酶的最佳结合区域；由图 6 可以看出，大黄酸嵌插到了  $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸残基中 (TRP58、TRP59、TYR62、GLN63、HIS101、VAL163、ARG195、ASP197、GLU233、HIS299 和 ASP300)，并与 TRP59 形成氢键，与 HIS101 和 HIS299 形成  $\pi$ - $\pi$  效应，而 TRP59 和 TYR62 为  $\alpha$ -淀粉酶中催化活性中心的关键残基<sup>[17]</sup>；这意味着大黄酸能够与淀粉竞争  $\alpha$ -淀粉酶的活性区域和改变酶的结构，并与活性中心残基形成氢键和  $\pi$ - $\pi$  效

应，从而会导致  $\alpha$ -淀粉酶的催化效率降低，这与我们上述所做的实验结果是一致的，这也是大黄酸对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制机理。

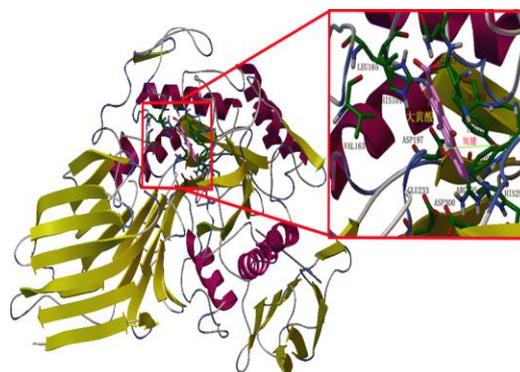


图 6 大黄酸与  $\alpha$ -淀粉酶的分子对接

Fig.6 Molecular docking of rhein and  $\alpha$ -amylase

## 3 结论

研究表明，大黄酸是一种可逆的竞争型  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂 (半抑制率 IC<sub>50</sub> 为 0.43±0.02 mM，抑制常数 K<sub>i</sub> 为 0.35±0.03 mM)；与阳性对照阿卡波糖相比具有一定的  $\alpha$ -淀粉酶抑制作用；圆二色谱分析表明，随着大黄酸浓度的增加， $\alpha$ -螺旋含量逐渐增加，这表明大黄酸能够诱导  $\alpha$ -淀粉酶的构象发生部分改变，使酶结构变得紧密而不利于其形成活性中心；螯合钙离子实验表明大黄酸能够与活性中心钙离子结合，与底物竞争活性中心，从而使  $\alpha$ -淀粉酶活性降低；分子模拟结果表明，大黄酸能够优先结合到  $\alpha$ -淀粉酶的活性中心，并与催化基团 TRP59 和 TYR62 发生相互作用，进而与淀粉竞争活性中心，从而起到抑制作用。

## 参考文献

[1] 师江波,边六交,董发昕.荧光相图法研究猪胰腺  $\alpha$ -淀粉酶在脲和盐酸胍溶液中的去折叠过程[J].分析化学,2006,35(5):707-712  
SHI Jiang-bo, BIAN Liu-jiao, DONG Fa-xin. Unfolding procedure of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase by phase diagram method of fluorescence [J]. Analytical Chemistry, 2006, 35(5): 707-712

[2] 冯健飞. $\alpha$ -淀粉酶的应用及研究进展[J].现代农业科技, 2010,17:354-355  
FENG Jian-fei. Application and research advances of  $\alpha$ -amylase [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010, 17: 354-355

[3] 刘自琴,黄惠华.绿茶和红茶浸提液对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用研究[J].现代食品科技,2010,26(7):680-683  
LIU Zi-qin, HUANG Hui-hua. Inhibition effects of extracts

- from green tea and black tea on  $\alpha$ -amylase [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(7): 680-683
- [4] 莎娜,赵力超,陈永泉. $\alpha$ -淀粉酶对甘薯果脯废糖液澄清效果的研究[J].*现代食品科技*,2007,23(3):27-29  
SHA Na, ZHAO Li-chao, CHEN Yong-quan. Clarification of waste sugar solution by  $\alpha$ -amylase in the production of preserved sweet potato [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(3): 27-29
- [5] 吕凤霞,陆兆新.淀粉酶抑制剂的研究进展[J].*食品科学*, 2002,23(3):152-155  
LV Feng-xia, LU Zhao-xin. The research advance on  $\alpha$ -amylase inhibitor [J]. *Food Science*, 2002, 23(3): 152-155
- [6] 万萍,孙建国,郝刚,等.大黄酸的 HPLC-荧光检测及其在人体药代动力学中的应用[J].*中国药科大学学报*,2013,44(1): 73-76  
WAN Ping, SUN Jian-guo, HAO Gang, et al. Determination of rhein in plasma, urine and feces by HPLC-fluorescence detection and its pharmacokinetics in healthy volunteers [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2013, 44(1): 73-76
- [7] 郭啸华,刘志红,王建平,等.大黄酸对 NOD 小鼠糖尿病肾病的治疗作用观察[J].*肾脏病与透析肾移植杂志*,2002,11(1): 11-16  
GUO Xiao-hua, LIU Zhi-hong, WANG Jian-ping, et al. Rhein halts the progression of diabetic nephropathy in NOD mice [J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2002, 11(1): 11-16
- [8] 郭啸华,刘志红,彭艾,等.大黄酸对 2 型糖尿病肾病大鼠疗效观察[J].*中华肾脏病杂志*,2002,18(4):280-284  
GUO Xiao-hua, LIU Zhi-hong, PENG Ai, et al. Rhein retards the progression of type 2 diabetic nephropathy in rats [J]. *Chinese Journal of Nephrology*, 2002, 18(4): 280-284
- [9] 高小平,张蔚瑜,邹文俊,等.中药提取物中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选[J].*天然产物研究与开发*,2003,15(6):536-538  
GAO Xiao-ping, ZHANG Wei-yu, ZOU Wen-jun, et al. Screening for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from extracts of traditional Chinese medicine [J]. *Natural Product Research and Development*, 2003, 15(6): 536-538
- [10] 陈磊,李秋红,韦庆益,等.山奈酚抑制  $\alpha$ -淀粉酶作用的研究[J].*食品工业科技*,2013,34(22):88-95  
CHEN Lei, LI Qiu-hong, WEI Qing-yi, et al. Study on the inhibition of kaempferol on  $\alpha$ -amylase [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(22): 88-95
- [11] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(12): 3661-3667
- [12] Yan J K, Zhang G W, Hu Y T, et al. Effect of luteolin on xanthine oxidase: Inhibition kinetics and interaction mechanism merging with docking simulation [J]. *Food Chemistry*, 2013, 14: 3766-3773
- [13] Enroth C, Eger B T, Okamoto K, et al. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2000, 97: 10723-10728
- [14] Seong H J, Young B R, Marcus J C, et al. Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of morus lhou [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(4): 1195-1203
- [15] Qiu L, Chen Q H, Zhang J X, et al. Inhibitory effects of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112: 609-613
- [16] 乔薇,巫晓琴,黎峰,等.苯甲醛及其类似物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J].*中山大学学报(自然科学版)*,2007,46(5): 41-44  
QIAO Wei, WU Xiao-qin, LI Feng. Tyrosinase inhibition by benaldehyde and its analogs [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2007, 46(5): 41-44
- [17] Najafian M, Habibi A E, Hezareh N, et al. Trans-chalcone: a novel small molecule inhibitor of mammalian alpha-amylase [J].*Molecular Biology Reports*, 2011, 38: 1617-1620