

天然来源 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法的研究进展范莉^{1,2}, 王业玲¹, 唐丽^{1*}¹中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081; ²华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 武汉 430030

摘要: α -葡萄糖苷酶抑制剂(alpha-glucosidase inhibitors, AGI)是一类通过延缓肠道内碳水化合物的水解和吸收从而到达有效控制餐后血糖上升的糖尿病治疗药物,具有控制餐后血糖、保护胰岛细胞功能及改善多种糖尿病并发症等作用。近10年来, α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选方法由传统的筛选模型迅速发展多种新技术的应用,各种新型筛选模型不断发展应用,从天然资源中寻找新的 α -葡萄糖苷酶抑制剂已成为现如今防治糖尿病的研究热点。本文对 α -葡萄糖苷酶抑制剂的降糖机制及作用特点、从天然资源中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的模型和方法等内容进行整理和归纳,重点对近10年来国内外从天然资源中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的新型筛选模型和方法进行总结和比较,探讨各类方法的特点、存在的问题以及研究思路,为寻找和发现天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂提供基础。

关键词: α -葡萄糖苷酶抑制剂; 筛选方法

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.026

Review on Screening Methods for alpha-Glucosidase Inhibitors from Natural Resources

FAN Li^{1,2}, WANG Ye-ling¹, TANG Li^{1*}¹College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China; ²Department of Pharmacy, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China

Abstract: Alpha-glucosidase inhibitors (AGI) are widely used in the treatment of diabetes as monotherapy and additional therapy, which play the therapeutic effect by delaying the hydrolysis and absorption of carbohydrates in the intestinal tract and effectively controlling postprandial blood glucose concentration. Alpha-glucosidase inhibitors have a variety of effects such as controlling postprandial blood glucose concentration, protecting the function of islet cell and improving the diabetic complications. In recent 10 years, the screening methods of alpha-glucosidase inhibitors have developed rapidly, a variety of new technologies have been developed and applied for screening alpha-glucosidase inhibitors from natural resources. Searching for new alpha-glucosidase inhibitors from the natural resources has become a research focus of prevention and control of diabetes nowadays. In the paper, the hypoglycemic mechanism, function characteristics and screening model of alpha-glucosidase inhibitors from natural resources were summarized. Different models and methods for screening alpha-glucosidase inhibitors from the natural resources both domestic and abroad in the recent years were compared. The characteristics of these methods, the existing problems and research ideas were discussed. The work may provide the basis for searching and discovering the natural alpha-glucosidase inhibitors.

Key words: alpha-glucosidase inhibitors; screening methods

α -葡萄糖苷酶抑制剂(alpha-glucosidase inhibitors, AGI)是用于治疗2型糖尿病的一类药物,目前已经成为单纯饮食控制不佳的2型糖尿病患者的首选药物及1型糖尿病患者使用胰岛素治疗的首选辅

助药物。近年大量临床研究表明, α -葡萄糖苷酶抑制剂能够严格控制餐后血糖的升高,减轻糖尿病患者高糖环境对机体组织、器官的刺激,延缓糖耐量异常患者向2型糖尿病转化的进程,能克服传统降糖药物的一些缺点,在调节糖脂代谢、提高胰岛素敏感性、保护胰岛细胞功能及改善多种糖尿病并发症等方面具有广泛的应用前景^[1]。目前该类药物品种少,上市应用的品种有阿卡波糖、伏格列波糖和米格

收稿日期: 2015-08-28 接受日期: 2015-10-21

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-12-0578); 高等学校学科创新引智计划(B08044); 国家大学生创新创业训练项目(GCCX2013110019)

* 通讯作者 Tel: 86-10-68932633; E-mail: etangli@126.com

列醇等,其制备工艺繁琐成本高,合成研究进展缓慢。因此,越来越多的学者青睐于从天然产物资源中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂,以期寻找到新的安全、有效的药物,现已发现黄酮类、生物碱类、多糖类、酚类等具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性^[2]。随着国内外该领域研究的渐趋活跃,近10年来, α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法迅速发展,由传统的筛选方法发展到多种新技术的应用,高效液相色谱(HPLC)、质谱(MS)、核磁共振(NMR)、液质联用(LC/MS)、毛细管电泳(CE)、荧光等多种研究技术与方法均应用于 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选研究,构建便捷高效、更加符合人体糖尿病病理生理特征的 α -葡萄糖苷酶抑制剂高通量体外筛选模型和方法,对该类降血糖药的研发具有重要的意义。本文对近10年来从天然资源中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的模型和方法进行整理和总结,并探讨各类方法的特点、存在的问题以及研究思路,为天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂类药物的研究与开发提供思路与基础。

1 α -葡萄糖苷酶抑制剂及其降血糖机制

1.1 α -葡萄糖苷酶抑制剂的降血糖机制

α -葡萄糖苷酶是一类存在于小肠黏膜细胞刷状缘处能够从含有葡萄糖苷键底物的非还原端催化水解葡萄糖基的酶的总称,主要包括 α -淀粉酶、麦芽糖酶、蔗糖酶、异构麦芽糖酶、乳糖酶、海藻糖酶等。食物中的多糖如淀粉、蔗糖、麦芽糖经口腔唾液、胰淀粉酶等水解成含少量葡萄糖分子的低聚糖, α -葡萄糖苷酶可在低聚糖的非还原末端切开 α -1,4糖苷键,释放出葡萄糖,经小肠上皮吸收后进入血液形成血糖^[3]。 α -葡萄糖苷酶参与人体糖代谢,参与多糖和寡糖的分解、代谢及吸收过程,对维持人体正常生理功能起着重要作用。 α -葡萄糖苷酶抑制剂的结构类似寡糖、葡萄糖或具氨基糖结构,通过在小肠上皮细胞刷状缘上处可逆性地竞争糖类与 α -葡萄糖苷酶的结合位点(为可逆性结合,经过2~3 h后 α -葡萄糖苷酶抑制剂就被缓慢地水解下来,几乎不被吸收),从而抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,从而延迟多糖和寡糖转化为可吸收的单糖,有效控制糖尿病人餐后血糖的升高,延迟餐后血糖大幅波动对胰腺的刺激,使血糖平稳且缓慢地维持在一定的水平,并改善机体高糖环境造成的外周组织胰岛素敏感性的降

低^[4]。同时在 α -葡萄糖苷酶抑制剂作用下肠内碳水化合物、脂肪、蛋白质等进入回肠远端,可以刺激GLP-1分泌的增加,刺激胰岛素的释放,从而降低餐后血糖浓度^[5]。大量临床数据表明, α -葡萄糖苷酶抑制剂可用于调节糖、脂代谢,改善高胰岛素血症、糖耐量异常,并能有效预防和改善糖尿病大血管及微血管并发症的发生和发展,对治疗和预防糖尿病及血管并发症具有重要的意义。

1.2 α -葡萄糖苷酶抑制剂的类型及其作用特点

目前上市应用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂依据其来源可分为三类,分别为:阿卡波糖(拜唐苹, Acarbose, 德国拜耳公司研发)、伏格列波糖(倍欣, Voglibose, 日本武田公司研发)和米格列醇(Miglitol, 德国拜耳公司研发)。这三种 α -葡萄糖苷酶抑制剂其化学结构均为葡萄糖类似物,阿卡波糖是70年代初自放线菌 *Acetivoplanes strain SE 50* 的培养液中分离得到,伏格列波糖是以天然产物或微生物发酵产物为母体再经化学修饰后获得的,米格列醇是以1-脱氧野尻霉素为母体经化学合成得到的。三种 α -葡萄糖苷酶抑制剂均可有效抑制小肠内 α -葡萄糖苷酶的活性,延缓或抑制葡萄糖在肠道的降解和吸收,从而控制餐后血糖。 α -葡萄糖苷酶属于键专一性酶,可专一性地切开糖类底物分子中的 α -1,4糖苷键,个别种类的 α -葡萄糖苷酶也可以作用于蔗糖的 α -1,2糖苷键。因此,一般来说, α -葡萄糖苷酶对底物要求不甚严格,具有广泛的底物专一性。

三种 α -葡萄糖苷酶抑制剂对酶的抑制活性区别主要表现在其各自抑制酶谱及胃肠道副反应的差别。阿卡波糖的结构为寡糖类类似物,对多种 α -葡萄糖苷酶均有较强的结合与抑制作用,主要抑制葡萄糖淀粉酶、蔗糖酶和胰 α -淀粉酶,能够竞争性抑制并延缓淀粉和蔗糖分解为葡萄糖及其吸收的过程。米格列醇的结构为葡萄糖类似物,其抑制作用更加广泛,对各种 α -葡萄糖苷酶具有较强的竞争性抑制作用,其中对葡萄糖淀粉酶、蔗糖酶、乳糖酶、异麦芽糖酶和海藻糖酶的抑制作用与阿卡波糖相当,但对 α -淀粉酶的作用稍弱。伏格列波糖的结构为含氨基寡糖类类似物,主要对双糖水解酶的抑制作用较强,如对麦芽糖酶、蔗糖酶等的抑制作用特别强,但对 α -淀粉酶几乎无抑制作用,其作用主要在碳水化合物消化的最后一步,抑制双糖水解为单糖。三种 α -葡萄糖苷酶抑制剂的主要副作用都是胃肠道反应,如腹胀、肠鸣、腹痛、腹泻等不良反应,其原因主要是由

于未被彻底消化的碳水化合物在肠道菌群的作用下进行异常发酵而引起。食物中的碳水化合物多为淀粉、寡糖、双糖等复合物,由于其不能经肠道直接吸收,在体内必须先经唾液、胰液中的 α -淀粉酶分解为分子量较小的寡糖,再经小肠上皮刷状缘处的 α -葡萄糖苷酶水解为可吸收的单糖后被吸收。阿卡波糖和米格列醇的抑酶谱较广,不仅能抑制双糖水解酶的活性,也能抑制 α -淀粉酶的活性,从而导致食物中的碳水化合物不能经 α -淀粉酶降解,未完全水解的淀粉、寡糖等物质均会进入小肠下端,在肠道菌群的作用下异常酵解后产生大量气体,从而导致腹胀、肠鸣、腹痛及腹泻等胃肠道副反应。伏格列波糖主要抑制双糖水解酶的活性,而对 α -淀粉酶的抑制作用非常弱,故此进入到小肠下端的未被完全水解的淀粉及寡糖的量较小,仅有部分残余双糖进入到小肠下端,发生异常酵解反应也相应较少,因此其胃肠道副反应比前二者较小^[6-8]。

此外还有一些从传统药物资源中筛选和发现的具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的药材提取物及特定组分,如苦荞、虎杖、桑叶、大豆、知母、枸杞、鸭跖草、石榴花等^[9-16],这些研究绝大多数是针对中草药的粗提取物或一些活性组分,在具体确切的 α -葡萄糖苷酶抑制活性有效成分方面的研究还存在很大不足。应用日新月异的新思路和新技术,结合中医药治疗消渴病的积累,从资源丰富的传统药物和天然药物中筛选和发现具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的活性分子,具有良好的开发前景和应用价值。

2 经典体外筛选模型

经典体外筛选模型主要包括以 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)为底物筛选方法、以糖类(淀粉、蔗糖、麦芽糖)为底物的筛选模型、微孔板筛选模型、固定化酶筛选和 Caco-2 细胞筛选模型 5 种模型和方法,其筛选模型方法、优缺点及应用简介如下。

2.1 以 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷为底物筛选方法

从天然产物中筛选降血糖活性成分最经典、最常见的方法是以 pNPG 为底物的筛选模型,其筛选过程耗材少,耗时短,可在体内直接进行筛选,特别适用于 α -葡萄糖苷酶抑制剂的初筛工作^[5]。pNPG 在 α -葡萄糖苷酶的作用下可分解成为对硝基苯酚(pNP),加入抑制剂后,通过检测酶作用后释放的

pNP 的吸光度来计算各抑制剂的抑制率。黄元等^[17]运用该方法从高寒菊科植物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂,发现苍耳、柳叶菜、风毛菊、多花亚菊、箭叶橐吾、珠光香青能显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性,抑制率达到 50% 以上;蓝萍等^[18]以 α -葡萄糖苷酶为靶标,对知母中活性成分进行分离纯化,发现其 30% 醇洗脱物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性最强且芒果苷为其主要活性成分。

通过比较各抑制剂的抑制率来判断其 α -葡萄糖苷酶抑制活性,但是由于 pNPG 是麦芽糖的类似物,因此该模型只能筛选得到对麦芽糖酶有强抑制活性的物质,无法确定其是否对 α -淀粉酶、蔗糖酶存在抑制作用,同时该模型也无法直接评价筛选得到的降血糖物质在体内的药效作用,存在得到的 α -葡萄糖苷酶抑制剂假阳性率高等缺点。

2.2 以淀粉、蔗糖、麦芽糖为底物的筛选模型

此方法具体筛选过程与以 pNPG 为底物的筛选模型基本相同,是第 2 代的酶-抑制剂筛选模型,与以 pNPG 为底物的筛选模型相比具有一些优点^[19]:假阳性率较低;更为经济快捷;可以分别使用不同的底物和相应的水解酶对抑制剂的抑制活性进行评价,得到其明确的抑制酶谱,明确其作用机制。蔗糖和麦芽糖在 α -葡萄糖苷酶的作用下分解为葡萄糖。通过测定反应体系中葡萄糖生成量的多少,判定抑制剂对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用,根据药物不同浓度下对酶活性的抑制百分率计算出 IC_{50} ,以衡量抑制剂对酶活性的抑制强度。杨秀芳等^[20]以麦芽糖作为底物构建 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型,发现虎杖水提物的乙酸乙酯萃取部位对 α -葡萄糖苷酶有较高的抑制活性,且为非竞争性抑制;高小平等^[21]采用 α -葡萄糖苷酶、淀粉酶及蔗糖酶活性测定方法对 126 种常见中药进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选,从中发现一些富含多酚类物质的中药如地榆、青果、大黄、山茱萸等抑制活性较强,大黄、山茱萸、赤芍、五倍子对三种酶的水解活性均有抑制作用。

虽然相较于以 pNPG 为底物的筛选模型,该模型具有很多优点,但该方法也具有以下缺点:材料来源有限,无法形成规模化生产,价格昂贵,实验成本较高;该模型使用的 α -淀粉酶大多为猪胰型酶,而蔗糖酶、麦芽糖酶及其他 α -葡萄糖苷酶大多来自于酵母,由于生物体间遗传差异导致酶的表达也存在差异,使得体内筛选结果不完全一致;无法直接评

价 α -葡萄糖苷酶抑制剂在体内的药效情况。

2.3 微孔板筛选模型

现如今往往需要同时从成百上千的天然药用植物提取物或者活性组分中筛选得到低毒、安全、有效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,基于上述的筛选模型,一些学者对其进行改进,将原试管中反应改作 96 微孔板为反应载体,大大缩短了筛选所需时间及试剂用量,同时微孔板筛选模型具有样品体积小、灵敏度高且筛选结果相对正确可靠等优点,已大量应用于 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外高通量筛选,但是该模型也具有上述模型的相关缺点。孙晓丽等^[22]采用该法对 63 种药食两用中药材提取物进行筛选,其中荷叶、姜黄、高良姜、黑胡椒、葶苈、桑枝、桑白皮土和茯苓的提取物显示出了较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性;卫强等^[23]运用该方法从木槿叶中分离得到的化合物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂,其中 syriacusin A 和异牡荆素对 α -葡萄糖苷酶有较强的抑制活性。

2.4 固定化酶筛选模型

20 世纪 60 年代以来酶的固定化技术逐渐发展起来,由于它能模拟体内作用,固定化酶筛选模型逐渐被用于 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选当中。 α -葡萄糖苷酶跨越双分子层膜多肽链锚定在膜上时,N 端在内,C 端在外,在进行体内 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选时,与 α -葡萄糖苷酶 N 端相互作用发挥抑制活性的抑制剂会完全失去抑制作用,这导致 α -葡萄糖苷酶体内外药理学效果存在差异,使得体外有强活性的物质在体内不一定有强活性。固定化酶筛选模型上的酶由于 N 端被固定使 α -葡萄糖苷酶与底物的结合受到一定程度的限制,与游离酶相比活力偏低,但是由于其可以模拟酶在小肠壁上的情况,可实际反应体内药效情况^[24]。同时,该模型能被重复利用,从众多的天然产物中更为快速高效地筛选得到天然的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,可直接评价 α -葡萄糖苷酶抑制剂在体内的作用效果及初步探讨其作用机制。卢大胜等^[24]运用该方法发现虎杖水溶性部位和广西血竭的甲醇提取物对固定化 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为 0.224 mg/mL 和 5.5 μ g/mL,具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

2.5 Caco-2 细胞筛选模型

Caco-2 细胞是一种结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞的人克隆结肠腺癌细胞,可表达出典型的小肠微绒毛水解酶和营养物质转运体。首先对 Caco-2 细胞进行接种培养得到 Caco-2 单细胞层,将

蔗糖或麦芽糖作为底物,待测样品加入 Caco-2 细胞腔侧,孵育后测定细胞两面液体中游离葡萄糖浓度来计算抑制率。王明贤等^[25]采用 Caco-2 细胞筛选发现柿叶黄酮对麦芽糖酶、蔗糖酶的抑制作用超过 75%;张海凤等^[26]发现大黄多糖对 Caco-2 细胞模型中的 α -葡萄糖苷酶有一定抑制作用;景赞等^[27]发现西青果提取物在体外和小肠模拟人类结肠 Caco-2 细胞中显示出很强的麦芽糖酶抑制活性,而对蔗糖酶抑制作用不显著。近年来通过 Caco-2 细胞筛选模型不仅可直观考察 α -葡萄糖苷酶抑制剂的抑制作用,而且可以探测出 α -葡萄糖苷酶抑制剂的体内作用机制和靶点,是最能直接反映样品对人体小肠内 α -葡萄糖苷酶抑制作用的模型^[28]。除此之外,该模型不仅可以有效避免假阳性情况的出现,而且可以反映体内降血糖效果。但是此模型对于实验操作条件设备要求相对较高、耗时较长,不适用于大量样品的筛选工作。

3 新型体外筛选模型

近年来,高效液相色谱、质谱及其联用技术等逐渐被应用于高通量筛选模型中,从而取代了传统采用的在活性追踪的指导下对天然药物进行筛选分离及活性成分鉴定等的繁琐步骤和较大的工作量,极大发展了快速、高效、较少用量地便捷筛选和发现天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂的方法。

3.1 基于薄层色谱法的筛选方法

采用薄层色谱法(TLC)进行生物自动化化验在从植物中寻找活性成分的研究中起着十分重要的作用,可以快速得知化合物活性及其相应位置^[29]。Claudia A 等^[30]利用 TLC 对植物提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂进行筛选,发现款冬、大荨麻的甲醇提取物具有一定的 α -葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶抑制活性。其 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选思路如下:首先将 α -葡萄糖苷酶溶液喷洒至 TLC 板上,室温下孵育 60 min。如若样品具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,当样品喷洒至 TLC 板时会出现白色斑点,并通过将样品稀释至不同浓度测定可得到样品在此方法下的检出限。其中不选择传统 pNPG 作为底物的原因是在研究中发现任何 pH 条件下都不能呈现由于 pNPG 分解成 pNP 所产生的黄色背景。此方法可明确得知样品是否有抑制活性,但是不可准确得知其抑制率,实验结果受到限制。Chen 等^[31,32]初步建立了纸色谱法筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂,并将该法用

于筛选知母中 α -葡萄糖苷酶抑制剂,表明知母水提取物以及多糖、皂苷、黄酮组分均为 α -葡萄糖苷酶抑制剂。该法将酶反应、纸色谱和比色法相结合,将麦芽糖、酶、抑制剂反应后的溶液进行点样、展开、显色,剪下色斑,加水浸提,测定生成葡萄糖的吸光度,每种抑制剂都以不加酶的反应样液点样,显色,浸提,比色作为空白对照来扣除纸层析过程中由抑制剂本身所造成的误差,以无抑制剂的空白实验作对照来考察抑制剂对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果。此方法操作及设备简单,但是步骤较为繁琐且灵敏度较低,假阳性出现率高,仍需结合相关色谱技术才能确定活性成分的结构。

3.2 基于高效液相色谱法的筛选模型

高效液相色谱法(HPLC)由于其强大的分离效能成为了一种主要的分离手段,将 HPLC 和其他方法相结合已成为了强有力的抑制剂筛选手段。朱文佳等^[33]以 pNPG 为底物通过高效液相色谱定量分析水解产物 pNP 来确定 α -葡萄糖苷酶的活性,可以克服由于样品本身有颜色带来的假阳性或者抑制率偏高的情况,但是在 HPLC 定量分析条件上的确定相对比较复杂耗时,特别是复杂样品,干扰较多。许芹永等^[34]运用此方法对 72 种药食两用中药进行了 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选,发现了芡实、砂仁、公丁香、甘草、肉豆蔻、覆盆子、青果等 16 种中药提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性达到 100%,并运用此方法对肉桂进行活性成分的追踪分离^[35],得到了肉桂石油醚提取物明显高于阿卡波糖,从中分离得到 2 个活性成分为桂皮醛和肉桂醛。Hu 等^[36]将 HPLC 与固定化酶法相结合对阿卡波糖和 3 种传统中药进行了活性筛选,用磁性金纳米粒固定酶,发现在此条件下该酶显示出强活性和稳定性且能重复利用 10 次,同时对 HPLC 色谱条件进行优化,通过测定其底物峰面积进行抑制率的计算,发现金银花、黄芩具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,但蛇足石杉并不具有该活性,较于传统筛选方法,该方法分离效率高,且固定酶可以重复利用,大大减少了实验耗材。Zhou 等^[37]运用超滤 HPLC 技术对从玉竹中分离得到的化合物进行活性筛选,得到 N-反式-对-香豆酰基去甲辛弗林和 N-反式-对-香豆酰基酪胺对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用,IC₅₀分别为 2.3 和 2.7 μ M。

3.3 基于毛细管电泳法的筛选模型

毛细管电泳(CE)已广泛应用于生物活性筛选的研究当中,是一种新型分析及活性筛选手段。

Guo 等^[38]运用基于电泳介导微量分析的毛细管电泳法对 21 种传统中药进行了 α -葡萄糖苷酶抑制剂活性筛选,发现其中五倍子抑制率可达 100%,抑制活性很强,应用于临床时应降低用量,鸡血藤、丁香、大黄、桑叶、葛根的抑制率在 55% ~ 75% 之间,与阿卡波糖活性相近,其它活性较低。实验中首先将 α -葡萄糖苷酶注入毛细管中,再将终浓度一定含抑制剂的 pNPG 溶液注入毛细管,测定 pNP 的峰面积计算抑制率,在此基础上同时检测了抑制剂的抑制类型。相较于其他传统方法,该方法有效避免了假阳情况的出现和极大简化了实验步骤,已证明为快速、简单、自动化及强有力的酶抑制剂筛选模型。Iqbal S 等^[39]对毛细管电泳的分离条件进行了优化包括 pH 值、缓冲液浓度等以期使得 pNP 和 pNPG 更好地分离,并对该方法进行了方法学验证,结果显示该方法是简单有效的 α -葡萄糖苷酶活性测定及筛选方法。在此基础上,将固定酶与毛细管电泳、高效液相色谱等分离技术相结合,这一筛选模型也逐渐应用于从传统药物中筛选得到抑制剂,具有高选择性、无样品损失、再现性等色谱技术的优点及特异性、敏感性等酶反应的优点^[40]。Zhang 等^[41]采用聚合改进金纳米粒子将 α -葡萄糖苷酶固定增强其稳定性及生理活性,在制得固定化酶的基础上,将 pH 为 7 的缓冲溶液喷射通过固定酶的微反应器,随后将混合的 pNPG 及一定量抑制剂以一定流速喷射通过,用离心管收集留下的溶液,采用毛细管电泳进行成分及含量分析,通过测定产物 pNP 的峰面积来确定其抑制活性,并利用此方法测定了 11 种不同天然药物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,发现葛根、毛皮粉末、赤芍均具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,并发现葛根素、芒果苷及芍药醇分别为其活性成分。

3.4 基于液-质联用的筛选方法

近年来,基于生物活性的 HPLC 成为了广泛应用于生物活性成分筛选的分析手段,因为它可以系统地得知天然药物的成分及具有生物活性的有效成分,同时 LC-MS 技术已成为了强有力的筛选及鉴定天然药物中活性成分的有效分析手段,这一方法可以克服基于活性追踪方法的繁琐分离鉴定及活性测定的过程,极大程度上缩短了实验耗时。Wang 等^[42,43]将基于生物活性的 LC-Q-TOF-MS 筛选模型应用于从放线菌代谢产物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的试验当中,从中得到了 2 个具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的化合物 1-脱氧野尻霉素和米格列醇。

具体过程为:首先采用 HPLC 对样品进行成分分离,用 96 微孔板每 1 min 收集 1 次 HPLC 分离组分,将收集的组分和淀粉溶液、CtMGAM 混合,在 37 °C 下反应 30 min 后终止酶反应,采用葡萄糖氧化酶法计算其抑制率。在此基础上,采用 UPLC-Q-TOF-MS 对活性成分进行富集及鉴定, HPLC-MS/MS 对活性成分进行量化分析,并利用 LC/Q-TOF-MS 技术对所得抑制剂进行了麦芽糖酶的 MGAM-N、MGAM-C 催化区和 α -淀粉酶进行了抑制活性筛选。Deng 等^[44]利用 UHPLC-Q-TOF-MS 和固定化酶亲和捕捉法对绿茶提取物进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选,得到表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,结果显示该法较于传统方法是快速、经济、灵敏且可行的。

基于在线 HPLC 测定及生物化学检测方法的筛选模型已被用于少量酶抑制剂筛选当中,其可以从复杂的传统药材中更为快速、简单、有效的筛选得到单体化合物。Li 等^[45]建立了 HPLC-DAD-MS/MS-BCD 模型对 α -葡萄糖苷酶抑制剂进行筛选,并对柯子肉、玫瑰花、丁香花、石榴壳进行活性筛选,由此得到了两个明确具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的化合物余甘子和鞣花酸。筛选过程为:样品首先经 HPLC 分离,随后洗脱液一部分进行 BCD 中进行 α -葡萄糖苷酶活性测定,另一部分进入 DAD 和 MS 进行化合物结构鉴定。其中活性测定实验采用的方法是将酶及底物 pNPG 均注射入反应器,与洗脱液混合混合,与 37 °C 下反应用 DAD 测定 405 nm 波长下的吸光度。Li 等^[46]将 LC-DAD-MS 和 SORI-CID FTICR MS 联合使用对山楂叶总黄酮提取物进行了 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选,发现 3-O-鼠李糖-(1,4)-葡萄糖鼠李糖槲皮素苷和 C-黄酮苷具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制,且黄酮 B 环上 C-3'-OH 的存在可以明显增强 α -葡萄糖苷酶抑制活性,A 环的 C-6 和 C-8 位发生糖基化后会减弱 α -葡萄糖苷酶抑制活性。具体过程为:首先将 α -葡萄糖苷酶与抑制剂在 37 °C 下孵化 0.5 h,过滤离心分离,冲洗除去未与 α -葡萄糖苷酶结合的物质,得到抑制剂与 α -葡萄糖苷酶的结合物后加入 50% 甲醇进行离心分离,将释放后的活性成分用 LC-MS 分析,同时将抑制剂稀释至适宜浓度后进入 SORI-CID FTICR MS 进行成分分析鉴定,最后运用微孔板筛选模型进行活性测定。基于此方法,不仅可快速从药用植物中筛选得到具

有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的单体化合物,还可以初步探讨其构效关系,为药物设计提供一定依据。相似地,Zhou 等^[47]建立了 UF-LC/MS 和 ESI-MSⁿ 的方法对刺五加进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选,发现其中槲皮素、槲皮苷、金丝桃苷、芦丁、1,5-二咖啡酰奎宁酸等 8 个化合物具有明确的 α -葡萄糖苷酶抑制活性;Ge 等^[48]建立 UHPLC/Q-TOF-MS-FC 筛选模型并将其应用于黄连的活性研究当中,UPLC-Q-TOF-MS 用于鉴定黄连中相应的化学成分,并同时收集馏份用于 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定,发现黄连提取物具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,生物碱是其最主要的活性成分,而酚酸活性较弱,其中黄连碱、表小檗碱、药根碱、黄连素是明确的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

何忠梅等^[49]利用靶向亲和-液相色谱-质谱联用技术(Target molecule affinity-LC-ESI-MSⁿ)对人参茎叶总皂苷中 α -葡萄糖苷酶抑制剂进行了快速筛选,得到了 12 种具有潜在 α -葡萄糖苷酶抑制活性的化合物,同时对其中 5 种化合物(包括人参皂苷 F₂, Rf, Rg₃, Rd, Rb₃)进行了活性验证,发现人参皂苷 Rb₃ 活性最强,该方法利用亲和原理,将具有潜在活性的小分子化合物混合物与受体混合,得到受体-配体复合物和未结合的小分子,通过超滤薄膜将未结合的小分子滤除后,复合物可以用有机溶剂处理,将小分子配体释放出来,采用 LC-MS 联用技术对这些活性分子进行分离和鉴别,已广泛应用于筛选与靶蛋白相结合的药物配体。Yi 等^[50]建立了联合 LC-MS、NMR 及固定化酶磁珠筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的方法,得到桑中 2 个明确具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的化合物异槲皮苷和黄芪苷,主要是基于磁珠上的羧基与 α -葡萄糖苷酶上的氨基可形成酰胺键制取 α -葡萄糖苷酶功能型磁珠,将抑制剂、磁珠及缓冲液混合,在 37 °C 下水浴 2 h,使得能与 α -葡萄糖苷酶作用有效成分与磁珠相互作用,后用缓冲液冲洗得到连接有与 α -葡萄糖苷酶 C 端有相互作用的有效成分的磁珠,随后乙腈冲洗,使有效成分与 α -葡萄糖苷酶功能型磁珠分离,收集洗脱液,采用 HPLC-ESI-MS 及 NMR 进行活性成分鉴定,最后运用经典的微孔板筛选模型对活性成分进行 IC₅₀ 测定。此方法是切实可行的 α -葡萄糖苷酶抑制剂的高通量筛选模型,不仅继承了固定化酶方法的优点,固定了 α -葡萄糖苷酶 N 端,使得筛选得到的抑制剂皆为与 α -葡萄糖苷酶 C 端作用的活性成分,排除了

在体外有活性在体内无活性的假阳性情况,而且将活性成分筛选与鉴定有效结合在一起,减少了以往活性成分筛选上许多繁琐的工作。

3.5 基于核磁共振技术及相关联用技术的筛选方法

核磁共振(NMR)是一种基于生物靶向识别的强有力筛选手段,Shang 等^[51]利用 NMR 技术对桑叶提取物进行 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选,得到 1 个具有潜力的 α -葡萄糖苷酶抑制剂脱氧野尻霉素。同时,将色谱分离技术、光谱技术与生物活性测定方法相结合是近几年发展较为迅速的抑制剂筛选方法,LC-MS 虽然快速、灵敏度,但由于其在化合物结构鉴定上的不足限制了其发展,为弥补此不足,研究者开始将 LC 与 NMR 联用,但是由于 NMR 测定时灵敏度相对较低,Staerk D 等^[52]利用固相萃取技术(SPE)对化合物进行富集,通过提高化合物浓度来提高测定的信噪比,发展了 HPLC-SPE-NMR 平台技术,Schmidt JS^[53]等首次将此技术运用于 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选中,首先运用 HPLC 进行化合物分析,运用传统 96 微孔板筛选方法对化合物进行活性测定,然后运用 SPE 技术对活性成分进行富集,最后通过 NMR 技术对活性单体化合物进行结构鉴定,从苹果皮中筛选得到 3 个活性成分(-)-表儿茶酸、槲皮素-3-D-木糖苷、扁蓄苷。

3.6 基于荧光技术的筛选方法

在新药研发中,通过荧光检测技术高通量筛选蛋白酶、蛋白激酶及其抑制剂、抗体、生长因子等小分子已成为研究领域的热点,现如今荧光技术在高通量筛选中的应用还受到仪器装备、筛选方法和设计能力等条件的限制。Cao 等^[54]设计了一种基于共轭聚合物的信号放大效应的荧光生物传感器来筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂,极大提高了筛选的灵敏度,当存在 pNPG 时,该共轭聚合物的荧光将被猝灭,而加入抑制剂后又被激活。Liu 等^[55]在 β -环糊精包裹量子点的基础上建立了基于荧光检测技术的筛选模型,并通过检测 2,4,6-三溴苯酚和阿卡波糖的抑制活性验证了该方法可行准确。

4 体内筛选

目前,用于评价活性成分 α -葡萄糖苷酶抑制活性作用的指标主要有血糖水平和胰岛素水平。 α -葡萄糖苷酶抑制剂的体内筛选主要是通过建立糖尿病动物模型,观察给药后动物血糖变化,进而对药物进

行药理评价。大多数研究在实验过程中采用正常或糖尿病模型动物,设置空白对照组、阳性对照组(阿卡波糖等该类抑制剂上市药物)和样品组,通过检测实验动物负荷淀粉或者蔗糖等后血糖变化及其相应耐糖量的变化,并结合测定该活性成分对小肠内 α -葡萄糖苷酶的抑制活性来评价其体内降血糖作用。其中高血糖动物模型的构建是该研究的基础和难点,目前国内外对糖尿病动物模型的建立有多种方法,以原发性糖尿病模型和四氧嘧啶、链脲菌素等药物所致糖尿病动物模型为主^[56]。袁海波等^[57]发现五味子能明显降低正常及四氧嘧啶糖尿病小鼠的血糖,降低肾上腺素引起的高血糖,提高正常小鼠的糖耐量;马永雷^[58]研究表明桑枝皮醇溶物可以显著提高正常小鼠的糖耐量,极显著地降低豚佐霉素所致糖尿病模型小鼠的餐后血糖。该模型能够准确地反映活性成分在动物体内的整体药效情况,以便于进行药物作用机制的研究。与体外筛选模型相比,结果假阳性低且更符合实际情况,但是由于建模时间周期较长成本较高,且无法反映药物具体的作用靶点,不适于进行大规模的活性成分筛选工作,可用于筛选得到的活性成分的最终活性验证工作。

5 虚拟筛选

除了以上实验方法以外,随着计算机技术和生物信息学的快速发展,应用计算机虚拟配体技术进行体外筛选也逐渐用于抑制剂的筛选工作中,筛选过程无需消耗样品和其他实验材料,既省时又经济,但是目前应用该技术筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的相关报道较少,如 Nguyen TTH 等^[59]在 WISDOM 环境下运用 Autodock 3.0.5 进行抑制剂体外筛选, Park JH 等^[60]对 α -葡萄糖苷酶进行了同源性建模,并运用 Flex X 和 Autodock 法进行虚拟筛选,对 188 种化合物进行检测,发现 13 种化合物在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时对 α -葡萄糖苷酶抑制活性超过 50%。在此方面研究薄弱,仍需努力,如果能够把它广泛应用于 α -葡萄糖苷酶抑制剂早期筛选工作中,将会大大加快新型 α -葡萄糖苷酶抑制剂类药物研制速度。

6 展望

随着 α -葡萄糖苷酶抑制剂的作用机制研究不断深入以及该类药物在临床的广泛应用,国内外开展了大量的筛选和发现新颖的活性良好的 α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究,从天然资源,尤其是传统药物

资源中寻找和发现新颖的、应用安全的、副作用少的 α -葡萄糖苷酶抑制剂更是新药研究的热点领域。经典的 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选模型存在假阳性及步骤繁琐等缺点,目前从天然药物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂不再单单是从中提取其粗提物及活性部位,逐渐发展为与多种现代分离分析技术相结合,因此基于经典筛选模型衍生出来的筛选新方法也相继广泛地应用,其中LC、MS、NMR、LC/MS、CE、荧光、分子对接等仪器分析方法和技术也逐渐应用于 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选中,显著提高了活性成分的筛选速度和准确性,同时,一些筛选模型将活性筛选和活性成分分离和鉴定紧紧结合在一起,边分离边筛选,在很大程度上节约了时间和实验耗材,值得进一步研究和推广,相信将来有更加新颖、快速、有效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选模型发展起来,为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的发现提供有效的方法和手段。

参考文献

- Guo FX(郭凤霞), et al. The development of pharmacological study of alpha glucosidase inhibitor (AGI). *J Qinghai Norm Univ, Nat Sci*(青海师范大学学报,自科版), 2011, 1:63-66.
- Guo JH(郭建华), et al. Advancement in research of α -glucose inhibitors of Chinese herbal medicine. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:213-216.
- Wang Y(王翼), et al. Progress on research of alpha-glucosidase inhibitors. *Str Pharm J*(海峡药学), 2009, 21(9):4-6.
- Xue YP(薛亚平), et al. Research and development on α -glucosidase inhibitor. *Chin JMAP*(中国现代应用药学杂志), 2005, 22:706-709.
- Zhang L(张丽). Study on the α -glucosidase inhibitory activity from *Luculia pinciana* Hook and *Rubia cordifolia* L. Henan; Henan University(河南大学), MSc. 2007.
- Stephen PC, et al. Acarbose a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs*, 1988, 35:214-243.
- Zhang JC(王家驰). A new generation of alpha-glycosidase inhibitor-Voglibose(Basen). *Chin J Diab*(中国糖尿病杂志), 1999, 7:126-127.
- Scott LJ, et al. Miglitol: a review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 2000, 59:521-549.
- Xue CY(薛长勇), et al. Effective way of tartary buckwheat flavone reducing the level of blood glucose and blood lipid. *Chin J Clin Rehab*(中国临床康复), 2005, 9:111-113.
- Zheng XY(郑晓媛), et al. Inhibition of extracts from *Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati* on α -glucosidase. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2007, 38:735-738.
- Hu JY(胡竞一), et al. Study on α -glucosidase inhibitory activities of *Morus alba* L. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2006, 22(6):44-45.
- Quan JS(全吉淑), et al. Study on α -glucosidase inhibitory activities of soybean isoflavones. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2005, 36:1377-1379.
- Huang F(黄芳), et al. Antidiabetic activity of compounds of extracting from *Anemarrhena asphodeloides*. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2005, 26:332-335.
- Wang LM(田丽梅), et al. The series research on α -glucosidase inhibitory activities of *Lycium barbarum polysaccharides*. *Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2005, 21(3):23-25.
- Wang GP(王国平), et al. Detection for α -glucosidase inhibiting polyhydroxyalkaloid ingredients of *Commelina communis* L. by ESI MS. *Chin Med Mat*(中药材), 2007, 30:157-160.
- Li YH, et al. *Punica granatum* flower extract, a potent α -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J Ethnopharm*, 2005, 99:239-244.
- Huang Y(黄元), et al. Screening of alpha-glucosidase inhibitors from the alpine composite herb extracts. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2008, 39:566-569.
- Lan P(蓝萍), et al. Extraction and identification of structures of α -glucosidase inhibitor from *Anemarrhena asphodeloides*. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2010, 32:1945-1948.
- Wu CF(吴酬飞), et al. Progress on research of screening for α -glucosidase inhibitors from Chinese medicinal herbs. *Int J Pharm Res*(国际药学研究杂志), 2008, 35(1):9-12.
- Yang XF(杨秀芳), et al. Preliminary study on alpha glucosidase inhibitors of *Polygonum cuspidatum*. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2008, 30(1):4-6.
- Gao XP(高小平), et al. Screening for α -glucosidase inhibitors from extracts of traditional Chinese medicine. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2003, 15:536-538.
- Sun XL(孙晓丽), et al. Screening of pancreatic lipase and α -glucosidase inhibitors from Chinese dietary herbs. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2012, 37:1319-1323.
- Wei Q(卫强), et al. Chemical constituents from leaves of *Hibiscus syriacus* and their α -glucosidase inhibitory activities. *Chin Med Mat*(中药材), 2015, 38:915-919.
- Lu DS(卢大胜), et al. Screening for α -glucosidase inhibitors in natural medicines by immobilized enzyme. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2005, 14:1411-1414.

- 25 Wang MX(王明贤), *et al.* Inhibition on α -glucosidase by flavone from leaves of *Disopyros kaki*. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18:232-234.
- 26 Zhang HF(张海凤), *et al.* The research of gallic acid's α -glucosidase inhibition and the hypoglycemic mechanism. *China Pharm*(中国药业), 2011, 20(21):8-10.
- 27 Jing Z(景赞), *et al.* *In vitro* and *in vivo* inhibitory effect of methanol extract from *Terminalia chebula* Retz fruits on α -glucosidase. *Food Chem*(食品科学), 2010, 31:284-287.
- 28 Ji F(季芳), *et al.* Development of α -glucosidase inhibitor from medicinal herbs. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2010, 35:1633-1640.
- 29 Marston A, *et al.* A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem Anal*, 2002, 13(1):51-54.
- 30 Claudia A, *et al.* A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts. *Phytochem Anal*, 2009, 20:511-515.
- 31 Chen HM, *et al.* A new method for screening α -glucosidase inhibitors and application to Marine Microorganisms. *Pharm Biol*, 2004, 42:416-421.
- 32 Chen LH(陈丽华), *et al.* Screening of α -glucosidase inhibitors from *Rhizoma Anemarrhenae* by paper chromatography. *Contem Chem Indust*(当代化工), 2013, 42:889-892.
- 33 Zhu WJ(朱文佳), *et al.* Study of screening method for α -glucosidase inhibitors *in vitro*. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2012, 33:171-175.
- 34 Xu QY(许芹永), *et al.* High throughput screening of α -glucosidase inhibitors in edible traditional Chinese medicine. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2012, 33:110-113.
- 35 Xu QY(许芹永), *et al.* The research of α -glucosidase inhibitors from *Cortex Cinnamoni*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:1246-1249.
- 36 Hu FL, *et al.* Development of high performance liquid chromatography with immobilized enzyme onto magnetic nanospheres for screening enzyme inhibitor. *J Chromatogr B*, 2008, 187:67-71.
- 37 Zhou XL, *et al.* Separation and purification of α -glucosidase inhibitors from *Polygonatum odoratum* by stepwise high-speed counter-current chromatography combined with Sephadex LH-20 chromatography target-guided by ultrafiltration-HPLC screening. *J Chromatogr B*, 2015, 985:149-154.
- 38 Guo LP, *et al.* Screening α -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. *J Pharm Biomed*, 2010, 53:1250-1253.
- 39 Iqbal S, *et al.* Development of a fast and efficient CE enzyme assay for the characterization and inhibition studies of α -glucosidase inhibitors. *J Sep Sci*, 2013, 36:3623-3628.
- 40 Girelli AM, *et al.* Application of immobilized enzyme reactor in online high performance liquid chromatography: A review. *J Chromatogr B*, 2005, 819:3-16.
- 41 Zhang AZ, *et al.* Screening α -glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles. *Food Chem*, 2013, 141:1854-1859.
- 42 Wang LQ, *et al.* Bioactivity-Based HPLC tandem Q/TOF for alpha-glucosidase inhibitors. Screening, identification, and quantification from actinomycetes. *Lat Am J Pharm*, 2012, 31:693-698.
- 43 Wang LQ, *et al.* An integrated strategy of ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and virtual screening for the identification of α -glucosidase inhibitors in acarviostatin-containing complex. *J Chromatogr A*, 2013, 1319:88-96.
- 44 Deng SR, *et al.* Screening of α -glucosidase inhibitors from green tea extracts using immobilized enzymes affinity capture combined with UHPLC-QTOF MS Analysis. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50:2582-2584.
- 45 Li DQ, *et al.* A novel sample preparation and on-line HPLC-DAD-MS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts: Case study of α -glucosidase. *J Pharm Biomed*, 2014, 88:130-135.
- 46 Li HL, *et al.* Screening and structural characterization of α -glucosidase inhibitors from Hawthorn Leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MSⁿ and SORI-CID FTICR MS. *J Am Chem Soc*, 2009, 20:1496-1503.
- 47 Zhou H, *et al.* Screening and determination for potential α -glucosidase inhibitors from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by using UF-LC/MS and ESI-MSⁿ. *Phytochem Anal*, 2012, 23:315-323.
- 48 Ge AH, *et al.* An activity-integrated strategy involving ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and fraction collector for rapid screening and characterization of the α -glucosidase inhibitors in *Coptis chinensis* Franch. (Huanglian). *J Pharm Biomed*, 2014, 100:79-81.
- 49 He ZM(何忠梅), *et al.* Screening and structures characterization of α -glucosidase inhibitors from total saponins of ginseng stems and leaves by ultrafiltration LC-MSⁿ. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2013, 41:1694-1698.
- 50 Tao Y, *et al.* Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27:148-155.