

基于磁性纳米粒子的垫状卷柏提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选

彭丹丽, 高琼, 匡菊香, 王安俊, 邓世星, 蒋永梅*, 王刚*
(遵义医科大学, 贵州 遵义 563000)

摘要: 目的 基于磁性纳米粒子筛选垫状卷柏提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂。方法 以 Fe_3O_4 为起始底物合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, 以其为底物进一步合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$, 并通过戊二醛将 α -葡萄糖苷酶固定在氨基修饰的磁性纳米粒子的表面, 得到固定化酶, 与95%乙醇提取物相互作用, 利用抑制剂与酶活性位点特异性结合的策略, 从中垂钓出目标化学成分。结果 α -葡萄糖苷酶成功固定在 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ 表面, 且具有酶活性。垂钓所得化合物经HPLC分析, 并与标准物质对比, 确定了2种活性成分。通过分子对接技术, 模拟了活性成分与 α -葡萄糖苷酶的结合情况。结论 本研究建立了基于磁性纳米粒固定化酶的配体垂钓方法, 可从垫状卷柏提取物中筛选出2种潜在的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

关键词: 垫状卷柏; 磁性纳米粒子; α -葡萄糖苷酶抑制剂; $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$; 配体垂钓

中图分类号: R284.3

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)07-2446-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.052

酶具有底物选择性强、高效、环保等优点, 被应用于众多领域^[1-2], 但易被外界环境影响, 导致其在实际应用过程中稳定性较差, 同时回收利用等问题制约了其产业化应用^[3]。固定化酶能够改善酶的理化性质^[4], 在很大程度上规避了上述问题^[5], 同时利用载体的磁性可以实现底物与酶的快速分离, 提高产品纯度与质量。酶的固定化方法众多, 交联法利用双功能或多功能试剂在酶分子之间、酶分子与载体分子间通过 -NH_2 、 -SH 等进行交联反应, 形成固定化酶^[6]。

糖尿病被世界卫生组织定义为由多种原因引起代谢紊乱的一种慢性病^[7], 人体摄入的多聚糖首先在消化道被水解为低聚糖, 接着被 α -葡萄糖苷酶水解生成葡萄糖, 从而提高餐后血糖水平^[8]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂可抑制 α -葡萄糖苷酶活性, 减慢机体对葡萄糖的摄取, 从而达到降血糖的作用^[9]。

垫状卷柏为卷柏科卷柏属植物垫状卷柏 *Selaginella pulvinata* (Hook. & Grev.) Maxim. 的干燥全草, 《神农本草经》将其列为上品^[10]。它具清热解毒、活血通经等功效^[11], 现代药理研究表明其提取物表现出较好的抗氧化、降糖等活性^[10]。本实验以 Fe_3O_4 为起始底物制备固定化酶, 通过配体垂钓法从垫状卷柏中垂钓活性物质, 与标准物质进行对比识别, 随后测定活性成分的酶抑制活性, 并运用分子对接技术研究抑酶机理。

1 材料

1.1 试剂与药物 穗花杉双黄酮对照品(批号CYKZ0653, 纯度 $\geq 97\%$, 成都草原康生物科技有限公司);

扁柏双黄酮对照品(批号S123011693, 纯度 $\geq 97\%$, 上海士锋生物科技有限公司); 槲皮素对照品(批号210921, 纯度 $\geq 97\%$, 成都瑞芬思生物科技有限公司); 阿魏酸对照品(批号210720, 纯度 $\geq 97\%$, 成都植标化纯生物技术有限公司)。对硝基苯- α -D-葡萄糖苷(批号C14600474)、考马斯亮蓝G-250、85%磷酸(上海麦克林生化科技有限公司); α -葡萄糖苷酶(批号N09IS231474, 上海源叶生物科技有限公司)。纳米 Fe_3O_4 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 硅酸乙酯(TEOS, 山东科源生化有限公司); 氨水(上海凇恩科技发展有限公司); 50%戊二醛、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)(天津希恩思生化科技有限公司); 甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、无水碳酸钠(上海迈瑞尔化学技术有限公司); NaOH(成都市科龙化工试剂厂)。垫状卷柏(产地贵州铜仁)经遵义医科大学药学院生药学教研室张玉金副教授鉴定为卷柏科卷柏属植物垫状卷柏 *Selaginella pulvinata* (Hook. & Grev.) Maxim. 的全草。

1.2 仪器 JJ-1B恒速电动搅拌器(常州苏瑞仪器有限公司); S10-3恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); GZX-9070MBE电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); DZF真空干燥箱(上海力辰邦西仪器科技有限公司); SHA-C水浴恒温振荡器(常州国宇仪器制造有限公司); YM-060S语盟牌超声波清洗机(深圳市方奥微电子技术有限公司); 722可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); Thermo352酶标仪(上海木森生物科技有限公司); O3100高效液相色谱仪[依利特(苏州)分析仪器

收稿日期: 2024-09-12

基金项目: 遵义市科技计划项目[遵市科合HZ字(2022)379号]

作者简介: 彭丹丽(2000—), 女, 硕士生, 从事天然药物研究。E-mail: 15120396728@163.com

*通信作者: 蒋永梅(1993—), 女, 硕士, 助教, 从事天然药物研究。E-mail: 18385042506@163.com

王刚(1978—), 男, 博士, 教授, 从事天然药物研究。E-mail: wg8855350@zmu.edu.cn

有限公司]。

2 方法

2.1 提取液制备 取垫状卷柏粉末 20.0 g, 加入 240 mL 95% 乙醇, 90 °C 回流提取 2 h, 重复 2 次, 提取液合并、浓缩后用 95% 乙醇定容至 100 mL, 即得, 再置于水浴锅上干燥, 得提取物, 去离子水复溶。

2.2 色谱条件 Supersil ODS2 色谱柱 (4.6 mm×25 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0~19 min, 35%~60% A; 19~30 min, 60%~70% A; 30~40 min, 70%~100% A; 40~45 min, 100%~35% A); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 330 nm; 进样量 20 μL。

2.3 磁性纳米固定化 α-葡萄糖苷酶制备 参照贾映彤等^[12]报道的方法, 并稍作修改。取 Fe₃O₄ (20 nm) 100 mg, 置于三颈烧瓶中, 加入 100 mL 80% 乙醇超声处理 10 min, 转移到搅拌器上, 搅拌过程中分别加入 1.0 mL 氨水和 1.0 mL TEOS, 室温反应 6 h, 磁吸分离, 水和无水乙醇交替洗至中性, 60 °C 真空干燥, 得 Fe₃O₄@SiO₂, 取 100 mg, 置于三颈烧瓶中, 加入 100 mL 无水乙醇, 超声处理 10 min, 转移到搅拌器上, 搅拌过程中加入 3.0 mL APTES, 室温反应 6 h, 磁吸分离, 水和无水乙醇交替洗涤 3 次, 60 °C 真空干燥, 得 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂。

取 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 10 mg, 加入 2 mL 无水乙醇与 PBS 缓冲液 (0.1 mol/L, pH=7.4) 超声处理 20 min, 再加入 400 μL 50% 戊二醛, 涡旋 1 min, 振摇 (37 °C、25 r/min) 4 h, 磁吸弃去上清, PBS 缓冲液洗涤固形物 3 次, 得戊二醛修饰后的磁性纳米。称取适量 α-葡萄糖苷酶, 0.10 mol/L PBS 缓冲液溶解, 加入表面醛基修饰的磁性纳米粒, 振摇 (37 °C、25 r/min), 磁吸弃去上清, PBS 缓冲液洗涤固形物 3 次, 即得, 4 °C 保存。

2.4 结构表征 采用傅里叶红外光谱 (FT-IR) 和扫描电子显微镜 (SEM), 证实表面改性和 α-葡萄糖苷酶结合成功。

2.5 固定化酶制备条件优化 以相对催化效率为指标, 采用单因素试验分别考察缓冲液 pH (6、7、8、9、10)、固定化时间 (1、2、3、4、5 h) 和 α-葡萄糖苷酶浓度 (0.1、0.4、0.8、1.2、1.6 mg/mL) 对固定化酶性质的影响。

2.6 α-葡萄糖苷酶活性测定 参照文献 [13] 报道, 并略做修改。取固定化酶 3 mg, 加入 125 μL PBS 缓冲液 (0.1 mol/L, pH=6.8), 37 °C 孵育 20 min, 随后加入 25 μL p-NPG (4 mmol/L) 溶液, 37 °C 继续孵育, 15 min 后立即加入 50 μL Na₂CO₃ (0.2 mol/L), 取 150 μL 上述混合液至 96 孔板中, 在 405 nm 波长处测定吸光度, 计算相对酶抑制率, 公式为相对酶抑制率 = (A/A_m) × 100%, 其中 A 为不同反应条件下的吸光度, A_m 为不同反应条件下的最大吸光度。

2.7 α-葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型建立 为了进行特异性检测, 将固定化 α-葡萄糖苷酶加入含有标准 α-葡萄糖苷酶抑制剂槲皮素和标准非 α-葡萄糖苷酶抑制剂阿魏酸的混合

溶液中^[14-15]。将 3 mg 固定化酶加到 2 mL 槲皮素、阿魏酸混合溶液 (S0) 中, 37 °C 孵育 5 h, 经外部磁条分离后收集上清液 (S1), 2 mL 磷酸缓冲液洗涤 3 次 (S2~S4), 固形物中加入 2 mL 甲醇, 洗脱 3 次, 外部磁条分离后收集上清液 (S5~S7), 采用 HPLC 法分析 S0~S7 中活性成分。

2.8 α-葡萄糖苷酶抑制剂筛选 取固定化酶 3 mg, 加入 150 μL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH=7.4) 混匀, 再加入 2 mL 垫状卷柏提取物溶液 (S0), 涡旋 2 min, 37 °C 孵育 5 h, 孵育结束后磁吸分离上清液 (S1), 2 mL PBS 缓冲液洗涤固定化酶 3 次 (S2~S4), 2 mL 甲醇洗脱 3 次, 磁吸分离固定化酶并收集上清液 (S5~S7)。S0~S7 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析, 并与标准物质 (S8) 进行对比。

2.9 α-葡萄糖苷酶抑制剂体外降血糖活性评价

2.9.1 体外酶活性抑制试验 参考文献 [16-17] 报道的方法, 并稍作调整, 以阿卡波糖 (终质量浓度 160 μg/mL) 为阳性对照, 对 2 个化合物 (终质量浓度 160 μg/mL) 进行 α-葡萄糖苷酶抑制活性检测。设置样品组 (80 μL PBS+20 μL 样品+25 μL 酶溶液)、样品对照组 (105 μL PBS+20 μL 样品)、阴性对照组 (80 μL PBS+20 μL 甲醇+25 μL 酶溶液), 每组平行测定 3 次, 在 96 孔板中进行反应, 37 °C 孵育 20 min, 随后加入 25 μL PNPG (4 mmol/L) 继续孵育 15 min, 迅速加入 50 μL Na₂CO₃ 终止反应, 在 405 nm 波长处测定吸光度, 计算抑制率, 公式为抑制率 = [1 - (A - A₀) / A₁] × 100%, 其中 A 为样品组吸光度, A₀ 为样品对照组吸光度, A₁ 为阴性对照组吸光度。

2.9.2 分子对接模拟 从 PDB 数据库中提取 α-葡萄糖苷酶 (PDB ID: 3A4A) 蛋白信息, 下载 pdb 结构, 将其作为蛋白受体的初始结构并进行残基补全, 采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件进行处理, 加氢, 保存电荷, 赋予对接原子类型, 并生成 pdbqt 文件用于对接。首先, 采用 ChemBioDraw 软件生成阿卡波糖、扁柏双黄酮 (HIN) 分子的 2D 文件, ChemBio3D 软件生成分子的 PDB 文件, 分子力学力场版本 2 (Molecular Mechanics force field version 2) 方法对小分子进行能量最小化, 参数 Minimum RMS Gradient 设为 0.01, 用于后续分子对接。然后, 采用 ADT 处理配体, 生成 pdbqt 文件用于对接。受体和配体的文件准备好后, 采用 AutoGrid 软件生成 GPF (Grid Parameter File) 文件, 用于计算受体和配体的格点能以及格点中心、范围等参数。最后读取受体、配体的 pdbqt 文件, 打开 Grid Box, 格点间距设为 0.375, 对接盒子的中心坐标设为 (15.068, -23.863, -21.554), X、Y、Z 方向上的格点数设为 126 Å×126 Å×126 Å。采用 Autodock4 软件预测结果, 选择复合体的对接结果中评分最好的对接模型代表最有利的对接模式, 选择拉马克遗传算法对接 20 次。

3 结果

3.1 固定化酶反应机理 首先, TEOS 在氨水的碱性催化作用下发生水解反应, 生成硅醇 (Si-OH) 基团, 它们之

间发生缩聚反应，形成硅氧键 (Si-O-Si)，同时 Fe_3O_4 纳米粒子表面存在的羟基 (-OH) 与 TEOS 水解产生的硅醇基团发生缩聚反应，随着反应的进行硅氧键更多地形成， Fe_3O_4 纳米粒子表面形成一层硅基涂层。其次，APTES 水解生成硅醇基团，与硅基修饰纳米粒子表面的硅醇基团发生缩聚反应，形成硅氧键 (Si-O-Si)，随着反应进行 APTES 氨基端暴露在纳米粒子的最外层，形成氨基修饰的表面，此外多个 APTES 分子可能会相互交联，形成一个网络结构，进一步稳定修饰层。最后，氨基修饰纳米粒子表面的氨基 (-NH₂) 与戊二醛的一个醛基 (-CHO) 发生反应，形成中间体，其不稳定脱水形成稳定的席夫碱 (C=N 双键)，戊二醛的另一个醛基与 α -葡萄糖苷酶表面的氨基 (主要是赖氨酸残基的 ϵ -氨基) 发生类似反应，通过这个过程， α -葡萄糖苷酶被共价键固定在氨基修饰的纳米粒子表面，见图 1。

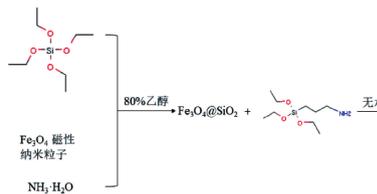


图 1 固定化 α -葡萄糖苷酶合成反应图

3.2 结构表征 FT-IR 证实了表面改性和 α -葡萄糖苷酶结合的成功。由图 2 可知， Fe_3O_4 磁性纳米粒子的 O-H 伸缩振动在 3415 cm^{-1} 处，在 1626 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 O-H 变形振动。 Fe-O 伸缩振动的特征吸附峰对应于 552 cm^{-1} 处。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2$ 的红外光谱在 1091 cm^{-1} 处显示出明显的 Si-O 弯曲振动吸附峰， 2923 、 2848 cm^{-1} 分别归属于 -CH₂ 和 C-H 的伸缩振动吸附峰。 Fe_3O_4 磁性纳米粒子和 APTES 相互作用， Fe-O 伸缩振动吸附带从 552 cm^{-1} (Fe_3O_4 磁性纳米粒子) 处转移至 558 cm^{-1} ($\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2$) 处，表明 APTES 修饰成功^[18-19]。固定 α -葡萄糖苷酶后，Si-O 弯曲振动的峰值发生了蓝移^[20]。游离 α -葡萄糖苷酶在 1647 、 1559 cm^{-1} 处出现 C=O 伸缩振动、N-H 弯曲振动吸收峰，当酶固定于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2$ 后，C=O 伸缩振动、N-H 弯曲振动吸收峰分别红移至 1641 、 1549 cm^{-1} 处。 Fe_3O_4 磁性纳米粒子呈球形或近球形结构，表面较为光滑，出现以一定程度的团聚现象 (图 3A)。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2$ 表面可观察到一层薄薄的包覆层，这是对 Fe_3O_4 磁性纳米粒子功能化所致 (图 3B)。固定化 α -葡萄糖苷酶因酶分子附着，表面较粗糙，单个粒子的轮廓较模糊，整体上呈现出更加致密的结构 (图 3C)。上述结果显示表面改性成功，即 α -葡萄糖苷酶固定于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2$ 上。

3.3 固定化反应参数优化 TEOS 水解生成硅醇 (Si-OH) 基团，通过缩聚反应在 Fe_3O_4 磁性纳米粒子表面形成一层硅基涂层，得硅基修饰 Fe_3O_4 磁性纳米粒子；APTES 水解生成硅醇基团与硅基修饰纳米粒子表面的硅醇基团发生缩聚反应，使得 APTES 的氨基端暴露在纳米粒子的最外层，

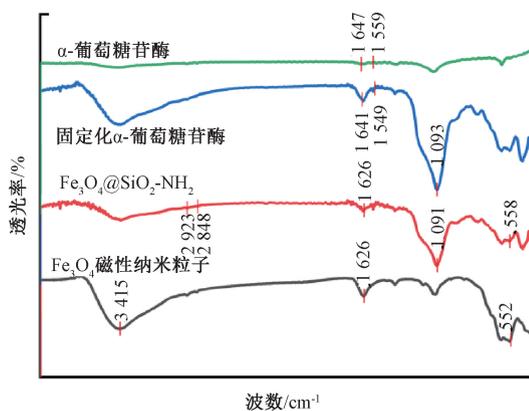
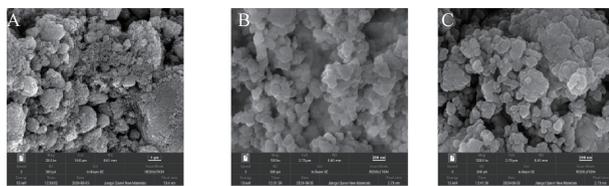


图 2 各磁性纳米粒子 FT-IR 光谱图



注：A 为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子，B 为 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2$ ，C 为固定化 α -葡萄糖苷酶。

图 3 各磁性纳米粒子扫描电子显微镜图

形成氨基修饰的表面，得氨基修饰 Fe_3O_4 磁性纳米粒子；氨基修饰纳米粒子表面的氨基和 α -葡萄糖苷酶表面的氨基分别与戊二醛的 2 个醛基 (-CHO) 发生反应，使得 α -葡萄糖苷酶被共价固定在氨基修饰的纳米粒子表面。如图 4A 所示，当缓冲液 pH 值为 7 时，相对催化效率最高；当缓冲液为酸性或者碱性时，相对催化效率均较低，说明酸性、碱性环境都不利于席夫碱反应 (双功能试剂戊二醛作为交联剂，其与 Fe_3O_4 磁性纳米粒子及酶分子的氨基发生席夫碱反应^[21-22]) 的正向进行，因此，制备固定化酶选用的缓冲液 pH 值为 7。当固定化时间为 4 h 时，固定化酶的相对催化效率最高 (图 4B)，随着时间延长酶分子聚集在磁性纳米粒表面，酶分子活性位点的暴露减少，从而相对催化效率大大降低 (图 4B)，因此，选择 4.0 h 作为制备固定化酶的最佳反应时间。如图 4C 所示，在 $0.1\sim 0.8\text{ mg/mL}$ 范围内，固定化酶的相对催化效率逐渐升高；但随着质量浓度继续增加，相对催化效率呈降低趋势，其原因可能是高质量浓度的 α -葡萄糖苷酶会导致酶分子聚集，阻碍了酶分子表面的氨基与戊二醛的醛基进行反应；也可能是溶液中残留有未与磁性纳米粒结合的戊二醛，形成酶-戊二醛-酶而降低酶活性。因此，选用 0.8 mg/mL α -葡萄糖苷酶制备固定化酶。

3.4 筛选模型建立 由图 5 可知， 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗涤 3 次后，未与固定化酶结合的成分被洗去，而与其结合者被甲醇洗脱，证明固定化酶配体垂钧具有特异性。

3.5 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选 为了进一步证实固定化酶的实用性，采用配体垂钧法来筛选垫状卷柏提取物中的抑制剂。由图 6 可知，共筛选得到 2 个化合物，并与标准物

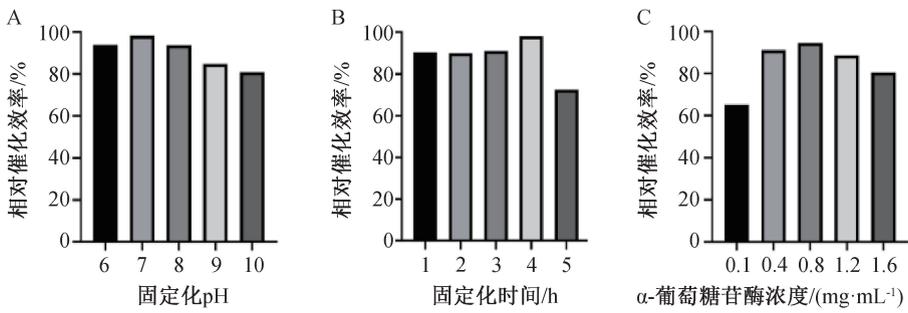
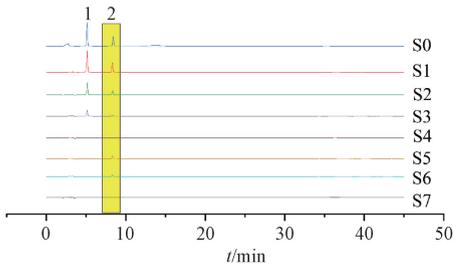
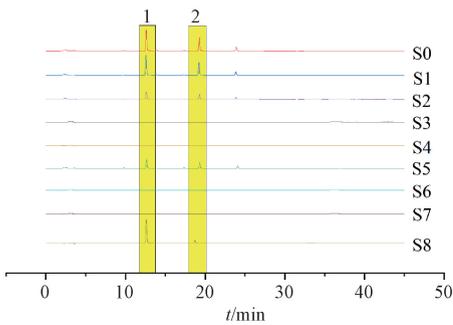


图4 各因素对固定化酶性质的影响



1. 阿魏酸 2. 槲皮素

图5 混合溶液经固定化酶筛选过程的HPLC色谱图



1. 穗花杉双黄酮 2. 扁柏双黄酮

图6 垫状卷柏提取物经固定化酶筛选过程的HPLC色谱图

质对比, 确定均为双黄酮类, 分别是穗花杉双黄酮和扁柏双黄酮。

3.6 活性化合物的体外酶抑制实验 由图7可知, 穗花杉双黄酮及扁柏双黄酮均对 α -葡萄糖苷酶具有抑制作用, 阿卡波糖、扁柏双黄酮、穗花杉双黄酮对 α -葡萄糖苷酶的IC₅₀值分别为0.12、0.14、29.75 μ g/mL, 进一步证实从卷柏提取物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的可行性。

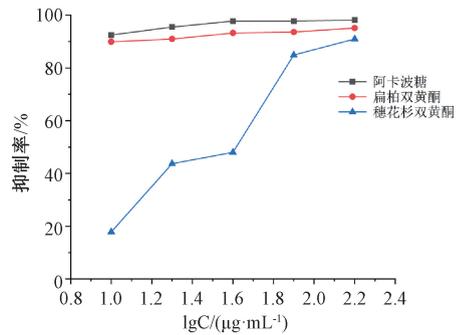
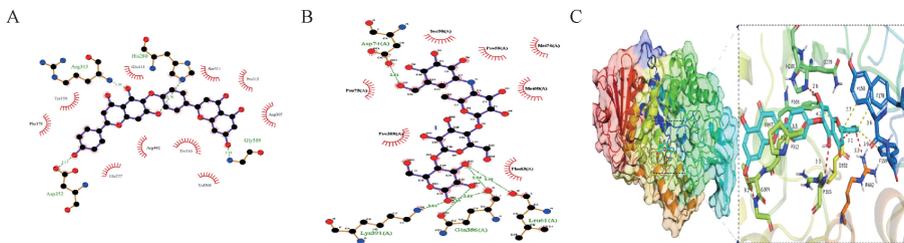


图7 各活性化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

3.7 分子对接模拟 扁柏双黄酮是垫状卷柏中典型的双黄酮, 故选择其通过 AutoDock 4.2 软件实现对接。由图8可知, HIS280、GLY309、ARG315、GLN352、ARG442 是重要氨基酸, 与小分子形成氢键; Thr158、PHE178、GLU277、ASP307、VAL308、THR310、SER311、PRO312、GLU411 是参与范德华作用的残基, 是辅助分子稳定结合的重要部分。从空间形态上看, 小分子三个环深入活性位点内部, 符合锁钥契合学说, 小分子扁柏双黄酮与 α -葡萄糖苷酶结合; 酶蛋白 A 链中的 Asp74、Leu61、Gln386、Lys391 参与了酶与阿卡波糖的氢键, 且阿卡波糖与蛋白的疏水相互作用的残基主要有 A 链中的 Ser58、Pro59、Met76、Met60、Phe63、Pro75、Pro388。结果表明, 扁柏双黄酮、阿卡波糖结构不同, 故两者与 α -葡萄糖苷酶存在不同的氢键作用、疏水作用; 扁柏双黄酮能和更多的氨基酸残基形成氢键, 发生疏水作用; 阿卡波糖与蛋白的结合能为-1.37 kcal/mol, 而扁柏双黄酮为-10.977 kcal/mol, 即具有更强的结合能力, 上述结果与 α -葡萄糖苷酶抑制活性实验相符。



注: A 为扁柏双黄酮与 α -葡萄糖苷酶的相互作用, B 为阿卡波糖与 α -葡萄糖苷酶的相互作用, C 为 α -葡萄糖苷酶和扁柏双黄酮的结合全局图及局部结合放大图。

图8 分子对接结果

4 讨论与结论

本实验探究了功能化磁性纳米粒子的合成及其在天然抗 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选中的应用。首先, Fe_3O_4 磁性纳米粒子表面的羟基 (-OH) 与 TEOS 水解产生的硅醇基团发生缩聚反应, 在纳米粒子表面形成一层硅基涂层, APTES 水解生成的硅醇基团进一步与其反应形成硅氧键 (Si-O-Si), 随着反应进行 APTES 的氨基端暴露在纳米粒子的最外层, 形成氨基修饰的表面。戊二醛通过席夫碱反应将酶与氨基修饰的纳米粒子结合, 制备得功能化磁性纳米粒子固定化 α -葡萄糖苷酶。FT-IR、SEM 结果表明, α -葡萄糖苷酶成功固定于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ 上。固定化技术、磁性纳米粒子具有高比表面积和良好的生物相容性、磁响应性, 使得固定化酶在热稳定性、酸碱稳定性、重复使用性、贮存稳定性等方面均优于游离酶, 从而固定化酶具有更高的实用价值。其次, 配体垂钓法结果表明, 固定化酶可区分已知的 α -葡萄糖苷酶配体和非配体, 并利用该方法从垫状卷柏提取物中成功筛选出了2种潜在的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 体外酶抑制实验亦证明两者抑制作用, 并利用分子对接技术解释了酶与活性成分的作用, 为从其他天然产物中筛选功效物质提供了理论依据和研究途径。

参考文献:

[1] 韩志萍, 叶剑芝, 罗荣琼. 固定化酶的方法及其在食品中的应用研究进展[J]. 保鲜与加工, 2012, 12(5): 48-53.

[2] Rehman S, Bhatti H N, Bilal M, et al. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Pencillium notatum* lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 1161-1169.

[3] 王 曼. 淫羊藿提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选与制备[D]. 镇江: 江苏大学, 2022.

[4] 解婉莹, 董墨思, 李苏红. α -半乳糖苷酶固定化的研究进展[J]. 粮油食品科技, 2016, 24(3): 92-97.

[5] 张玮玮, 杨慧霞, 薛 屏. 功能化磁性纳米粒子在固定化酶研究中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(4): 392-400.

[6] 陈 辉, 黄惠华. 菠萝皮渣羧甲基纤维素/海藻酸钠复合水凝胶珠固定化菠萝蛋白酶的制备及稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 131-134; 141.

[7] 李晓雪. 紫苏黄酮的提取工艺优化、含量分析及降糖活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.

[8] Salar U, Khan K M, Chigurupati S, et al. New hybrid hydrazinyl thiazole substituted chromones: As potential α -amylase inhibitors and radical (DPPH & ABTS) scavengers[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 16980.

[9] Lansakara L H M P R, Liyanage R, Perera K A, et al. Nutritional composition and health related functional properties of *Eleusine coracana* (finger millet) [J]. *Procedia Food Sci*, 2016, 6: 344-347.

[10] 孙允红, 王晓晴, 赵方舒, 等. 垫状卷柏的化学成分、药理作用现代研究及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(11): 115-121.

[11] 蔡 蕊, 于远洋, 谢 宁, 等. 垫状卷柏中化学成分的分离及其抑制肿瘤细胞增殖活性[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(9): 1507-1514.

[12] 贾映彤, 高志贤, 崔建升. 两种氨基修饰的四氧化三铁磁性纳米颗粒的制备与表征[J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(1): 1-5.

[13] Wang Z, Li X Q, Chen M H, et al. A strategy for screening of α -glucosidase inhibitors from *Morus alba* root bark based on the ligand fishing combined with high-performance liquid chromatography mass spectrometer and molecular docking[J]. *Talanta*, 2018, 180: 337-345.

[14] Grintzalis K, Georgiou C D, Schneider Y J. An accurate and sensitive Coomassie brilliant blue G-250-based assay for protein determination[J]. *Anal Biochem*, 2015, 480: 28-30.

[15] Abdel M A, Salem H H, Almaghaslah D, et al. Flavonol glycosides; *In vitro* inhibition of DPPIV, aldose reductase and combating oxidative stress are potential mechanisms for mediating the antidiabetic activity of *Cleome droserifolia*[J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5864.

[16] Zhao J Q, Wang Y M, Yang Y L, et al. Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from "Liucha" (young leaves and shoots of *Sibiraea laevigata*) [J]. *Food Chem*, 2017, 230: 117-124.

[17] Zhang B W, Li X, Sun W L, et al. Dietary flavonoids and acarbose synergistically inhibit α -glucosidase and lower postprandial blood glucose[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(38): 8319-8330.

[18] Zhang L, Wu H B, Lou X W. Metal-organic-frameworks-derived general formation of hollow structures with high complexity[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(29): 10664-10672.

[19] Feng J C, Yu S R, Li J, et al. Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe_3O_4 nanoparticles[J]. *Chem Eng J*, 2016, 286: 216-222.

[20] Cheng G R, Xing J P, Pi Z F, et al. α -Glucosidase immobilization on functionalized Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for screening of enzyme inhibitors[J]. *Chin Chem Lett*, 2019, 30(3): 656-659.

[21] Wubshet S G, Brighente I M C, Moaddel R, et al. Magnetic ligand fishing as a targeting tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -glucosidase inhibitory ligands and alkylresorcinol glycosides from *Eugenia catharinae*[J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(11): 2657-2665.

[22] Li Y F, Chen Y, Xiao C Y, et al. Rapid screening and identification of α -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 960: 166-173.