

## 酶抑制剂类抗糖尿病药物的分子水平筛选方法研究进展

张海枝, 刘鹏, 李川, 刘长鹰

天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

**摘要:** 酶抑制剂类抗糖尿病药物是目前药物研究的热点, 而药物筛选技术是制约此类抗糖尿病新药研发速度的关键步骤。主要从分子水平总结近年来报道的与糖尿病相关的酶抑制剂类候选药物的筛选方法, 包括传统方法和前沿方法, 着重介绍极具潜力的毛细管电泳法、质谱法、生物传感法和微通道筛选方法等。

**关键词:** 抗糖尿病药物; 酶抑制剂; 分子水平; 药物筛选方法

中图分类号: R977.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)08-0947-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.08.028

## Research progress on drug screening methods at the molecular level for enzyme inhibitors used as anti-diabetic drugs

ZHANG Hai-zhi, LIU Peng, LI Chuan, LIU Chang-ying

Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract:** Various enzyme inhibitors have been demonstrated to be a hotspot in the research area of anti-diabetic drugs, whose development has been greatly limited by the efficiency of diverse drug screening methods. This paper concerns on different types of drug screening methods in the molecular level for enzyme inhibitors used in diabete treatment, including both traditional and advanced methods. Importantly, several screening methods with great potential have been emphasized here, such as capillary electrophoresis, mass spectrometry, biosensors, screening methods based on microchannel and so on.

**Key words:** anti-diabetic drugs; enzyme inhibitors; molecular level; drug screening methods

糖尿病是全世界发病率最高的疾病之一, 是一种与胰岛素产生和作用异常相关、以高血糖为主要特征的代谢性疾病。现有报道证实, 体内参与血糖调节的多种酶已经成为抗糖尿病药物作用的关键靶点, 可为研制治疗糖尿病的药物提供新途径。以靶标酶为作用对象的酶抑制剂可有效抑制血糖的升高, 减缓糖尿病并发症的发生和发展, 是抗糖尿病药物研究的希望所在<sup>[1-2]</sup>。目前报道的可用于治疗糖尿病的酶抑制剂包括 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂、醛糖还原酶(AR)抑制剂、一氧化氮合酶(NOS)抑制剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、基质金属蛋白酶(MMPs)抑制剂、蛋白质酪氨酸磷酸酶1B(PTP-1B)抑制剂、果糖-1,6-二磷酸酶抑制剂、磷酸二酯酶(PDE)抑制剂、环氧酶-2(COX-2)抑制剂、二肽基肽酶-IV(DPP-IV)抑制剂等<sup>[3]</sup>。

近年来, 组合化学的快速发展已经解决了酶抑制剂类候选药物的大批量合成问题, 而如何快速高效准确地筛选出此类抗糖尿病新药是药物研发中的关键难题。现有报道中关于酶抑制剂类候选药物的筛选方法较多, 根据所选用的材料和药物作用的对象以及操作特点, 可将这些方法大致分为4个水平: 整体动物水平、组织器官水平、细胞水平和分子水平。其中, 基于分子水平的酶抑制剂类药物筛选方法具有反应体积小、筛选速度快、药物作用机制明确, 可实现大规模筛选等优点, 在药物筛选方面具有广阔的应用前景。基于此, 本文详细综述了酶抑制剂类抗糖尿病药物的分子水平筛选方法, 力图为这类药物的高通量筛选提供借鉴和参考, 以期提高抗糖尿病新药的研发速度。目前文献中报道的与糖尿病相关的酶抑制剂类药物分子水平筛选方法主要

收稿日期: 2014-06-28

作者简介: 张海枝(1985—), 女, 湖北黄冈市人, 博士, 助理研究员, 研究方向为分析化学。Tel: (022)23006859 E-mail: zhanghz@tjipr.com

分为传统方法和前沿方法。其中,传统筛选方法包括虚拟筛选、紫外-可见分光光度计法、荧光检测法和高效液相色谱法(HPLC)。近年来广受关注的前沿筛选方法包括毛细管电泳法(CE)、质谱法、生物传感法和微通道筛选方法等。

## 1 传统方法

### 1.1 虚拟筛选

虚拟筛选是针对酶的三维结构或定量构效关系(QSAR)模型,从现有小分子数据库中搜寻与靶标酶结合或符合QSAR模型的化合物,进行实验筛选研究。该方法目前已用于PTP-1B抑制剂、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂、AR抑制剂和DPP-IV抑制剂的筛选<sup>[4-5]</sup>。以 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选为例,利用虚拟筛选可从带有不同烷基链结构的绿原酸衍生物中筛选出高效抑制剂。与传统高通量筛选相比,虚拟筛选具有高效、快速和经济等优势。但是,目前许多酶的结构确定并未测定,极大地限制了虚拟筛选的应用。

### 1.2 紫外-可见分光光度计法

紫外-可见分光光度计法是最传统的酶抑制剂筛选方法,在抗糖尿病药物筛选中的经典实例为:以对硝基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷或葡萄糖为底物筛选 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,目前筛选得到的高效抑制剂包括一系列1H-1,2,3-三唑糖类衍生物、2-脱氧-2,2-二卤代糖苷和羟基香豆素类衍生物等<sup>[6-8]</sup>。紫外-可见分光光度计筛选方法操作简单,对仪器要求低(普通酶标仪),但是灵敏度较低,测定信号易受干扰,对酶和底物的消耗量不容忽视。

### 1.3 荧光检测法

荧光检测法是利用荧光底物与靶标酶及抑制剂候选药物共同作用,通过检测反应底物或产物的荧光信号变化来进行候选药物筛选。这种方法灵敏度高(检测限达到0.1  $\mu\text{g/mL}$ )、耗时短,并且通常在多孔板上进行,满足高通量药物筛选的需求,是目前使用最为广泛的酶抑制剂类抗糖尿病药物筛选方法<sup>[9-11]</sup>。如利用新型荧光探针构建DPP-IV抑制剂筛选体系,可实现3 841种化合物的快速筛选,发现表苯丁抑制素对DPP-IV有强烈抑制作用,可作为潜力药物进行开发<sup>[9]</sup>。荧光筛选方法虽然使用广泛,但是其缺陷也不容忽视,荧光物种的选择十分有限,并且由于没有引入分离步骤,样品中其他荧光物种极易对测定信号产生干扰。

### 1.4 高效液相色谱法

HPLC法在酶抑制剂筛选方面使用得较为广

泛,通常与紫外测定法、荧光测定法或质谱法联用。由于引入了高效的分离步骤,检测信号具有高准确度,但是多采用离线方式进行,HPLC只是作为单纯的分离检测手段,需要进行复杂的样品前处理过程<sup>[12-13]</sup>。目前可用于一系列N-烷基-脱氧野尻霉素衍生物中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选。

## 2 前沿方法

### 2.1 毛细管电泳法

毛细管电泳技术的出现为分子水平药物筛选技术的发展提供了新的策略和方向。由于其具有样品消耗量小、分析速度快、效率高、可集成化等优点,已逐渐成为酶抑制剂类药物筛选的有力工具,特别是能够在生理环境或接近生理环境下运行、维持酶活性,模拟实际生理环境中酶与抑制剂之间相互作用,非常有利于准确评价药物作用,为发现新型高效的酶抑制剂类抗糖尿病药物提供有效筛选途径<sup>[14]</sup>。

值得关注的是,毛细管电泳法的操作模式多样化和可集成化为形成集样品(酶、抑制剂和底物)在线混合、反应、分离和检测于一体的药物快速筛选平台提供了可能。通过选择合适的样品进样方式和调控毛细管内电渗流,可在线控制样品的混合和反应。通过与多种检测器相结合,实时监测反应产物或底物的信号变化,构建一体化的毛细管电泳筛选平台,可实现多种酶抑制剂类抗糖尿病药物的筛选,如毛细管电泳筛选方法与荧光检测器联用,构建在线的电泳辅助微分析系统,可高效测定多种天然产物结构如咖啡酸、槲皮素、白藜芦醇、氨基葡萄糖和多西环素对MMPs的抑制作用,实现天然产物中MMPs抑制剂候选药物的筛选<sup>[15]</sup>;毛细管电泳筛选方法与质谱联用,通过优化ESI-MS测定参数,建立具有高灵敏度(比传统的全扫描MS检测方法提高60倍)、高效、快速、准确的药物筛选方法,可用于四环素类抗生素和天然产物中MMPs抑制剂的寻找<sup>[16]</sup>;毛细管电泳筛选方法与二极管阵列检测器联用,在毛细管内将酶反应和产物检测结合起来,实现了多种ACE抑制剂如卡托普利、赖诺普利及其他类似结构成分的筛选研究<sup>[17]</sup>。

同时,毛细管电泳技术中用到的毛细管内壁具有丰富的硅羟基,极易进行修饰反应,为多种酶的固定化提供了有效途径。基于固定化酶建立的酶抑制剂筛选方法可大大减少酶的使用量,降低成本。现有报道表明,利用离子液体将与糖尿病相关的

ACE固定在毛细管壁,通过依次进样及合理调控电渗流,可实现多种天然提取物中ACE抑制剂的快速筛选<sup>[18]</sup>。

## 2.2 质谱法

质谱技术能够通过测定离子化后分子的质荷比得到相关分子的相对分子质量。近年来,随着质谱技术的不断完善及各种高性能质谱仪器的出现,质谱被越来越多地应用于分子水平药物筛选研究中。在酶抑制剂类抗糖尿病药物筛选方面,基于质谱技术构建的筛选方法主要分为两大类:一类是利用高分辨率的生物质谱实时监测酶与抑制剂相互作用;另一类是将新型质谱技术与传统分离技术相结合,建立更精确、更有效的酶抑制剂筛选方法。

以基质辅助激光解吸附-飞行时间(MALDI-TOF)质谱和电喷雾质谱(ESI-MS)为代表的现代生物质谱技术,由于具有高灵敏度和高质量检测范围,为实时测定酶及相关抑制剂的相互作用提供了必要的技术手段并逐步形成了独具特色的生物质谱筛选技术。这一筛选技术的思路是:通过调整质谱参数,观察靶标酶-抑制剂复合物在气相状态下的稳定性,进而比较不同抑制剂与靶标酶的相互作用强弱。目前,这种基于测定生物大分子相对分子质量的质谱筛选技术仅仅用于AR抑制剂的筛选<sup>[19-20]</sup>,从索伯尼尔和托瑞司他的结构类似物中进行候选药物筛选。该方法使用并不广泛,推测有两个原因,一是目前许多酶的结构确定并未测定,限制了生物质谱筛选的应用;二是酶-抑制剂在气相状态的结合情况并不能十分有效的反映溶液体系中结合状态与抑制作用。

随着质谱技术的完善更新,新型质谱技术与传统液相分离技术相结合为酶抑制剂类药物筛选提供了全新的思路。高效的分离手段保证了质谱测定信号的准确度,质谱信号则直接提供有效的抑制剂结构信息,将药物筛选与药物结构确证过程合二为一,简单方便。这种方法适用于复杂体系中候选药物的筛选,包括中药提取物以及生物菌液提取物。将超滤液相色谱-光电二极管阵列检测器-电喷雾质谱技术与傅里叶变换离子回旋共振质谱相结合,可筛选山楂叶总黄酮提取物中的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,并对活性较强抑制剂进行结构解析,得到4种抑制活性较强的结构,包括牡荆素、槲皮素糖苷以及两种黄酮糖苷。利用此技术对一系列黄酮及其糖苷结构的抑制活性进行分析,发现黄酮结构中B环的C-3

上有取代基时抑制活性增强,A环的C-6或8上有取代基时,抑制活性减弱<sup>[21]</sup>。利用超高效液相色谱-四级杆-时间飞行器质谱技术与虚拟筛选相结合,可对一系列天蓝黄链霉菌复合物结构的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性进行测定比较,进而筛选得出抑制活性最强的天蓝黄链霉菌复合物ABI656<sup>[22]</sup>。通过建立集样品前处理,样品反应和样品监测于一体的高效液相色谱-二极管阵列检测器-质谱-生物化学检测器体系,可实现诃子果实提取物、玫瑰花提取物、丁香花提取物以及石榴壳提取物中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选,发现鞣酸、鞣料云实素和鞣花酸具有较强的抑制活性<sup>[23]</sup>。

## 2.3 生物传感法

生物传感器是在生命科学和材料科学高速发展、融合的基础上形成的一项新技术。在酶抑制剂筛选方面,其是将靶标酶作为识别元件与理化换能器有机结合,依据待测物质的量与所产生信号之间的比例关系来达到检测的目的。因其具有快速、灵敏度高、特异性强、可实现实时检测、在线检测等优点,目前在酶抑制剂类抗糖尿病药物筛选中显示出巨大的应用潜力<sup>[24]</sup>。综合文献报道,根据换能系统的不同,其可分为电化学生物传感器和光学生物传感器,前者是指电导/电容生物传感器等,后者包括表面等离子体共振(SPR)生物传感器和光纤生物传感器等。

电导/电容生物传感器是一种发展较为成熟的传感方法,通常是将靶标酶固定在电极表面,利用修饰好的电极与底物-抑制剂溶液接触,记录一定电压下产生物的电流信号,通过对比不同抑制剂条件下的信号进行候选药物的筛选。在酶抑制剂类抗糖尿病筛选方面,这一方法已用于 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂和PDE抑制剂的筛选,并取得了初步成果<sup>[25-26]</sup>。利用普鲁士蓝薄层修饰玻碳电极构建的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选体系,在研究阿卡波糖和格列美脲的抑制活性时,显示出了较高的灵敏度和准确度,为其他结构类似物的抑制活性筛选提供了有效途径。利用电化学传感技术,同样可以简单直接地研究海洋贝类分泌物对于PDE的抑制作用,为海洋药物的开发奠定基础。

SPR传感器是基于在金属薄膜和电介质界面处,光能够激发产生表面等离子体共振的现象为基础的光学检测系统<sup>[27]</sup>。其具有方便、快捷、无需标记、实时检测、非破坏性及高选择性等特点,是检

测酶、底物和抑制剂之间相互作用的有效工具,已被广泛应用于酶抑制剂类药物的筛选。目前报道的使用实例是将靶标酶固定于金属膜表面,监控溶液中的抑制剂与酶的结合过程。在酶-抑制剂复合物形成或解离过程中,金属膜表面溶液的折射率发生变化,随即被SPR生物传感器检测出来,通过回归分析得出结合曲线并且计算出酶与抑制剂的平衡解离常数。目前,这一方法可用于筛选天然多肽类ACE抑制剂,已从食物来源的多肽中筛选出酪蛋白肽F174ALPQY179作为ACE的高效抑制剂( $IC_{50}$ 为4.3  $\mu\text{mol/L}$ ,平衡解离常数为3~4  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>[28]</sup>。利用SPR技术对1 120种合成的小分子化合物进行多次筛选,最终得出10个具有芳基哌啶结构的PTP-1B高效抑制剂<sup>[29]</sup>。在小分子类MMPs抑制剂筛选研究中,利用SPR技术对一系列候选化合物进行筛选,得到两个活性较强的抑制剂( $IC_{50}$ 最小为290 nmol/L)<sup>[30]</sup>。同样利用该技术对绿茶提取物中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂进行筛选,发现咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和表没食子儿茶素没食子酸酯对靶标酶具有较强抑制作用<sup>[31]</sup>。由于SPR生物传感器不需要对被检测样品进行预处理、操作简单、响应时间短、检测灵敏度高、特异性强,因而在近5年内得到快速发展,已显示出广阔的应用前景。

基于生物传感器建立的可视化测定方法也已用于分子水平药物筛选中。利用纳米金颗粒和近红外荧光淬灭探针构建的MMPs抑制剂筛选体系,可直接通过肉眼观测并比较不同抑制剂对MMPs作用的大小,筛选出高效的抗糖尿病药物<sup>[32]</sup>。

#### 2.4 微通道筛选方法

近10年来,微/纳尺度分析概念的提出使得分子水平药物筛选方法朝着样品微量化的方向不断发展,微通道筛选方法(微流控芯片及微阵列)正是在这种背景下应运而生。微通道筛选方法是基于在微米尺度的空间中对流体进行操控,具有将生物和化学实验室的基本功能微缩到一个几平方厘米大小的芯片上的能力。其基本特征和最大优势是多种单元技术在微小可控平台上的灵活组合和规模集成。目前,在分子层面的单元操作主要包括进样、样品处理、混合、反应及分离等,并且已被看成是最有可能满足高通量筛选要求的新兴技术平台之一<sup>[33]</sup>。

这一筛选方法的关键之处在于微通道的设计制作和流体的可控操作,而候选药物筛选机制与监测方法通常参见传统的荧光方法或紫外-可见分光光

度法。目前该方法在酶抑制剂类抗糖尿病药物筛选方面处于研究起步阶段,实例较少。依据现有文献报道,通过设计制作独特的Y字形通道,并调控不同通道中底物与抑制剂的加入量,可使得通道内形成一个底物浓度均一,抑制剂浓度呈梯度变化的微型筛选平台,快速准确得出不同抑制剂的 $IC_{50}$ ,为酶抑制剂类药物筛选提供新的思路<sup>[34]</sup>。同时,选用微阵列作为酶-底物-抑制剂的反应容器,利用纳米液滴技术来精准调控微阵列上加样位点和反应区域,与传统的荧光底物法相结合,可实现400种氨基酸衍生异羟肟酸类化合物对MMPs抑制作用的高效快速筛选,结果表明结构中含有芳香氨基酸(Trp/Tyr),小分子氨基酸(Ala),疏水性氨基酸(Leu/Ile),碱性氨基酸(Lys/Arg)和极性氨基酸(Gln/Asn)残基的化合物具有较强的抑制作用<sup>[35]</sup>。虽然这一微型集成化的筛选方法目前报道并不多见,但是其代表着未来高通量药物筛选方法的发展方向。从样品微量化、操作自动化、仪器功能集成化和成本节约等多角度出发,这种方法都能显示出卓越的优势和广阔的应用前景。

#### 2.5 其他方法

最近报道的酶抑制剂类抗糖尿病药物的分子水平筛选方法除了上述4种以外,还有核磁共振法、HPLC在线筛选方法以及新型的荧光底物法。核磁共振筛选方法是利用高分辨率的核磁共振仪实时观测PTP-1B酶与抑制剂结构片段的结合情况,进一步进行结构组合和设计,筛选出具有高活性的PTP-1B抑制剂类药物<sup>[36]</sup>。这种方法无需样品前处理,操作简单,但是对仪器要求较高。HPLC在线筛选方法是将固定化酶技术与HPLC分离相结合,构建集酶反应、反应液分离、检测于一体的在线筛选体系,大大地降低了昂贵酶的消耗量<sup>[37]</sup>,目前可用于筛选比较中草药提取物(黄芪、金银花和蛇足石杉)对于 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用。新型的荧光底物法主要集中于新型荧光底物的合成与开发<sup>[38]</sup>。

#### 3 展望

目前,组合化学技术的快速发展为药物研究开辟了新的天地,使药物及先导化合物的合成速度大大提高,然而,组合库中多组分的分析及筛选工作往往耗时较长,不能满足快速筛选的需要。这一现状对酶抑制剂类抗糖尿病药物的分子水平筛选方法提出了更高的要求,在沿用传统药物筛选方法的基础上,研究并开发新型酶抑制剂类分子水平药物筛

选方法势在必行。随着各种分析理念的提出和新型分析仪器的开发,酶抑制剂类抗糖尿病药物分子水平筛选方法的研究将沿着以下两条思路发展:一是采用各种新型材料及其独特的光、电性质,开发并建立新的药物筛选方法,如利用具有独特发光性质的纳米金颗粒或具有良好导电性能的碳纳米管等建立更为灵敏的生物传感方法;二是各种分子水平筛选方法的高度集成化和自动化,形成高通量药物筛选平台,实现快速高效的药物筛选,如具有多通道的微流控芯片,微阵列分析等。

#### 参考文献

- [1] 张杰, 张楠, 林燕, 等. 糖尿病治疗药物及其作用靶点研究进展 [J]. 上海医药, 2010, 31(5): 231-232.
- [2] 王小彦, 王玉丽, 徐为人. 近几年治疗糖尿病热点靶点的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 42-45.
- [3] 刘霞, 冯长根. 酶抑制剂在抗糖尿病药物中的应用研究 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(2): 89-91.
- [4] Cosconati S, Marinelli L, La Motta C, *et al.* Pursuing aldose reductase inhibitors through in situ cross-docking and similarity-based virtual screening [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(18): 5578-5581.
- [5] Narayana Moorthy N S, Ramos M J, Fernandes P A. Comparative structural analysis of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors on difference species: a computational study [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2012, 345(4): 265-274.
- [6] Ferreira S B, Sodero A C, Cardoso M F, *et al.* Synthesis, biological activity, and molecular modeling studies of 1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates  $\alpha$ -glucosidases inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(6): 2364-2375.
- [7] Zhang R, McCarter J D, Braun C, *et al.* Synthesis and testing of 2-deoxy-2, 2-dihaloglycosides as mechanism-based inhibitors of  $\alpha$ -glycosidases [J]. *J Org Chem*, 2008, 73(8): 3070-3077.
- [8] Shen Q, Shao J, Peng Q, *et al.* Hydroxycoumarin derivatives: novel and potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(23): 8252-8259.
- [9] Kawaguchi M, Okabe T, Terai T, *et al.* A time-resolved fluorescence probe for dipeptidyl peptidase 4 and its application in inhibitor screening [J]. *Chem Eur J*, 2010, 16(45): 13479-13486.
- [10] Díaz L, Casas J, Bujons J, *et al.* New glucocerebrosidase inhibitors by exploration of chemical diversity of N-substituted aminocyclitols using click chemistry and in situ screening [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(7): 2069-2079.
- [11] Ward R A, Perkins T D, Stafford J. Structure-based virtual screening for low molecular weight chemical starting points for dipeptidyl peptidase IV Inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2005, 48(22): 6991-6996.
- [12] Rawlings A J, Lomas H, Pilling A W, *et al.* Synthesis and biological characterisation of novel N-alkyl-deoxynojirimycin  $\alpha$ -glucosidases inhibitors [J]. *Chembiochem*, 2009, 10(6): 1101-1105.
- [13] Lahogue V, Réhel K, Taupin L, *et al.* A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity [J]. *Food Chem*, 2010, 118(3): 870-875.
- [14] 李偶连, 刘翠, 陈缙光. 毛细管电泳和微流控芯片在药物筛选中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(22): 1910-1914.
- [15] Hai X, Wang X, El-Attug M, *et al.* In-capillary screening of matrix metalloproteinase inhibitors by electrophoretically mediated microanalysis with fluorescence detection [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(1): 425-430.
- [16] Wang X, Dou Z, Yuan Y, *et al.* On-line screening of matrix metalloproteinase inhibitors by capillary electrophoresis coupled to ESI mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 930: 48-53.
- [17] Van Dyck S, Nováková S, Van Schepdael A, *et al.* Inhibition study of angiotensin converting enzyme by capillary electrophoresis after enzymatic reaction at capillary inlet [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1013(1/2): 149-156.
- [18] Tang Z M, Kang J W. Enzyme inhibitor screening by capillary electrophoresis with an on-column immobilized enzyme microreactor created by an ionic binding technique [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(8): 2514-2520.
- [19] Potier N, Barth P, Tritsch D, *et al.* Study of non-covalent enzyme-inhibitor complexes of aldose reductase by electrospray mass spectrometry [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 243(1/2): 274-282.
- [20] Rogniaux H, Dorsselaer A V, Barth P, *et al.* Binding of aldose reductase inhibitors: correlation of crystallographic and mass spectrometric studies [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999, 10(7): 635-647.
- [21] Li H L, Song F R, Xing J P, *et al.* Screening and structural characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS(n) and SORI-CID FTICR MS [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(8): 1496-1503.
- [22] Wang L Q, Cui Q X, Hou Y Y, *et al.* An integrated strategy of ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and virtual screening for the identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in acarviosatin-containing complex [J]. *J Chromatogr A*,

- 2013, 1319: 88-96.
- [23] Li D Q, Zhao J, Xie J, *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  $\alpha$ -glucosidase [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88: 130-135.
- [24] 宋玲玲, 肖 瑞, 陈苏红. 生物传感器的应用 [J]. *医学综述*, 2012, 18(10): 1441-1443.
- [25] Timur S, Anik U.  $\alpha$ -Glucosidase based bismuth film electrode for inhibitor detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 598(1): 143-146.
- [26] Campàs M, de la Iglesia P, Fernández-Tejedor M, *et al.* Colorimetric and electrochemical phosphodiesterase inhibition assays for yessotoxin detection: development and comparison with LC-MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2321-2330.
- [27] 刘 星, 黄 庆, 府伟灵. 表面等离子共振生物传感器的研究进展及发展趋势 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(3): 341-343.
- [28] Zidane F, Zeder-Lutz G, Altschuh D, *et al.* Surface plasmon resonance analysis of the binding mechanism of pharmacological and peptidic inhibitors to human somatic angiotensin I-converting enzyme [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(48): 8722-8731.
- [29] Zeder-Lutz G, Choulier L, Besse M, *et al.* Validation of surface plasmon resonance screening of a diverse chemical library for the discovery of protein tyrosine phosphatase 1b binders [J]. *Anal Biochem*, 2012, 421(2): 417-427.
- [30] Nordström H, Gossas T, Hämäläinen M, *et al.* Identification of MMP-12 inhibitors by using biosensor-based screening of a fragment library [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(12): 3449-3459.
- [31] Chen C C, Chuang P H, Chen Y S, *et al.* Chip-based drug screening for inhibiting  $\alpha$ -glucosidase [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8): 1249-1257.
- [32] Lee S, Cha E J, Park K, *et al.* A near-infrared-fluorescence-quenched gold-nanoparticle imaging probe for in vivo drug screening and protease activity determination [J]. *Angew Chem*, 2008, 47(15): 2846-2849.
- [33] 林炳承, 秦建华. 微流控芯片分析化学实验室 [J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(3): 433-445.
- [34] Garcia E, Hasenbank M S, Finlayson B, *et al.* High-throughput screening of enzyme inhibition using an inhibitor gradient generated in a microchannel [J]. *Lab Chip*, 2007, 7(2): 249-255.
- [35] Wang J, Uttamchandani M, Sun L P, *et al.* Activity-based high-throughput profiling of metalloprotease inhibitors using small molecule microarrays [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2006(7): 717-719.
- [36] Szczepankiewicz B G, Liu G, Hajduk P J, *et al.* Discovery of a potent, selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor using a linked-fragment strategy [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(14): 4087-4096.
- [37] Hu F, Deng C, Zhang X. Development of high performance liquid chromatography with immobilized enzyme onto magnetic nanospheres for screening enzyme inhibitor [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(1): 67-71.
- [38] Motabar O, Shi Z D, Goldin E, *et al.* A new resorufin-based  $\alpha$ -glucosidase assay for high-throughput screening [J]. *Anal Biochem*, 2009, 390(1): 79-84.