

# 天然产物中酶抑制剂的快速筛选方法研究进展

陈凯华<sup>1†</sup>, 朱雪艳<sup>2†</sup>, 郭嘉亮<sup>1,2\*</sup>, 曾煦欣<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>佛山科学技术学院, 佛山 528000; <sup>2</sup>暨南大学药学院, 广州 510632

**摘要:**酶是新药发现的重要靶点, 酶抑制剂的开发对于疾病治疗具有重要意义。中药及天然产物种类繁多、结构多样、生物活性广泛, 是酶抑制剂的重要源泉。然而, 中药及天然产物结构复杂、活性成分含量较低, 高效准确地从中筛选出酶抑制剂至关重要。近年来, 随着生物大分子构象研究的深入及计算机科学的发展以及现代分离分析及仪器的创新, 一系列酶抑制剂的快速筛选技术与方法应运而生。本文将系统介绍天然产物中酶抑制剂的快速筛选方法, 包括计算机虚拟筛选、基于酶分子与配体之间特异性作用的亲和筛选以及结合色谱分离的生物活性测试等, 并对此进行优缺点比较, 以期对中药及天然产物中酶抑制剂的发掘提供参考。

**关键词:**酶抑制剂; 快速筛选; 天然产物; 研究综述

中图分类号: Q503

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)7-1266-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.7.019

## Advances of rapid screening methods for enzyme inhibitors in natural products

CHEN Kai-hua<sup>1†</sup>, ZHU Xue-yan<sup>2†</sup>, GUO Jia-liang<sup>1,2\*</sup>, ZENG Xu-xin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Foshan University, Foshan 528000, China; <sup>2</sup>Pharmacy College, Jinan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract:** Enzymes are important drug targets, and the development of enzyme inhibitors is significant for treatment of diseases. Natural products characterized by various kinds, diverse structures and extensive biological activities are an abundant source of enzyme inhibitors. However, natural products have complex structures and low content of active ingredients, so it is crucial to screen enzyme inhibitors efficiently and accurately. In recent years, with the deepening of research on the conformation of biological macromolecules and the vigorous development of computer science and the innovation of modern separation and analysis techniques and instruments, a series of novel screening techniques and methods of enzyme inhibitors have been developed. In this paper, rapid screening techniques and methods for natural enzyme inhibitors, including computer virtual screening, affinity screening based on the specific interaction between enzyme molecules and ligands, and biological activity assay combined with chromatographic separation, were systematically introduced, then their advantages and disadvantages of these methods were also compared, in order to provide references for the exploration of enzyme inhibitors in natural products from traditional Chinese medicine.

**Key words:** enzyme inhibitor; rapid screening; natural products; research review

当前上市药物中, 以酶为靶点的占比高达22%。酶抑制剂新药发现主要有两大途径, 一是天然产物, 包括动植物和各种微生物等; 二是化学合成。中药及天然产物一直都是开发酶抑制剂新药的

重要来源之一。然而, 中药及天然产物是极为复杂的混合体系, 一般含有多达数百甚至数千种不同的成分, 但活性成分往往只有少数几种, 这使得生物活性成分的筛选和分析变得极为困难。因此, 如何从纷繁复杂的未知体系中, 准确有效地筛选目标靶酶抑制剂, 这成为了当前药物研发与分析领域所面临的重要挑战<sup>[1]</sup>。为此, 本文将系统阐述中药及天然活性化合物筛选的前沿进展, 并结合本课题组研究进展, 对酶抑制剂筛选领域的技术方法进行归纳和描述, 以期对天然来源新药的发掘提供可参考的方法与手段。

收稿日期: 2023-05-29 接受日期: 2023-08-15

基金项目: 国家自然科学基金(82173781); 广东省教育厅重点领域专项(2020ZDZX2057); 广东省岭南中药全过程质量控制与精准分析工程技术研究中心支持项目(204266924217); 佛山大学2023年度学生学术基金(xsjj202312kja02)

† 共同第一作者

\* 通信作者 Tel: 86-013826476717; E-mail: adhesion2002@163.com, janalguo@126.com

## 1 研究现状

目前,常规的酶抑制剂筛选与发现通常是基于中药及天然产物的整体药理学活性(overall pharmacological activity)考量,即基于整体药理学结果,经过一系列分离与纯化后得到单一的化合物,再进行化学结构信息鉴定和酶抑制活性验证等步骤<sup>[2,3]</sup>。这一类药效物质基础研究的方法被称为“活性追踪分离策略”(activity-guided fractionation, AGF),其核心在于“以整体活性为导向,对复杂体系进行反复柱色谱提取分离直至得到目标单体化合物”。与其他天然药物发现的过程相近,也是国内外普遍采用的一种基本的筛选研究模式。然而,由于“化学分离”与“活性评价”不同步,分离通量低、单次分析信息量有限,这种策略导致工作量大、周期长、成本高,而且在筛选过程中微量活性成分易丢失,严重阻碍了相关活性成分的开发,尤其在酶抑制剂筛选的高通量中存在明显的不足<sup>[4-7]</sup>。因此,开发新型的高通量、快速有效的天然酶抑制剂研究方法具有明确的意义和迫切性。

近年来,随着生物大分子构象研究不断深入及计算机科学的蓬勃发展,以及现代分离分析及仪器的创新,包括但不限于计算机虚拟筛选、蛋白芯片等高通量筛选技术、基于酶分子与配体之间特异性作用的亲和筛选,以及结合色谱分离的生物活性测试等酶抑制剂筛选新技术不断涌现<sup>[8]</sup>。上述方法各具特点,下面将系统进行介绍,并对此进行优缺点比较。

## 2 筛选方法

### 2.1 计算机虚拟筛选

计算机虚拟筛选(computerized virtual screening)是利用计算机模拟技术对药物筛选过程进行建模,通过分子对接将化合物配体分子与蛋白质配基进行对接,得到与靶标蛋白具有高亲和力的化合物小分子<sup>[9]</sup>。筛选识别靶蛋白抑制剂,通常使用包含数千或数百万个小分子的大规模化合物库来启动搜索过程。目前已有多种小分子数据库可用于药物筛选,其中最全面的免费数据库包括 ZINC、PubChem 和 ChemSpider 等。

该技术方法可分为基于配体(ligand-based drug design, LBDD)的筛选和基于靶标(target-based drug design, TBDD)的筛选。LBDD 筛选方法就是利用确定的生物活性小分子作为参考分子,以此获取相似分子的结构参数,利用油水分配系数 logP 值、氢键

供体/受体数目、分子量及化学键等理化相似性进行搜索。当中最为常见的是“药效团模型”(pharmacophore model)数据库搜索法,即通过分子叠合(superimpose alignment)来解析靶标蛋白的三维活性构象(three dimensional conformation),继而明确药效活性的必需结构特征<sup>[10]</sup>。Noha 等<sup>[11]</sup>针对 I kappa B 激酶  $\beta$  (I kappa B kinase  $\beta$ , IKK- $\beta$ ) 开发了一种基于配体的 IKK- $\beta$  抑制剂药效团模型,并运用于商业数据库的虚拟筛选,得到 10 种候选化合物,并发现了一种新型化学骨架 IKK- $\beta$  抑制剂,其在低微摩尔范围内显示出对体外 IKK- $\beta$  酶抑制活性。

基于靶标结构的虚拟筛选方法是利用分子对接技术来进行筛选<sup>[12]</sup>,根据靶蛋白的三维构象,在其结合位点处自动匹配化学分子库中的化合物,然后对可能的结合模式运用打分函数(scoring function)评估其亲和力,计算结合能;分子对接的虚拟筛选方法自动化程度高、效率高,结合阳性对照得到亲和力较高的候选化合物,再通过酶活测试进行抑制剂的活性验证,确定化合物的 IC<sub>50</sub> 值<sup>[11,13]</sup>。此外,蛋白质构象变化是配体对接筛选中的一个重要考虑因素,而且很难预测,因此在分子对接中还要考虑到蛋白晶体构象的柔性等因素<sup>[14]</sup>。Ke 等<sup>[15]</sup>基于 LBDD 法逻辑,应用分子对接方法并经过严格验证的模型搜索天然化合物数据库,命中 36 种化合物,采用荧光测定法进行体外 ACE 激酶抑制测定,最后筛选得到三种新型血管紧张素转换酶抑制活性化合物,分别是甘草查尔酮 A (licochalcone A)、刺甘草查尔酮(echinatin)以及表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate)。

对接的虚拟筛选方法能直接反映配体受体结合过程。大多数打分函数能够预测活性化合物的结合亲和力。目前,计算机辅助虚拟筛选技术已成为酶抑制剂先导化合物的重要途径,计算机虚拟筛选具有设置成本低、计算速度快和更改模拟条件灵活等优点,且该筛选技术也不会受到配体纯度、蛋白质稳定性或不同样品和测定条件的影响<sup>[16]</sup>。然而,经过大量验证,人们发现虚拟筛选法由于软件算法和打分函数本身与现实存在一定差距,容易引起的假阳性情况,因此仍然需要通过生物学实验加以验证。

### 2.2 亲和超滤质谱技术

超滤于 1981 年开发作为一种测定血清中蛋白质结合的方法<sup>[16]</sup>。1990 年代后期,超滤被引入靶向药物筛选<sup>[17]</sup>。亲和超滤质谱法是一种靶向药物

筛选策略,基于蛋白质-配体亲和性的特性开发而得<sup>[18]</sup>。由于质谱法具有出色灵敏度和高选择性,亲和超滤质谱法在小分子药物发现的应用领域中脱颖而出,引起了药物研发人员的极大关注<sup>[19]</sup>。亲和超滤(affinity-ultrafiltration, AUF)质谱法是一种基于溶液的亲和和选择质谱平台,采用超滤方法分离溶液中的目标配体复合物,是从复杂体系中发现生物活性分子的筛选方法。AUF-MS 的工作流程<sup>[20]</sup>见图 1;超滤单元包含具有一定截留分子量的半透膜作为分离介质。将酶蛋白与复杂体系共孵育,能与酶发

生相互作用的亲和分子会被靶标捕获形成酶蛋白-配体复合物;结合部分和游离部分因为分子量不同被超滤膜分离,其中未与靶标结合的游离小分子将会透过超滤膜,进行质谱分析鉴定,见“未结合组分分析”(unbound fraction analysis, UFA);而蛋白-配体复合物则通过使蛋白变性如有机溶剂或者改变 pH 等手段使复合物解离,并通过质谱分析来表征具有亲和活性的小分子,见“结合组分分析”(bound fraction analysis, BFA)。

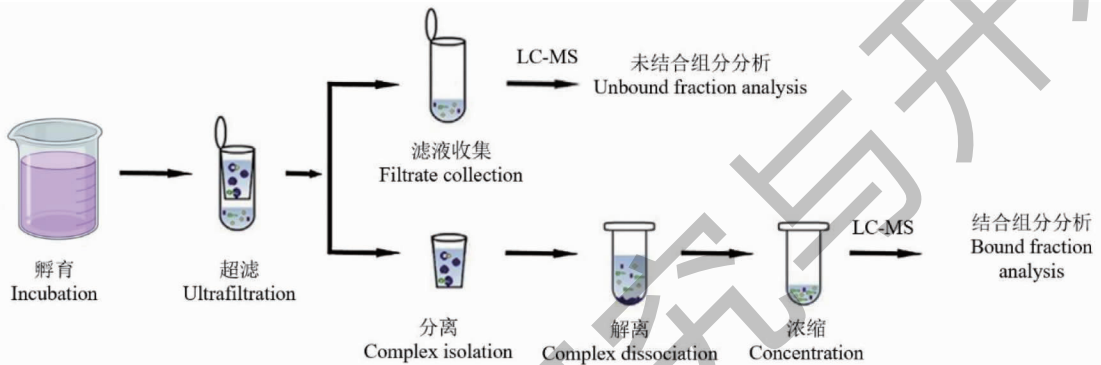


图 1 基于结合组分分析与非结合分数分析的 AUF-MS 通用工作流程

Fig. 1 General workflows for AUF-MS based on bound fraction analysis and unbound fraction analysis

超滤质谱又分为脉冲超滤质谱(pulsed ultrafiltration mass spectrometry)和离线超滤质谱(off-line ultrafiltration mass spectrometry)。脉冲超滤质谱首先由 van Breemen 等<sup>[21]</sup>开发作为一种在线筛选方法,该方法中超滤室和 LC-MS 平台直接相连,超滤得到的样品可以进行在线定性定量分析。该小组成功将脉冲超滤质谱法应用于酶抑制剂筛选研究,包括环氧酶-2<sup>[22]</sup>、人维甲酸 X 受体- $\alpha$ <sup>[23]</sup>、人雌激素受体<sup>[24]</sup>等。

离线超滤质谱法在质谱检测之前进行超滤,将分析物与靶标孵育后,通过将靶标-配体复合物与未结合的化合物分离,再分别进行 LC-MS 分析。Zhu 等<sup>[25]</sup>提出了一种基于超滤-超高效液相色谱-多级串联质谱(UPLC-MSn)方法的生物活性指纹图谱分析方法,从中药附子筛选得到 11 种源自药材附子的 cyclooxygenase-2 配体。Liu 等<sup>[26]</sup>采用光电二极管阵列检测超滤液相色谱结合电喷雾电离串联质谱(ultrafiltration LC-MS/MS)研究复方靛蓝颗粒正丁醇提取物和黄酮标准品的神经氨酸酶抑制活性。结果表明,黄酮苷元具有较强神经氨酸酶结合活性,而黄酮苷表现出弱或无结合活性。Li 等<sup>[27]</sup>通过该技术方

法与逆流色谱相结合,开发了一种简单、快速的方法用于从三七提取物中筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂,共分离、获得六种具有黄嘌呤氧化酶结合活性的化合物。Zhang 等<sup>[28]</sup>采用离线超滤法和电喷雾飞行时间质谱法对紫草中抗流感成分进行快速筛选和初步鉴定,通过该方法发现了紫草中五种化合物具有神经氨酸酶抑制活性。

亲和超滤质谱法具有特异性强、速度快、成本低及操作简单等优点,联用质谱可适用于生物大分子配体的快速筛选。然而,该方法仍存在一些不足:超滤法是基于靶标和配体的亲和作用原理,非特异性吸附现象较为严重,存在假阳性问题,且该方法无法同步评估生物活性。

### 2.3 固定化酶反应器

固定化酶是指通过共价和非共价的物理或化学的方法将酶固定在一定的载体上并维持其酶活性的方法<sup>[29,30]</sup>。酶的固定化将该酶的选择性、稳定性和动力学与载体的物理和化学特性结合,其主要作用是最大限度地提高生物催化剂的物理和酶稳定性。固定化酶不仅保持了较高的特异性和催化效率,其对热、pH 和有机溶剂的耐受能力也有所提高,还有

易于从反应介质中分离的优点。将固定化酶包含在色谱柱的固体支持物上,可以在失活过程中保持酶活性,能提高酶稳定性,具有极好的准确性和重现性<sup>[31]</sup>,故固定化酶反应器(immobilized enzyme reactor,IMER)引起了广泛关注,并被大量报道成功应用于天然酶抑制剂的筛选研究<sup>[32-36]</sup>。其筛选原理为:将中药及天然产物提取物加入固定化酶反应器中,其中亲和成分会与酶结合从而保留在固定相上以实现与未结合成分的在线分离,通过有机溶剂或其他变性手段解离,再经过 LC-MS 进行分离和鉴定,可快速高效地获取复杂体系中活性成分的结构信息。此外,IMER 可以与毛细管电泳(capillary electrophoresis,CE)、HPLC 和 MS 模式等结合进行在线分析,具有样品消耗量低、灵敏度高、分析速度快的优势。如 Min 等<sup>[37]</sup>通过戊二醛交联技术在毛细管入口处建立了高效的胰蛋白酶 IMER。该方法成功用于胰蛋白酶酶动力学研究,并在线筛选 19 种天然提取物中的胰蛋白酶抑制剂,具有样品消耗量低、灵敏度高、分析速度快的优势。

### 2.3.1 固定载体

事实上,酶的固定化(immobilization)过程主要存在着若干与固载材料性质紧密相连的关键技术指标。依据固定化的基本原理,固载材料首先应具有好的生物相容性(biocompatibility)、已知的三维孔隙结构和化学官能团。理想的固载材料应在广泛的酸碱度、温度、离子强度和有机溶剂范围内保持良好的稳定性。同时,载体材料的形态、孔隙率、溶胀能力等物理性质会影响动力学过程,因此材料的物理性质也同样重要。此外,酶量、底物影响着活性位点、底物的扩散性,继而深刻影响着酶的反应速率。下文将已用于固定化酶的载体分为有机材料、无机材料、整体材料和纳米材料等来进行简要介绍。

#### 2.3.1.1 有机材料

由于具有优良的传质性能、生物相容性佳、成本低等一系列特点,葡聚糖、琼脂糖、壳聚糖或纤维蛋白多糖基质等天然高分子材料均较为适合作为酶载体。其中,壳聚糖(chitosan,CTS)具有无毒、生物相容性佳和可生物降解的优势,成为了常用的固定化酶研究载体<sup>[38]</sup>。通过沉淀法制备壳聚糖大球并将 $\beta$ -半乳糖苷酶固定在壳聚糖支持物上<sup>[39]</sup>。为了克服壳聚糖在接近生理 pH 值时完全不溶解的局限性,有研究人员将壳聚糖(带正电荷)与藻酸盐(带负电荷)离子络合,形成凝胶或微胶囊系统,用于 $\beta$ -

半乳糖苷酶的固定<sup>[40]</sup>。此外,为应对壳聚糖机械强度差、容易发生溶胀等局限性,研究人员通常制备硅胶杂化壳聚糖材料作为高效液相色谱常用的重要固定相之一。

人工合成高分子材料(synthetic polymer material):甲基丙烯酸甲酯-二乙烯基苯树脂、聚苯乙烯等目前皆被用作酶的固定化载体。这些材料固载能力强、适用固载酶的种类多、理化性质多变,而且具有优秀的抗微生物腐蚀性能,因此引起了广泛关注。

#### 2.3.1.2 无机材料

与高分子材料相比,无机材料更稳定,机械强度较高(可用作高效液相固定相),同时具有成本低、耐酸碱,对微生物无毒性等优点。酶固定化中主要使用的载体有多孔无机固体,例如二氧化硅和可控孔隙玻璃(controlled porous glass,CPG)。二氧化硅及其衍生材料是无机材料中的典型,由于具有较大的比表面积和良好的力学性能,被广泛用作高效液相色谱的载体。由于其表面有硅醇基,这种材料也具有一定的衍生功能。然而,硅胶表面残留的硅羟基能够产生静电、氢键和疏水作用而导致非特异性吸附,因此研究者使用改性硅胶或者封端处理的方法来减弱材料的非特异性吸附<sup>[41,42]</sup>。

CPG 在酶固定化方面也发挥了重要作用。其具有宽比表面积、窄孔径分布、机械强度、刚性结构和化学惰性等特点,能很好地满足在线 HPLC 应用的要求。此外,表面羟基的存在使 CPG 易于化学改性,因此容易获得具有不同反应基团的 CPG。Girelli 等<sup>[43]</sup>基于用氰基硼氢化钠还原席夫碱的反应将酪氨酸酶共价结合到氨基-CPG 基质上,动力学参数测定结果表明,固定于 CPG 基质的酶活性与游离酶的活性相当。

#### 2.3.1.3 整体材料

近十年来,整体材料(monolithic material)由于具有“比表面积大、传质速度快、易于制备和修饰、生物相容性佳”等优点而得到了广泛的应用<sup>[44]</sup>,相关特点也提示了其在高通量、快速亲和筛选中的推广潜力<sup>[45]</sup>。整体材料的生物相容性好,具备化学稳定性,可以延长亲和色谱柱的使用寿命。Zhang 等<sup>[36]</sup>将 $\alpha$ -葡萄糖苷酶固定于 poly(GMA-co-ethylene dimethacrylate)(poly(GMA-co-EDMA))整体柱上,用于天然产物中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选。研究证明该反应器在一个月活性仅下降不足 8%,相较游离酶的活性仅在七天内就下降了 37.7%,其

稳定性和活性大大提升。其中,有机聚合物整体(organic polymer monolith)材料具有生物相容性佳、对酸碱稳定性佳、易于制备和修饰等优点,适合目标蛋白的固定化;此外,由于整体柱易于实现毛细管微型化以联用纳升液相,蛋白用量少,利于珍稀酶蛋白的固定化研究<sup>[46]</sup>。将毛细管亲和整体材料与亲和垂钓结合,用于中药及天然产物在线筛选具有良好的应用前景和研究意义。

#### 2.3.1.4 纳米材料

越来越多研究报道通过载体纳米粒子来结合、固定蛋白质、酶、抗体等,其中磁性纳米粒子(magnetic nanoparticles, MNP)的超顺磁性、比表面积大、在外磁场下易于分离等独特性能,作为酶的固定载体具有一定的优越性。磁性纳米粒子载体由三个功能部分组成:磁芯、保护磁芯的表面涂层和功能化外涂层<sup>[47]</sup>。Hu等<sup>[48]</sup>通过交联剂戊二醛将 $\alpha$ -葡萄糖苷酶稳定地固定在磁性纳米球上,并将其应用于酶抑制剂的筛选和酶活监测。纳米材料具有比表面积大和易于与酶稳定结合的特点,可以大大提高酶的负载量和酶的稳定性<sup>[49]</sup>。能够用于酶固定化的纳米材料还有如碳纳米管<sup>[51,52]</sup>、金纳米粒子<sup>[53]</sup>等等。

#### 2.3.1.5 其他材料

介孔材料由于其特有的有序孔道结构,除了比表面积大以外,它的热稳定性、化学稳定性等比微孔材料更好<sup>[50]</sup>,如今常用于固定化酶的介孔材料一般是硅基介孔材料(mesoporous silica)<sup>[50,51]</sup>。中空纤维因其成本低、富集能力强、纯化性能优异而被广泛应用于样品前处理<sup>[52]</sup>。基于中空纤维的固定化酶亲和和筛选通常与LC-MS结合使用,以快速筛选活性成分<sup>[53]</sup>。

#### 2.3.2 固定化酶反应器的应用研究

固定化酶具有高稳定性、易于储存和可重复利用的优点,已被广泛应用于复杂体系中活性成分的筛选。近年来基于固定化酶的筛选模式在化合物库以及中药复杂体系中都有较多研究。在化合物库筛选应用中,固定化酶反应器不仅可以对中药进行抑制活性的初筛,也可以对单体分子库进行筛选。Min等<sup>[54]</sup>开发了一种简单的毛细管电泳方法,在毛细管入口处使用乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)微反应器进行在线的酶抑制剂筛选,对30种天然提取物进行初步筛选,明确黄柏、黄连、绿茶、茯苓具有显著抑制活性。Vanzolini等<sup>[55]</sup>使用固定化毛细管酶反应器进行AChE的在线配体筛选,用于

香豆素衍生物库的筛选,最后筛选得到两个潜在活性分子。Cheng等<sup>[35]</sup>通过毛细管电泳在线筛选中药中的胰蛋白酶抑制剂,成功从15个中药单体化合物中发现黄芩苷具有胰蛋白酶抑制活性。

在复杂体系的筛选中,Wang等<sup>[56]</sup>利用固定化毛细管酶反应器结合液相色谱-质谱法在线筛选筛选延胡索提取物中的乙酰胆碱酯酶抑制剂,并通过酶抑制试验进一步验证了筛选得到的八个潜在化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制活性。Lin等<sup>[57]</sup>用固定化毛细管酶反应器离线筛选黄芩提取物中的胰蛋白酶抑制剂,并筛选得到三个潜在的胰蛋白酶抑制活性化合物。Cornelio等<sup>[58]</sup>将牛组织蛋白酶D(cathepsin D, CatD)固定在熔融石英开口管状毛细管上,利用基于多维高效液相色谱法(2D-HPLC)和区域亲和色谱法结合CatD固定化酶反应器去筛选CatD的配体。

此外,多靶点酶固定以筛选多靶点抑制剂相关研究近几年来备受关注,Lin等<sup>[59]</sup>将腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)和黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)共固定在柠檬酸盐封端的金纳米颗粒上,带负电荷的酶功能化金纳米颗粒通过静电相互作用固定在毛细管壁上从而制备了一款双酶反应器;双IMER被应用于筛选20种药用植物、天然提取物的抗ADA和抗XOD活性。研究发现,川芎、高良姜、黄柏和肉桂等中药提取物具有明显的XOD抑制活性;川芎和青黛等中药提取物则对ADA具有一定的抑制作用。值得关注的是,川芎提取物既有XOD抑制活性也有ADA抑制活性,侧面揭示了川芎的“多靶点活性作用”(multi-target effect)。

固定化酶亲和筛选是利用靶标蛋白与化合物的特异性结合来快速锁定、分离复杂体系中活性物质,具有效率高、特异性强的优点,结合现代质谱技术,可以实现对中药粗提取物中具体目标化合物的快速识别筛选。然而,固定化酶反应器存在成分分离和活性验证不同步的缺点,获得的成分仍需后续的分选、活性验证以排除假阳性成分;筛选过程主要根据酶的特异性底物或酶解产物来研究,对复杂体系中特定活性成分的研究并不适用<sup>[60]</sup>。

#### 2.4 磁珠配体垂钓

磁性纳米粒子具有比表面积大、超顺磁性,更易于修饰的特点,因此磁珠更适于通过共价键或吸附来固定蛋白质或酶,可用于从复杂体系中分离已知配体或未知化合物。磁珠配体垂钓法是将靶酶固定

于磁性纳米材料上用于复杂体系中活性配体的垂钓。参考文献报道<sup>[61]</sup>,流程具体见图2:将复杂体系与固定酶磁珠共孵育,该复杂体系中的亲和分子与固定酶磁珠结合,形成复合体,通过磁分离将其与非结合的小分子分离,再用有机溶剂或改变pH值将其洗脱,用LC-MS技术对其进行结构识别,最后筛选出对应的配体。磁珠配体垂钓表现出固定酶蛋白稳定性和易于分离的独特优势。

近年来,从复杂的中药及天然产物中发现生物活性化合物的磁珠配体垂钓方面已有许多应用研究。Yasuda等<sup>[62]</sup>将组蛋白去乙酰化酶SIRT6固定在磁珠上从天然植物葫芦种子提取物中识别SIRT6

抑制剂的筛选方法,并发现槲皮素和牡荆素在体外具有明显的SIRT6抑制活性。Tao等<sup>[63]</sup>利用 $\alpha$ -葡萄糖苷酶磁珠用于桑叶提取物中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选研究,最终筛选到两种黄酮类化合物(异槲皮苷和黄芪甲苷)。Li等<sup>[64]</sup>制备了 $\alpha$ -淀粉酶磁珠并结合高效液相色谱从藤黄提取物中筛选配体,最后筛选出三种配体。Vanzolini等<sup>[65]</sup>选择AChE作为靶点并将其包被在磁珠上,用于筛选*Melodinus fusiformis*提取物。Liu等<sup>[66]</sup>将酪氨酸酶固定于磁性纳米粒子与HPLC-DAD-MS/MS和反向超滤-HPLC相结合,用于甘草提取物的筛选,筛选鉴定出了11种潜在的酪氨酸酶抑制剂。

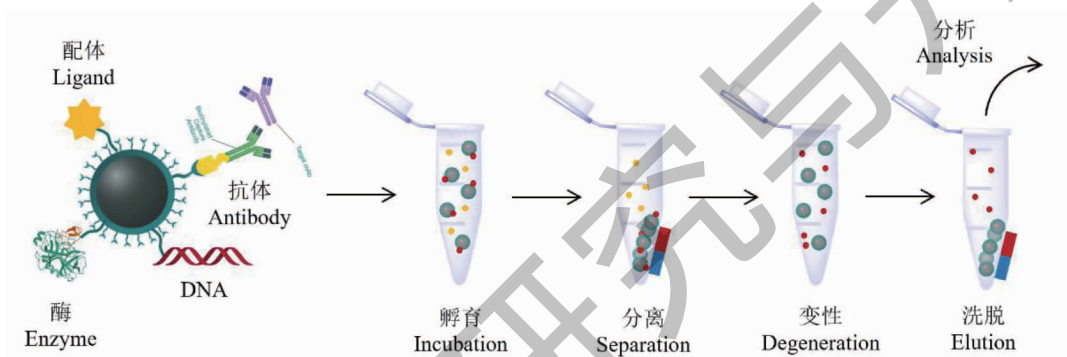


图2 基于磁珠配体垂钓的流程

Fig. 2 Flow chart of ligand fishing based magnetic beads

磁珠配体垂钓法结合LC-MS可以高效迅速地发现复杂体系中的活性化合物并鉴定其化学结构<sup>[67]</sup>。磁珠具有超顺磁性、比表面积大等优点,外加磁场作用下既易于分离也便于回收利用。然而,磁珠固定化基质自身具有较强的非特异性吸附,固定化方式也可能造成结合位点被屏蔽,大大降低筛选效率;存在配体难以洗脱及配体生物活性不确定等问题。

## 2.5 柱后生物测定法

在基于活性的活性筛选策略中,传统的活性追踪分离以活性为指导,层层分离并最终获得活性单体再进行活性评价和结构鉴定。然而该策略样品用量大、分离过程中容易导致活性成分丢失,此外该方法还存在活性评价与化学分离不同步、分离通量低、耗时耗力等不足,极大限制了新药研发的开发效率。在传统的活性筛选模式指导下发展起来的离线筛选(off-line post-column assay, Off-line)模式见图3A:通过引入HPLC及高分辨质谱构建分离分析平台,实现了筛选流程的半自动化,但仍然存在样品消耗量

大、活性测试和结构鉴定实时数据不匹配等缺陷,活性分子的发现效率低<sup>[68]</sup>。在线筛选(on-line post-column assay, On-line)模式见图3B:在离线筛选模式的基础上,通过引入在线活性测试模块,将“分离分析-结构鉴定-活性评价”一体化,提高分析通量的同时,实现了色谱、质谱及活性谱图的实时同步匹配,显著提高了活性分子的检出效率<sup>[69,70]</sup>。然而为了确保在线活性检测的灵敏度,在线模式对样品的需求量仍然较大;此外高有机溶剂的存在及有限的在线活性孵育时间使得活性评测数据存在极大的不确定性,限制药物靶标的同时也极易造成有效成分的“漏检”<sup>[71]</sup>。近线筛选(at-line post-column assay, At-line)模式见图3C:近年来集合诸多模式的优势而发展起来的一种全新筛选模式,它将液质分离分析模块及微流分收集模块有效整合,对整个色谱分离过程连续同步流分收集,采集的微流分经干燥后直接进行活性测试,获得与色谱-质谱分离数据高度匹配的活性谱图数据,实现活性成分的快速高通量筛选。近线筛选模式不仅保持了在线模式自动化程

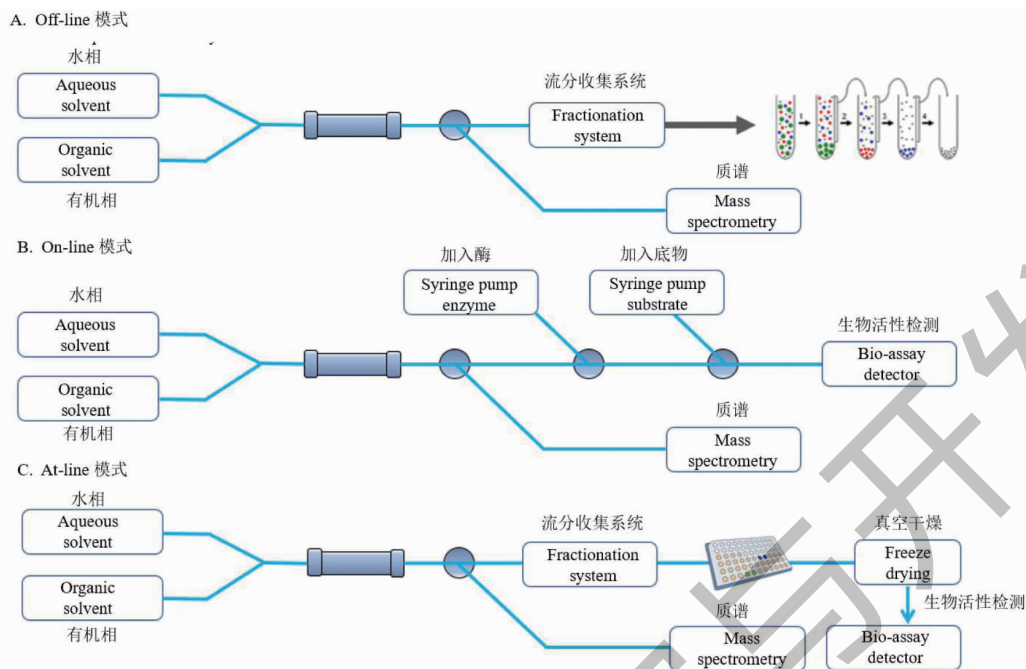


图3 柱后生物活性测定法  
Fig. 3 Post-column assay strategies

度高及多信息谱图实时匹配的优势,而且还兼具离线模式活性测试操作灵活、准确性好的特点,排除了有机溶剂的干扰,保证了充足的孵育时间<sup>[72,73]</sup>。

### 2.5.1 离线筛选模式(Off-line 模式)

离线筛选模式通过引入高效液相及高分辨质谱构建分离分析平台,实现了筛选流程的半自动化,但生物活性测定与化学结构鉴定不是同时进行的,该方法可用于特殊酶促反应体系环境或者化合物溶解度差等条件苛刻的情况下,同时也能满足高通量筛选的需求。这一方法是在收集完分离后的流分后离线进行活性评价,再对活性较好的流分进行液质分析以及结构鉴定,其反应体积为微升级别,比传统的活性追踪法的分辨率要高,较适用于已知化合物分子库筛选,很难用于复杂样品的筛选,如 Kheng 等<sup>[72]</sup>开发的 SPE-MS/MS 系统对分子库进行细胞色素 P<sub>450</sub> 抑制活性筛选评估,将分离后的流分用 384 孔板孵育,通过固相萃取将孵育液中的底物和产物分别用三重四级杆质谱仪进行定量分析,从而进行活性评估,最终筛选出六个具有良好活性的细胞色素 P<sub>450</sub> 抑制剂。

### 2.5.2 在线筛选模式(On-line 模式)

在线筛选模式可以实现分离和活性评估同步,同时进行活性评估与成分鉴定。然而,有机溶剂对酶活反应的影响大,而且各模块兼容性较差,搭建难

度大,故一般也是以活性导向,即在线活性导向筛选,见图4:样品于柱后分流,一部分柱流出物被引导至管路连续流动以进行生物活性评估;另一部分被引导至 MS 用于同时对洗脱的生物活性化合物进行化学表征。当化合物分子对酶活有抑制作用时,在线生物活性检测系统检测到的产物信号就会降低。Elswijk 等<sup>[72]</sup>利用 On-line 在活性测定法成功地从牛奶样品中筛选出 30 余种血管紧张素转换酶抑制剂;Jong 等<sup>[74]</sup>利用在线活性测定法从水仙(Bulbus Narcissi Chinensis)提取物中筛选乙酰胆碱酯酶抑制剂。

### 2.5.3 近线筛选模式(At-line 模式)

近线筛选模式一般要以微流分析为前提,近线微流分筛选(at-line nanofractionation)将液质分离分析模块及微流分收集模块有效整合,对整个色谱分离过程连续同步进行流分收集,采集的微流分进行离线的活性测试,获得与色谱-质谱分离数据高度匹配的活性谱图数据。近线微流分筛选平台的搭建见图5:样品进入液相系统于柱后分流,一条流路进入质谱进行化合物的结构鉴定,另一条流路利用流分收集系统流入微孔板中;然后进行离线的生物活性测定,微孔板挥干流动相后,加入酶和底物监测其生化反应以进行活性评估<sup>[75]</sup>。与在线模式相比,近线模式的自动化程度较低,但避免了在线模式下有

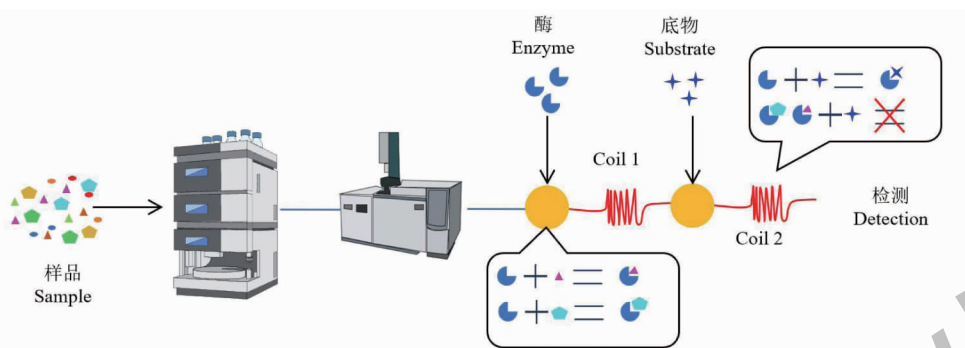


图4 在线活性导向筛选的示意图

Fig. 4 Schematic diagram for on-line bioassay-guided screening

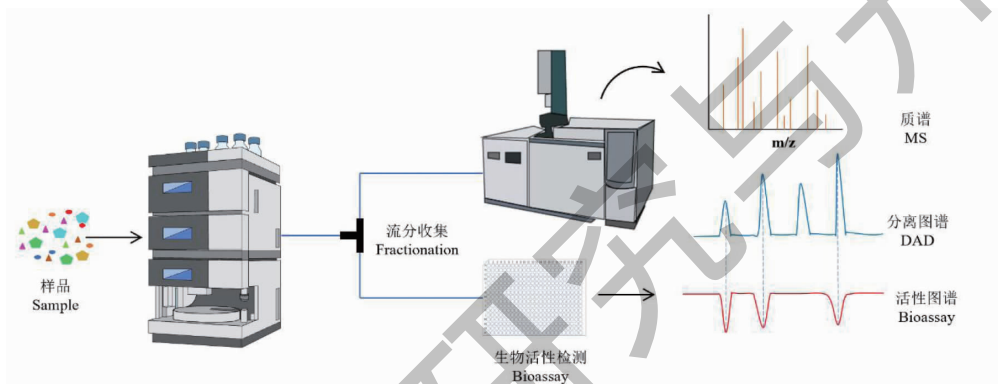


图5 近线微流分筛选平台的示意图

Fig. 5 Schematic diagram of at-line nanofractionation screening platform

机相对酶活的干扰,也能更灵活地运用各种活性检测技术。将整个筛选过程融汇于单次运行之中,不仅大大缩短了筛选时间,同时提高了筛选的全面性、稳定性和准确性,有助于减少假阳性结果;此外,通过同时联用多种活性检测技术以拓宽分析内涵,为未来药物筛选向“一测多评”发展奠定了基础。

为了提高筛选方法的分辨率,Kool 团队对近线微流分筛选平台的流分收集装置进行了改进,利用 384 微孔板收集流分,收集体积降至微升级别,提高了单孔收集分辨率,简化了每个微孔中的化合物成分,有利于色谱-质谱分离数据与生物活性的匹配。Kool 等<sup>[75]</sup>将优化的方法应用于快速筛选小型低分子量趋化因子受体 CXCR2 拮抗剂文库的代谢混合物中,发现了三种生物活性代谢物;应用于快速筛选蛇毒中影响凝血酶和 Xa 因子活性的化合物<sup>[76]</sup>;从蘑菇中筛选出了  $\alpha 7$ -烟碱型乙酰胆碱受体 ( $\alpha 7$ -nAChR) 的配体<sup>[77]</sup>。近年,Wang 等应用该平台与半制备反相液相色谱联用,在中药黄栌 (*Cotinus Coggryia* Scop.) 中发现了 12 种潜在胰蛋白酶抑制剂;

实验验证了当中成分漆黄素可通过抑制胰蛋白酶活性来抑制大肠癌体内外生长<sup>[78]</sup>。该方法自动化程度高,应用前景良好,但平台的搭建较为繁琐,仪器运行复杂;同时,需要根据分析样本情况,统一调整普通连口径,因此推广应用程度较低。

## 2.6 其他方法

除了上述五种方法以外,比色法 (colorimetry) 和荧光筛选法 (fluorescence screening) 也是常用的酶抑制剂的筛选方法;相比于比色方法,荧光法更为灵敏。该法通过使用荧光染料检查细胞对荧光染料的摄取情况或者测量细胞内成分泄漏来筛选酶抑制。Rhee 等基于特定非荧光底物 (7-acetoxy-1-methylquinolinium iodide, AMQI) 在 AChE 的作用下可分解生成强荧光物质的基本原理,发现 28 种对 AChE 有抑制作用的天然产物提取物<sup>[79]</sup>。与普通的紫外比色法相比,其灵敏度提高了 20 倍。

## 3 总结与展望

酶是一类重要的药物靶点,酶抑制剂的研究对于开发新药应用于疾病治疗至关重要。中药及天然



产物种类繁多、结构多样、生物活性广泛,在中国拥有悠久的临床应用历史,因其长期的临床试验和可靠的治疗效果而受到越来越多的关注,已成为了挖掘酶抑制剂的重要源泉。长期以来,由于中药及天然产物结构复杂、活性成分含量较低,如何高效、精准地从中发现含量很低的酶抑制剂是目前新药研发领域亟待解决一个科学问题<sup>[1]</sup>。众所周知,传统的酶抑制剂活性筛选方法往往具有操作繁琐、耗时费力和活性成分易发生丢失等不足,不能实现高通量筛选,无法满足当今社会对新药开发的需求。近年

来,新型的酶抑制剂筛选新技术不断涌现,根据筛选原理不同可以分为基于亲和原理的亲和筛选方法和基于活性测试的柱后活性评价法<sup>[80-82]</sup>。选择符合分析物特点的具体方法,将为天然来源药物的开发增效赋能(见表1)。其中,基于亲和作用原理的配体垂钓法(ligand fishing)是通过靶标酶与其配体分子之间的特异性亲和作用进行筛选,无需进行反复地提取分离、结构鉴定和活性验证,可直接实现中药提取物中活性成分的识别与分离,有望获得更多的应用。

表1 天然酶抑制剂快速筛选方法的比较

Table 1 Comparison of rapid screening methods for natural enzyme inhibitors

方法 Method	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
计算机虚拟筛选	成本低、计算速度快和灵活简便等	假阳性情况较为普遍,需要生物学实验加以验证
亲和超滤质谱技术	特异性强、速度快、成本低及操作简单;可与质谱联用,适用于生物大分子配体的快速筛选	非特异性吸附现象较为严重,存在假阳性问题,且无法同步评估生物活性
固定化酶反应器	效率高、特异性强的优点,结合现代质谱技术,可以实现对中药粗提物中具体目标化合物的快速识别筛选	需进一步分离纯化;基于特异性底物或酶解产物来研究,对复杂体系中特定活性成分,并不一定适用
磁珠配体垂钓	分离效率较高,易于操作、磁珠可回收,较为环保	存在非特异性吸附;固定化方式也可能造成结合位点被屏蔽;配体难以洗脱或配体生物活性难以确定
柱后生物测定法	该方法自动化程度高,商业化仪器配套成熟	平台的搭建较为繁琐,仪器运行复杂;缺乏商业化一体设备
荧光筛选法	灵敏度高、消耗量少、快速、成本低,精确度高且不需要载体	原理特定,故可测量的化合物数量少,部分荧光持续时间短或发散方向不集中

更值得关注的,是基于活性的近线微流分生物活性筛选方法,利用高效液相分离和高分辨质谱检测结合酶活监测能够同时实现活性评估与成分鉴定。该类方法打破原有的线性逻辑,重新组合化学分离、结构鉴定、生物活性评价等关键步骤,搭建集“分离-鉴定-评价”于一体的筛选平台,将从根本上为天然活性成分的挖掘提供全新的科学方法,不仅有望显著提高筛选的效率和准确性,更有利于天然药物资源的科学开发利用<sup>[83]</sup>。目前,该技术方法已在天然酶抑制剂的筛选中得到广泛应用,但活性评价模型仍旧较为局限,有待进一步拓展。此外,随着智能设计的迅猛发展,尤其是机器学习的广泛运用,亲和靶标尤其是人工模拟酶生物大分子的设计将成为现实,这也是未来待开发的重要领域,并有望进一步扩大其简便性和应用面。综上所述,酶抑制的快速筛选和发现,不仅为新药研发提供物质基础,也为医疗、食品和农业等领域的研究提供了重要的手段和技术,具有广阔的发展空间。随着当前分析检测技术、生物、化学和医学等多学科的发展和交叉应

用,中药和天然药物中具有多靶标成分的快速识别和机制的阐释将获得迅猛的发展。

#### 参考文献

- Lam KS. New aspects of natural products in drug discovery [J]. Trends Microbiol, 2007, 15: 279-289.
- Brown D. Unfinished business: target-based drug discovery [J]. Drug Discov. Today, 2007, 12: 1007-1012.
- Wang JG, et al. Target identification of natural and traditional medicines with quantitative chemical proteomics approaches [J]. Pharmacol Ther, 2016, 162: 10-22.
- Balunas MJ, et al. Drug discovery from medicinal plants [J]. Life Sci, 2005, 78: 431-441.
- Muhammad S, et al. Overview of online two-dimensional liquid chromatography based on cell membrane chromatography for screening target components from traditional Chinese medicines [J]. J Sep Sci, 2017, 40: 299-313.
- Sumner LW, et al. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects [J]. Nat Prod Rep, 2015, 32: 212-229.

- 7 Kang MJ, et al. Functional chromatography reveals three natural products that target the same protein with distinct mechanisms of action [ J ]. *Chembiochem*, 2014, 15: 2125-2131.
- 8 Imaduwaige KP, et al. HAMS: high-affinity mass spectrometry screening. A high-throughput screening method for identifying the tightest-binding lead compounds for target proteins with no false positive identifications [ J ]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, 27: 1870-1877.
- 9 Glaab E. Building a virtual ligand screening pipeline using free software: a survey [ J ]. *Brief Bioinform*, 2016, 17: 352-366.
- 10 Bianco G, et al. Selective and Effective: Current progress in computational structure-based drug discovery of targeted covalent inhibitors [ J ]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41: 1038-1049.
- 11 Noha SM, et al. Discovery of a novel IKK- $\beta$  inhibitor by ligand-based virtual screening techniques [ J ]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 577-583.
- 12 Forli S, et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite [ J ]. *Nat Protoc*, 2016, 11: 905-919.
- 13 Ripphausen P, et al. State-of-the-art in ligand-based virtual screening [ J ]. *Drug Discov Today*, 2011, 16: 372-376.
- 14 Spyraakis F, et al. Open challenges in structure-based virtual screening: receptor modeling, target flexibility consideration and active site water molecules description [ J ]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 583: 105-119.
- 15 Ke ZP, et al. Discovery of a potent angiotensin converting enzyme inhibitor via virtual screening [ J ]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 3688-3692.
- 16 Whitlam JB, et al. Ultrafiltration in serum protein binding determinations [ J ]. *J Pharm Sci*, 1981, 70: 146-150.
- 17 Duan WD, et al. Rapid screening of lipid-lowering active constituents from *Rheum palmatum* L. with chemical modified L02 liver membrane bioaffinity material [ J ]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 375-382.
- 18 Jonker N, et al. Recent developments in protein-ligand affinity mass spectrometry [ J ]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399: 2669-2681.
- 19 Deng G, et al. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery [ J ]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40: 528-538.
- 20 Qin SS, et al. Multiple ligand detection and affinity measurement by ultrafiltration and mass spectrometry analysis applied to fragment mixture screening [ J ]. *Anal Chim Acta*, 2015, 886: 98-106.
- 21 Johnson BM, et al. Applications of pulsed ultrafiltration-mass spectrometry [ J ]. *Mass Spectrom Rev*, 2002, 21: 76-86.
- 22 Nikolic D, et al. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors using pulsed ultrafiltration mass spectrometry [ J ]. *Anal Chem*, 2000, 72: 3853-3859.
- 23 Liu DT, et al. Screening for ligands of human retinoid X receptor- $\alpha$  using ultrafiltration mass spectrometry [ J ]. *Anal Chem*, 2007, 79: 9398-9402.
- 24 Sun YK, et al. Ultrafiltration tandem mass spectrometry of estrogens for characterization of structure and affinity for human estrogen receptors [ J ]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16: 271-279.
- 25 Zhu HB, et al. Bioactivity fingerprint analysis of cyclooxygenase-2 ligands from *Radix Aconiti* by ultrafiltration-UPLC-MSn [ J ]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 7437-7445.
- 26 Liu S, et al. Characterization of compounds and potential neuraminidase inhibitors from the n-butanol extract of compound indigowoad root granule using ultrafiltration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [ J ]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59: 96-101.
- 27 Li SN, et al. Development of a method to screen and isolate potential xanthine oxidase inhibitors from *Panax japonicus* var via ultrafiltration liquid chromatography combined with counter-current chromatography [ J ]. *Talanta*, 2015, 134: 665-673.
- 28 Zhang MM, et al. Rapid screening, identification, and purification of neuraminidase inhibitors from *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. by ultrafiltration with HPLC-ESI-TOF-MS combined with semipreparative HPLC [ J ]. *J Sep Sci*, 2016, 39: 2097-2104.
- 29 Sheldon RA, et al. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how [ J ]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 6223-6235.
- 30 Hanefeld U, et al. Understanding enzyme immobilisation [ J ]. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 453-468.
- 31 Zhang B, et al. Frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry for screening mixtures of enzyme inhibitors [ J ]. *Anal Biochem*, 2001, 299: 173-182.
- 32 Nie YL, et al. Immobilized enzyme reactor in on-line LC and its application in drug screening [ J ]. *Chromatographia*, 2009, 69: 5-12.
- 33 Min WN, et al. Capillary electrophoresis applied to screening of trypsin inhibitors using microreactor with trypsin immobilized by glutaraldehyde [ J ]. *Anal Biochem*, 2013, 438: 32-38.
- 34 Krenkova J, et al. Highly efficient enzyme reactors containing trypsin and endoproteinase LysC immobilized on porous polymer monolith coupled to MS suitable for analysis of antibody

- ies[J]. *Anal Chem*,2009,81:2004-2012.
- 35 Cheng MX, et al. Trypsin inhibitor screening in traditional Chinese medicine by using an immobilized enzyme microreactor in capillary and molecular docking study [J]. *J Sep Sci*,2017,40:3168-3174.
- 36 Zhang AZ, et al. Screening  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles [J]. *Food Chem*,2013,141:1854-1859.
- 37 Min W, et al. Capillary electrophoresis applied to screening of trypsin inhibitors using microreactor with trypsin immobilized by glutaraldehyde[J]. *Anal Biochem*,2013,438:32-38.
- 38 Krajewska B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations; a review [J]. *Enzyme Microb Technol*,2004,35:126-139.
- 39 Biró E, et al. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization [J]. *J Biochem Biophys Methods*,2008,70:1240-1246.
- 40 Taqieddin E, et al. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules [J]. *Biomaterials*, 2004, 25:1937-1945.
- 41 Xi FN, et al. Preparation of macroporous chitosan layer coated on silica gel and its application to affinity chromatography for trypsin inhibitor purification [J]. *React Funct Polym*,2006,66:682-688.
- 42 Lakhiari H, et al. Insulin adsorption on coated silica based supports grafted with *N*-acetylglucosamine by liquid affinity chromatography [J]. *J Chromatogr B*,2004,808:35-41.
- 43 Girelli AM, et al. Immobilized tyrosinase reactor for on-line HPLC application; development and characterization [J]. *Sens Actuators B Chem*,2007,121:515-521.
- 44 Pfaunmiller EL, et al. Affinity monolith chromatography; a review of principles and recent analytical applications [J]. *Anal Bioanal Chem*,2013,405:2133-2145.
- 45 Lebert JM, et al. Solid-phase assays for small molecule screening using sol-gel entrapped proteins [J]. *Biochem. Cell Biol*,2008,86:100-110.
- 46 Guo LP, et al. Screening  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis [J]. *J Pharm Anal*, 2010,53:1250-1253.
- 47 Vatta LL, et al. Magnetic nanoparticles; Properties and potential applications [J]. *Pure Appl. Chem*,2006,78:1793-1801.
- 48 Zhou Z, et al. Recent progress in biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts [J]. *Top Catal*,2012,55:1081-1100.
- 49 Yu WH, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on MSU-H type mesoporous silica for selective esterification of conjugated linoleic acid isomers with ethanol [J]. *J Mol Catal*,2015,111:43-50.
- 50 Lei SJ, et al. Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit [J]. *Appl Surf Sci*,2011,257:4096-4099.
- 51 Yu SB, et al. Gas chromatography-mass spectrometry determination of earthy-musty odorous compounds in waters by two phase hollow-fiber liquid-phase microextraction using polyvinylidene fluoride fibers [J]. *J Chromatogr A*,2014,1329:45-51.
- 52 Tao Y, et al. Hollow fiber based affinity selection combined with high performance liquid chromatography-mass spectrometry for rapid screening lipase inhibitors from lotus leaf [J]. *Anal Chim Acta*,2013,785:75-81.
- 53 Min WN, et al. On-line immobilized acetylcholinesterase microreactor for screening of inhibitors from natural extracts by capillary electrophoresis [J]. *Anal Bioanal Chem*,2012,404:2397-2405.
- 54 Vanzolini KL, et al. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry; an on-flow tool for ligand screening [J]. *J Med Chem*,2013,56:2038-2044.
- 55 Wang LH, et al. Online screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural products using monolith-based immobilized capillary enzyme reactors combined with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1563: 135-143.
- 56 Lin H, et al. A strategy for screening trypsin inhibitors from traditional Chinese medicine based on a monolithic capillary immobilized enzyme reactor coupled with offline liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*,2019,42:1980-1989.
- 57 Cornelio VE, et al. Cathepsin D immobilized capillary reactors for on-flow screening assays [J]. *J Pharm Anal*,2018,151:252-259.
- 58 Lin PT, et al. Preparation of a dual-enzyme co-immobilized capillary microreactor and simultaneous screening of multiple enzyme inhibitors by capillary electrophoresis [J]. *J Sep Sci*, 2013,36:2538-2543.
- 59 Duan J, et al. Application and development of bioaffinity chromatography columns in natural product screening [J]. *J Jinan Univ; Nat Sci Med (暨南大学学报: 自科与医学版)*, 2021,42:367-378.
- 60 Zhuo RJ, et al. Ligand fishing; a remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products [J]. *Molecules*,2016,21:1516.
- 61 Yasuda M, et al. Synthesis and characterization of SIRT6 pro-

- tein coated magnetic beads; identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts [J]. *Anal Chem*, 2011, 83:7400-7407.
- 62 Tao Y, et al. Rapid screening and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27:148-155.
- 63 Li YF, et al. Rapid screening and identification of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 960:166-173.
- 64 Vanzolini KL, et al. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: a new tool for plant extract ligand screening [J]. *Talanta*, 2013, 116:647-652.
- 65 Liu LL, et al. Analysis of tyrosinase binders from *Glycyrrhiza uralensis* root: evaluation and comparison of tyrosinase immobilized magnetic fishing-HPLC and reverse ultrafiltration-HPLC [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 932:19-25.
- 66 Jonker N, et al. Online magnetic bead dynamic protein-affinity selection coupled to LC-MS for the screening of pharmacologically active compounds [J]. *Anal Chem*, 2009, 81:4263-4270.
- 67 Fernández J, et al. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae) [J]. *J. Proteome Res*, 2011, 10:1816-1827.
- 68 Heus F, et al. Development of a microfluidic confocal fluorescence detection system for the hyphenation of nano-LC to on-line biochemical assays [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398:3023-3032.
- 69 Falck D, et al. On-line electrochemistry-bioaffinity screening with parallel HR-LC-MS for the generation and characterization of modified p38 $\alpha$  kinase inhibitors [J]. *Anal. Bioanal. Chem*, 2012, 403:367-375.
- 70 Booiij P, et al. Identification of photosynthesis inhibitors of pelagic marine algae using 96-well plate microfractionation for enhanced throughput in effect-directed analysis [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48:8003-8011.
- 71 Lim KB, et al. Development of a high-throughput online solid-phase extraction/tandem mass spectrometry method for cytochrome P450 inhibition screening [J]. *J Biomol Screen*, 2010, 15:447-452.
- 72 van Elswijk DA, et al. Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1020:45-58.
- 73 de Jong CF, et al. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1112:303-310.
- 74 Mladic M, et al. At-line coupling of LC-MS to bioaffinity and selectivity assessment for metabolic profiling of ligands towards chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 1002:42-53.
- 75 Mladic M, et al. At-line nanofractionation with parallel mass spectrometry and bioactivity assessment for the rapid screening of thrombin and factor Xa inhibitors in snake venoms [J]. *Toxicon*, 2016, 110:79-89.
- 76 Otvos RA, et al. At-line cellular screening methodology for bioactives in mixtures targeting the  $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholine receptor [J]. *J Biomol Screen*, 2016, 21:459-467.
- 77 Inoue KI, et al. Urinary trypsin inhibitor as a therapeutic option for endotoxin-related inflammatory disorders [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19:513-520.
- 78 Wang JC, et al. Screening of trypsin inhibitors in *Cotinus coggygria* Scop. extract using at-line nanofractionation coupled with semi-preparative reverse-phase liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2023, 1691:463817.
- 79 Rhee IK, et al. Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay [J]. *Phytochem Anal*, 2003, 14:145-149.
- 80 Zhang QX, et al. Preparation of a  $\beta$ -cyclodextrin functionalized monolith via a novel and simple one-pot approach and application to enantioseparations [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1325:147-154.
- 81 Guo JL, et al. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products [J]. *J Pharm Anal*, 2019, 165:182-197.
- 82 Zheng ZG, et al. Screening bioactive components of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. with isolated perfused lung extraction and HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> analysis [J]. *J Pharm Anal*, 2019, 169:127-132.
- 83 Chen Z, et al. Rapid screening of neuraminidase inhibitors using an at-line nanofractionation platform involving parallel oseltamivir-sensitive/resistant neuraminidase bioassays [J]. *J Chromatogr A*, 2023, 1687:463693.