DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250815011
引用格式: 张亚勋, 张立攀, 刘骁, 等. 金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制作用机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(18): 96–103.
Zhang Yaxun, Zhang Lipan, Liu Xiao, et al. Study on the mechanism of inhibition of α-amylase by hyperoside [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(18): 96–103. (in Chinese with English abstract).

金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制作用机制研究

张亚勋[1], 张立攀[1*], 刘　骁[1], 王俊朋[1], 董建民[1], 展琦翔[2], 李　冰[1], 赵梦瑶[1], 王春杰[1], 任　钊[1]

(1. 河南省商业科学研究所有限责任公司, 郑州　450000; 2. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州　450002)

摘　要: 目的　探究金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制作用及发挥降糖活性的机制。**方法**　通过酶促动力学评价金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制作用及类型, 采用荧光光谱观察金丝桃苷对 α-淀粉酶的活性影响及机制, 利用分子对接技术从微观角度阐释金丝桃苷与 α-淀粉酶之间的分子相互作用。**结果**　金丝桃苷对 α-淀粉酶具有明显的抑制作用, 其半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC_{50})为 1.081 mg/mL, 抑制类型为可逆性的竞争性和非竞争性混合抑制。金丝桃苷对 α-淀粉酶具有荧光猝灭效应, 猝灭方式为静态猝灭, 随着金丝桃苷浓度增加, α-淀粉酶的最大发射波长出现蓝移, 表明其空间构象发生改变。分子对接结果显示金丝桃苷能够进入 α-淀粉酶空腔内, 与活性位点竞争性结合, 以氢键和疏水作用力与 THR163A、LEU165A、TRP59A、GLN63A、ARG195A、HIS201A、GLU233A、ASP300A、HIS305A 发生相互作用, 两者结合能为–8.3 kcal/mol, 结合紧密。**结论**　金丝桃苷与 α-淀粉酶形成复合物, 阻碍酶催化底物, 进一步降低酶的活力, 达到降糖的目的。

关键词: 金丝桃苷; 荧光猝灭; 抑制; α-淀粉酶; 分子对接
中图分类号: TS201.4　　**文献识别码:** A　　**文章编号:** 2095–0381(2026)18–0096–08

Study on the mechanism of inhibition of α-amylase by hyperoside

ZHANG Ya-Xun[1], ZHANG Li-Pan[1*], LIU Xiao[1], WANG Jun-Peng[1], DONG Jian-Min[1], ZHAN Qi-Xiang[2], LI Bing[1], ZHAO Meng-Yao[1], WANG Chun-Jie[1], REN Zhao[1]

(1. *Henan Commerce Science Institute Co*., *Ltd*., *Zhengzhou* 450000, *China*; 2. *Institute of Food Science and Technology*, *Henan Agricultural University*, *Zhengzhou* 450002, *China*)

ABSTRACT: Objective　To investigate the inhibitory effect of hyperoside on α-amylase and its mechanism of exerting hypoglycemic activity. **Methods**　The inhibitory effect and type of hyperoside on α-amylase were evaluated via enzymatic kinetics. Fluorescence spectroscopy was used to observe the effect of hyperoside on α-amylase activity and its underlying mechanism. Molecular docking technology was employed to elucidate the molecular interactions between hyperoside and α-amylase from a microscopic perspective. **Results**　Hyperoside exhibited a significant inhibitory effect on α-amylase, with a median inhibitory concentration (IC_{50}) of 1.081 mg/mL. The inhibition type

收稿日期: 2025-08-15
基金项目: 河南省科学院成果转移转化项目(241611016, 231611005); 河南省中央引导地方科技发展资金项目(Z20241471145); 河南省科学院基本科研业务费项目(240611009); 河南省科技研发计划联合基金项目(235200810019, 245200810024)
第一作者: 张亚勋(1989—), 男, 工程师, 主要研究方向为功能健康产品及保健食品开发。E-mail: 2323197475@qq.com
***通信作者:** 张立攀(1982—), 男, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为药食同源产品开发。E-mail: lipanzhang@163.com

was identified as reversible mixed competitive and non-competitive inhibition. Hyperoside induced a fluorescence quenching effect on α-amylase, and the quenching mode was determined to be static quenching. With the increase in hyperoside concentration, the maximum emission wavelength of α-amylase showed a blue shift, indicating a change in its spatial conformation. Molecular docking results revealed that hyperoside could enter the cavity of α-amylase, competitively bind to the active site, and interact with amino acid residues (THR163A, LEU165A, TRP59A, GLN63A, ARG195A, HIS201A, GLU233A, ASP300A and HIS305A) through hydrogen bonds and hydrophobic interactions. The binding energy between hyperoside and α-amylase was –8.3 kcal/mol, indicating a tight binding. **Conclusion** Hyperoside forms a complex with α-amylase, thereby hindering enzymatic catalysis of substrates, further diminishing enzymatic activity, and ultimately contributing to its hypoglycemic effect.

KEY WORDS: hyperoside; fluorescence quenching; inhibition; α-amylase; molecular docking

0　引　言

随着居民生活水平提升及饮食结构改变, 亚健康与慢性病人群规模显著扩大。糖尿病作为常见的慢性疾病之一, 发病率较高, 据统计 2024 年我国糖尿病人群已达 1.43 亿, 是继肿瘤、心脑血管疾病之后的第三大非传染性疾病[1]。该疾病以胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗导致的高血糖为核心特征, 严格控制血糖水平是延缓其发生发展的关键手段[2]。淀粉作为膳食葡萄糖的主要来源, 需经 α-淀粉酶水解其 α-1,4-糖苷键生成葡萄糖, 进而影响餐后血糖, 因此通过抑制 α-淀粉酶活性可延缓碳水化合物的消化水解[3], 为血糖控制及糖尿病症状缓解提供有效途径。当前临床常用降糖药物(如阿卡波糖、米格列醇)主要以 α-淀粉酶为核心治疗靶点降糖控糖, 但长期服用此类药物副作用较明显[4]。近年来, 天然产物在降糖领域发挥作用的潜力日益凸显, 引起了国内外科研工作者的广泛关注, 大量研究表明多酚、黄酮、多糖、多肽等活性成分均具有明显的 α-淀粉酶抑制作用[5], 是开发糖尿病功能健康食品的绝佳原料, 具有广泛的应用前景。

金丝桃苷是天然的黄酮类化合物, 广泛存在于金丝桃科、蔷薇科、桔梗科、豆科、山茱萸科等果实和全草中。金丝桃苷具有广泛的生物活性, 在治疗心血管疾病、抗炎、抗抑郁、降血压、降糖等方面疗效显著[6]。目前关于金丝桃苷对 α-淀粉酶抑制作用的研究较少, 且对其作用机制、抑制类型等方面缺乏系统研究。王倩等[7]研究发现香蕉果肉多酚在 1 mg/mL 质量浓度时对 α-淀粉酶的抑制率达(76.25±3.79)%, 经鉴别其中含有金丝桃苷、紫云英苷、秦皮乙素 3 种多酚类化合物。王会等[8]发现核桃楸叶乙酸乙酯萃取物对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶具有明显的抑制作用, 经鉴定其主要活性成分为金丝桃苷、异槲皮素和紫云英苷。王辉[9]从番石榴叶醇提取物中分离出 7 种对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶具有抑制作用的物质, 其中金丝桃苷对 α-淀粉酶的半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC_{50})为(6.1±0.3) mmol/L。为了明确金丝桃苷对 α-淀粉酶的作用机制, 本研究从酶动力学、荧光光谱、分子动力学 3 方面分析了抑制的作用类型、空间结构的变化、分子间作用力及结合位点等, 期望为金丝桃苷降糖类功能健康产品的开发提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

金丝桃苷标准品(纯度>99.8%)、0.01 mmol/L pH 6.8 磷酸缓冲溶液、3,5-二硝基水杨酸试剂(3,5-dinitrosalicylic acid reagent, DNS)、阿卡波糖(分析纯)(上海源叶生物科技有限公司); 猪胰腺 α-淀粉酶(50 U/mg, 国药化学试剂集团有限公司); 可溶性淀粉(分析纯, 烟台双双化学试剂有限公司); 无水乙醇(分析纯, 上海易恩化学技术有限公司)。

1.2　仪器与设备

F-7000 型荧光分光光度计[赛伯乐(北京)仪器有限公司]; UV1901 双光束紫外可见分光光度计(青岛路博建业环保科技有限公司); PY-E627 电子天平(精度 0.01 g, 深圳市普云电子有限公司); 101-2A 煤炭鼓风干燥箱(鹤壁市科达仪器仪表有限公司); RC6 落地式大容量高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司); HH-4 数显恒温水浴锅(常州市亿能实验仪器厂)。

1.3　试验方法

1.3.1　金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制动力学

参考沈荷玉等[10]方法, 略有修改。准确称取 20.0 mg 金丝桃苷标准品, 以 60%乙醇溶液制备 10 mg/mL 标准品溶液, 吸取一定体积的标准液梯度稀释制备 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/mL 的金丝桃苷标准液, 以磷酸缓冲液制备 0.02 mg/mL 的 α-淀粉酶溶液(50 U/mL), 分别吸取 0.5 mL 不同浓度的金丝桃苷标准液与 0.5 mL 的 α-淀粉酶溶液加入 25 mL 具塞玻璃管, 混合均匀, 37 ℃下恒温水浴 5 min, 随后加入 1%质量浓度的淀粉溶液, 混合均匀, 继续在 37 ℃下反应 15 min, 加入 0.5 mL DNS 试剂, 立即放入沸水浴反应 5 min, 取出, 冷却至室温, 以纯净水定容至刻度线, 于 540 nm 波长下测定吸光值, 按照式(1)计算抑制率。采用 logit 函数计算金丝桃苷对 α-淀粉酶的半数抑制浓度, 按式(2)分别计算出 $\ln[(1-Y)/Y]$, 以 $\ln(X)$为横坐标作图。

$$Y/\%=\frac{(A_0-A'_0)-(A_1-A'_1)}{(A_0-A'_0)}\times 100\% \quad (1)$$

$$\ln[Y/(1-Y)]=k\ln(X)+b \quad (2)$$

式中: Y 为抑制率; A_0 为空白组吸光值; A_0'为空白对照组吸光值; A_1 为样品组吸光值; A_1'为样品对照组吸光值; k 为斜率; X 为金丝桃苷质量浓度, mg/mL; b 为截距。

1.3.2 金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制类型

参考李志鹏等[11]方法, 略有修改。固定 1%淀粉溶液, 将不同浓度 α-淀粉酶(0~1 U/mL)与金丝桃苷标准溶液进行混合, 按照 1.3.1 方法测定不同浓度的金丝桃苷对酶活性的抑制反应速率; 固定 α-淀粉酶浓度 1 U/mL, 随着淀粉浓度的改变(1.0000%、0.5000%、0.2500%、0.1250%、0.0625%), 分别测定不同质量浓度金丝桃苷溶液(4、2、1 mg/mL)时的酶促反应速率。采用 Lineweaver-Burk 作图法绘制以酶促反应速率($1/v$)为纵坐标、以淀粉溶液 $1/[S]$为横坐标的双倒数曲线图, 判断金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制类型。具体计算见式(3)。

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{v_{max}}\times\left(\frac{[I]}{K_i}+1\right)\times\frac{1}{[S]}+\frac{1}{v_{max}} \quad (3)$$

式中: v 为酶促反应速率, ΔOD/min, 指在特定条件(温度、pH、酶浓度等恒定)下, 单位时间内底物转化为产物的量, 是实验中实际测定的反应速率; v_{max} 为最大反应速率, ΔOD/min, 指当酶的活性中心被底物完全饱和(即所有酶分子都与底物结合形成酶-底物复合物)时, 酶促反应所能达到的最高速率, 它反映了酶的催化能力上限, 仅与酶的浓度和催化效率相关; $[S]$为底物浓度, %, 指反应体系中底物(淀粉)的初始浓度; K_m 为米氏常数, %, 指酶促反应速率达到最大速率(v_{max})一半时对应的底物浓度, 是衡量酶对底物亲和力的核心参数, K_m 值越小, 酶对底物的亲和力越强; K_m 值越大, 亲和力越弱; K_i 为抑制常数, mg/mL, 衡量抑制剂(金丝桃苷)与酶结合亲和力的参数, K_i 值越小, 说明抑制剂与酶的结合能力越强; K_i 值越大, 结合能力越弱; $[I]$为金丝桃苷质量浓度, mg/mL。

1.3.3 荧光猝灭分析

参考 Liu 等[12]方法, 略有修改。将 200 μL 不同浓度的金丝桃苷溶液(0~250 μmol/L)与 4 mL α-淀粉酶(1 U/mL)混合均匀, 分别置于 37 ℃下孵育 5 min, 进行荧光光谱扫描, 激发波长为 280 nm, 发射波长为 300~450 nm, 狭缝宽度为 10 nm, 扫描速率为 1200 nm/min。

1.3.4 分子对接

参考汤莹莹等[13]的方法, 利用 Auto Dock Tool 1.5.7 软件进行金丝桃苷和 α-淀粉酶的相互作用信息分析。金丝桃苷分子从 Pubchem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)网站下载, 保存为 mol2 格式, α-淀粉酶(PDB code:3BAJ)分子 3D 结构从 PDB (https://www.rcsb.org/)网站下载。对 α-淀粉酶分子进行去水、加氢、计算电荷等前处理, 保存为.PDBQT 格式, 确定盒子中心位置坐标为(X, Y, Z)=(7.508, 20.080, 50.540)。对接之后的亲和能越低, 表示结合的越稳定。利用 Pymol 2.4.0 软件对金丝桃苷/α-淀粉酶复合物构象绘图分析。

1.4 数据处理

每组试验 3 个平行, 结果以平均值±标准偏差表示, 利用 WPS Office 2023 Excel 记录数据并完成参数计算。采用 Origin 2019b 作图, 使用 Auto Dock Tools 1.5.7 软件进行分子对接, 用 Pymol 2.4.0 进行分子空间构象作图。组间差异显著性检验: 两组间比较采用独立样本 Student's t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著性差异法多重比较检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

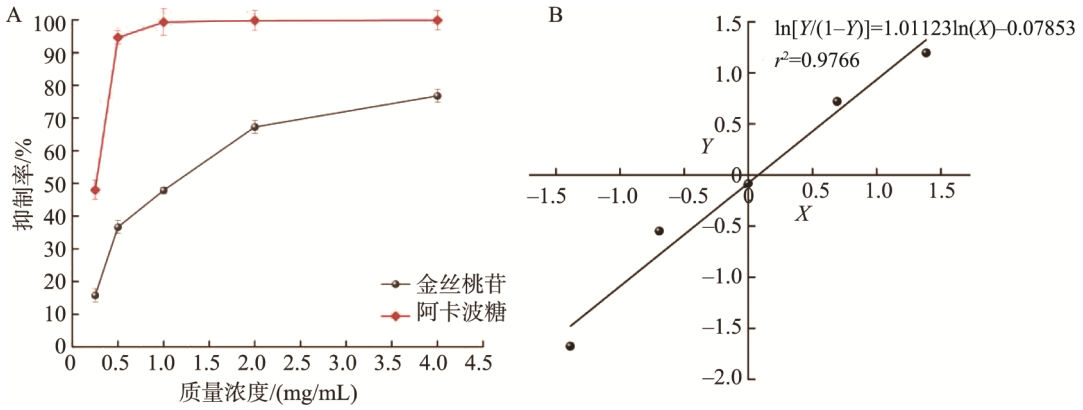
2 结果与分析

2.1 金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制作用

金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制作用见图 1, 由图 1A 可知随着金丝桃苷质量浓度的增加, 抑制率明显提高, 表明抑制剂浓度升高时, 其与 α-淀粉酶活性中心(或别构位点)的结合概率增加, 导致酶对底物的催化能力持续下降, 当质量浓度为 4 mg/mL 时抑制率达(78.45±2.27)%。IC_{50} 常被用于评价某物质的抑制能力, 数值越高表示抑制效果越差, 反之则越强。通过 logit 函数拟合得到 $\ln[Y/(1-Y)]$与 $\ln(X)$的线性关系为 $\ln[Y/(1-Y)]=1.01123\ln(X)-0.07853$, $r^2=0.9766$(图 1B), 经计算, 金丝桃苷对应的 IC_{50} 为 1.081 mg/mL。以临床降糖药物阿卡波糖为阳性对照[0.5 mg/mL 时抑制率达(94.73±2.01)%], 金丝桃苷的抑制活性确实较弱($P<0.05$), 这可能与二者的作用机制差异相关, 但与常见天然降糖功能因子相比, 金丝桃苷表现出显著优势: 其 IC_{50} 远低于杨梅素(9.25 mg/mL)和绿原酸(4.2 mg/mL), 且略优于鼠尾草酸(1.12 mg/mL)、茶多酚(1.35 mg/mL)[14−17], 表明是极具开发前景的 α-淀粉酶潜在抑制剂。金丝桃苷的来源广泛、食用安全, 可作为天然降糖成分添加至谷物制品、饮料中[18], 通过延缓淀粉类食物的消化吸收, 辅助控制餐后血糖波动, 尤其适合糖尿病前期人群的日常膳食干预, 开发潜力巨大。

2.2 抑制动力学分析

由动力学曲线可以判断金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制类型, 从图 2A 中可以看出不同金丝桃苷质量浓度对应的直线均通过原点, 说明即使存在抑制剂, 酶的催化活性未被永久破坏, 仍能够与底物发生催化反应, 具有可逆性, 斜率减小反映体系中"每单位酶的有效催化能力"下降, 原因是抑制剂与酶结合, 使游离酶浓度降低, 导致反应速率随抑制剂浓度增长减小, 这是可逆抑制的标志性规律[19]。抑制类型分为竞争性、非竞争性、反竞争性、混合型抑制[20], 由 Lineweaver-Burk 双倒数图可以判断金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制类型, 分别加入 1、2、4 mg/mL 的金丝桃苷, 在不同底物浓度下绘制曲线, 见图 2B, 由图 2B 可知, 随着金丝桃苷浓度的增加, 直线斜率增大, 与 Y 轴的交点上移, 最大的酶促反应速率 v_{max} 逐渐减小, 表明抑制

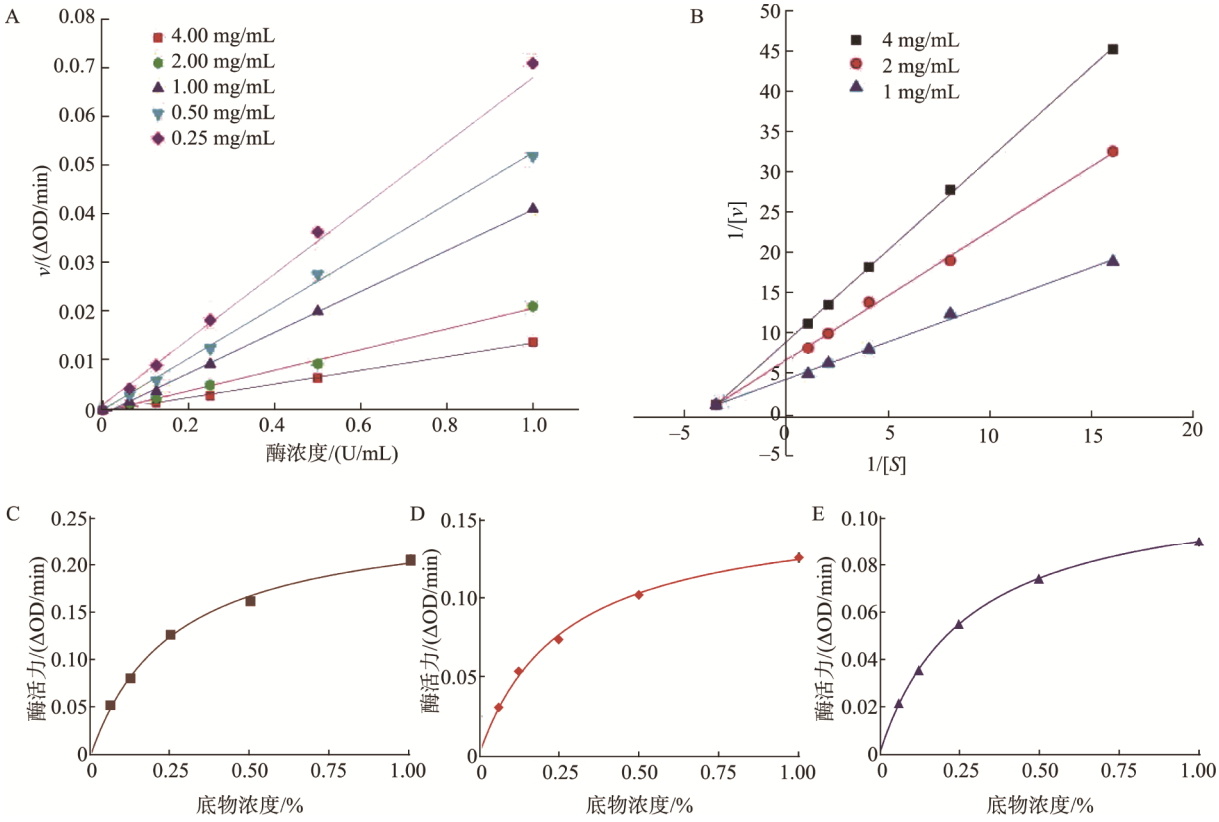


注: A. 抑制作用曲线; B. 通过 logit 函数计算 IC_{50}。

图 1　金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制作用

Fig.1　Inhibitory effects of hyperoside on α-amylase

剂既与游离酶结合(竞争性抑制部分)，又与酶-底物复合物结合(非竞争性抑制部分)，形成的酶-底物-抑制剂复合物无法转化为产物，体系中“能有效催化反应的酶-底物复合物比例”随抑制剂浓度升高而降低，最终导致 v_{max} 下降。K_m 值由 0.2574 mg/mL 增加至 0.2667 mg/mL，表明金丝桃苷可与游离酶结合，竞争酶的活性中心，使底物需更高浓度才能实现“半饱和结合”(即酶对底物的表观亲和力降低)，因此 K_m(半饱和底物浓度)升高。但由于金丝桃苷对酶的结合亲和力弱于对酶-底物复合物的结合亲和力，故 K_m 仅轻微增加。3 条曲线相交于第二象限，纯竞争性抑制曲线交于 Y 轴(v_{max} 不变)，纯非竞争性抑制曲线交于 X 轴(K_m 不变)，混合型抑制因“酶与酶-底物结合抑制剂的亲和力不同($K_i \neq K_i'$)”，曲线交点落入第二象限[21]，因此该抑制类型为竞争性和非竞争性的混合抑制。由非线性最小二乘法全局拟合 Michaelis-Menten 抑制模型，拟合得到的曲线图见图 2C~E，拟合得到 v_{max}、K_m 见表 1。



注: A. 抑制动力学曲线; B. Lineweaver-Burk 双倒数图; C. 1 mg/mL 金丝桃苷; D. 2 mg/mL 金丝桃苷; E. 4 mg/mL 金丝桃苷。

图 2　金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制动力学

Fig.2　Inhibitory kinetics of hyperoside on α-amylase

表 1 金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制动力学参数

Table 1 Inhibitory kinetic parameters of hyperoside on α-amylase

抑制剂质量浓度/(mg/mL)	动力学参数				
	K_m/%	v_{max}/(ΔOD/min)	R^2	95%Cl (K_m)	95%Cl (v_{max})
4	0.2667±0.003	0.1146±0.005	0.9997	0.2599~0.2736	0.1134~0.1157
2	0.2624±0.011	0.1563±0.002	0.9963	0.2396~0.2875	0.1510~0.1619
1	0.2574±0.013	0.2547±0.005	0.9947	0.2309~0.2870	0.2445~0.2656

注: 95% CI 为 95%置信区间(95% confidence interval), 指通过非线性回归拟合米氏方程时, 动力学参数 K_m、v_{max} 估计值的 95% CI, 用于反映参数拟合的精确度; 区间越窄表明参数估计越稳定可靠。

2.3 普通荧光光谱分析

研究表明在一定激发波长下, 蛋白质的酪氨酸(tyrosine, Tyr)、色氨酸(tryptophan, Trp)、苯丙氨酸会发出荧光, 因此蛋白质的荧光特性与这几个氨基酸关系密切。如图 3 所示, α-淀粉酶在 343 nm 波长处具有较强的荧光, 随着金丝桃苷浓度的增加, α-淀粉酶荧光强度逐渐减弱, 这与范阳扬[22]研究结果类似, 表明加入金丝桃苷能够使 α-淀粉酶内源荧光发生猝灭, 随着金丝桃苷浓度增加, 最大发射波长(λ_{max})发生了蓝移(343 nm→337 nm)(图 3A), 表明 α-淀粉酶与金丝桃苷发生了相互作用, 使酶的空间构象发生了改变, 从而导致酶的活性降低。通过对荧光猝灭分析能够获得一些关于相互作用的信息, 如结合机制、结合常数、猝灭常数、结合位点等[23]。荧光猝灭分为动态猝灭和静态猝灭, 荧光猝灭分析需要考虑内场效应校正, 内场效应校正与猝灭参数分析, 需遵循“吸光度测定→荧光校正→动力学模型拟合”步骤, 内场效应由“激发光吸收”和“发射荧光吸收”共同导致, 校正如公式(4)。

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{(A_{ex} - A_{em}) \times l} \tag{4}$$

式中: F_{corr} 为校正后荧光强度; F_{obs} 为校正前强度; A_{ex} 为 280 nm 处吸光度; A_{em} 为 340 nm 处吸光度; l 为光程, 取 1 cm。内场效应校正结果见表 2。

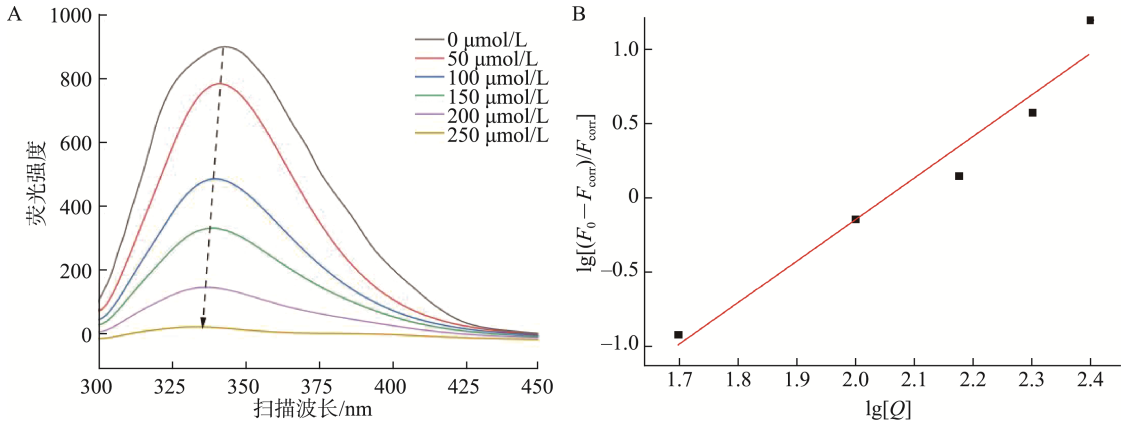


图 3 金丝桃苷对 α-淀粉酶的荧光猝灭作用

Fig.3 Fluorescence quenching effects of hyperoside on α-amylase

表 2 内场效应校正结果

Table 2 Calibration results of internal field effect

金丝桃苷浓度/(μmol/L)	A_{ex} (280 nm)	A_{em} (340 nm)	观测荧光 F_{obs}	F_{corr} (校正后)
0	0.001	0	920.8	923.0
50	0.030	0.020	803.9	822.6
100	0.050	0.030	508.2	532.2
150	0.080	0.050	354.3	379.6
200	0.110	0.060	170.4	191.2
250	0.140	0.080	47.2	54.2

荧光强度遵循 Stern-Volmer 公式[24]见式(5)。

$$\frac{F_0}{F_{corr}} = 1 + K_q \tau_0 [Q] \tag{5}$$

式中: F_0 为 α-淀粉酶的荧光强度; F_{corr} 为加入金丝桃苷后的校正荧光强度; [Q]为金丝桃苷浓度, mol/L; K_q 为猝灭速率常数, L·mol^{-1}·s^{-1}; τ_0 为荧光分子的初始平均寿命, 10^{-8} s。

根据表 3 数据, 采用线性拟合得到以[Q] (mol/L)为 X 轴, F_0/F_{corr} 为 Y 轴的方程见式(6)。

$$\frac{F_0}{F_{corr}} = 1 + 6.81 \times 10^{11} \times [Q] \tag{6}$$

表 3　Stern-Volmer 方程数据
表 3　Stern-Volmer equation data

[Q]浓度/(μmol/L)	F_0/F_{corr}
0	1.000
50	1.122
100	1.734
150	2.432
200	4.828
250	17.030

由斜率 6.81×10^{11} 计算得到 $K_q=6.81\times10^{19}$ L·mol^{-1}·s^{-1}, 远大于 2×10^{10} L·mol^{-1}·s^{-1}(扩散控制猝灭临界值)[25], 确证金丝桃苷对 α-淀粉酶的猝灭形式为静态猝灭。

当金丝桃苷对 α-淀粉酶为静态猝灭时, 结合常数和结合位点的计算按照式(7)计算[26]。

$$\lg\frac{F_0-F_{corr}}{F_{corr}}=\lg K_a+n\lg[Q] \quad (7)$$

式中: K_a为表观结合常数; n 为结合位点; [Q]为猝灭剂浓度, mol/L。以 $\lg[(F_0-F_{corr})/F_{corr}]$为纵坐标, 以 lg[Q]为横坐标绘制曲线图, 见图 3B, 通过拟合计算得到线性回归方程: $Y=2.804X-5.7515$, $r^2=0.9556$, 根据式(7)计算 K_a 和 n 分别为 1.77×10^6 L/mol、2.804, n 接近于 3, 表明金丝桃苷与 α-淀粉酶有 3 个结合位点, 说明两者相互作用时按照 3:1 结合。

2.4　同步荧光扫描分析

步荧光扫描通过固定波长间隔(Δλ), 可分别解析 Tyr (Δλ=15 nm)和 Trp (Δλ=60 nm)残基的微环境变化[12], 如图 4A、4B 所示, 随金丝桃苷浓度升高, Tyr 的同步荧光强度呈下降趋势, 且最大发射波长发生蓝移(从 284.0 nm 至 279.3 nm), Tyr 的荧光峰蓝移, 反映其周围环境的疏水性增强(Tyr 的 π→π*跃迁所需能量与环境极性负相关, 极性越低, 发射波长越短)[27], 金丝桃苷的疏水基团(如黄酮母核)可能与 Tyr 残基形成疏水相互作用, 导致其微环境疏水性提升, 这种直接的相互作用同时引发 Tyr 荧光团的能量转移, 造成荧光猝灭。Trp 的同步荧光强度随金丝桃苷浓度升高而降低, 且最大发射波长出现红移从(283.3 nm 至 290.3 nm), Trp 的荧光峰红移, 表明其周围环境的极性增强(Trp 的 π→π*跃迁所需能量随环境极性升高而降低, 发射波长变长)[28], 金丝桃苷结合 α-淀粉酶后, 诱导酶发生构象重排, 使原本处于酶疏水核心的 Trp 残基向分子表面暴露, 与极性溶剂(如水分子)接触增多, 导致其微环境极性上升, 这种构象变化间接引起 Trp 荧光团的能量分散, 造成荧光猝灭。同步荧光猝灭比值(ratio of synchronous fluorescence quenching, RSFQ)结果显示(图 4C), 相同条件下 Tyr 的 RSFQ 显著高于 Trp, 说明金丝桃苷对 α-淀粉酶的荧光猝灭以 Tyr 为主导[29], Tyr 残基更直接参与了与金丝桃苷的相互作用(如氢键、疏水作用)。

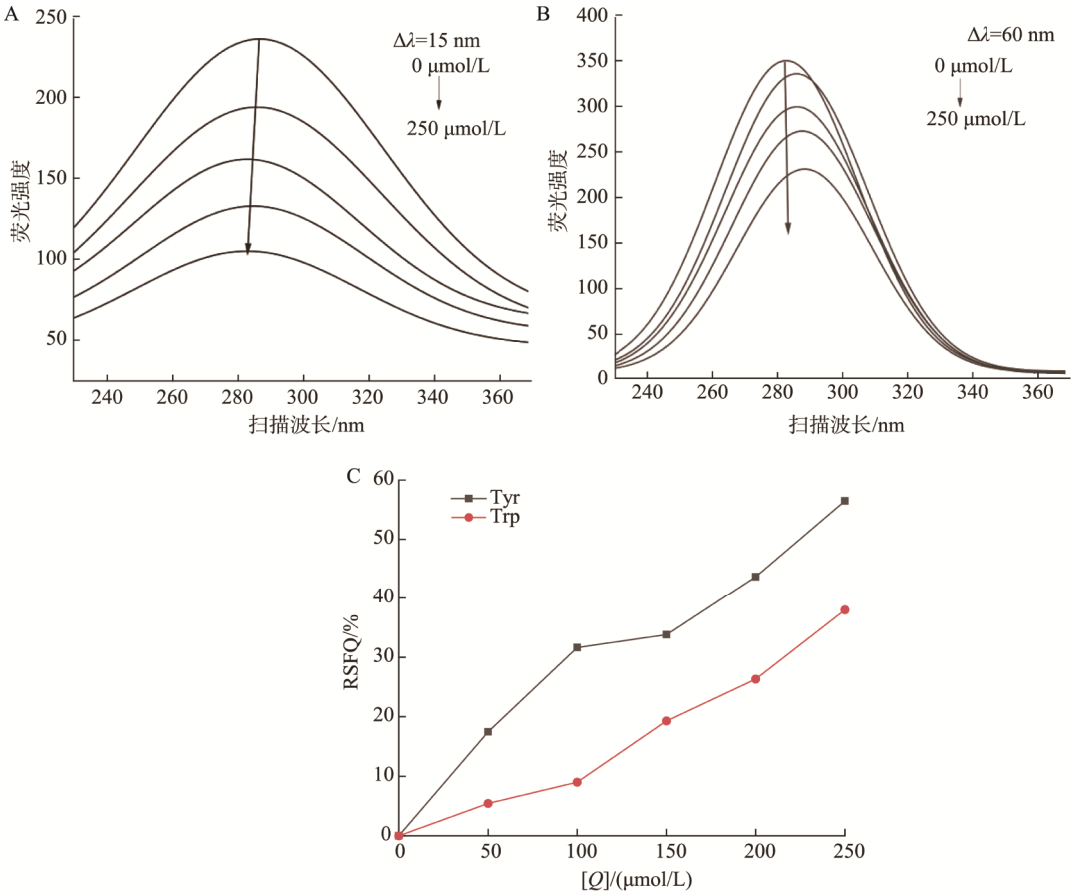


图 4　金丝桃苷与 α-淀粉酶的同步荧光光谱
Fig.4　Synchronous fluorescence spectra of hyperoside and α-amylase

2.5 分子对接结果

通过分子对接可以预测多种小分子(绿原酸、芦丁、槲皮素等)[30]与 α-淀粉酶的相互作用模式。金丝桃苷与 α-淀粉酶的分子对接模式见表 4，其中结合能最高的为–8.3 kcal/mol，由图 5 可知，金丝桃苷嵌入 α-淀粉酶内部，与 THR163A、LEU165A、TRP59A、GLN63A、ARG195A、HIS201A、GLU233A、ASP300A、HIS305A 等大量的氨基酸残基结合，共形成了 9 个氢键和 2 个疏水作用力(表 5)，表明金丝桃苷与 α-淀粉酶的活性位点竞争性结合，阻碍底物与酶催化反应，降低 α-淀粉酶的活力。

表 4 分子对接结果

Table 4 Results of molecular docking

模式	对接结合能/(kcal/mol)
1	–8.3
2	–8.1
3	–7.7
4	–7.7
5	–7.6
6	–7.5
7	–7.5
8	–7.5
9	–7.4

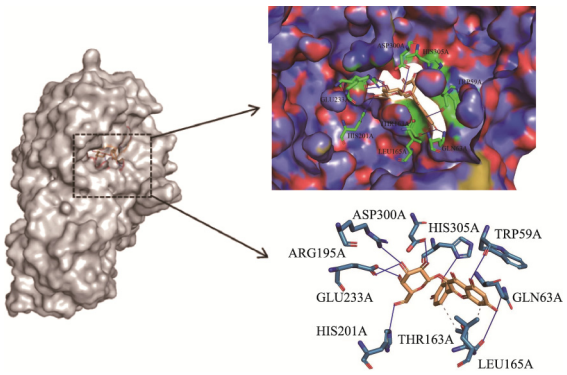


图 5 金丝桃苷与 α-淀粉酶的分子对接

Fig.5 Molecular docking of hyperoside and α-amylase

表 5 结合力及残基类型

Table 5 Binding forces and residue types

结合力类型	氨基酸残基	键长
疏水作用力	THR163A	3.75
疏水作用力	LEU165A	3.51
氢键	TRP59A	2.20
氢键	GLN63A	3.04
氢键	THR163A	3.17
氢键	ARG195A	2.24
氢键	HIS201A	2.31
氢键	GLU233A	2.08
氢键	GLU233A	2.33
氢键	ASP300A	3.35
氢键	HIS305A	2.15

3 结 论

通过生物酶活性抑制降糖实验证明金丝桃苷对 α-淀粉酶具有明显的抑制作用，其 IC_{50} 为 1.081 mg/mL，利用抑制动力学曲线分析了金丝桃苷对 α-淀粉酶的抑制类型，随着金丝桃苷浓度增加，速率常数 v_{max} 逐渐减小，米氏常数 K_m 逐渐变大，符合混合抑制类型特征。荧光猝灭反应结果表明金丝桃苷以静态猝灭方式猝灭 α-淀粉酶荧光强度。分子对接结果表明，金丝桃苷通过氢键和疏水作用力与 α-淀粉酶相互作用，进入酶的催化活性空腔内，与相关残基结合，抑制酶活性。本研究利用实验手段和分子模拟技术表明，金丝桃苷能够有效抑制 α-淀粉酶的活性，降低淀粉的水解，从而达到稳定血糖的目的，为金丝桃苷作为降糖食品功能因子的研究提供理论依据。

参考文献

[1] 叶真. 全人群全生命周期的糖尿病五级防治策略[J]. 中华糖尿病杂志, 2024, 16(9): 937–944.
Ye Zhen. Five-level diabetes control strategy for the entire population and full lifecycle [J]. Chinese Journal of Diabetes Mellitus, 2024, 16(9): 937–944.

[2] 杨雯, 邹佳琪, 刘胜楠, 等. 人参 α-淀粉酶抑制肽的降血糖作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(7): 24–34.
Yang Wen, Zou Jiaqi, Liu Shengnan, et al. Hypoglycemic effects of ginseng α-amylase inhibitory peptides [J]. Modern Food Science & Technology, 2024, 40(7): 24–34.

[3] 李梦瑶, 梁琪, 宋雪梅. 结合分子对接技术研究牦牛乳干酪苦味肽 RK7 和 KQ7 的 α-淀粉酶抑制活性[J]. 食品科学, 2023, 44(2): 132–138.
Li Mengyao, Liang Qi, Song Xuemei. Using molecular docking to investigate the alpha-amylase inhibitory activity of bitter peptides RK7 and KQ7 derived from yak cheese [J]. Food Science, 2023, 44(2): 132–138.

[4] 胡童霞, 张楠, 朱鑫麗, 等. 荞麦蜂花粉多酚对 α-淀粉酶的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(6): 930–937.
Hu Tongxia, Zhang Nan, Zhu Xinli, et al. Inhibition effect of buckwheat bee pollen polyphenols on α-amylase [J]. Natural Product Research and Development, 2024, 36(6): 930–937.

[5] 赵二劳, 赵三虎, 范建凤, 等. 天然产物中活性成分对 α-淀粉酶抑制作用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(19): 199–203.
Zhao Erlao, Zhao Sanhu, Fan Jianfeng, et al. Research progress on the inhibition of α-amylase by active ingredients in natural products [J]. Food Research and Development, 2020, 41(19): 199–203.

[6] 曹明明, 车琳琳, 朱路文. 金丝桃苷药理作用及机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(6): 150–155.
Cao Mingming, Che Linlin, Zhu Luwen. Research progress on the pharmacological action and mechanism of hyperoside [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 24(6): 150–155.

[7] 王倩, 王娟, 傅金凤, 等. 青香蕉果肉多酚成分鉴定及其对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2024, 45(7): 61–68.
Wang Qian, Wang Juan, Fu Jinfeng, et al. Identification of polyphenolic

components in unripe banana pulp and their inhibitory effects on α-amylase and α-glucosidase [J]. Food Science, 2024, 45(7): 61–68.

[8] 王会, 刘汇, 张楠茜, 等. 核桃楸叶降血糖和抗氧化有效部位的筛选及其成分分析[J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 312–315, 322.
Wang Hui, Liu Hui, Zhang Nanxi, et al. Screening and chemical analysis of hypoglycemic and antioxidant effective fractions from leaves of *Juglans mandshurica* [J]. Modern Chinese Medicine, 2019, 21(3): 312–315, 322.

[9] 王辉. 香豆素衍生物及番石榴叶化学成分的生物活性研究[D]. 广州: 中山大学, 2010: 112–116.
Wang Hui. Study on the biological activities of coumarin derivatives and chemical constituents from *Psidium guajava* leaves [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2010: 112–116.

[10] 沈荷玉, 李梦阳, 敖婧芳, 等. 没食子酸对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制作用及机理[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 31–38.
Shen Heyu, Li Mengyang, Ao Jingfang, et al. Inhibitory effect and mechanism of gallic acid on α-amylase and α-glucosidase activities [J]. Food Science, 2023, 44(22): 31–38.

[11] 李志鹏, 周晨熠, 潘书童, 等. 2 种青稞多糖对胰 α-淀粉酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 192–199.
Li Zhipeng, Zhou Chenyi, Pan Shutong, et al. Inhibitory effects of two polysaccharides from highland barley on the activity of pancreatic α-amylase [J]. Food Science, 2023, 44(22): 192–199.

[12] Liu Xiaotian, Liu Tiantian, Xu Huilong, et al. Inhibitory kinetics and bioactivities of nuciferine and methyl ganoderate on *Mucor* miehei lipase and 3T3-L1 preadipocytes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163: 1719–1728.

[13] 汤莹莹, 潘江凌, 潘劲松, 等. 基于分子对接探究三七皂苷对 α-淀粉酶活性的抑制作用[J]. 中国食品添加剂, 2025, 36(8): 24–30.
Tang Yingying, Pan Jiangling, Pan Jinsong, et al. Investigation of the inhibitory effect of *Panax notoginseng* saponins on activity of α-amylase based on molecular docking [J]. China Food Additives, 2025, 36(8): 24–30.

[14] 彭茜, 曹根凤, 陈婷, 等. 杨梅素对 α-淀粉酶的抑制机制研究[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(11): 121–128.
Peng Xi, Cao Genfeng, Chen Ting, et al. Study on the mechanism of myricetin's inhibitory effect on α-amylase [J]. China Food Additives, 2024, 35(11): 121–128.

[15] 史明威, 张梦玥, 初鸿, 等. 绿原酸对 α-淀粉酶的抑制作用及其分子对接模拟[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(4): 135–143.
Shi Mingwei, Zhang Mengyue, Chu Hong, et al. Inhibition of chlorogenic acid onα-amylase and its molecular docking simulation [J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(4): 135–143.

[16] 王静, 刁翠茹, 王华丽, 等. 鼠尾草酸对 α-淀粉酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2020, 41(3): 12–17.
Wang Jing, Diao Cuiru, Wang Huali, et al. Inhibitory mechanism of carnosic acid on alpha-amylase [J]. Food Science, 2020, 41(3): 12–17.

[17] 张宏图, 董伟进, 陈南, 等. 茶多酚对 α-淀粉酶的抑制作用及分子机理[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 90–96.
Zhang Hongtu, Dong Weijin, Chen Nan, et al. Inhibition effect and molecular mechanism of tea polyphenols on the α-amylase [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 90–96.

[18] 王红新, 张红瑞, 张毅, 等. 金丝桃苷的生物活性、液相色谱分析测试技术及应用研究进展[J]. 精细化工中间体, 2025, 55(3): 8–11, 19.
Wang Hongxin, Zhang Hongrui, Zhang Yi, et al. Biological activity and liquid chromatography analytical testing techniques of hyperoside and its application research progress [J]. Fine Chemical Intermediates, 2025, 55(3): 8–11, 19.

[19] Jia Yanan, Xue Zihan, Wang Yajie, et al. Chemical structure and inhibition on α-glucosidase of polysaccharides from corn silk by fractional precipitation [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 252: 117185.

[20] Zhao Yiling, Wang Ming, Huang Ganhui. Structure-activity relationship and interaction mechanism of nine structurally similar flavonoids and α-amylase [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86: 104739.

[21] Du Hongyan, Li Shujie. Inhibition of *Porphyra* polysaccharide on xanthine oxidase activity and its inhibition mechanism [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2022, 266: 120446.

[22] 范阳扬. 水仙苷与 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶相互作用机制研究[D]. 长春: 长春师范大学, 2023: 34.
Fan Yangyang. Interaction mechanism of narcissoside with α-amylase and α-glucosidase [D]. Changchun: Changchun Normal University, 2023: 34.

[23] Zhou Yiming, Jiang Qingyi, Ma Sijia, et al. Effect of quercetin on the *in vitro Tartary buckwheat* starch digestibility [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 818–830.

[24] Ding Huafang, Wu Xiaqing, Pan Junhui, et al. New insights into the inhibition mechanism of betulinic acid on α-glucosidase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(27): 7065–7075.

[25] 王公轲, 席辉, 田芳, 等. 光谱和分子模拟法研究乙硫异烟胺与木瓜蛋白酶的分子作用机制[J]. 化学学报, 2011, 69(1): 95–100.
Wang Gongke, Xi Hui, Tian Fang, et al. Mechanism of molecular interaction between ethionamide and papain: spectroscopic and molecular simulation investigations [J]. Acta Chimica Sinica, 2011, 69(1): 95–100.

[26] 王敏, 徐国辉, 赵一灵, 等. 金丝桃苷对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及分子机理[J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 92–99.
Wang Min, Xu Guohui, Zhao Yiling, et al. Inhibition effect and molecular mechanism of hypericin on xanthine oxidase [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(12): 92–99.

[27] Fan Yangyang, Tao Yanzhou, Wang Suqing, et al. Inhibitory interaction of narcissoside on α-glucosidase from *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by spectral analysis and molecular docking [J]. Journal of Molecular Structure, 2022, 1264: 133262.

[28] Zhang Guowen, Ma Yadi. Mechanistic and conformational studies on the interaction of food dye amaranth with human serum albumin by multispectroscopic methods [J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 442–449.

[29] Alanazi M M, Almehizia A A, Bakheit A H, et al. Mechanistic interaction study of 5,6-dichloro-2-[2-(pyridin-2-yl)ethyl] isoindoline-1,3-*Dione* with bovine serum albumin by spectroscopic and molecular docking approaches [J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2019, 27(3): 341–347.

[30] 覃亚娟, 王萍, 陈小爱, 等. 3 种黄酮类化合物对 α-淀粉酶的抑制机制[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(5): 110–122.
Qin Yajuan, Wang Ping, Chen Xiaoai, et al. Inhibition mechanism of three flavonoids on α-amylase [J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(5): 110–122.

(责任编辑: 安香玉　韩晓红)