

# 鲨鱼血胶原蛋白酶解条件及其体外活性的研究

邓春梅<sup>1</sup>, 何兰珍<sup>1</sup>, 张国光<sup>1</sup>, 吴育廉<sup>1</sup>, 温燕梅<sup>1</sup>, 洪鹏志<sup>2</sup>, 康信煌<sup>1\*</sup>

(1. 广东海洋大学化学与环境学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088)

**摘要:**为了考察鲨鱼血胶原蛋白(HXJ)酶解条件及其体外活性,以酶解后的肽得率为考察指标,在单因素的基础上,采用正交设计试验对酶解 pH、酶解温度和底物浓度进行筛选,寻找 HXJ 的最佳酶解条件;对酶解后的 HXJ 进行体外  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酶抑制活性测试,同时对其总抗氧化力和对 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子清除率进行测试。结果表明,HXJ 的最佳酶解条件为:pH 为 7.0、温度为 70℃、底物质量浓度为 0.38 mg/mL、胰酶质量浓度为 2.20 mg/mL、酶解时间为 5 h,此时肽得率为 36.50%;对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶的最大抑制率分别为 47.9% 和 97.5%;HXJ 具有一定总抗氧化能力,对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子的最大清除率分别为 29.3%、97.3% 和 25.9%。HXJ 能有效抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶,具有较强的抗氧化活性。

**关键词:**鲨鱼;胶原蛋白;酶解;活性

中图分类号:TS209

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2018)10-0118-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2018.10.026

## Study on enzymatic hydrolysis conditions of collagen from blood in *Limulus* and its vitro activities

DENG Chun-mei<sup>1</sup>, HE Lan-zhen<sup>1</sup>, ZHANG Guo-guang<sup>1</sup>, WU Yu-lian<sup>1</sup>, WEN Yan-mei<sup>1</sup>, HONG Peng-zhi<sup>2</sup>, KANG Xin-huang<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry and Environment, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** To explore the enzymatic hydrolysis conditions of collagen from blood in *Limulus* (HXJ) and its vitro activities, the optimal hydrolysis conditions for HXJ are screened through selecting enzymatic hydrolysis pH value, enzymatic hydrolysis temperature and substrate concentration by means of the orthogonal test based on single factor test with the peptide yield after enzymatic hydrolysis as evaluating index. Subsequently, the inhibitive activities of hydrolyzed HXJ are determined in vitro against  $\alpha$ -glucosidases and acetylcholinesterase, and the hydrolyzed HXJ's total antioxidant capacity and scavenging rates on DPPH free radicals, hydroxyl radicals and superoxide anion are studied too. The best enzymatic hydrolysis conditions for HXJ are as follows: pH is 7.0, enzymolysis temperature is 70℃, substrate concentration is 0.38 mg/mL, pancreatin concentration is 2.20 mg/mL and enzymolysis lasts for 5 h. Under the best conditions, the peptide yield can reach 36.50%, HXJ's inhibitive rates on  $\alpha$ -glucosidase and acetylcholinesterase are 47.9% and 97.5%, respectively, HXJ has certain total antioxidant capacity, and its scavenging rate on DPPH free radicals, hydroxyl radicals and superoxide anion are 29.3%, 97.3% and 25.9% respectively in the experimental range. To sum up, HXJ can inhibit effectively  $\alpha$ -glucosidase and acetylcholinesterase and has strong antioxidant activities.

**Key words:** Limulus blood; collagen; enzymatic hydrolysis; activities

海洋生物蛋白是开发新型海洋药物和功能食品的重要资源<sup>[1-4]</sup>。鲨鱼是一种十分珍贵的海洋生物,鲨鱼血中含有丰富的活性蛋白<sup>[5-7]</sup>,目前人们对鲨鱼血蛋白的研究主要是鲨鱼素和鲨鱼试剂<sup>[8-10]</sup>,而且提取出鲨鱼素的鲨鱼血往往作为废料处理掉,不仅浪费资源而且污染环境。为了高值化利用鲨鱼血资源,笔者以酶解后的肽得率为考察指标,在单因素的基础上,采用正交设计试验寻找 HXJ 的最佳酶解条件;并对酶解

后的 HXJ 进行体外抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酶活性测试,及其总抗氧化力和对 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子清除率测试,为 HXJ 的应用提供理论依据。

## 1 实验材料与仪器

材料与试剂:鲨鱼血胶原蛋白(HXJ),湛江博康海洋生物有限公司生产;三氯醋酸、双缩脲试剂、邻苯

收稿日期:2018-02-22;修回日期:2018-08-08

基金项目:广东海洋大学自然科学基金(Q15094, Q14176, E13503, 2013A090100009);湛江市科技局自然科学基金(A15445, A14457);国家高技术研究发展计划(863 课题)(2013AA102201)

作者简介:邓春梅(1968-),女,博士,高级实验师,研究方向为天然产物化学、天然药物化学, dcm2382405@163.com;康信煌(1965-),博士,副教授,研究方向为海洋化学,通讯联系人, kang.xinhuang@gmail.com。

三酚、二氯化铁、酪蛋白、胰酶、乙酰胆碱酯酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、石杉碱甲、阿卡波糖、总抗氧化能力试剂盒(FRAP法)等。

仪器: 紫外-可见分光光度计、酶标仪、高速低温冷冻离心机、真空冷冻干燥机等。

## 2 实验方法

### 2.1 酪蛋白标准曲线

在0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL的标准酪蛋白溶液中用蒸馏水补足到1 mL,然后分别加入4 mL双缩脲试剂,混匀,在25℃室温下放置30 min,测吸光度 $A_{540}$ ,每个浓度平行测定3次取平均值,以酪蛋白的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线<sup>[11]</sup>。

### 2.2 肽得率的测定

用TCA沉淀法测试肽得率<sup>[12]</sup>。

### 2.3 正交试验

在单因素试验的基础上,分别取酶浓度、pH、温度3个水平进行正交试验,优化鲎血胶原蛋白的最佳水解条件<sup>[13]</sup>。正交试验水平和因素如表1所示。

表1 正交实验因素和水平

水平	因素		
	A 温度/℃	B pH	C 底物质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )
1	65	6.5	1.8
2	70	7.0	2.0
3	75	7.5	2.2

### 2.4 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定

按照文献[14]所述方法进行体外 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性筛选。

### 2.5 乙酰胆碱酶抑制力测定

参照文献[15-16]中所述的方法进行体外乙酰胆碱酶抑制力测定。抑制率的计算式为:

$$\text{抑制率}(\%) =$$

$$\left\{ \frac{A_{\text{空白对照}} - (A_{\text{样品组}} - A_{\text{样品对照组}})}{A_{\text{空白对照}}} \right\} \times 100\%$$

### 2.6 总抗氧化能力测试

取样品溶液于酶标板中,加FRAP工作液混匀,在37℃微孔板恒温振荡器中孵化10 min,于593 nm波长处测定其吸光度<sup>[17]</sup>,维生素C作阳性对照。

### 2.7 DPPH 自由基清除率的测定

参照文献[18]中所述方法测定DPPH自由基的清除率。维生素C作为阳性对照。清除率的计算式为:

$$\text{清除率}(\%) =$$

$$\left\{ \frac{A_{\text{空白对照}} - (A_{\text{样品组}} - A_{\text{样品对照组}})}{A_{\text{空白对照}}} \right\} \times 100\%$$

注:空白对照组以纯水代替待测样品;样品对照组以无水乙醇代替DPPH无水乙醇溶液。

### 2.8 羟自由基的清除率测定

参照文献[19]中所述方法测定HXJ对羟自由基的清除率,用维生素C作为阳性对照。计算式为:

$$\text{清除率}(\%) =$$

$$\left\{ \frac{A_{\text{空白对照}} - (A_{\text{样品组}} - A_{\text{样品对照组}})}{A_{\text{空白对照}}} \right\} \times 100\%$$

注:空白对照组以纯水代替待测样品,样品对照组以纯水代替过氧化氢溶液。

### 2.9 超氧阴离子清除率的测定

将待测样品液加入邻苯三酚溶液,混匀后室温下反应20 min,加入浓盐酸,立即在420 nm波长处测吸光度<sup>[20]</sup>,维生素C作阳性对照。计算式为:

$$\text{清除率}(\%) =$$

$$\left\{ \frac{A_{\text{空白对照}} - (A_{\text{样品组}} - A_{\text{样品对照组}})}{A_{\text{空白对照}}} \right\} \times 100\%$$

注:空白对照组以纯水代替待测样品,样品对照组以纯水代替邻苯三酚溶液。

## 3 结果

### 3.1 酪蛋白标准曲线

酪蛋白的标准曲线如图1所示。

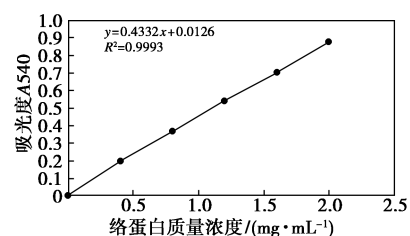


图1 酪蛋白标准曲线

由酪蛋白标准曲线可得回归方程为: $Y = 0.4332X + 0.0126$ ,  $R^2 = 0.9993$ 。

### 3.2 最佳水解酶筛选

最佳水解酶筛选结果如表2所示。

表2 不同酶的肽得率

酶的种类	胰蛋 白酶	木瓜 蛋白酶	胃蛋 白酶	碱性 蛋白酶	胰酶粉
肽得率/%	7.667	8.167	6.833	9.500	11.667

由表2可以看出,5种酶在各自催化能力最强的pH、温度范围内,胰酶粉的肽得率最高为11.67%,水解鲎血胶原蛋白选择胰酶最合适。

### 3.3 时间和胰酶质量浓度对 HXJ 酶解反应的影响

采用胰酶进行水解,胶原蛋白在 pH 8.0 以及温度 55℃ 下进行酶解,不同时间和酶质量浓度对应的肽得率如表 3 所示。

表 3 不同时间和酶质量浓度对应肽得率

序号	胰酶质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	肽得率/%					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
A	0.4	5.00	4.25	2.50	6.50	6.00	5.00
B	0.8	10.00	5.75	3.75	12.25	8.00	9.50
C	1.2	13.50	7.25	6.25	11.75	11.50	13.25
D	1.6	10.25	10.00	6.75	11.00	16.50	8.00
E	2.0	11.50	9.50	7.50	13.00	24.00	9.00
F	2.4	13.00	11.25	9.50	16.50	21.50	10.75

由表 3 可以看出,采用胰酶进行胶原蛋白水解,在 pH 8.0、温度 55℃、底物质量浓度为 0.64 mg/mL 的水解条件下,当胰酶质量浓度为 2.0 mg/mL、水解时间为 5 h 时,最高肽得率为 24.0%。

### 3.4 底物质量浓度、酶解温度和 pH 对 HXJ 酶解反应的影响

底物质量浓度、酶解温度和 pH 对 HXJ 酶解反应的影响分别如图 2~图 4 所示。

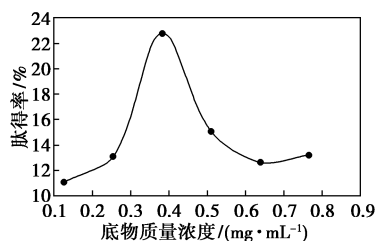


图 2 肽得率随底物浓度变化曲线

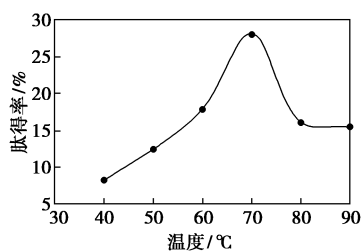


图 3 肽得率随酶解温度变化曲线

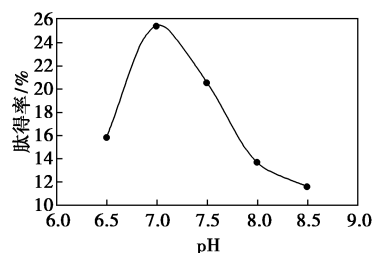


图 4 肽得率随 pH 变化曲线

由图 2 可以看出,底物质量浓度为 0.38 mg/mL 时,肽得率达到最高,为 22.74%。

由图 3 可以看出,酶解最佳为温度为 70℃。

由图 4 可以看出,最佳 pH 为 7.0。

因此,单因素实验结果得出胰酶粉酶解 HXJ 的最佳条件是:温度为 70℃、底物质量浓度为 0.38 mg/mL、酶质量浓度为 2.0 mg/mL、酶解时间为 5 h、pH 为 7.0。

### 3.5 正交试验结果

正交试验结果如表 4 所示。

表 4 正交试验结果

序号	因素			肽得率/ %
	A 温度/℃	B 酸碱度(pH)	C 酶质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	
1	1	1	1	19.00
2	1	2	2	20.33
3	1	3	3	17.50
4	2	1	2	17.25
5	2	2	3	36.50
6	2	3	1	17.75
7	3	1	3	17.38
8	3	2	1	21.00
9	3	3	2	17.00
K1	56.83	53.63	57.75	20.41
K2	71.50	77.83	54.58	
K3	55.38	52.25	71.38	
k1	18.94	17.88	19.25	
k2	23.83	25.94	18.19	
k3	18.46	17.42	23.79	
(k1-x) <sup>2</sup>	0.02	0.89	0.19	
(k2-x) <sup>2</sup>	25.17	50.81	0.39	
(k3-x) <sup>2</sup>	0.13	1.96	24.75	
极差 R	5.38	8.53	5.60	
主次顺序		B>C>A		
优水平	A2	B2	C3	
优组合		A2B2C3		

由正交实验结果中极差(R)可以得出最优组合为 A2B2C3,与实验组第 5 组实验条件相符合,得出 HXJ 与胰酶酶解反应的最佳条件是:温度为 70℃,酶质量浓度为 2.20 mg/mL,底物质量浓度为 0.38 mg/mL,pH 为 7.0,酶解时间为 5 h。

### 3.6 HXJ 酶抑制活性研究

#### 3.6.1 HXJ 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率

$\alpha$ -葡萄糖苷酶是新陈代谢过程中的关键酶, 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制可有效降低血糖浓度, 改善并预防糖尿病及其并发症<sup>[21]</sup>。HXJ 水解肽和阿卡波糖对  $\alpha$ -糖苷酶抑制率的影响分别如图 5、图 6 所示。

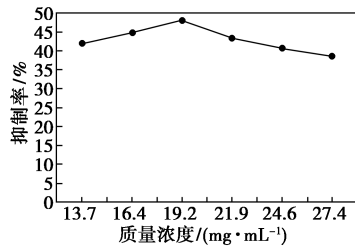


图 5 HXJ 水解肽对  $\alpha$ -糖苷酶抑制率

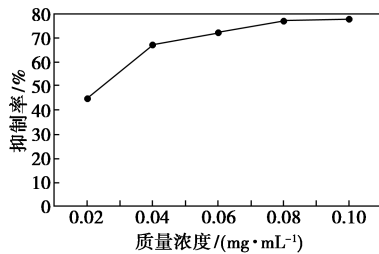


图 6 阿卡波糖对  $\alpha$ -糖苷酶抑制率

由图 5 和图 6 可以看出, 在实验测试质量浓度范围内, HXJ 能抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶, 当质量浓度为 19.2 mg/mL 时, 抑制率达到最大值 47.9%。

#### 3.6.2 HXJ 对乙酰胆碱酯酶的抑制率

HXJ 对乙酰胆碱酯酶的抑制率如表 5 所示。

表 5 HXJ 对乙酰胆碱酯酶的抑制率

HXJ		石杉碱甲	
质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	抑制率/ %	质量浓度/ ( $\mu$ g·mL <sup>-1</sup> )	抑制率/ %
0.04	69.3	1.0	85.8
0.08	71.4	2.0	91.2
0.12	85.6	3.0	92.7
0.16	91.6	4.0	92.7
0.20	97.5	5.0	98.2

由表 5 中可以看出, HXJ 能够有效地抑制乙酰胆碱酯酶, 抑制率高达 97.5%, 达到石杉碱甲的抑制效果。

### 3.7 HXJ 体外抗氧化活性研究

#### 3.7.1 HXJ 总抗氧化数据

采用 FRAP 法测试 HXJ 的总抗氧化能力,  $\text{FeSO}_4$  的标准曲线如图 7 所示, HXJ 的总抗氧化能

力如表 6 所示。

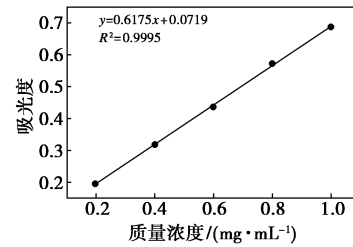


图 7  $\text{FeSO}_4$  的标准曲线

表 6 HXJ 的总抗氧化能力

HXJ 质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	0.172	0.344	0.516	0.688	0.86
FRAP	4.35	4.50	4.80	4.60	4.42

由图 7 和表 6 可以看出, HXJ 具有一定的总抗氧化能力, 当质量浓度为 0.516 mg/mL 时达到最大 FRAP 值 4.80, 并且质量浓度每增加 1 倍, FRAP 值都出现显著性变 ( $P < 0.01$ )。

#### 3.7.2 HXJ 对 DPPH 自由基的消除率

利用 DPPH 法测定 HXJ 对 DPPH 自由基消除率, 评价 HXJ 的抗氧化活性。测试结果如表 7 所示。

表 7 HXJ 对 DPPH 自由基清除能力

HXJ 质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
清除率/%	6.6	13.1	23.4	29.3	21.9

由表 7 可以看出, HXJ 具有一定 DPPH 自由基清除能力, 当质量浓度为 0.4 mg/mL 时, 清除率达到最大 29.3%, 各质量浓度之间都有极显著的差异 ( $p < 0.01$ )。

#### 3.7.3 HXJ 对羟自由基的清除率

HXJ 对羟自由基的清除率的影响如表 8 所示。

表 8 HXJ 对羟自由基的清除率

HXJ 质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	0.04	0.08	0.12	0.16	0.20
清除率/%	64.9	72.6	97.3	96.0	84.8

由表 8 可以看出, 对羟自由基的清除率的检测结果类似于清除 DPPH 和总抗氧化力的变化规律。当质量浓度为 0.12 mg/mL 时清除率达到最大 97.3%, 在实验范围, HXJ 对羟自由基清除率都超过 60%, 甚至可以达到 97.3%, 表明 HXJ 对羟自由基的高效清除力。

#### 3.7.4 HXJ 对超氧阴离子消除率

HXJ 对超氧阴离子消除率的影响如表 9 所示。

表 9 HXJ 对超氧阴离子消除率

HXJ 质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
清除率/%	20.3	24.1	24.4	25.0	25.9

由表 9 可以看出,在实验设定的质量浓度范围, HXJ 对超氧阴离子消除率与其质量浓度呈现剂量依赖关系,当质量浓度达到所设定的最大值(0.10 mg/mL)时,对超氧阴离子消除率也达到最大值 25.9%。各质量浓度间均为显著差异( $p < 0.01$ )。

#### 4 结论

鲨鱼胶原蛋白是鲨鱼血液中变形细胞的细胞外基质,是一种结构蛋白质,在体内以不溶性大分子存在,不容易被吸收,使用中需要把分子质量缩小。笔者筛选出肽得率最高的胰酶作为 HXJ 水解酶,在单因素实验基础上进行酶解条件正交实验优化,确定 HXJ 胰酶水解的最佳条件是:温度为 70℃、酶质量浓度为 2.20 mg/mL、底物质量浓度为 0.38 mg/mL、pH 为 7.0、酶解时间为 5 h,在此水解条件下,肽得率为 36.50%。HXJ 水解肽对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率达到 47.9%,对乙酰胆碱酯酶抑制率甚至可达 97.5%,由此可见, HXJ 有助于糖尿病治疗,可作为阿尔茨海默病人的药物和保健品,至于其高效的乙酰胆碱酯酶抑制活性,后续有必要深入研究。另外, HXJ 具有抗氧化能力,在实验范围内, HXJ 对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子清除率分别达到 29.3%、97.3%和 25.9%,活性氧主要包括羟自由基和超氧阴离子等,人体里过多的活性氧作为致病因子几乎和人类常见的几种主要疾病密切相关, HXJ 的抗氧化活性有助于体内活性氧的清除,其高效的羟基自由基清除率证明 HXJ 在药物和保健品上的使用价值。

#### 参考文献

- [1] Bitar Forghani, Mohammad Zarei, Afshin Ebrahimpour, *et al.* Purification and characterization of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from *Stichopus horrens*: Stability study against the ACE and inhibition kinetics[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 20: 276-290.
- [2] Jung-Kil Seo, Min Jeong Lee, Hyun-Gyo Jung, *et al.* Antimicrobial function of SH $\beta$ AP, a novel hemoglobin  $\beta$  chain-related antimicrobial peptide, isolated from the liver of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 37(1): 173-183.
- [3] Zou F. Study on bioactive peptide from laver hydrolyzed by protease [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [4] Wu S Y. A study on preparation and purification angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from protein of *Saurida elongata* [D]. Nanning: Guangxi University, 2013.
- [5] Xie H W, Dai J G, Guo Y. Research advance in the functional substance in the horseshoe crab [J]. *J. Anhui Gri Sci*, 2006, 34(24): 6512-6515.
- [6] Lu H Q, Li J, Liu C J, *et al.* Antioxidant effects of superoxide dismutase from horsefoot blood in aged mice induced by D-galactose [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012, 28(12): 1736-1740.
- [7] Wu F L, Huang X Z, Li Q Z, *et al.* Classification and characterization of hemocytes between *tachyples tridentatus* and *carinoscorpis rotundicauda* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(6): 1169-1176.
- [8] Zhang Y, Feng X, Han D, *et al.* Therapeutic effect of genetic engineering tachyplesin I on *Staphylococcus aureus* infection in mice [J]. *Chin J Vet Sci*, 2017, 37(4): 682-685.
- [9] Xie H W, Fang Y J, Wu L Z, *et al.* Preparation and characterization of microencapsulation of tachyplesin [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(9): 112-117.
- [10] Takahiro K, Masakatsu K, Tomoyasu A, *et al.* Interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and lipopolysaccharide [J]. *BBA-Proteins and Proteomics*, 2014, 1844(3): 527-534.
- [11] Jiang J. Study of determination of protein hydrolysis degree and its formation of standard curve [J]. *J. Guangdong Industry Technical College*, 2012, 11(1): 4-6.
- [12] Zhang R H. *Industrial pharmacy* [M]. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press, 1999: 315.
- [13] Liu R J, Zhang Y W, Wen C W, *et al.* Study on the design and analysis methods of orthogonal experiment [J]. *Experimental Technology and Management*, 2010, 27(9): 52-55.
- [14] Guo X C, Zhang Z J, Xia Z Y, *et al.* Content determination of four triterpenes in *Caragana sinica* by HPLC and -glucosidase activity assay in vitro [J]. *Chin Pharm J*, 2017, 52(6): 488-493.
- [15] Zhang J, Feng T T, Zhang M Z. Content determination and acetylcholinesterase inhibitory effect of isoflavones from fermented soybean [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2017, 29: 310-315.
- [16] Chen J T, Cao T T, Tian Y F, *et al.* Design, synthesis and evaluation of new *L*-phenylalanine derivative as acetylcholinesterase inhibitors [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(14): 1180-1185.
- [17] Zhang Y D, Cai Y N, Zhang Q, *et al.* Inhibitory effect of icariin on acetylcholinesterase [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(9): 1141-1146.
- [18] Huang R S, Qian Y L, Liu R N, *et al.* Ultrasonic-assisted extraction process of total flavonoids from *Zingiber mioga* and its antioxidant activity [J]. *Chin Pharm J*, 2016, 51(19): 1652-1658.
- [19] Zhu Y, Zhao G M, Liu Y X, *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis of chicken bone protein for production of antioxidation peptides using nutrase [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2016, 32(12): 309-314.
- [20] Xiang P, Lou G Q, Wang S Y, *et al.* Analysis of volatile oils in *Elsholtzia* and *Elsholtzia cypriani* and evaluation of their biological activities [J]. *Chinese Traditionalpatent Medicine*, 2017, 39(9): 1880-1884.
- [21] Zhang S P, Li L L, Mourboul A, *et al.* Inhibition of extracts of *coreopsis tinctoria* flowers from Kunlun mountain on  $\alpha$ -Glucosidase [J]. *Progress Inmodern Biomedicine*, 2011, 11(6): 1055-1058. ■