

药用植物中乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选

孙丽影^{1,2}, 杜杨^{2,3}, 赵凤娇^{2,3}, 周莹¹, 崔勤^{2,3*}, 张健夫^{1*}, 刘志强^{2,3}

¹长春理工大学化学与环境工程学院; ²中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130000; ³中国科学技术大学, 合肥 230026

摘要:本文研究了八种药用植物(合欢花、鸡血藤、卷柏、茵陈、楮实子、续断、阔叶十大功劳、黄柏)的提取物对 AChE 的抑制活性。结果表明:这八种植物的不同溶剂萃取物(强碱层、正丁醇层、乙酸乙酯层)对 AChE 表现出不同程度的抑制作用。当样品浓度为 1 mg/mL 时,黄柏的强碱层、鸡血藤的正丁醇层和乙酸乙酯层对 AChE 具有较强的抑制活性(抑制率 > 50%),其 IC₅₀ 值分别为 0.20 ± 0.017、0.56 ± 0.12 和 0.23 ± 0.10 mg/mL。本研究为快速筛选天然植物中抑制 AChE 活性的有效部分提供了数据和方法支持。

关键词:药用植物;乙酰胆碱酯酶抑制剂;筛选;Ellman 比色法

中图分类号:R93.77

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0093-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.014

Screening of acetylcholinesterase inhibitors from Chinese medicinal plants

SUN Li-ying^{1,2}, DU Yang^{2,3}, ZHAO Feng-jiao^{2,3},
ZHOU Ying¹, CUI Meng^{2,3*}, ZHANG Jian-fu^{1*}, LIU Zhi-qiang^{2,3}

¹College of Chemical and Environmental Engineering, Changchun University of Science and Technology;

²Changchun Institute of Applied Chemistry Chinese Academy of Sciences, Changchun 130000, China;

³University of Science and Technology of China, Hefei, 230026, China

Abstract: The inhibitory effects of extracts from eight Chinese medicinal plants on acetylcholinesterase (AChE) were investigated. The results showed that the different solvent extracts of eight plants showed different inhibition on AChE. At the sample concentration 1 mg/mL, the strong alkaline extract of *Cortex phellodendri* and the n-butanol extract and the ethyl acetate extract of *spatholobus sinensis* showed the strong inhibitory effects against AChE (inhibition rate > 50%). The corresponding IC₅₀ values were obtained as 0.20 ± 0.017, 0.56 ± 0.12 and 0.23 ± 0.10 mg/mL, respectively. This study provided rapid screening of potential AChE inhibitors from Chinese medicinal plants.

Key words: Chinese medicinal plants; acetylcholinesterase inhibitors; screening; Ellman colorimetric method

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)是一种缓慢进展的神经退行性疾病。它严重威胁了人类的生命和健康,给患者、家庭和社会均带来巨大痛苦和负担^[1-3]。临床上用于治疗 AD 的大多数药物都是基于胆碱能假说研发出来的,因此,抑制 AChE 活性已经成为目前主要的治疗策略^[4-6]。

临床上通过抑制乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性治疗 AD 的主要药物有以下五种:他克林,多奈哌齐,加兰他敏、利凡斯的明^[7,8]和石杉碱甲^[9],这几种药物除加兰他敏和石杉碱甲外,

均为合成药物,虽然有一定的治疗效果,但是存在活性低、选择性低、副作用大等问题^[10]。而加兰他敏和石杉碱甲均来自植物中,副作用低,选择性强,但是加兰他敏对 AChE 的抑制活性较弱^[11]。石杉碱甲对 AChE 的抑制作用虽然很强,但是在植物中的含量较低,而且由于结构复杂,合成途径十分复杂^[12]。所以希望从天然植物中寻找到活性高、选择性强、副作用小的乙酰胆碱酯酶抑制剂(acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs)。

近年来,人们发现天然植物中生物碱类成分和黄酮类成分对 AChE 具有较好的抑制活性^[13,14]。但是目前的筛选方法多是对植物的生物碱或黄酮总提取物进行 AChE 抑制活性筛选,而对于药用植物中抑制 AChE 的有效部位尚不清楚。因此,本研究利

收稿日期:2019-11-19 接受日期:2020-04-24

基金项目:国家自然科学基金(21675150)

*通信作者 E-mail:cuimeng@ciac.ac.cn, zhangjianfu@cust.edu.cn

用不同有机溶剂的极性差异,采用改进的 Ellman 比色法^[15],对八种植物(合欢花、鸡血藤、卷柏、茵陈、楮实子、续断、阔叶十大功劳、黄柏)的抑制 AChE 的有效部位进行了筛选,大大缩小了进一步筛选目标,为寻找潜在的抑制 AChE 的有效成分奠定基础。

1 材料

1.1 植物

合欢花(河北)、鸡血藤(广西)从永新堂大药房购买,黄柏(四川)从北京同仁堂药房购买,卷柏(山东)、茵陈(河北)、楮实子(湖北)、续断(四川)、阔叶十大功劳(四川)从吉深药店购买。所有药材均由长春中医药大学王淑敏教授鉴定。

1.2 药品与试剂

乙酰胆碱酯酶(AChE, Sigma 公司);碘化乙酰硫代胆碱(acetylthiocholine, ATCI, 阿拉丁公司);5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB, 阿拉丁公司);十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, 阿拉丁公司);石杉碱甲(huperzine A, Sigma 公司),其余试剂均为分析纯,所有化学试剂直接使用,没有经过纯化。实验中所有用水均为超纯水(18.2 M Ω),由 Milli-Q 制水仪(Millipore, Bedford, MA)制得。

1.3 实验仪器

PB-10 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);BSA124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);SH2-III 型循环式多用真空泵、旋转蒸发器(上海贤德实验仪器有限公司);电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);全 Infinite 200 PRO 型波长扫描多功能酶标仪(Tecan Austria GmBH);THZ-100 型恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司);96 孔酶标板(广州杰特生物过滤股份有限公司)。

2 方法

2.1 备用溶液的配制

20 mM (pH = 7.5) 的 Tris-HCl 缓冲液的配制:精密称取 1 211.4 mg Tris 碱于 500 mL 锥形瓶中,加入 500 mL 超纯水溶解,加入少许浓盐酸,充分搅拌后测定 pH 值,调至 7.51,最后定溶于 500 mL 容量瓶中。

AChE 溶液的配制:精密称取 1.0 mg AChE,溶解于 1 mL Tris-HCl (20 mM, pH = 7.5) 缓冲液中,此时 AChE 为 155 U/mL。从 155 U/mL 的 AChE 溶液

里吸取 100 μ L 酶溶液,用 800 μ L Tris-HCl (20 mM, pH = 7.5) 缓冲液溶解,得到 15.5 U/mL 的酶溶液。再用 Tris-HCl (20 mM, pH = 7.5) 缓冲液稀释成 0.3 U/mL 的酶溶液供 Ellman 法使用。

石杉碱甲溶液的配制:称取 1.2 mg 的石杉碱甲粉末,首先溶解在 1.2 mL 超纯水中配制成 1 mg/mL 的溶液,然后将其稀释成 0.1 mg/mL 的待用溶液。

底物(ATCI)溶液的配制:称取 32.7 mg ATCI 粉末,用 Tris-HCl (20 mM, pH = 7.5) 缓冲液 1.13 mL 溶解,得到 100 mM 的 ATCI 储备液。然后将其利用 Tris-HCl (20 mM, pH = 7.5) 缓冲液稀释 10 倍,得到 10 mM 的待用溶液。

显色剂(DTNB)溶液的配制:称取 37.4 mg DTNB 粉末,用 Tris-HCl (20 mM, pH = 7.5) 缓冲液 844 μ L 溶解,得到 100 mM 的 DTNB 储备液。然后将其利用 Tris-HCl (20 mM, pH = 7.5) 缓冲液稀释 10 倍,得到 10 mM 的待用溶液。

4% 终止剂(SDS)溶液的配制:称取 2.0 g SDS,加入 48 mL Tris-HCl (20 mM, pH = 7.5) 缓冲液溶解,得到 4% 的 SDS。

AChE、石杉碱甲、ATCI、DTNB 储备液均保存在 -20 °C 冰箱中。20 mM (pH = 7.5) 的 Tris-HCl 缓冲液配制后置于 4 °C 冰箱中保存。

2.2 样品制备

2.2.1 黄酮类成分的提取与粗分离

将植物(合欢花、鸡血藤、卷柏、茵陈)打碎成粉末后过 40 目筛,分别称取不同植物粉末质量为 100 g,用不同体积分数的乙醇依次进行回流和超声提取,合并提取液,旋蒸至浸膏,用水溶解,然后依次用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,分别将不同相减压干燥,得到不同相的黄酮冻干粉末。称取乙酸乙酯和正丁醇层适量浸膏,用超纯水配成质量浓度为 100 mg/mL 的储备液,然后稀释至 7 mg/mL 的样品溶液,备用。

2.2.2 生物碱类成分的提取与粗分离

将植物(黄柏、楮实子、续断、十大阔叶功劳木)打碎成粉末后过 40 目筛,分别称取不同植物质量为 100 g 的植物粉末用不同体积分数的乙醇依次进行回流和超声提取,合并提取液,旋蒸至浸膏,总生物碱浸膏用 2% HCl 溶解,用氯仿进行萃取,分别得到氯仿层(弱碱性生物碱)和酸水层,将酸水层用氨水调节至 pH 9 ~ 10,用氯仿萃取,分别得到氯仿层(中强碱性生物碱)和氨水层(强碱性生物碱)。将其进

行干燥,得到不同层的生物碱浸膏。称取强碱性生物碱的适量浸膏,用超纯水配成质量浓度为 100 mg/mL 的溶液,然后稀释至 7 mg/mL 的样品溶液,备用。

2.3 植物中抑制 AChE 活性成分的筛选

采用改良的 Ellman 比色法进行测定^[15-17],其基本原理是以 ATCI 为底物,加入 AChE 后,ATCI 会在 AChE 作用下水解,生成硫代胆碱(thiocholine, Tch),而显色剂 DTNB 原本在 412 nm 波长下没有吸收,但是与 Tch 反应生成的黄色物质 5-巯基-2-硝基苯甲酸(TNB)在 412 nm 波长下有最大吸收,可用酶标仪在 412 nm 波长下检测出来^[18]。具体操作步骤如下:将此实验分为空白组、阳性对照组、阳性空白

组、样品组、样品空白组,每组各做 3 次平行试验按照表 1 进行加样。保持各管的总体积不变。抑制率(I)分别通过公式(1)和公式(2)进行计算:

样品组:

$$\text{抑制率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})] / A_{\text{空白}} \times 100\% \quad (1)$$

阳性对照:

$$\text{抑制率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阳性空白}})] / A_{\text{空白}} \times 100\% \quad (2)$$

式(1)和(2)中, $A_{\text{空白}}$ 为用缓冲溶液代替样品溶液时的吸光值; $A_{\text{样品}}$ 为添加样品溶液时的吸光值; $A_{\text{样品空白}}$ 为添加样品溶液其余物质均用缓冲溶液替代的吸光值。所有实验重复三次并计算平均值和标准偏差,阳性对照为石杉碱甲。

表 1 抑酶活性测定步骤

Table 1 Processing of enzyme activity inhibition

| 试剂与样品 Reagent and sample | 空白组 Blank | 阳性对照组 Positive control | 阳性空白组 Negative control | 样品组 Sample | 样品空白组 Sample blank |
|--------------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|
| Tris 盐酸 Tris-HCl (20 mM) | 120 μL | 90 μL | 170 μL | 90 μL | 170 μL |
| 乙酰胆碱酯酶 AChE (0.3 U/mL) | 20 μL | 20 μL | - | 20 μL | - |
| 样品 Sample (终浓度 1 mg/mL) | - | - | - | 30 μL | 30 μL |
| 石杉碱甲 Huperzine A (0.1 mg/mL) | - | 30 μL | 30 μL | - | - |
| 碘化乙酰硫代胆碱 ATCI (10 mM) | 30 μL | 30 μL | - | 30 μL | - |
| 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)DTNB (10 mM) | 30 μL | 30 μL | - | 30 μL | - |

37 °C 下反应 30 min, 用 4% SDS 10 μL 终止反应。
显色 5 min, 测定吸光度值(412 nm)。

注:“-”表示未添加。

Note:“-” indicates that it has not been added.

2.4 半数抑制浓度 (IC₅₀) 测定

抑制率大于 50% 的样品进行 IC₅₀ 值的测定, IC₅₀ 值是通过测定样品不同浓度下的抑制率计算所得。石杉碱甲作为阳性对照,所有实验重复 3 次,并计算平均值和标准差。将所测得的不同浓度下的吸光度值按照公式(1)和公式(2)计算,得到不同浓度下的抑制率,然后将不同的样品浓度和计算得到的抑制率利用 GraphPadPrism 5 软件作图,从而得到样品和石杉碱甲的 IC₅₀ 值。

3 结果与讨论

3.1 黄酮类提取物的 AChE 抑制活性

3.1.1 黄酮类提取物的正丁醇层萃取物的 AChE 抑制活性

按照“2.2.1”样品制备的方法提取并且粗分离植物样品,并且采用改进的 Ellman 比色法进行酶抑制剂的筛选,按照表 1 中的加样方式对四种植物正

丁醇层萃取物进行 AChE 抑制活性的测定,根据测得各空白组、样品组、样品空白组的吸光度值,按照公式(1)所述的抑制率计算公式进行计算,得到四种植物的正丁醇提取物在终浓度为 1 mg/mL 时的 AChE 抑制活性(表 2),结果表明:在质量终浓度为 1 mg/mL 时,鸡血藤表现出良好的 AChE 抑制活性(抑制率 > 50%),它的抑制率为 65.3% ± 2.7%,其中合欢花和茵陈表现出较弱的 AChE 抑制活性(抑制率在 20% ~ 50% 之间),而卷柏对 AChE 几乎不表现抑制作用,抑制率仅为 16.0% ± 5.1%。在本实验中未出现植物提取物对 AChE 活性有促进作用的现象,说明所选取的几种植物均可作为潜在的 AChEIs。

3.1.2 黄酮类提取物的乙酸乙酯层萃取物的 AChE 抑制活性

对四种黄酮类提取物的乙酸乙酯层的萃取物进

表 2 黄酮类提取物的正丁醇萃取物的 AChE 抑制活性($\bar{x} \pm s$)Table 2 AChE inhibitory activities of the n-butanol soluble fractions isolated from flavonoid extracts($\bar{x} \pm s$)

| 植物 Plant | 终浓度 Final concentration(mg/mL) | 抑制率 Inhibition rate(%) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 合欢花 <i>Albizia julibrissin</i> flower | | 126.7 ± 0.8 |
| 鸡血藤 <i>Spatholobus sinensis</i> | | 165.3 ± 2.7 |
| 卷柏 <i>Selaginella</i> | 1 | 16.0 ± 5.1 |
| 茵陈 <i>Artemisia capillaris</i> Thunb | 1 | 21.7 ± 5.3 |

行 AChE 抑制活性的测定,结果表明(表 3):在质量终浓度为 1 mg/mL 时,鸡血藤表现出良好的 AChE 抑制活性(抑制率 > 50%),抑制率达到 62.6% ±

5.3%,其中合欢花和茵陈表现出较弱的 AChE 抑制活性(抑制率在 20% ~ 50% 之间),而卷柏对 AChE 几乎不表现抑制作用,它的抑制率仅为 6.5% ± 0.6%。

表 3 黄酮类提取物的乙酸乙酯层萃取物的 AChE 抑制活性($\bar{x} \pm s$)Table 3 AChE inhibitory activity of the ethyl acetate soluble fractions isolated from flavonoid extracts($\bar{x} \pm s$)

| 植物 Plant | 终浓度 Final concentration (mg/mL) | 抑制率 Inhibition rate (%) |
|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 合欢花 <i>Albizia julibrissin</i> flower | 1 | 20.5 ± 5.5 |
| 鸡血藤 <i>Spatholobus sinensis</i> | 1 | 62.6 ± 5.3 |
| 卷柏 <i>Selaginella</i> | 1 | 6.5 ± 0.6 |
| 茵陈 <i>Artemisia capillaris</i> Thunb | 1 | 32.1 ± 1.8 |

上述的实验结果表明,发现鸡血藤的正丁醇层和乙酸乙酯层均对 AChE 有较强的抑制作用,且正丁醇层的抑酶活性达到 65.3% ± 2.7%。

3.2 生物碱类提取物的 AChE 抑制活性

按照“2.2.2”样品制备的方法提取并且粗分离植物样品,并且采用改进的 Ellman 比色法进行酶抑制剂的筛选,按照表 1 中的加样方式对四种植物强碱性生物碱进行 AChE 抑制活性的测定,根据测得

各空白组、样品组、样品空白组的吸光度值,按照公式(1)所述的抑制率计算公式进行计算,对四种植物强碱性生物碱进行 AChE 抑制活性的测定,结果表明(表 4):在质量终浓度为 1 mg/mL 时,只有黄柏表现出良好的 AChE 抑制活性(抑制率 > 50%),其抑制率达 73.0% ± 0.8%,其中阔叶十大功劳、楮实子以及续断对 AChE 几乎不表现抑制作用(抑制率 < 20%)。

表 4 生物碱类提取物的强碱层萃取物的 AChE 抑制活性($\bar{x} \pm s$)Table 4 AChE inhibitory activity of the strong alkaline alkaloids layer of total alkaloid($\bar{x} \pm s$)

| 植物 Plant | 终浓度 Final concentration (mg/mL) | 抑制率 Inhibition rate(%) |
|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| 黄柏 <i>Cortex Phellodendri</i> | 1 | 73.0 ± 0.8 |
| 阔叶十大功劳 <i>Mahonia bealei</i> | 1 | 8.6 ± 3.2 |
| 楮实子 <i>Fructus Broussonetiae</i> | 1 | 19.1 ± 3.8 |
| 续断 <i>Dipsaci Radix</i> | 1 | 8.1 ± 1.6 |

3.3 半数抑制浓度(IC₅₀)的测定

选择抑制率大于 50% 的部分:黄柏强碱层、鸡血藤正丁醇层以及鸡血藤乙酸乙酯层进行半数抑制浓度(IC₅₀)值的测定,石杉碱甲作为阳性对照,按照表 1 所给的加样顺序进行加样,所有实验重复 3 次

并计算平均值和标准差。结果表明(表 5),黄柏强碱层、鸡血藤正丁醇层以及鸡血藤乙酸乙酯层的 IC₅₀ 值分别为 0.20 ± 0.017、0.56 ± 0.12 和 0.23 ± 0.10 mg/mL。

表 5 半数抑制浓度 (IC₅₀) 的测定Table 5 Determination of half-inhibitory concentration (IC₅₀)

| 植物 Plant | 测定部分 Measured | 半数抑制浓度 IC ₅₀ (mg/mL) |
|---------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 黄柏 <i>Cortex phellodendri</i> | 强碱层 Strong alkalinel layer | 0.20 ± 0.017 |
| 鸡血藤 <i>Spatholobus sinensis</i> | 正丁醇层 N-butanol layer | 0.56 ± 0.12 |
| 鸡血藤 <i>Spatholobus sinensis</i> | 乙酸乙酯层 Ethyl acetate layer | 0.23 ± 0.10 |
| 石杉碱甲 Huperzine A | 标准品 Standard | 0.005 7 ± 0.000 3 |

4 结论

通过改进的 Ellman 比色法评价了八种植物的生物碱提取物和黄酮提取物的 AChE 抑制活性。结果表明,具有强抑酶活性(抑制率 > 60%)的植物排序为:黄柏强碱层 > 鸡血藤正丁醇层 > 鸡血藤乙酸乙酯层。其半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 0.20 ± 0.017、0.56 ± 0.12 和 0.23 ± 0.10 mg/mL。具有弱抑酶活性(抑制率为 20% ~ 50%)的植物排序为:黄柏弱碱层 > 茵陈正丁醇层 > 合欢花正丁醇层 > 茵陈乙酸乙酯层 > 合欢花乙酸乙酯层。其余植物的提取物表现出无 AChE 抑制活性(抑制率 < 10%)。其中黄柏和鸡血藤对 AChE 表现出较强的抑制作用,说明这些植物中很有可能含有对 AChE 具有高活性的抑制成分,为进一步开发和治疗 AD 的新药提供有用的理论指导。

参考文献

- Zhang PF, Xu ST, Zhu ZY, et al. Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 176: 228-247.
- Lars B, Christina ML, Rudolph ET. The genetics of Alzheimer disease: back to the future [J]. *Neuron*, 2010, 68: 270-281.
- Ulep MG, Saraon SK, McLea S. Alzheimer disease [J]. *J Nurse Pract*, 2018, 14(3): 129-135.
- Friedrich L, Kostja S, Burkhard S, et al. Probiotic supplementation in patients with Alzheimer's dementia-an explorative intervention study [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15: 1106-1113.
- Zhou SD, Wang X, Feng JH, et al. Screening and evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity based on microscale screening model of 48 traditional Chinese medicines [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 328-332.
- Contestabile A. The history of the cholinergic hypothesis [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221: 334-340.
- Son M, Park C, Rampogu S, et al. Discovery of novel acetylcholinesterase inhibitors as potential candidates for the treat-

ment of Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 1000.

- Kabir MT, Uddin MS, Begum MM, et al. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer disease: multitargeting strategy based on anti-Alzheimer's drugs repositioning [J]. *Curr Pharm Design*, 2019, 25: 3519-3535.
- Wang YE, Yue DX, Tang XC. Anticholinester activity of huozhizine-A [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1986, 7(2): 110-113.
- Zarotsky V, Sramek JJ, Cutler NR. Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease [J]. *Am J Health-SystPh*, 2003, 60: 446-452.
- Marco L, Maria DCC. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2006, 1(1): 105-111.
- Yang JH, Tao YY, Chen YG. Research progress on acetylcholinesterase inhibitors in medicinal plants [J]. *Yunnan Chem Technol* (云南化工), 2006, 33(6): 78-82.
- Ahmad HI, Khan HMS, Akhtar N, et al. Phenolic, flavonoid content and radical scavenging activity of smilax China with its inhibitory potential against clinically important enzymes [J]. *Nat Prod Res*, 2019. DOI: 10. 1080/14786419. 2019. 1648463.
- Ahmad Z, Mehmood S, Ifzal R, et al. A new ursane-type triterpenoid from *Salvia santolinifolia* [J]. *Turk J Chem*, 2007, 31: 495-501.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2): 88-95.
- Kostelnik A, Pohanka M. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by a plant secondary metabolite boldine [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 9634349.
- Suganthy N, Devi KP. *In vitro* antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Rhizophora mucronata* [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(1): 118-129.
- Arduini F, Errico I, Amine A, et al. Enzymatic spectrophotometric method for aflatoxin B detection based on acetylcholinesterase inhibition [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 3409-3415.