

天然来源的乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选方法综述

薛欣怡, 张 翼, 刘亚月*

广东海洋大学食品与科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 湛江市脑健康海洋药物与营养品重点实验室, 广东海洋大学海洋药物研究所, 湛江 524088

摘要:乙酰胆碱酯酶抑制剂是目前临床上用于治疗阿尔茨海默症(AD)的首选药物。随着科学技术的提高,其筛选方法也在不断创新。本文介绍了基于“胆碱酯能损伤学说”的AD治疗靶点的研究及药物研究进展,并对目前可用于乙酰胆碱酯酶抑制剂筛选方法的原理及优缺点进行了重点阐述,主要包括基于紫外分光光度计的Ellman's比色法、薄层生物自显影法、荧光分析法和超高效液相色谱-质谱联用法。总结经验,不断创新,以期能更有效、更快速的从天然产物中筛选出新型的乙酰胆碱酯酶抑制剂。

关键词:阿尔茨海默症;乙酰胆碱酯酶抑制剂;天然产物;活性筛选模型

中图分类号:TQ041

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)5-0892-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.5.021

A review of screening methods for acetylcholinesterase inhibitors from natural sources

XUE Xin-yi, ZHANG Yi, LIU Ya-yue*

¹College of Food and Technology, Guangdong Ocean University, Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety in Guangdong Province, Key College of Aquatic Product Deep Processing in Guangdong Province Laboratory, Zhanjiang Key Laboratory of Marine Medicine and Nutrition for Brain Health, Institute of Marine Materia Medica, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Acetylcholinesterase inhibitors are currently the first choice for the clinical treatment of AD. With the improvement of science and technology, the screening methods are also in constant innovation. This article introduced the research progress of AD therapeutic targets and drug research based on the "cholinergic damage theory", and then emphatically expounded the current methods that could be used for acetylcholinesterase inhibitors' screening, which including Ellman's colorimetric method based on ultraviolet spectrophotometer, thin layer biological autoradiography method, fluorescence analysis method, and ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry combined with their principles and advantages or disadvantages. We hoped that it would be more effectively and quickly to screen new acetylcholinesterase inhibitors from natural products by summarizing the experience and keeping innovating.

Key words: Alzheimer's disease; acetylcholinesterase inhibitors; natural product; activity screening model

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD),是一种慢性神经退行性疾病,多发于65岁以上的老年人。临床上以记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害和执行功能障碍等为特征^[1]。目前AD已成为全球范围内亟需解决的社会问题和医学问题。据

2020年世界阿尔茨海默病事实和数据报告^[2]指出,当年全球该病患者超过5200万。平均每3秒就有1人罹患AD,预计到2050年该数据将会增长至1.52亿。而在中国,超过1450万人正在遭受AD困扰,约占世界总病例数的四分之一,居世界首位。但是目前针对该疾病的药物研发却一直没有很好的进展。1998~2017年期间,全球超过146个AD药物在临床阶段宣布失败,临床失败率高达97.3%^[3]。2019年我国自主研发的药物“GV-971”宣布上市,这将为患者提供新的用药选择。但该药

收稿日期:2020-07-14 接受日期:2021-11-09

基金项目:国家自然科学基金(21807015);广东海洋大学博士启动项目(R18008);深圳市科创委基础研究面上项目(JCYJ20190813105005619);广东省自然科学基金(2018A030307046)

*通信作者 Tel:86-018719091220; E-mail: yayue_liu@163.com

也只对 AD 轻、中度患者有效,只能在一定程度上改善患者的认知功能。因此,AD 新药研发的形势依然严峻。

目前关于 AD 的特征性病理变化研究发现,患者大脑表面会出现 β -淀粉样蛋白 (amyloid-protein, A β) 的异常沉积,形成老年斑;以及患者脑内 Tau 蛋白过度磷酸化,在神经细胞内形成神经元纤维缠结,并伴有神经胶质细胞的增生^[4]。目前关于 AD 的发病机制主要有“ β -淀粉样蛋白 (A β) 假说”、“Tau 蛋白假说”、“氧化应激学说”,“金属离子代谢紊乱学说”,“神经炎症假说”“胆碱能损伤学说”等^[5]。其中胆碱能损伤学说是最早提出的关于 AD 的发病机制学说,也是目前大部分 AD 药物研发的理论基础。该假说认为胆碱能活性丧失与 AD 患者的病症严重程度有关。对 AD 患者进行尸检发现,其基底前脑区域神经元丢失,乙酰胆碱酯酶和胆碱乙酰转移酶活力下降,从而导致胆碱摄取合成能力降低,学习记忆功能的减退和认知功能障碍^[6]。因此,研制出可以改善体内胆碱系统功能的药物一直是治疗 AD 疾病的重要方向之一。

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 属于丝氨酸水解酶类,主要存在于神经系统中,其活性中心主要由酶解部位、阴离子和与疏水性区域三部分组成^[7]。AChE 是生物神经传导中的一种关键性酶,能够催化胆碱能突触间隙的神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 水解成胆碱和乙酸,终止信号刺激,阻断神经信号在体内的正常传递^[8]。而现有研究表明 ACh 是参与学习和记忆的最重要的神经递质,故提高脑内 ACh 水平可有效改善 AD 患者的认知和学习记忆能力^[9]。乙酰胆碱酯酶抑制剂 (acetylcholinesterase inhibitor, AChEI) 是一种能对 AChE 进行可逆性抑制的物质,它可使 ACh 在突触处积累,含量增加,保证神经信号在体内的正常传递,从而改善学习和记忆等功能,是目前临床上最为广泛使用的 AD 治疗药物^[10]。

1 现有 AChEIs 药物简介

截至目前,FDA 批准可用于治疗 AD 的 5 种药物中除了美金刚属于 NMDA 受体拮抗药外,其余 4 种 [他克林 (tacrine)、利斯的明 (rivastigmine)、多奈哌齐 (donepezil) 和加兰他敏 (galanthamine)] 均属于 AChEIs^[11]。Tacrine 是最早用于治疗 AD 的药物,可改善 AD 病人的认知和识别功能;但其毒副作用较大,尤其对肝脏毒性大,且会引起体内转氨酶水平的

升高。故目前该药物已经很少被使用。Rivastigmine 则是一种假性不可逆氨基甲酸 AChEIs。它是人工合成的毒扁豆碱的氨基甲酸衍生物,结构中含有季胺基团,但不易通过血脑屏障,治疗效果并不显著^[12],且服用利斯的敏类药物后常会产生泌尿系统与呼吸道系统感染,高血压,心房颤动,神经错乱等各种反应。Donepezil 则是目前全世界应用最广泛的 AChEI,具有选择性高、作用时间长,耐受性良好,无肝毒性等优点;但大部分患者服用后会产生腹泻、肌痛、呕吐、疲劳、失眠、头晕和肌痉挛等较为显著的不良反应。Galanthamine 是从雪花莲和其它几种石蒜科植物中提取出来的生物碱,该药在 AD 治疗初期,患者有腹痛、腹泻、恶心、呕吐和厌食等不良反应^[13]。综上所述,目前临床使用的 AChEIs 药物都能在一定程度上对 AChE 进行可逆性抑制,从而改善 AD 患者的认知水平。但是其大多存在半衰期短或较严重的外周胆碱能系统副作用等缺点,不利于患者长期服用。因此,开发寻找具有适宜患者长期服用、选择性高、毒副作用小、且作用面广等优点的 AChEIs 受到科研工作者的广泛关注^[14]。

2 来源于天然产物的 AChEIs

天然产物一直是药物发现的重要资源。目前已发现的 AChEIs 的来源多为植物和微生物,如现有药物 galanthamine 和 rivastigmine,还有石杉碱甲、毒扁豆碱、小檗碱等也是目前已研发证明具有高活性、选择性强,来源于天然产物的 AChEIs^[15]。从 Eadie 等^[16]报告中我们得知,早在 1864 年,Jobst 等就从非洲西部毒扁豆 *Physostigma venenosum* Balf 的种子中分离得到一个四氢吡咯并咪唑环系的天然生物碱—毒扁豆碱,该化合物对 AChE 具有极强的抑制活性,这是已知最早天然 AChEI。而后国内外科学家从各类中药、动植物、微生物等天然资源中发现了一批具有显著活性的 AChEIs。例如,Ramli 等^[17]从植物 *Stichoneuron caudatum* 中分离得到四个新的生物碱,其中 sessilistemonamines E 对 AChE 具有显著的抑制活性,IC₅₀ 值为 9.10 μ M。Zhao 等^[18]从 *Phlegmarurus henryi* Ching 中分离得到 5 个新骨架石松生物碱类化合物。药理活性研究表明,化合物 phlegghenrines A 和 D 具有显著的 AChE 抑制活性(IC₅₀ 值分别为 4.91 和 4.32 μ M),同时化合物 phlegghenrine D 对丁酰胆碱酯酶不显示抑制活性,是一个极具潜力的治疗 AD 的先导化合物。Zhan 等^[19]从植物 *Zephyranthes candida* 的提取物中分离得到了若干个对

AChE 具有极强抑制活性的新生物碱。Cui 等^[20]也从中药加味补中益气汤中发现了 5 个具有显著抑制 AChE 的呋喃酮类化合物,其 IC_{50} 均小于 $12 \mu\text{M}$ 。随着现代分析和物质结构鉴定技术的进步,越来越多的 AChEIs 被发现,但是这只涉及天然资源中的极小一小部分。自然界中大量的微生物和植物中的 AChEIs 的筛选工作尚少,具有巨大的开发潜力。但是天然产物成分往往比较复杂,因此选择一种合适的活性模型来对自然界中潜在的 AChEIs 进行快速筛选,具有重要的意义^[21]。

3 天然来源的 AChEIs 的筛选方法

目前,AChEIs 的筛选方法主要有基于紫外分光光度计的 Ellman's 比色法、TLC 薄层生物自显影法、荧光分析法、液相色谱与质谱联用等方法^[22]。

3.1 基于紫外分光光度计的 Ellman's 比色法

基于紫外分光光度计的 Ellman's 比色法是最早用于 AChEIs 筛选的方法,其筛选原理为:乙酰胆碱酯酶水解底物硫代乙酰胆碱为硫代胆碱;硫代胆碱再与显色剂 DTNB(5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸))反应生成在波长为 405 nm 处有特征吸收的化合物 5-硫-2-硝基苯甲酸。AChEIs 的加入可以显著抑制 AChE 的活性,因此可以通过紫外分光光度计测定吸光度的增减量,进而间接测定待测样品对 AChE 的抑制活性^[23]。2020 年 Okello 等^[24]从绿茶中分离得到 5 种天然黄烷-3-醇化合物,采用 Ellman's 比色法筛选其对 AChE 的抑制活性,发现 EGCG 对 AChE 有显著抑制作用,其 IC_{50} 值小于 $0.02 \mu\text{mol/mL}$ 。Xi-ao 等^[25]从红树林中分离出两个新骨化合物 asperterpenol A 和 asperterpenol B,并采用改良的 Ellman's 比色法测定了其对 AChE 和 BuChE 的抑制作用,结果发现两种化合物都具有强烈的 AChE 抑制能力,其 IC_{50} 值分别为 2.3 和 $3.0 \mu\text{M}$,但均不能抑制 BuChE,可作为一种天然有效的 AChE 抑制剂。Mahsa 等^[26]以白杨的甲醇馏分为原料,研究了其粗提物的抗氧化活性及 AChE 抑制作用,从中检出了五个化合物,并利用 Ellman's 比色法发现黄酮化合物 quercetin 具有较强的抗氧化作用,其 IC_{50} 值为 $10.2 \mu\text{g/mL}$ 。而 Caffeic acid 则表现较强的 AChE 抑制作用,其 IC_{50} 值为 $12.1 \mu\text{g/mL}$ 。综上可知, Ellman's 比色法具有操作简单、耗费低等优点,从而得到了广泛的使用^[23-28]。但是由于该法利用的是物质的紫外吸收,而天然来源的化合物多为有颜色的一类物质,易干扰比色法的测定。因此该法不适

合于筛选本身具有颜色的化合物,否则容易出现假阳性结果^[29]。

3.2 TLC 薄层生物自显影法

TLC(thin-layer chromatography)薄层生物自显影法是一种快速靶向追踪分离、筛选活性成分的方法。其原理与基于紫外分光光度计的 Ellman's 比色法一致,但此方法的操作过程更为简便、成本更低,且能随时对活性物质进行追踪^[30]。此方法通常先将样品在薄层板上展开,然后喷上 AChE 和显色剂,在恒温恒湿的条件下培养 20 min 后再喷上适量底物。若样品中成分有抑制 AChE 活性,则显现白色斑点。Nokuthula 等^[31]研究了一种南非茛科植物抑制 AChE 的活性实验,并进行活性化合物的分离与其结合酶分子对接能力的检测。在利用 TLC 技术对 41 个代表样品进行 AChE 抑制活性体外评价时发现,活性最强的品种为 *Amaryllis belladonna* L、*Nerine huttoniae* 和 *Nerine undulata* (L.),其 IC_{50} 值分别为 14.3、45.3 和 $52.8 \mu\text{g/mL}$,并在甲醇提取物中追踪到若干个具有显著活性的化合物,为后续研究提供了较为可靠地实验依据。Cai 等^[32]对从 *Piper* 等芳香植物中提取的 23 个香精油(EO_s)进行化学成分分析发现其中富含倍半萜和苯丙烷类,采用 TLC 对组氨酸二聚体中活性最强的活性成分进行鉴别,最终确定其为细辛毒素,对 AChE 具有较好的抑制作用(IC_{50} 值为 0.44 mg/mL)。Fabio 等^[33]对来自加勒比海的软珊瑚(*Eunicea* 和 *Plexaura*)分离出的 14 种化合物进行 AChE 抑制活性评价,发现化合物 asperdiol、asperdiol diacetate 和 8*R*-dihydroplexaurone 均显示较强的活性斑点,并对化合物 14-acetoxy-crassine 和 asperdiol 进行定量检测,其 IC_{50} 分别为 1.40 和 $0.36 \mu\text{M}$ 。Zhang 等^[34]采用 TLC 薄层生物自显影的方法对 44 株海洋来源真菌的 AChE 活性成分进行了筛选与追踪,研究发现有 32 株真菌具有明显的 AChE 抑制斑点,表明其中含有潜在的抑制 AChE 的活性成分,这为结构多样化 AD 活性物质的研究提供了有益启示。但此方法耗时较长,误差大,易出现假阴性结果,一般只能用于定性测定,研究者经常将 TLC 薄层生物自显影法与 Ellman's 比色法联用,以保证实验结果更加真实可靠^[35]。

3.3 荧光分析法

荧光分析法也是一种可用于天然 AChEIs 的筛选方法,具有高灵敏度、检测下限低、简单快速等优点。其筛选原理主要是利用物质的荧光特性,当无

荧光的物质在被 AChE 水解后会生成有荧光物质,可以通过监测该物质的荧光变化情况间接测定 AChE 活性,常采用的是荧光探针和荧光猝灭效应等方法^[36]。Cai 等^[37]以荧光银纳米簇 DNA-AgNCs 为载体,根据氯化硫代乙酰胆碱被 AChE 水解后生成的 TCh 会与 DNA-AgNCs 反应使 DNA-AgNCs 的荧光性增强的原理,检测了 tacrine 在 635 nm 处的荧光变化情况,得出其 IC₅₀ 为 4.7 nM。该结果比文献报道值小,这说明此方法酶与底物的用量比其他方法少,更加经济方便。Han 等^[38]利用硫代胆碱对方酸染料的荧光猝灭效应,根据氯化乙酰硫代胆碱和 ACh 能竞争性的与 AChE 结合的原理,来调控硫代胆碱的生成量,使体系的荧光信号发生改变。结果表明当待测体系中存在有机磷抑制剂时,AChE 的催化活性受到有机磷的特异性抑制,酶对底物的水解作用减弱,硫代胆碱的生成量也会相应的减少,体系荧光信号发生改变,最终可实现对有机磷的检测。Liu 等^[39]采用荧光分析法研究了香豆素类化合物与 AChE 相互作用,发现该类化合物对 AChE 的内源荧光具有较强的猝灭作用。但荧光分析法的缺点是稳定性差,易受干扰,并且不是所有物质都具有荧光性,因此它的使用范围受到较大限制。

3.4 液相色谱-质谱联用法

高效液相色谱-质谱法 (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) 是近代发展起来的以 HPLC 为分离手段,MS 为鉴定工具的高效分析分离技术。其原理是底物乙酰胆碱在 AChE 的作用下生成胆碱,经过 HPLC 分离后,通过 MS 测定其底物的减少量来间接确定待测样品的 AChE 抑制活性。该方法将 HPLC 对复杂样品的高分离能力与 MS 的结构鉴定能力结合起来,具有分析速度快,灵敏度高等优点^[40]。尤其对于缺乏特征紫外吸收和不易分离的物质具有独特优势。Gokhan 等^[41]利用 HPLC-MS 方法对 *Ferula halophila* 的诱变/抗诱变活性进行评价,建立了该植物的化学成分谱。实验发现在丙酮提取物中酚类和黄酮类的含量最高,氯仿提取物对 AChE 的抑制作用显著,表明该植物可能是一种有希望的 AChEI 来源,具有较高的生物潜力与药用价值。Placines 等^[42]采用 HPLC-MS 对可食用盐生植物 *Cakile maritima* Scop 的主要代谢产物进行定量和 AChE 抑制试验,发现其类黄酮提取物对 AChE 具有显著的抑制活性。Zhao 等^[43]利用 HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS 技术发现

Coptis chinensis 植物根茎中的五种生物碱类化合物均具有较好的 AChE 抑制活性,其中化合物 palmatine 的活性最好,IC₅₀ 值为 36.6 μM。Kahraman 等^[44]也通过该技术比较了 *F. caspica* 和 *F. halophila* 根茎与地上部分的植物化学特性,实验发现 5-cafeoylquinic acid 是 *F. caspica* 和 *F. halophila* 提取物中的主要成分,其甲醇提取物都有较高的 AChE 抑制活性与抗氧化能力,且 *F. caspica* 地上部分的甲醇提取物比 *F. halophila* 的 AChE 抑制活性高,其 IC₅₀ 值为 0.044 33 μg/mL,这可能与它们提取物中总酚与类黄酮的含量有关,但 *F. caspica* 氯仿提取物的高总酚含量与其抗氧化活性和 AChE 抑制活性无关。

超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatograph, UPLC) 是近年来发展起来的一种适用于微量或痕量物质快速检测的技术。它是在传统的 HPLC 方法上发展的,采用更小颗粒填料色谱柱、更快速的检测手段及超高压系统结合的新兴液相色谱技术^[45]。与传统的 HPLC 相比,UPLC 具有高分离度、高速度、高灵敏度等优点。在全面提升 HPLC 的速度、灵敏度和分离度诸品质的同时,保留其原有的实用性及原理^[46]。其最显著的优势是可以缩短分析时间,提高工作效率。如针对某有关物质进行分析,使用 HPLC 运行 1 针需要 75 min,而 UPLC 只需要 10 min 就可以完成整个过程,分析效率提高将近 7.5 倍。当然,分析效率提高这么多,其配套设备要求也随之增加。UPLC 需要小颗粒杂化填料 (1.7 μm) 的色谱柱、更高耐压 (达 15 000 Psi)、低系统体积的输液单元^[47]。由于此方法具有高分离度,高灵敏性,分析周期短等优点,可为复杂、痕量物质体系的分离分析提供良好的平台。现已广泛应用于农药残留物检测,水质和环境监测,化妆品质量控制,中药复杂组分分析及代谢组学等领域。

Wang 等^[48]采用亲和超滤超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱结果实验发现这四种药用植物都具有较强的抑制活性。其中钩藤中的活性化合物可能为 3-二氢异卡丹宾、钩藤碱、柯诺辛等。Liu 等^[49]采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对 *D. auriculatum* 植物的化学成分进行调查,发现其中有五个生物碱化合物均表现较好的 AChE 抑制活性,其 IC₅₀ 值为 0.24 ~ 6.37 μM。Farag 等^[50]基于 UPLC-MS 技术检测 *Ocimum* 植物的 AChE 抑制活性,并对 *O. basilicum*、*O. africanum*、*O. americanum* 和 *O. minimum* 四种酚类物质的代谢差异进行评估,结果发现 *O.*

americanum、*O. africanum*、*O. basilicum* 的 IC_{50} 值为 2.5 ~ 6.6 mg/mL, 并且对从 *Ocimum* 提取物中获得的化合物 caftaric、chlorogenic 和 rosmarinic 进行活性测试, 得出其 IC_{50} 值分别为 24、0.5 和 7.9 mg/mL。采用 UPLC 方法进行分析可极大的提高其分析效率, 但同时样品的预处理要求也更严格。如果样品前处理不干净就会有杂峰, 基线也会很高; 同时由于 UPLC 色谱柱的填料粒径均很小, 因此容易造成色谱柱堵塞。最后由于实验过程中仪器内部压力过大, 也会产生相对应的问题。例如泵的使用寿命会相对降低, 仪器的连接部位老化速度加快, 包括单向阀等部位零件容易出现等问题^[51]。

4 总结

天然产物由于其本身具有结构多样化等优势, 是目前最大、最好的药物来源库。随着提取分离和结构鉴定技术的快速发展, 从天然产物中开发药物的速度和竞争力显著提高^[52], 这为寻找作用面广, 毒副作用小, 适合长期服用的新型 AChEIs 提供了新思路。同时随着针对 AChEIs 筛选的科学技术的不断创新, 科学仪器的不断进步, 并且对 AD 的确切病因研究逐渐深入, 我们坚信会从天然产物中发现更多化学结构新颖, 效果显著的化合物, 最终战胜 AD。

参考文献

- Xie F, et al. Progress in clinical research of traditional Chinese medicine in the treatment of senile dementia[J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2020, 47: 203-206.
- Lathe JC, et al. Evidence against a geographic gradient of Alzheimer's disease and the hygiene hypothesis [J]. Evol Med Public Health, 2020(1): 141-144.
- Li C. Research progress of Alzheimer's disease and therapeutic drugs[J]. Tianjin Pharm(天津药学), 2017, 29: 67-70.
- Nie YY. Screening of active algae and marine fungi associated with Alzheimer's disease and study on their secondary metabolites[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University(广东海洋大学), 2017.
- Qiao Y, et al. Computer-assisted speech analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a pilot study from Shanghai, China[J]. J Alzheimers Dis, 2020, 75: 211-221.
- Alejandro PC, et al. Automatic assessment of Alzheimer's disease diagnosis based on deep learning techniques [J]. Comput Biol Med, 2020, 120: 103764.
- Sheng JH, et al. Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging distinguished by multi-modal parcel-

- lation and machine learning[J]. Sci Rep, 2020, 10: 5475.
- Wu MH, et al. Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer's disease, dementia, and Parkinson's disease: a systematic review and time-response meta-analysis[J]. Pharmacol Res, 2020, 155: 104693.
- He ZM, et al. Rapid screening of acetylcholinesterase inhibitors in total alkaloids by targeted affinity-liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2017, 45: 211-216.
- Wang LP, et al. Screening of cholinesterase inhibitors in alcohol extract of Euodiae Fructus based on UPLC-MS/molecular model calculation[J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2020, 41: 111-117.
- Chen D, et al. Research progress of novel multi-target anti-Alzheimer's drug design[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2016, 28: 212-215.
- Liu J, et al. An established HPLC-MS/MS method for evaluation of the influence of salt processing on pharmacokinetics of six compounds in Cuscutae Semen[J]. Molecules, 2019, 24(13): 2502.
- Miao FP, et al. Aspewentins A-C, norditerpenes from a cryptic pathway in an algicolous strain of *Aspergillus wentii*[J]. J Nat Prod, 2014, 77: 429-432.
- Wang Q. Study on secondary metabolites and biological activities of two strains of *Aspergillus* spp. [D]. Kunming: Yunnan University(云南大学), 2017.
- Zhan G, et al. Zephyrandine A, the first naturally occurring imidazo[1,2-f] phenanthridine alkaloid from *Zephyranthes candida*, exhibits significant anti-tumor and anti-acetylcholinesterase activities[J]. Sci Rep, 2016, 6: 33990.
- Eadie GS. The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine[J]. J Biol Chem, 1942, 146: 85-93.
- Ramli RA, et al. Alkaloids from the roots of *Stichoneuron caudatum* and their acetylcholinesterase inhibitory activities[J]. J Nat Prod, 2014, 77: 894-901.
- Dong LB, et al. Phlegghenrines A-D and neophlegghenrine A, bioactive and structurally rigid lycopodium alkaloids from *Phlegmariurus henryi*[J]. Org Lett, 2016, 18: 4498-4501.
- Zhan G, et al. Galanthamine, plicamine, and secplicamine alkaloids from *Zephyranthes candida* and their anti-acetylcholinesterase and anti-inflammatory activities[J]. J Nat Prod, 2016, 79: 760-766.
- Cui L. Study on AChE inhibitor in Jiawei Buzhong Yiqi soup based on data mining[D]. Guangzhou: Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学), 2016.
- Zhan G, et al. Acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes carinata*[J]. J Nat Prod,

- 2017,80:2462-2471.
- 22 Zhan G, et al. Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors[J]. Eur J Med Chem, 2017, 127: 771-780.
- 23 An CL, et al. Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. scskfd66 in marine fungi [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 3001-3007.
- 24 Okello EJ, et al. Comparative kinetics of acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition by green tea catechins relevance to the symptomatic treatment of Alzheimer's disease[J]. Nutrients, 2020, 12: 1090.
- 25 Xiao Z, et al. Asperterpenols A and B, new sesterterpenoids isolated from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 085242[J]. Org Lett, 2013, 15: 2522-2525.
- 26 Mahsa S, et al. Leutea avicennia biological evaluation of the isolated compounds from methanol fraction of mozaff[J]. Iran J Pharm Res, 2018, 17: 1386-1391.
- 27 Zafer S, et al. Thiazole-substituted benzoylpiperazine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors [J]. Drug Dev Res, 2018, 79: 406-425.
- 28 Ahmad MF, et al. 2-(2-(4-Benzoylpiperazin-1-yl)-ethyl) isoindoline-1, 3-dione derivatives: synthesis, docking and acetylcholinesterase inhibitory evaluation as anti-alzheimer agents[J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20: 59-66.
- 29 Sebastian B, et al. Modular synthesis of the pyrimidine core of the manzacidins by divergent Tsuji-Trost coupling[J]. Beilstein J Org Chem, 2016, 12: 1111-1121.
- 30 Ewelina S, et al. Effect directed analysis and TLC screening of *Schisandra chinensis* fruits [J]. J Chromatogr A, 2020, 1618: 460942.
- 31 Nokuthula SM, et al. Isolation, *in vitro* evaluation and molecular docking of acetylcholinesterase inhibitors from South African Amaryllidaceae [J]. Fitoterapia, 2020, 146: 104650.
- 32 Cai P, et al. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils from *Piper* species [J]. J Agr Food Chem, 2017, 65: 3702-3710.
- 33 Fabio C, et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitors in marine organisms from the Caribbean Sea [J]. Nat Prod Res, 2019, 33: 3533-3540.
- 34 Zhang Y, et al. Screening and tracking of active components of marine fungi against senile dementia [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2016, 32: 63-71.
- 35 Zhang XY, et al. Simultaneous determination of calabasin BE and I in plasma, urine and fruits and vegetables by ultra high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2020, 38: 564-571.
- 36 Zhang RL. Enzyme activity detection and inhibitor screening based on novel fluorescent materials [D]. Xi'an; Shaanxi Normal University (陕西师范大学), 2017.
- 37 Cai YN. New method for detecting acetylcholinesterase activity and inhibitor screening [D]. Xi'an; Shaanxi Normal University (陕西师范大学), 2013.
- 38 Han WT. Fluorescence analysis of acetylcholinesterase and its related substances [D]. Changsha; Hunan University (湖南大学), 2013.
- 39 Liu L. Study on the interaction between coumarins and acetylcholinesterase [D]. Zhengzhou; Zhengzhou University (郑州大学), 2014.
- 40 Xu SL, et al. Determination of quinaldine residues in aquatic products by high performance liquid chromatography with fluorescence detector [J]. Chin J Anal Lab (分析实验室), 2020, 39: 1035-1039.
- 41 Gokhan Z, et al. Characterization of phytochemical components of *Ferula halophila* extracts using HPLC-MS/MS and their pharmacological potentials; a multi-functional insight [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 160: 374-382.
- 42 Chloe P, et al. Phenolic profile, toxicity, enzyme inhibition, *in silico* studies, and antioxidant properties of *Cakile maritima* Scop. (Brassicaceae) from Southern Portugal [J]. Plants (Basel), 2020, 9(2): 142.
- 43 Zhao HQ, et al. An *in vitro* AChE inhibition assay combined with UF-HPLC-ESI-Q-TOF/MS approach for screening and characterizing of AChE inhibitors from roots of *Coptis chinensis* Franch [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 120: 235-240.
- 44 Kahraman Ç, et al. Acetylcholinesterase inhibitory activities and LC-MS analysis of the antioxidant *Ferula caspica* M Bieb and *F. halophila* Peşmen extracts [J]. J Res Pharm, 2019, 23: 543-551.
- 45 Normaiza Z, et al. Comparative study of onion (*Allium cepa*) and leek (*Allium ampeloprasum*); identification of organosulphur compounds by UPLC-QTOF/MS and anticancer effect on MCF-7 cells [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2019, 74: 525-530.
- 46 Zhang LJ, et al. Toxic and active material basis of *Aconitum sinomontanum* Nakai based on biological activity guidance and UPLC-Q/TOF-MS technology [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 188: 113374.
- 47 Guo HY, et al. Comparison of gamma-aminobutyric acid in lactic acid bacteria fermentation broth by UPLC and HPLC [J]. Chin Brew (中国酿造), 2019, 38(12): 167-170.
- 48 Wang R, et al. Rapid discovery of acetylcholinesterase inhibitors in natural medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2008, 49: 5756-5760.