

乙酰胆碱酯酶微反应器的制备及其中药抑制剂筛选方法的建立

郭嘉亮^{1,2}, 沈焕圻¹, 林 航², 段倩倩², 黄若诗¹, 张婷婷²

1. 佛山科学技术学院医药工程学院, 广东 佛山 528000

2. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632

摘 要: **目的** 制备固定化乙酰胆碱酯酶微反应器, 并建立可用于中药乙酰胆碱酯酶抑制剂的快速筛选方法。**方法** 以戊二醛为交联剂, 氨基磁性微球为载体, 制备一种新型的固定化乙酰胆碱酯酶微反应器, 并对其理化性质和色谱性能进行了表征; 应用该酶反应器对千层塔 *Huperzia serratum* 各提取部位进行酶抑制剂的筛选。**结果** 酶反应体系的最佳底物浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 孵育时间 5 min; 红外表征、专属性验证、酶动力学考察以及稳定性考察均说明了该酶反应器的有效性; 从千层塔提取物中筛选获得了石杉碱甲等乙酰胆碱酯酶抑制剂。**结论** 建立了一种有效的乙酰胆碱酯酶抑制剂高通量筛选方法, 可进一步推广与应用。

关键词: 乙酰胆碱酯酶抑制剂; 千层塔; 微反应器; 磁性微球; 氨基磁性微球; 石杉碱甲

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5292-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.011

Study on preparation of immobilized acetylcholinesterase microreactor and its application in CMM inhibitors screening

GUO Jia-liang^{1,2}, SHEN Huan-qi¹, LIN Hang², DUAN Qian-qian², HUANG Ruo-shi¹, ZHANG Ting-ting²

1. School of Stomatology and Medicine, Foshan University, Foshan 528000, China

2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To prepare an immobilized acetylcholinesterase (AChE) microreactor and establish a rapid screening method for Chinese materia medica (CMM) acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs). **Methods** A novel immobilized AChE microreactor was prepared by crosslinking with glutaraldehyde, using aminated magnetic microspheres as carrier. The characterizations were conducted by physicochemical properties and chromatographic performance. The immobilized AChE reactor was used to screen AChEIs from the *Huperzia Serratum* extracts. **Results** In the enzyme reaction system, the optimum substrate concentration was 50 $\mu\text{mol/L}$, and the incubation time was 5 min, respectively. IR characterization, specificity verification, enzyme kinetics, and stability study results all demonstrated the effectiveness of the enzyme reactor. The CMM AChEI, huperzine A, was obtained from the screening of *H. Serratum* extracts. **Conclusion** A high throughput screening method for AChEIs is established in this paper, which will be further applied and popularized.

Key words: acetylcholinesterase inhibitor; *Huperzia Serratum* (Thunb.) Trev; microreactor; magnetic microspheres; aminated magnetic microspheres; huperzine A

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 开始于大脑, 记忆力会丧失, 最终导致患者无法独立行动进而导致死亡, 该疾病给社会带来了巨大负担^[1]。据美国疾病控制和预防中心 (CDC) 报告, AD 已成为美国第 3 大致死原因, 紧排在心脏病和癌症之

后。目前, AD 的治疗药物开发尚处于举步维艰的阶段, 美国 FDA 只批准了 5 种用于治疗 AD 的药物; 从 1998 到 2011 年, 药物研发企业先后取消或终止 101 个 AD 药物临床开发, 研发成功失败比为 1 : 34。因此, 探索新型 AD 治疗药物, 成为了亟需解决的

收稿日期: 2018-06-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503031, 81872832); 广东省科技计划项目 (2016A020226004); 广东省中医药建设专项资金项目 (20161068); 佛山科学技术学院博士启动项目 (gg040952); 大学生创新训练项目 (XJ2018189)

作者简介: 郭嘉亮, 副教授, 研究方向为新药研究与活性筛选。E-mail: janalguo@126.com

***通信作者** 张婷婷, 副教授, 研究方向为中药分析。E-mail: 601170237@qq.com

重要课题。

“胆碱能缺失假说”是目前最受认可的假说^[2-4]，现有治疗 AD 的药物大多数围绕这一理论去发掘乙酰胆碱酯酶抑制剂 (acetylcholinesterase inhibitors, AChEI)^[5-6]。我国中药和天然药物资源极其丰富，有望成为发现 AChEI 的新型药物先导物的重要来源。其中，银杏叶提取物、蛇床子素、石杉碱甲、文冠果等已被报道具有扩张脑血管、增加脑血流量、清除自由基的作用，并通过抑制脑内胆碱酯酶的活性，提高脑内兴奋性递质乙酰胆碱的含量，来改善老年痴呆症患者的症状。由此提示了从中药及天然药物中发掘药效更佳、成本更低新型治疗 AD 药物具有重要的前景和实践价值。

当前，从药用植物中发现 AChEI 的筛选方法有多种，包括如荧光法^[7]、Ellman 法^[8]等，但存在操作复杂、容易产生假阳性等不足；而且离不开纷繁复杂的中药分离和纯化，这严重阻碍了中药 AChEI 的开发效率，影响了下游药理学研究的开展，进而影响了临床的应用。亲和选择筛选法是一种能对中药天然药物活性成分筛选、分离和结构鉴定进行一体化分析的高通量技术，具有高专属性、高灵敏度及高效能的特点。磁性微球是一种良好的酶固定化载体，具有使用寿命长、稳定性佳、成本低、操作简便等一系列优势而引起了广泛关注。然而，有关基于磁性微球材料的 AChE 固定化酶筛选模型的研究报道目前还非常少。因此，本实验以戊二醛为交联剂，氨基磁性微球为载体^[9]，制备一种新型的固定化乙酰胆碱酯酶微反应器^[10]，并应用该酶反应器对中药千层塔 *Huperzia serratum* (Thunb.) Trev. 各提取部位进行 AChEI 的筛选，以期建立一种新颖、高通量的 AChEI 筛选方法，为从中药中寻找 AD 治疗药物提供重要的方法学支持。

1 仪器与材料

1.1 设备与仪器

DF-101S 集热式恒温加热搅拌器，河南予华仪器有限公司；Agilent HP1260 系统、DAD 检测器、Agilent 6120 Quadrupole LC/MS、自动馏份收集器，美国 Agilent 公司；BSA223S 电子天平，德国

Sartorius 公司；Tensor27 红外吸收光谱仪，德国 Bruker 公司；磁力分选器，挪威 Dynal 公司；Termomixer R 混匀器，德国 Eppendorf 公司。

1.2 药物与试剂

溴化乙酰胆碱 (acetylcholine bromide, ACh)、乙酰胆碱酯酶 (type VI-S, *eel*AChE, 来自电鳗的乙酰胆碱酯酶)、他克林 (tacrine)、加兰他敏 (galanthamine)、拉贝洛尔 (labetalol)，美国 Sigma-Aldrich 公司；氨基磁珠，澳大利亚 Bioclone 公司；对照品石杉碱甲 (huperzine A)，批号 20141012，质量分数为 99.5%，浙江万邦制药有限公司；戊二醛、吡啶、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，上海阿拉丁化学试剂有限公司；乙酸铵、甲醇，色谱纯，美国 Merck 公司；实验室用水为自制 Milli-Q 超纯水；千层塔 *Huperzia serratum* (Thunb.) Trev. 不同部位提取物 (氯仿、醋酸乙酯以及正丁醇部位) 由暨南大学张晓琪教授课题组提供。

2 方法与结果

2.1 酶反应器的制备

参考文献方法^[11-12]，取氨基磁珠 15 mg，磁分离，弃去上清液；使用吡啶缓冲液 (10 mmol/L, pH 6.0) 1 mL 分批清洗多次；加入含有 5% 戊二醛的吡啶缓冲液 (10 mmol/L, pH 6.0) 1 mL，4 °C 下垂直混悬器反应 3 h，磁分离，弃上清；吡啶缓冲液再清洗，加入 500 μ L 含 1.2 mg 的 AChE 的吡啶缓冲液，4 °C 下垂直混悬器反应 16 h，得到固定化 *eel*AChE 的磁珠；最后使用 Tris-HCl (100 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液 0.5 mL 清洗，低温保存待用 (图 1)。

2.2 固定化 AChE 筛选模型的优化

2.2.1 孵育时间的优化 参考文献方法^[11]，用乙酸铵缓冲液清洗制备好的固定化 AChE 磁珠，磁分离，弃上清。加入 50 μ mol/L 的底物 ACh 600 μ L，分别孵育 0、0.5、3、5、8、10 min，磁分离，收集上清液；乙酸铵缓冲液清洗磁珠。上清液使用 LC-MS 选择阳离子 SIM 模式检测 ACh 的母离子 $[M+H]^+$ m/z 226.1。测定底物 ACh 和水解产物胆碱的峰面积，计算水解比例，确定最佳孵育时间。

通过底物与 AChE 反应器孵育不同时间，测定

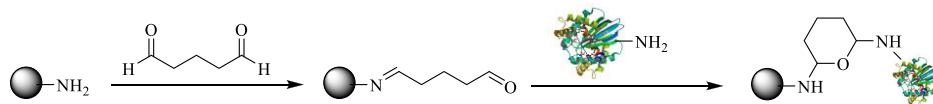


图 1 固定化乙酰胆碱酯酶微反应器的制备

Fig. 1 Preparation of immobilized AChE microreactor

不同孵育时间下的水解率,结果见图 2。可以看出,随着孵育时间的延长,底物水解的越充分。然而,从 5 min 开始水解的量增长较为缓慢,综合实验时间、成本,最终选择孵育时间 5 min 为后续实验的孵育时间。

2.2.2 底物浓度的优化 参考文献方法^[12], 乙酸铵缓冲溶液 (15 mmol/L, pH 8.0) 清洗磁珠, 然后分别将各种浓度底物 ACh (10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 各 600 μL , 加入固定化 AChE 磁珠反应体系中, 孵育 5 min, 磁分离, 收集上清液。按照“2.2.1”项的条件测定不同孵育时间上清液中的底物 ACh 和产物胆碱的峰面积, 计算水解率, 结果见图 3。可以发现, 底物浓度从 10 $\mu\text{mol/L}$ 到 200 $\mu\text{mol/L}$, 水解率均大于 95%, 综合底物使用量、产物峰面积和水解率, 最终确定底物浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 酶反应器的表征和评估

2.3.1 红外光谱表征 通过对比空白氨基磁珠以及固定化 AChE 磁珠的红外光谱图可以对氨基磁珠固

定化 AChE 的情况进行评估与判断。将氨基磁珠真空干燥后, 加入 KBr 压片。同样方法处理固定化 AChE 磁珠, 以红外吸收光谱仪记录波数在 4 000~400 cm^{-1} 的红外光谱。

对比未固定酶的空白氨基磁珠与固定化乙酰胆碱酯酶的氨基磁珠红外光谱图, 结果见图 4。1 090.15 cm^{-1} 为 Si-O 键的伸缩振动, 2 个样品均含有氨基磁珠, 因此均有该吸收峰。1 541.00 cm^{-1} 为肽键中 N-H 的弯曲震动 (图 4-a), 而 1 642.19 cm^{-1} 为肽键中 C=O 伸缩振动吸收 (由于存在中介效应, 肽键的 C=O 吸收频率比醛酮低很多, 醛酮和羧酸的 C=O 吸收峰均不小于 1 700 cm^{-1}), 未固定酶的氨基磁珠 (图 4-b) 不具有肽键, 因此对比固定化乙酰胆碱酯酶氨基磁珠的红外图谱 (图 4-a), 没有肽键的特征吸收峰。通过红外的表征可以说明, 乙酰胆碱酯酶键合到了氨基磁性微球表面, 这部分的实验成功的制备了固定化乙酰胆碱酯酶反应器, 下一步则需要对该酶反应器的有效性进行评估。

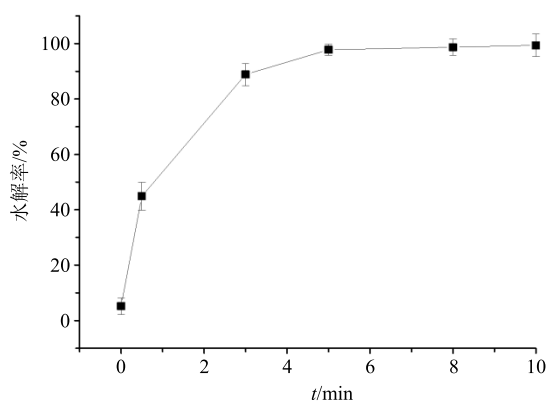


图 2 孵育时间的考察 ($n=5$)

Fig. 2 Investigation of incubate time ($n=5$)

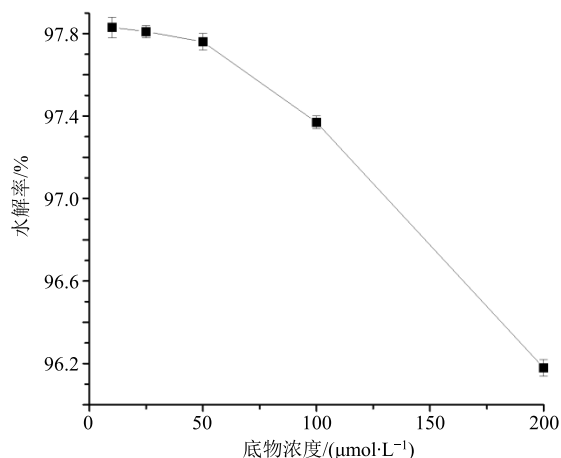


图 3 底物浓度的考察 ($n=5$)

Fig. 3 Investigation of substrate concentration ($n=5$)

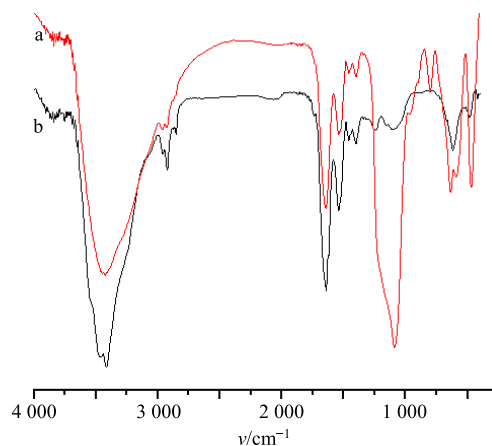


图 4 固定化 AChE 的氨基磁珠 (a) 与氨基磁珠 (b) 红外光谱图

Fig. 4 IR of immobilized AChE magnetic beads (a) and magnetic beads (b)

2.3.2 专属性测定 以 AChE 的选择性抑制剂加兰他敏、石杉碱甲和非选择性抑制剂他克林为阳性对照, 与胆碱能系统无关的 β 受体阻断剂拉贝洛尔为阴性对照, 参考文献方法^[12], 进行专属性研究。流程如图 5 所示: 首先分别配制上述样品与底物 ACh 的混合样品; 使用乙酸铵缓冲溶液 (15 mmol/L, pH 8.0) 清洗固定化 AChE 磁珠, 然后加入混合样品溶液, 孵育、分离取上清, 得到 S1; 使用乙酸铵缓冲溶液 (15 mmol/L, pH 8.0) 清洗磁珠 2 次, 分别得到清洗液 W1 和 W2; 加入 20% 甲醇的乙酸铵缓冲

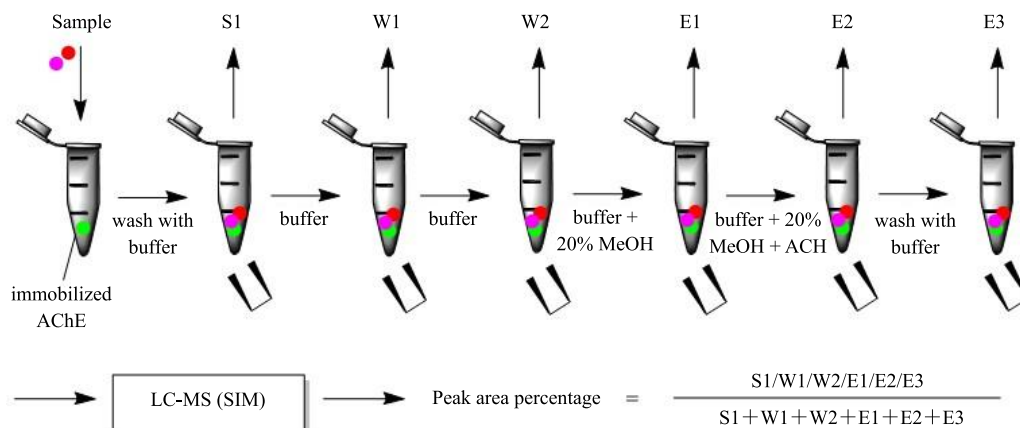


图 5 AChE 微反应器有效性实验操作流程

Fig. 5 Operation procedure of effectiveness experiment of AChE microreactor

溶液，孵育、磁分离取上清，得到洗脱液 E1；加入含 20% 甲醇及底物 ACH 的缓冲溶液，孵育、磁分离取上清，得到洗脱液 E2；最后使用乙酸铵缓冲溶液清洗磁珠，类似处理得到 E3，使用 LC-MS（同“2.2.1”项）分别测定各峰面积，并计算各占总峰面积的百分比。

本实验通过对比洗脱的方式考察了 3 种 AChEI，包括他克林、加兰他敏、石杉碱甲和阴性对照拉贝洛尔对固定化的 AChE 的相互作用，以此评价该微酶反应器的有效性和专属性，结果见图 6。3 种常用 AChEI 与 AChE 作用后，上清液 S 的含量明显下降，说明阳性药物与固定化 AChE 相作用。为了排除非特异性的吸附，使用乙酸铵缓冲溶液清洗磁珠 2 次，收集洗液 W1 和 W2，检测阳性药物含量，均小于 15%，说明阳性药与 AChE 的作用是具有特异性的。同时，以 20% 甲醇的乙酸铵缓冲溶液，以及含 50 $\mu\text{mol/L}$ 底物 ACH 和 20% 甲醇的乙酸铵缓冲溶液分别洗脱，收集洗液 E1 和 E2。发现 E1 中含有他克林 47.82%，而加兰他敏和石杉碱甲主则基本存在于 E2 中，其质量分数分别为 40.08% 和 70.91%。值得注意的是，由于他克林是一种非选择性的 AChEI，故含 20% 甲醇的缓冲溶液即可将其洗脱；但加兰他敏和石杉碱甲均具有更强的选择性，因此在同时含有底物及醇的情况下，才能够被竞争性洗脱下来。这体现了该反应器具有良好专属性。相比之下，阴性对照拉贝洛尔和 AChE 微反应器作用后，82.3% 的样品保留在上清液 S，以及 E1 和 E2 中，进一步证明了本酶反应器的有效性。

通过对比 3 种阳性对照样品在 E2 中的量，结合参考文献报道^[13]的 IC_{50} 值，分别为石杉碱甲最低

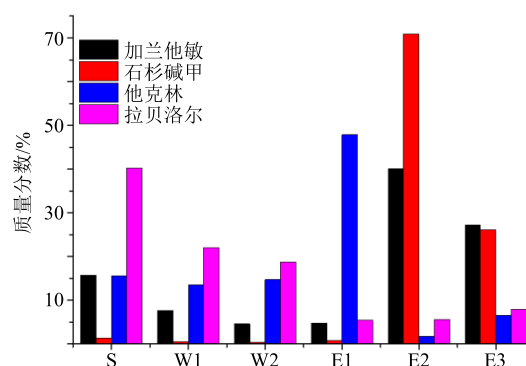


图 6 固定化乙酰胆碱酯酶微反应器有效性测定

Fig. 6 Effectiveness of immobilized AChE microreactor

(47 nmol/L)，他克林次之 (190 nmol/L)，加兰他敏最高 (800 nmol/L)。由此可以发现抑制作用大小的排序为石杉碱甲 > 他克林 > 加兰他敏；结合该微反应器对于阴性药物拉贝洛尔的作用，证明了本 AChE 反应器具有显著的专属性，可有效应用于建立模型，为酶抑制剂筛选提供有效方法。

2.3.3 酶动力学考察 酶催化反应符合米氏方程规定；作为酶极为重要的动力学参数，米氏常数 (K_m) 可以通过对米氏方程进行变形，利用双倒数 (Lineweaver-Burk) 作图法得到以下公式。

$$1/v = K_m/(v_{\max}[S]) + 1/v_{\max}$$

v 为酶促反应的初速度， $v_{\max}$ 为酶促反应的最大反应速度， $[S]$ 为底物的浓度

酶动力学是考察该反应器的 AChE 结合底物能力和催化反应速率的重要依据，其酶促反应的初速度可以用产物胆碱的峰面积来衡量。按照公式计算，分别以底物 ACH 浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标，以产物胆碱初速度的倒数 $1/v$ 为纵坐标，进行双倒数作图 (图 7)，获得酶促反应的 K_m 为 0.15 mmol/L。相

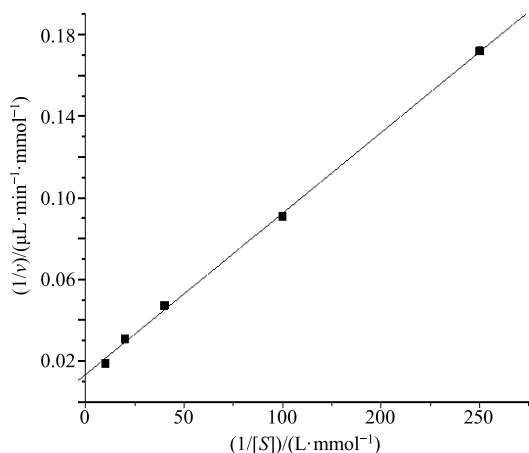


图 7 AChE 酶反应器 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 7 Lineweaver-Burk double reciprocal plot of AChE microreactor

关结果与已有文献报道^[14]的固定化 AChE 多壁碳纳米管交联壳聚糖复合材料微反应器的 K_m 值 (0.13 mmol/L) 接近, 低于其多壁碳纳米管微反应器^[15]的 K_m 值 (0.66 mmol/L), 以及聚乙稀亚胺修饰电极微反应器的 K_m 值 1.5 mmol/L^[16]。可见固定化材料的选择影响了 AChE 与底物的亲和力, 导致 K_m 值的变化。该实验初步反映了磁性微球固定化 AChE 酶反应器对底物有较强的亲和力, 这也为将其应用于 AChEI 的筛选提供了证据。

2.3.4 稳定性考察 稳定性进一步决定本反应器的使用范围和价值。根据“2.2”项优化所得最佳孵育条件, 连续使用 10 d, 考察 AChE 微反应器的稳定性。具体通过测试 AChE 微反应器对底物的水解作用, 以水解率表征其稳定性。

水解率 = 胆碱峰面积 / (胆碱峰面积 + ACH 峰面积)

稳定性是衡量该反应器的实际应用价值的具体指标。结果见图 8, 随着使用时间的迁移, 10 d 之内 AChE 微反应器对底物的水解率均可保持在 96% 左右, RSD 仅为 0.76%。研究结果体现了该酶反应器具有良好的稳定性 ($n=10$)。

2.4 中药千层塔中 AChEI 的筛选

通过考察 AChEI 对底物 ACH 水解的抑制作用,

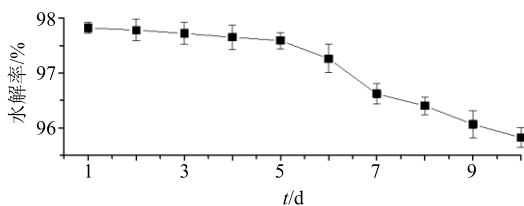


图 8 固定化 AChE 酶反应器稳定性

Fig. 8 Stability of immobilized AChE microreactor

分别对千层塔 3 个不同极性部位 (氯仿、醋酸乙酯、正丁醇部位) 进行筛选。首先配制 50 $\mu\text{mol/L}$ ACH 为空白对照, 然后分别配制 20 $\mu\text{mol/L}$ 氯仿、醋酸乙酯、正丁醇 3 部位的样品 (均含有 50 $\mu\text{mol/L}$ ACH); 进行孵育, 取上清液; 测定上清液中底物和产物的量, 根据峰面积计算抑制率; 将活性部位通过 LC 的分离得到相应馏份, 再次进行活性筛选, 从而找出并指征 AChEI。

按照“2.2”项优化获得的最佳条件, 将本反应器应用于千层塔的氯仿、醋酸乙酯、正丁醇 3 个部位的 AChEI 筛选。结果发现氯仿部位具有明显抑制活性, 抑制率为 10.2%。然后对氯仿部位进行液相分离^[17]和馏份收集, 共得到 13 个馏份, 并对每个馏份的活性进行测定, 最终发现馏份 9 具有明显抑制活性, 抑制率 51.2% (图 9); 其他组分抑制率均小于 1%。通过结构测定, 最终确定馏份 9 为石杉碱甲和另一未知化合物。石杉碱甲是已被广泛报道的 AChEI; 另一化合物有待进一步进行结构鉴定。上述结果有助于阐明千层塔对治疗 AD 病症的主要作用机制; 此外也反映了该微酶反应器可以很好地应用于中药中 AChEI 的高通量筛选。

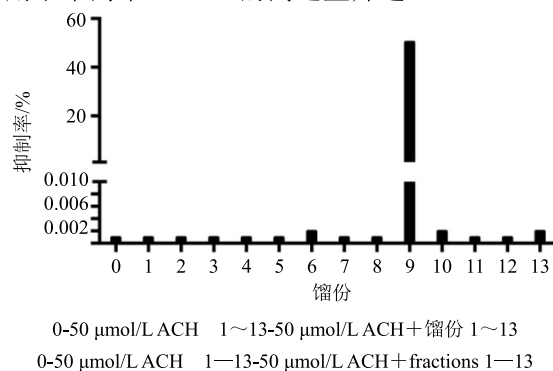


图 9 氯仿部位各个馏份乙酰胆碱酯酶抑制活性测定结果

Fig. 9 AChE inhibitory activity of different chloroform fractions

3 讨论

本实验通过制备 AChE 酶反应器中药复杂样品中 AChEI 的筛选, 建立了一个新颖、快速、高效、准确的 AChEI 高通量筛选方法, 为寻找中药及天然产物中更多有效的 AChEI 成分提供了一种可行的思路; 同时, 有助于阐明中药作用机制。本反应器的核心载体为磁珠, 由具有超顺磁性金属氧化物与高分子有机物相互作用形成的一种颗粒, 可高度分散在载液中形成的稳定胶体溶液。由于独特的顺磁性和高分子粒子的特性, 可在磁场控制下容易实现

磁珠与反应体系的固液分离,故在药物筛选领域有着重要的应用前景。本研究利用该反应器顺利从千层塔提取物中筛选获得了石杉碱甲等 AChEI,证明了技术的可行性与先进性。

制备的 AChE 微反应器及其抑制剂筛选方法具有以下优势:(1)以商业化的氨基磁性微球为载体,通过戊二醛交联法制备相应的固定化 AChE 微酶反应器,并对其制备工艺进行了一系列的考察。该方法具有商品化程度高、工艺简单、可重复性强等优点,具有重要的实践和应用价值。(2)本研究是一种能对中药天然药物活性成分“筛选、分离和结构鉴定”进行一体化分析的高通量技术,具有高专属性、高灵敏度及高效能的特点。不需要经过纷繁复杂的中药分离和纯化,这大大提升了中药 AChEI 的开发效率。(3)有别于传统的 Ellman 法和荧光法,可以同时底物和产物的直接测定,不需要进行衍生化,基本排除常规方法造成的假阳性结果;同时,微型化研究加上质谱的灵敏度较高,避免了中药有效活性成分含量较低而可能造成假阴性结果。本实验建立的方法具有显著的优势,为中药 AChEI 的开发提供了一种可行的思路,有利于中药的二次创新和深入开发。

参考文献

- [1] Kosasa T, Kuriya Y, Matsui K, *et al.* Inhibitory effects of donepezil hydrochloride (E2020) on cholinesterase activity in brain and peripheral tissues of young and aged rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 386(1): 7-13.
- [2] Bartus R T, Dean R L, Pontecorvo M J, *et al.* The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspective, and future directions [J]. *Ann Ny Acad Sci*, 1985, 444(1): 332-358.
- [3] 刘静,高颖,杨利,等. 知母-黄芪散复方通过 TNF- α /JNK 通路改善阿尔茨海默症大鼠认知障碍的研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(3): 320-326.
- [4] 杨江梅,彭福杰,辛增辉,等. 清脂软胶囊对实验性小鼠记忆障碍的改善作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2008, 19(1): 18-21.
- [5] Rösler M, Anand R, Cicin-Sain A, *et al.* Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: International randomised controlled trial [J]. *Brit Med J*, 1999, 318(7184): 633-640.
- [6] 孙春红,邹峥嵘. 植物来源的生物碱类乙酰胆碱酯酶抑制剂研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(21): 3172-3184.
- [7] Rhee I K, Appels N, Luijendijk T, *et al.* Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay [J]. *Phytochem Anal*, 2003, 14(3): 145-149.
- [8] Ellman G L, Courtney K D, Andres V, *et al.* Featherstone, a new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2): 88-95.
- [9] Hromadkova L, Kupcik R, Vajrychova M, *et al.* Kinase-loaded magnetic beads for sequential *in vitro* phosphorylation of peptides and proteins [J]. *Analyst*, 2018, 143(2): 466-474.
- [10] 肖丹,杨洪岩,由香玲,等. 植物异戊二烯生物反应器研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(24): 3641-3650.
- [11] Moaddel R, Marszał M P, Bigli F, *et al.* Automated ligand fishing using human serum albumin-coated magnetic beads [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(14): 5414-5417.
- [12] Yasuda M, Wilson D R, Fugmann S D, *et al.* Synthesis and characterization of SIRT6 protein coated magnetic beads: identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(19): 7400-7407.
- [13] Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives [J]. *Pharmacol Res*, 2004, 50(4): 433-440.
- [14] Du D, Huang X, Cai J, *et al.* An amperometric acetylthiocholine sensor based on immobilization of acetylcholinesterase on a multiwall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387(3): 1059-1065.
- [15] Kanchan A J, Jason T, Robert H, *et al.* A disposable biosensor for organophosphorus nerve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrode [J]. *Electroanal*, 2005, 17(1): 54-58.
- [16] Vakurov A, Simpson C E, Daly C L, *et al.* Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: I. Modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase [J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20(6): 1118-1125.
- [17] Zhang H, Liang H, Kuang P, *et al.* Simultaneously preparative purification of Huperzine A and Huperzine B from *Huperzia serrata* by macroporous resin and preparative high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 904: 65-72.