

# 海藻组分抑制乙酰胆碱酯酶活性研究\*

张翼 冯妍 李晓明 王斌贵<sup>1)</sup>

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071;

中国科学院研究生院 北京 100039)

<sup>1)</sup>(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071)

**提要** 采用乙酰胆碱酯酶抑制剂活性筛选模型对采自青岛沿海的 22 种海藻样品提取物的石油醚组分和乙酸乙酯组分进行了活性筛选。结果表明,22 种海藻的石油醚组分均具有不同程度的乙酰胆碱酯酶抑制活性,其中亮管藻、海头红、鸭毛藻和孔石莼表现出较强的活性,在浓度为 50 $\mu$ g/ml 时的抑制率均大于 50.0%,分别为 50.5%、55.5%、56.6% 和 65.8%;其他大部分海藻的抑制率在 30.1% 到 48.9% 之间。与石油醚组分不同的是,只有少数海藻的乙酸乙酯组分表现出乙酰胆碱酯酶抑制活性,其中鸭毛藻的活性最为显著,在浓度为 25 $\mu$ g/ml 时抑制率高达 71.8%;孔石莼的乙酸乙酯组分也具有较强的抑制活性;其余海藻的乙酸乙酯组分对乙酰胆碱酯酶的抑制活性较弱,有些不仅没有活性,反而表现出不同程度的增强作用。

**关键词** 海藻组分,乙酰胆碱酯酶,抑制剂,活性筛选

**中图分类号** R931.77

乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)在人体中主要存在于神经肌肉组织的突触后膜上,已知其主要功能是催化乙酰胆碱的分解,在胆碱能神经纤维的信号传导中扮演重要角色(朱美财,1992)。

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease, AD),又称早老性痴呆症,是发生于老年和老年前期以进行性神经退化为特征的大脑退行性病变。随着老龄人口的不断增加,AD 病人日益增多,已经成为继心血管疾病和肿瘤之后严重威胁老年人生命健康的主要疾病之一。目前多方面的研究表明,其病理与患者神经间隙中乙酰胆碱酯酶活性过高具有重要关系(胡海峰等,1999;李前等,2002),其治疗策略的研究主要集中在胆碱能的替代疗法,即寻找新的中枢拟胆碱药,其中乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)是研究最为活跃的。目前最具代表性、应用最广泛、最有效的中枢神经性可逆

AChE 抑制剂是化学合成药物他克林(Tacrine)。Tacrine 是在美国批准上市的第一个用于 AD 治疗的合成药物,但它的副作用,如肝细胞毒性(尤其是引起转氨酶水平升高)、肠胃不适等,严重影响了其应用(胡海峰等,1999;陶纪宁,2001)。天然药物方面,从石松科植物千层塔中发现的石杉碱甲(谭昌恒等,2003)和从芸香科植物黄皮中发现的黄皮酰胺(张均田,2002),经药理研究表明对 AD 患者有显著的治疗作用。

目前,利用各种手段研究发现新的、切实有效的早老性痴呆症防治药物是新药研究的一个热点领域。海洋生物因其特殊的生活环境而在生长和代谢过程中产生和积累了大量结构新、活性强的次生代谢产物,是研究发现新型海洋药物的重要资源。近年来,关于海藻抗肿瘤、重要靶酶抑制活性的研究多见报道(徐年军等,2001;李宪瑾等,2002;牛荣丽等,2003;徐秀丽等,2004)。但文

\* 中国科学院“百人计划”资助项目, LSC2-10 号;中国科学院海洋研究所知识创新工程领域前沿资助项目, L79032432 号。张翼, 硕士研究生, E-mail: zhangyi@ms.qdio.ac.cn

1) 通讯作者: 王斌贵, 研究员, E-mail: wangbg@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2004-08-02, 收修改稿日期: 2004-12-20

献检索表明,迄今为止尚未发现有关海藻抗乙酰胆碱酯酶抑制活性的筛选研究报道。为寻找海洋藻类植物来源的乙酰胆碱酯酶抑制剂,作者建立了AChEI的筛选模型,并首次对22种海藻样品提取物的石油醚组分和乙酸乙酯组分进行了活性筛选。

## 1 材料与方 法

### 1.1 海藻及其样品的制备

本实验所用的海藻样品均采自青岛海区,由中国科学院海洋研究所分类室鉴定。新鲜的海藻样品用过滤海水清洗,除去附着的杂藻、贝类后,晾干,备用。

取上述每种海藻样品 15g(干重),粉碎,用 300ml 甲醇分 3 次浸泡提取,合并提取液,减压浓缩后,将获得的浸膏依次用石油醚(100ml×3)、乙酸乙酯(100ml×3)分别萃取 3 次,合并提取液,减压浓缩,分别获得相应的石油醚组分和乙酸乙酯组分。

### 1.2 仪器

Spectrumlab54 紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司),SG-15 超级数控恒温槽(宁波天恒仪器厂),旋转蒸发仪(瑞士 BÜCHI 公司)。

### 1.3 药品与试剂

乙酰胆碱酯酶(AChE, Sigma 公司), 50mmol/L、pH 8.0 的磷酸缓冲盐溶液(PBS), 15mmol/L 二硫二硝基苯甲酸(Dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB)溶液(Sigma 公司)(用 50mmol/L、pH 8.0 PBS 配制), 15mmol/L 硫代乙酰胆碱(Acetylthiocholine, ATCh, Sigma 公司,用 50mmol/L、pH 8.0 PBS 配制), 4% 十二烷基硫酸钠(SDS, Sigma 公司), 阳性对照 tacrine (Sigma 公司), 0.75mol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液, 甲醇、乙醇、正丁醇、二甲基亚砜。以上所有化学试剂均为分析纯。萃取用溶剂石油醚、乙酸乙酯、甲醇、氯仿等为工业纯试剂,使用前经过重蒸处理。

### 1.4 筛选模型的建立

**1.4.1 实验原理** 硫代乙酰胆碱(ATCh)在乙酰胆碱酯酶(AChE)作用下分解,生成硫代胆碱(Thiocholine),硫代胆碱与显色剂 DTNB 迅速作用,生成在 412nm 处有光吸收的黄色物质(Fernando *et al.*, 1999),在酶催化反应的稳态阶段其 OD 值即可代表起始反应速率。

**1.4.2 OD-t 曲线** 实验方法:取 20μl 0.75 mol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 于试管中,加入 50mmol/L 的 PBS 2730μl, 37℃水浴预热 2min, 再依次加入乙酰胆碱

酯酶 50μl, 15mm 的 DTNB 100μl, 15mmol/L 的 ATCh 100μl, 37℃水浴反应不同时间,加入 4% 的 SDS 1ml 终止反应,测其 412nm 的 OD 值(董悦生等, 2002; 彭汶铎等, 1996; 刘静等, 1999; Fernando *et al.*, 1999; Klemens *et al.*, 2001)。

**1.4.3 OD-酶活曲线** 实验方法同 1.4.2, 只是加酶时加的是稀释成不同浓度的乙酰胆碱酯酶 50μl, 反应时间确定为 20min。

**1.4.4 1/OD-1/[S] 曲线** 由于在酶反应稳态阶段内可用 OD 值来表征反应速度 *v*, 同理可用 1/OD-1/[S] 曲线代替 1/*v*-1/[S] 曲线来探讨乙酰胆碱酯酶的性质,方法同 1.4.2, 只是加入的 100μl 底物是稀释为不同浓度的,均足量,反应时间为 20min。

**1.4.5 溶剂选择** 溶剂选择的原则:对样品的溶解性好,对酶的抑制率低。

实验方法:取 20μl 0.75mol/L 的 MgCl<sub>2</sub>, 50mmol/L 的 PBS 2630μl 或 2530μl, 相应加入 100μl 或 200μl 甲醇,乙醇,50%乙醇或 DMSO(二甲基亚砜)(董悦生等, 2002; 刘静等, 1999; Gary *et al.*, 1989), 37℃水浴预热 2min, 再依次加入 AChE 50μl, 15mmol/L 的 DTNB 100μl, 15mmol/L 的 ATCh 100μl, 于 37℃水浴反应 20min, 加 4% 的 SDS 1ml 终止反应,测其在 412nm 的 OD 值。

### 1.5 海藻组分的活性筛选

方法如 1.4.5 所述, PBS 用量为 2630μl, 加 100μl 溶于 50%乙醇溶液的样品,测其 OD<sub>412</sub>, 记为 A<sub>样品</sub>;由于海藻样品多有颜色,故每个样品同时做一个本底扣除,即用 100μl 50mmol/L 的 PBS 代替酶溶液,其吸光度记为 A<sub>本底</sub>;同时每批样品都做溶剂对照,即用 50%乙醇代替样品的乙醇溶液,其吸光度记为 A<sub>对照</sub>;再做空白对照,即用 100μl PBS 来代替样品,记为 A<sub>空白</sub>。

样品的吸光度为:

$$A_{\text{真实}} = A_{\text{样品}} - A_{\text{本底}}$$

样品的抑制率为:

$$(A_{\text{对照}} - A_{\text{真实}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

每个样品同时做 3 个平行测试,取平均值,作为各样品的平均抑制率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 筛选模型

**2.1.1 OD-t 曲线** 由图 1 的结果可以看出, 20min 内线性关系比较好,反应处在稳态阶段,故而

取20min作为反应时间,此点的OD<sub>412</sub>可代表其反应速率。

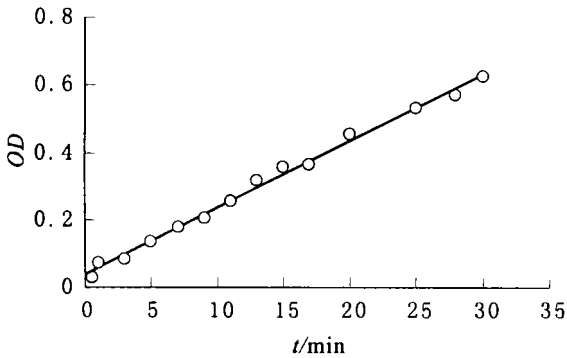


图1 OD-时间曲线

Fig.1 Curve of OD-time

2.1.2 OD-酶活曲线 由图2的结果可以看出,在20min、0.1—1.0倍的酶浓度下,OD值与酶的浓度呈现出较好的线性关系,也直观地证实了在此范围内可以用OD值来代表酶活。

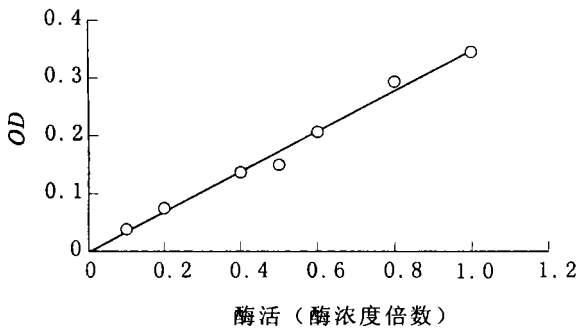


图2 OD-酶活曲线

Fig.2 Curve of OD-enzyme activity

2.1.3 1/OD-1/[S]曲线 由图3可见,在一定范围内1/OD与1/[S]成正比,即1/OD与1/[S]间存在线性关系,说明乙酰胆碱酯酶为米氏酶,满足米氏方程:  $v = v_{max}[S] / (K_m + [S])$ , 后续研究中可用此曲线探讨抑制剂的性质,并由公式  $1/v = 1/v_{max} + (K_m/v_{max}) \times 1/[S]$  (即相应的  $1/OD = 1/OD_{max} + (K_m/OD_{max}) \times 1/[S]$ ) 求得:

$$K_m = (K_m / OD_{max}) / (1 / OD_{max}) = \text{斜率} / \text{纵轴截距} = 1.0496 / 9.6512 = 0.113\text{mm}$$

2.1.4 溶剂选择 由表1可见,50%乙醇100μl的抑制率相对较低,且样品在50%乙醇中的溶解性相对较好,故选择50%乙醇作为溶剂,加入100μl样品的50%乙醇溶液测活。

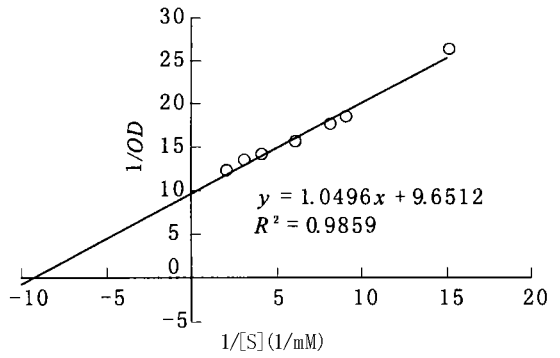


图3 1/OD-1/[S]曲线

Fig.3 Curve of 1/OD-1/[S]

表1 各种溶剂的平均抑制率

Tab.1 Average inhibition ratios for different solvents

溶剂种类	平均抑制率(%)	
	溶剂用量 100μl	溶剂用量 200μl
甲醇	37.0	41.7
乙醇	38.4	50.2
50%乙醇	17.1	30.1
DMSO	48.6	52.4

### 2.2 活性筛选结果

海藻样品的溶剂提取物依次用石油醚和乙酸乙酯分配成极性不同的石油醚组分和乙酸乙酯组分后分别进行乙酰胆碱酯酶抑制活性测定。实验结果表明(表2),所有受试海藻样品的石油醚组分均表现出一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性,其中亮管藻、囊藻、海头红、鸭毛藻和孔石莼表现出较强的活性,在浓度为50μg/ml时的抑制率均大于50.0%,分别为50.5%、52.5%、55.5%、56.6%和65.8%。其他大部分海藻的石油醚组分的抑制率在30.1%到48.9%之间,鼠尾藻和金膜藻的抑制率最低,分别为14.7%和24.1%。

与石油醚组分不同的是,只有少数海藻的乙酸乙酯组分表现出乙酰胆碱酯酶抑制活性,其中活性最显著的是鸭毛藻,在浓度为25μg/ml时抑制率高达71.8%;孔石莼的乙酸乙酯组分也具有较强的抑制活性,在浓度为50μg/ml时的抑制率为46.7%;松节藻和海带的乙酸乙酯组分具有较弱的活性,在浓度为50μg/ml时抑制率小于35.0%。其余海藻的乙酸乙酯组分均未表现出对乙酰胆碱酯酶的抑制活性,反而表现出不同程度的增强作用。

表 2 海藻样品的平均抑制率(50 $\mu$ g/ml)Tab.2 Average inhibition ratios for the seaweed samples (50 $\mu$ g/ml)

海藻样品	石油醚 组分(%)	乙酸乙酯 组分(%)
红藻门 Rhodophyta		
角叉菜 <i>Chondrus ocellatus</i>	37.7	- 54.2
海头红 <i>Plocamium telfairiae</i>	55.5	- 51.6
粗枝软骨藻 <i>Chondria crassicaulis</i>	42.4	- 75.4
蜈蚣藻 <i>Grateloupiia licina</i>	25.3	- 41.1
多管藻 <i>Polysiphonia urceolata</i>	25.3	- 39.2
三叉仙菜 <i>Ceramium kondoi</i>	34.6	- 30.4
金膜藻 <i>Chrysmenia wrightii</i>	24.1	- 41.2
珊瑚藻 <i>Corallina officinalis</i>	39.9	- 43.8
扁江篱 <i>Gracilaria textorii</i>	48.9	- 52.5
松节藻 <i>Rhodomela confervoides</i>	33.3	33.6
亮管藻 <i>Hyalosiphonia caespitosa</i>	50.5	- 40.9
带状蜈蚣藻 <i>Grateloupiia turuturu</i>	43.3	15.5
鸭毛藻 <i>Symphycloadia latiuscula</i>	56.6	71.8*
条斑紫菜 <i>Porphyra yezoensis</i>	30.1	- 15.4
褐藻门 Phaeophyta		
萱藻 <i>Scytosiphon lomentarius</i>	37.2	- 29.4
裙带菜 <i>Undaria pinnatifida</i>	43.8	- 24.4
厚点叶藻 <i>Punctaria plataginea</i>	34.8	- 67.9
鼠尾藻 <i>Sargassum thunbergii</i>	14.7	- 39.0
海黍子 <i>Sargassum hjelmsianum</i>	35.4	- 37.9
海带 <i>Laminaria japonica</i>	35.6	7.7
囊藻 <i>Colpomenia sinuosa</i>	52.5	- 54.2
绿藻门 Chlorophyta		
孔石莼 <i>Ulva pertusa</i>	65.8	46.7

\* 浓度为 25 $\mu$ g/ml。带负号的数据表示这些乙酸乙酯组分对乙酰胆碱酯酶没有抑制活性,但有增强活性

由于各种海藻的石油醚组分都有强弱不同的活性,初步推测有可能是其中含量较大的同一种或同一类化合物在起作用,活性强弱不同可能是因为成分的活性或含量不同所引起。石油醚组分多为脂溶性成分,已有的文献报道表明(Faulkner, 2001; Blunt *et al.*, 2003),脂肪酸、甘油酯、长链烃类化合物以及极性小、含氧取代低的萜类、甾体、

生物碱等成分是石油醚组分的主要组成,其中含氮的生物碱类是最有可能的乙酰胆碱酯酶抑制活性成分,在今后的化学成分研究中应特别注意。而不同海藻的乙酸乙酯组分的活性差别很大,初步推断其中含有结构类型完全不同的化合物,相当部分海藻的乙酸乙酯组分对乙酰胆碱酯酶不仅没有抑制活性,反而具有增强作用,这也可能是其中的化学成分结构类型迥异所致。这些都有待于进一步深入系统的化学研究。

近年来,海藻化学成分的研究与活性筛选受到了极大的重视,也取得了许多重要的进展。但针对海藻防治早发性痴呆症活性的乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选尚未见报道。本文中的研究结果表明,不同海藻组分对乙酰胆碱酯酶具有不同的抑制活性,通过进一步化学成分研究,尤其是对初筛中表现出较强活性的亮管藻、囊藻、海头红、鸭毛藻和孔石莼等的化学成分进行系统深入研究,很有可能从中发现活性更强的有效成分,从而为海洋生物用于防治早发性痴呆症的药物研究提供有价值的活性先导结构。进一步的活性追踪、化学成分分离与结构鉴定工作仍在进行中。

## 参 考 文 献

- 牛荣丽, 范晓, 韩丽君, 2003. 海藻提取物抗炎活性筛选. 海洋与湖沼, 34(2): 150—154 [Niu R L, Fan X, Han L J, 2003. A screening for the anti-inflammatory effect of algal extracts. Oceanologia et Limnologia Sinica, 34(2): 150—154]
- 刘静, 章海燕, 王黎明等, 1999. 石杉碱乙的抗胆碱酯酶作用. 中国药理学报, 20(2): 141—145 [Liu J, Zhang H Y, Wang L M *et al.*, 1999. Inhibitory effects of hupeizine B on cholinesterase activity in mice. Acta Pharmacologica Sinica, 20(2): 141—145]
- 朱美财, 1992. 乙酰胆碱酯酶的结构与功能研究进展. 生物化学与生物物理进展, 19(5): 338—342, 356 [Zhu M C, 1992. Advances in acetylcholinesterase's structure and function. Progress in Biochemistry & Biophysics, 19(5): 338—342, 356]
- 李前, 朱振霞, 孙曼霁, 2002. 乙酰胆碱酯酶与老年性痴呆关系的研究进展. 中国老年学杂志, 22(4): 325—326 [Li Q, Zhu Z X, Sun M J, 2002. Advances in relations between acetylcholinesterase and presenile dementia. Chinese Journal of Gerontology, 22(4): 325—326]
- 李宪瑾, 范晓, 韩丽君等, 2002. 海藻提取物中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的初步筛选. 中国海洋药物, 21(2): 8—11 [Li X C, Fan X, Han L J *et al.*, 2002. Screening

- for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the macroalgal extracts. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 21(2): 8—11]
- 张均田, 2002. 老年痴呆的发病机制及防治药物. *医药导报*, 21(8): 469—471 [Zhang J T, 2002. Mechanism of senile dementia and its therapeutic drugs. *Herald of Medicine*, 21(8): 469—471]
- 胡海峰, 朱宝泉, 龚炳永, 1999. 乙酰胆碱酯酶及其抑制剂的研究进展. *国外医药: 抗生素分册*, 20(2): 81—87 [Hu H F, Zhu B Q, Gong B Y, 1999. Advances in acetylcholinesterase and its inhibitors. *Foreign Med Pharm-Section Antibiotic*, 20(2): 81—87]
- 徐年军, 范 晓, 韩丽君等, 2001. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选. *海洋与湖沼*, 32(4): 408—413 [Xu N J, Fan X, Han L J *et al*, 2001. Screening marine algae from Shandong coast for antitumor activity. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 32(4): 408—413]
- 徐秀丽, 范 晓, 宋福行, 2004. 中国经济海藻提取物的生物活性. *海洋与湖沼*, 35(1): 55—63 [Xu X L, Fan X, Song F H, 2004. Bioactivity of Chinese marine alga extracts. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 35(1): 55—63]
- 陶纪宁, 2001. 胆碱酯酶抑制剂治疗阿尔茨海默病的研究进展. *药学进展*, 25(4): 202—206 [Tao J N, 2001. Advances in cholinesterase inhibitors on treatment for Alzheimer's Disease. *Dev Pharm*, 25(4): 202—206]
- 彭汶铎, 许实波, 彭 逊, 1996. 柳珊瑚酸对乙酰胆碱酯酶的抑制作用. *中国药理学报*, 17(4): 369—372 [Peng W D, Xu S B, Peng X, 1996. Inhibitory effect of suberogargin on acetylcholinesterase. *Acta Pharmacologica Sinica*, 17(4): 369—372]
- 董悦生, 郑智慧, 张 谦等, 2002. 微生物来源的乙酰胆碱酯酶抑制剂 N98-1021A 的研究. *中国抗生素杂志*, 27(5): 260—263 [Dong Y S, Zheng Z H, Zhang Q *et al*, 2002. N98-1021A, a selective acetylcholinesterase inhibitor derived from microorganisms. *Chinese Journal of Antibiotic*, 27(5): 260—263]
- 谭昌恒, 朱大元, 2003. 石松生物碱研究进展. *中国天然药物*, 1(1): 1—7 [Tan C H, Zhu D Y, 2003. Progress in the research of *Lycopodium* alkaloids. *Chinese Journal of Natrual Medicines*, 1(1): 1—7]
- Blunt J B, Copp B R, Munro M H G *et al*, 2003. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 20(1): 1—48
- Faulkner D J, 2001. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 18(1): 1—49
- Fernando P, Maurizio D, Maria R D G, 1999. The kinetic inhibition of acetylcholinesterase from human erythrocyte by tacrine and some tacrine derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 27(3): 197—205
- Gary M B, Chen C H, 1989. The effects of ethanol on the structural stability of acetylcholine receptor and the activity of various molecular forms of acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 992(3): 333—340
- Klemens H, Karl B, Albert E *et al*, 2001. Synthesis and acetylcholinesterase inhibition of 5-desamino hupazine A derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(19): 2627—2630

## ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY SCREENING FOR FRACTIONS OF SEaweEDS

ZHANG Yi, FENG Yan, LI Xiao-Ming<sup>-</sup>, WANG Bin-Gui<sup>-</sup>

(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

<sup>-</sup>(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** For its important role in the pathologic mechanism of Alzheimer's Disease (AD), acetylcholinesterase (AChE) has become one of the hottest target enzymes in inhibitor screening. In the present study, 44 samples of petroleum ether-, ethyl acetate-soluble fractions derived from the organic solvent extracts of 22 marine seaweeds collected near Qingdao coastline (14, 7 and 1 species belonging to Rhodophyta, Phaeophyta, and Chlorophyta, respectively), were screened and assessed for the inhibitory activities to AChE.

By spectrophotometric analysis, the AChE inhibitor screening model was established through measurement of 3 curves including  $OD-t$ ,  $OD$ -enzyme activity, and  $1/OD-1/[S]$ , and the solvent used in the screening was selected and compared in dissolving capability and by the inhibition ratio to the enzyme. It was found that in 20-minute test, this Michaelis enzymatic reaction remained constant. The enzyme activity can be represented by the  $OD$  value according to their direct proportion in this constant stage. In addition, 50% aqueous ethanol was selected as a unified solvent to dissolve the samples in the activity screening.

The AChE inhibitor screening results indicated that most of the petroleum ether-soluble fractions among the tested samples exhibited various activities in each screening. *Hyalosiphonia caespitosa*, *Colpomenia sinuosa*, *Placomium telfairiae*, *Symphiodadia latiuscula*, and *Ulva pertusa* demonstrated higher activity with the inhibition ratios of 50.5%, 52.5%, 55.5%, 56.6%, and 65.8%, respectively, at the concentration of 50 $\mu$ g/ml. In this concentration, most of the other petroleum ether-soluble samples showed moderate activities with the inhibition ratios between 30.1% and 48.9%, except for *Sargassum thunbergii* and *Chrysiomenia wrightii*, which showed only 14.7% and 24.1% inhibition ratios, respectively. These results suggested that active principals in most samples might be similar to each other. The type of compounds and correspondent inhibition degrees reflected the contents of these ingredients. As to the ethyl acetate-soluble fractions, only a few seaweeds exhibited the AChE inhibition, including *Symphiodadia latiuscula* with inhibition at ratio of 71.8% and the concentration of 25 $\mu$ g/ml and *Ulva pertusa* at 46.7% and 50 $\mu$ g/ml respectively. The other ethyl acetate-soluble fractions did not show inhibitory activity or showed very limited activity and, on the contrary, some samples even enhanced this enzyme. This could be resulted from the compounds in quite different structural types in ethyl acetate-soluble fractions, compared to petroleum ether-soluble fractions.

The result of this study suggests that some seaweeds can be treated as potential sources for the extraction of AChE inhibitory principals, which might be used as dietary supplements beneficial to human healthy. The present findings also provide a clue in leading to future experiments on the identification and characterization of specific compounds producing relatively high AChE inhibitory activities in petroleum-soluble fractions from marine alga such as *H. caespitosa*, *C. inuosa*, *P. telfairiae*, *S. latiuscula*, and *U. pertusa*. These experiments are now under progress.

**Key words** Seaweed fraction, Acetylcholinesterase (AChE), Inhibitor, Activity screening