

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00093

独活活性单体对中型指环虫的杀灭作用及其成分鉴定

汪开毓^{1,2} 姚璐¹ 谢嘉宾¹ 黄锦炉^{1,2} 苗常鸿^{1,2}

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014)

摘要: 利用硅胶柱层析和生物活性跟踪对独活乙醇提取物进行杀中型指环虫活性成分的分离纯化, 并测定活性成分在不同浓度条件下的离体生物活性, 通过薄层色谱(TLC)、紫外光谱(UV)、高效液相色谱(HPLC)、气质联用(GC-MS)对活性成分进行鉴定。结果表明: 从独活分离得到的 F 和 K₁₋₂₋₃ 两种流分均对中型指环虫具有不同程度的杀灭作用, 其中 F 流分 48h 内的完全杀灭中型指环虫的浓度为 1.6 mg/L, 而 K₁₋₂₋₃ 的使用浓度分别为 5 mg/L 时, 其 48h 内对中型指环虫的杀灭率为 74.9%。理化性质测定和光谱分析, F 流分和 K₁₋₂₋₃ 流分分别鉴定为蛇床子素和东莨菪内酯。

关键词: 中型指环虫; 独活; 活性成分; 杀虫活性; 成分鉴定

中图分类号: S963.73 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)01-0093-09

目前, 危害水产养殖的多种病害中, 寄生虫感染鱼类引发疾病的现象极为普遍, 常见的寄生虫种类有指环虫^[1]、车轮虫^[2]和黏孢子虫^[3]等。指环虫作为一种能引起鱼类鳃部感染的常见病原, 其种类较多, 对鱼类的致病力不仅具有较大的种属差异性, 与虫体感染的程度也密切相关^[4]。据报道, 中型指环虫(*Dactylogyrus intermedius*)在亚洲、中欧和北美均有流行, 能引起鱼类鳃炎、黏液分泌亢进以及加速呼吸^[5], 也能和其他种属的寄生虫共同侵染同一宿主鱼以及引起细菌病的继发性感染^[4]。中型指环虫一旦发生感染, 鱼类食欲和生长性能下降, 甚至可发生死亡^[7-9], 我国水产养殖业每年也因中型指环虫感染流行而造成严重的经济损失^[10]。目前, 虽然化学药物对中型指环虫具有一定的杀灭作用, 但化药的使用引起的副作用(如环境污染、虫体耐药性产生、药物毒性等问题)却不容忽视^[11]。因此, 从天然植物中筛选出对中型指环虫具有高效、低毒杀灭活性的有效成分具有重要的生产意义。

独活(*Radix angelicae pubescentis*)又名大活、香独活、肉独活、川独活等, 是伞形科多年生草本植

物重齿毛当归(*Angelica pubescens Maxim.f. biserrata* Shan et Yuan)的干燥根, 其化学成分主要有香豆素类、挥发油、萜类和少量的炔烯类化合物等物质^[12, 13]。目前, 人们从独活中分离到的单体已达 100 余种, 部分单体如香豆素、挥发油等物质对人体的良好药理作用也相继被人们发现^[14, 15]。本实验室通过前期的研究发现, 独活的乙醇提取物对鱼类中型指环虫具有良好的杀灭作用, 为了对其提取物的活性成分做进一步研究, 我们对独活乙醇提取物采用柱层析进行分离、纯化, 并对分离出的主要杀虫成分进行生物活性跟踪观察, 同时通过薄层色谱(TLC)、紫外光谱(UV)、高效液相色谱(HPLC)、气质联用(GC-MS)对独活的主要杀指环虫活性成分进行鉴定, 旨在为实现独活活性成分的仿生合成提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

寄主模型为健康金鱼(*Carassius auratus*), 体重均小于 5 g, 来源于四川省绵竹市名人水族金鱼养殖场; 寄生虫模型为寄生于金鱼鳃部的中型指环虫

收稿日期: 2010-09-25; 修订日期: 2011-08-12

基金项目: 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放研究基金资助课题(Bm2007-11); 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队项目(IRT0848)资助

通讯作者: 汪开毓(1955—), 男, 四川荣经人; 博士, 教授; 主要从事水生动物病理学与药理学研究。Tel: 0835-2885910, E-mail: kywang@sicau.edu.cn

(*Dactylogyrus intermedius*), 通过把感染中型指环虫的金鱼与健康金鱼混养, 使健康金鱼感染中型指环虫, 以达到活体保种的目的。

1.2 供试样品

独活样品: 亳州永刚饮片厂生产(批号: 071102); 粉碎为 50—60 目。

1.3 主要试剂

薄层层析硅胶 GF254(化学纯)批号 070506, 青岛海浪硅胶干燥剂厂制造; 羧甲基纤维素钠(化学纯), 批号 20070444, 成都市科龙化工试剂厂; 柱层层析硅胶(化学纯), 批号 070819, 粒度范围 100—200 目, 青岛海浪硅胶干燥剂厂制造; 柱层层析硅胶(化学纯), 070727, 粒度范围 300—400 目, 青岛海浪硅胶干燥剂厂制造; 无水乙醇(分析纯), 批号 20080313, 成都市科龙化工试剂厂生产; 石油醚(沸程 60—90℃)(分析纯), 批号 20080327, 成都市科龙化工试剂厂生产; 乙酸乙酯(分析纯), 批号 20080212, 成都市科龙化工试剂厂生产; 丙酮(分析纯), 批号 20080324, 成都市科龙化工试剂厂生产。

1.4 独活活性成分的跟踪分离

将独活粉碎物用无水乙醇在 75℃ 热回流提取 3 次, 每次 2h, 合并提取液, 减压浓缩得乙醇浸膏, 作为进一步分离的对象。取乙醇浸膏 120 g, 用无水乙醇溶解后加入 120 g 硅胶(100—200 目)拌匀, 置恒温水浴锅(温度 60℃)上蒸干, 研磨均匀。上样所采用的玻璃层析柱柱径 100 mm, 柱长 1200 mm, 柱层层析硅胶 2300 g (100—200 目), 石油醚湿法装柱, 干法上样。经薄层层析(TLC)确定洗脱系统进行梯度洗脱。洗脱时, 每 300 mL 收集一个流分。采用 TLC 检查, 合并相似流分, 对收集合并的各组分进行药效试验。

1.5 独活活性成分杀灭指环虫活性的测定

使用容积为 8 L 的搪瓷盆, 盛入充分曝气地下水 5 L, 控制水温(25±1)℃, pH 7.0—7.5。试验开始时, 首先对感染了中型指环虫的金鱼材料随即抽检 10 尾, 若金鱼感染率为 100%, 且感染金鱼鳃部中型指环虫的数量为 25 个以上时, 感染金鱼即可用于试验。根据独活分离物或单体成分的分离流分数量, 设置与其对应的试验组, 每组设置三个重复, 每个重复用到的感染金鱼 30 尾。然后结合预设定的独活分离物或活性单体的浓度分别向各组加入对应的独活分离物或单体成分, 搅拌均匀。试验第 48 小时

取金鱼全鳃制片、显微镜检查, 观察各种成分在不同浓度下对中型指环虫的杀灭效果, 最后统计最佳有效浓度、最高杀虫率、鱼中毒浓度以及中毒浓度时的鱼死亡率。对照组的设置和用金鱼数量与试验组相同, 所用试验鱼为健康金鱼。

结果判定: 若杀虫率在 20 % 以下的药物浓度视为无效浓度; 若达到最高杀虫率且鱼不中毒时的药物浓度则视为最佳杀虫浓度; 若供试金鱼出现中毒症状(浮头、侧游无力以及死亡)的浓度则视为药物对鱼的中毒浓度。在设定的杀灭指环虫时间里, 若指环虫没有从金鱼鳃部脱落, 观察虫体是否死亡, 以虫体头腺周围口器在 1—2min 不发生收缩者视为死亡; 若金鱼鳃部无指环虫或指环虫已死亡则均确定杀虫率为 100%; 若部分虫体从鳃部脱落, 则统计每尾金鱼鳃部存活的指环虫数量, 计算平均值, 并与对照组进行对比, 计算杀虫率, 并以此来评价活性成分对中型指环虫的杀灭效果。

1.6 杀虫活性单体的结构鉴定

采用熔点仪对独活活性单体进行熔点测定, 并参考相关文献报道的紫外分光光度法^[16]、高效液相色谱分析法^[17]和气质联用分析法^[18]等波谱对独活活性单体进行鉴定。

2 结果

2.1 乙醇提取物的柱层析分离及活性跟踪测定结果

将乙醇提取物进行硅胶柱层析分离, 通过 TLC 法合并收集的流分得到 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P16 个流分组。对各个流分组进行杀虫药效测定, 其中对照组寄生虫平均存活数量为 36.0 个/尾。如表 1 所示, 作用 48h 时, 在鱼不发生死亡情况下, 只有 F 流分组能 100% 杀灭寄生在鱼鳃上的指环虫, 其 100% 杀虫的最低浓度为 2.0 mg/L; K 流分组对中型指环虫也有一定的杀灭效果, 当浓度为 15.0 mg/L 时, 其杀虫率达到 79.7%, 其他流分组在鱼中毒死亡浓度或 20.0 mg/L 时, 仍对中型指环虫没有杀灭效果。F 流分经 TLC 检测为单点, 可认定是一种结晶物质, 因此需要做进一步的鉴定, 而 K 流分组则需进行进一步的分离。

K 流分组的柱层析分离及活性跟踪测定结果对 K 流分组进行硅胶柱层析分离, 通过 TLC 法合并各流分得到 11 个流分组(K₁、K₂、K₃、K₄、K₅、K₆、K₇、K₈、K₉、K₁₀、K₁₁)。对各流分组进行杀虫药效

表 1 48h 时独活乙醇提取物分离流分对中型指环虫的杀灭效果
Tab.1 The parasitocidal effect of the fraction of ethanol extract from *Radix angelicae pubescentis* against *D. intermedius*

供试样品 Samples	浓度 Concentration (mg/L)	试验组寄生虫存活数量(个/尾) Survivor number of parasites	杀虫率 Parasitocidal rate (%)	鱼死亡率 Mortality of fish (%)
A	30.0	26.3	26.9	0
	25.0	28.6	20.5	0
	20.0	31.0	13.8	0
	15.0	32.5	9.7	0
	15.0	19.4	46.1	50.0
B	10.0	22.1	38.6	36.6
	5.0	27.6	23.3	0
	25.0	—	—	100
C	20.0	20.0	44.4	63.3
	15.0	24.2	32.7	30.0
	10.0	26.7	25.8	0
	10.0	19.3	46.3	53.3
D	5.0	25.0	30.5	36.6
	4.0	29.8	17.2	0
	25.0	21.9	39.1	30.0
E	20.0	27.1	24.7	0
	10.0	31.5	12.5	0
	3.0	0	100	46.6
F	2.0	0	100	0
	1.0	11.3	68.6	0
G	20.0	25.4	29.4	20.0
	10.0	29.0	19.4	0
H	20.0	31.1	13.6	0
	10.0	34.3	4.7	0
I	20.0	29.4	18.3	0
	10.0	31.7	11.9	0
J	20.0	23.0	36.1	0
	10.0	28.2	21.6	0
K	20.0	5.4	85.0	33.3
	15.0	7.3	79.7	0
	10.0	12.7	64.7	0
L	20.0	29.3	18.6	0
	10.0	32.5	9.7	0
M	20.0	25.0	30.5	0
	10.0	28.5	20.8	0
N	20.0	22.3	38.0	0
	10.0	27.9	22.5	0
O	20.0	26.2	27.2	0
	10.0	31.0	13.8	0
P	20.0	21.3	40.8	0
	10.0	25.8	28.3	0

测定，其中对照组寄生虫平均存活数量为 25.4 个/尾。如表 2 所示，作用 48h 时，K₁ 流分组对中型指环

虫的杀灭作用最强，当浓度为 15 mg/L 时，对中型指环虫的杀灭率为 87.0%，其他流分组在鱼中毒死

表 2 48h 时独活 K 流分组分离物对中型指环虫的杀灭效果
Tab. 2 The parasitocidal effect of fraction K from *Radix angelicae pubescentis* against *D. intermedius* in 48h

供试样品 Samples	浓度 Concentration (mg/L)	试验组寄生虫存活数量 (个/尾) Survivor number of parasites	杀虫率 Parasitocidal rate (%)	鱼死亡率 Mortality of fish (%)
K ₁	20.0	2.7	89.3	30.0
	15.0	3.3	87.0	0
	10.0	5.4	78.7	0
K ₂	20.0	20.0	21.2	23.3
	10.0	22.1	12.9	0
K ₃	20.0	15.3	39.7	0
	10.0	19.6	22.8	0
K ₄	20.0	17.8	29.9	0
	10.0	21.5	15.3	0
K ₅	20.0	17.4	31.4	0
	10.0	20.3	20.0	0
K ₆	20.0	18.0	29.1	10.0
	10.0	21.6	14.9	0
K ₇	20.0	14.2	44.0	0
	10.0	19.1	24.8	0
K ₈	20.0	16.0	37.0	0
	10.0	19.7	22.4	0
K ₉	20.0	18.2	28.3	0
	10.0	22.5	11.4	0
K ₁₀	20.0	14.5	42.9	0
	10.0	18.2	28.3	0
K ₁₁	20.0	15.9	37.4	0
	10.0	20.2	20.4	0

亡浓度或 20.0 mg/L 时, 仍对中型指环虫没有杀灭效果。K₁ 流分经 TLC 检测非单点, 因此需要进行进一步分离。

K₁ 流分组的柱层析分离及活性跟踪测定结果对 K₁ 流分组进行硅胶柱层析分离, 通过 TLC 法合并各流分得到 6 个流分组(K₁₋₁、K₁₋₂、K₁₋₃、K₁₋₄、K₁₋₅、K₁₋₆)。对各流分组进行杀虫药效测定, 其中对照组寄生虫平均存活数量为 29.7 个/尾。如表 3 所示, 作用 48h 时, K₁₋₁ 和 K₁₋₂ 流分组对中型指环虫都具有杀灭作用, K₁₋₁ 浓度为 20 mg/L 时, 对中型指环虫的杀灭率为 52.1%; K₁₋₂ 浓度为 10 mg/L 时, 对中型指环虫的杀灭率为 82.4%, 其他流分组在鱼中毒死亡浓度或 20.0 mg/L 时, 仍对中型指环虫没有杀灭效果。而 K₁₋₁ 为油性成分, 对中型指环虫的杀灭效果不理想。K₁₋₂ 流分经 TLC 检测非单点, 因此需要进行进一步分离。

K₁₋₂ 流分组的柱层析分离及活性跟踪测定结果对 K₁₋₂ 流分组进行硅胶柱层析分离, 通过 TLC 法合

并各流分得到 4 个流分组(K₁₋₂₋₁、K₁₋₂₋₂、K₁₋₂₋₃、K₁₋₂₋₄)。对各流分组进行杀虫药效测定, 其中对照组寄生虫平均存活数量为 31.8 个/尾。如表 4 所示, 作用 48h 时 K₁₋₂₋₃ 流分组各浓度对中型指环虫都具有杀灭作用, 浓度为 5 mg/L 时, 对中型指环虫的杀灭率为 72.9%, 而且有试验金鱼发生死亡, 其他浓度或者造成试验金鱼个别死亡, 或者对中型指环虫的杀灭率较低。K₁₋₂₋₃ 经 TLC 检测为单点, 已经是结晶体, 因此可做进一步的结构鉴定。

2.2 活性单体杀虫活性测定

F 流分的杀虫活性测定 由表 5 可知, 当 F 流分的浓度从 1.6 mg/L 开始, 对中型指环虫的杀灭率达 100%; 而当浓度达到 6.4 mg/L 时, 开始对鱼表现出一定的毒性, 此时鱼的死亡率为 23%。F 流分对中型指环虫具有较好的杀灭活性, 有效浓度是从 1.6—6.2 mg/L。对照组寄生虫平均存活数量为 33.3 个/尾。

K₁₋₂₋₃ 流分的杀虫活性测定 由表 6 可知,

表 3 48h 时独活 K₁ 流分组分离物对中型指环虫的杀灭效果
Tab. 3 The parasitocidal effect of fraction from *Radix angelicae pubescentis* K₁ against *D. intermedius* in 48h

供试样品 Samples	浓度 Concentration (mg/L)	试验组寄生虫存活数量(个/尾) Survivor number of parasites	杀虫率 Parasitocidal rate (%)	鱼死亡率 Mortality of fish (%)
K ₁₋₁	20.0	14.2	52.1	0
	10.0	17.5	41.0	0
	20.0	—	—	100
K ₁₋₂	15.0	3.7	87.5	36.6
	10.0	5.2	82.4	0
	5.0	8.5	71.3	0
K ₁₋₃	20.0	22.3	24.9	30.0
	10.0	24.9	16.1	0
K ₁₋₄	20.0	17.1	42.4	0
	10.0	20.0	32.6	0
K ₁₋₅	20.0	15.4	48.1	0
	10.0	18.1	39.0	0
K ₁₋₆	20.0	19.8	33.3	0
	10.0	23.6	20.5	0

表 4 48h 时独活 K₁₋₂ 流分组分离物对中型指环虫的杀灭效果
Tab. 4 The parasitocidal effect of fraction from *Radix angelicae pubescentis* K₁₋₂ against *D. intermedius* in 48h

供试样品 Samples	浓度 Concentration (mg/L)	试验组寄生虫存活数量(个/尾) Survivor number of parasites	杀虫率 Parasitocidal rate (%)	鱼死亡率 Mortality of fish (%)
K ₁₋₂₋₁	20.0	19.0	40.2	33.3
	10.0	22.7	28.6	0
K ₁₋₂₋₁	20.0	14.2	55.3	0
	10.0	18.6	41.5	0
	20.0	—	—	100
K ₁₋₂₋₃	15.0	3.4	89.3	63.3
	10.0	5.5	82.7	30.0
	5.0	8.6	72.9	0
K ₁₋₂₋₄	20.0	22.1	30.5	0
	10.0	25.3	20.4	0

表 5 48h 时独活 F 对中型指环虫的杀灭活性
Tab. 5 The parasitocidal effect of fraction from *Radix angelicae pubescentis* F against *D. intermedius* in 48h

浓度 Concentration (mg/L)	试验组寄生虫存活数量(个/尾) Survivor number of parasites	杀虫率 Parasitocidal rate (%)	鱼死亡率 Mortality of fish (%)
1.2	6.0	81.9	0
1.4	4.3	87.0	0
1.6	0	100	0
1.8	0	100	0
2.0	0	100	0
2.2	0	100	0
2.4	0	100	0
2.6	0	100	0
2.8	0	100	0
3.0	0	100	0
3.2	0	100	0
3.4	0	100	0
3.6	0	100	0
3.8	0	100	0
4.0	0	100	0
6.0	0	100	0
6.2	0	100	0
6.4	0	100	23.3

表 6 48h 独活 K_{1-2-3} 对中型指环虫的杀灭活性
Tab. 6 The parasitocidal effect of fraction from *Radix angelicae pubescentis* K_{1-2-3} against *D. intermedius* in 48h

浓度 Concentration (mg/L)	试验组寄生虫存活数量(个/尾) Survivor number of parasites	杀虫率 Parasitocidal rate (%)	鱼死亡率 Mortality of fish (%)
4.0	9.4	67.2	0
5.0	7.2	74.9	0
6.0	6.0	79.0	26.6
7.0	5.1	82.2	60.0
8.0	3.9	86.4	86.6
9.0	—	—	100

当 K_{1-2-3} 的浓度为 5 mg/L 时, 对中型指环虫的杀灭率达 74.9%; 而当浓度为 6 mg/L 时, 开始对鱼表现出一定的毒性, 此时鱼的死亡率为 26.6%。这说明 K_{1-2-3} 对中型指环虫也具有较好的杀灭活性, 但与 F 相比, K_{1-2-3} 对中型指环虫的杀灭活性明显要低, 对鱼的安全浓度范围也要窄一些。对照组寄生虫平均存活数量为 28.7 个/尾。

2.3 活性单体鉴定

F 单体的成分鉴定 F 单体在乙醇中为白色细针状晶体, 在乙酸乙酯、氯仿、丙酮等有机溶剂中易溶, 在甲醇、乙醇等醇类溶剂中溶解度低, 但是在它们的热溶剂中溶解度较高, 在水中难溶。TLC 检测在石油醚、石油醚-乙酸乙酯、石油醚-乙酸乙酯-氯仿、石油醚-氯仿、氯仿、氯仿-丙酮、氯仿-甲醇、甲醇等展开系统下为单点。在紫外线 (365 nm) 照射下, 显蓝紫色光。熔点为 83—84℃。根据 F 单体与蛇床子素标准品的气相色谱-质谱联用仪的波普比对结果(图 1、2), 可将 F 单体鉴定为蛇床子素(Osthole)。

K_{1-2-3} 的成分鉴定 K_{1-2-3} 活性单体在氯仿中呈淡黄色针状结晶, 易溶于氯仿, 微溶于水或冷乙醇, 溶于热乙醇或热冰醋酸, 几乎不溶于苯。TLC 检测在石油醚、石油醚-乙酸乙酯、石油醚-乙酸乙酯-氯仿、石油醚-氯仿、氯仿、氯仿-丙酮、氯仿-甲醇、甲醇等展开系统下为单点。HPLC 检测为单峰(图 3), 色谱柱为 SpheriSorb_C18 柱, 以甲醇-水-冰醋酸(32:68:0.16)为流动相, 检测波长为 298 nm 熔点为 203—204℃。

根据上述物理数据和 K_{1-2-3} 、标准品液相图谱对比(图 4), 可将 K_{1-2-3} 鉴定为东莨菪内酯(Scopletin), 分子式为 $C_{10}H_8O_4$ 。

3 讨论

独活乙醇提取物柱层析各流分杀虫活性结果表明, 其所得到的 16 个流分中, F 流分和 K 流分具有较强的杀虫活性。流分 F 最低使用浓度为 1.6 mg/L 时, 对中型指环虫的杀灭率就高达 100%, K 流分浓度为 15.0 mg/L 时, 其杀虫率达到 79.7%, 且 F 流分

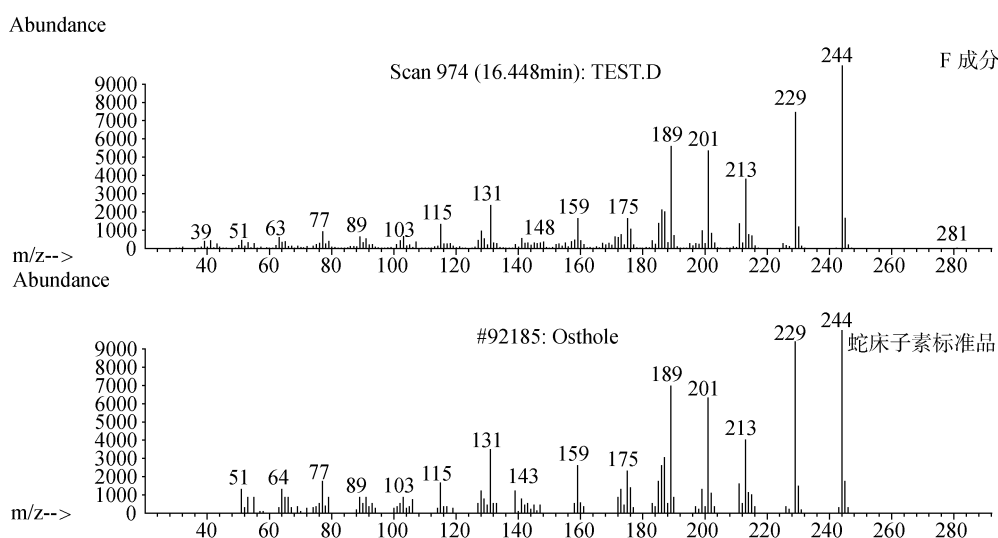


图 1 F 成分和蛇床子素标准品质谱图

Fig. 1 The mass spectrum of fraction F and the reference substance

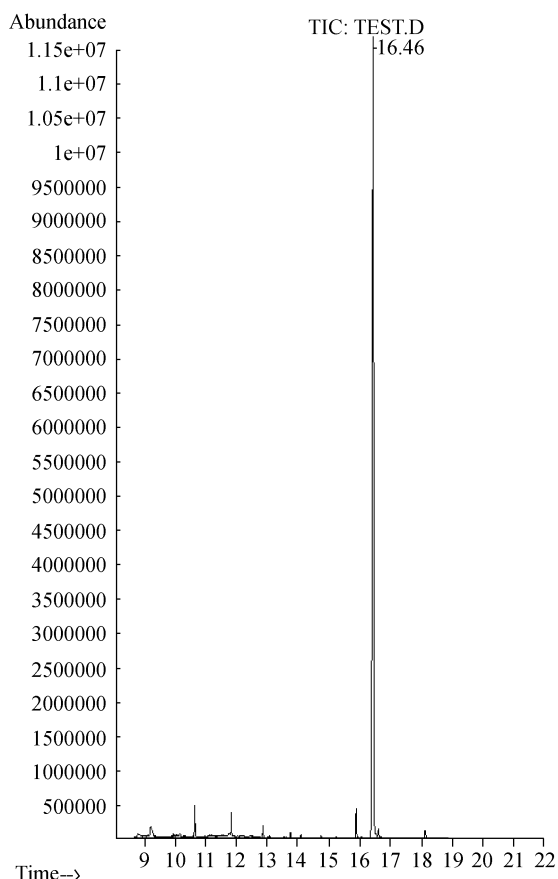
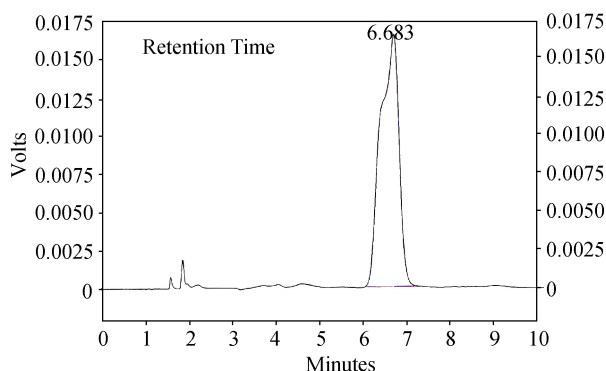


图2 F成分气相色谱图

Fig. 2 The gas chromatogram of fraction F

图3 K₁₋₂₋₃的HPLC图谱Fig. 3 HPLC spectrum of K₁₋₂₋₃

通过柱层析直接得到了单体物质。以上结果表明独活乙醇提取物中 F 流分含量较高和杀虫效果最好, 是独活的主要杀虫活性物质。

为了进一步研究独活杀虫的活性物质, 将前期研究具有较好杀虫活性的 K 流分进行柱层析分析, 得到 11 个流分, 其中 K₁ 流分组对中型指环虫的杀灭作用最强, 当浓度为 15 mg/L 时, 对中型指环虫的杀灭率为 87.0%, 其他流分组在鱼中毒死亡浓度

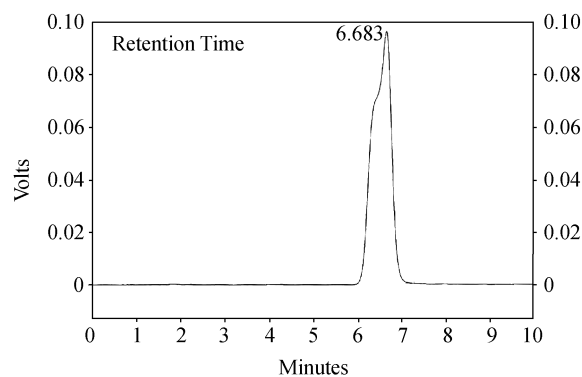


图4 东莨菪内酯标准品的HPLC图谱

Fig. 4 HPLC spectrum of Scopletin standard

或 20.0 mg/L 时, 仍对中型指环虫没有杀灭效果。因为在天然植物中, 有些活性成分是含量低而活性高, 所以对 K₁ 流分杀灭鱼类指环虫的活性成分做进一步分离是十分必要, 也是获得活性更高的单体物质的重要途径。对 K₁ 流分进一步分离结果表明, 获得的 6 个流分中, K₁₋₁ 和 K₁₋₂ 流分组在 48h 试验期间对中型指环虫都具有杀灭作用, 当这两者的使用浓度分别为 20 mg/L 和 10 mg/L 时, 对中型指环虫的杀灭率依次为 52.1% 和 82.4%, 其他流分组在鱼中毒死亡浓度或 20.0 mg/L 时, 仍对中型指环虫没有杀灭效果。基于与上述相同的原则, 对 K₁₋₂ 流分的分离中又获得了一种杀虫活性强且又是单体的物质 K₁₋₂₋₃, 当其使用浓度为 5 mg/L 时, 对中型指环虫的杀灭率达 74.9%。由此可以看出, 独活的杀虫活性一方面与活性成分的浓度有关系, 另一方面也与作用时间有关系, 故独活各流分的杀虫活性呈时间-浓度依赖型。且随着物质纯度的提高, 其杀虫活性也不断程度的提高, 表明采用本研究方法进行独活杀虫活性物质的分离纯化具有可行性。

本研究通过对独活乙醇提取物的杀指环虫活性物质的追踪分离, 从中分离得到两种具有较强杀虫活性的物质, 分别为 F 流分、K₁₋₂₋₃ 流分。为了确定这些活性物质, 本研究采用波谱分析方法对其进行鉴定, 确定 F 流分为蛇床子素(Osthole), K₁₋₂₋₃ 流分为东莨菪内酯(Scopletin)。蛇床子素和东莨菪内酯等都属于香豆素类化合物, 而香豆素类则是独活中的主要化学成分, 至今从独活中分离出的香豆素已达 70 余种^[19, 20]。在中医方面, 蛇床子素主要是应用于皮肤发炎、皮肤过敏等症状的治疗; 在农业应用方面, 蛇床子素对菜青虫和玉米象等储粮害虫的具有触杀作用, 对动物具有调节中枢神经系统、抗氧化、

抗血栓、局部麻醉等作用,对农作物病原菌如小麦纹枯病菌、黄瓜炭疽病菌、杨树溃疡病菌、番茄灰霉病菌等也具有较强的杀灭和抑制作用^[24-26]。根据实验结果,我们首次发现独活的蛇床子素对鱼类中型指环虫具有良好的杀灭效果,且具有杀虫浓度低、杀虫效果好和对实验鱼毒性低等优点。有报道称,东莨菪内酯具有镇痛和抗炎作用,可从丁公藤和华山参等多种药用植物中被分离到^[27, 28],但至今仍尚无关于东莨菪内酯在鱼类寄生虫病害防治应用方面的研究报道。在本试验中,通过对东莨菪内酯的杀指环虫活性的跟踪试验,我们首次发现它在杀灭鱼类中型指环虫方面也具有较好的效果,且在安全浓度下其对中型指环虫的最高杀灭率达 75%,这是该物质在药理活性发现的新补充。根据东莨菪内酯的理化特性可知,它在自然中容易被降解,对环境和动物危害较低,因此我们认为东莨菪内酯在鱼类中型指环虫防治领域具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Woo P T K. Fish Diseases and Disorders: Protozoan and Metazoan Infections [M]. 2nd edn. London: CAB International. 2006, 791
- [2] Tang F H, Zhao Y J. Taxonomic study on trichodinids parasitic on gills of freshwater fish, *Carassius auratus* from Chongqing, China, with the description of *Trichodina brevica* sp. Nov. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 1004—1011 [唐发辉, 赵元著. 重庆地区鲫外寄生车轮虫形态分类学研究及一新种的描述. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 1004—1011]
- [3] Zhao Y J, Song W B. Myxozoan parasites of leptotheca thelohan, 1895 (Myxosporea, bivalvulida) from marine fishes of Qingdao coastal waters off the yellow sea in China, with the description of a new species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(1): 68—73 [赵元著, 宋微波. 青岛近岸海洋鱼类 4 种寄生薄壳虫属黏孢虫包括 1 新种的研究 (黏体门, 双壳目). 水生生物学报, 2009, **33**(1): 68—73]
- [4] Alvarez-pellitero P. Report about Fish Parasitic Diseases [M]. Spain: CIHEAM-IAMZ, Zaragoza. 2004, 123
- [5] Reed P A, Francis-Floyd R, Klinger R C. FA28/FA033: Monogenean Parasites of Fish [M]. EDIS-Electronic Data Information Source-UF/IFAS Extension. University of Florida. 2009, 36—48
- [6] Woo P T K, Bruno D W, Lim L H S. Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture [M]. Malaysia: CABI. 2002, 203—217
- [7] Topic' P N, Hacmanjek M, Teskeredz'ic' E. Health status of rudd (*Scardinius erythrophthalmus hesperidicus* H.) in Lake Vrana on the Island of Cres, Croatia [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2001, **17**(1): 43—45
- [8] Kritsky D C, Heckmann R. Species of *Dactylogyrus* (Monogenea: Dactylogyridae) and *Trichodina mutabilis* (Ciliata) infesting koi carp, *Cyprinus carpio*, during mass mortality at a commercial rearing facility in Utah, U.S.A [J]. *Comparative Parasitology*, 2002, **69**(2): 217—218
- [9] Bagge A M, Poulin R, Valtonen E T. Fish population size, and not density, as the determining factor of parasite infection: a case study [J]. *Parasitol*, 2004, **128**(3): 305—313
- [10] Wang G X, Ma Q L, Cheng C, et al. Study on active site of 8 plants to control the *Dactylogyrus* of fish [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2008, **36**(3): 64—68, 74 [王高学, 马秋丽, 程超, 等. 八种植物杀灭鱼类指环虫的活性部位研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, **36**(3): 64—68, 74]
- [11] Marshall C J. Use of Supaverm® for the treatment of monogenean infestation in koi carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Fish Veterinary Journal*, 1999, (4): 33—37
- [12] Huang L L, Xiong S P, Zhou Z, et al. Comparative study on chemical components of the volatile oil from the root of angelica pubescens in different habitats [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2002, **20**(1): 78—80 [黄蕾蕾, 熊世平, 周治, 等. 不同产地独活挥发油化学成分的比较研究. 武汉植物学研究, 2002, **20**(1): 78—80]
- [13] Liu J, Zschocke S, Bauer R. A polycetylenic acetate and coumarin from angelica pubescens f. biserrate [J]. *Phytochemistry*, 1998, **49**(1): 211—213
- [14] Wang A W, Liu Y, Luo Q, et al. Study on pharmacodynamics of analgesia and anti-inflammation of du huo-jisheng tang [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2008, **14**(12): 61—64 [王爱武, 刘娅, 雒琪, 等. 独活寄生汤抗炎、镇痛作用的药效学研究. 中国实验方剂学杂志, 2008, **14**(12): 61—64]
- [15] Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, et al. Studies on bioactive substances include drug used for arthritic disease in traditional Chinese medicine. Isolation and identification of an anti-inflammatory and analgesic principle from the root of angelica pubescens maxim [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1985, **33**(12): 5351
- [16] Rukke E O, Olsen E F, Devold T, et al. Technical note: Comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy [J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, **93**(7): 2922—2925
- [17] Abang M M, Abraham W, Asiedu R, et al. Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) [J]. *Mycological Research*, 2009, **113**(1): 130—140
- [18] Christakoudi S, Cowan D A, Taylor N F. Steroids excreted in urine by neonates with 21-hydroxylase deficiency: Char-

- acterization, using GC-MS and GC-MS/MS, of the D-ring and side chain structure of pregnanes and pregnenes [J]. *Steroids*, 2010, **75**(1): 34—52
- [19] Dong S Y, Li H, Li J. Progress in the synthesis of coumarin derivatives [J]. *Chemistry World*, 2009, (8): 494—497 [董社英, 李辉, 李靖. 香豆素衍生物合成研究进展. 化学世界, 2009, (8): 494—497]
- [20] Wang H, Lu X M, Yao H, *et al.* Research progress on application of coumarin and its derivatives [J]. *Chemical Industry Times*, 2009, **23**(8): 40—43 [王华, 鲁小梅, 姚虎, 等. 香豆素及其衍生物的应用研究进展. 化工时刊, 2009, **23**(8): 40—43]
- [21] Zhang Y S, Hua R M, Yue Y D, *et al.* Studies on antifeedant activity of cnidium monnieri against the larvae of *Pieris rapae* L. [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2002, **29**(4): 333—335 [章焰生, 花日茂, 岳永德, 等. 蛇床子对菜青虫的拒食活性研究. 安徽农业大学学报, 2002, **29**(4): 333—335]
- [22] Xia C X, Li S Q, Cai W L, *et al.* Bioactivity of osthole powder against 5 species of stored-grain insect [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2009, **24**(9): 108—111 [夏长秀, 李绍勤, 蔡万伦, 等. 蛇床子素粉剂对 5 种储粮害虫生物活性研究. 中国粮油学报, 2009, **24**(9): 108—111]
- [23] Chen R, Xie M L, Zhou J. Experimental study of osthole on inhibition of thrombosis and platelet aggregation [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2005, **21**(4): 440—443 [陈蓉, 谢梅林, 周佳. 蛇床子素抑制血栓形成和血小板聚集的实验研究. 中国药理学通报, 2005, **21**(4): 440—443]
- [24] Wang X H. Study on minimal inhibitory concentrations of some medicinal plants for pathogenic bacteria in plants [J]. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 2005, **28**(2): 322—324 [王兴华. 多种药用植物抑菌效果研究. 山西大学学报(自然科学版), 2005, **28**(2): 322—324]
- [25] Yin C P, Zhang Y L, Deng X L, *et al.* Study on bioactivity of *Cnidium monnieri* etc. Chinese herb extracts to several kinds of fungi [J]. *Journal of Jinggangshan University (Natural Science)*, 2005, **6**(8): 33—34 [尹彩萍, 张应焰, 邓贤兰, 等. 蛇床子等中药提取物对几种病菌生物活性的初步研究. 井冈山学院学报(综合版), 2005, **6**(8): 33—34]
- [26] Huang C H, Yang T W, Xiao F P, *et al.* Determination of inhibition of cnidiadin against pathogens [J]. *Journal of Huanzhong Agricultural University*, 2005, **24**(3): 258—260 [黄昌华, 杨天武, 肖凤平, 等. 蛇床子素对植物病原菌抑制效果的测定. 华中农业大学学报, 2005, **24**(3): 258—260]
- [27] Cao H, Wang M J. Determination of scopoletin in *Ding-gongteng* injection by HPLC [J]. *Pharmaceutical and Clinical Research*, 2007, **15**(2): 139—140 [曹海, 王梅娟. HPLC 法测定丁公藤注射液中东莨菪内酯含量. 药学与临床研究, 2007, **15**(2): 139—140]
- [28] Wang Y, Qing W X, Li S W, *et al.* Determination of scopoletin in *Physoclaina infundibularis* Kuang by TLCS [J]. *Central South Pharmacy*, 2005, **3**(5): 274—276 [王勇, 庆伟霞, 李松武, 等. 薄层扫描法测定华山参中总东莨菪内酯的含量. 中南药学, 2005, **3**(5): 274—276]

EFFECT OF THE ACTIVE MONOMER FROM *RADIX ANGELICAE PUBESCENTIS* ON KILLING *DACTYLOGYRUS INTERMEDIUS* AND ITS ACTIVE COMPONENT IDENTIFICATION

WANG Kai-Yu^{1, 2}, YAO Lu¹, XIE Jia-Bing¹, HUANG Jin-Lu^{1, 2} and MIAO Chang-Hong^{1, 2}

(1. Fisheries Department of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Activated components of parasiticide *Dactylogyrus intermedius* extracted from *Radix angelicae pubescentis* were isolated and purified by column chromatography and biological tracking in this study. The activity *in vitro* of activated components at different concentrations were determined. Then their chemical structures were identified by TLC, UV, HPLC and GC-MS. Observations implied that the killing effect of the components on *D. intermedius* at different concentrations were fraction F and K₁₋₂₋₃. Fraction F could reach to 100% parasiticide rate when the concentration was 1.6 mg/L. As for K₁₋₂₋₃, concentrations of 5 mg/L could reach to the parasiticide rate of 74.9%. According to physico-chemical property examination and spectroanalysis, fraction F and K₁₋₂₋₃ were identified as the osthole and scopoletine.

Key words: *Dactylogyrus intermedius*; *Radix angelicae pubescentis*; Active components; Parasiticide activity; Component identification