

肉桂活性成分肉桂醛杀灭离体多子小瓜虫效果

梁靖涵, 张其中*, 付耀武, 王 彬

(暨南大学水生生物研究所, 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室/
热带亚热带水生态工程教育部工程研究中心, 广东 广州 510632)

摘要: 研究从肉桂中分离纯化出具有抑杀多子小瓜虫活性的化合物。以乙醇为提取剂, 用索氏超声提取法从肉桂中提取浸膏, 再用石油醚、乙酸乙酯、甲醇为萃取剂, 萃取不同有效组分, 以不同浓度分别进行杀灭离体多子小瓜虫实验, 发现石油醚萃取物的杀虫效果最优。然后对石油醚萃取物采用硅胶层析柱和制备型高效液相色谱进行分离纯化, 利用质谱和核磁共振分析, 最终鉴定其杀虫活性成分为肉桂醛; 将肉桂醛溶于二甲基亚砷并用二倍梯度稀释法配成不同浓度的药液测试其对离体小瓜虫的杀灭活性。结果表明, 100% 杀灭滋养体和感染性幼虫的剂量分别为 50 和 8 mg/L, 半数有效浓度分别为 13.9 和 1.8 mg/L; 使用剂量在 50 mg/L 可完全抑制小瓜虫包囊孵化。

关键词: 肉桂醛; 分离; 鉴定; 杀虫活性; 多子小瓜虫

中图分类号: Q 946.82; S 942

文献标志码: A

多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 属纤毛虫纲 (Oligohymenophorea)、凹口科 (Ophryoglenidae)、小瓜虫属 (*Ichthyophthirius*), 是淡水寄生纤毛原生动物, 其生活史分 3 个阶段: 滋养体 (寄生阶段)、包囊 (离体繁殖阶段) 和感染性幼虫 (感染阶段)^[1-2]。该虫主要寄生在鱼鳃和皮肤上, 致使鱼体分泌大量粘液, 造成鱼呼吸困难, 同时, 寄生处上皮细胞增生, 出现许多小白点, 因此, 小瓜虫病又称“白点病”^[3]。该病主要危害鱼苗和鱼种, 严重时可引起病鱼大批死亡, 造成严重经济损失。过去常用的能有效防治多子小瓜虫病的药物有汞制剂和孔雀石绿^[4-6]等, 但是, 由于这些化学药品的高毒和致癌致畸性, 在国际上已被明令禁用, 我国政府也禁用了这些化学制剂。而目前预防多子小瓜虫病的疫苗还处在研发阶段^[7]。所以, 安全高效的新型杀小瓜虫渔药的研制迫在眉睫。

在我国, 中草药治疗人畜疾病的历史悠久, 与化学合成药物相比, 具有毒副作用小, 安全性高, 残留少等诸多优点。目前已经发现一些中草药植物粗提

物具有抑杀多子小瓜虫的作用, 如辣椒 (*Capsicum frutescens*)^[8]、青蒿 (*Artemisiae annuae*)^[9]、大蒜 (*Allium sativum*)^[4]、木瓜 (*Carica papaya*) 和刺毛黧豆 (*Mucuna pruriens*)^[10] 等的粗提物能杀灭离体多子小瓜虫, 甚至已经从五倍子 (*Galla chinensis*)^[11]、博落回 (*Macleaya cordata*)^[12] 和小果博落回 (*Macleaya microcarpa*)^[13] 中分离纯化出杀虫活性化合物。这就为防治多子小瓜虫病, 开发新型安全环保杀虫剂提供了新思路和新途径。

肉桂 (*Cinnamomum cassia* Presl) 是我国卫生部公布的药食兼用植物材料, 在临床上具有镇痛解痉、解热、抗菌、抗肿瘤、抗溃疡等作用^[14-15]。已有研究表明, 肉桂提取物对真菌与尘螨具有杀灭作用^[16], 但是其能否杀灭多子小瓜虫还未见报道。本实验以肉桂为材料分离纯化其杀小瓜虫活性化合物, 并对其抑杀效果进行研究。

1 材料与方法

1.1 肉桂

肉桂购于广州市清平中药材市场, 产地广西。

收稿日期: 2013-09-05 修回日期: 2013-12-12

资助项目: 国家高新技术研究发展计划“八六三”(2011AA10A216); 广州市科技计划项目(2013J4100047); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201301B05)

通信作者: 张其中, E-mail: zhangqzdr@126.com

1.2 仪器与材料

Agilent 1100 分析型高效液相色谱仪;Agilent 1100 制备型高效液相色谱仪;Applied Biosystems 4000 QTRAP 串联四极杆-线性离子阱质谱仪;Varian-500MHz-FT-NMR 型核磁共振仪;D24 UV Millipore 超纯水机。实验用制备色谱柱为 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(21.2 mm × 250 mm, 5 μm);柱层析用硅胶(100 ~ 200 目、200 ~ 300 目)购于青岛海洋化工厂。实验中所用乙醇(分析纯)、石油醚(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯)、异丁醇(分析纯)、甲醇(分析纯、色谱纯)购于禹王化工试剂厂;色谱级乙腈为 Oceanpak 公司产品;甲醇-d₄ 为 Sigma-Aldrich 公司产品。

1.3 植物杀虫活性化合物分离、鉴定

肉桂 500 g 烘干粉碎,每次用 95% 乙醇 1.5 L 在 78 °C 水中超声提取 1 h,重复 3 次,抽滤分离提取液,合并滤液,滤液在旋转蒸发仪中减压浓缩干燥。将酒精提取物和水(W:V=1:1)悬溶,然后依次用石油醚、乙酸乙酯和甲醇萃取。将萃取物减压浓缩干燥,用二甲基亚砜促溶配成药液,对各萃取物做离体杀灭小瓜虫实验,确定石油醚萃取物杀虫效果最好。然后将石油醚萃取物经过硅胶层析柱,用异丁醇、异丁醇:石油醚(1:1)和石油醚 3 种洗脱液洗脱。获得 Fr1、Fr2 和 Fr3 3 段提取物,各段提取物分别做杀虫活性实验,发现 Fr3 效果明显。Fr3 经硅胶柱层析,异丁醇-石油醚(10:1→1:10)梯度反复洗脱(2 次),最终获得化合物 1。化合物 1 经高效液相色谱(HPLC)分析,并结合质谱和核磁共振波谱鉴定其结构和种类。

1.4 药液的配制

称取各段萃取物、各级洗脱物及活性化合物 5 mg,用 20 μL 二甲基亚砜促溶,加入 3.105 mL 蒸馏水,配成 1 600 mg/L 的药液,用二倍梯度稀释法依次往下稀释至实验所需浓度,以实验用最高浓度药液中二甲基亚砜的含量(0.1%)为标准,配制含 0.1% 二甲基亚砜的对照组处理液。同时设置只加蒸馏水的空白对照。

1.5 多子小瓜虫的传代培养

从广州花地湾花鸟鱼虫批发市场购买患多子小瓜虫病的金鱼,将病鱼与健康无损伤,体长为(12 ± 1.3) cm,体质量为(25.7 ± 3.8) g 的草鱼苗混养,饲养在实验室 55 cm × 55 cm × 55 cm 的水族箱中,温度控制在(24 ± 0.5) °C,每天每箱均更换

1/4 经过曝气的自来水,当草鱼体表及鳃上出现密集小白点时,可收集小瓜虫供实验用。在被感染草鱼用完之前投入新的健康个体传接多子小瓜虫。

1.6 杀灭小瓜虫滋养体、感染性幼虫和抑制包囊孵化实验

滋养体 用吸管吸取经曝气的蒸馏水,将寄生于草鱼体表及鳃中成熟的小瓜虫滋养体(已经从白点中出来)冲洗下来,经几次漂洗去除粘液等杂质,收集于培养皿中,取 24 孔板,各孔中加入 200 μL 约含 100 个成熟滋养体的虫液并准确计数各孔滋养体数,再分别加入 200 μL 不同浓度的药液,使最终药物的浓度依次为 200、100、50、25、12.5 和 0 mg/L(对照,含 0.1% 二甲基亚砜)、0 mg/L(对照,仅加蒸馏水),各药物浓度 3 个重复。实验温度保持为(24 ± 0.5) °C,4 倍显微镜下观察记录各孔虫体全部致死时间和 4 h 的死亡数。

包囊 在 24 孔板中,各孔中吸入 200 μL 约含 30 个成熟小瓜虫滋养体的虫液,显微镜下准确计数各孔滋养体数,静置 6 h,待其形成包囊后,计数各孔包囊数,再分别加入 200 μL 不同浓度的药液,使最终药物的浓度依次为 200、100、50、25、12.5、6.25 和 0 mg/L(对照,含 0.1% 二甲基亚砜)、0 mg/L(对照,仅加蒸馏水),各药物浓度设 3 个重复。将 24 孔板于 24 °C 恒温培养箱中静置 16 h,接着在 4 倍显微镜下观察包囊孵化情况,计数各孔孵化幼虫数,具体方法为:充分混匀幼虫液,用移液器取 10 μL 幼虫液,加入等体积福尔马林(1%)固定幼虫,放计数框内在 4 × 物镜下计数幼虫数,每孔计数 5 个样,算平均数,并最终计算平均每个包囊孵化的幼虫数:

平均每个包囊孵化的幼虫数 = 各孔幼虫总数/各孔包囊数 (1)

幼虫 将培养皿中收集到的成熟小瓜虫滋养体在 24 °C 恒温培养箱中静置 22 h,直至孵化释放出感染性幼虫,吸出幼虫,充分混匀,调整虫液浓度(100 μL 约 200 只幼虫),取样计数幼虫的平均浓度(实验中记录幼虫数均为取样计数其平均浓度)。取 96 孔板,各孔中加入 100 μL 的虫液,在各孔中加入 100 μL 不同浓度的药液,使最终药物浓度依次为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 和 0 mg/L(对照,含 0.1% 二甲基亚砜)、0 mg/L(对照,仅加蒸馏水),各药物浓度设 3 个重复。实验温度保持为(24 ± 0.5) °C,在 4 × 物镜下记录不

同药物浓度中幼虫的致死时间和 4 h 各孔的死亡数:

死亡数 = 实验初始幼虫数 - 4 h 各孔存活幼虫数 (2)

1.7 虫体死亡标准

每次杀虫实验,观察记录以 4 h 为限^[17],成虫胞质停止流动,纤毛停止摆动,表示虫体死亡;包裹在加药后 48 h 内未分裂,表明包裹死亡;幼虫停止游动,其纤毛不动或仅微微摆动,在药液中很快变圆或裂解,说明幼虫死亡^[17-18]。

1.8 数据处理

用 Excel 软件计算平均致死率、平均每个包裹孵化幼虫数及标准差(±SD),用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学处理,分析不同剂量浓度实验结果的显著性差异及计算半数有效浓度(EC₅₀)。

2 结果

2.1 石油醚、甲醇、乙酸乙酯萃取物杀虫活性比较

以 4 h 为限,观察 3 个萃取组分对多子小瓜虫滋养体和感染性幼虫的杀灭活性,结果显示石油醚萃取物的杀虫活性最好,乙酸乙酯萃取物次之,甲醇萃取物的活性最差。200 mg/L 时各萃取物中滋养体在 33.0~98.7 min 内全部死亡,当药物浓度在 50 mg/L 时,只有石油醚萃取物在 4 h 内全部杀死小瓜虫滋养体。在杀感染性幼虫实验中,药物处理浓度在 32 和 16 mg/L 时,4 h 后乙酸乙酯和甲醇萃取物处理组均有幼虫存活,只有石油醚萃取物能全部杀死幼虫,且致死时间分别为 79.3 和 230.7 min(表 1)。

表 1 肉桂石油醚、乙酸乙酯、甲醇萃取物杀灭多子小瓜虫的致死时间(min)比较
Tab. 1 The lethal duration of three extracts of *C. cassia* against trophonts and theronts of *I. multifiliis*

萃取物 extract	滋养体实验药物浓度/(mg/L) concentrations for killing trophonts				幼虫实验药物浓度/(mg/L) concentrations for killing theronts			
	200	100	50	25	128	64	32	16
石油醚 petroleum ether	33.0±2.0	51.3±3.1	189.3±3.1	+	4.3±0.6	21.3±1.5	79.3±1.5	230.7±8.5
乙酸乙酯 ethyl acetate	46.3±2.3	65.3±2.1	+	+	14.7±1.2	56.0±2.6	+	+
甲醇 methanol	98.7±3.1	+	+	+	61.3±0.6	+	+	+

注:“+”代表 4 小时内虫体没有全部死亡。表 2 和表 3 中的注释与此相同
Notes:“+” represents existence of live trophonts or theronts after 4 h exposure. The note in tables 2 and 3 is the same as this one

2.2 石油醚萃取物的 3 种洗脱成分的杀虫活性比较

石油醚萃取物经过硅胶层析柱,用异丁醇、异丁醇:石油醚(1:1)和石油醚 3 种洗脱液洗脱,所获得的 Fr1、Fr2 和 Fr3 3 段提取物以 4 h 为限,观察其对多子小瓜虫滋养体和感染性幼虫的杀灭活

性,结果显示 Fr3 的杀虫活性最好。50 mg/L 的 Fr3 可全部杀死滋养体,而 100 mg/L 的 Fr1、Fr2 作用 4 h 仍有滋养体存活;在抑杀感染性幼虫实验中,16 mg/L 的 Fr3 能在 130 min 内全部杀死感染性幼虫,而同样浓度的 Fr1、Fr2 处理相同时间仍有幼虫存活(表 2)。

表 2 异丁醇(Fr1)、异丁醇:石油醚(1:1)(Fr2)和石油醚(Fr3)提取物杀灭全部多子小瓜虫的致死时间(min)
Tab. 2 The lethal duration of three extracts from petroleum ether fraction against trophonts and theronts of *I. multifiliis*

提取物 extract	滋养体实验药物浓度/(mg/L) concentrations for killing trophonts				幼虫实验药物浓度/(mg/L) concentrations for killing theronts			
	200	100	50	25	128	64	32	16
Fr1 异丁醇(isobutanol)	114.1±7.1	+	+	+	44.3±1.5	180.2±6.8	+	+
Fr2 异丁醇:石油醚=1:1 (isobutanol:petroleum ether=1:1)	70.5±3.4	+	+	+	12.8±1.2	73.5±6.6	167.9±7.6	+
Fr3 石油醚(petroleum ether)	19.4±2.2	27.3±2.6	151.7±4.2	+	2.7±0.9	10.3±1.9	54.5±5.1	127.4±8.9

2.3 肉桂醛的分离纯化及鉴定

对石油醚萃取物经过硅胶层析柱和制备型高效液相色谱仪分离提纯,最终获得纯度达到 98%

的化合物 1,呈黄色粘稠状液体,EI-MS m/z: 133.2[M+H]⁺,155.2[M+Na]⁺,150.3[M+NH₄]⁺,287.2[2M+Na]⁺,131.1[M-H]⁻,

167.2 [M + Cl]⁻, 177.2 [M + HCOO]⁻, 279.2 [2M - H]⁻, 推断其相对分子质量为 132, 结合其¹H-NMR、¹³C-NMR 确定分子式为 C₉H₈O。¹³C-NMR (125 MHz, MeOD) δ: 194.7 (C-1), 131 (C-2), 153.6 (C-3), 133.4 (C-4), 128.8 (C-6, C-8), 128.3 (C-5, C-9); ¹H-NMR (500 MHz, MeOD) δ: 9.65 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1), 7.66 (1H, d, J = 9.3 Hz, H-3), 7.57 (2H, d, J = 2.9 Hz, H-5, H-9), 7.31 (2H, d, J = 7.4 Hz, H-6, H-8), 7.26 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-7), 6.49 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2)。经鉴定化合物 1 为肉桂醛(图 1)。

2.4 不同浓度肉桂醛杀灭多子小瓜虫滋养体、幼虫的致死时间和致死率

剂量 50 或 100 mg/L 的肉桂醛药液能在 90 min 内杀死全部滋养体, 200 mg/L 的肉桂醛能

在 15 min 内杀死全部滋养体, 浓度 25 mg/L 处理 4 h 对小瓜虫滋养体的致死率为 90.5%; 在杀灭感染性幼虫实验中, 8 mg/L 以上浓度可在 4 h 内将幼虫全部杀死, 4 mg/L 在 4 h 内对幼虫的致死率为 98.2%, 浓度在 2 mg/L 以下时, 随着浓度降低, 杀灭效果下降(表 3)。

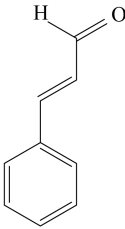


图 1 肉桂醛分子结构式
Fig.1 Structure of cinnamaldehyde

表 3 不同浓度肉桂醛杀灭多子小瓜虫滋养体、幼虫的致死时间和致死率
Tab.3 Lethal duration and rate of various concentrations of cinnamaldehyde against trophonts and theronts in 4 h exposure

浓度/(mg/L) concentration	滋养体实验 treating trophont trial		浓度/(mg/L) concentration	幼虫实验 treating theront trial	
	全部致死时间/min lethal duration	4 h 致死率/% 4 h-mortality		全部致死时间/min lethal duration	4 h 致死率/% 4 h-mortality
0(D H ₂ O)	+	0.3 ± 0.0 ^a	0(D H ₂ O)	+	0.0 ± 0.0 ^a
0(0.1% DMSO)	+	0.3 ± 0.1 ^a	0(0.1% DMSO)	+	0.0 ± 0.0 ^a
12.5	+	49.3 ± 6.7 ^b	0.5	+	6.0 ± 5.2 ^b
25	+	90.5 ± 5.2 ^c	1	+	40.9 ± 2.6 ^c
50	81.0 ± 13.2 ^a	100 ^d	2	+	55.5 ± 2.5 ^d
100	32.3 ± 7.1 ^b	100 ^d	4	+	98.2 ± 1.3 ^e
200	14.1 ± 3.4 ^c	100 ^d	8	208.4 ± 9.8 ^a	100 ^e
			16	74.3 ± 6.2 ^b	100 ^e
			32	31.2 ± 4.1 ^c	100 ^e
			64	3.5 ± 1.6 ^d	100 ^e
			128	2.3 ± 0.6 ^d	100 ^e

注:同一列中标有不相同字母的值表示差异显著($P < 0.05$);0(D H₂O)表示空白对照组为蒸馏水;0(0.1% DMSO)表示对照组为含 0.1% 的二甲基亚砜溶液。表 5 的注释与此相同
Notes: Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$). Blank control group is distilled water (D H₂O) only, another control group contains 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO). The note in table 5 is the same as this one

2.5 肉桂醛对小瓜虫滋养体和幼虫的半数有效浓度

用概率单位法 (SPSS 16.0) 计算肉桂醛对小瓜虫滋养体和感染性幼虫的半数有效浓度 (EC₅₀) 分别为 13.9 和 1.8 mg/L (表 4)。

2.6 不同浓度肉桂醛抑制小瓜虫包囊孵化活性

50 mg/L 以上浓度的肉桂醛可完全抑制小瓜

虫包囊孵化, 杀灭包囊内虫体; 25 mg/L 肉桂醛处理后, 平均每个包囊仅孵出 (34.0 ± 6.6) 只幼虫, 处理浓度为 6.25 mg/L 时, 平均每个包囊孵化 (287.5 ± 12.9) 只幼虫, 均显著低于对照组 (表 5)。

3 讨论

本实验采用的研究路线是从肉桂的各个萃取

表 4 肉桂醛对多子小瓜虫滋养体和幼虫的半数有效浓度
Tab.4 Half effective concentration (EC₅₀) of
cinnamaldehyde against *I. multifiliis* (trophonts, theronts)

类别 items	半数有效浓度/ (mg/L) EC ₅₀	95% 置信区间/ (mg/L) 95% confidence intervals
肉桂醛杀小瓜虫滋养体 against trophonts	13.9	10.1 ~ 18.5
肉桂醛杀小瓜虫幼虫 against theronts	1.8	1.5 ~ 2.1

表 5 不同浓度肉桂醛抑制小瓜虫包囊孵化活性
(平均值 ± 标准差)

Tab.5 Mean number of theronts produced by
every encysted tomont treated with different
concentrations of cinnamaldehyde (mean ± SD)

肉桂醛浓度/(mg/L) cinnamaldehyde concentrations	平均每个包囊孵化幼虫数/只 mean number of theronts released per tomont
0 (D H ₂ O)	648.9 ± 16.7 ^a
0 (0.1% DMSO)	651.5 ± 19.3 ^a
6.25	287.5 ± 12.9 ^b
12.5	122.6 ± 9.2 ^c
25	34.0 ± 6.6 ^d
50	0 ^e
100	0 ^e
200	0 ^e

部位进行杀虫活性测试,筛选活性强的萃取部位,指向性地分离纯化杀虫活性化合物。通过这种杀虫活性追踪的方法,逐步分离提纯活性化合物,并鉴定其种类。在 3 个萃取部位中,石油醚萃取物活性明显优于乙酸乙酯和甲醇萃取物的活性,说明肉桂抑杀多子小瓜虫的活性成分主要集中在石油醚萃取物中。故对石油醚萃取物进一步分离提纯,最后获得化合物 1,经质谱和核磁分析确定该化合物为肉桂醛,并且通过活性测试结果显示杀虫效果较初提物显著提高,确定肉桂醛为抑杀多子小瓜虫的活性物质。肉桂醛对小瓜虫滋养体(成虫)、感染性幼虫、包囊的抑杀效果与药物浓度呈正相关,浓度越高杀虫效果越好。同时,小瓜虫生活史各阶段虫体对肉桂醛的敏感度不同,寄生的滋养体阶段比感染性幼虫阶段难杀灭,全部杀灭感染性幼虫的最低有效浓度为 8 mg/L,但是,全部杀死滋养体的浓度需要达到 50 mg/L,这种现象与现有的同类研究结果类似^[10-11]。本研

究显示,50 mg/L 浓度的肉桂醛可完全杀死包囊内幼虫,最终无感染性幼虫孵出;低于该浓度,尽管不能全部杀灭所有包囊,但是能显著降低平均每个包囊孵化的幼虫数。因此,肉桂醛浓度在 8 ~ 50 mg/L 时,能中断小瓜虫的生活史,起到防治小瓜虫病的作用。

在石油醚萃取物活性测试中发现,在 50 mg/L 时,4 h 内可将滋养体全部杀死,100 mg/L 时,1 h 内致死率达 100%,其效果与大蒜提取物杀灭离体多子小瓜虫相当^[4];而明显低于热带植物刺毛黧豆的叶粗提液(150 mg/L)和木瓜种子粗提物(200 mg/L)完全杀灭多子小瓜虫的剂量^[10]。苦豆子(*Sophora alopecuroides*)的甲醇提取物浓度在 40 ~ 160 mg/L 时,作用时间 20 h,多子小瓜虫的致死率为 29.7% ~ 80.3%,浓度在 320 mg/L 时才达到 100%^[19],可见肉桂的石油醚萃取物杀虫效果更好。从博落回叶的氯仿萃取物分离纯化出的血根碱与肉桂醛相比表现出更强的抗小瓜虫活性,100% 杀死各阶段虫体的药物浓度为 0.7 mg/L,但是从粗提物杀虫活性来看,肉桂石油醚萃取物(50 mg/L)的杀虫效果要优于博落回氯仿萃取物(70 mg/L)^[12],推测肉桂石油醚萃取物中还含有其他杀小瓜虫活性化合物或者肉桂醛含量较高,而从小果博落回叶的氯仿粗提物分离纯化出来的二氢血根碱(EC₅₀ = 5.18 mg/L)和二氢白屈菜红碱(EC₅₀ = 9.43 mg/L)的半有效浓度比肉桂醛(EC₅₀ = 14.7 mg/L)的低^[13]。但是,肉桂醛杀小瓜虫滋养体的半有效浓度只有从五倍子中分离的五没食子酰葡萄糖的该值(EC₅₀ = 30.5)的一半,说明肉桂醛杀小瓜虫效果较好^[11]。

本研究证实了肉桂中的肉桂醛是杀灭多子小瓜虫的活性物质,对小瓜虫滋养体、包囊和感染性幼虫都具有较强杀灭作用。肉桂醛用于防治小瓜虫病与传统的化学药物相比可以克服残留、毒副作用、污染环境等缺点,具有开发天然、绿色、环保型渔药的潜在价值。同时,我国是肉桂的生产大国,肉桂资源相当丰富,所以,肉桂醛在新型环保渔药的开发和应用方面具有广阔前景。

参考文献:

[1] Swennes A G, Noe J G, Findly R C, et al. Differences in virulence between two serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 69 (2 - 3) : 227 - 232.

- [2] Dickerson H W. *Ichthyophthirius multifiliis* [M] // Patrick T K W, Kurt B. Fish Parasites: Pathobiology and Protection. Oxfordshire: CABI Publishing, 2012: 55 – 72.
- [3] Matthews R A. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriosis in Freshwater Teleosts [J]. Advances in Parasitology, 2005, 59: 159 – 241.
- [4] Buchmann K, Jensen P B, Kruse K D. Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *in vitro* experiments [J]. North American Journal of Aquaculture, 2003, 65(1): 21 – 24.
- [5] Wahli T, Schmitt M, Meier W. Evaluation of alternatives to malachite green oxalate as a therapeutant of ichthyophthiriosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Applied Ichthyology, 1993, 9(3 – 4): 237 – 249.
- [6] Straus D L, Griffin B R. Efficacy of potassium permanganate in treating ichthyophthiriasis in channel catfish [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2002, 14(2): 145 – 148.
- [7] Zhang Q Z, Chen D L, Liu Q P. Protective Immunity of Goldfish Against *Ichthyophthirius multifiliis* Infection Induced by Different Trophont Vaccine Preparations [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2009, 40(4): 561 – 566.
- [8] Chen D L, Zhang Q Z. Experiments of drugs to free-living parasites of *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Freshwater Fisheries, 2005, 35(1): 31 – 32. [陈达丽, 张其中. 杀灭离体小瓜虫的药物试验. 淡水渔业, 2005, 35(1): 31 – 32.]
- [9] Lei M H. A preliminary study on the therapeutic effect of artemisinin on *Ichthyophthirius multifiliis* disease [J]. Shandong Fisheries, 2005, 22(8): 10. [雷曼红. 青蒿素对小瓜虫病治疗作用初探. 齐鲁渔业, 2005, 22(8): 10.]
- [10] Ekanem A P, Obiekezie A, Kloas W, *et al.* Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Parasitology Research, 2004, 92(5): 361 – 366.
- [11] Zhang Q, Xu D H, Klesius P H. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Veterinary Parasitology, 2013, 198(1 – 2): 45 – 53.
- [12] Yao J Y, Shen J Y, Li X L, *et al.* Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Parasitology Research, 2010, 107(5): 1035 – 1042.
- [13] Yao J Y, Zhou Z M, Li X L, *et al.* Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*) [J]. Veterinary Parasitology, 2011, 183(1 – 2): 8 – 13.
- [14] Zeng Z Y, Lan Z P. Current status and progress of research on the application of cinnamon [J]. Modern Medicine & Health, 2007, 23(1): 59 – 60. [曾正渝, 兰作平. 肉桂的研究现状及应用进展. 现代医药卫生, 2007, 23(1): 59 – 60.]
- [15] Dong W C. Use and pharmacological action of cinnamon [J]. Special Economic Animal and Plant, 2001, 4(6): 43. [董万超. 肉桂的利用及药理作用. 特种经济动植物, 2001, 4(6): 43.]
- [16] Li J, Wu H Q, Liu Z G, *et al.* Acaricidal activity of exsasia extracts against dermatophagoides farinae [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009, 25(10): 964 – 967. [李静, 吴海强, 刘志刚, 等. 肉桂提取物对粉尘螨杀灭的实验研究. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(10): 964 – 967.]
- [17] Zhang Q Z, Zhang Z H, Chen D L, *et al.* Influence of water temperature on hatchability and activity power of theront of *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Ecologic Science, 2010, 29(2): 116 – 120. [张其中, 张占会, 陈达丽, 等. 水温对多子小瓜虫孵化及幼虫活力的影响. 生态科学, 2010, 29(2): 116 – 120.]
- [18] Chu C, Zhang Q Z, Luo F. Effect of twenty Chinese herbal medicines on killing trophonts, cysts and theronts of *Ichthyophthirius multifiliis in vitro* [J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(1): 55 – 60. [鉏超, 张其中, 罗芬. 20 种中草药杀灭离体小瓜虫的药效研究. 淡水渔业, 2010, 40(1): 55 – 60.]
- [19] Yi Y L, Lu C, Hu X G, Ling F, *et al.* Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Parasitology Research, 2012, 111(4): 1771 – 1778.

Effect of cinnamaldehyde from *Cinnamomum cassia* on killing *Ichthyophthirius multifiliis* *in vitro*

LIANG Jinghan, ZHANG Qizhong*, FU Yaowu, WANG Bin

(Key Laboratory of Eutrophication and Red Tide Prevention of Guangdong Higher Education Institutes,
Engineering Research Center of Tropical and Subtropical Aquatic Ecological Engineering, Ministry of
Education, Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) is one of the most pathogenic ciliated protozoan parasitizing the gills and skin of fishes, and can cause mortality of a large number of cultured fishes, subsequently resulting in a serious economic loss in aquaculture. So it is necessary to control the parasitic ciliate in aquaculture. In the past several decades, malachite green was frequently used to treat ichthyophthiriasis in fish farms. However, malachite green has been banned nowadays for use in food fish due to its carcinogenic and genotoxic effects on humans. So far, there is none of both effective and safe therapeutants to treat Ich, therefore, there is an urgent need to find both efficacious and safe parasitocides to control Ich. Previous studies showed some Chinese medicinal plants contained anti-Ich compounds, which were easily degradable, and safe for human and water environment, and could further be developed into promising therapeutants against Ich, but the anti-Ich activity of *Cinnamomum cassia* Presl, a Chinese medicinal plant, was unknown. The present study was designed to investigate the anti-Ich activity and compound of *C. cassia* Presl with grass carps under *in vitro* conditions. The powdered *C. cassia* were extracted primarily with 95% ethanol. Then the crude extract was sequentially extracted with petroleum ether, ethyl acetate and methanol, respectively. The anti-Ich efficacy of petroleum ether fraction was the best among the 3 extracts. Thereby, bioactivity-guided fractionation and isolation of the compound responsible for anti-Ich activity were carried out with the petroleum ether extract, and one purified compound with anti-Ich activity was obtained, and subsequently identified as cinnamaldehyde by means of MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR spectroscopic analyses. The anti-Ich compound, cinnamaldehyde, could cause 100% mortality of trophonts at 50 mg/L, and theronts at 8 mg/L for 4 h exposure. The 4-h EC_{50} values of cinnamaldehyde against trophonts and theronts were 13.9 mg/L and 1.8 mg/L, respectively. The compound also stopped reproduction of all encysted tomites at 50 mg/L. These data confirmed that cinnamaldehyde is effective against *I. multifiliis*, and promising for development of a new, safe and efficacious antiparasitic agent.

Key words: cinnamaldehyde; isolation; identification; antiparasitic activity; *Ichthyophthirius multifiliis*

Corresponding author: ZHANG Qizhong. E-mail: zhangqzdr@126.com