

福寿螺不同生长发育阶段的抗菌活性物质及化学成分分析

陈寅山 吴鸾玉 林 静 饶小珍
(福建师范大学生命科学学院 福州 350108)

摘要: 福寿螺 (*Pomacea canaliculata*) 不同生长发育阶段(螺苗、仔螺、中螺、成螺)的软体匀浆物用乙酸乙酯进行提取。提取物分别用硅胶柱进行柱层析,并分别用不同极性的有机溶剂进行洗脱,分离出不同极性组分:非极性组分(石油醚洗脱组分)、弱极性组分(苯洗脱组分)、强极性组分(乙醇洗脱组分)。然后用 11 种细菌对不同极性组分进行抗菌活性检测。结果表明,不同生长发育阶段组分抗菌作用的共同点是:强极性组分的抗菌活性最强,弱极性组次之,非极性组分无抑菌作用。将不同生长发育阶段抗菌活性最强的乙醇洗脱组分分别进行薄层层析(TLC)分析并进行抗菌实验。薄层层析所用的展层剂不同,分离出条带数不同,各条带抗菌活性也存在差异。将抗菌活性最强的条带用气相色谱-质谱法进行化学成分鉴定,结果表明,各不同生长发育阶段抗菌物质的化学成分大部分是酸类物质,相同的化学成分在不同生长发育阶段的含量及相似度都不一样。

关键词: 福寿螺; 抗菌活性; 硅胶柱层析; 薄层层析; 气相色谱-质谱法; 化学成分

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)03-23-11

The Antimicrobial Activities and Their Chemical Components of Lipid Substances in Different Developmental Stages of *Pomacea canaliculata*

CHEN Yi-r-Shan WU Luarr Yu LIN Jing RAO Xiao-Zhen
(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: Lipid substance from *Pomacea canaliculata* at different developmental stages was extracted using ethyl acetate. The extracted substance was purified with silica gel column chromatography and thin layer chromatography (TLC). The antimicrobial activities of the separated compounds derived from effluent fractions of three different organic solvents (petroleum ether, benzene and ethanol) were tested against 11 bacteria. They have varying levels of antimicrobial activities, with the non-polar solvent showing the least activity and the strong polar solvent showing the strongest activity. The liposoluble compounds extracted by TLC from all of the bands of the ethanol effluent fraction exhibited variable antimicrobial activities. GC-MS analysis revealed that the most of the chemical components are the acid substances in the strongest of these antimicrobial fractions from different developmental stages. The same chemical component had different content and different similitude at different developmental stages of *P. canaliculata*.

Key words: *Pomacea canaliculata*; Antimicrobial activities; Silica gel column chromatography; TLC; GC-MS; Chemical components

福寿螺 (*Pomacea canaliculata*), 又名大瓶螺、苹果螺, 属软体动物门(Mollusca)腹足纲(Gastropoda)中腹足目(Mesogastropoda)瓶螺科(Ampullariidae)。福寿螺原产南美洲亚马逊河

基金项目 福建省科技厅资助项目(No. 2005K018);
第一作者介绍 陈寅山, 男, 教授; 研究方向: 动物学; E-mail: biocys@fjnu.edu.cn.
收稿日期: 2007-09-10, 修回日期: 2008-03-03

流域, 20 世纪 70~ 80 年代引入台湾、广东等地。由于福寿螺食性杂、繁殖力强、生长速度快, 很快便成为福建、广东、广西、浙江、上海等地的有害动物, 主要危害水稻、菱角、空心菜、茭白等作物, 给入侵地造成严重的经济损失并导致本地物种多样性迅速降低, 破坏了原有的生态平衡。同时, 它是广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 的中间宿主, 可引起人类嗜酸性脑膜炎, 对人类的健康构成威胁^[1]。面对如此泛滥成灾的福寿螺, 目前通常的防控措施是防治和利用。对福寿螺采取以化学防治为主, 物理防治、生物防治、农业防治为辅的方法^[2-6]。化学防治过程使用的大量有机杀螺剂对环境造成了严重的污染, 危害到本地水生动物, 同时也危害到人类的健康。对福寿螺的资源利用方面的相关报道较少, 多集中于其营养价值和动物蛋白饲料的研究^[7,8], 少数涉及到体内活性物质的研究^[9-13], 对其体内的抗菌活性物质的研究至今未见报道。本研究以不同生长发育阶段的福寿螺作为材料, 用化学方法提取抗菌物质, 并进行其抗菌活性试验, 用气相色谱质谱法 (GC-MS) 分析薄层层析组分的化学成分, 以期为福寿螺的开发利用提供科学依据和基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料处理 福寿螺采自福州万升小区菜园。将打捞回来的福寿螺在水族箱中暂养几天, 再根据傅先源^[14]的划分标准将福寿螺分为螺苗级 (I)、仔螺级 (II)、中螺级 (III) 和成螺级 (IV) 4 个生长发育阶段。用毛刷刷净后用滤纸吸干表面水分, 备用。

1.2 粗品提取 按文献^[15]将不同生长发育阶段的福寿螺去壳, 得到的软体部分分别置于高速组织捣碎机内, 以 8 000~ 12 000 r/min 匀浆 2~ 3 min, 将匀浆物按 1: 1 (V/V) 加入乙酸乙酯浸泡, 3 d 后过滤, 再浸泡 3 d 后再次过滤, 合并两次滤液, 用旋转蒸发仪进行浓缩, 得到各阶段的提取物, 放置于冰箱的冷冻层保存、备用。

1.3 不同极性组分的分离 按文献^[16]将各提取物经硅胶 (GF₂₅₄) 柱层析, 然后用石油醚、苯、

乙醇进行洗脱, 分离出不同极性组分: 非极性组分 (石油醚洗脱组分)、弱极性组分 (苯洗脱组分)、强极性组分 (乙醇洗脱组分), 并将各不同极性组分进行抗菌检测。再将抗菌活性最强的洗脱组分用薄层层析 (TLC) 进一步分离, 收集各条带, 并将各条带进行抗菌检测。

1.4 抗菌检测

1.4.1 受试菌种 本实验受试菌种有 11 种细菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、蜡样芽孢杆菌 (*B. cereu*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、赤皮病病原菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、甘薯薯瘟病病原菌 (*Fasarium axysporam*)、烂尾病病原菌 (*Aeromonas sobria*)、肠炎病病原菌 (*A. punctata*)。菌种由福建省微生物研究所和本学院微生物实验室提供。

1.4.2 抗菌实验 将福寿螺各生长发育阶段不同极性组分配制成 0.10 g/ml 溶液, 不同条带组分配制成 0.04 g/ml 溶液, 备用。

抗菌实验采用圆形纸片扩散抑菌法。用接种环分别从每种受试菌的斜面上刮取菌苔于 5 ml 无菌水中, 充分振荡摇匀后, 得到各种菌悬液 (细菌 2.2×10^6 个/ml)。将 11 种菌悬液分别倒入 40~ 45 °C 融化的培养基, 摇匀后分别迅速分装到培养皿 (Φ 90 mm), 培养基厚度约为 4~ 5 mm。待冷却后, 取已消毒过的圆形纸片 (Φ 6 mm) 二片重叠, 分别用微量取液枪注射每种提取液 10 μl, 略干后, 贴于培养基平板上, 同时每一培养皿作一溶剂的空白对照。而后置于恒温培养箱 (36~ 37 °C) 中倒置培养。20~ 24 h 后分别观察结果, 测量抑菌圈宽度。粗品提取物实验重复 2~ 4 次, 取平均值, 之后实验为单次测量值。

1.5 气相色谱质谱法 (GC-MS) 分析薄层层析组分的化学成分 用 GC-MS 仪分别对薄层层析活性较强条带进行化合物成分分析。GC-MS 仪系安捷伦 6890/ms5972 气质联用仪, 色谱柱为 HP-5 ms 毛细管柱 (30 m × 0.25 μm), 程序

升温 70~ 290 °C, 升温速率 4 °C/min, 恒温 30 min 炉温 40~ 220 °C, 进样口温度 250 °C。质谱仪电子轰击能量 70 eV, 分流进样, 分流比 20: 1, 载气为氦气, 载气流速 5 ml/min, 进样量 1.0 μl。

2 结 果

2.1 不同生长发育阶段提取物的抗菌活性
福寿螺不同生长发育阶段提取物粗品对 11 种细菌的抑菌效果如表 1 所示。从表 1 可以看出, 福寿螺不同生长发育阶段提取物粗品表现出一定的抑菌效果。同一个生长发育阶段对不同的菌抑制作用不同, 说明对不同的菌敏感性不同; 不同发育阶段对同一种菌的抑制作用也

表现出差异性。不同发育阶段对不同的菌敏感性不同: 螺苗级的提取物对枯草芽孢杆菌最敏感 ($\Phi= 31.3 \text{ mm}$), 但对赤皮病病原菌最不敏感 ($\Phi= 21.5 \text{ mm}$); 仔螺级提取物对赤皮病病原菌最敏感 ($\Phi= 29.7 \text{ mm}$), 对藤黄八叠球菌最不敏感 ($\Phi= 15.2 \text{ mm}$); 中螺级提取物对烂尾病病原菌最敏感 ($\Phi= 31.7 \text{ mm}$), 对短小芽孢杆菌最不敏感 ($\Phi= 19.2 \text{ mm}$); 成螺级提取物对赤皮病病原菌最敏感 ($\Phi= 30.3 \text{ mm}$), 对甘薯薯瘟病病原菌最不敏感 ($\Phi= 18.7 \text{ mm}$)。说明不同发育阶段提取物的抗菌活性存在差异。图版 I: 1 为福寿螺 4 个不同发育阶段提取物粗品对赤皮病病原菌的抑制效果。

表 1 福寿螺不同生长发育阶段提取物粗品的抗菌结果(Φ :mm)

Table 1 The antimicrobial activities of extracts from different developmental stages of *P. candiculata*

受试菌种 Species of bacteria	发育阶段 Developmental stages				
	螺苗 Rank I	仔螺 Rank II	中螺 Rank III	成螺 Rank IV	乙酸乙酯 Ethyl acetate
<i>E. c</i>	27.2 ± 1.3	27.3 ± 1.8	22.3 ± 2.2	26.5 ± 1.3	0
<i>S. l</i>	21.2 ± 1.3	15.2 ± 1.0	19.6 ± 2.0	20.3 ± 4.5	0
<i>S. a</i>	29.3 ± 0.6	24.2 ± 0.8	30.5 ± 1.5	28.7 ± 1.5	0
<i>P. f</i>	21.5 ± 1.3	29.7 ± 0.8	21.2 ± 1.0	30.3 ± 2.3	0
<i>F. a</i>	28.3 ± 1.5	24.3 ± 1.5	25.8 ± 1.0	18.7 ± 3.6	0
<i>P. v</i>	24.2 ± 0.8	23.2 ± 0.8	20.2 ± 1.3	27.3 ± 1.5	0
<i>B. s</i>	31.3 ± 0.6	26.5 ± 1.8	27.3 ± 1.5	24.8 ± 0.8	0
<i>B. p</i>	26.2 ± 1.0	25.2 ± 1.0	19.2 ± 1.3	22.3 ± 0.6	0
<i>A. s</i>	24.6 ± 1.1	19.3 ± 1.5	31.7 ± 1.5	21.6 ± 1.2	0
<i>B. c</i>	23.4 ± 1.2	26.2 ± 1.1	20.2 ± 1.0	18.8 ± 1.2	0
<i>A. p</i>	22.1 ± 0.8	24.4 ± 0.6	19.8 ± 1.0	27.2 ± 1.1	0

E. c: 大肠杆菌; *S. l*: 藤黄八叠球菌; *S. a*: 金黄色葡萄球菌; *P. f*: 赤皮病病原菌; *F. a*: 甘薯薯瘟病病原菌; *P. v*: 普通变形杆菌; *B. s*: 枯草芽孢杆菌; *B. p*: 短小芽孢杆菌; *A. s*: 烂尾病病原菌; *B. c*: 蜡样芽孢杆菌; *A. p*: 肠炎病病原菌。表 2、3 相同。

E. c: *Escherichia coli*; *S. l*: *Saraina lutea*; *S. a*: *Staphylococcus aureus*; *P. f*: *Pseudomonas fluorescens*; *F. a*: *Fusarium oxysporum*; *P. v*: *Proteus vulgaris*; *B. s*: *Bacillus subtilis*; *B. P*: *Bacillus pumilus*; *A. s*: *Aeromonas sobria*; *B. c*: *Bacillus cereu*; *A. p*: *Aeromonas punctata*.
As same as table 2 and 3.

2.2 不同极性成分的抗菌活性 福寿螺不同生长发育阶段各洗脱组分对细菌的抑菌结果见表 2。从表 2 可以看出, 福寿螺不同生长发育阶段的不同极性成分对细菌的抗菌活性是不同的: 非极性组分除了螺苗和仔螺对蜡样芽孢杆菌有较弱抑制作用外, 各生长发育阶段对其他受试细菌均无抑制作用。各不同生长发育阶段的弱极性组分除了螺苗级对藤黄八叠球菌和肠炎病病原菌, 成螺对蜡样芽孢杆菌无抑制作用

之外, 其他均有抑制作用, 但抑菌作用较强极性组分弱。强极性组分对受试的 11 种细菌均有抑制作用, 在 3 种洗脱组分中抗菌活性最强。强极性组分的抗菌活性在不同生长发育阶段之间差异不大, 但在同一个生长发育阶段对不同菌敏感度不同。螺苗弱极性组分对枯草芽孢杆菌最敏感, 而对藤黄八叠球菌和肠炎病病原菌则无抑制作用。仔螺弱极性组分对赤皮病病原菌的抑制作用最强, 而对肠炎病病原菌抑制作

用最弱。中螺弱极性组分对烂尾病病原菌抑制作用最强,而对藤黄八叠球菌和短小芽孢杆菌的抑制作用最弱。成螺弱极性组分对赤皮病病原菌抑制作用最强而对蜡样芽孢杆菌则无抑制作用。各生长发育阶段都是乙醇组分的抗菌效果最好,但不同生长发育阶段之间有异同点:除螺苗对普通变形杆菌最敏感外,其他三个阶段

均对金黄色葡萄球菌抑制作用最好,而且从仔螺到成螺的抑菌效果有增强趋势;不同生长发育阶段之间不敏感菌不同,螺苗对肠炎病病原菌最不敏感,仔螺对藤黄八叠球菌效果最差,中螺和成螺对蜡样芽孢杆菌效果最弱。图版 I: 2 ~ 5 分别为螺苗、仔螺、中螺、成螺的 3 种不同极性洗脱组分对大肠杆菌抑菌作用效果。

表 2 福寿螺不同生长发育期各洗脱组分对 11 种细菌的抗菌活性(Φ: mm)

Table 2 The antimicrobial activities of different effluent fractions of *P. canaliculata* at different developmental stages

发育阶段 Developmental stages	组分 Effluent fractions	受试菌种 Species of bacteria										
		<i>E. c</i>	<i>S. l</i>	<i>S. a</i>	<i>P. f</i>	<i>F. a</i>	<i>P. v</i>	<i>B. s</i>	<i>B. p</i>	<i>A. s</i>	<i>B. c</i>	<i>A. p</i>
螺苗 Rank I	非极性 Nonpolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.5	0
	弱极性 Weak polar	11.0	0	8.0	9.0	9.5	12.0	13.0	8.0	9.0	9.5	0
	强极性 Strong polar	35.5	17.1	34.0	23.5	27.0	38.5	31.5	16.2	27.5	14.9	12.2
仔螺 Rank II	非极性 Nonpolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.0	0
	弱极性 Weak polar	9.0	11.0	10.5	14.0	13.0	9.0	9.2	9.5	8.5	13.1	8.0
	强极性 Strong polar	33.0	21.0	35.0	24.0	23.0	25.0	27.5	22.0	29.5	23.0	22.5
中螺 Rank III	非极性 Nonpolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	弱极性 Weak polar	10.2	7.0	13.0	8.0	11.9	10.0	13.5	7.0	14.2	10.5	8.5
	强极性 Strong polar	28.0	25.5	36.0	24.5	27.0	22.0	26.5	21.5	20.0	18.5	12.5
成螺 Rank IV	非极性 Nonpolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	弱极性 Weak polar	8.0	7.2	9.0	10.0	8.0	9.0	8.5	8.6	8.8	0	9.5
	强极性 Strong polar	23.5	26.5	38.0	21.5	21.0	20.5	23.5	28.0	20.5	11.6	19.5
空白对照 CK	石油醚 Petroleum ether	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	苯 Benzene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	乙醇 Ethanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.3 薄层层析各条带的抗菌活性 薄层层析展层剂的选择与样品极性有关,根据相似相溶规律,极性组分易溶于极性溶剂,非极性组分则易溶于非极性溶剂。福寿螺不同生长发育阶段乙醇洗脱组分薄层层析所用的展层剂不同。经实验得到各个阶段所用的展层剂分别如下:螺苗(氯仿:甲醇= 98:2)、仔螺(石油醚:丙酮= 4:1)、中螺(石油醚:丙酮= 3:1)、成螺(环己烷:乙酸乙酯= 4:1)。本实验过程中得到各不同生长发育阶段展层剂不同,说明不同生长发育阶段乙醇洗脱组分的极性、酸碱性、溶解性都有差异。不同生长发育阶段分离出条带的迁移率和

数目都不同,且没有阶段性规律。不同生长发育阶段薄层层析分离出的各条带均有抗菌活性,同一生长发育阶段各条带之间对同一种菌的抗菌活性差异明显,不同生长发育阶段对同一种菌的抑制作用也有差异。不同生长发育阶段都有一条带抗菌活性较强,如螺苗 R_f0.59、仔螺 R_f0.52、中螺 R_f0.61、成螺 R_f0.47 条带抗菌活性较强。各分离条带抗菌活性结果见表 3。图版 I: 6~ 9 分别为螺苗、仔螺、中螺、成螺薄层层析各分离条带分别对大肠杆菌、甘薯病病原菌、普通变形杆菌及肠炎病病原菌抑菌作用的效果。

表 3 福寿螺乙醇洗脱组分薄层层析分离条带抗菌活性结果(Φ : mm)Table 3 The antimicrobial activities of separated compounds of ethanol effluent fractions by using TLC from *P. candiculata*

发育阶段 Developmental stages	条带 TLC bands	受试菌种 Species of bacteria										
		<i>E. c</i>	<i>S. l</i>	<i>S. a</i>	<i>P. f</i>	<i>F. a</i>	<i>P. v</i>	<i>B. s</i>	<i>B. p</i>	<i>A. s</i>	<i>B. c</i>	<i>A. p</i>
螺苗 Rank I	R _f 0.59	15.8	14.3	14.5	15.2	15.0	14.5	15.5	15.0	15.6	14.9	14.5
	R _f 0.62	14.0	14.0	12.7	12.5	11.3	11.8	14.0	13.8	13.2	13.0	13.0
	R _f 0.68	12.2	10.2	10.5	11.0	11.6	11.0	12.8	11.0	12.2	13.5	9.2
	R _f 0.74	12.0	11.1	11.5	11.4	11.3	11.0	11.0	10.2	12.5	10.6	11.5
仔螺 Rank II	R _f 0.00	9.8	10.0	9.5	9.3	10.5	9.5	13.5	11.0	11.0	11.0	8.5
	R _f 0.16	12.7	13.0	14.8	11.4	11.6	13.1	14.5	14.1	14.0	16.1	13.2
	R _f 0.32	12.2	12.8	12.5	11.3	10.5	10.9	12.1	11.0	10.5	12.8	10.9
	R _f 0.37	12.1	13.1	13.1	12.5	14.5	13.0	14.0	12.2	11.6	13.1	13.0
	R _f 0.43	12.5	12.5	14.5	11.2	12.0	12.8	14.0	16.0	14.5	15.6	12.9
	R _f 0.52	14.2	14.2	14.6	12.9	12.6	13.8	14.0	16.5	13.5	14.5	15.6
	R _f 0.55	15.5	11.4	14.1	15.0	17.5	15.1	11.5	16.5	10.5	12.2	10.8
	R _f 0.61	13.0	13.5	12.0	8.5	12.8	11.0	15.0	16.5	11.5	11.5	14.2
中螺 Rank III	R _f 0.00	11.7	13.0	12.0	9.0	13.5	14.0	15.5	13.0	12.2	12.2	14.8
	R _f 0.56	10.5	14.0	12.0	11.5	10.9	12.5	13.2	10.6	9.3	10.9	13.2
	R _f 0.6	113.0	15.1	14.2	13.5	11.2	13.8	15.1	13.9	11.6	11.7	14.8
	R _f 0.66	14.2	14.2	11.2	12.2	13.5	12.6	14.2	14.5	12.4	11.3	14.6
	R _f 0.72	12.3	14.9	15.0	10.7	12.5	13.4	15.5	14.5	11.3	12.2	14.0
	R _f 0.81	11.8	13.1	10.4	12.2	12.1	13.9	13.2	11.5	11.5	12.2	12.1
	R _f 0.87	11.7	11.5	11.0	11.3	11.6	10.8	12.0	12.0	11.8	11.2	10.4
成螺 Rank IV	R _f 0.00	12.6	11.0	12.0	13.0	13.0	12.0	16.5	9.5	11.4	11.5	11.5
	R _f 0.12	12.5	12.0	12.5	13.0	11.2	11.5	17.0	12.0	11.6	13.0	10.5
	R _f 0.40	13.5	11.5	13.0	13.0	10.2	10.7	14.0	14.0	13.2	12.0	12.0
	R _f 0.47	14.8	15.5	16.7	17.2	13.0	16.6	2.1	13.5	15.5	17.5	15.4
	R _f 0.59	12.3	14.0	13.0	14.5	13.5	14.0	18.0	14.6	13.4	15.3	13.0
	R _f 0.71	11.6	11.4	11.6	11.5	9.3	10.6	15.5	14.3	11.5	12.3	11.5

2.4 薄层层析带的成分鉴定 福寿螺各生长发育阶段乙醇组分经过薄层层析后,活性较强条带成分鉴定的总离子流图见图 1~4,经 GC-MS 分析后各生长发育阶段所具有的化学成分见表 4~7。福寿螺各不同生长发育阶段抗菌活性较强条带的总离子流图不同,它们之间的化学成分也有差异。螺苗级的化学成分主要是十四烷酸(相对含量 9.20%,相似度是 91)、十六烷酸(相对含量 36.07%,相似度是 90)、十八碳二烯(相对含量 8.38%,相似度是 87)、十八烷酸(相对含量 13.94%,相似度是 93)、1-菲羧酸(相对含量 6.81%,相似度 92);仔螺级的主

要成分是十六烷酸(相对含量 33.63%,相似度是 81)、十八烯酸(相对含量 20.06%,相似度是 93)、十八烷酸(相对含量 17.06%,相似度是 91)、1-菲羧酸(相对含量 2.72%,相似度 90);中螺级的主要成分是十四烷酸(相对含量 7.01%,相似度是 91)、十六烷酸(相对含量 27.92%,相似度是 84)、9,12,15 亚麻酸(相对含量 14.99%,相似度 86)、十八烷酸(相对含量 10.79%,相似度 94)、1-菲羧酸(相对含量 6.19,相似度 83);成螺级的主要成分是胆固醇(59.75%)、1-菲羧酸(13.55%)。可见福寿螺不同生长发育阶段的化学成分大部分是酸类物

质, 且有许多相同的化学成分。从螺苗级到成螺级都含有菲羧酸, 菲羧酸具有增强吞噬细胞功能和增强机体免疫作用。但相同化学成分在不同生长发育阶段中的含量和相似度不同。成

螺的主要成分是胆固醇, 胆固醇与性激素有关, 成螺胆固醇高可能与其生殖有关, 这是成螺区别于其他级别螺的一个重要特征。

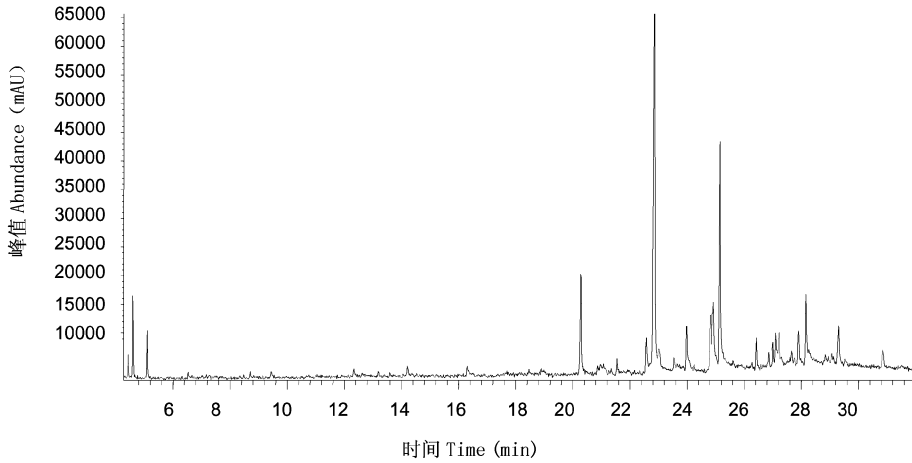


图 1 螺苗级薄层层析后 R_f 0.59 带的总离子流图

Fig. 1 The total ion current of the TLC fraction R_f 0.59 from Rank I of *P. canaliculata*

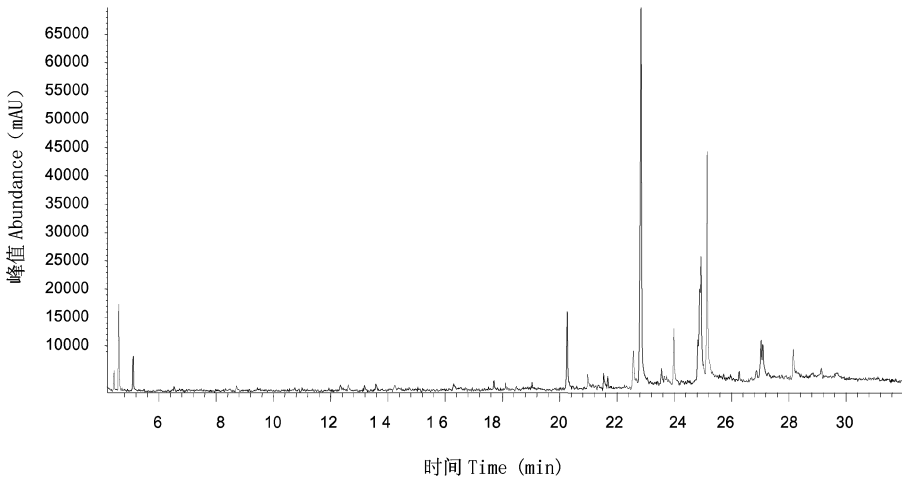


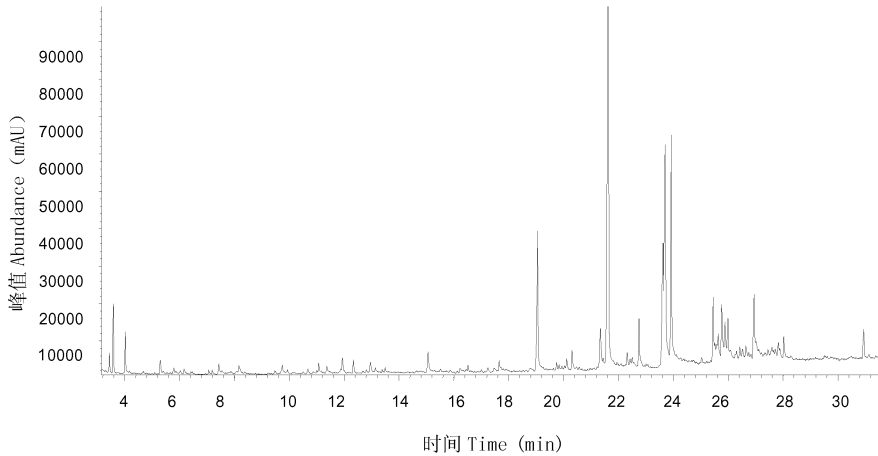
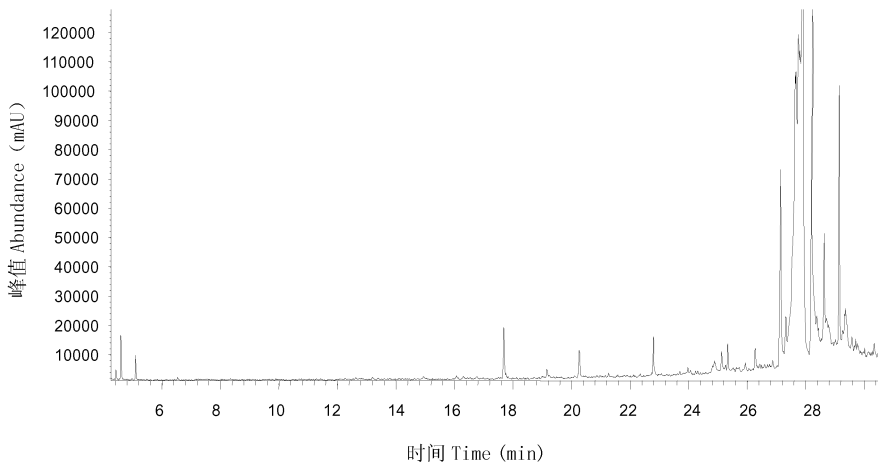
图 2 仔螺乙醇组分薄层层析 R_f 0.52 带的总离子流图

Fig. 2 The total ion current of the TLC fraction R_f 0.52 from Rank II of *P. canaliculata*

3 讨论

本实验将福寿螺不同生长发育阶段提取物粗品柱层析后, 分离出不同洗脱组分: 石油醚洗脱组分(非极性)、苯洗脱组分(弱极性)、乙醇洗脱组分(强极性), 不同极性的洗脱组分含量存

在差异。对这三种不同极性组分进行抗菌研究, 结果是石油醚洗脱组分几乎没有抗菌作用, 而苯洗脱组分大部分具有抗菌作用, 乙醇洗脱组分抗菌效果最强。这表明福寿螺抗菌物质大部分能溶解于强极性的溶剂, 且极性越强的溶剂能溶解的物质成分越多, 所以其抗菌作用就

图 3 中螺级乙醇组分薄层层析 R_f 0.61 带的总离子流图Fig. 3 The total ion current of the TLC fraction R_f 0.61 from Rank III of *P. canaliculata*图 4 福寿螺成螺级薄层层析后 R_f 0.47 带的总离子流图Fig. 4 The total ion current of the TLC fraction R_f 0.47 from Rank IV of *P. canaliculata*表 4 螺苗级薄层层析后 R_f 0.59 带的化学成分Table 4 The chemical components of the TLC fraction R_f 0.59 from Rank I of *P. canaliculata*

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compounds	相对含量 Relative content (%)	相似度 Similarity (%)
1	4.61	对二甲苯 <i>p</i> -Xylene	4.36	93
2	5.10	1,3-二甲苯 Benzene, 1,3-dimethyl	2.04	76
3	20.30	十四烷酸 Tetradecanoic acid	9.20	91
4	22.58	环戊烷十一酸 Cyclopentaneundecanoic acid	2.64	58
5	22.87	十六烷酸 Hexadecanoic acid	36.07	90
6	23.99	十七烷酸 Heptadecanoic acid	4.16	83
7	24.83	安息香酸 Benzoic acid	3.47	74
8	24.92	9,12-十八碳二烯 Sinigrin	8.38	87
9	25.16	十八烷酸 Octadecanoic acid	13.94	93
19	27.11	二丙基环丙烯 1,2-Dipropylcyclopropene	1.54	43
11	27.91	七硅氧烷 Trisiloxane	3.38	32
12	28.17	1-菲羧酸 1-Phenanthrenecarboxylic acid	6.81	92
13	29.31	1,1,1,5,5,5-六甲基七硅氧烷 Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl	3.99	40

表 5 仔螺级薄层层析后 $R_f 0.52$ 带的化学成分

Table 5 The chemical components of the TLC fraction $R_f 0.52$ from Rank II of *P. canaliculata*

序号 No.	保留时间(min) Retention time	化合物 Compounds	相对含量(%) Relative content	相似度(%) Similarity
1	4.60	对二甲苯 p-Xylene	4.30	76
2	5.11	1,3-二甲苯 Benzene, 1,3-dimethyl	2.40	46
3	20.27	十四烷酸 Tetradecanoic acid	5.92	91
4	22.57	环戊烷十一酸 Cyclopentaneundecanoic acid	3.54	76
5	22.85	十六烷酸 Hexadecanoic acid	33.63	81
6	23.99	癸酸 Decanoic acid	4.25	83
7	24.93	油酸, 或十八烯酸 Oleic acid	20.06	93
8	25.15	十八烷酸 Octadecanoic acid	17.06	91
9	27.04	9-十四烷酸 9-Octadecanoic acid	2.82	70
10	27.11	未知 Unknown	3.30	
11	28.16	1-菲羧酸 1-Phenanthrenecarboxylic acid	2.72	90

表 6 中螺级薄层层析后 $R_f 0.61$ 带的化学成分

Table 6 The chemical components of the TLC fraction $R_f 0.61$ from Rank III of *P. canaliculata*

序号 No.	保留时间(min) Retention time	化合物 Compounds	相对含量(%) Relative content	相似度(%) Similarity
1	3.59	乙苯 Ethylbenzene	2.20	50
2	4.01	对二甲苯 p-Xylene	1.12	40
3	15.06	未知 Unknown	1.16	
4	19.05	十四烷酸 Tetradecanoic acid	7.01	91
5	21.35	2-呋喃甲醇 2-Furanmethanol	2.57	43
6	21.63	十六烷酸 Hexadecanoic acid	27.92	84
7	22.77	2-环戊烯十一酸 2-Cyclopentene 1-undecanoic acid	2.08	79
8	23.62	4-癸炔 4-decyne	6.55	72
9	23.70	9,12,15-亚麻酸 9,12,15-Octadecatrienoic acid	14.99	86
10	23.92	十八烷酸 Octadecanoic acid	10.79	94
11	25.45	环丙烷 Cyclopropane	3.62	87
12	25.64	3-羟基十八烷酸 Octadecanoic acid, 3-hydroxy	2.48	94
13	25.77	苯并腈 Benzonitrile	3.17	45
14	25.88	三环戊二烯化物 Tricyclopentadiene 3,7-dien	2.43	93
15	25.99	3-羟基十六烷酸 Hexadecanoic acid, 3-hydroxy	3.40	87
16	26.95	1-菲羧酸 1-Phenanthrenecarboxylic acid	6.19	83
17	28.05	苯甲腈 Benzonitrile	1.00	64
18	30.94	四氯环丙烯 Tetrachlorocyclopropane	1.33	43

越强。其根本原因是由于不同极性溶剂提取的酸类物质存在差异所致。酸类物质含有大量极性基团,易于溶于极性较强的溶剂中,提取结果是酸在极性溶剂提取物中含量高,而在弱极性溶剂提取物中含量低。用强极性溶剂提取物中的酸量大,弱极性溶剂提取物中的酸量少^[17]。本实验化学成分鉴定中发现福寿螺不同生长发育阶段的乙醇洗脱组分中含有大量的烷酸、烯

酸和羧基菲酸,证明了乙醇洗脱组分含有酸性物质,而这些酸性物质对受试菌具有较强的抑制作用,所以乙醇洗脱组分抗菌效果最好。另外,福寿螺不同生长发育阶段的乙醇洗脱组分对受试菌的敏感度存在差异,这与不同生长发育阶段乙醇洗脱组分的化学成分组成、含量的差异有关。

表 7 福寿螺成螺级薄层层析后活性较强条带 R_f0.47 的化学成分Table 7 The chemical components of the TLC fraction R_f0.47 from Rank IV of *P. canaliculata*

序号 No.	保留时间(min) Retention time	化合物 Compounds	相对含量(%) Relative content	相似度(%) Similitude
1	4.61	乙苯 Ethylbenzene	0.83	64
2	5.10	对二甲苯 p-Xylene	0.37	59
3	17.70	2-甲基-5-硝基-咪唑 2-methyl-5-nitro-Imidazole	1.22	9
4	20.28	十四烷酸 Tetradecanoic acid	0.70	84
5	22.82	十六烷酸 Hexadecanoic acid	0.87	88
6	25.14	十四烷酸 Tetradecanoic acid	0.51	86
7	25.34	雄甾烷-17,19-二醇 Androster-17,19-diol	0.48	45
8	26.28	苯甲酸 Benzoic acid	0.70	60
9	27.15	1,5,5-三甲基-1-甲基-环己烯 1,5,5-trimethyl-1-methyl-cyclohexene	5.35	38
10	27.33	贝壳杉烯酸 Kauric 16-err-18-oic acid	1.61	94
11	27.66	胆固醇 Cholesterol	21.25	92
12	27.77	胆固醇 Cholesterol	18.08	90
13	27.91	胆固醇 Cholesterol	20.42	93
14	28.24	1-菲羧酸 1-Phenanthrene-carboxylic acid	13.55	94
15	28.38	1-菲羧酸 1-Phenanthrene-carboxylic acid	2.00	78
16	28.64	松香酸 Abietic acid	3.87	82
17	28.73	1-菲羧酸 1-Phenanthrene-carboxylic acid	1.18	85
18	29.15	壬酸 Cyclopropanoic acid	4.80	95
19	29.36	胆二烯醇 Cholesta-8,24-dien-3-ol	2.20	53

展层剂的选用与样品中的化学成分有关,可根据样品的极性、酸碱度、溶解性来选择和调整。本实验中,福寿螺不同生长发育阶段的乙醇洗脱组分薄层层析使用的展层剂不同,说明了不同生长发育阶段的乙醇洗脱组分的成分存在差异。本实验用气相色谱-质谱法(GC-MS)分析各不同生长发育阶段抗菌活性最强的条带化学成分,结果表明,福寿螺不同生长发育阶段的抗菌物质的化学成分大部分是脂肪酸,这与提取溶剂乙酸乙酯是脂溶性溶剂有关,所以提取的成分大多是酸类物质。这些酸类物质能够抑制新陈代谢中某些酶或蛋白质的合成或活性发挥,或者抑制核酸的合成,或改变细胞通透性从而抑制代谢的进行而发挥抑菌效果。一般来说抑菌物质的分子结构特征与生物膜脂分子结构特征愈相似,则愈易进入菌体,从而更易发挥抑菌作用^[18]。福寿螺不同生长发育阶段所含有的酸类物质的种类及含量有差异,这是因为脂类在生物生长发育过程中起了重要的免疫作用。在生物生长发育过程中,脂肪酸的种类与

含量都会根据不同阶段的需要进行调整,这从福寿螺身上也体现出来,在螺苗级和仔螺级主要酸类物质是十六烷酸与十八烷酸,二者含量总和高达50%,这两种脂肪酸对机体的免疫具有重要作用。到了中螺级,体内出现了亚麻酸,这是一种很重要的必需脂肪酸,具有很强的抗菌、抗肿瘤、消炎作用。成螺级体内的脂类变化最明显,十六烷酸和十八烷酸未检测到,取而代之的是胆固醇。胆固醇是一种固醇类激素,与福寿螺的生殖生长发育有密切关系。

参 考 文 献

- [1] 周卫川. 外来入侵生物福寿螺的风险分析. 检验检疫科学, 2004, 14(6): 37~39.
- [2] 吕利华, 肖汉祥, 黄炳超等. 5%梅塔小颗粒剂防治稻田福寿螺试验. 广东农业科学, 2000, 4: 43~45.
- [3] 李安国, 陈岗兵, 龙品基. 45%三苯醋锡可湿性粉剂防治福寿螺试验. 广西植保, 1998, (1): 16~17.
- [4] 张加炳. 福寿螺对几种农药的毒力反应及田间药效试验. 汕头大学学报(自然科学版), 1993, 8(2): 71~78.
- [5] 李敬利, 金晓星. 福寿螺防治技术试验. 温州农业科技,

- 2003, (3): 8~ 10.
- [6] 陈秉瑶. 几种药剂防治稻田福寿螺试验. 广西植保, 1994, (2): 24~ 25
- [7] 沈忠明, 姚文, 钟显华等. 大瓶螺肉干营养成分研究. 重庆水产, 2001, (3): 35~ 37
- [8] 赵强基, 袁从伟, 郑建初等. 动物蛋白资源大瓶螺的开发利用研究. I. 大瓶螺动物蛋白的生产潜力与公害问题的澄清. 农村生态环境, 1992, (3): 26~ 31.
- [9] 李清漪, 曾和期. 大瓶螺碱性磷酸酶的分离纯化及部分性质研究. 生物化学杂志, 1995, 11(3): 363~ 365
- [10] 江红, 李清漪. 大瓶螺凝集素的分离纯化及部分性质研究. 生物化学杂志, 1996, 12(3): 352~ 356
- [11] 李清漪, 刘堰. 大瓶螺四种同工酶的电泳分析. 水产学报, 1995, 19(2): 184~ 186
- [12] 赵红, 张, 周兴旺等. 福寿螺 β -葡萄糖苷酶催化功能基团. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 292~ 296.
- [13] 陈清西, 石艳, 张 等. 福寿螺 β -葡萄糖苷酶在豚溶液中失活动力学研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 39(1): 102~ 106.
- [14] 傅先源, 王洪. 温度对福寿螺生长发育的影响. 水产学报, 1999, 23(1): 20~ 26.
- [15] 陈寅山, 郑怡, 卢海声等. 福建沿海 16 种海洋动物抗菌活性的筛选. 中国海洋药物, 1997, (4): 24~ 26
- [16] 江红霞, 郑怡, 林雄平. 蛋白核小球藻脂溶性化合物的抑菌活性及成份分析. 植物资源与环境学报, 2003, (1): 1~ 5.
- [17] 霍光华, 高荫榆, 陈明辉. 乌柏叶抑菌活性功能成分的研究. 食品与发酵工业, 2005, 31(3): 52~ 56
- [18] 宁正祥, 高建华, 秦燕等. 荔枝精油对西式火腿肠的保鲜效果. 食品与发酵工业, 1997, 23(4): 34~ 36.

图 版 说 明

A. 福寿螺四个不同发育阶段提取物粗品对赤皮病原菌的抑制效果: 1. 螺苗提取物; 2. 仔螺提取物; 3. 中螺提取物; 4. 成螺提取物. B. 螺苗三种不同洗脱组分对大肠杆菌的抑菌效果; C. 仔螺三种不同极性组分对大肠杆菌的抑菌效果; D. 中螺三种极性组分对大肠杆菌的抑菌效果; E. 成螺三种不同极性组分对大肠杆菌的抑菌效果. 1. 石油醚洗脱组分; 2. 苯洗脱组分; 3. 乙醇洗脱组分. F. 螺苗薄层层析后各条带对大肠杆菌的抑制效果: 1. 螺苗 R_f 0.59; 2. 螺苗 R_f 0.62; 3. 螺苗 R_f 0.68; 4. 螺苗 R_f 0.74. G, H. 仔螺薄层层析后各条带对甘薯薯瘟病原菌的抑制效果: 1. 仔螺 R_f 0.00; 2. 仔螺 R_f 0.16; 3. 仔螺 R_f 0.32; 4. 仔螺 R_f 0.37; 5. 仔螺 R_f 0.43; 6. 仔螺 R_f 0.52; 7. 仔螺 R_f 0.55; 8. 仔螺 R_f 0.61. I. 中螺薄层层析后各条带对普通变形杆菌抑制效果: 1. 中螺 R_f 0.00; 2. 中螺 R_f 0.56; 3. 中螺 R_f 0.61; 4. 中螺 R_f 0.66; 5. 中螺 R_f 0.72; 6. 中螺 R_f 0.81; 7. 中螺 R_f 0.87. J. 成螺薄层层析后各条带对肠炎病原菌的抑菌效果: 1. 成螺 R_f 0.00; 2. 成螺 R_f 0.12; 3. 成螺 R_f 0.40; 4. 成螺 R_f 0.47; 5. 成螺 R_f 0.59; 6. 成螺 R_f 0.71.

Explanation of Plate

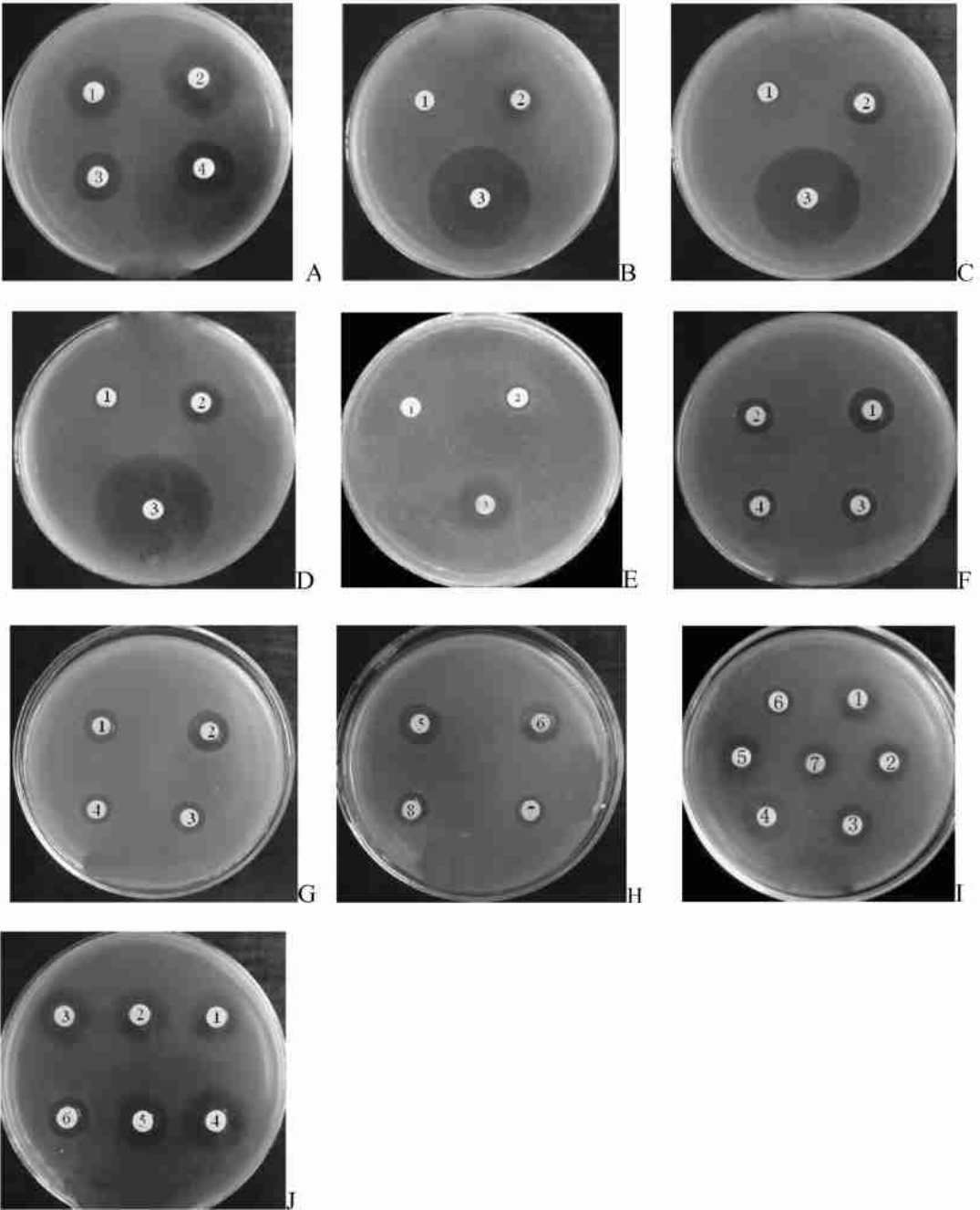
A. Activities of crude extracts of different developmental stages of *P. canaliculata* against *Pseudomonas fluorescens*: 1. Rank I; 2. Rank II; 3. Rank III; 4. Rank IV. B. Activities of different effluent fractions of Rank I from *P. canaliculata* against *Escherichia coli*; C. Activities of different effluent fractions of Rank II from *P. canaliculata* against *Escherichia coli*; D. Activities of different effluent fractions of Rank III from *P. canaliculata* against *Escherichia coli*; E. Activities of different effluent fractions of Rank IV from *P. canaliculata* against *Escherichia coli*: 1. Petroleum ether; 2. Benzene; 3. Ethanol. F. Activities of each fractions after TLC of Rank I from *P. canaliculata* against *Escherichia coli*: 1. R_f 0.59; 2. R_f 0.62; 3. R_f 0.68; 4. R_f 0.74. G, H. Activities of each fractions after TLC of Rank II from *P. canaliculata* against *Fusarium oxysporum*: 1. R_f 0.00; 2. R_f 0.16; 3. R_f 0.32; 4. R_f 0.37; 5. R_f 0.43; 6. R_f 0.52; 7. R_f 0.55; 8. R_f 0.61. I. Activities of each fractions after TLC of Rank III from *P. canaliculata* against *Proteus vulgaris*: 1. R_f 0.00; 2. R_f 0.56; 3. R_f 0.61; 4. R_f 0.66; 5. R_f 0.72; 6. R_f 0.81; 7. R_f 0.87. J. Activities of each fractions after TLC of Rank IV from *P. canaliculata* against *Aeromonas punctata*: 1. R_f 0.00; 2. R_f 0.12; 3. R_f 0.40; 4. R_f 0.47; 5. R_f 0.59; 6. R_f 0.71.

陈寅山等:福寿螺不同生长发育阶段的抗菌活性物质及化学成分分析

图版 I

CHEN Yir Shan *et al.*: The Antimicrobial Activities and Their Chemical Components of Lipid Substances in Different Developmental Stages of *Pomacea canaliculata*

Plate I



图版说明见文后