

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2012.04.010

常用萃取剂提取福寿螺卵中类胡萝卜素的初步研究

杨叶欣, 顾党恩, 牟希东, 宋红梅, 徐 猛, 李玺洋, 罗建仁, 胡隐昌*

中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380

摘要:【背景】福寿螺为世界性恶性入侵水生动物,也是我国公布的第一批外来入侵物种之一。福寿螺大量啃食为害水稻、茭白、白莲等重要农作物,对我国南方各省农业生产造成了巨大威胁,因此,预防和控制福寿螺灾害显得尤为重要。合理利用福寿螺能有效控制福寿螺的数量和危害,是生物防治的一个重要部分。福寿螺卵中含丰富的类胡萝卜素,充分利用螺卵中的类胡萝卜素能拓展福寿螺的利用途径和方法。【方法】为探寻福寿螺卵中类胡萝卜素的提取方法,本研究采用甲醇、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚等6种常用萃取剂提取福寿螺卵中类胡萝卜素,用紫外可见分光光度计测定其含量。【结果】结果显示,不同萃取剂中类胡萝卜素的提取量不同,醇类为较适合的提取液(甲醇>无水乙醇>丙酮)。【结论与意义】本研究对福寿螺卵中类胡萝卜素的提取方法进行了探索和研究,找出了合适的提取液,为拓展福寿螺的利用途径,以及福寿螺的综合防治提供了参考。

关键词: 福寿螺; 类胡萝卜素; 萃取剂

Total carotenoids in the eggs of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*

Ye-xin YANG, Dang-en GU, Xi-dong MU, Hong-mei SONG, Meng XU,
Xi-yang LI, Jian-ren LUO, Yin-chang HU*

Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River
Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510380, China

Abstract: 【Background】Apple snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck) is a worldwide invasive aquatic animal and is one of the first alien invasive species recognised by the State Environmental Protection Administration of China. It eats important crops such as rice, *Zizania aquatica*, white lotus and has caused a great threat to agricultural production in Southern China. The control of apple snails and the management of their damage has become a priority. There are many carotenoids in the eggs of the golden apple snail, rational utilization of the carotenoids means to expand the use of apple snails, and can effectively control the harm. 【Method】In order to research the extraction methods of carotenoid in the eggs of golden apple snail, total carotenoids were extracted using 6 different organic solvents, methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate, dichloromethane and petroleum ether. The resulting total carotenoid content in the extract was measured by ultraviolet-visible spectrophotometer. 【Result】The quantity of extracts varied in different solvents. Alcohols being the most suitable for extracting the carotenoids from the eggs (methanol > ethanol > acetone). 【Conclusion and significance】Our study researched the method of extract carotenoids in eggs of apple snail, and identified the appropriate extraction, which could help to develop means of utilisation of the eggs of this invasive species, and thus contribute to its control.

Key words: *Pomacea canaliculata*; carotenoid; extracts

福寿螺 *Pomacea canaliculata* Lamarck, 又名苹果螺, 隶属腹足纲中腹足目瓶螺科瓶螺属, 原产于南美洲, 为世界性入侵物种 (Naylor, 1996)。20 世纪 80 年代初作为淡水养殖新品种引入我国, 后因口味不佳没有市场, 被大量丢弃于自然界。由于福寿螺对环境适应强、繁殖快, 很快建立种群, 并啃食为害水稻、茭白、白莲等重要农作物, 给我国南方农业生产造成了巨大经济损失 (许燎等, 2008)。不同于其他水生动物, 福寿螺将卵产出粘于水面上方, 以此逃避水生动物的捕食, 并用鲜红色作为警戒色 (Albrecht *et al.*, 1996; Estebenet & Cazzaniga, 1993; Estebenet & Martín, 2002)。目前, 仅有报道显示, 热

带火蚁 *Solenopsis geminate* Fabr. 可捕食福寿螺卵 (Yusa,2001)。福寿螺繁殖力极强,在广州 1 只雌螺 1 年可产卵 20.4 块(约 4352.4 粒)(李承龄,1995)。激光拉曼光谱分析福寿螺卵壳中除含有六方碳钙石外,还含有类胡萝卜素(张刚生和郝玉兰,2005)。对螺卵周液蛋白研究发现,99% 的卵红蛋白类胡萝卜素为虾青素及其酯化物,每粒卵约含虾青素 1.5 nmol (Dreon *et al.*,2004)。可见,福寿螺卵中含丰富的类胡萝卜素。目前,有关福寿螺的研究主要涉及生物学(潘颖瑛等,2008;尹绍武等,2000)、养殖(敖鑫如,1990;毛盛贤,1989)、危害防治(湛美容等,2008;闫小红等,2011)及作为饲料蛋白源(成丽萍,2009;周维官和覃国森,2008);对螺卵的研究也主要集中在生物学特征(黄鹏等,2010;湛江华等,2011)及理化性质(Christeller,2005;Ituarte *et al.*,2010)方面。因此,本研究采用 6 种常用萃取剂对福寿螺卵中类胡萝卜素含量进行初步研究,以期 为福寿螺的综合防治和利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 福寿螺卵

采集珠江水产研究所内池塘边上附着的当天新产的卵块,整块取下。

1.2 试剂

甲醇、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚均为分析纯。

1.3 仪器

Eppendorf 离心机,UV-8000s 双光束紫外可见光分光光度计(上海元析仪器有限公司)。

1.4 试验方法

称取 0.05 g 福寿螺卵和 0.01 g 无水 Na₂SO₄ (脱水),取适量萃取液于研钵迅速研磨后置于离

管中定容至 15 mL,4 ℃ 冰箱过夜提取。浸提后于离心机 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上层清液测定。在 300 ~ 800 nm 波长范围内进行扫描,找出最大吸收峰所处的波长,在该波长下测定各组提取液的吸光值。

类胡萝卜素含量计算公式: $S = AKV/EG$

其中: S 为类胡萝卜素含量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), A 为吸光值, K 为常数(10^4), V 为提取液体积(mL), E 为吸光系数(2500), G 为样品质量(g)。

1.5 数据分析

用 Excel 进行平均值和标准差计算,用 SPSS15.0 对数据进行方差分析和 LSD 多重比较。

2 结果与分析

福寿螺卵中的色素易溶于甲醇、无水乙醇和丙酮,不易溶于乙酸乙酯、二氯甲烷和石油醚。6 种常用有机溶剂萃取福寿螺卵中总类胡萝卜素,在 471 ~ 474 nm 有最大吸收峰,本试验将测定波长设为 472 nm。结果表明,甲醇、无水乙醇提取液中的类胡萝卜素含量无显著差异;二氯甲烷和石油醚提取液中的类胡萝卜素含量差异也不显著;其他各组间差异显著。甲醇、无水乙醇和丙酮 3 种极性较强的提取液中类胡萝卜素含量明显高于其他 3 种提取液(表 1、2)。甲醇与乙醇提取的类胡萝卜素含量分别是丙酮提取液的 1.49 和 1.34 倍。

表 1 不同提取液类胡萝卜素含量方差分析

Table 1 ANOVA for total carotenoids content from different extracts

组群 Group	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	<i>F</i>	显著性 Sig.
组间 Between groups	26891.195	5	5378.239	144.025 *	0.000
组内 Within groups	672.163	18	37.342		
总数 Total	27563.358	23			

* 为差异显著 ($P < 0.05$)。
* means significantly different at the 0.05 probability level.

表 2 不同提取液类胡萝卜素含量 LSD 多重比较

Table 2 Multiple comparisons for total carotenoids content from different extracts

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

提取液 Extracting solvent	含量均值 Mean of content	石油醚 Petroleum ether	二氯甲烷 Dichloromethane	乙酸乙酯 Ethyl acetate	丙酮 Acetone	无水乙醇 Ethanol
甲醇 Methanol	83.23a	81.1549 *	80.0003 *	68.0519 *	27.4813 *	8.5153
无水乙醇 Ethanol	74.71a	72.6396 *	71.4850 *	59.5366 *	18.9660 *	
丙酮 Acetone	55.74b	53.6736 *	52.5190 *	40.5706 *		
乙酸乙酯 Ethyl acetate	15.17c	13.1029 *	11.9483 *			
二氯甲烷 Dichloromethane	3.23d	1.1546				
石油醚 Petroleum ether	2.07d					

* 为差异显著 ($P < 0.05$)。
* means significant difference at the 0.05 probability level.

3 讨论

类胡萝卜素是一类广泛存在的天然色素,具有清除自由基、抑制细胞增殖、防止细胞恶性转化、预防癌症等重要的生物学功能(赵文恩等,1998、2006)。迄今为止,人类在自然界中已发现600余种类胡萝卜素类化合物(Oliver,2000)。目前,类胡萝卜素的研究方法主要有分光光度法、薄层色谱法和高效液相色谱法等,分光光度法测定快速,成本低廉,是最常用的分析类胡萝卜素的方法(Piccaglia *et al.*,1998)。本研究结果表明,甲醇萃取率最高,而甲醇的极性也最大。可见,福寿螺卵中类胡萝卜素更易溶于极性较强的溶剂,且溶剂极性越大提取效率越高,与菊花 *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel 花瓣(车越等,2011)和紫苏粕 *Perilla frutescens* (L.) Britton(朱建飞等,2011)的研究结果一致,而与白果 *Ginkgo biloba* L.(黄文等,2001)相反。根据“相似相溶”规律,含氧类的类胡萝卜素在极性强的有机溶剂中的饱和溶解度高,只由碳氢组成的类胡萝卜素在非极性有机试剂中的饱和溶解度高(惠柏棣,2005)。推测,福寿螺卵中类胡萝卜素中极性较强的含氧衍生物含量较高,Dreon *et al.* (2004)在研究中发现,卵红蛋白类胡萝卜素中99%为虾青素及其酯化物,因而具有强抗氧化能力。

本研究中,甲醇提取的福寿螺卵中类胡萝卜素含量为(83.23±12.60) mg·kg⁻¹,高于番木瓜果肉(73.3 μg·g⁻¹)(郭鹏飞,2009)、紫苏粕(0.04 mg·g⁻¹)(朱建飞等,2011)和淫羊藿 *Epimedium grandiflorum* Morr. 叶片(29.25 μg·g⁻¹)(曾丽萍等,2011),低于菊花花瓣(3.8 mg·g⁻¹)(车越等,2011)和银杏渣(119.25 μg·g⁻¹)(唐仕荣等,2009)。类胡萝卜素的提取率不仅与有机溶剂的种类相关,而且受提取方法、时间、温度、体积比、光照及提取次数等影响(刘云等,2009;马利华等,2007;颜少宾等,2011;曾丽萍等,2011),因此,可以通过优化提取工艺来提高萃取率。

产于水面上方的福寿螺卵避开了水生动物的捕食,但面对更大的环境压力,如陆生动物捕食、阳光直射、干燥等。因此,在进化过程中福寿螺卵形成了一系列有效的防御对策,如卵中蛋白抑制因子可保护卵不被细菌侵袭(Christeller,2005)及其营养不被捕食者消化吸收(Dreon *et al.*,2010),类胡萝卜素—卵红蛋白可抵抗阳光照射(Heras *et al.*,2007),糖类化合物可抵御干燥(Ituarte *et al.*,2010),可编

码神经毒素(Heras *et al.*,2008)等,这样的繁殖策略为其入侵提供了有利条件,也为福寿螺防治和根除带来困难,因此,对福寿螺卵的合理开发利用,可以为福寿螺综合防治和利用开辟新思路。

参考文献

敖鑫如. 2011. 福寿螺的生活习性及其养殖试验. 南昌大学学报:理科版,(2):30-34.

车越,王普,孙卫,戴思兰. 2011. 10种提取液对菊花花瓣中类胡萝卜素提取效率的影响. 湖北农业科学,50(15):3152-3155.

湛江华,姚冬明,刘芳睿,陈若霞. 2011. 福寿螺卵和幼螺抗逆性的初步研究. 浙江农业科学,(4):902-905.

郭鹏飞,胡长鹰. 2009. 番木瓜中类胡萝卜素的提取. 中国调味品,34(1):95-99.

黄鹏,林兆里,徐金汉. 2010. 福寿螺卵期生物学特性. 福建农林大学学报:自然科学版,39(1):25-29.

黄文,谢笔钧,付勇,刘红东,彭光华. 2001. 白果中类胡萝卜素的提取. 江苏食品与发酵,(4):3-5.

惠柏棣. 2005. 类胡萝卜素化学及生物化学. 北京:中国轻工业出版社.

李承龄. 1995. 福寿螺的生长速度和繁殖力试验. 植物保护,21(4):12-14.

刘云,王保健,林亲雄,吴谋成. 2009. 油菜籽中天然类胡萝卜素的提取工艺研究. 食品工业科技,30(2):234-236.

马利华,秦卫东,宋慧,葛剑. 2007. 不同提取方法对牛蒡中类胡萝卜素含量的影响. 食品科技,(1):80-85.

毛盛贤. 1989. 福寿螺生态习性及其在北京地区养殖的可行性. 生物学通报,(3):36-40.

潘颖琰,董胜张,俞晓平. 2008. 温度胁迫对福寿螺生长、摄食及存活的影响. 植物保护学报,(3):239-244.

唐仕荣,宋慧,刘全德,潘志雨,张恩会. 2009. 银杏渣中类胡萝卜素的提取及柱层析研究. 食品工业科技,30(5):245-247.

许燎原,赖朝晖,李军进,吴龙根,杨筠文,吴降星. 2008. 宁波市福寿螺的发生为害与防治技术研究. 中国农技推广,(10):37-38.

颜少宾,张好艳,马瑞娟,俞明亮. 2011. 杏果肉中类胡萝卜素的提取方法研究. 江西农业学报,23(9):159-161.

闫小红,周兵,邹有,蒋平,许冬梅. 2011. 16种植物提取物对福寿螺杀螺效果的研究. 广东农业科学,38(4):81-84.

尹绍武,颜亨梅,王洪全. 2000. 福寿螺的生物学研究. 湖南师范大学自然科学学报,23(2):76-82.

曾丽萍,刘谊兰,王瑛. 2011. 淫羊藿叶片中类胡萝卜素的提取分析研究. 时珍国医国药,22(2):319-321.

湛美容,张天才,李晶. 2008. 垫江县福寿螺发生及防治对

- 策. 河北渔业, (1): 43–44, 56.
- 张刚生, 郝玉兰. 2005. 福寿螺卵壳的激光拉曼光谱分析. 分析仪器, (2): 27–29.
- 赵文恩, 韩雅珊. 1998. 类胡萝卜素的生物学性质. 生物学杂志, 15(3): 1–3.
- 赵文恩, 康保珊, 焦风云. 2006. 类胡萝卜素的抗癌作用与基因表达的联系. 生物学杂志, 23(2): 1–6.
- 朱建飞, 赖川, 唐春红. 2011. 紫苏粕中类胡萝卜素提取工艺参数的优化. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 37(6): 689–692.
- Albrecht E A, Carreno N B and Castro-Vazquez A. 1996. A quantitative study of copulation and spawning in the South American apple-snail, *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger*, 39: 142–147.
- Christeller J T. 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal*, 272: 5710–5722.
- Dreon M S, Ituarte S and Heras H. 2010. The role of the proteinase inhibitor ovorubin in apple snail eggs resembles plant embryo defense against predation. *PLoS ONE*, 5: e15059.
- Dreon M S, Schinella G, Heras H and Pollero R J. 2004. Antioxidant defense system in the apple snail eggs, the role of ovorubin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 422: 1–8.
- Estebenet A L and Cazzaniga N J. 1993. Egg variability and the reproductive strategy of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *APEX*, 8: 129–138.
- Estebenet A L and Martín P R. 2002. *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life-history traits and their plasticity. *Biocell*, 26: 83–89.
- Heras H, Dreon M S, Ituarte S and Pollero R J. 2007. Egg carotenoproteins in neotropical *Ampullariidae* (Gastropoda: Architaenioglossa). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146: 158–167.
- Heras H, Frassa M V, Fernández P E, Galosi C M and Gimeno E J. 2008. First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicon*, 52: 481–488.
- Ituarte S, Dreon M S, Pasquevich M Y, Fernandez P E and Heras H. 2010. Carbohydrates and glycoforms of the major egg perivitellins from *Pomacea* apple snails (Architaenioglossa: Ampullariidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 157: 66–72.
- Naylor R. 1996. Invasions in agriculture: assessing the cost of golden apple snail in Asia. *A Journal of the Human Environment*, 25: 443.
- Oliver J and Palou A. 2000. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *A Journal of Chromatography*, 881: 543–555.
- Piccaglia R, Marotti M and Grandi S. 1998. Lutein and lutein ester content in different type of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Industrial Crops and Products*, 8: 45–51.
- Yusa Y. 2001. Predation on eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) by the fire ant *Solenopsis geminata*. *Journal of Molluscan Studies*, 67: 275–279.

(责任编辑: 彭露)

