

• 研究论文 •

夹竹桃叶提取物对福寿螺的杀螺活性

董道青^{1,2}, 陈建明^{*1}, 俞晓平¹, 陈列忠¹

(1. 浙江省农业科学院 植物保护与微生物研究所, 杭州 310021; 2. 杭州师范大学 生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要: 从夹竹桃叶中筛选杀灭福寿螺的活性成分。采用浸渍法研究了夹竹桃叶的乙醇粗提物和组分 I 对不同日龄福寿螺的毒杀和抑制作用。结果表明: 组分 I 浸渍 10、30 和 50 日龄螺 6 h 的 LC_{50} 值分别为 2.86、5.87 和 8.68 mg/L; 浸渍 24 h 的 LC_{50} 值分别为 0.98、2.31 和 3.16 mg/L, 其中 2 mg/L 的组分 I 浸渍 10 日龄螺 24 h 的死亡率为 100%。乙醇粗提物对福寿螺的毒杀效果较差, 用其 100 mg/L 浸渍 10 日龄和 30 日龄螺 72 h 的死亡率均为 100%, 浸渍 50 日龄螺 120 h 时, 死亡率 100% 时的质量浓度达到 200 mg/L。但乙醇粗提物和组分 I 各浓度对福寿螺的活动均无抑制作用, 反而有促进其上爬的作用。

关键词: 夹竹桃叶; 乙醇提取物; 组分 I; 福寿螺; 杀螺活性

中图分类号: S482.39

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)01-0109-05

Molluscicidal Activity of Ethanol Extracts from *Nerium indicum* Leaves on *Pomacea canaliculata*

DONG Dao-qing^{1,2}, CHEN Jian-ming^{*1}, YU Xiao-ping¹, CHEN Lie-zhong¹

(1. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;

2 College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310016, China)

Abstract In order to find molluscicidal active components from *Nerium indicum* leaves on golden apple snail (GAS), *Pomacea canaliculata* (Lamarck), the lethal and inhibition effect of ethanol crude extracts and component I from *N. indicum* leaves against different-day old GAS was conducted by the snail-immersed method. The results showed that the LC_{50} value of component I against GAS of 10, 30 and 50 days old were 2.86, 5.87 and 8.68 mg/L on 6 h after treatment, respectively, and were 0.98, 2.31 and 3.16 mg/L on 24 h, respectively. Treated with 2 mg/L of component I for 24 h, the mortality of 10 d-old GAS reached 100%. When treated with 100 mg/L ethanol crude extracts for 72 h, the mortality of 10 d-old and 30 d-old GAS all reached 100%; and the mortality of 50 d-old GAS also reached 100% when treated with 200 mg/L extract for 120 h. Both ethanol crude extract and component I had no inhibitory effect on activities of GAS, but promoted upward climbing of GAS.

Key words *Nerium indicum* leaves; ethanol crude extracts; component I; *Pomacea canaliculata*; molluscicidal activity

福寿螺 *Pomacea canaliculata* Lamarck 是我国及其他亚洲国家农业生产上的一种恶性水生动物,

严重危害水稻、蔬菜及水生植物等^[1], 2003 年被原国家环保总局列为 16 种“危害最大的外来物

收稿日期: 2008-08-12; 修回日期: 2008-12-01.

作者简介: 董道青 (1982-), 女, 山东济南人, 硕士研究生, E-mail: whyl20062002@163.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 陈建

明 (1963-), 男, 浙江天台人, 博士, 研究员, 从事有害生物防治和生物农药研究. 联系电话: 0571-86400486 E-mail: chenjm63@yahoo.com.cn

基金项目: 浙江省重大科技项目 (2006C12120); 浙江省农科院重点实验室开放课题 (2006R17A00D02); 宁波市科技计划项目 (2007C10022).

©1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

种”之一。福寿螺还能传播“广州管圆线虫病”,严重威胁着人类的身体健康。目前,防治福寿螺的方法主要是人工拾螺和喷施化学杀螺剂,但人工拾螺成本高且效果不明显,化学杀螺对皮肤刺激性大,且对水生生物的毒性较大。为此,探索研究高效、安全和环境友好型的杀螺剂,尤其是从中草药植物资源中寻找杀螺高效成分研制选择性杀螺剂尤为重要。目前虽已筛选出多种毒杀钉螺的杀螺植物^[2~4],但有关植物源活性成分毒杀福寿螺的研究报道尚不多^[5~7],且大都局限在植物粗提物的生物测定阶段。作者利用乙醇提取和硅胶柱层析方法从夹竹桃叶中制备粗提物和活性组分,通过试验评价了其不同日龄福寿螺的生物活性。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 福寿螺 于2008年5月在浙江省余姚市河姆渡镇茭白生产基地采集螺卵,待其孵化后置于26℃恒温光照培养箱中以浮萍饲养待用。使用时分别选取个体大小一致的10、30和50日龄福寿螺供试。

1.1.2 夹竹桃叶原粉 夹竹桃 *Nerium indicum* M. 叶采自浙江省农业科学院院外路旁,用清水洗净后置烘箱中60℃烘干72 h,粉碎后得夹竹桃叶原粉,待用。

1.1.3 试剂 3,5-二硝基苯甲酸为化学纯,其余均为分析纯(杭州常青化工有限公司产品)。

1.2 仪器与设备

GXZ智能型光照培养箱(宁波江南仪器厂),BSZ-100部分收集仪(上海沪西分析仪器厂),硅胶(200~300目)和GF₂₅₄硅胶板(青岛海洋化工厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 乙醇粗提物和组分的制备 采用索氏提取法,参考陈业高^[8]的提取方法并作修改。称取夹竹桃叶原粉50 g加入质量分数为70%的乙醇250 mL,在室温(25℃)下提取8 h,得乙醇提取液。多次重复该过程,得到乙醇提取液。取部分乙醇提取液减压浓缩后得乙醇粗提物,保存用于试验。其余部分的乙醇提取液在冷却后加入活性炭(每250 mL提取液中加0.625 g),回流脱色20 min,趁热过滤后减压浓缩,在室温下用氯仿反复萃取,直至提取液对Kedde反应(质量分数为2%的

3,5-二硝基苯甲酸的乙醇液与5%的氢氧化钠的乙醇液,用前等量混合,遇强心甙显紫红色,几分钟后褪色)呈弱为止。合并氯仿萃取液减压浓缩至适量。以乙酸乙酯-氯仿-正己烷(体积比9:1:1)为洗脱液平衡硅胶柱(ϕ 25 mm $\times$ 650 mm),取5 mL氯仿浓缩液进行柱层析,使用部分收集仪自动分管收样,流速2.5 mL/min,每管收集15 mL,逐管TLC检测组分(25%三氯乙酸氯仿液喷射后于110℃下加热5 min,日光灯下显蓝绿色^[9])。合并R_f值相近的两个组分,其中,16~22管合并后浓缩至粘稠状,加少量乙醇溶解,于室温下静置,析出结晶用无水乙醇多次洗涤,得无色针状结晶(组分I)100 mg。23~50管合并、浓缩后加少量甲醇溶解,静置析出结晶,用甲醇多次洗涤,得无色颗粒状结晶(组分II)19.5 mg。预试验结果表明,两个组分均对福寿螺显示杀螺活性,但其组分I活性高于组分II,故用组分I和乙醇粗提物进行试验评价其对不同日龄福寿螺的毒杀和抑制活性。

1.3.2 生物活性测定

1.3.2.1 杀螺活性测定 参考骆悦等和Vasconcelos等^[6,10]方法。准确称取组分I和乙醇粗提物,先分别用丙酮和乙醇配成高浓度母液,再按等倍法用水稀释,分别配制浓度为16、8、4、2、1 mg/L和400、200、100、50、25 mg/L的溶液待用。分别以体积分数0.2%的丙酮水溶液和0.4%的乙醇水溶液作对照,每处理重复4次。在盛有200 mL药液的500 mL烧杯中各放入同龄螺(10、30和50日龄,每只平均体重分别为0.02、0.10和0.67 g)20只和少量浮萍食料,纱布封口。分别浸渍6、12 h和1~7 d后按Santos等方法^[11]判断福寿螺死亡数,计算死亡率。

1.3.2.2 抑制上爬活性测定 在500 mL烧杯中加入200 mL浓度分别为400、200、100、50 mg/L的乙醇粗提物和16、8、4、2 mg/L的组分I,对照处理同上,放入50日龄螺20只,纱布封口,分别在处理后6、12和24 h观察记录福寿螺爬出液面外的数量并计算其上爬率。

2 结果与分析

2.1 乙醇粗提物杀螺活性

图1显示,用400、200、100、50和25 mg/L的

乙醇粗提物处理 10、30 和 50 日龄螺, 各同龄螺的死亡率与药物剂量和处理时间均呈明显的正相关。用 100 和 200 mg/L 的乙醇粗提物分别处理 10 日龄和 30 日龄螺 72 h 及 50 日龄螺 120 h, 其死

亡率均为 100%。表 1 是将图 1 的结果按 LC_{50} 值进行统计分析后的结果。可见乙醇粗提物对福寿螺的毒杀活性随螺龄增加而下降, 随处理时间延长而提高。

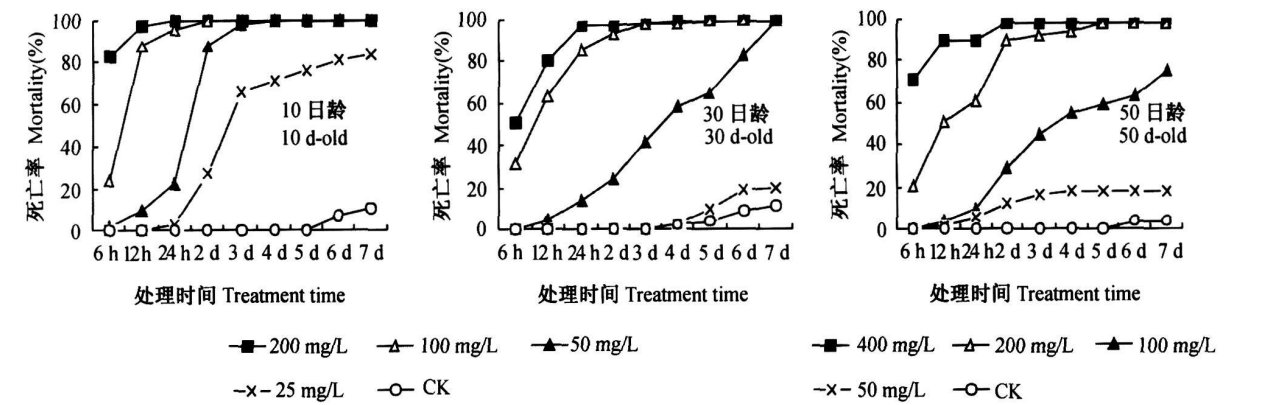


图 1 乙醇粗提物对不同日龄福寿螺的杀螺活性
Fig. 1 Molluscicidal activity of ethanol crude extracts from *N. indicum* leaves on *P. canaliculata* with different ages

表 1 乙醇粗提物对不同日龄福寿螺的 LC_{50} 值

Table 1 LC_{50} value of ethanol crude extracts from *N. indicum* leaves to *P. canaliculata*

螺龄 Different ages of snail/d	处理时间 Treatment time/h	LC_{50} /(mg/L)	回归方程 Regression equations	相关系数 Correlation coefficients
10	6	151.24	$Y = -2.92 + 3.63x$	0.9342
	12	74.73	$Y = -7.53 + 6.69x$	0.8915
	24	60.02	$Y = -7.16 + 6.84x$	0.9468
30	6	255.93	$Y = 2.56 + 1.01x$	0.9264
	12	125.47	$Y = -0.80 + 2.77x$	0.9202
	24	73.08	$Y = -5.89 + 5.84x$	0.9538
50	6	297.15	$Y = -6.69 + 4.73x$	0.9998
	12	199.44	$Y = -5.50 + 4.57x$	0.9673
	24	171.15	$Y = -3.30 + 3.72x$	0.9674

2.2 组分 I 的杀螺活性

图 2 显示, 分别用 16、8、4、2、1 和 0.5 mg/L 的组分 I 浸渍 10、30 和 50 日龄螺, 不同日龄螺的死亡率与药物浓度和浸渍时间均呈明显正相关。用 4 mg/L 的组分 I 处理 10 日龄和 30 日龄螺 24 h, 其死亡率均为 100%, 用 8 mg/L 的组分 I 处理 50 日龄螺 72 h, 其死亡率也达 100%。表 2 是将图 2 结果按 LC_{50} 值进行统计分析后的结果, 可见组分 I 毒杀福寿螺的活性随螺龄增加而下降, 随处理时间延长而提高。

2.3 乙醇粗提物和组分 I 对福寿螺上爬的影响

不同浓度的乙醇粗提物和组分 I 对福寿螺的活动无抑制作用, 反而有促进其上爬的作用 (见图 3)。

清水处理 (CK) 的福寿螺, 其浸泡 24 h 的上爬率 < 10%。乙醇粗提物处理后, 福寿螺上爬率明显高于对照, 但不同浓度处理的上爬率变化无明显规律性。除 2 mg/L 外, 组分 I 其余处理与乙醇粗提物的处理结果相似。

3 讨论

夹竹桃属常绿直立灌木, 栽培广泛。夹竹桃叶在传统医学中用于治疗毒蛇咬伤, 全株或其根、茎、叶、花组织的提取物对农业害虫 (蝗虫) 等也具有毒杀作用^[12-14]。从夹竹桃中已分离到各种强心甙、甾类、萜类等化学成分, 并证明其具有镇痛

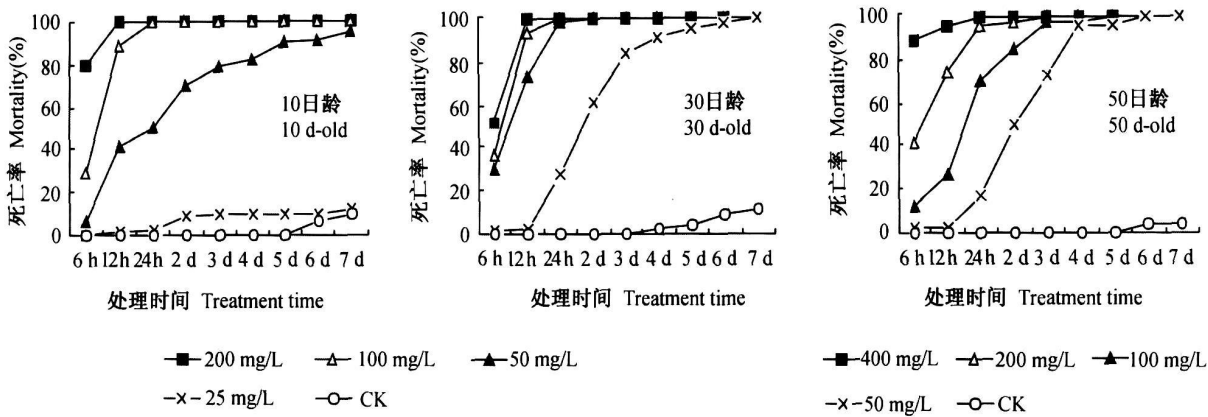


图 2 组分 I 对不同日龄福寿螺的杀螺活性

Fig 2 Molluscicidal activity of component I from *N. indicum* leaves on *P. canaliculata* with different ages

表 2 组分 I 对不同日龄福寿螺的毒杀作用

Table 2 Bioassay results of component I from *N. indicum* leaves on *P. canaliculata*

螺 龄 Different ages of snail/d	处理时间 Treatment time/h	LC ₅₀ /(mg/L)	回归方程 Regression equations	相关系数 Correlation coefficients
10	6	2.86	$Y = 3.61 + 3.05x$	0.9559
	12	1.15	$Y = 4.68 + 5.43x$	0.9936
	24	0.98	$Y = 5.08 + 7.43x$	0.9894
30	6	5.87	$Y = 1.73 + 4.25x$	0.9810
	12	3.60	$Y = 2.02 + 5.37x$	0.9355
	24	2.31	$Y = 1.57 + 9.41x$	0.8647
50	6	8.68	$Y = 1.46 + 3.77x$	0.9802
	12	5.62	$Y = 2.06 + 3.92x$	0.9982
	24	3.16	$Y = 2.66 + 4.68x$	0.9959

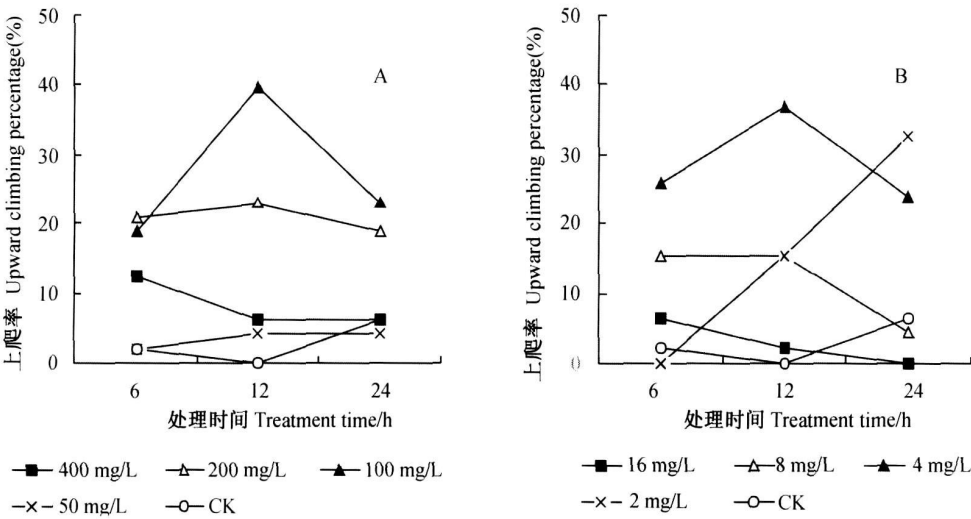


图 3 乙醇粗提物及组分 I 对福寿螺上爬率的影响

Fig 3 Effects of crude extracts and component I from *N. indicum* leaves on upward climbing percentage of *P. canaliculata*

A. 乙醇粗提物 Crude extract B. 组分 I Component I

和去瘀功效^[15-17]。有关夹竹桃对钉螺毒杀作用的研究报道较多^[3, 18-20], 且主要采用夹竹桃叶的粗提物进行试验, 但有关其对福寿螺影响的研究报道仅见作者一例^[7]。本文报道了夹竹桃乙醇粗提物及其活性组分 I 对不同日龄福寿螺的杀螺活性, 表明其杀螺剂量远远低于 WHO 专家委员会规定的相关有效标准^[21]。

本文中的组分 I、组分 II 是参考陈业高的方法从夹竹桃中分离出来的, 文献记载按此方法提取的物质经鉴定为强心甙^[8], 推测组分 I 和组分 II 可能是强心甙, 具体结构尚待进一步确证。强心甙是一类对心肌有兴奋作用的甙体化合物, 其基本结构是由甾醇母核和连在 C₁₇位上的不饱和共轭内酯环构成甙元部分, 然后通过甾醇母核 C₃位上的羟基和糖缩合而成。强心甙成分多为无色结晶或无定形粉末, 对粘膜有刺激性, 主要分布在 17 个以上科的数百种植物中, 其中以夹竹桃科、萝藦科、百合科、十字花科植物的分布最广^[8]。有关强心甙对福寿螺的毒杀作用尚未见报道。

夹竹桃对福寿螺的杀灭活性高且原材料简便易得, 具有研发新杀螺剂的潜力。有关夹竹桃成分的杀螺机理尚不清楚, 但有文献报道可能与开启或抑制其体内某些位点基因酶的合成^[22]或者是扰乱肝代谢、破坏膜系统有关, 最终导致肝功能衰竭而死亡^[3]。另外, 作者在试验中还发现清水对照的福寿螺如果同时饲喂食物, 其自然上爬数很少, 而在一定浓度的药液中, 其上爬率明显增加, 当药液达到一定浓度时, 则抑制其上爬, 这与夹竹桃浸泡钉螺的抑制上爬作用现象有所不同^[6]。

参考文献:

- [1] CHEN Jian-ming(陈建明), YU Xiao-ping(俞晓平), ZHENG Xu-song(郑许松), et al 茭白田福寿螺的生物学特性和无害化治理技术 [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis(浙江农业学报), 2003, 15(3): 154-160.
- [2] WANG Wan-xian(王万贤), YANG Yi(杨毅), WANG Hong(王宏), et al 夹竹桃对钉螺的毒杀作用及机理研究 [J]. Acta Hydrobiologica Sinica(水生生物学报), 2007, 31(3): 448-452.
- [3] WANG H, CAI W M, WANG W X, et al Molluscicidal Activity of Nerium indicum Mill, Pterocarya stenoptera DC, and Rumex japonicum Houtt on Oncomelania hupensis [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2006, 19: 245-248.
- [4] XIANG Xiu-li(项秀丽), YANG Yi(杨毅), WANG Wan-xian(王万贤), et al 绞股蓝总皂甙灭螺活性研究 [J]. J Hubei Univ, Nat Sci(湖北大学学报, 自然科学版), 2008, 30(1): 87-89.
- [5] LUO Yue(骆悦), ZENG Xin-nian(曾鑫年), ZHANG Shuai(张帅), et al 钩吻总碱及粗提物的杀螺活性研究 [J]. Chin Agric Sci Bull(中国农学通报), 2004, 20(6): 243-246.
- [6] LUO Yue(骆悦), ZENG Xin-nian(曾鑫年), JU Jian-hua(居建华), et al 40种植物甲醇提取物的杀螺活性研究 [J]. Plant Protection(植物保护), 2005, 31(1): 31-34.
- [7] YU Xiao-ping(俞晓平), CHEN Jian-ming(陈建明). Study on Techniques of High Efficiency and Safety Production of Zizania(茭白高效安全生产大全) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 2007: 256-259.
- [8] CHEN Ye-gao(陈业高). Chemical Composition of Plants(植物化学成分) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2004: 194-206.
- [9] SHA Shi-yan(沙世炎). Analysis Methods on Active Components of Chinese Herbs The First Volume(中药有效成分分析法, 上册) [M]. Beijing(北京): People Hygiene Press(人民卫生出版社), 1982: 104-106.
- [10] VA SCONCELLOS M C, AMOR M A. Molluscicidal Action of the Latex of Euphorbia splendens var hispidii N. E. B. ("Christ's Crown") (Euphorbiaceae) against Lymnaea columella (Say, 1817) (Pulmonate Lymnaeidae). Intermediate Host of Fasciola hepatica Linnaeus 1758 (Trematode Fasciolidae). 1-Test in Laboratory [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003, 98(4): 557-563.
- [11] SANTOS J A, TOMASSINI T C, XAVIER D C, et al. Molluscicidal Activity of Physalis angulata L. Extracts and Fractions on Biomphalaria tenagophila (d'Orbigny, 1835) under Laboratory Conditions [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003, 98(3): 425-428.
- [12] SINGH S, SINGH D K. Molluscicidal Activity of Nerium indicum Leaf [J]. Fitoterapia, 1997, 68(6): 545-546.
- [13] ZHENG Xu-song(郑许松), YU Xiao-ping(俞晓平), LV Zhong-xian(吕仲贤), et al 夹竹桃叶提取物对茭白二化螟的生物活性 [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis(浙江农业学报), 2003, 15(3): 167-171.
- [14] LIN Tong(林同), LIRong-bin(黎荣彬), LU Ning-jiang(陆宁将). 夹竹桃、鱼藤、乌柏对锈同心舟蛾的毒杀活性 [J]. Chinese Bull Entom(昆虫知识), 2006, 43(4): 517-519.
- [15] YAMAUHJI TAKATA, M MURA T. Cardiac Glycosides of the Leaves of Nerium odorum [J]. Phytochemistry, 1975, 14: 1379-1382.
- [16] BEGUM S, SULTANA R, SIDDIQUI B S. Triterpenoids from the Leaves of Nerium oleander [J]. Phytochemistry, 1997, 44(2): 329-332.
- [17] DONG Dao-qing(董道青), CHEN Jian-ming(陈建明), YU Xiao-ping(俞晓平). 夹竹桃植物的杀螺活性及其杀螺机理研究进展 [J]. Hubei Agric Sci(湖北农业科学), 2008, 47(Suppl): 57-60.
- [18] WANG Wan-xian(王万贤), YANG Yi(杨毅), WANG Hong(王宏), et al 夹竹桃强心总甙杀螺活性与机理 [J]. Acta Ecologica Sinica(生态学报), 2006, 26(3): 954-959.
- [19] LIU Ying-fang(刘颖芳), PENG Yu(彭宇), LIU Feng-xiang(刘凤想). 夹竹桃、樟树杀螺活性成分的初步提取 [J]. J Hubei Univ, Nat Sci(湖北大学学报, 自然科学版), 2006, 28(1): 81-83.
- [20] WANG Wan-xian(王万贤), ZHANG Yong(张勇), YANG Yi(杨毅), et al 钉螺对夹竹桃化感物质三帖总皂甙毒理作用的反应 [J]. Acta Zoologica Sinica(动物学报), 2008, 54(3): 489-499.
- [21] WHO. Molluscicide Screening and Evaluation [J]. Bull WHO, 1965, 33: 567.
- [22] WU Liang(吴亮), CHEN Sheng-xia(陈盛霞), YANG Xiao-ming(杨小明). 植物杀螺剂及其杀螺机理的研究进展 [J]. J Jiangsu Univ, Medical(江苏大学学报, 医学版), 2007, 17(1): 87-90.

(Ed. JIN SH)