

紫贻贝贝壳和脉红螺厖中色素的提取与鉴定

郝世鑫^{1,2}, 侯 鑫³, 孙东方¹, 于文超¹, 何 成¹, 王晓通¹

(1. 鲁东大学 农学院, 山东 烟台 264025; 2. 山东海洋资源与环境研究院, 山东 烟台 264006; 3. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 为了确定紫贻贝(*Mytilus edulis*)贝壳与脉红螺厖中的黑色物质是否为黑色素这一物质, 作者实验选取紫贻贝贝壳和脉红螺(*Rapana venosa*)厖, 清洗干净, 之后分别对两份样品进行研磨粉碎、称量、盐酸浸泡、沸水浴加热、乙醚纯化等步骤后, 将得到的黑色提取物质用 0.01 ml/L 氢氧化钠水溶液溶解, 在 190~500 nm 的范围内测定紫外吸收光谱, 发现两份样品最大吸收峰都在 210~220 nm, 随波长增加, 其吸光值下降, 与公认的黑色素紫外吸收光谱特征一致; 另外将提取的两份黑色固体物质分别用溴化钾压片后进行傅里叶红外光谱扫描, 其红外图谱都在 3 μm 和 6 μm 处分别有特征吸收峰, 亦与公认的黑色素红外扫描图谱特征一致, 从而首次确定紫贻贝贝壳和脉红螺厖中的黑色物质为黑色素, 提示黑色素在贝类中可能是广泛存在的。

关键词: 紫贻贝(*Mytilus edulis*)贝壳; 脉红螺(*Rapana venosa*)厖; 黑色素鉴定; 紫外吸收光谱; 傅里叶红外扫描图谱

中图分类号: P735 文献标识码: A
doi: 10.11693/hyhz20150731005

文章编号: 1000-3096(2015)11-0049-05

紫贻贝(*Mytilus edulis*)隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、异柱目(Anisomyaria)、贻贝科(Mytilidae)、贻贝属(*Mytilus*)。贻贝种类很多, 仅中国沿海就有 30 多种, 其中经济价值较高的有 10 多种。脉红螺(*Rapana venosa*)属软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、新腹足目(Neogastropoda)、骨螺科(Muricidae)、红螺属(*Rapana*), 自然分布于西北太平洋的日本海、渤海、黄海、东海等海域, 是重要的经济物种。

黑色素(Melanin)主要是由酪氨酸氧化反应, 随后通过聚合反应, 而产生的一种生物多聚体, 是生物色素中分布范围最广的色素之一^[1], 一般呈黑色或棕褐色, 广泛存在于动植物中, 是一种难溶于水、酸及有机溶剂的生物大分子^[2]。随着对天然黑色素的深入研究, 人们发现, 天然的黑色素存在巨大的潜在价值和药理, 在化妆品和功能性食品等领域有广泛应用^[3]。目前人们对细菌、海绵(Spongiatia)^[4]、真菌^[5]、鲰鱼(*Heteropneustes fossilis*)^[6]、乌鸡(*Gallus gallus*)^[7]中的黑色素都有一定程度的研究与开发。本研究团队曾经发现长牡蛎外套膜、贝壳和闭壳肌痕处均存在黑色素, 但黑色素在贝类的其他器官或者其他贝类中是否存在, 目前尚不明确。

作者发现紫贻贝的贝壳和脉红螺的厖呈现黑色或黑红色, 但目前还没有实验证明其中的黑色物质是何种成分, 本实验计划提取这两处部位中的黑色物质并进行鉴定, 希望可以确定紫贻贝贝壳和脉红螺厖中是否含有黑色素。

1 材料与方法

1.1 试验样品

本实验选取山东省烟台市海滨的紫贻贝与脉红螺为实验材料, 购于鲁东大学农贸市场。紫贻贝贝壳与脉红螺厖的示意图如图 1 所示。

1.2 实验仪器与试剂

TU-1810 紫外分光光度计、傅里叶红外光谱仪、电热恒温水浴锅、电热套、电子密度天平、冷凝管、烧杯、索氏提取器、抽滤器、研钵、布氏漏斗、玻

收稿日期: 2015-07-31; 修回日期: 2015-08-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31302181); 山东省重点研发计划(2015GSF115013); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2013CM026); 烟台市科技发展计划资助项目(2013ZZ357)

作者简介: 郝世鑫(1992-), 男, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事海洋贝类学研究, 电话: 18253557506, E-mail: 852030869@qq.com; 王晓通, 通信作者, 副教授, 电话: 15589582318, E-mail: wangxiaotong999@163.com



图1 紫贻贝贝壳与脉红螺厖的示意图

Fig.1 Shells of *Mytilus edulis* and operculum of *Rapana venosa*

左边为紫贻贝, 右边为脉红螺

Left is *Mytilus edulis*, right is *Rapana venosa*

璃棒等。所用实验试剂包括盐酸、氢氧化钠、溴化钾、乙醚、蒸馏水等。

1.3 两种实验样品中色素的提取

1.3.1 材料处理

分别将紫贻贝贝壳和脉红螺厖清理干净。

1.3.2 粉碎

在 60 °C 烘箱中烘干一夜, 至完全去除水分, 用研钵将 2 份样品分别研磨成精细的粉末。

1.3.3 浸泡水解

1.3.3.1 贻贝贝壳

共称量贝壳粉末 140 g 平分两份各置于 1 000 mL 的烧杯中, 分别将 280 mL 的 6 mol/L 的盐酸缓慢倒入两烧瓶中, 边倒边用玻璃棒搅拌; 此步骤应格外注意, 倒入盐酸时要缓缓倒入, 否则会因反应过于剧烈而溢出烧杯; 置 12 h 以上使其充分反应。

1.3.3.2 脉红螺厖

共取厖粉末 32.5 g 置于 1 000 mL 的烧杯中, 将 130 mL 的 6 mol/L 的盐酸缓慢倒入烧瓶中; 进行此步骤时, 不会像使用盐酸浸泡贻贝贝壳一样反应剧烈, 其原因可能是两样品中成分有所差异造成的; 置 12h 以上使其充分反应。

1.3.4 沸水浴

1.3.4.1 贻贝贝壳

经 12 h 浸泡, 贝壳壳粉能被溶解大部分, 将浸泡过贝壳粉末的盐酸溶液弃去少许, 留残渣, 将带有残渣的剩余液体倒入 1 000 mL 圆底烧瓶中, 再加 6 mol/L 盐酸溶液 420 mL, 安装上冷凝管装置置于电热套上沸水浴加热 1 h; 目的是进一步增加反应完全度, 这一步也可以使壳中可能存在的微量蛋白质彻底变性而沉淀, 以免对实验结果产生影响。经此步

骤, 残渣基本完全溶解, 只留有微量的固体物质。

1.3.4.2 脉红螺厖

经 12 h 以上的浸泡之后, 仍残留大量残渣, 将浸泡过厖粉末的盐酸溶液弃去上清留残渣, 将残渣倒入 1 000 mL 圆底烧瓶中再加 6 mol/L 盐酸溶液 195 mL, 安装上冷凝管装置置于电热套上沸水浴加热 1 h, 使其进一步反应充分。在沸水浴结束时, 同贻贝贝壳一样, 只留有些许固体物质, 其余都已溶解。

1.3.5 抽滤

取下圆底烧瓶, 待冷却后, 将瓶内的液体用布氏漏斗抽滤, 弃去滤液, 保留滤渣。注意上述步骤中是将贻贝贝壳均分为 2 份同时进行的, 所以在此步骤抽滤时也应两份同时抽滤。

1.3.6 脱脂

将滤渣用滤纸包好, 置于索氏提取器中, 用乙醚在 42 °C 左右的水浴中脱脂, 待索氏管中乙醚呈现出澄清状态, 约为 1 h 左右, 脱脂结束, 再将滤纸包取出, 在抽滤装置上用蒸馏水反复洗涤多次。

1.3.7 干燥

最后在 80 °C 恒温干燥箱中烘干滤纸包, 取下滤纸上的黑色固体物质。

1.4 样品部位处色素的鉴定

1.4.1 紫外光谱鉴定

将紫贻贝贝壳和脉红螺厖中提取的黑色固体物质各取微量, 分别溶解在少量的 0.01 mol/L 氢氧化钠水溶液中, 并用同样的氢氧化钠水溶液作为空白对照, 在 190~500 nm 的范围内进行紫外光谱扫描, 得到的数据使用 Origin 软件制作吸收曲线。

1.4.2 红外光谱鉴定

按照 1 : 100 比例各取微量两种样品提取的黑色固体粉末与 KBr 干粉混合, 研磨均匀后压片, 测定 500~4 000 cm⁻¹ 的红外光谱, 然后进行对比分析。

1.5 色素提取率的计算

色素提取率即提取得到的色素量占样品总量的百分比, 计算公式为

$$\text{色素提取率} = \frac{\text{提取色素量(g)}}{\text{样品总量(g)}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 2 份样品中的色素提取率

2.1.1 紫贻贝贝壳色素提取率

本次实验取贻贝贝壳共 140 g, 经实验提取, 得

到 0.092 g 的色素样品, 所以贻贝壳的色素提取率为 0.066%。

2.1.2 脉红螺厖色素提取率

本次试验取脉红螺厖共 32.5 g, 经实验提取, 得到 0.011 g 的色素样品, 所以脉红螺厖的色素提取率为 0.034%。

2.2 紫贻贝壳中色素的光谱特征

2.2.1 紫贻贝壳中色素的紫外光谱特征

紫贻贝壳中色素的紫外光谱扫描结果如图 2 所示。光谱扫描结果表明, 紫贻贝壳中的色素在紫外波长下存在明显吸收特征, 并有最大吸收峰, 其最大值在 214 nm 处(图 2), 并且随着波长的增加, 其吸光值也下降, 与 Bell^[8]报道的黑色素紫外吸收特征一致。

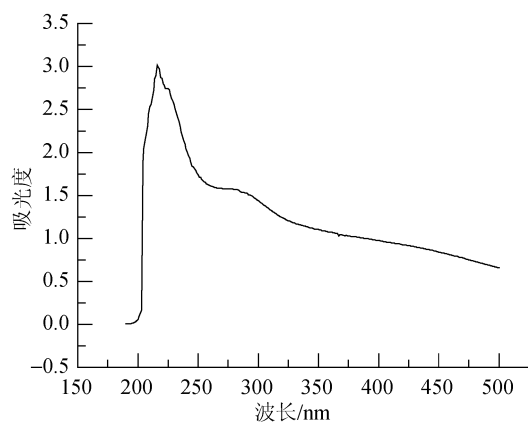


图 2 紫贻贝壳中色素的紫外扫描图谱

Fig.2 UV absorption spectra: pigment in the *Mytilus edulis* shells

2.2.2 紫贻贝壳中色素的红外光谱特征

紫贻贝壳中色素的红外光谱扫描结果如图 3 所示。从图中可见, 本实验所提取的紫贻贝壳中色素的特征吸收峰主要集中在以下 3 组峰: 3 500~3 300 cm^{-1} 、1 620~1 600 cm^{-1} 和 1 150~1 000 cm^{-1} , 其中 3 440 cm^{-1} 处强吸收峰是由 O—H 和吡啶的 N—H 伸缩振动产生的, 1 630 cm^{-1} 附近吸收峰为真黑色素的吡啶环归属, 1 095 cm^{-1} 处的吸收峰, 部分由烷烃中 C—CH₃ 的弯曲和骨架振动吸收参与形成^[9-10]。动物源黑色素多属吡啶型, 根据构成黑色素结构单元骨架是吡啶还是苯丙噻嗪, 又将动物黑色素分为真黑色素和脱黑色素两大类^[11], 而根据图 3 中的吸收峰特征, 可以判断紫贻贝壳中提取的色素为真黑色素。

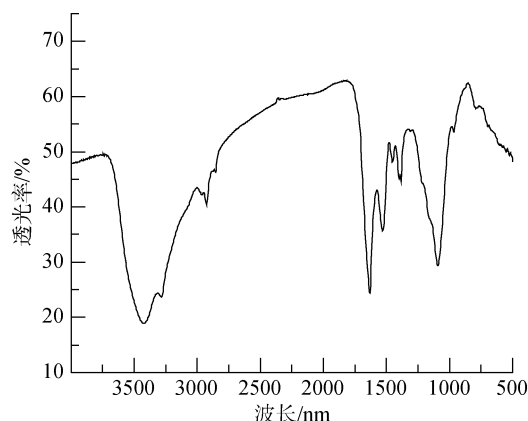


图 3 紫贻贝壳中色素的红外扫描图谱

Fig.3 IR spectra: Pigment in the *Mytilus edulis* shells

2.3 脉红螺厖中色素的光谱特征

2.3.1 脉红螺厖中色素的紫外光谱特征

脉红螺厖中色素的紫外光谱扫描结果如图 4 所示。光谱扫描结果表明, 脉红螺厖中色素在紫外波长下存在明显吸收特征, 并有最大吸收峰, 其最大值在 216 nm 处(图 4), 并且随着波长的增加, 其吸光值也下降, 与紫贻贝壳中色素的紫外光谱相似, 也与 Bell^[8]报道的黑色素紫外吸收特征基本一致。

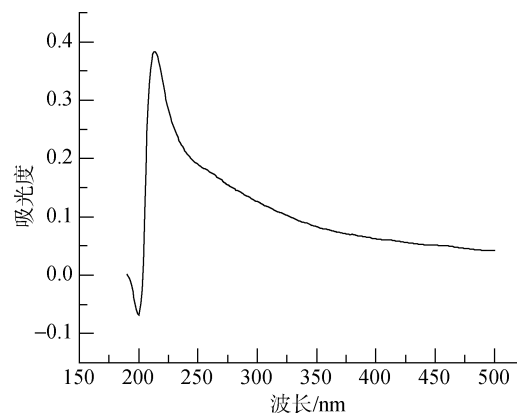


图 4 脉红螺厖中色素的紫外扫描图谱

Fig.4 UV absorption spectra: Pigment in the *Rapana venosa* operculum

2.3.2 脉红螺厖中色素的红外光谱特征

脉红螺厖中色素的红外光谱扫描结果如图 5 所示。从图 5 可见, 本实验所制备的脉红螺厖中色素的特征吸收峰也主要集中在以下 3 组峰: 3 500~3 300 cm^{-1} 、1 620~1 600 cm^{-1} 和 1 150~1 000 cm^{-1} , 我们知道, 3 440 cm^{-1} 处强吸收峰是由 O—H 和吡啶的 N—H 伸缩振动产生的, 1 630 cm^{-1} 附近吸收峰为真黑色

素的吡啶环归属, $1\ 095\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰, 部分由烷烃中 $\text{C}-\text{CH}_3$ 的弯曲和骨架振动吸收参与形成^[9-11], 与紫贻贝贝壳中色素的红外吸收特征一致, 因此作者判定, 紫贻贝贝壳中的色素与脉红螺厖中的色素均为真黑色素。

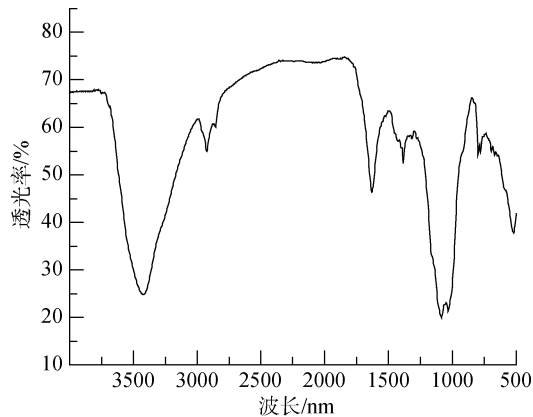


图5 脉红螺厖中色素的红外扫描图谱

Fig.5 IR spectra: Pigment in the *Rapana venosa* operculum

3 讨论与结论

实验结果表明, 紫贻贝贝壳与脉红螺厖中均含有黑色素, 说明黑色素在贝类中的具有较广泛的分布, 除了在长牡蛎外套膜、贝壳和闭壳肌痕处均存在黑色素之外(本课题组未发表的数据), 黑色素在其他贝类或贝类的其他器官中均存在。贝类含有黑色素对于贝类自身有何影响、有何生物学意义, 是一个值得研究的问题。

研究黑色素对于贝类育种也具有重要价值。迄今, 已有对贝类其他色素的提取和利用并取得了一定的研究成果, 如扇贝贝壳和闭壳肌中类胡萝卜素的提取和鉴定已有报道^[12-13], 并育成了颜色明亮、营养价值较高的虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)和华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)新品(种)系。黑色素也具有抗氧化、抗衰老的作用^[14], 与胡萝卜素的生理作用相似, 本研究对贻贝贝壳中黑色素成功的进行了提取、鉴定, 证明了紫贻贝贝壳中也存在黑色素, 对于紫贻贝的壳色育种具有重要的参考价值。另外, 已有研究表明在长牡蛎壳中含有黑色素这一物质, 而紫贻贝与牡蛎同为双壳纲(Bivalvia)贝类, 说明黑色素在双壳纲贝类中的存在可能是比较广泛的。

脉红螺的厖是一种比较特殊的矿化结构, 厖是腹足纲贝类着生于后足上面的板状结构, 软体部缩

入贝壳内后藉此堵封壳口。本次实验提取并验证了厖中的黑色物质也为黑色素, 这是首次对腹足纲动物矿化结构所含色素进行提取和鉴定, 也说明黑色素在双壳纲和腹足纲贝类都是存在的。另外, 黑色素在头足纲动物中的存在早已得到确定^[15], 结合本次实验的结果, 可以推测黑色素在软体动物中是广泛存在的一种色素。

参考文献:

- [1] Kollosa N. New trends in photobiology, phytoprotection by melanins[J]. *Phytochem Photobiol*, 1991, 9(1): 135-160.
- [2] Bassam S E, Benhamou N, Carisse O, et al. The role of melan in in the an tagonistic interaction between the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* and *Microsphaeropsis ochracea*[J]. *Canadian Journal of Microbiolog*, 2002, 48(4): 349-358.
- [3] Zhang M, Xiao G, Thring R W, et al. Production and characterization of melanin by submerged culture of culinary and medicinal fungi *Auricularia auricula*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176(1): 253-266.
- [4] Araujo M, Xavier J R, Nunes C D, et al. Marine sponge melanin: a new source of an old biopolymer[J]. *Structural Chemistry*, 2012, 23(1): 115-122.
- [5] Langfelder K, Streibel M, Jahn B, et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi[J]. *Fungal Genet Biol*, 2003, 38(2): 143-158.
- [6] Kumar R, Joy K P. Melanins as biomarkers of ovarian follicular atresia in the catfish *Heteropneustes fossilis*: biochemical and histochemical characterization, seasonal variation and hormone effects[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2015, 41(3): 761-772.
- [7] Chen S R, Jiang B, Zheng J X, et al. Isolation and characterization of natural melanin derived from silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson)[J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(3): 745-749.
- [8] Bell A A, Wheeler M H. Biosynthesis and functions of fungal melanins[J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1986, 24: 411-451.
- [9] 王岩, 刘学惠, 尹佩玉, 等. 几种天然黑色素分子结构的红外光谱表征研究[J]. *分析试验室*, 1996, 15(6):

- 63-65.
- [10] 赵肃清, 孙明远, 蔡燕飞, 等. 香蕉皮黑色素的鉴定及其抗氧化作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(6): 496-498.
- [11] Nicolaurs R A, Piattellim, F E. The syrustructure of melanin and melanogenesis-IV: On some natural melanins[J]. Tetrahedron, 20(5): 1163-1172.
- [12] Li N, Hu J J, Wang S, et al. Isolation and identification of the main carotenoid pigment from the rare orange muscle of the Yesso scallop[J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 616-619.
- [13] Zheng H P, Liu H L, Zhang T, et al. Total carotenoid differences in scallop tissues of *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae) with regard to gender and shell colour[J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1164-1167.
- [14] Lu Y, Ye M, Song S, et al. Isolation, purification, and anti-aging activity of melanin from *Lachnum singerianum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(2): 762-771.
- [15] Derby C D. Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications[J]. Marine Drugs, 2014, 12(5): 2700-2730.

Extraction and identification of the pigment in the *Mytilus edulis* shells and *Rapana venosa* operculum

HAO Shi-xin^{1, 2}, HOU Xin³, SUN Dong-fang¹, YU Wen-chao¹, HE Cheng¹, WANG Xiao-tong¹

(1. School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 3. School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China)

Received: Jul., 31, 2015

Key words: *Mytilus edulis* shell; *Rapana venosa* operculum; melanin identification; ultraviolet spectrum; infrared radiation spectrum

Abstract: To determine if the black substance in the *Mytilus edulis* shells and *Rapana venosa* operculum is melanin, we selected the *Rapana venosa* operculum part and collected *M. edulis* shells, cleaned the two samples and then pulverized them, weighed, followed by hydrochloric acid soaking, boiling water bath for heating, as well as diethyl ether purification step, then, the dissolved black substance in 0.01 mL/L NaOH, the maximum absorption of the two pigments in the UV absorption spectrum within the range of 190–500 nm was both observed between 210–220 nm. The UV absorbance decreased with increasing wavelength which was consistent with the UV spectral absorption characteristics of melanin. In addition, Fourier transform infrared spectroscopy scanning revealed characteristic absorption peaks that emerged near 3 μm and 6 μm , which was consistent with infrared scanning features of eumelanin. Thus the black substance in the *Rapana venosa* operculum and *M. edulis* shells was confirmed to be melanin for the first time.

(本文编辑: 谭雪静)