

番红砗磲外套膜色素提取条件优化及成分分析

付正祎¹, 刘二田¹, 顾志峰¹, 石耀华¹, 王爱民^{1,2}, 吴川良³, 刘春胜¹

(1. 海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南 海口 570228; 3. 三亚珊瑚礁生态研究所, 海南 三亚 572000)

摘要: 以番红砗磲(*Tridacna crocea*)为实验对象, 通过单因素对比实验对其外套膜色素的提取条件进行了优化, 并利用薄层层析色谱法对色素组成进行了初步分析。结果表明: 丙酮和乙醇为适宜的番红砗磲外套膜色素提取剂; 使用丙酮为提取剂时, 浸提时间为 4 h, 提取温度为 25℃, 料液比为 1:40。使用乙醇为提取剂时, 浸提时间为 4 h, 提取温度为 30℃, 料液比为 1:200; 利用薄层色谱法分离外套膜颜色为蓝色和红棕色的番红砗磲外套膜色素后发现, 蓝色番红砗磲外套膜色素由 9 种色素组分构成, 红棕色个体番红砗磲外套膜色素由 10 种色素组分构成。

关键词: 番红砗磲(*Tridacna crocea*); 外套膜色素; 提取条件; 薄层层析色谱

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)06-0071-07

DOI: 10.11759/hyxx20190207001

砗磲是现已知的海洋中最大的双壳纲动物, 目前世界范围内共发现有 2 属 13 种^[1-4]。砗磲主要分布在印度洋和太平洋的热带和亚热带海区, 在我国分布的砗磲有 6 种, 其中番红砗磲(*Tridacna crocea*)是在南海地区发现的数量较多的种类之一, 因其体型较小、较为易于养殖和外套膜颜色鲜艳而成为海水水族观赏动物^[5,6]。

在双壳贝类中, 砗磲以颜色艳丽的外套膜和与虫黄藻共生的特点成为了区别于其他贝类的独特物种, 它的颜色多态性为其与环境融合提供了可能, 这与砗磲的隐态保护密切相关^[7]。有研究发现, 当砗磲外套膜颜色与栖息环境相近时, 其被捕食的几率会明显减小^[8]。砗磲的外套膜颜色除了受自身基因决定外, 还与周边底质颜色、光照等许多环境因素有关^[9]。砗磲外套膜内共生的虫黄藻不仅可为砗磲提供营养, 更对其外套膜颜色产生了一定影响^[10,11]。水生动物表皮色素提取相关研究在鱼类中已有诸多报道(例如金鱼、锦鲤和罗非鱼等)^[12-15]; 然而对于番红砗磲的研究多集中在资源保护、繁殖及与环境相互作用等领域, 尚未见外套膜色素组成的相关报道^[16-18]。

基于此, 本研究拟通过单因素实验优化番红砗磲外套膜色素提取条件, 建立其外套膜色素提取方法, 并利用薄层色谱法对蓝色和红棕色番红砗磲外套膜色素进行分离, 以期探究不同外套膜颜色的番红砗磲色素组成差异, 为砗磲颜色多态性及环境适

应机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

番红砗磲野生个体采自南海西沙海域。在前期工作基础上, 本实验选取数量较多, 且颜色对比明显的红棕色和蓝色外套膜番红砗磲(壳长 79.69 mm±10.43 mm)进行相关研究。两种颜色的番红砗磲各取 5 个个体。

1.2 方法

1.2.1 番红砗磲外套膜色素的提取

将番红砗磲外套膜剪碎后, 置于盛有液氮的研钵中匀浆, 再置于真空冷冻干燥机(SCIENTZ-10N 型, 宁波新芝生物科技股份有限公司)中冷冻干燥 6 h, 温度为 -50℃, 密封避光保存于 -20℃ 待用。称取 0.0125 g 样品粉末, 按一定的料液比加入提取剂, 在

收稿日期: 2019-02-07; 修回日期: 2019-04-28

基金项目: 海南省重点研发计划项目(ZDYF2019153); 国家重点研发计划项目(2018YFD0900704); 海南省自然科学基金项目(317029)

[Foundation: Key Research and Development Project of Hainan Province, No.ZDYF2019153; National Key Research and Development Plan, No.2018 YFD0900704; Natural Foundation of Hainan Province, No.317029]

作者简介: 付正祎 (1995-), 女, 辽宁辽阳人, 硕士研究生, 主要从事水产养殖学研究, 电话: 17330937293, E-mail: zhengyifu@163.com; 刘春胜, 通信作者, 副教授, 主要从事水产养殖学研究, E-mail: lcs5113@163.com

恒温水浴锅中孵育一定时间,提取期间注意避光。8000 r/min 离心 3 min, 取上清液过滤, 得到色素提取液, 稀释后在分光光度计(752N 型, 上海佑科仪器仪表有限公司)上测出最大吸收波长处的吸光度 A , 以 A 值的大小代表砗磲外套膜色素的含量。

1.2.2 番红砗磲外套膜色素提取剂筛选

称取 7 份 0.025 g 样品粉末于离心管, 分别加入 1 mL 丙酮、乙醇、石油醚、乙酸、甲醛、甲酸及纯水作为提取剂(所用化学试剂均为分析纯), 25℃, 24 h 浸提, 使用多功能微孔板检测仪(Synergy H1 型, BioTek Instruments, Inc.)进行全波长扫描, 对上述溶剂进行初筛。

1.2.3 番红砗磲外套膜色素提取条件优化

采用单因素对比实验, 经前期预实验并参考相关文献^[14, 19]设定提取时间、温度、料液比等条件梯度。

1.2.3.1 不同提取时间对番红砗磲色素提取效果的影响

称取 0.0125 g 样品粉末于离心管, 加入 10 mL 丙酮或乙醇, 25℃, 浸提 8 h, 期间每小时取上清液于 462 nm 波长测定吸光度, 每组 3 个平行。

1.2.3.2 不同提取温度对番红砗磲色素提取效果的影响

称取 0.0125g 样品粉末于离心管, 加入 10 mL 丙酮或乙醇, 分别于 15、20、25、30、35、40℃ 条件下浸提 4 h, 取 2 mL 上清液稀释至 4 mL 于 462 nm 波长测定吸光度, 每组 3 个平行。

1.2.3.3 不同料液比对番红砗磲色素提取效果的影响

称取适量样品粉末于离心管, 加入适量丙酮使料液比分别为 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:100、1:200 或加入适量乙醇使料液比分别为 1:100、1:150、1:200、1:400、1:600、1:800, 25℃, 浸提, 4 h, 取全部浸提液过滤后稀释至 10 mL, 波长为 462 nm 测定吸光度, 每组 3 个平行。

1.2.4 不同颜色番红砗磲外套膜色素组成分析

称取 1 个蓝色和 1 个红棕色系砗磲的外套膜粉末各 0.0250 g, 分别加入 0.5 mL 丙酮在 25℃ 避光条件下浸提 4 h, 25℃、4000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液进行色素分离。用毛细玻璃管(吸取色素溶液约 200 μ L)在硅胶薄层板上点样, 每次 1 板, 以上点样操作重复 3 次。然后分别将点好样的薄层板放入盛有 25 mL 展层剂(氯仿:甲醇:石油醚=3:1:6)的封闭层析缸中层析 15 min。用佳能扫描仪(CanoScan 9000F Mark II)记录层析结果, 计算各色素组分 R_f

值。每个颜色组重复 3 次, 每次样品来源于 1 个不同砗磲个体。

1.3 数据处理与分析

各实验数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD), 所有数据采用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 17.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 番红砗磲外套膜总色素提取溶剂筛选

从图 1 中可以看出, 经 24 h 溶解后, 溶剂为丙酮、乙醇组砗磲外套膜粉末沉淀变为无色, 色素几乎全部溶于溶剂; 在石油醚、乙酸、甲醛和水作为溶剂组中, 仅部分色素溶于溶剂; 当甲酸作为溶剂时, 样品全部发生溶解, 无法作为色素提取剂。综上, 通过观察提取剂和底部杂质颜色深浅初步判断丙酮和乙醇为适宜的番红砗磲外套膜色素提取剂。

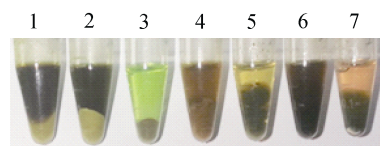


图 1 番红砗磲外套膜在各溶剂中的溶解结果

Fig. 1 Results of dissolution in various reagents of *Tridacna crocea* mantle

1. 丙酮; 2. 乙醇; 3. 石油醚; 4. 乙酸; 5. 甲醛; 6. 甲酸; 7. 水

取上述提取液使用 Synergy H1 型多功能微孔板检测仪在波长 300~1000 nm 进行扫描, 得到的最大吸收峰处波长(nm)和其吸光值(图 2, 表 1)。由表 1 可知, 石油醚、甲醛、纯水提取物没有明显吸收峰, 乙酸提取物的最高峰值显著小于丙酮和乙醇。

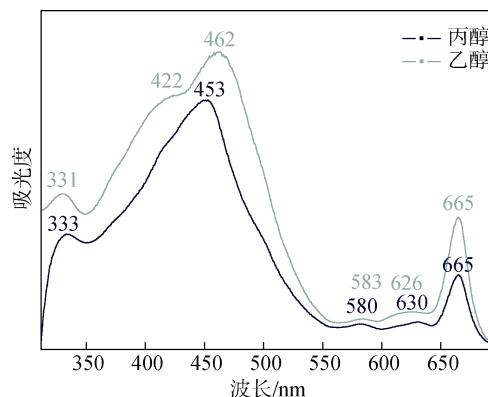


图 2 番红砗磲外套膜色素在丙酮和乙醇中的光谱特性

Fig. 2 Spectral characteristics of pigment from *T. crocea* mantle

表 1 不同番红砗磲外套膜色素提取剂最大吸收波长和吸光度值

提取剂	丙酮	乙醇	石油醚	乙酸	甲醛	甲酸	纯水
最大吸收峰处波长/nm	453	462	-	412	-	407	-
最大吸收峰处吸光值	3.312	3.952	-	2.463	-	3.582	-

注：“-”指无吸收峰值

2.2 番红砗磲外套膜色素提取最优条件

丙酮作为提取剂时, 提取剂提取色素的效果均随时间的增加而提高, 但均呈现先快速提高后缓慢提高的规律。为了加快色素提取的效率和防止色素氧化降解, 选择 4 h 作为色素的最佳提取时间(图 3A); 提取剂中色素浓度随温度的升高呈先升高后下降趋

势, 最佳提取温度为 25℃(图 3C); 随着料液比中提取剂的比重的增加, 吸光度先升高, 后在一定范围内保持相对平稳, 所以 1 : 40 为最佳料液比(图 3E)。

乙醇作为提取剂时, 色素提取规律与丙酮作为提取剂时类似, 4 h 是色素的最佳提取时间(图 3B); 最佳提取温度为 30℃(图 3D); 最佳料液比为 1 : 200 (图 3E)。

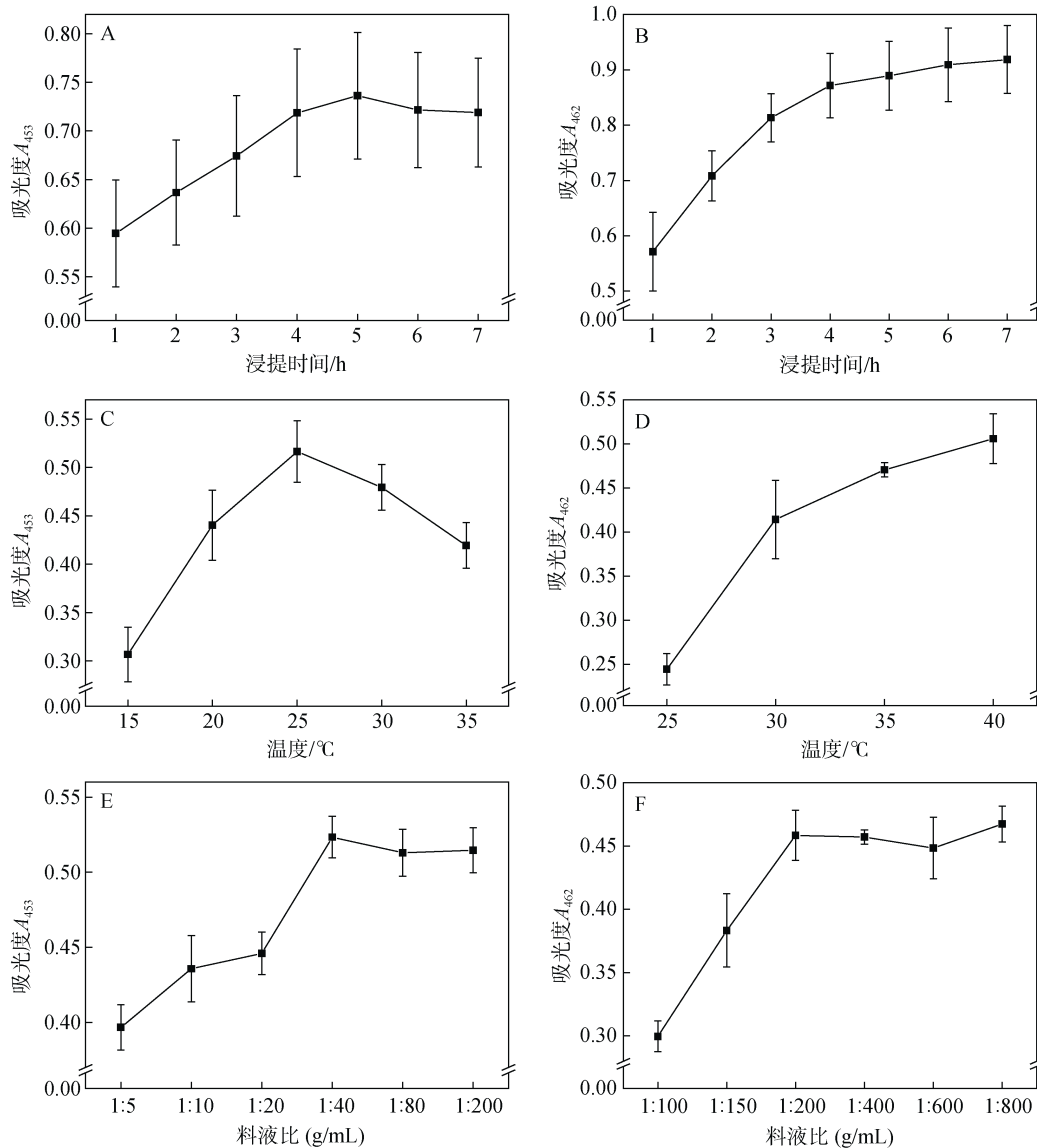


图 3 番红砗磲外套膜色素提取条件优化

Fig.3 Optimum conditions for the extraction of pigment from *T. crocea* mantle

注: A、C 和 E 分别为丙酮在不同时间、温度和料液比时吸光度值; B、D 和 F 分别为乙醇在不同时间、温度和料液比时吸光度值

2.3 不同颜色番红砗磲外套膜色素薄层层析分析

番红砗磲外套膜色素薄层层析色谱结果显示(图 4), 蓝色个体有 9 个条带, 红棕色番红砗磲有 10 个条带, 即蓝色系番红砗磲外套膜由 9 种色素组分

构成, 红棕色番红砗磲外套膜由 10 种色素组分构成。进一步比较发现, 蓝色番红砗磲比棕红色个体缺少第五条带(Rf 0.30)。此外, 蓝色个体的第 2 条带亮度明显高于红棕色个体, 第 3 条带亮度稍低于红棕色个体。

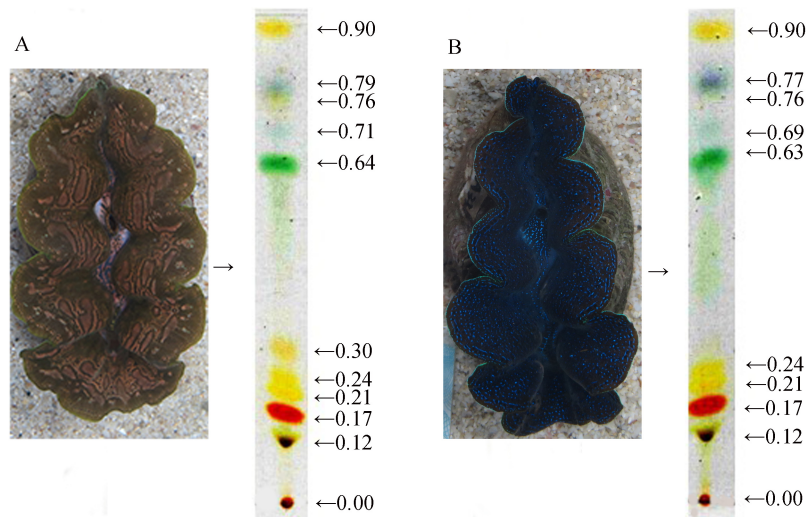


图 4 番红砗磲外套膜总色素薄层层析色谱及示意图

Fig. 4 Thin-layer chromatography of the total pigments from *T. crocea* mantle

A. 红棕色; B. 蓝色; 数字为 Rf 值

3 讨论

3.1 提取条件对番红砗磲外套膜色素提取效果的影响

提取剂提取色素的原理是渗透细胞内部溶解色素, 但细胞基质中存在各种物理和化学特性阻碍了色素提取过程中色素转移, 因此不同物种色素的最佳提取剂有所不同^[20-22]。醇类溶剂甲醇和乙醇对藻类叶绿素 a 的提取效果要优于丙酮和丙酮与二甲基亚砜的混合溶剂^[23]。在本研究中, 乙醇对番红砗磲外套膜色素的提取效果略优于丙酮, 可能原因是砗磲外套膜共生虫黄藻体色素是其外套膜色素的重要组成部分, 而叶绿素 a 是虫黄藻的主要色素种类。

有机溶剂提取色素的能力与色素的化学结构有关, 化学结构对应的极性大小决定了其在不同极性的有机溶剂中的溶解度。虾夷扇贝闭壳肌中的类胡萝卜素在极性较小的有机溶剂中溶剂效果较好, 且最佳提取剂为丙酮^[19]。本研究表明丙酮是番红砗磲外套膜色素提取的优良提取剂, 说明番红砗磲可能含有与虾夷扇贝结构相同或相似的类胡萝卜素。

有很多色素如类胡萝卜素中的一些色素稳定性

较差, 高温、光照和空气中长时间暴露均有可能导致其吸光度降低^[17]。高温可造成类胡萝卜素结构改变而形成顺式异构体, 而光照和氧气共同作用会促使其中 C-C 双键的断裂使色素分解^[24-25]。类胡萝卜素对酸也体现了不稳定性^[26]。本研究中, 提取条件也遵循了时间尽量短、温度尽量低的原则, 以避免外界因素对色素的破坏。

3.2 番红砗磲外套膜色素组分

砗磲外套膜颜色是由外套膜管状系统中共生虫黄藻及外套膜自身组织中的颜色共同决定, 因此番红砗磲外套膜总色素应包括共生虫黄藻所含色素种类和外套膜内自身的色素两部分。从化学结构分类, 藻类中存在的光合色素主要有三大类: 叶绿素类、类胡萝卜素类和藻胆色素类^[27], 据报道, 以上的三大类藻类光合色素在虫黄藻属的叶绿体中均有发现^[28]。已报道的存在于水产动物表皮和肌肉组织的色素包括类胡萝卜素、黑色素、胆汁色素、 α -萘醌系色素、蝶啶系色素等^[15]。番红砗磲外套膜色素在 312~690 nm 之间均有吸光值, 并且在 333、452、582、630 和 665 nm 处有明显吸收峰, 这种吸光范围较广、吸收峰数量较多的现象表明番红砗磲外套膜色素组分复杂, 应包

含多种类型的色素^[29]。

薄层层析色谱的结果显示蓝色和红棕色番红砗磲外套膜第二条带(蓝色)亮度有差异,说明该种色素与外套膜是否呈现蓝色有密切关系。此外,与红棕色番红砗磲相比,蓝色个体在第六条(Rf 值为 0.30)黄色条带明显缺失,这亦是导致两种颜色砗磲差异的原因。

4 结论

本研究筛选出丙酮和乙醇两种适宜的番红砗磲外套膜色素提取剂,优化了两种提取剂的提取条件。选用丙酮作为提取剂时,浸提时间为 4 h,提取温度为 25℃,料液比为 1:40;选用乙醇作为提取剂时,浸提时间为 4 h,提取温度为 30℃,料液比为 1:200;利用薄层色谱法对蓝色和红棕色番红砗磲外套膜色素比较分析发现,蓝色番红砗磲外套膜色素由 9 种色素组分构成,红棕色个体番红砗磲外套膜色素由 10 种色素组分构成。

参考文献:

- [1] Penny S S, Willan R C. Description of a new species of giant clam (Bivalvia: Tridacnidae) from Ningaloo Reef, Western Australia[J]. Molluscan Research, 2014, 34(3): 201-211.
- [2] Richter C, Roa-Quiaoit H, Jantzen C, et al. Collapse of a new living species of giant clam in the Red Sea[J]. Current Biology, 2008, 18(17): 1349-1354.
- [3] Huelsken T, Keyse J, Liggins L, et al. A novel widespread cryptic species and phylogeographic patterns within several giant clam species (Cardiidae: Tridacna) from the Indo-Pacific Ocean[J]. PLoS ONE, 2013, 8(11): e80858.
- [4] 周勤, 王玉芬, 姜秀凤. 砗磲研究现状及在我国南海开展养殖的前景[J]. 热带海洋学报, 2014, 33(2): 87-93.
Zhou Qin, Wang Yufen, Jiang Xiufeng. Giant clam research and prospect of aquaculture in the South China Sea[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2014, 33(2): 87-93.
- [5] 刘春胜, 刘小霞, 汪浩, 等. 光照强度和光色对番红砗磲(*Tridacna crocea*)氨氮、活性磷酸盐及氧代谢的影响[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(2): 313-318.
Liu Chunsheng, Liu Xiaoxia, Wang Hao, et al. Effects of light intensity and spectra on metabolism of ammonia, active phosphates, and oxygen consumption in *Tridacna crocea*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2018, 49(2): 314-318.
- [6] 董杨, 李向民. 砗磲资源保护、开发及其产业化发展前景[J]. 水产科学, 2015, 33(2): 195-200.
- [7] Dong Yang, Li Xiangmin. Protection, development and industrialization of Tridacnidae stock[J]. Fisheries Science, 2015, 33(2): 195-200.
- [8] Todd P A, Briers R A, Ladle R.J, et al. Phenotype-environment matching in the shore crab (*Carcinus maenas*)[J]. Marine Biology, 2005, 148(6): 1357-1367.
- [9] Ozog S T. Balancing anti-predation and energetic needs: color polymorphism in the giant clam *Tridacna maxima*[D]. Oakland: University of California, 2009.
- [10] Todd P A, Lee J H, Chou L M. Polymorphism and crypsis in the boring giant clam (*Tridacna crocea*): potential strategies against visual predators[J]. Hydrobiologia, 2009, 635 (1): 37-43.
- [11] 李晓梅, 杜宇, 林焯贤. 长砗磲(*Tridacna maxima*)个体大小与虫黄藻数量的相关性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6): 2981-2982.
Li Xiaomei, Du Yu, Lin Zhixian. Research on relationship between body size and zooxanthellae number of *Tridacna maxima*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(6): 2981-2982.
- [12] Gula R L, Adams D K. Effects of symbiodinium colonization on growth and cell proliferation in the giant clam *Hippopus hippopus*[J]. Biological Bulletin, 2018, 234(2): 130-138.
- [13] 刘金海, 王安利, 王维娜. 金鱼总色素及色素组分的比较研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 73-77.
Liu Jinhai, Wang Anli, Wang Weina. Comparative studies on the total pigment and pigment components of goldfish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(1): 73-77.
- [14] 王安利, 刘金海, 王维娜. 锦鲤总色素及色素组分的比较研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 96-100.
Wang Anli, Liu Jinhai, Wang Weina. Comparative studies on the total pigment and pigment components of color carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(6): 96-100.
- [15] 梁志, 胡鑫鑫, 车文成, 等. 罗非鱼鱼尾色素提取及其稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2018, 6: 80-85.
Liang Zhi, Hu Xinxin, Che Wencheng, et al. A study on the extraction and stability of the pigment from Tilapia fish tail[J]. China Food Additives, 2018, 6: 80-85.
- [16] 刘金海, 王安利, 王维娜, 等. 水产动物体色色素组分及着色剂研究进展[J]. 动物学杂志, 2002, 37(3): 92-96.
Liu Jinhai, Wang Anli, Wang Weina, et al. Progress of study on the component of pigment and painting substance of aquatic animals[J]. Chinese Journal of Zoology, 2002, 37(3): 92-96.
- [17] 谭围, 王荣霞, 黄敏. 番红砗磲水泥池循环水养殖模式研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(29): 102-103.

- Tan Wei, Wang Rongxia, Huang Min. Study on *Tridacna crocea* circulation water aquaculture mode of cement tanks[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(29): 102-103.
- [17] 高桦楠. 砗磲室内循环水养殖系统构建[D]. 海口: 海南大学, 2016.
- Gao Huanan. Construction an indoor recirculating aquaculture system for Tridacnidae[D]. Haikou: Hainan University, 2016.
- [18] 晏宏, 刘成程. 砗磲地球化学与古气候学研究进展[J]. 第四纪研究, 2017, 37(5): 1077-1090.
- Yan Hong, Liu Chengcheng. Review on tridacna geochemistry and paleoclimate research[J]. Quaternary Sciences, 2017, 37(5): 1077-1090.
- [19] 李宁. 虾夷扇贝橘红色闭壳肌产生的原因及其在育种中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- Li Ning. What accounting for orange color of Yesso scallop muscle (*Patinopecten yessoensis*) and its application in breeding[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.
- [20] Saini R K, Keum Y. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments[J]. Food Chemistry, 2018, 240(1): 90-103.
- [21] 李其雨, 李爱芬, 张成武. 真眼点藻类色素的提取与测定方法[J]. 生态科学, 2012, 31(3): 278-283.
- Li Qiyu, Li Aifen, Zhang Chengwu. The method of extraction and determination of pigment in *Eustigmatophyceae*[J]. Ecologic Science, 2012, 31(3): 278-283.
- [22] Wellburn A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution[J]. Plant Physiol, 1994, 144(3): 307-313.
- [23] Sartory D P, Grobbelaar J U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis[J]. Hydrobiologia, 1984, 114(3): 177-187.
- [24] 陈志行, 王建平, 黄创兴. 叶黄素的提取和稳定性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 284-288.
- Chen Zhixing, Wang Jianping, Huang Chuangxing. Study on the extraction and stability of xanthophyll[J]. Food Science, 2005, 26(9): 284-288.
- [25] Kopas-Lane L M, Warthesen J J. Carotenoid photostability in raw spinach and carrots during cold storage[J]. Journal of Food Science, 1995, 60(4): 773-776.
- [26] 刘清, 周光宏, 陆治年. β -胡萝卜素研究进展[J]. 畜牧与兽医, 1995, 27(4): 182-184.
- Liu Qing, Zhou Guanghong, Lu Zhinian. Research progress of β -carotene[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1995, 27(4): 182-184.
- [27] Lee S Y, Jeong H J, Kang N S, et al. *Symbiodinium tridacnidorum* sp. nov., a dinoflagellate common to Indo-Pacific giant clams, and a revised morphological description of *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, emended Trench & Blank[J]. European Journal of Phycology, 2015, 50(2): 155-172.
- [28] Hoegh-Guldberg O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs[J]. Marine Freshwater Research, 1999, 50(8): 839-866.
- [29] 曲慧, 马国平, 陈敏, 等. 东海原甲藻的培养及色素分离分析[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2008, 21(3): 197-203.
- Qu Hui, Ma Guoping, Chen Min, et al. Culture and pinment analysis of *Prorocentrum donghaiense* Lu[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering edirion), 2008, 21(3): 197-203.

Optimization of extraction conditions of pigments in *Tridacna crocea* mantle and its composition analysis

FU Zheng-yi¹, LIU Er-tian¹, GU Zhi-feng¹, SHI Yao-hua¹, WANG Ai-min^{1, 2},
WU Chuan-liang³, LIU Chun-sheng¹

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Ecologic Sanya Institute of Coral Reef Ecosystem, Sanya 572000, China)

Received: Feb. 7, 2019

Key words: *Tridacna crocea*; pigment of mantle; extraction condition; thin layer chromatography

Abstract: The extraction conditions of total pigments in *Tridacna crocea* mantle were optimized by single factor experiment, then the pigments composition were also preliminarily analyzed by thin layer chromatography. Results showed that acetone and ethanol were suitable solvents for the extraction of mantle pigments. When acetone was selected as the extractant, the extraction time, temperature and solid-liquid ratio were 4h, 25°C and 1 : 40, respectively. When ethanol was selected as the extractant, the extraction time, temperature and solid-liquid ratio were 4h, 30°C and 1 : 200, respectively. Thin Layer Chromatography was used to separate and compare the pigment components of reddish brown and blue individuals. It was found that the mantle pigments in reddish brown mantle were composed of 10 kinds of pigment components, while the pigments of blue mantle were composed of 9 kinds of pigment components.

(本文编辑: 康亦兼)