

文章编号: 1004-7271(2008)03-0339-05

七彩神仙鱼皮肤色素细胞观察及 类胡萝卜素组分分析

刘晓东, 陈再忠

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:观察了黄白、红点绿和红盖子七彩神仙鱼皮肤色素细胞的分布情况,并通过光谱、色谱和类胡萝卜素显色反应等方法分析了其皮肤类胡萝卜素的组成成分。黄白七彩神仙鱼体侧皮肤以黄色素细胞为主并有少量黑色素细胞,皮肤类胡萝卜素主要为黄体素;红盖子七彩神仙鱼体侧皮肤以红色素细胞和黄色素细胞为主,也有一定的黑色素细胞和虹彩细胞;红点绿七彩神仙鱼在皮肤红色区有大量的红色素细胞、黄色素细胞和黑色素细胞,而在蓝条纹区有大量虹彩细胞和黑色素细胞。红点绿和红盖子七彩神仙鱼皮肤色素组成均为虾青素及其酯、角黄素、玉米黄素的酯及 α -胡萝卜素。

关键词:七彩神仙鱼;色素细胞;观察;类胡萝卜素;组分分析

中图分类号:S 917 文献标识码:A

Study on the chromatophores and the carotenoid components in the skin of discus fish (*Symphysodon spp.*)

LIU Xiao-dong, CHEN Zai-zhong

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The study was conducted to investigate the distribution of the chromatophores and the components of carotenoid in the skin of gold white, red point and solid red discus fish through thin layer chromatography, spectrum and color reaction. For gold white discus, xanthophores were the most widespread, and the melanophores were minority. The component of the carotenoid in its skin was lutein. In the skin of solid red discus, xanthophores and erythrophores were the most widespread, while the melanophores and irridophores were minority. In the red area of the skin of red point discus, there were a lot of xanthophores, erythrophores and melanophores, while in the blue area melanophores and irridophores were observed. For both red point and solid red discus the components of carotenoid were astaxanthin, esterifiable astaxanthin, canthaxanthin, esterifiable zeaxanthin and α -carotene.

Key words: discus fish; chromatophores; observation, carotenoid; componential analysis

七彩神仙鱼隶属于鲈形目(Perciformes)、慈鲷科(Cichlidae)、盘丽鱼属(*Symphysodon*),原产于亚马逊河流域,是一种名贵的观赏鱼。观赏鱼的体色是其品质的决定性因素之一。但目前国内有关观赏鱼

收稿日期:2007-06-12

基金项目:上海市水产养殖重点学科建设项目(Y1101)

作者简介:刘晓东(1981-),男,吉林省吉林市人,硕士研究生,专业方向为水产动物繁殖生物学和观赏鱼养殖。

通讯作者:陈再忠, Tel:021-65710883, E-mail:chenzz@shfu.edu.cn

体色的研究较少,主要集中在色素和激素对鱼体的增色效果上^[1-3],而对于鱼类皮肤色素细胞类胡萝卜素组分尚未见报道。本课题观察了红盖子、红点绿、黄白三个品种七彩神仙鱼色素细胞的分布情况,研究了七彩神仙鱼色素细胞中的类胡萝卜素组分,以期能为筛选对七彩神仙鱼有理想增色效果的增色剂,开发七彩神仙鱼增色饲料提供有益资料。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

七彩神仙鱼包括红盖子、红点绿、黄白三个品种,各6尾,体长8~10 cm。

1.2 色素细胞的观察

取鱼体背鳍、背鳍基部和体侧皮肤,用Olympus倒置生物显微镜观察色素细胞,并用Olympus数码相机拍照。

1.3 类胡萝卜素组分分析

将实验鱼急性处死,剥取皮肤1 g,以丙酮和石油醚为提取液,提取方法参考王安利、刘金海^[4]。提取液定容50 mL后用分光光度计在400~600 nm处检测总类胡萝卜素最大吸收波长。然后再将提取液风干浓缩,用微量进样器在硅胶板上点样,在展开缸中展开。展开剂为正己烷:乙酸乙酯:丙酮:甲醇=27:4:2:2^[5]。用数码相机拍摄层析结果,计算各组分的迁移率(Rf值),并与文献报道的用相同展开剂展开的类胡萝卜素标准品比较。

将硅胶色带洗脱,用石油醚定容2 mL,用分光光度计检测最大吸收波长,并与文献报道的标准品的最大吸收波长比较。再将洗脱液分为两份,分别进行羰基检测反应和黄体素显色反应^[5-6]。

另取皮肤1 g,按上述方法提取色素,并将提取液风干,然后加入5 mL 10%的氢氧化钾甲醇溶液,在常温避光条件下皂化5小时,再将皂化后的色素用薄层色谱展开,观察组分色谱行为的变化^[7-8]。

1.4 数据处理

用SPSS 10.0统计软件对皮肤总类胡萝卜素最大吸收波长处的吸收值及红点绿和红盖子七彩神仙鱼薄层色谱对应色带的迁移率进行方差分析和多重比较。

2 结果

2.1 七彩神仙鱼色素细胞的分布

七彩神仙鱼皮肤色素细胞有黑色素细胞、红色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞。黑色素细胞、红色素细胞和黄色素细胞呈圆形或椭圆形,多分枝。虹彩细胞体积比其他三种色素细胞小,呈棒状或颗粒状,多成簇分布。

黄白七彩神仙鱼背鳍、臀鳍和体侧都以黄色素细胞为主,黑色素细胞数量很少,背鳍和臀鳍基部黄色素细胞密度明显高于体侧其他部位(图版1-1,1-2)。

红点绿七彩神仙鱼全身红蓝相间,在红色区又大量的红色素细胞、黄色素细胞和黑色素细胞。而在蓝条纹区有大量虹彩细胞和黑色素细胞。(图版1-3,1-4)。

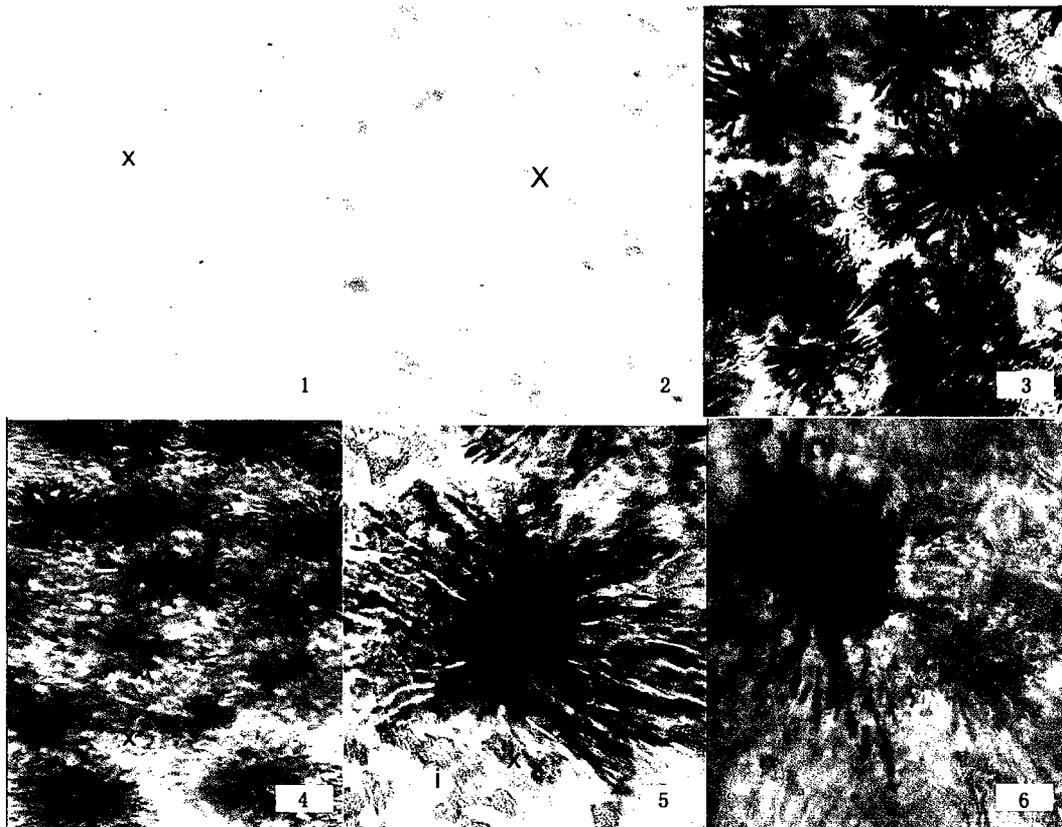
红盖子七彩神仙鱼背鳍、背鳍基部色素细胞主要是红色素细胞和黄色素细胞,鳍条边缘有少量虹彩细胞和黑色素细胞。(图版1-5,1-6)。

2.2 七彩神仙鱼类胡萝卜素光谱和薄层色谱

三种七彩神仙鱼皮肤总类胡萝卜素光谱研究结果显示,红盖子和红点绿七彩神仙鱼总类胡萝卜素在468 nm处有最大吸光值,黄白七彩神仙鱼总类胡萝卜素在440 nm处有最大吸光值(表1)。

图版2是三种七彩神仙鱼皮肤总类胡萝卜素薄层色谱图。红盖子七彩神仙鱼和红点绿七彩神仙鱼

都有五条色带, Rf 见表 2。经 F 检验, 两种鱼的 Rfa, Rfb, Rfc, Rfd, Rfe 均无显著差异, 说明两种鱼有五种相同的组分。而黄白七彩神仙鱼只有一条明显的色素带 f, Rf 为 0.718 ± 0.012 。



图版 1 七彩神仙鱼皮肤色素细胞 (×40)

Plate 1 The chromatophores in the skin of discus fish (×40)

1. 黄白七彩神仙鱼体侧皮肤; 2. 黄白七彩神仙鱼背鳍; 3. 红点绿七彩神仙鱼体侧蓝色区域; 4. 红点绿七彩神仙鱼体侧红色区域; 5. 红盖子七彩神仙鱼背鳍外缘区域; 6. 红盖子七彩神仙鱼背鳍基部; m 黑色素细胞; x 黄色素细胞; e 红色素细胞; i 虹彩细胞

表 1 三个品种七彩神仙鱼皮肤总类胡萝卜素光谱

Tab. 1 The spectrum of the carotenoid from the skin of gold white, red point and solid red discus

样品名	最大吸收波长 (nm)	吸收值
红盖子七彩神仙鱼	468	$0.530^a \pm 0.135$
红点绿七彩神仙鱼	468	$0.251^b \pm 0.113$
黄白七彩神仙鱼	440	$0.133^b \pm 0.0316$

注: 同一列标注不同上标表示差异显著 ($P < 0.05$)

表 2 红盖子、红点绿七彩神仙鱼类胡萝卜素组分的迁移率

Tab. 2 The Rf of the components of carotenoid of solid red and red point discus

样品名	a	b	c	d	e
红盖子七彩神仙鱼	$0.226^a \pm 0.015$	$0.396^a \pm 0.015$	$0.4667^a \pm 0.0057$	$0.723^a \pm 0.005$	$0.886^a \pm 0.012$
红点绿七彩神仙鱼	$0.21^a \pm 0.0058$	$0.386^a \pm 0.025$	$0.48^a \pm 0.023$	$0.71^a \pm 0.01$	$0.87^a \pm 0.0058$

注: 表中同一列标注不同上标表示差异显著 ($P < 0.05$)

2.3 类胡萝卜素组成成分

2.3.1 组分 a

组分 a 呈淡红色,极性较强,羰基检测反应结果阳性,Rf 值(表 2)与文献报道的用相同展开剂展开的虾青素标准品的 Rf 值相同(0.22)^[5],最大吸收波长在 468 nm - 474 nm(表 3)与虾青素接近(474 nm)^[7],因此判断组分 a 是虾青素。

表 3 a,b,c,d,e,f 六种组分光谱
Tab.3 The spectrum of the carotenoid components

组分编号	a	b	c	d	e	f
吸收峰(nm)	468 ~ 474	468 ~ 474	468	468	423*, 440 ~ 450, 468 ~ 474	445

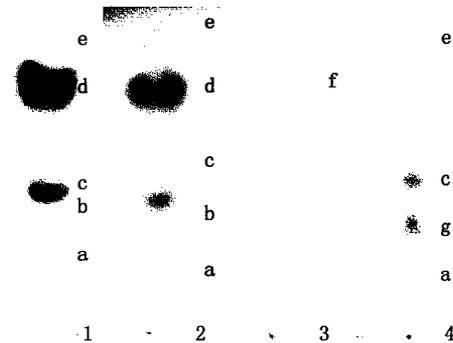
注: * 该测定结果不是十分稳定,在有些样品中没有能够检测到

2.3.2 组分 c

组分 c 呈橙色,羰基检测反应结果阳性,Rf 值(表 2)与用相同展开剂展开的角黄素标准品相同(0.47)^[5],因此判断组分 c 是角黄素。

2.3.3 组分 b 和 d

组分 b 呈橙色,组分 d 呈橙红色,羰基检测反应结果显示组分 b 和 d 分子中都含有羰基。如图版 2 所示,皂化反应后的薄层色谱展开图中组分 b 和 d 色谱行为发生变化,说明组分 b 和 d 是类胡萝卜素的酯。皂化反应后,在薄层色谱上出现一条新的橙色带 g,极性介于色素 a 和 c 之间,且组分 a 处的颜色明显加深。因此判断色素 g 是组分 d 皂化后的产物,而组分 b 是组分 a 的皂化产物。虾青素(组分 a)分子中含有两个羰基和两个羟基极性较强,而角黄素(组分 c)分子中有两个羰基而不含羟基,极性相对较弱,所以判断组分 g 是分子中含两个羟基而不含羰基玉米黄素,组分 d 则是玉米黄素的酯。而组分 b 则可能是虾青素的酯。



图版 2 皮肤总类胡萝卜素及皂化反应后薄层色谱展开图

Plate 2 The chromatography of the total carotenoid in the skin and the chromatography after saponification
1. 红盖子七彩神仙鱼; 2. 红点绿七彩神仙鱼; 3. 黄白七彩神仙;
4. 皂化反应后薄层色谱展开图

2.3.4 组分 e

组分 e 呈杏黄色,极性很弱,但 Rf 值(表 2)小于用相同展开剂展开的 β -胡萝卜素(0.98)^[5]。最大吸收波长与 α -胡萝卜素接近(422,444,473)^[7],因此判断组分 e 为 α -胡萝卜素。

2.3.5 组分 f

组分 f 中加入 AgNO_3 的饱和甲醇溶液后由黄色变为桔红色,说明组分 f 为黄体素^[6]。

3 讨论

3.1 关于方法可靠性问题

3.1.1 实验方法的选择

天然类胡萝卜素有 600 多种,要准确鉴定其种类通常要综合使用薄层色谱、化学反应测试、液相色谱、拉曼光谱、质谱、红外光谱、吸收光谱等^[5,9]。但因目前的研究已证实与鱼类呈色有关的类胡萝卜素主要是虾青素、角黄素、黄体素、玉米黄素及胡萝卜素^[10],因此通过薄层色谱、可见光谱和化学反应测试可以达到分离鉴定的目的。不同的类胡萝卜素由于分子结构不同其光谱、色谱行为不同。另外,含羟基的类胡萝卜素(虾青素、黄体素、玉米黄质)在动物体中常以酯化的形式存在,酯化后其极性明显降

低,而通过皂化反应可使羟基重新生成,使色谱 Rf 值减小。黄体素分子中含有一个 β -末端基团,可与硝酸银的甲醇溶液反应使溶液由黄色变为桔红色^[6]。因此,通过光谱、色谱、羰基检测反应、黄体素显色反应及比较皂化反应前后的色谱行为变化可鉴别七彩神仙鱼色素细胞中类胡萝卜素的种类。

3.1.2 影响类胡萝卜素光谱和色谱测定结果的因素

类胡萝卜素在高温、光照和暴露在空气中都易氧化,共轭双键氧化后光谱会发生蓝位移,即最大吸收波长变小^[7],因此本实验结果中 a,b,c,d,e 五种组分的光谱最大吸收波长均略小于标准值,可能是实验过程中共轭双键氧化所致。

薄层色谱结果显示,黄白七彩神仙鱼皮肤以黄色素细胞为主,类胡萝卜素组分主要是黄体素,因此七彩神仙鱼黄色素细胞内类胡萝卜素主要为黄体素。红点绿和红盖子七彩神仙鱼皮肤类胡萝卜素组分主要是虾青素及其酯、角黄素、玉米黄素的酯、及 α -胡萝卜素,且两种鱼皮肤均有大量的红色素细胞,因此以上五种类胡萝卜素七彩神仙鱼红色素细胞类胡萝卜素组分。红点绿和红盖子皮肤中也有黄色素细胞存在,但黄体素的 Rf(0.718 \pm 0.012)与玉米黄素(0.723 3 \pm 0.005)相近,因此在薄层色谱上两者会重叠,因此红点绿和红盖子七彩神仙鱼总色素薄层色谱上只有 5 条色带。

3.3 色素细胞及其类胡萝卜素组分与体色的关系

如表 1 所示,黄白七彩神仙鱼皮肤类胡萝卜素含量显著低于红盖子七彩神仙鱼,主要原因可能是黄白七彩神仙鱼仅有黄色素细胞而红盖子七彩神仙鱼同时具有黄色素细胞和红色素细胞;红点绿七彩神仙鱼红色素细胞和黄色素细胞与虹彩细胞和黑色素细胞交替分布,而红盖子七彩神仙鱼红色素细胞和黄色素细胞遍及体侧,因此红盖子七彩神仙鱼皮肤类胡萝卜素含量又显著高于红点绿七彩神仙鱼。另外红点绿七彩神仙鱼体侧红点的数量不稳定,这就直接影响了总的类胡萝卜素含量,因此红点绿七彩神仙鱼皮肤总色素在最大吸收波长处的吸光值不稳定,个体差异较大。

鱼类红色素细胞和黄色素细胞的成色物质均为类胡萝卜素和喋啶^[11],但实验结果显示七彩神仙鱼红色素细胞和黄色素细胞的类胡萝卜素组分有所不同。因此七彩神仙鱼红色素细胞和黄色素细胞呈现出完全不同的色彩,进而使鱼体呈现特定的颜色。如黄白七彩神仙鱼皮肤以黄色素细胞为主,因此鱼体呈现黄色;而红盖子七彩神仙鱼皮肤中虽然也有大量的黄色素细胞,但黄色被红色素细胞的红色掩盖,因此鱼体呈现红色。除黄色素细胞和红色素细胞外,七彩神仙鱼皮肤中还有黑色素细胞和虹彩细胞。四种色素细胞以不同的方式分布组合进一步丰富了鱼的体色。如红点绿七彩神仙鱼红色素细胞和黄色素细胞常呈簇分布,在未被红色素细胞和黄色素细胞占据的位置又常常存在大量的虹彩细胞和黑色素细胞,使鱼体呈现红蓝相间的色彩。另外,当黑色素细胞中的黑色素颗粒呈扩散状态时,黑色素细胞常常将虹彩细胞掩盖,因此红点绿七彩神仙鱼在受到某种刺激或在生殖期间体色会明显加深。

参考文献:

- [1] 王 锐,费小红. 四种增色剂在观赏鱼中应用的研究[J]. 北京水产,2005,4:37-38.
- [2] 李 云,李英文,向 泉,等. 类胡萝卜素甲基萘酮对观赏鱼体色的影响[J]. 西南农业大学学报,1999,21(3):270-273.
- [3] 王吉桥,赵 睿. 不同食物和光照时间对黑龙睛金鱼体色和生长的影响[J]. 中国观赏鱼,2002,(2):24-26.
- [4] 王安利,刘金海,王维娜. 锦鲤总色素及组分的比较研究[J]. 水生生物学报,2005,29(6):694-697.
- [5] 王海滨,任丹丹. 苜蓿红色类胡萝卜素结构的初步鉴定[J]. 中国农业科学,2004,37(9):1363-1368.
- [6] 卢艳杰,陈正行. 玉米蛋白粉中黄体素和玉米黄素的分离与定性[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(5):11-15.
- [7] 王海滨. 类胡萝卜素的紫外可见光谱特性及其应用[J]. 武汉工业学院学报,2004,23(4):10-13.
- [8] 陈龙胜,彭密军. 叶黄素酯的皂化工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2006,(18):122-124.
- [9] 王海滨,任丹丹. 苜蓿红色类胡萝卜素的拉曼光谱特性研究[J]. 水生生物学报,2004,28(4):380-384.
- [10] 冷向军,李小勤. 水产动物着色的研究进展[J]. 水产学报,2006,30(2):138-143.
- [11] 余国勇. 五中色素细胞的研究及其鉴别方法[J]. 生物学教学,1996,(10):6-7.