

文章编号:1001-6880(2014)10-1705-06

# 乌骨鸡黑色素氧化降解工艺研究

黄宇玫<sup>1,2</sup>,田颖刚<sup>1\*</sup>,乔娟娟<sup>1</sup><sup>1</sup>南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室,南昌 330047; <sup>2</sup>南昌大学 科学技术学院,南昌 330029

**摘要:**采用碳酸钾-过氧化氢法、高锰酸钾法、氢氧化钠-过氧化氢法及氨水-过氧化氢法对乌骨鸡黑色素进行氧化降解,并获得可溶性的降解产物,运用GC-MS分析降解萃取产物中物质种类,并且分析了降解产物得率和分子量分布,发现降解方法不同,降解产物各指标也存在相应差异。其中高锰酸钾法得率最高为82.5%,碳酸钾-过氧化氢次之为61.5%,其余均在50%以上;降解产物分子量以氨水-过氧化氢法最高,高达12265.5 Da,其降解程度最小,其萃取物中的物质种类及含量较少,而强酸性环境下高锰酸钾氧化降解乌骨鸡黑色素程度最大,降解产物中存在许多被彻底氧化的有机酸类,进一步表明强酸、强碱介质中黑色素更容易被氧化断裂。

**关键词:**乌骨鸡黑色素;氧化降解;分子量;GC-MS

中图分类号:R914

文献标识码:A

## Research on Oxidative Degradation Technology of Melanin from Black-Bone Silky Fowl

HUANG Yu-mei<sup>1,2</sup>, TIAN Ying-gang<sup>1\*</sup>, QIAO Juan-juan<sup>1</sup><sup>1</sup>State Key Laboratory of Food Sience and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;<sup>2</sup>Nanchang University College of Science and Technology, Nanchang 330029, China

**Abstract:** The Black-bone silky fowl melanin (BSFM) was degraded with  $K_2CO_3$ - $H_2O_2$ ,  $KMnO_4$ ,  $NaOH$ - $H_2O_2$  and  $NH_3 \cdot H_2O$ - $H_2O_2$  oxidative degradation methods to afford water-soluble products. The identities and molecular weight distributions of the degradation products were analyzed and the degradation yields of different methods were calculated. Results showed that products from different degradation methods were different. The degradation yield of  $KMnO_4$ -degradation method was up to 82.5%, followed by  $K_2CO_3$ - $H_2O_2$  method with 61.5%, the degradation yields of the rest two methods were also above 50%. As to the molecular weight of degradation products,  $NH_3 \cdot H_2O$ - $H_2O_2$  degradation products was the biggest and up to 12265.5 Da, the degradation degree was least, the types and quantities of  $NH_3 \cdot H_2O$ - $H_2O_2$  degradation products was also less than the other three methods. On the other hand, with the strong acidic environment,  $KMnO_4$  oxidation degradation degree of BSFM was largest. It further proved that in the strong acidic and/or basic conditions melanin was more easily to be oxidized and hence degraded.

**Key words:** black-bone silky fowl melanin; oxidative degradation; molecular weight; GC-MS

乌骨鸡黑色素是一种大分子的生物功能活性物质,具有抗氧化清除自由基<sup>[1]</sup>、延缓衰老<sup>[2]</sup>、抗诱变和提高机体免疫力<sup>[3]</sup>等功能,由于乌骨鸡黑色素具有黑色素的共性特征,即不溶于水和几乎所有溶剂且与蛋白质紧密相连<sup>[4]</sup>,这对乌骨鸡黑色素的深入研究造成极大的影响。目前国内外大多对乌骨鸡黑色素这一系多聚物进行整体性研究,通过元素分析、ICP-AES 对其 C、H、O、N、S 及金属元素进行分析,

通过波谱法(红外光谱、电子能谱、电子顺磁共振波谱、X-射线衍射等)研究其基本结构特征。但这些结构特征及信息仍不能完全阐述乌骨鸡黑色素的结构。

近年来,研究者采用化学氧化降解法<sup>[5]</sup>、高温裂解气相质谱法<sup>[6]</sup>对乌骨鸡黑色素进行裂解,并对裂解后物质进行相关研究,期望对乌骨鸡黑色素结构进行进一步阐明,其中化学氧化降解法包括高锰酸钾氧化降解法、碱性过氧化氢氧化降解法。孙亚真等<sup>[7]</sup>对乌骨鸡黑色素进行化学氧化降解,并用HPLC 色谱对降解产物酸性乙醚萃取物进行分析发现降解产物中 PDCA 和 PTCA;涂勇刚等采用 Py-

收稿日期:2013-05-02 接受日期:2013-09-02

基金项目:国家自然科学基金项目(20962015);江西省自然科学基金项目(2009GZN0087);江西省教育厅科技项目(GJJ10308)

\* 通讯作者 E-mail:tianyinggang@126.cn

GC/MS 对乌骨鸡黑色素进行高温裂解分析发现裂解产物中存在苯、苯酚、吲哚、吡咯、氰类衍生物及脂类物质。

乌骨鸡黑色素作为一个大分子多聚物,实验室前期研究发现,经过化学降解所得降解产物较复杂,且不同的降解方法对乌骨鸡黑色素的降解程度及降解产物的种类是有影响的。本实验采用四种不同的氧化降解方法对乌骨鸡黑色素进行降解,并对降解得率、降解产物分子量进行初步分析,运用 GC-MS 对不同降解方法所得降解产物乙醚萃取部分进行分析,为指示不同降解方法对乌骨鸡黑色素降解程度及降解产物中物质的种类的影响,也为进一步研究乌骨鸡黑色素结构及彼此间生源关系提供一定的依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

乌骨鸡黑色素由实验室自制。

硅胶 G 板,青岛海洋化工厂分厂;牛血清白蛋白,上海丽珠东风生物技术有限公司;细胞色素 C、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、甘氨酸,购于索莱宝公司;葡聚糖 T-10、T-40、T-70、T-500、浓硫酸、高锰酸钾、亚硫酸钠、碳酸钾、过氧化氢(30%)、氢氧化钠、氨水(25%)、乙醚、硫酸铜、酒石酸钾钠、香草醛、硫酸、磷酸、氯化铁、溴酚兰、溴百里酚兰、磷钼酸、茚三酮、正丁醇、对二甲氨基苯甲醛、丙酮、硅钨酸等,均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器与设备

DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;HL-2S 恒流泵,上海青浦沪西仪器厂;旋转蒸发仪,上海申生科技有限公司;SHZ-Ⅲ型循环水真空泵,上海亚荣生化仪器厂;G1314B 型 Agilent 紫外检测器;G1310A 型 Agilent 单元泵;Agilent 6890 型气相色谱与 5973 型质谱联用仪;ZF-2 型三相紫外仪,上海安亭电子仪器厂;TGL-16G-A 离心机,上海安亭科学仪器厂;Precisa XB220A 分析天平;HH-4 数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;PHS-2C 型 pH 计,上海理达仪器厂;UV-2000 紫外-可见分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器,河南省予华仪器有限公司。

## 2 实验方法

### 2.1 乌骨鸡黑色素的不同方法降解

#### 2.1.1 碳酸钾-过氧化氢氧化法

参考文献<sup>[8]</sup>并做改进,精密称取 100 mg 乌骨鸡黑色素,加入 100 mL 1 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,以一定流速连续通入 4 mL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(可稀释处理),100 ℃ 加热回流反应。反应结束后流水冷却,取 1/4 反应液离心(6000 rpm,5 min),沉淀用蒸馏水洗涤两次后,合并上清,上清与沉淀置于恒重后坩埚中,于 105 ℃ 恒重,以计算降解得率。剩余反应液用重蒸后乙醚进行萃取,每次 5 mL,萃取 5 次,萃取液合并后用无水硫酸钠除去水分,浓缩至 1 mL 用于 GC-MS(降解产物中挥发性成分)分析;萃取后剩余液浓缩后定容到 50 mL 以用于降解产物成分及分子量分析。样品编号为 A。

#### 2.1.2 高锰酸钾氧化法

参考文献<sup>[9]</sup>并做改进,精密称取 100 mg 乌骨鸡黑色素,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 200 mL 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,混匀后,加入 3% KMnO<sub>4</sub>,每次 200 μL,高速磁力搅拌反应至紫色消失时,立即再次加入 200 μL,直到紫色不消失,静置 10 min 后,加入 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 2 mL 除去剩余的 KMnO<sub>4</sub> 和 MnO<sub>2</sub>。取 1/4 反应液离心(6000 rpm,5 min)用于得率分析,剩余反应液用重蒸后乙醚进行萃取,每次 5 mL,萃取 5 次,萃取液合并后用无水硫酸钠除去水分,浓缩至 1 mL 用于 GC-MS(降解产物中挥发性成分)分析;萃取后剩余水相缩后定容到 50 mL 用于降解产物成分及分子量分析,样品编号为 B。

#### 2.1.3 氢氧化钠-过氧化氢氧化法

精密称取乌骨鸡黑色素 100 mg,置于 50mL 反应釜内,加入 pH 12 的 NaOH 溶液 20 mL,以 0.2 mL/min 流速通入 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.4 mL(可稀释处理),90 ℃ 保温搅拌冷凝反应,反应 20 h,反应结束后流水冷却。降解液定重至 40 g,取混匀的降解液 10 g 用于得率分析,剩余反应液用重蒸后乙醚进行萃取,每次 5 mL,萃取 5 次,萃取液合并后用无水硫酸钠除去水分,浓缩至 1mL 用于 GC-MS(降解产物中挥发性成分)分析;萃取后剩余液浓缩后定容到 50 mL 以用于降解产物成分及分子量分析,样品编号为 C。

#### 2.1.4 氨水-过氧化氢氧化法

参考文献<sup>[10]</sup>并做进一步改进,精密称取 100 mg 乌骨鸡黑色素,按固液比 10:3(W:V) 加入 pH 值为 10 的氨水溶液,匀速通入 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mL(可稀

释处理),70 ℃水浴搅拌反应8 h,流水冷却后,定重,反应液混匀后取1/4用于得率分析,剩余反应液用重蒸后乙醚进行萃取,每次5 mL,萃取5次,萃取液合并后用无水硫酸钠除去水分,浓缩至1 mL用于GC-MS(降解产物中挥发性成分)分析;萃取后剩余液浓缩后定容到50 mL以用于产物成分及分子量分析,样品编号为D。

### 2.1.5 得率计算

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{样品重量} - \text{沉淀重量}}{\text{样品重量}} \times 100\%$$

## 2.2 乌骨鸡黑色素降解产物分子量分布测定

运用凝胶色谱柱测定不同方法降解所得乌骨鸡黑色素降解产物的分子量分布,用已知分子量标准品作分子量与时间的标准曲线来衡量各降解产物的分子量分布情况,从而比较不同方法所获降解产物分子量大小,为后期研究提供依据。前期研究发现乌骨鸡黑色素降解产物紫外全波长扫描图中最大吸收峰在205~215 nm之前,故本实验吸光度测定选用210 nm。

### 2.2.1 色谱条件

#### 2.2.1.1 分子量范围100~7000 Da

仪器:Agilent131型高效液相色谱仪;色谱柱:Superdex peptide 10/300 GL(10 mm×300 mm I. D., 13-15 μm);检测器:Agilent G1314B型紫外检测器;检测波长:210 nm;流动相:0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液,含0.01 mol/L 氯化钠,pH为6.96;流速:0.8 mL/min;进样量:20 μL。

#### 2.2.1.2 分子量范围>7000 Da

仪器:Waters515二元高压高效液相色谱仪;色谱柱:Ultrahydrogel Linea 7.8×300 mm column;检测器:视差检测器(RID-10A型);流动相:超纯水;检测温度:35 ℃,柱温箱:35 ℃;流速:0.6 mL/min;进样量:20 μL。

### 2.2.2 分子量标准曲线的绘制

分子量范围100~7000 Da:将分子量标准品用流动相配制成0.5 mg/mL的溶液,充分溶解混匀后用0.45 μm水系膜过滤,按“2.2.1.1”色谱条件进样分析。分子量标准品分别为:细胞色素C、氧化型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽以及甘氨酸。

分子量>7000 Da:将系列分子量标品用超纯水配制成2 mg/mL的溶液,充分溶解后用0.45 μm水系膜过滤,按“2.2.1.2”色谱条件进行分析,葡聚糖标品分别为:T-2000(2000000 Da)、T-70(7000 Da)、

T-40(4000 Da)、T-10(10000 Da)和葡萄糖(180 Da)。

### 2.2.3 不同降解产物的分子量测定

将A、B、C样用流动相配制浓度为0.5 mg/mL的溶液,0.45 μm的水系微孔滤膜过滤,按“2.2.1.1”色谱条件进样分析;D样配制为用超纯水4 mg/mL溶液,按“2.2.1.2”色谱条件进行分析。

## 2.3 四种不同降解产物乙醚萃取物GC-MS初步分析

### 2.3.1 GC-MS分析条件

色谱条件:Agilent HP-5毛细管色谱柱(30 m×250 μm,0.25 μm);自动进样,进样量1 μL,不分流模式,进样口温度250 ℃;程序升温:初始温度60 ℃,保留3 min,以5 ℃/min的速率升至300 ℃,保留15 min;检测器温度250 ℃;载气He,流速1 mL/min。

质谱条件:EI电离源;电子能量70 eV;离子源温度230 ℃;接口温度250 ℃;扫描周期2.84次/s,扫描范围33~500 u;数据处理系统MSD Chem Station;标准质谱库:NIST02。

### 2.3.2 样品分析

取“2.1”所制备乙醚萃取物过膜进行GC-MS分析。

## 3 结果与讨论

### 3.1 四种不同氧化降解方法对乌骨鸡黑色素可溶性产物得率的影响

由图1可看出,在高锰酸钾条件下,降解产物得率最高,达到82.5%;碳酸钾-过氧化氢降解得率次之,为61.5%;氢氧化钠-过氧化氢(pH 12)及氨水-过氧化氢(pH 10)得率分别为56%和53.6%,这表明在强碱及强氧化条件下,乌骨鸡黑色素降解产物

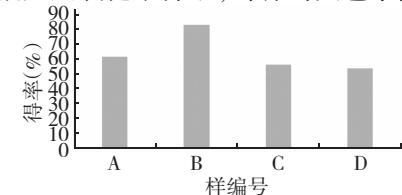


图1 不同降解方法所得可溶性产物得率

Fig. 1 Yields of soluble components of BSFM degradation products using different degradation methods

A:碳酸钾-过氧化氢降解;B:高锰酸钾氧化降解;C:氢氧化钠-过氧化氢降解;D:氨水-过氧化氢降解

A:K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,B:KMnO<sub>4</sub>,C:NaOH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,D:NH<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

得率较中低强度碱性条件下要高,推测可能由于强碱条件下黑色素舒展溶解性增强,更易被过氧化氢氧化断裂所致。

但由于强酸强碱条件,降解产物中酸及盐的含量较高,使后期水溶性降解产物的分离程序变复杂,且对水溶性降解产物分析也造成了较大的影响;与其相比,较弱的条件降解得率可达到 50% 以上,且杂质含量少,分析水溶性产物较便利。

表 1 分子量标准品保留时间 min 及 logMw

Table 1 The retention times and logarithmic values of molecular weight markers

| 分子量标准品<br>Standard           | 标准品分子量 Mw<br>Mw of standard | logMw | 保留时间<br>Retention time (min) |
|------------------------------|-----------------------------|-------|------------------------------|
| 甘氨酸 Glycine                  | 75.07                       | 1.876 | 23.003                       |
| 还原型谷胱甘肽 Reduced glutathione  | 307.33                      | 2.488 | 20.960                       |
| 氧化型谷胱甘肽 Oxidized glutathione | 612.63                      | 2.787 | 19.179                       |
| 细胞色素 CCytochrome C           | 12400                       | 4.093 | 13.449                       |

### 3.2.1.2 分子量 > 7000 Da 标准曲线

运用凝胶色谱测定物质分子量的依据是凝胶的分子筛原理,即对于某一型号的凝胶,其要求的分子量范围内,物质分子量的对数 (LogMw) 与其在凝胶柱上的洗脱体积 (Ve) 及分配系数 (Kav) 存在线性关系,根据关系式  $Kav = (Ve - V_0) / (Vt - V_0)$ ,  $Ve = a -$

$b \cdot \text{LogMw}$ (其中  $V_0$  为蓝色葡聚糖的洗脱体积,  $Vt$  为葡萄糖的洗脱体积)计算出  $Ve$  和  $Kav$ ,以 LogMw 为横坐标,  $Kav$  为纵坐标做标准曲线,分子量标准曲线方程为  $Kav = -0.2383 \cdot \text{LogMw} + 1.5498$ ,  $R^2 = 0.9909$ 。

表 2 系列葡聚糖的保留体积 Ve 和 Kav

Table 2 The retention volume and Kav of Dextrans

|             | Mw      | 保留体积 Ve | LogMw | Kav   |
|-------------|---------|---------|-------|-------|
| 葡萄糖 Glucose | 180     | 11.30   | 2.255 | 1.000 |
| T-10        | 10000   | 8.45    | 4.000 | 0.584 |
| T-40        | 40000   | 7.76    | 4.602 | 0.483 |
| T-70        | 70000   | 7.16    | 4.845 | 0.396 |
| T-500       | 500000  | 6.03    | 5.699 | 0.232 |
| T-2000      | 2000000 | 4.43    | 6.301 | 0.000 |

对四种不同降解产物水溶性部分的分子量分布进行初步测定,降解产物分子量分布不仅可以间接评估降解方法的剧烈程度,同时也对乌骨鸡黑色素在不同方法下的降解程度进行了指示。通过对降解程度不同的掌握,为降解产物进一步的分析做了基础铺垫。水溶性产物分子量分布结果如图 2,乌骨鸡黑色素各方法降解产物分子量如表 3 所示。氨水-过氧化氢降解分子量最大,且分子量跨度也较大

为一千到几万道尔顿,次之为碳酸钾-过氧化氢降解,氢氧化钠-过氧化氢与高锰酸钾降解样图谱保留时间相当,分子量相当,均在 1000 Da 以下,这表明不同降解方法对乌骨鸡黑色素的降解程度不同,其中强酸性环境下高锰酸钾氧化降解乌骨鸡黑色素程度最大,而氨水-过氧化氢的降解程度最小,进一步表明强酸、强碱介质中黑色素更容易被氧化断裂。

## 3.2 四种不同氧化降解方法对乌骨鸡黑色素水溶性产物分子量的影响

### 3.2.1 分子量标准曲线的制作

#### 3.2.1.1 分子量范围 100-7000 Da 标准曲线

表 1 为甘氨酸、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽和细胞色素 C 在凝胶柱上的保留时间,根据此表得出分子量标准曲线方程为:  $\text{logMw} = -0.2272x + 7.1626$ ,  $R^2 = 0.9957$ 。

表 3 乌骨鸡黑色素各方法降解产物分子量

Table 3 The molecular weight distribution of different degradation products

| 样品编码<br>Sample code | 样品名称<br>Sample name                                       | 保留时间/体积(min/mL)<br>Retention time/volume | 分子量范围(Da)<br>Distribution of Mw |
|---------------------|---|--|---------------------------------|
| A                   | 碳酸钾-过氧化氢降解样品 $K_2CO_3-H_2O_2$ degradation products        | 17.448 min                               | 1572.8                          |
|                     |   | 21.785 min                               | 162.5                           |
|                     |   | 22.938 min                               | 88.9                            |
|                     |   | < 22.938 min                             | < 88.9                          |
| 13B.5               | 高锰酸钾氧化降解样品 $KMnO_4$ degradation products                  |  | 22.091 min                      |
|                     |   | 22.959 min                               | 87.9                            |
|                     |   | 24.081 min                               | 48.9                            |
| 88E.6               | 氢氧化钠-过氧化氢降解样品 $NaOH-H_2O_2$ degradation products          |  | 18.539 min                      |
|                     |   | 20.041 min                               | 404.8                           |
|                     |   | 22.189 min                               | 131.5                           |
| 122D5.5             | 氨水-过氧化氢降解样品 $NH_3 \cdot H_2O-H_2O_2$ degradation products |  | 8.444 mL                        |
|                     |   | 8.923 mL                                 | 6320.9                          |
|                     |   | 10.180 mL                                | 1106.6                          |

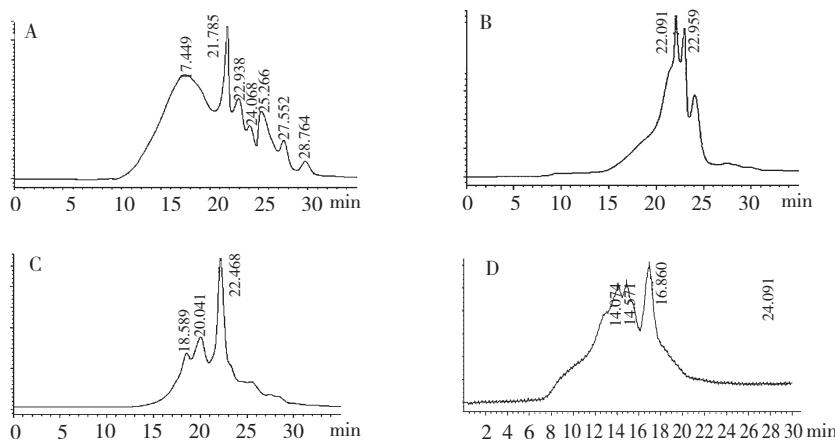


图 2 样品 A、B、C、D 的分子量分布图

Fig. 2 The molecular weight distribution of sample A, B, C and D

### 3.3 GC-MS 分析不同降解产物的乙醚萃取部份的化学组成

乌骨鸡黑色素的化学氧化降解过程亦是一个复杂的过程,且产物亦是复杂混合的未知物。采用GC-MS对四种不同氧化降解方法获得的降解产物乙醚萃取部分进行物质定性分析。图3为四种样品总离子流图,由图可以看出A、B、C样乙醚萃取物中物质含量较D样多,且A、B样物质含量相当;从种类数来看,D样物质种类数最少,其他三种样品相当;从物质成分来看,A和B样中物质主要以有机酸和脂类物质为主,其中A又以脂类为主,还含有少

量萘、醛、酮、醇、菲、唑及胺类物质,B则以有机酸类物质为主,含有少许烃类及吡喃、呋喃、吡唑衍生物,C样中主要成分为脂肪族与不饱和烃类、酮及醛类,还含有少量吡啶、呋喃、吖啶、少量有机酸及醚类物质;D样中成分为酚类衍生物、烃类、芴、酰胺以及喹啉衍生物。

四种不同氧化降解样品乙醚萃取物中的物质种类和含量有差异与降解条件有很大的关系,碳酸钾降解提供了强碱性环境,为过氧化氢的氧化提供了一个有利的条件;尽管黑色素不溶于酸性介质,但高锰酸钾在强酸性条件下有极强的氧化能力,故在降

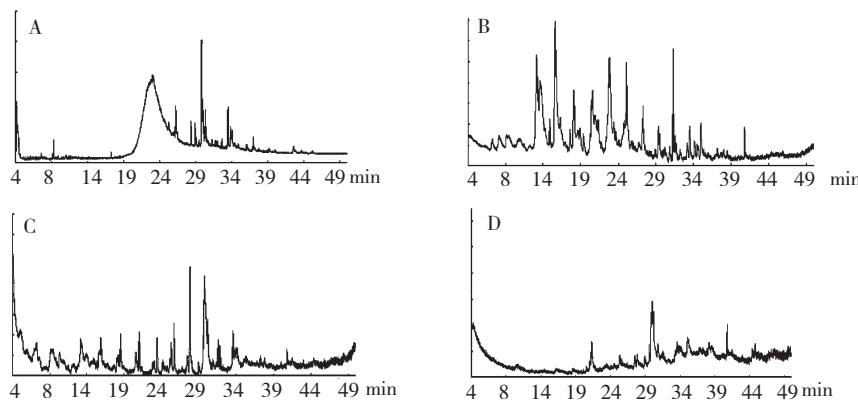


图3 样品 A、B、C、D 乙醚萃取物 GC-MS 总离子流图

Fig. 3 GC-MS total ion chromatograms of ethereal extracts of BSFM degradation products A, B, C and D

解产物中存在许多被彻底氧化的有机酸类物质;氨水-过氧化氢由于对黑色素的断裂程度最低,降解产物分子量较大,故其萃取物中的物质种类及含量较少。

## 4 结论与讨论

乌骨鸡黑色素经四种不同化学氧化降解方法降解后,降解产物中产物得率、分子量分布及乙醚萃取物存在的挥发性成分进行分析。结果显示:降解方法不同,降解产物各指标也存在相应差异。降解产物得率随降解条件强度的增加而增大,强氧化条件下得率较中低强度碱性条件下要高,其中高锰酸钾法最高为 82.5%,碳酸钾-过氧化氢次之为 61.5%,其余均在 50% 以上;降解产物分子量以氨水-过氧化氢法最高,高达 12265.5 Da,碳酸钾-过氧化氢次之为 1572.8 Da。

四种降解产物乙醚萃取物挥发性物质分析发现氨水-过氧化氢降解产物中挥发性成分较少,可能与其降解产物程度较小产物、分子量较大有关;其他方法所得产物中挥发性成分均较多,其中氢氧化钠-过氧化氢降解物中以烃类物质为主,也存在少量的酸类物质,而碳酸钾和高锰酸钾降解产物中以脂肪酸和酯类物质为主,含有少量烃类物质。这表明降解方法的不同对影响到降解产物各方面的性质差异。乌骨鸡黑色素是大分子生物多聚物,其降解过程较复杂且存在各种不确定性,故控制好降解条件对其结构成分的研究有一定的帮助,通过初步确定化合物种类亦可为后期相应产物分离奠定基础。

## 参考文献

1 Tu YG, Sun YZ, Tian YG, et al. Physicochemical characteri-

sation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus Brisson*). *Food Chemistry*, 2009, 114: 1345-1350.

- 2 Xu XL(徐幸莲), Zhuang S(庄苏), Chen BX(陈伯祥), et al. The wfect of white silky fowl on antiaging in *Drosophila melanogaster*. *Food Sci* (食品科学), 2000, 21: 134-136.
- 3 Yuan Y(袁缨), Yuan X(袁星), Bai QY(白庆余). The preliminary research on the chicken melanin anti mutagenic effect. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 5: 301-303.
- 4 Cesarini JP. Melanins and their possible roles through biological evolution. *Adv Space Res*, 1996, 18(12): 35-40.
- 5 Liu Y, Kempf VR, Nofsinger JB, et al. Comparison of the structural and physical properties of human hair eumelanin following enzymatic or acid/base extraction. *Pigment Cell Res*, 2003, 16: 355-365.
- 6 Tu YG, Xie MY, Sun YZ, et al. Structural characterization of melanin from Black-bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus Brisson*). *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 22: 134-136.
- 7 Sun YZ(孙亚真), Xie MY(谢明勇), Tu YG(涂勇刚), et al. Determination of melanin from Black-bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus Brisson*) by HPLC. *J Instru Anal*, 2008, 27: 1363-1366.
- 8 Sun YZ(孙亚真). Study on the determination and physico-chemical properties of melanin from Black-bone Silky Fowl. Nanchang: Nanchang University College, MSc. 2008.
- 9 Napolitano A, Vincensi MR, d' Ischia M, et al. A new benzothiazole derivative by degradation of pheomelanins with alkaline hydrogen peroxide. *Tetrahedron Lett*, 1996, 37: 6799-6802.
- 10 Tu YG(涂勇刚). Study on the structure and function of Taihe Silky Fowl Melanin. Nanchang: Nanchang University College, PhD. 2009.