

# 大鲵皮肤色素提取工艺及抗氧化研究

杨慧<sup>1</sup>,陈德经<sup>1,2\*</sup>,夏冬辉<sup>3</sup>,韩豪<sup>1,2</sup>,陈海涛<sup>4</sup>

<sup>1</sup>陕西理工大学生物科学与工程学院;<sup>2</sup>陕西理工大学,陕西省资源生物重点实验室;

<sup>3</sup>陕西理工大学化学与环境科学学院;<sup>4</sup>汉中龙鲵生物工程股份有限公司,汉中 723001

**摘要:**为优化大鲵皮肤黑色素的提取工艺条件,探讨大鲵皮肤黑色素组成成分及体外抗氧化活性,采用酶法和碱溶酸沉法提取大鲵皮肤黑色素,以氢氧化钠浓度、液料比、提取温度为影响色素提取率因素,优化黑色素提取工艺条件,用紫外-可见光谱仪、红外光谱仪和超高效液相质谱仪测定黑色素的光谱特性,测定其抗氧化性。结果表明:大鲵皮肤黑色素最佳提取工艺条件为氢氧化钠浓度 1.5 mol/L、液料比 1:15、提取温度 45 ℃,黑色素提取率达 0.65%。大鲵皮肤黑色素的紫外最大吸收波长为 214 nm,由真黑色素和脱黑色素两种色素组成,其对超氧阴离子自由基的清除率为 30.51%,对羟基自由基的清除率为 54.17%。大鲵皮肤黑色素具有一定的体外抗氧化能力。

**关键词:**大鲵;黑色素;提取工艺;抗氧化

中图分类号:R914;Q71

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0887-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.023

## Extraction process and antioxidant activity of melanin from giant salamander skin

YANG Hui<sup>1</sup>, CHEN De-jing<sup>1,2\*</sup>, XIA Dong-hui<sup>3</sup>, HAN Hao<sup>1,2</sup>, CHEN Hai-tao<sup>4</sup>

<sup>1</sup>College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology;

<sup>2</sup>Provincial Bio-resource key Laboratory;

<sup>3</sup>College of Chemistry and Environment, Shaanxi University of Technology;

<sup>4</sup>Hanzhong Longni Biological Engineering Co., Ltd, Hanzhong 723001, china

**Abstract:** In order to optimize the extraction conditions of skin melanin from giant salamander, the composition of skin melanin and its antioxidant activity *in vitro* were studied. The melanin of giant salamander skin was extracted by enzymatic method and alkali solution acid precipitation method. Taking sodium hydroxide concentration, solid-liquid ratio and extraction temperature as factors and optimizing the melanin extraction process. We also determined its spectral characteristics by ultraviolet-visible spectroscopy, infrared spectroscopy, ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry and its antioxidant effect. The results showed that the optimum extraction conditions of skin melanin from giant salamander were sodium hydroxide concentration 1.5 mol/L, solid-liquid ratio 1:15, extraction temperature 45 ℃, and the extraction rate of melanin was 0.65%. The maximum absorption wavelength of skin melanin of giant salamander is 214 nm, which is composed of two pigments: eumelanin and phaeomelanin. The scavenging rate of superoxide anion radical and hydroxyl radical was 30.51% and 54.17% respectively. In general, giant salamander skin melanin has antioxidant activity *in vitro*.

**Key words:** giant salamander; melanin; extraction process; antioxidant

大鲵(*Andrias davidianus*)俗称“娃娃鱼”,属有尾目、隐鳃鲵科,是鱼类和爬行动物之间的代表两栖类过渡类型,有“生物界活化石”的美称<sup>[1]</sup>,其机体内含有多种天然活性物质,在药用、保健产品的开发利用方面具有独特的经济价值<sup>[2]</sup>。近年来,人们对大

鲵研究主要集中在大鲵肉<sup>[3]</sup>和大鲵黏液<sup>[4]</sup>等方面,尚未对大鲵皮肤黑色素开展相关研究。黑色素是酚类或吲哚类物质通过氧化聚合形成的高分子生物色素,其不溶于水、酸和常见的有机溶剂,可溶于氢氧化钠、三乙胺等碱性溶液<sup>[5]</sup>。动物黑色素有真黑色素和脱黑色素两类,前者不含硫,呈棕色或黑色;后者含硫,呈黄色或微红棕色。天然黑色素具抗紫外、抗氧化、抗菌、提高免疫力<sup>[6-9]</sup>功效,可应用于化妆

品、天然染发剂、食品添加剂和药品等领域。

目前,动物黑色素的提取方法主要有高速离心法<sup>[10]</sup>、酸/碱水解法<sup>[11]</sup>、酶法<sup>[12]</sup>和碱溶酸沉法<sup>[13]</sup>。提取和制备方法的不同会对黑色素结构和生物活性产生不同程度的影响,要获得高纯度的黑色素,就要最大限度的去除色素以外的其它物质。酶解可去除蛋白质,碱溶酸沉可去除黑色素中其它不被酶解的杂质,得到纯度较高的色素。

本实验利用酶法和碱溶酸沉法制备大鲵皮肤黑色素,以大鲵皮黑色素的提取率为指标,在单因素实验基础上,用正交实验优化黑色素提取的工艺条件。利用紫外-可见光谱仪、红外光谱仪和超高效液相-三重四级杆串联质谱仪测定大鲵皮肤黑色素的组成成分,并测定其抗氧化性,为大鲵皮黑色素的综合开发利用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

材料:大鲵皮,汉中龙鲵生物工程股份有限公司提供。

试剂:维生素C,GR(天津市天新精细化工开发中心);三乙胺,GR(天津市富宇精细化工开发中心);硫酸亚铁、水杨酸,GR(天津市北联精细化学品开发有限公司);邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷,GR(上海源叶生物科技有限公司);木瓜蛋白酶,酶活力1000 U/mg(北京鼎国生物技术有限责任公司);溴化钾,色谱纯(天津天光光学仪器有限公司);甲醇、甲酸,色谱纯(天津市光复科技发展有限公司)。

仪器:UPLC-TQD超高效液相-三重四级杆串联质谱仪(Waters);BRUKER VERTEX 70红外光谱仪(德国布鲁克有限公司);UV-1750型紫外可见分光光度仪(日本岛津仪器公司);LC-800低速离心机

表1 正交因素水平设计表  
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	氢氧化钠浓度 A Concentration of NaOH (%)	料液比 B Solid-liquid ratio (g/mL)	提取温度 C Extraction temperature (℃)
1	1	1:10	40
2	1.5	1:15	45
3	2	1:20	50

### 1.2.4 大鲵皮色素定性分析

#### 1.2.4.1 紫外-可见光谱法

取大鲵皮色素于0.01%氢氧化钠溶液中,震荡混匀后置于超声清洗器中超声30 min,制得大鲵皮

(科大创新股份有限公司);JA5003电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);DZF-6050型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);601超级水浴锅(金坛市瑞华仪有限公司);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大鲵皮肤色素提取及纯化工艺

将大鲵皮置于6%NaCl中浸泡60 min后转入0.1%柠檬酸溶液中脱色,45 ℃水浴90 min后刮取色素,而后加入5%木瓜蛋白酶,55 ℃酶解4 h后离心,弃上清液。用石油醚反复溶解沉淀物3次以除去色素中的脂肪,抽滤后真空干燥沉淀物。然后称取沉淀物,加入氢氧化钠溶液浸提一段时间后,离心,取上清液,用6 mol/L HCl溶液调pH至1.0,静置后4 000 rpm离心10 min,所得沉淀物即为黑色素粗提物。将黑色素粗提物按以上碱溶、酸沉步骤反复进行3次后,用乙醇、蒸馏水洗涤后,40 ℃真空干燥即得大鲵黑色素纯品,计算提取率。

$$\text{提取率} = \frac{\text{黑色素纯品质量}}{\text{刮取色素质量}} \times 100\%$$

#### 1.2.2 单因素实验

准确称取大鲵皮色素1 g,设定氢氧化钠浓度6%、料液比1:15、提取温度45 ℃为固定值,分别考察不同氢氧化钠浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mol/L)、料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 g/mL)和提取温度(35、40、45、50、55 ℃)对大鲵皮肤黑色素提取率的影响,提取时间为30min。

#### 1.2.3 正交实验

在单因素实验基础上,进行L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验,以大鲵皮肤黑色素提取率为指标,确定最佳工艺条件。实验方案见表1。

色素溶液。紫外可见分光光度计测定200~800 nm大鲵皮色素溶液的吸光值,绘制吸光值随波长变化的曲线图。

#### 1.2.4.2 红外光谱法

**溴化钾压片法:**将烘干的溴化钾置于玛瑙钵体中研成细粉,准确称取 150 mg 溴化钾粉末两份,一份与 1 mg 纯化后色素样品研细混匀,另一份作为空白,分别压片。用红外光谱仪测定 4 000~400 cm<sup>-1</sup>区间内的透过率。

#### 1.2.4.3 UPLC-MS/MS 法

**样品制备:**取纯化的大鲵皮黑色素 10 mg 溶解于 1% 三乙胺-50% 甲醇混合溶液中,用混合液定容至 25 mL,然后过 0.45 μm 有机滤膜,用 UPLC-MS/MS 测定。

**色谱条件:**ACQUITY BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流速:0.8 mL/min;柱温 40 °C;进样量:10 μL。流动相甲醇和 1% 甲酸水溶液(两者体积比 5:95);检测波长 270 nm。

**质谱条件:**MS 扫描;电离模式:ESI 扫描方式,负离子扫描;脱溶剂气流:600 L/h;脱溶剂气温度:400 °C;锥孔电压:30 V;离子源温度:110 °C;毛细管电压:3 KV。

#### 1.2.5 大鲵皮色素抗氧化性

##### 1.2.5.1 清除超氧阴离子自由基

取不同质量浓度的样品溶液 1 mL,加入 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)4.5 mL,在 25 °C 水浴 10 min 后,加入 3 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.2 mL 混匀,在 25 °C 水浴 5 min,最后加入 8 mmol/L HCl 终止反应,在波长 299 nm 处测定其吸光度值,以 4% NaOH 溶液调零,维生素 C 为阳性对照,平行测定吸光度值 3 次。按下式计算超氧阴离子自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

式中:A<sub>0</sub> 为不加样品溶液,加入邻苯三酚的溶液吸光度;A<sub>1</sub> 为加入样品溶液和邻苯三酚的溶液吸光度;A<sub>2</sub> 为加入样品溶液但不加邻苯三酚的溶液吸光度。

##### 1.2.5.2 清除羟基自由基

向试管中加入不同质量浓度的样品溶液 2 mL,9 mmol/L 硫酸亚铁 2 mL,9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2 mL,最后加入 9 mmol/L 双氧水 2 mL 启动反应,震荡混匀,37 °C 水浴保温 30 min,冷却至室温后离心(5 000 rpm,10 min),取上清液在波长 510 nm 处每隔 30 s 测定其吸光度值,以 4% NaOH 溶液调零,维生素 C 为阳性对照,平行测定吸光度值 3 次。按下式计算羟自由基的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

式中:A<sub>0</sub> 为不加样品溶液,加入水杨酸-乙醇显色剂的溶液吸光度;A<sub>1</sub> 为加入样品溶液和水杨酸-乙醇显色剂的溶液吸光度;A<sub>2</sub> 为加入样品溶液但不加水杨酸-乙醇显色剂的溶液吸光度。

#### 1.3 数据分析

用 SPSS 软件进行数据分析,用 Origin 8.5 软件绘图。

#### 2 结果与分析

##### 2.1 单因素实验结果与分析

###### 2.1.1 氢氧化钠浓度对提取率的影响

氢氧化钠浓度对大鲵皮肤黑色素提取率的影响见图 1。由图 1 可知,随着 NaOH 浓度的增大,黑色素的提取率逐渐升高,当浓度为 1.5 mol/L 时,提取率最高为 0.93%。再增加 NaOH 浓度,黑色素的提取率开始降低,可能是因为氢氧化钠浓度越大,碱溶性杂质溶解量会增加,影响了大鲵皮黑色素在酸沉过程的析出,导致其提取率降低。因此,单因素确定氢氧化钠的最适浓度为 1.5 mol/L。

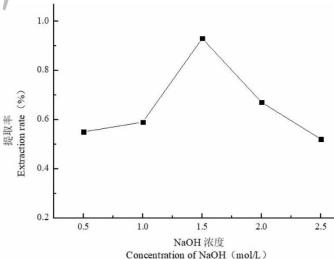


图 1 NaOH 浓度对大鲵皮肤黑色素提取率的影响

Fig. 1 Effect of NaOH concentration on melanin extraction rate of giant salamander skin

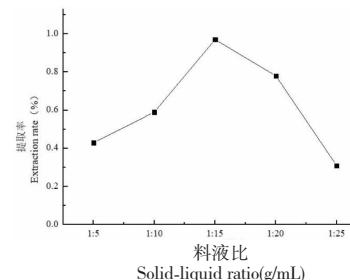


图 2 料液比对大鲵皮肤黑色素提取率的影响

Fig. 2 Effect of solid-liquid on melanin extraction rate of giant salamander skin

###### 2.1.2 料液比对提取率的影响

料液比对大鲵皮肤黑色素提取率的影响见图

2。由图 2 可知,随着料液比的增加,大鲵皮肤黑色素的提取率呈现先升高后降低趋势。这是因为随着料液比的增加,内外浓度差增大,传质动力加大,提取率也随之增大。当料液比达到 1:15 时,提取率最大为 0.97%。再增加料液比,其它碱溶性杂质的溶解度增加,提取率降低。因此,单因素确定最适料液比为 1:15。

### 2.1.3 提取温度对提取率的影响

提取温度对大鲵皮肤黑色素提取率的影响见图 3。由图 3 可知,随着温度升高,提取率先升高后降低,温度为 45 ℃时提取率最高为 0.95%,继续升温至 55 ℃,提取率降至 0.29%。这可能是温度升高可增大分子扩散系数,有利于提取率的提高。温度持续升高,碱溶性杂质溶解度增加,黑色素结构可能破坏,提取率降低。因此,单因素确定最适温度为 45 ℃。

## 2.2 正交实验结果

在单因素实验的基础上,选取氢氧化钠浓度、液料比、提取温度进行 3 因素 3 水平的正交实验,实验

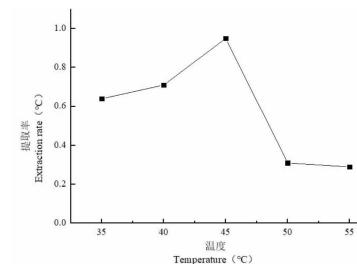


图 3 提取温度对大鲵皮肤黑色素提取率的影响

Fig. 3 Effect of extraction temperature on melanin extraction rate of giant salamander skin

方案及结果见表 2。由表 2 中 R 值大小可以看出,各因素影响大小为 C(温度) > A(氢氧化钠浓度) > B(料液比),理论上以  $A_2B_2C_1$  为最优组合。对正交试验进行了表 3 的方差分析,发现 A、B、C 因素对提取工艺均无显著性影响 ( $P > 0.05$ )。综合成本及能耗因素,最终确定大鲵皮肤黑色素提取的最佳工艺为  $A_2B_2C_1$ ,即在氢氧化钠浓度为 1.5 mol/L,反应温度 45 ℃,料液比 1:15 g/mL 条件下提取,提取率为 0.65%。

表 2 正交实验结果

Table 2 The result of Orthogonal experiment

实验号 No.	(A) 氢氧化钠浓度 Concentration of NaOH	(B) 料液比 Solid-liquid ratio	(C) 提取温度 Extraction temperature	提取率 Extraction rate(%)
1	1	1	1	0.43
2	1	2	2	0.33
3	1	3	3	0.10
4	2	1	2	0.26
5	2	2	3	0.29
6	2	3	1	0.57
7	3	1	3	0.26
8	3	2	1	0.43
9	3	3	2	0.29
$K_1$	0.86	0.95	1.43	
$K_2$	1.12	1.05	0.88	
$K_3$	0.98	0.96	0.65	
R	0.26	0.1	0.78	

## 2.3 大鲵皮色素定性分析结果

### 2.3.1 UV-VIS 光谱图

大鲵皮色素的红外光谱图如图 4 所示,黑色素多聚物因其高度的共轭效应而产生广谱的光吸收特性。大鲵皮黑色素在紫外区的最大吸收波长为 214

nm,在可见光区没有特征吸收峰,在 200 ~ 400 nm 波长范围内吸收值随波长的增大而减少。这与报道的不同来源动物黑色素的最大吸收波长在 210 nm 左右一致。宋茹等<sup>[14]</sup>用酶解法制备的鱿鱼黑色素在 220 nm 有特征吸收峰。衡惠等<sup>[15]</sup>用碱溶酸沉法

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P P value
A	0.011	2	0.006	0.489	0.672
B	0.002	2	0.001	0.088	0.919
C	0.107	2	0.054	4.638	0.177
误差 Errors	0.023	2	0.012	-	-
总和 Total	1.117	8	-	-	-

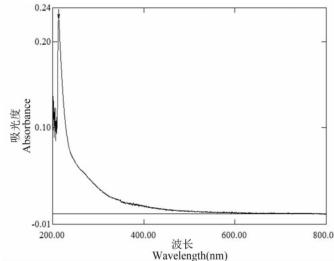
注:  $F_{0.05}(1,2) = 19$ 。Note:  $F_{0.05}(1,2) = 19$ .

图 4 大鲵皮色素的紫外-可见光谱图

Fig. 4 Ultraviolet visible spectrum of giant salamander skin pigment

提取的黑蚂蚁黑色素的最大吸收峰在 212 nm 处。

### 2.3.2 红外光谱谱图

红外光谱是一种化合物结构鉴定的有效方法,有关天然和合成黑色素的研究<sup>[16]</sup>表明,黑色素的红外光谱大体可归属为 3 200~3 500 cm<sup>-1</sup> 为吲哚和吡咯结构单元中 N-H 和 O-H 的伸缩;2 950~2 980 cm<sup>-1</sup> 为烷基中的 C-H 的伸缩;1 710 cm<sup>-1</sup> 为羧基中 C=O 伸缩振动;1 610~1 690 cm<sup>-1</sup> 为芳香环中 C=C 和 C=N 的弯曲以及 C=O 伸缩(酰胺);1 250~1 468 cm<sup>-1</sup> 为酚羟基和羧羟基;1 100~1 050 cm<sup>-1</sup> 为氨基酸中的醇羟基 O-H 振动;700~600 cm<sup>-1</sup> 为 C-S 单键的伸缩振动。

由图 5 可知大鲵皮黑色素结构信息如下,N-H 伸缩振动 (3 296 cm<sup>-1</sup>), 氨基酸中脂肪族 C-H 伸缩振动 (2 858 cm<sup>-1</sup>、2 931 cm<sup>-1</sup>), 酰胺 C=O 伸缩振动 (1 653 cm<sup>-1</sup>), 黑色素吲哚环和氨基酸中 N-H 的弯曲振动 (1 543 cm<sup>-1</sup>), 氨基酸中脂肪族 C-C 弯曲振动 (1 455 cm<sup>-1</sup>), 氨基酸中 C-N 伸缩振动 (1 377 cm<sup>-1</sup>), 酚羟基伸缩振动 (1 236 cm<sup>-1</sup>), C-O 伸缩振动 (1 060 cm<sup>-1</sup>), C-S 伸缩振动 (617 cm<sup>-1</sup>)。1653 cm<sup>-1</sup> 处的强吸收峰推测其有黑色素典型的苯醌类结构,3 296 cm<sup>-1</sup> 和 1 543 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰推测有吲哚结构,617 cm<sup>-1</sup> 推测其可能含硫元素。与乌鸡黑色素的红外光谱相比<sup>[17]</sup>, 主要特征吸收峰位置非常接近, 说明大

鲵皮黑色素与乌鸡黑色素的主要功能基团基本一致。

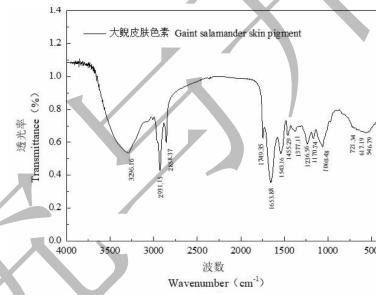


图 5 大鲵皮色素的红外光谱图

Fig. 5 Infrared spectrum of giant salamander skin pigment

### 2.3.3 UPLC-MS/MS 谱图

黑色素的基本结构是一些共价交联的吲哚环,同时含有不定量的吲哚合成前体物。动物黑色素细胞主要产生真黑色素和脱黑色素。真黑色素是由 5,6-二羟基吲哚-2-羧酸 (DHICA) 黑色素和 5,6-二羟基吲哚 (DHI) 黑色素聚合而成, 脱黑色素是由 2-S-半胱氨酸和 5-S-半胱氨酸聚合脱羧形成的苯丙噻嗪衍生物。由图 6 可知, 采用 1% 三乙胺-50% 甲醇混合溶液溶解后, 三乙胺将大鲵黑色素氧化, 通过色谱柱分离后得到图 3C 两个色谱峰, 保留时间分别为 0.90 和 2.15 min。采用 MS 扫描后, 可得准分子离子峰分别为  $m/z$  258 和  $m/z$  283, 结合真黑色素和脱黑色素的降解过程及降解产物可知<sup>[18]</sup>, 化合物 A 相对分子质量为 257, 名称为 5-(羧(羟)基)-4-(羧羰基)-1H-吡咯-2-羧酸, 为真黑色素的降解过程产物之一; 化合物 B 相对分子质量为 282, 名称为 6-(2-氨基-2-羧乙基)-2-羧基-4-羟基苯并噻唑 (BTCA), 为脱黑色素的降解产物之一, 对应化合物的结构式分别如图 7A、B 所示。初步可知, 大鲵皮肤色素由真黑色素和脱黑色素两种色素组成。

有研究表明乌贼黑色素几乎为纯净的真黑色素, 含有 75% 的 DHICA 和 20% 的 DHI<sup>[19]</sup>, 其余 5%

为结合蛋白<sup>[20]</sup>。孙亚真<sup>[21]</sup>利用高相液相色谱及质谱对乌骨鸡黑色素进行分析,认为乌骨鸡黑色素为真黑色素。Borges 等<sup>[22]</sup>对人体头发黑色素的研究

表明,头发黑色素既有真黑色素,也有脱黑色素。由此可见,不同生物、不同组织中黑色素的组成随物种的差异而不同。

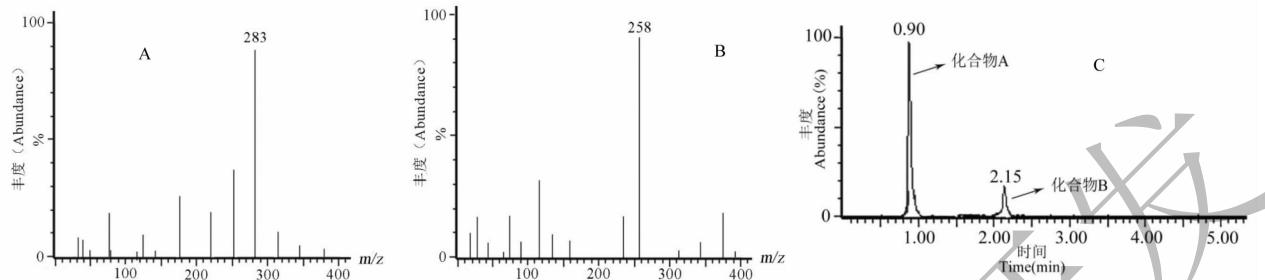


图 6 大鲵皮色素的 UPLC-MS/MS 谱图

Fig. 6 UPLC-MS/MS spectrum of giant salamander skin pigment

注:图 6A 为化合物 A 质谱图,图 6B 为化合物 B 质谱图,图 6C 为大鲵皮色素全扫描总离子流图。

Note: Fig. 6A is compound A mass spectrogram, Fig. 6B is compound B mass spectrogram,

Fig. 6C is total ion flow diagram of giant salamander skin pigments.

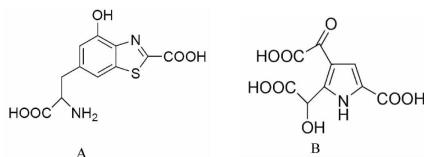


图 7 大鲵皮色素的化学结构式

Fig. 7 Chemical structure of giant salamander skin pigment

注:图 7A 为化合物 A 名称【6-(2-氨基-2-羧乙基)-2-羧基-4-羟基苯并噻唑】。图 7B 为化合物 B 名称【5-(羧(羟)基)-4-(羧羰基)-1H-吡咯-2-羧酸】。

Note: Fig. 7A is the name of compound A [6-(2-amino-2-carboxyethyl)-2-carboxylic acid-4-hydroxybenzo[d]thiazole]. Fig. 7B is the name of compound B [5-(carboxy(hydroxy)methyl)-4-(carboxycarbonyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid].

## 2.4 大鲵皮肤色素抗氧化性

### 2.4.1 超氧自由基清除能力

大鲵皮色素对超氧阴离子自由基的清除作用如图 8 所示,从图 8 可以看出,在实验设置的质量浓度

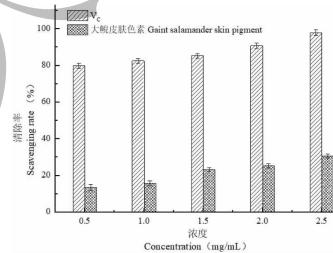


图 8 大鲵皮肤色素对超氧阴离子自由基清除率曲线

Fig. 8 Clearance curves for giant salamander skin pigment to superoxide free radicals

范围内大鲵皮色素对超氧自由基均有一定的清除作用,其清除能力与质量浓度成正比。当浓度在 2.5 mg/mL 时,大鲵皮色素对超氧阴离子自由基的清除率为 30.51%,而 V<sub>C</sub> 对超氧自由基的清除能力较强,在浓度 2 mg/mL 时清除率就已超过 90%。

### 2.4.2 羟基自由基清除能力

大鲵皮色素对羟基自由基的清除作用如图 9 所示:由图 9 可知,大鲵皮色素在实验设置的质量浓度范围内对羟自由基的清除作用随浓度的增大而增强,但清除作用均低于 V<sub>C</sub>。在浓度为 0.5~2.0 mg/mL 时,随浓度的增加,大鲵皮色素对羟自由基的清除率显著升高,但当浓度高于 2 mg/mL 时,随浓度的增加,清除率趋于稳定。浓度在 2.5 mg/mL 时,大鲵皮色素对羟基自由基的清除率为 54.17%,而 V<sub>C</sub> 在 1.5 mg/mL 时清除率达到 93% 以上。

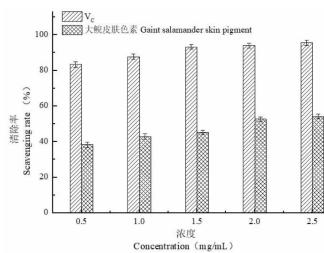


图 9 大鲵皮肤色素对羟基自由基清除率曲线

Fig. 9 Scavenging curves for giant salamander skin pigment to hydroxyl radicals

吴世玉等<sup>[23]</sup>研究了林蛙卵黑色素的抗氧化性,表明林蛙卵黑色素具有较强的抗氧化活性,清除超

氧阴离子的  $IC_{50}$  值为 1.250 mg/mL, 清除羟自由基的  $IC_{50}$  值为 0.662 mg/mL。陈士国等<sup>[24]</sup>测定了鱿鱼墨黑色素对羟基自由基与超氧阴离子自由基的清除活性,结果表明其清除超氧阴离子自由基和羟基自由的  $IC_{50}$  值分别为 0.015 mg/mL 和 0.2 mg/mL。动物黑色素抗氧化性大小因动物种类而存在差异,物种不同,其抗氧化活性也不同。

### 3 结论

木瓜蛋白酶酶解可以去除黑色素中蛋白质,碱溶酸沉可以去除黑色素中其他不被酶解的杂质,得到高纯度的大鲵黑色素。单因素及正交实验确定大鲵皮肤黑色素最适提取工艺条为:氢氧化钠 1.5 mol/L、液料比 1:15、提取温度 45 °C, 提取率最高为 0.65%。

大鲵皮肤黑色素的紫外最大吸收波长为 214 nm,由真黑色素和脱黑色素两种色素组成,对羟自由基和超氧阴离子有一定的清除作用,具抗氧化作用。食用不脱除色素的大鲵系列产品时,黑色素可进入人体,发挥其抗氧化、延缓衰老功效。此外,工业化生产时,还可对大鲵皮黑色素进行脱除,将其添加到防晒品、美容护肤品和药品中,促进大鲵产业的发展。

### 参考文献

- Hou JH, Zhu BC, Tong YW, et al. Research advances of chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. J Sichuan Zoo(四川动物), 2004, 23: 262-266.
- Luo QH. Research advances in nutritional composition and exploitation of chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31: 390-393.
- Cao J, Yu LJ, Cui YM, et al. Antifatigue effect and immunological function of andrias daridianus mice [J]. J Sichuan Zoo(四川动物), 2008, 27: 149-152.
- Zhang JY, Liu H, Sun HQ, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of mucoprotein from giant salamander [J]. J Chin Ins of Food Sci Tech(中国食品学报), 2018, 18: 175-181.
- Zhu S. Extraction and degradation of melanin from black-bone silky fowl and isolation and analysis of degradation products[D]. Nanchang: Nanchang University(南昌大学), 2012.
- Wang ZP, Deng XM, Wang AR. Photoprotective effect of melanin derived from white silky fowl on drosophila melanogaster against ultraviolet radiation[J]. J Chin Agri Univ(中国农业大学学报), 2007, 12(1): 17-21.
- Liu HZ, Luo P, Chen SH, et al. Effects of squid ink on growth performance, antioxidant functions and immunity in growing broiler chickens [J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2011, 24: 1752-1756.
- Yuspihana F, Iin KK. Antibacterial activity of melanin from cuttlefish and squid ink [J]. J Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia, 2017, 20: 266-274.
- Dong H, Wang LD, Wang CL, et al. Immunomodulatory effects of melanin from sepiella maindroni ink on hypoimmune mice [J]. J Bio(生物学杂志), 2016, 33(5): 27-30.
- Liu Y, Simon JD. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis* [J]. Pig Cell Res, 2003, 16(1): 72-80.
- Mario M, Químico, Paolo P. Purification, characterization and analysis of sepiia melanin from commercial sepiia ink (*Sepia officinalis*) [J]. Revista CES Med Veterinaria Zoo, 2010, 5(2): 18-28.
- Li X, Li HS. Technics of melanin extraction from ink of sepiia esculenta hoyle by enzymatic method [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2010, 22: 159-162.
- Liu XW, Liu SJ, Zhang XQ. Optimizing the preparation of squid ink melanin by response surface methodology [J]. J Hainan Univer(海南大学学报), 2016, 34(1): 25-32.
- Song R, Li HB, Deng SG. Optimization of enzymatic preparation of natural melanin from squid ink and its spectral characterization [J]. Food Sci(食品科学), 2011, 32(18): 63-67.
- Heng H, Shan FS, Guo WY, et al. Research on extraction and physicochemical properties of melanin from black ants [J]. Food Ind(食品工业), 2018, 39(5): 26-29.
- Yuan L, Gao RC, Guo XX, et al. Influence of several treatments on properties of squid melanin [J]. Food Mach(食品与机械), 2011, 27(5): 37-39.
- Qiao JJ, Tian YG, Xie MY, et al. Infrared spectral properties of melanin from black-bone silky fowl and its degradation products [J]. Food Sci(食品科学), 2011, 32: 112-115.
- Lei M. Studies on the bioactivities of squid ink melanin and melanin-Fe[D]. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学), 2008.
- Pezzella A, Napolitano A, Palumbo A, et al. An integrated approach to the structure of sepiia melanin-evidence for a high proportion of degraded 5, 6-dihydroxyindole-carboxylic acid units in the pigment backbone [J]. Tetrahedron, 1997, 53: 8281-8286.
- Liu Y, Simon JD. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: Applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy [J]. Pig Cell Res, 2003, 16: 606-618.

- 21 Sun YZ. Determination of melanin in silky fowl and its physicochemical properties [D]. Nanchang : Nanchang University (南昌大学), 2008.
- 22 Borges CR, Roberts JC, Wilkins DG, et al. Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: Application to human hair [J]. Analytical Biochemistry, 2001, 290:116-125.
- 23 Wu SY, Meng XM, Liu JM, et al. Antioxidant activity and physicochemical characterization of melanin from the ovum of *rana chensinensis* [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2018, 39(14):25-29.
- 24 Chen SG, Xue CH, Xue Y, et al. Studies on the free radical scavenging activities of melanin from squid ink [J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物), 2007, 26(1):24-27.

(上接第 849 页)

- 7 XU L, Zhang D, Tong TT, et al. Assessment on antibacterial and whitening effect of tea (*Camellia sinensis*) flower extraction [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:1287-1293.
- 8 Xi YL, Zhou X, Ma P, et al. Optimization by response surface methodology of extraction technology and study on the bacteriostasis of polyphenols from *Ligustrum lucidum* ait [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2018, 39(11):42-47.
- 9 Liu J, Li XL, Liang BD, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of the polyphenol from purple cabbage [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2017, 38(23):49-52.
- 10 Wei Q, Yue W, Lyu BK, et al. Study on extracting technology by orthogonal design and antibacterial activity of procyanidins from chestnut shells [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2016, 42:214-219.
- 11 Liu G, Ren G, Zhao L, et al. Antibacterial activity and mechanism of bifidocin A against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2016, 73:854-861.
- 12 Lv F, Liang H, Yuan Q, et al. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms [J]. Food Res Int, 2011, 44:3057-3064.
- 13 Liu YM, Qian TT, Jiang DW, et al. The Comparison with kjeldahl and coomassie brilliant blue method on testing protein content of the polysaccharide from *Sipunculus nudus* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(19):96-98.
- 14 Liu YX. Antibacterial activity and mechanism of action of phenyllactic acid [D]. Linfen: Shanxi Normal University (山西师范大学), 2017.
- 15 Li YH, Li ZH, Fu XJ, et al. Antibacterial activity and application on grass carp muscle in cold storage of camphor tree leaves' polyphenol [J]. Food Machinery(食品与机械), 2018, 34:128-130.
- 16 Wang MH, Zhang XL, Yang J, et al. Antioxidation and antibacterial activity of polyphenols form corn silk [J]. Mol Plant Breeding(分子植物育种), 2018, 16:6476-6480.
- 17 Wang MH, Shao ML, Gao ZY, et al. Enzymatic extraction of polyphenols from *Euodia rutaecarpa* and its antioxidant and antibacterial activities [J]. Northern Horticul(北方园艺), 2017, 22:126-131.
- 18 Shen K, Zhang H, Yan BY, et al. Study on extraction of polyphenols from stems of *Trapa bispinosa* Roxb. and its antioxidant and antimicrobial activities [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2018, 39:225-231.
- 19 Huang SQ. Study on the antimicrobial and antioxidant activity of polyphenols in hakka rice wine [D]. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering(仲恺农业工程学院), 2016.
- 20 Qian LH, Tao Y, Xie J. Antimicrobial mechanisms of tea polyphenol against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiol China(微生物学通报), 2010, 37: 1628-1633.
- 21 Pandey R, Kalra A, Tandon S, et al. Essential oil compounds as potent source of nematicidal compounds [J]. J Phytopathol, 2000, 148:501-502.
- 22 Liu YF, Zhang DX, Ding YY. Study on bacteriostatic activities of alkaloid extract from the inedible parts of the eggplant [J]. Food Machinery(食品与机械), 2018, 34(1):67-71.
- 23 Zhang TJ, Wang F, Li CY, et al. Quantitative analysis and antimicrobial activity of polyphenols from blueberry leaves [J]. Food Sci(食品科学), 2016, 37(23):95-99.