

乌鳖黑色素理化性质及其抗氧化活性研究

项锦敏,赵琼瑜,远航,彭振辉,宋伟*

浙江万里学院生物与环境学院,宁波 315100

摘要:本试验以乌鳖肌肉为原料,采用“脱脂-酶解-酸解”三步法制备乌鳖黑色素,研究其结构特性、理化性质和抗氧化活性。采用紫外分光光度计、傅里叶红外光谱仪和元素分析仪对乌鳖肌肉黑色素结构特性进行分析,并进行了颜色检测、溶解性试验、稳定性试验、总抗氧化能力试验、羟基自由基清除能力试验、DPPH自由基清除能力试验、超氧阴离子自由基清除能力试验等理化性质和抗氧化活性检测分析。结果表明:乌鳖黑色素粉末呈黑色($L^* = 45.04$),略带红色和黄色($a^* = 1.92, b^* = 5.27$);具有与其他黑色素相似的溶解性,溶于碱性溶液,不溶于水、有机溶剂和酸性溶液等;乌鳖黑色素在1 h内具有较强光稳定性和热稳定性;乌鳖黑色素具有较强的抗氧化能力,其中2.0 mg/mL浓度的黑色素溶液羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和DPPH自由基清除率均在40%以上。

关键词:乌鳖;黑色素;结构特性;理化性质;抗氧化活性

中图分类号:TS254.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)3-0453-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.3.013

Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin from Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)

XIANG Jin-min, ZHAO Qiong-yu, YUAN Hang, PENG Zhen-hu, SONG Wei*

College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

Abstract: This study aimed to develop a method for extracting melanin in muscle of Chinese soft-shelled turtle by Skim-enzymatic hydrolysis and acid hydrolysis, and to study its structural characteristics, physicochemical property, as well as antioxidant activity. The melanin was examined by ultraviolet-visible spectroscopy, fourier transform infrared spectroscopy and elemental analyzer, before being evaluated by color detection, solubility test, stability test, hydroxyl radical assay, DPPH radical-scavenging assay and superoxide-radical scavenging assay. The result showed that the melanin powder was dark mixed with a little red and yellow ($L^* = 41.03, a^* = 2.26, b^* = 3.78$). The solubility properties were similar to those of typical melanin. The melanin possessed a stronger thermal stability and light stability within 1 hour, as well as exhibited a strong antioxidant activity. At concentration of 2.0 mg/mL, the total antioxidant activity, hydroxyl radical scavenging activity, DPPH radical scavenging activity, and superoxide-radical scavenging activity of melanin were reduced more than 40%.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; melanin; structural characteristics; physicochemical property; antioxidant activity

黑色素是目前所知唯一能保护生物体免受辐射伤害的天然内源性生物聚合体,具有很强的生理活性,能够有效的消除自由基^[1],对人体具有提高机体免疫力^[2]、防止衰老^[3,4]、抑制病毒^[5]等功能。因此,黑色素被广泛应用于医药、食品和保健品等领域。目前,天然黑色素的开发研究主要集中在植物、

真菌类材料。动物中黑色素与蛋白质、脂肪等紧密相连、不易分离。因此,动物来源的黑色素研究局限在乌骨鸡^[6]、泥鳅^[7]、大鲵^[8]、海参^[9]等少数乌质性状动物材料中。

“清溪乌鳖”(*Pelodiscus sinensis*,以下简称“乌鳖”)是从中华鳖的体色变异个体经过扩繁得到的新品种^[10],是浙江省特有地方品种,其典型形态特征是全身体色乌黑,富含黑色素,具有很高的食药用价值^[11]。近年来,国内外学者主要从形态特征^[10]、养殖性能^[12]、营养成分^[13]、同工酶^[14]、细胞水平和DNA分子水平^[15]等方面对乌鳖种质资源进行研

收稿日期:2020-04-28 接受日期:2021-01-22

基金项目:浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016C02055-4-1);宁波市重大科技专项(2017C110012);浙江省教育厅一般科研项目(Y201738596)

*通信作者 Tel:86-574-88222991;E-mail:sw2014wl@163.com

究。有关乌鳖中黑色素的研究却鲜见报道。本文以乌鳖肌肉为原材料采用“脱脂-酶解-酸解”三步法制备乌鳖黑色素,探讨其结构、理化性质以及抗氧化活性,以期为乌鳖综合利用以及高值化产品的开发提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:乌鳖,体重约为 500 g,购于浙江清溪鳖业有限公司。

试剂:黑色素标准品(美国 Sigma 公司);木瓜蛋白酶,酶活力 $\geq 2\,000\text{ U/mg}$ (生工生物工程(上海)股份有限公司);甲醇、无水乙醚、无水乙醇、乙酸乙酯、氯仿、石油醚、丙酮、二甲基亚砜、盐酸、氢氧化钠、乙酸、氢氧化钠、溴化钾、浓硫酸、磷酸钠、钼酸铵、甲硫氨酸、氮蓝四唑、乙二胺四乙酸二钠、核黄素,AR(国药集团化学试剂有限公司);1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), $\geq 97.0\%$ (HPLC)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

仪器:百万分之一微量天平 XS3DU(梅特勒-托利多公司);DS-1 高速组织捣碎机(上海标本模型厂);Alphal-4LSCplus 冷冻干燥机(德国 Christ 公司);5810 大容量低温高速台式离心机(德国 Eppendorf 公司);DHG-9246A 型电热鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);CM-700D 色差计(日本柯尼卡美能达公司);Cary100 紫外可见分光光度计(安捷伦科技有限公司);Vertex 70 傅立叶红外光谱仪(德国布鲁克公司);VarioMicro cube 元素分析仪(德国 Elemtar 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 乌鳖肌肉黑色素的提取

参考 Huang 等^[6]的方法,略作修改。活体宰杀后剥离肌肉,在高速组织匀浆机中打碎成肉糜,于冷冻干燥机中冻干,-20 ℃密封保存备用。精密称取一定量样品置于索氏提取器中,按照乙醇回流脱脂 8 次,料液比 1:60(m: V)条件进行脱脂,脱脂反应结束后,滤渣置于干燥箱中以 60 ℃干燥至恒重;脱脂后用木瓜蛋白酶进行酶解,酶解工艺为酶底比为 1:2(m: m)、酶解温度 60 ℃、酶解时间 5 h、料液比 1:25(m: V)、酶解 pH 5.0,酶解处理结束后,10 000 rpm 离心 15 min,蒸馏水冲洗离心 2~3 次,沉淀物置于干燥箱中以 60 ℃干燥至恒重;最后利用盐酸进行纯化,纯化工艺为盐酸浓度 6 mol/L、料液比 3:50

(m: V)、时间 4 h、温度 90 ℃,酸化处理结束后,10 000 rpm 离心 15 min,蒸馏水冲洗离心 2~3 次,沉淀物置于干燥箱中以 60 ℃干燥至恒重,低温密封保存备用。此提取工艺条件下,乌鳖黑色素提取率达 1.09%。提取率计算公式如下:

$$\text{提取率} = [\text{“脱脂-酶解-酸解”三步法制备的乌鳖黑色素(g)/乌鳖干肉重(g)}] \times 100\%$$

1.2.2 乌鳖黑色素的结构特征检测

1.2.2.1 紫外可见光分光光度扫描

精确称取 1 mg 乌鳖黑色素样品和 1 mg 黑色素标准品,分别加入 10 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液,震荡均匀,在 80 ℃水浴中恒温加热 1 h(避光),获得黑色素溶液。待冷却至室温后(避光),紫外可见光分光光度计测定 190~800 nm 范围内吸光值,绘制随波长变化的曲线图。

1.2.2.2 傅里叶红外扫描

精确称取 1 mg 乌鳖黑色素样品和 1 mg 黑色素标准品,将样品分别与 0.1 g 溴化钾混合,在玛瑙研钵中研成细粉,混合均匀后用红外压片机压片。测定样品在 4 000~400 cm⁻¹ 范围内的红外吸收光谱。

1.2.2.3 元素组成分析

参考 Tu 等^[16]的方法,根据国标 GB/T 19143-2017《岩石有机质中碳、氢、氧元素分析方法》和国标 GB/T 19145-2003《沉积岩中总有机碳的测定》的方法,采用元素分析仪测定乌鳖黑色素中的 C、H、O、N、S 等元素含量。

1.2.3 乌鳖黑色素的理化性质检测

1.2.3.1 粉末颜色

黑色素粉末的外观颜色通过色差计测定,色差值采用 L*、a* 和 b* 表示。

1.2.3.2 溶解性研究

溶剂选择:精确称取 1 mg 乌鳖黑色素样品和 1 mg 黑色素标准品,分别加入 10 mL 不同溶剂(甲醇、乙醇、乙酸、乙酸乙酯、氯仿、石油醚、二甲基亚砜、蒸馏水、1 mol/L 盐酸溶液、1 mol/L 氢氧化钠溶液)于 80 ℃水浴中恒温加热 1 h(避光),待溶液冷却至室温后(避光),测定其在 215 nm 处的吸光值。

溶解温度:精确称取 1 mg 乌鳖黑色素样品和 1 mg 黑色素标准品,分别加入 10 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液,摇匀后分别置于 25、40、60、80、100 ℃恒温水浴中保持 1 h(避光),待溶液冷却至室温后(避光),测定其在 215 nm 处的吸光值。

溶剂浓度:精确称取 1 mg 乌鳖黑色素样品和 1

mg 黑色素标准品, 分别加入 10 mL 的 0.25、0.5、1、1.5、2 mol/L 的氢氧化钠溶液, 溶液摇匀后于 80 ℃ 水浴中恒温加热 1 h(避光), 待溶液冷却至室温后(避光), 测定其在 215 nm 处吸光值。

料液比: 分别精确称取 1 mg 乌鳖黑色素样品和 1 mg 黑色素标准品, 按照料液比(m: V)1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液混合均匀, 将溶液置于 80 ℃ 水浴中恒温加热 1 h(避光), 待溶液冷却至室温后测定其在 215 nm 处吸光值。

时间: 精确称取 1 mg 乌鳖黑色素样品和 1 mg 黑色素标准品, 加入 25 mL 的 1 mol/L 的氢氧化钠溶液, 混合均匀后将溶液在 80 ℃ 下恒温加热 10、20、30、60、90、120 min(避光), 待溶液冷却至室温后(避光), 测定其在 215 nm 处吸光值。

1.2.3.3 稳定性研究

时间稳定性研究: 精确称取 1 mg 乌鳖黑色素样品和 1 mg 黑色素标准品, 加入 25 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液于 80 ℃ 恒温溶解 1 h, 待溶液冷却至室温, 分装 8 管, 每管 3 mL, 依次编号 1~8, 置于暗处保存。依次测定 0、1、2、3、4、8、12、24 h 后黑色素溶液在 215 nm 处吸光值。

光照稳定性: 精确称取 5 mg 乌鳖黑色素样品和 5 mg 黑色素标准品, 加入 125 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液于 80 ℃ 恒温加热 1 h, 待溶液冷却至室温, 分装 37 管, 每管 3 mL, 依次编号对照 0、紫外 1~12、日光 1~12、黑暗 1~12, 分别置于环境温度相同的暗箱、30 W 白炽灯箱、30 W 紫外灯箱等设施中处理。1 h 内每隔 10 min 各取一管不同处理组样品, 在 215 nm 处检测其吸光值。

温度稳定性: 精确称取 2 mg 乌鳖黑色素样品和 2 mg 黑色素标准品, 加入 50 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液于 80 ℃ 水浴中恒温加热 1 h, 待溶液冷却至室温, 分装 9 管, 每管 3 mL, 依次编号 1~9, 每三个管子为一组(1~3、4~6、7~9) 分别置于 25、60、100 ℃ 水浴中暗处理 1 h, 在 0、30、60 min 时各取一管不同处理组样品, 在 215 nm 处检测其吸光值。

1.2.4 乌鳖黑色素的抗氧化性检测

参考 Wang 等^[9]方法, 乌鳖黑色素和黑色素标准品用二甲基亚砜充分溶解, 总抗氧化检测中样品配制成质量浓度为 0.01、0.05、0.10、0.15 和 0.20 mg/mL 的溶液; 其他抗氧化检测(DPPH 自由基清除能力、超氧阴离子自由基清除能力、羟自由基清除能力) 中样品配制成质量浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5 和

2.0 mg/mL 的溶液。

1.2.4.1 总抗氧化能力的测定

参考 Prieto 等^[11]的方法。在 10 mL 具塞比色管中分别加入 1 mL 不同质量浓度的样品溶液(乌鳖黑色素溶液或黑色素标准品溶液)、1 mL H₂SO₄ 溶液(3 mol/L)、1 mL Na₃PO₄ 溶液(0.028 mol/L)、1 mL (NH₄)₂MoO₄ 溶液(4 mmol/L)、蒸馏水定容至 5.0 mL, 摆匀后 95 ℃ 加热 30 min, 溶液冷水浴冷却至室温, 695 nm 测定吸光度。以蒸馏水代替乌鳖黑色素溶液和黑色素标准品溶液作为空白参比。

1.2.4.2 DPPH 自由基清除能力的测定

参照 Chen 等^[12]的方法, 略作修改。分别准确吸取 1 mL 不同质量浓度的样品溶液、3 mL DPPH(0.1 mmol/L, 无水乙醇配制)、1 mL 蒸馏水于 10 mL 具塞比色管中充分混匀, 在室温下反应 30 min; 在 517 nm 处测定其吸光度。按照下面公式计算 DPPH 清除率。

$$\text{DPPH 清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

式中: A₀: 对照液的吸光度; A₁: 加入样品溶液后的吸光度; A₂: 为样品溶液本底吸光度。

1.2.4.3 超氧阴离子自由基清除能力的测定

参照 Beauchamp 等^[13]的方法, 略作修改。分别取 0.05 mL 样品溶液、1.5 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.8, 50 mmol/L)、0.3 mL 甲硫氨酸(130 μmol/L)、0.3 mL 氮蓝四唑(750 μmol/L)、0.3 mL 乙二胺四乙酸二钠(100 μmol/L)、0.3 mL 核黄素(20 μmol/L) 和 0.25 mL 蒸馏水等溶液加入到 10 mL 具塞比色管中并充分混匀, 混匀后置暗处, 于 560 nm 处测定其吸光度。按照下面公式计算超氧阴离子自由基清除率。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

式中: A₀: 空白对照液的吸光度; A₁: 加入样品溶液后的吸光度; A₂: 为样品溶液本底吸光度。

1.2.4.4 羟自由基清除能力的测定

参考 Liu 文献^[17]的方法, 略作改进。试管中依次加入 1 mL PBS 缓冲液(pH 7.4, 0.4 mol/L)、1 mL 邻菲罗啉溶液(2.5 mmol/L)、1 mL 样品溶液、1 mL 硫酸亚铁溶液(2.5 mmol/L)、0.5 mL H₂O₂ 溶液(20 mmol/L), 应在 37 ℃ 恒温水浴锅中进行, 准确反应 1 h 后, 快速记录 536 nm 处的吸光度。按照以下公式计算羟自由基清除率:

$$\text{羟自由基清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 :空白对照液的吸光度; A_1 :加入样品溶液后的吸光度; A_2 :为样品溶液本底吸光度。

2 结果与分析

2.1 乌鳖黑色素的结构特性

2.1.1 紫外可见光扫描图谱

乌鳖黑色素的紫外可见光谱图如图1所示,乌鳖黑色素和黑色素标准品在扫描范围内(190~800 nm)出现了一致的吸收变化规律,两种黑色素在紫外区域都有强烈的吸收,其中在215 nm处有最强特征吸收峰,伴随波长的逐渐增加,吸光度呈现下降的趋势。这与已报道的不同来源动物黑色素的特征吸收峰在210 nm左右一致,如鱿鱼黑色素在201 nm处有特征吸收峰^[15],大鲵皮肤黑色素紫外最大吸收波长为214 nm^[8],蚂蚁黑色素在214 nm处有特征吸收峰^[18]。

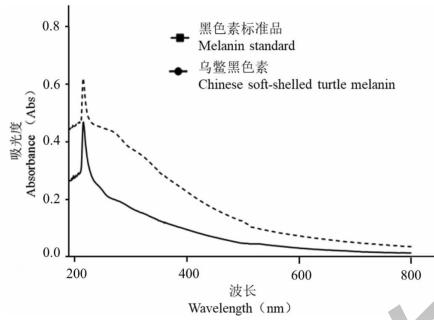


图1 乌鳖黑色素的紫外-可见光谱图

Fig. 1 Ultraviolet visible spectrum of the melanin from Chinese soft-shelled turtle

2.1.2 傅里叶红外扫描图谱

图2是黑色素的傅里叶红外光谱图,从两种黑色素共同的吸收峰来看,在3 400 cm⁻¹处有较强的吸收峰,是由O-H和吲哚的N-H伸缩振动产生的,是黑色素的一个特征吸收峰^[16];2 930~2 850 cm⁻¹处附近存在相对较弱的吸收峰,推测为烷烃结构的C-H吸收区^[8,9];在1 600 cm⁻¹处附近由因芳香环骨架振动引起的较强的吸收峰,说明结构中吲哚环占比

较大,属于黑色素典型的苯醌类结构^[16];乌鳖黑色素在1 528 cm⁻¹附近的吸收峰和标准品在1 380 cm⁻¹附近的吸收峰由因吸收COO-的变形振动或C=C/C=N变形振动归属于苯并噻嗪环^[16]。说明乌鳖黑色素具有非常典型的吲哚结构,与动物源黑色素多属吲哚型的观点相符。

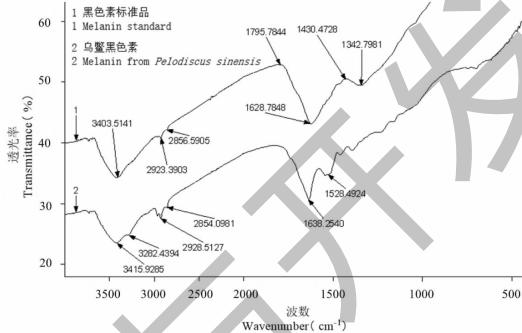


图2 乌鳖黑色素的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectrum of the melanin from Chinese soft-shelled turtle

2.1.3 元素分析

Ito等^[19]研究表明,合成的真黑色素和棕黑色素的S:N分别为0.01和0.46、C:N分别为7.76和5.75、O:N分别为3.29和2.81。由表1可知,乌鳖黑色素和黑色素标品的S:N为0.05和0.02,这表明乌鳖黑色素主要含有真黑色素;乌鳖黑色素和黑色素标品的C:N为10.45和8.11,明显高于合成真黑色素和棕黑色素的C:N,这说明乌鳖黑色素含有脂肪族;乌鳖黑色素和黑色素标品的O:N分别4.09和3.61,说明乌鳖黑色素中-COOH含量更高。这与已报道的泰和乌骨鸡^[16]、林蛙卵^[20]等来源的黑色素的元素组成相似。

2.2 乌鳖黑色素的理化性质

2.2.1 乌鳖黑色素外观颜色检测结果

色差计测定中L*表示亮度,a*表示红/绿,b*表示黄/蓝。由表2可知,乌鳖黑色素L*值较大,而

表1 黑色素元素组成分析

Table 1 Elemental composition analytical data of melanin from Chinese soft-shelled turtle

样品名称 Sample name	百分含量 Percentage composition						相对N物质的量比 Mole per mole of N		
	C	H	N	O	S	H	O	S	
乌鳖黑色素 Melanin of Chinese soft-shelled turtle	58.55	3.72	6.54	30.45	0.74	10.45	7.97	4.09	0.05
黑色素标准品 Melanin standard	55.26	3.53	7.95	32.81	0.45	8.11	6.30	3.61	0.02

a^* 值和 b^* 较小, 这表明乌鳖黑色素是趋近于黑色并略带黄色的固体粉末; 黑色素标准品 L^* 值较小,

并且 a^* 值和 b^* 趋近于 0, 这表明黑色素标准品是趋近于黑色的固体粉末。

表 2 乌鳖黑色素的外观颜色

Table 2 Color values of the melanin from Chinese soft-shelled turtle

样品名称 Sample name	颜色指标 Color index		
	L^*	a^*	b^*
乌鳖黑色素 Melanin of Chinese soft-shelled turtle	45.04 ± 0.31	0.92 ± 0.11	4.27 ± 0.15
黑色素标准品 Melanin standard	23.07 ± 0.21	0.5 ± 0.09	1.02 ± 0.11

2.2.2 乌鳖黑色素溶解性试验结果

2.2.2.1 溶剂选择

由表 3 可知, 乌鳖黑色素和黑色素标准品在甲醇、乙醇、乙醚、乙酸乙酯、氯仿、石油醚、丙酮等常见的有机溶剂是不溶的, 而且在无机溶剂以及水中也

是不溶的。但在二甲基亚砜中微溶, 在氢氧化钠溶液中易溶解。乌鳖黑色素的溶解性与报道的乌骨鸡^[16]、黑蚂蚁^[18]、林蛙卵^[20]中黑色素的溶解性十分相似。

表 3 乌鳖黑色素在不同溶剂中的溶解性

Table 3 Solubility of the melanin from Chinese soft-shelled turtle

溶剂名称 The name of the solvent	溶解性 Solubility	
	乌鳖黑色素 Melanin of Chinese soft-shelled turtle	黑色素标准品 Melanin standard
甲醇 Methanol	不溶	不溶
乙醇 Ethyl Alcohol	不溶	不溶
乙醚 Diethyl ether	不溶	不溶
乙酸乙酯 Ethyl acetate	不溶	不溶
氯仿 Chloroform	不溶	不溶
石油醚 Mineral ether	不溶	不溶
丙酮 Acetone	不溶	不溶
二甲基亚砜 Dimethyl sulfoxide	微溶	微溶
蒸馏水 Distilled water	不溶	不溶
1 mol/L 乙酸 Ethanoic acid	不溶	不溶
1 mol/L 盐酸 Hydrochloric acid	不溶	不溶
1 mol/L 氢氧化钠 Sodium hydroxide	溶解	溶解

2.2.2.2 溶解温度

溶解温度对乌鳖黑色素溶解性的影响见图 3。由图 3 可知, 随着温度的升高, 黑色素的吸光度增加, 即黑色素的溶解量增加。到达 80 ℃ 时, 黑色素的吸光度最大, 之后随着温度的升高, 黑色素的吸光度减小。100 ℃ 黑色素的吸光度减小可能是由于过高的温度会导致蛋白质、脂质等杂质的溶出, 影响黑色素的溶解。

2.2.2.3 溶剂浓度

溶剂浓度对乌鳖黑色素溶解性的影响见图 4。由图 4 可知, 随着氢氧化钠溶液浓度的增加, 黑色素吸光度不断增大, 当氢氧化钠浓度增大至 1.0 mol/L 时吸光度达到最大值, 此时黑色素的溶解量最大, 此后黑色素的吸光度随着氢氧化钠浓度的增大而减小。黑色素溶解性随着氢氧化钠浓度增大先升高后降低可能是因为浓度过高时造成残留的杂质(如蛋

白质、脂质等)溶出,影响黑色素的溶解。

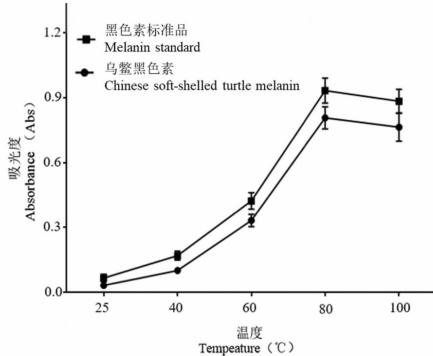


图3 温度对乌鳖黑色素溶解性的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the solubility of melanin from Chinese soft-shelled turtle

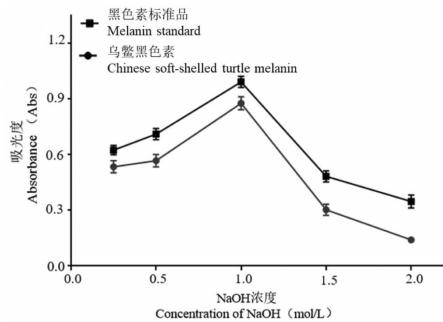


图4 NaOH浓度对乌鳖黑色素溶解性的影响

Fig. 4 The effect of concentration of NaOH on the solubility of melanin from Chinese soft-shelled turtle

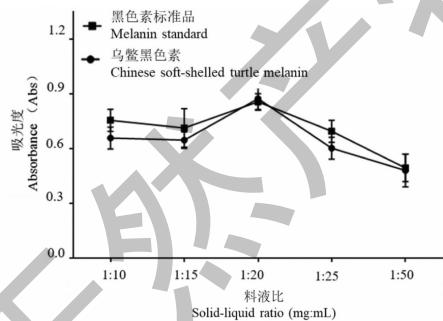


图5 料液比对乌鳖黑色素溶解性的影响

Fig. 5 The effect of solid-liquid ratio on the solubility of melanin from Chinese soft-shelled turtle

2.2.2.4 料液比

料液比对乌鳖黑色素溶解性的影响见图5。由图5可知,随着料液比的增加,黑色素的吸光值先升高后降低,当料液比在1:20(mg:mL)时吸光度达到最大值,此时黑色素的溶解量最大。这可能因为随着液料比的增加,内外黑色素浓度差就增大,传质推

动力就增大,有利于黑色素溶解在碱溶液中,当液料比过大时黑色素中其他碱溶性杂质的溶出增加,致使黑色素被杂质包裹,导致黑色素的溶解量减少。

2.2.2.5 溶解时间

溶解时间对乌鳖黑色素溶解性的影响见图6。由图6可知,随着溶解时间的增长乌鳖黑色素和黑色素标准品的吸光度先升高后降低,溶解时间为60 min时吸光度最大,此时黑色素的溶解量最大,之后随着时间的增长,黑色素的溶解量趋于稳定,略有点下降。

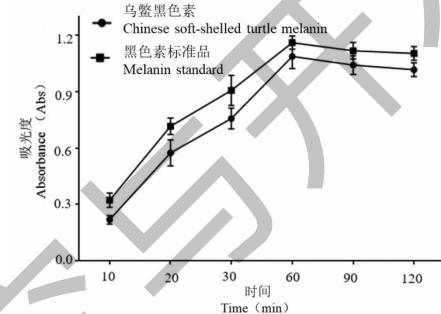


图6 溶解时间对乌鳖黑色素溶解性的影响

Fig. 6 The effect of time on the solubility of melanin from Chinese soft-shelled turtle

2.2.3 乌鳖黑色素稳定性试验结果

2.2.3.1 时间稳定性

时间对乌鳖黑色素稳定性的影响如图7所示,从图7可以看出,乌鳖黑色素和黑色素标准品随着放置时间的延长吸光度变小,其中在黑色素溶液放置1 h后急剧下降,4 h后下降趋于平缓。黑色素溶液放置前1 h内乌鳖黑色素仅损失4.44%、黑色素标准品损失8.91%,表明1 h内乌鳖黑色素具有较好的稳定性。

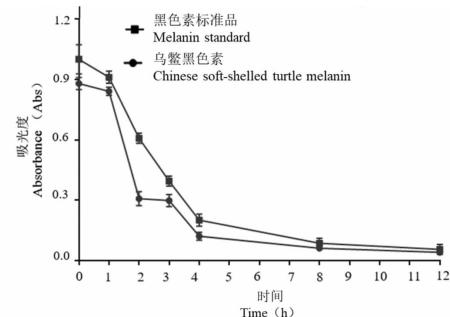


图7 时间对乌鳖黑色素稳定性的影响

Fig. 7 The effect of time on the stability of melanin from Chinese soft-shelled turtle

2.2.3.2 光稳定性

光照对乌鳖黑色素稳定性的影响如图8所示,

从图 8 可以看出,乌鳖黑色素和黑色素标准品在不同光照条件(黑暗、日光照射、紫外照射)下处理,黑色素溶液的吸光度相对变化无显著差异,表明黑色素的光稳定性较好。与泰和乌骨鸡^[21]黑色素的光稳定性相似。黑色素是由吲哚类单元结构不规则聚合而成,特殊的结构导致其具有吸收紫外线的功能,良好的光稳定性可能也与此有关。

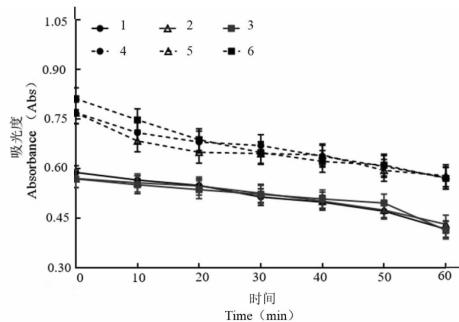


图 8 光照对乌鳖黑色素稳定性的影响

Fig. 8 The effect of illumination on the stability of melanin from Chinese soft-shelled turtle

注:1、2、3 分别为乌鳖黑色素暗处理、日光处理、紫外处理;4、5、6 为黑色素标准品暗处理、日光处理、紫外处理。Note:1,2,3 were melanin of Chinese soft-shelled turtle in dark treatment, sunlight treatment and UV-treatment;4,5,6 were melanin standard in dark treatment, sunlight treatment and UV-treatment.

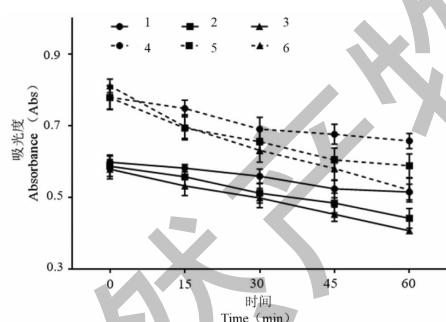


图 9 温度对乌鳖黑色素稳定性的影响

Fig. 9 The effect of temperature on the stability of melanin from Chinese soft-shelled turtle

注:1、2、3 为乌鳖黑色素在 25、60、100 °C 下加热 1 h;4、5、6 为黑色素标准品在 25、60、100 °C 下加热 1 h。Note:1,2,3 were melanin of Chinese soft-shelled turtle was heated at 25, 60 and 100 °C for 1h;4,5,6 were melanin standard was heated at 25, 60 and 100 °C for 1h.

2.2.3.3 热稳定性

耐热性是考察色素开发利用潜能的一个重要指标。温度对乌鳖黑色素稳定性的影响如图 9 所示,从图 9 可以看出,乌鳖黑色素溶液和黑色素标准品溶液分别在 25、60、100 °C 情况下保持 1 h,随着加热温

度的升高和加热时间的延长,黑色素的保存率有所下降,但在 60 °C 下加热 1 h,相对色素保存率达到 85.0% 以上;在 100 °C 加热 1 h,相对色素保存率达到 80.0% 以上。这表明乌鳖黑色素较为耐热,具有一定的热稳定性,这与 Tu 等^[21]和 Zou 等^[22]的研究结果相似。

2.3 乌鳖黑色素的抗氧化活性

2.3.1 总抗氧化能力

通过比较不同质量浓度(0.01~0.2 mg/mL)的乌鳖黑色素和黑色素标准品与磷钼酸反应后的吸光度大小来评价其总抗氧化能力强弱。吸光度越大则说明还原能力越强,抗氧化性也越强。图 10 是乌鳖黑色素和黑色素标准品的总抗氧化力测定结果,从图 10 中可以看出随着质量浓度的增大,两种黑色素的总抗氧化力也都增大,黑色素标准品的总抗氧化能力高于乌鳖黑色素。乌鳖黑色素的总抗氧化能力与黑蚂蚁^[18]、乌骨鸡黑色素^[14]相近。

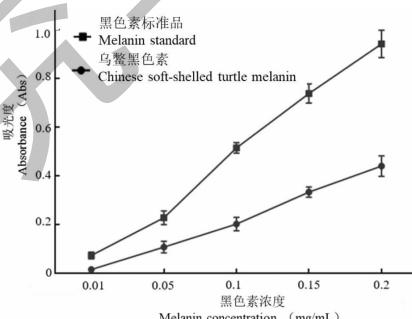


图 10 乌鳖黑色素总抗氧化能力

Fig. 10 Total antioxidant activity of melanin from Chinese soft-shelled turtle

2.3.2 DPPH 自由基清除能力

乌鳖黑色素和黑色素标准品对 DPPH 的清除作用如图 11 所示,从图 11 可以看出,在实验设置的质量浓度范围内(0.1~2.0 mg/mL),两种黑色素对

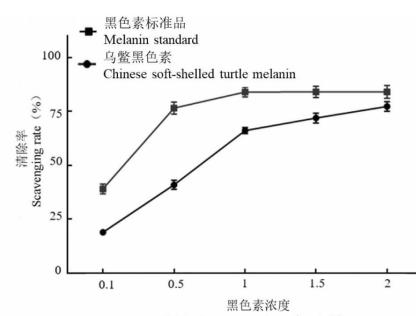


图 11 乌鳖黑色素清除 DPPH 自由基能力

Fig. 11 DPPH radical scavenging activity of melanin from Chinese soft-shelled turtle

DPPH 均有一定的清除作用,随着质量浓度的增大,其清除能力也增大,其中黑色素标准品质量浓度在 0.5 mg/mL 后,对 DPPH 清除率趋于平缓;乌鳖黑色素质量浓度在 2 mg/mL 时,对 DPPH 的清除率达到 77.28%。乌鳖黑色素清除 DPPH 自由基能力与乌骨鸡黑色素^[14]、林蛙卵黑色素^[20]、黑木耳黑色素^[22]等相似。

2.3.3 超氧阴离子自由基清除能力

乌鳖黑色素和黑色素标准品对超氧阴离子自由基的清除作用如图 12 所示,从图 12 可以看出,在测试浓度范围内(0.1~2.0 mg/mL),乌鳖黑色素对超氧阴离子的清除率随着浓度的提高而逐渐增大,当浓度在 2.0 mg/mL 时,乌鳖黑色素对超氧阴离子自由基的清除率为 44.05%,该研究结果与大鲵皮肤黑色素^[8]、林蛙卵黑色素^[20]、乌骨鸡黑色素^[14,21]等对超氧阴离子自由基的清除能力相似。黑色素标准品对超氧阴离子的清除率随着浓度的提高而逐渐增大,在浓度在 0.5 mg/mL 时,其对超氧阴离子的清除率增大趋于平缓,这与 Chen 等^[23]研究结果一致。这表明乌鳖黑色素具有一定的超氧阴离子清除能力,但低于阳性对照黑色素标准品的超氧阴离子清除能力。

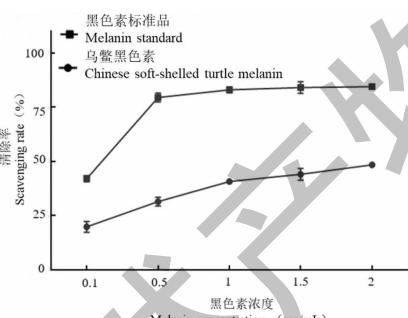


图 12 乌鳖黑色素清除超氧阴离子自由基能力

Fig. 12 Superoxide radical scavenging activity of melanin from Chinese soft-shelled turtle

2.3.4 羟自由基清除能力

羟自由基通常产生于抽氢反应和加成反应过程中,其可轻易通过细胞膜,并与细胞内的碳水化合物、蛋白质、DNA 等生物大分子发生反应,从而导致细胞损伤^[23]。乌鳖黑色素和黑色素标准品对羟自由基的清除作用如图 13 所示,从图 13 可以看出,在测试浓度范围内(0.1~2.0 mg/mL)对羟自由基的清除率随着浓度的增大而增大,其中黑色素标准品在 0.5 mg/mL 时对羟自由基清除率趋于平缓;乌鳖

黑色素质量浓度在 2 mg/mL 时,对羟自由基的清除率达到 48.44%,这表明乌鳖黑色素对羟自由基的清除能力低于阳性对照组黑色素标准品的清除能力,乌鳖黑色素的羟自由基清除能力与大鲵皮肤黑色素^[8]、林蛙卵黑色素^[20]、乌骨鸡黑色素^[14,21]等黑色素的清除能力相似。

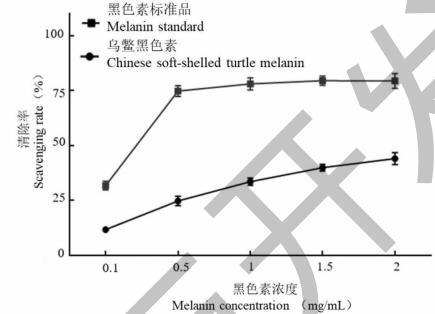


图 13 乌鳖黑色素清除羟自由基能力

Fig. 13 Hydroxide free radical scavenging activity of melanin from Chinese soft-shelled turtle

3 结论

动物中黑色素与蛋白质的紧密相连、不易分离,要获得比较纯净的黑色素,就必须尽可能去除蛋白质等杂质。因此,本研究采用“脱脂-酶解-酸解”三步法精制乌鳖黑色素,减少多余杂质对乌鳖黑色素结构分析、理化性质和抗氧化活性的影响。通过乌鳖黑色素紫外可见光扫描图谱(215 nm 处有特征吸收峰)、傅里叶红外扫描图谱(3 400 cm⁻¹ 和 1 600 cm⁻¹ 处附近有较强的吸收峰,是以吲哚结构为主体)和元素组成分析(S:N 为 0.05,以真黑色素为主)等结构特性显示均具有非常典型黑色素典型特征,结构完整。这些结果表明,本试验获得的乌鳖黑色素纯度高、结构完整,可完全满足乌鳖黑色素的理化性质和抗氧化活性等方面的研究。

乌鳖黑色素具有黑色素典型的性质:色差计测得黑色素粉末呈黑色,略带黄色;不溶于水、酸液和一般的有机溶剂,微溶于二甲基亚砜,溶于碱性溶液;乌鳖黑色素在一定时间段内(1 h)具有较强的热稳定性和光稳定性,长时间存放可引起黑色素活性损失。另外,乌鳖黑色素具有较强的抗氧化活性,随溶解液质量浓度的增加而增大。其中,质量浓度在 2.0 mg/mL 时,乌鳖黑色素溶液总抗氧化能力在 77% 左右,羟自由基清除率和 DPPH 自由基清除率均在 40% 以上,说明乌鳖黑色素具有一定的抗氧化作用。该研究结果有利于黑色素的有效提取利用和

产品开发等研究提供可靠的科学依据,从而对大幅增加乌鳖的药用资源的附加值,发掘我国的优秀物种资源,具有较高的经济价值和现实意义。

参考文献

- 1 Mauro ED, Xu R, Soliveri G, et al. Natural melanin pigments and their interfaces with metal ions and oxides: emerging concepts and technologies [J]. MRS Commun, 2017, 7: 141-151.
- 2 Lin TK, Man MQ, Abuabara K, et al. By protecting against cutaneous inflammation, epidermal pigmentation provided an additional advantage for ancestral humans [J]. Evol Appl, 2019, 10: 1960-1970.
- 3 Hung YC, Sava VM, Makan SY, et al. Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states [J]. Food Chem, 2002, 78: 233-240.
- 4 Rageh MM, El-Gebaly RH. Melanin nanoparticles: antioxidant activities and effects on γ -ray-induced DNA damage in the mouse [J]. Mutat Res-Gen Tox En, 2018, 828: 15-22.
- 5 El-Naggar NEA, El-Ewasy SM. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H [J]. Sci Rep, 2017, 7: 1-19.
- 6 Hang MY, Tian YG, Zhu S. Three stage extraction and structural characters of melanin from black-bone silky fowl [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2014, 35: 249-253.
- 7 Zhang LJ, Cui TH. Extraction of melanin from loach skin [J]. Jiangsu Agr Sci(江苏农业科学), 2009(5): 263-265.
- 8 Yang H, Chen DJ, Xia DH, et al. Extraction process and antioxidant activity of melanin from giant salamander skin [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 150-157.
- 9 Wang JB, Liu HX, Li XJ, et al. Study of the extraction, structural characteristics and physicochemical property of melanin from sea cucumber [J]. Food Sci Technol Int(食品科技), 2019, 44: 260-265.
- 10 Zhang HQ, Wang GL, He ZH, et al. Biological traits and growth of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. Zhejiang Agr Sci(浙江农业科学), 2014, 1: 111-113.
- 11 Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E [J]. Anal Biochem, 1999, 269: 337-341.
- 12 Chen Y, Xie MY, Nie SP, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. Food Chem, 2008, 107: 231-241.
- 13 Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1971, 44: 276-287.
- 14 Tu YG, Sun YZ, Tian YG, et al. The antioxidant activity of melanin from Taihe black-bone silky fowl *in vitro* [J]. J Food Sci Biotechnol(食品与生物技术学报), 2009, 28: 145-149.
- 15 Gao R, Chen JD, Li JY, et al. Optimization of enzymolysis preparation process and physicochemical properties of squid melanin(*Urotryphus chinensis*) [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2019, 40: 14-27.
- 16 Tu YG, Sun YZ, Tian YG, et al. Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) [J]. Food Chem, 2009, 114: 1345-1350.
- 17 Li HJ, Li JX, Zhao Z. Response surface optimization of ultrasonic-assisted extraction of melanin from testae of wild apricots and its antioxidant activities [J]. Food Sci(食品科学), 2016, 37: 26-33.
- 18 Tao J, Qiao LN, Tong JJ, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of melanin from the black ants [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2012, 24: 17-20.
- 19 Ito S, Fujita K. Microanalysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas by chemical degradation and liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1985, 144: 527-536.
- 20 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: 25-29.
- 21 Tu YG, Xie MM, Tian YG, et al. Spectroscopic properties and stability of melanin extracted from Taihe black-bone silky fowl [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2008(5): 179-183.
- 22 Zou Y, Yin DM, Hu WZ, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of *Auricularia auricula* melanin [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2013, 34: 118-120.
- 23 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: 24-26.