

## 超声降解法制备可溶性鱿鱼墨黑色素及其抗氧化性

郭 欣<sup>1</sup>, 陈士国<sup>1</sup>, 薛长湖<sup>2</sup>, 胡亚芹<sup>1</sup>, 刘东红<sup>1</sup>, 叶兴乾<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310058;

2. 中国海洋大学食品科学与食品工程学院, 山东 青岛 266000)

**摘要:** 实验研究了一种在碱性条件下利用超声降解制备可溶性鱿鱼墨黑色素的新方法。将鱿鱼墨黑色素溶于 NaOH 后用超声细胞破碎仪处理 1 h, 超滤后分别获得不同分子量可溶性黑色素组分。结果显示, 超声处理后黑色素平均粒度从 17.34  $\mu\text{m}$  下降至 1.467  $\mu\text{m}$ , 紫外、红外光谱和核磁共振谱图从结构上说明超声作用主要破坏黑色素的高度聚合状态, 而黑色素的主要化学结构并没有被破坏, 只有少部分基团, 尤其是较低分子量组分中的 DHI 和 DHICA 结构被氧化; 体外抗氧化实验显示经过 0.5 mol/L 和 1 mol/L 的 NaOH 处理, 分子量大于 10 ku 的组分具有很强的抗氧化性, 这些组分清除超氧自由基能力 ( $\text{IC}_{50} = 19 \sim 80 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 远优于作为商品抗氧化剂的肌肽 ( $\text{IC}_{50} = 355 \mu\text{g}/\text{mL}$ ); 清除羟基自由基活性 ( $\text{IC}_{50} = 115 \sim 180 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 与肌肽 ( $\text{IC}_{50} = 110 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 相当。可溶性鱿鱼墨黑色素作为一种天然色素和新型自由基清除剂, 其良好的可溶性大大提高了机体的吸收利用率。

**关键词:** 鱿鱼; 黑色素; 可溶性; 抗氧化

**中图分类号:** TS 254.4

**文献标志码:** A

黑色素 (melanin) 是一种不溶于水的生物大分子多聚体, 广泛存在于人类和高等动物的皮肤、毛发和眼球组织, 以及部分植物和昆虫的表皮中。黑色素的基础结构是一些共价交联的吡啶环, 根据产生前体不同可分为 3 类<sup>[1]</sup>: 以 5,6-二羟基吡啶 (DHI) 和 5,6-二羟基吡啶酸 (DHICA) 为前体的真黑色素, 显深黑色; 以半胱氨酸多巴为前体的棕黑色素, 一般显棕色或者红色; 以多巴胺 (同时含有吡啶和苯丙噻嗪结构) 为前体的神经元黑色素。本研究中使用的黑色素来源于鱿鱼墨汁, 属于一种典型的真黑色素。

鱿鱼是头足类海洋动物中枪乌贼和柔鱼的俗称。北太平洋鱿鱼 (*Ommastrephes bartrami*) 是最重要的鱿鱼加工品种之一, 年加工量在 15 ~ 30 万 t, 其墨囊大约占整个体质量的 1.3%, 但是作为一种加工后的废弃物却未得到很好的利用, 同时也给环境造成了较大的污染。实验发现, 鱿鱼墨中

所含的黑色素具有光保护, 抗氧化, 提高免疫力, 抗衰老, 抗病毒等诸多生物活性<sup>[2-5]</sup>。因此, 从鱿鱼墨中提取可利用的鱿鱼墨黑色素不仅提高鱿鱼加工过程中废弃物的综合利用率, 为开发新的海洋生物活性物质开拓新来源, 更能促进我国远洋渔业水产品加工废弃物的高值化利用的发展, 具有重要的经济和社会意义。

一般生物大分子常见降解手段为化学降解法, 如酸降解, 自由基降解等, 此类方法由于加入了强酸或强氧化性物质, 一般需要在高温条件下进行, 对降解物质结构的破坏较大; 并且易产生副产物, 反应过程不易控制; 此外反应过程伴随着大量化学物质的使用和化学废弃物的产生。酶降解法由于反应条件温和, 对产物结构破坏小, 近年来受到人们的关注, 但是酶解成本往往较高且条件苛刻, 不适于工业化生产, 更为重要的是, 目前尚未发现可用于降解本实验中

收稿日期: 2013-01-26 修回日期: 2013-04-03

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31171784); 国家支撑计划项目 (2012BAD38B09); 浙江省公益技术研究农业项目 (2011C22026); 中国博士后项目 (16000 - X91009; 316000 - X91005)

通信作者: 叶兴乾, E-mail: psu@zju.edu.cn

鱿鱼墨黑色素的酶类。与前两种手段相比,超声降解法显示了巨大的优势,利用超声波空化作用产生的瞬时高温高压和剪切力效应,可以迅速打破高分子的聚合状态,不仅反应速率高,反应可控性好,而且对可溶性黑色素产物的结构破坏小,不影响其生物活性。

实验利用超声处理的手段,在不改变鱿鱼墨黑色素结构和活性的情况下,大大提高其溶解性,促进其被机体的吸收率和利用率,为开发鱿鱼墨黑色素作为一种天然色素和自由基清除剂提供新的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料和仪器

北太平洋鱿鱼墨囊由舟山渔业总公司提供,  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  贮藏;鲁米诺(Luminol)购于MERCK公司;肌肽(carnosine)购于WAKO公司;维生素C(Vc)分析纯,购于淄博化学试剂厂;连苯三酚(焦性没食子酸)购自贵州遵义市第二化工厂;NaOH, HCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。实验中所用水均为超纯水。

超滤膜(10, 50 ku), 合肥世杰膜工程有限责任公司;高速冷冻离心机, 日本Hitachi公司;真空冷冻干燥机, Labconco公司;超声细胞破碎仪, 宁波新芝公司;紫外分光光度计, 岛津公司;红外光谱仪, Nicolet Instruments公司;激光粒度仪, Beckman Coulter公司。

### 1.2 方法

**鱿鱼墨黑色素的制备** 参考Liu等<sup>[1]</sup>的方法,利用水洗高速离心法获得鱿鱼墨黑色素,鱿鱼墨囊在室温下解冻,去除表皮膜和内部网状膜获得鱿鱼墨汁,加入2倍体积冰水搅拌后过夜,  $8\ 000\times\text{g}$ 离心20 min,弃去上清液,将沉淀用20倍体积  $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  的水洗涤,  $8\ 000\times\text{g}$ 离心20 min,弃去上清保留沉淀,重复4~6次直至上清液澄清透明,将沉淀物真空冷冻干燥后获得黑色素样品。

**可溶性鱿鱼墨黑色素的制备** 取2 g 鱿鱼墨黑色素,分别溶于100 mL浓度为0.1 mol/L, 0.5 mol/L和1 mol/L NaOH溶液中,将混合液转移至直径为3 cm的棕色玻璃试管中并置于循环水浴锅中保持温度为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,设定超声细胞破碎仪振幅为50%,超声2 s,间歇2 s,总处理作用时间

为1 h。待冷却至室温后,加1 mol/L HCl中和至pH 7.0。将所得溶液  $8\ 000\times\text{g}$ 离心20 min,弃去沉淀,取上清液进行真空冷冻干燥得3组精制黑色素样品,分别命名为A(0.1 mol/L NaOH)、B(0.5 mol/L NaOH)、C(1 mol/L NaOH)。

**可溶性鱿鱼墨黑色素的分级** 将不同浓度NaOH处理的3组可溶性鱿鱼墨黑色素溶于100 mL水,分别过10和50 ku的超滤膜,得到10 ku以下,10~50 ku,大于50 ku 3种组分。真空冷冻干燥后将收集到的组分分别记为A-1, A-2, A-3(0.1 mol/L NaOH); B-1, B-2, B-3(0.5 mol/L NaOH); C-1, C-2, C-3(1.0 mol/L NaOH)。

**粒度分析** 分别取天然鱿鱼墨黑色素和可溶性鱿鱼墨黑色素B组分溶于去离子水中,使用激光粒度仪测试样品粒度。

**紫外光谱** 取20 mg可溶性鱿鱼墨黑色素样品溶于500 mL去离子水中,用紫外分光光度计扫描样品200~800 nm波长范围内的紫外光谱。

**红外光谱** 将干燥的样品约0.5 mg与KBr压制成片,使用Nicolet-Nexus 470傅立叶变换红外光谱仪,扫描  $400\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$  波长范围的光谱吸收值。

**可溶性鱿鱼墨黑色素清除超氧自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )活性(连苯三酚-鲁米诺体系)** 在侯冬岩等<sup>[6]</sup>的方法上做细微改进,各可溶性黑色素组分用磷酸盐缓冲液PBS(0.05 mol/L, pH 7.8)配制浓度分别0、50、100、150、200、300、350、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,各取400  $\mu\text{L}$ ,然后加入连苯三酚(0.625  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )50  $\mu\text{L}$ ,迅速加入550  $\mu\text{L}$ 鲁米诺(1 mmol/L,用0.1 mol/L  $\text{NaCO}_3$ 配制),拉盖后测定鲁米诺化学发光值C。每组实验设3个平行。抑制率(%) =  $(C_0 - C)/C_0 \times 100$  ( $C_0$ 为未加抗氧化剂的空白的发光值, C为加入抗氧化剂后的发光值)。根据浓度与抑制率的关系曲线可以得,抑制率达50%时样品的浓度即为  $\text{IC}_{50}$ 。

**可溶性鱿鱼墨黑色素清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )活性(抗坏血酸-Cu酵母悬浮液-鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系)** 依据Szpoganicz等<sup>[7]</sup>,各可溶性黑色素组分用PBS(0.05 mol/L, pH 7.8)配制浓度分别0、50、100、150、200、250、350、450和550  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,各取550  $\mu\text{L}$ 于小试管中,再加入0.2 mL抗坏血酸(2 mmol/L),0.4 mL

CuSO<sub>4</sub> (2 mmol/L), 50 μL 鲁米诺 (0.1 mmol/L, 用 0.1 mol/L NaCO<sub>3</sub> 配制), 0.2 mL 酵母悬浮液 (75 mg/mL), 混匀后温育 30 min。再加入 0.6 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6.8 mmol/L) 启动反应。拉上盖, 测鲁米诺化学发光值  $C$ 。抑制率 (%) =  $(C_0 - C)/C_0 \times 100$  ( $C_0$  为未加抗氧化剂的空白的发光值,  $C$  为加入抗氧化剂后的发光值)。根据浓度与抑制率的关系曲线可以得发光值抑制率达 50% 时样品的浓度 IC<sub>50</sub>。

## 2 结果

### 2.1 可溶性鱿鱼墨黑色素的制备

分级后的降解产物冷冻干燥后分别称重 (表 1), 可以发现, 随着处理碱液浓度的升高, 降解产物的产率不断增加, 2 g 天然鱿鱼墨黑色素溶于 1 mol/L NaOH 进行超声降解处理可得到 0.793 mg 可溶性黑色素, 产率为 39.65%, 大多数可溶性降解产物集中于 50 ku 之下。

表 1 不同浓度 NaOH 处理的可溶性黑色素各组分的重量

Tab.1 The weight of each fraction treated with different concentration of NaOH

样品组分 sample	< 10 ku/mg	10 ~ 50 ku/mg	> 50 ku/mg	总重/mg total weight	产率/% productivity
A	438	159	48	0.645	32.25
B	371	238	86	0.695	34.75
C	296	376	121	0.793	39.65

### 2.2 天然鱿鱼墨黑色素和可溶性降解产物粒度分析

对可溶性黑色素组分 B 和天然鱿鱼墨黑色素进行粒度分析, 结果如图 1 所示, 超声处理前, 天然鱿鱼墨黑色素颗粒集中于 1.26 ~ 121 μm 范围内, 超声处理后的可溶性组分 B 的粒度分布于 0.04 ~ 0.08 μm 和 2.01 ~ 3.86 μm 两个区间内, 鱿鱼墨黑色素在超声处理后的平均粒度从 17.34 μm 下降至 1.467 μm。

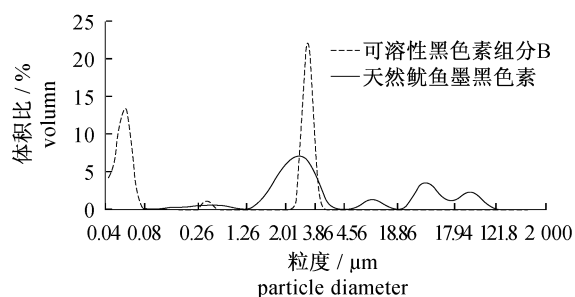


图 1 天然鱿鱼墨黑色素和可溶性黑色素组分 B 粒度分布图

Fig. 1 Particle size distributions of natural melanin and soluble melanin fraction B

### 2.3 可溶性鱿鱼墨黑色素降解产物的紫外光谱分析

观察用 0.5 mol/L NaOH 处理的可溶性鱿鱼墨黑色素降解产物的紫外光谱图 (图 2) 可以发现, B-1, B-2, B-3 都显示出了很强的光谱吸收范

围, 这与实验之前对天然鱿鱼墨黑色素紫外光谱分析结果是一致的<sup>[8]</sup>。3 种组分在 220 nm 处都有吸收峰, 随着分子量的减小, 吸收峰变弱; 此外, B-2 和 B-3 在 310 nm 和 450 nm 还有 2 个微弱的吸收峰, 其中 310 nm 处的吸收峰可能是由于 DHI 基团引起的, 而 450 nm 处的不明显吸收峰可能由亚氨基基团引起, 与 220 nm 吸收峰的变化趋势一致, 分子量较大的组分吸收较强, 10 ku 以下组分在此区域吸收峰消失。

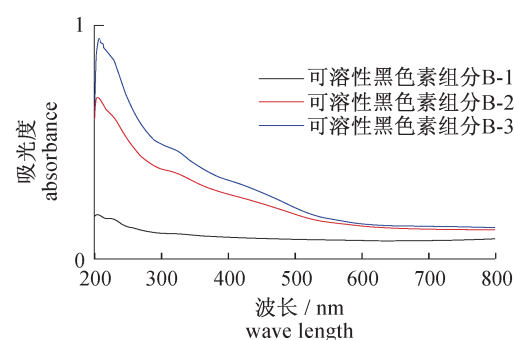


图 2 可溶性鱿鱼墨黑色素 B 不同分子量组分紫外光谱图

Fig. 2 UV spectra of soluble melanin fraction B with different molecular weight

### 2.4 可溶性鱿鱼墨黑色素降解产物的红外光谱分析

图 3 所示为可溶性鱿鱼墨黑色素组分 B-1, B-2 和 B-3 在 400 ~ 4 000 cm<sup>-1</sup> 波长范围的红外

光谱,由于鱿鱼墨黑色素是结构非常复杂的生物大分子,包含的各种官能团振动相叠加形成了一系列宽且强的吸收峰。3种组分红外图谱相似,分别做如下归属<sup>[7-11]</sup>:在 $3\ 300\sim 3\ 500\text{ cm}^{-1}$ 区出现的共振强吸收宽峰,为吡啶和吡咯结构单元中的 $-\text{NH}$ ( $3\ 200\text{ cm}^{-1}$ )和 $-\text{OH}$ ( $3\ 600\text{ cm}^{-1}$ )的伸缩振动产生; $2\ 000\sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$ 区为脂肪族 $\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动; $1\ 610\sim 1\ 690\text{ cm}^{-1}$ 为芳香环中 $\text{C}=\text{C}$ 和 $\text{C}=\text{N}$ 的弯曲振动以及 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动(酰胺或酮基等非羧酸集团); $1\ 385\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收是 $\text{COO}-$ 的变形振动,或是芳构化、环化的 $\text{C}-\text{C}$ 变形振动; $1\ 037\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 236\text{ cm}^{-1}$ 处吸收归属为 $1\ 300\sim 1\ 000\text{ cm}^{-1}$ 区的 $\text{C}-\text{O}$ 、 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动吸收,说明含羟基结构。

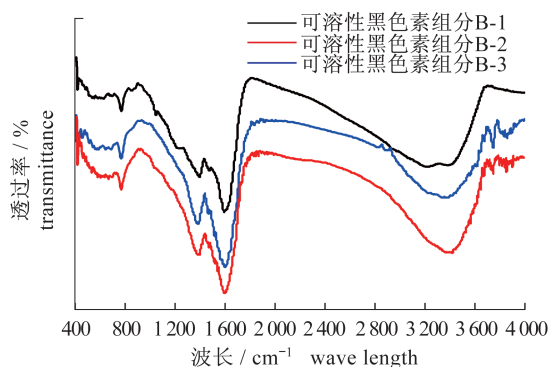


图3 可溶性黑色素B不同分子量组分红外光谱图  
Fig. 3 IR spectra of soluble melanin fraction B with different molecular weight

通过进一步比较发现,B-2组分和B-3组分相对B-1,其活性基团破坏较低,如B-1组分在 $3\ 300\sim 3\ 400\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰的减弱说明低分子量组分DHI,DHICA基团破坏较严重,被氧化程度更剧烈, $1\ 634\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰的减弱说明黑色素中苯环的结构在超声过程中被破坏,且小分子量组分破坏程度更严重。这与上一部分中自由基清除实验中B-2,B-3组分具有较强的自由基清除活性是一致的。

### 2.5 天然鱿鱼墨黑色素和可溶性降解产物的<sup>13</sup>C核磁共振谱图分析

图4所示为可溶性黑色素组分B和天然鱿鱼墨黑色素的<sup>13</sup>C核磁共振谱图,将2种样品化学位移做如下归属<sup>[12-14]</sup>:1)  $\delta 10\sim 95\text{ ppm}$ 为脂肪族中的C原子;2)  $\delta 95\sim 165\text{ ppm}$ 归属为芳香族中的C原子,其中主要为吡啶,吡咯结构;3)  $\delta 165\sim 200$

ppm由酰胺,羧化物,醌类物质中的羧基碳产生。

具体来说, $\sim 830\text{ ppm}$ 和 $\sim 850\text{ ppm}$ 处的信号归属为DHICA派生物中脂肪族结构; $\sim 8103\text{ ppm}$ 处的化学位移由异头碳引起,来自于吡啶结构中C-3; $\sim 8130\text{ ppm}$ 归属为芳香基团; $\sim 8174\text{ ppm}$ 是由于DHI和DHICA的降解产物以及DHI的氧化产物中的羧酸基团引起<sup>[13-15]</sup>。除了2个组分相似之处,可溶性黑色素组分B和天然鱿鱼墨黑色素仍有细微差别,与可溶性黑色素组分B相比,天然鱿鱼墨黑色素在 $895\sim 165\text{ ppm}$ 处的化学位移强度更大,这是由于黑色素骨架结构中质子化的碳原子( $895\sim 130\text{ ppm}$ )和季碳原子( $130\sim 145\text{ ppm}$ )引起的<sup>[12]</sup>,说明黑色素可溶性降解组分芳香结构被微弱破坏。

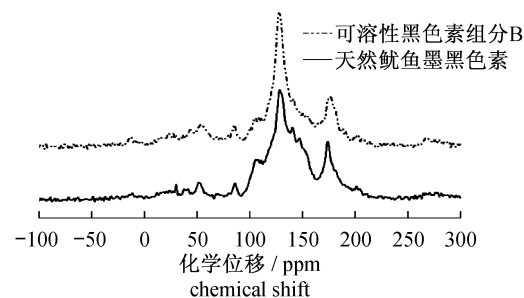


图4 天然鱿鱼墨黑色素和可溶性组分B的<sup>13</sup>C固体核磁共振图谱

Fig. 4 Solid-state <sup>13</sup>C NMR spectra of natural squid ink melanin and soluble melanin fraction B

### 2.6 可溶性黑色素降解产物的清除自由基活性

可溶性鱿鱼墨黑色素降解产物的清除超氧自由基活性 表2和图5列出了不同可溶性鱿鱼墨黑色素组分和肌肽的清除超氧自由基的 $\text{IC}_{50}$ 值,结果显示使用 $0.1\text{ mol/L NaOH}$ 处理的可溶性黑色素 $\text{IC}_{50}$ 值普遍比较高,对于分子量 $< 10\text{ ku}$ 组分,浓度达 $450\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率也只有40%左右,分子量 $> 10\text{ ku}$ 的组分, $\text{IC}_{50}$ 值也同样较高,活性最好的分子量 $> 50\text{ ku}$ 组分 $\text{IC}_{50}$ 值也达到了 $165\text{ }\mu\text{g/mL}$ ;  $0.5\text{ mol/L NaOH}$ 和 $1.0\text{ mol/L NaOH}$ 处理的组分抗氧化性较好,其中,使用 $1\text{ mol/L NaOH}$ 处理,分子量 $> 50\text{ ku}$ 组分(C-3)的 $\text{IC}_{50}$ 值均仅为 $19\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,显示出极高的清除超氧自由基活性。与作为商品抗氧化剂的肌肽( $\text{IC}_{50} = 355\text{ }\mu\text{g/mL}$ )相比,各组分子量 $> 10\text{ ku}$ 组分清除超氧自由基活性明显优于肌肽。

表 2 不同浓度碱降解后的各组分可溶性黑色素对  $O_2^- \cdot$  的  $IC_{50}$  值

Tab.2  $IC_{50}$  on superoxide anion radical of soluble melanin fractions degraded by different concentration alkali  $\mu\text{g/mL}$

NaOH 浓度/ (mol/L)	分子量 molecular weight		
	< 10 ku	10 ~ 50 ku	> 50 ku
0.1	> 400	240	165
0.5	330	35	27
1.0	235	80	19

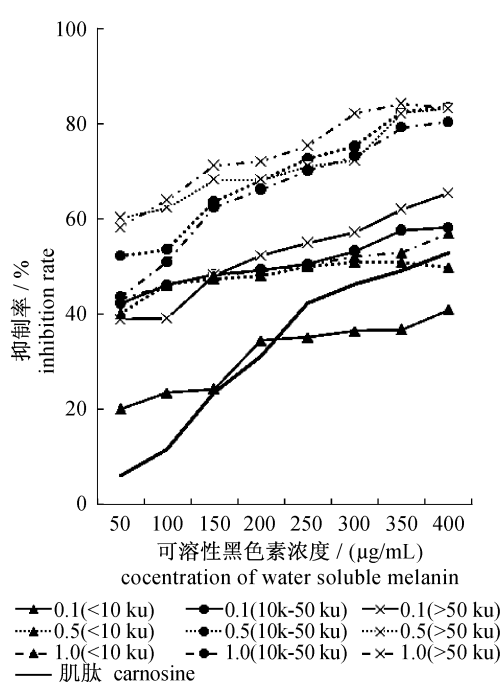


图 5 不同浓度碱降解后的各组分可溶性黑色素对  $O_2^- \cdot$  的  $IC_{50}$  值

Fig.5  $IC_{50}$  on superoxide anion radical of soluble melanin fractions degraded by different concentration alkali

可溶性鱿鱼墨黑色素降解产物的清除羟基自由基活性 表 3 和图 6 显示了可溶性黑色素降解产物清除羟基自由基活性,其趋势与清除超氧自由基活性类似,使用 0.1 mol/L NaOH 处理的组分  $IC_{50}$  值最高,分子量 < 50 ku 组分的  $IC_{50}$  值均大于 550  $\mu\text{g/mL}$ ;使用 0.5 mol/L NaOH 和 1.0 mol/L NaOH 处理的组分  $IC_{50}$  值明显减小,分子量大于 10 ku 的组分  $IC_{50}$  值在 115 ~ 180  $\mu\text{g/mL}$  之间,清除羟基自由基活性与肌肽相当 ( $IC_{50} = 110 \mu\text{g/mL}$ )。

表 3 不同浓度碱降解后的各组分可溶性黑色素对  $\cdot\text{OH}$  的  $IC_{50}$  值

Tab.3  $IC_{50}$  on hydroxyl radical of soluble melanin fractions degraded by different concentration alkali  $\mu\text{g/mL}$

NaOH 浓度/ (mol/L)	分子量 molecular weight		
	< 10 ku	10 ~ 50 ku	> 50 ku
0.1	> 550	> 550	300
0.5	540	145	130
1.0	> 550	180	115

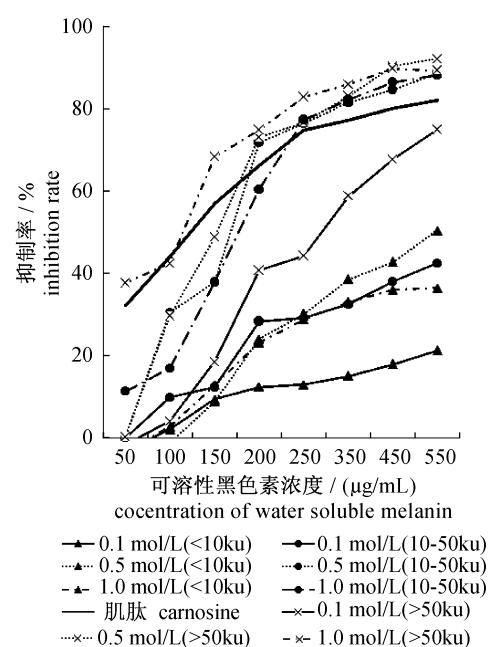


图 6 不同浓度碱降解后的各组分可溶性黑色素对  $\cdot\text{OH}$  的  $IC_{50}$  值

Fig.6  $IC_{50}$  on hydroxyl radical of soluble melanin fractions degraded by different concentration alkali

### 3 讨论

#### 3.1 超声处理对于鱿鱼墨黑色素结构的影响

从形态上分析,通过对天然鱿鱼墨黑色素和可溶性组分的粒度分析可知,超声处理之后黑色素颗粒的尺寸大幅度下降,平均粒度从 17.34  $\mu\text{m}$  下降至 1.467  $\mu\text{m}$ ,直观的说明超声作用将鱿鱼墨黑色素大分子从高度聚合状态降解为小颗粒物质;进一步从化学结构角度分析,由于真黑色素基础结构是一些共价交联的吡啶环,高度的共轭效应产生了广谱光吸收特性,对比各组分的紫外光谱,红外光谱和核磁共振谱可以发现,与天然鱿鱼

墨黑色素相比,可溶性降解产物的化学结构并没有发生太大变化,推断超声主要破坏黑色素颗粒的高度聚合状态,而黑色素的主要化学结构和官能团并没有被破坏,只有少数基团,如 DHI 和 DHICA 的部分环状结构发生断裂,或是被氧化生成了羧基。将可溶性降解产物进行超滤处理分级后发现,小分子量组分( $<10\text{ ku}$ )结构破坏较为剧烈,随着分子量的增大,主要结构和基团保留的越完整。因此,超声对大分子物质的降解主要作用于三维高度聚合结构或是重复序列单元,而对于和活性密切相关的主要化学结构破坏很小。

### 3.2 超声降解鱿鱼墨黑色素机理

超声作用可以迅速将不溶性的鱿鱼墨黑色素降解为可溶性小分子物质,且不破坏产物的主要化学结构,其降解机理包括3方面<sup>[16-18]</sup>:1)空化作用产生的瞬时高温高压和剪切力效应,液体受到超声波作用后,当媒质分子间的平均距离渐渐增大并超过极限距离,便会将液体拉断形成空穴,空化现象包括气泡的形成、成长和崩溃过程。在气泡剧烈收缩与崩溃的瞬间,泡内可以产生局部的高达  $1.013 \times 10^7\text{ Pa}$  的压力,以及  $5\ 000\text{ }^\circ\text{C}$  的高温,使各种粒子运动速度大大加快,从而使许多物理和化学过程急剧加速,空化效应使得大分子聚合结构快速断裂,降解为小分子颗粒;2)自由基效应,液体中的水分子利用空穴破碎时的瞬时高温高压,在空穴周围进行热裂解反应,生成大量氢自由基( $\text{H}\cdot$ )和羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ ),在自由基的攻击下,黑色素大分子经过部分氧化还原反应,发生降解;3)降解过程中加入的高浓度碱液,加速了共价键和氢键的断裂,加剧了降解的发生。

### 3.3 自由基清除活性与超声处理过程中碱液浓度以及各组分分子量的关系

黑色素清除自由基活性主要由于黑色素结构中的 DHI 和 DHICA 结构,当 DHI 和 DHICA 在苯二酚和苯醌结构之间转换时会失去2个电子,此时 DHI 和 DHICA 在催化  $\text{O}_2^- \cdot$  变为  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2$  起到了超氧化物歧化酶的作用<sup>[19]</sup>。

各可溶性黑色素降解产物在清除羟基自由基和超氧自由基活性上显示出了相同趋势,随着处理碱液浓度的增大,  $\text{IC}_{50}$  值逐渐减少,清除自由基活性逐渐增大,这可能由于,较低浓度碱液使得黑色素溶解不充分,在超声过程中与溶剂作用没有高浓度碱液组彻底,而高浓度碱液处理的组分降

解的更为充分,暴露了更多的活性基团。

对于相同碱液处理的样品来说,清除自由基活性随着组分分子量的增大而增强,这是由于低分子量组结构被破坏程度最剧烈,一部分具有还原性的基团被破坏,而高分子量组分则较完整的保留了黑色素的化学结构中的相关活性基团, DHI 和 DHICA 结构较少被破坏,这也与不同分子量组分的紫外和红外光谱的结果一致。

实验表明,用  $0.5\text{ mol/L NaOH}$  和  $1\text{ mol/L NaOH}$  处理,分子量大于  $10\text{ ku}$  的可溶性黑色素组分具有显著的自由基清除活性。机体的衰老是由自由基引起的,鱿鱼墨黑色素作为一种天然的新型自由基清除剂,具有较强开发潜力,而黑色素可溶性能够增强其吸收效果,提高其体内利用效率,为进一步开发黑色素产品提供广阔前景。

### 参考文献:

- [1] Liu Y, Simon J D. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy [J]. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(6): 606-618.
- [2] Sarna T, Sealy R C. Photo-induced oxygen consumption in melanin systems. Action spectra and quantum yields for eumelanin and synthetic melanin [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1984, 39(1): 69-74.
- [3] Menter J M, Patta A M, Hollins T D, et al. Photoprotection of mammalian acid-soluble collagen by cuttlefish sepia melanin *in vitro* [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1998, 68(4): 532-537.
- [4] Pugh N D, Balachandran P, Lata H, et al. Melanin: dietary mucosal immune modulator from Echinacea and other botanical supplements [J]. *International immunopharmacology*, 2005, 5(4): 637-647.
- [5] 林亮全, 陈维泰. 不同动物来源所萃取黑色素之抗氧化特性 [J]. *台湾农业化学与食品科学*, 2004, 42(4): 274-279.
- [6] 侯冬岩, 回瑞华, 刘晓媛, 等. 荞麦、大麦和燕麦抗氧化性能的比较 [J]. *食品科学*, 2004, 25(10): 54-56.
- [7] Szpoganicz B, Gidanian S, Kong P, et al. Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by  $\text{Cu}(\text{II})$  and  $\text{Zn}(\text{II})$  ions [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 89(1-2): 45-53.

- [ 8 ] 陈士国,薛勇,薛长湖,等. 鱿鱼墨黑色素络合铁离子的活性研究[J]. 离子交换与吸附,2010,26(4): 310 - 316.
- [ 9 ] Stainsack J, Mangrich A S, Maia C M B F, *et al.* Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin [ J ]. *Inorganica Chimica Acta*,2003,356:243 - 248.
- [ 10 ] Liu Y, Hong L, Wakamatsu K *et al.* Comparison of structural and chemical properties of black and red human hair melanosomes [ J ]. *Photochemistry and Photobiology*,2005,81(1):135 - 144.
- [ 11 ] Centeno S A, Shamir J. Surface enhanced Raman scattering ( SERS ) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art [ J ]. *Journal of Molecular Structure*,2008,873(1 - 3): 149 - 159.
- [ 12 ] Adhyaru B B, Akhmedov N G, Katritzky A R, *et al.* Solid-state cross-polarization magic angle spinning <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR characterization of *Sepia* melanin, *Sepia* melanin free acid and Human hair melanin in comparison with several model compounds [ J ]. *Magnetic Resonance in Chemistry*,2003,41(6):466 - 474.
- [ 13 ] Jalmi P, Bodke P, Wahidullah S, *et al.* The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications [ J ]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*,2012,28(2):505 - 512.
- [ 14 ] Tian S, Garcia-Rivera J, Yan B, *et al.* Unlocking the molecular structure of fungal melanin using <sup>13</sup>C biosynthetic labeling and solid-state NMR [ J ]. *Biochemistry*,2003,42(27):8105 - 8109.
- [ 15 ] Knicker H, Almendros G, Gonzales-Vila F J, *et al.* <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR analysis of some fungal melanins in comparison with soil organic matter [ J ]. *Organic Geochemistry*,1995,23(11 - 12):1023 - 1028.
- [ 16 ] Basedow A M, Ebert K H. Ultrasonic degradation of polymers in solution [ J ]. *Physical Chemistry: Advances in Polymer Science*,1977,22:83 - 148.
- [ 17 ] Suslick K S, Price G J. Applications of ultrasound to materials chemistry [ J ]. *Annual Review of Materials Science*,1999,29(1):295 - 326.
- [ 18 ] Riesz P, Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications [ J ]. *Free Radical Biology and Medicine*,1992,13(3): 247 - 270.
- [ 19 ] Moscaa L, Blarzinoa C, Cocciaa R, *et al.* Melanins from tetrahydroisoquinolines: spectroscopic characteristics, scavenging activity and redox transfer properties [ J ]. *Free Radical Biology and Medicine*,1998,24(1):161 - 167.

## Ultrasound-assisted degradation for preparing soluble melanin from squid ink and its anti-oxidant activity

GUO Xin<sup>1</sup>, CHEN Shiguo<sup>1</sup>, XUE Changhu<sup>2</sup>, HU Yaqin<sup>1</sup>, LIU Donghong<sup>1</sup>, YE Xingqian<sup>1\*</sup>

(1. College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** We developed a new method using ultrasound-assisted degradation under alkaline condition for preparation of solution squid ink melanin. The squid ink melanin was mixed with NaOH solvent in brown glass tubes. The melanin-solvent suspension was treated by ultrasound for 1 h and then divided into three different molecular weight (Mw) fractions by membrane separation (below 10 ku, among 10 – 50 ku and over 50 ku). The result showed that the mean diameter of the squid ink melanin was decreased from 17.34  $\mu\text{m}$ . to 1.467  $\mu\text{m}$  after ultrasound process. UV, IR and solid<sup>13</sup>C NMR spectra indicated that the basic structure of melanin fraction was still retained after ultrasound process. The fraction with Mw below 10 ku showed more severe degree of oxidation on active groups (DHI and DHICA) than those above 10 ku. Further *in vitro* analysis showed soluble melanin fractions obtained in 0.5 and 1 mol/L NaOH, with Mw above 10 ku which had greater characteristic absorption peak of –OH and –NH structure exhibited much higher antioxidant potency. The IC<sub>50</sub> of these fractions (among 19 – 80  $\mu\text{g}$ ) on scavenging O<sub>2</sub><sup>-</sup> · is more efficient than carnosine (IC<sub>50</sub> = 355  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a commercialized antioxidant. And they (IC<sub>50</sub> among 115 – 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) are as efficient as carnosine (IC<sub>50</sub> = 110  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on scavenging ·OH in free radical scavenge assay. In conclusion, our results showed that soluble squid melanin is a natural pigment and a new free radical scavenger with a promising prospect. The excellent solubility can increase absorption and enhance utilization rate *in vivo*, providing a potential prospect for squid ink melanin product as a natural antioxidant.

**Key words:** squid; ink melanin; soluble; anti-oxidant activity

**Corresponding author:** YE Xingqian. E-mail: psu@zju.edu.cn