

鱿鱼墨黑色素及黑色素铁定量分析

高翔, 李国云, 王静凤, 薛长湖, 王玉明, 李兆杰*
(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用高速离心法从北太平洋鱿鱼(*Ommastrephes bartrami*)墨囊中提取鱿鱼黑色素, 并通过黑色素与 FeCl_3 螯合制备了 Fe(III) 含量为7%的黑色素铁。采用 H_2O_2 氧化降解及高效液相色谱法定量测定黑色素两种降解产物2,3-二羧酸吡咯(PDCA)和2,3,5-三羧酸吡咯(PTCA)对鱿鱼墨黑色素及黑色素铁进行定量研究。结果表明: 以 H_2O_2 氧化降解黑色素产物PDCA和PTCA为基础的鱿鱼墨黑色素定量方法效果良好。利用该方法对黑色素铁进行定量仅检测出40%的黑色素, 盐酸脱铁后检出量上升至75%。常规的鱿鱼墨黑色素的定量方法不适用于黑色素铁的定量分析。

关键词: 鱿鱼墨黑色素; 鱿鱼墨黑色素铁; 定量分析; 高效液相色谱

Quantitative Analysis of Melanin and Melanin-Fe (III) from Squid

GAO Xiang, LI Guo-yun, WANG Jing-feng, XUE Chang-hu, WANG Yu-ming, LI Zhao-jie*
(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Melanin was extracted from the ink of North Pacific squid (*Ommastrephes bartrami*) by high-speed centrifugation. Squid melanin-Fe (III) containing 7% (m/m) bound Fe (III) was prepared by exposing squid melanin to aqueous solution of FeCl_3 . Melanin was degraded with H_2O_2 and two degradation products, pyrrole-2,3-dicarboxylic acid (PDCA) and pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid (PTCA) were determined by HPLC. The quantitative method to determine squid melanin based on the degradation products of melanin PTCA and PDCA exhibited desired results. Only 40% of the melanin was detected in quantitative analysis of the squid melanin-Fe (III) by this method and increased to 75%. After hydrochloric acid treatment to expel Fe, the melanin detected rose to 75%.

Key words: squid melanin; squid melanin-Fe (III); quantitative analysis; HPLC

中图分类号: TS254.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)10-0173-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201310037

黑色素(melanin)是一种不溶于水的生物大分子多聚体, 它广泛存在于动植物体内。根据产生前体不同, 黑色素可分为3类: 真黑色素、棕黑色素以及神经元黑色素。真黑色素是由酪氨酸氧化而成的两种吡咯结构的分子, 5,6-二羟基吡咯(DHI)及5,6-二羟基-2-吡咯羧酸(DHICA)为其基本结构单元, 呈深黑色; 棕黑色素以Cys-Dopa(半胱氨酸多巴)为基本结构单元, 分子中含有硫, 一般显棕色或红色; 神经元黑色素以多巴胺为前体。

鱿鱼墨是鱿鱼加工过程中的废弃物, 其主要化学成分是黑色素和蛋白多糖复合体。鱿鱼墨黑色素几乎为纯净的真黑色素^[1], 主要由DHI及DHICA组成, 仅含5%左右结合蛋白^[2]。在碱性 H_2O_2 条件下, DHI和DHICA分别被氧化为2,3-二羧酸吡咯(PDCA)和2,3,5-三羧酸吡咯(PTCA)^[3-8]。黑色素具有很强的阳离子络合特性, 它主要通过羧基和去质

子化羟基等阴离子起作用^[9], 能与 Fe(III) 络合形成黑色素铁。前期研究发现鱿鱼墨黑色素铁能够显著促进IDA大鼠贫血症状的恢复^[10], 是改善营养型贫血类保健食品的良好原料。目前对鱿鱼墨黑色素的组成和定量方法已有一些研究报道^[1-3,5,8], 但是, 已有的定量检测方法是否适用于鱿鱼墨黑色素铁的定量检测未见研究报道, 因此本实验对鱿鱼墨黑色素及黑色素铁的定量检测进行比较研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

北太平洋鱿鱼(*Ommastrephes bartrami*)墨囊(-20℃储藏) 中国水产舟山海洋渔业公司; 5-羟基吡咯(DHI)、5-羟基吡咯-2-羧酸(DHICA) 美国Sigma公司; 甲醇(色

收稿日期: 2012-03-01

基金项目: 海洋公益性行业科研专项(201105029)

作者简介: 高翔(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与化学。E-mail: xx526916212@126.com

*通信作者: 李兆杰(1970—), 男, 高级工程师, 博士, 研究方向为水产品化学、大宗海洋生物资源高效利用技术。

E-mail: lizhaojie@ouc.edu.cn

谱纯), 甲酸、30% H_2O_2 、无水乙醚、 K_2CO_3 、 Na_2SO_3 均为分析纯, 实验中所用水均为超纯水。

1.2 仪器与设备

1260高效液相色谱仪(带紫外检测器) 美国Agilent公司; Laborota 4000 efficient旋转蒸发器 德国海道尔夫公司; AB135-S型精密电子分析天平 瑞士梅特勒-托利多公司; AA6800型石墨炉原子分光光度计 日本岛津公司; ZMQS50001型Milli-Q超纯水系统 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 鱿鱼墨黑色素的提取

采用高速离心法, 参照文献[11]。

1.3.2 鱿鱼墨黑色素铁的制备

参照文献[12-13]制备鱿鱼墨黑色素铁, 原子分光光度法于248.3nm测定黑色素墨铁中铁含量为7%(质量分数)。

1.3.3 黑色素氧化降解产物PDCA及PTCA检测色谱条件
色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈(4.6mm×150mm, 5 μm); 检测波长: 275nm; 进样量: 10 μL ; 流速: 0.5mL/min; 流动相: 0.1%甲酸(流动相A), 甲醇(流动相B); 梯度洗脱条件: 0~15min, 流动相A由98%降至60%, 流动相B由2%升至40%, 保持5min, 20~25min, 流动相A由60%降至0%, 流动相B由40%升至100%。

1.3.4 PDCA及PTCA标准品制备

按文献[14-15]方法, 精确称取DHI和DHICA各300mg, 分别溶于300mL 1mol/L K_2CO_3 溶液中, 加入12mL 30%(体积分数) H_2O_2 , 沸水浴加热反应20min后迅速流水冷却至室温, 加入18mL 10%(质量分数) Na_2SO_3 溶液终止反应后, 以6mol/L HCl溶液调至pH1。待溶液冷至室温后分别用300mL无水乙醚萃取4次, 合并有机相, 用300mL超纯水水洗一次, 有机相于40℃旋转蒸干后用流动相A(0.1%甲酸)复溶, 过0.45 μm 有机滤膜, 液相制备。色谱条件: 色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈(4.6mm×150mm, 5 μm)、检测波长275nm、进样量50 μL 、流速2mL/min; 流动相: 0.1%甲酸(流动相A)-甲醇(流动相B)(6:4, V/V)等度洗脱。制备液冻干后即得PDCA及PTCA标准品。

1.3.5 PDCA及PTCA标准曲线

分别配制质量浓度为0.5、1、2、5、10、15 $\mu\text{g/mL}$ 的PDCA标准溶液及质量浓度为1、5、10、20、30、50 $\mu\text{g/mL}$ 的PTCA标准溶液, 按1.3.3节色谱条件进样分析, 以PDCA和PTCA吸收峰面积(y)对应质量浓度(x)绘制得到标准曲线。

1.3.6 反应条件确定

1.3.6.1 H_2O_2 用量对PDCA及PTCA得率的影响

精确称取10mg黑色素8份, 加入10mL 1mol/L K_2CO_3 溶液, 分别加入0.02、0.08、0.16、0.3、0.6、0.8、1、2mL

30% H_2O_2 , 沸水浴加热反应20min后迅速流水冷却至室温, 加入1mL 10% Na_2SO_3 溶液终止反应后, 以6mol/L HCl溶液调至pH1, 待溶液冷至室温后以8000r/min离心10min, 上清液用50mL无水乙醚萃取4次, 合并有机相于40℃旋转蒸干后用流动相A(0.1%甲酸)定容至10mL, 过0.45 μm 有机滤膜后按1.3.3节色谱条件测定PDCA及PTCA的含量。

1.3.6.2 氧化时间对PDCA及PTCA得率的影响

精确称取10mg黑色素5份, 加入10mL 1mol/L K_2CO_3 溶液, 分别加入0.8mL 30% H_2O_2 溶液, 沸水浴加热反应10、15、20、30、40min, 其他操作同1.3.6.1节。

1.3.6.3 黑色素多次降解对PDCA及PTCA得率的影响

精确称取10mg黑色素3份(1~3号), 加入10mL 1mol/L K_2CO_3 溶液, 分别加入0.8mL 30% H_2O_2 溶液, 沸水浴加热反应20min后迅速流水冷却至室温, 加入1mL 10% Na_2SO_3 溶液终止反应后, 以6mol/L HCl溶液调至pH1, 待溶液冷至室温后以8000r/min离心10min, 1号上清液用50mL无水乙醚萃取4次, 2号对一次反应完所得沉淀继续如上反应一次, 合并上清液后, 50mL无水乙醚萃取4次。3号对一次反应完所得沉淀继续如上反应两次, 合并上清液, 50mL无水乙醚萃取4次, 其他操作同1.3.6.1节。

1.3.7 黑色素完全降解对应PDCA及PTCA得率的确定

精确称取10mg黑色素6份, 分别加10mL 1mol/L K_2CO_3 溶液, 加入0.8mL 30% H_2O_2 溶液, 沸水浴加热反应20min后迅速流水冷却至室温, 加入1mL 10% Na_2SO_3 溶液终止反应, 其他操作同1.3.5.1节。根据1.3.4.3节所得标准曲线计算产物得率, 确定黑色素对应产物PDCA及PTCA的得率。

1.3.8 鱿鱼墨黑色素铁的定量分析

精确称取10mg黑色素铁3份, 经1.3.7节反应条件处理后按1.3.3节色谱条件测定PDCA及PTCA含量。根据建立的鱿鱼黑色素与PDCA及PTCA之间得率, 计算从黑色素铁中检出的黑色素含量。

1.3.9 鱿鱼墨黑色素铁脱铁后的定量分析

称取约1g黑色素铁, 以25mL 0.5mol/L HCl溶液洗5次, 25mL超纯水洗2次, 脱去Fe(III)。冻干后精确称取10mg冻干产物3份, 经1.3.7节反应条件处理后按1.3.3节色谱条件测定PDCA及PTCA含量。根据建立的鱿鱼黑色素与PDCA及PTCA之间得率, 计算从除铁后的黑色素铁中检出的黑色素含量。

2 结果与分析

2.1 PDCA及PTCA标准品谱图

图1a、1b表明, 归一化分析, 标准品PDCA及PTCA纯度不小于98%。如图1c所示, 标准品PDCA及PTCA在

1.3.3节所示色谱条件下, 峰形对称且分离良好, 分离度 R 大于2。

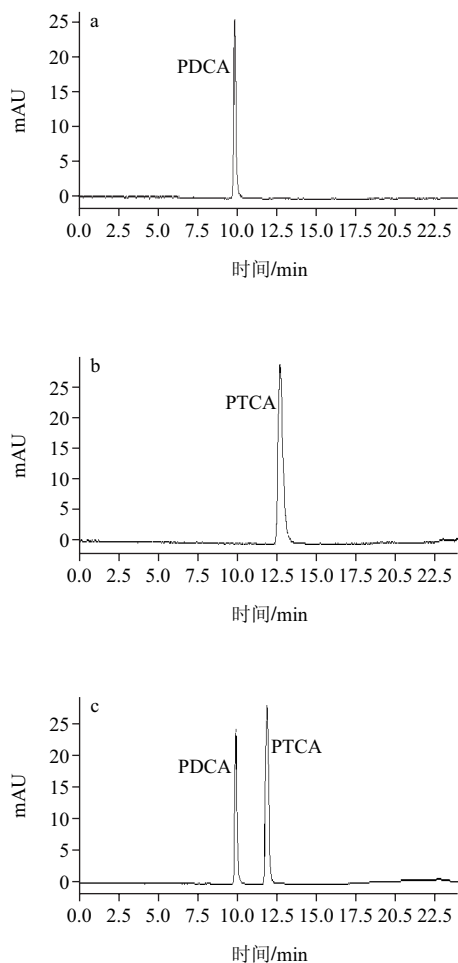


图1 标准品液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatogram of individual and mixed standards of PDCA and PTCA

2.2 PDCA及PTCA标准曲线

以峰面积为纵坐标, 对应质量浓度为横坐标, 绘制标准品PDCA及PTCA标准曲线。回归方程PDCA: $y=21.519x+2.8684$, $r=0.9996$, 线性范围: $0.5\sim15\mu\text{g/mL}$; PTCA: $y=64.428x-33.808$, $r=0.9994$, 线性范围: $1\sim50\mu\text{g/mL}$, 在线性范围内线性良好。

2.3 反应条件确定结果

2.3.1 H_2O_2 用量及氧化时间对PDCA和PTCA得率的影响

如图2所示, 随30% H_2O_2 溶液用量的增加, PDCA及PTCA得率随之增加, 当30% H_2O_2 溶液用量大于0.8mL时, PDCA及PTCA产率得最大, 并保持稳定, 故确定30% H_2O_2 溶液用量为0.8mL。如图3所示, 氧化反应时间为20min时, PDCA及PTCA产率最大, 且相对稳定, 氧化时间过长, 产物量减少, 可能由于产物结构遭到破坏, 故确定氧化时间为20min。

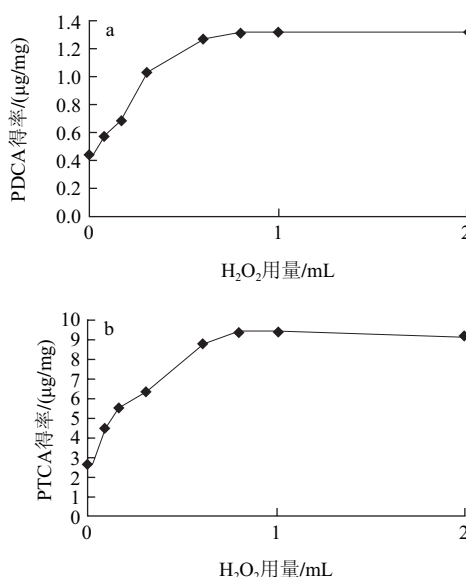


图2 H_2O_2 用量对PDCA和PTCA得率的影响

Fig.2 Effect of H_2O_2 dosage on PDCA and PTCA yield

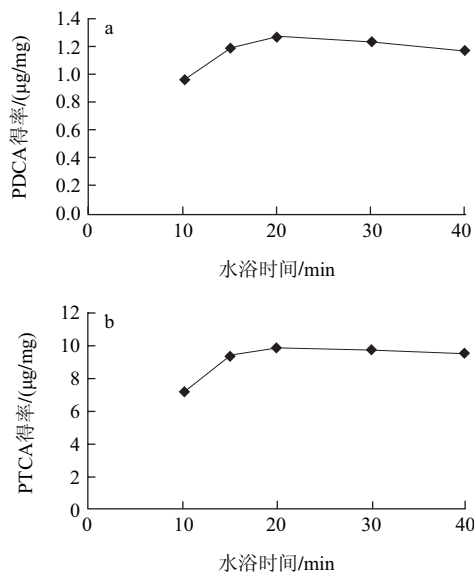


图3 氧化时间对PDCA和PTCA得率的影响

Fig.3 Effect of water bath (for oxidation) time on PDCA and PTCA yields

2.3.2 黑色素多次降解对PDCA和PTCA得率的影响

表1 黑色素降解次数对PDCA及PTCA得率的影响

Table 1 Effect of number of degradation cycles of melanin on PDCA and PTCA yields

降解次数	PDCA得率/($\mu\text{g}/\text{mg}$)	PTCA得率/($\mu\text{g}/\text{mg}$)
1	1.23	9.28
2	1.29	9.54
3	1.31	9.57

氧化降解两次或者3次相对于降解一次, 产物PDCA及PTCA得率变化均在10%以内; 氧化降解3次相对于降

解两次，产物PDCA及PTCA得率变化微弱，见表1，说明氧化降解一次即可使鱿鱼黑色素降解完全，故确定黑色素氧化降解次数为一次。

2.4 黑色素完全降解对应PDCA及PTCA得率

实验确定黑色素完全降解对应产物PDCA及PTCA的得率分别为1.272μg/mg和9.479μg/mg，见表2。

表 2 鱿鱼墨黑色素氧化降解后产物PDCA及PTCA得率

Table 2 PDCA and PTCA yields from squid melanin after oxidative degradation							
样品	1	2	3	4	5	6	平均值 RSD/%
PDCA得率/(μg/mg)	1.239	1.249	1.186	1.306	1.304	1.350	1.272 4.6
PTCA得率/(μg/mg)	9.300	9.313	9.008	9.647	9.483	10.124	9.479 4.01
比值	0.133	0.134	0.132	0.135	0.138	0.133	0.134 1.5

2.5 鱿鱼墨黑色素铁的定量分析

利用本实验建立的定量黑色素的方法对鱿鱼墨黑色素铁进行定量分析，计算黑色素铁中黑色素含量为40%左右，详见表3。结果表明，黑色素在螯合铁元素后其氧化降解过程及氧化产物的类型受到显著影响。

表 3 鱿鱼墨黑色素铁定量分析
Table 3 Quantitative analysis of squid melanin-Fe (III)

实验号	黑色素铁/mg	PDCA		PTCA	
		检出黑色素量/mg	含量/%	检出黑色素量/mg	含量/%
1	10.12	4.45	43.9	3.97	39.2
2	10.08	4.25	42.2	3.79	37.2
3	10.13	4.43	43.7	3.96	39.1
平均	10.11	4.36	43.2	3.91	38.6

2.6 鱿鱼墨黑色素铁除铁后的定量分析

鱿鱼墨黑色素铁经盐酸除铁后，利用本实验建立的定量黑色素的方法对黑色素铁进行定量分析，计算黑色素铁中黑色素含量升高至75%左右，脱除螯合铁对黑色素定量结果有大幅提高，详见表4。结果表明，单纯的脱铁仍然不能实现鱿鱼墨黑色素铁中黑色素的准确定量，有待进一步研究。

表 4 鱿鱼墨黑色素铁脱铁后定量分析

Table 4 Quantitative analysis of squid melanin-Fe (III) after expelling Fe					
实验号	黑色素铁/mg	PDCA		PTCA	
		检出黑色素量/mg	含量/%	检出黑色素量/mg	含量/%
1	10.23	8.01	78.29	7.68	75.05
2	10.03	7.79	76.15	7.30	72.78
3	10.06	7.88	78.33	7.45	74.07
平均	10.11	7.89	78.04	7.48	73.97

3 结 论

本实验建立基于黑色素的氧化降解产物PDCA和PTCA的鱿鱼墨黑色素HPLC定量分析方法，最终确定鱿鱼墨黑色素完全降解对应产物的得率，PDCA为1.272μg/mg，PTCA为9.479μg/mg。利用该法对鱿鱼墨黑色素铁的定量结果显示，黑色素螯合Fe(III)后氧化降解产物PDCA及PTCA的量相对于同等量的黑色素明显减少，仅为40%；对黑色素铁进行酸洗脱铁后，氧化降解产物中PDCA及PTCA的量有大幅度上升，但仅相当于同等量的黑色素的75%。黑色素在螯合铁元素后，其氧化降解过程及氧化产物的类型受到显著影响，普通的黑色素定量方法不适用于鱿鱼墨黑色素铁的定量分析。

参考文献：

[1] PEZZELLA A, ISCHIA M, NAPOLITANO A, et al. An integrated approach to the structure of sepi melanin: evidence for high proportion of degraded 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid units in the pigment backbone[J]. Tetrahedron, 1997, 53(24): 8281-8283.

[2] YAN L, 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.

[3] ITO S, JIMBOW K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas[J]. Investigative Dermatology, 1983, 80: 268-272.

[4] ITO S. Reexamination of the structure of eumelanin[J]. Biochimica et biophysica acta, 1986, 883(1): 155-161.

[5] SMIT N, Van NIEUWPOORT F, OUT C, et al. Measurement of eumelanin by detection of PDCA and PTCA after alkaline hydrogen peroxide degradation[J]. Pigment Cell Research, 2001, 14(5): 409.

[6] NAPOLITANO A, PERZZELLA A, VINCENSI M R, et al. Oxidative degradation of melanins to pyrrole acids: a model study[J]. Tetrahedron, 1995, 51(20): 5913-5920.

[7] BORGES C R, ROBERTSB J C, WILKINSA D G, et al. Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: application to human hair[J]. Analytical Biochemistry, 2001, 290(1): 116-125.

[8] 王鑫玉, 孙守荣, 周艳华, 等. 黑色素分析指标的研究进展及其应用[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(5): 31-34.

[9] BARBARA B S. On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interactions with Cu²⁺ ion[J]. Spectrochimica Acta A, 2001, 57(12): 2525-2533.

[10] 雷敏, 王玉明, 王静凤, 等. 鱿鱼墨黑色素铁对大鼠缺铁性贫血的治疗作用[J]. 中国医药大学学报, 2007, 38(6): 539-543.

[11] LIU Y, SIMON J D. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*[J]. Pigment Cell Res, 2003, 16(1): 72-80.

[12] KROL E S, LIEBLER D C. Photoprotective actions of natural of natural and synthetic melanins[J]. Chem Res Toxicol, 1998, 11(12): 1434-1440.

[13] 陈士国, 薛长湖, 薛勇, 等. 鱿鱼墨黑色素的自由基清除活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(1): 24-27.

[14] ITO S, FUJITA K. Microanalysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanoma as chemical degradation and liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1985, 144(2): 527-536.

[15] ITO S, WAKAMSTU K. Chemical degradation of melanins application to identification of dopa mine-melanin[J]. Pigment Cell Research, 1998, 11(2): 120-126.