

# 山杏种皮黑色素理化性质研究\*

姚增玉, 赵 忠, 李科友, 史清华, 马希汉, 朱海兰

(西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌, 712100)

**摘 要** 山杏种皮黑色素具有黑色素典型的性质。稳定性研究表明: 温度影响该黑色素的氧化还原状态, 但对溶液的颜色无显著影响;  $\text{pH} < 6$  时, 冷冻使黑色素沉淀; 光照使溶液褪色; 随  $\text{pH}$  升高, 溶液颜色略有加深;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  有一定的增色护色作用,  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、氨基酸、糖和淀粉对该黑色素无显著影响; 有机酸使溶液略有褪色。本研究尝试以吸光度的对数对波长的回归直线斜率作为衡量黑色素稳定性的指标, 该指标能够很好地反映出山杏种皮黑色素结构的变化。

**关键词** 山杏, 种皮, 黑色素, 提取, 理化性质

黑色素(melanin)是一类普遍存在于生物界结构复杂多样的酚类或吡咯类生物大分子色素的总称<sup>[1]</sup>。黑色素一般为黑色或棕色, 由于组成结构不同, 也存在少数红色、黄色、紫色、蓝色和绿色的黑色素<sup>[2]</sup>。它们是一类强抗氧化剂、自由基清除剂和金属离子螯合剂, 具有广谱的生物活性, 如抗蛇毒<sup>[3]</sup>、抗癌<sup>[4]</sup>、抑制 HIV<sup>[5]</sup>、免疫促进<sup>[6]</sup> 和治疗帕金森症<sup>[7]</sup> 等。本试验首次从山杏(*Prunus armeniaca* var. *ansu*)种皮中提取获得了黑色素, 旨在研究山杏种皮黑色素作为天然食用色素的稳定性, 为进一步开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

去壳杏仁, 购自陕西省麟游县, 带回实验室用热烫法剥取种皮, 种皮用自来水冲洗干净, 摊放在室内自然干燥后揉碎, 室温下保存备用。

Folin-Ciocalteu 试剂, 购自 Sigma 公司(USA); 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 山杏种皮黑色素的制备

称取 5.0 g 山杏种皮, 放入 150 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 去离子水煮沸 15 min 后过滤。向滤渣中加入 0.5 mol/L NaOH 溶液 75 mL, 在  $\text{N}_2$  的保护下 60 ℃ 水浴中提取 2 次, 每次 12 h。提出液用棉布粗滤、离心, HCl 酸化后得到的黑色素沉淀用 7 mol/L HCl 溶液 100 ℃ 水解 2 h, 离心, 再依次用乙醇、乙酸乙酯、丙酮洗涤, 所得黑色素颗粒用 0.5 mol/L NaOH 水溶液超声辅助溶解, 离心, 酸化使之沉淀,

如此反复沉淀 4 次, 得到的凝胶状黑色素放入 -5 ℃ 的冰箱中使之冻结, 然后室温下解冻, 得到的颗粒状山杏种皮黑色素, 用蒸馏洗涤至离心上清液  $\text{Cl}^-$  定性检测为阴性, 最后真空干燥。

用于分析的山杏种皮黑色素溶液参照 Sava 等人的方法配制<sup>[8]</sup>。用少量质量分数 0.2%  $\text{NH}_4\text{OH}$  将黑色素在  $\text{N}_2$  的保护下超声辅助溶解, 用旋转蒸发仪减压抽去氨气, 直至  $\text{pH}$  值达 7.5。最后用去离子水定容配制成所需浓度的溶液。

### 1.3 总多酚含量的测定

总多酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 法<sup>[9]</sup>。其值用没食子酸当量(Gallic Acid Equivalents)表示(GAE mg/g)。

### 1.4 黑色素的理化化学性质

#### 1.4.1 黑色素的紫外-可见光吸收光谱

黑色素溶液浓度为 27 mg/L。试验中所有紫外-可见光光谱和吸光度均用 mini-1240 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)测定。

#### 1.4.2 溶解性

溶解性的测定参照 Wang 等人的方法<sup>[10]</sup>, 并略有改动。0.1 g 山杏种皮黑色素加入 10 mL 蒸馏水、HCl、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、NaOH、 $\text{NH}_4\text{OH}$  溶液, 甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷、乙醚、石油醚、苯、正己烷、乙酸等有机溶剂, 室温下搅拌 1 h, 过滤, 测定滤液在 200 nm 的吸光度。

#### 1.4.3 温度对山杏种皮黑色素稳定性的影响

22 mg/L 山杏种皮黑色素溶液分别在 25、60、80 和 100 ℃ 水浴中处理 2.5 h 后立即在冰浴中冷却, 然后对其进行扫描, 并测定总多酚的含量。

#### 1.4.4 冷冻对山杏种皮黑色素稳定性的影响

将 22 mg/L 山杏种皮黑色素溶液用 NaOH 或

\* 第一作者: 博士研究生(赵忠为通讯作者)。

\* 国家林业局“948”项目(2004-4-52), 本研究在国家林业局黄土高原林木培育重点开放实验室完成

收稿日期: 2007-01-25, 改回日期 2007-05-23

HCl 调至不同的 pH 值(4~9),放入-5℃冰箱冷冻 2 h,在室温下解冻后放入 60℃水浴中保温 30 min,然后 15 000 g 离心 30 min。测定上清液 200 nm 处的吸光度。对照以 4℃冷藏代替冷冻,其他处理方法相同。

#### 1.4.5 pH 对山杏种皮黑色素稳定性的影响

将 22 mg/L 山杏种皮黑色素溶液用 NaOH 或 HCl 调至不同的 pH 值(4~12),然后对其进行扫描。

#### 1.4.6 光照对山杏种皮黑色素稳定性的影响

将 22 mg/L 山杏种皮黑色素溶液于室内自然光照或置于距 20 W 紫外灯管(紫晶特种光源有限公司,中国天津)30 cm 处进行照射,每隔一段时间对其进行扫描。

#### 1.4.7 氧化剂对山杏种皮黑色素稳定性的影响

参照 Harki 等人的方法<sup>[11]</sup>并略有改动。10 mL 66 mg/L 山杏种皮黑色素溶液分别与 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%)、NaClO(3.5% 活性 Cl)、KMnO<sub>4</sub>(100 mg/L)和 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>(100 mg/L)溶液混合,观察混合溶液颜色的变化。

#### 1.4.8 还原剂对山杏种皮黑色素稳定性的影响

10 mL 22 mg/L 山杏种皮黑色素溶液与 1 mL 200 mg/L Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 混合后每隔一定时间对其进行扫描。

#### 1.4.9 金属离子对山杏种皮黑色素稳定性的影响

10 mL 22 mg/L 山杏种皮黑色素溶液分别与 1 mL 15 mg/L CuSO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub>、AlCl<sub>3</sub>和 ZnCl<sub>2</sub>混合,2 h 后对其进行扫描。

#### 1.4.10 糖、氨基酸、有机酸和淀粉对山杏种皮黑色素稳定性的影响

10 mL 22 mg/L 山杏种皮黑色素溶液分别与 1 mL 0.5 g/L 糖(葡萄糖和蔗糖)、氨基酸(L-赖氨酸)、有机酸(柠檬酸和酒石酸)和可溶性淀粉混合,2 h 后对其进行扫描。

### 1.5 统计分析

每一个处理独立重复 3 次。所有实验数据均使用 SAS v 8.1 (USA) 进行分析。显著水平设  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外-可见光谱

山杏种皮黑色素的紫外-可见光谱(200~800 nm)是 1 条随波长增加吸光度呈指数式减小的曲线,在整个扫描范围内没有明显的吸收峰(图 1)。吸光

度的对数对波长回归所得直线斜率为-0.003 9。据报道,该回归直线斜率与黑色素的氧化程度有关,新鲜配制的合成 DOPA 黑色素和 *Tuber melanosporum* 黑色素的斜率分别为-0.001 8 和-0.001 3,其碱溶液在室温下放置 48 h 后,由于氧化,斜率分别变为-0.003 3 和-0.002 2<sup>[11]</sup>。本研究中,所有的处理均未改变紫外-可见光吸收光谱的形状,回归 R<sup>2</sup> 值均在 0.985 以上,因此文中首次尝试将这一斜率作为衡量黑色素稳定性的指标,用于以下试验的分析。

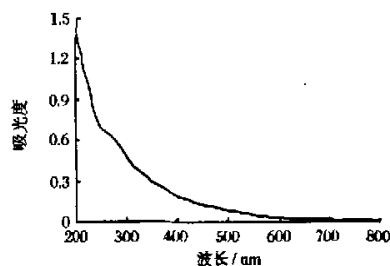


图 1 山杏种皮黑色素的紫外-可见光谱

### 2.2 溶解性

山杏种皮黑色素与前人<sup>[5,10]</sup>报道的其他植物黑色素以及人工合成多巴黑色素一样,不溶于水和乙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿、苯、正己烷等常见的有机溶剂,溶于碱溶液。

### 2.3 温度对山杏种皮黑色素的影响

以 25~100℃对山杏种皮黑色素溶液处理 2.5 h 后,溶液的颜色无明显变化,仍为棕色,200 nm 处的吸光度也没有显著变化(表 1),但经过 100℃热处理以后总多酚含量降低,回归直线斜率增大,因此,温度影响该黑色素的氧化程度,但其溶液的颜色对温度比较稳定。

表 1 山杏种皮黑色素的热稳定性

温度/℃	斜率	吸光度(A <sub>200</sub> )	总多酚含量(GAE)/mg·g <sup>-1</sup>
25	-0.004 10 <sup>a</sup>	1.078	262.20 <sup>a</sup>
60	-0.004 07 <sup>a</sup>	1.088	261.72 <sup>a</sup>
80	-0.004 03 <sup>a</sup>	1.089	262.19 <sup>a</sup>
100	-0.003 90 <sup>b</sup>	1.068	221.21 <sup>b</sup>
CK	-0.004 10 <sup>a</sup>	1.070	260.77 <sup>a</sup>

注:标有同一字母者为邓肯氏检验无显著差异。

### 2.4 冷冻对山杏种皮黑色素的影响

冷冻对山杏种皮黑色素的影响因溶液的 pH 而异,pH<6 时,解冻后黑色素发生沉淀,而且 pH 越低沉淀越多,pH≥6 时,并不发生沉淀,吸光度也与对照无显著差异(见表 2)。

表2 离心上清液 200 nm 处的吸光度

pH	CK	冷冻 <sup>1)</sup>	pH	CK	冷冻
4	0.887	0.465 * s	7	0.918	0.916
5	0.896	0.787 * s	8	0.922	0.923
6	0.904	0.899	9	0.932	0.931

注:1) \*, t 检验与对照有显著差异; s, 发生沉淀。

## 2.5 pH 对山杏种皮黑色素的影响

随着 pH 的增大,山杏种皮黑色素溶液颜色略有加深,吸光度和回归直线斜率都随着 pH 值的增大而增大(见图 2)。

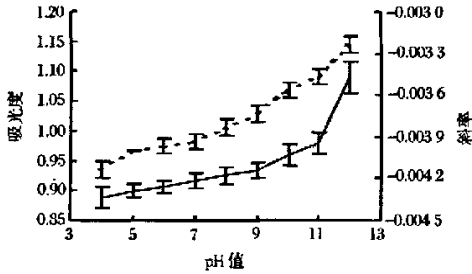


图2 pH 对吸光度(实线)和斜率(虚线)的影响  
误差线为标准差,下同。

## 2.6 光照对山杏种皮黑色素的影响

由图 3 和图 4 可以看出,紫外光和自然光都能使山杏种皮黑色素溶液发生褪色。经过紫外光 6 h 或自然光 5 d 的照射,溶液的吸光度和回归直线斜率显著下降 ( $P < 0.01$ )。

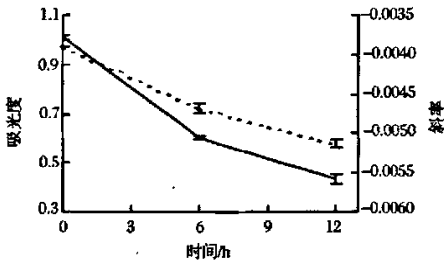
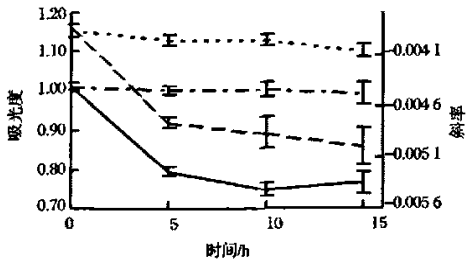


图3 紫外光对吸光度(实线)和斜率(虚线)的影响



.....对照斜率; —光照后斜率; — — — — — 对照吸光度; —光照后吸光度。

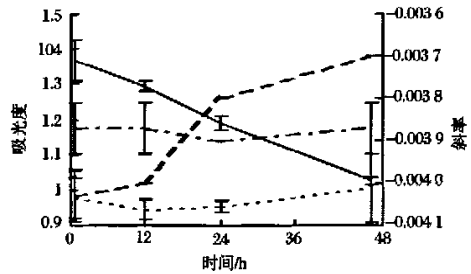
图4 自然光对吸光度和斜率的影响

## 2.7 氧化剂对山杏种皮黑色素的影响

与以往报道的天然黑色素的性质相同<sup>[12~14]</sup>,山杏种皮黑色素可被强氧化剂  $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、 $\text{NaClO}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  漂白。当加入  $\text{KMnO}_4$  后,首先形成沉淀,而后溶液褪色。

## 2.8 还原剂对山杏种皮黑色素的影响

与对照相比,加入  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  后混合液的吸光度增大,但随着时间的延续吸光度逐渐降低(见图 5),48 h 后接近于对照,而回归直线斜率变化趋势正好与吸光度相反,首先减小,以后逐渐增大。因此,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  在短期内有增色护色作用。



.....对照吸光度; —加入  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  后吸光度;  
— — — — — 对照斜率; —加入  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  后斜率

图5 还原剂对吸光度斜率的影响

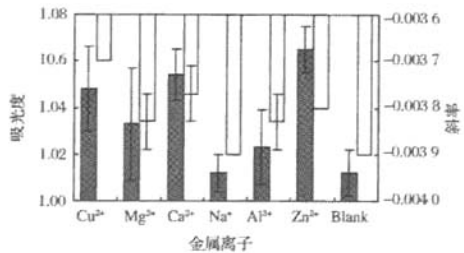


图6 金属离子对吸光度(灰色柱)和斜率(白色柱)的影响

## 2.9 金属离子对山杏种皮黑色素的影响

如图 6 所示,当加入  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  后溶液的吸光度和回归直线的斜率均显著增大,因此  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对山杏种皮黑色素具有增色护色作用,加入  $\text{Al}^{3+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  后吸光度和回归直线斜率也略有增大,但不显著,加入  $\text{Na}^+$  对吸光度和回归直线斜率均无显著影响。黑色素是一种络合剂,这些现象可能与络合有关。加入  $\text{FeCl}_3$  后产生沉淀,加入  $\text{FeSO}_4/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  后反应形成蓝色,预示着酚结构的存在。

## 2.10 氨基酸、有机酸、糖和淀粉对山杏种皮黑色素的影响

为了避免加入的有机物对吸收光谱的直接影响,只采用 400~800 nm 的吸光度来计算回归直线的斜率,用 400 nm 处的吸光度进行分析,实验结果如图 7。氨基酸、糖和淀粉对山杏种皮黑色素没有显著影响。有机酸使吸光度和回归直线斜率均显著降低,这与 pH 对山杏种皮黑色素的影响相似,因此可能是  $H^+$  影响的结果,而非有机酸根离子的效应。

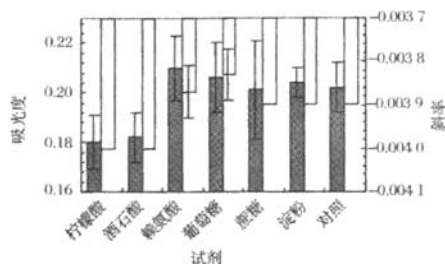


图 7 氨基酸、有机酸、糖和淀粉对吸光度(灰色柱)和斜率的影响

### 3 结论与讨论

黑色素结构仍然是未知的,因此无法从结构上给出一个严格的定义。鉴定黑色素的一般标准包括通常不溶于水和常见的有机溶剂,可被氧化剂漂白,多酚定性反应呈阳性和具有稳定的自由基。山杏种皮黑色素具有黑色素典型的性质:不溶于水和常见的有机溶剂,溶于碱溶液, pH 值 < 3 时发生沉淀,可被  $KMnO_4$ 、 $K_2Cr_2O_7$ 、 $NaClO$  和  $H_2O_2$  氧化漂白,多酚定性反应呈阳性。笔者还研究证实,山杏种皮黑色素同样具有稳定的自由基,该部分内容将在笔者别的文章中报道。

温度影响山杏种皮黑色素的氧化程度,但其溶液的颜色对温度比较稳定。冷冻对山杏种皮黑色素的影响因溶液的 pH 而异, pH < 6 时,解冻后,黑色素发生沉淀, pH ≥ 6 时,冻结没有显著影响。紫外光和自然光都使山杏种皮黑色素褪色。山杏种皮黑色素溶液色泽在较宽的 pH 范围内较为稳定,但随 pH 的增大颜色略有加深。 $Na_2SO_3$  在短期内有增色护色作用。 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  具有增色护色作用,  $Al^{3+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Na^+$ 、氨基酸、糖和淀粉对山杏种皮黑色素无显著影响。加入有机酸后,溶液略有褪色。

有关黑色素稳定性的研究报告非常有限,山杏种皮黑色素在对紫外光、可见光、还原剂以及有机酸等的稳定性方面与桂花种子黑色素<sup>[10]</sup>并不一致,反映了它们在结构和类型上的差异。

在以往的报道中,将吸光度的对数对波长的回归直线的斜率当作黑色素的特征性参数用于表征黑色素<sup>[13, 15]</sup>。Harki 等人研究发现,这一斜率随黑色素的氧化程度不同而发生变化<sup>[11]</sup>。本研究中,所有的处理都未改变紫外-可见光吸收光谱的形状,回归  $R^2$  值均在 0.985 以上,因此我们首次尝试将这一斜率作为衡量黑色素稳定性的指标,结果表明,这一斜率不仅因黑色素氧化还原状态而异,还受溶液 pH 值、金属离子、光照、温度和其它一些因素的影响,可以反映黑色素内部结构的变化,而且与吸光度相比,有时还具有一定的优点,比如在本研究中经过 100℃ 的热处理,黑色素总多酚含量降低,氧化程度增大,这一变化并不能被吸光度反映出来,但回归直线斜率的变化预示着黑色素已经发生了结构上的变化。

总的来说,山杏种皮黑色素有望成为一种新型的天然色素,但是由于其在一些方面不甚稳定,加工、运输、储藏过程中应蔽光,尽量避免高温和冷冻,避免使用金属容器并控制好 pH 值范围等。

### 参考文献

- Butler M J, Day A W. Fungal melanins: a review [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(12): 1 115~1 136
- Wheeler M H, Bell A A. Melanins and their importance in pathogenic fungi[J]. Current Topics in Medical Mycology, 1988, 2: 338~387
- Hung Y C, Sava V, Hong M Y, et al. Inhibitory effects on phospholipase  $A_2$  and antivenin activity of melanin extracted from *Thea sinensis* Linn. [J]. Life Sciences, 2004, 74(16): 2037~2047
- El-Obeid A, Al-Harbi S, Al-Jomah N, et al. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production [J]. Phytomedicine, 2006, 13(5): 324~333
- Kerestes J J R, Kerestes J, Venger L A. Biologically active fraction of vegetable melanin, process for its production and its use [P]. USA, 6576268. 2003
- Sava V M, Galkin B N, Hong M Y, et al. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity [J]. Food Research International, 2001, 34(4): 337~343
- Berliner, David L, Erwin, et al. Methods of treating Parkinson's disease using melanin [P]. USA, 5210076. 1993
- Sava V M, Galkin B N, Hong M Y, et al. A novel mela-

- nin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity [J]. Food Research International, 2001, 34(4):337~343
- 9 Spanos G A, Wrolstad R E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38: 1 565~1 571
  - 10 Wang H S, Pan Y M, Tang X J, et al. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans* seeds [J]. LWT - Food Science and Technology, 2006, 39(5), 496~502
  - 11 Harki E, Talou T, Dargent R. Purification, characterization and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. [J]. Food Chemistry, 1997, 58, (1~2), 69~73
  - 12 Aghajanyan A E, Hambarzumyan A A, Hovsepyan A S, et al. Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin [J]. Pigment Cell Research, 2005, 18(2):130~135
  - 13 Escarpa A, Gonzalez M C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods [J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 427:119~127
  - 14 Paim S, Linhares L F, Magrich A, et al. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy [J]. Biology and Fertility of Soils, 1990, 10, 72~76
  - 15 Charles E, Turick F Caccavo J R, et al. Electron transfer from *Shewanella algae* BrY to hydrous ferric oxide is mediated by cell-associated melanin [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 220, 99~104

### Physicochemical Properties of Melanin from *Prunus armeniaca* var. *ansu*

Yao Zengyu, Zhao Zhong, Li Keyou, Shi Qinghu, Ma Xihan, Zhu Hailan

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**ABSTRACT** The melanin from *Prunus armeniaca* var. *ansu* exhibited typical physicochemical properties of melanin. The stability experiment showed that: Temperature affected the total phenolic content but did not change the color of the melanin solution. When frozen at pH < 6, the pigment precipitated; ultraviolet and natural light had discoloration effect; with PH increased, it became more dark;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  had the function of color increase or color preservation.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Na}^+$ , glucose, amino acid, sugar and starch did not affect the melanin, while pH, organic acid and reducer affected it slightly. Moreover, the slope of the log absorbance versus wavelength was employed as a parameter to evaluate melanin stability and the change of the slope could reflect the alteration in structure of the melanin.

**Keywords** melanin, physicochemical properties, *Prunus armeniaca* var. *ansu*, testa, stability

(上接第 36 页)

### Immobilization of Cyclodextrin Glycosyl Transferase in Sodium Alginate

Guo Yan, Wang Weiwei, Guo Liwei, Xiao Liming

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**ABSTRACT** The optimum conditions for immobilizing CGTase with sodium alginate and the properties of the immobilized enzyme were studied by the single factor and orthogonal design. The results showed that the high recovery rate of the immobilized enzyme could be obtained under the conditions of 7% sodium alginate, 3%  $\text{CaCl}_2$ , the ratio of sodium alginate and enzyme 1 : 2, 2.5 h immobilization time. The optimum pH and temperature of the immobilized enzyme were as the same as free enzyme. It also showed a wider range of reaction pH value and temperature value than free enzyme. The immobilized enzyme showed a high operational stability by retaining almost 75% of the initial activity at seventh round.

**Key words** sodium alginate, immobilization, CGTase