

文章编号:1673-1689(2009)02-0145-05

泰和乌骨鸡黑色素的体外抗氧化作用

涂勇刚, 孙亚真, 田颖刚, 杨美艳, 谢明勇*

(食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047)

摘要: 采用分光光度法测定磷钼酸配合物、自由基和丙二醛(MDA)的含量,用于研究酶法提取的泰和乌骨鸡黑色素的总抗氧化能力及其清除自由基和抗脂质过氧化的作用,研究过程中用合成黑色素与之进行比较。结果表明:泰和乌骨鸡黑色素清除羟基自由基的能力虽然低于合成黑色素,但其总抗氧化能力与合成黑色素相当,而清除 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的能力以及抗脂质过氧化作用都优于合成黑色素,说明泰和乌骨鸡黑色素具有明显的体外抗氧化功能。

关键词: 泰和乌骨鸡;黑色素;清除自由基;抗脂质过氧化;抗氧化作用

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

The Antioxidant Activity of Melanin from Taihe Black-Bone Silky Fowl *in vitro*

TU Yong-gang, SUN Ya-zhen, TIAN Ying-gang, YANG Mei-yan, XIE Ming-yong*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The antioxidant activity of melanin from Taihe Black-bone Silky Fowl (TBSF) *in vitro* was studied. Total antioxidant activity, radical scavenging activity and inhibition of lipid peroxidation were evaluated by the content of phosphomolybdenum complex, radical and malondialdehyde (MDA) observed in the spectrophotometric method. Those various antioxidant activities were compared to the synthetical melanin. It was found that the ability of TBSF melanin on scavenging hydroxide free radicals was weaker than that of the synthetical melanin and total antioxidant activity were quite close for both pigments, but superoxide radical scavenging activity, DPPH radical scavenging activity and prevention of lipid peroxidation of TBSF melanin were all superior than that of the synthetic melanin. The results demonstrated that TBSF melanin has stronger antioxidant effects *in vitro*.

Key words: Taihe black-bone silky fowl, melanin, radical scavenging activity, inhibition of lipid peroxidation, antioxidant activity

黑色素(melanin)广泛存在于动物、植物和微生物中,是由吡啶类物质或多酚类物质氧化聚合而成

收稿日期:2008-04-03

基金项目:教育部“长江学者和创新团队发展计划资助”项目(IRT0540);江西省农业科技攻关重点项目(2005);江西省研究生创新基金项目(YC07A034)。

作者简介:涂勇刚(1979-),男,江西南昌人,食品科学博士研究生。

*通讯作者:谢明勇(1957-),男,江西宜春人,博士,教授,博士生导师,主要从事天然产物的研究与开发。Email: myxie@ncu.edu.cn

的一类复杂生物多聚体^[1]。黑色素一般可分为 3 类:真黑色素(eumelanin, 不含硫原子, 呈棕色或黑色)、脱黑色素(pheomelanin, 含硫原子, 呈黄色或微红棕色)、异黑色素(allomelanin, 呈棕色或黑色, 主要存在于植物中)^[2]。天然黑色素除了具有结构保护、调节体温等生物学功能外, 还被证明具有光保护、抗脂质过氧化、清除自由基和提高免疫等多种生物活性作用^[3-5]。

泰和乌骨鸡是江西特有物种资源, 它既是一种营养丰富的滋补食品, 又是我国特有药用鸡种。作者通过对泰和乌骨鸡营养和活性成分及功效的系统研究, 发现泰和乌骨鸡具有低脂肪、高磷脂含量及多不饱和脂肪酸、必需脂肪酸和花生四烯酸在脂肪酸组成中比例较高等特点^[6-7]。作者还发现其总脂质具有明确的补血作用^[8], 鉴定出其高含量肌肽的存在^[9]。上述工作为阐明乌骨鸡独特的滋补作用进行了有益的探索。乌骨鸡区别于其他品种鸡的显著特征就是其体内富含黑色素, 目前已有泰和乌骨鸡黑色素(TBSF melanin)抗氧化作用的报道^[10], 但只考察了个别体系, 也未选择合适的对照物, 很难准确反映其抗氧化作用的程度。因此, 作者以抗氧化活性较佳的合成黑色素为对照, 系统考察了泰和乌骨鸡黑色素的总抗氧化能力及其清除自由基和抗脂质过氧化的作用, 以便为其独特的结构与活性功能研究进一步提供理论依据与实验基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器

紫外-可见分光光度计 UV2800; 上海尤尼柯公司产品; 电子天平: FA1104; 上海天平仪器厂产品; 离心机 TDL-5-A; 上海安亭科学仪器厂公司产品; 恒温水浴锅 HH-4; 国华电器有限公司公司产品; AL-PHA1-2 冷冻干燥机; 德国 Martin Christ 公司产品。

1.2 试验材料

合成黑色素、1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); Sigma 公司产品; 硫代巴比妥酸(TBA)、邻菲罗啉等均为国产分析纯或普通生化试剂; 泰和乌骨鸡黑色素: 作者所在本实验室自行制备。

1.2.1 总抗氧化能力的测定 参考 Pilar 等人的方法^[11], 略有改进。在 10 mL 具塞刻度比色管中加入 1 mL 质量浓度分别为 0.10、0.25、0.50、1.00 g/L 的泰和乌骨鸡黑色素或合成黑色素溶液、1 mL 3 mol/L H₂SO₄ 溶液、1 mL 0.028 mol/L Na₃PO₄ 溶液和 1 mL 0.004 mol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 溶液, 加入蒸馏水定容至 5.0 mL, 摇匀, 置 95 °C 水浴中加热

反应, 每 30 min 取出冷至室温, 以不加抗氧化剂体系为空白参比, 测定 695 nm 波长下的吸光度。

1.2.2 超氧阴离子自由基(·O₂⁻)清除能力试验

10 mL 比色管按表 1 加入各溶液, 泰和乌骨鸡黑色素或合成黑色素溶液的质量浓度分别为 0.10、0.25、0.50、1.00 g/L, 空白组中用 1 mL 去离子水代替样品溶液, 混匀后将对照管置暗处, 其它各管室温条件下置于 30 W 日光灯下(距桌面高 15 cm)反应 20 min, 于 560 nm 比色测定, 计算清除率(%)^[12]。

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

式中: A₁ 为空白组吸光度; A₂ 为样品组吸光度; A₀ 为对照组吸光度。

表 1 各溶液加入量

Tab. 1 The addition of solution

试剂	用量/ mL	终浓度(比色时)/ (μmol/L)
0.05 mol/L 磷酸缓冲液	1.5	
130 mmol/L Met 溶液	0.3	13 000
750 μmol/L NBT 溶液	0.3	75
100 μmol/L EDTA-Na ₂ 液	0.3	10
20 μmol/L 核黄素	0.3	2.0
黑色素溶液	0.05	空白和对照管 加缓冲液代替
蒸馏水	0.25	
总体积	3.0	

1.2.3 羟基自由基(·OH)清除能力试验 参考文献[13]的方法, 略作改进; 试验设样品组、空白组和对照组。样品组试管中依次加入 PBS 缓冲液(pH 7.4, 0.4 mol/L)、邻菲罗啉溶液(2.5 mmol/L)、样品溶液、硫酸亚铁溶液(2.5 mmol/L)各 1 mL, H₂O₂ 溶液(20 mmol/L)0.5 mL; 空白组中用 1 mL 去离子水代替样品溶液; 对照组中用 1.5 mL 去离子水代替样品溶液和 H₂O₂ 溶液。反应在 37 °C 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。

按下式计算样品对羟基自由基的清除率:

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

式中: A₁ 为空白组吸光度; A₂ 为样品组吸光度; A₀ 为对照组吸光度。

1.2.4 DPPH 自由基清除能力试验 参考文献[14]的方法, 将实验分为样品组、对照组和空白组。具体操作如下: 3 mL DPPH 有机溶液(0.1 mmol/L, 无水乙醇配制)加入 10 mL 具塞试管中, 再加入 0.5 mL 样品溶液, 然后加入 1 mL 水充分混匀, 静置 30 min 后在 517 nm 处测定吸光度。清除率计

算公式如下:

$$\text{清除率} = [1 - (A_2 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

式中: A_2 为 3 mL DPPH+0.5 mL 样品溶液+1 mL 水的吸光度; A_1 为 3 mL 乙醇+0.5 mL 样品溶液+1 mL 水的吸光度; A_0 为 3 mL 乙醇+1.5 mL 水的吸光度。

1.2.5 抗脂质过氧化试验 参考文献[15]的方法,新鲜蛋黄加入等体积的磷酸盐缓冲液(pH 7.4),磁力搅拌 10 min 后,加入磷酸盐缓冲液稀释成体积比为 1:25 的蛋黄悬液。将 1 mL 蛋黄悬液,0.5 mL 样品溶液,1 mL 磷酸盐缓冲液和 1 mL FeSO_4 (25 mmol/L)溶液分别加入 10 mL 具塞管中,37℃保温震荡 15 min;然后加入 1 mL 质量分数 2.5% 的三氯乙酸溶液,混合均匀后在 4 800 r/min 转速下离心 15 min;取上清液 3 mL 加入 2 mL 硫代巴比妥酸,混匀后的沸水浴中加热 10 min;冷却后在 532 nm 处测定吸光度。空白组中不加样品,而用等量的样品溶剂代替。然后按下式计算样品对脂质过氧化的抑制能力。

$$\text{抑制率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 为空白吸光度; A_1 为样品吸光度。

1.2.6 统计分析 每组数据均重复测定 3 次,所得试验数据采用 SPSS11.5 统计软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 总抗氧化能力

通过比较不同质量浓度的泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素与磷酸钼反应后的吸光度大小来评价其总抗氧化能力大小。吸光度越大则说明还原能力越强,抗氧化性也越强。图 1 是泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素的总抗氧化力测定结果,从图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,在相同质量浓度下,泰和乌骨鸡黑色素与合成黑色素相比差异性都不显著($P > 0.05$),表明泰和乌骨鸡黑色素的总抗氧化能力与合成黑色素相当。

2.2 清除超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)能力

图 2 是泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素清除超氧阴离子自由基能力试验结果,在质量浓度为 100,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 情况下,泰和乌骨鸡黑色素的清除超氧阴离子自由基能力大于合成黑色素($P < 0.05$),而在其它高浓度情况下两者相比差异不显著($P > 0.05$)。乌骨鸡黑色素清除超氧阴离子自由基的半抑制质量浓度($1\ 878.48 \pm 90.86$) $\mu\text{g}/\text{mL}$,

略低于合成黑色素的($2\ 043.74 \pm 67.91$) $\mu\text{g}/\text{mL}$,结果表明乌骨鸡黑色素清除超氧阴离子自由基的能力略高于合成黑色素。

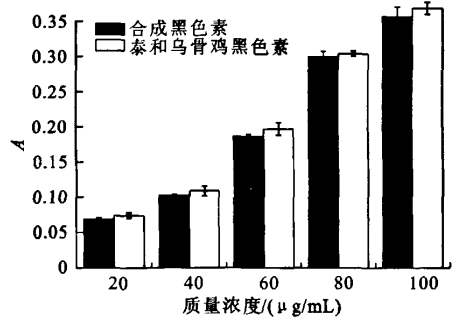


图 1 泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素总抗氧化能力
Fig. 1 Total antioxidant activity of Taihe Black-Bone silky fowl melanin and synthetic melanin

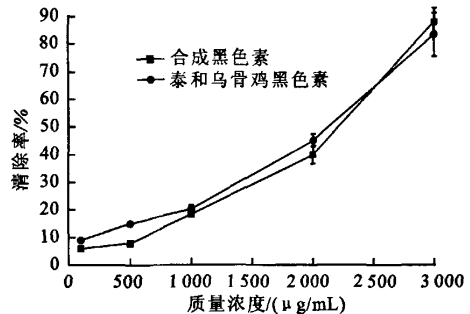


图 2 泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素清除超氧阴离子自由基能力
Fig. 2 Superoxide radical scavenging activity of TBSF melanin and synthetic melanin

2.3 清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)能力

由图 3 可以看出,样品在试验剂量下对体系产生的羟基自由基均有清除作用,清除率与样品质量浓度有一定的量效关系。在质量浓度为 1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素的清除率分别为(24.68 ± 3.05)%、(34.05 ± 3.61)%和(42.54 ± 3.34)%、(48.76 ± 2.81)%,前者明显低于后者($P < 0.05$)。结果表明泰和乌骨鸡黑色素清除羟基自由基的能力低于合成黑色素。

2.4 清除 DPPH 自由基能力

按 1.2.4 所述方法,分别研究了不同质量浓度的泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素对 DPPH 自由基的清除作用,结果见图 4。从图中可以看出随着质量浓度的增大,两种黑色素清除 DPPH 自由基能力也都增大,在质量浓度为 10 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的情况下,泰和乌骨鸡黑色素清除 DPPH 自由基的能力大于合成黑色素($P < 0.05$),而在质量浓度为 75,100,150 mg/mL 的情况下两者相比差异不显著($P >$

0.05)。泰和乌骨鸡黑色素清除 DPPH 自由基的半抑制质量浓度为 $(37.33 \pm 2.62) \mu\text{g/mL}$, 明显低于合成黑色素的半抑制率 $(49.22 \pm 2.48) \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$)。结果表明泰和乌骨鸡黑色素清除 DPPH 自由基的能力强于合成黑色素。

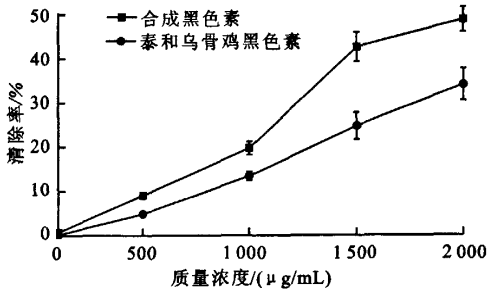


图3 泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素清除羟基自由基能力

Fig. 3 Hydroxide free radical scavenging activity of TBSF melanin and synthetic melanin

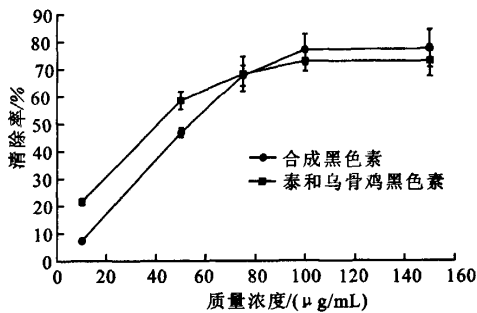


图4 泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素清除 DPPH 自由基能力

Fig. 4 DPPH radical scavenging activity of TBSF melanin and synthetic melanin

2.5 抑制脂质过氧化能力

引起机体脂质过氧化的因素很多,其中二价铁离子是生物体内最主要的脂质过氧化促进剂,故作者以二价铁离子为氧化促进剂,以软黄脂质体体系为模型,研究黑色素对脂质过氧化的抑制作用。图5是泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素对脂质过氧化抑制作用的结果,在质量浓度为 $100 \sim 2000 \mu\text{g/mL}$ 情况下,泰和乌骨鸡黑色素对脂质过氧化的抑制率为 $(28.31 \pm 0.87)\% \sim (75.30 \pm 5.19)\%$,合成黑色素则为 $(16.03 \pm 0.78)\% \sim (63.63 \pm 3.83)\%$,在同质量浓度情况下相比,前者明显高于后者 ($P < 0.05$)。以半抑制浓度相比较,泰和乌骨鸡黑色素的抗脂质过氧化的半抑制浓度 $(775.19 \pm 40.34) \mu\text{g/mL}$ 不到合成黑色素 $(1681.06 \pm 91.18) \mu\text{g/mL}$ 的二分之一。结果表明泰和乌骨鸡黑色素的抗脂质过氧化作用明显高于合成黑色素。

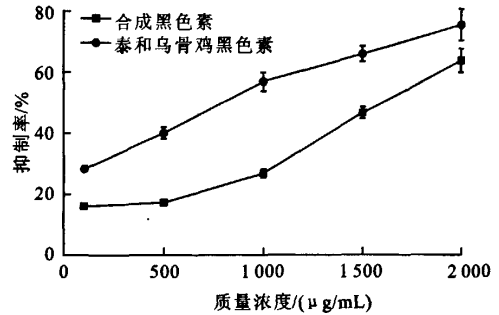


图5 泰和乌骨鸡黑色素和合成黑色素对脂质过氧化抑制作用

Fig. 5 Prevention of lipid peroxidation by TBSF melanin and synthetic melanin

3 讨论

自由基是人体组织中许多生化反应的中间代谢产物,正常情况下,机体存在着完善的自由基清除系统,使体内自由基的产生与清除处于动态平衡中。应激时,由于机体产生的自由基不能被及时清除,化学性质活泼的自由基与游离或结合状态的不饱和脂肪酸作用,不但改变膜的结构和功能,还诱发脂质过氧化反应产物增多。许多研究表明自由基是包括各种炎症,动脉粥样硬化、脑动脉痉挛、老年性痴呆等在内的多种疾病的重要诱因。寻找能够有效清除自由基和抗脂质过氧化功能且无毒副作用的天然抗氧化剂,预防和减轻上述疾病的发生和发展,是人类研究的重要课题之一。

合成黑色素是一种公认的活性较高的抗氧化剂,并与泰和乌骨鸡黑色素溶解性质相似,因此作者所有体系都以合成黑色素作为对照。结果表明泰和乌骨鸡黑色素清除羟基自由基的能力低于合成黑色素,总抗氧化力与合成黑色素相当,而清除 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的能力和抗脂质过氧化作用都优于合成黑色素。总体来说,泰和乌骨鸡黑色素的体外抗氧化作用强于合成黑色素。氨基酸分析表明泰和乌骨鸡黑色素中含有质量分数 25% 的蛋白质或残留多肽,黑色素蛋白质复合物或多肽复合物中的多肽可能是导致泰和乌骨鸡黑色素具有较强抗氧化活性的原因。此外,作者研究发现,与合成黑色素相比,泰和乌骨鸡黑色素含有更多含有羧基的单元结构,可以螯合更多的 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 等离子,这可能是泰和乌骨鸡黑色素抗脂质过氧化作用明显高于合成黑色素的原因之一。因此,泰和乌骨鸡黑色素的结构与抗氧化活性之间的关系还有待于进一步研究。

4 结 语

泰和乌骨鸡黑色素清除羟基自由基的能力虽然低于合成黑色素,但其总抗氧化能力与合成黑色

素相当,而清除DPPH自由基和超氧阴离子自由基的能力以及抗脂质过氧化作用都优于合成黑色素,说明泰和乌骨鸡黑色素具有明显的体外抗氧化功能,有望开发成为一种天然的抗氧化剂。

参考文献(References):

- [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, 16:606—618.
- [2] ITO S. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of eu- and pheomelanin in melanogenesis control[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1993, 100:166—171.
- [3] Wang Z, Dillon J, Gaillard E R. Antioxidant properties of melanin in retinal pigment epithelial cells[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2006, 82:474—479.
- [4] Sarna T, Menon I A, Sealy R C. Photosensitization of melanins; a comparative study[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1985, 42:529—532.
- [5] Sava V M, Galkin B N, Hong M Y, et al. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immune-stimulating activity[J]. *Food Research International*, 2001, 34:337—343.
- [6] 田颖刚, 谢明勇, 付志红, 等. 乌骨鸡脂肪油中脂肪酸组成的气相色谱-质谱分析[J]. 南昌大学学报:理科版, 2006, 31:264—267.
TIAN Ying-gang, XIE Ming-yong, FU Zhi-hong, et al. Analysis of fatty acids in oil extracted from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus brisson*) by GC-MS[J]. *Journal of Nanchang University: Natural Science*, 2006, 31:264—267. (in Chinese)
- [7] 田颖刚, 谢明勇, 吴红静, 等. 乌骨鸡与非药用鸡种鸡肉总脂质含量及脂肪酸组成的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26:29—32.
TIAN Ying-gang, XIE Ming-yong, WU Hong-jing, et al. Comparison of total lipid content and fatty acid composition of meat from black-bone silky fowl and other chickens[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26:29—32. (in Chinese)
- [8] 田颖刚, 谢明勇, 吴红静, 等. 乌骨鸡正己烷提取物补血作用研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23:48—50.
TIAN Ying-gang, XIE Ming-yong, WU Hong-jing, et al. Effects of hexane extract from Black-bone silky fowl on hematopoiesis[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2007, 23:48—50. (in Chinese)
- [9] Tian Y G, Xie M Y, Wang W Y, et al. Determination of carnosine in Black-Bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus Brisson*) and common chicken by HPLC[J]. *European Food Research and Technology*, 2007, 226: 311—314.
- [10] 蔡华珍, 陈守江, 张丽, 等. 乌骨鸡黑色素的酶法提取及其抗氧化作用的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32:99—102.
CAI Hua-zhen, CHEN Shou-jiang, ZHANG Li, et al. A Primary study on separating of melanin by enzymic Hydrolysis of protein and on antioxidization of the melanin in Taihe Silkies [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32:99—102. (in Chinese)
- [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]. *Analytical Biochemistry*, 1999, 269: 337—341.
- [12] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase; Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44:276—287.
- [13] 李发荣, 杨建雄, 沈小婷, 等. 桃叶珊瑚甙的体外抗氧化研究(英文)[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版, 2004, 32:98—102.
LI Fa-rong, YANG Jian-xiong, SHEN Xiao-ting, et al. Antioxidative activities of aucubin in vitro[J]. *Journal of Shanxi Normal University: Natural Science Edition*, 2004, 32:98—102. (in Chinese)
- [14] Chen Y, Xie M Y, Nie S P, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*[J]. *Food Chemistry*, 2008, 107 (1):231—241.
- [15] Dasgupta N, De B. Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract in vitro[J]. *Food Chemistry*, 2004, 88:219—224.

(责任编辑:朱明)