

不同精制方法对鱿鱼(*Ommastrephes bartrami*)墨黑色素微观形态、光谱特征及金属元素的影响*

宋茹¹ 李仁伟² 俞群娣¹ 邓尚贵¹

(1. 浙江海洋学院食品与药学学院 舟山 316000; 2. 浙江北极品水产有限公司 杭州 311215)

提要 采用扫描电镜、光谱分析和元素分析法,进行了胃蛋白酶水解法、高速离心法和酸水解法精制的鱿鱼墨黑色素颗粒形态、紫外可见光谱、红外光谱及金属元素含量的研究。结果表明,酸水解法破坏了鱿鱼墨黑色素的颗粒结构;三种不同精制方法所得的鱿鱼墨黑色素在 220nm 附近均有强吸收。胃蛋白酶水解和酸水解法有效切除黑色素的氨基基团,但酸水解法下鱿鱼墨黑色素吡啶类化合物的特征峰由 1399.64cm^{-1} 移至 1307.88cm^{-1} ;高速离心法精制的黑色素则在 2925.02cm^{-1} 和 2854.09cm^{-1} 有新吸收峰。不同精制方法对鱿鱼墨黑色素自身的不同金属元素含量具有降低和富集效应。

关键词 鱿鱼墨,黑色素精制,颗粒形态,光谱特征,金属元素分析

中图分类号 Q53

黑色素(Melanin)是分布最广的一类天然色素,广泛存在于细菌、真菌和动植物体内,鱿鱼墨黑色素是鱿鱼加工副产物墨囊的提取物,属于真黑色素类,是由酪氨酸经酪氨酸酶、酪氨酸酶 TRP-1 和酪氨酸酶 TRP-2 等系列酶的作用氧化形成的大分子聚合物(Magarelli *et al.*, 2010),除了具有强染色能力外,还具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、降血脂、脱除重金属等生理活性。

鱿鱼墨汁有机物质含量丰富,蛋白质含量达 67.2% (郑高利等, 2002)。高纯度黑色素的制备常常需要除去水溶性的蛋白及糖类杂质,目前,动物类天然黑色素纯化方法有化学法(酸水解和碱水解)(李兴旺等, 2001; Liu *et al.*, 2003b)、高速离心法(Birbeck *et al.*, 1956)及酶解法(阎克路等, 2001; Birbeck *et al.*, 1956; Novellino *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008),但是,不同精制方法对鱿鱼墨天然黑色素特性影响的研究还鲜见报道。本文采用胃蛋白酶水解法、高速离心法和酸水解法精制鱿鱼墨黑色素,运用扫描电镜技术、光谱分析法和金属元素分析法比较不同精制方法对鱿鱼墨黑色素形态结构、主要官能团及

金属元素的影响,旨在为鱿鱼墨黑色素结构对生物活性影响及在食品与药品方面的进一步开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

北太平洋鱿鱼(*Ommastrephes bartrami*)墨囊由舟山兴业有限公司提供, -20℃ 冻藏, 备用。

胃蛋白酶(BR)购于中国医药集团上海化学试剂公司; Cd、Cr、Pb、Fe、Zn、Sr 标准溶液(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 德国 Merck 公司, 用前逐级稀释; Hg、As 标准溶液(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 国家钢铁材料测试中心, 用前逐级稀释; HNO_3 为优级纯, 实验用水为高纯蒸馏水, 其余试剂均为分析纯级。

1.2 主要仪器与设备

S-3400N 型扫描电镜, 日本日立公司; TENSOR27 傅立叶变换红外光谱仪, 瑞士 BRUKER 公司; UV-2100 型紫外-可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; Prodigy 型电感耦合等离子体原子发射仪, 美国 Leeman 公司; Excel 型微波消解仪, 上海屹尧微波化学技术有限

* 浙江省水产品加工产业创新团队项目, 2011R09031-08 号; 浙江省自然科学基金项目, Y3110153 号; 浙江省优先主题重点项目, 2011C13027-2 号。宋茹, 博士, 讲师, E-mail: happysong545@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-23, 收修改稿日期: 2011-03-30

公司。

1.3 实验方法

1.3.1 鱿鱼墨黑色素精制 鱿鱼墨囊于 4℃ 下自然解冻, 手工剥去囊衣, 收集囊衣内黑色素, 分别采用胃蛋白酶水解法、高速离心法和酸水解法精制鱿鱼墨黑色素, 高速离心法参照文献(Liu *et al*, 2003b)进行, 胃蛋白酶水解法和酸水解法具体步骤如下:

胃蛋白酶水解法: 取一定鱿鱼墨, 按照 1 : 10 (W/V)比例加入去离子, 用 6mol/L 盐酸调节混合物 pH 至 1.5, 在 37℃ 水浴保温 10min 后, 根据鱿鱼墨质量按照 1.5% 比例加入胃蛋白酶, 37℃ 下水解 5h, 然后在 95—100℃ 沸水浴加热 5min, 7000 r/min 离心 15min, 弃去上清液, 沉淀反复用去离子水洗涤, 并离心至上清液基本无棕色, 收集沉淀备用。

酸水解法: 按照 1 : 10 (W/V)比例在鱿鱼墨中加入浓度为 1% 盐酸, 用玻璃棒搅拌 5min 后, 采用倾除法除去水溶性成分, 然后按照鱿鱼墨质量 1 : 40 (W/V)比例加入浓盐酸, 沸水浴加热 3h, 加热过程中不时用玻璃棒搅拌。加热结束后, 静置鱿鱼墨水解液, 倾除掉上清液, 沉淀物反复用去离子水洗涤至中性, 备用。

将未水解鱿鱼墨黑色素和胃蛋白酶水解法、高速离心法和酸水解法精制的鱿鱼墨黑色素沉淀物分别在 40℃ 下烘干, 得到黑色素粉末, 分别记作 STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4, 用于黑色素形态、光谱特征及金属元素测定实验。

1.3.2 鱿鱼墨黑色素微观形态观察 STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 颗粒分别镀金后, 采用扫描电镜观察鱿鱼墨黑色素微观形态。

1.3.3 鱿鱼墨黑色素紫外可见光谱 STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 分别用二甲基亚砜溶解, 稀释适当倍数, 200—700nm 进行紫外可见光谱扫描。

1.3.4 鱿鱼墨黑色素红外光谱 STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 分别与干燥的 KBr 按照 1 : 100 (W/W)比例混合, 研磨均匀, 压片, 测定鱿鱼墨黑色素在 400—4000 cm^{-1} 范围红外吸收光谱。

1.3.5 金属元素分析 在 STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 中各加入 3ml 浓 HNO_3 , 用微波消解装置程序升温消解至液体澄清, 分别定容到 25.00ml 容量瓶中。采用电感耦合等离子体原子发射仪测定各消化液中 Cd、Cr、Hg、As、Pb、Fe、Zn 和 Sr 元素含量, 测试条件如下: 功率 1.0kW, 冷却气流量: 20L/min, 辅助气流量: 0.3L/min; 雾化器压力: 0.2MPa; 样品提升量: 1.2ml/min, 积分时间 2s, 水平观测, 金属元素含

量以 $\mu\text{g/g}$ 计。

2 结果

2.1 鱿鱼墨黑色素微观形态比较

图 1 扫描电镜结果显示, 鱿鱼墨黑色素由大小较为均匀、边缘清晰的球状小颗粒组成, 颗粒间相互连接, 形成大小不等的聚合体(STPM1)。胃蛋白酶水解法和高速离心法精制的鱿鱼墨黑色素 STPM2 和 STPM3 也是由边缘清晰的球形颗粒构成, 且颗粒大小与 STPM1 一致, 但 STPM3 的颗粒结合程度比 STPM1 更为紧密。酸水解法制备的 STPM4 与 STPM1、STPM2、STPM3 的微观形态明显不同, 总体上看, 除了有零星球形颗粒存在外, STPM4 中的颗粒边界已模糊不清, 且有大量凹沟和凹洞形成。

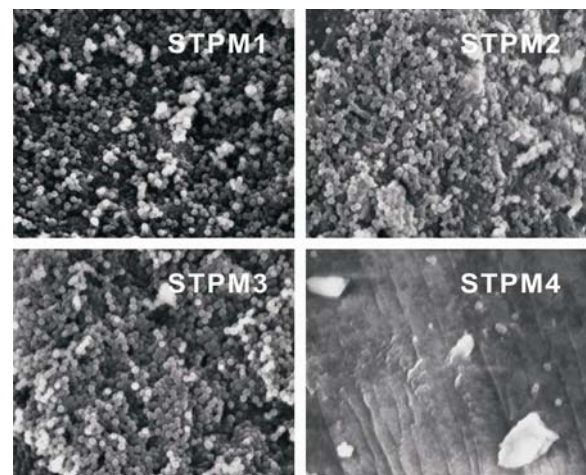


图 1 不同精制方法所得的鱿鱼墨黑色素扫描电镜结果比较

Fig.1 Comparison of the scanning electronic microscopes of squid melanin by different refining methods

注: $\times 10000$ 。STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 分别代表未水解、胃蛋白酶水解、高速离心和酸水解法精制鱿鱼墨黑色素, 下同

2.2 鱿鱼墨黑色素光谱特征

2.2.1 紫外可见光谱 STPM1 在紫外区 220nm 附近存在强吸收峰, 不同精制方法所得的鱿鱼墨黑色素 STPM2、STPM3 和 STPM4 均在 220nm 附近有强吸收值(图 2A)。另外, 图 2B 显示 STPM1、STPM2 和 STPM3 在 320nm 左右也有较强吸收, 而 STPM4 则在 330nm 处吸光值增加, 出现红移现象。在可见光区内, STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 的吸光值随着波长的增加而减小, 但 STPM1、STPM2 和 STPM3 在 435nm 附近有肩峰出现, STPM4 则无明显肩峰(图 2B)。

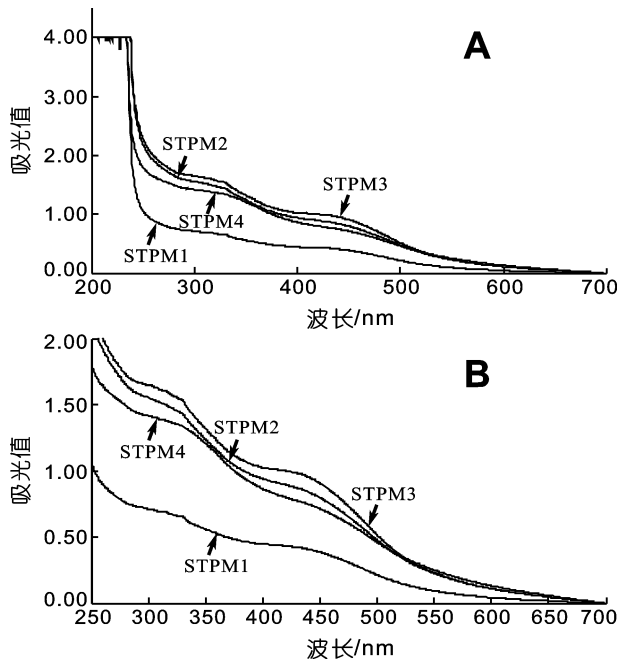


图2 不同精制方法所得鱿鱼墨黑色素的紫外可见光谱比较
Fig.2 Comparison of UV-vis spectra of squid melanin by different refining methods

2.2.2 鱿鱼墨黑色素的红外光谱分析 图3 红外分析显示, 不同精制方法对鱿鱼墨黑色素的官能团有较大影响, 虽然 STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 分别在 $3500\text{--}3300\text{cm}^{-1}$ 、 $1620\text{--}1600\text{cm}^{-1}$ 和 $1465\text{--}1250\text{cm}^{-1}$ 存在强吸收峰, 但 STPM2 和 STPM4 在 $3500\text{--}3300\text{cm}^{-1}$ 区间的吸收峰是强宽峰, 且 STPM1 在 $2400\text{--}2200\text{cm}^{-1}$ 有弱吸收峰, STPM2 和 STPM4 在此区间则无吸收。与 STPM1 相比较, STPM3 的官能团更为复杂, 除了有与 STPM1 相近吸收峰外, STPM3 在 2925.02 、 2854.09 和 1466.49cm^{-1} 出现了较强吸收。STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 的红外光谱特征吸收峰及可能归属官能团总结见表1。

— 2200cm^{-1} 有弱吸收峰, STPM2 和 STPM4 在此区间则无吸收。与 STPM1 相比较, STPM3 的官能团更为复杂, 除了有与 STPM1 相近吸收峰外, STPM3 在 2925.02 、 2854.09 和 1466.49cm^{-1} 出现了较强吸收。STPM1、STPM2、STPM3 和 STPM4 的红外光谱特征吸收峰及可能归属官能团总结见表1。

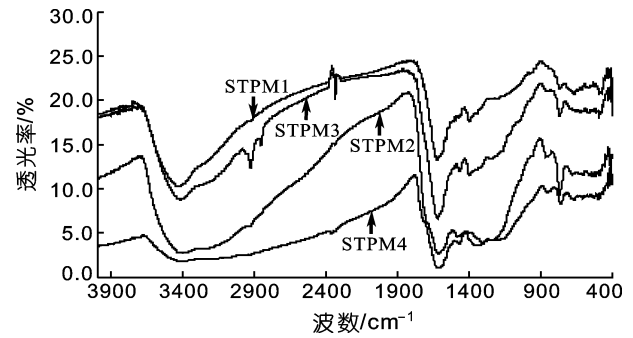


图3 不同精制方法对鱿鱼墨黑色素红外光谱影响
Fig.3 Effects of different refining methods on the fourier transform infra-red (FTIR) spectra of squid melanin

2.3 不同精制方法对鱿鱼墨黑色素金属元素影响

由表2可以看出, STPM1 本身含有一定量的有害重金属元素, 虽然 Cr、Hg、As 和 Pb 的含量均低于 $1\mu\text{g/g}$, 但 Cd 含量达到 $4\mu\text{g/g}$ 。此外, 鱿鱼墨黑色素富含 Sr 和 Fe 元素, 含量分别为 $120\mu\text{g/g}$ 和 $133\mu\text{g/g}$ 。对鱿鱼墨黑色素的精制处理可以降低或提高其金属元素含量, 其中 STPM4 的 Cd 含量降至 $1\mu\text{g/g}$, 同时

表1 不同精制方法所得的鱿鱼墨黑色素红外光谱吸收峰及归属官能团
Tab.1 Peaks and functional groups of FTIR spectra of squid melanin by different refining methods

方法	吸收峰(cm^{-1})及归属官能团						
	OH/NH 伸展	CH_3 非对称/对称伸展	Amino 基团	C=O/芳香族	C=C 伸展	CH_2CH_3 弯曲	CN 伸展
STPM1	3427.45	—	2349.65 2289.68	1617.60	—	—	1399.64
STPM2	3399.49	—	—	1616.94	—	—	1363.95
STPM3	3415.36	2925.02 2854.09	2335.83 2281.93	1624.34	1466.49	—	1400.21
STPM4	3397.49	—	—	1620.30	1483.83	—	1307.88

注: 表中“—”表示未出现吸收峰

表2 不同精制方法对鱿鱼墨黑色素的金属元素含量影响
Tab.2 Effects of different refining methods on the contents of metal elements in squid melanin

方法	金属元素种类及含量($\mu\text{g/g}$)								
	Cd	Cr	Hg	As	Pb	Fe	Zn	Sr	—
STPM1	4	1	1	1	1	120	14	133	—
STPM2	1	1	1	1	1	73	7	1	—
STPM3	12	1	1	1	1	62	54	121	—
STPM4	1	1	1	1	1	21	5	2	—

Fe、Zn 和 Sr 含量也显著减少, Sr 损失率达到 98% 以上。STPM2 的 Cd 和 Sr 含量均降低到 $1\mu\text{g/g}$, Sr 几乎全部损失。与 STPM1 相比较, STPM2 中 Fe 含量可以保留 60% 以上, 且明显高于 STPM3 和 STPM4 中 Fe 含量, 但是 STPM2 中 Zn 含量损失严重, 总量仅略高于 STPM4 中的 Zn。而 STPM3 的 Cd 和 Zn 含量均明显高于 STPM1 中 Cd 和 Zn, 虽然 Sr 含量可以保留 90% 以上, 但是 Fe 含量由 $120\mu\text{g/g}$ 降至 $62\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

鱿鱼墨黑色素属于真黑色素, 天然真黑色素单体 5, 6-二羟基吲哚(DHI)和 5, 6-二羟基吲哚酸(DHICA)具有高度的聚合性, 而且聚合方式受溶液 pH、金属离子种类和含量以及糖和蛋白质等含量的影响(陈士国, 2007¹⁾; Wolfram *et al.*, 1970; Arnaud *et al.*, 1981)。鱿鱼墨黑色素的精制条件不同, 将影响黑色素的形态及化学结构。本文用强酸水解法精制的鱿鱼墨黑色素与胃蛋白酶水解法和高速离心法得到的鱿鱼墨黑色素相比较, 在微观结构、红外光谱特征及金属元素含量上均有明显差别。扫描电镜结果显示, 强酸水解法得到的 STPM1 晶体结构松弛, 外部黑色素颗粒球状不完整, 边界模糊, 说明强酸对鱿鱼墨黑色素的结构有破坏作用。阎克路等(2001)曾报道盐酸分离法制备的牦牛绒黑色素颗粒边缘变得模糊不清, 且黑色素颗粒尺寸略变大。虽然强酸水解可以除去黑色素中蛋白质等杂质, 但是近来研究发现人头发真黑色素在强酸作用下脱去羧基, 促使蛋白质转变成色素类似物(Liu *et al.*, 2003a)。图 2 紫外可见光谱中 STPM4 在 220nm 强吸收和 330nm 的弱吸收可能与鱿鱼墨黑色素残留的蛋白或特定氨基酸有关(Nofsinger *et al.*, 2002), STPM4 在红外光谱中 2400—2200 cm^{-1} 范围内无吸收峰出现, 进一步说明了强酸对 STPM4 中氨基基团的破坏作用, 但在 1483.83 cm^{-1} 出现的弱吸收峰可能与蛋白质降解后生成的官能团有关。此外, STPM4 中的金属元素损失严重(见表 2 结果), 与 Liu 等(2003a)报道碱水解和酸水解人发黑色素的金属离子被大部分除去的结果一致。

与 STPM4 相比较, STPM2 和 STPM3 的黑色素颗粒形态未发生大的变化, 紫外可见光谱分析结果与 STPM1 相似, 但是红外光谱特征有差异, 如: STPM2

在 2349.65 cm^{-1} 和 2289.68 cm^{-1} 下无吸收, 说明胃蛋白酶可以有效水解鱿鱼墨黑色素中的蛋白质; STPM3 在 2925.02 cm^{-1} 和 2854.09 cm^{-1} 下出现新的较强吸收峰, 分别对应 CH_3 非对称和对称性伸展; 真黑色素基本结构——吲哚类化合物特征吸收峰对应 1399.64 cm^{-1} (Tu *et al.*, 2009), 而在 STPM4 中已移至 1307.88 cm^{-1} , 证实了强酸水解法对鱿鱼墨黑色素的基本结构单元有损伤作用, 与图 1 中扫描电镜结果一致。

水生生物可以从周围生活环境中富集营养盐和金属元素(张才学等, 2010; 唐建勋等, 2010), 鱿鱼墨黑色素通过羧基和去质子化羟基等阴离子与金属阳离子螯合(McGraw, 2003), 这种螯合作用对有益金属离子(如 Fe、Zn、Sr 等)起到富集效应, 但同时也捕获诸如 Cd 等有害金属(见表 2 结果)。不同金属元素与鱿鱼墨黑色素的结合位点有所不同, 如: 研究发现 Fe(III)能与鱿鱼墨黑色素中的酚羟基、吲哚二羟基单元和羧基基团络合(陈士国等, 2010; Samokhvalov *et al.*, 2004), Cu(II)则是结合到黑色素的羧基(COOH)和亚胺基(NH_2)上(Jonas, 2003), Cd(II)和 Pb(II)能够与鱿鱼墨黑色素的酚羟基和氨基相结合, 而且 Pb(II)还能与羧基基团相互作用(Chen *et al.*, 2009)。因此, 表 2 中不同精制方法对鱿鱼墨黑色素金属元素含量的影响应该与金属元素结合位点处官能团丢失或改变有关。

综上所述, 胃蛋白酶水解法和高速离心法有利于保持鱿鱼墨黑色素原有基本结构, 但是这两种精制方法对鱿鱼墨黑色素自身的金属元素含量影响较大。高速离心法精制的鱿鱼墨黑色素需要进一步脱除有害重金属才可以用作食品添加剂或药用; 而胃蛋白酶水解法降低了鱿鱼墨黑色素的 Fe、Zn 和 Sr 含量, 如何回收鱿鱼墨水解液中的有益金属元素, 将会是一项有意义的工作, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- 李兴旺, 王 隹, 蒋云霞, 2001. 从鱿鱼墨中精制黑色素. 上海水产大学学报, 10(3): 252—256
 张才学, 白富进, 孙省利等, 2010. 流沙湾冬、春季大型海藻的微量元素分析. 海洋与湖沼, 41(1): 154—159
 陈士国, 薛 勇, 薛长湖等, 2010. 鱿鱼墨黑色素络合铁离子的活性研究. 离子交换与吸附, 26(4): 310—316
 陈士国, 薛长湖, 薛 勇等, 2007. 鱿鱼墨黑色素的自由基清除活性研究. 中国海洋药物杂志, 26(1): 24—27
 郑高利, 张信岳, 周彦钢等, 2002. 鱿鱼墨和乌贼墨部分成分

1) 陈士国, 2007. 鱿鱼墨多糖和黑色素的研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 46—52

- 及微量元素含量比较. 中国海洋药物, 21(3): 12—14
- 唐建勋, 邢承华, 刘忠良等, 2010. 重金属 Cu、Pb 在泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 卵巢的蓄积特性及其对卵细胞发育的影响. 海洋与湖沼, 41(3): 386—390
- 阎克路, 宋心远, Schaefer K *et al*, 2001. 蛋白酶和盐酸分离牦牛绒中黑色素的研究. 纺织学报, 22(6): 348—351
- Arnaud J C, Bore P, 1981. Isolation of melanin pigments from human hair. *J Soc Cosmet Chem*, 32: 137—152
- Birbeck M S C, Mercer E H, Bamicot N A, 1956. The structure and formation of pigment granules in human hair. *Exp Cell Res*, 10: 505—514
- Chen S G, Xue C H, Wang J F *et al*, 2009. Adsorption of Pb(II) and Cd(II) by squid *Ommastrephes bartrami* melanin. *Bioinorg Chem Appl*, doi: 10.1155/2009/901563
- Chen S R, Jiang B, Zheng J X *et al*, 2008. Isolation and characterization of natural melanin derived from silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chemistry*, 111: 745—749
- Hong L, Simon J D, 2005. Physical and chemical characterization of iris and choroid melanosomes isolated from newborn and mature cows. *Photochem Photobiol*, 81(3): 517—523
- Jonas S, 2003. Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin. *Inorganica Chimica Acta*, 356: 243—248
- Liu Y, Kempf V R, Simon J D *et al*, 2003a. Comparison of the structural and physical properties of human hair eumelanin following enzymatic or acid/base extracting. *Pigment Cell Res*, 16(4): 355—365
- Liu Y, Simon J D, 2003b. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*. *Pigment Cell Res*, 6: 72—80
- McGraw K J, 2003. Melanins, metals, and mate quality. *Oikos*, 102: 402—406
- Nofsinger J B, Weinert E E, Simon J D, 2002. Establishing structure-function relationships for eumelanin. *Biopolymers*, 67(4—5): 302—305
- Novellino L, Napolitano A, Prota G, 2000. Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides. *Biochim Biophys Acta*, 1475(3): 295—306
- Samokhvalov A, Liu Y, Simon J D, 2004. Characterization of the Fe(III)-binding site in *Sepia eumelanin* by resonance Raman confocal microspectroscopy. *Photochem Photobiol*, 80: 84—88
- Tu Y G, Sun Y Z, Tian Y G *et al*, 2009. Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chemistry*, 114: 1345—1350
- Wolfram L J, Hal K, Hui I, 1970. The mechanism of hair bleaching. *J Soc Cosmet Chem*, 21: 875—882

EFFECTS OF DIFFERENT REFINING METHODS ON THE MICRO-MORPHOLOGY, SPECTRA PROPERTIES AND METAL ELEMENTS OF MELANIN FROM SQUID (*OMMASTREPHEs BARTRAMI*) INK

SONG Ru¹, LI Ren-Wei², YU Qun-Di¹, DENG Shang-Gui¹

(1. School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316000;

2. Beijipin Aquatic Product Co. Ltd. of Zhejiang Province, Hangzhou, 311215)

Abstract In this study, pepsin hydrolysis, high speed centrifugation and acidic hydrolysis were used to refine the melanin from squid (*Ommastrephes bartrami*) ink, and the characteristics of surface morphology, optical spectra and metal elements of these refined squid melanin were investigated. Results of scanning electronic microscope (SEM) showed that acidic hydrolysis damaged the melanin's original morphology. These refined squid melanin had maximum absorbance around 220nm. Fourier transform infra-red (FTIR) spectra revealed that pepsin hydrolysis and acidic hydrolysis cut off amino groups from squid melanin. However, the characteristic peak of indole group of melanin shifted from 1399.64cm⁻¹ to 1307.88cm⁻¹ after acidic hydrolysis. High speed centrifugation for squid melanin resulted in forming new peaks at 2925.02cm⁻¹ and 2854.09cm⁻¹, respectively. Moreover, the different refining methods lead to the effects of decrease or enrichment on the contents of metal elements in squid melanin.

Key words Squid ink, Refining melanin, Granular morphology, Spectra properties, Metal element analysis