

H₂O₂ 氧化-荧光分析法测定乌骨鸡中黑色素含量的研究

陈露露, 田颖刚

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

摘要: 本研究首次建立了简单、快速地测定乌骨鸡黑色素含量的荧光分析方法。乌骨鸡黑色素在碱性条件下经过氧化氢氧化后产生强烈的荧光。本研究优化了样品前处理条件以及氧化反应条件, 对线性范围、检测限以及加标回收率进行了评价。结果表明, 最佳氧化条件: 氧化温度为 55 °C, 过氧化氢溶液工作浓度范围为 20%~25%, 氧化反应时间为 2 h; 最佳样品前处理的条件: NaOH 浓度为 0.1~0.2 M, 超声时间为 40 min, 超声温度为 70 °C。黑色素浓度在 50~600 μg/mL 范围内呈良好线性关系, 相关系数 $r=0.9986$ 。与传统检测方法相比, 荧光分析法无需从样品中提取黑色素, 极大地加快了分析速度, 简化了分析操作, 并且该方法相对于紫外分光光度法的检测限降低了至少 10 倍。样品添加不同浓度的黑色素工作标准品的平均回收率为 102.87%, RSD 值为 4.51%。采用该方法测定了乌骨鸡鸡皮、腿肌、胸肌中的黑色素含量, 结果显示乌骨鸡肉中的黑色素含量: 鸡皮>腿肌>胸肌, 分别占鲜重的 1.08%、0.44%、0.34%。以上结果表明该方法较快速、准确、检测限低, 适用于乌骨鸡中黑色素含量的测定。

关键词: 乌骨鸡; 黑色素; 含量; 荧光分析法

文章编号: 1673-9078(2019)09-283-290

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.037

A Fluorescence Detection Method for Melanin Content in Black-bone Silky Fowl Based on H₂O₂ Oxidation

CHEN Lu-lu, TIAN Ying-gang

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

Abstract: For the first time, a simple and rapid fluorescence analysis method was established in this study for determining the melanin content in Black-bone Silky Fowl (BSF). The melanin in BSF could produce strong fluorescence after oxidation by H₂O₂ under alkaline conditions. In this study, the conditions for sample pretreatment and oxidation reaction were optimized, and the linear range, detection limit and spiked recovery rate were then evaluated. The results showed that the optimal oxidation conditions were: oxidation temperature 55 °C, working concentration range of hydrogen peroxide solution 20%~25%, oxidation reaction time 2 h. The optimal sample pretreatment conditions were: NaOH concentration 0.1~0.2 M, ultrasonic time 40 min, ultrasonic temperature 70 °C. The melanin concentration showed a good linear relationship in the range of 50~600 μg/mL, with the correlation coefficients as 0.9986. Compared with the traditional detection method, the fluorescence analysis method did not require the extraction of melanin from the sample, which greatly speeded up the analysis and simplified the analysis operation, and enabled at least 10 times lower detection limit as compared to the ultraviolet spectrophotometric method. The average recovery of the sample spiked with different concentrations of melanin working standard was 102.87% with the RSD value as 4.51%. Using this method, the contents of melanin in BSF's skin, thigh meat and breast meat were found to follow the order of chicken skin>thigh meat >breast meat (accounting for 1.08%, 0.44% and 0.34% of fresh weight, respectively). The above results showed that the established method is fast and accurate with a low detection limit, thus is suitable for the determination of melanin content in BSF.

Key words: black-bone silky fowl; melanin; content; fluorescence analysis

收稿日期: 2019-02-28

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (21162018); 食品科学与技术国家重点实验室自由探索资助课题 (SKLF-ZZB-201520)

作者简介: 陈露露 (1993-), 女, 硕士生, 研究方向: 营养与食品卫生学
通讯作者: 田颖刚 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品化学与营养

泰和乌骨鸡, 是我国重要的特色药食资源, 药用历史悠久, 能补虚劳羸弱, 治消渴, 益产妇, 治女人崩中带下, 一切虚损诸病^[1]。乌骨鸡的乌色性状及其程度是由其体内黑色素含量所决定。黑色素是乌骨鸡重要的功能物质基础, 有滋补、抗氧化、抗衰老、维持内环境稳定等作用^[2]。明代李时珍在《本草纲目》

中记载：“乌骨鸡有白毛乌骨者、黑毛乌骨者、斑毛乌骨者、骨肉俱乌者、肉白骨乌者，但观鸡舌黑者，则肉骨俱乌，入药更良”。可见乌骨鸡药用效果与黑色素的含量有关，黑色素含量越高者，颜色越深，入药越佳^[3]。

黑色素的测定方法有紫外可见分光光度法^[4,5]和高效液相色谱法(HPLC)等^[6]。研究证实，紫外分光光度法有一定的不足之处：(1) 尽管黑色素溶解的很充分，其在分光光度测量中都会产生一定的散射和假吸收。(2) 黑色素样品含有的蛋白质多，其背景吸收值大。高效液相色谱法(HPLC)也用于定量黑色素，该方法灵敏度高、准确，主要通过测定黑色素的氧化产物PDCA和PTCA的含量来间接换算成样品中真黑色素的含量，但其操作复杂，成本较高^[6-8]。荧光分析法是一种光学领域中用于荧光物质分析的常用方法。荧光分析法具有操作简单、灵敏度高、快速、重现性好、节省时间，不复杂且不昂贵一系列优点^[9,10]。根据朗伯-比尔定律，当荧光物质的浓度较低时，荧光强度与物质的浓度成正比，因此，此方法适用于单一荧光物质的痕量检测^[11]。目前荧光分析法已广泛应用于分析领域，如无机物、有机物以及生物大分子的测定^[12]。目前已有学者证实黑色素在碱性过氧化氢溶液中的降解伴随着强荧光的产生，该荧光特征可用于定量体外培养黑色素瘤细胞中的黑色素含量，且黑色素氧化后的荧光信号不受蛋白质和脂质的影响，较吸收光谱法测定黑色素具有明显的优势^[8,13]。Peter等^[14]人的研究也验证了RPE和脉络膜中黑色素经氧化降解后形成可溶性的荧光物质，产生强烈的黄色荧光。但目前对于该荧光物质还未有明确的认识。

虽然乌骨鸡黑色素是乌骨鸡重要的功能成分，目前对于乌骨鸡黑色素测定方法研究比较薄弱。主要有本团队前期发表的高效液相法^[6]和粗略评价乌骨鸡乌色性状的色差仪比色法^[15]。目前，尚未采用荧光分析法测定乌骨鸡黑色素含量。

本文旨在建立一种利用荧光定量乌骨鸡黑色素的方法，为客观评价乌骨鸡质量和进一步开发乌骨鸡黑色素奠定基础，并对测定其他天然黑色素含量也有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

泰和乌骨鸡产地为中国江西泰和县；木瓜蛋白酶(40万U/g)，北京房山酶制剂总厂；浓盐酸(分析纯)，南昌鑫光精细化工厂；无水乙醇(分析纯)，西陇科学

股份有限公司；过氧化氢(分析纯)，广州西陇科学股份有限公司；氢氧化钠(分析纯)，上海润捷化学试剂有限公司；氯仿(分析纯)，国药集团化学试剂有限公司；甲醇(分析纯)，天津市大茂化学试剂厂；合成黑色素，美国Sigma公司；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DZF-6050真空干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；HH-4电热恒温水浴锅，上海森信实验仪器有限公司；Varioskan Flash 4.00.53全波长扫描式多功能读数仪，美国赛默飞世尔科技公司；80-2B低速台式离心机，上海安亭科学仪器厂；KQ-50超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；Precisa XB220A电子天平，深圳市新朗普电子科技有限公司；F-4500荧光分光光度计，日本日立公司；DS-1型高速组织捣碎机，上海标本模型厂。

1.3 方法

1.3.1 乌骨鸡黑色素工作标准品的制备

参考文献方法^[16]制备乌骨鸡黑色素，精密称取乌骨鸡黑色素10g，加入2mol/L的HCl 100mL，90℃回流3h后过滤，弃滤液，连续回流5次后用蒸馏水洗涤至中性，再依次采用乙醇、CM试剂(氯仿:甲醇=2:1)反复多次洗涤至洗涤溶剂无色，无干物质残留，真空干燥后即为乌骨鸡黑色素工作标准品。

1.3.2 傅里叶红外光谱分析

将乌骨鸡黑色素在研钵中研成细粉，过160目筛，称取2mg样品于200mg溴化钾在玛瑙钵中混匀后，研成细粉，压片，在500~4000cm⁻¹范围内测定其红外吸收光谱。

1.3.3 乌骨鸡黑色素激发波长和发射波长的测定

取浓度为600μg/mL的乌骨鸡黑色素工作标准品5mL于50mL的锥形瓶中，加入终浓度为24%的过氧化氢溶液，避光，55℃孵育2h后，超声10min，再于容量瓶中将其定容至50mL。混匀，3500r/min离心5min，取3mL上清液，在狭缝宽度为5nm，扫描速度为2400nm/min，扫描间隔为1nm条件下使用荧光分光光度计进行扫描，确定其激发波长以及发射波长。

1.3.4 标准曲线的制作

分别配制质量浓度为50、75、100、200、300、400、500、600μg/mL的乌骨鸡黑色素标准溶液，各取5mL于50mL的锥形瓶中，按照1.3.3的氧化条件进行反应，将反应液上清置于全黑酶标板中，使用全

波长扫描式多功能读数仪测定其相对荧光强度。

1.3.5 过氧化氢浓度对氧化反应的影响

取浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ 的乌骨鸡黑色素工作标准品 5 mL, 加入终浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25% 的过氧化氢溶液。按照 1.3.3 的氧化条件进行反应, 测定其相对荧光强度, 每个浓度做 5 个平行, 取测量值的平均值, 确定最佳过氧化氢浓度。

1.3.6 时间对氧化反应的影响

取浓度为 50 和 600 $\mu\text{g/mL}$ 的乌骨鸡黑色素工作标准品 5 mL, 按照 1.3.3 的氧化条件, 分别孵育 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h, 每个时间点做 5 个平行, 取测量值的平均值, 测定其相对荧光强度, 确定最佳氧化时间。

1.3.7 NaOH 浓度对氧化反应的影响

精密称取 1 mg 和 3 mg 的乌骨鸡黑色素工作标准品分别于 5 mL 浓度为 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M、 10^{-3} M、0.01 M、0.1 M、0.2 M 的 NaOH 溶液中, 使黑色素终浓度分别为 200 $\mu\text{g/mL}$ 和 600 $\mu\text{g/mL}$, 80 $^{\circ}\text{C}$ 超声 1 h, 其余氧化条件按照 1.3.3 所述, 每个时间点做 5 个平行, 取测量值的平均值, 测定其相对荧光强度, 确定最佳 NaOH 浓度。

1.3.8 样品超声温度对氧化反应的影响

精密称取 1 mg 和 3 mg 的乌骨鸡黑色素工作标准品于 0.15 M 的 NaOH 溶液中, 使黑色素终浓度分别为 200 $\mu\text{g/mL}$ 和 600 $\mu\text{g/mL}$, 分别在室温、30、40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 中超声 1 h, 其余氧化条件按照 1.3.3 所述, 每个时间点做 5 个平行, 取测量值的平均值, 测定其相对荧光强度, 确定最佳样品超声温度。

1.3.9 样品超声时间对氧化反应的影响

精密称取 1 mg 和 3 mg 的乌骨鸡黑色素工作标准品于 0.15 M 的 NaOH 溶液中, 使黑色素终浓度分别为 200 $\mu\text{g/mL}$ 和 600 $\mu\text{g/mL}$, 80 $^{\circ}\text{C}$ 分别超声 0 min、10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min, 其余氧化条件按照 1.3.3 所述, 每个时间点做 5 个平行, 取测量值的平均值, 测定其相对荧光强度, 确定最佳样品超声温度。

1.3.10 乌骨鸡黑色素的测定

取 50 g 乌骨鸡鸡皮、胸肌、腿肌样品分别用组织粉碎机制成肉糜, 再分别精密称取 0.2 g 各肉糜样品于 50 mL 锥形瓶中, 加入 5 mL 的 0.15 M 的 NaOH 溶液, 80 $^{\circ}\text{C}$ 超声 1 h, 再分别加入终浓度为 24% 的过氧化氢溶液, 避光, 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 超声 10 min, 用蒸馏水定容到 50 mL, 混匀, 取 1 mL 溶液于 1.5 mL 离心管中, 3500 r/min 离心 5 min, 取上清于全黑酶标板中, 使用全波长扫描式多功能读数仪测定其相对荧光强

度。

1.3.11 检出限的测定与计算

分别采用荧光分析法和紫外分光光度法测定 10 份空白样品的相对荧光强度^[17-19], 按照公式 (1) 计算方法方检出限:

$$C_k = 3s/k \quad (1)$$

式中: C_k 为方法检出限; s 为空白的标准偏差; k 为标准曲线斜率。

1.3.12 数据统计分析

所有数据和图表均采用 Excel (2019 版) 和 Origin 9.0 软件处理, 采用 SPASS 17.0 软件对数据进行统计分析, 多个样本之间比较用单因素方差分析, 检验水准为 $\alpha=0.05$, $p<0.05$ 表示差异显著, $p<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 乌骨鸡黑色素工作标准品的红外光谱分析

乌骨鸡精制黑色素和合成黑色素的红外图谱如图 1 和 2 所示, 两种黑色素的红外光谱图相比较后有较大差异, 精制黑色素和合成黑色素在 3100~3600 cm^{-1} 区具有强烈的共振吸收宽峰, 是由 O-H 和酰胺中的 N-H 伸缩振动产生的, 但合成黑色素在 3200 cm^{-1} 处的吸收峰更强。1241.98 cm^{-1} 处有吸收, 此为 1000~1300 cm^{-1} 区的 C-O、C-N 伸缩振动吸收, 这表明乌骨鸡精制黑色素结构中有羟基结构, 合成黑色素中在该范围内并无吸收峰。乌骨鸡精制黑色素在 2961.65 cm^{-1} 处的吸收为 2800~3000 cm^{-1} 脂肪族 C-H 的伸缩振动。精制黑色素在 1450.25 cm^{-1} 处有吸收, 此为 1420~1480 cm^{-1} 区的脂肪族 C-H 的弯曲振动。酰胺谱带 I C=O 的伸缩振动吸收峰通常在 1630~1680 cm^{-1} 区, 仲酰胺的谱带 II 和仲酰胺的 C-N 吸收峰分别出现在 1515~1570 cm^{-1} 和 1200~1305 cm^{-1} 区, 而乌骨鸡精制黑色素的红外谱图在 1631.74 cm^{-1} 、1533.55 cm^{-1} 和 1241.98 cm^{-1} 处出现的吸收峰则可表明它的结构中含有酰胺结构。而合成黑色素在上述峰位处均无吸收, 这表明合成黑色素中可能无酰胺结构。在小于 1000 cm^{-1} 的区域范围内为 C-H、N-H、C=O 超出平面的变角振动, 如图所示, 乌骨鸡精制黑色素在 751.07 cm^{-1} 、670.74 cm^{-1} 有吸收, 合成黑色素在 785.07 cm^{-1} 以及 631.81 cm^{-1} 处有吸收。综上所述, 乌骨鸡精制黑色素与合成黑色素的结构上具有差异, 因此本文选用精制黑色素作为乌骨鸡黑色素的工作标准品。

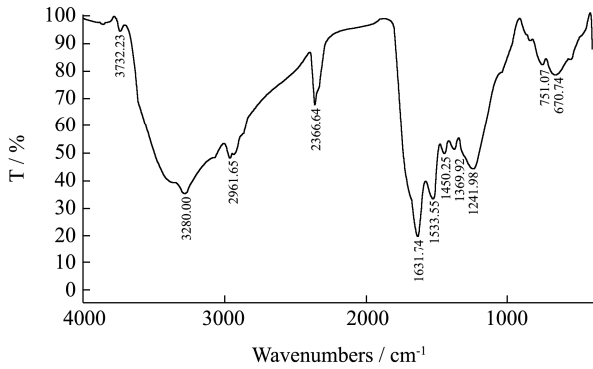


图1 乌骨鸡精制黑色素的红外光谱图

Fig.1 The infrared spectrum of refined melanin of black-bone silky fowl

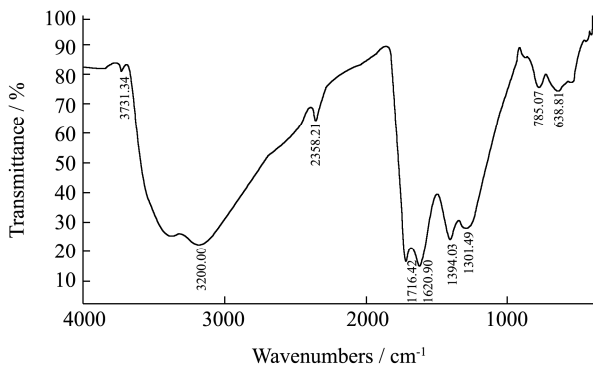


图2 合成黑色素的红外光谱图

Fig.2 The infrared spectrum of synthetic melanin

2.2 乌骨鸡黑色素的激发光谱和发射光谱

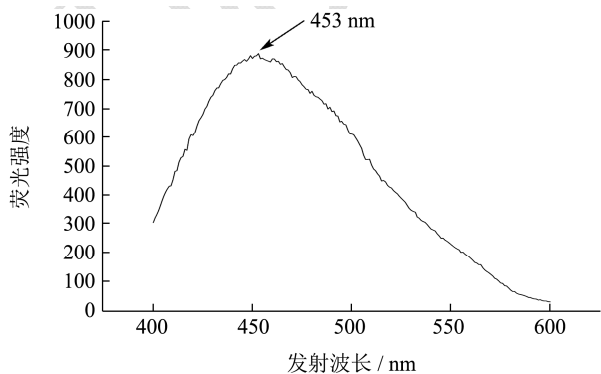
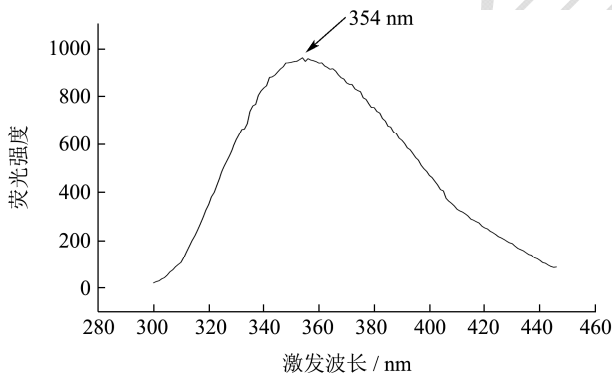


图3 激发光谱与发射光谱

Fig.3 Excitation spectrum and emission spectrum

由图3可知, 激发光在 300 nm~440 nm 之间有最大值为 354 nm, 发射光在 400~600 nm 之间有最大值为 453 nm。因此, 本研究将选用 354 nm 为乌骨鸡黑色素的激发波长, 453 nm 为发射波长。

2.3 乌骨鸡样品前处理条件对黑色素氧化反应的影响

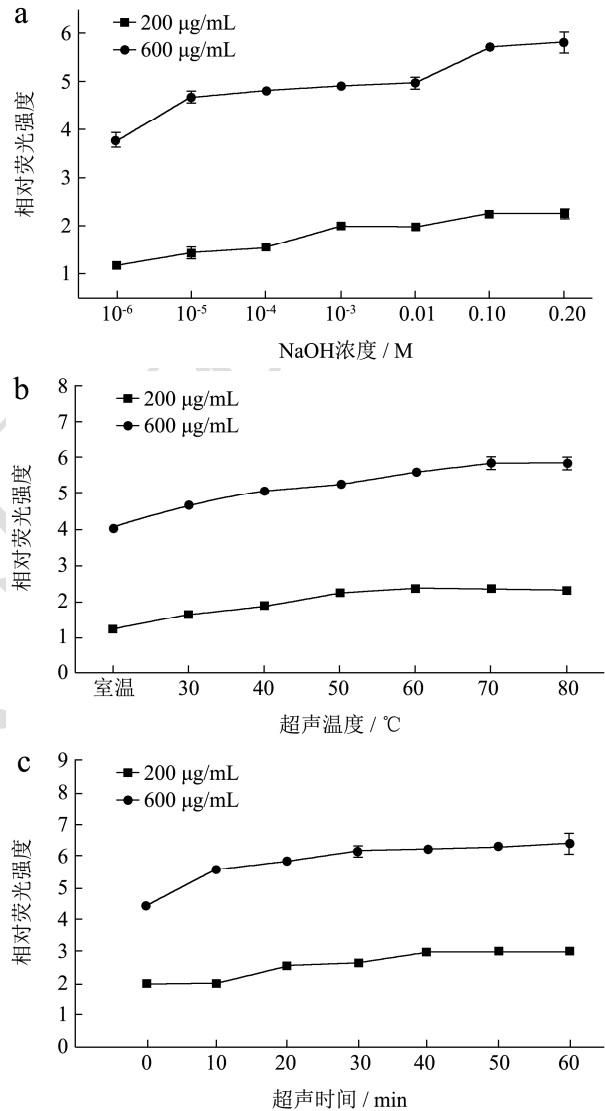


图4 样品前处理条件对氧化反应的影响

Fig.4 Effect of sample pretreatment conditions on oxidation reaction

2.3.1 NaOH 浓度对氧化反应的影响

如图 4a 所示, 随着 NaOH 浓度的升高, 浓度为 200 µg/mL 和 600 µg/mL 的黑色素相对荧光强度值也随之升高, 当 NaOH 浓度达到 0.1 M 时, 其相对荧光强度达到稳定, 根据统计学结果可知, NaOH 浓度处于 0.1 M~0.2 M 范围内, 其相对荧光强度无显著性差异, 因此, 最佳 NaOH 的浓度范围为 0.1~0.2 M。

2.3.2 超声温度对氧化反应的影响

通过图 4b 可知, 超声温度越高, 黑色素的相对荧光强度越高, 且显著高于室温处理的相对荧光强度 ($p<0.01$), 当温度为 60 °C 以上时, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素相对荧光强度值达到稳定, 当温度达到 70 °C 时, 600 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素相对荧光强度相对稳定, 且与 80 °C 时的相对荧光强度无显著性差异, 综上所述, 本文将选择 70 °C 为最佳超声温度。

2.3.3 超声时间对氧化反应的影响

如图 4c 所示, 两种浓度的黑色素的相对荧光强度随着超声时间的增大而增大, 且显著高于不超声处理的相对荧光强度 ($p<0.01$). 并且由图可知, 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 和 600 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素相对荧光强度值均在 40 min 时达到稳定, 因此本文选择最佳超声时间为 40 min。

2.4 乌骨鸡黑色素氧化条件的优化

2.4.1 过氧化氢浓度对氧化反应的影响

如图 5a 所示, 相对荧光强度随着过氧化氢浓度的增加而增加, 当过氧化氢浓度为 20% 时, 相对荧光强度显著高于 15% ($p<0.01$), 与浓度为 25% 时的相对荧光强度无显著差异, 表明氧化反应的最佳过氧化氢浓度范围为 20%~25%, 本文为了保证氧化反应的彻底完成, 以及减少操作误差, 选用终浓度为 24% 过氧化氢溶液进行后续实验。

2.4.2 温度对氧化反应的影响

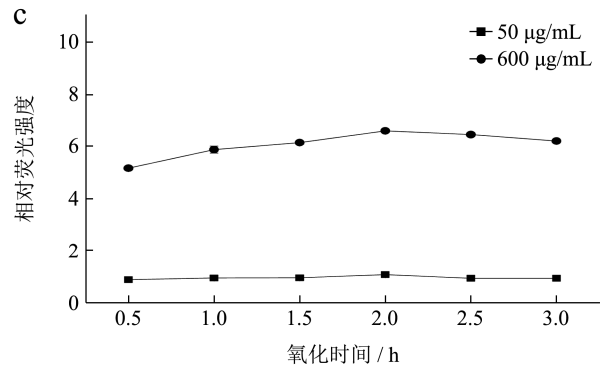
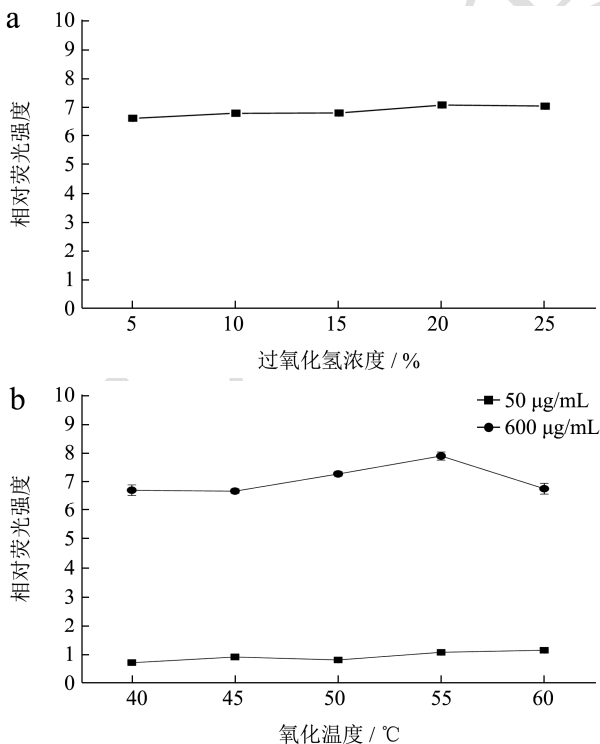


图 5 各因素对黑色素氧化反应的影响

Fig.5 Effect of various factors on the oxidation reaction of melanin

如图 5b 所示, 浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素在 55 °C 的相对荧光强度最大 ($p<0.01$), 并且显著大于其他氧化时间下的相对荧光强度, 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素在 55 °C 时, 相对荧光强度值达到稳定, 综上所述, 本文选择 55 °C 作为黑色素的最佳氧化温度。

2.4.3 时间对氧化反应的影响

如图 5c 所示, 当氧化时间在 0.5~2 h 之间时, 浓度为 50 和 600 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素的相对荧光强度随着时间的增加而增加, 当氧化时间在 2~3 h 之间时, 相对荧光强度随着时间的增加而逐渐降低, 经统计学分析, 当氧化时间为 2 h 时, 无论在低浓度或高浓度时, 黑色素的相对荧光强度均处于最大值 ($p<0.01$), 这表明最佳的氧化时间为 2 h。

2.5 线性回归分析及检测限

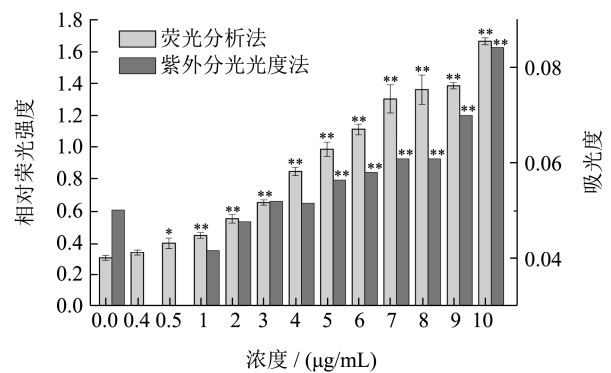


图 6 两种方法最低检测浓度

Fig.6 Minimum detection concentration of two methods

注: 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 相比, *表示差异显著, $p<0.05$; **表示差异极显著, $p<0.01$ 。

按照 1.3.3 的氧化条件, 线性范围在 50~600 $\mu\text{g/mL}$ 中的回归方程为 $y=0.0094x+0.6926$, $r=0.9986$, 相关系数为正数, 说明相对荧光强度随黑色素的含量增加而增加, 并且它的绝对值接近 1, 成较好的正相关性。

采用荧光分析法以及紫外分光光度法测定浓度范围在 0 $\mu\text{g/mL}$ ~10 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素时,如图 6 所示,通过荧光分析法在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时测得的相对荧光强度显著高于空白组的相对荧光强度 ($p<0.05$),表明该方法测定的黑色素最低浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$,而紫外分光光度法测定的最低浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。根据 1.3.11 的检出限测定方法计算,荧光分析法的方法检出限为 0.30 $\mu\text{g/mL}$,紫外分光光度法的方法检出限为 3.68 $\mu\text{g/mL}$ 。两种方法测得的检测限值相差不大,且结果均表明荧光分析法的检测限比紫外分光光度法至少低 10 倍。

2.6 稳定性和精密度

精密称取 0.2 g 肉糜样品,经过 1.3.10 方法测定其黑色素含量后,放置 0 h、2 h、4 h、6 h,结果显示在 6 h 之内,其相对荧光强度的 RSD 值为 1.49%,表明

黑色素含量的测定结果较稳定。

精密称取 0.2 g 的肉糜样品,根据上述 1.3.10 的测定方法连续测定 5 次,其相对荧光强度的 RSD 值为 2.03%,表明仪器的精密度良好。

2.7 加标回收实验

精密称取 15 份的乌骨鸡肉糜样品,分成三组,每组分别加入含量为 0.56 mg、1.00 mg、1.60 mg 的乌骨鸡黑色素工作标准品,按照 1.3.10 的步骤测定黑色素含量,每个加标水平平行测定 5 次,计算回收率和平均回收率,见表,回收率在 97.54%~106.00%之间,平均回收率为 102.87%,RSD 为 4.51%,由结果可以看出,在乌骨鸡肉样品中添加的不同含量的标准品后所得的加标回收率较高,表明该方法准确性较高。

表 1 加标回收实验

Table 1 Standard addition recovery experiment

| 序号 | 样品黑色素/mg | 加标量/mg | 测得黑色素总量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|----|-----------|--------|------------|--------|---------|-------|
| 1 | 0.68±0.01 | 0.56 | 1.28±0.02 | 105.05 | | |
| 2 | 0.69±0.02 | 1.00 | 1.66±0.03 | 97.54 | 102.87 | 4.51 |
| 3 | 0.63±0.01 | 1.60 | 2.33±0.02 | 106.01 | | |

2.8 乌骨鸡黑色素含量分析

表 2 乌骨鸡黑色素含量测定 (Mean±SD)

Table 2 Determination of melanin content in black-bone silky fowl

| 序号 | 肉糜鲜重/g | 黑色素测定值/mg (n=5) | 占鲜重百分比/% |
|----|--------|------------------------|----------|
| 腿肌 | 0.20 g | 0.88±0.02 ^a | 0.44 |
| 胸肌 | 0.20 g | 0.68±0.01 ^b | 0.34 |
| 鸡皮 | 0.20 g | 2.16±0.08 ^c | 1.08 |

注: a、b、c 分别表示差异极显著, $p<0.01$ 。

利用所建立的黑色素荧光检测方法,对乌骨鸡不同肉组织:鸡皮、腿肌、胸肌的黑色素含量进行了分析。分析结果见表 2,腿肌、胸肌和鸡皮中黑色素的含量分别占鲜重的 0.44%、0.34%、1.08%,结果显示乌骨鸡皮中黑色素含量显著高于腿肌与胸肌中的含量 ($p<0.01$),胸肌中黑色素的含量最低,而腿肌中黑色素含量仅次于鸡皮中的含量,并且显著高于胸肌中的含量 ($p<0.01$)。

3 讨论

乌骨鸡黑色素含量的测定方法主要有紫外可见分光光度法和高效液相色谱法。但是上述方法均需要从乌骨鸡中提取黑色素。王欢欢等^[20]利用酶解法提取

黑色素,前处理过程包括酶解、去酯以及烘干称重,其中酶解时间达到 24 h。潘珂等^[21]使用盐酸水解法提取黑色素,其过程中乌骨鸡肉需经盐酸浸泡 12 h,再回流 1 h,最后经过脱脂、烘干后可得黑色素样品。黄宇玫等^[22]经“脱脂-酶解-酸解”三步法提取乌骨鸡肉中黑色素,提取时间大于 10 h。由此可知,采用紫外可见分光光度法和高效液相色谱法测定乌骨鸡黑色素含量时,仅黑色素提取时间均要消耗 10 h 以上,甚至达 24 h 以上。黑色素溶解性差,提取和分离比较困难,且一些不溶于水的杂质以及结合的蛋白会对结果造成较大的影响^[23,24]。而采用荧光分析法测定乌骨鸡肉中黑色素时,无需提取黑色素,只需将样品通过超声的方式混悬在碱液中,再经过过氧化氢氧化 2 h 后测定相对荧光强度,并根据标准曲线计算其黑色素含量,这将极大地缩短了样品前处理时间,降低了样品损失的风险,简化了分析操作。已有研究证实荧光分析法测定黑色素时,脂质和杂蛋白质并不干扰黑色素氧化后产生的荧光^[14]。本研究在加标回收实验中测得的加标回收率在 97.54%~106.00%之间,平均回收率为 102.87%,RSD 为 4.51%,这些结果表明,荧光分析法在测定乌骨鸡肉中的黑色素时,并未受其他杂质的干扰,具有较高的准确性。本文通过比较荧光分析法和紫外分光光度法的检测限可知,荧光分析法检测限降低了 10 倍左右。综上所述,荧光分析法是一种简单、

快速、准确且检测限低的乌骨鸡黑色素含量测定方法。该方法的首次建立将为乌骨鸡黑色素的深入开发利用、乌骨鸡质量标准的完善提供坚实的科学基础。乌骨鸡黑色素氧化后荧光发射基团结构及荧光生成机理还有待于进一步研究。

4 结论

本文首次建立了荧光定量乌骨鸡黑色素的新方法,通过筛选得出乌骨鸡黑色素最佳氧化条件:氧化温度为 55 °C,过氧化氢浓度在 20%~25%之间,氧化时间为 2 h。最佳样品前处理条件为:NaOH 浓度为 0.1~0.2 M,超声时间为 40 min,超声温度为 70 °C。该方法稳定、可靠,仪器精密度较好,检测限低,且该方法无需从样品中提取黑色素,较其它测定方法大大缩短了样品的前处理时间,且加标回收率较高,测定结果准确可靠,该方法为客观评价乌骨鸡质量和进一步开发乌骨鸡黑色素奠定了良好的基础,并对测定其它天然黑色素含量也有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 田颖刚,李慧,杨亚杰,等.乌骨鸡蛋与普通鸡蛋品质特征及脂肪酸组成比较[J].食品工业科技,2018,39(15):223-227
TIAN Ying-gang, LI Hui, YANG Ya-jie, et al. Comparison of quality characteristics and fatty acid composition of eggs with black-bone silky fowl and common chicken [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(15): 223-227
- [2] 田颖刚,徐德利,廖春艳.泰和乌骨鸡黑色素细胞形态与分布特征[J].中国家禽,2015,37(1):5-8
TIAN Ying-gang, XU De-li, LIAO Chun-yan. Distribution and characteristic of melanocytes in Taihe black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* brisson) [J]. China Poultry, 2015, 37(1): 5-8
- [3] 谢明勇,田颖刚,涂勇刚.乌骨鸡活性成分及其功能研究进展[J].现代食品科技,2009,25(5):461-465
XIE Ming-yong, TIAN Ying-gang, TU Yong-gang. Review of the bioactive components of black-bone silky fowl and their functions [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(5): 461-465
- [4] 赵艳平,黎观红,瞿明仁,等.日粮酪氨酸水平对1-4周龄泰和乌骨鸡生产性能及组织黑色素含量的影响[J].动物营养学报,2010,22(1):181-186
ZHAO Yan-ping, LI Guang-hong, QU Ming-reng, et al. Effects of dietary tyrosine levels on performance and melanin contents in tissues of Taihe silky fowls aged from 1 to 4 weeks [J]. Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(1): 181-186
- [5] Iris U, Raquel T V, Lorena M P, et al. Hesperetin induces melanin production in adult human epidermal melanocytes [J]. Food and Chemical Toxicology, 2015, 80:80-84
- [6] 孙亚真,谢明勇,涂勇刚,等.乌骨鸡黑色素的高效液相色谱法测定[J].分析测试学报,2008,27(12):1363-1366
SUN Ya-zhen, XIE Ming-yong, TU Yong-gang, et al. Determination of melanin from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) by HPLC [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2008, 27(12): 1363-1366
- [7] 蒋明,李智,董莲花,等.乌鸡黑色素的提取和测定及黑色素过度沉积相关基因的研究进展[J].国外畜牧学-猪与禽,2016,36(4):77-79
JANG Ming, LI Zhi, DONG Lian-hua, et al. Research development in extraction and determination of melanin from black-bone silky fowl and genes related to melanin over-deposition [J]. Animal Science Abroad-Pigs and Poultry, 2016, 36(4): 77-79
- [8] Fernandes B, Teresa Matamá, Diana Guimarães, et al. Fluorescent quantification of melanin [J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2016, 29(6): 707-712
- [9] 王蕾.荧光分析法在药物分析中的应用[J].课程教育研究,2014(27):249-250
WANG Lei. Application of fluorescence analysis in pharmaceutical analysis [J]. Course Education Research, 2014(27): 249-250
- [10] Dong M, Liu C, Li S, et al. Polymerizing dopamine onto Q-graphene scaffolds towards the fluorescent nanocomposites with high aqueous stability and enhanced fluorescence for the fluorescence analysis and imaging of copper ions [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 232: 234-242
- [11] 王书涛,陈东营,王兴龙,等.荧光分析法和 ABC-BP 神经网络相结合的多环芳烃的检测[J].中国激光,2015,42(11):265-272
WANG Shu-tao, CHEN Dong-ying, WANG Xing-long, et al. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons combining fluorescence analysis with ABC-BP neural network [J]. Chinese Journal of Lasers, 2015, 42(11): 265-272
- [12] Xiao Wei, Zhen dong Zhang, Zhen Hong-wang. A simple dopamine detection method based on fluorescence analysis and dopamine polymerization [J]. Microchemical Journal, 2019, 145: 55-58
- [13] Rosenthal M H, Kreider J W, Shiman R. Quantitative assay of melanin in melanoma cells in culture and in tumors [J]. Anal. Biochem., 1973, 56(1), 91-99

- [14] Kayatz P, Thumann G, Luther T T, et al. Oxidation causes melanin fluorescence [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(1): 241-246
- [15] 钱凡柯,廖娟,陈鲜鑫,等.沐川乌骨黑鸡体重与肤色性状的相关性分析[J].*黑龙江畜牧兽医*,2018,4:195-197
QIAN Fan-ke, LIAO Juan, CHEN Xian-xin, et al. Correlation analysis between body weight and skin color traits of Muchuan black-bone silky fowl [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018, 4: 195- 197
- [16] 田颖刚,赵溪雁,乔娟娟,等.乌骨鸡黑色素氧化降解产物成分初探[J].*食品工业科技*,2013,34(12):86-89
TIAN Ying-gang, ZHAO Xi-yan, QIAO Juan-juan, et al. Analysis of oxidative degradation product of melanin from black-bone silky fowl [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(12): 86-89
- [17] W I Stephen. *Compendium of Analytical Nomenclature* [M]. Oxford: IUPAC, 1998.
- [18] 卢秋榕,韦迎春,黎慧,等.荧光分析法测定芒果叶总黄酮含量的研究[J].*广州化工*,2016,44(20):85-87
LU Qiu-rong, WEI Ying-chun, LI Hui, et al. Determination of total flavanoid in leaves of mango by spectrofluorimetry [J]. *Guangzhou Chemical industry*, 2016, 44(20): 85-87
- [19] Niaz S K. *Validation of analytical procedures* [J]. Chapter, 2009, 14(1): 68-69
- [20] 王欢欢,张乐,李庆海,等.高效液相色谱法同时测定乌骨鸡肌肉中的黑色素与肌苷酸[J].*中国家禽*,2014,36(21): 12-16
WNAG Huan-huan, ZHANG Le, LI Qing-hai, et al. Simultaneous determination of melanin and IMP in black-bone chicken muscles with high performance liquid chromatography [J], *China poultry*, 2014, 36(21): 12-16
- [21] 潘珂,黎观红,朱年华,等.不同生长阶段泰和乌骨鸡体内黑色素含量比较测定[J].*饲料工业*,2011,32(21):15-17
PAN Ke, LI Guan-hong, ZHU Nian-hua, et al, Comparison of melanin content in Taihe silky chickens at different growth stages [J]. *Feed Industry*, 2011, 32(21): 15-17
- [22] 黄宇玫,田颖刚,朱胜.乌骨鸡黑色素三步法提取及结构性状研究[J].*食品工业科技*,2014,35(1):249-253
HUANG Yu-mei, TIAN-Ying-gang, ZHU sheng. Three stage extraction and structural characters of melanin from black-bone silky fowl [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(1): 249-253
- [23] 廖娟,王钢,喻世刚.乌骨鸡肤色性状的遗传研究进展[J].*当代畜牧*,2017,6:33-36
LIAO Juan, WANG Gang, YU Shi-gang. Advances in genetic research of skin color traits in black-bone chickens [J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2017, 6: 33-36
- [24] 李瑞成,尚永彪,管俊峰.乌骨鸡黑色素及其研究进展[J].*肉类研究*,2010,10:54-59
LI Rui-cheng, SHANG Yong-Biao, GUAN Jun-feng. Research on melanin from black-bone silky fowl [J]. *Meat Research*, 2010, 10: 54-59

(上接第 282 页)

- [14] 张莉,鄢明华,王东,等.猪伪狂犬病毒环介导等温扩增检测方法的建立[J].*中国兽医科学*,2011,41(7):723-727
ZHANG Li, YAN Ming-hua, WANG Dong, et al. Establishment of loop-mediated isothermal amplification assay for pseudorabies virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Sciences*, 2011, 41(7): 723-727
- [15] Ming Gao, Jin Cui, Yudong Ren, et al. Development and evaluation of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 185(1): 18-23
- [16] 于新友,李天芝.环介导等温扩增技术及其在猪病原检测中的应用研究进展[J].*猪业科学*,2016,33(7):38-43
YU Xin-you, LI Tian-zhi. Research progress of ring-mediated isothermal amplification technology and its application in detection of swine pathogens [J]. *Pig Science*, 2016, 33(7): 38-43
- [17] 侯康华.猪伪狂犬病诊断与病毒分离鉴定及 gB、gC、gE 基因序列分析[D].咸阳:西北农林科技大学,2018
HOU Kang-hua. Diagnosis and identification of pseudorabies in pigs and gB, gC, gE gene sequence analysis [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2018
- [18] 彭金美,安同庆,赵鸿远,等.猪伪狂犬病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J].*中国预防兽医学报*,2013,35(1):1-4
PENG Jin-mei, AN Tong-qing, ZHAO Hong-yuan, et al. Isolation and identification of new epidemic strains of pseudorabies virus and antigen differential analysis [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(1): 1-4