

天然黑素结构分析进展

★ 王琴 (江西中医学院药学系 南昌 330004)

★ 陈晓东 (南京大学化学化工学院 南京 210093)

关键词:天然黑素;结构分析;进展

中图分类号:R 914.4 文献标识码:A

天然黑素是一种重要的生物资源,具有特殊的生物学功能。天然黑素具有强吸光性能,可发挥光感受器屏蔽、体温调节、光电保护等作用,避免紫外线引起的急、慢性改变;也具有清除自由基、抗氧化功能,从而起到预防癌变、抗衰老、提高机体免疫力的作用^[1,2]。近年来,还发现一些天然黑素在体外对肝诱导的肝损伤有保护作用^[3],对艾滋病毒也有显著抑制作用^[4]。但是由于天然黑素是不规则聚合的复杂生物大分子化合物,具有特殊的理化性质,应用常规的结构分析方法难以对其结构进行鉴定,从而使得天然黑素结构至今尚未确定,也因此限制了天然黑素作为药品、食品添加剂的研究和开发。因此采用恰当的分析方法研究天然黑素结构,是实现相关药品、食品研究和开发的重要前提。本文旨在对近年来国内外应用紫外-可见光谱、红外光谱、质谱、热降解、气相色谱、质谱以及顺磁共振谱等分析方法研究天然黑素结构的现状作一综述。

1 天然黑素的分类、生物合成和理化性质

天然黑素广泛存在于动物、植物和微生物体内,是目前已知的最多最广的生物色素之一。根据颜色、化学组成(含氮量与含硫量的差异)及颗粒形状分为真黑素、棕黑素和异黑素。真黑素(eumelanin)是黑色或深棕色的含氮不含硫大分子。棕黑素(phaeomelanin)是红色、黄色或棕色等颜色的含硫、氮的大分子,其颜色浅于真黑素。异黑素(allomelanin)呈棕色或黑色,主要存在于植物中。

天然黑素生物合成的途径对理解聚合方式的特征有重要作用。在生物合成中,黑素形成于黑色素细胞中,其数量及种类由各种酶和反应物来决定。现普遍认为,真黑素的生物合成遵循经典的 Raper-

Mason 途径^[5];棕黑素合成途径与真黑素相似,但还涉及到半胱氨酸或谷胱甘肽的参与。

天然黑素不溶于水、酸性溶液以及常见的有机溶剂:乙酸、(正)己烷、丙酮、苯和氯仿等;略溶于碱性溶液,在碱性 FeCl_3 以及 $\text{pH} < 3$ 的溶液中析出。过氧化氢、高锰酸钾、重铬酸钾和次氯酸钠能使其褪色;在硫酸亚铁或氰铁酸盐溶液中产生蓝色^[6]。天然黑素在体内与蛋白质、多糖结合紧密,不易分离。通常利用其在碱性溶液中溶解,而在酸性溶液中形成沉淀的性质,以及酸水解去除与黑素结合的蛋白质、碳水化合物和脂类物质的方法分离纯化黑素。也可利用酶降解方法去除蛋白质,以达到纯化黑素的目的^[7]。

2 天然黑素的结构分析

2.1 紫外-可见光谱分析 天然黑素分子中含有大量共轭结构及生色团和助色团。因此,可用紫外-可见光谱对其进行初步分析。如 Sava VM^[6]等利用紫外扫描从茶叶中提取所得黑素的磷酸盐缓冲液,结果发现在 275~280 nm 处有一明显尖峰。Novellino L 等^[8]紫外扫描牛虹膜黑素的肉豆蔻基三甲基铵溴化物溶液,在 315 nm 有最大吸收峰。

2.2 红外光谱(IR)分析 IR 特征性比紫外光谱强,可提供化合物官能团、化合物类别等结构信息。近年来,IR 被广泛应用于天然黑素的官能团分析中。

对黑发黑素、香蕉皮黑素、芝麻黑素等几种天然黑素的 IR 光谱研究发现,天然黑素在 1600 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} 附近都有芳环骨架振动引起的较强吸收峰,在 $860 \sim 650 \text{ cm}^{-1}$ 范围的吸收带弱,表明芳环被取代,形成共轭体系,芳氢相对减少;在 3400 cm^{-1}

附近存在的较强共轭吸收峰,说明天然黑素分子中含有羟基(-OH)和氨基(-NH)结构;在 $1\,650\sim 1\,710\text{ cm}^{-1}$ 的较强吸收峰,说明分子中有羧基(-COO)结构,与 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 处的强吸收峰共同指示羧酸根(-COOH)的存在^[9]。

IR 光谱也可用来比较不同来源黑素的结构差异。如头发黑素在 $1\,535\text{ cm}^{-1}$ 处具有由噻嗪环振动引起的特征吸收峰;香蕉皮黑素、葵花子皮黑素具有较多-OH,因此在 $1\,250\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰强;乌贼黑素在 $3\,420\text{ cm}^{-1}$ 处有-NH 的强吸收峰;芝麻黑素在 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,620\text{ cm}^{-1}$ 处有吡啶和酞式结构单元的强吸收峰^[9]。比较黑发黑素与红发黑素的 IR 图谱,两者的主要差别在于红发黑素在 $1\,100\text{ cm}^{-1}$ 左右显示强的吸收峰,在 $2\,800\sim 2\,900\text{ cm}^{-1}$ 范围的吸收带比黑发黑素强,说明红发黑素含较多脂肪族 C-H^[10]。

黑素易与金属离子作用,形成络合物。研究黑素-金属络合物的 IR 图谱,可推测黑素-金属络合物结构及络合方式。在不同 pH 条件下,黑发、红发黑素与铜离子(Cu^{2+})形成络合物。比较它们的 IR 图谱,结果发现随着 pH 从 2.0 到 5.0 逐渐升高, $1\,700\text{ cm}^{-1}$ 附近-COO 吸收峰强度逐渐减弱; $1\,200\text{ cm}^{-1}$ 附近-OH 的吸收峰亦随之逐渐减弱。表明 Cu^{2+} 可能与-COOH、-OH 键合,从而形成金属-羧酸盐络合物。同时根据金属-羧酸盐络合物 COO-的振动吸收带,可推测铜离子-黑素络合物的键合形式。铜离子-黑素络合物在 $1\,580\sim 1\,600\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带表明其键合形式主要是离子型、 $1\,600\sim 1\,615\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带表明络合物具有离子-共价过渡态的特征、 $1\,615\sim 1\,630\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带表明络合物键合形式主要是共价键形式。黑发黑素-铜离子络合物在 $1\,600\sim 1\,615\text{ cm}^{-1}$ 的强吸收,即表明其具有离子-共价过渡态的特征;红发黑素-铜离子络合物在 $1\,615\sim 1\,630\text{ cm}^{-1}$ 的强吸收带表明其主要是以共价键形式键合^[10]。

应用 IR 光谱研究黑素分子官能团和键合可获得令人满意的结果。但是对于结构未知的化合物,IR 图谱只能提供其官能团、键合等方面的信息。因此,对于结构复杂的黑素生物大分子,单独应用 IR 光谱难以确定其结构。

2.3 质谱 质谱是研究分子结构的有效方法,可通过离子碎片获得的信息推测未知物的分子量、分子

结构。Novellino L 等^[8]通过基质辅助激光解析质谱对应用酶降解方法获得的人发黑素和牛虹膜黑素进行分析。通过解析质谱图的离子碎片信息,推测出牛虹膜黑素的分子结构。但是,运用相同方法分离得到的人发黑素质谱图含有许多 $400\sim 1\,000\text{ Da}$ 范围未确定峰,难以解析。通过匀浆组织,蔗糖梯度快速离心法获得的,不经酶降解的牛虹膜黑素在 7、25、49 kDa 附近也有难以确定的离子峰簇。结果说明应用质谱对天然黑素进行分析,可能会因为来源和提取方法不同而影响分析。

随着质谱联用技术的不断发展,气相色谱/质谱法被广泛用于化合物的分离、分析。此项技术首先利用气相色谱对化合物进行分离、然后用质谱给出分离化合物的分子结构信息。尹佩玉等^[11]将黑芝麻黑素进行碱熔降解,并对降解产物进行硅烷化衍生,通过气相色谱/质谱联用分析,结果发现产物中含有儿茶酚、对苯酚和儿茶酸,从而证明黑芝麻黑素是儿茶酚型黑素。

运用质谱分析的物质纯度要求高,一般分离方法所得黑素杂质多、纯度不够,而且不同来源和提取方法也可能造成质谱图复杂、难解析。

2.4 热降解/气相色谱/质谱(Py/GS/MS)法 Py/GS/MS 是利用居里点热解器在高温情况下对黑素进行热降解,气相色谱对降解产物进行分离,再通过质谱给出降解产物的分子结构信息。应用 Py/GS/MS 联用技术分析黑素热降解产物组分可以推测黑素结构特征,获得黑素的结构单元信息。根据 Py/GS/MS 分析所得的黑素热分解图谱之间的差别,也可对不同来源黑素的相似性作出客观评价^[12]。

Latocha M 等^[13]通过分析合成多巴黑素与天然果蝇黑素的 Py/GS/MS 热分解图,发现合成多巴黑素具有大量吡咯、酚、苯并乙炔基团;果蝇黑素富有甲苯、酚、2-甲基吡啶基团。聚类分析表明:合成多巴黑素与果蝇黑素有明显差别,相似度仅为 32.2%。而不同颜色果蝇的黑素所含各基团比例也有差异。黑果蝇黑素与灰果蝇黑素的差异小,两者均含有大量苯基、吡啶基、吡啶衍生物,无含硫基团,相似度为 97.8%,都是真黑素;黄果蝇黑素具有甲硫醇、苯并甲硫醇、3-羟苯并噻吩等含硫结构单元,属于棕黑素。

Py/GS/MS 联用技术的热降解图谱通常很复杂,必须在专业统计技术指导下应用和解析。同时,

Py/GS/MS 大多用于比较不同来源黑素的结构差别,而不单独用于鉴定未知结构的黑素。

2.5 顺磁共振谱(EPR) EPR 适用于研究大分子有机物与顺磁金属离子的作用,可以提供关于配位原子、氧化状态、配位方式和配体几何结构、类型等信息。天然黑素具有强大抗氧化功能,如能络合金属离子,减少金属离子对细胞的损伤。应用 EPR 研究金属离子对黑素结构的影响,不仅帮助人们分析黑素结构,也为研究黑素药理作用机制提供依据。

Chodurek E 等^[14]利用 EPR 研究在黑素合成过程中,顺磁性铜离子(Cu^{2+})和反磁性锌离子(Zn^{2+})与多巴黑素的结合作用,比较黑素和黑素-金属络合物的自由基性质。结果发现多巴黑素、 Zn^{2+} -多巴黑素都具有 o-半醌自由基特有的单 EPR 谱线; Cu^{2+} -多巴黑素的 EPR 谱自由基信号完全猝灭,共振吸收谱显示 Cu^{2+} 信号。以上结果说明反磁性 Zn^{2+} 能增强多巴黑素自由基耦极作用、稳定黑素聚合物自由基,增加多巴黑素自由基浓度;顺磁性 Cu^{2+} 与黑素自由基之间的偶极-偶极作用引起黑素自由基浓度降低,从而导致 Cu^{2+} -多巴黑素 EPR 谱自由基信号猝灭。

Stainsack J 等^[15]通过 EPR 谱研究氧化钒(VO)、铜离子与合成黑素的配位化学。氧化钒-黑素络合物 EPR 参数表明 VO 具有轴对称结构,与黑素氧配位原子结合;根据 EPR 特征参数 A 值与 g 值相关性、氧化钒易与酚羟基进行 π 耦合、络合物 IR 谱中氧-钒(O-V)键在 970 cm^{-1} 频率低,推测黑素结构中存在大量以儿茶酚为主、能与氧化钒螯合的酚羟基,氧化钒-黑素络合物具有四氧原子络合结构。铜-黑素络合物 EPR 显示 X-对称;根据 g 与 A 比值、谱线分裂数,推测 Cu^{2+} 与 2 个吡啶环氮、2 个-COO 的氧原子配位形成具有四方平面结构的铜-黑素络合物。

综上所述,国内外学者在天然黑素的结构分析方面已做了大量研究。但天然黑素的分子结构仍不完全明确。因此,有必要综合应用各种分析方法对黑素及其络合物的结构、性质等进行更深入的研究,为天然黑素的开发、应用奠定基础。

参考文献

[1] Nirmal DP, Premalatha B, Hemant L, et al. Melanin: dietary mucosal immune modulator from Echinacea and other botanical supple-

ments[J]. International Immunopharmacology, 2005, 5(4): 637~647

[2] Chakraborty DP, Roy S. Chemical and biological aspects of melanin [J]. The Alkaloids, 2003, 60: 345~391

[3] Hung YC, Sava VM, Blagodarsky VA, Hong MY, Huang GS. Protection of tea melanin on hydrazine-induced liver injury[J]. Life sciences, 2003, 72(9): 1 061~1 071

[4] Manning JT, Bundred PE, Henzi P. Melanin and HIV in sub-Saharan Africa[J]. Journal of Theoretical Biology, 2003, 223(1): 131~133

[5] Prota, G. Melanins and melanogenesis[M]. San-Diego: Academic Press, 1998

[6] Sava VM, Yang SM, Hong MY, et al. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols[J]. Food Chemistry, 2001, 73(2): 177~184

[7] Blinova MI, Yudinseva NM, Kalmykova NV, et al. Effect of melanins from black yeast fungi on proliferation and differentiation of cultivated human keratinocytes and fibroblasts[J]. Cell Biology International, 2003, 27(2): 135~146

[8] Novellino L, Napolitano A, Prota G. Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1475(3): 295~306

[9] 王岩, 刘学惠, 陆懋荪, 等. 几种天然黑素分子结构的红外光谱表征研究[J]. 分析实验室, 1996, 15(6): 63~65

[10] Bilińska B. On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interactions with Cu^{2+} ions [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2001, 57(12): 2 525~2 533

[11] 尹佩玉, 陆懋荪, 孔庆山, 等. 气相色谱/质谱法鉴定黑芝麻中黑素的类型[J]. 色谱, 2001, 19(3): 268~269

[12] Bleasel MD, Aldous S, Davies NW, et al. Distinction between melanins derived from different precursors using pyrolysis /gas chromatography /mass spectrometry and the NIST mass spectral search algorithm[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2003, 70(2): 649~663

[13] Latocha M, Chodurek E, Kurkiewicz S, et al. Pyrolytic GC-MS analysis of melanin from black, gray and yellow strains of *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2000, 56(1): 89~98

[14] Chodurek E, Pilawa B, Dzierzega-Lecznar A, et al. Effect of Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on DOPA-melanin structure as analyzed by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and EPR spectroscopy [J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2003, 70(1): 43~54

[15] Stainsack J, Mangrich AS, Maia CMBF, et al. Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin[J]. Inorganica Chimica Acta, 2003, 356(3): 243~248

(收稿日期: 2005-05-16)