

H₂O₂ 氧化-荧光分析法测定乌骨鸡黑色素细胞中黑色素含量

陈露露¹, 田颖刚^{1,2*}

1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047

2. 南昌大学生物转化教育部工程研究中心, 江西 南昌 330047

摘要 建立一种简单、准确、灵敏度高的测定乌骨鸡黑色素细胞中黑色素含量的荧光分析法。黑色素不发光,一旦在强烈的氧化条件下(在碱性过氧化氢中加热)被氧化后就会发出强烈的荧光,通过测量其相对荧光强度来测定细胞中黑色素的含量。利用荧光分光光度计在带宽为 5 nm,扫描速度为 2 400 nm·min⁻¹,扫描间距为 1 nm 的条件下确定乌骨鸡黑色素的激发波长和发射波长。通过单因素实验筛选浓度范围在 10~100 μg·mL⁻¹ 的乌骨鸡黑色素的最佳氧化条件,对该方法的线性范围、检测限、仪器精密度、重复性等结果进行分析评价。向 A375 细胞(无黑色素的人的黑色素瘤细胞)样品中分别加入 25, 40 和 80 μg·mL⁻¹ 黑色素标准品,在最佳氧化条件下进行反应后测定细胞样品中黑色素含量。计算测定值与理论值的相对误差值,意在探究细胞中杂蛋白和脂质对黑色素定量结果的影响;向乌骨鸡黑色素细胞样品中分别加入 5.00, 7.50 和 10.00 μg 的黑色素标准品,按照最佳氧化条件测定其细胞样品中总黑色素含量,并计算其加标回收率。结果表明:乌骨鸡黑色素的激发波长为 354 nm,发射波长为 453 nm;乌骨鸡黑色素最佳氧化条件为:pH 为 8,氧化温度为 55 °C,过氧化氢浓度范围为 24%~26%,氧化时间为 2 h;黑色素浓度在 10~100 μg·mL⁻¹ 范围内与相对荧光强度呈良好线性关系,相关系数 $r=0.9974$,线性回归方程为 $b=0.0147a+0.3138$,荧光分析法的方法检出限为 0.30 μg·mL⁻¹,紫外分光光度法的方法检出限为 3.68 μg·mL⁻¹;精密度实验的 RSD 值为 1.87%,重复性实验的 RSD 值为 4.59%;在 A375 细胞中加入不同质量的黑色素标准品后,测量值与理论值的相对误差分别为 2.78%, 3.53% 和 0.25%;在乌骨鸡黑色素细胞中加入不同黑色素标准品后,测得的加标回收率分别为 95.94%, 92.14% 和 99.83%, RSD 值为 4.00%;综上所述,该方法简单、准确、稳定、检测限低,且测定结果不受细胞内杂蛋白以及脂质的干扰,更适用于测定乌骨鸡黑色素细胞中黑色素的含量。

关键词 乌骨鸡;黑色素细胞;黑色素含量;荧光分析法

中图分类号: O657.39 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)05-1595-06

引言

乌骨鸡(black-bone silky fowl, BSF) 作为我国特有的药食两用的资源,具有补肝肾、益气血,尤其在增强体力、补血、治疗糖尿病和妇科疾病等方面效果显著^[1]。与其他品种鸡相比,较显著差别在于乌骨鸡体内含有较多的黑色素。现代科学研究已证实黑色素具有抗氧化、抗衰老、抗诱变等众多生理功能^[2]。

乌骨鸡黑色素是由黑色素细胞生成,且广泛分布于乌骨鸡许多组织和器官表面,如皮肤、肌肉、心脏、肾脏、消化器

官和骨骼等。本实验室已建立了乌骨鸡黑色素细胞的培养体系^[3],这对于乌骨鸡黑色素的进一步研究具有重要意义。目前黑色素含量的测定方法有称重法^[4]、色差仪比色法^[5]、紫外-可见分光光度法^[6]和高效液相色谱法(HPLC)等^[7]。前两种方法可粗略地测定出黑色素含量,但在测定过程中可能会受到一些不溶于水的杂质的干扰^[8]。研究证实,紫外分光光度法有一定的不足之处:(1)假阳性:黑色素在测量过程中会出现散射和假吸收。(2)高背景:黑色素样品中会有残留的蛋白,这些蛋白会使背景偏高,导致测量值较大。高效液相色谱法(HPLC)也用于黑色素定量测量,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

收稿日期:2019-04-06,修订日期:2019-08-19

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课题(SKLF-ZZB-201520)资助

作者简介:陈露露,女,1993年生,南昌大学食品科学与技术国家重点实验室硕士研究生 e-mail: 1126830970@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: yinggangtian@163.com

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^[9-11]。

目前对于黑色素细胞中的黑色素含量的测定,主要采用 NaOH 裂解法^[12-14],该方法是将黑色素细胞在加热的 NaOH 中裂解,再采用酶标仪在 400 nm 左右测定其吸光值来定量细胞中黑色素的含量。由于该方法与紫外分光光度法的原理相同,都是采用朗伯-比尔定律,因此也存在和紫外分光光度法相同的缺点和不足,因此建立一种测定细胞中黑色素含量的新方法显得至关重要。

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。与传统方法相比,荧光检测方法具有线性范围宽、灵敏度高以及操作简单等优点。Fernandes 等^[10]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,并且可用于定量测定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。目前,尚未采用荧光分析法测定乌骨鸡黑色素细胞中含量。

本研究旨在建立一种荧光定量乌骨鸡黑色素细胞中黑色素的新方法,并进行方法学验证,这将为乌骨鸡黑色素细胞中黑色素的生成机理以及调控的进一步研究奠定了基础,也为测定其他更加复杂的生物组织中的黑色素含量提供了参考。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

乌骨鸡苗(5 日龄)由江西泰和提供。胶原酶 I (Sigma 公司), DMEM 培养基(北京索莱宝公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶(北京博大泰克生物基因技术有限公司),乙二胺四乙酸(EDTA, Sigma 公司),十四烷酰佛波醇乙酯(TPA, 美国 Sigma 公司),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, 美国 Sigma 公司),过氧化氢(30%, 50%)(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),其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

F-4500 荧光分光光度计,日本日立公司;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;INC153 型细胞培养箱,德国 memmert 公司;DG5033A 型酶标仪,南京华东电子集团医疗装备有限责任公司;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;电热恒温水浴锅 HH-4,上海森信实验仪器有限公司;低速台式离心机 80-2B,上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

1.3.1.1 乌骨鸡黑色素细胞培养

取乌骨鸡鸡苗,处死,3% Na₂S 脱毛,蒸馏水擦洗,浸没于 75% 乙醇中。在超净工作台取皮肤组织,置于培养皿中,用 PBS 漂洗两遍,并除去血块和肌肉等杂质。用 0.25% 氯霉素-青链霉素/PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。PBS 漂洗两遍后加

入 0.25% 胰蛋白酶-0.53 mmol · L⁻¹ EDTA 置于 37℃ 水浴消化 90 min, 10% FBS/DMEM 完全培养基终止反应。400 目无菌筛网过滤消化液,1 500 r · min⁻¹ 离心 5 min 后收集细胞,按 1 × 10⁶ 个 · mL⁻¹ 的细胞浓度接种于 25 cm² 培养瓶中,加入 10% FBS, 10 ng · mL⁻¹ TPA, 20 ng · mL⁻¹ bFGF, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞融合至 90% ~ 100% 后进行传代。本文选用第 3 代进行后续实验。

1.3.1.2 A375 细胞的培养

取培养至对数生长期的 A375 细胞,按 4 × 10⁵ 细胞个数接种于无菌培养瓶中,加入含 10% FBS 的 DMEM,置于 37℃, 5% CO₂ 恒温恒湿培养箱中培养。

1.3.2 乌骨鸡黑色素激发波长和发射波长的测定

制备乌骨鸡精制黑色素(本研究以精制黑色素为黑色素标准品)^[15],取浓度为 100 μg · mL⁻¹ 的乌骨鸡黑色素标准品 0.5 mL 于 25 mL 的锥形瓶中,加入终浓度为 24% 的过氧化氢溶液,使反应液体积达到 2.5 mL,调节体系的 pH 值为 8,避光,55℃ 孵育 2 h,超声 10 min,用蒸馏水定容到 5 mL,混匀,3 500 r · min⁻¹ 离心 5 min,取上清,利用 F-4500 荧光分光光度计,在狭缝宽度 5 nm、扫描速度为 2 400 nm · min⁻¹ 以及扫描间距为 1 nm 条件下对反应液进行荧光扫描,确定其最佳激发波长和发射波长。

1.3.3 标准曲线制作

分别配制质量浓度为 10, 20, 40, 60, 80 和 100 μg · mL⁻¹ 的乌骨鸡黑色素标准溶液,各取 0.5 mL 于 25 mL 的锥形瓶中,按照 1.3.2 的反应条件,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。

1.3.4 过氧化氢浓度对相对荧光强度的影响

取浓度为 100 μg · mL⁻¹ 的乌骨鸡黑色素标准品 0.5 mL,加入终浓度分别为 6%, 10%, 14%, 18%, 22%, 24% 和 26% 的过氧化氢溶液,其余氧化条件同 1.3.2,测定其相对荧光强度,确定最佳过氧化氢浓度。

1.3.5 氧化时间对相对荧光强度的影响

取浓度为 10 和 100 μg · mL⁻¹ 的乌骨鸡黑色素标准品 0.5 mL,加入终浓度为 24% 的过氧化氢溶液,分别孵育 40, 60, 80, 100, 120 和 140 min,其余氧化条件同 1.3.2,测定其相对荧光强度,确定最佳氧化时间。

1.3.6 pH 值对相对荧光强度的影响

取浓度为 10 和 100 μg · mL⁻¹ 的乌骨鸡黑色素标准品 0.5 mL,加入终浓度为 24% 的过氧化氢溶液,调节体系的 pH 值分别为 6, 7, 8, 9 和 10,其余氧化条件同 1.3.2,测定其相对荧光强度,选择最佳 pH 值。

1.3.7 细胞中黑色素含量的测定

待细胞培养结束后,吸取细胞上清,PBS 清洗 1 遍,加入 0.5 mL 0.25% 胰蛋白酶-0.53 mmol · L⁻¹ EDTA 进行消化,含 10% FBS 的 DMEM 终止消化,收集细胞悬液,PBS 清洗两遍,1 500 r · min⁻¹ 离心 5 min,细胞沉淀中加入 0.5 mL 的 0.15 mol · L⁻¹ NaOH,80℃ 超声 1 h,按照 1.3.2 的氧化条件进行反应,测定其相对荧光强度值。

1.3.8 方法检出限的测定与计算

按照 1.3.3 的测定方法,测定 10 份空白样品的相对荧

光强度,采用紫外分光光度法^[16]测定 10 份空白样品的吸光值,按照式(1)计算方法检出限^[17-18]

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

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。

1.3.9 统计学分析

所得数据和图表的制作采用 EXCEL(2019 版)和 Origin9.0 软件进行处理,数据的统计分析采用 SPSS17.0 软件。数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本之间比较用单因素的方差分析,两两比较采用 LSD 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $p < 0.05$ 表示有显著性差异, $p < 0.01$ 表示有极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 乌骨鸡黑色素细胞形态

如图 1 所示,乌骨鸡黑色素细胞如其他黑色素细胞一样,胞内充满了黑色素颗粒,由于其生理状态不同,细胞中的黑色素含量也不同。由图可知,第 1 代黑色素细胞(a)中含有的黑色素含量显著高于第 2 代黑色素细胞(b)。

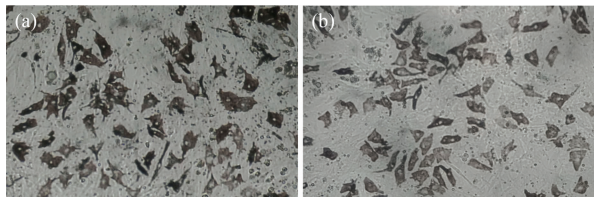


图 1 乌骨鸡原代黑色素细胞形态

(a): 第 1 代乌骨鸡黑色素细胞; (b): 第 2 代乌骨鸡黑色素细胞

Fig. 1 Morphological of primary melanocytes of Black-bone silky fowl

(a): The first generation of BSF melanocytes;

(b): The second generation of BSF melanocytes

2.2 乌骨鸡黑色素激发波长和发射波长

按照 1.3.3 测定方法,测定乌骨鸡黑色素标准品以及乌骨鸡黑色素细胞中黑色素的荧光光谱。由图 2 和图 3 可知,激发光均在 354 nm 的荧光强度最大,发射光均在 453 nm 的荧光强度最大,因此乌骨鸡黑色素的激发波长为 354 nm,发射波长为 453 nm。

2.3 过氧化氢浓度对相对荧光强度的影响

如图 4(a)所示,当过氧化氢的浓度范围在 6%~24% 之间时,相对荧光强度值随着过氧化氢浓度的增大而增大,当浓度达到 24% 时,相对荧光强度值开始趋于平稳,经统计学分析,过氧化氢浓度在 24% 时的相对荧光强度值显著高于 22% ($p < 0.05$),与浓度为 26% 时的相对荧光强度无显著差异,这表明过氧化氢最佳浓度范围在 24%~26% 之间,本文选用 24% 为过氧化氢的工作浓度。

2.4 氧化时间对相对荧光强度的影响

当氧化时间在 60~140 min 的范围内,浓度为 10 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黑色素标准品的相对荧光强度如图 4(b)所示,

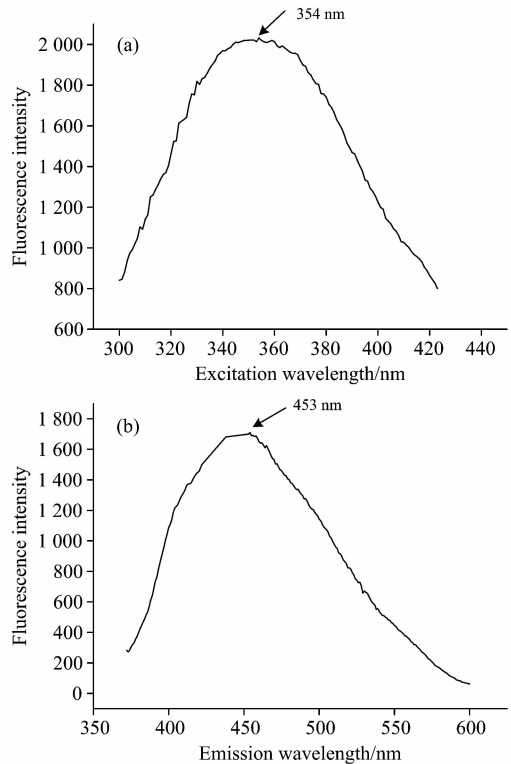


图 2 乌骨鸡黑色素标准品激发光谱和发射光谱

Fig. 2 Excitation spectrum and emission spectrum of the BSF standard

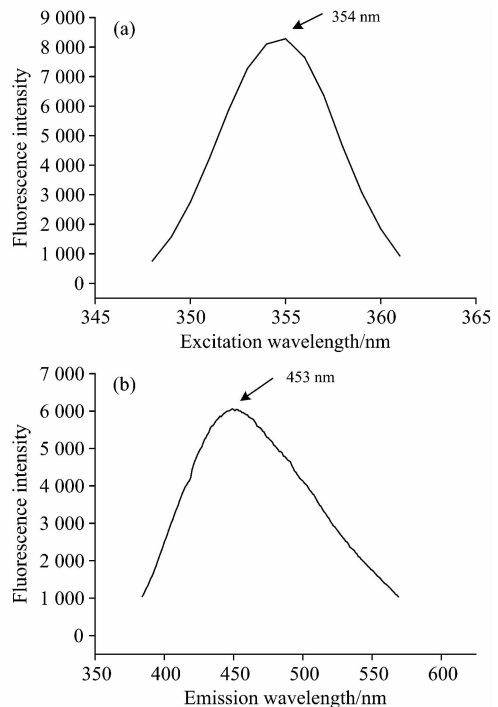


图 3 乌骨鸡黑色素细胞中黑色素激发光谱和发射光谱

Fig. 3 Excitation spectrum and emission spectrum of melanin in BSF melanocyte

当黑色素标准品浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 氧化不同时间后所测得的相对荧光强度之间无显著差异, 当黑色素标准品浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 相对荧光强度在 120 min 处最大, 且显

著大于 100 min 处的相对荧光强度值 ($p < 0.01$), 因此最佳氧化时间为 120 min。

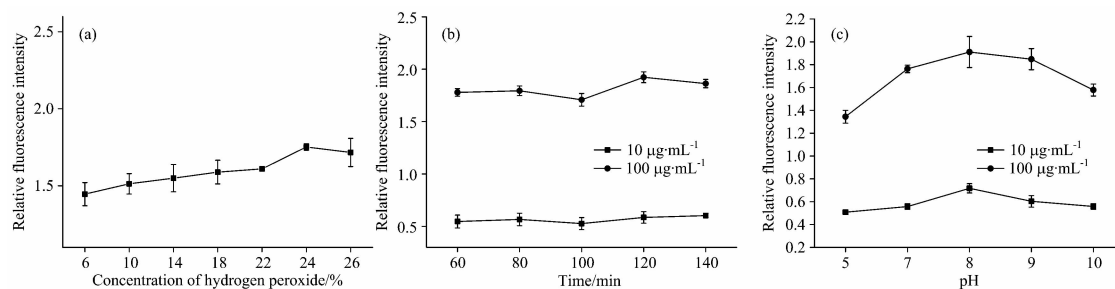


图 4 各因素对相对荧光强度的影响

Fig. 4 Effect of various factors on the relative fluorescence intensity

2.5 pH 值对相对荧光强度的影响

如图 4(c) 所示, 黑色素标准品的浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, pH 8 时的相对荧光强度显著大于其他 pH 值的相对荧光强度 ($p < 0.01$); 当黑色素标准品的浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 值为 8 时的相对荧光强度最大, 与 pH 值为 9 时的相对荧光强度并无显著性差异。综上所述, 黑色素的氧化反应的最佳 pH 值为 8。

2.6 线性回归分析及检测限

按照 1.3.2 的方法, 得回归方程为 $b = 0.014 7a + 0.313 8$ (b 为相对荧光强度, a 为浓度), $r = 0.997 4$, 线性范围在 $10 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 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。按照 1.3.8 的方法计算可得荧光分析法的方法检出限为 $0.30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 紫外分光光度法的方法检出限为 $3.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 这表明荧光分析法的检测限较低, 更适用于细胞内黑色素含量的测定。

2.7 精密度和重复性

精密量取细胞悬液, 按照 1.3.7 的方法连续测定 5 次, 其相对荧光强度值分别为 0.93, 0.97, 0.96, 0.97 和 0.95, RSD 值为 1.87%, 表明仪器精密度良好。

精密量取 3 份相同的细胞悬液, 按照 1.3.7 的方法分别测定, 其相对荧光强度分别为 0.93, 1.00 和 0.93, RSD 值为 4.59%, 表明其重复性较好。

2.8 加标回收实验

精密量取 15 份的 A375 细胞悬液, 分成三组, 每组加入浓度分别为 25, 40 和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黑色素标准溶液, 按照 1.3.7 的方法测定其黑色素含量, 每个加标水平平行测定 5 次, 如表 1 所示, 测得的黑色素含量分别为 24.30, 41.41 和 $80.17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 则相对误差分别为 2.78%, 3.53% 和 0.25%。

精密量取 15 份的黑色素细胞悬液, 分成三组, 每组分别加入质量为 5.00, 7.50 和 $10.00 \mu\text{g}$ 的黑色素, 按照 1.3.7 的方法测定其黑色素含量, 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 2, 回收率在 95.94% ~ 99.83% 之间, 平均回收率 95.57%, RSD 值为 4.00%, 表明该方法较准确。

表 1 加标回收实验(人恶性黑色素瘤细胞)

Table 1 Standard addition recovery experiment(A375)

理论值 / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ (mean \pm SD)	相对误差 /%
25	24.30 ± 0.98	2.78
40	41.41 ± 1.76	3.53
80	80.17 ± 3.46	0.25

表 2 加标回收实验(乌骨鸡黑色素细胞)

Table 2 Standard addition recovery experiment
(the BSF melanocytes)

序号	样品黑色素/ μg	加标量/ μg	测得黑色素总量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	12.04	5.00	16.83 ± 0.60	95.94		
2	12.04	7.50	18.95 ± 0.38	92.14	95.97	4.00
3	10.57	10.00	20.49 ± 0.69	99.83		

2.9 乌骨鸡黑色素细胞中黑色素含量的测定

按照 1.3.7 的方法测定不同代数的乌骨鸡黑色素细胞中黑色素的含量如表 3 所示, 第 1、2 代的乌骨鸡黑色素细胞中的黑色素含量分别为 $7.06 \mu\text{g}/10^4$ 个细胞、 $3.36 \mu\text{g}/10^4$ 个细胞。这表明在体外培养的乌骨鸡黑色素细胞中, 细胞中黑色素含量随着代数的升高有下降的趋势。

表 3 乌骨鸡黑色素细胞中黑色素含量的测定

Table 3 Determination of melanin content
in BSF melanocytes

乌骨鸡黑色素细胞代数	相对荧光强度	黑色素细胞数	黑色素含量/ $(\mu\text{g}/10^4$ 个细胞)
第 1 代	1.58 ± 0.03	1.22×10^5	7.06
第 2 代	1.66 ± 0.05	2.723×10^5	3.36

采用 NaOH 裂解法测定细胞中的黑色素含量时, 一些杂质与蛋白也会溶于 NaOH 中产生一定的吸收从而影响定量结果, 使结果偏大^[19]。本研究通过在 A375 细胞(无黑色素的人的黑色素瘤细胞)中添加不同浓度的黑色素标准品(25,

40 和 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 结果显示, 测定值与理论值的相对误差分别为 2.78%, 3.53% 和 0.25%。这表明 A375 细胞中的其他杂蛋白以及脂质不会对黑色素氧化后产生的荧光有贡献。有研究已经证实, 采用荧光分析法测定黑色素时, 其他杂蛋白以及脂质对测定结果并无干扰^[20]。为了进一步证实该方法的准确性, 在乌骨鸡黑色素细胞中也分别添加了不同质量的乌骨鸡黑色素标准溶液, 所得的回收率在 92.14%~99.83% 之间, 平均回收率为 95.97%, RSD 值为 4.00%, 回收率较高, 这表明该方法较准确可靠。黑色素溶解性较差, 采用紫外分光光度法测定细胞中黑色素色的前提条件是黑色素需要完全溶解在碱液中, 而荧光分析法在样品前处理过程中只需黑色素混悬在碱液中, 简化了分析操作过程。并且通过比较可知, 荧光分析法的方法检测限比紫外分光光度法低至少 10 倍。

综上所述, 荧光分析法是一种简单、准确、检测限低, 灵敏度较高的细胞中黑色素含量的测定方法, 该方法的建立将为乌骨鸡黑色素细胞中黑色素的生成机理以及调控的进一步研究奠定了基础, 也为测定其他更加复杂的生物组织中的

黑色素含量提供了参考。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。

3 结 论

建立了荧光定量乌骨鸡黑色素细胞中黑色素的新方法, 通过筛选得出乌骨鸡黑色素在 10~100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内的最佳氧化条件: pH 值为 8, 氧化温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 过氧化氢浓度在 24%~26% 之间, 氧化时间为 2 h。该方法稳定、可靠, 仪器精密度较高, 重复性较好, 且加标回收率较高, 测定结果不受细胞中的杂蛋白以及脂质的影响, 且准确可靠, 成本较低、灵敏度高、检测限比紫外分光光度法低至少 10 倍、仪器操作简单, 能够较好地应用于乌骨鸡黑色素细胞中黑色素含量的测定。该方法的首次建立将为乌骨鸡黑色素细胞中黑色素合成过程的调控以及乌骨鸡黑色素的深入开发利用奠定了坚实的基础, 也为测定其他更加复杂的生物组织中的黑色素含量提供了参考。

References

- [1] TIAN Ying-gang, HU Qing-qing, XIE Ming-yong(田颖刚, 胡清清, 谢明勇). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2018, 38(11): 3563.
- [2] LIU Qing, JIANG Yan, HE Zi-ying, et al(刘青, 江彦, 何资颖, 等). Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine(黑龙江畜牧兽医), 2018, (11): 93.
- [3] TIAN Ying-gang, LIAO Chun-yan, XU De-li(田颖刚, 廖春艳, 徐德利). China Poultry(中国家禽), 2014, 36(12): 6.
- [4] Chen S R, Jiang B, Zheng J X, et al. Food Chemistry, 2008, 111(3): 745.
- [5] ZHANG Kun, BIAN Liang-yong, XU Sheng-hai, et al(张琨, 卞良勇, 许盛海). China Poultry(中国家禽), 2017, 39(15): 12.
- [6] Iris U, Raquel T. V, Lorena M. P. Food and Chemical Toxicology, 2015, 80: 80.
- [7] WANG Huan-huan, ZHANG Le, LI Qing-hai, et al(王欢欢, 张乐, 李庆海, 等). China Poultry(中国家禽), 2014, 36(21): 12.
- [8] LI Rui-cheng, SHANG Yong-biao, GUAN Jun-feng(李瑞成, 尚永彪, 管俊峰). Meat Research(肉类研究), 2010, (10): 54.
- [9] JIANG Ming, LI Zhi, DONG Lian-hua, et al(蒋明, 李志, 董莲花, 等). Animal Science Abroad—Pigs and Poultry(国外畜牧学—猪与禽), 2016, 36(4): 77.
- [10] Fernandes B, Teresa Matamá, Diana Guimarães, et al. Pigment Cell & Melanoma Research, 2016, 29(6): 707.
- [11] Rosenthal M H, Kreider J W, Shiman R. Anal. Biochem., 1973, 56: 91.
- [12] Matsuda H, Hirata N, Kawaguchi Y, et al. Biol. Pharm. Bull., 2005, 28: 1229.
- [13] WANG Ya-lan, LIU Zi-jun, LI Qi-ling, et al(王亚兰, 刘子君, 李绮玲, 等). Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine(辽宁中医杂志), 2018, 45(1): 111.
- [14] TU Cai-xia, ZHANG Rong-xin, LIU Ya-ling, et al(涂彩霞, 张荣鑫, 刘亚玲, 等). Chinese Journal of Dermatology(中华皮肤科杂志), 2006, (7): 400.
- [15] TIAN Ying-gang, ZHAO Xi-yan, QIAO Juan-juan, et al(田颖刚, 赵溪雁, 乔娟娟, 等). Science and Technology of Food Industry(食品工业科技), 2013, 34(12): 86.
- [16] Delijewski M, Beberok A, Otreba M, et al. Environmental Research, 2014, 134: 309.
- [17] IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, 1998.
- [18] ICH. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B.
- [19] Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Analytical Biochemistry, 1993, 215(2): 273.
- [20] Kayatz P, Thumann G, Luther T T, et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001, 42(1): 241.

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

CHEN Lu-lu¹, TIAN Ying-gang^{1,2*}

1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

2. Engineering Research Center of Biomass Conversion, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Abstract We established a simple, accurate and highly sensitive fluorescence analysis method for detecting the melanin content of Black-bone Silky Fowl (BSF) melanocytes for the first time. Melanins did not fluoresce but, once they were subjected to oxidative conditions (heating in alkaline hydrogen peroxide solution), they acquired strong fluorescence. Melanin content of melanocytes was determined by measuring its relative fluorescence intensity. In this paper, the excitation wavelength and emission wavelength of BSF melanin were determined by fluorescence spectrophotometer with a bandwidth of 5 nm, scanning speed of 2 400 nm • min⁻¹ and scanning pitch of 1 nm. The optimal oxidation conditions of BSF melanin in the range of 10~100 μg • mL⁻¹ were screened by a single factor experiment. The linear range, detection limit, instrument precision and repeatability of the method were analyzed and evaluated. 25, 40 and 80 μg • mL⁻¹ melanin standards were added to samples of A375 cells (melanoma cells without melanin), and the melanin content in the cell samples was determined after that the reaction was carried out under optimal oxidation conditions. Calculate the relative error value of the measured value and the theoretical value for exploring the effect of heterologous proteins and lipids in cells on the quantitative results of melanin; After that 5.00, 7.50 and 10.00 μg melanin standards were added to BSF melanocyte samples, the total melanin content in the cell samples was determined under optimal oxidation conditions and then the spiked recovery was calculated. The results showed that the BSF melanin had an excitation wavelength of 354 nm and an emission wavelength of 453 nm; The optimal oxidation conditions for BSF melanin were as follows; the PH value was 8, oxidation temperature was 55 °C, hydrogen peroxide concentration ranged from 24% to 26% and oxidation time was 2 h; The concentration of melanin in the range of 10~100 μg • mL⁻¹ showed a good linear relationship with the relative fluorescence intensity. The correlation coefficient was 0.997 4 and the linear regression equation was $y=0.0147x+0.3138$. The detection limit of the method of fluorescence analysis was 0.30 μg • mL⁻¹ and the detection limit of ultraviolet spectrophotometry was 3.68 μg • mL⁻¹. The RSD value of the precision experiment was 1.87%, and the RSD value of the repeat experiment was 4.59%. After adding melanin standards of different quality to A375 cells, the relative errors of measured values and theoretical values were 2.78%, 3.53%, and 0.25%, respectively; After adding different melanin standards to BSF melanocytes, the measured recovery rates were 95.94%, 92.14%, 99.83% and the RSD value was 4.00%. In summary, the method was simple, accurate, stable, and low detection limit. In addition, the measurement result was not interfered by intracellular heteroprotein and lipid. So the method was more suitable for determining the content of melanin in BSF melanocytes.

Keywords Black-bone silky fowl; Melanocyte; Melanin content; Fluorescence analysis

(Received Apr. 6, 2019; accepted Aug. 19, 2019)

* Corresponding author