

山杏种皮黑色素提取工艺研究^{*}

姚增玉,赵 忠,史清华,李科友,朱海兰,马希汉,马玉花

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 研究了提取溶剂及其浓度、提取温度和有无氮气保护及提取时间对山杏种皮黑色素提取效果的影响,并对提取的山杏种皮黑色素与人工合成的多巴黑色素的理化性质进行了比较。结果表明,该黑色素适宜于用 0.5 mol/L NaOH 在 60 ℃ 下提取 2 次,每次 12 h,提取宜在氮气下进行,以防止黑色素的过度氧化。在该工艺条件下,经过酸水解和进一步有机溶剂洗涤及反复沉淀纯化以后,可从 5 g 山杏种皮中得到黑色素 237 mg,得率为 4.73%;山杏种皮黑色素中总多酚含量较高,约为 262 mg/g。山杏种皮黑色素与合成多巴黑色素的理化性质非常相似,不溶于水和常见的有机溶剂,在 1 mol/L KOH 溶液中完全溶解,pH 小于 3 时发生沉淀,可被 KMnO₄、K₂Cr₂O₇、NaClO 和 H₂O₂ 氧化漂白,多酚定性反应呈阳性;在紫外-可见光区没有吸收峰,红外光谱中在 3 400 cm⁻¹ 附近和 1 650~1 620 cm⁻¹ 各有一个强的吸收带。

[关键词] 山杏;种皮;黑色素;提取工艺;理化性质

[中图分类号] S662.209.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0120-07

Isolation of melanin from testae of *Prunus ameniaca* Linn.

YAO Zeng-yu, ZHAO Zhong, SHI Qing-hua, LI Ke-you, ZHU Hai-lan,

MA Xi-han, MA Yu-hua

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Melanin was extracted from testae of *Prunus ameniaca* first and the effective extraction of melanin was explored. The result showed the melanin was suitable to be extracted twice with 0.5 mol/L NaOH at 60 ℃ for 12 h, and the operation should be carried out under nitrogen to avoid excessive oxidation. After acid hydrolysis, further purification with organic solvents and repeated precipitation, 4.73% yield of melanin was obtained. The melanin from testae of *Prunus ameniaca* contained higher total phenolic content, about 262 mg gallic acid equivalents per gramme. The physicochemical properties of the melanin from testae of *Prunus ameniaca* showed a strong similarity to these of synthetic DOPA melanin. They were insoluble in both water and common organic solvents but dissolved only in alkali, while precipitated in alkaline FeCl₃ and when pH is below 3, and were bleached in KMnO₄, K₂Cr₂O₇, NaClO and H₂O₂, and produced a blue color with FeSO₄/ferricyanide. In the ultraviolet and visible range of wavelengths the melanin absorption spectrum represents the decreasing line. The infrared spectra had the same strong absorption peaks as the broad band at 3 400 cm⁻¹ and at 1650 - 1620 cm⁻¹, respectively.

Key words: *Prunus ameniaca*; testae; melanin; isolation; physicochemical property

黑色素(Melanin) 普遍存在于生物界,是一类 结构复杂多样的酚类或吲哚类生物大分子色素的总

* [收稿日期] 2006-11-30

[基金项目] 国家林业局“948”项目(2004-4-52)

[作者简介] 姚增玉(1974-),男,陕西定边人,在读博士,主要从事森林培育研究。

[通讯作者] 赵 忠(1958-),男,甘肃宁县人,教授,博士生导师,主要从事森林培育研究。

称^[1],可为生物体提供结构性强度或保护生物免受紫外线、电离辐射、重金属污染、低温和高温等环境胁迫的伤害^[2]。黑色素不仅是一类光保护剂、抗辐射剂、螯合剂、生物抗氧化剂^[3]和免疫促进剂^[4],而且还是一类生物半导体材料^[5]。近年来的研究还发现,黑色素具有抗蛇毒^[6]、抗癌^[7]、抑制艾滋病毒复制^[8]、治疗帕金森症^[9]等作用。因此,黑色素在医药、化妆品、食品、电子等领域有着广泛的应用前景。目前,黑色素既可以通过酪氨酸或其衍生物的氧化进行化学合成^[10],也可以从动植物材料中提取^[8,11],还可以利用微生物合成^[12-13]。相比而言,植物黑色素安全性较高,应用范围更广,但生产中仍缺乏黑色素含量高且具有开发利用价值的原料。

山杏(*Prunus ameniaca* Linn.)是我国北方重要的经济树种和水土保持树种,杏仁在各国面包、糖果、饮料等的生产中广泛应用,其种皮是杏仁深加工过程中产生的下脚料。据笔者初步测定,其种皮约占杏仁质量的5%。国外已有利用此下脚料提取天然酚类化合物的报道^[14-18],但还未见从中提取黑色素的研究报道。以山杏种皮为原料提取黑色素可以变废为宝,提高杏仁深加工企业的经济效益。各种生物来源的黑色素性质差异很大,因此提取方法也不尽相同。本研究以山杏种皮为原料,以期确定从中提取黑色素的最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料

去壳杏仁购自陕西省麟游县。带回实验室用热烫法剥取种皮,种皮用自来水冲洗干净,摊放在室内自然干燥后揉碎,室温下保存备用。Folin-Ciocalteu试剂和作为标准品的合成多巴(Dihydroxyphenylalanine, DOPA)黑色素购自Sigma公司(美国),其他试剂均为分析纯。试验中所用的去离子水在使用前煮沸1~2 h。

1.2 山杏种皮中黑色素的提取

1.2.1 黑色素提取工艺流程 称取5.0 g山杏种皮,放入150 mL锥形瓶中,加入100 mL去离子水煮沸15 min后过滤,以除去水溶性杂质和排除材料中的氧气。向滤渣中加入75 mL提取溶剂,经过一段时间提取后,用棉布进行粗滤,滤液15 000 g离心30 min,上清液用2 mol/L HCl溶液调pH=2.5,使黑色素沉淀,室温静置2 h,离心分离,其沉淀即为山杏种皮黑色素粗提物。

1.2.2 黑色素提取工艺条件优化试验 根据预试

验确定提取溶剂、温度、有无氮气保护和提取时间为影响山杏种皮黑色素提取效果的关键因素。采用单因素和双因素试验相结合以优化黑色素提取工艺。

(1) 提取溶剂浓度的确定。以0.5~2.0 mol/L NaOH水溶液为提取溶剂,在60℃下提取6 h。

(2) 提取温度和氮气保护的确定。以0.5 mol/L NaOH水溶液为溶剂,在空气中或氮气保护下于室温(25~30℃)和40,60,80,100℃下分别提取6 h。

(3) 提取时间的确定。以0.5 mol/L NaOH水溶液为提取溶剂,在氮气保护下提取6~36 h。

1.3 山杏种皮黑色素的纯化

经过上述提取工艺得到的山杏种皮黑色素粗提物在10倍体积的7 mol/L HCl溶液中于100℃水解2 h,以除去与之结合的糖类、蛋白质等^[19]。冷却后10 000 g离心分离黑色素颗粒,再分别用有机溶剂(乙醇、乙酸乙酯、丙酮)反复处理洗涤,以除去脂肪、单宁、花青素和木质素等杂质^[8]。具体做法为:将山杏种皮黑色素与溶剂按质量体积比1:100混合后振荡30 min,然后离心分离,每种溶剂重复洗涤至上清液无色为止。黑色素固体颗粒用0.5 mol/L NaOH水溶液超声辅助溶解并离心,上清液用2 mol/L HCl溶液调pH至2.5,使之沉淀,离心,所得沉淀再用质量分数0.2%氨水溶解,离心取上清液,酸化使之沉淀,再用质量分数0.2%氨水溶解,离心,酸化上清液使黑色素沉淀,如此反复4次,以除去低分子质量的多酚,提高山杏种皮黑色素的均一性。将得到的凝胶状黑色素放入-5℃的冰箱中使之冻结,然后室温下解冻,所得到的颗粒状山杏种皮黑色素用去离子水洗涤至离心上清液Cl⁻定性检测为阴性,最后真空干燥。

山杏种皮黑色素溶液参照Sava等^[4]的方法配制。将22 mg纯化干燥后的黑色素用10 mL质量分数0.2%的氨水,在氮气保护下超声辅助溶解,用旋转蒸发仪减压抽去氨气,直至pH值达7.5,最后用去离子水稀释至所需浓度。

1.4 山杏种皮黑色素中总多酚含量的测定

总多酚含量的测定采用Folin-Ciocalteu法^[20]并略有改进,其值用没食子酸含量表示(mg/g)。将1 mL山杏种皮黑色素溶液、没食子酸标准溶液或去离子水(作为空白对照)分别加入20 mL试管中,然后加入5 mL 0.1 mol/L Folin-Ciocalteu试剂摇匀,并在室温下静置5~8 min。再加入4 mL Na₂CO₃溶液(75 g/L),摇匀后室温下静置2 h,最后3 000 g

离心 10 min,测定 760 nm 处的吸光度。

1.5 山杏种皮黑色素与多巴黑色素理化性质的比较

1.5.1 黑色素的光谱分析 紫外 - 可见光光谱用 mini-1240 紫外 - 可见分光光度计(日本岛津公司)分析,黑色素溶液浓度为 27 mg/L。红外吸收光谱分析采用 KBr 压片法,用 Thermo Avatar 330 型傅里叶红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)记录。

1.5.2 黑色素的定性分析 山杏种皮黑色素定性鉴定参照前人通用的方法^[21-23]。即以在水和常见的有机溶剂中的溶解性,可被 KMnO₄、K₂Cr₂O₇、NaClO 和 H₂O₂ 等强氧化剂漂白,多酚反应呈阳性等黑色素普遍具有的性质对山杏种皮黑色素进行定性鉴定,并以合成的多巴黑色素作为对照。

1.6 统计分析

试验采用完全随机设计,每一个处理独立重复 3 次。所有试验数据均采用 SAS v 8.1 软件(美国)进行分析。山杏种皮黑色素得率/ %=(黑色素干质量/ 山杏种皮干质量) ×100 %。

2 结果与分析

2.1 山杏种皮黑色素提取条件的优化试验

2.1.1 提取溶剂浓度对提取效果的影响 黑色素在生物体内一般与蛋白质、糖类等其他成分相结合,因此从植物材料中提取黑色素是一个化学过程。提取黑色素一般采用碱溶液作为提取溶剂,多采用氨水或 NaOH^[8,24-25]。经预试验可知,山杏种皮黑色素的提取用氨水作为提取溶剂,提取率较低,且加热提取时容易挥发,若采用密闭加压提取,则操作复杂,因此本研究以不同浓度的 NaOH 溶液为提取溶剂进行对比研究。由图 1 可见,NaOH 浓度对黑色素得率有极显著影响($P < 0.01$),从山杏种皮中提取黑色素适宜的 NaOH 浓度为 0.5 mol/L。

2.1.2 提取温度与氮气保护对提取效果的影响 由表 1 可知,温度对黑色素得率、纯黑色素干质量/

粗提物湿质量的比率和总多酚含量均有极显著影响($P < 0.01$)。在本试验所设定的条件下,黑色素得率与温度呈正相关,在室温下黑色素几乎不能被提取出来,因此未作进一步分析。由表 1 还可以看出,在温度高于 60 后,纯黑色素/ 粗提物的比率明显下降,即有较多的杂质被提取出来,给进一步纯化带来不便。氮气保护对得率、纯黑色素/ 粗提物的比率(与空气相比)均无显著影响。植物黑色素是一类由酚类单体组成的大分子物质,具有还原性,易于被氧化。前人的研究表明,在氧化过程中,酚羟基转变为醌基^[26]。因此,本试验用测定总多酚含量的方法来衡量不同提取条件下所得黑色素的氧化程度。由表 1 可以看出,40 下有无氮气保护对总多酚含量的影响无显著差异,但 60 ~ 100 时氮气保护可有效减轻山杏种皮黑色素的氧化程度($P < 0.01$)。黑色素的氧化程度越低,抗氧化能力越强^[3]。因此,综合考虑得率、粗提物中杂质含量和氧化程度 3 个方面认为,从山杏种皮中提取黑色素以 60 为宜,为了防止黑色素的氧化,应在氮气保护下进行。

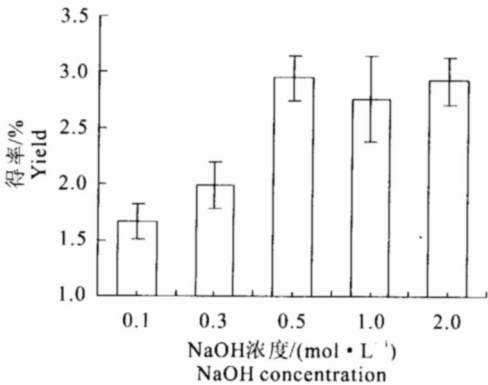


图 1 NaOH 浓度对山杏种皮黑色素得率的影响
Fig.1 Effect of NaOH concentration on the yield of melanin from testae of *Prunus ameniaca* Linn.

表 1 提取温度与氮气保护对山杏种皮黑色素提取效果的影响

Table 1 Effect of temperature and nitrogen protection on extraction of melanin from testae of <i>Prunus ameniaca</i> Linn.						
提取温度/ Temperature	得率/ % Yield		黑色素/ 粗提物 Melanin Pure/ crude		总多酚含量/ (mg · g ⁻¹) Total phenolic content	
	空气 Air	氮气保护 Nitrogen	空气 Air	氮气保护 Nitrogen	空气 Air	氮气保护 Nitrogen
40	1.44 ±0.26	1.53 ±0.27	0.008 ±0.002	0.009 ±0.002	261.56 ±4.66	263.45 ±5.10
60	3.46 ±0.20	3.75 ±0.19	0.017 ±0.001	0.017 ±0.001	229.04 ±3.89	252.17 ±7.87
80	3.98 ±0.31	4.26 ±0.25	0.015 ±0.001	0.014 ±0.001	220.16 ±5.97	251.79 ±7.12
100	4.61 ±0.34	4.72 ±0.34	0.012 ±0.001	0.012 ±0.001	209.56 ±5.49	250.85 ±8.68

注:数值为平均值 ±标准差 (n = 3)。
Note: Values are mean ±S.D. (n = 3).

2.1.3 提取时间对提取效果的影响 图 2 为不同提取时间下山杏种皮黑色素的得率和总多酚含量。从图 2 可见,提取时间对黑色素得率有极显著影响($P < 0.01$)。就得率而言,提取时间以 24 h 为宜,但反应 12 h 后,总多酚含量略有降低。综合考虑应采用多次提取的方法,即提取 12 h 后更换提取溶剂,再提取 12 h。

2.1.4 提取条件优化后的提取效果 以 0.5 mol/L NaOH 为提取溶剂,在 60 ℃ 氮气保护下提取 2 次,每次 12 h,从 5 g 山杏种皮中提取得到 (237 ± 33) mg 黑色素,得率为 $(4.73 \pm 0.66)\%$,所得山杏种皮黑色素总多酚含量为 (262 ± 1.28) mg/g。

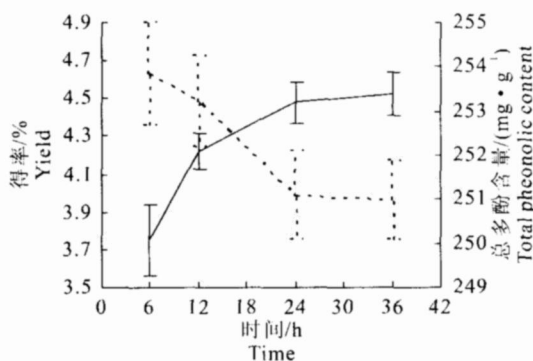


图 2 提取时间对山杏种皮黑色素提取效果的影响
—, 得率; ---, 总多酚含量

Fig. 2 Effect of reaction time on extraction of melanin from testae of *Prunus ameniaca* Linn.
—, Yield; ---, Total phenolic content

2.2 山杏种皮黑色素的理化性质

2.2.1 紫外-可见光光谱 由图 3 可以看出,山杏种皮黑色素的紫外-可见光光谱(200~800 nm)和标准品的合成多巴黑色素非常相似,二者的曲线均随波长的增大而吸光度减小,在紫外区和可见光短波区很宽的波长范围内有较强的吸收,在整个扫描范围内没有明显的吸收峰。但与合成黑色素相比,山杏种皮黑色素在 270~280 nm 处有一较弱的肩峰,这一肩峰是由水解残留蛋白质中的芳族氨基酸残基对光的吸收所引起的^[27-28]。将吸光度取对数对波长回归作图可得到一条斜率为负值的直线,山杏种皮黑色素的回归直线斜率为 -0.003 9,合成多巴黑色素为 -0.003 3。据报道,直线的斜率还与黑色素的氧化程度有关,新鲜配制的多巴黑色素和 *Tuber melanosporum* 黑色素的斜率分别为 -0.001 8和 -0.001 3,其碱溶液在室温下放置 48 h 后,由于氧化,其斜率分别变为 -0.003 3和 -0.002 2^[19]。

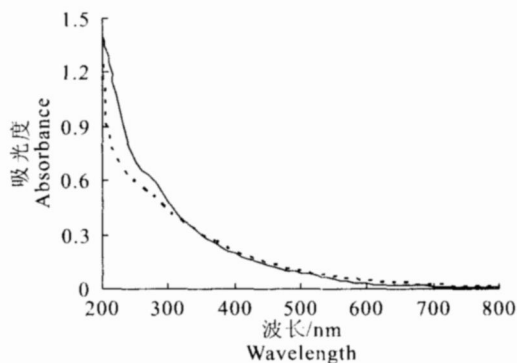


图 3 山杏种皮黑色素和合成多巴黑色素的紫外-可见光谱
—, 山杏种皮黑色素; ---, 多巴黑色素

Fig. 3 UV-Vis spectra of melanin from testae of *Prunus ameniaca* Linn. and DOPA melanin
—, Melanin from testae of *Prunus ameniaca* Linn.; ---, DOPA melanin

2.2.2 红外光谱 红外光谱是研究天然黑色素和人工合成黑色素的重要方法之一,可以给出黑色素结构中主要官能团的信息^[21,29-33]。图 4 为山杏种皮黑色素和对照品人工合成多巴黑色素的红外光谱。从图 4 可以看出,二者的红外光谱均有黑色素所具有的 2 个特征性吸收带:(1)在 3400 cm^{-1} 附近都存在强而宽的共振吸收带,是由 OH 和 NH_2 的伸缩振动产生的;(2)在 $1650 \sim 1620\text{ cm}^{-1}$ 有一强的吸收带,是由芳香 $\text{C}=\text{C}$ 、酰胺 I 中的 $\text{C}=\text{O}$ 和(或) COO^- 的振动引起的。由于黑色素是一类大分子物质,来源不同的黑色素组成的单体也不同,因此其红外光谱也存在一定差异。人工合成多巴黑色素在 $1720 \sim 1710\text{ cm}^{-1}$ 处有一弱的吸收带,这是由许多含 $\text{C}=\text{O}$ 的官能团伸缩振动引起的^[30,34-35]。山杏种皮黑色素该吸收带的缺失可能是由于含 $\text{C}=\text{O}$ 的官能团参与氢键形成,并部分形成离子化羧基造成的^[34,36]。山杏种皮黑色素在 1510 cm^{-1} 附近还有一弱的吸收带,为酰胺 II 带^[2]。

2.2.3 与合成多巴黑色素的性质比较 山杏种皮黑色素与合成多巴黑色素的性质比较结果见表 2。由表 2 可知,二者的性质非常相似,不同之处在于漂白所需时间不同,合成多巴黑色素比山杏种皮黑色素更易被双氧水漂白,但后者则对 NaClO 较为敏感。多巴黑色素、儿茶酚黑色素和 DHN (1,8-dihydroxy-naphthalene) 黑色素等不同类型的黑色素漂白时间不同,这一现象早在 20 世纪 70 年代就有报道^[37]。Harki 等^[19]指出,这种反应速率的不同非常重要,其反映了各种黑色素结构上的差异。

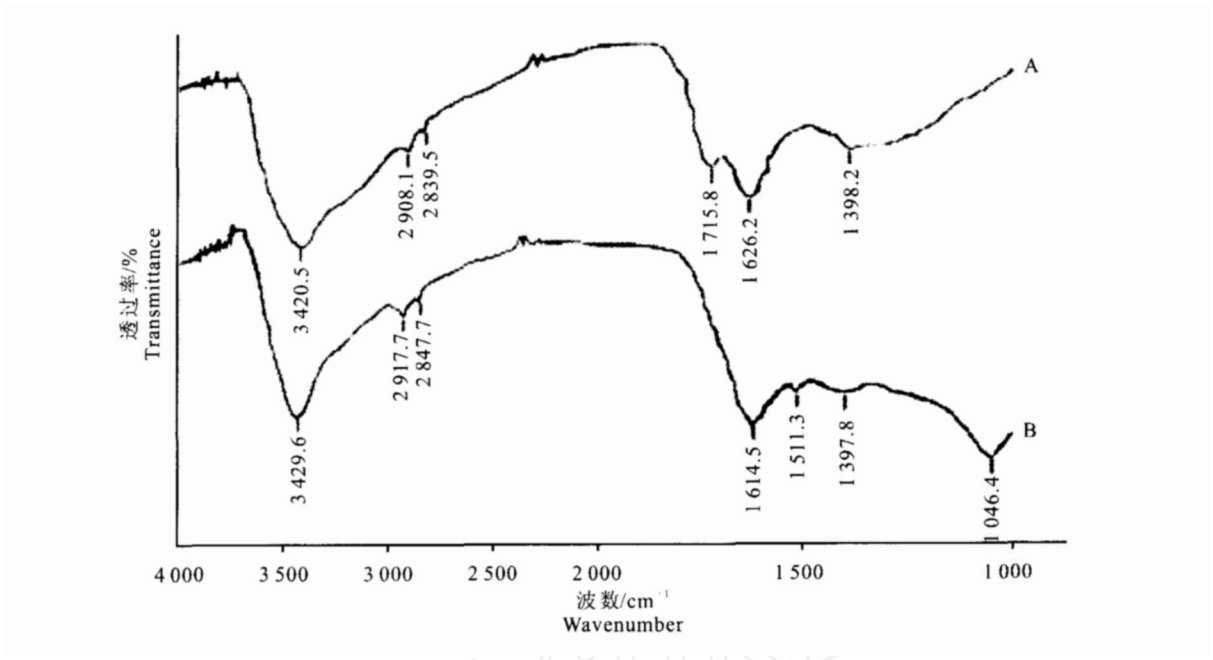


图 4 人工合成多巴黑色素(A)与山杏种皮黑色素(B)的红外光谱

Fig. 4 Infrared spectra of synthetic DOPA melanin (A) and the melanin extracted from testae of *Prunus ameniaca* Linn. (B)

表 2 山杏种皮黑色素与作为标准品的人工合成多巴黑色素的比较试验

Table 2 Diagnostic tests for melanin from testae of *Prunus ameniaca* Linn. and standard synthetic DOPA melanin

试验项目 Test items	山杏种皮黑色素 Melanin from testae of <i>Prunus</i> <i>ameniaca</i> Linn.	合成黑色素 Synthetic melanin	试验项目 Test items	山杏种皮黑色素 Melanin from testae of <i>Prunus</i> <i>ameniaca</i> Linn.	合成黑色素 Synthetic melanin
溶于水 Solubility in H ₂ O	N	N	KMnO ₄ 漂白 Bleached by KMnO ₄	P	P
溶于一般有机溶剂 Solubility in common organic solvents	N	N	NaClO 漂白 Bleached by NaClO	P (2 h)	P (3 h)
溶于 1 mol/L KOH Solubility in 1 mol/L KOH	P	P	H ₂ O ₂ 漂白 Bleached by H ₂ O ₂	P (36 h)	P (2 h)
溶于二甲基亚砷 Solubility in dimethylsulfoxide	P	P	K ₂ Cr ₂ O ₇ 漂白 Bleached by K ₂ Cr ₂ O ₇	P	P
酸性溶液中沉淀 Precipitation by HCl	P(at pH 3)	P(at pH 3)	多酚定性反应 Reaction for polyphenols with FeCl ₃	P	P

注:N. 反应呈阴性;P. 反应呈阳性。
Note :N. negative response ; P. positive response.

3 结论与讨论

植物黑色素的提取和纯化,主要依赖于其溶于碱而在酸中沉淀并抗强酸水解的性质,因此,一般用碱溶液提取黑色素。不同来源的黑色素性质有所不同,适宜的提取条件也有差异,目前一般采用氨水或氢氧化钠水溶液来提取。近年来,已从茶叶^[4,24]、桂花种子^[25]、七叶树^[8]以及其他植物材料中提取出了黑色素。本研究首次从山杏种皮中提取得到了黑色素,该黑色素适宜于用 0.5 mol/L NaOH 在 60 下提取 2 次,每次 12 h,提取宜在氮气保护下进行,

以防止黑色素的过度氧化。植物材料中黑色素的含量一般很低,只有 2~3 g/kg,少数材料可达 60~80 g/kg^[8]。山杏种皮中黑色素含量较高,本研究中,经过酸水解和进一步有机溶剂洗涤和反复沉淀纯化以后,黑色素得率约为 4.73%。
山杏种皮黑色素的理化性质与人工合成多巴黑色素以及其他天然黑色素^[21-23,31,38] 非常相似,不溶于水和常见的有机溶剂,溶于碱溶液,pH 小于 3 时或遇 FeCl₃后产生沉淀,可被 H₂O₂、KMnO₄、K₂Cr₂O₇或 NaClO 等强氧化剂漂白,遇 FeSO₄/ K₃Fe(CN)₆ 产生蓝色。

天然动植物黑色素具有广谱的生物活性,这些活性都是基于其抗氧化性质的^[39-40]。黑色素的这些性质在医疗保健^[41]和功能食品生产方面具有重要意义^[42]。前人研究发现,黑色素的抗氧化活性依赖于其氧化还原状态,可以表现出各种不同氧化还原状态是黑色素的基本性质之一^[41,43],这是由黑色素的酚-醌结构引起的^[3,41]。本研究提取得到的山杏种皮黑色素中总多酚含量较高,约为262 mg/g,因此具有广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] Butler M J, Day A W. Fungal melanins: A review [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(12): 1115-1136.
- [2] 霍夫里特 M, 斯泰因比希尔 A. 生物高分子: 第一卷 木质素、腐殖质和煤 [M]. 郭圣荣, 译. 北京: 化学工业出版社, 2004: 251-273.
- [3] Hung Y-C, Sava V M, Makan S Y, et al. Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states [J]. Food Chemistry, 2002, 78: 223-240.
- [4] Sava V M, Galkin B N, Hong M-Y, et al. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immunostimulating activity [J]. Food Research International, 2001, 34(4): 337-343.
- [5] Guerra, Elidia M. Electrochromic and conductivity properties: A comparative study between melanin-like/ $V_2O_5 \cdot nH_2O$ and polyaniline/ $V_2O_5 \cdot nH_2O$ hybrid materials [J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 2000, 273: 193-197.
- [6] Hung Y C, Sava V, Hong M Y, et al. Inhibitory effects on phospholipase A2 and antivenin activity of melanin extracted from *Thea sinensis* Linn [J]. Life Sciences, 2004, 74(16): 2037-2047.
- [7] El-Obeid A, Al-Harbi S, Al-Jomah N, et al. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production [J]. Phytomedicine, 2006, 13(5): 324-333.
- [8] Kerestes J J R, Kerestes J, Venger L A. Biologically active fraction of vegetable melanin, process for its production and its use: USA, 6576268 [P]. 2003.
- [9] Berliner, David L, Erwin, et al. Methods of treating Parkinson's disease using melanin: USA, 5 210 076 [P]. 1993.
- [10] Pawelek J M, Orlov S J. Soluble melanin: USA, N5618519 [P]. 1997.
- [11] Golounin A V. The method of melanin preparation: Russian, N2083214 [P]. 1997.
- [12] Oloke J K, Click B R. A new, pigment-producing, strain of *Bacillus thuringiensis*: PCT WO 97/41235 [P]. 1997.
- [13] Robisheva Z N, Vinarov, Yu A, et al. The method of microbiological preparation of melanin: Russian, N2186105 [P]. 2000.
- [14] Frison-Norrie S, Sporns P. Identification and quantification of flavonol glycosides in almond seed coats using MALDI-TOF MS [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 2782-2787.
- [15] Harrison K, Were L M. Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of almond skin extracts [J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 932-937.
- [16] Wijeratne S S K, Abour-Zaid M M, Shahidi F. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(2): 312-318.
- [17] Chen C Y, Milbury P E, Lapsley K, et al. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation [J]. Journal of Nutrition, 2005, 135(6): 1366-1373.
- [18] Sang S, Lapsley K, Jeong W S, et al. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus Batsch*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2459-2463.
- [19] Harki E, Talou T, Dargent R. Purification, characterization and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt [J]. Food Chemistry, 1997, 58(1/2): 69-73.
- [20] Spanos G A, Wrolstad R E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38: 1565-1571.
- [21] Paim S, Linhares L F, Magrich A S, et al. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy [J]. Biology and Fertility of Soils, 1990, 10: 72-76.
- [22] Nicolaus R. Melanins [M]. Paris: Hermann, 1968.
- [23] Prota G. Melanins and melanogenesis [M]. San Diego: Academic Press, 1998.
- [24] Sava V, Yang S M, Hong M Y, et al. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols [J]. Food Chemistry, 2001, 73(2): 337-343.
- [25] Wang H S, Pan Y M, Tang X J, et al. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans* 'seeds' [J]. LWT - Food Science and Technology, 2006, 39(5): 496-502.
- [26] Horak V, Gillette J R. A study of the oxidation-reduction state of synthetic 3,4-dihydroxy-DL-phenylalanine melanin [J]. Molecular Pharmacology, 1971, 7: 429-433.
- [27] Nofsinger J B, Weinert E E, Simon J D. Establishing structure-function relationships for eumelanin [J]. Biopolymers, 2002, 67: 302-305.
- [28] Aghajanyan A E, Hambardzumyan A A, Hovsepyan A S, et al. Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin [J]. Pigment Cell Research, 2005, 18(2): 130-135.
- [29] Bull A T. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls: The nature of polysaccharide and melanin constituents [J]. Journal of general Microbiology, 1970, 63: 75-94.
- [30] Schnitzer M, Neyroud J A. Further investigations on the

- chemistry of fungal 'humic acids'[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1975, 7: 365-371.
- [31] Ellis D H, Griffiths D A. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi[J]. Canadian Journal of microbiology, 1974, 20: 1379-1386.
- [32] Senesi N, Miano T M, Martin J P. Elemental, functional infrared and radical characterization of humic acid-type fungal polymers (melanins) [J]. Biology and fertility of soils, 1987, 5: 120-125.
- [33] Bilińska B. Progress of infrared investigations of melanin structures [J]. Spectrochimica Acta, Part A, 1996, 52: 1157-1162.
- [34] Filip Z, Haide K, Beutelspacher H, et al. Comparison of IR spectra from melanins of microscopic soil fungi, humic acids and model phenol polymers[J]. Geoderma, 1974, 11: 37-52.
- [35] Russell J D, Vaughan D, Jones D, et al. An IR spectroscopic study of soil humin and its relationship to other soil humic substances and fungal pigments[J]. Geoderma, 1983, 29: 1-12.
- [36] Saiz J C, Martin M F. Ácidos húmicos de origen fungico? [J]. An Edajol Agrobiol, 1972, 31: 133-141.
- [37] Wheeler M H, Tolmsoff W J, Bell A A, et al. Ultrastructure and chemical distinction of melanins formed by *Verticillium dahliae* from (+)-scytalone, 1,8-dihydroxynaphthalene, catechol and L-3,4-dihydroxyphenylalanine [J]. Canada Journal of Microbiology, 1978, 24: 289-297.
- [38] Escarpa A, Gonzalez M C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 427: 119-127.
- [39] Barr F E. Melanin: The organizing molecule [J]. Medicinal Hypotheses, 1983, 11: 1-140.
- [40] Lukiewicz S. The biological role of melanin I: New concepts and methodological approaches[J]. Folia Histochemica Cytochemica, 1972, 10(1): 93-108.
- [41] Gokce N, Frei B. Basic research in antioxidant inhibition of steps in atherogenesis[J]. Journal Cardiovascular Risk, 1996, 3: 352-357.
- [42] Farr D R. Functional foods[J]. Cancer Letters, 1997, 114(1/2): 59-63.
- [43] Crippa R, Horak V, Protta G, et al. Chemistry of melanins[J]. The Alkaloids, 1989, 36: 253-323.

(上接第 119 页)

- [4] 张改生, 赵惠燕, 吴兆苏, 等. 偏、粘和易型非 1BL/1RS 小麦雄性不育系研究初报[J]. 西北农业学报, 1994, 3(4): 7-12.
- [5] 张改生, 刘宏伟, 王军卫, 等. 陕西省杂种小麦产业现状与发展对策[J]. 陕西农业科学, 1997(3): 7-14.
- [6] 张改生, 刘宏伟, 王军卫, 等. 我国杂种小麦走向生产的关键策略[J]. 科技导报, 1997(10): 27-28.
- [7] Huang Q Y, Zhu Y G. Molecular mechanism of the cytoplasmic male sterility and its fertility restoration in plants [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 1999, 17(Suppl.): 52-60.
- [8] Yao F Y, Xu C G, Yu S B, et al. Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild abortive cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica, 1997, 98: 183-187.
- [9] Kihara H. Characteristic of *Aegilops squarrosa* cytoplasm[C]. Proc 4th Intern Wheat Genet Symp. Columbia USA: [s. n.], 1973: 351-353.
- [10] Franckowiak J D, Maan S S, Williams N D. A proposal for hybrid wheat utilizing *Aegilops squarrosa* cytoplasm[J]. Crop Sci, 1976, 16: 725-728.
- [11] Tsunewaki K. Genome-plasmon interactions in wheat [J]. Japan J Genet, 1993, 68: 1-34.
- [12] Tsunewaki K. Monosomic analysis on the fertility restoration by *Triticum aestivum* Chinese Spring against *Aegilops ovata* cytoplasm [J]. Japan J Genet, 1982, 57: 513-525.
- [13] Kaul M L H. Male sterility in higher plants[C]. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 10. New York: Springer-Verlag, 1988: 517-551.
- [14] Martin J M, Talbert L E, Lanning S P, et al. Hybrid performance in wheat as related to parental diversity [J]. Crop Sci, 1995, 35: 104-108.
- [15] 刘保申, 孙兰珍, 高庆荣, 等. K 型小麦细胞质雄性不育系育性恢复性的遗传研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2000, 31(1): 11-14.
- [16] Huang N, Angeles E R, Domingo J, et al. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker assisted selection using RFLP and PCR[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 313-320.
- [17] Hittalmani S, Parco A, Mew T V, et al. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1121-1128.
- [18] 王心宇, 陈佩度, 张守忠. 小麦白粉病抗性基因的聚合及其分子标记辅助选择[J]. 遗传学报, 2001, 28(7): 640-646.