



天然黑色素的提取、改性和应用

周建良^{1,2}, 王怀雨^{2*}, 童丽萍^{2*}

1. 福州大学先进制造学院, 泉州 362251;

2. 中国科学院深圳先进技术研究院医药所, 深圳 518055

* 联系人, E-mail: hy.wang1@siat.ac.cn; lp.tong@siat.ac.cn

2022-10-11 收稿, 2022-12-20 修回, 2023-01-09 接受, 2023-01-10 网络版发表

国家自然科学基金(82172397)和深圳市基础研究重点项目(JCYJ20220818101414032)资助

摘要 天然黑色素作为自然界中最常见的生物色素之一, 主要来源于动物、植物及微生物, 并且作为一种氨基酸衍生物, 具备良好的生物安全性、抗氧化性、紫外光吸收特性、光热转换性、金属离子螯合性等性能, 因此在药物输送、组织抗炎、光热治疗、医学成像等生物医学领域有着广泛的应用. 然而, 由于天然黑色素的结构成分复杂且来源各异, 所以提取方法也大相径庭, 目前尚缺乏统一的界定标准. 此外, 提取的天然黑色素理化性质并不能完全契合实际需求, 需要对其进行改性以提高不同功能特性, 满足不同应用场景. 针对上述黑色素的研究与产业现状, 本文从天然黑色素的提取、理化性质改性及其在生物医学领域的应用3个方面, 对目前天然黑色素的研究和发展现状进行阐述和总结, 旨在为天然黑色素潜力的开发和应用提供参考.

关键词 天然黑色素, 理化性质, 提取与改性, 黑色素生物医学应用

天然黑色素来源广泛, 存在于各种生物体内, 对生物体应对外界环境发挥巨大的保护作用. 例如, 墨鱼喷出墨水混淆天敌的视线以逃生; 蝴蝶翅膀通过含黑色素的鳞片提供保护色^[1]; 哺乳动物的神经黑色素可以螯合有害金属离子, 有效减缓细胞的氧化应激, 保护大脑免受伤害^[2]. 而在人体中, 黑色素多组织分布, 发挥屏蔽紫外线、调节体温、光保护和抗氧化等作用^[3,4]. 天然黑色素丰富的功能与其化学结构息息相关. 它是由一系列酚氧化衍生物间通过侧链氢键形成的平面状低聚结构或 π - π 堆叠形成的片层状堆叠结构^[5]. 例如, 真黑色素是由吡咯酮形成的聚合物(图1(a), (b)), 以吡咯为基本结构, 衍生出来的各种发色基团与它们所形成的各种低聚物之间相互作用, 引起 π 电子系统的扰动, 使黑色素具备了优异的紫外吸收和光热转化性能^[7]. 同时, 黑色素各个异质单体之间容易发生氧化聚合, 导致天

然黑色素溶解性差, 不溶于水和大部分有机溶剂. 此外, 位于吡咯苯环上的羟基是黑色素抗氧化和金属螯合能力的主要基团, 羟基进一步氧化形成的羰基和其吡咯环上的羧基也同样对上述两种功能起着重要的作用. 天然黑色素的结构也为金属离子提供了大量的螯合位点, 如酚羟基、羧基、吡咯氨基、邻位半醌(图1(c)), 便于黑色素快速响应有毒金属离子刺激、稳定机体内环境. 可见, 天然黑色素成分中功能基团和特定结构及其含量是决定黑色素相应性质的关键因素. 因此, 提高天然黑色素的提取率以及纯化, 并对某些特异性基团进行修饰和改造, 对黑色素性质的发挥至关重要.

1 天然来源的黑色素

不同物种来源的黑色素由于物种间代谢方式的差异其主要组成成分也会有所不同, 这导致天然黑色素

引用格式: 周建良, 王怀雨, 童丽萍. 天然黑色素的提取、改性和应用. 科学通报, 2023, 68: 1406–1420

Zhou J L, Wang H Y, Tong L P. Extraction, modification, and application of natural melanin (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 1406–1420, doi: [10.1360/TB-2022-1009](https://doi.org/10.1360/TB-2022-1009)

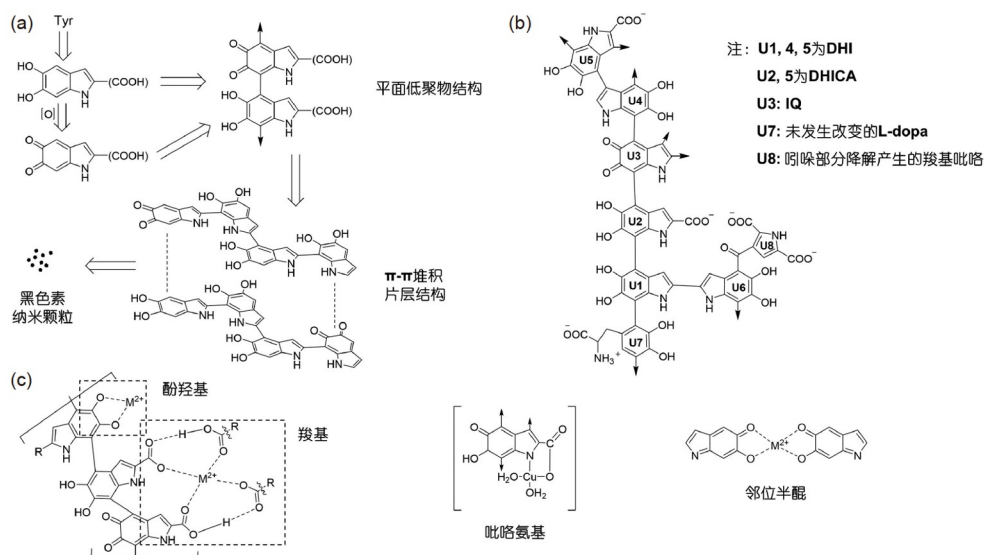


图 1 真黑素的聚合和金属离子螯合方式. (a) 真黑素聚合的概述示意图^[5]; (b) 真黑素低聚物结构聚合形式^[6]; (c) 黑色素不同位点螯合金属离子的结构模型^[8-10]

Figure 1 Polymerization and metal ions chelation of eumelanin. (a) Schematic overview of eumelanin polymerization^[5]; (b) polymerized forms of eumelanin oligomeric structures^[6]; (c) structural models of chelating metal ions at different sites of melanin^[8-10]

结构组成复杂多变. 根据组成结构的不同, 可将天然黑色素分为五类, 其组成和结构单元概述如表1所示.

除了酚氧化物外, 天然黑色素往往还包含多肽、脂质、糖类、无机盐、水等杂质. 在众多来源中, 乌贼墨水因其易获取、提取方便、杂质含量较少而成为理想的天然黑色素提取源. 乌贼墨水不携带大量的组织碎屑, 可直接使用去离子水提取. Xie等人^[14]通过简单的去离子水洗涤方法从乌贼墨水中提取黑色素, 其提取率高达87.1%, 即使是通过反应强烈的酸沉淀收集, 提取率也能达到62.5%. 氨基酸分析仪分析结果表明, 乌贼墨水的总氨基酸含量为6%~8%, 低于头发(14.6%~44%)、乌鸡肉(25.4%)和黑木耳(32.2%)中的氨基酸含量^[15], 这也说明乌贼墨水提取的黑色素相对于其他来源具有更高纯度.

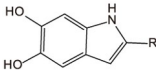
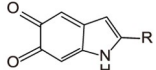
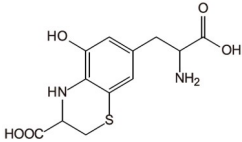
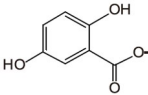
除乌贼墨水外, 人类的头发、动物的毛发和组织以及植物皮层, 由于来源广泛、原料廉价, 也可作为黑色素提取的组织来源. 然而, 这些原料存在提取率低、随机变量多的问题, 限制了它们的应用. 例如, Singh和Prasad^[16]从人类黑发中提取黑色素的最高提取率为22%; Liang等人^[17]从羊驼毛发纤维中提取黑色素的最高提取率仅约为3.73%; Tu等人^[18]从乌鸡肌肉中仅得到0.12%的黑色素提取物; Keles和Özdemir^[19]从葵花籽皮的黑色素提取率也仅为1.95%.

相较于以上来源, 微生物由于来源广泛、生长周

期短、易于培育, 并且其代谢过程易于人工调节, 提取得到的黑色素性能优异, 因而成为优质的黑色素来源之一. 如Zou等人^[15]从黑木耳中提取得到富含褐黑色素和强抗氧化性的黑色素; Lu等人^[20]从成熟高粱黑穗病菌中提取得到具有降血糖活性的黑色素; Zerrad等人^[21]从海洋石莼分离得到的假单胞菌中提取具有水溶性和强抗菌活性的黑色素. 尽管微生物黑色素有诸多优点, 但是野生型菌株的黑色素提取率仍需要进一步提高, 例如, 上述的高粱黑穗病菌的黑色素提取率仅为3.52%, 石莼假单胞菌在培养3 d后的黑色素总含量仅为110 mg/L. 为了提高黑色素产量, 人们用基因技术改造真菌和细菌, 以期提高其体内黑色素含量. 根据不同菌种黑色素合成代谢通路的不同, 常将代谢关键酶(如以酪氨酸为前体、负责氧化的酪氨酸酶和漆酶, 以及以DHN为前体、负责聚合的聚酮合酶)作为改造对象, 可在一定程度上提高黑色素提取率^[22]. 此外, 通过将多种关键酶基因转入大肠杆菌中, 实现多种黑色素同时生产, 也是一种提高黑色素提取率的有效策略^[11]. 微生物扩增速度远快于动物和植物, 以改造后的真菌或细菌作为黑色素的来源, 不仅可以快速地大规模获取黑色素, 还可以利用微生物来源黑色素(尤其是以胞外分泌方式代谢产生的可溶于水的黑色素), 简化提取过程, 减少黑色素损耗, 为黑色素的进一步研究和应用拓展提供有利条件.

表 1 不同黑色素的来源和组成成分

Table 1 Sources and composition of different melanins

种类	来源	组成	结构单元	文献
真黑素 (eumelanin)	动物(乌贼墨水是研究真黑素结构和性质的最佳模型)	L-多巴氧化脱羧或氧化未脱羧产物聚合而来的非均相聚合物, 前体物质包括5,6-二羟基吲哚(DHI)、5,6-二羟基吲哚-2-羧酸(DHICA)、5,6-吲哚醌(IQ)和5,6-吲哚醌-2-羧基(IQCA)	 DHI: R=H, DHICA: R=COOH  IQ: R=H, IQCA: R=COOH	[7,11]
褐黑素 (pheomelanin)	动物	L-多巴与半胱氨酸或其他硫醇化合物反应后的产物聚合成的非均相聚合物, 前体物质包括苯并噻嗪、苯并噻唑	 苯并噻嗪	[7,11]
异黑色素 (allomelanin)	植物、真菌	由前体物质二羟基萘(DHN)氧化衍生得到的非均相聚合物	 苯并噻唑 DHN	[7,11]
神经黑色素 (neuromelanin)	哺乳动物大脑, 其中人脑中含量最多	由前体物质苯并噻嗪和其他吲哚单元氧化聚合而成的非均相聚合物	苯并噻嗪, DHI, DHICA, IQ, IQCA (结构式同上)	[2,7,12]
脓黑素 (pyomelanin)	细菌、真菌	由前体物质L-3,4-二羟基苯丙氨酸的氧化聚合而成的均相聚合物	 L-3,4-二羟基苯丙氨酸	[7,11,13]

2 天然黑色素的提取

除少数微生物外泌的黑色素外, 绝大多数天然黑色素都不溶于水, 但可溶于pH≈11的强碱溶液, 并且在pH<3的溶液中完全沉淀^[23](以下简称碱溶酸沉)。该特点与黑色素单体表面负载电荷和溶液的相互作用有关。其中, 中性至碱性环境会引起黑色素单体表面负电荷进一步脱质子, 使各单体负电荷增加、单体间静电排斥力增强, 从而使得聚合物分散性和溶解度增加。相反, 在低pH下, 质子化作用减少了表面静电荷, 促使各单体聚合, 进而发生沉淀^[24]。上述性质为天然黑色素的

提取提供了基本思路。除碱溶酸沉外, 溶剂法、酶解法也是常用的天然黑色素提取方法, 并且这些方法可以叠加使用, 以提高提取率。各种常规提取方法的优缺点见表2。

2.1 溶剂法

溶剂法主要以无机或有机溶剂, 如去离子水、季铵化合物、咪唑鎓、吡啶鎓、吡咯烷鎓等黑色素不溶的溶液作为提取介质。其中, 有机溶剂提取常采用强氢键受体溶液作为提取介质。这类有机溶剂可与粗提物

表 2 不同黑色素提取方法的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of different melanin extraction methods

提取方法	优点	缺点	文献
溶剂法	反应条件温和, 黑色素原有结构得到保留; 操作简便; 溶剂可循环利用, 环保	除杂程度有限; 溶剂消耗大; 可能会导致分离不完全; 适用对象有限	[14,16,17,25~28]
碱溶酸沉法	除杂效率高; 使用范围广泛; 提取更彻底	反应程度剧烈, 对原有结合破坏性强; 耗时长; 溶剂消耗大; 污染环境	[14,17,19,21,23,29~36]
酶解法	酶促反应温和, 黑色素原有结构得到较好的保留; 除杂率较高; 环保	反应条件要求高; 提取时间长	[4,14,36~40]
水溶性黑色素提取	操作简便; 提取快速; 可持续产出; 黑色素原有结构得到保留	适用对象有限, 仅针对微生物来源的水溶性天然黑色素有效	[41~45]

中的纤维素、角蛋白、角叉菜胶、琼脂糖等生物聚合物竞争氢键, 从而破坏这类聚合物在黑色素外部形成的保护层并将其溶解^[46], 最终释放黑色素。与此同时, 有机溶剂还能与黑色素的羟基、羧基、亚氨基在碱性条件下形成氢键, 导致黑色素单体与其他分子或单体相互分离, 有利于杂质的分离去除^[25]。该方法的大致步骤为: 首先以大量去离子水或有机溶剂直接浸泡, 并充分混匀以溶解离子盐、蛋白和多糖等成分, 然后离心收集黑色素沉淀, 最后将得到的收集物进行冷冻干燥, 得到去除了可溶性杂质的黑色素提取物^[25,28]。该方法最大的优点是不破坏黑色素的原有结构、能最大程度地保留天然黑色素性质。此外, 溶剂法对环境友好, 提取黑色素后的废液中溶解了大量蛋白质和糖类营养物质, 可直接用作肥料^[16]; 有机溶剂也可在后期经乙醇处理, 脱去溶解在其中的蛋白和多糖, 进一步蒸发除去乙醇和多余的水, 便可循环利用^[17]。但是, 溶剂法也有其局限性, 如处理条件温和, 无法破坏粗提物中的共价交联结构, 导致除杂不彻底, 影响提取率。Liang等人^[17]将溶剂法、酸沉淀和碱溶酸沉3种方法用于羊驼毛发纤维黑色素提取, 结果表明, 溶剂法的提取率为三者中最低。使用范围受限是溶剂法的另一个缺点, 例如, 去离子水只能用在易于进行机械分离的原料(如乌贼墨水^[14]、虹膜黑色素^[26]、黑色素瘤黑色素^[27]等); 有机溶剂仅针对含角质层的黑色素原料(如动物的皮毛、人的头发等); 两种溶液均无法用于胞内黑色素的提取。

2.2 碱溶酸沉法

对于更深结构层次和胞内的黑色素, 则需要比溶剂法更为强烈有效的提取方式。此时, 黑色素的碱溶酸沉性质便起到了重要作用。利用碱溶酸沉性质提取黑色素的优势在于: 一方面, 可以通过酸水解键合在黑色

素颗粒上的有机物; 另一方面, 还可以通过调节pH实现黑色素的反复溶解和沉淀, 以便多次、彻底地除杂洗涤。因此, 该方法是黑色素提取中最常用且使用范围最广的方法, 可用于动物^[17,29,30]、植物^[19,23,31]和微生物^[21,32,33]。例如, Ushakova等人^[29]通过碱溶酸沉法从黑水虻中提取黑色素, 并比较了使用碱溶酸沉法和仅用酸沉淀法提取黑色素的提取率和纯度, 结果表明, 碱溶酸沉法得到的黑色素提取率相对较低, 但纯度更高, 性能更佳。Keles和Özdemir^[19]通过碱溶酸沉法从葵花籽皮中提取黑色素; Madkhali等人^[23]通过碱溶酸沉法从廉价的黑种草中提取黑色素。微生物作为优质的天然黑色素来源, 也可以使用碱溶酸沉法来提取。例如, Zer-rad等人^[21]从巴利阿里假单胞菌(*Pseudomonas balearica*)的培养液中提取具有强抗菌活性和抗氧化能力的黑色素, 提取率达到110 mg/L。Zhang等人^[33]从蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus* 58)中提取得到具备优异抗紫外能力的黑色素。尽管该方法能有效地除杂, 但过于强烈的反应条件, 尤其是强酸、强碱的长时间反应会导致黑色素部分脱羧, 从而破坏天然黑色素原有的化学结构, 使其失去部分天然功能, 甚至引入新的杂质, 降低提取率^[14,47]。另外, 提取后的废液会对环境造成污染, 废液的后处理也是一个有待解决的问题。

2.3 酶解法

酶解法是一种介于溶剂法和碱溶酸沉法之间, 且兼具保护性和除杂效率的提取方法。其基本原理为: 通过生物酶破坏动植物或真菌^[36~38]的组织 and 细胞, 释放内部黑色素; 或利用碱性蛋白酶与游离的黑色素粗提液反应, 促使连接在黑色素颗粒上的多肽水解, 纯化黑色素^[48]。与溶剂法相比, 酶解法有着良好的除杂效果; 与碱溶酸沉法相比, 酶解法反应更加温和, 对黑色素结

构的破坏程度低,能很好地保留天然黑色素原有的分子结构,高效的酶促反应还能缩短反应时间^[14].酶解法中如何终止酶解反应是关键,其通常与酸沉法联用.基本原理是经酶解法处理后的黑色素可与强酸短时间反应,利用强酸使酶变性,从而终止酶促反应.同时,粗提的黑色素产物可经酸沉淀进一步纯化.此外,天然黑色素有良好的热稳定性,其分子发生热降解的温度高达900°C^[49],因此也可以采用提高温度的方法终止酶促反应.最后,通过洗涤除去无机盐和水解产生的小分子有机物、冻干,即可得到天然黑色素提取物.酶解法的局限性在于,酶的专一性导致除杂效果有限,需要多种酶配合使用才能去除多种杂质^[4].另外,酶促反应对温度和反应液pH等条件要求严格,也是限制酶解法使用的因素之一.

2.4 水溶性黑色素提取

尽管绝大多数的黑色素不溶于水,但也有少数可溶解于水的天然黑色素存在.例如,链霉菌、苏云金芽孢杆菌和溶杆菌等细菌可以胞外分泌的方式产生可溶于水的黑色素.此类天然黑色素的提取方式则较为简单.例如, Madhusudhan等人^[41]通过倾斜培养的方式,收集链霉菌(*Streptomyces lusitanus*)在培养基表面产生的深色液体并进行烘干,即可得到黑色素粗提物. Wibowo等人^[42]采用正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷等有机溶剂萃取链霉菌(*Streptomyces cavourensis*)的培养液,去除有机杂质后,再通过透析进一步去除无机盐和残余小分子有机物,最后冻干便可得到水溶性黑色素粉末. Aghajanyan等人^[43]通过酸沉淀从苏云金芽孢杆菌的培养液中得到黑色素粗提物,随后以阴离子交换树脂对粗提物进行纯化,得到水溶性黑色素浓缩溶液. Kimura等人^[44]通过将来源于南极的寡营养溶杆菌培养液(*Lysobacter oligotrophicus*)进行酸沉淀和凝胶色谱层析后,洗涤干燥得到水溶性黑色素粉末.值得一提的是,

少数植物体也可作为天然水溶性黑色素的来源, Gil-Avilés等人^[45]将*Randia echinocarpa*果实粉末用去离子水透析后可获得水溶性黑色素.

2.5 其他辅助方法

为了进一步提高复杂组织或胞内黑色素的提取率,同时减少操作流程,提高效率,一些辅助方法应运而生.其中,微波辅助提取法^[50]、超声波辅助提取法^[20,51]、超高压辅助提取法^[52]是目前较常用的方法.微波辅助提取法是利用强透射力的电磁波使水、细胞内基质、活性化合物等极性分子快速振动,体系温度迅速升高,进而使得胞内压力增加,挥发性物质蒸发,最终导致细胞壁或质膜破裂^[53],胞内黑色素得以释放.超声波辅助提取法则是通过超声波产生的机械力学作用、空化效应和热效应来破坏细胞^[20],在释放黑色素的同时,还能促使黑色素分散性增加,有利于黑色素随液体流出^[54].超高压辅助提取法是指将100 MPa以上的流体静压力施加在细胞和溶剂上,当细胞内外达到压力平衡后迅速卸压,从而使胞内物质冲出^[55].黑色素提取辅助方法的优缺点如表3所示.

鉴于每种方法均有各自的优缺点,为了克服单一方法的局限性,在实际提取过程中往往需要根据黑色素的来源、产生方式、组织内的定位以及用途等选择不同方法的组合.例如,以乌贼墨水为原料提取黑色素时,如果要求保留天然黑色素的原有结构,可以采用简单且温和的去离子水直接提取^[28].若需提取包裹在浅层组织中的黑色素,如细胞壁、皮革、毛发等,则可以采用有机溶剂浸泡提取黑色素;而对于包裹在深层且复杂结构内的黑色素,如组织、胞内,则可以采用碱溶酸沉法^[23,29,35,36]或者酶解法^[40]提取.此外,如果对纯度要求高,大多使用碱溶酸沉法^[34]或酶解法^[39].以细菌和真菌为提取源时,由于细胞壁的存在,常需要辅助方法进行破壁,再结合碱溶酸沉或酶解法等常用黑色素提

表3 黑色素提取辅助方法的优缺点

Table 3 Advantages and disadvantages of assisted methods for melanin extractions

辅助方法	优点	缺点	文献
微波辅助提取法	选择性提取,减少了能量的消耗;缩短提取时间	温度的快速升高可能会造成溶剂沸腾,降低实验体系的稳定性	[50]
超声波辅助提取法	缩短提取时间,增加黑色素的分散性	能量消耗大;对于高浓度、大规模样品制备会因超声波衰减降低均匀性	[20,51]
超高压辅助提取法	受力均匀性好;缩短提取时间	过高的压力会导致物质的化学结构发生改变	[52]

取方法, 缩短反应时间. 值得一提的是, 在使用辅助方法时, 需要拟合优化来寻找最佳提取条件: 一方面, 防止作用强度不足导致破壁效果不佳; 另一方面, 防止作用过度导致黑色素结构破坏^[20,52].

经过上述方法提取得到的黑色素粗产物中仍有部分杂质以多种形式与黑色素共存, 如简单吸附在黑色素颗粒表面, 或是包裹在黑色素颗粒内部, 甚至与黑色素发生共价连接^[14]. 因此, 需要根据使用需求, 进一步精炼和提纯. 对于难去除的杂质, 一般策略是在粗产物中加入相应的有机溶剂, 如氯仿、乙酸乙酯、甲醇、丙酮等去除蛋白质和脂质, 再离心收集得到黑色素提纯物, 用于进一步修饰或改性^[16,33,56].

3 黑色素的修饰和改性

目前医疗领域对黑色素的利用, 主要是基于其独特的性质, 如良好的水溶性、抗氧化性和高效且稳定的光热转换能力. 然而提取和纯化的天然黑色素产物往往不能完全满足临床应用对某种性质的高要求, 因此需要对天然黑色素进行改性, 提升所需性能以满足应用要求. 本节分别从水溶性、抗氧化性、光吸收和稳定性三方面进行介绍.

3.1 提升水溶性

成人体内水分含量占60%~70%, 儿童体内可高达80%, 因此在水中的溶解性是其应用于药物或生物分子体内的先决条件. 黑色素的异质性是黑色素多功能的源头, 但异质性又导致黑色素易聚积形成大颗粒, 使其难以进入体内循环系统、不能被靶细胞吸收, 制约了黑色素用作体内抗炎药物和成像剂. 因此, 多种物理和化学改性方法被提出, 在保留黑色素异质性的前提下, 提高其水溶性.

物理改性方法的本质是通过增加黑色素颗粒的分散性, 从而提高其水溶性. 如Guo等人^[54]通过在碱性条件下进行超声波处理, 使黑色素颗粒均匀地分散成均质小颗粒, 各小颗粒之间因静电斥力作用, 在分散后不再重新聚合, 从而获得了稳定的水溶性黑色素. Chu等人^[57]在将黑色素颗粒超声波处理后, 进一步用大豆卵磷脂进行封装, 提高了黑色素颗粒的分散性和稳定性, 同时还增加了整体颗粒的细胞透过性. 虽然强碱煮沸和强氧化剂处理同样能获得纳米级、分散程度高的黑色素小颗粒, 但是超声波处理能确保黑色素分子结构不会发生改变, 保留了天然黑色素的原有性能^[58].

化学修饰方法是通过将天然黑色素与亲水性基团结合, 促进黑色素单体与水分子形成氢键, 呈现溶解性增强的现象. (1) 氨基化修饰: 如碱性氨基酸修饰、D-氨基葡萄糖修饰^[59]、氨基聚乙二醇($\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$)^[58,60]等, 其中氨基酸修饰是常见的天然黑色素氨基改性手段. Ye等人^[61]用精氨酸(Arg)修饰来自真菌(*Lachnum* YM-346)的黑色素, 使其在30℃蒸馏水中的溶解度从原来的不溶增加到4.55%(重量百分比). 类似地, Ye等人^[62]用组氨酸(His)修饰来自真菌(*Lachnum* YM296)的黑色素, 使其在蒸馏水中的溶解度从原来的1.1 mg/mL增加到47.7 mg/mL. 然而, 何种氨基酸修饰对水溶性的提升最显著目前尚无定论, 溶解度提升的差异可能不仅与所采用的氨基酸有关, 还与黑色素的来源有关. (2) 羧甲基化修饰: Zong等人^[63]将黑色素依次与异丙醇和氯乙酸反应, 透析后得到羧甲基化黑色素, 其在水中的溶解度达到3.75 g/L. (3) 乙酰化修饰: Pezzella等人^[6]通过巯基将黑色素前体与乙酰化的半乳糖(Gal)交联, 显著降低了黑色素单体的聚集, 增加了黑色素的溶解性. (4) 其他氧化聚合反应: Cicco等人^[64]用亲水性三甘醇修饰黑色素单体DHI的吡咯氮, 进一步氧化后得到的聚合物介电常数高于纯DHI单体, 有效提高其水溶性; 加入低浓度(1%~5%)的聚乙烯醇溶液氧化黑色素, 可增加黑色素低聚物的分散性, 防止聚集沉淀^[65].

3.2 增强抗氧化性

黑色素优异的抗氧化性使其常被用作自由基清除剂, 强大的抗氧化能力可以提高聚合物的热稳定性, 对于功能性材料的应用具有重要意义^[66], 并且可以清除紫外线引发的大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 增强机体或材料的抗老化能力^[31,67], 同时还可以减缓由氧化应激过程导致的炎症反应, 表现出良好的抗炎能力^[68]. 关于黑色素的抗氧化机理, Guo等人^[69]从邻苯二酚单体角度进行了解释, 他们认为, 邻苯醌能在氢过氧化自由基($\text{HOO}\cdot$)的激活下转变为更活跃的邻位半醌, 从而具备了清除脂质自氧化形成的烷基过氧自由基($\text{ROO}\cdot$)和 $\text{HOO}\cdot$ 的能力. 此外, 天然黑色素本身存在的氢键受体, 如羧基($-\text{COO}$)上的羰基($-\text{C=O}$), 可能会在黑色素前体物氧化聚合过程中促使邻苯二酚向邻位醌转变, 从而对 $\text{ROO}\cdot$ 的清除也起到一定作用(图2). 这在一定程度上解释了为何含有DHICA的天然黑色素抗氧化能力优于聚多巴胺(polydopamine, PDA)^[70]. 除此之外, 更为广泛认可的解释是, 黑色素的抗氧化能

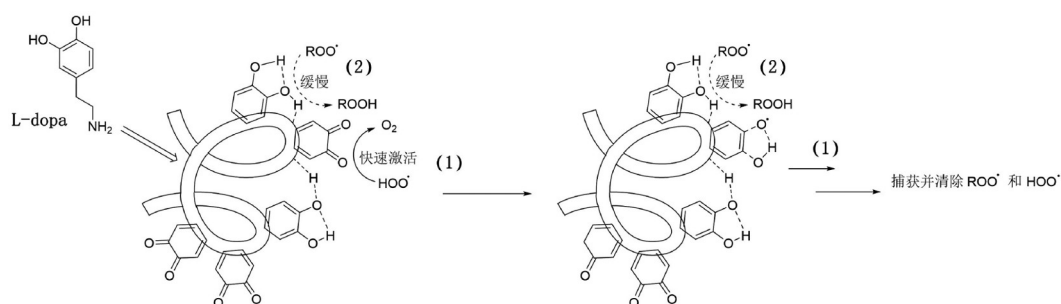
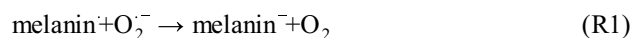


图2 黑色素邻苯醌单元的抗氧化机理^[69]

Figure 2 The antioxidant mechanism of the *o*-quinone unit of melanin^[69]

力源自与超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)类似的催化能力,可以促进歧化反应的发生^[71].



研究证实,提高黑色素颗粒分散性,以及其与反应底物(如ROS)的充分接触是提高黑色素抗氧化能力的有效途径之一.如前所述,可用于提高黑色素分散性的物理或化学方法对提高黑色素的抗氧化能力也有效. Liu等人^[72]通过超短激光脉冲并配合机械粉碎得到纳米级黑色素颗粒.相比于未处理的黑色素,纳米级黑色素对暴露在 H_2O_2 和光照下的视网膜色素上皮细胞活性有更好的保护效果. Ye等人^[62]和Xu等人^[73]利用碱性氨基酸修饰天然黑色素提高分散性和溶解性的方法,也会显著提升其抗氧化能力.此外,鉴于羰基的存在可以提供更强的抗氧化性,因此提高黑色素中DHICA成分的比例也将提升其抗氧化能力,如Micillo等人^[74]通过对DHICA的羧基进行酯化,保护了2位上的羰基,进而呈现出更强的抗氧化活性.

鉴于天然黑色素抗氧化能力与其SOD酶属性相关,而SOD酶活性的发挥与所结合的金属离子(Cu、Mn、Fe)息息相关.因此,研究人员试图通过引入可增强黑色素催化能力的金属离子来提高其抗氧化能力. Chen等人^[75]通过使黑色素颗粒结合具有优异催化活性的Pt和Cu纳米颗粒,形成具有类SOD活性的纳米酶,从而赋予黑色素更优异的抗氧化能力.其用于大鼠的骨关节炎治疗时,结合了Pt和Cu的黑色素纳米粒在第8周即能显著缓解骨关节炎的发展. Wang等人^[76]将硒代半胱氨酸与黑色素前体——多巴氧化聚合,形成的黑色素纳米复合材料(PDA-Se-Cys纳米粒)同时具备了类SOD和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)催化活性,进一步提高了自由

基清除效率,在神经毒素诱导SH-SY5Y细胞损伤模型中表现出比同等剂量PDA更强的自由基清除效果.

3.3 提升光吸收和光稳定性

黑色素在红外和紫外区均有广泛的吸收谱,尤其是天然黑色素,因为含有大量的DHICA,在320 nm附近会表现出强的吸收带^[70],因此可作为一种优良的光保护剂.尽管黑色素对光辐射具有宽谱吸收,但在光照条件下黑色素很容易发生氧化聚合,导致黑色素颗粒的比表面积降低,进而使颗粒的光吸收量减少.可见,提高黑色素颗粒的分散性也有利于提高其吸光度,前述各种提高黑色素分散性的方法,对提高其光吸收能力均有效^[77].除此之外,通过螯合特定金属离子也能提高吸光度. Laref等人^[78]通过在黑色素中掺入 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等过渡金属元素,有效地提高了其在紫外和可见光区的吸收度. Zou等人^[79]报道了除过渡金属元素(Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+})外,主族元素 Ga^{3+} 和镧系元素 Gd^{3+} 也可与黑色素结合,降低其能量带隙,提高对光的吸收能力,并且提高程度与金属离子浓度成正比. Liu等人^[80]将 Ag^+ 与黑色素结合,得到了光吸收能力和光热性能优异的复合物,并将其用于棉织物快速灭菌.

除光吸收外,黑色素的光稳定性也备受关注.黑色素在高强度的光诱导下很容易发生氧化和降解^[81]. Wood等人^[82]报道了有氧条件下,黑色素在蓝光(波长为547 nm)和紫外光的照射下会转变为亚稳态的黑色素自由基,这种自由基与氧分子接触后会产生ROS,包括单线态氧、超氧阴离子、羟基自由基以及后续产生的过氧化氢.它们会破坏黑色素的苯环结构,进而引发黑色素氧化降解^[83](图3).因此,提高黑色素的光稳定性与提高其抗氧化性有共通之处.例如, Micillo等人^[74]通过酯化羧基带来的抗氧化性提升来提高黑色素抵抗光老

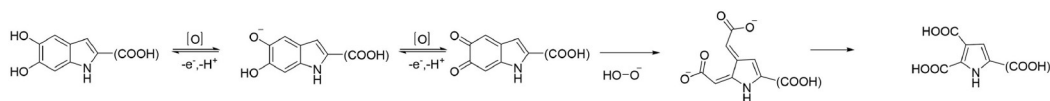


图3 黑色素氧化降解的示意图^[5]。DHI和DHICA在ROS的作用下生成吡咯-2,3-二羧酸和吡咯-2,3,5-三羧酸

Figure 3 Schematic overview of melanin oxidative degradation^[5]. DHI and DHICA generate pyrrole-2,3-dicarboxylic acid and pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid under the action of ROS

化的能力。此外,高pH、过渡金属离子的存在也是加剧黑色素光不稳定性的因素之一^[14,84],而适当隔绝与上述不利环境的直接接触是提高稳定性的一种方案。因此,Moraes等人^[85]利用二棕榈酰磷脂酰甘油封装黑色素颗粒,在保证其溶解度的同时,使黑色素颗粒被隔绝在接近生理pH条件下的环境中,有效提高了其稳定性,延长了黑色素在受光条件下的寿命。具有较好光吸收能力的纳米颗粒是另一种修饰选择,可通过竞争入射光线对黑色素颗粒表面进行保护,提高黑色素光稳定性。Sun课题组^[35,86,87]将黑色素与具有良好紫外吸收能力的金红石型TiO₂按一定比例混合,通过Ti与酚羟基的双齿桥联键合,形成表面分布TiO₂的TiO₂-黑色素纳米颗粒(melanin nanoparticles, MNPs)。相对于单一材料体系,TiO₂-MNPs复合物的紫外光屏蔽能力可进一步提升,且TiO₂纳米层的保护也提高了黑色素的光稳定性。

值得注意的是,黑色素不仅自身可进行修饰,提高其自有性能,而且其多个反应活性基团还能用于对聚合物的修饰,在提高黑色素性能的同时,还可以提高复合材料体系的整体性能。例如,黑色素的酚羟基(-OH)或亚氨基(-NH-)与氨基甲酸乙酯中的异氰酸酯基团(-NCO)交联,可以提供更多的氢键位点,加强聚氨酯的机械性能和自愈性^[88]。聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)嵌入黑色素后,由于黑色素强大的自由基清除能力,能保护PMMA中的弱不饱和端,从而增强了PMMA的热稳定性^[66];将乳清蛋白基膜与低浓度的黑色素混合,能提高膜的紫外屏蔽能力、水蒸气屏蔽性和抗氧化性^[31]。可见,无论是作为混合体系中的功能组分,还是作为修饰成分,黑色素都有很大的应用潜力。

4 生物医学应用

4.1 药物输送系统

黑色素纳米颗粒(MNPs)在制备成水凝胶载药体系后,具有不同于传统水凝胶的性质。黑色素各单体之间的 π - π 堆叠,使该体系在响应pH时不会产生明显的溶胀

行为^[24],有利于维持纳米尺寸,从而能通过简单扩散而不是胞吞作用进入细胞。另外,黑色素分子的 π 电子系统和多氢位点使其具备与芳香结构药物的强结合能力^[89]。Araujo课题组^[90]将黑色素涂覆在生物玻璃-陶瓷支架上,通过将覆有黑色素的支架浸渍在超临界CO₂流体中载入布洛芬,能有效改善药物的爆释问题,延长药物在体内的作用时间,降低支架植入后的炎症反应。Caldas等人^[91]报道了一种由PDA修饰的MNPs与聚吡咯组成的电刺激响应性药物控释体系负载地塞米松,药物负载率达到约94%。在需要释放时,通过电刺激使聚吡咯从正电性转变为负电性,带有负电的地塞米松在强静电斥力作用下会从载体颗粒脱离,实现表面直接释放和内部间接促释放,该工作为电刺激贴片给药方式的设计和调控提供了指导。Lee等人^[92]将阿霉素键合到pH敏感的甲基修饰的MNPs上,得到的体系能在pH<5.6时发生聚集。利用超声微泡将药物体系输送至肿瘤组织,在肿瘤酸性微环境下,载药体系发生聚沉,实现靶向药物释放。

黑色素的光热转换能力也可作为黑色素药物载体控释的重要调节手段。得益于黑色素的光吸收能力,以黑色素作为载体时,还能通过近红外光(near infrared, NIR)控制药物的释放。Wang等人^[93]利用硫醇化的聚乙二醇(PEG)与黑色素颗粒交联形成载药体系,再通过黑色素与抗癌药物——7-乙基-10-羟基喜树碱连接组成药物负载体系,以NIR光照作为药物控释的开关,即光照时药物释放,暂停光照时药物的释放迅速减缓。Kim等人^[94]将黑色素与磷脂、胆固醇、温敏性聚合物聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)混合制成纳米级载药薄膜。该薄膜可在808 nm的NIR照射下升温,当温度到达51℃时,膜中的PNIPAM分子形态发生改变,导致薄膜流动性的增加和微结构的改变,加速膜内药物的释放,从而实现定点和可控释放。为提升此类载药平台的光热转换效率,Yang等人^[95]还将黑色素嵌入以MoS₂为基底的纳米平台上,以MoS₂的强光热转换能力弥补此体系热刺激释放药物能力的不足。

4.2 抗炎剂

炎症因子的产生与氧化应激息息相关,而黑色素能够清除ROS的特性使其具有抗炎能力. Eom等人^[96]通过层层自组装技术将聚乙烯醇(PVA)和天然MNP逐层组装到氧化铟锡(ITO)基板上,与RAW 264.7巨噬细胞共培养的结果表明,相比于无黑色素的ITO薄膜,培养在MNP/ITO薄膜上的巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子(TNF- α)减少了1.8倍. 在脂多糖的刺激下,其差距则更加明显,黑色素组巨噬细胞产生的TNF- α 比对照组少5倍. 在抗炎应用方面,从体表的皮肤治疗到体内的脏器治疗,均有相关工作报道. 例如, Araújo等人^[68]通过将黑色素嵌入海藻酸钠基水凝胶中,使复合水凝胶具备了持续清除ROS的能力,有利于慢性炎症造成的溃烂伤口的愈合. Belemets等人^[97]通过给非酒精性肝病小鼠注射含有黑色素的溶液,抑制由ROS大量累积导致的肝损伤. 结果表明,黑色素溶液可有效降低小鼠肝脏中脂肪的氧化变性程度,同时显著降低促炎因子IL-1 β 的释放,使抗炎因子IL-10、TGF- β 恢复到正常水平. 综上所述,无论是作为材料涂层、敷料,还是注射剂,黑色素均能发挥其抗氧化功能,以及由氧化应激引起的急性或慢性炎症反应,展现出在植入式医疗设备、伤口愈合、慢性炎症治疗等方面的应用潜力.

4.3 光热治疗

肿瘤细胞在超过42°C的情况下会发生坏死,而在该温度下正常细胞尚不会发生损伤^[98]. 因此,利用具有高效光热转换效率的材料将所吸收的光能转换为热量,可原位杀死肿瘤细胞. 使用PDA作为光热治疗剂的研究较多^[99],而将天然黑色素用于光热治疗(photothermal therapy, PTT)的研究相对较少. 天然黑色素光热转换效率约为40%,显著高于PDA(约29%),且生物降解性更高^[28],因此天然黑色素是一种优良的光热转换材料. Kim等人^[100]通过磷脂膜包裹黑色素颗粒,避免其进入体内后引起免疫反应. 小鼠尾静脉注射后对其肿瘤部位进行NIR照射治疗(808 nm, 每天2次),结果发现,肿瘤生长显著受到抑制,甚至发生肿瘤消融. Jiang等人^[101]则对上述策略进行改进,将红细胞膜和肿瘤细胞膜混合形成杂化膜并包被来源于乌贼的MNP,用于PTT. 红细胞膜组分可帮助MNP实现免疫逃避,肿瘤细胞膜组分则可以实现肿瘤靶向效果. 在裸鼠体内进行PTT治疗后发现,当两种细胞膜组分比例为1:1时,光热剂在肿瘤部位的聚集率最高,光热治疗肿瘤的效果

也最好. 此外,该融合光热剂在680~800 nm具有很好的光声信号,可用于黑色素的体内定量和靶向追踪. 除肿瘤治疗外,黑色素的光热能力还被用于I型糖尿病的治疗. 针对I型糖尿病自身免疫缺失引起的胰岛素缺乏问题, Huang等人^[102]以尼龙为基质,将海藻酸钠、聚乙烯亚胺和黑色素混合组成复合水凝胶,用于负载胰岛B细胞,通过黑色素将光转换成热,促使负载的胰岛B细胞分泌胰岛素,从而达到降低患者血糖的目的. 黑色素改善糖尿病的机制也可能与黑色素光热转换产生的温热效应增强靶器官的胰岛素敏感性有关^[103],具体的机理还有待进一步探索.

4.4 医学成像

为了更好地观察体内组织的病变情况,临床常通过注入或服用放射性同位素、磁性纳米颗粒等作为正电子发射断层扫描(positron emission computed tomography, PET)、核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、X射线计算机断层扫描(computed tomography, CT)的造影剂^[104]. 然而目前临床使用的造影剂品种有限,且存在诸多问题,因此仍需开发更优质的造影剂. 天然黑色素无细胞毒性,且具有多个修饰位点可用于交联生物标记物、靶向蛋白以及螯合各种金属离子,为提高造影剂的靶向性、渗透性、体内滞留时间和减少其使用量提供了有利的先天条件. 目前黑色素在医学成像方面已有大量的应用,如Liu等人^[105]利用柠檬酸酰胺修饰的MNP螯合⁶⁸Ga,得到的聚合物不仅具备PET成像能力,还可利用柠檬酸酰胺在肿瘤弱酸性环境下(pH 6)水解产生的正电荷中和MNP表面电荷,引起MNP靶向聚积到肿瘤组织,实现对肿瘤成像的靶向增强. Nedaei和Delavari^[106]利用MNP可通过酚羟基或氨基与Ba²⁺结合的特点,得到水溶性良好的CT造影剂Ba-MNP,其X射线衰减系数高于等浓度下的市售碘化造影剂碘海醇.

由于单一成像方式存在固有的局限性,如CT虽然扫描快速,空间分辨率好,但在用于反差小的软组织成像时,对比度和分辨率均会大幅降低;MRI虽然软组织对比分辨率高,但是扫描速度慢,无法获得实时信息;PET虽然扫描速度快,但是空间分辨率差^[107]. 因此,构建多模态成像平台能更好地弥补单一成像方法的不足. 黑色素本身便可作为天然的光声成像(photoacoustic imaging, PAI)材料,常被用于多模态纳米成像剂的制备. Zhang课题组^[108]通过MNP酚羟基结合Mn²⁺构建了

低毒性且具有MR/PA双模态成像能力的造影剂。Sun等人^[109]通过PEG修饰的MNPs(PEG-MNP)与近红外二区(NIR-II)分子染料结合,构建PAI/荧光双模态成像造影剂,与此同时,MNPs也加强了荧光染料在体内的保留性,有利于染料在肿瘤部位累积,增强荧光成像。Xia等人^[110]通过将PEG-MNPs与靶向肺癌标记物——SSTR₂蛋白的巯基奥曲肽结合,分别螯合Mn²⁺和¹²⁴I作为MRI和PET的成像探针,最终制成一种靶向肺肿瘤的PAI/MRI/PET多模态成像造影剂。

结合黑色素自身具有的抗氧化、光吸收等多种性能,研究人员在制备成像造影剂的同时,希望构建诊疗一体的系统,实现更多功能。例如上文所述的Zhang课题组^[108]制备的MR/PA纳米成像剂,其在成像的同时,还可作为纳米热疗剂用于肿瘤光热治疗。Sun等人^[109]制备的PAI/荧光纳米成像剂还可通过 π - π 键结合Pt²⁺基聚合物,用于肿瘤化疗,并配合PTT协同抑制肿瘤生长、降低耐药性;Xia等人^[110]所制备的成像剂除了可以用于PTT外,若替换螯合的放射性核素(将¹²⁴I替换为¹³¹I或¹²⁵I),则可用于肿瘤的放射性核素治疗。

5 总结

由于黑色素来源广泛且复杂多样,其提取方法也是多种多样的,根据提取过程和所使用提取试剂的不同,本文将目前常用的提取方法归纳为三类,即溶剂法、酶解法和碱溶酸沉法,并系统比较了各种方法的优缺点和适用条件。为了提高天然黑色素的提取率,提

取过程还常采用一些辅助方法,如微波、超声和超高压辅助提取。实际使用方法的选择和参数优化需要根据黑色素的来源、提取率、纯度和实际用途等来进行组合与调整。尽管已有大量黑色素研究和应用的成果报道,但对其提取的流程并没有统一的标准,对所得到的产物组分、纯度也没有系统地横向比较,这也是当前各研究结果出现差异性甚至相互矛盾的主要原因。除提取方法外,本文重点总结了天然黑色素的水溶性、抗氧化性和光学性质的特点与针对性改进方法,并系统总结了近年来黑色素在药物递送载体、抗炎剂、光热治疗和成像造影剂等方面的临床需求与应用,希望为扩大天然黑色素在生物医学领域的应用提供借鉴。尽管天然黑色素的研究已经取得较快进展,但受限于其固有性质、提取和分析方法,仍存在一些不足。例如,受天然黑色素不溶于水和大部分有机溶剂的影响,紫外-可见光谱和核磁共振这类常规的结构分析方法只能在碱性条件下对黑色素进行定量和结构研究,但碱性环境会导致黑色素结构变化,甚至结构或功能损失,并且与体内实际环境的差异也无法准确解析黑色素的结构与功能间的关系。作为替代方案,当前针对黑色素作用机理的研究主要是在合成黑色素中开展,然而天然黑色素的某些优良性质是合成黑色素所无法比拟的,因此开发适用于天然黑色素纯化、成分和结构分析的新技术、新方法,是目前亟须解决的关键问题,对探索天然黑色素性质、拓展其潜在价值具有重要意义。

参考文献

- 1 Chung K, Yu S, Heo C J, et al. Flexible, angle-independent, structural color reflectors inspired by morpho butterfly wings. *Adv Mater*, 2012, 24: 2375–2379
- 2 Zucca F A, Basso E, Cupaioli F A, et al. Neuromelanin of the human substantia nigra: An update. *Neurotox Res*, 2014, 25: 13–23
- 3 Dubey S, Roulin A. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2014, 27: 327–338
- 4 Novellino L. Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj*, 2000, 1475: 295–306
- 5 Smith R A W, Garrett B, Naqvi K R, et al. Mechanistic insights into the bleaching of melanin by alkaline hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 110–117
- 6 Solano F. Melanins: Skin pigments and much more—Types, structural models, biological functions, and formation routes. *New J Sci*, 2014, 2014: 1–28
- 7 Pezzella A, Iadonisi A, Valerio S, et al. Disentangling eumelanin “black chromophore”: Visible absorption changes as signatures of oxidation state- and aggregation-dependent dynamic interactions in a model water-soluble 5,6-dihydroxyindole polymer. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 15270–15275
- 8 Park S A, Lee C, Lee J, et al. Applications of natural and synthetic melanins as biosorbents and adhesive coatings. *Biotechnol Bioproc E*, 2020, 25: 646–654
- 9 Sarna T, Froncisz W, Hyde J S. Cu²⁺ probe of metal-ion binding sites in melanin using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch*

- Biochem Biophys, 1980, 202: 304–313
- 10 Szpoganicz B, Gidanian S, Kong P, et al. Metal binding by melanins: Studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu (II) and Zn(II) ions. *J Inorg Biochem*, 2002, 89: 45–53
 - 11 Singh S, Nimse S B, Mathew D E, et al. Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. *Biotechnol Adv*, 2021, 53: 107773
 - 12 Odh G, Carstam R, Paulson J, et al. Neuromelanin of the human substantia nigra: A mixed-type melanin. *J Neurochem*, 1994, 62: 2030–2036
 - 13 Turick C E, Knox A S, Becnel J M, et al. Properties and function of pyromelanin. *Biopolymers*, 2010, 449: 72
 - 14 Xie J, Li H, Che H, et al. Extraction, physicochemical characterisation, and bioactive properties of ink melanin from cuttlefish (*Sepia esculenta*). *Int J Food Sci Technol*, 2021, 56: 3627–3640
 - 15 Zou Y, Zhao Y, Hu W. Chemical composition and radical scavenging activity of melanin from *Auricularia auricula* fruiting bodies. *Food Sci Technol*, 2015, 35: 253–258
 - 16 Singh N, Prasad K. Multi-tasking hydrated ionic liquids as sustainable media for the processing of waste human hair: A biorefinery approach. *Green Chem*, 2019, 21: 3328–3333
 - 17 Liang Y, Han Q, Byrne N, et al. Recyclable one-step extraction and characterization of intact melanin from alpaca fibers. *Fibers Polym*, 2018, 19: 1640–1646
 - 18 Tu Y, Sun Y, Tian Y, et al. Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chem*, 2009, 114: 1345–1350
 - 19 Keles Y, Özdemir Ö. Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds. *Int J Sec Metabol*, 2018, 5: 140–148
 - 20 Lu M, Yu M, Shi T, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin and its hypoglycemic activities from *Sporisorium reilianum*. *J Food Process Preserv*, 2020, 44: e14707
 - 21 Zerrad A, Anissi J, Ghanam J, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of melanin produced by a *Pseudomonas balearica* strain. *J Biotechnol Lett*, 2014, 5: 87–94
 - 22 Pavan M E, López N I, Pettinari M J. Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 1357–1370
 - 23 Madkhali N, Alqahtani H R, Al-Terary S, et al. Control of optical absorption and fluorescence spectroscopies of natural melanin at different solution concentrations. *Opt Quant Electron*, 2019, 51: 227
 - 24 Araújo M, Viveiros R, Correia T R, et al. Natural melanin: A potential pH-responsive drug release device. *Int J Pharm*, 2014, 469: 140–145
 - 25 Ghadge V, Kumar P, Maity T K, et al. Facile alternative sustainable process for the selective extraction of microbial melanin. *ACS Sustain Chem Eng*, 2022, 10: 2681–2688
 - 26 Aula P, Kaila T, Huupponen R, et al. Prostaglandin F_{2α} binding to bovine ocular and synthetic melanins *in vitro*. *Pharmacol Toxicol*, 1989, 65: 100–103
 - 27 Tsukamoto K, Palumbo A, D’Ischia M, et al. 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid is incorporated in mammalian melanin. *Biochem J*, 1992, 286: 491–495
 - 28 Jiang Q, Luo Z, Men Y, et al. Red blood cell membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhanced photothermal therapy. *Biomaterials*, 2017, 143: 29–45
 - 29 Ushakova N, Dontsov A, Sakina N, et al. Antioxidative properties of melanins and ommochromes from black soldier fly *Hermetia illucens*. *Biomolecules*, 2019, 9: 408
 - 30 Tao J, Qiao L N, Tong J J, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of melanin from the black ants (in Chinese). *Nat Prod Res Dev*, 2012, 24: 873–876, 915 [陶浚, 乔李娜, 童晶晶, 等. 蚂蚁黑色素的提取、纯化及抗氧化活性研究. *天然产物研究与开发*, 2012, 24: 873–876, 915]
 - 31 Łopusiewicz Ł, Drozłowska E, Trocer P, et al. Whey protein concentrate/isolate biofunctional films modified with melanin from watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds. *Materials*, 2020, 13: 3876
 - 32 Łopusiewicz Ł. Isolation, characterisation and biological activity of melanin from *Exidia nigricans*. *World Sci News*, 2018, 91: 111–129
 - 33 Zhang J, Cai J, Deng Y, et al. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus cereus*. *Front Biol China*, 2007, 2: 26–29
 - 34 Panzarasa G, Osypova A, Consolati G, et al. Preparation of a sepia melanin and poly(ethylene-alt-maleic anhydride) hybrid material as an adsorbent for water purification. *Nanomaterials*, 2018, 8: 54
 - 35 Liang Y, Pakdel E, Zhang M, et al. Photoprotective properties of alpaca fiber melanin reinforced by rutile TiO₂ nanoparticles: A study on wool fabric. *Polym Degrad Stabil*, 2019, 160: 80–88
 - 36 Youngchim S, Morris-Jones R, Hay R J, et al. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol*, 2004, 53: 175–181
 - 37 Punitha V, Kannan P, Saravanabhavan S, et al. Enzymatic removal of melanin in enzyme based dehairing and fiber opening. *J Am Leather Chem*

- Assoc, 2008, 103: 203–208
- 38 Li X, Wang J, Liu H, et al. Comparison of structure and properties of sea cucumber melanin before and after degradation. *J Biotech Res*, 2019, 10: 283–292
 - 39 Li X, Li H S. Technics of melanin extraction from ink of *Sepia esculenta* Hoyle by enzymatic method (in Chinese). *Nat Prod Res Dev*, 2010, 22: 159–162, 166 [李晓, 李和生. 酶法提取金乌贼墨汁中黑色素的工艺条件研究. *天然产物研究与开发*, 2010, 22: 159–162, 166]
 - 40 Chen S R, Jiang B, Zheng J X, et al. Isolation and characterization of natural melanin derived from silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chem*, 2008, 111: 745–749
 - 41 Madhusudhan D N, Mazhari B B Z, Dastager S G, et al. Production and cytotoxicity of extracellular insoluble and droplets of soluble melanin by *Streptomyces lusitanus* DMZ-3. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 306895
 - 42 Wibowo J T, Kellermann M Y, Petersen L E, et al. Characterization of an insoluble and soluble form of melanin produced by *Streptomyces cavourensis* SV 21, a sea cucumber associated bacterium. *Mar Drugs*, 2022, 20: 54
 - 43 Aghajanyan A E, Hambardzumyan A A, Hovsepyan A S, et al. Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin. *Pigm Cell Res*, 2005, 18: 130–135
 - 44 Kimura T, Fukuda W, Sanada T, et al. Characterization of water-soluble dark-brown pigment from Antarctic bacterium, *Lysobacter oligotrophicus*. *J Biosci Bioeng*, 2015, 120: 58–61
 - 45 Gil-Avilés M D R, Montes-Avila J, Díaz-Camacho S P, et al. Soluble melanins of the *Randia echinocarpa* fruit—Structural characteristics and toxicity. *J Food Biochem*, 2019, 43: e13077
 - 46 Mäki-Arvela P, Anugwom I, Virtanen P, et al. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids—A review. *Ind Crop Prod*, 2010, 32: 175–201
 - 47 Shan L, Xu L P, Jin Q Z, et al. Stability and free radical scavenging activities of black sesame melanin (in Chinese). *J Anhui Agric Sci*, 2008, 36: 11527–11531, 11541 [单良, 徐利萍, 金青哲, 等. 黑芝麻黑色素的稳定性及自由基清除活性. *安徽农业科学*, 2008, 36: 11527–11531, 11541]
 - 48 Liu Y, Kempf V R, Brian Nofsinger J, et al. Comparison of the structural and physical properties of human hair eumelanin following enzymatic or acid/base extraction. *Pigm Cell Res*, 2003, 16: 355–365
 - 49 Wang L F, Rhim J W. Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 99: 17–23
 - 50 Lu Y, Ye M, Song S, et al. Isolation, purification, and anti-aging activity of melanin from *Lachnum singerianum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 174: 762–771
 - 51 Hou R, Liu X, Xiang K, et al. Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom. *Food Chem*, 2019, 277: 533–542
 - 52 Yin C M, Yao F, Wu W, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of natural melanin extracted from the wild wood ear mushroom, *Auricularia auricula* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 2022, 24: 67–82
 - 53 Desai M, Parikh J, Parikh P A. Extraction of natural products using microwaves as a heat source. *Sep Purif Rev*, 2010, 39: 1–32
 - 54 Guo X, Chen S, Hu Y, et al. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity. *J Food Sci Technol*, 2014, 51: 3680–3690
 - 55 Lee A R, Choi S H, Choi H W, et al. Optimization of ultra high pressure extraction (UHPE) condition for puffed ginseng using response surface methodology. *Food Sci Biotechnol*, 2014, 23: 1151–1157
 - 56 Dong C, Yao Y. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. *J Biosci Bioeng*, 2012, 113: 474–479
 - 57 Chu M, Hai W, Zhang Z, et al. Melanin nanoparticles derived from a homology of medicine and food for sentinel lymph node mapping and photothermal *in vivo* cancer therapy. *Biomaterials*, 2016, 91: 182–199
 - 58 Fan Q, Cheng K, Hu X, et al. Transferring biomarker into molecular probe: Melanin nanoparticle as a naturally active platform for multimodality imaging. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 15185–15194
 - 59 Song S, Li S, Su N, et al. Structural characterization, molecular modification and hepatoprotective effect of melanin from *Lachnum* YM226 on acute alcohol-induced liver injury in mice. *Food Funct*, 2016, 7: 3617–3627
 - 60 Kim M A, Yoon S D, Lee J S, et al. Melanin-PEG nanoparticles as a photothermal agent for tumor therapy. *Mater Today Commun*, 2020, 25: 101575
 - 61 Ye M, Wang Y, Guo G, et al. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum* YM-346. *Food Chem*, 2012, 135: 2490–2497
 - 62 Ye Z, Lu Y, Zong S, et al. Structure, molecular modification and anti-tumor activity of melanin from *Lachnum singerianum*. *Process Biochem*, 2019, 76: 203–212
 - 63 Zong S, Li L, Li J, et al. Structure characterization and lead detoxification effect of carboxymethylated melanin derived from *Lachnum* Sp. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 182: 669–686

- 64 Cicco S R, Ambrico M, Ambrico P F, et al. A water-soluble eumelanin polymer with typical polyelectrolyte behaviour by triethyleneglycol N-functionalization. *J Mater Chem C*, 2015, 3: 2810–2816
- 65 Pezzella A, Ambrogio V, Arzillo M, et al. 5,6-Dihydroxyindole oxidation in phosphate buffer/polyvinyl alcohol: A new model system for studies of visible chromophore development in synthetic eumelanin polymers. *Photochem Photobiol*, 2010, 86: 533–537
- 66 Shanmuganathan K, Cho J H, Iyer P, et al. Thermooxidative stabilization of polymers using natural and synthetic melanins. *Macromolecules*, 2011, 44: 9499–9507
- 67 Poljšak B, Dahmane R. Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatol Res Pract*, 2012, 2012: 135206
- 68 Araújo M, Silveira J, Sousa A, et al. A bioinspired multifunctional hydrogel patch targeting inflammation and regeneration in chronic intestinal wounds. *Biomater Sci*, 2021, 9: 6510–6527
- 69 Guo Y, Baschieri A, Mollica F, et al. Hydrogen atom transfer from HOO[•] to *ortho*-quinones explains the antioxidant activity of polydopamine. *Angew Chem Int Edit*, 2021, 60: 15220–15224
- 70 Panzella L, Gentile G, D’Errico G, et al. Atypical structural and π -electron features of a melanin polymer that lead to superior free-radical-scavenging properties. *Angew Chem Int Edit*, 2013, 52: 12684–12687
- 71 Liu Y, Ai K, Ji X, et al. Comprehensive insights into the multi-antioxidative mechanisms of melanin nanoparticles and their application to protect brain from injury in ischemic stroke. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 856–862
- 72 Liu Y C, Chen S M, Liu J H, et al. Mechanical and photo-fragmentation processes for nanonization of melanin to improve its efficacy in protecting cells from reactive oxygen species stress. *J Appl Phys*, 2015, 117: 064701
- 73 Xu L, Li J, Chang M, et al. Comparison of physicochemical and biochemical properties of natural and arginine-modified melanin from medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Basic Microbiol*, 2020, 60: 1014–1028
- 74 Micillo R, Iacomino M, Perfetti M, et al. Unexpected impact of esterification on the antioxidant activity and (photo)stability of a eumelanin from 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2018, 31: 475–483
- 75 Chen Y, Wang Y, Chen Z, et al. NIR-driven polydopamine-based nanoenzymes as ROS scavengers to suppress osteoarthritis progression. *Mater Today Nano*, 2022, 19: 100240
- 76 Wang W, Zheng J, Zhou H, et al. Polydopamine-based nanocomposite as a biomimetic antioxidant with a variety of enzymatic activities for Parkinson’s disease. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14: 32901–32913
- 77 Yang P, Zhang S, Zhang N, et al. Tailoring synthetic melanin nanoparticles for enhanced photothermal therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 42671–42679
- 78 Laref A, Madkhali N, Alqahtani H R, et al. Electronic structures and optical spectroscopies of 3D-transition metals-doped melanin for spintronic devices application. *J Magn Magn Mater*, 2019, 491: 165513
- 79 Zou Y, Wu T, Li N, et al. Photothermal-enhanced synthetic melanin inks for near-infrared imaging. *Polymer*, 2020, 186: 122042
- 80 Liu W, Cheng W, Zhou M, et al. Construction of multifunctional UV-resistant, antibacterial and photothermal cotton fabric via silver/melanin-like nanoparticles. *Cellulose*, 2022, 29: 7477–7494
- 81 Kawasaki T, Sato A, Tominaga Y, et al. Photo-modification of melanin by a mid-infrared free-electron laser. *Photochem Photobiol*, 2019, 95: 946–950
- 82 Wood S R, Berwick M, Ley R D, et al. UV causation of melanoma in *Xiphophorus* is dominated by melanin photosensitized oxidant production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4111–4115
- 83 Sarna T, Swartz H M, Zadlo A. Interaction of melanin with metal ions modulates their cytotoxic potential. *Appl Magn Reson*, 2022, 53: 105–121
- 84 Zadlo A. Application of transition metal ions in a study of photoinduced modifications of melanin. *Acta Biochim Pol*, 2019, 66: 237–241
- 85 Moraes M L, Gomes P J, Ribeiro P A, et al. Polymeric scaffolds for enhanced stability of melanin incorporated in liposomes. *J Colloid Interface Sci*, 2010, 350: 268–274
- 86 Xie W, Pakdel E, Liu D, et al. Waste-hair-derived natural melanin/TiO₂ hybrids as highly efficient and stable UV-shielding fillers for polyurethane films. *ACS Sustain Chem Eng*, 2020, 8: 1343–1352
- 87 Li S, Wang Y, Li T, et al. Skin bioinspired anti-ultraviolet melanin/TiO₂ nanoparticles without penetration for efficient broad-spectrum sunscreen. *Colloid Polym Sci*, 2021, 299: 1797–1805
- 88 Ma X, Shi C, Huang X, et al. Effect of natural melanin nanoparticles on a self-healing cross-linked polyurethane. *Polym J*, 2019, 51: 547–558
- 89 Zhang R, Fan Q, Yang M, et al. Engineering melanin nanoparticles as an efficient drug-delivery system for imaging-guided chemotherapy. *Adv Mater*, 2015, 27: 5063–5069
- 90 Araújo M, Viveiros R, Philippart A, et al. Bioactivity, mechanical properties and drug delivery ability of bioactive glass-ceramic scaffolds coated with a natural-derived polymer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 77: 342–351
- 91 Caldas M, Santos A C, Rebelo R, et al. Electro-responsive controlled drug delivery from melanin nanoparticles. *Int J Pharm*, 2020, 588: 119773
- 92 Lee S, Lee H, Han H, et al. External stimuli-responsive melanin-like nanoparticles for photoacoustic imaging-guided therapy. *Sci Adv Mater*,

- 2018, 10: 665–673
- 93 Wang X, Wang C, Wang X, et al. A polydopamine nanoparticle-knotted poly(ethylene glycol) hydrogel for on-demand drug delivery and chemophotothermal therapy. *Chem Mater*, 2017, 29: 1370–1376
 - 94 Kim Y S, Kim M A, Lee C M. Controlled drug release from PNIPAM-incorporated melanin nanovesicles by photo-stimulation. *Mater Technol*, 2019, 34: 639–644
 - 95 Yang Y, Wu J, Bremner D H, et al. A multifunctional nanoplatform based on MoS₂-nanosheets for targeted drug delivery and chemophotothermal therapy. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2020, 185: 110585
 - 96 Eom T, Woo K, Cho W, et al. Nanoarchitecturing of natural melanin nanospheres by layer-by-layer assembly: Macroscale anti-inflammatory conductive coatings with optoelectronic tunability. *Biomacromolecules*, 2017, 18: 1908–1917
 - 97 Belemets N, Kobylak N, Virchenko O, et al. Effects of polyphenol compounds melanin on NAFLD/NASH prevention. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 267–276
 - 98 Trieb K, Sztankay A, Amberger A, et al. Hyperthermia inhibits proliferation and stimulates the expression of differentiation markers in cultured thyroid carcinoma cells. *Cancer Lett*, 1994, 87: 65–71
 - 99 Cheng W, Zeng X, Chen H, et al. Versatile polydopamine platforms: Synthesis and promising applications for surface modification and advanced nanomedicine. *ACS Nano*, 2019, 13: 8537–8565
 - 100 Kim M A, Do Yoon S, Kim E M, et al. Natural melanin-loaded nanovesicles for near-infrared mediated tumor ablation by photothermal conversion. *Nanotechnology*, 2018, 29: 415101
 - 101 Jiang Q, Liu Y, Guo R, et al. Erythrocyte-cancer hybrid membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhancing photothermal therapy efficacy in tumors. *Biomaterials*, 2019, 192: 292–308
 - 102 Huang L, Xiang J, Cheng Y, et al. Regulation of blood glucose using islets encapsulated in a melanin-modified immune-shielding hydrogel. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 12877–12887
 - 103 Gan L, Huang S, Hu Y, et al. Heat treatment reduced the expression of miR-7-5p to facilitate insulin-stimulated lactate secretion by targeting IRS2 in boar Sertoli cells. *Theriogenology*, 2022, 180: 161–170
 - 104 Ha S W, Cho H S, Yoon Y I, et al. Ions doped melanin nanoparticle as a multiple imaging agent. *J Nanobiotechnol*, 2017, 15: 73
 - 105 Liu Q, Fang H, Gai Y, et al. pH-triggered assembly of natural melanin nanoparticles for enhanced PET imaging. *Front Chem*, 2020, 8: 755
 - 106 Nedaei S T, Delavari H H. Preparation of naturally active melanin nano-platforms chelated with barium ions as a potential X-ray-computed tomography contrast agent. *ChemistrySelect*, 2018, 3: 11098–11102
 - 107 Kasban H, El-Bendary M, Salama D. A comparative study of medical imaging techniques. *Int J Intell Syst*, 2015, 4: 37–58
 - 108 Sun J, Xu W, Li L, et al. Ultrasmall endogenous biopolymer nanoparticles for magnetic resonance/photoacoustic dual-modal imaging-guided photothermal therapy. *Nanoscale*, 2018, 10: 10584–10595
 - 109 Sun Y, Ding F, Chen Z, et al. Melanin-dot-mediated delivery of metallacycle for NIR-II/photoacoustic dual-modal imaging-guided chemophotothermal synergistic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 16729–16735
 - 110 Xia L, Guo X, Liu T, et al. Multimodality imaging of naturally active melanin nanoparticles targeting somatostatin receptor subtype 2 in human small-cell lung cancer. *Nanoscale*, 2019, 11: 14400–14409

Summary for “天然黑色素的提取、改性和应用”

Extraction, modification, and application of natural melanin

Jianliang Zhou^{1,2}, Huaiyu Wang^{2*} & Liping Tong^{2*}¹ School of Advanced Manufacturing, Fuzhou University, Quanzhou 362251, China;² Institute of Biomedicine and Biotechnology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China* Corresponding authors, E-mail: hy.wang1@siat.ac.cn; lp.tong@siat.ac.cn

Melanin is one of the most widespread natural pigments, which can be derived from animals, plants, and microorganisms. As an amino acid derivative, natural melanin shows outstanding biosafety. Due to the distinct metabolic systems of the source organisms, there are variations in color, composition, and even properties, based on which assorted melanin subtypes are derived. When extracting a certain type of melanin, the extraction strategy will vary in accordance with the location and distribution of the diversified biological melanin. Although there are various extraction methods for natural melanin, there is no uniform norm, causing confusion in choosing the extraction method and formulating the extraction scheme, and it is not conducive to the reference and comparison between research results. Nevertheless, sustaining the equilibrium of the three essential factors, namely, the purpose, cost, and benefit, has proven to be the most challenging task of this process. On the contrary, excluding the wide range of sources, melanin is non-cytotoxic and possesses a series of excellent properties, such as anti-oxidation, UV light absorption, photothermal conversion, and metal chelation. These distinguished properties enable melanin to be widely used in various fields, such as materials, batteries, and the environment, especially in biomedicine. Categorical biomedical applications include drug delivery, anti-inflammation, photothermal therapy, medical imaging, etc. According to the main component of eumelanin, polydopamine is often used as a melanin for biomedical research and demonstrates many intrinsic advantages such as good biocompatibility, excellent photothermal conversion performance, adhesion, high chemical reactivity, and multiple drug release response mechanisms. However, the diversity of the structures and components of natural melanin endows its advantages, such as antioxidant properties, photothermal conversion ability, and metal ion chelation ability, which cannot be matched by synthetic melanin. Therefore, exploring and utilizing natural melanin is imperative for the development of synthetic melanin with superior efficiencies. However, because the original properties of natural melanin are incapable of entirely supporting its actual application, it is essential to modify natural melanin to meet the actual demand. Whereas, the current traditional extraction and detection technologies have not been able to meet the standards required for further exploration of natural melanin, and there are still many unknown issues should be solved. For instance, the potential property changes under strong acidic conditions which commonly adopted in natural melanin extraction. In addition, the existing purification methods cannot provide effective protection for natural components, resulting in the loss of active components in the extraction process. With the development of detection and analysis technology, the research on natural melanin will achieve a further breakthrough, which will drive the industrialization and diversification of synthetic melanin, thereby promoting progress in related fields. On account of the above research and the current industrial status of melanin, this review first introduces the melanin subtypes existing in nature and provides an insight into the conventional extraction methods of natural melanin and its classification into four categories according to their principles. Second, it summarizes the insoluble, antioxidant, and optical properties of melanin and introduces the corresponding modification methods, including the application of melanin in biomedicine in recent years. Finally, the research and industrial development of natural melanin are discussed. We hope to provide useful insight into the exploitation of natural melanin and pave the way for its potential applications.

natural melanin, physicochemical properties, extraction and modification, biomedical applications of melanindoi: [10.1360/TB-2022-1009](https://doi.org/10.1360/TB-2022-1009)