

中性壳聚糖复合液的制备及其功效研究

章子锋^{1*}, 郝高亚^{2#}, 张莹洁², 潘大庆², 王菲², 陈斐³, 李伟⁴, 王丽楠⁴, 杨保成¹, 李小红^{4*}

(1. 黄河科技学院纳米功能材料研究所, 河南郑州, 450000;

2. 河南健康广济生物技术有限公司, 河南郑州, 450000;

3. 河南大学纳米科学与材料工程学院, 河南开封, 475004;

4. 河南大学纳米科学与工程研究院, 河南开封, 475004)

DOI:10.61369/CDCST.2025030003

摘要: 以壳聚糖为原料, 采用酸碱沉淀法制备中性壳聚糖复合液, 并进行功效评价研究。通过 DPPH 自由基清除测试、酪氨酸酶/透明质酸酶/弹性蛋白酶的活性抑制率测试、体外头发梳理力、体外细胞毒性和人体功效实验等, 评估壳聚糖复合液的功效性和安全性。结果显示, 在体积分数为 1% (v/v) 时, 壳聚糖复合液对酪氨酸酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶抑制率分别为 27.55%、12.42%、13.07%, 对 DPPH 自由基清除率为 16.58%, 头发梳理力减小 7%; 壳聚糖复合液无细胞毒性, 人体功效实验结果表明壳聚糖复合液可显著提升皮肤水分含量, 降低经皮失水率、红区面积、皱纹面积和皮肤紧致度。壳聚糖复合液具有美白、紧致、抗皱、舒缓、抗氧化、提升头发梳理性的功效, 在化妆品领域有较好的应用前景。

关键词: 壳聚糖溶液; 功效; 化妆品原料

第一作者简介: 章子锋, 讲师, 黄河科技学院纳米功能材料研究所, 主要研究方向为功能高分子材料, E-mail: zhangzifeng@hhstu.edu.cn。

并列第一作者简介: 郝高亚, 硕士, 河南健康广济生物技术有限公司研发项目经理, E-mail: haogy@unionmed.com。

通讯作者简介: 李小红, 教授, 河南大学纳米科学与工程研究院, 主要研究方向为聚合物基纳米功能材料, E-mail: xiaohongli@vip.henu.edu.cn。

杨保成, 教授, 黄河科技学院纳米功能材料研究所, 主要研究方向为纳米复合材料, E-mail: baochengyang@infm.hhstu.edu.cn。



章子锋

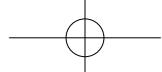
壳聚糖来源丰富^[1], 属于可再生的绿色生物资源。从虾蟹、昆虫甲壳等海洋节肢动物中得到甲壳素, 经脱乙酰化处理, 可得到不同分子量和脱乙酰度的壳聚糖^[2]。作为唯一的大分子天然碱性多糖, 壳聚糖的结构中含有丰富的伯氨基, 因具备较好的生物相容性^[3]、保湿^[4]、成膜^[5]、无毒^[6]、抗菌^[7]、促愈^[8]、抗氧化^[9]、增强免疫力^[10]等特性, 在食品、生物医学^[11]、工业等方面应用较广, 尤其在伤口敷料^[12]方面已有大量研究。由于壳聚糖分子结构中的氨基等亲水基团易形成氢键, 在配制水溶液时, 水分子无法克服壳聚糖内部的相互作用力, 因此壳聚糖难以在水中溶解, 仅溶于盐酸、乙酸等酸性溶液中。目前溶解壳聚糖常需要乙酸作为辅助溶剂^[13], 导致壳聚糖溶液的 pH 在 2~4 之间, 会刺激伤口、皮肤和毛发, 产生不良反应, 限制了壳聚糖在化妆品领域的应用。因此探索合适的工艺提高壳聚糖的水溶性, 以及探索壳聚糖在护肤方面的应用显得尤为迫切。

目前研究主要从两方面提升壳聚糖的水溶性: (1) 降解高分子壳聚糖, 得到能溶于水的低分子壳聚糖; 常见的调控壳聚糖分子量的方法有酶解法、化学调控 (氧化降解

和酸水解)、物理调控 (紫外线、辐射、超声等)。贾飞鸿等^[14]利用超声-微波法联合复合酶法制备壳寡糖, 但该方法工艺复杂、成本高并且难以实现工业化生产; 赵坐都^[15]通过氧化降解、超声波和低温冻干方法联用制备低分子量壳聚糖, 然而氧化降解时过氧化氢易导致壳聚糖褐变, 且该工艺复杂, 成本较高; 而物理降解法通常存在产物难于分离的缺陷。(2) 通过化学修饰, 利用壳聚糖的氨基或羟基的活性引入亲水基团, 改善壳聚糖分子内的氢键等作用力, 提高壳聚糖的水溶性, 同时期望获得功能化的拓宽。一般的改性方法有: 酰化、醚化、烷基化、酯化及季铵化改性壳聚糖, 均能提升壳聚糖的水溶性^[16]。但引入基团对壳聚糖进行化学修饰, 其工艺苛刻、复杂, 对生产设备的要求及生产成本较高, 同时存在副产物, 有潜在的安全性风险。

基于此, 本文提出一种新策略, 不进行化学修饰或改变壳聚糖的分子量得到 pH 为中性的壳聚糖水溶液, 并对其功效进行探究。通过将氢氧化钠溶液滴入壳聚糖-乙酸溶液中, 使壳聚糖絮凝沉淀析出, 再将其溶解在乙酸溶液中, 优化制备中性壳聚糖复合液的工艺参数; 采用防腐挑

国家资助博士后研究人员计划 C 档资助 (GZC20240386), 河南省重大专项 (批准号: 231111233100), 河南省科技攻关 (批准号: 252102310447、222102230089、242102230070)



战实验, 筛选出最佳配方保证壳聚糖溶液在应用中的储存稳定性; 通过对透明质酸酶、弹性蛋白酶、酪氨酸酶的活性抑制率, 以及头发梳理力和 DPPH 自由基清除率进行测试, 验证了壳聚糖溶液的护肤和护发功效。本文提供一种工艺简单、成本可控、易于实现低成本产业化生产的壳聚糖水溶液的制备方法, 并为壳聚糖在化妆品方向的功效应用提供参考。

1. 实验部分

1.1 材料和仪器

壳聚糖 (CS), 为河南健康广济生物技术有限公司自有原料, 脱乙酰度不小于 75%; 冰乙酸, AR, 购自阿拉丁; 氢氧化钠, AR, 购自阿拉丁; Nago A91 (甘油辛酸酯、丙二醇、辛酰羟肟酸=12 : 87 : 1, 以下简称 A91), 日化级, 购自广州艾卓生物科技股份有限公司; 聚乙二醇 4000 (PEG4000)、聚乙二醇 6000 (PEG6000)、聚乙二醇 8000 (PEG8000), 药用辅料, 购自辽宁奥克化学股份有限公司; EUXYL PE 9010 (苯氧乙醇: 乙基己基甘油=9 : 1)、对羟基苯乙酮、1,2-己二醇, 日化级, 购自亚什兰。

分析天平 (YT2204, 昆山); 悬臂式强力电动搅拌器 (LC-CES-120S, 上海); 旋转黏度计 (NDJ-5s, 上海); pH 计 (pHS-3E, 上海); 老化试验箱 (DHG-2050B, 郑州); 集热式恒温加热磁力搅拌器 (DF-101S, 上海)。

1.2 试验方法

1.2.1 壳聚糖复合液的制备

(1) 将 4% 氢氧化钠 (w/v) 溶解在水中, 冷却至室温, 备用。

(2) 壳聚糖的预处理: 将 7.6 g 壳聚糖分散溶解在 950 mL 质量分数为 0.25% 的乙酸水溶液中, 转速为 600~750 r/min 搅拌 2 h, 使壳聚糖充分溶解。缓慢加入 4% 的氢氧化钠溶液, 调整体系 pH 值至 7.3~8.5, 使壳聚糖絮凝析出, 继续搅拌 2 h 后经 100 目过滤得到壳聚糖絮凝沉淀。

(3) 壳聚糖复溶液的制备: 将壳聚糖絮凝沉淀溶解在质量分数为 0.04% 的乙酸溶液中, 搅拌 1 h, 并经过 300 目过滤去除不溶物。

(4) 中性壳聚糖复合液的制备: 将 PEG6000、防腐剂 (A91、EUXYL PE 9010、对羟基苯乙酮、1,2-己二醇)、余量水加入壳聚糖复溶液中搅拌均匀, 灌装进铝箔袋中, 密封, 再使用剂量为 8kGy 的 γ 射线进行辐射, 即得 pH 值

偏中性的壳聚糖复合液。

1.2.2 pH 测定方法

采用 pH 计, 依据《化妆品安全技术规范》(2015 年版) 中的试验方法对壳聚糖絮凝沉淀的滤液和壳聚糖复合液进行直接测定。

1.2.3 防腐挑战实验

按照 TSHRH017-2019 的方法进行测定。

1.2.4 壳聚糖复合液的舒缓功效测定

采用抑制透明质酸酶试验测试: (1) 将 100 μ L 的透明质酸酶 (500 U/mL), 100 μ L 的 PBS 缓冲液 (100 mmol/L, pH=7.37 $^{\circ}$ C), 100 μ L 的 NaCl (50 mmol/L), 100 μ L 的 BSA (0.01%) 与 50 μ L 的样本溶液混匀作为培养基, 在摇床中 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。(2) 加入透明质酸溶液 (0.03%, 溶于 300 mmol/L PBS 溶液, pH=5.35) 100 μ L, 作为反应的开始, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 45 min。(3) 未经水解的透明质酸用 1.0 mL 的酸白蛋白溶液 (0.1% 的 BSA 溶于 24 mmol/L 的乙酸钠和 79 mmol/L 的乙酸, pH=3.75) 沉淀。(4) 室温放置 10 min, 检测 600nm 处的吸光度。以 PBS 组作为空白对照, 以未加酶的测试组作为最大抑制率的对照, 0.016% 维生素 E 作为阳性对照。

透明质酸酶活性抑制率的百分比计算如公式 (1) 所示:

$$\text{透明质酸酶活性抑制率(\%)} = \frac{\text{样品组 OD}}{\text{对照组 OD}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.5 壳聚糖复合液的抗氧化功效测定

采用 DPPH 自由基清除实验测试, 将样品用超纯水制备成体积分数为 0.5%、1.0%、2.5%、5%、10% 的待测液作为实验组, 并按照表 1 进行反应体系的制备, 室温下避光反应 30 min 后, 测试体系吸光度 (517 nm), 按照公式 (2) 计算 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{DPPH 自由基的清除率(\%)} = \frac{(OD_{C_1} - OD_{C_2}) - (OD_{T_1} - OD_{T_2})}{OD_{C_1} - OD_{C_2}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: T_1 ——有 DPPH 的实验组, T_2 ——无 DPPH 的实验组; C_1 ——有 DPPH 的对照组, C_2 ——无 DPPH 的对照组。

表 1 DPPH 自由基清除实验设计

试剂	$C_1/\mu\text{L}$	$C_2/\mu\text{L}$	$T_1/\mu\text{L}$	$T_2/\mu\text{L}$
DPPH 乙醇溶液	180	0	180	0
实验组	0	0	20	20
无水乙醇	0	180	0	180
对照组	20	20	0	0

1.2.6 壳聚糖复合液的美白功效测定

采用抑制酪氨酸酶试验测试: 将样品用超纯水制备成体积分数为 0.5%、1.0%、2.5%、5%、10% 的待测液作为实

验组, 并按照表2进行反应体系的配制, 测试475 nm处的吸光度。

表2 抑制酪氨酸酶实验设计

试剂	对照组 (A)	对照底色 组(B)	样品组 (C)	样品底色 组(D)	曲酸(阳 性对照)
	体积/ μL				
PBS缓 冲液	10	100	-	90	-
样品	-	-	10	10	10
酪氨 酸酶	90	-	90	-	90
37℃孵育30 min					
100 μL					
L-多巴					
37℃孵育30 min					
$A_{475\text{ nm}}$ 测定					

注①底物为L-多巴; ②曲酸为酪氨酸酶抑制剂。

按照公式(3)计算酪氨酸酶活性抑制率:

$$\text{酪氨酸酶活性抑制率}(\%) = \frac{(OD_A - OD_B) - (OD_C - OD_D)}{OD_A - OD_B} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.7 壳聚糖复合液的抗皱、紧致功效测定

采用抑制弹性蛋白酶试验测试: 将弹性蛋白酶和显色底物N-琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸-p-硝基苯胺使用缓冲液配制工作液, 临用配制。将阳性对照物EGCG(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)用缓冲液配制, 梯度稀释成系列浓度以验证试验系统。将样品用缓冲液制备成体积分数为0.5%、1.0%、5%、10%的待测液作为实验组, 并按照表3进行反应体系的配制, 使用96微孔板进行试验并测试410 nm处的吸光度值。

表3 抑制弹性蛋白酶实验设计

	样品组 (T)	样品底色组 (T0)	阴性对照组 (C)	溶剂底色组 (C0)
弹性蛋白酶	+	-	+	-
阳性受试物/待 测受试物	+	+	-	-
缓冲液	-	+	+	+
25℃ 15min				
AAAPAN	+	+	+	+
25℃ 15min				

按照公式(4)计算弹性蛋白酶活性抑制率:

$$\text{弹性蛋白酶活性抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{OD_T - OD_{T0}}{OD_C - OD_{C0}}\right) \times 100\% \quad (4)$$

其中, T为实验组, T0为阳性对照组, C为阴性对照组, C0为空白对照组。

1.2.8 壳聚糖复合液的护发功效测定

(1) 试验前准备: 选取相同规格的体外真发, 随机分成实验组和对照组, 每组5束每束头发至少测量3次。(2) 试验测定: 将样品用超纯水制备成体积分数为5%的待测液

作为实验组, 用自来水将发束润湿后, 取适量待测液涂抹均匀, 顺着头发至发尾方向捏洗, 确保其不蓬乱且均匀受样数分钟, 用水冲洗30 s, 洗净方可进行测试。对照组用清水处理, 待其自然干燥后, 按照同样的方法再次测量头发的梳理力, 并做好记录试验过程使用同一仪器和同一测量人员。

1.2.9 壳聚糖复合液的体外细胞毒性测定

使用MTT法测试壳聚糖复合液的体外细胞毒性。(1) 实验前准备: 实验组为壳聚糖复合液, 阴性对照为高密度聚乙烯, 阳性对照为一次性使用灭菌橡胶外科手术手套; 各组均按照0.2g样品加1mL浸提介质比例配制, 并在37℃下震荡浸提24h。(2) 实验测定: 将实验组、阴性对照、阳性对照组、空白对照组的浸提液分别放于已接种小鼠成纤维细胞(L929)的96孔细胞培养板内, 置于含5% CO₂细胞培养箱中, 37℃培养24h至形成半汇合单层细胞, 24h后显微镜下观察各组的细胞形态, 并用MTT法测定各组相对于空白对照组的存活率。

1.2.10 壳聚糖复合液的人体功效评价测试

选取健康男性/女性受试者12名, 年龄范围20-55岁, 参照人体皮肤斑贴实验的方法测试未稀释的壳聚糖复合液和含壳聚糖复合液面霜的人体安全性。人体功效试验以自身使用前后及左右脸对照, 左侧使用基质面霜作为对照组, 右侧使用含壳聚糖复合液的面霜作为试验组。测量受试者在使用样品前和28天后的皮肤角质层水分含量、皮肤经皮水分流失值、皮肤皱纹面积、皮肤紧致度F4, 进行主观评估并拍摄全脸照片, 对比皮肤红区面积占比。

1.2.11 统计学方法

用t-test双尾检验方法进行统计分析, 样品组与对照组相比, 显著性以*表示, $p\text{-value} < 0.05$ 表示为*, $p\text{-value} < 0.01$ 表示为**, p 值 < 0.05 为差异具有统计学意义。

2. 结果与讨论

2.1 壳聚糖复合液的pH

中性壳聚糖复合液的制备流程图如图1所示。将壳聚糖颗粒在乙酸水溶液中首次溶解时, 壳聚糖在溶液中的分子链构象为无规线团, 大部分氨基分布在分子链内, 少部分氨基被质子化, 分子内、分子间存在氢键作用; 通过酸碱沉淀法得到壳聚糖絮凝沉淀, 其分子链排列稍显规整, 并呈现紧密蜷缩的构象, 将水分子锁在网状结构中; 在壳

聚糖复溶阶段, 由于壳聚糖分子链构象的变化, 大部分氨基暴露在分子链外, 使用少量乙酸即可使壳聚糖完全溶解, 此时壳聚糖的分子链呈现出更为规整的三维网状结构, 由于壳聚糖的部分氨基被质子化, 一部分乙酸的氢离子被消耗, 因此溶液的酸碱度接近中性。

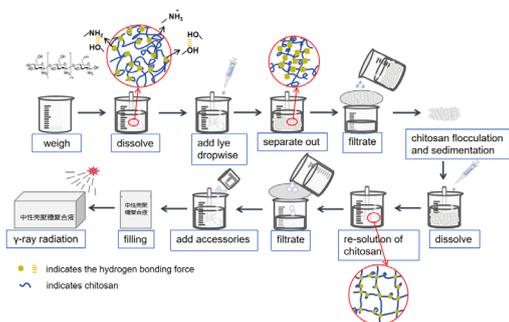


图1 中性壳聚糖复合液的制备流程图

直接接触人体的材料, 其 pH 值是关键的安全性指标之一。由于人体皮肤的 pH 值为中性偏酸性, 若接触皮肤的材料 pH 值过酸或过碱, 都会对皮肤有刺激作用, 引发红斑、水肿等不良反应。对样品的 pH 进行测试, 结果见表 4。其中 A、B、C 三组分别对应添加不同防腐剂的三组样品。由表 4 可知, 壳聚糖絮凝沉淀的滤液 pH 控制在 8 附近时, 壳聚糖复合液的 pH 可控制在 5.5~6.5, 呈弱酸性, 接近正常皮肤的 pH 值。

表 4 pH 测试结果

样本号	壳聚糖絮凝沉淀的滤液 pH	防腐剂种类及添加量	壳聚糖复合液的 pH
A	7.85	0.16% EUXYL PE 9010	6.03
B	8.13	0.3% A91	6.02
C	7.86	0.5% 对羟基苯乙酮 + 0.5% 1,2-己二醇	5.95

2.2 壳聚糖复合液的防腐体系筛选

防腐剂在产品中起到保障产品质量稳定的作用。为了验证产品的微生物稳定性, 采用防腐挑战实验, 分别检测样品耐细菌和真菌的稳定性。添加不同防腐剂产品的防腐挑战结果如表 5 所示, 采用 A91 的 B 组具有优异的微生物稳定性。此外还观察到 A91 可有效缓解 γ 射线辐射导致的变色。因此本文选取 A91 作为壳聚糖复合液的防腐剂, 选择 B 组样品作为后续功效测试的样品。

2.3 壳聚糖复合液的舒缓功效

透明质酸作为天然保湿物质, 在维持细胞外基质体积及皮肤正常生理功能上有关键作用, 透明质酸酶能够特异性分解透明质酸, 可以用透明质酸酶抑制率作为样品舒缓、保湿效果的评价依据。透明质酸酶在碱性条件下可将

二硝基水杨酸还原为氨基化合物, 沸水浴后使其充分显色, 因此可通过测定吸光度变化评估样品对透明质酸酶的抑制率。壳聚糖复合液在不同体积分数 (0.5%、1.0%、2.5%、5%、10%) 下对透明质酸酶活性的抑制情况见图 2-(a)。

表 5 添加不同防腐剂的防腐挑战实验结果

样本号	菌种	菌落总数 / $CFU \cdot g^{-1}$	7天活菌对数减少值 R_x	14天活菌对数减少值 R_x	28天活菌对数减少值 R_x	测试结果
A	大肠埃希氏菌	0	因中和剂鉴定阶段未筛选出合适的中和剂, 故该组实验未进行到最后阶段。			不合格
	金黄色葡萄球菌					
	黑曲霉菌					
	白色假丝酵母菌					
	铜绿假单胞菌					
	大肠埃希氏菌					
金黄色葡萄球菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
黑曲霉菌	0	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI		
白色假丝酵母菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
铜绿假单胞菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
大肠埃希氏菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI	合格		
金黄色葡萄球菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
黑曲霉菌	0	≥ 3	≥ 3 且 NI		≥ 3 且 NI	
白色假丝酵母菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
铜绿假单胞菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
大肠埃希氏菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI		合格	
金黄色葡萄球菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
黑曲霉菌	0	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI		
白色假丝酵母菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
铜绿假单胞菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
大肠埃希氏菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI	合格		
金黄色葡萄球菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
黑曲霉菌	0	≥ 3	≥ 3 且 NI		≥ 3 且 NI	
白色假丝酵母菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
铜绿假单胞菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
大肠埃希氏菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI		合格	
金黄色葡萄球菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
黑曲霉菌	0	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI		
白色假丝酵母菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			
铜绿假单胞菌	≥ 3	≥ 3 且 NI	≥ 3 且 NI			

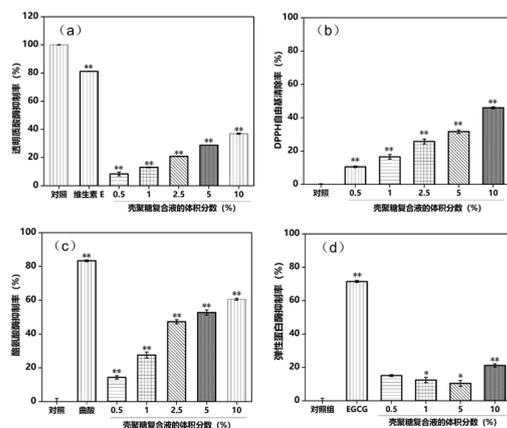


图 2 壳聚糖复合液舒缓、抗氧化、美白功效评价结果: (a) 为透明质酸酶抑制率与样品体积分数的关系; (b) 为 DPPH 自由基清除率与样品体积分数的关系; (c) 为酪氨酸酶抑制率与样品体积分数的关系; (d) 为弹性蛋白酶抑制率与样品体积分数的关系

由图2-(a)可见,壳聚糖复合液具有抑制透明质酸酶活性的作用,在0.5%~10%范围内,随着壳聚糖复合液体积分数的提高,透明质酸酶活性的抑制率逐步提高,且与对照组相比具有统计学差异($p<0.01$)。在壳聚糖复合液的体积分数为1%时,对透明质酸酶活性的抑制率达到13.07%,说明壳聚糖复合液具有一定的舒缓功效,可应用到化妆品中,有望协同增效对皮肤的舒缓作用。

2.4 壳聚糖复合液的抗氧化功效

DPPH的乙醇溶液为深紫色,添加自由基清除剂可使其褪色。褪色程度与其接受的电子数有线性关系,因此可通过颜色变化测试样品对自由基的清除作用,并表征样品抗氧化活性的强弱。壳聚糖复合液在不同体积分数(0.5%、1.0%、2.5%、5%、10%)下清除DPPH的实验结果如图2-(b)所示。

由图2-(b)可见,壳聚糖复合液具有清除DPPH自由基的作用,在0.5%~10%范围内,随着壳聚糖复合液体积分数的提高,DPPH自由基清除率逐步提高,且与对照组相比具有统计学差异($p<0.01$)。在壳聚糖复合液的体积分数为1%时,对DPPH自由基清除率达到16.58%,说明壳聚糖复合液具有抗氧化功效,在使用时有望改善皮肤的氧化损伤状态。

2.5 壳聚糖复合液的美白功效

酪氨酸酶是皮肤黑色素合成路径中的关键酶,可诱导多巴转化为多巴醌,最终生成黑色素,使皮肤变黑,因此,可通过测试样品对酪氨酸酶活性抑制率表征样品的美白作用。抑制酪氨酸酶的活性,能够抑制多巴转化成多巴醌,可通过测试体系的吸光度变化表征样品的酪氨酸酶活性抑制率。壳聚糖复合液在最终测试体系中的体积分数分别为0.5%、1%、2.5%、5%、10%,对照组为PBS液,阳性组为曲酸。酪氨酸酶活性抑制结果见图2-(c)。

通过图2-(c)可见,壳聚糖复合液具有抑制酪氨酸酶活性的作用,在0.5%~10%范围内,随着壳聚糖复合液体积分数的提高,酪氨酸酶活性的抑制率逐步增大,且与对照组相比具有统计学差异($p<0.01$)。在壳聚糖复合液的体积分数为1%时,对酪氨酸酶活性的抑制率达到27.55%,说明壳聚糖复合液具有美白功效,可通过降低皮肤中黑色素的合成率,协同增效对皮肤的美白作用。

2.6 壳聚糖复合液的抗皱、紧致功效

弹性蛋白的缺失是皮肤老化的主要原因,抑制弹性蛋白酶的活性能有效减缓弹性蛋白的分解,维持皮肤弹性。

弹性蛋白酶能催化水解多种氨基酸中多肽键所含的羧基,与底物N-琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸-p-硝基苯胺发生反应时,会产生有色物质,可在410 nm处测试其吸光度。根据吸光值的变化,计算样品对弹性蛋白酶活性的抑制作用,可评价样品是否具有紧致、抗皱功效。壳聚糖复合液在不同体积分数(0.5%、1.0%、5%、10%)下抑制弹性蛋白酶活性的实验结果如图2-(d)所示。

通过图2-(d)可见,壳聚糖复合液具有抑制弹性蛋白酶活性的作用,在1.0%~10%范围内,随着壳聚糖复合液体积分数的提高,对弹性蛋白酶活性抑制率逐步增大,且与对照组相比具有统计学差异($p<0.01$)。在壳聚糖复合液的体积分数为1%时,对酪氨酸酶活性的抑制率达到12.42%。说明壳聚糖复合液具有抗皱、紧致功效,可以改善皮肤的松弛、细纹状态。

2.7 壳聚糖复合液的护发功效

护理头发时,降低头发间、头发与梳齿间的摩擦力,可使头发收到的拉伸力减小,从而减少脱发量,因此头发梳理力是评价护发性能的指标之一。壳聚糖复合液在体积分数5%时,改善头发梳理力的实验结果如图3所示。

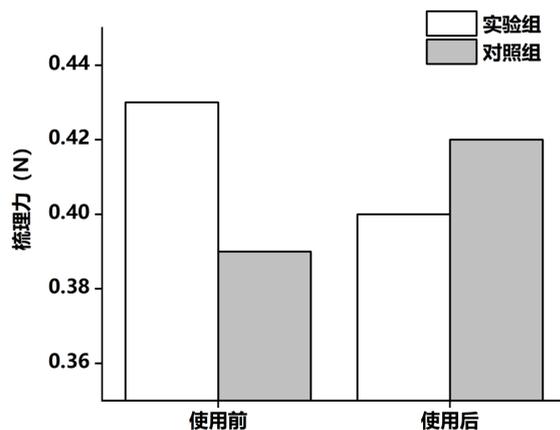


图3 使用壳聚糖复合液前后、对照组的梳理力

通过图3可见,壳聚糖复合液组的平均梳理力在实验后降低0.03N,减小7%,而空白对照组的平均梳理力在实验后提高0.03N,提高7.7%,统计学差异 p 值 <0.05 。说明壳聚糖复合液能改善头发的梳理性能,如断裂性、顺滑性。

2.8 壳聚糖复合液的体外细胞毒性

用体外细胞毒性测试评价壳聚糖复合液致细胞毒性反应的潜在性,以确保其直接接触皮肤的生物安全性,测试结果见图4。通过图4可见,各组细胞的活性均高于70%,表明壳聚糖复合液没有细胞毒性。

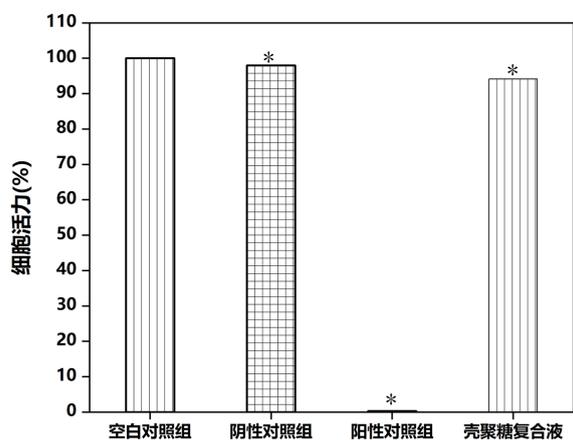
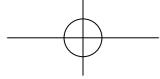


图4 壳聚糖复合液的体外细胞毒性测试结果

2.9 壳聚糖复合液的人体功效

对壳聚糖复合液与含壳聚糖复合液的面霜进行人体皮肤斑贴试验,结果显示,测试48 h后12名受试者均为阴性,无阳性,表明壳聚糖复合液及面霜对人体皮肤具有一定的安全性。由图5可知,与对照组相比,试验组使用含壳聚糖复合液的面霜28天后,皮肤角质层水分含量显著提升,皮肤经皮水分流失值显著下降,皮肤红区面积占比显著下降,皱纹面积显著下降,皮肤紧致度 F4 显著下降。表明壳聚糖复合液具有保湿、舒缓、抗皱和紧致功效,且在测试过程中未出现不良反应,人体安全性较高。

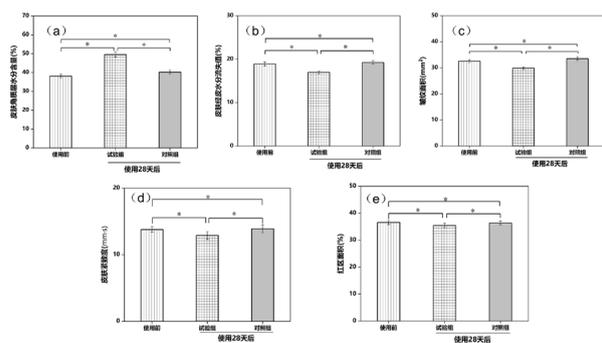


图5 壳聚糖复合液的人体功效测试结果: (a)测试区域使用样品前后的皮肤角质层水分含量; (b)测试区域使用样品前后的经皮失水率; (c)测试区域使用样品前后的红区面积; (d)测试区域使用样品前后的皱纹面积变化; (e)测试区域使用样品前后的皮肤紧致度。

3. 结论

本文以壳聚糖为原料,采用酸碱沉淀法制备壳聚糖絮凝沉淀,再将其复溶到低浓度乙酸溶液中,复配 PEG6000 与防腐剂的辅料,γ 射线辐照后可得到一种 pH 接近中性的壳聚糖复合液。通过清除 DPPH 自由基、抑制酪氨酸酶活

性、抑制透明质酸酶活性、抑制弹性蛋白酶活性、体外头发梳理力、体外细胞毒性和人体功效测试等实验评估了复合液的护肤、护发功效和安全性。研究表明,壳聚糖复合液无细胞毒性,在较低体积分数时(不超过1%)具有舒缓、美白、抗氧化、去皱/紧致和提升头发梳理性的功效,人体功效测试证明其有舒缓、紧致和抗皱的功效,是一种多功能的化妆品护肤、护发原料,能够广泛应用于护肤/护发领域。该复合液为壳聚糖的水溶液,解决了高分子量壳聚糖难溶于水以及溶液 pH 偏酸的问题,且本文提供的制备方法对生产设备的要求低,易于实现低成本产业化生产。

参考文献

[1]裴诺,施文正,汪之和.壳聚糖与生物保鲜剂复合使用在水产品保鲜中的研究进展[J].食品工业科技,2022,43(5):448-454.

[2]常海洋,赵安琪,王婧,等.壳聚糖和壳寡糖的制备及应用[J].现代农业科技,2024,5:161-164.

[3]楚陈晨,张丽颖,王文进,等.壳聚糖导电自修复凝胶的构建[J].闽江学院学报,2022,43(2):85-92.

[4]Dimier F, Vergnes B, Vincent M. Relationships between mastication conditions and rheological behavior of a natural rubber[J]. Rheologica Acta, 2004, 43(2): 196.

[5]杨亮,李韦霖,宋鑫钥,等.基于聚乙烯醇复合膜的改性研究进展[J].印染助剂,2022,39(11):5-11.

[6]耿志杰,于珊,曾志文,等.壳聚糖/海藻酸钠自修复水凝胶的制备与性能[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2022,43(3):322-331.

[7]董谦,母瑞红.药械组合产品属性界定中壳聚糖分子量与抗菌机制的关系探讨[J].中国药事,2020,34(11):1324-1328.

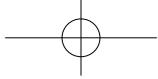
[8] Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar P T, et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications[J]. Biotechnol Adv, 2011, 29(3): 322-337.

[9] Anraku M, Fujii T, Kondo Y, et al. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 501-505.

[10] Xia W, Liu P, Zhang J, et al. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2): 170-179.

[11] Choi Y J, Simonsen J. Cellulose nanocrystal-filled carboxymethyl cellulose nanocomposites[J]. Journal of Nanoscience & Nanotechnology, 2006, 6(3): 633 - 639(7).

[12] 焦天宇,王宇宁,向巧灵,等.左氧氟沙星/壳聚糖/聚乙烯醇纳米纤维膜的制备与抗菌性能研究[J].化学与黏合,2022,44(1):7.



[13] 刘建安, 葛鹤, 王欢欢, 等. 不同分子量水溶性壳聚糖在纸质文献加固中的应用研究 [J]. 中国造纸, 2024,43(5): 116-123.
[14] 陈声, 侯婷婷, 江雅婷, 等. 壳聚糖分子量调控研究进展 [J]. 广州化工, 2019, 47(23).

[15] 赵坐都. 水溶性低分子量壳聚糖的制备工艺研究 [J]. 海峡药学, 2022,32(9): 8-10.
[16] 田光磊, 刘其海, 胡文斌, 等. 水溶性壳聚糖制备方法的研究进展 [J]. 广州化工, 2015, 43(20): 10-12.

Research on Preparation of a Neutral Chitosan Composite Liquid and Its Efficacy

Zhang Zi-feng^{1#}, Hao Gao-ya^{2#}, Zhang Ying-jie², Pan Da-qing², Wang Fei², Chen Fei³, Li Wei⁴, Wang Li-nan⁴, Yang Bao-cheng^{1*}, Li Xiao-hong^{4*}

(1. Institute of Nanostructured Functional Materials, Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou, Henan 450000;

2. Henan UNION MEDICAL SUPPLIES CO. LTD., Zhengzhou, Henan, 450000;

3. College of Nanoscience and Materials Engineering, Henan University, Kaifeng, Henan, 475004;

4. Engineering Research Center for Nanomaterials, Henan University, Kaifeng, Henan, 475004)

Abstract : Using chitosan as raw material, neutral chitosan complex solution was prepared by acid-base precipitation method and evaluated for efficacy. The efficacy of the chitosan complex was evaluated by DPPH free radical scavenging test, tyrosinase/hyaluronidase/elastase activity inhibition rate test, in vitro hair combing performance test, in vitro cytotoxicity and human efficacy tests. The results showed that at a volume fraction of 1% (V/V), the chitosan complex solution inhibited tyrosinase, elastase and hyaluronidase by 27.55%, 12.42% and 13.07% respectively, and scavenged DPPH free radicals by 16.58%, with a 7% reduction in hair combability. Chitosan complex solution is non-cytotoxic, and the results of human efficacy tests have shown that it can significantly increase skin moisture content, reduce transdermal water loss, red zone area, wrinkle area and skin firmness. Chitosan complex solution have whitening, firming, anti-wrinkle, soothing, antioxidant, and hair combability enhancing properties, showing great application prospects in the field of cosmetics..

Keywords : chitosan solution; skincare efficacy; cosmetic raw material

