

DOI: 10.3969/j.issn.1004-4949.2025.05.012

弱螯合重组胶原锌原料制备、理化表征及抗痤疮功效的检测研究

负琳琦, 强 飞, 李 冲

(浙江诸暨聚源生物技术有限公司, 浙江 绍兴 312000)

[摘要]目的 开发一种新型抗痤疮原料—弱螯合重组胶原锌, 并通过弱螯合技术对锌离子的长效释放和抗炎效果进行分析。方法 采用特定的pH和质量比, 制备并表征弱螯合重组胶原蛋白锌原料。利用电感耦合、扫描电子显微镜-能量色散X射线光谱 (SEM-EDS) 等多种分析技术对原料的理化特性进行全面评估。结果 胶原锌螯合率先升后降, 10/8配比时最高, 其螯合物特征吸收峰红移, $1600\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ 峰强度增加。在锌离子体外释放模拟实验中, 1 mg/ml的弱螯合重组胶原锌 (10/8) 整个释放过程更加平稳。在同水平锌离子浓度下条件下, 葡萄糖酸锌在1 h内全部释放, 而弱螯合重组胶原锌 (10/8) 的锌离子释放过程可持续4 h。弱螯合重组胶原锌在10%浓度时, 5α -还原酶抑制率为 $(46.70\pm 1.30)\%$, 高于纯胶原对照组和阳性对照的平均抑制率, 且随着浓度的增加而提高。而在1%浓度下, 在所有时间点均展现出最高的抑菌率, 随时间延长, 抑菌率显著增加, 8 h抑菌率为84.96%。结论 弱螯合重组胶原锌原料为痤疮治疗提供了一种新的有效选择, 具有在化妆品行业中应用的潜力。

[关键词] 痤疮; 弱螯合技术; 重组胶原蛋白; 锌离子**[中图分类号]** TQ658**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1004-4949 (2025) 05-0053-04

Research on the Preparation, Physicochemical Characterization and Anti-acne Efficacy of Weak Chelation Recombinant Collagen Zinc Raw Material

YUN Linqi, QIANG Fei, LI Chong

(Zhejiang Zhuji Jland Biotech Co., Ltd., Shaoxing 312000, Zhejiang, China)

[Abstract]**Objective** To develop a new anti-acne raw material, weak chelation recombinant collagen zinc, and analyze the long-term release and anti-inflammatory effects of zinc ions through the weak chelation technology. **Methods** The weak chelation recombinant collagen zinc raw material was prepared and characterized using specific pH and mass ratios. The physicochemical properties of the raw materials were comprehensively evaluated by various analytical techniques such as inductive coupling, scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS). **Results** The chelation rate of collagen zinc increased first and then decreased, reaching the highest at a ratio of 10/8. The characteristic absorption peak of its chelate was red-shifted, with increased intensity at $1600\sim 1400\text{ cm}^{-1}$. In the simulation experiment of zinc ion release *in vitro*, the whole release process of 1 mg/ml of weak chelation recombinant collagen zinc (10/8) was more stable. Under the same level of zinc ion concentration, zinc gluconate was completely released within 1 h, while the zinc ion release process of weak chelation recombinant collagen zinc (10/8) could last for 4 h. When the concentration of weak chelation recombinant collagen zinc was 10%, the inhibition rate of 5α -reductase was $(46.70\pm 1.30)\%$, which was higher than the average inhibition rate of the pure collagen control group and the positive control, and increased with the increase of concentration. At the concentration of 1%, it showed the highest antibacterial rate at all time points. With the extension of time, the antibacterial rate increased significantly, reaching 84.96% at 8 h. **Conclusion** The weak chelation recombinant collagen zinc raw material provides a new and effective option for acne treatment, with potential applications in the cosmetics industry.

[Key words] Acne; Weak chelation technology; Recombinant collagen; Zinc ion

第一作者: 负琳琦 (1996.6-), 女, 山西洪洞县人, 硕士, 主要从事生物高分子的研究工作

痤疮 (acne) 主要发生于青少年时期, 12~24岁为高发年龄段, 此特征与性激素改变有关^[1, 2]。另外, 不同地区的痤疮发病率也不同, 可能与饮食习惯、生活习惯、环境暴露等相关, 比如高糖、高脂饮食、精神紧张、长期暴晒于日光之下, 这些都会导致痤疮的发生。痤疮不仅影响患者外观, 还会导致患者自信心受损, 社交能力下降, 严重降低其生活质量^[3, 4]。重组胶原蛋白因优秀生物相容性和保湿性能而被广泛应用于皮肤护理领域。然而, 传统重组胶原蛋白产品在抑菌和抗炎方面的功效有限, 无法全面满足痤疮治疗的需求。锌 (Zn) 作为一种必需的微量元素, 已被证明具有显著的抗炎和抑菌特性^[5, 6]。因此, 将锌与重组胶原蛋白结合, 可能为痤疮治疗提供一种新的有效成分。本研究目标是优化螯合条件, 制备具有最佳螯合效果的材料, 并对其理化特性和生物活性进行评估, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 原料制备

1.1.1 仪器与材料 葡糖酸锌、氢氧化钠, 购自国药集团; 可溶性胶原 (>90%), 购自江苏江山聚源有限公司; 纯化水, 自制; 非那雄安、人5 α -还原酶ELISA试剂盒、痤疮丙酸杆菌ATCC6919, 购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.1.2 制备方法 首先, 将葡糖酸锌粉末在纯化水中溶解, 直至达到无色透明的均匀溶液。其次, 在葡糖酸锌溶液中, 根据预先设计的实验方案, 以不同的质量比 (10/3~10/10) 向溶液中加入重组胶原蛋白, 持续搅拌溶液0.5~2 h, 以确保螯合反应的充分进行。在这个过程中, 使用一定量氢氧化钠溶液调节溶液, pH值在5.5~6.5范围内。

1.1.3 理化检测 通过电感耦合等离子体质谱[ICP, 美国Agilent 7700 (MS)]确定重组胶原蛋白和葡糖酸锌的最佳螯合比^[7~10]。利用傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR, 美国Thermo Fisher Scientific Nicolet iS20) 对原料中的化学键和分子结构进行了鉴定, 检测条件400~4000 cm⁻¹。

1.2 功效检测

1.2.1 锌离子体外释放实验 通过评估弱螯合重组胶原原料中锌离子的体外释放行为, 探究原料的控释效果。具体方法如下: 采用葡糖酸锌作为实

验对照, 称取一定量样品置于透析袋中, 透析袋随后浸入去离子水中, 并在37℃培养箱中孵育以模拟生理环境。在预设时间点 (0、0.5、1、2、4、8、24 h), 取出10 ml溶液并保存于4℃的离心管中, 同时补充等体积去离子水以维持透析体系的体积恒定。采用电感耦合等离子体质谱[icp, 美国Agilent 7700 (MS)]测试锌离子含量, 评估锌离子的释放特性。

1.2.2 控油实验 采用双抗体夹心法检测样品对5 α -还原酶的抑制率, 通过比较分析试验数据评估样品对5 α -还原酶的抑制效果, 评价原料控油功效, 测试对照组选择非那雄安。具体实验方法如下: 设立以下组别: 空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和样品组, 每组设置3个平行孔。除空白对照组外, 其他各组每孔首先加入20 U/ml的5 α -还原酶标准品25 μ l。接着, 阴性对照组加入样品稀释液, 阳性对照组加入0.5 mg/ml的非那雄安, 样品组加入相应浓度的样品, 每孔加样量为25 μ l。在37℃恒温反应器中孵育60 min后, 进行洗涤、抗体孵育、再次洗涤、显色反应, 最终在450 nm波长下测定吸光度。5 α -还原酶抑制率计算公式如下: 5 α -还原酶抑制率=[1-(样品组/阳性对照组-空白对照组均值)/(阴性对照组-空白对照组均值)] $\times$ 100%。

1.2.3 抑菌实验 针对痤疮相关细菌, 痤疮丙酸杆菌采用WS/T 650-2019《抗菌和抑菌效果评价方法》悬液定量抑菌试验, 评估原料的直接抑菌效果。具体测试方法如下: 采用PBS洗下24 h斜面培养的试验菌, 配制成菌悬液, 确保菌液浓度在 $1 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ cfu/片或ml范围内。接着, 取等量的被试样片 (尺寸为2.0 cm $\times$ 3.0 cm) 或样液 (5 ml), 以及对照样品 (与被试样品材质相同, 但不含抗菌成分, 并经灭菌处理) 各4份, 置于无菌平皿中。将菌悬液均匀涂布于样片或样液上, 滴加100 μ l后开始计时, 并在指定时间后, 将样片或样液转移至含5 ml PBS的试管中充分混匀。经过适当稀释, 取2~3个稀释度的溶液, 各0.5 ml, 倾注于营养琼脂培养基 (用于细菌) 或沙氏琼脂培养基 (用于酵母菌), 在40~45℃条件下进行平板倾注, 待琼脂凝固后翻转平板, 于35 $\pm$ 2℃下培养48 h (细菌) 或72 h (酵母菌), 并进行活菌菌落计数。实验重复3次, 根

据公式计算抑菌率： $X = (A - B) / A \times 100\%$ 。其中，X代表抑菌率（%）；A代表对照样品平均菌落数；B代表被试样品平均菌落数。

2 结果

2.1 整合率及结构分析 弱整合重组胶原锌随胶原和锌的配位比10/3、10/5、10/8、10/10整合率分别为20%、25%、38%、35%，呈先上升后下降的趋势，在10/8处整合率最高。胶原锌整合物的特征吸收峰位置也发生了红移，在1600~1400 cm^{-1} 范围内可看到明显峰强度有所增加，见图1。

2.2 性能及功效分析 在锌离子体外释放模拟实验，1 mg/ml的弱整合重组胶原锌（10/8）整个释放过程更加平稳。在同水平锌离子浓度条件下，葡萄糖酸锌在1 h内全部释放，而弱整合重组胶原锌（10/8）的锌离子释放过程可持续4 h，见图2。弱整合重组胶原锌在10%浓度时，5 α -还原酶抑制率为（46.70 $\pm$ 1.30）%，均高于纯胶原对照组

和阳性对照的平均抑制率，且随着浓度的增加而提高，见图3。而在1%浓度下，在所有时间点均展现出最高的抑菌率，随时间延长，抑菌率显著增加，在8 h抑菌率达84.96%，见图4。

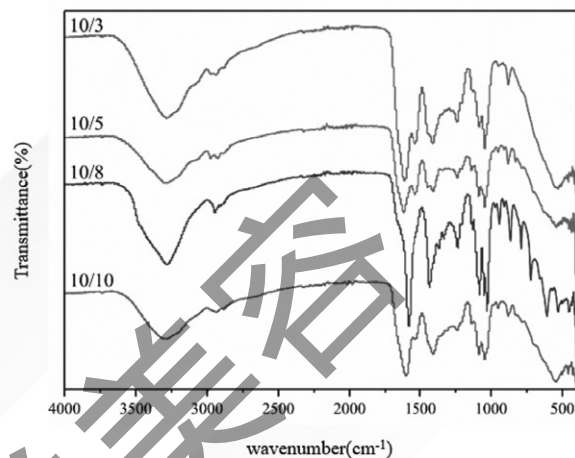


图1 不同配比的弱整合重组胶原锌 FTIR 结果图

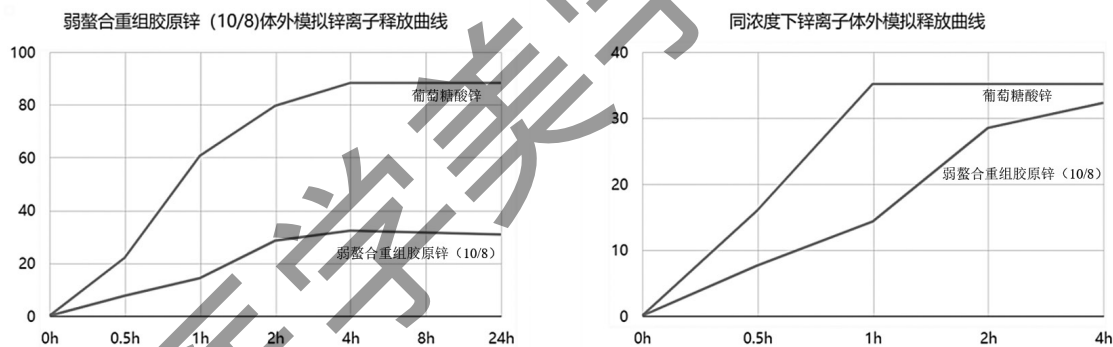


图2 弱整合重组胶原锌（10/8）原料体外锌离子释放情况

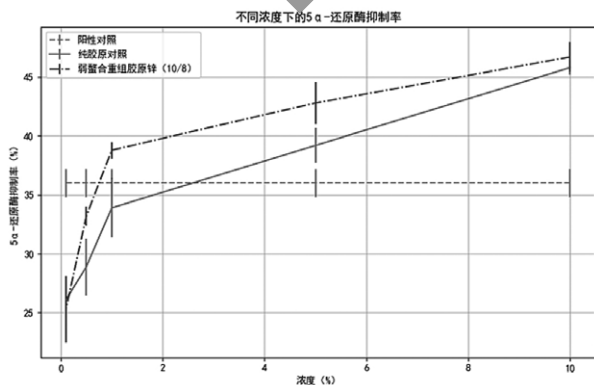


图3 弱整合重组胶原锌（10/8）对5 α -还原酶的抑制率

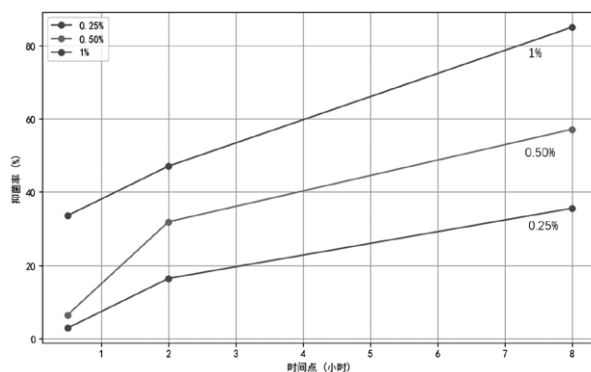


图4 不同浓度弱整合重组胶原锌（10/8）对痤疮丙酸杆菌的抑制率

3 讨论

在现代医疗美容与护肤行业蓬勃发展下,消费者对于皮肤护理产品的需求呈现出显著上升态势,其对于痤疮等皮肤疾病的重视程度亦随之大幅提升。在痤疮的临床治疗领域,传统抗痤疮产品往往倚重于抗生素及过氧化物等化学成分,然而长期使用这些成分,可能会引发皮肤过敏现象,同时还会导致细菌耐药性增强等问题^[11, 12]。鉴于此,当前的研究热点聚焦于研发天然或仿生型抗痤疮制品,旨在确保其安全性与有效性,从而为痤疮治疗开辟新的路径,满足广大消费者对高品质皮肤护理产品的迫切需求。

本研究通过红外测试结果显示,特征吸收峰的位置发生明显红移以及 $1600 \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ 峰值明显变化。结合胶原和锌的配位螯合率测试结果可以发现,重组胶原蛋白天然的氨基酸结构中氨基酸上具有羰基和亚氨基,与锌相互螯合作用。由于螯合作用使得锌离子可被有效包附在重组胶原蛋白分子中,蛋白质分子特性发生改变。在锌离子体外释放模拟实验中,相较于 1 mg/ml 葡萄糖酸锌,弱螯合重组胶原锌(10/8)无明显的突释情况,整个释放过程保持更加平缓,显现出螯合作用能够降低释放速率,实现长效缓慢释放的效果。此外,在对 5α -还原酶的抑制率以及对痤疮丙酸杆菌的抑制率可以看出,弱螯合重组胶原锌原料通过长效稳定释放锌离子可以实现长效控油和抑菌效果^[13-15]。考虑原因为弱螯合重组胶原锌原料是通过重组胶原蛋白特异性氨基酸结构与锌离子相互螯合一种安全有效的仿生型抗痤疮原料,通过相互协同的作用使得锌可实现缓慢释放,达到长效抑菌和有效修复效果,从而解决控油、抑菌、炎症等皮肤问题,在痤疮治疗和皮肤护理产品具备广阔的潜在应用价值。

综上所述,本研究通过优化重组胶原蛋白与葡萄糖酸锌的质量比和螯合条件,成功制备了弱螯合重组胶原锌原料,并通过一系列实验验证了其在控油、抗炎和抑菌方面的功效。尽管本研究取得了积极的结果,但仍需进一步研究以评估原料的长期稳定性、皮肤渗透性以及临床条件下的

疗效和安全性。

[参考文献]

- [1]陈帆,杨君,杨素萍,等.水解透明质酸锌的抗痤疮功效研究[J].日用化学工业(中英文),2023,53(2):165-170.
- [2]张亚飞,逢欣雨,叶张靖,等.胶原蛋白改性方法与应用[J].渔业研究,2020,42(2):185-194.
- [3]Bhate K,Williams HC.Epidemiology of acne vulgaris[J].British Journal of Dermatology,2013,168(3):474-485.
- [4]张洁,李彩霞,吴琰瑜,等.玫瑰痤疮患者抑郁及其影响因素分析[J].临床皮肤科杂志,2020,49(2):86-88.
- [5]张钧凯,金学睿,严吉,等.纳米氧化锌抑菌机制与应用进展[J].中国药理学杂志,2022,57(24):2045-2050.
- [6]郭洪辉,张怡评,洪专,等.河豚鱼皮胶原寡肽螯合锌的体内体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2021,42(5):66-71.
- [7]王一帆,缪雨晴,张敏红,等.锌治疗痤疮的作用机制及临床应用研究进展[J].四川医学,2023,44(3):311-314.
- [8]孙晓萱,高建新,李杭,等.金属抗菌机理的研究进展[J].功能材料,2020,51(9):9066-9071.
- [9]林新瑜,罗旭松,董巍,等.痤疮患者血清白介素-1 α 、白介素-6、白介素-8和 α -肿瘤坏死因子水平的检测分析[J].临床皮肤科杂志,2003,32(6):335-336.
- [10]谷海晶,刘丽敏,凌均荣.锌离子在口腔原位菌斑生物膜形成过程中抑菌作用的研究[C]//全国第八次牙体牙髓病学学术会议论文汇编.2011:25-26.
- [11]Kutlu Ö,Karadağ AS,Wollina U.Adult acne versus adolescent acne: a narrative review with a focus on epidemiology to treatment[J].An Bras Dermatol,2023,98(1):75-83.
- [12]柯泉,胡晓,杨贤庆,等.罗非鱼皮胶原蛋白肽-锌螯合物的制备及结构表征与体外消化分析[J].食品与发酵工业,2021,47(14):38-44.
- [13]王雅丽,林达珊,许文萍.果酸产品治疗面部寻常性痤疮的疗效及安全性[J].中国医疗美容,2017,7(6):35-37.
- [14]郭洪辉,陈晖,赵雪,等.罗非鱼鳞胶原肽螯合锌抗氧化及抑菌活性研究[J].食品与发酵工业,2021,47(20):120-125.
- [15]贾丽梅,曹乐,王翔韵,等.甘草锌颗粒联合超分子水杨酸治疗轻中度痤疮的临床观察[J].中国中医药科技,2022,29(6):1052-1054.

收稿日期: 2024-10-28

编辑: 周思雨