http://pmse.scu.edu.cn

静电纺丝聚乙烯醇/丝素蛋白/秦皮提取物-聚己内酯双层纳米纤维膜的制备及抗氧化性能

黄 丹[1]，杨安全[2]，谢 敏[2]，王 菁[2]，朱苗苗[1]，邓晏康[1]，陈 龙[1]，熊燃华[1,3]，黄超伯[1,3]

（1. 南京林业大学 化学工程学院，江苏 南京 210037；2. 欧诗漫生物股份有限公司，浙江 湖州 313000；
3. 南京林业大学 林业资源高效加工利用协同创新中心，江苏 南京 210037）

摘要：为制备干燥面膜，解决湿剂面膜中使用防腐剂、增稠剂等成分来延长面膜保质期对皮肤造成伤害的问题，通过顺序静电纺丝技术制备了以聚乙烯醇（PVA）、丝素蛋白（SF）负载秦皮提取物（CRF）为“亲肤层”和聚己内酯（PCL）为疏水层的双层纳米纤维膜。利用扫描电子显微镜、红外光谱分析及水接触角对纤维膜进行表征，并研究了纤维膜黏附性能、释放性能、抗氧化性能及生物相容性。结果表明，PVA/SF可以负载1%，3%和5%不同浓度的秦皮提取物，在湿润后PVA/SF/CRF-PCL纤维膜具有很强的黏附性，同时CRF可以在4 min左右释放平衡，达到快速释放的效果。负载5%秦皮提取物的PVA/SF纤维膜具有良好的抗氧化性能，对DPPH自由基和ABTS自由基清除率分别为89.13%±0.42%和85.49%±0.82%，PVA/SF/CRF-PCL纤维膜溶血率低，对B16细胞、Hela细胞均无毒性，B16细胞存活率均在89%以上，显示了良好的生物相容性，可以安全应用于皮肤领域。

关键词：静电纺丝；面膜；抗氧化；生物相容性

中图分类号：TQ340.64 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-7555（2024）04-0157-09

近年来，随着人们生活水平的提高，对皮肤美容和护肤的需求也呈指数增长，而片状面膜成为美容护肤领域中主要的增长类别[1]。传统的片状面膜由无纺布、生物纤维材质为基材，浸泡在含有活性成分的黏性精华液中，内部潮湿的环境需要添加防腐剂、乳化剂和增稠剂来延长保质期，但这些成分对皮肤具有刺激性。因而无防腐剂、增稠剂的干剂面膜是解决该问题的最佳方法之一[2]。

静电纺丝技术是在高压电场下将聚合物液滴拉伸并变形为椎体形状，固化沉积为微/纳米纤维的技术[3,4]，可以制备高比表面积、高孔隙率、孔径小和高力学性能的微米级至纳米级的纳米纤维膜，其中可以负载多种植物提取物，从而被广泛应用于伤口敷料、食品包装、空气过滤等领域[5,6]，但其在化妆品中的应用研究还很少。静电纺丝技术可以实现负载活性成分的干性纳米纤维膜的制备，仅在使用时给予水分，使活性物质从中释放至皮肤中。Xu等[7]利用透明质酸对粗黄水多糖进行包裹，制备了具有优异的保湿性及抗氧化性的干剂面膜，并通过黏膜刺激性实验证明了面膜的温和安全性。麦仁标[8]通过静电纺丝技术制备了聚环氧乙烷和胶原蛋白肽纳米纤维面膜，可以在3 s内快速释放在水中，有利用功效小分子快速作用于皮肤领域。

双层纳米纤维膜是进一步提升纤维膜释放时的保湿效率及黏附性的结构之一[9, 10]。贴紧皮肤层的纳米纤维膜可以使营养物质快速溶解在水中，并贴合皮肤促进有效成分的进入，外层疏水层可以延缓水分的蒸发，延长面膜使用时间[11]。丝素蛋白（SF）

doi: 10.16865/j.cnki.1000-7555.2024.0064
收稿日期：2023-04-21
基金项目：国家自然科学基金资助项目（22275094, 22275093, 52203059）；江苏省自然科学基金资助项目（BK20220420）
通讯联系人：黄超伯，主要从事绿色纤维膜的制备及应用及林源活性物质功效评价的研究，E-mail: Chaobo.Huang@njfu.edu.cn

是一种水溶性天然纤维蛋白，具有良好的生物降解性、生物相容性，但丝素蛋白因其蛋白质结构而导致其力学性能差[12]，使用丝素蛋白时，需要与合成聚合物共混纺织。聚乙烯醇（PVA）是一种水溶性合成聚合物，因其无毒、可降解、成本低、生物相容性好等特点而受到广泛关注。Shadi等[13]研究发现，PVA良好的静电纺丝能力使其适合与其他水溶性生物聚合物共混，从而获得连续且无珠的纳米纤维。聚己内酯（PCL）由于其疏水性好、生物相容性、良好的力学性能和可生物降解性能被广泛应用于皮肤生物工程，Zhang等[14]通过明胶层和PCL层制备了不对称的双层贴附纳米纤维膜，亲肤层可以黏附在口腔中释放虾青素作用于口腔，PCL层可以极大地防止药物在口腔中应用后流失，并表现出良好的透气性。

纳米纤维膜中负载不同的植物提取物，可以赋予纤维膜不同的功效特性。秦皮是我国重要的道地药材之一，是木犀科植物苦枥白蜡树、尖叶白蜡树、白蜡树或宿柱白蜡树的树皮，资源丰富，秦皮提取物（CRF）中含有丰富的咖啡酸、4-羟基-3,5-二甲氧基肉桂酸、阿魏酸、对羟基肉桂酸等酚类物质[15]，使得秦皮提取物具有较强的抗氧化功效，且具有良好的生物相容性。

综上所述，本文通过静电纺丝技术制备了PVA/SF/CRF-PCL双层纳米纤维膜，研究了PVA/SF/CRF-PCL双层纳米纤维膜的结构特性，考察纤维膜的释放效果及抗氧化效果，并进一步探究了纤维膜的生物相容性，为纤维膜应用于化妆品领域提供参考。

1 实验部分

1.1 原料与设备

聚乙烯醇（PVA124）、聚己内酯（PCL，M_n=8×10^4）、溴化钾（KBr，分析纯）、无水乙醇（分析纯）：均购于上海阿拉丁有限公司；丝素蛋白（SF）：CAS号96690-41-4，购于上海颖心实验室设备有限公司；三氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺：分析纯，均购于国药化学试剂有限公司；四甲基偶氮唑蓝（MTT）、牛血清蛋白：细胞级，均购于上海源叶生物科技有限公司；二甲基亚砜（DMSO）、胰酶（EDTA）：细胞级，均购于上海麦克林生化科技有限公司；DMEM培养基：细胞级，购于赛默飞世尔科技公司；青霉素•链霉素溶液：购于北京索莱宝科技有限公司；Calcein-AM/PI活细胞/死细胞双染试剂盒：购于上海翊圣生物科技有限公司；绵羊血：购于联硕生物有限公司。

静电纺丝设备：购于青岛诺康环保科技有限公司；超声波清洗器：KH5200B，购于昆山禾创超声仪器有限公司；场发射扫描电子显微镜：JSM-7600F，购于日本电子株式会社；傅里叶变换红外光谱仪：Nicolet 7000，购于美国Thermo Scientific公司；除湿机：DE12CU1，购于海尔电器集团有限公司；酶标仪：ReadMax 1900，购于闪谱生物科技有限公司；细胞培养箱（3111）：购于赛默飞世尔科技公司；倒置显微镜：OLYMPUS X53，购于奥林巴斯光学工业株式会社。

1.2 实验过程

1.2.1 *秦皮提取物的制备*：参考优化后秦皮提取物的实验过程得到[15]。采用60.96%（体积分数）乙醇溶液，在液料比为49.60 mL/g，提取时间为1.63 h，提取温度为53.36 ℃的条件下进行提取，得到的上清液在真空旋蒸装置中蒸发浓缩，待有机溶剂蒸发完毕后，将浓缩液真空冷冻干燥得到秦皮提取物在－20 ℃避光保存，备用。

1.2.2 *纺丝溶液配制*：在50 mL水中，加入5 g PVA，于80 ℃水浴条件下加热搅拌4 h，配制成质量分数为10%的PVA溶液；在40 mL水中，加入2 g SF，在常温下水浴搅拌10 h，配制成质量分数为5%的丝素蛋白溶液，再加入不同质量的秦皮提取物。根据预实验的研究，m(PVA):m(SF)=8:1为复合纤维膜的最佳比例，最终分别配制成含有1%，3%和5%的秦皮提取物混合溶液。

在39 mL N,N-二甲基甲酰胺/三氯甲烷（质量比1:9）溶液中，加入11 g PCL，配制成质量分数为22%的PCL溶液，在磁力搅拌器上均匀搅拌12 h，充分溶解后，超声30 min去除气泡后备用。

1.2.3 *静电纺丝*：用5 mL的医用注射器匀速吸入PVA/SF/CRF混合溶液，使用直径0.26 mm的钢制针头，在17 kV的施加电压下进行纺丝，纺丝速度为0.8 mL/h，温度(28±2) ℃，湿度30%±2%，于12 cm收集距离处放置滚筒进行收集。滚筒绕卷速度为200 r/min，将收集好的纤维膜轻轻取下后，放置于烘箱中干燥，干燥后放置密封袋中低温储存备用。

用5 mL的医用注射器匀速吸取PCL溶液,在已经纺织好的PVA/SF/CRF纤维膜上进行顺序静电纺丝,使用直径0.84 mm的钢制针头,在17 kV的施加电压下进行纺丝,纺丝速度为1 mL/h,温度(28±2) ℃,湿度30%±2%,于12 cm收集距离处放置滚筒进行收集,滚筒绕卷速度为300 r/min。将收集好的纤维膜轻轻取下,放置于烘箱中干燥,干燥后放置密封袋中低温储存备用。

1.3　测试与表征

1.3.1　*形貌分析和纤维直径测定*:在高压真空条件下,采用扫描电镜(SEM,日本Hitachi公司,Regulus 8100)对电纺PVA/SF/CRF纳米纤维膜形貌进行表征,表面喷金,加速电压3 kV。静电纺丝纳米纤维的直径用图像可视化软件Image-J随机测量100根纤维来确定平均纤维直径和直径分布。利用Origin绘制直径分布并计算平均直径和标准差。

1.3.2　*傅里叶变换红外光谱分析*(FT-IR):将干燥样品与KBr置于研钵中充分研磨、压片。以空白KBr压片为背景进行校正,扫描样品在4000~4000 cm^{-1}波长范围内的透过率,分辨率为4 cm^{-1},扫描次数为80次。

1.3.3　*PCL纳米纤维膜接触角测试*:将PCL纳米纤维膜裁剪成5 mm×1 cm的长方形装载到载玻片上,通过接触角仪器对膜进行接触角测试。

1.3.4　*纳米纤维膜包封率测定*:参考金晓春[16]等的方法测试纳米纤维膜中秦皮提取物的包封率(并做些许修改)。将秦皮提取物配置成不同浓度的待测液,用紫外分光光度计检测,并绘制秦皮提取物释放标准曲线(y=16.844x−0.207,R^2=0.9966)。

精确称取20 mg PVA/SF/CRF1/3/5,溶于10 mL PBS(pH=5.4)中,室温搅拌直至纤维膜内的秦皮提取物完全溶解。吸取1 mL溶液用PBS(pH=5.4)稀释5倍后以3000 r/min离心10 min,吸取上清液,利用紫外分光光度计在339 nm处测出吸光度值,并计算纤维膜中秦皮提取物的量(m),根据(1)计算纤维膜的负载率(R)

$$R = \frac{m}{M} \tag{1}$$

1.3.5　*纳米纤维膜体外释放试验*:将20 mg PVA/SF/CRF纳米纤维膜浸入20 mL PBS(pH=5.4)中。前25 min内,每隔1 min,抽取3 mL上清液,用紫外-可见分光度计测量后,向释放系统中添加相同量的PBS以保持恒定的体积。绘制在指定时间段溶解的秦皮提取物释放的百分比与时间的关系图。

1.3.6　*纳米纤维膜的体外抗氧化性分析*

(1)纳米纤维膜对DPPH自由基清除率的影响:采用DPPH自由基清除法检测PVA/SF/CRF纳米纤维膜的抗氧化活性。取5 mg含有不同浓度的PVA/SF/CRF纳米纤维膜浸泡在3 mL 0.2 mmol/L DPPH乙醇溶液中,将其混合均匀,在黑暗中反应30 min,检测样品混合液在517 nm处的紫外吸光度值,对DPPH自由基的清除活性根据(2)计算

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \tag{2}$$

式中:A_i——DPPH溶液中样品的吸光度值;A_j——与A_i相同条件下用蒸馏水代替DPPH的混合物的吸光度值;A_0——与A_i相同条件下用去离子水代替样品溶液的吸光度值。

(2)纳米纤维膜对ABTS自由基清除率的影响:将ABTS溶液(7.4 mmol/L)和过硫酸钾溶液(2.6 mmol/L)以体积1:1混合后,避光反应12 h得到ABTS工作液,用0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.4)稀释至其在734 nm处吸光度值为0.70 ± 0.02。取5 mg含有不同浓度的PVA/SF/CRF纳米纤维膜,分别加入0.8 mL ABTS稀释液,避光反应6 min,于波长734 nm处测其吸光度值A_1,实验重复3次,根据式(3)计算

$$\text{ABTS radical scavenging activity} = 1 - \frac{A_1}{A_0} \tag{3}$$

式中:A_1——0.2 mL样品溶液与0.8 mL ABTS稀释液混合液吸光度;A_0——0.2 mL蒸馏水与0.8 mL ABTS稀释液混合液。

1.3.7　*纳米纤维膜抗溶血性试验*:采用绵羊血红细胞实验测定纤维膜的溶血性。将PVA/SF/CRF纳米纤维膜和PCL纳米纤维膜(均裁剪为1 cm×1 cm的正方形)浸泡在PBS溶液中,得到待测工作液。取1 mL红细胞,加入3 mL PBS清洗3次后,在转速为1500 r/min下离心,弃除上清液后,取0.5 mL红细胞分别加入0.5 mL质量分数为0.1%的Triton X-100作为阳性对照,PBS作为阴性对照和样品于试管中摇

晃1 h。在8000 r/min转速下离心2 min，在540 nm波长下检测其吸光度值，根据式(4)进行计算溶血率

$$\text{Hemolytic rate} = \frac{A-B}{C-B} \quad (4)$$

式中：A——加入样品吸光度值；B——加入PBS吸光度值；C——加入Triton X－100吸光度值。

1.3.8 纳米纤维膜细胞毒性测试

（1）B16细胞和Hela细胞培养：将细胞从液氮中取出后，迅速放入37 ℃水浴锅中快速解冻细胞，解冻好后立即将细胞转移到4 mL预热培养基的15 mL离心管中，用额外的1 mL预热培养基冲洗冻存管以尽可能多地收集细胞。以1000 r/min离心5 min后，去除上清液，加入5 mL培养基吹打均匀，将全部细胞液转移至新的培养瓶中，转移至细胞培养箱孵化24 h。观察细胞长满80%左右，吸出培养基后，用3 mL PBS清洗贴壁细胞2次，用0.25%胰酶消化后加入预热好的4 mL培养基进行吹打，把贴壁细胞吹打下来。转至15 mL离心管离心后，丢弃上清液，加入预热的5 mL培养基，吹打分散细胞，从试管中用移液枪吸取50 μL细胞悬浮液转移到1.5 mL PE管中，加入100 μL台盼蓝后观察细胞生存状态。确认好细胞状态后，转移10~20 μL混合物到血球计数器中，使用10倍镜显微镜观察细胞，并进行技术，利用细胞培养基调节细胞密度至(1~2)×10^4后，转移至96孔板继续培养24 h。

（2）纳米纤维膜对B16细胞毒性测试：将PVA/SF/CRF纳米纤维膜和PCL纳米纤维膜（均裁剪为1 cm×1 cm的正方形）浸泡在PBS溶液中，得到待测工作液，用0.22 μm无菌过滤膜过滤备用。将96孔板中培养了24 h的细胞放入显微镜下进行观察细胞状态，吸出旧培养基，用PBS小心冲洗2次后，加入100 μL纤维膜工作液，空白对照加入100 μL新鲜培养基，阳性对照加入100 μL苯酚，将96孔板置于细胞培养箱中培养24 h。吸出旧培养基，加入20 μL MTT，放入细胞培养箱中孵育4 h，弃掉上清液，每孔加入150 μL DMSO，放入酶标仪中避光振荡20 min，在492 nm处测定各孔吸光度OD值，根据式(5)进行计算

$$\text{Cell viability} = OD(\text{samples})/OD(\text{blank}) \quad (5)$$

（3）细胞活死染色试验：将PVA/SF/CRF纳米纤维膜和PCL纳米纤维膜（均裁剪为1 cm×1 cm的正方形）浸泡在PBS溶液中，得到待测工作液，用0.22 μm无菌过滤膜过滤备用。将48孔板中培养了24 h的细胞放入显微镜下进行观察细胞状态，吸出旧培养基，用PBS小心冲洗2次后，加入300 μL秦皮提取物工作液，空白对照加入300 μL新鲜培养基，将48孔板置于细胞培养箱中培养24 h后，参照活死染色试剂盒进行后续操作。

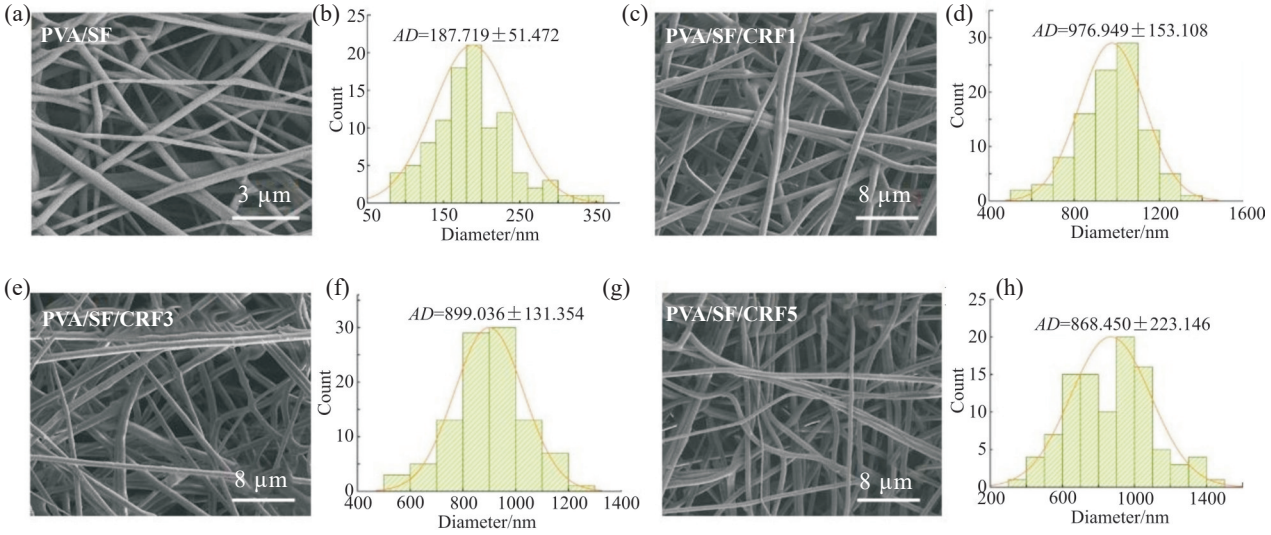


Fig. 1 SEM diagrams and its diameter distribution maps of nanofiber membranes with different contents of CRF prepared by electrospinning

2　结果与讨论

2.1　纳米纤维膜形貌和直径分布

采用静电纺丝法制备了负载不同浓度秦皮提取物PVA/SF纳米纤维膜。Fig.1显示了复合纳米纤维的SEM图像和直径分布,所有纤维都是随机分布、无序交错的,表面光滑无交联、无珠粒。直径分布统计如Fig.1(a~e)所示,PVA/SF,PVA/SF/CRF1,PVA/SF/CRF3和PVA/SF/CRF5平均直径分别为(187.72±51.47) nm,(976.95±153.11) nm,(899.04±131.35) nm和(868.45±223.15) nm。PVA/SF/CRF1/3/5负载秦皮提取物的纳米纤维膜平均纤维直径略有减小,尺寸分布更宽,这可能是由于添加了不同含量的秦皮提取物所导致聚合物溶液黏度和可纺性的不同。这与已报道文献规律一致[17],即植物提取物含量越高,静电纺纤维的直径越小。

2.2　纳米纤维膜FT-IR分析

由Fig.2的红外光谱中可以看出,PVA/SF的特征吸收峰为3419 cm^{-1}处的O—H吸收峰,3004 cm^{-1}处的C—H伸缩峰,1640 cm^{-1}处的C=O处吸收峰,1455 cm^{-1}处的CH—OH伸缩振动峰,1093 cm^{-1}处的C—O面外弯曲振动峰,在酰胺I带条(1600~1700 cm^{-1})和酰胺II条带(1477~1600 cm^{-1})内均可观察到SF特征吸收峰1650 cm^{-1}和1455 cm^{-1}的特征吸收峰。在制备的3个负载秦皮提取物的PVA/SF/CRF1/3/5纳米纤维膜中可以观察到秦皮提取物的吸收峰均已减弱,一方面是秦皮提取物的含量较少,所以能被检测到的部分就较弱,另一方面也说明了秦皮提取物已被有效地负载于PVA/SF纳米纤维膜中。

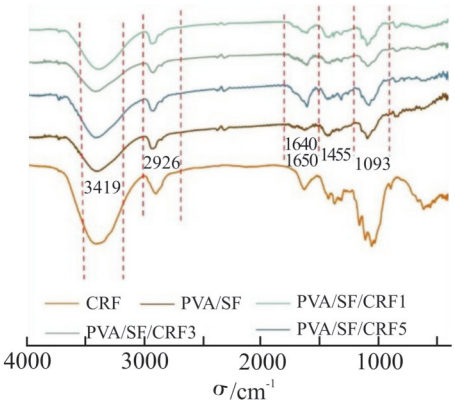


Fig. 2　FT-IR of PVA/SF/CRF nanofiber membranes

2.3　PCL纳米纤维膜疏水性和复合纳米纤维膜黏附性

通过顺序静电纺丝形成如Fig.3(a)所示的不对称的双层纳米纤维膜。Fig.3(b,c)中得知,作为与皮肤接触的PVA/SF/CRF层,在遇水后使纤维膨胀,迅速形成透明凝胶状,而使纤维结构被破坏,使CRF可以更容易溶解在液体介质中。而通过顺序静电纺丝,在PVA/SF/CRF纳米纤维膜外层的PCL纳米纤维膜与水接触角为109°,表现出了良好的疏水性。双层纳米纤维膜结构显示出良好的黏附能力,将PVA/

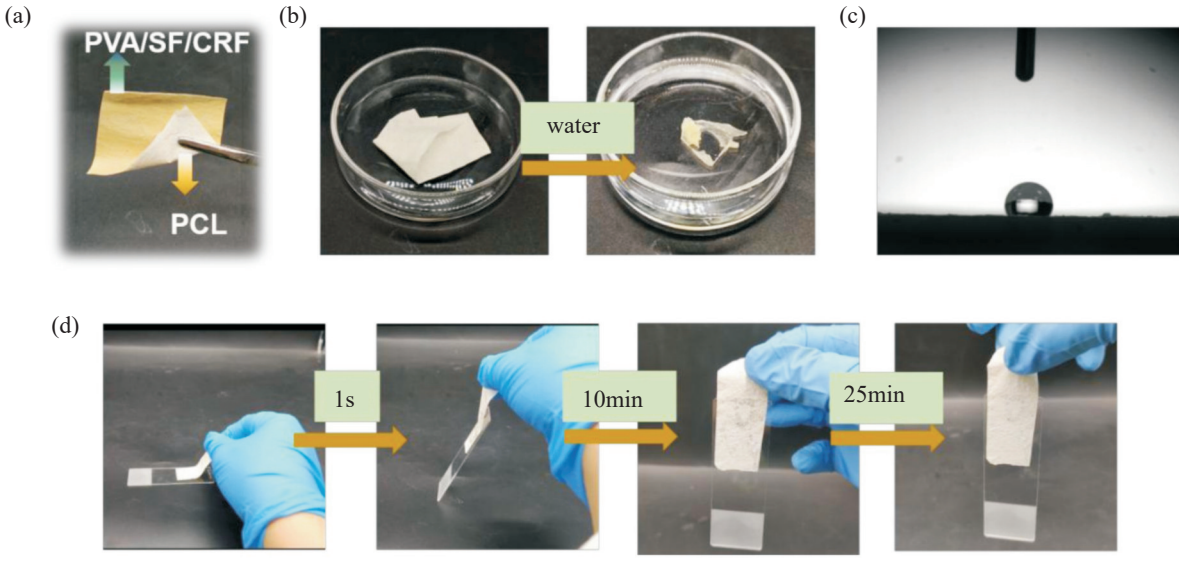


Fig. 3　(a) PVA/SF/CRF- PCL nanofiber membrane prepared by sequential electrospinning; (b) PVA/SF/CRF nanofiber membrane forms a gel after contacting with water; (c) contact angle of PCL nanofiber membrane; (d) adsorption capacity of PVA/SF/CRF-PCL nanofiber membrane on glass slides

SF/CRF-PCL纳米纤维膜放置在润湿的干净载玻片上(5 g),由Fig.3(d)中可以观察到,PVA/SF/CRF层在接触到水后,由于其可以迅速形成凝胶状连接载玻片与外层的PCL疏水层,而使PVA/SF/CRF-PCL纳米纤维膜快速黏附在载玻片上。在10 min后,随着水分的挥发,PVA/SF/CRF-PCL纳米纤维膜仍与载玻片保持良好的黏附力;当25 min后,水分完全蒸发,PVA/SF/CRF-PCL纳米纤维膜可以稳定地固定在载玻片上。这展示了PVA/SF/CRF-PCL纳米纤维膜良好的黏附性,可以广泛应用在皮肤敷料领域。

2.4 纳米纤维膜包封率和体外释放性能

通过紫外分光光度计在330 nm处对秦皮提取物有特殊吸收峰,可以记录不同浓度的负载秦皮提取物纳米纤维膜的包封率,经计算,PVA/SF/CRF1/3/5纳米纤维膜的封装率分别为50.84%±5.52%,50.06%±2.41%和42.67%±2.38%,从表中可以看出,不同比例的PVA/SF/CRF纳米纤维膜对秦皮提取物

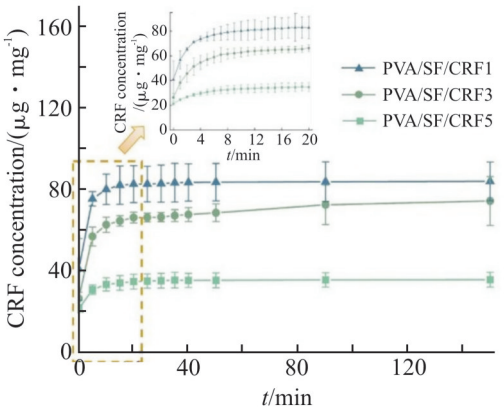


Fig. 4 Electrospinning PVA/SF/CRF nanofiber membranes with different concentrations released in PBS (pH=5.4) buffer

均具有一定的包封效果,但包封效果一般,在秦皮提取物浓度较高时,能负载的效率逐渐降低,但均在40%以上。Fig.4显示了PVA/SF/CRF纳米纤维膜中体外释放秦皮提取物的效率,在纳米纤维膜释放体系中,为探究其在皮肤方面的应用场景,模拟了皮肤pH值为5.4的PBS缓冲液环境进行释放,由图可知,

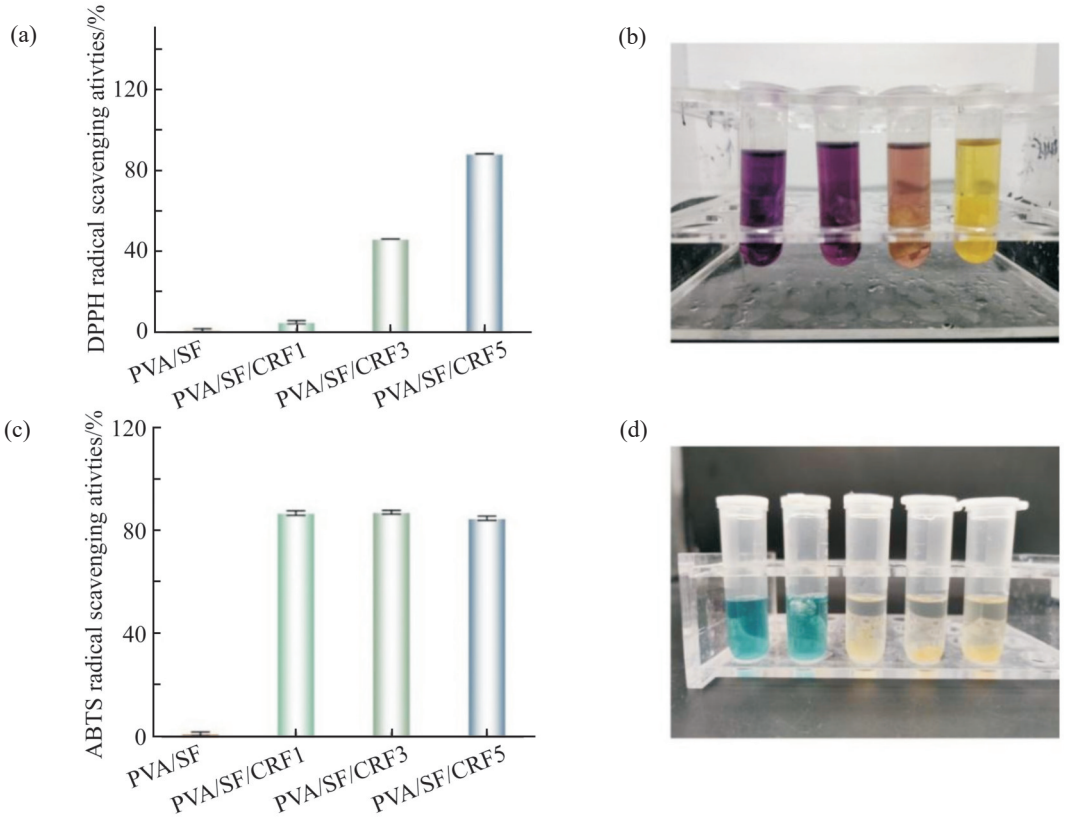


Fig. 5 (a) DPPH radical scavenging rate and (b) solution change color for different concentrations of PVA/SF/CRF nanofiber membranes; (c) ABTS radical scavenging rate and (d) solution change color for different concentrations of PVA/SF/CRF nanofiber membranes

在前4 min内,纤维膜中的秦皮提取物快速释放,这可能是由于纳米纤维膜具有较大的表面积和孔隙率,可以让秦皮提取物快速从中释放出来。在4~20 min内,秦皮提取物累积释放量逐渐缓慢增加,在20 min后趋于平衡。在不同浓度的纳米纤维膜释放曲线中均能观察到相似的效果,整个释放的过程主要以扩散为主。实验结果表明,静电纺丝技术可以用于秦皮提取物包封,并成功将所包封的秦皮提取物快速释放出来,因此所制备出来的纳米纤维膜可以缩短使用时间,达到方便快捷的效果。

2.5　纳米纤维膜体外抗氧化性

采用DPPH自由基清除法评价了负载不同浓度秦皮提取物的纳米纤维膜和没有负载秦皮提取物的抗氧化活性。如Fig.5(a)表示,PVA/SF纳米纤维膜和PCL纳米纤维膜对DPPH自由基无清除作用。在先前的研究中,验证了秦皮提取物具有较好的抗氧化活性,且对DPPH自由基的清除效率随着浓度的增加而增加。秦皮提取物浓度为1%时,纳米纤维膜对DPPH自由基清除率仅为9.52%±5.19%,在浓度增加到5%时,可以观察到DPPH溶液颜色变为淡黄色,清除率为89.13%±0.42%。说明PVA/SF/CRF纳米纤维膜可以将负载在其中的秦皮提取物释放出来,有效清除自由基。由Fig.5(b)得知,不同浓度的PVA/SF/CRF纳米纤维膜在对ABTS自由基进行清除时,可以观察到在不同浓度下均可以高效清除ABTS自由基,在含有1%秦皮提取物的纳米纤维膜中,对ABTS自由基清除率高达到87.54%±0.92%。ABTS和DPPH自由基清除活性之间的差异可能与用于制备自由基的不同溶剂(分别为蒸馏水和乙醇)有关。因此,水溶性化合物秦皮提取物从纳米纤维释放到培养基中的速度更快,并且与ABTS自由基的反应比与DPPH自由基的反应更有效。复合纳米纤维膜可以在不同的溶剂中释放出具有抗氧化活性的秦皮提取物,可以作为潜在的抗氧化活性面膜、敷料、包封袋等应用在化妆品、生物医药或食品中。

2.6　纳米纤维膜抗溶血活性

对于纳米纤维膜在人体皮肤领域长时间的接触中是否有伤害,需要通过毒理学来进行表征绵羊红细胞溶血试验是动物眼刺激的一种常用替代试验,可以检测物质对皮肤的刺激性。通过使用酶标仪测量上清液在540 nm处的吸光度,可以确定溶血活性作为血红蛋白释放的函数。Fig.6(a)显示了直接接触不同纳米纤维膜后红细胞的溶血率,其溶血率均低于2%,表明其非溶血特性符合ASTM F 756-00标准(溶血比为2%的样品可被视为非溶血性)。在0.1% TritonX-100作用后可以从Fig.6(b)中观察到红细胞出现了较大程度的溶血行为,说明PVA/SF/CRF-PCL纳米纤维膜可以安全应用在皮肤领域。

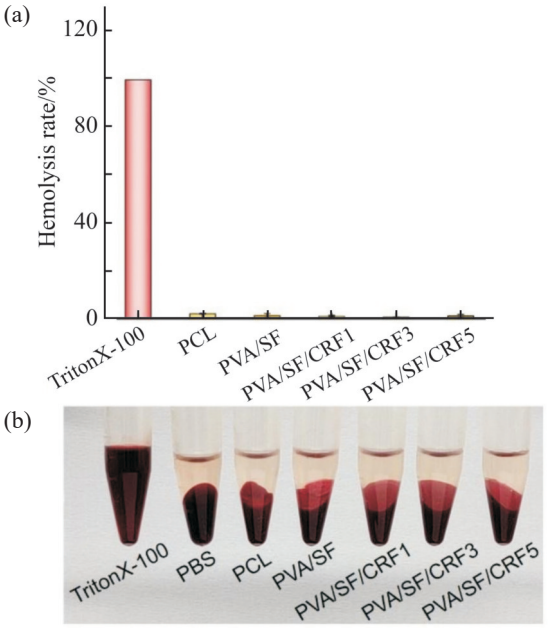


Fig. 6 (a) Hemolysis rate and (b) hemolysis diagram of PCL nanofiber membranes and PVA/SF/CRF nanofiber membranes at different concentrations

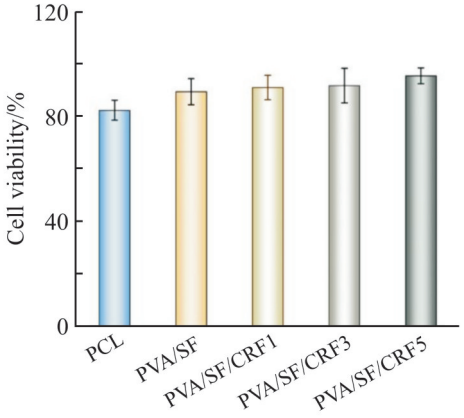


Fig. 7 Effects of different concentrations of PVA/SF/CRF nanofiber membranes and PCL nanofiber membranes on B16 cell viability

2.7　纳米纤维膜生物相容性

以空白完全培养基及PVA/SF纳米纤维膜为对

照，对不同浓度的复合纳米纤维膜对B16细胞的细胞活力进行评价。从Fig.7中可以得知，1%，3%和5%秦皮提取物浓度下的纳米纤维膜生长率均在89%以上，对B16细胞均无细胞毒性，并与PVA/SF纳米纤维膜相比，细胞活性更高，这可能由于秦皮提取物具有促进细胞增殖的作用，且观察到浓度越高，细胞存活率越高。在疏水层的PCL纳米纤维膜层培养下，细胞生长率为82.58%，对细胞生长无显著抑制作用。这表明负载秦皮提取物的PVA/SF纳米纤维膜和PCL纳米纤维膜具有较小的细胞毒性和良好的生物相容性。

细胞活死荧光染色可以更直接评估经秦皮提取物共培养后的细胞活力。Calcein-AM是一种对活细胞进行荧光标记的染色试剂，发绿色荧光，PI不能穿过活细胞的细胞膜，仅能穿过死细胞膜的无须区域而达到细胞核，从而发红色荧光。是由Fig.8所示，Hela细胞在与PCL纳米纤维膜和PVA/SF，PVA/SF/CRF1/3/5纳米纤维膜共培养24 h后仍然存活，几乎找不到红色染色荧光，说明Hela细胞在PCL纳米纤维膜和PVA/SF，PVA/SF/CRF1/3/5纳米纤维膜的共培养下，并没有影响到细胞的活性，与上述细胞毒性测定结果一致。

3 结论

本文采用静电纺丝技术成功制备了聚乙烯醇/丝素蛋白/秦皮提取物-聚己内酯（PVA/SF/CRF-PCL）双层纳米纤维膜，内层可以快速释放负载的秦皮提取物，具有抗氧化效果，外层有良好的黏附性。研究发现纳米纤维膜均无毒性和刺激性，相较于传统的湿剂面膜材料，所制备的静电纺丝纤维膜可以快速释放活性成分，在化妆品和医药中可以规避使用防腐剂等使皮肤过敏的成分，可以实现其在化妆品和生物医药领域的应用。静电纺丝负载活性物质的应用在化妆品领域中的研究尚少，可以深入探究在皮肤组织上的应用，静电纺丝快速释放面膜的美白、抗衰老等活性成分，从而制备纯天然刺激性小的“快速释放”的面膜。

参考文献：

[1] Wahab J A, Xu G, Lee H, *et al.* Fabrication of silk fibroin/eggshell nanofiber membranes for facemasks[J]. Fibers and Polymers, 2016,17: 1776-1781.

[2] Teno J, Pardo-Figuerez M, Hummel N, *et al.* Preliminary studies on an innovative bioactive skin soluble beauty mask made by combining electrospinning and dry powder impregnation[J]. Cosmetics, 2020,7: 96.

[3] Shi S, Si Y F, Han Y T, *et al*. Recent progress in protective membranes fabricated via electrospinning: advanced materials, biomimetic structures, and functional applications[J]. Advanced Materials, 2022, 34: 2107938.

[4] Lan X Z, Wang H, Bai J F, *et al.* Multidrug-loaded electrospun micro/nanofibrous membranes: Fabrication strategies, release behaviors and applications in regenerative medicine[J]. Journal of Controlled Release, 2021, 330:1264-1287.

[5] Spasova M, Stoyanova N, Manolova N, *et al.* Facile preparation of novel antioxidant fibrous material based on natural plant extract from Portulaca oleracea and polylactide by electrospinning for biomedical applications[J]. Polymer International, 2022, 71: 689-696.

[6] Suwantong O, Ruktanonchai U, Supaphol P. Electrospun cellulose acetate fiber mats containing asiaticoside or Centella asiatica crude extract and the release characteristics of asiaticoside[J]. Polymer, 2008, 49: 4239-4247.

[7] Xu H L, Wu Z Y, Zhao D, *et al*. Preparation and characterization of electrospun nanofibers- based facial mask containing hyaluronic acid as a moisturizing component and huangshui polysaccharide as an antioxidant component[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 214:212-219.

[8] 麦仁标. 基于多针静电纺丝的速溶型纳米纤维面膜的制备研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2022.
Mai R B. Research on the preparation of instant nanofiber facial mask based on multi- needle electrospinning[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2022.

[9] Krysiak Z J, Knapczyk-Korczak J, Maniak G, *et al*. Moisturizing effect of skin patches with hydrophobic and hydrophilic electrospun fibers for atopic dermatitis[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021,199: 111554.

[10] Lunni D, Cianchetti M, Filippeschi C, *et al.* Plant-inspired soft bistable structures based on hygroscopic electrospun nanofibers [J]. Advanced Materials Interfaces, 2020, 7: 1901310.

[11] Si Y F, Guo C X, Xu X Y, *et al.* Bioinspired Janus all-natural electrospinning membranes with directional water transport as ecofriendly dry facial masks[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2022, 10: 7726-7738.

[12] Selvaraj S, Fathima N N. Fenugreek incorporated silk fibroin nanofibers—a potential antioxidant scaffold for enhanced wound healing[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9: 5916-

5926.

[13] Kheradvar S A, Nourmohammadi J, Tabesh H, *et al.* Starch nanoparticle as a vitamin E-TPGS carrier loaded in silk fibroin-poly(vinyl alcohol)-Aloe vera nanofibrous dressing[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018,166: 9-16.

[14] Zhang H, Ji Y J, Yuan C Q, *et al*. Fabrication of astaxanthin-loaded electrospun nanofiber-based mucoadhesive patches with water-insoluble backing for the treatment of oral premalignant lesions[J]. Materials & Design, 2022, 223: 111131.

[15] Huang D, Wang J, Li F, *et al.* Optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of Cortex fraxini using response surface methodology[J]. European Journal of Wood and Wood Products, 2023, 81: 685-697.

[16] 金晓春,安琪,王心雅,等.玉米醇溶蛋白/聚环氧乙烷同轴静电纺丝负载姜黄素及其释放特性[J].食品工业科技,2021,42(14):61-69.
Jin X C, An Q, Wang X Y, *et al*. Release characteristics of curcumin loaded on zein/poly(ethylene oxide) by coaxial electrospinning [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 61−69.

[17] Tang Y, Liu L, Han J, *et al*. Fabrication and characterization of multiple herbal extracts-loaded nanofibrous patches for topical treatment of acne vulgaris[J]. Fibers and Polymers, 2021, 22: 323-333.

Preparation of Electrospun Polyvinyl Alcohol/Silk Protein/*Cortex Fraxini*-Polycaprolactone Bilayer Nanofiber Film and Antioxidant Properties

Dan Huang[1], Anquan Yang[2], Min Xie[2], Jing Wang[2], Miaomiao Zhu[1], Yankang Deng[1]
Long Chen[1], Ranhua Xiong[1,3], Chaobo Huang[1,3]
(*1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Zhejiang OSM Group Co., Ltd, Huzhou 313000, China; 3. Jiangsu Co-Innovation Center for Efficient Processing and Utilization of Forest Products, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China*)

ABSTRACT: In order to prepare a dry mask and solve the problem of using preservatives and thickeners in wet mask to prolong the shelf life of mask and cause damage to skin, double-layer nanofiber films with polyvinyl alcohol (PVA), silk protein (SF) loaded with Cortex fraxini (CRF) as "skin-friendly layer" and polycaprolactone (PCL) as hydrophobic layer were prepared by sequential electrostatic spinning technology. The films were characterized by scanning electron microscopy, infrared spectroscopy and water contact angle, and their adhesion, release, antioxidant and biocompatibility properties were investigated. The results show that PVA/SF can be loaded with different concentrations of CRF at 1%, 3% and 5%, and the PVA/SF/CRF-PCL fiber membranes have strong adhesion after wetting, while CRF can reach the release equilibrium at about 4 min to achieve rapid release. The PVA/SF fibrous membrane loaded with 5% CRF has good antioxidant properties, and the scavenging rates of DPPH radicals and ABTS radicals are 89.13%±0.42% and 85.49%±0.82%, respectively. The PVA/SF/CRF-PCL fibrous membrane has a low hemolysis rate and is not toxic to B16 cells and Hela cells, and the survival rate of B16 cells is 89% or more, showing a good biocompatibility and can be safely applied in the skin field.

Keywords: electrostatic spinning; mask; antioxidant; biocompatibility