

墨鱼黑色素纳米球 pH 响应机制及其对毛鳞片光保护的影响

朱元宇¹, 赵洪德², 赵芷晴¹, 王新昊¹, 王继乾¹, 王栋^{1*}

(1.中国石油大学(华东)化学化工学院, 山东 青岛 266580; 2.中华人民共和国黄岛海关, 山东 青岛 266000)

摘要:本研究针对墨鱼黑色素在化妆品应用中存在的结构异质性及难溶性难题,创新性地提出 pH 调控介导的结构重塑策略,系统揭示黑色素分散特性与功能演变之间的构效关系。通过多尺度结构表征(透射电子显微镜(TEM)/扫描电子显微镜(SEM))发现,碱性处理可诱导黑色素发生显著结构重组,其天然致密球形颗粒(中性 pH)转化为具有高表面活性的纤维-无定形复合结构,该重构显著提升其分散度和界面结合能力。在此基础上,以人发纤维为模型构建光损伤防护体系,通过 FT-IR 光谱证实经碱处理的黑色素可通过氢键网络与角蛋白形成稳定复合物,紫外-可见光谱进一步显示其对 UVA/UVB 波段吸收效率提升。尤其值得关注的是,共聚焦显微分析表明改性黑色素能在毛鳞片间隙形成连续光防护膜,较天然黑色素的离散分布模式,其紫外线反射率降低。该研究为开发基于海洋生物物质的高效光防护化妆品提供理论依据与技术路径。

关键词:墨鱼黑色素; pH 敏感; 光防护

中图分类号: O648 **文献标志码:** A

引用格式:朱元宇,赵洪德,赵芷晴,等. 墨鱼黑色素纳米球 pH 响应机制及其对毛鳞片光保护的影响[J]. 山东大学学报(理学版), 2025, 60(10): 127-140.

pH-responsive mechanism of cuttlefish melanin nanospheres and their effect on photoprotection of hair scales

ZHU Yuanyu¹, ZHAO Hongde², ZHAO Zhiqing¹, WANG Xinhao¹, WANG Jiqian¹, WANG Dong^{1*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum (East China), Qingdao 266580, Shandong, China; 2. Huangdao Customs of the People's Republic of China, Qingdao 266000, Shandong, China)

Abstract: The inherent structural heterogeneity and pronounced insolubility of natural cuttlefish melanin, a biomacromolecule, pose critical bottlenecks in material characterization and functional regulation, severely limiting its advanced applications in cosmetics. To overcome these technical limitations, this study innovatively employed a pH-modulated structural remodeling strategy to systematically elucidate the structure-function relationships governing its solubility evolution and functional enhancement. Multi-scale structural analyzed (SEM/TEM) reveal that alkaline treatment induced a phase transition from native compact spherical particles (neutral pH) to fibrous-amorphous composited with elevated surface activity. This structural reconfiguration enhanced aqueous solubility and interfacial binding capacity compared to native melanin. Using human hair fibers as a photodamage protection model, FT-IR spectroscopy confirmed stable keratin-melanin complex formation through reconstructed hydrogen-bond networks following alkaline treatment. UV-Vis spectroscopy demonstrated an improvement in UVA/UVB absorption efficiency (280–400 nm wavelength range). Notably, confocal microscopy revealed that modified melanin forms continuous photoprotective films within cuticle interstices, achieved lower UV reflectivity compared to the discrete distribution pattern of native melanin. This research established a dual theoretical-technical framework for developing marine biomass-derived advanced photoprotective cosmeceuticals, offering insights into biomacromolecule functionalization through supramolecular restructuring.

Key words: cuttlefish melanin; pH sensitivity; light protection

收稿日期:2025-05-29; 网络出版时间:2025-09-30 11:23:56

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MB039)

第一作者:朱元宇(2001—),男,硕士研究生,研究方向为多肽自组装、生物表面活性剂在油田化学中的应用。E-mail:1264526541@qq.com

*通信作者:王栋(1984—),男,副教授,博士,研究方向为多肽自组装、生物表面活性剂在油田化学中的应用。E-mail:wangdong@upc.edu.cn

墨鱼墨水是由蛋白质、脂肪、糖胺聚糖和黑色素组成的复合生物材料^[1],其独特的成分在生物医学材料、功能性食品、化妆品等领域有研究价值。其中的黑色素是一类重要的生物聚合物,广泛分布于自然界,因其具有独特的光敏^[2]、抗氧化^[3]、金属离子螯合能力^[4]、抗菌特性^[5]、广谱光保护功能^[6-9]等物理化学特性而备受关注。根据分子构象差异,黑色素可系统分为真黑色素与泛黑色素两大类,其颜色特征(黑色/棕褐色/黄色)直接关联于吡啶酮单元的交联密度及硫元素掺杂水平^[10-11]。在人体中,黑色素广泛分布于多个关键器官与组织,包括皮肤、耳蜗、脑黑质及虹膜等部位,通过光防护与抗氧化双重机制发挥重要生物学功能^[12]。病理学研究表明,毛发黑色素合成不足可导致毛囊干细胞耗竭并引发白发形成,而表皮黑色素细胞功能障碍则与白癜风等色素脱失性疾病存在显著相关性^[13]。

黑色素的光防护作用主要通过选择性吸收紫外线(尤其是UVB波段)实现,其作用机制涉及降低辐射对真皮层血管内皮细胞的穿透性。当紫外线辐照时,黑色素颗粒通过吸收大部分入射光子能量,有效保护基底角质形成细胞免于DNA光损伤。这些功能粒子由胚胎神经嵴源性的黑素细胞特异性合成,该细胞主要定位于表皮基底层(密度1200~1500 cells/mm²)和毛囊隆突区^[14]。在黑素细胞内,酪氨酸酶催化产生的黑色素前体经氧化聚合后储存于黑素体(直径0.5~1.2 μm)中,最终通过树突状突起的胞吐作用转移至周围角质形成细胞,形成皮肤色素屏障^[15]。

黑色素独特的生物学特性与物理化学性质使其在电子器件、个人护理产品、食品着色剂及医药材料等领域展现出广阔应用前景^[16-19]。墨鱼黑色素的高附加值特性源于其纳米级异质结构。生物合成机制研究表明,酪氨酸酶催化多巴胺氧化生成多巴醌中间体,继而通过分子内转化形成5,6-二羟基吡啶(DHI)或5,6-二羟基吡啶-2-羧酸(DHICA),其中DHI与DHICA被确认为墨鱼黑色素的基本结构单元^[20]。现有研究模型指出,黑色素约由20% DHI衍生单体、75% DHICA衍生单体及少量氧化还原形式的5,6-吡啶酮与半醌组成,其氧化过程可产生吡咯二羧酸与三羧酸,这些酸性基团通过与黑素蛋白的肽段相互作用形成稳定复合物^[21]。基于此结构,黑色素作为功能性成分被添加到商业产品中。例如,通过逐层喷涂墨鱼黑色素和疏水二氧化硅纳米颗粒,成功构建了一种兼具防冰与光热除冰功能的超疏水涂层,用于可防止户外应用中的表面污染^[22]。墨鱼汁黑色素作为食品加工副产物,因其富含具有抗氧化与抗菌活性的天然成分,可作为海产品天然添加剂应用于食品保鲜领域^[23]。在光学材料方面,墨鱼黑色素宽波段紫外线吸收特性被用于开发抗蓝光智能镜片^[24]。黑色素单体含有许多官能团,包括羟基和羧基,可以自由地螯合各种金属离子,构建染料敏化太阳能电池的仿生光阳极^[25]。通过水相介质中自组装制备多巴黑色素薄膜,其对水中亚甲基蓝染料污染物具有高效去除能力,发展成为智能、可循环且易于规模化的水处理装置^[26]。

尽管墨鱼黑色素具有天然丰度高、可从墨鱼分泌物便捷提取等优势,但其在化妆品领域的应用仍严重受限,主要归因于该生物大分子在常规溶剂体系中低的分散度(水中分散度为0.8 mg·mL⁻¹)。为突破该技术瓶颈,本研究创新性采用pH调控策略进行系统研究:通过构建pH 2.0~12.0的宽域处理体系,发现酸性条件(pH<7.0)对黑色素微观结构无显著影响,而碱性处理(pH>9.0)可诱导不可逆结构重组——在碱性环境中黑色素分散度提升至12.4 mg·mL⁻¹(较中性条件提高15.5倍),且体系回调至中性时仍保持分散稳定性,证实其发生了永久性拓扑结构转变。透射电镜分析显示,碱改性黑色素由原始球形颗粒转变为多孔纤维网络结构,这种形态演变显著提升其在化妆品基质中的分散性。光防护性能评估表明,改性材料对UV波段的屏蔽效率天然黑色素提升,这归因于其增强的界面结合能力与连续光防护膜的形成。该研究首次揭示pH诱导的黑色素结构-功能协同演化机制,为开发高附加值海洋源光防护剂提供了理论支撑和产业化路径。

1 实验部分

1.1 实验材料

氢氧化钠(NaOH,质量分数为99%)、氯化氢(HCl,质量分数为99.8%)、溴化钾(KBr,质量分数为99%)和硫酸钡(BaSO₄,质量分数为99.9%)购自Macklin有限公司;胎牛血清(FBS)购自浙江天行生物科技有限公司;DMEM/HIGH GLUCOSE培养基、胰蛋白酶(酶活力≥2500 units/mg)、磷酸缓冲液(PBS 0.2 mol·L⁻¹)、calcein-AM(质量分数≥90%)和碘化丙啶(Propidium iodide,质量分数为98%)购自Cytiva Biotechnology有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

将墨汁从囊的切口中挤出,用去离子水浸泡,用磁力搅拌器搅拌 2 h,提取黑色素,在离心力 7 104 g 下离心 15 min,然后倒出上方液体,用去离子水洗滌沉淀。此过程重复 5 次。然后将得到的沉淀物在 60 °C 下真空干燥,研磨后制成墨鱼黑色素粉。将干燥后的沉淀物用研钵研磨成细粉,再进行筛分,得到质地均匀的黑色素粉。从 25 岁健康汉族女性身上获得黑色头发纤维,在去离子水中浸泡 2 h,去除表面杂质。在研究前,通过光学显微镜观察,这些头发纤维被鉴定为没有明显的外部损伤。

1.2.2 透射电子显微镜(TEM)测试

为了研究墨鱼黑色素的微观结构,对黑色素样品进行了 TEM(JEM 1400Plus(JEOL)电子显微镜,120 kV 加速电压)观察。将 10 μL 不同 pH 值的黑色素分散液滴在 300 目铜网板上,铜网板会自动吸附分散液中的黑色素颗粒,约 10 min 后用滤纸除去多余的分散液,然后将铜网板干燥。

1.2.3 扫描电子显微镜(SEM)测试

黑色素粉在高真空条件下冷冻干燥 24 h,然后将黑色素粉末附着在导电胶带上,并在粉末表面镀金。制备的样品在 FEI QUANTA FEG250 SEM 上进行分析以获得形貌表征。

1.2.4 傅里叶变换红外(FT-IR)光谱分析测试

样品与纯溴化钾(KBr)混合处理,并在玛瑙臼中研磨,压成薄片,在 64 次扫描下被表征,并在 500~4 000 cm^{-1} 的波数范围内收集信息。

1.2.5 紫外-可见(UV-vis)光谱分析测试

用 UV-2600 型 UV-vis 分光光度计测定黑色素分散液的 UV-vis 吸收光谱。黑色素样品的制备方法如下:将黑色素悬浮于去离子水中,用 HCl 和 NaOH 调节 pH,超声(40 kHz)分散 30 min,静置 4.5 h,然后将所得液体分为两份,一份稀释 4 倍进行 UV-vis 光谱测试,另一份过滤得到固体黑色素用于固体 UV-vis 光谱测试。将头发纤维单独浸泡在黑色素中,悬浮 10 min,室温风干,在分光光度计上测量固体黑色素样品和覆盖黑色素的毛发纤维。

1.2.6 细胞培养实验

以人皮肤成纤维细胞(HSF)为实验材料,37 °C、5% CO_2 湿化气下,在含有 10% 热灭活胎牛血清(FBS)的 DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基中培养。

1.2.7 细胞活死试验

Calcein-AM 是一种活细胞染料,可以与活细胞结合产生绿色荧光,而丙啶(PI)是一种死细胞染料,只能进入死细胞产生红色荧光。黑色素与细胞共存 24 h 后,用 AM/PI 细胞染色后,使用倒置荧光显微镜(DMI3000,徕卡)观察观察黑色素作用下的细胞形态。

1.2.8 UV 辐射和温度对墨鱼黑色素的影响实验

本文采用水浴控温(京虹 DK-S24,上海)来考察温度对分散液状态下黑色素的影响。黑色素样品的制备与分散液状态的 UV-vis 样品相同,样品分别置于 50、60 和 70 °C 的水浴中 0~52 h。每隔 4 h 测定样品在波长 270 nm 处的吸光度。用紫外光(250 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)照射两个黑色素样品 0~24 h,每隔 3 h 取样,测定在波长 270 nm 处的吸光度。

1.2.9 人体毛发上的暴露实验

用墨鱼黑色素对人体毛发进行了防紫外线实验。将黑色素分散于去离子水中,形成质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的均匀分散液,然后用 NaOH 溶液调节 pH,并用超声波将分散液分散 30 min,静置 4.5 h,然后用 HCl 将分散液的 pH 由 13 调至 7。将头发纤维单独浸泡在黑色素中 10 min,让黑色素粒子吸附,然后在室温下风干。用 250 mW/cm^2 的 UV 光照射人发 70 h,采用不同的处理方法:(1)将人发浸在超纯水中不用紫外灯照射;(2)用 pH 为 13 处理的黑色素涂覆人发不用紫外灯照射;(3)将人发浸入超纯水中并用紫外灯照射;(4)用 pH 13 处理的黑色素涂覆人发并用紫外灯照射;(5)用 pH 为 7 的黑色素涂覆人发并用紫外灯照射。将头发纤维处理 10 h 后自然风干,然后将头发纤维置于 UV 光下,并通过光学显微镜(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)和 UV-vis 分光光度计 UV-2600 观察、对比。

1.2.10 其他仪器表征

在 Malvern Zetasizer Nano ZS 上进行了动态光散射(DLS)实验。元素分析实验采用扫描电镜(SEM, FEI QUANTA FEG250)进行能谱分析(EDS)。

2 结果与讨论

2.1 墨鱼黑色素的微观结构

TEM 显微图像显示,墨鱼黑色素在纯水分散体系中的颗粒呈典型球形形貌,粒径分布为 80~150 nm (图 1(a)—(c))。研究显示,这种球形结构源于 DHI 与 DHICA 单体通过芳香环 π - π 堆叠作用自组装形成^[27-28]。颗粒尺寸的相对均一性可能与 π - π 堆叠作用力与颗粒解离能之间的动态平衡相关。还可观察到颗粒之间有明显的团聚行为,这也是其在水中分散度不高的主要原因。

采用 SEM 表征技术,在 0.5 k 至 50 k 放大倍数下系统解析黑色素的微观形貌。0.5 k 放大倍数(对应 100 μ m 标尺)下的初始 SEM 图像(图 1(d))显示黑色素粉末呈现微米级聚集体形貌。当放大倍数提升至 10 k(5 μ m 标尺)时,显微图像(图 1(e))清晰揭示聚集体由亚微米级次级颗粒有序堆叠构成。通过逐级放大观察,最终在 50 k 放大倍数(200 nm 标尺)下成功解析构成次级颗粒的基本单元——粒径呈单分散分布的球形纳米颗粒(图 1(f)),统计其直径分布为 80~180 nm(见附录图 S1(b)),该尺寸分布范围与 TEM 表征结果高度一致。

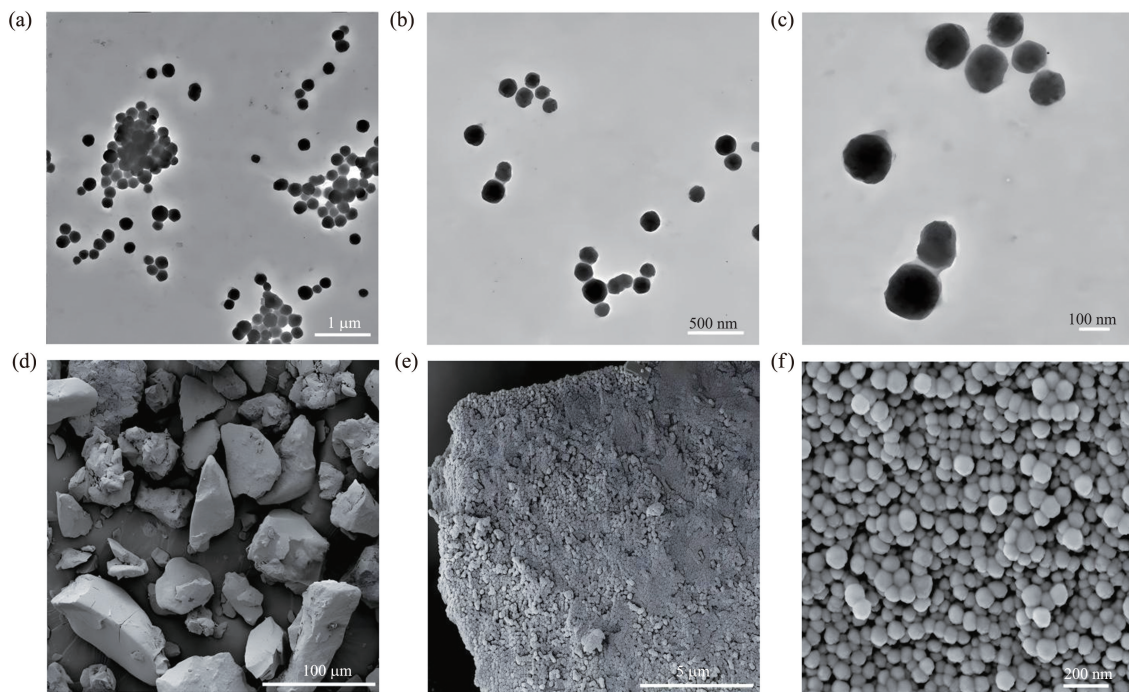


图 1 (a—c) pH 值为 7 时,墨鱼黑色素的 TEM 图像;(d—f) 墨鱼黑色素粉末的 SEM 图像

Fig.1 (a—c) TEM images of cuttlefish melanin at pH 7; (d—f) SEM images of cuttlefish melanin powder

采用 TEM 系统研究 pH 梯度对墨鱼黑色素结构的影响(图 S2)。结果显示,在 pH 1~7 范围内,黑色素维持稳定的球形形貌(图 S2(a)—(d)),证实其超分子组装体对酸性环境具有结构惰性。当 pH 升至 9 时,黑色素的微观结构发生了明显的变化。图 S2(e)显示了聚合物纳米纤维从球形颗粒表面脱离的情况。同时如图 S2(f)中红色箭头标记所示,大颗粒开始发生解聚。

当 pH 进一步增大到 11 和 13 时,黑色素颗粒的球形形态完全消失,出现了条状结构、链状结构和网状结构等新的微观结构(图 S2(g)—(i))。这种 pH 依赖的结构演化表明碱性环境对黑色素重构具有显著促进作用。基于此,选择 pH 11 和 13 体系进行动态演变研究,深入探讨黑色素的微观结构属性。黑色素在 pH 11 下孵育 1 h 后(图 2(a)),曾经均匀的球形轮廓被破坏,产生了纳米棒结构。如红色箭头所示,这些结构的轮廓变得不规则,观察到不规则结构的发展(绿色箭头标记)。纳米棒结构的新生碎片用蓝色椭圆形圆

圈突出显示,表明纳米棒形成的明显趋势。经过 3 h 后,这些颗粒进一步解体,形成了如图 2(b) 所示的丝状结构。这与已报道的认为黑色素颗粒由聚合物链组成的结论一致^[29]。

经 pH 13 处理 1 h 的黑色素样品在 TEM 图像中(图 2(c))呈现不规则形态(绿色箭头标注)、链状组装体(黄色箭头指示)及带状结构(红色圆圈标识)。延长处理至 3 h 后,观测到具有层状有序排列的宽带结构(图 2(d)),其带状单元的周期性堆叠特征,通过黄色参考线清晰展现。该系列结构演变证实黑色素组分在强碱性环境中会发生层级化自组装,表明材料的微观结构对 pH 值变化具有显著的响应特性。

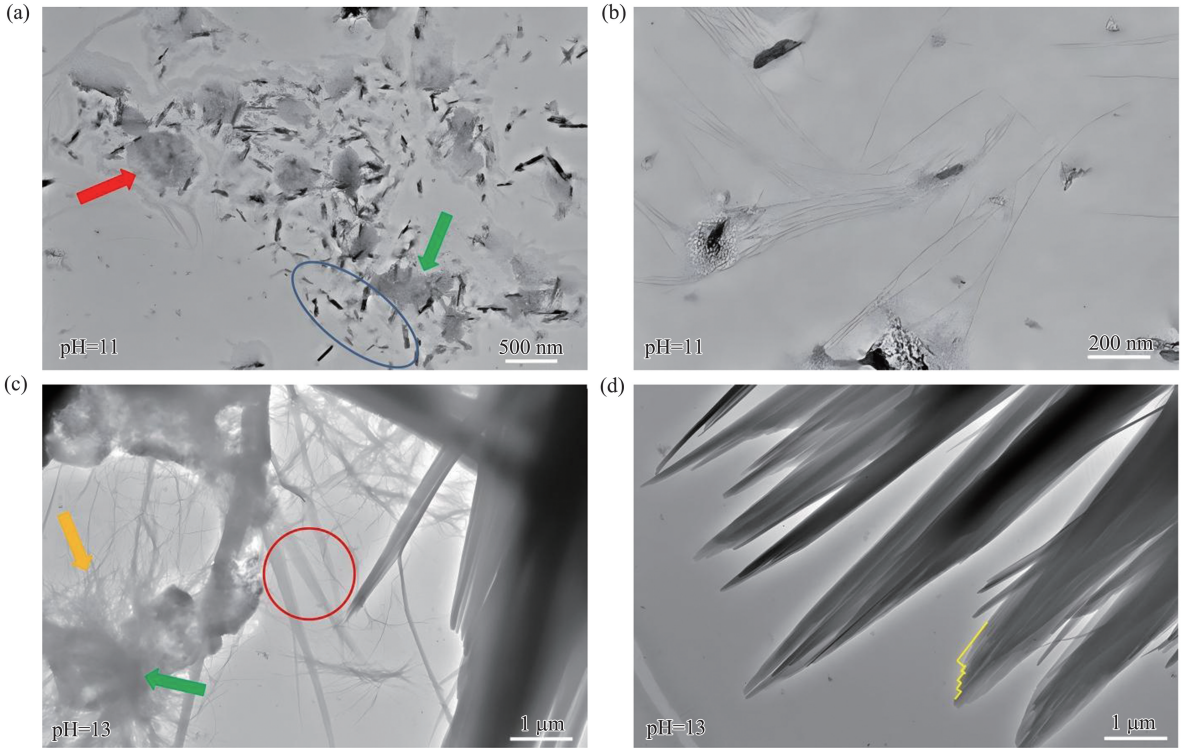


图 2 墨鱼黑色素的 TEM 图像: (a) pH 11 下孵育 1 h; (b) pH 11 下孵育 3 h; (c) pH 13 下孵育 1 h; (d) pH 13 下孵育 3 h
Fig.2 TEM images of cuttlefish melanin: (a) incubated at pH 11 for 1 h; (b) incubated at pH 11 for 3h; (c) incubated at pH 13 for 1 h; (d) incubated at pH 13 for 3 h

2.2 墨鱼黑色素的特性

墨鱼黑色素分散液的紫外-可见吸收光谱(图 3(a))在 270 nm(UV-C 波段)处呈现特征吸收峰,且该峰位在不同 pH 处理的分散液中保持稳定。相对于 pH 值为 7 的分散液,pH 值为 9、11 和 13 的黑色素分散液表现出逐渐增强的紫外线吸收能力。这表明,黑色素在碱性条件下分散度逐渐增大。分散实验证实,黑色素在 pH 7 的水中分散度为 0.8 mg/mL,在 pH 13 水中分散度增为 12.4 mg/mL,为中性条件的 15.5 倍,充分验证碱性处理对黑色素生物大分子分散度的促进作用。

本文通过 EDS 进行表征 pH 值为 7 和 13 时黑色素样品的元素组成^[30],结果如图 3(b)和图 3(c)所示。图 3b 显示了碳(C)、氮(N)、氧(O)、钠(Na)、镁(Mg)、磷(P)、硫(S)、钾(K)和钙(Ca)对应的峰的存在,其中碳、氮和氧是最主要的元素,磷、硫和钾表现出相对较弱的强度。碳被确定为最丰富的元素,约占总元素含量的 49.80%,几乎占组成的一半。其他重要元素氧和氮的含量分别为 32.03%和 13.75%。相比之下,钠、硫、钾和磷等微量元素的含量低于 1%。pH 为 13 时(图 3(c)),与 pH 为 7 时的黑色素相比,EDS 光谱显示出相似的光谱特征。表 S1 表明,在 pH 值为 7 和 13 时,黑色素的元素仅显示略有不同,在 pH 值为 13 的黑色素样品中钠的比例增加是 NaOH 处理过程的结果,这说明碱性处理对黑色素元素含量的影响很小。在应用场景中,黑色素通常以固态形式使用。固态墨鱼黑色素的紫外-可见吸收光谱分析显示(图 3(d)):pH 7 与 pH 13 样品均在 UV-A 波段(370 nm)呈现特征吸收峰,且在 215~280 nm 范围展现出宽谱吸收特性。进一步扫描 190~220 nm 区间,检测到 4 个连续特征峰(图 3(e)),其峰值分别定位于 197、203、205 和 211 nm。两样品间未出现显著峰位移,证实碱性处理未改变黑色素固态的光吸收基元结构,同时也能证实固态黑色素

具有良好的紫外吸收能力。

墨鱼黑色素在 pH 7 与 pH 13 条件下的 FT-IR 光谱分析如图 3(f) 所示。pH 7 样品特征峰归属如下: 在 $3\ 600\sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 处以 $3\ 380\ \text{cm}^{-1}$ 为中心的宽吸收带是由 O—H 或 N—H 的拉伸振动引起的; $1\ 580\ \text{cm}^{-1}$ 处为 C=C 芳香环或吡咯环拉伸振动或吡啶环振动; $1\ 375\ \text{cm}^{-1}$ 处为酚基和羧基的 O—H 引起的吸收峰。在光谱中还发现了 C—H 基团, 如脂肪族 C—H 在 $2\ 917\ \text{cm}^{-1}$ 处的拉伸振动, 碳链中 CH_2 在 $2\ 852\ \text{cm}^{-1}$ 处的 C—H 对称拉伸以及 1,3-二取代的 C—H 在 $801\ \text{cm}^{-1}$ 处的拉伸。与 pH 7 时的黑色素相比, pH 13 时的黑色素发生了较大的变化: 峰值位置从 $1\ 580\ \text{cm}^{-1}$ 变为 $1\ 615\ \text{cm}^{-1}$, 这是由于 C=C 芳香环振动或 COO^- 反对称拉伸的存在。另一个不同之处在于 $1\ 468\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰消失被认为是吡咯环拉伸振动, 表明碱性处理导致黑色素聚合物链部分水解。所得的 FT-IR 光谱与文献中 O—H、N—H、C=C 和 C—H 等基团以及吡咯和吡啶等结构一致^[31-33]。主要谱带指认参照 Binsi 团队建立的解析标准^[34]。

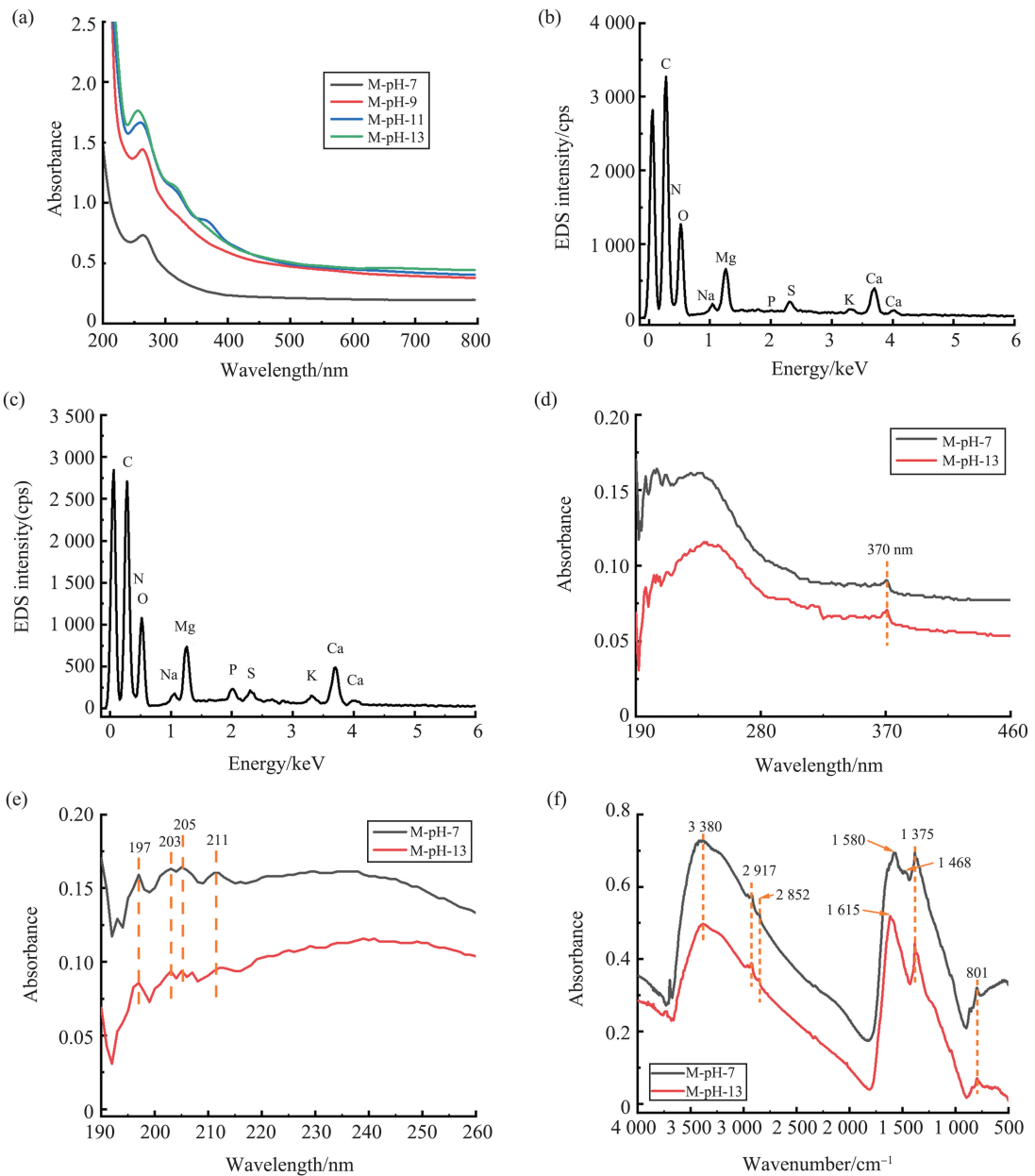


图 3 (a) 分散液状态的黑色素的紫外-可见光谱; (b) pH 7 的黑色素的 EDS 光谱; (c) pH 13 的黑色素的 EDS 光谱; (d—e) 固态的黑色素的紫外-可见光谱; (f) 黑色素粉末的 FT-IR 光谱

Fig. 3 (a) UV-vis spectra of melanin in solution state; (b) EDS spectra of melanin at pH 7; (c) EDS spectra of melanin at pH 13; (d—e) UV-vis spectra of melanin in solid state; (f) FT-IR spectra of melanin powder

2.3 墨鱼黑色素的生物相容性

文献研究证实,墨鱼黑色素凭借其宽谱紫外吸收特性(UVB-UVA, 280~400 nm),在光防护材料领域展现显著应用潜力^[35-38]。生物相容性是评价黑色素是否适合应用于生物体的重要标准。用 HSF 细胞评价 pH 7 和 13 处理过的黑色素样品的细胞毒性,Calcein AM/PI 双染色研究黑色素对细胞形态的影响,其中绿色代表活细胞,红色代表死细胞。对照组 HSF 细胞呈明显梭形,仅见少量死细胞(图 4(a) 和 4(b))。黑色素在 pH 7 下处理后,与细胞共存,观察到 HSF 细胞聚集的现象(图 4(c)), HSF 细胞的聚集行为可归因于黑色素颗粒的聚集特性。与对照细胞相比,死亡细胞的数量有所增加(图 4(d))。黑色素在 pH 13 下处理后加入培养基中,观察到聚集行为明显降低,细胞形态(图 4(e))与对照组 HSF 细胞相似,与 pH 7 处理后黑色素相比,死亡细胞数量也明显减少(图 4(f))。结果表明,通过优化处理条件至 pH 13,可有效消除黑色素颗粒的表面聚集效应,从而显著提升其生物安全性。

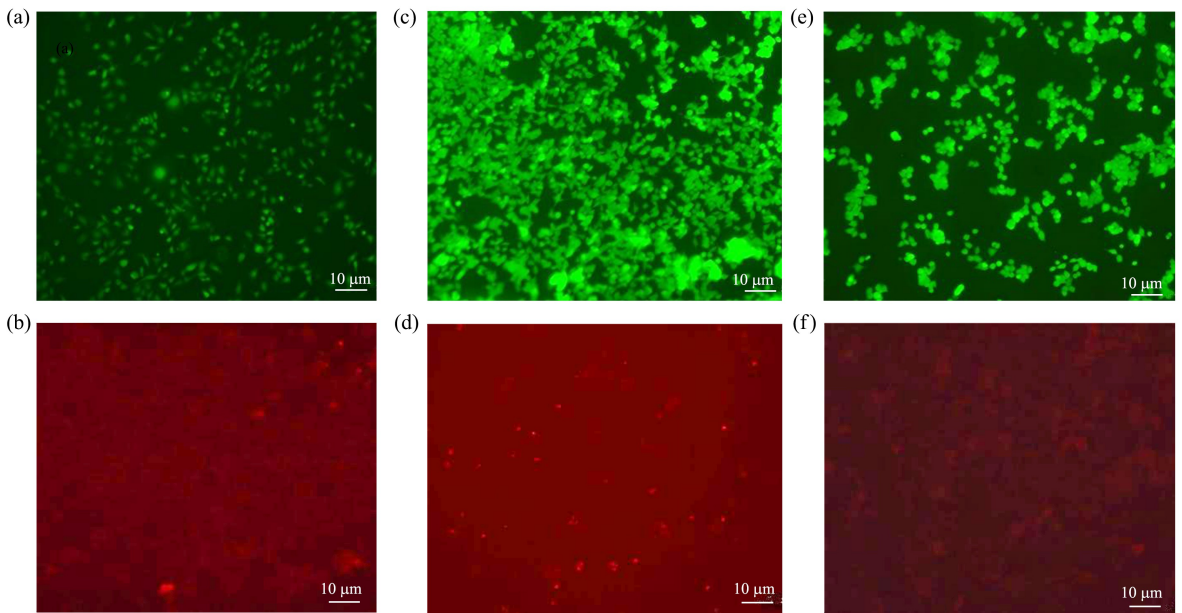


图 4 活/死 HSF 细胞染色表征:(a) 空白对照活细胞;(b) 空白对照死细胞;(c) 与 pH 7 处理后黑色素共同培养下活细胞;(d) 与 pH 7 处理后黑色素共同培养下死细胞;(e) 与 pH 13 处理后黑色素共同培养下活细胞;(f) 与 pH 13 处理后黑色素共同培养下死细胞

Fig.4 Live/dead cell staining of HSF cells: (a) blank control living cells; (b) blank control dead cells; (c) living cells co-cultured with melanin after pH 7 treatment; (d) dead cells co-cultured with melanin after pH 7 treatment; (e) living cells co-cultured with melanin after pH 13 treatment; (f) dead cells co-cultured with melanin after pH 13 treatment

2.4 UV 辐射、时间和温度对墨鱼黑色素的影响

紫外辐射阐明了分散液态黑色素的光降解行为(图 5(a))。270 nm 处吸光度对比显示,两种 pH 条件处理的黑色素样品在辐照过程中均呈现吸光度下降趋势。然而,pH 为 13 的碱性环境增强了黑色素的分散度,导致分散液中黑色素的浓度高于 pH 为 7 的分散液。因此,在 3 h 的照射期后,相对于对照样品,大量黑色素仍未降解。图 S3 描述了样品在 pH 为 7 时,在 270 nm 处的特征吸收峰,在 UV 照射 3 h 后显著减弱,表明黑色素降解明显。相比之下,pH 为 13 的黑色素分散液在 UV 光下在 0~24 h 内保持峰值(图 S4)。证实碱性处理可增强材料光稳定性。

对黑色素样品开展时间稳定性研究。DLS 结果(图 S5)表明,pH 7 条件下,黑色素颗粒的初始聚集粒径在 500 nm 范围内,而到第三周时,尺寸已扩大到约 3 000 nm,证实该体系在水中存在随时间推移的聚集倾向。鉴于 pH 13 条件下黑色素呈现纤维状形貌导致 DLS 检测误差率较高,本研究补充紫外-可见吸收光谱进行稳定性追踪。紫外可见光谱(图 S6)显示中性条件(pH 7)样品在 270 nm 特征峰于第二周后完全消失,该现象与 DLS 检测的聚集度提升结果相互印证,提示样品可能发生降解或严重聚集沉淀。在 pH 13 下处理的样品的紫外可见光谱(图 S6)显示,随时间变化,270 nm 处特征峰没有明显变化,表明其具有优异的时间稳定性。

为深入探究温度升高对黑色素理化性质的影响,本研究通过加热实验监测样品在 270 nm 处的吸光度变

化。实验数据显示(图5(b)),在 pH 7 条件下,黑色素吸光度随加热时间延长呈温度依赖性上升,该现象推测其机制可能涉及高温引发的黑色素颗粒聚集态解聚,进而改变其光吸收特性。在 pH 13 条件下对黑色素分散液进行的加热实验结果如图 5(c) 所示。270 nm 处吸光度变化呈现典型两阶段特征,初始阶段随加热时间延长而递减,后续阶段则转为递增趋势。该结果表明,碱性条件(pH 13)下黑色素颗粒也表现出良好的温度稳定性。

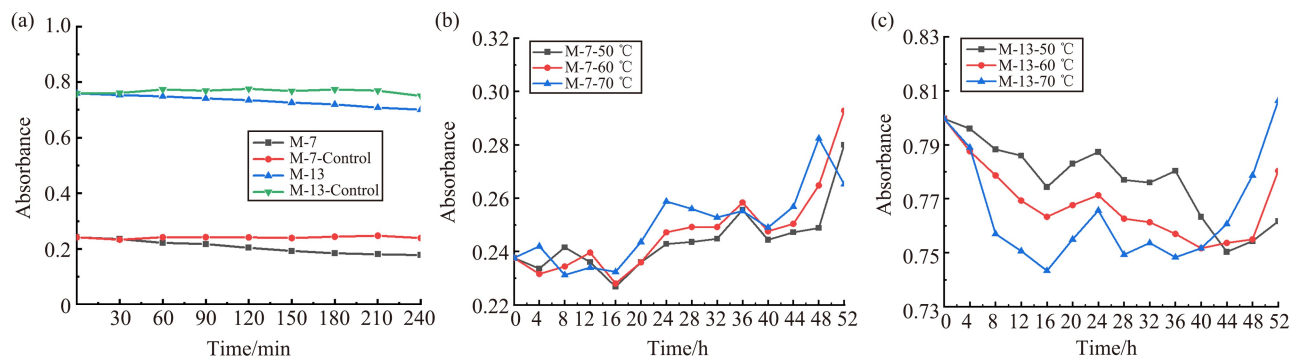


图5 光降解(a)和温度(b—c)对黑色素吸光度的影响

Fig.5 Effects of photodegradation (a) and temperature (b—c) on the absorbance of melanin

2.5 黑色素对头发纤维的光保护作用

本研究系统评估了该色素作为头发保护涂层的防护效能,重点探究其对紫外线(UV)诱导的毛发纤维结构损伤的抑制效果^[34]。通过光学显微术对 UV 辐照前后毛发形态进行表征(图 6),结果显示,未处理组(无黑色素涂层)的毛发样品在 UV 辐照前呈现完整光滑的角质层结构(图 6(a)),经辐照后出现显著的形态学改变,具体表现为角质层结构不均匀性(红色箭头指示)及表面纤维大面积剥落(绿色箭头指示)(图 6(b))。

经 pH 7 黑色素分散液处理的毛发样品(图 6(c))在 UV 辐照后未出现明显结构缺陷(图 6(d)),但显微图像仍可辨识微量表面纤维突起(红色箭头指示)。相较之下,pH 13 黑色素处理组展现出更优异的防护性能,未辐照对照组(图 6(e))与辐照后样品(图 6(f))的纤维表面形貌无显著差异,证实碱性条件处理的黑色素涂层能有效维持毛发纤维的结构完整性。

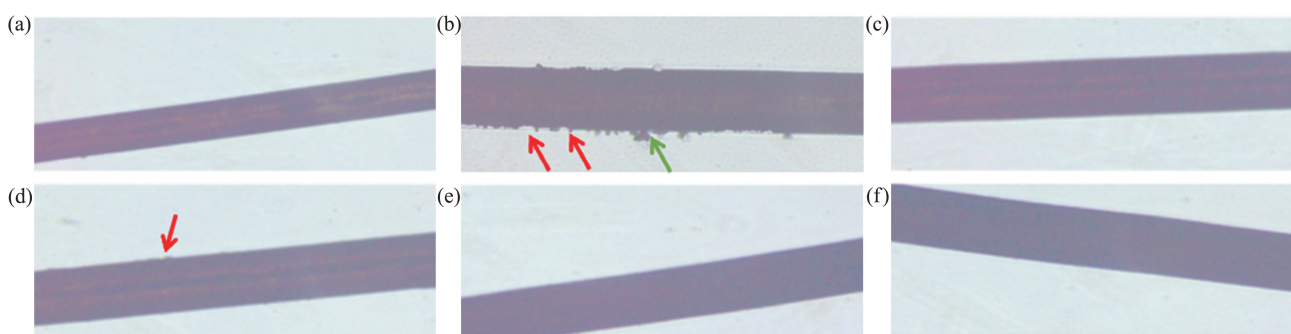


图6 头发纤维的光学显微镜图像:(a) 没有紫外线辐射的对照头发纤维;(b) 紫外线辐射下的头发纤维;(c) 在 pH 7 下处理的黑色素和没有紫外线辐射的涂层头发纤维;(d) pH 7 下处理的黑色素涂覆和在紫外线辐射下的毛发纤维;(e) pH 13 下处理的黑色素涂覆和无紫外线辐射的头发纤维;(f) pH 13 下处理的黑色素涂覆并在紫外线照射下头发纤维

Fig.6 Optical microscope images of hair fibers: (a) control hair fibers without UV radiation; (b) control hair fibers under UV radiation; (c) melanin treated at pH 7 and coated hair fibers without UV radiation; (d) melanin treated at pH 7 and coated hair fibers under UV radiation; (e) melanin treated at pH 13 and coated hair fibers without UV radiation; (f) melanin treated at pH 13 and coated hair fibers under UV radiation

SEM 表征结果(图 7(a)、(b))清晰显示,未施加黑色素涂层的毛发样品经 UV 辐照后,表面呈现毛发鳞片显著剥落现象(红色圆圈表示)。经 pH 7 黑色素处理的毛发样品(图 7(c)、(d))虽较未处理组有所改善,但仍存在不规则表面条纹(图 7(c)),且电镜高倍图像(图 7(d))可明确观测到黑色素颗粒选择性富集于毛发鳞片间隙(红色箭头标识),该空间分布特性有效抑制了鳞片脱落。与之形成鲜明对比的是,pH 13 黑色素处理组(图 7(e)、(f))的毛发在 UV 辐照后仍保持规整的角质层结构,未出现大面积剥落损伤特征。高分辨

率图像(图 7(f))进一步揭示毛发鳞片间隙内存在大量纤维状黑色素(红色箭头标识)。对比分析证实,pH 13 条件处理的黑色素涂层展现出更优的护发性能,这主要归因于碱性环境提升黑色素分散度的同时,促进其纳米纤维结构在毛发界面的定向吸附。具体而言,图 7(e)中毛发表面呈现的高密度分布白色亮点即为成功吸附的黑色素聚集体,较之 pH 7 处理组(图 7(c))的离散颗粒分布,该连续涂层结构对毛发鳞片损伤的屏障作用更为显著。

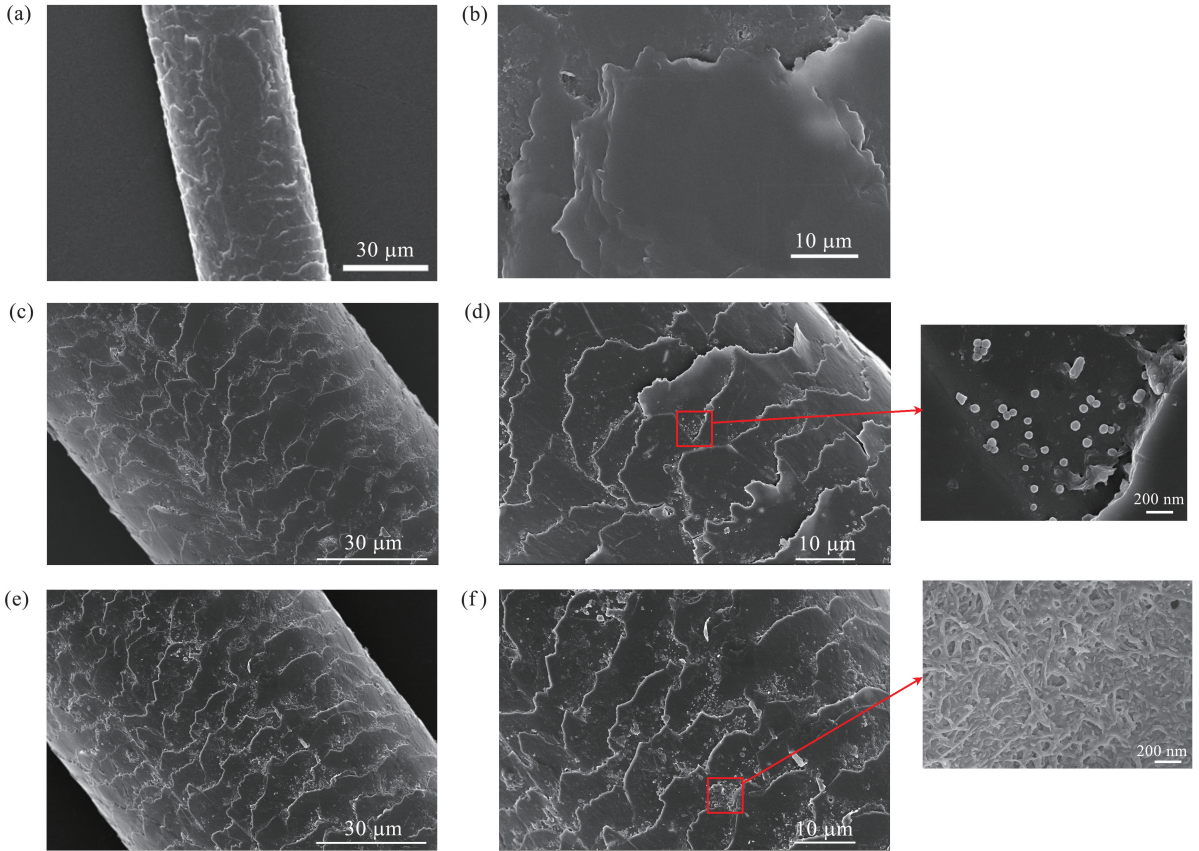


图 7 (a—b)曝光后未涂覆黑色素的毛发的 SEM 图像;(c—d)曝光后涂覆黑色素(pH=7)的毛发的 SEM 图像;(e—f)曝光后涂覆黑色素(pH=13)的毛发的 SEM 图像

Fig.7 (a—b) SEM images of hair without melanin coated after light exposure; (c—d) SEM images of melanin (pH=7) coated hair after light exposure; (e—f) SEM images of melanin (pH=13) coated hair after light exposure

为深入探究黑色素对头发的保护机制,通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)进行分子键级别的系统分析(图 S7 与图 8)。未涂敷毛发在 $3\ 308\ \text{cm}^{-1}$ 处呈现强吸收峰,该特征峰归属于 O—H 伸缩振动、羧酸根基团(COO^-)及酚类化合物的协同振动(图 S7)。 $1\ 652\ \text{cm}^{-1}$ 与 $1\ 533\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征吸收峰分别对应酰胺 I 带(C=O 伸缩振动)和酰胺 II 带(N—H 弯曲与 C—N 伸缩耦合振动),而 $603\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰则源于羧酸基团(COOH)的 C—O—O 变形振动(图 S7)。在人发纤维之后 FT-IR 光谱显示,未涂覆和涂覆黑色素的头发之间没有显著差异,这表明两种黑色素样品对人类头发的化学结构没有损害。

进一步比较 UV 辐射前后未涂覆和涂覆的头发纤维,证据表明,FT-IR 吸收模式发生了更清晰的变化。图 8(a)显示,在 UV 辐射后,未涂覆的头发在约 $1\ 116\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了一个新的波段,对应于胺的 C—N 拉伸振动或醚/醇的 C—O 拉伸振动,表明未涂覆的头发在 UV 辐射后结构发生了变化。此外,图 8(b)显示,未涂覆的头发样品暴露于 UV 辐射后,在 $2\ 851\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了新的吸收峰,对应于脂质 CH_2 基团的对称 C—H 拉伸,表明人类头发中脂质结构可能发生了变化在 UV 辐射下,未涂覆头发的脂质分裂会导致短链游离脂肪酸的产生,而脂质分裂会降低头发的光泽和头发的自我调节能力。进而会导致头发中水分子的流失,这一点从图 8(a)中可以明显看出,在 UV 照射前,所有样品中观察到的头发中水分的 O—H 带的吸收峰在 $3\ 736\ \text{cm}^{-1}$ 左右占主导地位,而在 UV 照射后,未涂覆的样品中吸收峰消失,说明未涂覆的头发水分流失。因此,未涂覆的毛发纤维表面会出现不均匀和缺陷,这与光学显微镜下的形态学结果一致。然而,毛发被黑色素覆盖在 UV 照射前后,FTIR 没有出现如此显著的变化,说明黑色素具有良

好的光防护作用。

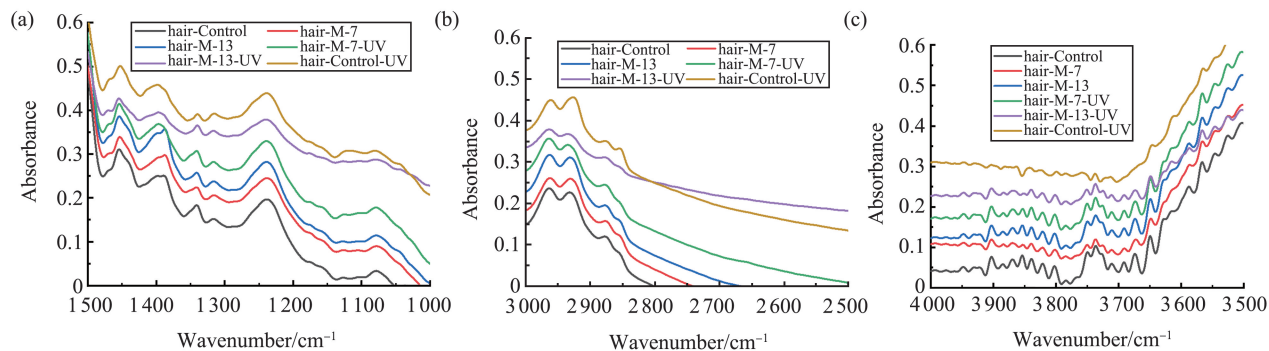


图8 黑色素处理的头发纤维紫外辐照前后的 FTIR 光谱: (a) $1\ 000\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$; (b) $2\ 500\sim 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$; (c) $3\ 500\sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$

Fig.8 FTIR spectra of hair fibers before and after UV radiation: (a) $1\ 000\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$; (b) $2\ 500\sim 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$; (c) $3\ 500\sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$

采用紫外-可见光谱技术系统分析涂层处理与未处理毛发样品在紫外辐照前后的光学特性差异。如图 S7(a) 和 S7(b) 所示,两种黑色素标准样品在 370 nm 处均呈现特征性吸收峰,该特征峰在涂层毛发样品中的重现性验证了黑色素在毛发纤维表面的成功负载。经紫外辐照后,两组样品均呈现显著的光谱改变:原始 3 个主峰强度显著衰减,同时新生多个吸收峰,这证实紫外辐射引发的纤维结构损伤导致了光学性质的改变。值得注意的是,与未处理对照组 (hair-control-UV) 相比,碱性条件处理的黑色素涂层样品 (hair-M-13-UV) 仅观察到 203 nm 吸收峰向 202 nm 的微小蓝移,显示出优异的紫外损伤抑制效果。在 pH 7 下,如图 9 (b) 所示, hair-7-UV 样品存在明显的波段移位现象,197 nm 波段较对照发样移位至 195 nm, 203 nm 和 206 nm 波段分别移位至 202 nm 和 207 nm。与对照 UV 样品相比,黑色素同样发挥了显著的保护作用。总的来说, hair-M-13-UV 样品的吸收峰变化可以忽略不计,这种显著的防护性能差异充分证实,经碱性条件修饰的黑色素涂层具有更优异的紫外线防护性能。

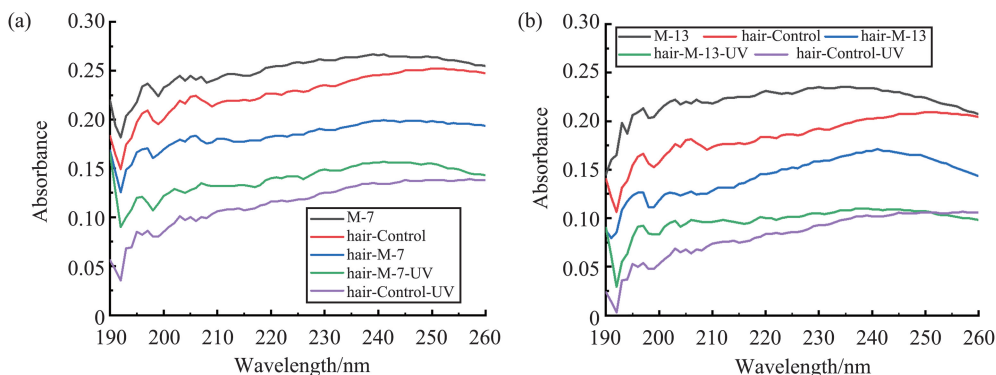


图9 黑色素处理的头发纤维紫外辐照前后紫外-可见光谱图: (a) pH=7; (b) pH=13
Fig.9 UV-vis spectra of hair fibers before and after UV radiation: (a) pH=7; (b) pH=13

3 结论

本研究通过高速离心法成功提取墨鱼黑色素,系统阐明了 pH 调控对其超分子组装行为的构效关系,获得了一些关键发现:(1) 酸性条件 ($\text{pH}<7$) 能够维持黑色素纳米颗粒的固有球状形貌,而碱性环境 ($\text{pH}\ 7\sim 13$) 可触发不可逆重构,形成具有多级有序特征的链状组装体、带状聚集及三维网络结构;(2) 分散度实验证实,碱性处理使黑色素分散度提升至 $12.4\ \text{mg/mL}$ (较中性条件提高 15.5 倍),且 pH 回调至中性时仍保持分散稳定性;(3) 细胞毒性评估显示,经 pH13 改性的黑色素可使 HSF 细胞存活率提升,其机制归因于表面亲水改性的膜亲和特性增强;(4) 毛发防护实验证实,碱性重构黑色素涂层对毛发表面具有显著防护效果,可使 UVB/UVA 屏蔽效率明显提升。本研究创新性地建立了黑色素 pH 响应性结构调控-功能强化关联模型,为海洋源智能防护材料的分子设计与工程化应用提供了新的应用路径。

参考文献:

- [1] AYU SHAZWANI Z, RABETA M S. Enzymatic hydrolysis as an approach to produce alternative protein from cephalopods ink powder: a short review[J]. *Food Research*, 2020, 4(5):1383-1390.
- [2] PYO J, JU K Y, LEE J K. Artificial pheomelanin nanoparticles and their photo-sensitization properties[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2016, 160:330-335.
- [3] XIE J W, LI H Y, CHE H X, et al. Extraction, physicochemical characterization, and bioactive properties of ink melanin from cuttlefish (*Sepia esculenta*) [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2021, 56(7):3627-3640.
- [4] LIN Z J, LIU L Z, WANG W, et al. The role and mechanism of polydopamine and cuttlefish ink melanin carrying copper ion nanoparticles in antibacterial properties and promoting wound healing[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(17):5951-5964.
- [5] POTA G, ZANFARDINO A, DI NAPOLI M, et al. Bioinspired antibacterial PVA/melanin-TiO₂ hybrid nanoparticles: the role of poly-vinyl-alcohol on their self-assembly and biocide activity[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 202:111671.
- [6] MENTER J M, PATTA A M, HOLLINS T D, et al. Photoprotection of mammalian acid-soluble collagen by cuttlefish sepia melanin *in vitro* [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1998, 68(4):532-537.
- [7] BETTINGER C J, BRUGGEMAN J P, MISRA A, et al. Biocompatibility of biodegradable semiconducting melanin films for nerve tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(17):3050-3057.
- [8] PAULIN J V, BATAGIN-NETO A, NAYDENOV B, et al. High-field/high-frequency EPR spectroscopy on synthetic melanin: on the origin of carbon-centered radicals[J]. *Materials Advances*, 2021, 2(19):6297-6305.
- [9] CUZZUBBO S, CARPENTIER A F. Applications of melanin and melanin-like nanoparticles in cancer therapy: a review of recent advances[J]. *Cancers*, 2021, 13(6):1463.
- [10] GALVÁN I, WAKAMATSU K. Color measurement of the animal integument predicts the content of specific melanin forms [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(82):79135-79142.
- [11] SUGUMARAN M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects[J]. *Pigment Cell Research*, 2002, 15(1):2-9.
- [12] D'MELLO S, FINLAY G, BAGULEY B, et al. Signaling pathways in melanogenesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7):1144.
- [13] KUNDU R V, MHLABA J M, RANGEL S M, et al. The convergence theory for vitiligo: a reappraisal[J]. *Experimental Dermatology*, 2019, 28(6):647-655.
- [14] SLOMINSKI A, WORTSMAN J, PLONKA P M, et al. Hair follicle pigmentation[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, 124(1):13-21.
- [15] SLOMINSKI A, TOBIN D J, SHIBAHARA S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation [J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84(4):1155-1228.
- [16] VAHIDZADEH E, KALRA A P, SHANKAR K. Melanin-based electronics: From proton conductors to photovoltaics and beyond[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 122:127-139.
- [17] SOLANO F. Photoprotection and skin pigmentation: melanin-related molecules and some other new agents obtained from natural sources[J]. *Molecules*, 2020, 25(7):1537.
- [18] GHATTAVI K, HOMAIEI A, KAMRANI E, et al. Melanin pigment derived from marine organisms and its industrial applications[J]. *Dyes and Pigments*, 2022, 201:110214.
- [19] CAVALLINI C, VITIELLO G, ADINOLFI B, et al. Melanin and melanin-like hybrid materials in regenerative medicine[J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(8):1518.
- [20] KIM D J, JU K Y, LEE J K. The synthetic melanin nanoparticles having an excellent binding capacity of heavy metal ions [J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2012, 33(11):3788-3792.
- [21] PEZZELLA A, D'ISCHIA M, NAPOLITANO A, et al. An integrated approach to the structure of *Sepia* melanin. Evidence for a high proportion of degraded 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid units in the pigment backbone[J]. *Tetrahedron*, 1997, 53(24):8281-8286.
- [22] XUE C H, LI H G, GUO X J, et al. Superhydrophobic anti-icing coatings with self-deicing property using melanin nanoparticles from cuttlefish juice[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 424:130553.
- [23] ESSID I, AROUSSIA H, SOUFI E, et al. Improving quality of smoked sardine fillets by soaking in cuttlefish ink[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 42:e65020.
- [24] SONG C H, WU X Y, WANG Y, et al. Cuttlefish-inspired photo-responsive antibacterial microparticles with natural melanin nanoparticles spray[J]. *Small*, 2024, 20(19):2310444.
- [25] MORITA T, MATSUURA T, IZAWA H, et al. Melanin upcycling: creation of polymeric materials from melanin

- decomposition products[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(18):7115-7125.
- [26] GAETA M, BARCELONA M, PURRELLO R, et al. Hybrid Porphyrin/DOPA-melanin film as self-assembled material and smart device for dye-pollutant removal in water[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 433:133262.
- [27] SAJJAN S S. Properties and functions of melanin pigment from *klebsiella* sp. GSK[J]. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 41(1):60-69.
- [28] GUO X, CHEN S G, HU Y Q, et al. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(12):3680-3690.
- [29] WATT A A R, BOTHMA J P, MEREDITH P. The supramolecular structure of melanin[J]. Soft Matter, 2009, 5(19):3754-3760.
- [30] MBONYIRYIVUZE A, NURU Z Y, DIOPNGOM B, et al. Morphological and chemical composition characterization of commercial sepia melanin[J]. American Journal of Nanomaterials, 2015, 3(1):22-27.
- [31] JAKUBIAK P, LACK F, THUN J, et al. Influence of melanin characteristics on drug binding properties[J]. Molecular Pharmaceutics, 2019, 16(6):2549-2556.
- [32] CHEN J L, ZHANG Y Y, WU F G, et al. Cellulose nanofiber/melanin hybrid aerogel supported phase change materials with improved photothermal conversion efficiency and superior energy storage density[J]. Cellulose, 2021, 28(15):9739-9750.
- [33] ADHYARU B B, AKHMEDOV N G, KATRITZKY A R, et al. Solid-state cross-polarization magic angle spinning 13C and 15N NMR characterization of Sepia melanin, Sepia melanin free acid and human hair melanin in comparison with several model compounds[J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2003, 41(6):466-474.
- [34] BINSI P K, MUHAMED ASHRAF P, PARVATHY U, et al. Photo-protective effect of cuttlefish ink melanin on human hair[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2022, 139(7):51631.
- [35] CENTENO S A, SHAMIR J. Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art[J]. Journal of Molecular Structure, 2008, 873(1/2/3):149-159.
- [36] PAKDEL E, XIE W J, WANG J F, et al. Superhydrophobic natural melanin-coated cotton with excellent UV protection and personal thermal management functionality[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 433:133688.
- [37] JALMI P, BODKE P, WAHIDULLAH S, et al. The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(2):505-512.
- [38] WANG Y, WANG X F, LI T, et al. Effects of melanin on optical behavior of polymer: from natural pigment to materials applications[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(15):13100-13106.

附录:

表 S1 不同 pH 值的墨鱼黑色素的元素占比
Table S1 Element proportion of cuttlefish melanin with different pH values 单位: %

pH	元素占比								
	C	N	O	Na	Mg	P	S	K	Ca
7	49.80	13.75	32.03	0.43	1.82	0.03	0.39	0.23	1.51
13	50.40	11.77	32.62	0.48	1.70	0.25	0.47	0.41	1.91

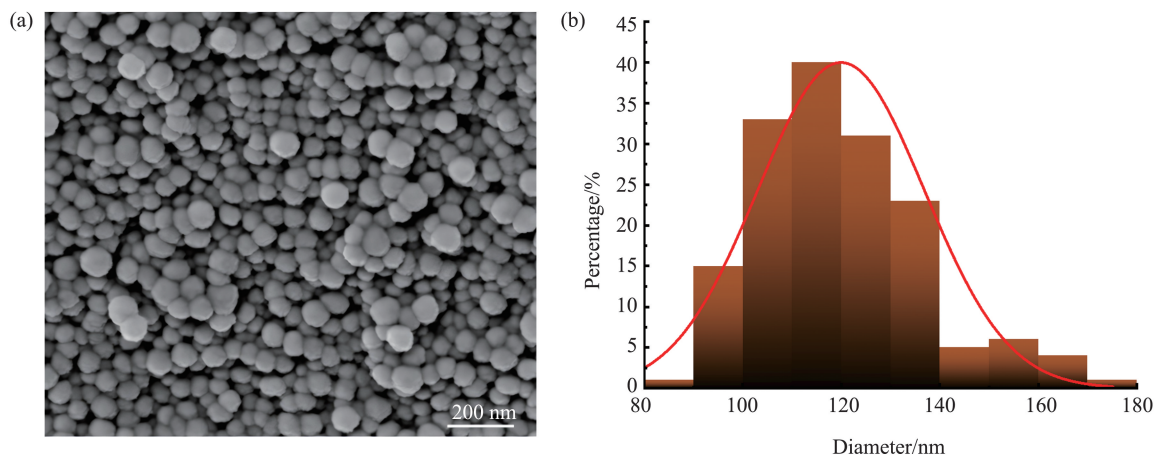


图 S1 pH 值为 7 时黑色素的 SEM 图像(a)及粒度分布(b)

Fig.S1 SEM image (a) and particle size distribution (b) of melanin at pH 7

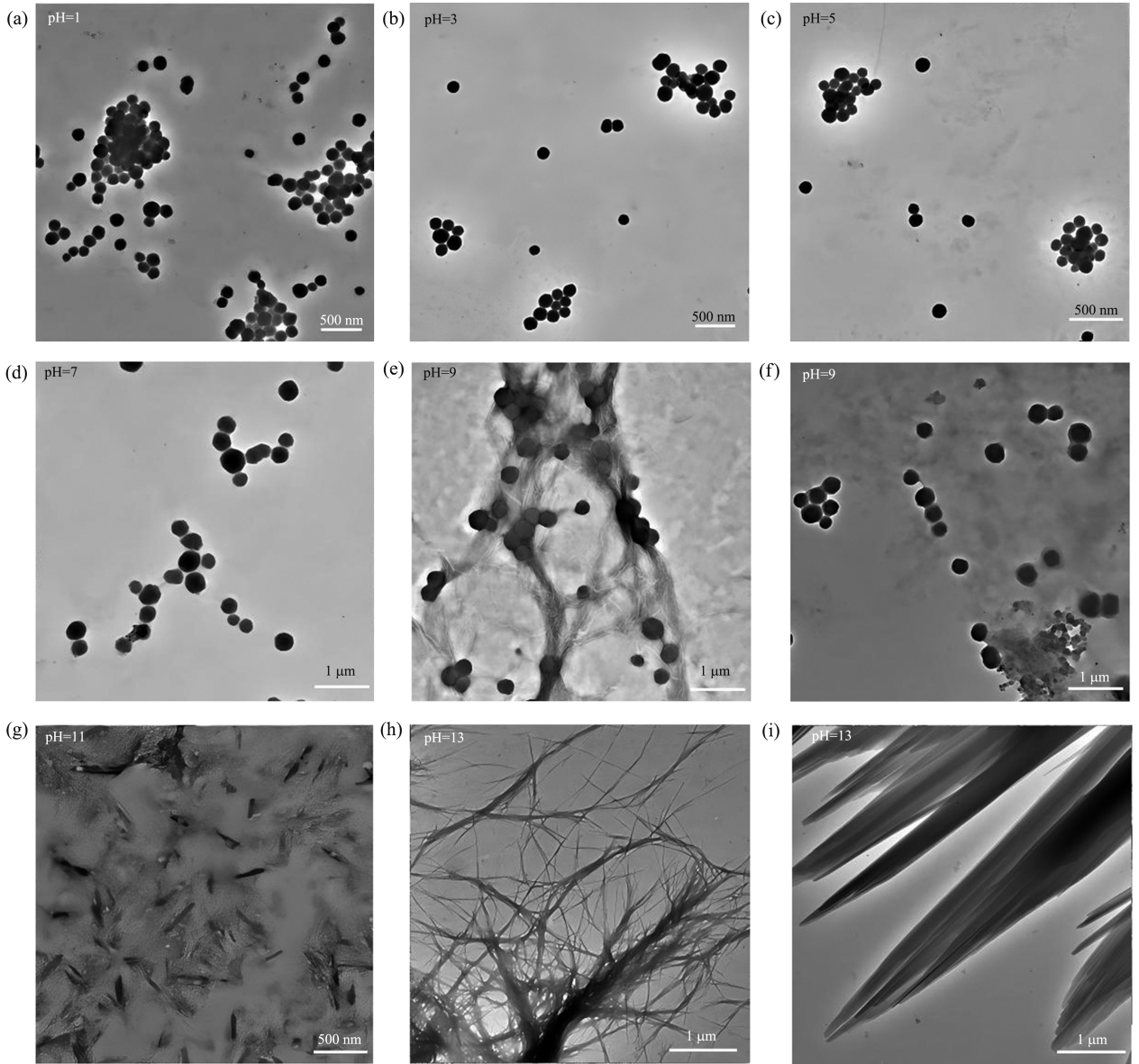


图 S2 不同 pH 值下墨鱼黑色素的透射电镜图像
Fig.S2 TEM images of cuttlefish melanin under different pH

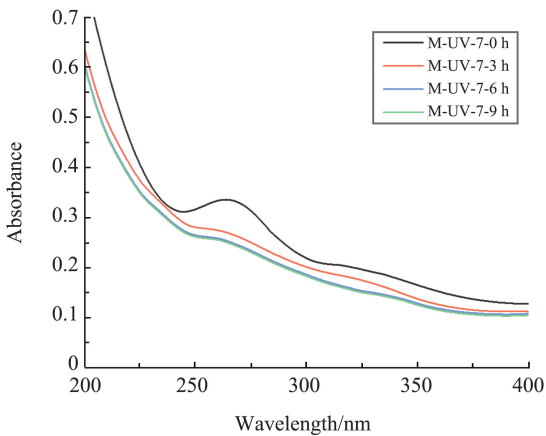


图 S3 在 pH 7 时,黑色素溶液在紫外照射处理后的紫外-可见光谱
Fig.S3 UV-vis spectrum of melanin solution at pH 7 after UV radiation

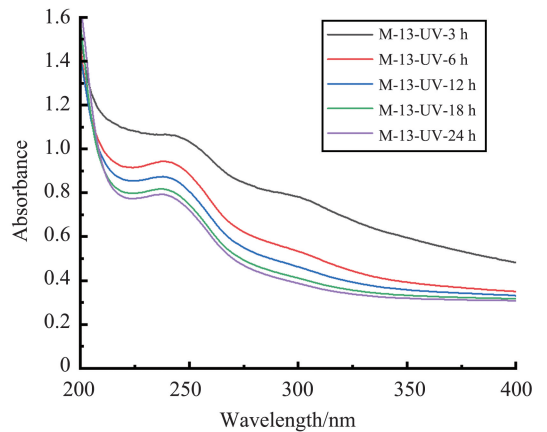


图 S4 在 pH 13 时,紫外照射下黑色素的紫外-可见光谱
Fig.S4 UV-vis spectrum of melanin at pH 13 after UV radiation

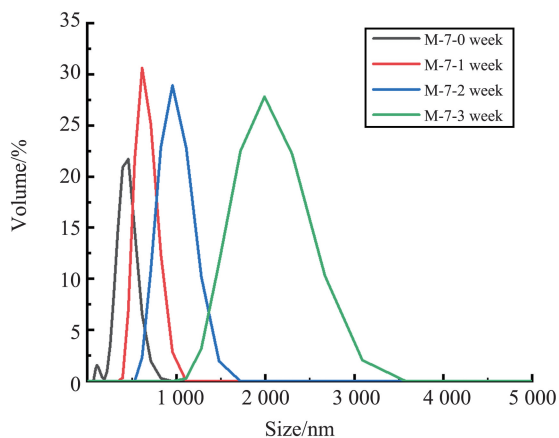


图 S5 pH 值为 7 时, 黑色素的 DLS 光谱
Fig.S5 DLS spectrum of melanin at pH 7

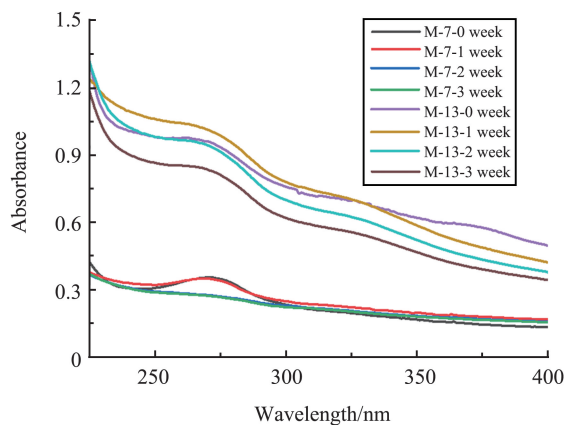


图 S6 pH 值为 7 和 13 时, 黑色素的紫外-可见光谱 (常温下放置样品, 每周取样观察)

Fig.S6 UV-vis spectrum of melanin at pH 7 and 13 (Samples were placed at room temperature and observed weekly)

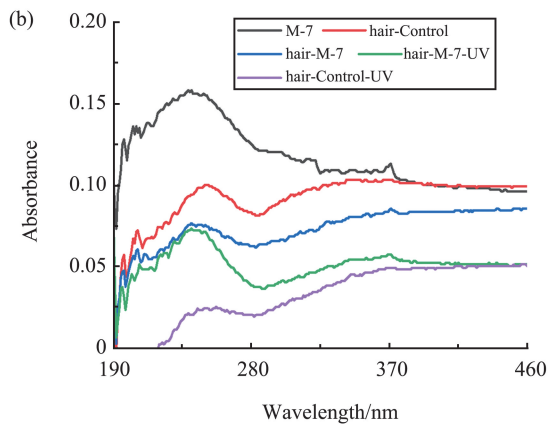
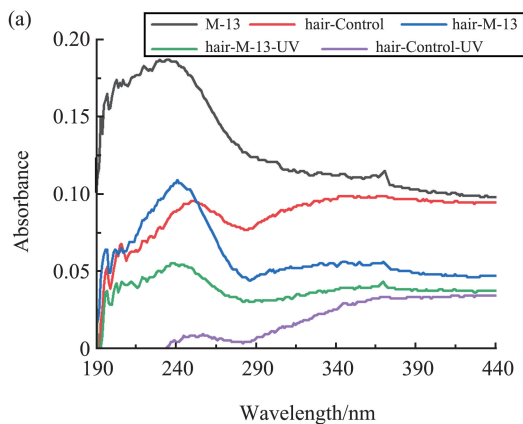


图 S7 毛发纤维紫外-可见光谱: (a) pH=7; (b) pH=13
Fig.S7 UV-vis spectrum of hair fibers: (a) pH=7; (b) pH=13

(编辑: 胡春燕)