



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116023423 A

(43) 申请公布日 2023.04.28

(21) 申请号 202310315449.6

A61K 47/10 (2017.01)

(22) 申请日 2023.03.29

A61K 36/258 (2006.01)

(71) 申请人 中国农业科学院特产研究所

A61P 17/00 (2006.01)

地址 130000 吉林省长春市净月经济开发区聚业大街4899号

A61P 31/04 (2006.01)

(72) 发明人 李美佳 陈建波

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

专利代理师 邓宇

(51) Int. Cl.

C07J 17/00 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

C08B 37/16 (2006.01)

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 9/12 (2006.01)

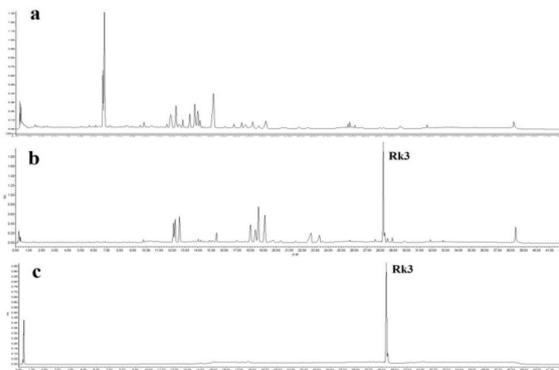
权利要求书1页 说明书9页 附图7页

(54) 发明名称

人参皂苷Rk3及制备和在制备毛囊炎药物中的应用

(57) 摘要

人参皂苷Rk3及制备和在制备毛囊炎药物中的应用,属于天然化合物制备技术领域。为解决现有技术制备人参皂苷Rk3存在的技术问题,研究人参皂苷Rk3功能,本发明公开一种制备高纯度人参皂苷Rk3的方法,该方法利用新型氨基酸水解技术,通过高温降解人参茎叶总皂苷后,人参皂苷Rk3在特定pH值条件下与环糊精包合,沉淀析出的特性,得到高纯度的人参皂苷Rk3。本发明提供的方法与现有技术相比,减少了利用大孔树脂、硅胶分离纯化的过程,降低生产成本,不污染环境,适合工业化生产;采用廉价易得的人参属茎叶或者果实总皂苷为原料,促进了人参属植物的开发利用。本发明发现人参皂苷Rk3对于毛囊炎具有显著治疗效果。



1. 一种人参皂苷Rk3的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 取人参总皂苷,按照1 g:10 mL的料液比添加pH为1~5的天冬氨酸水溶液,搅拌均匀后,于80-100℃水浴3~5 h,静置冷却后,离心收集上清液;

(2) 向步骤(1)获得的上清液中添加环糊精,边加边搅拌,静置12 h后离心收集沉淀,获得人参皂苷Rk3环糊精包合物;所述环糊精的添加量为人参总皂苷质量的0.8-1.4倍;

(3) 利用无水乙醇对步骤(2)获得的人参皂苷Rk3环糊精包合物进行洗脱,得到乙醇洗脱液并进行浓缩,干燥后得到人参皂苷Rk3粗品,于60℃溶解于无水乙醇中,并加入5%的乙酸乙酯,搅拌均匀,冷却、重结晶后即可得到人参皂苷Rk3。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述人参总皂苷包括人参茎叶总皂苷、人参果总皂苷、西洋参茎叶总皂苷、西洋参果总皂苷。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述天冬氨酸水溶液的pH为3。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述水浴温度为100℃,所述水浴时间为4 h。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述环糊精的添加量为人参总皂苷质量的1.2倍;所述环糊精为 α 环糊精或 β 环糊精或 γ 环糊精。

6. 一种人参皂苷Rk3,其特征在于,所述人参皂苷Rk3由权利要求1-5任意一项所述制备方法获得。

7. 一种人参皂苷Rk3的应用方法,其特征在于,由权利要求1-5任意一项所述制备方法获得的人参皂苷Rk3用于制备治疗毛囊炎的药物。

8. 根据权利要求7所述的应用方法,其特征在于,所述药物以人参皂苷Rk3为活性成分,配合用于药物的辅料制成。

9. 一种用于治疗毛囊炎的喷剂的制备方法,其特征在于,所述喷剂是将人参皂苷Rk3溶解于Tween 80,丙二醇和水的混合溶液中,所述混合溶液中Tween 80,丙二醇和水的质量比为1:1:18,所述人参皂苷Rk3在混合溶液中的浓度为10 mg/mL。

10. 一种用于治疗毛囊炎的喷剂,其特征在于,所述喷剂由权利要求9所述的制备方法获得。

人参皂苷Rk3及制备和在制备毛囊炎药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于天然化合物制备技术领域,具体涉及人参皂苷Rk3及制备和在制备毛囊炎药物中的应用。

背景技术

[0002] 人参(*Panax ginseng* C.A.Meyer)为五加科多年生草本植物人参的根,自古有“百草之王”之称。现代药理研究表明,人参的主要活性物质是人参皂苷,具有调节中枢神经系统及心脑血管,改善消化系统促进代谢,提高免疫力,抗衰老以及益智等功效。

[0003] 药理研究表明,稀有人参皂苷Rk3具有多种的药理活性,如抗癌、抗炎提高免疫力等。然而原人参中稀有人参皂苷Rk3含量极低,且因其结构比较复杂,利用现有的科学技术无法实现化学上的全合成。通过水解普通人参皂苷可产生稀有人参皂苷Rk3。人参皂苷Rk3是由常见人参三醇型皂苷Rg1首先脱去第21位C的葡萄糖,转化成Rh1,再由Rh1脱去20位C的一分子水转化而来。目前,稀有人参皂苷Rk3的制备方法通常为,首先通过水解如酸、碱、酶及微生物等将普通皂苷转化成为人参皂苷Rk3,然后通过常规分离纯化方法,如大孔树脂,硅胶及制备型液相色谱等获得高纯度人参皂苷Rk3。但是,普通水解法反应复杂、副反应多、反应条件难以控制,存在产率过低的问题;而常规分离纯化法,提取效率低,无法得到大量人参皂苷Rk3。例如CN201811301790.1公开了一种利用冬虫夏草种子液转化制备人参皂苷Rk3的方法:首先制备冬虫夏草种子液,然后接种至灭菌后的原人参药材上培养至长满菌丝,将长满菌丝的原人参药材取出,干燥,获得含有人参稀有皂苷Rk3的初级产物;将初级产物用乙醇加热回流提取,回收溶剂并挥干至无醇味后用水混悬,乙酸乙酯萃取,回收溶剂,得乙酸乙酯层浸膏;利用硅胶色谱柱用梯度浓度的二氯甲烷-甲醇进行梯度洗脱,得到富含人参皂苷Rk3的部分;再通过开放式ODS柱用梯度浓度甲醇进行梯度洗脱,得到富含人参皂苷Rk3的部分,将此部分通过半制备液相,制备得到高纯度人参皂苷Rk3单体化合物。CN201310107895.4公开一种利用蒸制三七根茎制备人参皂苷Rk3的方法:蒸制三七根茎用乙醇提取,浸膏与硅藻土拌样制成颗粒,烘干,用乙酸乙酯提取,得浓缩物,浓缩物硅胶柱层析,用二氯甲烷和甲醇的混合溶剂洗脱,得人参皂苷Rk3和Rh4粗品;粗品经制备液相色谱制备得到人参皂苷Rk3与Rh4的混合品,再用高速逆流分离人参皂苷Rk3与Rh4混合品得精制人参皂苷Rk3和精制人参皂苷Rh4。

[0004] 由上述比较可知,目前对人参皂苷Rk3分离通常存在以下问题:(1)以酸碱或者微生物转化与硅胶、大孔树脂等纯化方式相结合,该方式工艺复杂,分离时间长,需要脱盐处理,并容易造成资源浪费,且环境不友好;(2)人参皂苷转化后杂质众多,对其单体Rk3分离多采用柱色谱分离,不但分离成本高,且环境不友好;不适合工业化大规模生产。因此,亟需探索出成本低廉,环境友好,适合于大规模工业生产的高纯度人参皂苷Rk3的生产方法。据报道,利用氨基酸通过蒸制降解人参总皂苷,可获得稀有人参皂苷。氨基酸是动植物所必须的主要营养成分,是生物有机体构建细胞和修复组织的基本材料,在自然界中广泛存在,具有一定的生物活性,可被吸收降解,无毒副作用。因此,选择合适的氨基酸作为催化剂对于

人参皂苷绿色、安全、高效的转化稀有人参皂苷具有重要意义。

[0005] 毛囊炎是一种由马拉色菌 (*Malassezia*) 或者金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 侵犯毛囊及皮脂腺所引起的急性化脓性炎症, 初起为粟粒大毛囊性炎性丘疹, 逐渐形成脓疱, 脓疱成批出现, 互不融合, 脓疱破裂后, 可排出少量脓血, 愈后不留瘢痕, 但倾向复发, 常绵延数周乃至数月之久, 自觉瘙痒或灼痛, 主要侵犯头部、颈部, 亦见四肢、腋部、阴部等处。临床上多采用内服抗生素, 外涂新霉素软膏、莫匹罗星软膏或碘酊等。但目前无特效药, 加之抗生素的广泛使用, 使得身体产生耐药性, 反反复复发作, 久久不能痊愈, 给病人带来极大的痛苦和不便。中药抑菌作用因其高效性和低毒副作用等特点已成为目前抑菌研究的热点。人参皂苷在抑菌和抑制细菌生物膜方面显示出较强的活性。天然药安全, 可靠, 廉价易得, 从天然中草药中寻找预防和治疗毛囊炎具有广阔的前景。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术中制备人参皂苷Rk3存在的技术问题, 并进一步研究人参皂苷Rk3的功能, 本发明提供了一种人参皂苷Rk3环糊精包合物的制备方法, 所述制备方法包括以下步骤:

(1) 取人参总皂苷, 按照1 g:10 mL的料液比添加pH为1~5的天冬氨酸水溶液, 搅拌均匀后, 于80-100℃水浴3~5 h, 静置冷却后, 离心收集上清液;

(2) 向步骤(1)获得的上清液中添加环糊精, 边加边搅拌, 静置12 h后离心收集沉淀, 获得人参皂苷Rk3环糊精包合物; 所述环糊精的添加量为人参总皂苷质量的0.8-1.4倍;

(3) 利用无水乙醇对步骤(2)获得的人参皂苷Rk3环糊精包合物进行洗脱, 得到乙醇洗脱液并进行浓缩, 干燥后得到人参皂苷Rk3粗品, 于60℃溶解于无水乙醇中, 并加入5%的乙酸乙酯, 搅拌均匀, 冷却、重结晶后即可得到人参皂苷Rk3。

[0007] 进一步地限定, 步骤(1)所述人参总皂苷包括人参茎叶总皂苷、人参果总皂苷、西洋参茎叶总皂苷、西洋参果总皂苷。

[0008] 进一步地限定, 步骤(1)所述天冬氨酸水溶液的pH为3。

[0009] 进一步地限定, 步骤(1)所述水浴温度为100℃。

[0010] 进一步地限定, 步骤(1)所述水浴时间为4 h。

[0011] 进一步地限定, 步骤(2)所述环糊精的添加量为人参总皂苷质量的1.2倍。

[0012] 进一步地限定, 步骤(2)所述环糊精包括 α 环糊精, β 环糊精, γ 环糊精。

[0013] 本发明还提供了上述制备方法获得的人参皂苷Rk3。

[0014] 本发明还提供了上述制备方法获得的人参皂苷Rk3在用于制备治疗毛囊炎的药物中的应用。

[0015] 进一步地限定, 所述药物以人参皂苷Rk3为活性成分, 配合用于药物的辅料制成。

[0016] 进一步地限定, 所述药物可通过口服或胃肠外给药发挥作用; 所述药物的剂型包括片剂、胶囊剂、粉剂、丸剂、颗粒剂、注射剂和贴剂。

[0017] 本发明还提供了一种用于治疗毛囊炎的喷剂的制备方法, 所述喷剂是将人参皂苷Rk3溶解于Tween 80, 丙二醇和水的混合溶液中, 所述混合溶液中Tween 80, 丙二醇和水的质量比为1:1:18, 所述人参皂苷Rk3在混合溶液中的浓度为10 mg/mL。

[0018] 本发明还提供了由上述制备方法制备获得的治疗毛囊炎的喷剂。

[0019] 本发明的有益效果:

本发明以人参总皂苷为原料,采用新型氨基酸水解技术,通过高温降解人参总皂苷后,人参皂苷Rk3在特定PH值条件下与环糊精包合,并沉淀析出的特性,得到高纯度的人参皂苷Rk3。本发明所述的人参皂苷Rk3的制备方法减少了利用大孔树脂、硅胶分离纯化的过程,降低生产成本,有很强的实用价值,适合工业化生产;该方法简单高效,不污染环境,反应底物均可以工业化获得,可从市场上购买到,完全可以用于人参皂苷Rk3的制备,采用廉价易得的人参属茎叶及果实总皂苷为原料,促进人参属植物的开发利用。此外,本发明发现人参皂苷Rk3对于毛囊炎具有显著治疗效果,且具有毒副作用小的优点。

附图说明

[0020] 图1为5种不同的氨基酸对人参皂苷Rk3含量的影响结果图;

图2为氨基酸溶液的pH值对人参皂苷Rk3纯度的影响结果图;

图3为水浴温度对人参皂苷Rk3纯度的影响结果图;

图4为水浴时间对人参皂苷Rk3纯度的影响结果图;

图5为β环糊精与人参茎叶总皂苷的质量比对人参皂苷Rk3得率的影响结果图;

图6为实施例1中人参茎叶总皂苷水解前后及分离纯化后人参皂苷Rk3的HPLC色谱图;其中,图6中的a为人参茎叶总皂苷水解前的HPLC色谱图,图6中的b为人参茎叶总皂苷水解后的HPLC色谱图,图6中的c为分离纯化后人参皂苷Rk3的HPLC色谱图;

图7为人参皂苷Rk3对金黄葡萄球菌和马拉色菌的抑制作用实验结果图;其中,图7中的A为人参皂苷Rk3对金黄葡萄球菌的抑制作用图,a为空白,b为阳性对照,c为人参皂苷Rk3;图7中的B为人参皂苷Rk3对马拉色菌的抑制作用图,a为空白,b为阳性对照,c为人参皂苷Rk3;

图8为人参皂苷Rk3对马拉色菌介导的THP-1细胞炎症因子IL-1β蛋白表达水平的影响结果图;

图9为人参皂苷Rk3对马拉色菌介导的THP-1细胞炎症因子IL-8蛋白表达水平的影响结果图;

图10为不同组中ERK蛋白表达水平对比结果图和WB图;其中,图10中的β-actin为内参蛋白;

图11为不同组中JNK蛋白表达水平对比结果图和WB图;其中,图11中的β-actin为内参蛋白;

图12为不同组中p38蛋白表达水平对比结果图和WB图;其中,图12中的β-actin为内参蛋白;

图13为不同组中核外p-P65和P65蛋白表达水平对比结果图和WB图;其中,图13中的β-actin为内参蛋白;

图14为不同组中核内p-P65和P65蛋白表达水平对比结果图和WB图;其中,图14中的LaminB为内参蛋白。

具体实施方式

[0021] 以下通过具体实施例及附图对本发明做进一步的说明,但不用以限制本发明,凡

在本发明精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0022] 本发明所用的制备人参皂苷Rk3的方法包括如下步骤:

(1)称取人参总皂苷,按照1 g:10 mL的料液比添加天冬氨酸水溶液,搅拌均匀后,进行水浴,静置冷却后,离心收集上清液;

(2)向步骤(1)获得的上清液中添加环糊精,边加边搅拌,静置12 h后离心收集沉淀,获得人参皂苷Rk3环糊精包合物;

(3)利用无水乙醇对步骤(2)获得的人参皂苷Rk3环糊精包合物进行洗脱,得到乙醇洗脱液并进行浓缩,干燥后得到人参皂苷Rk3粗品,于60℃溶解于无水乙醇中,并加入5%的乙酸乙酯,搅拌均匀,冷却、重结晶后即可得到人参皂苷Rk3。

[0023] 为获得纯度更高的人参皂苷Rk3,本发明对上述方法中的相应参数进行优化,优化过程中人参总皂苷均选用人参茎叶总皂苷(总含量约为80%),环糊精选用β环糊精,具体优化过程如下:

1、对步骤(1)中氨基酸的种类进行优化:

选择五种氨基酸,包括两种酸性氨基酸天冬氨酸和谷氨酸,三种碱性氨基酸精氨酸、组氨酸和赖氨酸。为控制变量将氨基酸水溶液的pH值设定为3,反应水浴温度设定为100℃,水浴时间设定为1 h,将β环糊精的添加量设定为与人参茎叶总皂苷的质量相同,利用HPLC法检测粗品中人参皂苷Rk3的含量。

[0024] 结果如图1所示,5种氨基酸对稀有人参皂苷Rk3转化率差异显著($P<0.05$),精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸和天冬氨酸对稀有人参皂苷Rk3转化效果依次增强;其中,酸性氨基酸对稀有人参皂苷Rk3的转化显著高于碱性氨基酸($P<0.05$)。天冬氨酸对稀有人参皂苷Rk3的转化率最佳。因此最终选定天冬氨酸作为最佳催化剂。

[0025] 2、对步骤(1)中天冬氨酸水溶液的pH值进行优化:

配置不同pH的天冬氨酸水溶液(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0),为控制变量将水浴温度设定为100℃,水浴时间设定为1 h,将β环糊精的添加量设定为与人参茎叶总皂苷的质量相同,利用HPLC法检测粗品中人参皂苷Rk3的含量。

[0026] 结果如图2所示,步骤(1)中天冬氨酸水溶液的pH对所得粗品人参皂苷Rk3的纯度具有显著的影响。当天冬氨酸水溶液的pH为1-6时,都能够得到人参皂苷Rk3,但是人参皂苷Rk3含量相差巨大;当天冬氨酸水溶液的pH为1-5时,粗品人参皂苷Rk3的纯度在40%以上;当天冬氨酸水溶液的pH为3时,人参皂苷Rk3的纯度最高,为93.2%。因此,选择步骤(1)中天冬氨酸水溶液的pH为1-5,优选地为3。

[0027] 3、对水浴温度进行优化:

分别将水浴温度限定为60℃、70℃、80℃、90℃、100℃、110℃、120℃,为控制变量将步骤(1)中的天冬氨酸水溶液的pH设定为3,将水浴时间设定为1 h,将β环糊精的添加量设定为与人参茎叶总皂苷的质量相同。利用HPLC法检测粗品中人参皂苷Rk3的纯度。

[0028] 结果如图3所示,水浴温度对所得粗品中人参皂苷Rk3的纯度具有显著的影响。当水浴温度从60℃上升至90℃时,人参皂苷Rk3的纯度逐渐提高,当水浴温度从90℃上升至100℃时,人参皂苷Rk3的纯度基本稳定,变化不明显,其中水浴温度为100℃时,人参皂苷Rk3的纯度最高,为95.8%。因此,选择水浴温度为80℃-100℃,优选地为100℃。

[0029] 4、对水浴时间进行优化：

分别将水浴时间设定为1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h，为控制变量将步骤(1)中的天冬氨酸水溶液的pH设定为3，将水浴温度设定为100℃，将β环糊精的添加量设定为与人参茎叶总皂苷的质量相同。利用HPLC法检测粗品中人参皂苷Rk3的纯度。

[0030] 结果如图4所示，水浴时间对所得粗品中人参皂苷Rk3的纯度具有显著的影响。当水浴时间从1 h延长至4 h时，人参皂苷Rk3的纯度逐渐提高，当水浴时间从4 h延伸至6 h时，人参皂苷Rk3的纯度基本稳定，变化不明显，其中水浴时间为4 h时，人参皂苷Rk3的纯度最高，为94.2%。因此，选择水浴时间为3 h-5 h，优选地为4 h。

[0031] 5、对环糊精的添加量进行优化：

分别将β环糊精的添加量设置成人参茎叶总皂苷质量的0.4、0.6、0.8、1.0、1.1、1.2、1.4倍，为控制变量将步骤(1)中的天冬氨酸水溶液的pH设定为3，将水浴温度设定为100℃，水浴时间设定为4 h。利用HPLC法检测粗品的人参皂苷Rk3的得率。

[0032] 结果如图5所示，β环糊精的添加量对所得粗品人参皂苷Rk3得率具有显著的影响。当β环糊精的添加量从人参茎叶总皂苷质量的0.4倍提高到1.2倍时，人参皂苷Rk3的得率逐渐增加，当β环糊精的添加量从人参茎叶总皂苷质量的1.2倍提高到1.4倍时，人参皂苷Rk3的得率提高缓慢，当β环糊精的添加量达到人参茎叶总皂苷质量的1.2倍时，人参皂苷Rk3的得率最大，为8.6%。因此，选择β环糊精的添加量为人参茎叶总皂苷质量的0.8-1.4倍，优选地为1.2倍。

[0033] 经过如上优化过程，本发明得到了能够获得较高纯度的人参皂苷Rk3的制备方法，具体如下：

(1)取人参总皂苷，按照1 g:10 mL的料液比添加pH为1-5的天冬氨酸水溶液，搅拌均匀后，于80-100℃水浴3-5 h，静置冷却后，离心收集上清液；

(2)向步骤(1)获得的上清液中添加环糊精，边加边搅拌，静置12 h后离心收集沉淀，获得人参皂苷Rk3环糊精包合物；所述环糊精的添加量为人参总皂苷质量的0.8-1.4倍；

(3)利用无水乙醇对步骤(2)获得的人参皂苷Rk3环糊精包合物进行洗脱，得到乙醇洗脱液并进行浓缩，干燥后得到人参皂苷Rk3粗品，于60℃溶解于无水乙醇中，并加入5%的乙酸乙酯，搅拌均匀，冷却、重结晶后即可得到人参皂苷Rk3。

[0034] 本发明针对优化后的制备方法提供了如下实施例：

下列各实施例都进行了三次平行实验

实施例1：

(1)取人参茎叶总皂苷，总含量约为80%(UV法)，按照1 g:10 mL的料液比添加pH为5的天冬氨酸水溶液，搅拌均匀后，于80℃水浴5 h，静置冷却后，离心收集上清液；

(2)向步骤(1)获得的上清液中添加α环糊精，边加边搅拌，静置12 h后离心收集沉淀，获得人参皂苷Rk3环糊精包合物；所述α环糊精的添加量为人参总皂苷质量的1.4倍；

(3)利用无水乙醇对步骤(2)获得的人参皂苷Rk3环糊精包合物进行洗脱，得到乙醇洗脱液并进行浓缩，干燥后得到人参皂苷Rk3粗品，于60℃溶解于无水乙醇中，并加入5%的乙酸乙酯，搅拌均匀，冷却、重结晶后即可得到人参皂苷Rk3。将上述重结晶后获得的三批次Rk3进入HPLC分析，纯度为92.3%~95.2%。本实施例中人参茎叶总皂苷水解后的HPLC色谱图及分离纯化后人参皂苷Rk3的HPLC色谱图见图6。

[0035] 实施例2:

(1)取人参果总皂苷,总含量约为80%(UV法),按照1 g:10 mL的料液比添加pH为1的天冬氨酸水溶液,搅拌均匀后,于90℃水浴4 h,静置冷却后,离心收集上清液;

(2)向步骤(1)获得的上清液中添加β环糊精,边加边搅拌,静置12 h后离心收集沉淀,获得人参皂苷Rk3环糊精包合物;所述β环糊精的添加量为人参总皂苷质量的1.0倍;

(3)利用乙醇对步骤(2)获得的人参皂苷Rk3环糊精包合物进行洗脱,得到乙醇洗脱液并进行浓缩,干燥后得到人参皂苷Rk3粗品,于60℃溶解于无水乙醇中,并加入5%的乙酸乙酯,搅拌均匀,冷却、重结晶后即可得到人参皂苷Rk3。将上述重结晶后获得的三批次Rk3进入HPLC分析,纯度为94.2%~96.1%。

[0036] 实施例3:

(1)取西洋参果总皂苷,总含量约为80%(UV法),按照1 g:10 mL的料液比添加pH为2的天冬氨酸水溶液,搅拌均匀后,于100℃水浴3 h,静置冷却后,离心收集上清液;

(2)向步骤(1)获得的上清液中添加γ环糊精,边加边搅拌,静置12 h后离心收集沉淀,获得人参皂苷Rk3环糊精包合物;所述γ环糊精的添加量为人参总皂苷质量的1.2倍;

(3)利用乙醇对步骤(2)获得的人参皂苷Rk3环糊精包合物进行洗脱,得到乙醇洗脱液并进行浓缩,干燥后得到人参皂苷Rk3粗品,于60℃溶解于无水乙醇中,并加入5%的乙酸乙酯,搅拌均匀,冷却、重结晶后即可得到人参皂苷Rk3。将上述重结晶后获得的三批次Rk3进入HPLC分析,纯度为94.5~97.1%。

[0037] 实施例4:

(1)取西洋参茎叶总皂苷,总含量约为80%(UV法),按照1 g:10 mL的料液比添加pH为3的天冬氨酸水溶液,搅拌均匀后,于100℃水浴3 h,静置冷却后,离心收集上清液;

(2)向步骤(1)获得的上清液中添加γ环糊精,边加边搅拌,静置12 h后离心收集沉淀,获得人参皂苷Rk3环糊精包合物;所述γ环糊精的添加量为人参总皂苷质量的0.8倍;

(3)利用无水乙醇对步骤(2)获得的人参皂苷Rk3环糊精包合物进行洗脱,得到乙醇洗脱液并进行浓缩,干燥后得到人参皂苷Rk3粗品,于60℃溶解于无水乙醇中,并加入5%的乙酸乙酯,搅拌均匀,冷却、重结晶后即可得到人参皂苷Rk3。将上述重结晶后获得的三批次人参皂苷Rk3进入HPLC分析,纯度94.1~98.1%。

[0038] 实施例5:人参皂苷Rk3在治疗毛囊炎中的应用**(一)人参皂苷Rk3的抑菌实验****材料:**

人参皂苷Rk3:由实施例4制备获得,纯度为(97.5%);

金黄葡萄球菌(ATCC6538)和马拉色菌(ATCC44344)均购于北京微生物菌种保藏中心。

[0039] 营养肉汤培养基购自北京奥博星生物技术有限责任公司。

[0040] 分别称取人参皂苷Rk3和庆大霉素各10 mg溶于10 mL水中,配制成浓度为1 mg/mL的样品溶液。将灭菌后的圆形滤纸片(直径6 mm)放入样品溶液中浸泡30 min,取出后放在称量纸上晾干,置于紫外灯下。金黄色葡萄球菌用移液枪吸取200 μL菌液,均匀涂布于培养基表面;用镊子将滤纸片呈四边形形状铺在培养基表面;将培养皿置于37℃生化恒温培养箱中培养24 h,采用十字交叉法测量抑菌圈直径,平行测量3次,取平均值。

[0041] 将马拉色菌株病原菌活化培养,用打孔器在真菌菌落边缘取直径为6 mm的菌饼,将病原菌菌饼置于90 mm的PDA培养基中心。将浸润在Rk3溶液中的无菌滤纸片($\phi=8$ mm)放在在距离病原菌菌饼15 mm处PDA固体培养基上,26℃,培养7 d,测量抑菌距离(病原菌菌落边缘与无菌滤纸片边缘的距离),确定各内生菌的抑菌活性。每组实验设置3个平行对照,以无菌水为空白对照,选用等浓度的庆大霉素作为阳性对照。

[0042] 抑菌率计算公式如下:抑菌率(%)=(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径 $\times 100\%$

抑菌实验结果见图7,由图7中的A可知,人参皂苷Rk3对金黄葡萄球菌具有较强的抑制作用,抑制率可达83.1%。由图7中的B可知,人参皂苷Rk3对马拉色菌具有较强的抑制作用,抑制率达60.8%。

[0043] (二)人参皂苷Rk3在用于制备毛囊炎药物中的应用

实验材料:

人参皂苷Rk3:由实施例4制备获得,纯度为(97.5%)。

[0044] 人单核细胞THP-1细胞:购买于中国科学院细胞所。

[0045] 马拉色菌(ATCC44344)购买于北京微生物菌种保藏中心。

[0046] 试剂:

甲醇;乙腈;胎牛血清,上海吉泰依科赛公司特级;MTT,上海威奥生物有限公司;RPMI1640培养基,江苏凯基生物技术股份有限公司;瘦肉牛肉粒,青岛日水生物技术有限公司;碎肉培养基,青岛日水生物技术有限公司;人IL-1 β 试剂盒,上海吉泰依科赛公司;人IL-8 ELISA试剂盒,上海吉泰依科赛生物有限公司;兔源p-NF- κ B抗体,Signalway;兔源LaminB抗体,Boster;兔源ERK抗体,Proteintech;兔源p-ERK抗体,Signalway;兔源JNK抗体,Proteintech;兔源p-JNK抗体,Signalway;兔源p38抗体,Proteintech;兔源p-P38抗体,Signalway;鼠源GAPDH抗体,Proteintech;FITC-羊抗兔IgG,上海威奥生物有限公司;SDS-PAGE凝胶配置试剂盒,上海威奥生物有限公司;5X蛋白上样缓冲液,上海威奥生物有限公司。

[0047] (1)毛囊炎炎症模型的建立

将THP-1细胞与马拉色菌共同培养,以刺激单核细胞产生特异性的炎症反应,进而建立毛囊炎相关炎症模型。以不同数量比的活菌或热灭活的马拉色菌刺激THP-1细胞,以建立毛囊炎相关炎症模型,具体操作步骤如下:

a. 取处于指数生长期的THP-1细胞,用无血清且不含抗生素的新培养基调整其浓度,用 5×10^5 /mL的密度接种在无菌96个孔细胞培养板中,每个孔添200 μ L;

b. 离心收获培养3 d的马拉色菌,用PBS缓冲液洗涤菌3次,并用PBS缓冲液制成菌悬液,将菌悬液分成两个部分,一部分直接以活菌形式添加到96孔板中,另一部分则在90℃的热水浴中灭活30 min,以热灭活的菌形式加入到孔板中,其中细菌与细胞的个数比为1:1,10:1,和100:1,每组平行,3个孔,用只加入等体积不含菌的PBS缓冲液为空白对照,37℃,5% CO₂培养箱中孵育24 h;

c. 刺激结束以后,离心收集孔板中的细胞上清液。

[0048] (2)ELISA法测细胞炎症因子IL-1 β 和IL-8

THP-1细胞在发生免疫反应时,会特异性地产生IL-1 β 和IL-8,所以通常会将其作

为炎症筛选的指标。用不同浓度的Rk3预孵THP-1细胞4 h,之后按照上述炎症模型的刺激条件来刺激细胞24 h,离心收集细胞培养上清液,立即采用ELISA法检测培养物上清里IL-1 β 和IL-8含量的变化。

[0049] 如图8和图9所示,马拉色菌诱导导致THP-1细胞产生炎症反应,使胞外炎症因子IL-1 β 和IL-8分泌量显著升高(** $p < 0.01$),即证明模型建立成功。当使用100 μ M的人参皂苷Rk3预处理细胞时,马拉色菌诱导的炎症因子分泌被抑制,IL-1 β 和IL-8的抑制率分别高达90.4%和94.5%;该结果也显示,人参皂苷Rk3是浓度依赖地抑制胞外炎症因子的分泌。

[0050] (3) Western blot法检测MAPK和NF- κ B信号通路及NF- κ B核质转移蛋白

当马拉色菌和THP-1细胞一起孵育时,会刺激下游的MAPK信号通路并产生免疫炎症反应。同时,下游的NF- κ B信号通路被激活,从而由核外转移至核内并参与后续炎症反应。因此,本实验检测了人参皂苷Rk3对马拉色菌诱导的THP-1细胞中MAPK信号通路及NF- κ B信号通路及NF- κ B核质转移的影响。具体方法如下:

A. 收集细胞。

[0051] B. 细胞总蛋白提取方法:

在每个样品中分别加入适量含有混合抑制剂(PMSF+磷酸盐抑制剂+蛋白酶抑制剂)的IP裂解液,混匀后于冰上裂解10 min在13000 rpm条件下离心10 min,小心吸出上清液,待用。

[0052] C. 细胞核蛋白和浆蛋白提取方法:

a. 根据样品中的细胞压积V,加入1.5 V的混合Buffer(Buffer A:Buffer B=1:9),混匀,冰上反应30 min;

b. 3000 rpm,4 $^{\circ}$ C离心10 min,上清即为细胞浆蛋白;

c. 在上述沉淀添加1.2倍细胞压积的Buffer C,混匀,在冰上反应45 min,每10 min剧烈震荡15 s;

d. 12000 rpm,4 $^{\circ}$ C离心30 min,上清即为细胞核蛋白。

[0053] (4) 蛋白印迹法

a. 在所提蛋白样品中加入上样缓冲液(蛋白溶液:上样缓冲液=4:1),于100 $^{\circ}$ C金属浴加热5 min,使SDS与蛋白结合;

b. 将蛋白上样量定为10 μ g,计算需要电泳的样品体积;

c. 通过浓度为10%的SDS-PAGE电泳分离蛋白样品,再将其电转到PVDF膜,使用5%的BSA溶液封闭4 h;

d. 在4 $^{\circ}$ C下与第一抗体工作液孵育过夜,洗涤3次后,在37 $^{\circ}$ C与第二抗体工作液孵育1 h;

e. 洗涤3次后使用ECL显色法进行显色,观察拍照。

[0054] 当马拉色菌和THP-1细胞一起孵育时,会刺激下游的MAPK信号通路并产生免疫炎症反应。因此,本实验检测了人参皂苷Rk3对马拉色菌诱导的THP-1细胞中MAPK信号通路的影响。由图10、图11和图12可知,马拉色菌可增加MAPK的ERK、JNK和p38蛋白磷酸化。当使用不同浓度Rk3(100 μ M,50 μ M和10 μ M)进行孵育后,发现这些蛋白的磷酸化水平都有所下降,且呈剂量依赖状态。当100 μ M的人参皂苷Rk3作用THP-1细胞后,细胞内ERK、JNK和p38蛋白磷酸化水平被抑制,抑制率分别为75.8%、57.5%和53.2%人参皂苷Rk3对ERK和JNK蛋白磷

酸化的抑制较强,可使JNK和p38磷酸化程度降低至未使用刺激组水平。这说明人参皂苷Rk3可通过抑制MAPK信号通路来抑制马拉色菌诱导的炎症反应。

[0055] 当马拉色菌诱导THP-1细胞时,下游的NF- κ B信号通路被激活,从而由核外转移至核内并参与后续炎症反应。如图13和图14所示,当使用高浓度的人参皂苷Rk3(100 μ M)作用于THP-1细胞时,胞内p-P65蛋白条带变浓,且核内p-P65蛋白条带变淡,这说明磷酸化的P65的入核情况由于人参皂苷Rk3的作用而被显著抑制,且该抑制作用是呈剂量依赖的,这说明人参皂苷Rk3都能通过抑制NF- κ B信号通路的核易位现象来抑制毛囊炎症的发生。

(5)数据分析:

采用SPSS 13.0软件,所列数据以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,结果均经t检验处理,组间比较采用单因素方差分析,双侧 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

[0056] (三)人体实验

人参皂苷Rk3:由实施例4制备获得,纯度为(97.5%);

(1)人参皂苷Rk3喷剂的制备

10 g人参皂苷Rk3,溶于1L(5% Tween 80,5%丙二醇,90%水),浓度为:10 mg/mL,灌装喷剂30 mL/瓶。

[0057] (2)给药

征集50名毛囊炎患者作为志愿者。在患处喷涂,每日2次,连续10天后,根据各个症状的治愈情况填写调查问卷,然后统计问卷结果。

[0058] (3)结果

根据每位患者治疗情况给出得分。70%的患者完全治愈,25%的患者症状基本消失,4%的患者有改善,1%的患者没有作用。没有出现任何副作用。可见由人参皂苷Rk3制备的喷剂对于毛囊炎具有明显的治疗效果,且无副作用。

[0059] 虽然本发明已以较佳的实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明精神和范围内,都可以做各种的改动与修饰,因此,本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

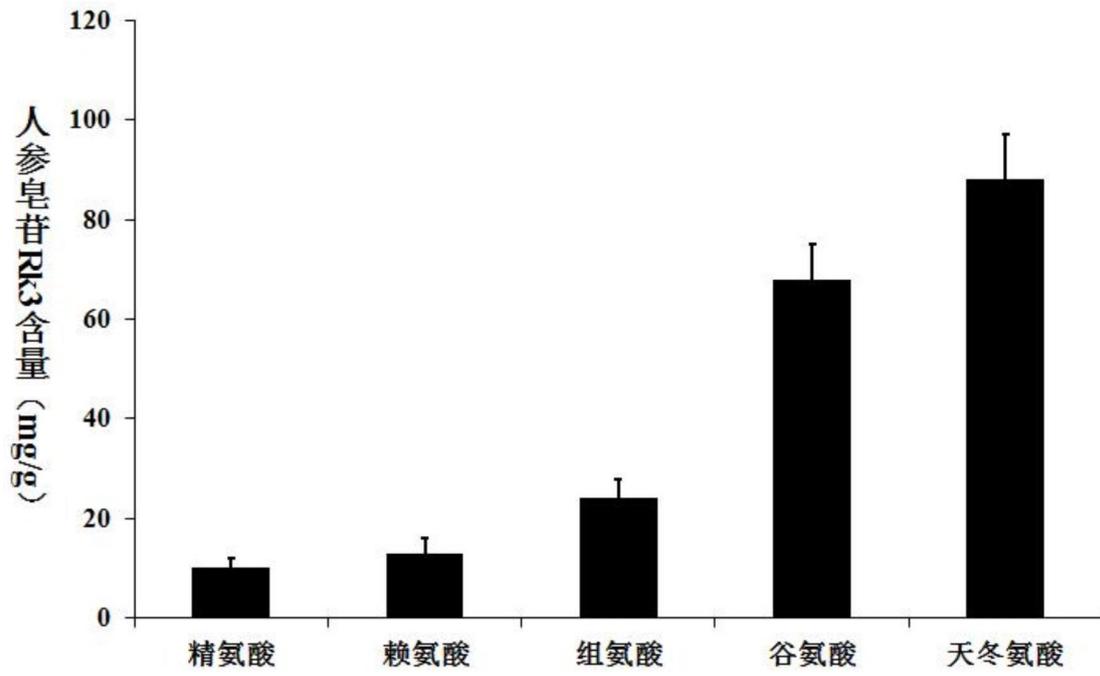


图1

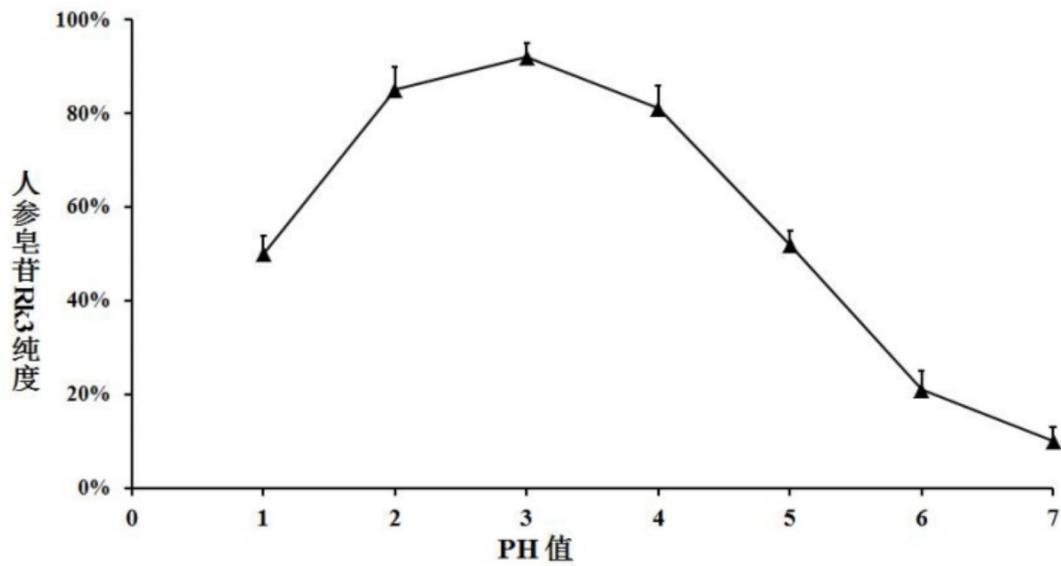


图2

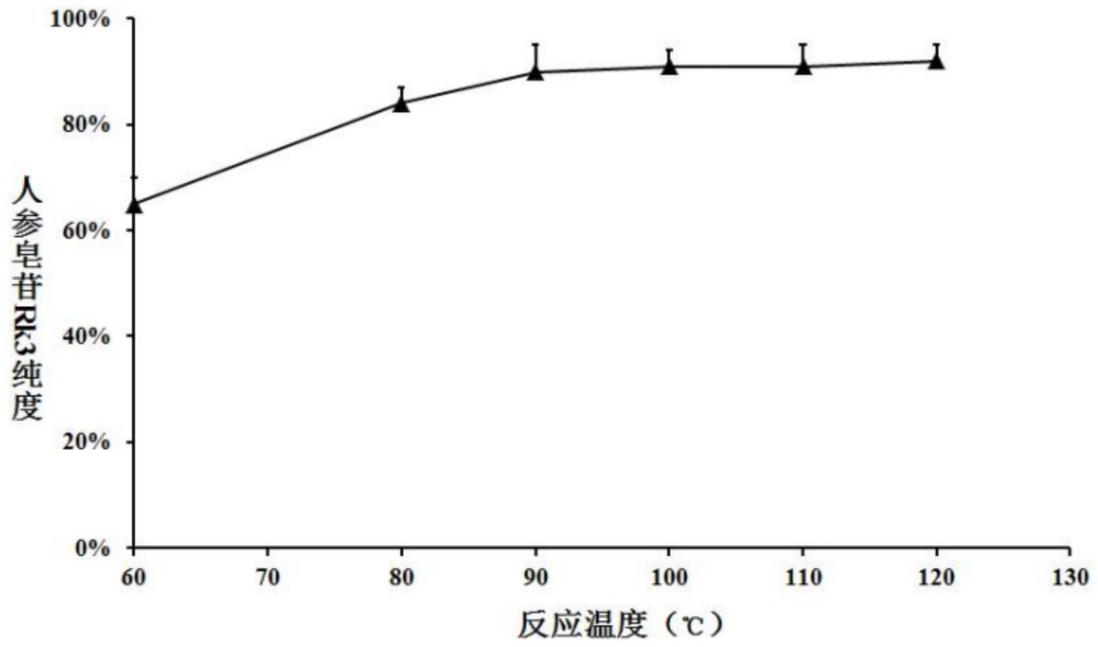


图3

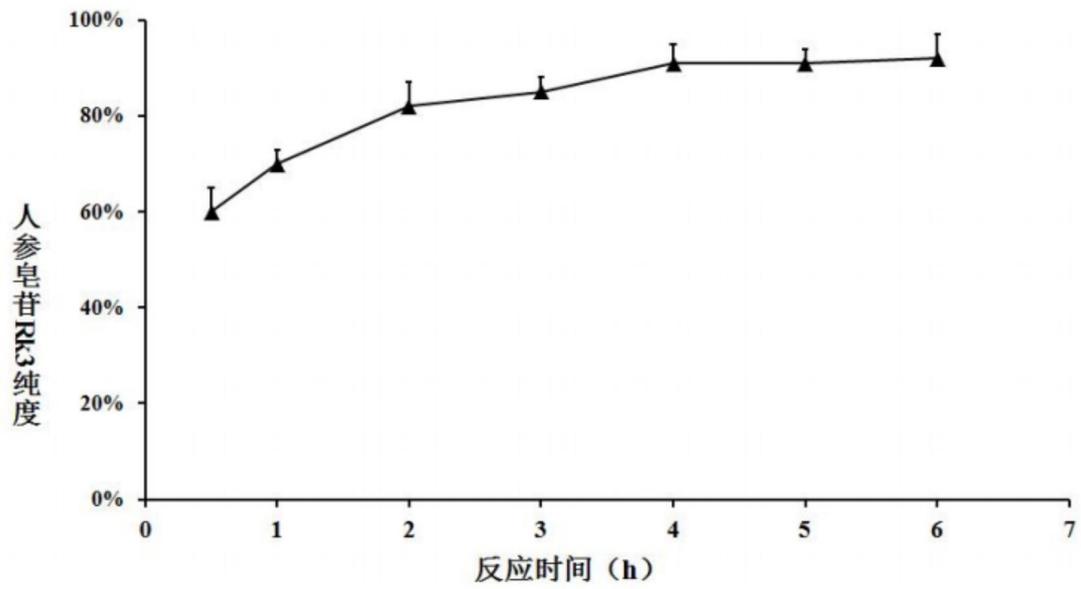


图4

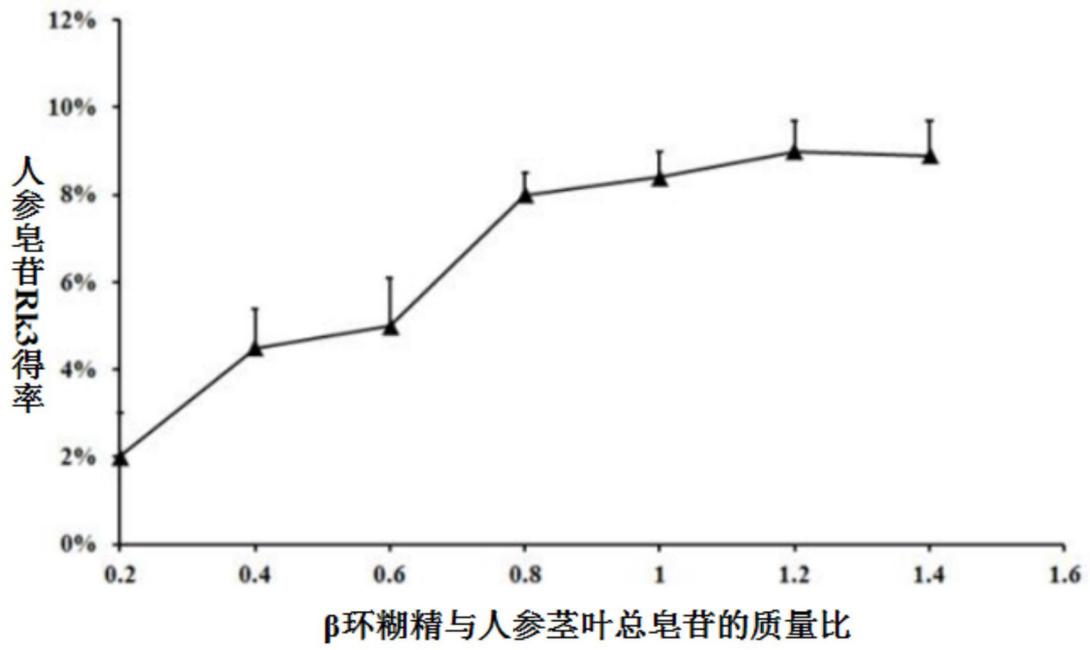


图5

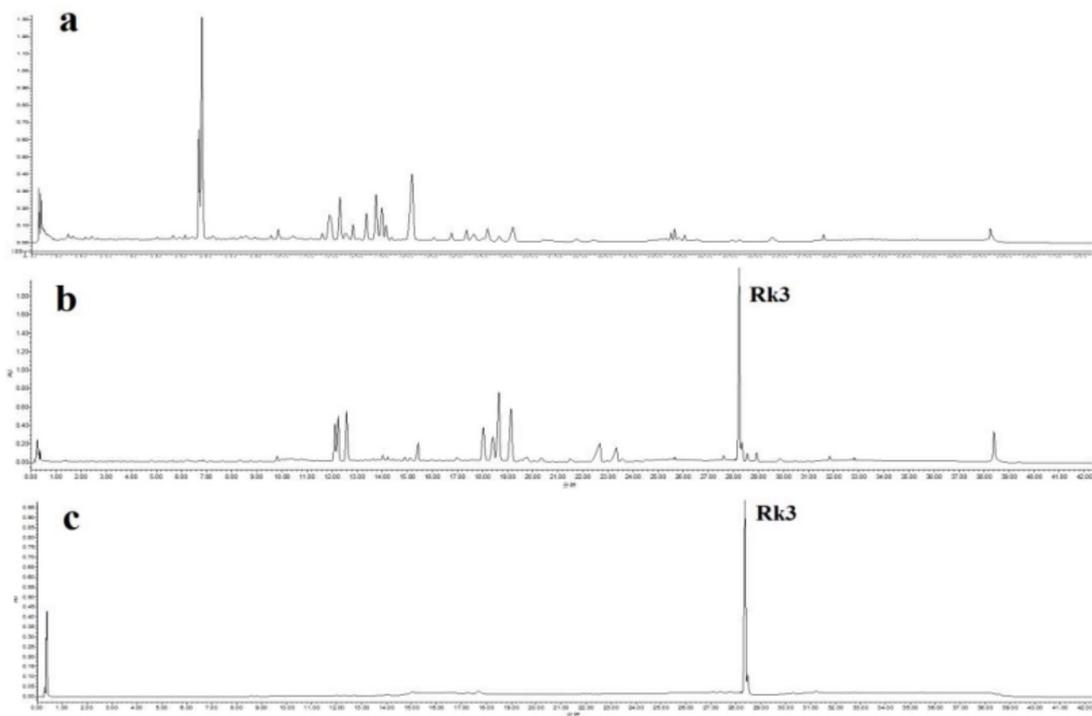


图6

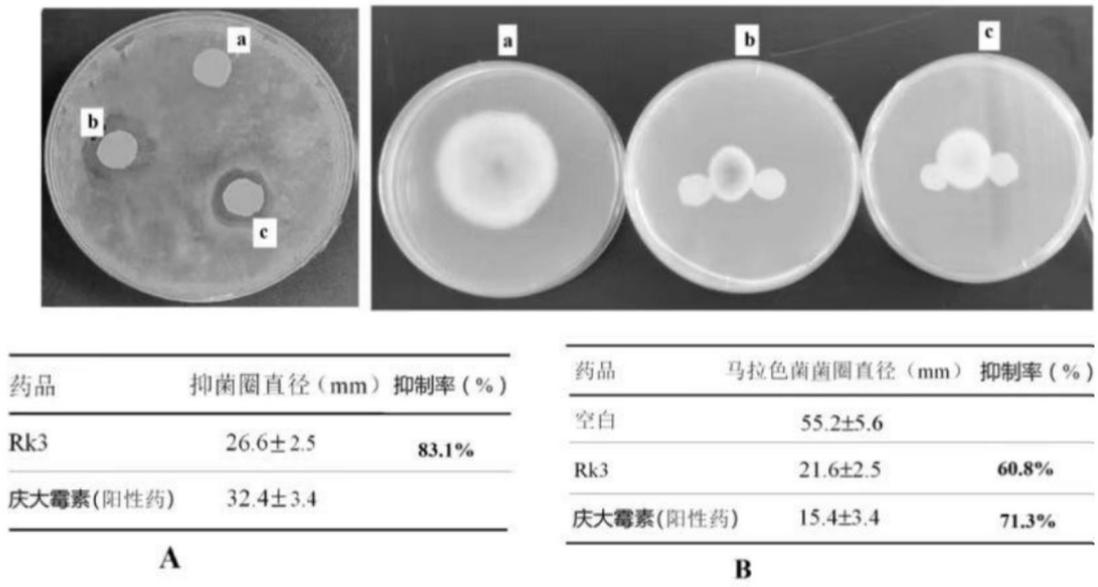


图7

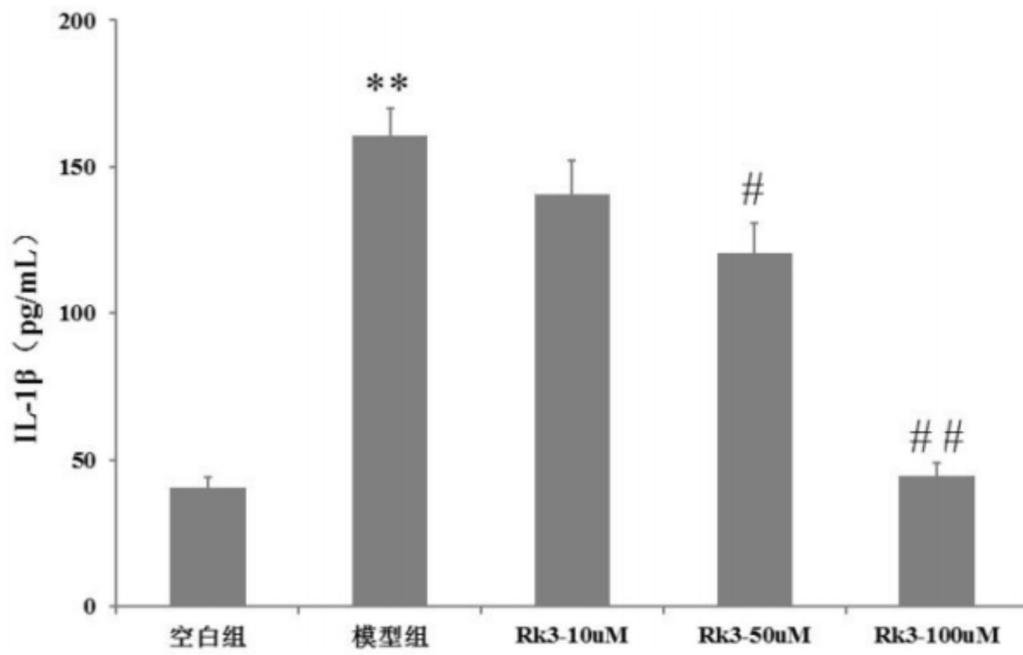


图8

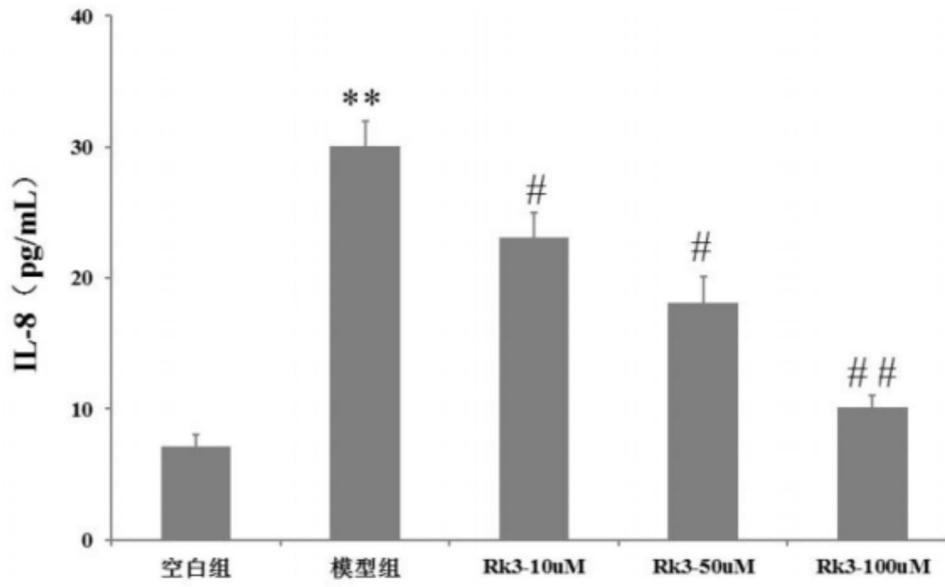


图9

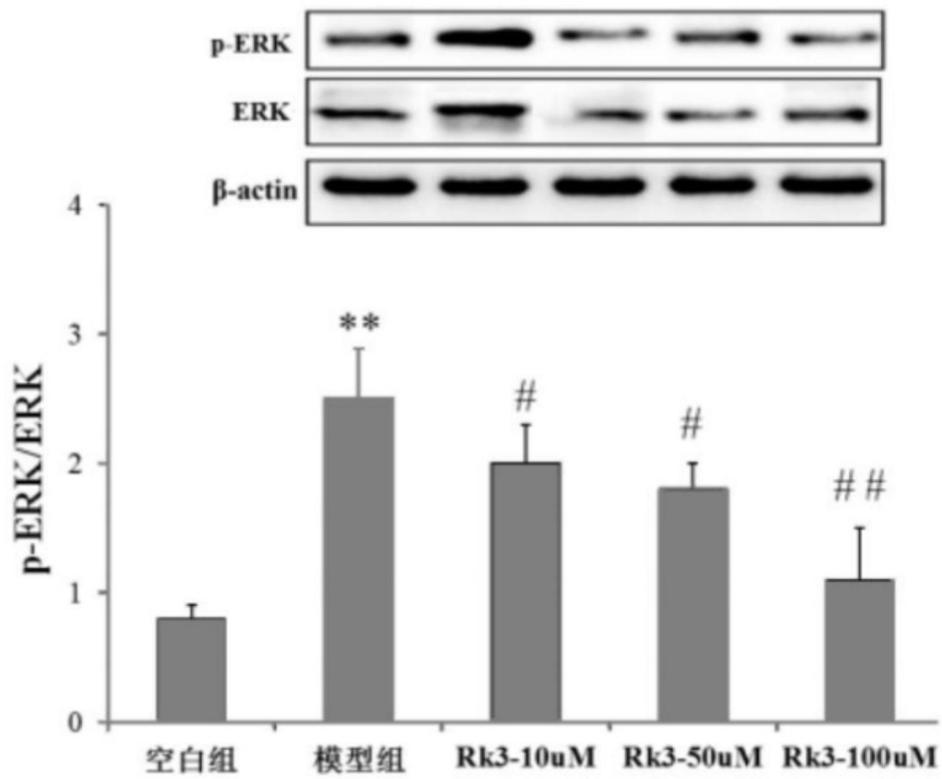


图10

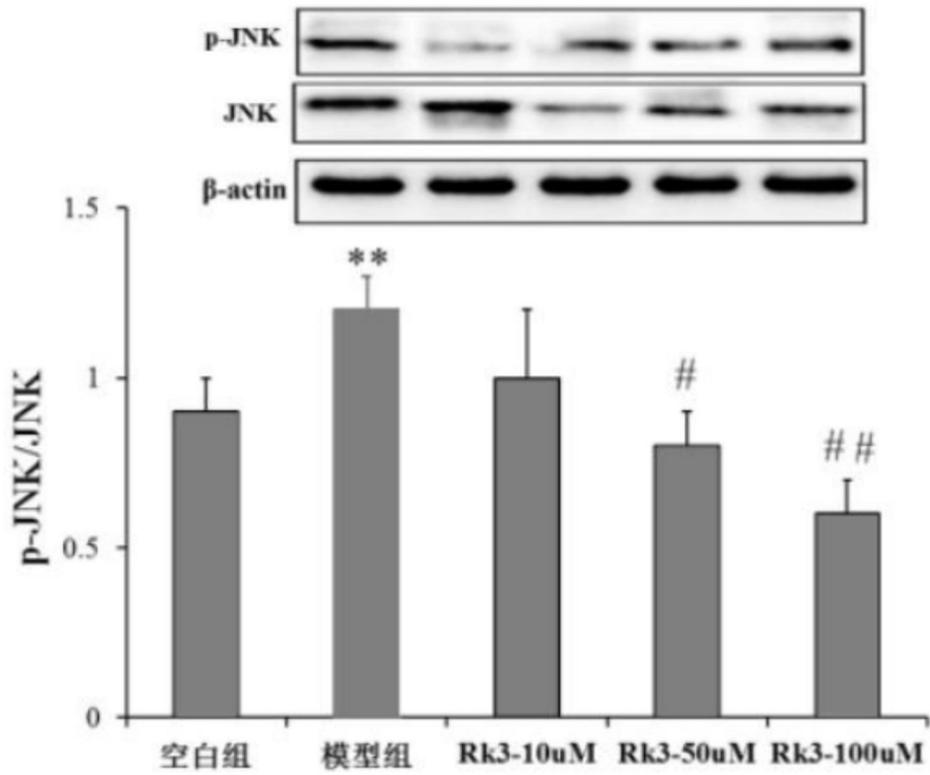


图11

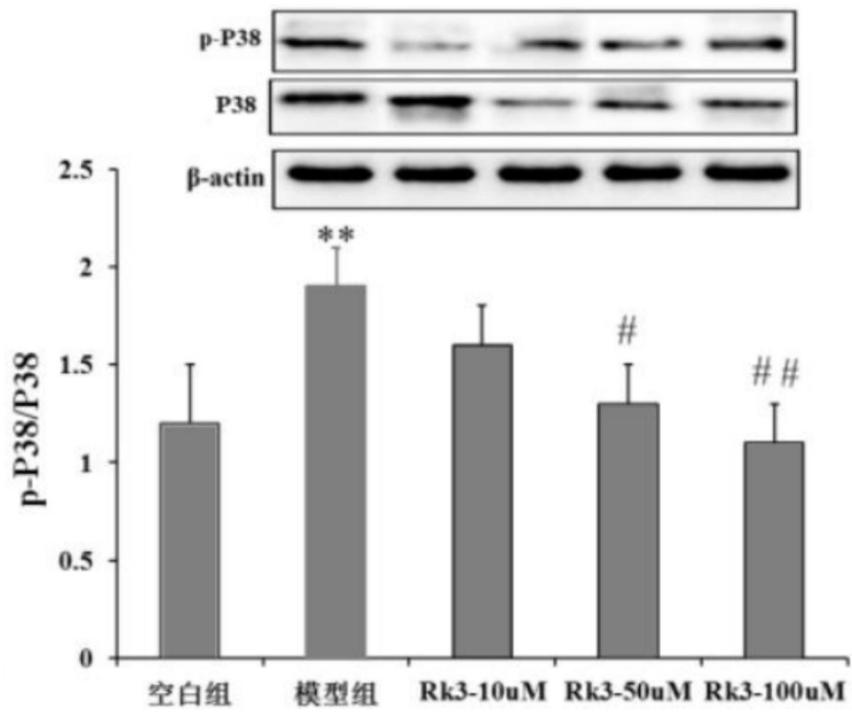


图12

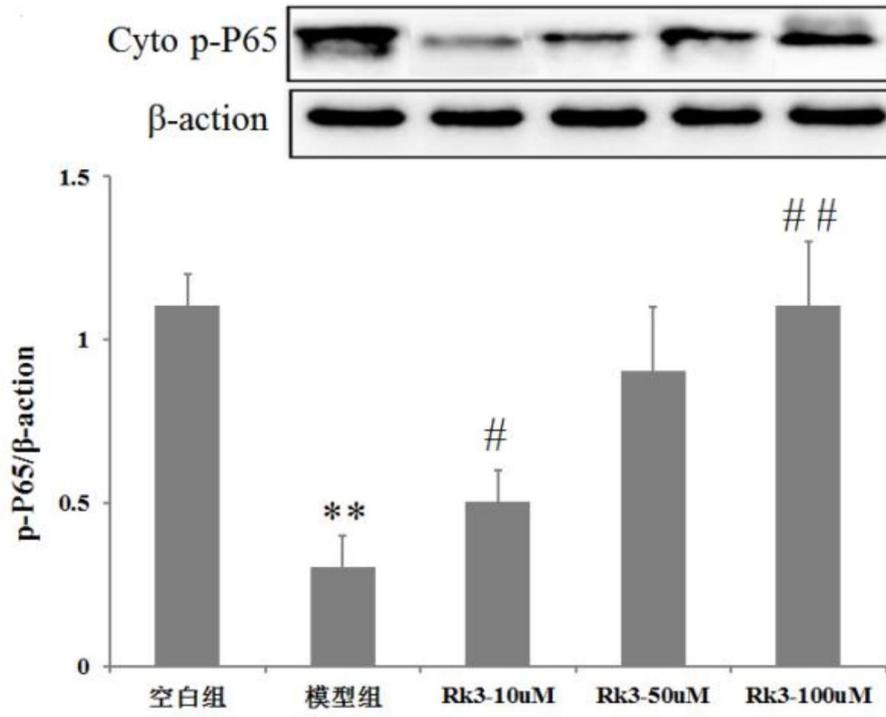


图13

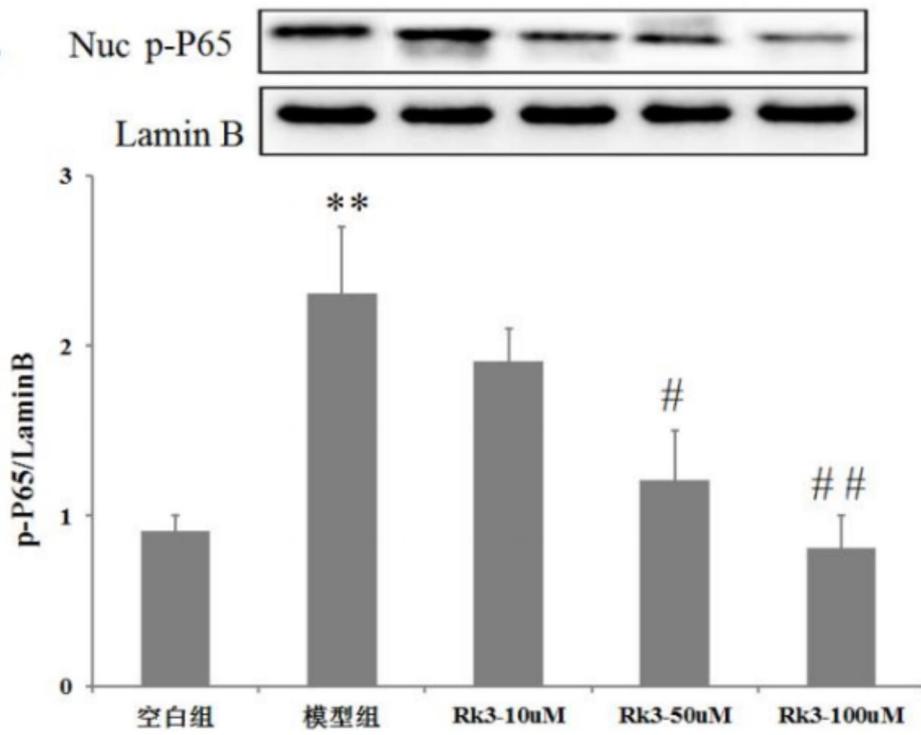


图14