



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117342970 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 05

(21) 申请号 202310186333.7

A61P 17/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.03.01

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(71) 申请人 深圳市迪克曼生物科技有限公司

A23L 33/12 (2016.01)

地址 518000 广东省深圳市坪山区坑梓街
道秀新社区中兴路14号4#厂房401

A23L 33/105 (2016.01)

(72) 发明人 杨超文 叶柳 李青

(51) Int. Cl.

C07C 233/20 (2006.01)

C07C 233/18 (2006.01)

C07C 231/02 (2006.01)

A61K 8/68 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

A61K 31/164 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

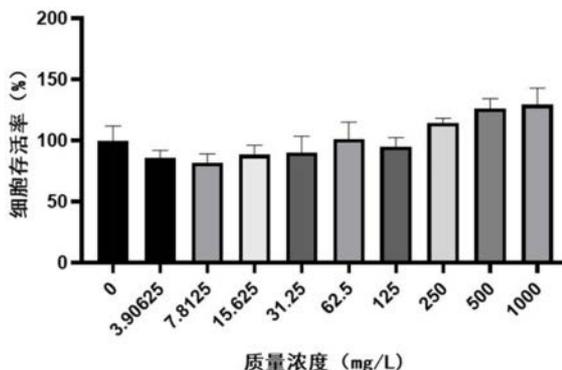
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

小麦胚芽油神经酰胺及其合成方法与用途

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,公开了小麦胚芽油神经酰胺,其由小麦胚芽油脂肪酸与鞘氨醇类化合物反应得到,所述鞘氨醇类化合物选自鞘氨醇、植物鞘氨醇、二氢鞘氨醇,本方案还公开了小麦胚芽油神经酰胺的合成方法与用途。小麦胚芽油神经酰胺在皮肤天然屏障的修复、抗炎、组织愈合、抗衰老等方面表现出优异性能,在化妆品、保健品、生物医药等领域有着广泛的应用前景。



1. 小麦胚芽油神经酰胺,其由小麦胚芽油脂肪酸与鞘氨醇类化合物反应得到,所述鞘氨醇类化合物选自鞘氨醇、植物鞘氨醇、二氢鞘氨醇。

2. 根据权利要求1所述的小麦胚芽油神经酰胺,其特征在于,所述小麦胚芽油脂肪酸由小麦胚芽油水解得到。

3. 根据权利要求1或2所述的小麦胚芽油神经酰胺,其特征在于,所述小麦胚芽油脂肪酸含有50~75wt%亚油酸、15~45wt%油酸、2~10wt%棕榈酸、1~8wt%亚麻酸、0.1~1wt%花生一烯酸。

4. 小麦胚芽油神经酰胺,其组成包括:亚油酸神经酰胺,油酸神经酰胺,棕榈酸神经酰胺,亚麻酸神经酰胺,花生一烯酸神经酰胺。

5. 根据权利要求4所述的小麦胚芽油神经酰胺,其组成包括:50~75wt%亚油酸神经酰胺,15~45wt%油酸神经酰胺,2~10wt%棕榈酸神经酰胺,1~8wt%亚麻酸神经酰胺,0.1~1wt%花生一烯酸神经酰胺。

6. 根据权利要求4或5所述的小麦胚芽油神经酰胺,其组成还包括:0~0.5wt%硬脂酸神经酰胺、0~0.5wt%花生酸神经酰胺。

7. 权利要求1~6任意一项所述的小麦胚芽油神经酰胺的合成方法,包括以下步骤:

在缩合剂、有机碱条件下,小麦胚芽油脂肪酸与鞘氨醇类化合物反应,所述缩合剂为EDCI,所述有机碱为 Et_3N ;

所述小麦胚芽油脂肪酸、鞘氨醇类化合物、EDCI、 Et_3N 的摩尔比为1:(1~1.5):(1~2):(1~2),所述反应的溶剂为二氯甲烷、四氢呋喃、乙酸乙酯、乙腈中的至少一种。

8. 权利要求1~6任意一项所述的小麦胚芽油神经酰胺在化妆品、药品、膳食食品或保健品中的用途。

9. 根据权利要求8所述的用途,其特征在于,所述小麦胚芽油神经酰胺具有皮肤屏障修复、组织愈合、抗衰老、抗炎、抗光老化、抗氧化、促进胶原合成、维持弹性蛋白活力、美白功效中的至少一种。

10. 一种组合物,包括权利要求1~6任意一项所述的小麦胚芽油神经酰胺,所述组合物具有皮肤屏障修复、组织愈合、抗衰老、抗炎、抗光老化、抗氧化、促进胶原合成、维持弹性蛋白活力、美白功效中的至少一种。

小麦胚芽油神经酰胺及其合成方法与用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及小麦胚芽油神经酰胺及其合成方法与用途。

背景技术

[0002] 神经酰胺(Ceramide,又称分子钉)天然存在于皮肤中,是皮肤屏障(角质层)非常重要的组成部分,含量高达40~50wt%,神经酰胺是一类由鞘氨醇类长链碱基与脂肪酸组成的神经鞘氨脂质,其中的鞘氨醇部分、脂肪酸部分的碳链长度、不饱和度和羟基数目都是可以变化的,神经酰胺代表了一类化合物。神经酰胺在调控皮肤屏障功能,恢复皮肤水分以及增强皮肤角质细胞之间的粘着力等方面表现出优异的性能。

[0003] 由于神经酰胺的重要性,许多化妆品和制药公司正在研究、开发相应的产品。天然植物来源的神经酰胺因其更加可持续和更加环保的原料来源,以及与皮肤神经酰胺成分相近的特性,能形成有效的皮肤屏障防止水分流失,并对抗外部损坏,将可能成为下一代环境友好、安全可靠神经酰胺产品。

[0004] 小麦胚芽油是以小麦芽为原料制取的一种谷物胚芽油,它富含人体必需的脂肪酸,含量高达80wt%以上,其中亚油酸的含量就占到50wt%以上;小麦胚芽油中还含有油酸、棕榈酸等脂肪酸。小麦胚芽油中的维生素E含量位居植物油之冠,已被公认为是一种颇具营养保健作用的功能性油脂,可以调节血脂,软化血管,有预防动脉硬化、高血压、中风的作用。小麦胚芽油中含少量甘八碳醇、谷甾醇、卵磷脂、尿囊素、精氨酸、淀粉酶、麦芽糖酶、蛋白酶、维生素B、植物凝集素等多种生理活性组分,可以减少过氧化脂质的生成,促进皮肤保湿功能,使皮肤润泽,延缓衰老。小麦胚芽油也是理想的美容基础油,被誉为可以吃的化妆品,能加强皮肤的结缔组织,增进血液循环和保持皮肤弹性,促进新陈代谢和皮肤更新,抗皱防皱、防皮肤老化、消除疤痕;对调节干性皮肤、黑斑也有很好的效果。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种利用植物来源的小麦胚芽油脂肪酸合成得到的神经酰胺。

[0006] 本发明的另一目的是提供小麦胚芽油神经酰胺的合成方法,其利用天然植物来源且易得的小麦胚芽油油脂或者小麦胚芽油脂肪酸作为原料。

[0007] 本发明的另一目的是提供小麦胚芽油神经酰胺的用途。

[0008] 为达到上述目的之一,本发明采用以下技术方案:

[0009] 本发明的第一方面,小麦胚芽油神经酰胺,其由小麦胚芽油脂肪酸与鞘氨醇类化合物反应得到,所述鞘氨醇类化合物选自鞘氨醇、植物鞘氨醇、二氢鞘氨醇。

[0010] 反应即可以是化学合成反应(如下文详述),也可采用微生物发酵法,即应用雪氏毕赤酵母或酿酒酵母,在一定环境下发酵得到鞘氨醇类化合物,然后加入脂肪酸,最终得到神经酰胺;或者以小麦胚芽油为原料,选用合适的菌株,进行发酵得到小麦胚芽油神经酰胺。

胺。

[0011] 鞘氨醇指2-氨基-4-十八烯-1,3-二醇,植物鞘氨醇指2-氨基-十八烷-1,3,4-三醇,二氢鞘氨醇指2-氨基-十八烷-1,3-二醇。

[0012] 进一步地,所述小麦胚芽油脂肪酸由小麦胚芽油油脂水解得到。

[0013] 进一步地,所述小麦胚芽油脂肪酸含有50~75wt%亚油酸。

[0014] 进一步地,所述小麦胚芽油脂肪酸含有15~45wt%油酸。

[0015] 进一步地,所述小麦胚芽油脂肪酸含有2~10wt%棕榈酸。

[0016] 进一步地,所述小麦胚芽油脂肪酸含有1~8wt%亚麻酸。

[0017] 进一步地,所述小麦胚芽油脂肪酸含有0.1~1wt%花生一烯酸。

[0018] 此外,小麦胚芽油脂肪酸还含有0~0.5wt%硬脂酸、0~0.5wt%花生酸。

[0019] 小麦胚芽油脂肪酸的组成为:50~75wt%亚油酸、15~45wt%油酸、2~10wt%棕榈酸、1~8wt%亚麻酸、0.1~1wt%花生一烯酸、0~0.5wt%硬脂酸、0~0.5wt%花生酸。

[0020] 小麦胚芽油脂肪酸的主要成分为亚油酸,其他的脂肪酸包括油酸、棕榈酸、亚麻酸和花生一烯酸,这些是必要组分,受植物品种、土壤、气候、产地、采摘季节、提取过程的影响,各组分的含量会有所不同,而硬脂酸、花生酸不一定含有,是可选组分或者非必要组分。

[0021] 小麦胚芽油神经酰胺,其组成包括:亚油酸神经酰胺,油酸神经酰胺,棕榈酸神经酰胺,亚麻酸神经酰胺,花生一烯酸神经酰胺;因为脂肪酸都会参与相同的反应,反应后神经酰胺的质量占比变化不大,所以与小麦胚芽油脂肪酸的组成类似,小麦胚芽油神经酰胺的组成为:50~75wt%亚油酸神经酰胺,15~45wt%油酸神经酰胺,2~10wt%棕榈酸神经酰胺,1~8wt%亚麻酸神经酰胺,0.1~1wt%花生一烯酸神经酰胺。各组分的含量因小麦胚芽油脂肪酸或油脂中各脂肪酸的含量不同而存在差异。此外,小麦胚芽油神经酰胺还包括硬脂酸、花生酸中的一种或多种与鞘氨醇类化合物反应得到的神经酰胺,即还包括0~0.5wt%硬脂酸神经酰胺、0~0.5wt%花生酸神经酰胺。小麦胚芽油神经酰胺还包括维生素A、维生素B、维生素D、维生素E、 β -胡萝卜素、 γ -谷维素、谷甾醇、卵磷脂、尿囊素、精氨酸、淀粉酶、麦芽糖酶、蛋白酶、植物凝集素等存在于小麦胚芽油脂肪酸中但是不与鞘氨醇类化合物反应的化合物。

[0022] 小麦胚芽油神经酰胺,其组成包括:亚油酸神经酰胺,油酸神经酰胺,棕榈酸神经酰胺;亚油酸神经酰胺占比50~75wt%,油酸神经酰胺占比15~45wt%,棕榈酸神经酰胺占比2~10wt%。

[0023] 进一步地,小麦胚芽油神经酰胺包括亚麻酸神经酰胺,亚麻酸神经酰胺占比1~8wt%。

[0024] 进一步地,小麦胚芽油神经酰胺包括花生一烯酸神经酰胺,花生一烯酸神经酰胺占比0.1~1wt%。

[0025] 进一步地,小麦胚芽油神经酰胺包括不超过0.5wt%的硬脂酸神经酰胺和不超过0.5wt%的花生酸神经酰胺,尤其是0.1~0.5wt%硬脂酸神经酰胺和0.1~0.5wt%花生酸神经酰胺。

[0026] 亚油酸神经酰胺是亚油酸与鞘氨醇类化合物缩合反应得到,包括亚油酸植物鞘氨醇神经酰胺、亚油酸鞘氨醇神经酰胺、亚油酸二氢鞘氨醇神经酰胺;油酸神经酰胺是油酸与鞘氨醇类化合物缩合反应得到,包括油酸植物鞘氨醇神经酰胺、油酸鞘氨醇神经酰胺、油酸

二氢鞘氨醇神经酰胺;棕榈酸神经酰胺是棕榈酸与鞘氨醇类化合物缩合反应得到,包括棕榈酸植物鞘氨醇神经酰胺、棕榈酸鞘氨醇神经酰胺、棕榈酸二氢鞘氨醇神经酰胺;亚麻酸神经酰胺、花生一烯酸神经酰胺、硬脂酸神经酰胺、花生酸神经酰胺等以此类推。

[0027] 本发明的第二方面,小麦胚芽油神经酰胺的合成方法,包括以下步骤:

[0028] 在缩合剂、有机碱条件下,小麦胚芽油脂肪酸与鞘氨醇类化合物反应,所述缩合剂为EDCI,所述有机碱为 Et_3N 。

[0029] 进一步地,所述小麦胚芽油脂肪酸、鞘氨醇类化合物、EDCI、 Et_3N 的摩尔比为1:(1~1.5):(1~2):(1~2),所述反应的溶剂为二氯甲烷、四氢呋喃、乙酸乙酯、乙腈中的至少一种。

[0030] 在市场上购买的小麦胚芽油一般是油脂形态,需要水解成小麦胚芽油脂肪酸,因此还包括以下步骤:

[0031] 小麦胚芽油油脂通过皂化反应水解得到小麦胚芽油脂肪酸。

[0032] 进一步地,所述皂化反应是小麦胚芽油油脂在氢氧化钾溶液中水解。

[0033] 进一步地,所述小麦胚芽油油脂与氢氧化钾的质量比为1:(1~2)。

[0034] 本发明的第三方面,小麦胚芽油神经酰胺在化妆品、药品、膳食食品或保健品中的用途。

[0035] 进一步地,所述小麦胚芽油神经酰胺具有皮肤屏障修复、组织愈合、抗衰老、抗炎、抗光老化、抗氧化、促进胶原合成、维持弹性蛋白活力、美白功效中的至少一种。

[0036] 一种组合物,包括小麦胚芽油神经酰胺,所述组合物具有皮肤屏障修复、组织愈合、抗衰老、抗炎、抗光老化、抗氧化、促进胶原合成、维持弹性蛋白活力、美白功效中的至少一种。

[0037] 该组合物含有可接受的辅料,包括增溶剂、防腐剂、抗氧化剂、pH调节剂、促渗剂、脂质体、保湿剂、增稠剂、螯合剂、肤感调节剂、表面活性剂、乳化剂、香精及色素中的一种或多种;该组合物为霜剂、乳剂、溶液剂、膜剂、气雾或喷雾形式。

[0038] 本发明具有以下有益效果:

[0039] 小麦胚芽油脂肪酸属于天然形成的脂肪酸,最主要的成分是不饱和脂肪酸——亚油酸,此外还含有油酸、棕榈酸、亚麻酸、花生一烯酸等,其与天然存在于皮肤中的鞘氨醇类化合物,经温和反应制备得到小麦胚芽油神经酰胺,在皮肤天然屏障的修复、抗氧化、抗衰老等方面表现出优异性能,在化妆品、保健品、生物医药等领域有着广泛的应用前景。

[0040] 1、与单一神经酰胺相比效果更好。不同的神经酰胺,因其结构的差异,功效也会存在差异,单一结构的神经酰胺一般难以具备全面的效果。本方案基于仿生的思路,利用天然来源的小麦胚芽油油脂或脂肪酸作为原料,合成复合的神经酰胺,以弥补不同神经酰胺功效的差异,小麦胚芽油中的微量脂肪酸可以形成微量神经酰胺,起到功效补充的作用。

[0041] 2、与复配的神经酰胺相比效果更好。除了脂肪酸(或油脂),小麦胚芽油还含有维生素A、维生素B、维生素D、维生素E、 β -胡萝卜素、 γ -谷维素、谷甾醇、卵磷脂、尿囊素、精氨酸、淀粉酶、麦芽糖酶、蛋白酶、植物凝集素等,这些营养物质有调节内分泌、抗氧化、抗皱、保湿、润泽皮肤的效果,用小麦胚芽油合成的神经酰胺,与小麦胚芽油中含有的其它活性成分具有协同增效的作用,相比按照类似比例复配的神经酰胺,具有更好的效果。

[0042] 3、成本更低。本发明的方法快速得到多种神经酰胺复配的组合物,植物源的小麦

胚芽油油脂或其脂肪酸来源广泛、易于商业化获取、成本较低,更加环保经济,有别于将不同的单一神经酰胺混合复配的思路,单一成分的脂肪酸不仅原料价格高,而且需要分别生产不同的神经酰胺,然后再进行复配,增加了制备成本。

[0043] 4、合成方法简单。本发明的方法可以采用化学合成,实现一步制备多种神经酰胺,也可以使用微生物发酵法。

附图说明

- [0044] 图1为实施例4细胞增殖活力测试结果柱形图;
[0045] 图2为实施例5细胞迁移能力测试结果;
[0046] 图3、4为实施例6弹性蛋白酶抑制率柱形图;
[0047] 图5为实施例7抗炎修复功效检测IL-6因子表达量柱形图;
[0048] 图6、7为实施例8抗光老化测试MMP1表达量柱形图;
[0049] 图8、9为实施例9抗氧化性测试DPPH自由基清除率柱形图;
[0050] 图10为实施例10美白活性测试黑色素含量柱形图。

具体实施方式

[0051] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明。

[0052] EDCI指1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺,Et₃N指三乙胺。硅胶柱层析使用青岛海洋硅胶(粒径0.040-0.063mm)。薄层色谱分析(TLC)使用60F254硅胶板,TLC显色采用UV光(254nm)或碘。

[0053] 实施例1

[0054] 小麦胚芽油脂肪酸和植物鞘氨醇合成神经酰胺

[0055] 第一步:将50g小麦胚芽油油脂溶于60mL四氢呋喃,冰浴下冷却,滴加110mL氢氧化钾(25wt%)溶液,滴加完毕后升至室温反应,至TLC检测反应完毕。

[0056] 后处理:加入稀盐酸(3N)调节反应体系的pH值到3,加入120mL乙酸乙酯萃取水相,加入80mL饱和食盐水洗一次,有机相加入无水Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩,得到40g小麦胚芽油脂肪酸。

[0057] 第二步:将小麦胚芽油脂肪酸(50mmol,以主成分脂肪酸计)、EDCI(80mmol)、Et₃N(80mmol)加入250mL圆底烧瓶中,再加入80mL二氯甲烷,随后在室温条件下搅拌1小时,随后将植物鞘氨醇(75mmol)加入到反应体系中,在室温条件下搅拌,至TLC检测反应完毕。

[0058] 后处理:加入水淬灭反应,分离有机层,干燥,过滤并真空浓缩后经溶剂洗涤得到小麦胚芽油神经酰胺,产物经HPLC分析,HPLC色谱条件:使用岛津高效液相色谱仪(LC-2030C3D Plus),用Innoval ODS-2 4.6*250mm,5μm色谱柱,柱温:30℃,进样体积:10μL,流速:1.0mL/min,蒸发温度:40℃,载气流速:2.5L/min,流动相:100%甲醇。

[0059] 各成分HPLC的保留时间为:亚麻酸-植物鞘氨醇神经酰胺8.3min,亚油酸-植物鞘氨醇神经酰胺9.5min,棕榈酸-植物鞘氨醇神经酰胺10.7min,油酸-植物鞘氨醇神经酰胺11.3min,花生一烯酸-植物鞘氨醇神经酰胺12.9min,硬脂酸-植物鞘氨醇神经酰胺13.9min,花生酸-植物鞘氨醇神经酰胺16.5min。

[0060] 所得产物经高效液相色谱分析,亚油酸-植物鞘氨醇神经酰胺、油酸-植物鞘氨醇

神经酰胺、棕榈酸-植物鞘氨醇神经酰胺、亚麻酸-植物鞘氨醇神经酰胺、花生一烯酸-植物鞘氨醇神经酰胺、硬脂酸-植物鞘氨醇神经酰胺、花生酸-植物鞘氨醇神经酰胺的含量依次为61%、26%、5%、5%、0.5%、0.5%、0.5%，其余为其他成分，含量较少。

[0061] 实施例2

[0062] 小麦胚芽油脂肪酸和鞘氨醇合成神经酰胺

[0063] 第一步:将50g小麦胚芽油油脂溶于60mL四氢呋喃,冰浴下冷却,滴加110mL氢氧化钾(25wt%)溶液,滴加完毕后升至室温反应,至TLC检测反应完毕。

[0064] 后处理:加入稀盐酸(3N)调节反应体系的pH值到3,加入120mL乙酸乙酯萃取水相,加入80mL饱和食盐水洗一次,有机相加入无水 Na_2SO_4 干燥,过滤并真空浓缩,得到39.5g小麦胚芽油脂肪酸。

[0065] 第二步:将小麦胚芽油脂肪酸(50mmol,以主成分脂肪酸计)、EDCI(70mmol)、 Et_3N (70mmol)加入250mL圆底烧瓶中,再加入100mL二氯甲烷,随后在室温条件下搅拌1小时,随后将鞘氨醇(65mmol)加入到反应体系中,在室温条件下搅拌,至TLC检测反应完毕。

[0066] 后处理:加入水淬灭反应,分离有机层,干燥,过滤并真空浓缩后经溶剂洗涤得到小麦胚芽油神经酰胺,产物经HPLC分析,HPLC色谱条件:使用岛津高效液相色谱仪(LC-2030C3D Plus),用Innoval ODS-2 4.6*250mm,5 μm 色谱柱,柱温:30 $^\circ\text{C}$,进样体积:10 μL ,流速:1.0mL/min,蒸发温度:40 $^\circ\text{C}$,载气流速:2.5L/min,流动相:100%甲醇。

[0067] 各成分HPLC的保留时间为:亚麻酸-鞘氨醇神经酰胺7.9min,亚油酸-鞘氨醇神经酰胺8.7min,油酸-鞘氨醇神经酰胺10.2min,棕榈酸-鞘氨醇神经酰胺10.4min,花生一烯酸-鞘氨醇神经酰胺12.8min。

[0068] 所得产物经高效液相色谱分析,亚油酸-鞘氨醇神经酰胺、油酸-鞘氨醇神经酰胺、棕榈酸-鞘氨醇神经酰胺、亚麻酸-鞘氨醇神经酰胺、花生一烯酸-鞘氨醇神经酰胺的含量依次为72%、15%、3%、7%、1%,其余为其他成分,含量较少。

[0069] 实施例3

[0070] 小麦胚芽油脂肪酸和二氢鞘氨醇合成神经酰胺

[0071] 第一步:将50g小麦胚芽油油脂溶于60mL四氢呋喃,冰浴下冷却,滴加110mL氢氧化钾(25wt%)溶液,滴加完毕后升至室温反应,至TLC检测反应完毕。

[0072] 后处理:加入稀盐酸(3N)调节反应体系的pH值到3,加入120mL乙酸乙酯萃取水相,加入80mL饱和食盐水洗一次,有机相加入无水 Na_2SO_4 干燥,过滤并真空浓缩,得到39.8g小麦胚芽油脂肪酸。

[0073] 第二步:将小麦胚芽油脂肪酸(50mmol,以主成分脂肪酸计)、EDCI(60mmol)、 Et_3N (60mmol)加入250mL圆底烧瓶中,再加入100mL二氯甲烷,随后在室温条件下搅拌1小时,随后将二氢鞘氨醇(55mmol)加入到反应体系中,在室温条件下搅拌,至TLC检测反应完毕。

[0074] 后处理:加入水淬灭反应,分离有机层,干燥,过滤并真空浓缩后经溶剂洗涤得到小麦胚芽油神经酰胺,产物经HPLC分析,HPLC色谱条件:使用岛津高效液相色谱仪(LC-2030C3D Plus),用Innoval ODS-2 4.6*250mm,5 μm 色谱柱,柱温:30 $^\circ\text{C}$,进样体积:10 μL ,流速:1.0mL/min,蒸发温度:40 $^\circ\text{C}$,载气流速:2.5L/min,流动相:100%甲醇。

[0075] 各成分HPLC的保留时间为:亚麻酸-二氢鞘氨醇神经酰胺8.3min,亚油酸-二氢鞘氨醇神经酰胺9.5min,棕榈酸-二氢鞘氨醇神经酰胺10.6min,油酸-二氢鞘氨醇神经酰胺

11.1min,硬脂酸-二氢鞘氨醇神经酰胺13.5min,花生一烯酸-二氢鞘氨醇神经酰胺14.0min,花生酸-二氢鞘氨醇神经酰胺16.0min。

[0076] 所得产物经高效液相色谱分析,亚油酸-二氢鞘氨醇神经酰胺、油酸-二氢鞘氨醇神经酰胺、棕榈酸-二氢鞘氨醇神经酰胺、亚麻酸-二氢鞘氨醇神经酰胺、花生一烯酸-二氢鞘氨醇神经酰胺、硬脂酸-二氢鞘氨醇神经酰胺、花生酸-二氢鞘氨醇神经酰胺的含量依次为53%、32%、8%、2.5%、1%、0.5%、0.5%,其余为其他成分,含量较少。

[0077] 实施例4

[0078] MTT法检测化合物对细胞的增殖活力

[0079] 将HaCaT细胞以 1×10^4 个/孔的密度种于96孔板,培养箱内过夜。24h后弃去上清液,加入含不同浓度的样品(实施例1产物)的培养基100 μ L,继续孵育24h后除去培养基,每孔中加入100 μ L噻唑蓝(MTT),测定450nm处吸光度,计算细胞存活率 $=A_{\text{检测孔}}/A_{\text{空白孔}} \times 100\%$ 。

[0080] 结果如图1所示,小麦胚芽油神经酰胺对细胞活力有促进作用,在浓度为3.90625、7.8125、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1000mg/L时的细胞存活率分别为85.71%、81.67%、88.48%、90.32%、101.10%、94.93%、114.64%、126.05%、129.46%。在较高浓度下表现出促进细胞增殖效果,具有良好的组织修复能力。

[0081] 实施例5

[0082] 细胞迁移评估皮肤屏障修复作用

[0083] 原理:当细胞长到融合成单层状态时,在融合的单层细胞上划痕工具制造一个空白区域,空白区域的细胞被机械力去除了,通过一段时间的培养,观察细胞向无细胞区域迁移的情况,通过测量细胞的迁移距离反映细胞的迁移能力。

[0084] 操作步骤:

[0085] 1、培养板划线。首先使用Marker笔在6孔板背后,用直尺比着,均匀的划横线,大约每隔0.5~1cm一道,横穿过孔,每孔至少穿过5条线,划线时注意线不要太粗。

[0086] 2、铺细胞。在孔中加入约 5×10^5 个细胞(不同的细胞数量有所不同,根据细胞的生长快慢调整),接种原则为过夜后融合率达到100%。

[0087] 3、细胞划线。第二天用枪头,垂直于细胞平面,沿着第一天划在平板背面的线在细胞层上进行划痕(不同孔之间最好使用同一只枪头)。

[0088] 4、洗细胞。划痕完成后,使用无菌PBS洗细胞3次,洗去不贴壁的细胞,即划线时划线的细胞,划线后留下的间隙清晰可见,然后更换新鲜无血清培养基。

[0089] 5、细胞培养、观察。样品(实施例1产物、神经酰胺3B)用培养基稀释后(实施例1产物浓度为50mg/L,神经酰胺3B浓度为100mg/L)加入细胞培养皿,将细胞放入37 $^{\circ}$ C、5wt%CO₂培养箱培养,在24h后取出细胞,显微镜观察并测量划痕的宽度,并拍照,用Image J软件计算愈合率。

[0090] 结果如图2所示,相比溶剂对照组,实验组的划痕宽度更窄,说明小麦胚芽油神经酰胺具有更好的组织愈合能力。溶剂对照组在24h后的愈合率为36.85%,小麦胚芽油神经酰胺在24h后的愈合率为85.36%,神经酰胺3B在24h后的愈合率为59.32%。本发明的化合物明显提升了细胞愈合速率,具备良好的皮肤组织修复活性,而且效果比神经酰胺3B更好。

[0091] 实施例6

[0092] 弹性蛋白酶抑制实验测试抗衰老作用

[0093] 弹性蛋白酶抑制方法:取2mg/mL弹性蛋白酶溶液2mL,加入不同浓度样品(实施例1产物),充分涡旋混匀,在37℃、400r/min摇床振荡20min,立即加入pH6.0的0.5mol/L磷酸盐缓冲液5mL,涡旋混匀,取适量混匀液至2mL离心管内,在 $9\ 391\times g$ 下离心10min,精密吸取上清液200 μ L至96孔板内,在波长495nm处酶标仪测定吸光度,同时进行400~800nm光谱扫描。

[0094] 以底物加酶溶液为空白对照组,底物加酶和样品溶液为酶抑制组,底物加样品不加酶溶液作扣背景用。每组均设3复孔。抑制率(%) = $[1 - (A_n - A_n') / (A_0 - A_0')] \times 100\%$,式中, A_0 为加酶不加样品的吸光度, A_0' 为仅加底物不加样品和酶的吸光度, A_n 为仅加样品溶液的吸光度, A_n' 为加样品不加酶的吸光度。若 $A_n' > A_n$,则表现为促进作用,促进率(%) = $[1 - (A_n' - A_n) / (A_0 - A_0')] \times 100\%$ 。

[0095] 结果如图3所示,小麦胚芽油神经酰胺在不同浓度下对弹性蛋白酶均具有优异的抑制效果,具体而言,在0.25g/L的浓度时对弹性蛋白酶的抑制率为17.47%,在0.5g/L的浓度时对弹性蛋白酶的抑制率为35.00%,在1.0g/L的浓度时对弹性蛋白酶的抑制率为46.93%,在2.0g/L的浓度时对弹性蛋白酶的抑制率为58.67%。

[0096] 按照相同的方法测试神经酰胺4对弹性蛋白酶的抑制活性,结果如图4所示,在浓度为0.25、0.5、1.0、2.0g/L时的弹性蛋白酶抑制率分别为10.12%、18.06%、28.84%和19.78%,其抑制效果不如相同浓度的小麦胚芽油神经酰胺。

[0097] 实施例7

[0098] LPS诱导细胞法检测抗炎修复功效

[0099] 将B16小鼠黑色素瘤细胞以密度 1×10^4 个/孔种于96孔板,置于培养箱内贴壁过夜,24h后弃去上清液,加入100 μ L经DMEM培养基稀释的不同浓度的样品(实施例1产物),阴性对照组为不含样品的DMEM培养基,每组3个复孔,在5wt%CO₂、37℃环境中孵育。给药2h后脂多糖模型组与实验组加入10 μ g/mL LPS并共同孵育至24h。反应结束后取细胞上清液50 μ L,使用IL-6ELISA试剂盒检测细胞内IL-6基因表达。

[0100] 结果如图5所示,在工作浓度为10 μ g/mL的LPS刺激下,IL-6水平为基础水平的10.97倍。在浓度分别为50mg/L、100mg/L、200mg/L、400mg/L的小麦胚芽油神经酰胺的作用下,IL-6因子水平显著降低,分别为LPS模型组的0.95、0.88、0.91、0.57倍,呈剂量依赖性,这证明小麦胚芽油神经酰胺具有良好的抗炎效果,可以促进炎症受损皮肤的修复。

[0101] 实施例8

[0102] MMP1又称间质性胶原酶、基质金属蛋白酶,属基质金属蛋白酶家族,其主要作用底物为纤维性胶原,可降解细胞外基质中的胶原纤维和明胶及改变细胞的微环境。MMP1在弹性蛋白中起着重要作用,抑制MMP1可提高成纤维细胞胶原蛋白和弹性蛋白合成,MMP活性降低可增加胶原合成速度。

[0103] 将HaCaT细胞以 1×10^5 个/孔的密度种于96孔板,培养箱内过夜。24h后弃去上清液,加入含不同浓度的样品(实施例1产物)的培养基100 μ L,模型组不加入样品,阴性对照组为不含样品的DMEM培养基,每组3个复孔,在质量分数5% CO₂、37℃环境中孵育2h后,辐射UVA或UVB紫外线。紫外线辐射光源与细胞之间的距离为15cm,UVA强度为200mJ/cm²,辐射时间为2h,UVB强度为50mJ/cm²,辐射时间为1h。结束辐射后,在培养箱内继续孵育12h。使用MMP-1ELISA试剂盒检测细胞内MMP-1基因表达。抑制率 = $1 - (\text{实验组MMP1表达式} / \text{模型组MMP1表达式}) \times 100\%$ 。

[0104] 结果如图6、7所示,对于UVA,阴性对照组的MMP1表达量设为1,模型组的表达量为1.90,小麦胚芽油神经酰胺在125、250、400mg/L的浓度时,相对模型组MMP1表达的抑制率为38%、61%、67%;对于UVB,阴性对照组的MMP1表达量设为1,模型组的表达量为2.33,小麦胚芽油神经酰胺在125、250、400mg/L的浓度时,相对模型组MMP1表达的抑制率为43%、48%、68%。

[0105] UVA紫外线辐射后,角质形成细胞促进成纤维细胞MMP1表达升高,从而引起皮肤细胞外基质和皮肤胶原降解,导致皮肤光老化。上述结果表明,小麦胚芽油神经酰胺可以抑制紫外线辐射导致的成纤维细胞产生MMP1,对防止皮肤光老化有一定作用。

[0106] 实施例9

[0107] DPPH自由基清除检测抗氧化性能

[0108] DPPH是1,1-二苯-2-三硝苯肼,可以用于抗氧化实验。

[0109] 将对应浓度(50、100、200、400、800mg/L)样品(实施例1产物)分别与0.1mol/L DPPH、无水乙醇溶液按1:1的体积比例混合均匀,DPPH与无水乙醇1:1等体积混合,室温避光反应30min,于517nm处测吸光值。样品与DPPH反应液的吸光度记作A1,样品与无水乙醇反应液的吸光度记作A2,DPPH与无水乙醇反应液的吸光度记作A3,样品的DPPH清除率= $[1 - (A1 - A2) / A3] \times 100\%$ 。

[0110] 结果如图8所示,在浓度为50、100、200、400、800mg/L时的DPPH自由基清除率分别为11.09%、24.91%、30.44%、35.07%、40.58%,表现出优异的抗氧化效果。按照相同的方法测试神经酰胺3B(即油酸神经酰胺)的抗氧化效果,结果如图9所示,在浓度为50、100、200、400、800mg/L时的DPPH自由基清除率为7.76%、12.82%、24.10%、29.60%、33.16%。小麦胚芽油神经酰胺对DPPH的清除率高于神经酰胺3B,具有更好的抗氧化效果。

[0111] 实施例10

[0112] 美白活性测试

[0113] 取指数生长期B16细胞,用质量分数0.25%胰蛋白酶-EDTA消化并吹打均匀,将细胞按 3×10^5 个/孔的密度接种于12孔板。于37℃、质量分数5%CO₂环境中培养过夜。弃去上清液,加入含不同质量浓度样品(实施例1产物)的培养液,以不加样品的RPMI-1640培养基孵育为空白组,加DMEM培养基孵育为造模组,每组3个复孔,在质量分数5%CO₂、37℃环境中孵育24h。将孔板中培养基弃去,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗一到两次后,加入1mL含质量分数10%DMSO的NaOH溶液(1mol/L)裂解细胞,置于80℃或100℃下恒温2h至细胞完全溶解。置于酶标仪中,于405nm下测吸光值。计算出黑色素抑制率= $1 - (\text{各孔OD值} / \text{模型组OD值}) \times 100\%$ 。

[0114] 结果如图10所示,空白对照组的黑色素含量设为1,造模组的黑色素表达为1.51,在浓度为10、20、40、80、100mg/L时,小麦胚芽油神经酰胺的黑色素抑制率分别为4.16%、12.52%、17.79%、16.73%、22.84%,表现出较好的美白效果。

[0115] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何属于本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应该以权利要求的保护范围为准。

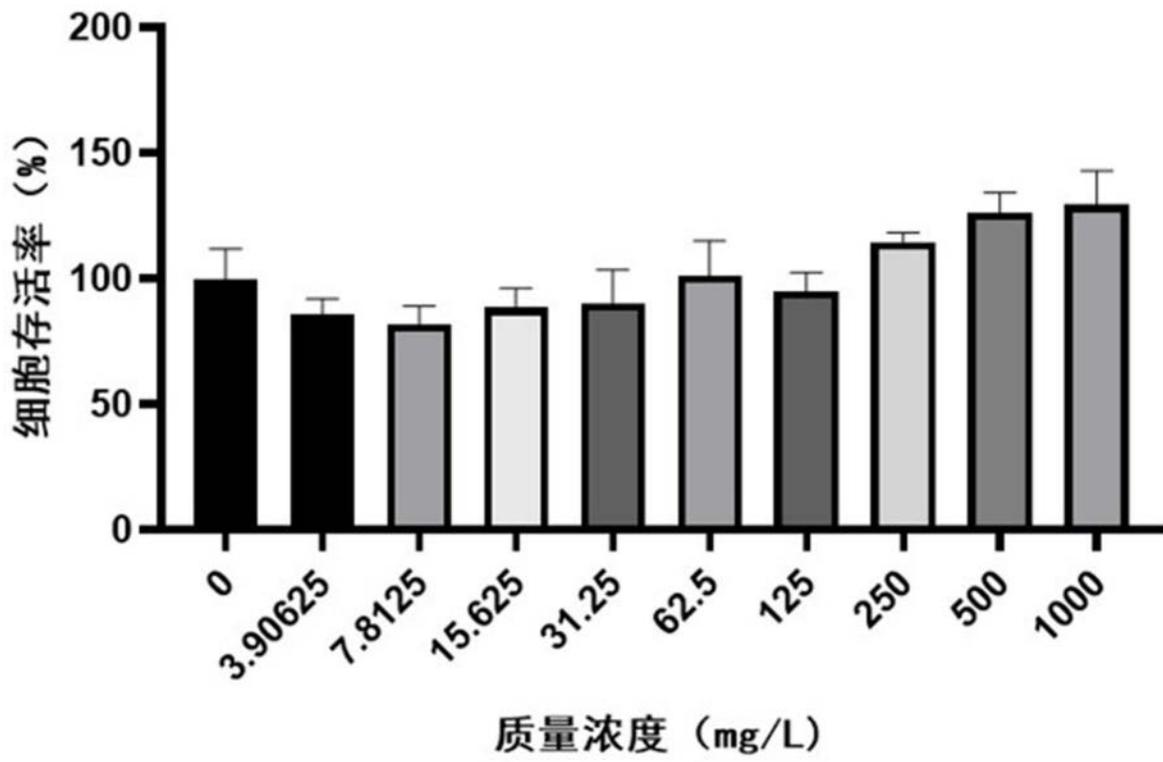


图1

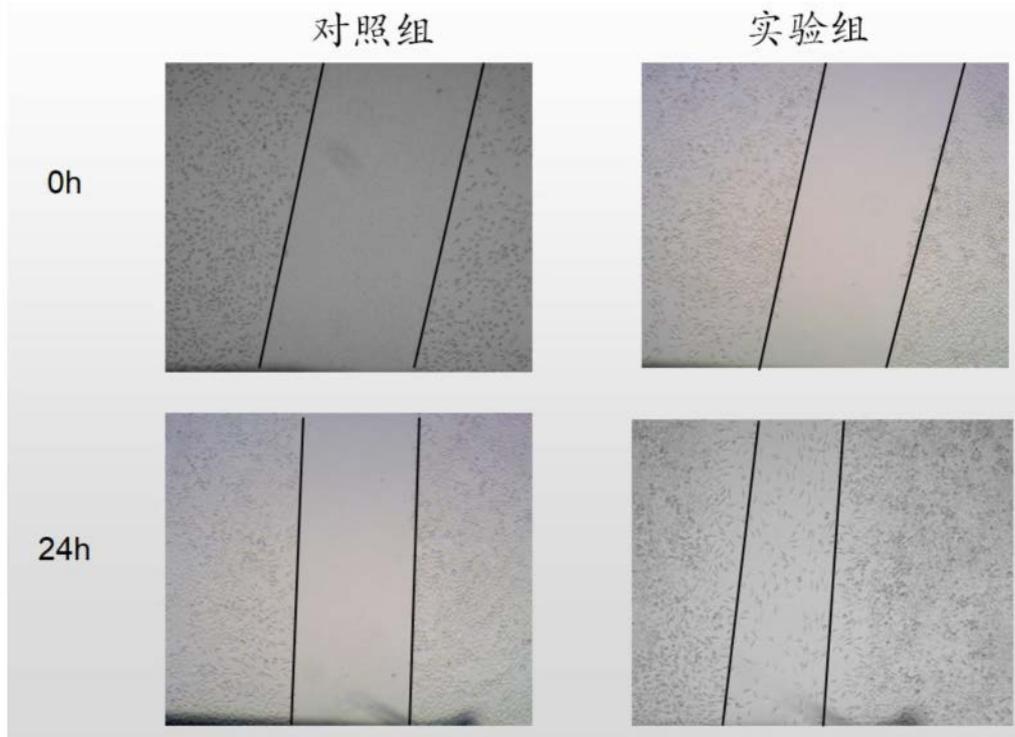


图2

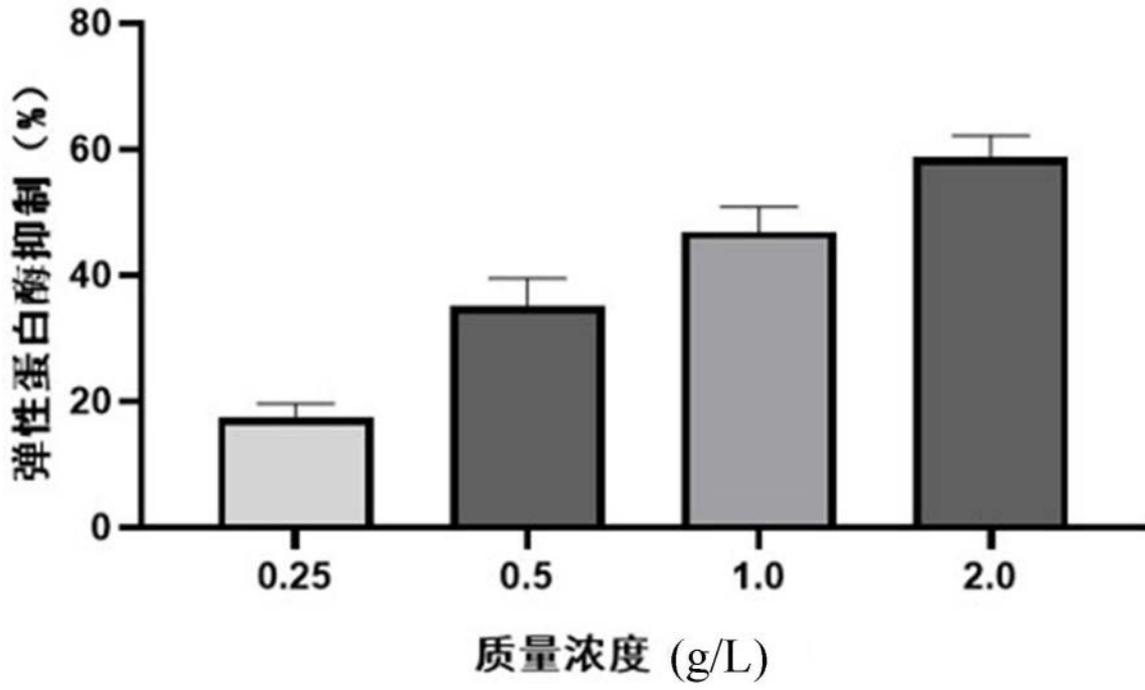


图3

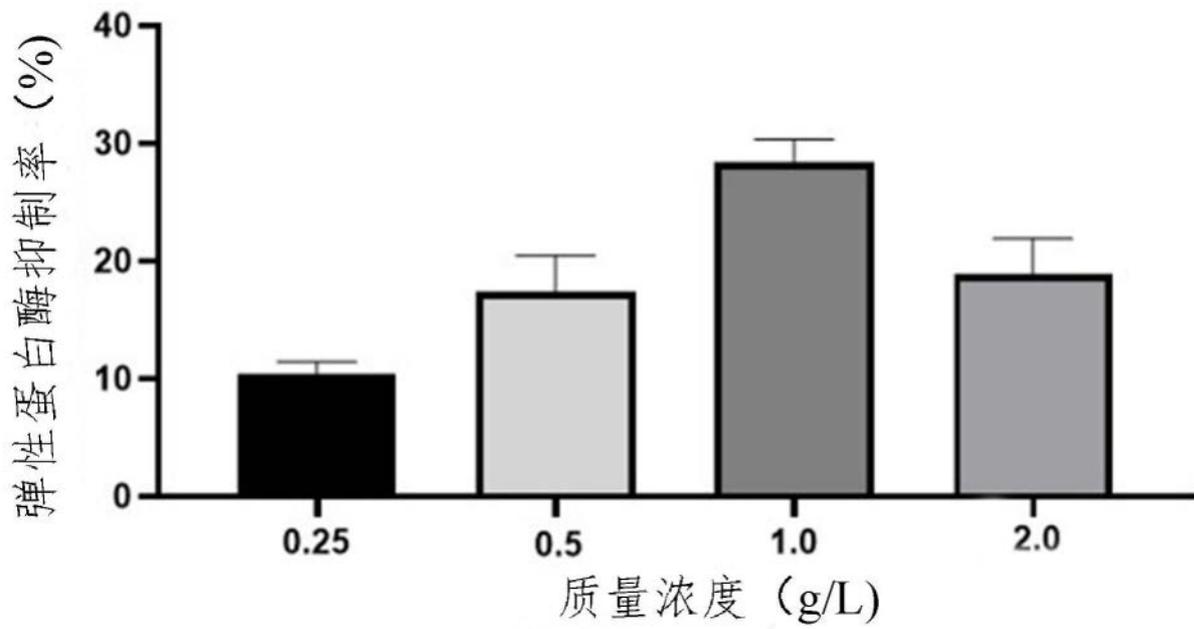


图4

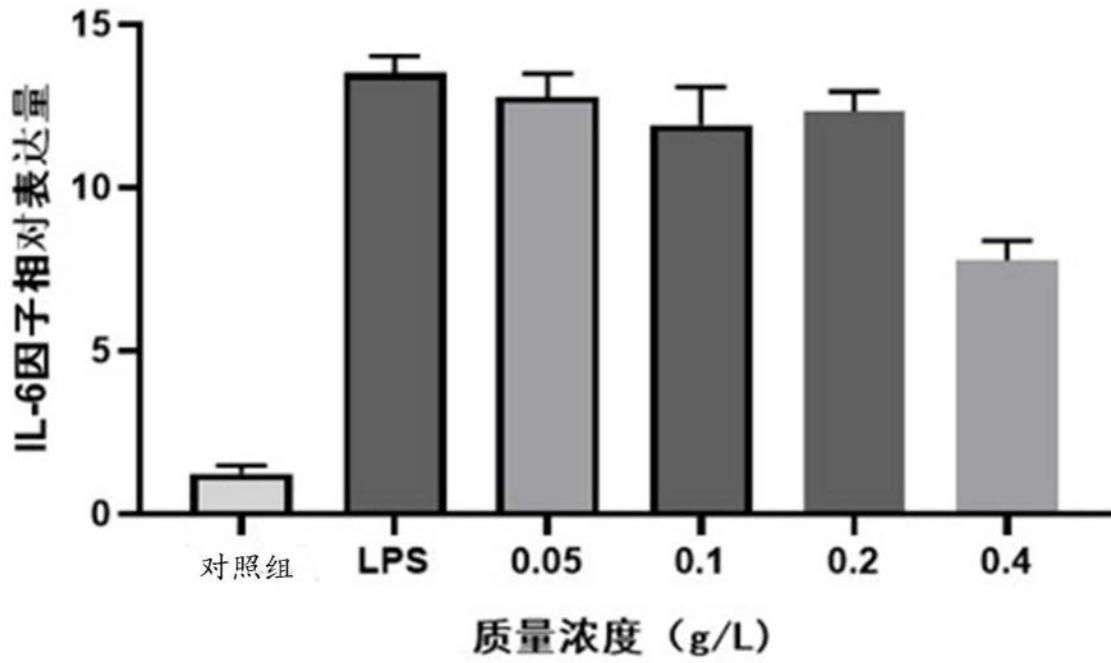


图5

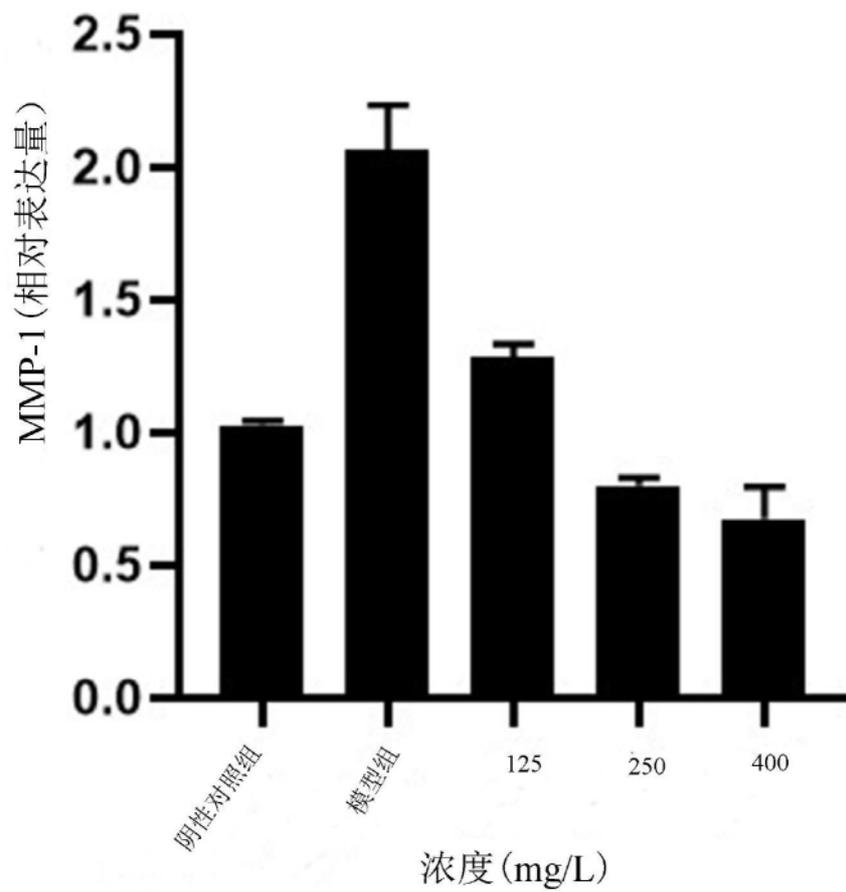


图6

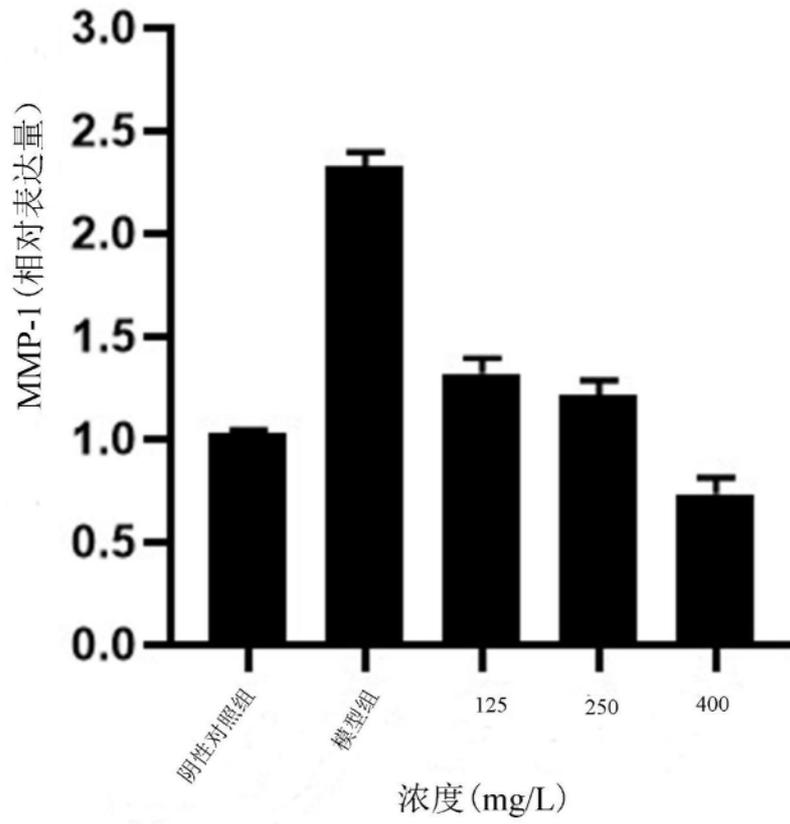


图7

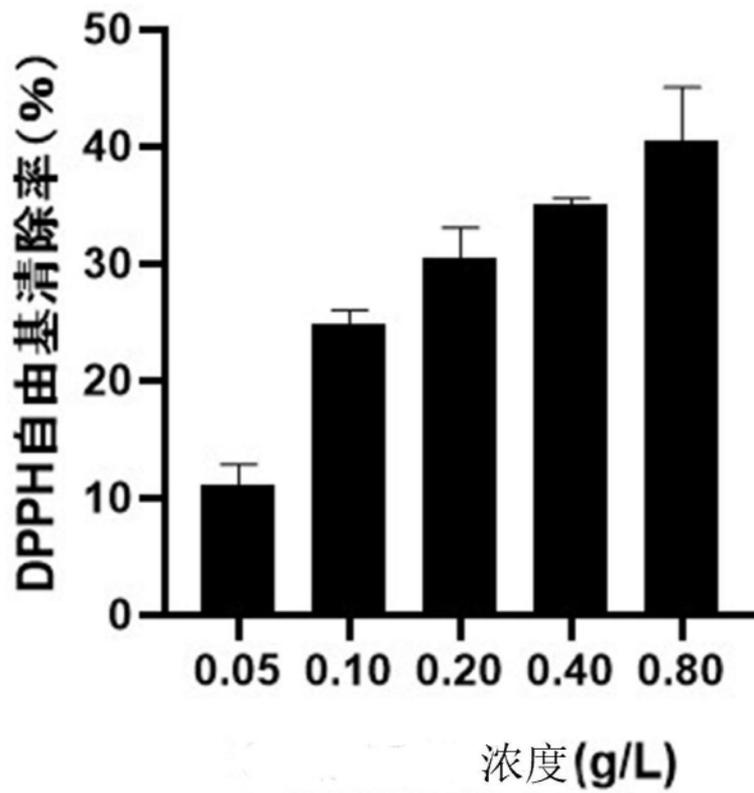


图8

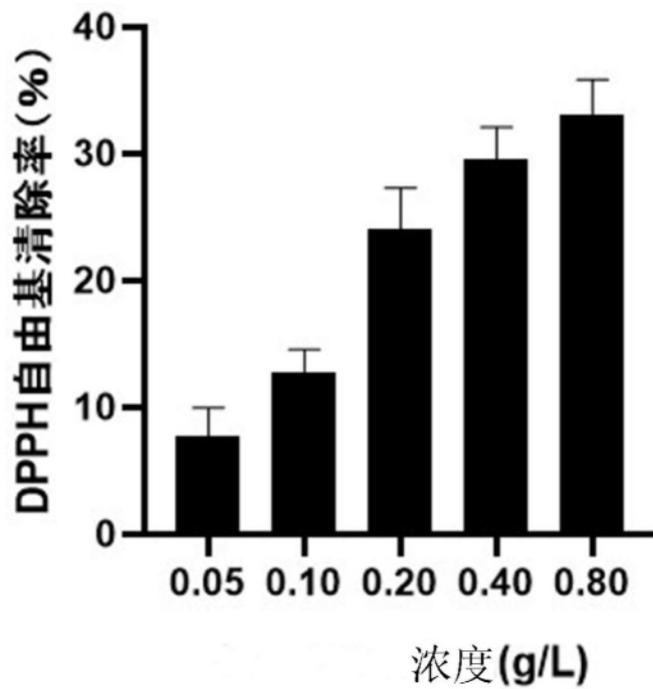


图9

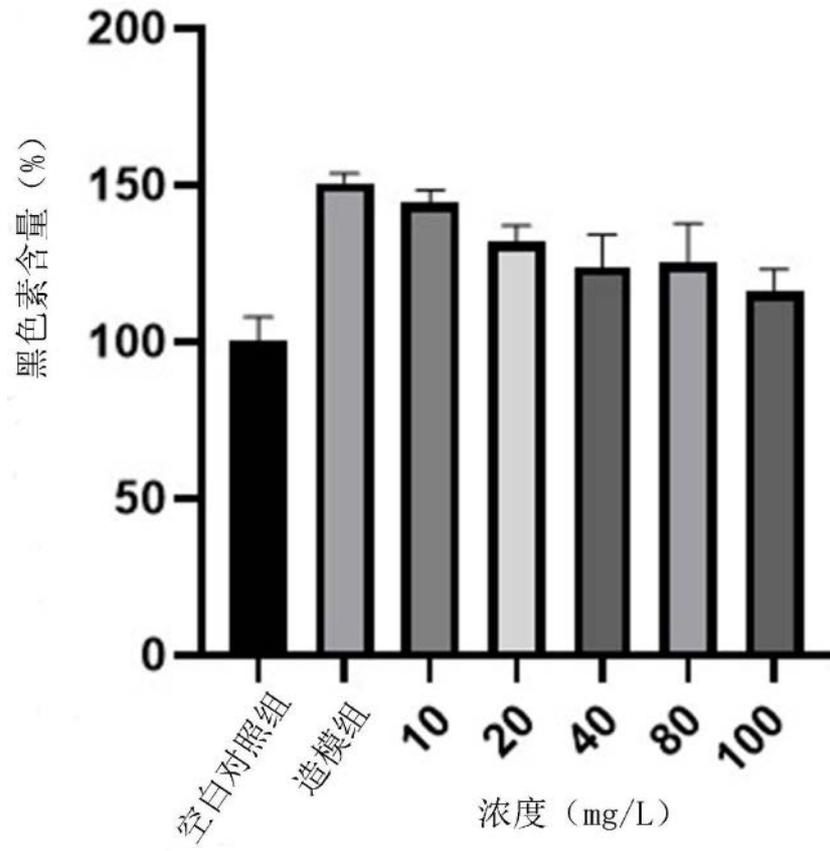


图10