



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102038650 A

(43) 申请公布日 2011.05.04

(21) 申请号 201010526519.5

(22) 申请日 2010.10.15

(66) 本国优先权数据

200910197331.8 2009.10.16 CN

(71) 申请人 上海医药工业研究院

地址 200040 上海市北京西路 1320 号

(72) 发明人 杨义芳 金隽迪 杨国红

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 郑立柱 谢燕军

(51) Int. Cl.

A61K 9/19(2006.01)

A61K 31/715(2006.01)

A61K 36/074(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂,其特征在于,其由 5-25wt% 的紫芝菌丝体精制物的 75-95wt% 的冻干赋形剂组成。本发明的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂由于采用了紫芝菌丝体多糖精制物制备,后者多糖含量高、分子量范围小,因此该冻干粉制剂具有更好的抗肿瘤活性且起效剂量低、毒性更小;另一方面,由于多糖精制物不含蛋白质等杂质,因此使用该冻干粉制剂产生不良反应的概率较之现有技术的紫芝菌丝体多糖冻干粉针剂大大降低。

1. 紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂,其特征在于,其由 5-25wt%的紫芝菌丝体精制物的 75-95wt%的冻干赋形剂组成。
2. 根据权利要求 1 所述的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂,其特征在于,其由 8-20wt%的紫芝菌丝体精制物和 80-92wt%的冻干赋形剂组成。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂,其特征在于,所述冻干赋形剂选自甘露醇、聚乙二醇、羟丙基 β 环糊精、磷酸二氢钠或柠檬酸钠中的一种或几种。
4. 根据权利要求 3 所述的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂,其特征在于,所述赋形剂是甘露醇和 / 或柠檬酸钠。
5. 根据权利要求 1-4 任一权利要求所述的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂,其特征在于,所述粉针剂的 pH 为 7.44-7.47。
6. 权利要求 1-5 任一所述的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂的制备方法,所述方法包括在原料混合物中加入针剂活性炭并用微孔滤膜过滤的步骤。

紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及中药制剂领域,具体涉及一种紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 食药真菌具有抗肿瘤抗病毒、降血脂、延缓衰老、护肝排毒、促进核酸和蛋白质生物合成等多种功效,在中国有悠久的历史。国内外大量研究表明,真菌多糖是从真菌子实体、菌丝体、发酵液中分离得到的,为真菌类药物的药效部位,是能够控制细胞分裂分化,调节细胞生长衰老的一类活性多糖。

[0003] 紫芝 (*Ganoderma Sinense Zhao, Xu et Zhang*) 是灵芝属的一种,目前对紫芝研究较少,紫芝提取物(以多糖为主)具有抗肿瘤、抗辐射、升高白细胞的作用,研究表明紫芝多糖为其药效主要部位。

[0004] 中国专利 200710045369.4 “一种紫芝发酵方法及制得的紫芝菌丝体”公开了一种紫芝液体深层发酵产生菌丝体的方法,该菌丝体用水提醇沉法提取得到的粗多糖含量在 39 ~ 75%,其体内药理实验中,口服剂量为 40mg/kg/day 时有明显抗肿瘤活性。中国专利 200710045368.x “紫芝菌丝体胞内多糖及其制备方法和应用”公开了一种从紫芝液体深层发酵产生的菌丝体中提取制备得到粗多糖的方法。涉及了水提醇沉法提取得到粗多糖含量在 39 ~ 75%。其药理实验证明其有明显的抗肿瘤作用(对小鼠 H22 肝癌和 Lewis 肺癌的抑制率分别在 45 ~ 55%,和 40 ~ 50%),剂量也为 40mg/kg/day (给药方式:口服喂药)。杨国红,杨义芳,金隽迪(紫芝液体深层发酵的抗肿瘤活性部位研究[J]. 中草药,2008,39(6): 877-880)对紫芝液体深层发酵的抗肿瘤活性多糖进行了研究,从紫芝菌丝体中提取得到胞内多糖,药理实验证明其抗肿瘤活性与双灵固本散相当。

[0005] 多糖由于其分子量大,不易透过生物膜,故影响其吸收率。紫芝菌丝体多糖制备成冻干粉针剂可直接透过生物膜,进入血液循环,提高生物利用度。

[0006] 多糖类冻干粉针剂的配方多含右旋糖酐,临床上已发现有其过敏性休克导致死亡的案例多起。

[0007] 另外,传统的紫芝菌丝体多糖提取方法一般使用水提醇沉法,该法得到的粗多糖含量低,多糖组分复杂,并同时含有蛋白质色素等大分子成分,也容易引起输液反应。

[0008] 鉴于现有技术的状况,需要寻找制备多糖含量高、分子量范围小、不含蛋白质等杂质、具有明显的抗肿瘤活性且起效剂量低,毒性更小的紫芝菌丝体多糖精制物的方法,从而提供不会产生不良反应的多糖精制物的冻干粉针剂。

发明内容

[0009] 本申请人由紫芝 (*Ganoderma Sinense Zhao, Xu et Zhang*) 经过液体深层发酵得到菌丝体提取分离精制,得到紫芝菌丝体多糖精制物。该多糖精制物的多糖含量达到 90% 以上,不含蛋白质。该多糖经药理实验证明具有明显的抗肿瘤作用,且起效剂量低,毒性甚

微。

[0010] 本发明要解决的技术问题是利用紫芝抗多糖菌丝体多糖精制物为原料,提供一种抗肿瘤活性更好、起效剂量低、毒性更小、且不良反应发生率更低的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂。

[0011] 因此,本发明的第一个目的是提供一种紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂,其特征在于,其由 5-25wt% 的紫芝菌丝体精制物的 75-95wt% 的冻干赋形剂组成。

[0012] 作为本发明的进一步优选,所述的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂由 8-20wt% 的紫芝菌丝体精制物和 80-92wt% 的冻干赋形剂组成。

[0013] 更有选地,本发明的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂由 15wt% 的紫芝菌丝体精制物和 85wt% 的冻干赋形剂组成。

[0014] 进一步,所述冻干赋形剂选自甘露醇、聚乙二醇、羟丙基 β 环糊精、磷酸二氢钠或柠檬酸钠中的一种或几种。优选的赋形剂是甘露醇和 / 或柠檬酸钠。

[0015] 进一步,所述粉针剂的 pH 为 7.44-7.47。

[0016] 本发明的第二个目的是提供上述紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂的制备方法,所述方法包括在原料混合物中加入针剂活性炭并用微孔滤膜过滤的步骤。

[0017] 本发明冻干粉针剂的原料紫芝菌丝体多糖精制物的制备方法包括如下步骤:紫芝菌丝体经水提醇沉得到粗多糖,粗多糖经超滤、浓缩和沉析,得到紫芝菌丝体多糖精制物。

[0018] 具体方法如下:

[0019] 粗多糖提取:

[0020] 采用山东紫芝菌种 (*Ganoderma sinense*) 进行液体发酵,得发酵液 1300L,得到菌丝体用水洗,板框压滤。取菌丝体用 3 倍水提加热提取 2 次,每次 3h,提取温度为 90℃。水提液合并浓缩至菌丝体量和药液量比为 1 : 2,后加 4 倍 95% 醇沉过夜,沉淀取出晾干,得到粗多糖 119.22g。

[0021] 粗多糖精制:

[0022] 取上述粗多糖用 20 倍水溶解,用分子量为 3 万的超滤膜分离粗多糖液,取截留液用纳滤膜浓缩。

[0023] 取干燥后的多糖部位 1g,溶于 100mL 去离子水中,离心分离,取上清液加 2% 三甲基十六烷基溴化铵,混匀,离心分离,取上清液加 1% 硼酸 50mL,用 1MNaOH 溶液调 pH 至 11,继续用乙酸调 pH 至 7,离心分离。取上清液用乙酸调 pH 至 4.4,加 1.5 倍乙醇醇沉过夜,离心分离取沉淀,用水溶解后用透析袋流水透析,取出透析袋内液后,浓缩,冷冻干燥,即得紫芝菌丝体多糖精制物。

[0024] 该多糖精制物的得率为 64.5%,多糖含量为 92.5%,单糖含量为 1.7%,蛋白质反应为阴性。

[0025] 由上述紫芝菌丝体多糖精制物制备本发明紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂的方法包括如下步骤:

[0026] 取紫芝菌丝体多糖精制物,用适量注射用水溶解,加入处方量赋形剂,加入针剂活性炭,微孔滤膜过滤,分装在西林瓶中,冷冻干燥,封口,制取针剂。

[0027] 本发明的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂由于采用了紫芝菌丝体多糖精制物制备,后者多糖含量高、分子量范围小,因此该冻干粉制剂具有更好的抗肿瘤活性且起效剂

量低、毒性更小；另一方面，由于多糖精制物不含蛋白质等杂质，因此使用该冻干粉制剂产生不良反应的概率较之现有技术的紫芝菌丝体多糖冻干粉针剂大大降低。

具体实施方式

[0028] 为了更好地理解本发明，通过以下实施例来说明为了更好地理解本发明，但本发明不受其限制：

[0029] 苯酚硫酸法测定多糖（以及单糖）含量的具体步骤如下：

[0030] 标品配制：精密称定干燥好的葡萄糖 25mg，定溶至 100ml，配成 250ug/ml 标品溶液，分别取 0.1、0.2、0.4、0.5、0.7、0.80. ml 于不同试管中，加水补足 1ml，分别加 5% 苯酚 0.5ml，充分摇匀，快速加入浓硫酸 3.5ml，置 40℃ 水浴，反应 30 分钟，再冷水放置 5min，作标品液。

[0031] 空白配制：取 2ml 去离子水，加 5% 苯酚 1ml，浓硫酸 7ml，水浴加热，冷却，作空白液。

[0032] 标准曲线绘制：将标准待测液和空白液用紫外分光光度法于 490nm 处测其吸收值，并做标准曲线。

[0033] 样品配制：取粗多糖样品精密称定 20mg，加入 10ml 的去离子水中配制 2mg/ml 溶液，取 0.2ml 于试管中，加水补足 1ml，按标品液依次加入苯酚、浓硫酸，水浴加热，冷却，作样品液。

[0034] 检测：将待测样品用紫外分光光度法于 490nm 处测其吸收值，用标准曲线测其多糖含量。

[0035] 用葡聚糖标准品 Dextron 系列标定本发明紫芝菌丝体多糖精制物的分子量的方法如下：（也请补充具体操作步骤及计算方法）

[0036] 单糖含量测定

[0037] 3,5-二硝基水杨酸试剂：精密称取 1.000g 3,5-二硝基水杨酸于 100mL 烧杯中，先加入 20mL 2mol/L 氢氧化钠溶液，再加入 30g 酒石酸钾钠，加水充分溶解定容至 500mL

[0038] 葡萄糖溶液配制：精密称取干燥好的葡萄糖 200mg，定溶至 100ml 配制成 2mg/ml 溶液，分别取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0ml 于 25ml 容量瓶中，分别加水补足 2ml，各加入 3,5-二硝基水杨酸 2ml，沸水煮 5min，立即冷却，用去离子水稀释至刻度，摇匀，在 550nm 处测其紫外吸收值，做标准曲线。

[0039] 样品检测：取样品 12mg 于 10ml 容量瓶中，加去离子水 2ml 使之溶解，再加 3,5-二硝基水杨酸 2ml，沸水煮 5min，立即冷却，加水稀释至刻度。在 550 处测其紫外吸收，带入标准曲线，算出单糖含量。

[0040] 采用高效凝胶法测定纯度及分子量

[0041] 色谱条件：TSK-GEL GMPWx1 色谱柱；流动相为水；流速：0.3mL/min；柱温 35℃；检测器为：示差检测器。

[0042] 标品 Dextron、多糖样品分别用水溶解，进样。

[0043] 测定葡聚糖 Dextron 系列和样品保留时间，以 Dextron 的保留时间 -Dextron 系列的分子量对数值做标准曲线，将多糖样品的保留时间带入标准曲线，可推知每个多糖峰的分子量。

[0044] 蛋白质阴性反应的具体步骤如下：

[0045] 茚三酮试液配制方法：0.2g 茚三酮溶于 100mL95%乙醇，浓度为 0.2%茚三酮反应（蛋白质鉴别）：将样品溶液滴于白瓷板（蒸发皿）上，加一滴茚三酮液，定性检测是否有蛋白质。

[0046] 实施例 1：

[0047] 处方组成

	组分	用量
	紫芝菌丝体多糖精制物	160mg
[0048]	甘露醇	900mg
	柠檬酸钠	250mg
	注射用水	50mL

[0049] 取紫芝菌丝体多糖精制物，用适量注射用水溶解，加入甘露醇和柠檬酸钠，搅拌 20 分钟，加入针剂活性炭 0.8mg，于 80℃加热 30 分钟，冷却后用孔径为 0.22 μm 微孔滤膜过滤，分装在西林瓶中，每瓶 2mL，至冻干箱冷冻干燥，封口，制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.45。

[0050] 实施例 2：

[0051] 处方组成

	组分	用量
	紫芝菌丝体多糖精制物	160mg
[0052]	甘露醇	900mg
	柠檬酸钠	70mg
	注射用水	50mL

[0053] 取紫芝菌丝体多糖精制物，用适量注射用水溶解，加入甘露醇和柠檬酸钠，搅拌 20 分钟，加入 0.5%针剂活性炭，于 80℃加热 30 分钟，冷却后用孔径为 0.22 μm 微孔滤膜过滤，分装在西林瓶中，每瓶 2mL，至冻干箱冷冻干燥，封口，制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.47。

[0054] 实施例 3：

[0055] 处方组成

	组分	用量
	紫芝菌丝体多糖精制物	192mg
[0056]	甘露醇	1000mg
	柠檬酸钠	540mg
	注射用水	50mL

[0057] 取紫芝菌丝体多糖精制物，用适量注射用水溶解，加入甘露醇和柠檬酸钠，搅拌 20 分钟，加入针剂活性炭 0.8mg，于 80℃加热 30 分钟，冷却后用孔径为 0.22 μm 微孔滤膜过

滤,分装在西林瓶中,每瓶 2mL,至冻干箱冷冻干燥,封口,制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.46。

[0058] 实施例 4:

[0059] 处方组成

	组分	用量
[0060]	紫芝菌丝体精制多糖	240mg
	甘露醇	1200mg
[0061]	柠檬酸钠	440mg
	注射用水	50mL

[0062] 取紫芝菌丝体多糖精制物,用适量注射用水溶解,加入甘露醇和柠檬酸钠,搅拌 20 分钟,加入针剂活性炭 1.6mg,于 80℃加热 30 分钟,冷却后用孔径为 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装在西林瓶中,每瓶 2mL,至冻干箱冷冻干燥,封口,制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.46。

[0063] 实施例 5:

[0064] 处方组成

	组分	用量
[0065]	紫芝菌丝体精制多糖	192mg
	聚乙二醇	1500mg
	注射用水	50mL

[0066] 取紫芝菌丝体多糖精制物,用适量注射用水溶解,加入聚乙二醇,搅拌 20 分钟,加入针剂活性炭 0.96mg,于 80℃加热 30 分钟,冷却后用孔径为 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装在西林瓶中,每瓶 2mL,至冻干箱冷冻干燥,封口,制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.44。

[0067] 实施例 6:

[0068] 处方组成

	组分	用量
[0069]	紫芝菌丝体精制多糖	160mg
	羟丙基 β 环糊精	800mg
	柠檬酸钠	320mg
	注射用水	50mL

[0070] 取紫芝菌丝体多糖精制物,用适量注射用水溶解,加入羟丙基 β 环糊精和柠檬酸钠,搅拌 20 分钟,加入针剂活性炭 0.8mg,于 80℃加热 30 分钟,冷却后用孔径为 0.22 μm 微

孔滤膜过滤,分装在西林瓶中,每瓶 2mL,至冻干箱冷冻干燥,封口,制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.46。

[0071] 实施例 7 :

[0072] 处方组成

	组分	用量
	紫芝菌丝体精制多糖	192mg
[0073]	聚乙二醇	1500mg
	磷酸二氢钠	500mg
	注射用水	50mL

[0074] 取紫芝菌丝体多糖精制物,用适量注射用水溶解,加入聚乙二醇和磷酸二氢钠,搅拌 20 分钟,加入针剂活性炭 0.96mg,于 80℃加热 30 分钟,冷却后用孔径为 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,分装在西林瓶中,每瓶 2mL,至冻干箱冷冻干燥,封口,制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.46。

[0075] 实施例 8 :

[0076] 处方组成

	组分	用量
	紫芝菌丝体精制多糖	160mg
[0077]	甘露醇	800mg
	磷酸二氢钠	50mg
	注射用水	50mL

[0078] 取紫芝菌丝体多糖精制物,用适量注射用水溶解,加入甘露醇和磷酸二氢钠,搅拌 20 分钟,加入针剂活性炭 0.8mg,于 80℃加热 30 分钟,冷却后用孔径为 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,分装在西林瓶中,每瓶 2mL,至冻干箱冷冻干燥,封口,制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.46。

[0079] 实施例 9 :

[0080] 处方组成

	组分	用量
	紫芝菌丝体精制多糖	192mg
[0081]	聚乙二醇	1200mg
	柠檬酸钠	400mg
	注射用水	50mL

[0082] 取紫芝菌丝体多糖精制物,用适量注射用水溶解,加入聚乙二醇和柠檬酸钠,搅拌 20 分钟,加入针剂活性炭 0.96mg,于 80℃加热 30 分钟,冷却后用孔径为 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装在西林瓶中,每瓶 2mL,至冻干箱冷冻干燥,封口,制取针剂。所得粉针剂 pH 为 7.47。实施例 10:本发明实施例 1、3、4、5 和 8 所制的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂对小鼠肝癌 H22,小鼠 Lewis 肺癌的疗效研究

[0083] 1. 动物

[0084] 品系:昆明小鼠

[0085] 生产许可证号:SCXK(沪)2003-0003

[0086] 使用许可证号:SYXK(沪)2004-0015

[0087] 体重:18-20g

[0088] 性别:雌雄兼有

[0089] 各组动物数:10 只,对照组 15 只(♀、♂各半)

[0090] 2. 移植性肿瘤

[0091] 小鼠肝癌 H22,小鼠 Lewis 肺癌。

[0092] 3. 试验方法

[0093] 取生长良好的小鼠肝癌 H22 腹水或 Lewis 肺癌瘤块,用生理盐水稀释(细胞浓度约 $1-2 \times 10^7$ 个/ml),每只小鼠右腋皮下接种 0.2ml,随机分组,接种后次日起以本发明实施例 1、3、4、5 和 8 所制的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂用注射用水配成溶液给药;阳性对照药物为双灵固本散(购自西安绿谷制药有限公司,批号为 070105),用注射用水配成溶液给药;空白对照为注射用水,给药体积为 0.5ml/20g 体重,小鼠肝癌 H22 连续腹腔注射 7 天,Lewis 肺癌连续腹腔注射 10 天。接种后 10 日解剖 H22,14 日解剖 Lewis 肺癌,取瘤块,称瘤重,结果判定根据以下公式:

[0094]

$$\text{肿瘤抑制率 \%} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100 \%$$

[0095] 4. 试验结果

[0096] 结果见表 1 和 2。

[0097] 表 1. 本发明实施例 1、3、4、5 和 8 所制的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂对小鼠肝癌 H22 的抑瘤作用

[0098]

组 别	剂 量	给 药	给药前体重	给药后体重	瘤重(g)	抑瘤率
	(mg/kg)	方 案	(g)	(g)	$\bar{x} \pm SD$	%
空白对照		ig×7	18.6±0.57	28.6±1.63	1.15±0.67	
实施例 1	2.223	ig×7	18.5±0.80	27.3±2.31	0.42±0.25	63.59
实施例 3	2.223	ig×7	18.6±0.65	27.9±1.59	0.40±0.27	65.17
实施例 4	2.223	ig×7	18.8±0.55	27.5±1.92	0.45±0.31	60.56
实施例 5	2.223	ig×7	18.6±0.67	27.7±2.34	0.49±0.29	57.40
实施例 8	2.223	ig×7	19.0±0.57	28.1±1.55	0.48±0.38	57.73
双灵固本散	250	ig×7	18.7±0.64	28.0±1.75	0.70±0.39	39.13

[0099] 表 2. 本发明实施例 1、3、4、5 和 8 所制的紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂对小鼠 Lewis 肺癌的抑瘤作用

[0100]

组 别	剂 量	给 药	给药前体重	给药后体重	瘤重(g)	抑瘤率
	(mg/kg)	方 案	(g)	(g)	$\bar{x} \pm SD$	%
空白对照		ig×10	18.5±0.54	26.5±2.23	1.87±0.33	
实施例 1	2.223	ig×10	18.4±0.71	30.5±1.58	0.84±0.64	54.93
实施例 3	2.223	ig×10	18.2±0.56	30.7±1.63	0.62±0.44	66.87
实施例 4	2.223	ig×10	18.5±0.60	30.9±1.29	0.53±0.34	71.58
实施例 5	2.223	ig×10	18.2±0.88	29.6±1.61	0.65±0.45	65.25
实施例 8	2.223	ig×10	18.4±0.54	30.4±1.55	0.74±0.51	60.47
双灵固本散	250	ig×10	18.4±0.73	28.5±1.72	1.15±0.67	38.51

[0101] 由表 1 和 2 的数据可见, 和传统中药制剂双灵固本散相比, 本发明紫芝菌丝体多糖精制物冻干粉针剂的给药剂量非常小, 然而抑瘤率却非常高。