



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105017441 B

(45)授权公告日 2018.01.16

(21)申请号 201510541581.4

(22)申请日 2015.08.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105017441 A

(43)申请公布日 2015.11.04

(73)专利权人 桂林茗兴生物科技有限公司

地址 541300 广西壮族自治区桂林市兴安县迎宾路(桂林市灵渠化工厂仓库)

(72)发明人 文继承

(74)专利代理机构 桂林市持衡专利商标事务所有限公司 45107

代理人 石晓玲

(51)Int.Cl.

C08B 37/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

郭雨桐.“灵芝多糖对结肠癌细胞增殖的抑制作用”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2013,(第01期),第E057-258页.

审查员 王春芬

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

灵芝多糖的提取方法

(57)摘要

本发明公开了一种灵芝多糖的提取方法,包括以下步骤:1)将灵芝乙醇提取,取滤渣备用;2)将滤渣水提,收集滤液备用;3)将滤液浓缩浸膏,乙醇沉淀,离心得沉淀;4)将沉淀依次无水乙醇、丙酮分别洗涤,将洗涤后的沉淀用蒸馏水溶解,过截留分子量为5万的中空纤维膜,收集浓缩液,然后将浓缩液过截留分子量为8万的中空纤维膜,收集透过液离心,过滤,取滤液备用;5)往滤液加入活性炭脱色,过滤,取滤液喷雾干燥,即为灵芝多糖。本发明的灵芝多糖纯度高,色泽洁白,且抗肿瘤活性强。

1. 灵芝多糖的提取方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将灵芝破碎,用6~12倍重量80~95v%乙醇回流提取2~3次,每次回流2~3h,过滤,取滤渣备用;

2) 将滤渣用6~12倍重量的水回流提取2~3次,每次提取2~3h,过滤,收集滤液备用;

3) 将滤液浓缩至60℃下相对密度为1.1~1.3的浸膏,加入乙醇沉淀,离心得沉淀;

4) 将沉淀依次用2~4倍重量的无水乙醇、丙酮分别洗涤,将洗涤后的沉淀用2~4倍蒸馏水溶解,过截留分子量为5万的中空纤维膜,收集浓缩液,然后将浓缩液过截留分子量为8万的中空纤维膜,收集透过液离心,过滤,取滤液备用;

5) 往滤液加入活性炭脱色,过滤,取滤液喷雾干燥,即为灵芝多糖。

2. 根据权利要求1所述的灵芝多糖的提取方法,其特征在于:步骤3)中,往浸膏中加入90~95v%的乙醇至乙醇含量为80~85v%。

3. 根据权利要求1所述的灵芝多糖的提取方法,其特征在于:步骤5)中,活性炭的添加量为滤液重量的1~3%。

## 灵芝多糖的提取方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物提取技术领域,具体涉及灵芝多糖的提取方法。

### 背景技术

[0002] 灵芝多糖是灵芝的重要化学成分之一,具有抗肿瘤、免疫调节、降血糖、降血脂、抗氧化和抗衰老等作用,还可作为抗肿瘤和放射治疗的有效辅助治疗药物。然而,灵芝多糖由于提取工艺落后,得到的产品呈黄褐色,这是由于灵芝多糖中色素含量较多,影响了灵芝多糖的色泽,不仅如此,杂质含量过高的灵芝多糖的抗癌活性也较差。

### 发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是提供一种灵芝多糖的提取方法,该方法得到的灵芝多糖纯度高,且抗癌活性好。

[0004] 本发明提供的技术方案是灵芝多糖的提取方法,包括以下步骤:

[0005] 1) 将灵芝破碎,用6~12倍重量80~95v%乙醇回流提取2~3次,每次回流2~3h,过滤,取滤渣备用;

[0006] 2) 将滤渣用6~12倍重量的水回流提取2~3次,每次提取2~3h,过滤,收集滤液备用;

[0007] 3) 将滤液浓缩至60℃下相对密度为1.1~1.3的浸膏,加入乙醇沉淀,离心得沉淀;

[0008] 4) 将沉淀依次用2~4倍重量的无水乙醇、丙酮分别洗涤,将洗涤后的沉淀用2~4倍蒸馏水溶解,过截留分子量为5万的中空纤维膜,收集浓缩液,然后将浓缩液过截留分子量为8万的中空纤维膜,收集透过液离心,过滤,取滤液备用;

[0009] 5) 往滤液加入活性炭脱色,过滤,取滤液喷雾干燥,即为灵芝多糖。

[0010] 步骤3)中,往浸膏中加入90~95v%的乙醇至乙醇含量为80~85v%。

[0011] 步骤5)中,活性炭的添加量为滤液重量的1~3%。

[0012] 步骤4)中,洗涤后的沉淀溶于蒸馏水后,先过截留分子量为5万的中空纤维膜,这样活性分子量低于5万的多糖以及低聚糖、单糖和色素均随着透过液流出,收集的浓缩液过截留分子量为8万的中空纤维膜,大分子蛋白质以及分子量高于8万的多糖被截留,收集透过液。

[0013] 本发明两次过中空纤维膜,不仅可以最大程度地去除杂质和色素,以保证成品纯度和色泽,且提取得到的灵芝多糖分子量在5万~8万之间,其抗肿瘤活性比其他区间范围内的多糖活性要高。

### 具体实施方式

[0014] 以下具体实施例对本发明作进一步阐述,但不作为对本发明的限定。

[0015] 实施例1

[0016] 1) 将灵芝破碎,用6倍重量80v%乙醇回流提取2次,每次回流2h,过滤,取滤渣备

用;

[0017] 2) 将滤渣用6倍重量的水回流提取2次,每次提取2h,过滤,收集滤液备用;

[0018] 3) 将滤液浓缩至60℃下相对密度为1.1的浸膏,往浸膏中加入90v%的乙醇至乙醇含量为80v%沉淀,离心,得到沉淀;

[0019] 4) 将沉淀依次用2倍重量的无水乙醇、丙酮分别洗涤,将洗涤后的沉淀用2倍蒸馏水溶解,过截留分子量为5万的中空纤维膜,收集浓缩液,然后将浓缩液过截留分子量为8万的中空纤维膜,收集透过液离心,过滤,取滤液备用;

[0020] 5) 往滤液加入活性炭脱色,活性炭的添加量为滤液重量的1%,过滤,取滤液喷雾干燥,即为灵芝多糖。用苯酚-硫酸法测定多糖含量为92.3%,颜色为白色。

[0021] 对照组

[0022] 1) 将灵芝破碎,用6倍重量80v%乙醇回流提取2次,每次回流2h,过滤,取滤渣备用;

[0023] 2) 将滤渣用6倍重量的水回流提取2次,每次提取2h,过滤,收集滤液备用;

[0024] 3) 将滤液浓缩至60℃下相对密度为1.1的浸膏,往浸膏中加入90v%的乙醇至乙醇含量为80v%沉淀,离心,得到沉淀;

[0025] 4) 将沉淀依次用2倍重量的无水乙醇、丙酮分别洗涤,将洗涤后的沉淀用2倍蒸馏水溶解,上D303型大孔树脂,用水洗脱至流出液无色透明,收集流出液,浓缩,喷雾干燥,即为灵芝多糖。用苯酚-硫酸法测定多糖含量为88.3%,颜色为浅黄色。

[0026] 实施例2

[0027] 1) 将灵芝破碎,用12倍重量95v%乙醇回流提取3次,每次回流3h,过滤,取滤渣备用;

[0028] 2) 将滤渣用12倍重量的水回流提取3次,每次提取3h,过滤,收集滤液备用;

[0029] 3) 将滤液浓缩至60℃下相对密度为1.3的浸膏,往浸膏中加入95v%的乙醇至乙醇含量为85v%沉淀,离心,得到沉淀;

[0030] 4) 将沉淀依次用4倍重量的无水乙醇、丙酮分别洗涤,将洗涤后的沉淀用4倍蒸馏水溶解,过截留分子量为5万的中空纤维膜,收集浓缩液,然后将浓缩液过截留分子量为8万的中空纤维膜,收集透过液离心,过滤,取滤液备用;

[0031] 5) 往滤液加入活性炭脱色,活性炭的添加量为滤液重量的3%,过滤,取滤液喷雾干燥,即为灵芝多糖。用苯酚-硫酸法测定多糖含量为91.8%,颜色为白色。

[0032] 实施例3

[0033] 1) 将灵芝破碎,用10倍重量90v%乙醇回流提取2次,每次回流2h,过滤,取滤渣备用;

[0034] 2) 将滤渣用10倍重量的水回流提取2次,每次提取2h,过滤,收集滤液备用;

[0035] 3) 将滤液浓缩至60℃下相对密度为1.2的浸膏,往浸膏中加入95v%的乙醇至乙醇含量为85v%沉淀,离心,得到沉淀;

[0036] 4) 将沉淀依次用3倍重量的无水乙醇、丙酮分别洗涤,将洗涤后的沉淀用3倍蒸馏水溶解,过截留分子量为5万的中空纤维膜,收集浓缩液,然后将浓缩液过截留分子量为8万的中空纤维膜,收集透过液离心,过滤,取滤液备用;

[0037] 5) 往滤液加入活性炭脱色,活性炭的添加量为滤液重量的2%,过滤,取滤液喷雾

干燥,即为灵芝多糖。用苯酚-硫酸法测定多糖含量为92.0%,颜色为白色。

[0038] 为验证本发明的灵芝多糖的抗癌活性,现进行以下动物实验。

[0039] 1、抗Lewis肺癌活性实验

[0040] 取清洁级C57BL/6小鼠30只,小鼠体重18~20g,随机分为3组,每组10只,分别为实验组,阴性对照组和阳性对照组。

[0041] 取生长旺盛的小鼠Lewis肺癌肿瘤细胞以常规方法制成匀浆约 $1\sim 2\times 10^7$ cfu/ml的癌细胞悬浮液,于每只小鼠的右腋皮下接种0.2ml癌细胞悬浮液,24h后,各组开始每日口服给药一次,实验组给药实施例1的灵芝多糖,阴性对照组给药生理盐水,阳性对照组给药对照例1的灵芝多糖,给药剂量见下表1,连续给药10天。停药后次日处死所有动物,截取足趾称重并计算肿瘤抑制率。肿瘤生长抑制率按下列公式计算,抑制率(%) = (阴性对照组瘤重-实验组/阳性对照组瘤重) / 阴性对照组瘤重  $\times 100$ 。

[0042] 表1

[0043]

	剂量 (mg/kg)	动物增重 (g)	瘤重 (g)	抑制率 (%)
阴性对照组	1ml	3.0	2.80 $\pm$ 0.33	
阳性对照组	2000	2.9	1.78 $\pm$ 0.07	36.42*
实验组	2000	1.8	1.16 $\pm$ 0.16	58.57**

[0044] 注:与阴性对照组相比,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ 。

[0045] 由上表可知,采用常规方法提取的灵芝多糖对小鼠Lewis肺癌的抑制率达36.42%,而本发明提取的灵芝多糖对小鼠Lewis肺癌的抑制率高达58.57%,明显优于常规灵芝多糖。

[0046] 2、抗C-26结肠癌活性实验

[0047] 取清洁级C57BL/6小鼠30只,小鼠体重18~20g,随机分为3组,每组10只,分别为实验组,阴性对照组和阳性对照组。

[0048] 取生长旺盛的小鼠C-26结肠癌肿瘤细胞以常规方法制成匀浆约 $1\sim 2\times 10^7$ cfu/ml的癌细胞悬浮液,于每只小鼠的右腋皮下接种0.2ml癌细胞悬浮液,24h后,各组开始每日口服给药一次,实验组给药实施例1的灵芝多糖,阴性对照组给药生理盐水,阳性对照组给药对照例1的灵芝多糖,给药剂量见下表2,连续给药10天。停药后次日处死所有动物,截取足趾称重并计算肿瘤抑制率。肿瘤生长抑制率按下列公式计算,抑制率(%) = (阴性对照组瘤重-实验组/阳性对照组瘤重) / 阴性对照组瘤重  $\times 100$ 。

[0049] 表2

[0050]

	剂量 (mg/kg)	动物增重 (g)	瘤重 (g)	抑制率 (%)
阴性对照组	1ml	3.8	2.99 $\pm$ 0.26	
阳性对照组	2000	3.8	2.11 $\pm$ 0.23	29.43**
实验组	2000	1.9	1.22 $\pm$ 0.06	59.19**

[0051] 注:与阴性对照组相比,\*, $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ 。

[0052] 由上表可知,采用常规方法提取的灵芝多糖对小鼠C-26结肠癌的抑制率达29.43%,而本发明提取的灵芝多糖对小鼠Lewis肺癌的抑制率高达59.19%,明显优于常规

灵芝多糖。