[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510101678.X

[43] 公开日 2006 年 5 月 24 日

[11] 公开号 CN 1775813A

[22] 申请日 2005.11.30
[21] 申请号 200510101678.X
[71] 申请人 华南理工大学
地址 510640 广东省广州市天河区五山路 381 号
[72] 发明人 郭祀远 周 林 李 琳 郑必胜 蔡妙颜 王兆梅 肖凯军 魏 东
[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司
代理人 何淑珍

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

羧甲基裂褶多糖制备方法及在化妆品和抗肿瘤药物中应用

[57] 摘要

本发明公开了一种羧甲基裂褶多糖制备方法及在化妆品和抗肿瘤药物中应用。 本发明通过将裂褶多糖进行羧甲基化，从而将中性的裂褶多糖转化为带负电荷的羧酸纳盐，在显著改善其溶解性能的前提下，仍保持良好的流变性能和抗肿瘤活性。 本发明通过用化学试剂对多糖中的羟基进行取代，通过反应条件控制羧甲基裂褶多糖的分子量和取代度，使其具有良好的溶解性能和抗肿瘤活性。 用本发明制备的羧甲基裂褶多糖可以应用在化妆品、抗肿瘤药物、食品等方面。

1．一种羧甲基裂褶多糖的制备方法，其特征在于步骤如下：

（1）在裂褶多糖中加入 5～25 倍质量的异丙醇或丙酮或水，搅拌速率为100r/min，浸润时间为 30～60min；

（2）在上述溶液中加入 0.2～1 倍体积的 20%～30%的氢氧化钠溶液，搅拌 0.4～2h，搅拌速率为 100～300r/min；

（3）再加入 0.1～0.2 倍体积的 2～5 mol/L 氯乙酸溶液，搅拌速率为 100～500r/min，同时控制溶液的温度在 40～100℃，反应 1～4h；

（4）用 10.0 mol/L 的乙酸调节产物 pH 为 6～7，用截留分子量为 30～100kD 的超滤膜进行透析和浓缩，并将浓缩液进行干燥，得到羧甲基裂褶多糖。

2.根据权利要求 1 所述的羧甲基裂褶多糖的制备方法，其特征在于步骤(4)中的干燥是冷冻干燥或喷雾干燥。

3.权利要求1或2制备的羧甲基裂褶多糖在化妆品和抗肿瘤药物中的应用。

羧甲基裂褶多糖制备方法及在化妆品和抗肿瘤药物中应用

技术领域

本发明属于羧甲基裂褶多糖领域，尤其涉及羧甲基裂褶多糖制备方法及在化妆品和抗肿瘤药物中应用。

背景技术

裂褶多糖（Schizophyllan）是由药用真菌裂褶菌（*Schizophyllum commune Fries*）深层发酵产生的一种中性的胞外多糖。裂褶多糖具有β-(1-6)葡萄糖苷分支的β-(1-3)-D葡聚糖结构，主链上每隔3个葡萄糖单元产生一个分支。由于其具有良好的理化性质（如流变学特性）和生理活性（如抗肿瘤、抗衰老），引起了国内外研究人员的重视。但研究过程中我们发现，由于裂褶多糖分子量较大和独特的三螺旋结构，干燥后的裂褶多糖在水中溶解缓慢，且很难完全溶解，即使以DMSO（二甲基亚砜）作为溶剂也是如此。Udo R也曾有相似的报道(Udo R. Carbohydrate Biotechnology Protocols,10,1999)。这极大地限制了其在食品、化妆品和药物开发中的应用。而且高分子量的裂褶多糖在用作注射药物时，有比较大的副作用，疗效欠佳。日本Taito公司1978申请的专利（专利号US 4098661）就是采用超声降解的方法，降低裂褶多糖的分子量，并将其作为抗肿瘤药物。韩国的Pacific公司1999申请了将裂褶多糖用于皮肤抗衰老的专利（专利号JP 11313667）。有研究表明，虽然高分子量的裂褶多糖由于溶解性问题会影响其应用，但是要发挥其流变特性和抗肿瘤活性又必须保证一定大小的分子量。如Takemasa K报道(Takemasa K, et al.,Agri.Biol.Chem,50,1,1986)在水溶液中，只有三股螺旋的裂褶菌多糖（分子量大于10^5）有较高的

活性，分子量小于 5×10^4 的裂褶菌多糖不具备三股螺旋结构，也没有抗肿瘤活性。多糖改性的方法一般分为物理方法、化学方法和酶法，常用的是物理方法和化学方法。而用物理超声对裂褶多糖进行改性存在作用时间长，效率低、能耗和噪音大，振动杆易腐蚀等问题。而采用一般化学改性虽有反应快、能耗低的优点，但产物的分子量和性质都难以控制。

发明内容

本发明的目的在于提供一种羧甲基裂褶多糖的制备方法。

本发明的另一个目的在于提供羧甲基裂褶多糖在化妆品和抗肿瘤药物中的应用。

本方法针对目前裂褶多糖的应用技术存在的问题，利用氯乙酸、氢氧化钠等常规化学试剂对裂褶多糖进行化学改性，制备出具有良好水溶性的羧甲基裂褶多糖。

本发明通过将裂褶多糖进行羧甲基化，从而将中性的裂褶多糖(重均分子量 M_w 为 2.5×10^7)转化为带负电荷的羧酸纳盐（M_w 为 2.0×10^5～1.0×10^7），在显著改善其溶解性能的前提下，仍保持良好的流变性能和抗肿瘤活性。

本发明通过用化学试剂对多糖中的羟基进行取代，通过反应条件控制羧甲基裂褶多糖的分子量和取代度，使其具有良好的溶解性能和抗肿瘤活性。

羧甲基裂褶多糖的制备方法如下：

（1）在裂褶多糖中加入 5～25 倍质量（W/W）的异丙醇或丙酮或水，搅拌速率为 100r/min，浸润时间为 30～60min；

（2）在上述溶液中加入 0.2～1 倍体积（V/V）的 20%～30%的氢氧化钠（wt%）溶液，搅拌 0.4～2h，搅拌速率为 100～300r/min；

（3）再加入0.1～0.2倍体积（V/V）的2～5 mol/L氯乙酸溶液，搅拌速率为100～500r/min，同时控制溶液的温度在40～100℃，反应1～4h；

（4)用10.0 mol/L的乙酸调节产物pH为6～7,用截留分子量为30～100kD的超滤膜进行透析和浓缩，并将浓缩液进行干燥，得到羧甲基裂褶多糖。

所述步骤（4）中的干燥是冷冻干燥或喷雾干燥。

羧甲基裂褶多糖在化妆品和抗肿瘤药物中的应用：

将浓度为0.2mg/mL的羧甲基裂褶多糖水溶液按10mg/kg/d的剂量腹腔注射20±5 g荷瘤小鼠（S-180肉瘤或GLC-82肺癌或HEPG-2肝癌），连续10d，肿瘤抑制率可以达到50％以上。

另外，在传统的保湿和润肤化妆品中添加0.1％～0.6％羧甲基裂褶多糖，可以有效的提高其吸湿和保湿效果，同时具有营养肌肤的功效。

本发明与现有技术相比，具有如下优点和有益效果：

（1）本发明采用化学改性的方法制备出羧甲基裂褶多糖，解决了裂褶多糖干燥后难以溶解的问题；

（2）本发明采用异丙醇或丙酮或水溶液与氢氧化钠－氯乙酸的反应体系，不仅原料简单、成本低，而且反应速度快、容易控制；

（3）本发明采用膜分离技术可以简化工艺、降低成本；

（4）通过控制化学改性的条件，可以制备不同分子量和取代度的羧甲基化裂褶多糖；

（5）本发明的产物易于溶解，同时保留了裂褶多糖的生理活性，可以更为广泛地应用于食品、化妆品、药品的生产。

具体实施方式

为了更好地理解本发明，下面结合实施例对本发明作进一步地描述。

实施例 1

10g 裂褶多糖，加入 100mL 异丙醇至 500mL 反应器中，100r/min 搅拌 60min；加入 100mL 30%氢氧化钠溶液，100r/min 搅拌 2h；加入 25ml 4mol/L 的氯乙酸溶液，60℃反应 3h，搅拌转速为 300r/min；反应结束后用 10.0 mol/L 的乙酸调节 pH 为 6，反应液经 50KD 的超滤膜脱盐、浓缩和冷冻干燥得到白色海绵状的羧甲基裂褶多糖 CM1。

实施例 2

6g 裂褶多糖，加入 30mL 水，100r/min 搅拌 30min；加入 6mL 20%氢氧化钠溶液，300r/min 搅拌 25min；加入 6mL 3mol/L 的氯乙酸溶液，100℃反应 1h，搅拌转速为 100r/min；反应结束后用 10.0 mol/L 的乙酸调节 pH 为 7；反应液经 30KD 的超滤膜脱盐、浓缩和喷雾干燥得到白色粉末状的羧甲基裂褶多糖 CM2。

实施例 3

10 g 裂褶多糖，加入 250mL 丙酮，100r/min 搅拌 40min；加入 100mL 25%氢氧化钠溶液至 500mL 反应器中，200r/min 搅拌 1h；加 35ml 2mol/L 的氯乙酸溶液，45℃反应 2h，搅拌转速为 500r/min；反应结束后用 10.0 mol/L 的乙酸调节 pH 为 6.5；反应液经 100KD 的超滤膜脱盐、浓缩和冷冻干燥得到白色海绵状的羧甲基裂褶多糖 CM3。

应用实施例 1

将浓度为 0.2mg/mL 羧甲基裂褶多糖 CM1 按 10mg/kg/d 的剂量对 20±5g 荷 S-18 肉瘤的昆明小鼠腹腔注射，连续 10d，肿瘤抑制率可以达到 60%。

应用实施例 2

将浓度为 0.2mg/mL 羧甲基裂褶多糖 CM3 按 10mg/kg/d 的剂量对 20±5g 荷 HEPG-2 肝癌的 BALB/c 小鼠腹腔注射，连续 10d，肿瘤抑制率可以达到 53%。

应用实施例 3

采用以下配方（wt%）：液体石蜡 10.0，角鲨烷 2.5，甘油 4.0，羧基乙烯聚合物 0.1，氢氧化钾 0.1，乳酸链球菌素 0.1，羧甲基裂褶多糖(CM2) 0.3，加去离子水至 100，可以起到更好的保湿和促进表皮细胞的增值和分化的作用。通过吸湿和保湿性能的模拟试验（结果见表 1）表明，CM2 和 CM3 的吸湿和保湿综合性能优于传统保湿剂甘油以及透明质酸钠。

表 1 CM2 和 CM3 的保湿性能和甘油、透明质酸钠的比较

试样	吸湿率（48 h）	保湿率（48 h）	吸湿率（168 h）	保湿率（168h）
甘油	24.2%	75.1%	67.9%	6.8%
透明质酸钠	16.1%	36.5%	40.7%	1.0%
CM2	43.8%	53.3%	112.1%	3.5%
CM3	44.7%	54.1%	113.7%	3.1%

测试条件：25℃，相对湿度 46%。