



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95104764.7

[43] 授权公告日 2003 年 2 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1102154C

[22] 申请日 1995.4.22 [21] 申请号 95104764.7

[30] 优先权

[32] 1994. 4.22 [33] DE [31] P4414138.6

[71] 专利权人 电化学工业有限公司(国际)

地址 联邦德国慕尼黑

[72] 发明人 罗尔夫·希尔森科恩

[56] 参考文献

JP 平 6 - 9709A 1994.01.18 C08B37/16

JP 平 6 - 9709A 1994.01.18 C08B37/16

US5288916 1994.02.22 C07C45/79

审查员 郭 俭

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

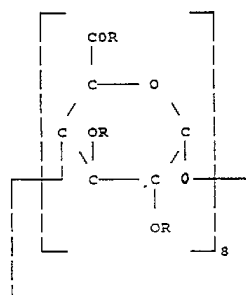
代理人 于 辉

权利要求书 2 页 说明书 18 页

[54] 发明名称 酰化 γ - 环糊精混合物、其制备方法和用途

[57] 摘要

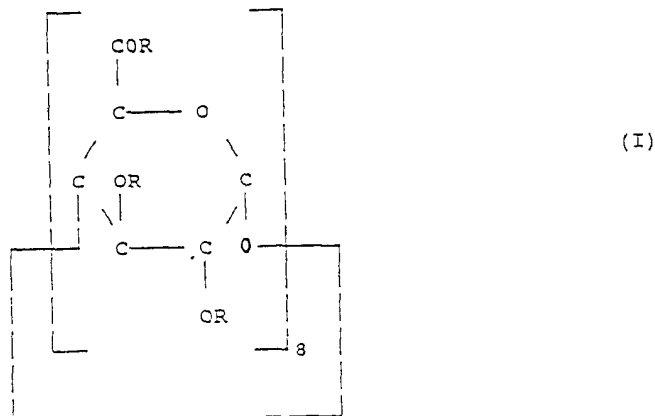
本发明涉及一种下式(I)的酰化环糊精: 其中 R 不同时为氢, 和/或 R 为 R₁, 并且 R₁ 是相同或不同的, 且为乙酰基、丙酰基、丁酰基、2 - 烷氧基乙酰基、2 - 氯乙酰基、2 - 氟乙酰基、2 - N - 乙酰氨基乙酰基、异丁烯酰基或丙烯酰基, 用¹HNMR 光谱所测定的 R₁ 的 DS 为 0.3 - 2.0。



(I)

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种下式 (I) 的酰化 γ -环糊精混合物:



其中 R 不同时为氢, 和/或 R 为 R1, 并且

R1 是相同或不同的, 且为乙酰基、丙酰基、丁酰基、2-烷氧基乙酰基、2-氯乙酰基、2-氟乙酰基、2-N-乙酰氨基乙酰基、异丁烯酰基或丙烯酰基, ^1H -NMR 光谱所测定的 R1 的 DS 为 0.6-1.4, 并且取代基的分布是随机的, 在葡萄糖 6 位上的羟基被取代的数目小于 90%。

2、根据权利要求 1 的酰化 γ -环糊精混合物, 其中式 (I) 中的 R1 为乙酰基、丙酰基或丁酰基。

3、根据权利要求 1 的酰化 γ -环糊精混合物, 其中式 (I) 中的 R1 为乙酰基。

4、根据权利要求 1 的酰化 γ -环糊精混合物, 其中在葡萄糖 6 位上的羟基被取代的数目小于 85%。

5、一种制备如权利要求 1 所述的酰化 γ -环糊精

混合物的方法，其特征在于使 γ - 环糊精在碱性催化剂的存在下与至少一种酰化剂进行反应，反应温度为 80 - 150°C，环糊精与酰化剂的摩尔比为每摩尔环糊精用 2 - 35 摩尔酰化剂。

6、根据权利要求 5 的方法，其中所用酰化剂为乙酸酐、丙酸酐、丁酸酐、2 - 氯乙酸酐、2 - 氟乙酸酐、丙烯酸酐或甲基丙烯酸酐，它们或单独使用或以任意混合物的形式使用。

7、如权利要求 1 所述的酰化 - γ - 环糊精混合物在加溶药物活性化合物中的应用。

酰化 γ -环糊精混合物、其制备方法和用途

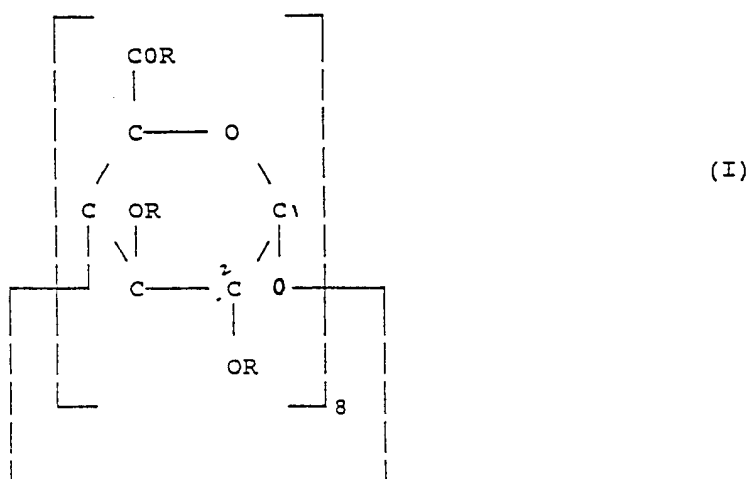
本发明涉及酰化 γ -环糊精及其制备方法和应用。

环糊精是由6、7或8个 α (1-4) -键相连的葡萄糖单元组成的环状低聚糖的总称。通过酶的作用转化淀粉而制成的 α -环糊精、 β -环糊精或 γ -环糊精它们的空腔 (c a v i t y) 直径是不同的, 这些空腔通常能够包结大量分子大小不同的疏水性外来分子。

然而, 由于天然 γ -环糊精 (γ -CD) 的溶解度只有18.7% (重量), 因此其在水中的溶解性相对较差, 并且加溶能力也较低。例如, US 4, 764, 604 栏1 最后一段, 栏7 / 8 表指出 γ -CD 只能在低浓度范围内加溶, 而在较高浓度时其配合物往往会沉淀出来。US 4, 764, 604 同时还指出通过形成醚可以提高 γ -CD 的溶解性和改善加溶特性。人们知道甲基- γ -CD 可溶于水并具有平均加溶性。虽然羟基丙基- γ -CD 衍生物具有良好的溶血性, 但它们的加溶性只是一般。如上述所列举的那些 γ -CD 醚, 它们的另一缺点是生物降解很困难。

本发明的目的是制备这样一类有用的 γ -CD 衍生物, 其加溶性好于羟丙基- γ -CD 衍生物, 具有良好的溶血性, 易溶于水并且还容易被生物降解。

本发明的目的是通过下式 (I) 酰化环糊精而实现的:



其中R不同时为氢，和/或R为R₁，并且

R₁是相同或不同的，且为乙酰基、丙酰基、丁酰基、2-烷氧基乙酰基、2-氯乙酰基、2-氟乙酰基、2-N-乙酰氨基乙酰基、异丁烯酰基或丙烯酰基，¹H NMR光谱所测定的R₁的DS为0.3-2.0。

在式(I)中R₁优选乙酰基、丙酰基或丁酰基；特别优选乙酰基。

R₁的DS优选0.4-1.6，特别优选0.6-1.4。

本发明环糊精衍生物上取代基的分布优选是随机的，优选的是，在葡萄糖6位上的羟基被取代的数目小于90%，更优选的是羟基被取代的数目小于85%，尤其优选的是，羟基被取代的数目小于80%。

本发明的γ-环糊精衍生物在水中具有良好的溶解性，并同时兼有良好的加溶性和溶血性。另外，它们是可生物降解的，即由在自然界中及在胃肠中的酯酶和脂酶代谢转化为γ-CD，已知γ-CD具有可接受的毒理学特性 (G. Antlsperger, Minutes of the 6th Internatio

nal Symposium on Cyclodextrins, Chicago, 21-24 April 1992, Editions de Sante, Paris, 277)。

本发明的环糊精衍生物兼有良好的产品特性与毒理学特性,尤其是R1的DS为0.90-1.20的衍生物是特别合适的。

酰化环糊精混合物是以其平均取代度(DS值)表征的。DS值表明每一葡萄糖酐上平均键合的取代基数目。

DS值例如可以通过¹H NMR光谱法在一适宜溶剂如二甲亚砜/三氟乙酸中测得。为了测定DS值,分别将酰基基团(积分-a c)的信号和糖质子(积分-s u)的信号求积分,再分别除以酰基取代基中的质子数或糖质子数,然后建立它们彼此的关系式。

还可以从取代基的分布确定DS。以它们的结构式为基础,环糊精可以在2位、3位和/或6位上被取代。例如,通过将产物甲基化,然后水解为葡萄糖单元,再通过还原和乙酰化作用将它们转化为D-葡萄糖醇乙酸酯,可以确定DS值(P. Mischnick, Analysis of the Substitution Pattern of Chemically Modified Cyclodextrins in Dominique Duchene, New Trends in Cyclodextrins and Derivatives, Editions des Santes, Paris)由气相色谱分馏能够得出在具体环糊精衍生物中8种理论上可能的葡萄糖单元所占的摩尔比例,这8种葡萄糖单元如下所列:

乙酰氧基数目	位置	D - 葡萄糖醇乙酸酯
3	S2,3,6	D-葡萄糖醇六乙酸酯
2	S3,6	1,3,4,5,6-五-O-乙酰基- 2-——O-甲基-D-葡萄糖醇
2	S2,6	1,2,4,5,6-五-O-乙酰基- 3-——O-甲基-D-葡萄糖醇
2	S2,3	1,2,3,4,5-五-O-乙酰基- 6-——O-甲基-D-葡萄糖醇
1	S6	1,4,5,6-四-O-乙酰基- 2,3-二-O-甲基-D-葡萄糖醇
1	S3	1,3,4,5-四-O-乙酰基- 2,6-二-O-甲基-D-葡萄糖醇
1	S2	1,2,4,5-四-O-乙酰基- 3,6-二-O-甲基-D-葡萄糖醇
0	S0	1,4,5-三-O-乙酰基-2, 3,6-三-O-甲基-D-葡萄糖醇

用测出的各葡萄糖单元的摩尔百分数也可以计算得出每一位置上的平均取代度。在一具体位置上的取代基的平均概率X按如下所示X6（取代基在6位上的平均

概率) 进行计算:

$$X_6 = m o l \% S_6 + m o l \% S_{2,6} + m o l \% S_{3,6} + m o l \% S_{2,3,6}$$

用类似的方法可以计算出取代基在2位和3位上的平均取代度。借助取代基分布也可以确定取代度。

本发明还涉及一种制备酰化 γ -环糊精衍生物的方法, 在该方法中, γ -环糊精在碱性催化剂存在下与至少一种酰化剂进行反应。

本发明方法可以使用商品级质量且含水量为0 - 16 % 的 γ -环糊精。但是也可以按已知方法制备环糊精, 如利用环糊精糖基转移酶 (C G T a s e E . C . 2 . 4 . 1 . 1 9) 在酶的作用下转化淀粉来制备环糊精。由于成本的原因, 优选使用含水量为6 - 12 % 的 γ -环糊精, 这种 γ -环糊精是可商购的 (如可从W a c k e r - C h e m i e G m b H (M u n i c h) 获得, 牌号为G A M M A W 8) 。

所用酰化剂优选为至少一种羧酸酐或一种羧酸。特别优选使用乙酸酐、丙酸酐、丁酸酐、2 - 氯乙酸酐、2 - 氟乙酸酐、丙烯酸酐、甲基丙烯酸酐, 或相应的羧酸, 单独或以任意混合物的形式使用。尤其优选使用乙酸酐或乙酸。

作为催化剂, 优选使用羧酸酐的相应酸的碱金属盐, 例如乙酸钠、乙酸钾、丙酸钠、丙酸钾、丁酸钠或丁酸钾, 和/ 或叔胺如三乙胺或吡啶, 和/ 或碱性离子交换剂 (如R o h m & H a s s 的A m b e r l i t e A 2 1 或A m b e r l i t e I R A - 9 3) 。特别优选使用乙酸钠。

本发明可以在不附加任何溶剂的情况下, 用酰化剂

直接进行酰化反应。

如果采用至少一种惰性溶剂进行稀释的话，对于产物的着色是有利的。所述的溶剂并非是指所有的反应成分都需溶解在该溶剂中。反应也可以在含一种或多种试剂的悬浮液或乳浊液中进行。适用的惰性溶剂的实例有乙酸、丙酸、丁酸、甲酰胺、甲基甲酰胺、二甲基甲酰胺。N-甲基吡咯烷酮、DMPU (1, 3-二甲基-3, 4, 5, 6-四氢-2 (1H)-嘧啶酮)、乙酰胺、甲基乙酰胺或二甲基乙酰胺。

当采用羧酸酐作为酰化剂时，如果使用与该酰化剂相应的羧酸作为稀释溶剂是特别有益的，也就是说，例如，当采用乙酸酐作酰化剂时，如果用乙酸作为溶剂将是有益的。

每摩尔 γ -环糊精优选使用2-3.5 mol、更优选3-20 mol、特别优选5-15 mol的酰化剂。在本文中，每种情况下所用的摩尔比是根据要求的取代程度和所用环糊精的含水量而选择的。

每摩尔 γ -环糊精优选使用0.01-5 mol、特别是0.5-3 mol的至少一种所说的催化剂。

γ -环糊精和反应介质所用量之比优选为 γ -CD比反应介质为1:0.5-1:10，更优选1:1-1:6，所说的反应介质是指酰化剂与溶剂的总克数。反应介质最好是以基本上无水的形式采用。

为了制备本发明的 γ -环糊精，把环糊精、酰化剂、催化剂和反应介质按给定比例或同时或依次添加到一起。除去反应中的水份有利于酰化剂的结合速率。

为了保持放热反应处于控制状态下，优选在升高的温度（约80°C-120°C）下向其余组分的混合物中

滴加酰化剂。

在升高的温度（约80 °C - 150 °C）下搅拌反应混合物，该反应混合物通常为一种悬浮液。一般说来，反应结束时的特征是反应混合物变澄清，这时开始时的悬浮液变为溶液。

在部分真空条件下，蒸馏出挥发性成分，提取出水中的残留物，再次于部分真空条件下蒸发该溶液。这些操作步骤优选重复进行几次，如进行三次。

将如此获得的含有本发明的酰化 γ -环糊精的水溶液通过已知方法（如用沉淀法或渗析法除去盐或溶剂残留物）进一步提纯，再干燥（如冷冻干燥或喷雾干燥）。

因此，本发明的方法是一种简单的无需复杂提纯步骤的制备酰化 γ -环糊精的方法。本发明的方法可以仅在一部反应步骤中，在催化剂存在下，通过使天然CD与酰化剂反应直接制备酰化CD。

本发明的方法是先进的，因为按照以往纤维素化学所采用的方法（如D. Blaser等人的“Cellulose Esters” in Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th Edition Ed. E. Gerhartz, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1986, P 419 - 459），一般在开始时制得的酰化产物产率高，随后进行水解，直到达到要求的取代度。

本发明方法由于避免了水解步骤从而避免了水解产物的生成，由此解决了提纯问题。

本发明方法具有灵活性，一般通过简单改变酰基给

体即可使用。该方法是经济的。由于生成有作为化学计量付产物的易挥发性化合物，而这些付产物可以通过蒸馏这样的简单方法分离出去，该方法是催化操作的。本发明方法所达到的转化是定量的。

如果需要，可以用已知方法，如利用沉淀法、离子交换色谱法、渗析法、柱色谱法或制备HPLC法进一步提纯环糊精衍生物。

本发明的环糊精衍生物适合于环糊精及其衍生物的所有已知应用。

它们特别适合于：

- 加溶水溶性差的化合物，如甾族化合物，
- 作为配制佐剂，优选作为药物、化妆品和农业化学产品的佐剂，
- 用于稳定光敏性、热敏性或对氧化作用敏感的物质，
- 用于药物活性化合物、农业化学活性化合物如杀虫剂和杀真菌剂，以及香味物质的控制释放，尤其是用于化妆品和家庭用品，
- 用于表面去油和清洁，
- 取代有机溶剂，尤其是从亲油介质中提取和分离物质的过程中的有机溶剂，
- 作为助剂物质，尤其在造纸、皮革和纺织工业中所用涂料和/或粘合介质中的助剂物质，
- 改变流变学特性，
- 作为相转移催化剂，
- 掩蔽味道和气味。

具体而言，乙酰基- γ -环糊精 (AC- γ -CD) 特别适合用于药物领域。例如，它们适用于加溶药物活

性化合物, 如甾族化合物、生物碱、维生素、抗风湿病化合物、强心甙或精神药物如安定药或神经松弛剂。

下面的实施例将进一步详细地说明本发明。

这些实施例中所描述的反应过程是靠薄层色谱监控的。在薄层色谱之前, 如通过丙酮沉淀先分离出物质。在这些实施例中所提到的DS 值是用 ^1H NMR 光谱(溶剂: 二甲亚砜/ 三氟乙酸)测定的。

实施例1 制备乙酰基- γ -CD (DS, 1.17)

将200 g (135.4 mmol) γ -CD (含水12.2%) 和20 g (244.3 mmol) 乙酸钠悬浮于282 ml 的乙酸中, 加热此悬浮物至105 °C。在大约1 小时内将141 g (1382 mmol) 乙酸酐缓慢滴加到充分搅拌后的悬浮物中。在此步过程中, 把混合物的温度升到回流温度 (117 °C)。随后在回流下煮沸该混合物, 在此期间, 反应混合物缓慢变为溶液。大约1.3 小时后反应完成。将混合物冷却到室温。

向反应混合物中滴加50 ml 水。通过旋转蒸发 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 mmHg) 基本上除去乙酸。然后将所得产物溶解于200 ml 水中, 再进行旋转蒸发。该步骤共进行3 次。最后, 将产物溶解于400 g 水中。如此获得的产物其DS 为1.17。

实施例2: 制备乙酰基- γ -CD (DS, 0.83)

按照实施例1 的描述, 使100 g (67.7 mmol) γ -CD (含水12.2%)、45 g (441

mmol) 乙酸酐、220 ml 乙酸和10 g (122.1 mmol) 乙酸钠进行反应。大约14小时后反应完成。然后按照实施例1的描述进行进一步处理。所得产物的DS为0.83。

实施例3：制备乙酰基- γ -CD (DS, 0.95)

按照实施例1的描述, 使200 g (135.4 mmol) γ -CD (含水12.4%)、130 g (127.4 mmol) 乙酸酐、382 ml 乙酸和20 g (244.3 mmol) 乙酸钠进行反应。大约16小时后反应完成。然后按照实施例1的描述进行进一步处理。所得产物的DS为0.95。

实施例4：制备乙酰基- γ -CD 衍生物

按照实施例1的描述制备DS值分别为1.11、1.00、1.36和0.90的乙酰基- γ -CD 衍生物。

(DS 1.11: 100 g (72.5 mmol) γ -CD (含水量6%), 52.1 g (511 mmol) 乙酸酐, 180 ml 乙酸和6 g (73 mmol) 乙酸钠; 117 °C; 24 小时)

(DS 1.00: 200 g (134.1 mmol) γ -CD (含水量13%), 82.1 g (800 mmol) 乙酸酐, 382 ml 乙酸和20 g (243 mmol) 乙酸钠; 105 °C; 20 小时)

(DS 1.36: 200 g (134.1 mmol)

γ -CD (含水量1.3%), 191.6 g (1880 mmol) 乙酸酐, 382 ml 乙酸和20 g (243 mmol) 乙酸钠; 117 °C; 16 小时)

(DS 0.90 : 100 g (67.1 mmol) γ -CD, 55.5 g (544 mmol) 乙酸酐, 200 ml 乙酸和10 g (122 mmol) 乙酸钠; 117 °C; 20 小时)

实施例5 : 制备乙酰基- γ -CD (DS, 0.95)

把100 g (73.08 mmol) γ -CD (含水5.2%) 和15 g (244.3 mmol) 乙酸钠悬浮于350 ml 乙酸中, 将该混合物加热到 $T = 117$ °C (回流温度)。在回流下煮沸混合物, 在此期间反应混合物缓慢变为溶液 (约18.5 小时)。变澄清后继续煮沸反应混合物1 小时。然后将混合物冷却到室温。

通过旋转蒸发 ($T = 80$ °C, 100 mg Hg) 除去大部分乙酸。然后把所得产物溶于200 ml 水中, 再进行旋转蒸发。该方法共进行三次。最后, 把所得产物溶于400 g 水中。如此获得的产物其DS 为0.95。

实施例6 : 制备丙酰基- γ -CD (DS, 0.85)

按类似实施例1 的方法, 使100 g (67.7 mmol) γ -CD (含水量1.2.3%)、109.7 g (843 mmol) 丙酸酐、6 g (73.8 mmol) 乙酸钠和100 ml 丙酸进行反应, 然后处理。反

应温度为140 °C, 反应时间为1.5 小时。

所得产物的DS 值为0.85。

实施例7：测定实施例1 -5 所得产物中取代基的分布

把实施例1 -5 的样品各称5 mg, 分别放入4 ml Reacti-Vial (反应容器) 中, 再用移液管移入1 ml 磷酸三甲酯。如果需要, 在超声波浴中, 将混合物溶解短的一段时间。

然后, 加入100 μ l 三氟甲磺酸甲酯和150 μ l 2, 6 -二-叔丁基吡啶, 在容器中装上搅拌器, 密封好; 随后使混合物在容器中放置反应2 小时, 所说的容器是放置在50 °C的水浴中的。用20 ml 双蒸水洗涤所说的混合物并使之定量流入50 ml 的分液漏斗中, 然后用5 ml 氯仿充分摇振提取一次。

把最下层相排入Reacti-Vial, 在室温下用N₂ 气蒸发到干燥。

水解

向装有经过甲基化步骤的样品的容器中加入三氟乙酸达到4 ml 刻度, 密封, 在110 °C下加热4 小时。然后冷却到60 °C, 用氮气吹出三氟乙酸 (至干燥)。用约25 ml 二氯甲烷处理残留物3 次, 每次都用氮气吹扫。

还原

将0.25 ml 0.5 M的硼氢化钠于NH₄OH 中的溶液加入到水解残留物中, 在60 °C下加热此混合物至少1 小时。待冷却后, 通过添加冰醋酸来破坏过量

试剂，直到摇振时不再有气体放出。反复加入含有约2 % 乙酸的甲醇，然后用氮气吹扫，使硼酸化合物以硼酸甲酯的形式排出，六次填装容器，最高达到4 ml 刻度，然后每次均将混合物浓缩至（几乎）干燥。

酰化

冷却后，加入25 μ l 吡啶和200 μ l 乙酸酐。将Reacti-Vial 密封，放入100 °C的干燥炉中3 小时。

待冷却后，小心加入大约1 -2 ml 饱和的碳酸氢钠溶液，然后迅速将容器密封起来。把1 ml CHCl_3 和少量的 NaHCO_3 溶液加入到第二个反应容器中。将第一个容器中的溶液小心地倒入第二个容器中，密封此容器，摇振到一定的程度，通气，然后摇匀。用移液管吸出水相，弃之。将第一个容器淋洗两次。这样，重复摇振提取过程约三次。把 CaCl_2 加入到已经过如此提纯的氯仿中，如果需要，再另加少量 CHCl_3 ，用玻璃管尖取出溶液以便将其移入小玻璃试管中。然后进行GC 分析。

表1 给出了取代基的分布。

表1

取代基分布

AC-γ-CD		S0	S3	S2	S6
实施例2	AC-γ-CD(0.83)	26.45%	3.45%	0.75%	57.55%
实施例4	AC-γ-CD(0.90)	19.65%	3.70%	0.75%	60.70%
实施例1	AC-γ-CD(1.17)	14.95%	2.85%	2.30%	57.45%
实施例3	AC-γ-CD(0.95)	23.75%	2.65%	2.25%	55.00%
实施例4	AC-γ-CD(1.11)	15.40%	3.00%	2.90%	49.05%
实施例4	AC-γ-CD(1.0)	19.45%	3.05%	2.75%	50.70%
实施例4	AC-γ-CD(1.36)	13.65%	3.35%	3.00%	38.50%
实施例5	AC-γ-CD(0.95)	23.70%	2.70%	2.20%	56.40%

取代基分布

AC-γ-CD		S2.3	S3.6	S2.6	S2.3.6
实施例2	AC-γ-CD(0.83)	1.00%	7.35%	2.00%	1.35%
实施例4	AC-γ-CD(0.90)	1.10%	9.55%	2.20%	2.35%
实施例1	AC-γ-CD(1.17)	0.90%	10.40%	8.45%	2.60%
实施例3	AC-γ-CD(0.95)	0.65%	7.50%	6.35%	1.85%
实施例4	AC-γ-CD(1.11)	1.05%	11.80%	11.60%	5.15%
实施例4	AC-γ-CD(1.0)	1.15%	10.00%	9.25%	3.80%
实施例4	AC-γ-CD(1.36)	2.00%	15.05%	13.45%	10.95%
实施例5	AC-γ-CD(0.95)	0.70%	7.00%	6.10%	1.40%

取代基分布

AC- γ -CD	X2	X3	X2,3	X6
实施例2 AC- γ -CD(0.83)	5.10%	13.15%	18.25%	68.25%
实施例4 AC- γ -CD(0.90)	6.40%	16.70%	23.10%	74.80%
实施例1 AC- γ -CD(1.17)	14.25%	16.75%	31.00%	78.90%
实施例3 AC- γ -CD(0.95)	11.10%	12.65%	23.75%	70.70%
实施例4 AC- γ -CD(1.11)	20.70%	21.00%	41.70%	77.60%
实施例4 AC- γ -CD(1.0)	16.95%	18.00%	34.95%	73.75%
实施例4 AC- γ -CD(1.36)	29.40%	31.35%	60.75%	77.95%
实施例5 AC- γ -CD(0.95)	10.40%	11.80%	22.20%	70.90%

实施例8：测定实施例1-5所制备产品的不同性能，并与现有技术产品进行比较。

测定项目为产品的水溶性、加溶能力、溶血活性，酶催降解性和生物降解性。现有技术的代表产品为甲基- γ -环糊精(DS, 1.8)(Me- γ -CD)和两种羟丙基- γ -环糊精衍生物(DS, 0.9; DS, 0.6)(Hp- γ -CD)。

水溶性是在25℃下测定的。

为了测定对氢化可的松的加溶能力，制备浓度为30%的环糊精衍生物的水溶液，在25℃下与过量的氢化可的松一起摇振24小时。用膜过滤器(0.2 μ m)过滤分离出未溶解的产物。用HPLC测定滤液中的氢化可的松浓度。

为了测定加溶胆甾醇的能力，在所有情况下，均将

40 mg 胆甾醇加入到1 ml 浓度为30 %的环糊精衍生物的水溶液中，摇振混合物过夜。然后离心分离出沉淀物。

为了测定胆甾醇，制备下述溶液：

a) 缓冲液：将1.21 g 三羟甲基氨基甲烷缓冲剂、430 mg 胆酸的钠盐和100 mg ABTS 溶解于大约80 ml 的去离子水中，用1 M HCl 调节pH 至7.7。再加入1.02 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 和40 U 的过氧化物酶，并且0.1 M HCl 将pH 校正到7.7。在容量瓶中用去离子水将体积补充到100 ml。

b) 胆甾醇氧化酶溶液：

将15,000 U 的胆甾醇氧化酶 (Sigma (815) (E.C. 1.1.3.6)) 加入到100 ml 的1 M $(NH_4)_2SO_4$ 中。

为了测定胆甾醇，用移液管把50 μ l 样品溶液，3 ml 缓冲液和20 μ l 胆甾醇氧化酶溶液移入试管中，该试管用一种薄膜parafilm封住，摇振以使试剂充分混合，然后将此试管在37-40 °C的水浴中温育1 小时。当溶液适当地变稀时，就立即用光度法 (730 nm) 测定其中的胆甾醇含量。

按照EP-B-0 149 197 中的描述测定溶血活性。

用下列混合物测定酶催化降解性：

2.5 ml 的0.1 M 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (Tris-buffer)

22.5 ml 的水

10 μ l 乙腈

200 μ l 的乙酰基- γ -CD 溶液 (500 mg / ml)

100 单位的酶

利用Zahn-Wellens 试验 (OECD Guidelines for testing of Chemicals 302 B, Adopted by the Council on 17th July 1992) 测定生物降解性。

水溶性、加溶结果、Zahn-Wellens 试验 (ZaWe-14d) 结果以及溶血结果均列于表2中。

表2： γ -衍生物的比较

		水溶性	氢化可的松 的加溶能力 [mg/ ml]	胆甾醇的 加溶能力 [mg/ ml]	降解率 ZaWe- 14d	溶血率 CD浓度 50%
实施例2	AC- γ -CD(0.83)	50.00%	46.6	1.09	98%	3.7%
实施例4	AC- γ -CD(0.87)	24.50%	53.7	0.44		3.7%
实施例4	AC- γ -CD(0.90)	29.90%	52.7	0.90	98%	6.0%
实施例3	AC- γ -CD(0.95)	>70%	52.5	0.70		
实施例4	AC- γ -CD(1.0)	>68%	52.4			
实施例4	AC- γ -CD(1.11)	>70%	50.2	0.37		9.1%
实施例1	AC- γ -CD(1.17)	>70%	49.5	0.30		8.6%
实施例4	AC- γ -CD(1.36)	>68%	39.6	0.13		16.0%
实施例5	AC- γ -CD(0.95)	>70%	53.4			
	Hp- γ -CD(0.9)		28	0.04	25%	>30%
	Hp- γ -CD(0.6)		41	0.10		>30%
	Me- γ -CD(1.8)		39.6		14%	14.9%

乙酰基- γ -CD 可被下列酶降解：

- 解脂酶 (l i p o l a s e) 1 0 0 L (N o v o I n d u s t r i , C o p e n h a g e n)

- 脂肪酶，来源于胰腺 (E C 3 . 1 . 1 . 3)
S i g m a C h e m . 公司

- 酯酶，来源于猪肝，B o e h r i n g e r M a n n h e i m 公司

- 脂肪酶，来源于黑曲霉，E C 3 . 1 . 1 . 3 ,
F l u k a