



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105031663 B

(45)授权公告日 2018.10.16

(21)申请号 201510374914.9

A61P 39/06(2006.01)

(22)申请日 2015.06.30

A61P 29/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 31/04(2006.01)

申请公布号 CN 105031663 A

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

(43)申请公布日 2015.11.11

(73)专利权人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号重庆医科大学

## (56)对比文件

伍永富等.Box-Behnken设计-效应面法优化木犀草素-β-环糊精包合物的制备工艺研究.《中草药》.2010,第41卷(第7期),1094-1099.

(72)发明人 尚京川 王兰 马赟 王靖雯 李晶

王灵杰等.木犀草素羟丙基-β-环糊精包合物的制备及其鉴定.《中国现代应用药学杂志》.2006,第23卷(第6期),第477-479页.

(74)专利代理机构 北京汇信合知识产权代理有限公司 11335

代理人 赵倩

李锦莲等.正交试验法优选木犀草素的β-环糊精包合工艺.《数理医药学杂志》.2004,第17卷(第1期),60-61.

审查员 齐丹丹

(51)Int.Cl.

A61K 47/69(2017.01)

A61K 31/352(2006.01)

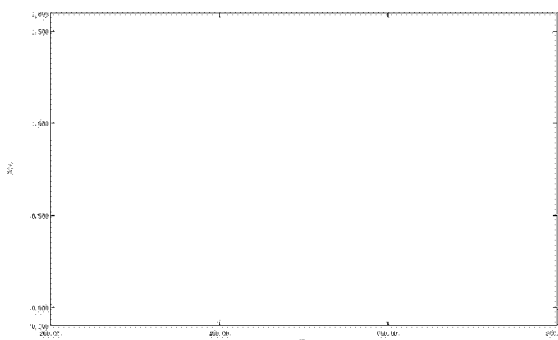
权利要求书1页 说明书6页 附图6页

## (54)发明名称

一种制备木犀草素/SBE-β-CD包合物的方法

## (57)摘要

本发明公开了一种制备木犀草素/SBE-β-CD包合物的方法,属于中药制剂技术领域。该方法包括如下步骤:将木犀草素与SBE-β-CD按物质的量之比1:2物理混匀,缓慢加入100 μL超纯水,研磨70min,得到初始包合物;将所述的初始包合物于60℃干燥1h,研细后置于垫有滤纸的布氏漏斗中,用无水乙醇洗涤,取残渣,60℃干燥20min,得到木犀草素/SBE-β-CD包合物。本发明以投料比、研磨时间和水量作为考虑因素,采用正交试验法优选制备处方。制备得到的木犀草素/SBE-β-CD包合物的溶解度得到了很大的提高。本发明的制备方法简单,得到较满意的包合率和收率,可应用于生产与临床需要。



1. 一种制备木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的方法,其特征在于,包括如下步骤:

将木犀草素与SBE- $\beta$ -CD按物质的量之比1:2物理混匀,缓慢加入100 $\mu$ L超纯水,研磨70min,得到初始包合物;将所述的初始包合物于60 $^{\circ}$ C干燥1h,研细后置于垫有滤纸的布氏漏斗中,用无水乙醇洗涤,取残渣,60 $^{\circ}$ C干燥20min,得到木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物。

2. 根据权利要求1所述的制备木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的方法,其特征在于,所述的研磨为沿同一方向匀速研磨。

## 一种制备木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于中药制剂技术领域,特别涉及一种制备木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的方法。

### 背景技术

[0002] 木犀草素(luteolin)是一种天然的黄酮类化合物,广泛存在于白毛夏枯草、金银花、菊花等天然药材中,具有抗氧化、抗炎、抗菌等方面的作用。近年来的研究证实,木犀草素是一种拓扑异构酶抑制剂,可多靶点、多途径、多环节产生抗肿瘤效应,如直接干扰肿瘤细胞的生长和代谢,诱导其凋亡;抑制肿瘤的转移;通过增强机体的免疫力,抑制血管内皮细胞的生长,减少肿瘤组织血管的生成;与化疗药物联用产生增敏效应,从而提高药物疗效,是一种很有前途的天然抗肿瘤药物。磺丁基醚- $\beta$ -环糊精(sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin简称SBE- $\beta$ -CD)是对 $\beta$ -CD进行磺酸化修饰的衍生物。与 $\beta$ -CD的其他衍生物相比,SBE- $\beta$ -CD中引入的极性强大的伸向外侧的磺丁基醚基团,扩大了 $\beta$ -CD的洞穴范围,在和药物包合时,它结合的更加牢固。SBE- $\beta$ -CD主要应用于增加药物溶解度和稳定性、提高生物利用度、调节释放速度、防止挥发性成分逸散、改善不良气味、减少刺激性、降低不良反应等方面。

[0003] 但是,由于木犀草素水溶性较差,将其制成木犀草素新剂型以改善药物溶解度,存在一定的困难。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术中存在的缺点与不足,提供一种制备木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的方法。

[0005] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种制备木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的方法,包括如下步骤:

[0006] 将木犀草素与SBE- $\beta$ -CD按物质的量之比1:2混匀,缓慢加入100 $\mu$ L超纯水,研磨70min,得到初始包合物,将所述的初始包合物于60 $^{\circ}$ C干燥1h,研细后置于垫有滤纸的布氏漏斗中,用无水乙醇洗涤,取残渣,60 $^{\circ}$ C干燥20min,得到木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物。

[0007] 所述的研磨优选为沿同一方向匀速研磨。

[0008] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:SBE- $\beta$ -CD水溶性好、肾毒性和溶血作用等不良反应可降至最低,是一种优良的药物辅料。本发明以投料比与研磨时间为常设置的因素,以可明显影响研磨力度的加水量作为第三个因素,采用正交试验法优选制备处方。制备得到的木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物经IR和DSC鉴别证明已形成,相对木犀草素而言其溶解度得到了很大的提高。本发明采用HPLC作为检测方式,该方法专属性强,灵敏度高,重复性好,操作方便。其制备方法简单,可得到较满意的包合率和收率,可应用于生产与临床需要。

## 附图说明

[0009] 图1是木犀草素的紫外扫描图；

[0010] 图2是木犀草素对照品溶液、阴性样品溶液、供试品溶液的HPLC图谱；其中，A为木犀草素对照品的HPLC图谱，B为SBE- $\beta$ -CD的HPLC图谱，C为木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的HPLC图谱，1为木犀草素；

[0011] 图3是木犀草素的相溶解度图，以木犀草素溶解度(mol/L)为纵坐标，SBE- $\beta$ -CD浓度(mol/L)为横坐标；

[0012] 图4是各物质的红外分析图谱，其中，A为木犀草素的红外分析图谱；B为SBE- $\beta$ -CD的红外分析图谱；C为木犀草素与SBE- $\beta$ -CD物理混合物的红外分析图谱；D为木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的红外分析图谱；

[0013] 图5是各物质的差示扫描量热分析图谱，其中，A为木犀草素的差示扫描量热分析图谱，B为SBE- $\beta$ -CD的差示扫描量热分析图谱，C为木犀草素与SBE- $\beta$ -CD物理混合物的差示扫描量热分析图谱，D为木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物的差示扫描量热分析图谱。

## 具体实施方式

[0014] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[0015] 实施例

[0016] 1仪器与材料

[0017] 1.1仪器

[0018] 高效液相色谱仪、SPD-20A检测器及色谱数据处理系统(日本岛津)；UV2600型紫外-可见分光光度计(日本岛津)；Discovery DV215CD电子天平(美国OHAUS Corporation,)；CS101-1E电热鼓风干燥箱(重庆万达仪器有限公司)；G16型医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司)；KQ3200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；HITECH Edi-S10UV实验室纯水系统(上海和泰仪器有限公司)；THZ-82水浴恒温振荡器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)；傅里叶红外光谱仪(美国Thermo Fisher scientific)；TGA/DSC1STAR<sup>e</sup> System(METTLER1100LF)。

[0019] 1.2试药

[0020] 木犀草素对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号MUST-14050411,纯度大于98%)；木犀草素(西安唯奥生物科技有限公司,批号20140912,纯度98%)；SBE- $\beta$ -CD(山东滨州智源生物科技有限公司,批号20140626,平均取代度6.5)；甲醇(色谱纯,美国TEDIA公司)；磷酸,无水乙醇均为分析纯；水为超纯水。

[0021] 2方法与结果

[0022] 2.1色谱条件

[0023] 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18(4.6 $\times$ 250mm,5 $\mu$ m)；流动相:甲醇-0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液(70:30)；流速:1ml/min；检测波长:348nm；进样量:10 $\mu$ L。

[0024] 2.2溶液配制

[0025] 木犀草素对照品储备液:精密称取木犀草素对照品适量,置10mL容量瓶,以甲醇溶

解并定容,摇匀,即得浓度为111.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,临用前配制成浓度分别为6.696、8.928、11.160、13.392、15.624、20.088 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准溶液。

[0026] 供试品溶液:精密称取木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物适量,置10mL容量瓶,以40%甲醇溶解并定容,超声20min,即为供试品溶液。

[0027] 阴性样品溶液:精密称取SBE- $\beta$ -CD适量,置10mL容量瓶中,以甲醇溶解并定容,即得阴性样品溶液。

[0028] 2.3包合物制备(研磨法)

[0029] 称取适量木犀草素与SBE- $\beta$ -CD(物质的量之比1:2),将二者物理混匀,缓慢加入100 $\mu\text{L}$ 适量超纯水,沿同一方向匀速研磨70min,即得初步的包合物,将包合物于60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1h后研细,后置于垫有滤纸的布氏漏斗中,用适量无水乙醇洗涤未包合的木犀草素,60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥20min,即得木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物。

[0030] 2.4方法学研究

[0031] 2.4.1检测波长的确定

[0032] 将一定浓度的木犀草素对照品溶液,以甲醇为空白,在200-800nm范围内全波段扫描,测得木犀草素的 $\lambda_{\text{max}}$ 为348nm(图1)。

[0033] 2.4.2专属性

[0034] 按照“2.1”项下色谱条件,分别考察木犀草素对照品溶液、阴性样品溶液、供试品溶液的色谱图(见图2)。结果表明,木犀草素峰形良好,SBE- $\beta$ -CD未对木犀草素的测定产生干扰。

[0035] 2.4.3标准曲线

[0036] 取系列木犀草素对照品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,对照品浓度为横坐标绘制标准曲线,得回归方程为: $Y=23794X-17234$  ( $r=0.999$ ),表明木犀草素在6.696~20.088 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好。

[0037] 2.4.4精密度

[0038] 取浓度为15.624 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木犀草素对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件于1d内重复测定5次,连续测定5d,记录峰面积,计算得日内精密度RSD为0.35%,日间精密度RSD为0.64%,表明仪器精密度良好,日内及日间精密度均满足检测要求。

[0039] 2.4.5稳定性

[0040] 取供试品溶液,于室温下放置0、1、2、4、8、10、24h后按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算得RSD为0.38%,表明供试品溶液在24小时内稳定。

[0041] 2.4.6重复性

[0042] 精密称取包合物5份,按“2.2”项下供试品溶液制备方法,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算得RSD为2.99%。结果表明该方法重复性良好。

[0043] 2.4.7加样回收率

[0044] 精密量取木犀草素对照品溶液( $C=15.624\mu\text{g}/\text{mL}$ )各0.6、1、1.4mL于2mL EP管中,每个浓度三份,分别加入包合物供试品溶液(其中木犀草素含量29.6088 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )0.5mL,各加甲醇0.9、0.5、0.1mL以保证总体积为2mL,最终配制成低、中、高浓度的溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。结果见表1,平均加样回收率为100.81%,RSD为2.15%。

[0045] 2.5含量测定

[0046] 取供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算包合率和收率(包合率=包合物中木犀草素的质量/木犀草素投料量;收率=包合物实际质量/(SBE- $\beta$ -CD+木犀草素)投料量)。

[0047]

序号	样品含量 μg	加入量 μg	测得量 μg	回收率 %	平均回收率 %	RSD %
1	14.8044	9.3744	24.3010	101.30		
2	14.8044	9.3744	24.5083	103.51		
3	14.8044	9.3744	24.4321	102.70		
4	14.8044	15.624	30.3421	99.45		
5	14.8044	15.624	30.3782	99.68	100.81	2.15
6	14.8044	15.624	30.3746	99.66		
7	14.8044	21.8736	35.9780	96.80		
8	14.8044	21.8736	37.3869	103.24		
9	14.8044	21.8736	36.8840	100.94		

[0048] 表1 加样回收率试验

[0049] 2.6溶解度测定

[0050] 称取过量包合物与木犀草素置10mL容量瓶中,制成过饱和溶液,于室温(25±2)℃振荡24h。上清液13000rpm/min离心10min,各精密量取上清液适量于10mL容量瓶,40%甲醇定容,超声20min,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,代入回归方程计算出包合物与木犀草素的溶解度,得出包合物在水中的溶解度为5174.25mg/L,木犀草素的溶解度为82.26mg/L。结果表明包合物较木犀草素的溶解度提高了62.90倍。

[0051] 2.7正交实验优化包合工艺

[0052] 根据文献及预实验结果,以SBE- $\beta$ -CD与木犀草素的投料比、加水量、研磨时间为考察因素,按L9(3<sup>4</sup>)正交表进行正交设计,以包合率和收得率拟合的综合结果为指标,进行9次试验,因素水平见表2,结果及直观分析见表3,方差分析见表4。由极差R可知,各因素对综合结果的影响顺序为B>A>C。由方差分析表可知,B因素三个水平对综合结果有统计学意义,A和C水平内差异均无统计学意义。A因素中K3>K2>K1,B因素中K1>K3>K2,C因素中K3>K2>K1,因此确定木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物制备工艺的最优处方为A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>,即SBE- $\beta$ -CD与木犀草素的投料比为2:1,加水量为100μL、研磨时间为70min。

[0053] 表2 正交因素水平表

[0054]

水平	因素		
	SBE- $\beta$ -CD/luteolin (A)	加水量 (B)/μL	研磨时间(C)/min
1	1:1	100	30
2	1.5:1	300	50
3	2:1	200	70

[0055] 表3 直观分析表

[0056]

序号	因素				包合率 %	收率 %	综合评分 %
	A	B	C	空白			
1	1	1	1	1	61.01	75.16	82.91
2	1	2	2	2	44.46	48.86	62.45
3	1	3	3	3	70.49	78.06	89.74
4	2	1	2	3	66.08	82.03	88.68
5	2	2	3	1	48.46	71.72	73.99
6	2	3	1	2	68.58	67.20	84.25
7	3	1	3	2	75.94	86.62	96.44
8	3	2	1	3	61.91	45.75	71.68
9	3	3	2	1	72.17	78.18	90.80
K1	235.1	268.03	238.84	247.7			
K2	246.92	208.12	241.93	243.14			
K3	258.92	264.79	260.17	250.1			
K1'	78.367	89.344	79.614	82.567			
K2'	82.307	69.373	80.643	81.047			
K3'	86.307	88.263	86.723	83.367			
R	8.23	20.261	7.109	2.32			

[0057] 综合结果=0.6×(24%+包合率)+0.4×(4.56%+收率)

[0058] 表4 方差分析

[0059]

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	94.514	2	47.257	11.301	>0.05
B	756.966	2	378.483	90.512	<0.05
C	88.538	2	44.269	10.587	>0.05
误差	8.363	2	4.182		

[0060] 2.8验证试验

[0061] 按照以上所选最优处方,制备三批木犀草素/SBE-β-CD包合物,综合评分结果分别为95.08、96.06、92.40,平均值为94.51,表明该工艺稳定。

[0062] 2.9木犀草素/SBE-β-CD包合物的鉴定

[0063] 2.9.1相溶解度图

[0064] 在浓度为0、0.9091、1.8182、2.7273、3.6364、4.5454mmol/L的SBE-β-CD溶液中分别加入过量的木犀草素,置25mL容量瓶中于水浴恒温振荡器中振摇3d(25±2℃),取上清液13000rpm/min离心10min,各精密量取上清液适量于10mL容量瓶,40%甲醇定容,超声20min,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,代入回归方程计算不同浓度SBE-β-CD溶液中木犀草素的溶解度,以木犀草素溶解度(mol/L)为纵坐标,SBE-β-CD浓度(mol/L)为横坐标,绘制相溶解度图(图3),回归方程为 $Y=0.4989X+0.0004$ ( $r=0.9981$ )。可见木犀草素的溶解度与SBE-β-CD浓度成线性关系,相溶解度图为AL型,证实形成的是1:1的包合物。若包合物的形成摩尔比为1:1,则有 $b=[KS_0/(1+KS_0)]a+S_0$ ( $b$ 为SBE-β-CD存在时木犀草素分子的总浓度, $S_0$ 为游离木犀草素分子的浓度, $a$ 为SBE-β-CD的总浓度)。通过 $b$ 对 $a$ 作图就可得相溶解度图。通过斜率和截距可以求得平衡常数 $K$ 为 $2.49 \times 10^3 L/mol$ 。这说明木犀草素分子

很易进入SBE- $\beta$ -CD中与之形成包合物,其结合很牢固。

#### [0065] 2.9.2红外光谱分析

[0066] 采用KBr压片法制备样品,波数范围 $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$ ,分别对木犀草素、SBE- $\beta$ -CD、木犀草素与SBE- $\beta$ -CD物理混合物(物质的量之比1:1)及包合物进行红外扫描,见图4。结果表明,物理混合物的红外光谱中木犀草素和SBE- $\beta$ -CD两者有简单的叠加。木犀草素在 $3464, 3234, 1603, 1262, 1126\text{cm}^{-1}$ 左右的特征峰在包合物中消失,而在混合物中仍存在。SBE- $\beta$ -CD与包合物的峰形相似,推测木犀草素可能被完全进入SBE- $\beta$ -CD的空腔中,表明木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物已形成。

#### [0067] 2.9.3差示扫描量热分析

[0068] 分别对木犀草素、SBE- $\beta$ -CD、木犀草素与SBE- $\beta$ -CD的物理混合物(物质的量之比1:1)及包合物进行差示扫描量热分析。测试条件:以 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 为参比,Ar为气氛,升温速率为 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ,扫描范围为 $30\sim 300^\circ\text{C}$ 。结果见图5。四种物质在 $55^\circ\text{C}$ 左右均有吸热峰,而物理混合物在 $55^\circ\text{C}$ 的峰相对SBE- $\beta$ -CD较强,推测木犀草素在此处的贡献较大,SBE- $\beta$ -CD与物理混合物在 $221^\circ\text{C}$ 左右均有放热峰,因此物理混合物基本包括了木犀草素和SBE- $\beta$ -CD的主要特征,包合物在 $261, 288^\circ\text{C}$ 处出现两个新的放热峰,与前三者有差异,结果表明木犀草素/SBE- $\beta$ -CD包合物已形成。

#### [0069] 3、讨论

[0070] 本实验采用HPLC作为检测方式,该方法专属性强,灵敏度高,重复性好,操作方便。之前文献所报道的木犀草素包合物的制备多采用 $\beta$ -CD或者HP- $\beta$ -CD,相比之下SBE- $\beta$ -CD水溶性更好、肾毒性和溶血作用等不良反应可降至最低,是一种优良的药物辅料。经文献查阅投料比与研磨时间为常设置的因素,实验过程中发现加水量可明显影响研磨力度,故设置为第三个因素。实验采用正交试验法优选制备处方,分析了对包合物制备工艺的主要影响因素与收率和包合率的关系,从而了解因素与收率和包合率的相关性。制备的包合物经IR和DSC鉴别证明已形成,相对木犀草素而言溶解度得到很大提高。本方法可得到较满意的包合率和收率,可应用于生产与临床需要。

[0071] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

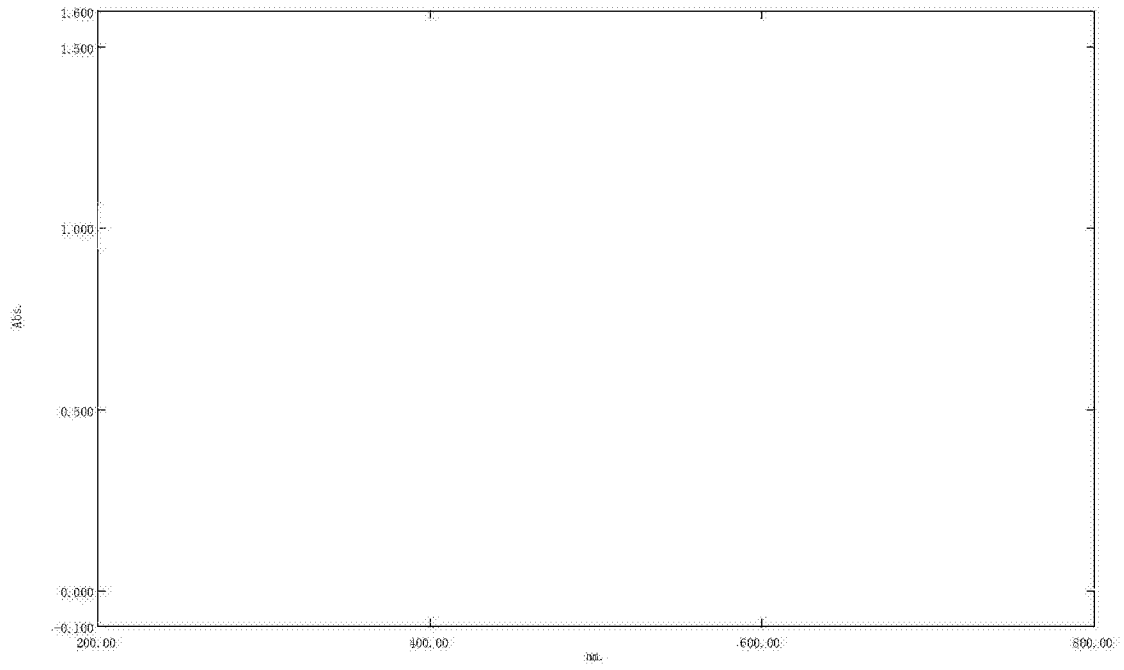
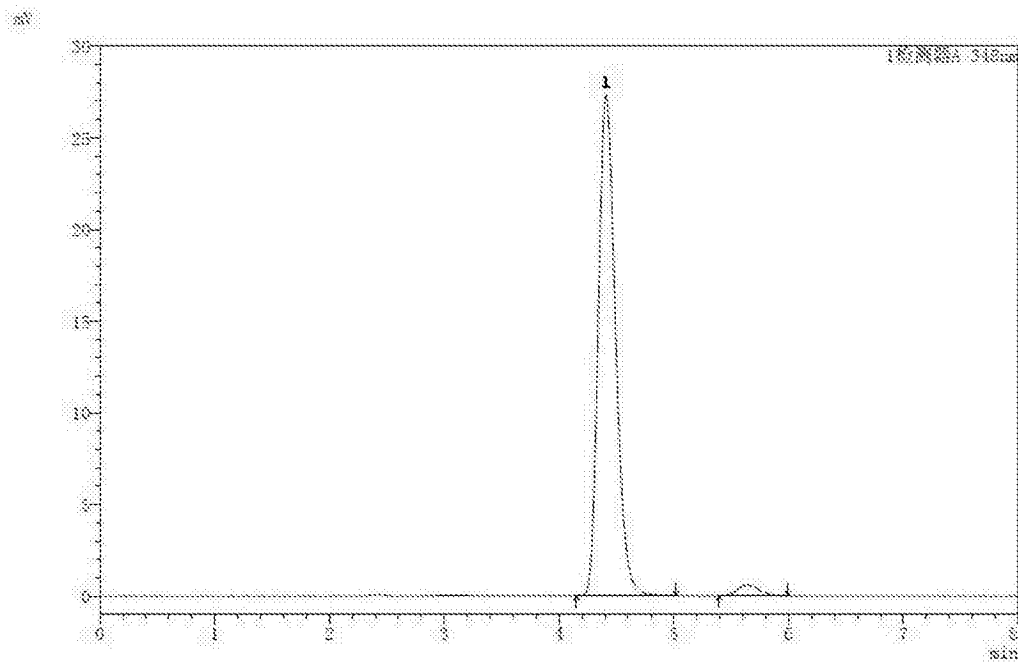
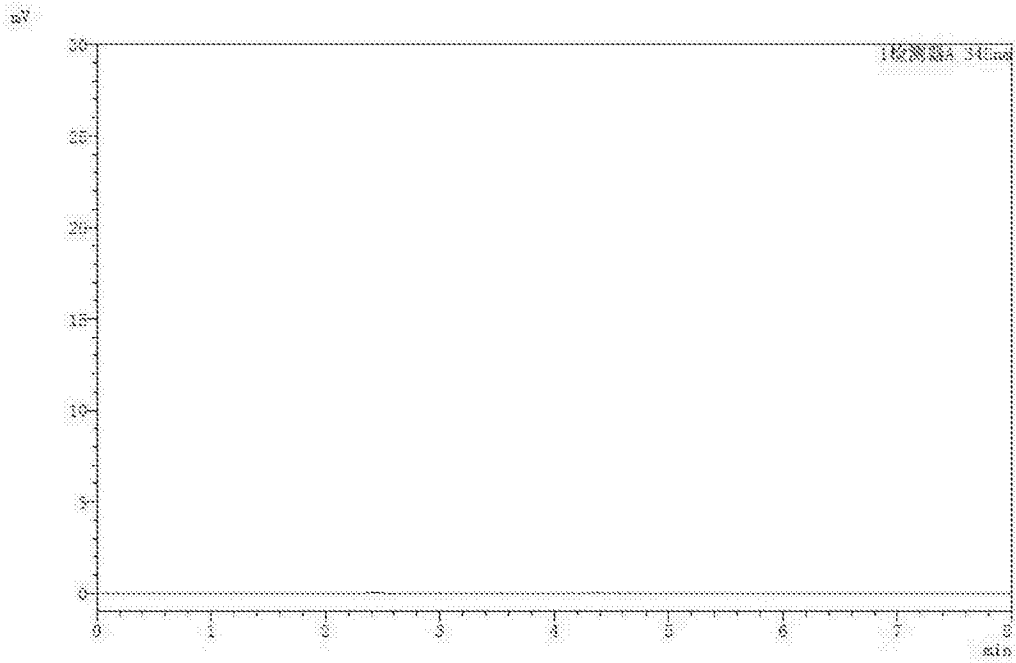


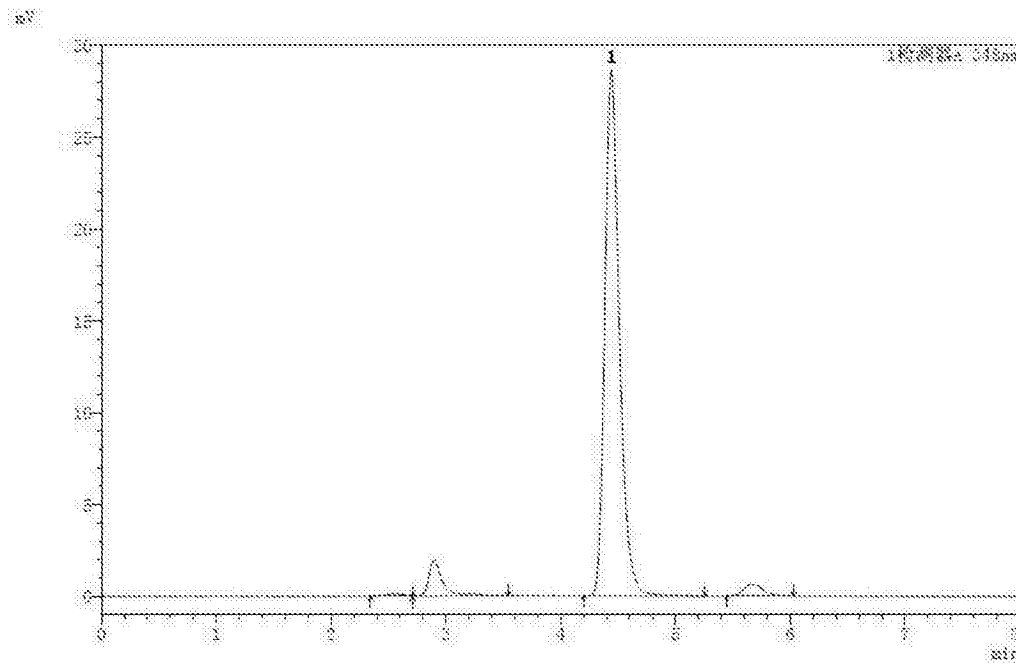
图1



A



B



C

图2

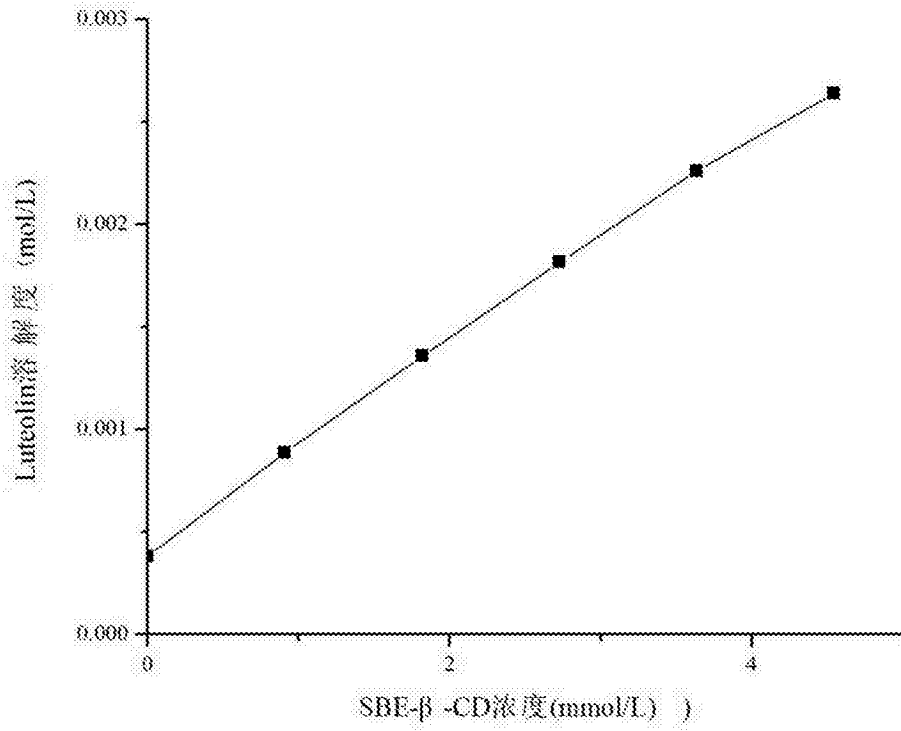
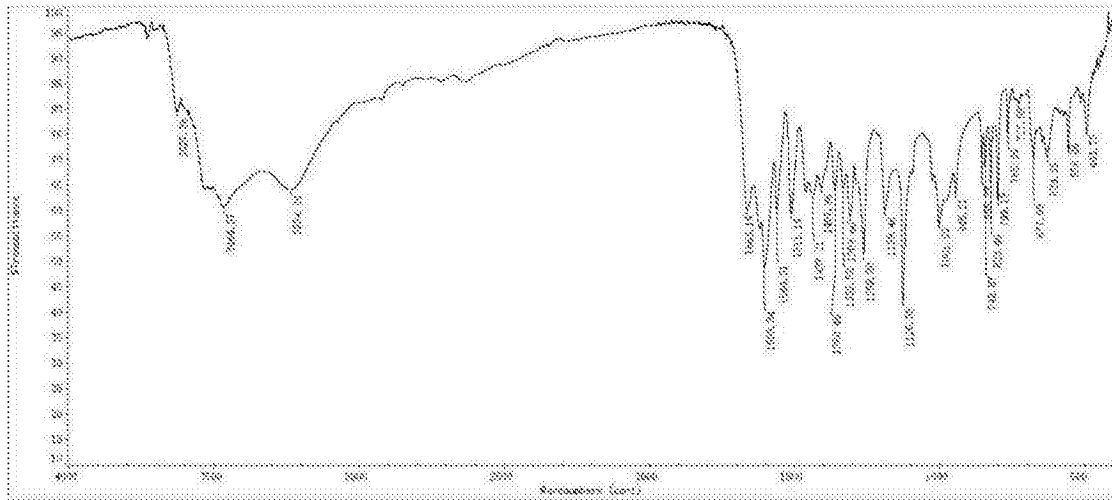
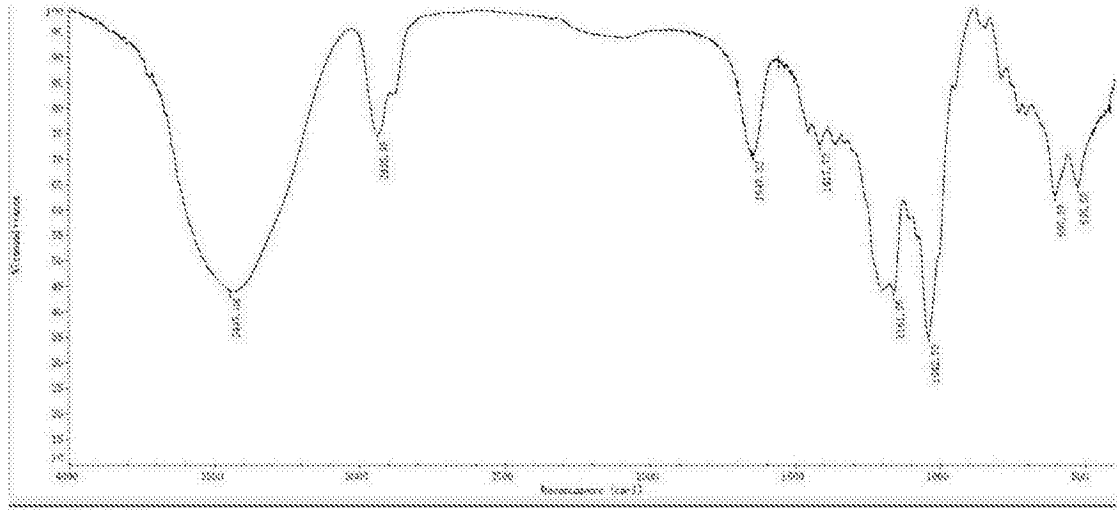


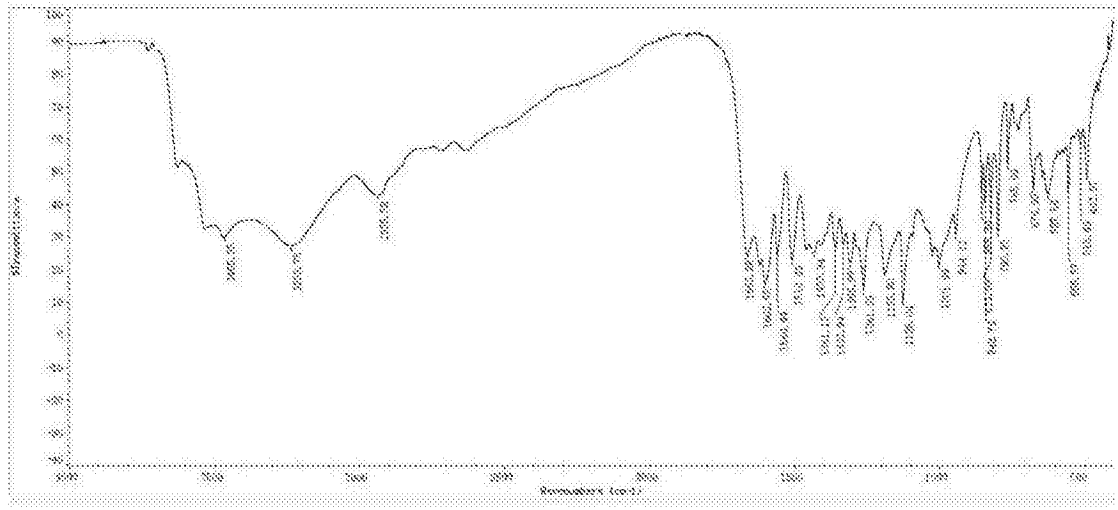
图3



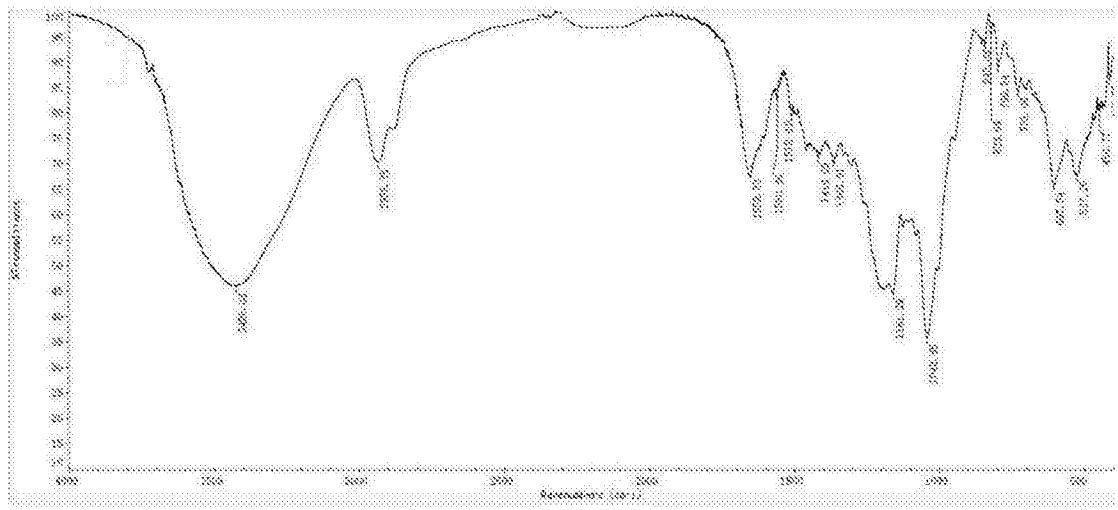
A



B

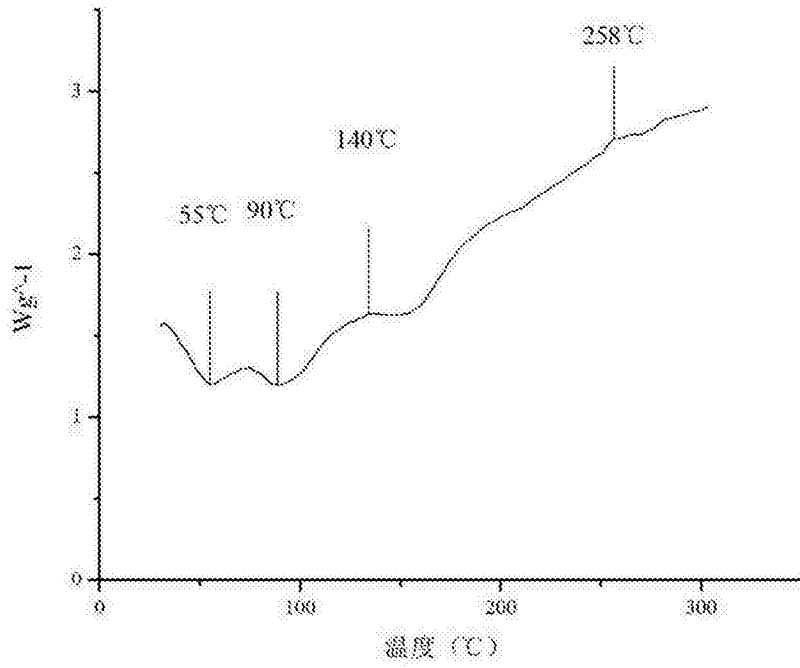


C

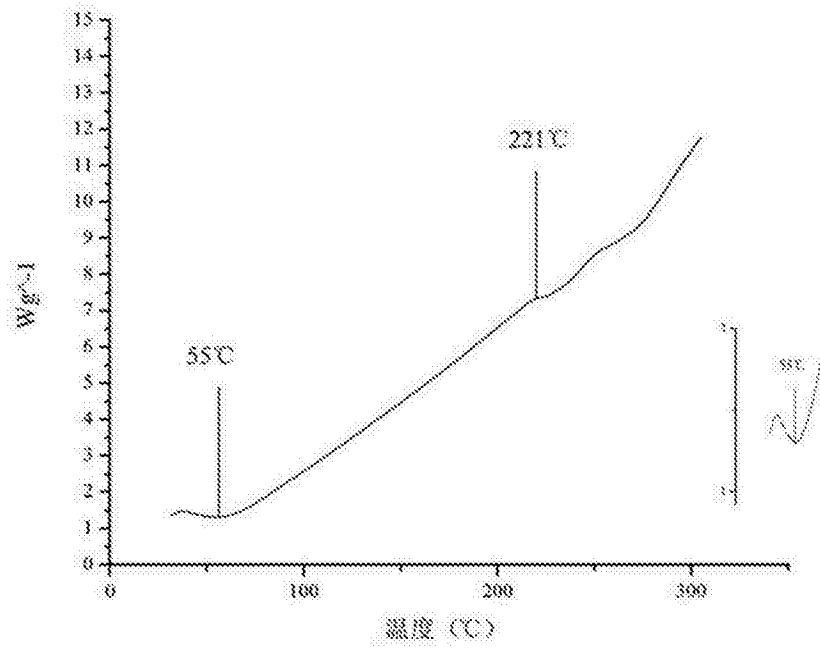


D

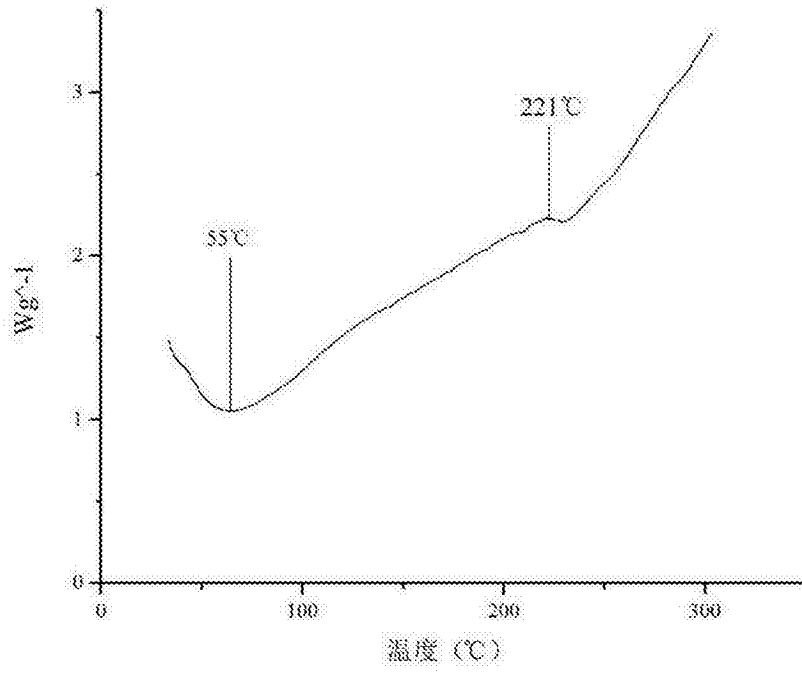
图4



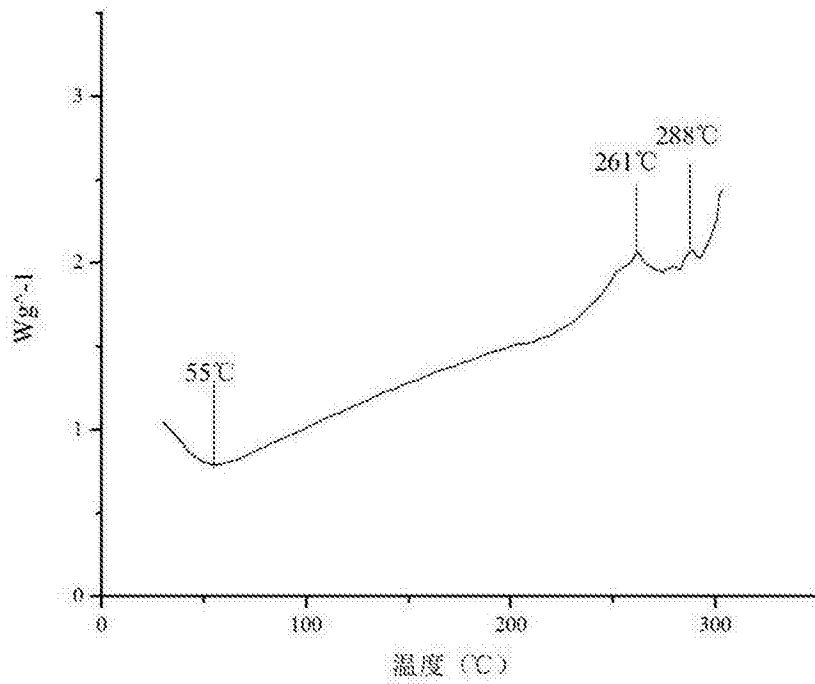
A



B



C



D

图5