

# 乙水杨胺-草酸共晶的制备、表征及溶解性研究

蒋成君<sup>1</sup>, 张晋娜<sup>1</sup>, 申静<sup>1</sup>, 程桂林<sup>2\*</sup> (1.浙江科技学院生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2.浙江中医药大学中医药科学院, 杭州 310053)

**摘要:** 目的 制备乙水杨胺-草酸共晶, 研究共晶在磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)以及模拟胃液(simulated gastric juice, SGF)中的溶解度。方法 采用溶液结晶法, 将乙水杨胺和草酸加热溶于乙酸乙酯, 缓慢降温至室温, 析晶、抽滤、干燥, 即获得乙水杨胺-草酸共晶。应用单晶 X 射线衍射(SCXRD)、粉末 X 射线衍射(PXRD)、差示扫描量热法(DSC)对乙水杨胺-草酸共晶进行了结构表征, 然后测试溶解度。结果 乙水杨胺与草酸以 2 : 1 的化学计量比通过形成共晶, 共晶在磷酸盐缓冲溶液以及模拟胃液中的溶解度分别为乙水杨胺的 2.0 倍和 2.5 倍。结论 通过公认安全的草酸形成难溶性药物的共晶, 为改善药物溶解度提供了理论依据。

**关键词:** 乙水杨胺; 共晶; 草酸; 溶解性质; 结构表征

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)10-1177-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.10.005

引用本文: 蒋成君, 张晋娜, 申静, 等. 乙水杨胺-草酸共晶的制备、表征及溶解性研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(10): 1177-1181.

## Preparation, Characterization and Solubility Study of Ethenzamide-oxalic Acid Cocrystal

JIANG Chengjun<sup>1</sup>, ZHANG Jinna<sup>1</sup>, SHEN Jing<sup>1</sup>, CHENG Guilin<sup>2\*</sup> (1.School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2.Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare ethenzamide-oxalic acid cocrystal and study the solubility of cocrystal in phosphate buffer saline(PBS) and simulated gastric juice(SGF). **METHODS** By using solution crystallization method, ethenzamide and oxalic acid were dissolved in ethyl acetate, and the solution was slowly cooled to room temperature, the ethenzamide-oxalic acid cocrystal was obtained through crystallization, filtration and drying. The structure of cocrystal was characterized by single crystal X-ray diffraction(SCXRD), powder X-ray diffraction(PXRD), differential scanning calorimeter(DSC), then solubility was tested. **RESULTS** The cocrystal was finally formed with ethenzamide and oxalic acid by the stoichiometric ratio of 2 : 1. The solubilities for studied cocrystal in PBS and SGF appeared to be approximately 2.0 and 2.5 times-fold higher than ethenzamide. **CONCLUSION** The study provides a theoretical basis for improving the solubility of drugs by forming the cocrystal of insoluble drugs with oxalic acid, which is generally recognized as safe additives.

**KEYWORDS:** ethenzamide; cocrystal; oxalic acid; solubility; structure characterization

制药工业开发的新药物中, >40%的药物几乎不溶于水。这些水溶性差的药物吸收缓慢, 导致生物利用度极差。溶解度问题是药物科学家面临的一个重大挑战<sup>[1]</sup>。采用合适的共晶形成物(cocrystal former, CCF)与活性药物成分形成共晶可以优化药物的溶解度、溶解速率等理化性质, 提高生物利用度<sup>[2]</sup>。乙水杨胺(2-乙氧基苯甲酰胺)是一种常用的镇痛和抗炎药物, 用于缓解发烧、头痛, 它是许多感冒药和处方镇痛药的成分<sup>[3]</sup>。众所周知, 乙水杨胺属于生物药物分类系统(BCS) II 类药物, 结构式见图 1, 其主要缺点是溶解度和生物利用度

低<sup>[4]</sup>。提高乙水杨胺的溶解度最好的方法之一是形成共晶<sup>[5-6]</sup>。

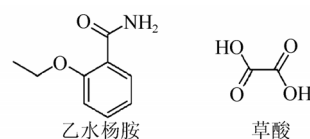


图 1 乙水杨胺和草酸的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of ethenzamide and oxalic acid

Sarmah 等<sup>[7]</sup>制备了乙水杨胺与 2,4-二羟基苯甲酸、3,5-二羟基苯甲酸、阿魏酸的共晶, 其中乙水杨胺与 3,5-二羟基苯甲酸的共晶在纯水中的溶解度是

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGJ20B060001); 浙江中医药大学校级科研基金项目(2019ZG48)

作者简介: 蒋成君, 男, 博士, 高级工程师 Tel: (0571)85070383 E-mail: jcyj312@163.com \*通信作者: 程桂林, 女, 博士, 工程师 Tel: (0571)61768510 E-mail: cheng\_guilin@163.com

乙水杨胺的 13 倍。然而, 3,5-二羟基苯甲酸没有收录在公认安全(generally recognized as safe, GRAS)和 FDA 发布新的食品添加剂目录信息(Everything Added to Food in the United States, EAFUS)的目录中。Khatioda 等<sup>[8]</sup>制备了乙水杨胺与 2,4-二羟基苯甲酸的共晶, 其共晶是一种多晶型化合物, 包括晶型 I 和晶型 II。研究表明乙水杨胺在 pH=1.2 时具有较高溶解度, 原因是容易形成盐酸盐。在 pH=7.4 的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)中, 2 种晶型的溶解度都相对乙水杨胺提高了 2.5 倍。Nechipadappu 等<sup>[9]</sup>制备乙水杨胺与芥子酸的共晶, 在蒸馏水和 0.1 g·L<sup>-1</sup> HCl 溶液中的溶解度研究表明, 溶解度均没有明显增加。Khatioda 等<sup>[10]</sup>制备了乙水杨胺与 2,5-二羟基苯甲酸、2,6-二羟基苯甲酸、3,4-二羟基苯甲酸、3,5-二羟基苯甲酸的共晶。研究表明, 环境的 pH 值是影响溶解度的主要因素。Kozak 等<sup>[11]</sup>制备了 3 种乙水杨胺与丙二酸、戊二酸以及马来酸的共晶, 这些共晶在模拟胃液(simulated gastric juice, SGF)中的溶解度约为乙水杨胺的 1.6 倍。本研究目的在于克服乙水杨胺溶解度低的缺点, 完善乙水杨胺共晶体系, 提供一种提高溶解性的方法。同时, 方便后续研究中对乙水杨胺共晶形成机制与结构关系的探索。最有可能成药的共晶所选择的共晶形成物通常为 GRAS 或 FDA 发布的 EAFUS 的物质<sup>[12-13]</sup>, 本研究以乙水杨胺为药物活性成分, 选用 GRAS 和 EAFUS 目录中的草酸为 CCF, 制备得到一种药物共晶, 通过单晶 X 射线衍射(single crystal X-ray diffraction, SCXRD)测定了其单晶结构, 并进行了表征, 为其在药物领域的应用提供了基础数据和理论基础, 为乙水杨胺-草酸共晶作为药物及其在制剂领域中的应用提供了新的选择。

## 1 仪器与试剂

Nicolet IST<sup>TM</sup>50 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo 公司); Panalytical X 射线粉末衍射分析仪(荷兰帕纳科公司); Q20 型差示扫描量热仪(美国 TA 公司); Rigaku XtaLAB Synergy X 射线衍射仪, (日本理学株式会社); Waters1525 高效液相色谱仪(美国 Water 公司)。

乙水杨胺(货号: B020301-25g, 未另作纯化)、草酸(货号: A0103875000)均购自安耐吉化学; 其他试剂均为分析纯; 实验用水为自制二次蒸馏水; SGF、PBS 均购自 ThermoFisher Scientific 公司。

## 2 方法

### 2.1 乙水杨胺-草酸共晶的制备

乙水杨胺与草酸分别以化学计量比 1:1, 1:2, 2:1 混合, 加热溶解于乙酸乙酯中, 冷却结晶制备共晶。典型的实验如下: 165 mg 乙水杨胺, 90 mg 草酸置于硼硅玻璃瓶中(15 mm×45 mm、4 mL), 加入 3 mL 乙酸乙酯, 缓慢升温至 60~70 °C 溶解, 再缓慢降温至室温, 析晶 24 h, 析出白色细针状晶体, 抽滤干燥, 即获得乙水杨胺-草酸共晶。

### 2.2 SCXRD 分析

在培养的共晶中, 挑选形状较为规则的单晶, 采用 Rigaku XtaLAB Synergy-S X 射线衍射仪收集 SCXRD 数据。在 100 K 或室温下测量 X 射线强度, HyPix-6000HE 检测器距离样品 32.01 mm。用 CrysAlisPro v38.46(Rigaku Oxford Diffraction)处理数据并校正吸收。使用 SHELXT41 在 OLEX240 中解析结构, 并使用 SHELXL42 精制。所有非氢原子均被各向异性地精制, 氢原子置于理想位置。

### 2.3 粉末 X 射线衍射(PXRD)分析

采用 Panalytical X 的 X-射线衍射仪, 射线源为 Cu/K $\alpha$ ( $\lambda$ =0.154nm), 扫描范围为 5~50°(2 $\theta$ ), 扫描步长为 0.05°, 扫描速度为 10°·min<sup>-1</sup>, 电源设置为 40 kV, 40 mA。

### 2.4 差示扫描量热法(differential scanning calorimeter, DSC)分析

采用 Q-20 差式扫描量热仪, 考察乙水杨胺、草酸以及乙水杨胺-草酸共晶的热行为。将样品约 3 mg 置铝坩埚中, 升温速率为 10 °C·min<sup>-1</sup>, 测定的温度范围为 40~200 °C, 氮气的流速为 20 mL·min<sup>-1</sup>。

### 2.5 红外光谱法(infra-red, IR)分析

分别取乙水杨胺、草酸及制备的乙水杨胺-草酸共晶样品(约 10 mg), 直接进行 IR 测试。

### 2.6 溶解度的测定

将过量细粉末样品加入装有 PBS、SGF 溶液的锥形瓶中, 设定温度分别为 25 °C, 振荡一定时间, 使其充分混合以达到固液平衡状态。水浴恒温振荡器的温度波动<0.1 °C。平衡后用过滤器吸取混悬液, 用 0.45  $\mu$ m 的聚四氟乙烯(PTFE)过滤头进行固液分离, 滤液用 HPLC 分析, 色谱条件为采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m), 以甲醇-水(80:20)为流动相, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 检测波长 235 nm,

进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 乙水杨胺-草酸共晶的单晶结构分析

单晶结构解析是表征化合物结构最直观,也是最有效的手段之一。乙水杨胺-草酸共晶的不对称单元中包括 2 个乙水杨胺分子和 1 个草酸分子,分子之间通过 2 种典型的氢键形成超分子的结构。一种是草酸分子上的-OH 与乙水杨胺上的=O 形成氢键,还有一种是乙水杨胺结构中的 N-H 与草酸结构中=O 形成氢键,见图 2。

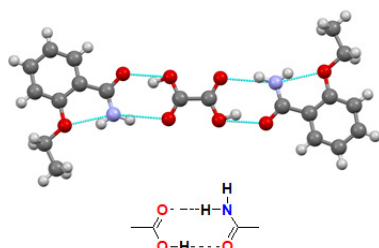


图 2 共晶的一维氢键作用方式

Fig. 2 One-dimensional hydrogen bonding mode of cocrystal

乙水杨胺与草酸的相互作用堆积成三维结构。其三维结构显示出 2 个分子之间的相互作用呈现交错排列堆积,见图 3。单晶 X 射线衍射数据见表 1。

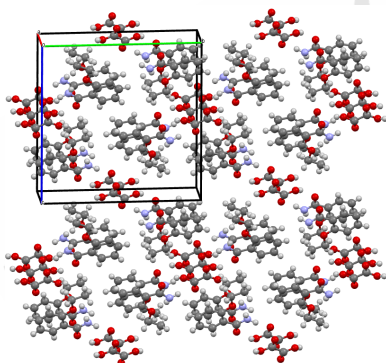


图 3 共晶的三维堆积方式

Fig. 3 Three-dimensional stacking method of cocrystal

表 1 乙水杨胺-草酸共晶的主要晶体学数据

Tab. 1 Crystal data for ethenzamide-oxalic acid cocrystal

| 参数       | 测试结果                                                                                                                                            |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 名称       | 乙水杨胺-草酸                                                                                                                                         |
| 分子式      | $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_4$                                                                                                         |
| 相对分子质量   | 210.08                                                                                                                                          |
| 晶系       | 单斜                                                                                                                                              |
| 空间群      | $P2_1/n$                                                                                                                                        |
| 晶胞参数     | $a=4.002\ 1(16)\text{\AA}$ , $b=16.141(4)\text{\AA}$ , $c=16.258(5)\text{\AA}$ ,<br>$\alpha=90^\circ$ , $\beta=95.55^\circ$ , $\gamma=90^\circ$ |
| 晶胞体积     | 1 045.31(3)                                                                                                                                     |
| 晶胞尺寸     | 0.334 mm $\times$ 0.299 mm $\times$ 0.301 mm                                                                                                    |
| 单胞分子数(Z) | 4                                                                                                                                               |

由表 1 可见,乙水杨胺-草酸共晶属单斜晶系, $P2_1/n$  空间群,晶胞参数  $a=4.002\ 1(16)\text{\AA}$ ,  $b=16.141(4)\text{\AA}$ ,  $c=16.258(5)\text{\AA}$ ,  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=95.55^\circ$ ,  $\gamma=90^\circ$ 。单胞分子数  $Z=4$ ,分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_4$ 。

#### 3.2 乙水杨胺-草酸共晶的 PXRD 分析

乙水杨胺、草酸以及其共晶的 PXRD 结果见图 4。共晶的 PXRD 图谱并不是乙水杨胺与草酸图谱的简单叠加。归属于乙水杨胺的  $2\theta=9.56^\circ$ ,  $12.44^\circ$ ,  $14.46^\circ$ ,  $15.89^\circ$ ,  $19.27^\circ$ ,  $22.91^\circ$ ,  $25.42^\circ$ ,  $33.7^\circ$  特征峰消失,出现了既不归属乙水杨胺又不归属草酸的新的衍射峰,  $2\theta=7.69^\circ$ ,  $10.92^\circ$ ,  $12.20^\circ$ ,  $15.44^\circ$ ,  $17.25^\circ$ ,  $19.73^\circ$ ,  $24.58^\circ$ ,  $26.48^\circ$ ,  $28.90^\circ$ 。证明乙水杨胺与草酸形成了共晶,而导致了衍射行为的改变。

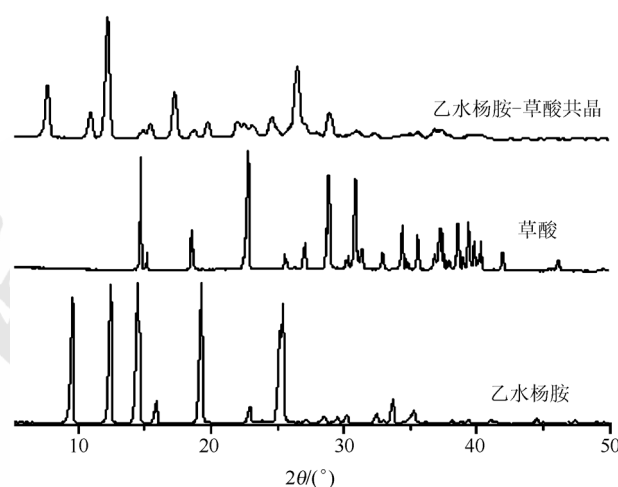


图 4 乙水杨胺、草酸及其共晶的 PXRD 图

Fig. 4 PXRD chart of ethenzamide, oxalic acid and their cocrystal

#### 3.3 乙水杨胺-草酸共晶的 DSC 分析

乙水杨胺、乙水杨胺-草酸共晶的 DSC 分析结果见图 5。乙水杨胺的吸热峰在  $132.79^\circ\text{C}$ ,草酸的熔点为  $189\sim 191^\circ\text{C}$  [12],其共晶的吸热峰在  $134.42^\circ\text{C}$ 。不同于乙水杨胺与草酸,说明乙水杨胺与草酸之间形成了新的氢键,改变了分子间的作用力与晶格能 [14],进而导致了热行为的改变 [15],进一步证明乙水杨胺和草酸形成了共晶。共晶的熔点介于 2 种组分之间,与药物活性成分乙水杨胺并没有太大的区别。

#### 3.4 乙水杨胺-草酸共晶的 IR 分析

乙水杨胺的分子结构中 N-H 的特征峰在  $3\ 366.69\ \text{cm}^{-1}$  处, C=O 的特征吸收峰在  $1\ 625.22\ \text{cm}^{-1}$  处,形成共晶后  $3\ 366.69\ \text{cm}^{-1}$  处的峰蓝移至  $3\ 429.51$ ,  $1\ 625.22\ \text{cm}^{-1}$  处的峰也蓝移至

1706.12  $\text{cm}^{-1}$  处, 这是 2 处最明显的特性。这些特征表明乙水杨胺的酰胺基与草酸中的羧基参与了共晶的氢键作用, 见图 6。

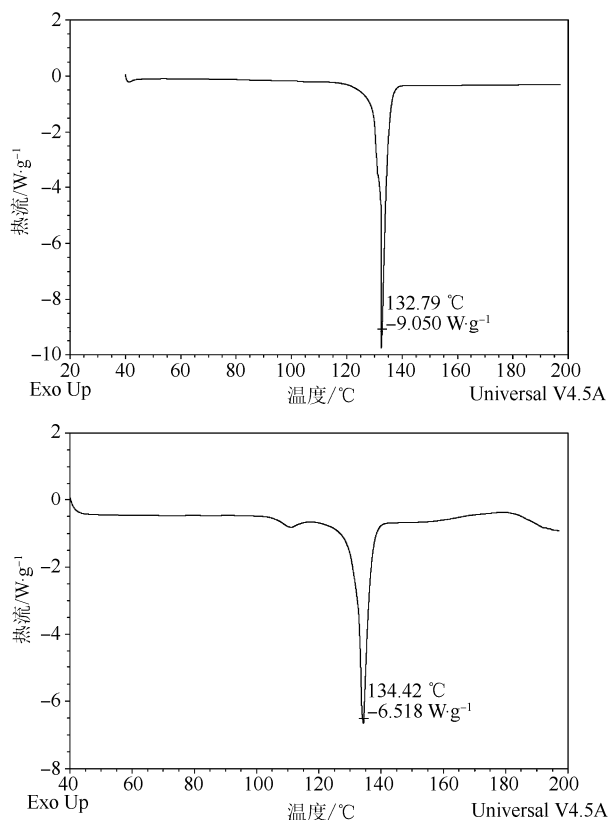


图 5 乙水杨胺、草酸及其共晶的差示扫描量热分析图  
Fig. 5 DSC chart of ethenzamide, oxalic acid and their cocrystal

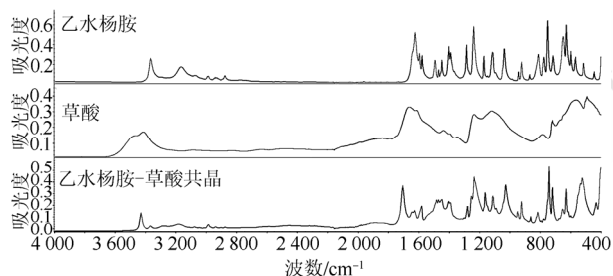


图 6 乙水杨胺、草酸及其共晶的红外光谱图  
Fig. 6 FTIR of ethenzamide, oxalic acid and their cocrystal

### 3.5 共晶溶解度分析

乙水杨胺及其草酸共晶在 PBS 溶液中是一个缓慢溶解的过程, 在 24 h 达到溶解平衡, 乙水杨胺的溶解度为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其草酸共晶的溶解度为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 见图 7。在 24 h 后, 共结晶导致共晶中乙水杨胺在 PBS 的溶解度提高 1.0 倍。当使用 SGF 时, 可以得出类似的结论。乙水杨胺的溶解度为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其草酸共晶的溶解度为  $3.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。24 h 后, 共结晶中乙水杨胺在 SGF

的溶解度提高 1.5 倍, 见图 8。

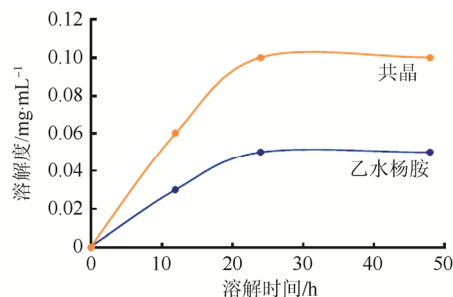


图 7 乙水杨胺及其草酸共晶在 PBS 溶液中的溶解度  
Fig. 7 Solubility of ethenzamide and its oxalic acid cocrystal in PBS solution

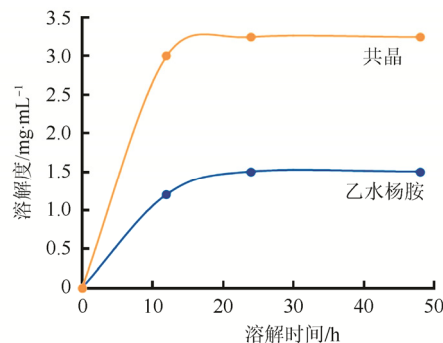


图 8 乙水杨胺及其草酸共晶在 SGF 溶液中的溶解度  
Fig. 8 Solubility of ethenzamide and its oxalic acid cocrystal in SGF solution

### 3.6 共晶高湿稳定性

40 °C 下, 共晶放置  $\text{NH}_4\text{Cl}$  饱和溶液, 相对湿度  $(90 \pm 5)\%$  中, 分别放置 5, 10, 30 d, 共晶粉末的 PXRD 图与之前无差异, 见图 9, 未发生晶型的变化。共晶形成物草酸非常容易形成二水合物, 但是形成共晶后, 由于结构中的氢键占据了易于水结合的基团, 并没有形成水合药物, 所以乙水杨胺-草酸共晶具有良好的高湿稳定性。

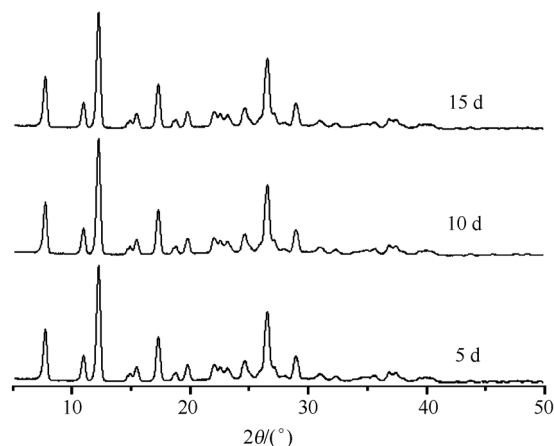


图 9 乙水杨胺-草酸共晶不同放置时间的 PXRD 图  
Fig. 9 PXRD chart of ethenzamide-oxalic cocrystal with different time

#### 4 结论

通过溶液结晶法制备了乙水杨胺-草酸共晶, 并通过 SCXRD、PXRD、DSC、IR 对共晶进行表征, 证明了 2 分子乙水杨胺和 1 分子草酸通过氢键形成了乙水杨胺-草酸共晶。通过对共晶的性质进行研究, 发现乙水杨胺与草酸形成共晶以后, 在 PBS 及 SGF 中的溶解度分别为乙水杨胺的 2.0 倍和 2.5 倍, 且高湿稳定性好。该研究证实了共晶可以改善原料药的某些物理化学性质, 为改善原料药在制剂领域的应用提供更有价值的方法。然而, 乙水杨胺与草酸形成共晶后, 临床应用时可能会导致草酸的过量摄入, 存在一定的不良反应。其药理、毒理性质有待于进一步的研究。

#### REFERENCES

- [1] BABU N J, NANGIA A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals [J]. *Cryst Growth Des*, 2011, 11(7): 2662-2679.
- [2] KAVANAGH O N, CROKER D M, WALKER G M, et al. Pharmaceutical cocrystals: From serendipity to design to application [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(3): 796-804.
- [3] WANG P J, GUO H R. Frequent analgesics consumption in migraineurs: Comparison between chronic and episodic migraineurs [J]. *J Headache Pain*, 2004, 5(1): 30-35.
- [4] KAWANO O, SAWABE T, MISAKI N, et al. Studies on combination dosing (III). Aspirin and ethenzamide [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1978, 28(6): 829-835.
- [5] SOKAL A, PINDELSKA E. Pharmaceutical cocrystals as an opportunity to modify drug properties: From the idea to application: A review [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(13): 1357-1365.
- [6] CHENG G L, DENG C Y, JIANG C J. Research on solubility products of curcumin-catechol co-crystal [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2018, 35(5): 623-627.
- [7] SARMAH K K, BORO K, ARHANGELSKIS M, et al. Crystal structure landscape of ethenzamide: A physicochemical property study [J]. *Cryst Eng Comm*, 2017, 19(5): 826-833.
- [8] KHATIODA R, BORA P, SARMA B. Trimorphic ethenzamide cocrystal: *In vitro* solubility and membrane efflux studies [J]. *Cryst Growth Des*, 2018, 18(8): 4637-4645.
- [9] NECHIPADAPPU S K, TRIVEDI D R. Cocrystal of nutraceutical sinapic acid with Active Pharmaceutical Ingredients ethenzamide and 2-chloro-4-Nitrobenzoic acid: Equilibrium solubility and stability study [J]. *J Mol Struct*, 2018, 1171: 898-905.
- [10] KHATIODA R, SAIKIA B, DAS P J, et al. Solubility and *in vitro* drug permeation behavior of ethenzamide cocrystals regulated in physiological pH environments [J]. *Cryst Eng Comm*, 2017, 19(46): 6992-7000.
- [11] KOZAK A, MAREK P H, PINDELSKA E. Structural characterization and pharmaceutical properties of three novel cocrystals of ethenzamide with aliphatic dicarboxylic acids [J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(4): 1476-1485.
- [12] KAVANAGH O N, CROKER D M, WALKER G M, et al. Pharmaceutical cocrystals: From serendipity to design to application [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(3): 796-804.
- [13] SHAIKH R, SINGH R, WALKER G M, et al. Pharmaceutical cocrystal drug products: An outlook on product development [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(12): 1033-1048.
- [14] SUZUKI N, KAWAHATA M, YAMAGUCHI K, et al. Comparison of the relative stability of pharmaceutical cocrystals consisting of paracetamol and dicarboxylic acids [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2018, 44(4): 582-589.
- [15] KARAGIANNI A, MALAMATARI M, KACHRIMANIS K. Pharmaceutical cocrystals: New solid phase modification approaches for the formulation of APIs [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(1): 18.

收稿日期: 2019-07-10

(本文责编: 李艳芳)