

柚皮素烟酰胺共晶的制备及表征

许丹, 李彤, 张婷婷, 金波, 马辰* (中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要:目的 制备一种新型柚皮素共晶,以改善柚皮素水溶性差等问题。方法 采用溶剂挥发法,以乙酸乙酯为溶剂制备柚皮素烟酰胺共晶,利用红外光谱法(IR),差示扫描量热法(DSC),X射线粉末衍射法(XRPD)以及扫描电镜(SEM)等技术对其进行表征。结果 通过测定不同pH溶液的平衡溶解度,发现柚皮素烟酰胺共晶相比于柚皮素,其平衡溶解度有了显著提高。结论 该方法能够提高柚皮素的溶解度,简单易行,为进一步改善柚皮素溶解度打下基础。

关键词:共晶;柚皮素;烟酰胺;平衡溶解度

doi:10.11669/cpj.2019.04.007 中图分类号:R284 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)04-0291-06

Preparation and Characterization of Naringenin Nicotinamide Co-crystal

XU Dan, LI Tong, ZHANG Ting-ting, JIN Bo, MA Chen* (*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare a novel naringenin co-crystal to improve the poor water solubility of the compound. **METHODS** Solvent volatilization method was used to prepare naringenin nicotinamide co-crystal, with ethyl acetate as solvent. It is characterized by the technology of infrared spectroscopy (IR), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffraction (XRPD), scanning electron microscopy (SEM) and other techniques. **RESULTS** By measuring the equilibrium solubility of different pH solutions, it was found that the naringenin nicotinamide co-crystal has a significantly improved equilibrium solubility compared with naringenin. **CONCLUSION** This method can improve the solubility of naringenin, which is simple and easy, and lays the foundation for further study of naringenin co-crystal.

KEY WORDS: co-crystal; naringenin; nicotinamide; equilibrium solubility

柚皮素(naringenin, NAR)是一种广泛存在于芸香科植物葡萄柚,葡萄以及柑橘类水果中的二氢黄酮类化合物,因具有丰富的药理活性而被广泛关注。柚皮素具有抗氧化作用^[1-2]、抗肿瘤作用^[3-4]、抗焦虑作用^[5]、抗炎作用^[6-7]以及抗糖尿病作用^[8-9]等活性,被广泛应用于食品,化妆品以及医药领域。虽然其具有众多的药理活性,但是研究显示该物质的水溶性和脂溶性均较差,导致体内吸收差,生物利用度低^[10-11],柚皮素在兔体内的生物利用度仅为4%^[12]。已有文献^[13]报道采用固体分散体,纳米混悬剂^[14-15],脂质体^[16-17]等新剂型来提高柚皮素的生物利用度。与其他新剂型相比,共晶因制备简单,稳定性高等优点^[18]被广泛关注。

共晶可定义为由活性分子(active pharmaceutical ingredient, API)和一种或多种独特的共晶形成物组成的结晶物质,其在室温下为固体。共晶可以通过几种类型的相互作用来构建,包括氢键,π堆积和Vander

Waals力。通常依赖于API和其他组分中性分子之间的氢键进行结合,对于非离子化合物,共晶体通过改变化学稳定性,吸湿性,机械行为,溶解度和溶解速率来改善化合物性质^[19]。相比于其他技术,共晶存在如下优点:①化合物以原型形式存在,不改变化学结构;②共晶前驱体(co-crystal former, CCF)一般均采用安全无毒的分子配体;③无需离子化,因此理论条件下每个药物都可以形成共晶^[20]。

已有文献^[21-22]报道共晶能够改善化合物溶解性,关于柚皮素的研究,仅有柚皮素-异烟酰胺^[23],柚皮素-异烟肼^[24]2种共晶体。本实验采用安全性更高的烟酰胺^[25](nicotinamide, NCT)为CCF(烟酰胺是烟酸的酰胺形式,又被称为维生素B₃,是水溶性维生素的一种),采用溶剂挥发法,以乙酸乙酯为溶剂,制备柚皮素-烟酰胺共晶。通过红外光谱法(infrared spectroscopy, IR),差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC),X射线粉末衍射

基金项目:“重大新药创制”国家科技重大专项资助(2012ZX09301002-001-006)

作者简介:许丹,女,硕士 研究方向:药物分析 * 通讯作者:马辰,女,研究员 研究方向:药物分析 Tel:(010)63165239
E-mail:mach@imm.ac.cn

法(X-ray powder diffractio, XRPD)以及扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)等技术对其进行表征。溶解度结果显示,共晶在不同 pH 的溶液中平衡溶解度有了显著改善,该方法简单易行,为进一步研究柚皮素共晶打下基础。

1 实验方法

1.1 仪器

DSC-TGA-STARe 型热分析仪(瑞士梅特勒-托利多仪器公司),Spectrometer 400 型傅里叶红外光谱仪(英国 PerkinElmer 公司),D8 Advance 型 X 射线粉末衍射仪(德国 Bruker 公司),SU8010 扫描电镜仪(日本 Hitachi 公司),KH2200DE 型数控超声波清洗器(江苏昆山禾创仪器有限公司),H-Class 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),TH2 - C 恒温摇床(中国苏州培英实验设备公司)。

1.2 药品与试剂

柚皮素(纯度 96%,北京百灵威科技有限公司),烟酰胺(纯度 98%,北京百灵威科技有限公司),乙酸乙酯为分析纯,纯净水。

1.3 制备方法

采用溶剂挥发方法制备共晶,称取柚皮素 50 mg,烟酰胺 45 mg(摩尔比 NAR-NCT = 1:2),加入乙酸乙酯 10 mL,超声溶解,在 40 °C 水浴中加热 4 h,取出,用 0.22 μm 滤膜过滤,滤液转移到通风下,使溶剂挥干,即得。

2 表征

2.1 差示扫描量热法

分别称取 NAR、NCT 以及 NAR-NCT 共晶约 2 mg,置于带盖铝坩锅中,以空铝坩锅作为参比,N₂气氛 50 mL · min⁻¹,升温速率:35 ~ 300 °C,10 °C · min⁻¹,记录吸热曲线。

2.2 红外光谱分析

分别称取 NAR、NCT 以及 NAR-NCT 共晶样品适量,与溴化钾以质量比 1:100 的比例进行研磨,去除静电后压片测定,扫描次数 16 次,4 000 ~ 650 cm⁻¹全谱扫描,记录红外谱图。

2.3 X 射线粉末衍射分析

取适量 NAR、NCT、二者物理混合物以及 NAR-NCT 共晶样品,研成细粉状,测试条件为:Cu 靶,电压 40 kV、电流 40 mA,测试角度范围在 5° ~ 40°。

2.4 扫描电镜分析

扫描电镜分辨率 20.0 μm,电加速压 5 kV,记录

NAR 和 NCT 以及 NAR-NCT 共晶样品的 SEM 图。

3 平衡溶解度试验

分别称取过 100 目筛的 NAR-NCT 共晶 8 mg, NAR 4 mg 和物理混合物(1:1)8 mg,分别加入 50 mL 溶剂(pH 1 盐酸溶液,水,pH 6.8 磷酸盐缓冲液),加盖,于 100 r · min⁻¹,25 °C 恒温摇床中振摇 12 h,取样,用 0.22 μm 滤膜过滤,续滤液用 UPLC 分析测定样品平衡溶解度。

色谱条件:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm,1.7 μm);柱温:40 °C;流动相:甲醇-0.1% 乙酸水溶液(70:30),流速:0.2 mL · min⁻¹;进样量:1 μL;检测波长:290 nm。

4 结果与讨论

4.1 ΔpKa

美国 FDA 药物评估研究中心发布的药物共晶指导原则^[26],认为 API 与其共聚物 ΔpKa(pKa_碱 - pKa_酸) > 1 时,表明发生了实质性的质子转移导致电离,从而形成盐;相反,当有 ΔpKa(pKa_碱 - pKa_酸 < 1),将不会有可观的质子传递。如果符合这个标准,那么形成的实体应该被分类为共晶。柚皮素和烟酰胺的 pKa 值分别为 6.7^[27] 和 3.4^[28],二者的 ΔpKa 值为 -3.3,表明合成产物属于共晶。

4.2 NAR-NCT 共晶的表征

4.2.1 差示扫描量热法(DSC) NAR、NCT 以及 NAR-NCT 共晶的 DSC 热分析曲线见图 1。NAR 和 NCT 的吸热峰分别为 254.07 和 129.46 °C。经溶剂挥发法制得的 NAR-NCT 共晶吸热峰为 134.68 °C,该吸热峰的温度与 NAR 和 NCT 都不相同,且新产物在 254.07 和 129.46 °C 处并未产生吸收峰,表明有新的晶相生成。

4.2.2 红外光谱解析(IR) 红外吸收光谱是依据分子内部原子间相互振动以及分子转动等信息来推测被测物分子结构的一类分析方法。其峰位、峰强和峰形等可以判断存在于共晶化合物中的官能团,可推断分子间可能存在氢键等其他分子间作用力。NAR、NCT 以及 NAR-NCT 共晶的红外光谱图见图 2。NAR 羟基的 ν_{O-H} 峰位于 3 261 cm⁻¹,羰基的 ν_{C=O} 峰位于 1 624 cm⁻¹,碳氧单键的 ν_{C-O} 峰位于 1 155,1 082 cm⁻¹^[29]。NCT 酰胺中的 ν_{N-H} 峰位于 3 356 cm⁻¹,ν_{C=O} 峰位于 1 672 cm⁻¹,ν_{C-N} 峰位于 1 391 cm⁻¹。NAR-NCT 共晶在 3 413,3 310,1 676,1 629,1 402,1 157,1 085,828 和 695 cm⁻¹ 等处有吸收峰(表 1)。

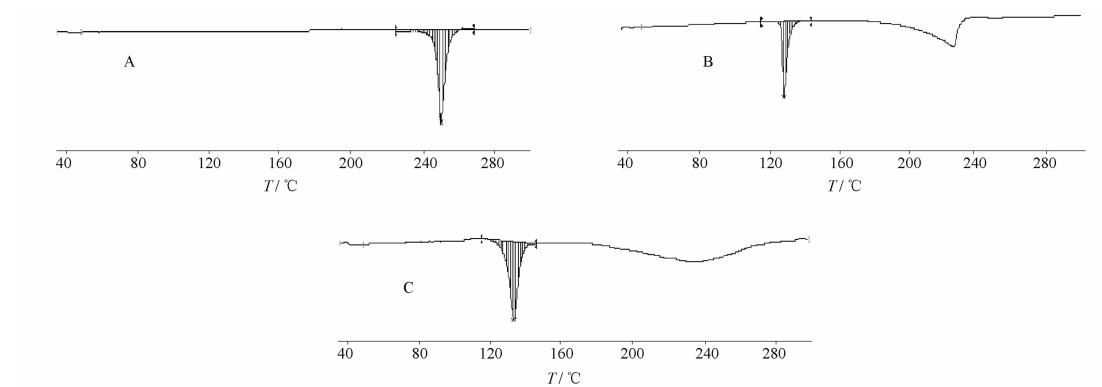


图1 柚皮素(NAR,A),烟酰胺(NCT,B)和 NAR-NCT 共晶(C)的 DSC 图

Fig. 1 DSC of NAR(A), NCT(B) and NAR-NCT co-crystal(C)

表1 NAR,NCT 和 NAR-NCT 共晶的红外光谱分析

Tab. 1 Infrared spectroscopy of NAR, NCT and NAR-NCT

Sample	ν_{O-H}/cm^{-1}	ν_{N-H}/cm^{-1}	$\nu_{C=O}/\text{cm}^{-1}$	ν_{C-O}/cm^{-1}	ν_{C-N}/cm^{-1}	ν_{C-O}/cm^{-1}
NAR	3 261			1 624		1 155, 1 082
NCT		3 356	1 672		1 391	
NAR-NCT	3 413	3 310	1 676	1 629	1 402	1 157, 1 085

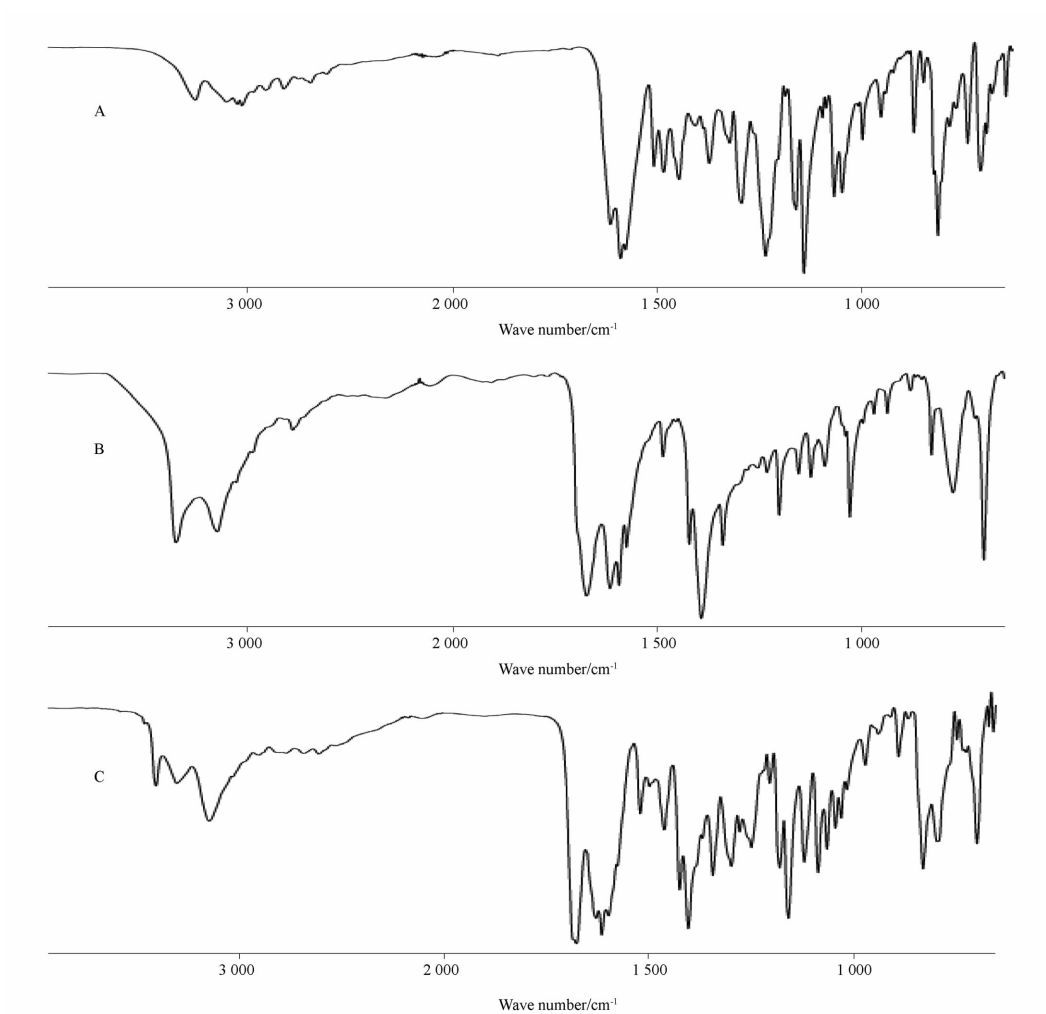


图2 NAR(A),NCT(B)和 NAR-NCT 共晶(C)的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectrum of NAR(A), NCT(B) and NAR-NCT co-crystal(C)

共晶中位于 $3\,413\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰与 NAR 的红外光谱 $\nu_{\text{O-H}}\ 3\,261\text{ cm}^{-1}$ 峰相似,并且发生了位移,由此可以推断,NAR 中 5 位,7 位和 4' 位的羟基有可能参与了氢键的形成。共晶中 $3\,310\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰与 NCT 的红外光谱 $\nu_{\text{N-H}}\ 3\,356\text{ cm}^{-1}$ 峰相似,NCT 的 $\nu_{\text{N-H}}$ 吸收峰发生了位移,可能是由于酰胺 N 上的 H 与 NAR 中的原子形成氢键所致。共晶在 $1\,676\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰与 NCT 的 $1\,672\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰相似; $1\,629\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰与 NAR 的 $1\,624\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰相似,NCT 和 NAR 中 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰均发生了位移,表明二者 C=O 键中的氧原子成为受氢体,形成氢键。NAR-NCT 共晶位于 $1\,402\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\nu_{\text{C-N}}$ 峰与 NCT 中 $1\,391\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\nu_{\text{C-N}}$ 峰相似,表明 C-N 键周围存在氢键,对峰位产生影响。NAR-NCT 共晶与 NAR 相比, $\nu_{\text{C=O}}$ 峰位也发生了位移,由此推断氧原子在共晶形成过程中起到了关键的作用。综上所述,由红外吸收光谱分析可知,NAR 和 NCT 之间由于 C=O...H 相互作用,形成共晶。

4.2.3 X 射线粉末衍射解析(XRPD) 每一种晶体的 X 射线粉末衍射图谱都是独特的。而且衍射图谱的位置和强度均具有独特的性质。因此,当新晶体生成的时候,在粉末衍射图谱中就会有新的衍

射峰出现。NAR、NCT、NAR-NCT 共晶以及物理混合物的粉末图谱见图 3。对比可得,NAR-NCT 共晶与物理混合物的粉末衍射图谱中特征峰发生明显改变,峰位以及峰形完全不同。共晶化合物在 $2\theta = 10.272^\circ, 12.283^\circ, 13.045^\circ$ 出现了新的衍射峰,归属于 NAR 的 $18.690^\circ, 32.807^\circ$ 和归属于 NCT 的 $15.015^\circ, 38.875^\circ$ 的特征峰消失。XRPD 图谱结果表明,柚皮素和烟酰胺之间形成了新的晶型。

4.2.4 扫描电镜(SEM)分析 为 NAR、NCT 以及 NAR-NCT 共晶的 SEM 图见图 4,电镜结果显示,本法所制得的 NAR-NCT 共晶的外观与 NAR 和 NCT 明显不同,在放大 2000 倍下,NAR 为板状晶体,NCT 为棒状晶体,NAR-NCT 共晶为粒状的晶体,具有明显的形成共晶的特征。

4.3 Material Studio 软件模拟

根据 NAR 与 NCT 的结合摩尔比为 1:2,采用计算机 Material Studio 软件进行模拟,显示结果与上文推测的结论相符,二者间主要以 C=O...H 的形式相互结合,形成共晶化合物(图 5)。

4.4 平衡溶解度实验

NAR-NCT 共晶,NAR 以及物理混合物在水及不同 pH 水溶液中的平衡溶解度见表 2。NAR-NCT

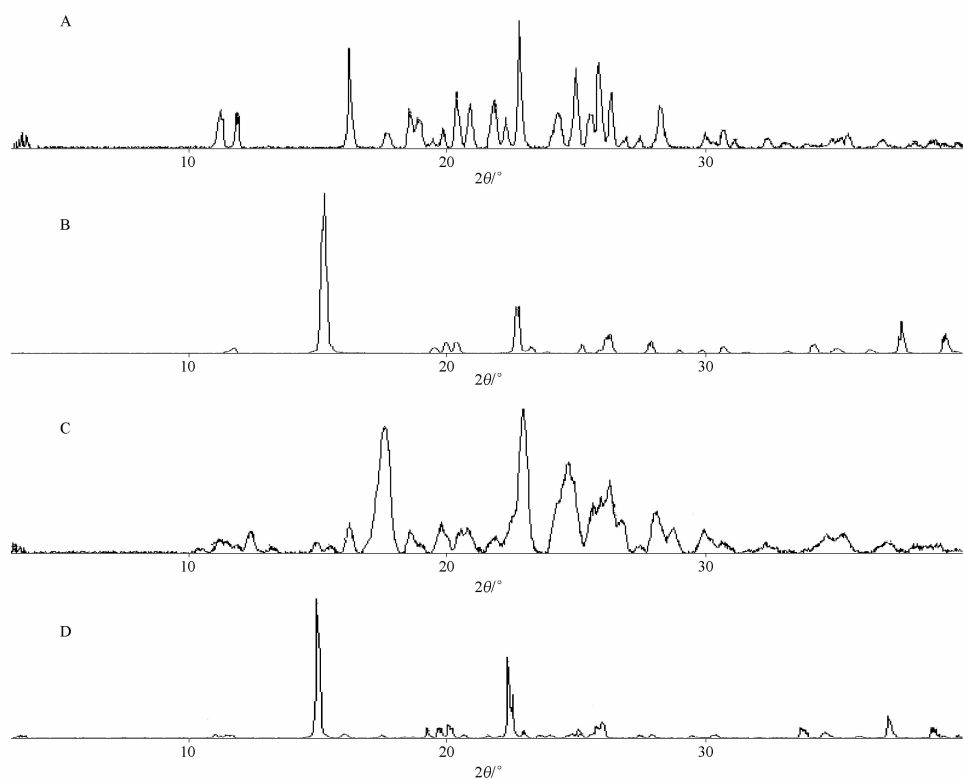


图 3 NAR(A), NCT(B), NAR-NCT 共晶(C)和物理混合物(D)的 X 射线粉末衍射图谱

Fig. 3 X-ray powder diffraction spectrum NAR(A), NCT(B), co-crystal(C) and physical mixture(D)

共晶在 pH 1 盐酸溶液的平衡溶解度为 NAR 以及物理混合物的 2.6 倍,在水中分别为 NAR 和物理混合物的 2.7 和 2.3 倍,在 pH 6.8 缓冲液中为 NAR 以及物理混合物的 3.2 倍。NAR-NCT 共晶提升了柚皮素的溶解度。

结合分析结果推测共晶在溶解过程中,水溶性组分 NCT 率先从晶格中脱离出来,使得晶体的结构变得疏松,溶剂易于进入,使 NAR 的溶解度得到提

高,柚皮素烟酰胺共晶中柚皮素的最高溶解度约为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

本实验采用溶剂挥发法,制备柚皮素-烟酰胺共晶,并利用差示扫描量热法(DSC),红外光谱法(IR),X 射线粉末衍射法(XRPD)以及扫描电镜(SEM)等技术对其进行表征,该共晶能够提高柚皮素的溶解度,为后续黄酮类化合物溶解度的改善提供新思路。

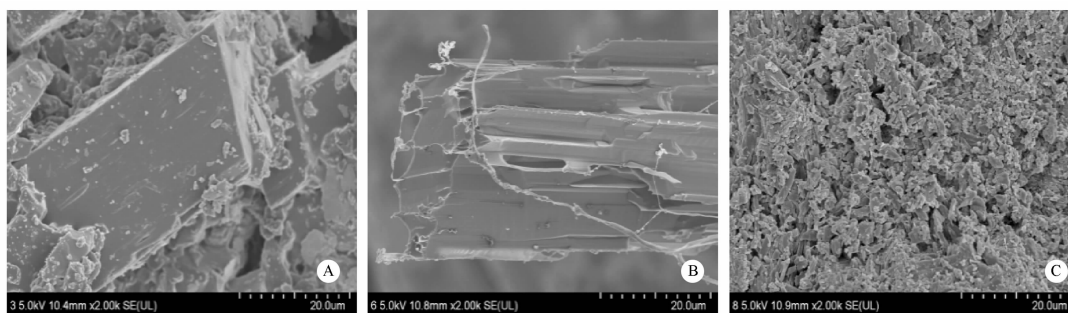


图 4 NAR(A),NCT(B)和 NAR-NCT 共晶(C)的 SEM 图($\times 2000$)

Fig. 4 SEM of NAR(A), NCT(B) and NAR-NCT co-crystal(C) ($\times 2000$)

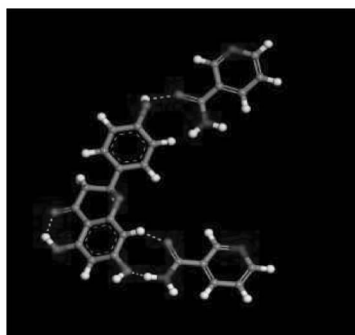


图 5 NAR 与 NCT 在晶体内的作用形式

Fig. 5 Form action of NAR and NCT in the crystal

表 2 不同溶剂中 NAR 的平衡溶解度

Tab. 2 Equilibrium solubility of NAR in different solvents

Samples	$\rho_{\text{pH } 1 \text{ hydrochloric acid}}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	ρ_{Water} / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\rho_{\text{pH } 6.8 \text{ buffer solution}}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
NAR	7.85	9.20	8.48
NAR + NCT	7.83	10.69	8.38
NAR-NCT	20.75	24.94	26.58

REFERENCES

[1] PARK M, KIM K, LEE Y M, *et al.* Naringenin stimulates cholecystokinin secretion in STC-1 cells[J]. *Nutr Res Pract*, 2014, 8(2):146-150.

[2] CAVIA-SALIZ M, BUSTO M D, PILAR-IZQUIERDO M C, *et al.* Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90

(7):1238-1244.

[3] LIM W, PARK S, BAZER F W, *et al.* Naringenin-induced apoptotic cell death in prostate cancer cells is mediated via the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(5):1118-1131.

[4] PARK H J, CHOI Y J, LEE J H, *et al.* Naringenin causes ASK1-induced apoptosis via reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 99:1-8.

[5] ANDERSON W, BARROWS M, LOPEZ F, *et al.* Investigation of the anxiolytic effects of naringenin, a component of mentha aquatica, in the male Sprague-Dawley rat [J]. *Holist Nurs Pract*, 2012, 26(1):52-57.

[6] MANCHOPE M F, CASAGRANDE R, VERRI W A J R. Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3):3766-3767.

[7] JIN L, ZENG W, ZHANG F, *et al.* Naringenin ameliorates acute inflammation by regulating intracellular cytokine degradation [J]. *J Immunol*, 2017, 199(10):3466-3477.

[8] NYANE N A, TLAILA T B, MALEFANE T G, *et al.* Metformin-like antidiabetic, cardio-protective and non-glycemic effects of naringenin: molecular and pharmacological insights [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 803:103-111.

[9] SANDEEP M S, NANDINI C D. Influence of quercetin, naringenin and berberine on glucose transporters and insulin signalling molecules in brain of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94:605-611.

[10] ZHANG T T, MA C. Determination of plasma concentration of naringenin and glucuronic acid conjugate in rat plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2014, 49(10):864-868.

- [11] MA Y, LIN B Q, LI W Z, *et al.* Study on the absorption kinetics of naringenin in the intestine[J]. *Chin Tradit Patent Med*(中成药), 2012, 34(8):1487-1491.
- [12] HSIU S L, HUANG T Y, HOU Y C, *et al.* Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits[J]. *Life Sci*, 2002, 70(13):1481-1489.
- [13] KHAN A W, KOTTA S, ANSARI S H, *et al.* Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation carrier[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(5):772-779.
- [14] SINGH M K, POOJA D, RAVURI H G, *et al.* Fabrication of surfactant-stabilized nanosuspension of naringenin to surpass its poor physicochemical properties and low oral bioavailability[J]. *Phytomedicine*, 2018, 40:48-54.
- [15] GERA S, TALLURI S, RANGARAJ N, *et al.* Formulation and evaluation of naringenin nanosuspensions for bioavailability enhancement[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2017, 18(8):3151-3162.
- [16] JI P, ZHAO W M. Preparation of naringenin liposome and pharmacokinetic study of rat lung administration[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2015, 37(8):1699-1704.
- [17] JI P, ZHAO W M. Preparation and pharmacodynamic evaluation of naringenin liposome freeze-dried powder[J]. *Acta Acad Med Sin*(中国医学科学院学报), 2015, 37(2):208-214.
- [18] GAO Y, ZU H, ZHANG J J. Pharmaceutical cocrystals[J]. *Prog Chem*(化学进展), 2010, 22(5):829-835.
- [19] YADAV A V, SHETE A S, DABKE A P, *et al.* Co-crystals: a novel approach to modify physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2009, 71(4):359-370.
- [20] MIROSHNYK I, MIRZA S, SANDLER N. Pharmaceutical co-crystals-an opportunity for drug product enhancement [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6(4):333-341.
- [21] YI H, YIN Y M, ZHAO X L, *et al.* Preparation and characterization of itraconazole eutectic[J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2014, 31(3):161-168.
- [22] XU H, ZHANG F K, CHI Z L, *et al.* Preparation of curcumin lysine eutectic and comparison of solubility of different crystal forms[J]. *Chin Pharm*(中国药师), 2017, 20(2):208-212.
- [23] LIANG S J, ZHOU S Y, YANG S T, *et al.* Thermodynamic study on the formation of naringenin-isonicotinamide eutectic [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2017, 52(4):625-633.
- [24] LIANG W D, LUO C, ZHANG H L, *et al.* Characterization and properties of isoniazid-naringenin eutectic[J]. *J Wuhan Univ Sci Technol*(武汉科技大学学报), 2018, 41(3):190-194.
- [25] HUANG T, LIN X R. Progress in the application of nicotinamide in dermatology[J]. *Int J Dermatol Venereol*(国际皮肤性病杂志), 2009, 35(2):76-79.
- [26] FDA. Guidance for industry: Regulatory classification of pharmaceutical co-crystals [S/OL]. FDA, [2011-12-01] [2013]. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
- [27] JOVANOVIĆ S V, STEENKEN S, TOSIĆ M, *et al.* Flavonoids as antioxidants [J]. *J Am Chem Soc*, 1994, 116(11):4846-4851.
- [28] SHI Y, FRITZ J S. New electrolyte systems for the determination of metal cations by capillary zone electrophoresis[J]. *J Chromatogr A*, 1994, 671(1-2):429-435.
- [29] JEON S H, CHUN W, CHOI Y J, *et al.* Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*[J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(8):978-982.

(收稿日期:2018-07-29)