晶习对辛伐他汀氧化稳定性的影响

王欣雨[1]，俞卡茜[1]，周新波[2]，胡秀荣[1]，施蒂儿[1]，陈芳[1]
1. 浙江大学 化学系，浙江 杭州　310027
2. 浙江京新药业股份有限公司，浙江 绍兴　312500

摘　要：目的　分析晶习对辛伐他汀氧化稳定性的影响。**方法**　将辛伐他汀从不同极性的溶剂混合物中重结晶，制备辛伐他汀的不同晶习，使用电子顺磁共振波谱仪（EPR）表征氧化稳定性，采用密度泛函理论（DFT）方法计算分析氧化位点，使用多晶 X 射线衍射仪（PXRD）进行晶面检测分析。**结果**　制备得到辛伐他汀 I 晶型的薄片状和棒状两种晶习，EPR 结果显示棒状晶习氧化稳定性更好，DFT 计算显示辛伐他汀氧化位点在辛伐他汀六氢萘片段上，PXRD 结果显示薄片状晶习比棒状晶习暴露的氧化位点更多。辛伐他汀晶习不同导致各晶面占比不同，活泼氧化位点的暴露比例不同，活泼氧化位点暴露越多的晶习越不稳定，而将活泼位点更多保护在晶体内部的晶习更加稳定。**结论**　开发了一种高效、无损的氧化稳定性 EPR 检测方法，为药物晶习的相关研究提供了新思路和新方法。

关键词：辛伐他汀；晶习；氧化稳定性；电子顺磁共振；多晶 X 射线衍射；密度泛函理论
中图分类号：R927　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 5515(2023)01 - 0065 - 06
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.01.009

Influence of crystal habit on oxidation stability of simvastatin

WANG Xin-yu[1], YU Ka-xi[1], ZHOU Xin-bo[2], HU Xiu-rong[1], SHI Di-er[1], CHEN Fang[1]
1. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China
2. Zhejiang Jingxin Pharmaceutical Co., Ltd., Shaoxing 312500, China

Abstract: Objective　To study influence of crystal habit on the oxidative stability of simvastatin. **Methods**　Different crystal habits of simvastatin were recrystallized from solvent mixtures with different polarities. The oxidation stability was characterized by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR). The oxidation sites were calculated by density functional theory (DFT). The crystal planes were detected and analyzed by polycrystalline X-ray diffraction (PXRD). **Results**　Lamellar and rodlike crystal habits of simvastatin I crystal form were prepared. EPR results showed that rodlike crystal habit have better oxidation stability. DFT calculation showed that the oxidation site of simvastatin was on the hexahydronaphthalene fragment of simvastatin. PXRD results showed that the lamellar crystal habit exposed more oxidation sites than the rodlike crystal habit. The proportion of exposed active oxidation sites in the two crystal habits was different. The more active oxidation sites were exposed, the more unstable the crystal habit was. **Conclusion**　An efficient and nondestructive EPR method for measuring oxidation stability has been developed. This experiment provides a new idea and method for the related research of drug crystal habit.

Key words: simvastatin; crystal habit; oxidation stability; EPR; PXRD; DFT

辛伐他汀是洛伐他汀的衍生物，是一种口服降血脂药物。辛伐他汀的氧化稳定性较差，必须加入叔丁基-4-羟基-茴香醚（BHA）、维生素 C 或枸橼酸等抗氧化剂保证其稳定性[1]，因此辛伐他汀的氧化稳定性是影响其有效期和安全性的重要性质之一。文献报道了制备方法差异对非晶态辛伐他汀稳定性的影响[2-5]，但未见对晶态辛伐他汀氧化稳定性的研究。大部分药品中的活性成分或中间体都含有原料药晶体[6]，这些晶体的排列方式决定了药物的物化性质，从而最终决定了药物的溶解性能、稳定性

收稿日期：2022-08-31
基金项目：国家自然科学基金资助项目（22103068）；浙江省基础公益研究计划项目（LGC22B050010）
作者简介：王欣雨（1989—），女，实验师，博士，从事自由基的稳定性研究。E-mail: wxy789819@126.com

和加工性能等[7-8]。即使生产得到相同的晶型，不同重结晶工艺得到的产品在形貌上可能天差地别，这种晶型一致、生长优势取向不同导致的晶体形貌差异称为晶习。晶习是在结晶过程中决定的，当药物晶体具有不同的晶习时，晶体表面暴露的官能团的比例有所差异，晶体的物化性质可能会发生显著变化[9]。因此通过研究晶习对氧化稳定性的影响就有可能筛选制备更加稳定优质的产品。本研究将多晶 X 射线衍射（PXRD）、电子顺磁共振波谱（EPR）技术与密度泛函理论（DFT）计算相结合，开发了一种高效、无损的氧化稳定性 EPR 检测方法，DFT 计算得到辛伐他汀的氧化位点，结合 PXRD 晶面分析，研究了晶习对辛伐他汀氧化稳定性的影响，并得到一种更稳定的辛伐他汀优势晶习，为药物晶习的相关研究提供了新思路和新方法。

1 仪器与材料

Hitachi SU8010 场发射扫描电子显微镜（SEM）；PXRD 测试采用 SmartLab X 射线粉末衍射仪（日本理学 Rigaku 公司），以 CuKα 射线（λ=15.4059 nm）为辐射源进行数据采集，所得数据用 MDI-Jade version 7.5.1 软件处理；EPR 测试采用 Bruker A300 X-band EPR spectrometer；DFT 计算采用 Gaussian 09 D.01 软件[10]运行，所有结构优化均使用 B3LYP/ 6-31G(d,p)方法，并进行频率分析，以确定结构为能量最低结构。Beckman Coulter LS13 320 激光粒度仪。辛伐他汀原料药（浙江京新药业股份有限公司，批号 1910271，质量分数＞99.0%）；BHA（上海百灵威化学技术有限公司，质量分数＞99.0%）；所用有机溶剂均为分析纯试剂（天津永大化学试剂有限公司）。

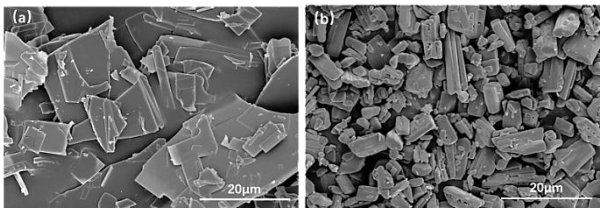
2 方法与结果

2.1 晶习的制备

将未经处理的辛伐他汀从具有不同极性的溶剂混合物中重结晶，制备得到辛伐他汀 I 晶型的不同晶习。在乙醇－水体系中重结晶所得晶习为晶习 I（Sim-I），在丙酮－正庚烷中重结晶所得晶习为晶习 II（Sim-II）。由于辛伐他汀易氧化，为防止纯品烘干过程中的氧化带来的误差，将辛伐他汀湿品与 2% BHA 均匀混合，40 ℃真空干燥 4 h，即得。

2.2 晶习的表征

使用 SEM 表征两种辛伐他汀晶体形貌，加速电压 10 kV，发射电流 10 μA，结果见图 1。可见两种晶习的形貌具有显著差异，Sim-I 为薄片状晶体，



a-Sim-I b-Sim-II

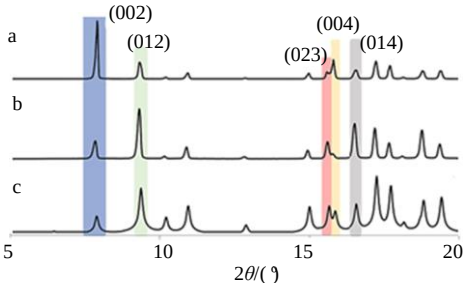
图 1 辛伐他汀晶体的 SEM 图

Fig. 1 SEM of simvastatin crystal

Sim-II 为棒状晶体。有一些研究组已经研究了辛伐他汀的不同晶习对其最终剂型溶解行为的影响，提出板状晶习的溶解性和生物制药性能都显著增强，原因是其比针状晶习具有更丰富的亲水表面[11-13]。

2.3 PXRD 分析

将样品置于玻璃样品板上制样，在 X 射线粉末衍射仪上使用一维阵列探测器，管电压 40 kV，管电流 180 mA，2θ 扫描范围 3°～40°，步宽 0.02°，扫描速度 5°/min，进行测试。得到两种不同晶习的辛伐他汀 PXRD 结果，为使前面有差异的峰更清楚，局部放大到 5°～20°，见图 2。可见两者衍射峰数量、位置相同，但衍射峰相对强度有差异，主要表现在 2θ＝7.9°、9.3°、15.6°、15.8°、16.5°几个衍射峰，分别对应的是(002)、(012)、(023)、(004)、(014)晶面。将它们的特征衍射谱线与根据剑桥晶体结构数据库（CCDC）单晶结构（CCDC No：219566）[14]计算得到的 PXRD 图进行对比，结果它们属于同一个晶型，即辛伐他汀 I 晶型。



a-Sim-I b-Sim-II c-计算所得

a-Sim-I b-Sim-II c-calculated

图 2 辛伐他汀的 PXRD 谱图

Fig. 2 PXRD of simvastatin crystal

2.4 氧化稳定性

辛伐他汀是不稳定药物，易氧化变质，该过程为自由基过程。辛伐他汀稳定性通常采用高效液相色谱法[15-16]，但该方法操作较复杂，配制溶液的过程中研磨等操作会导致样品变质，产生误差[17-18]，

而且测试结果难以区分氧化产物和水解产物。EPR 是自由基最直接有效的检测手段，且无需研磨、溶解，能够有效解决上述问题。但对纯辛伐他汀样品直接测量 EPR 时，发现无法检测到信号，可能由于药物降解产生的自由基非常活泼，会立刻进行下一步甚至多步链反应生成非自由基物种，自由基寿命太短，导致 EPR 无法直接检测到信号。

一般在辛伐他汀片的处方中会加入抗氧化剂（常用的是 BHA）以增加辛伐他汀的稳定性。BHA 的抗氧化机制是自由基吸收剂，即药物氧化生成自由基后，与 BHA 反应进一步生成 BHA 自由基（BHAR），BHAR 为较稳定的酚自由基，从而阻断了药物的自由基链反应过程。而 BHAR 寿命较长，是能够被 EPR 直接检测到的，其信号强度用ΔH_{pp}表示（图 3）。依据定量 EPR 的原理，在其他条件都不变的情况下，该信号强度与 BHAR 的数目呈正比。因此在辛伐他汀纯品中添加 BHA，通过 BHAR 的信号变化间接得到辛伐他汀的变化规律。

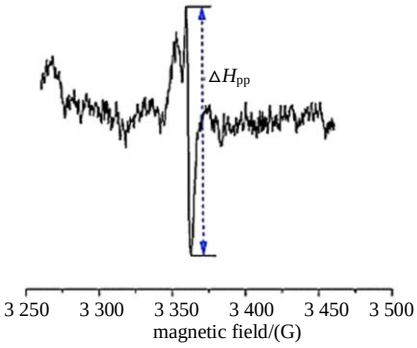


图 3　BHAR 的 EPR 信号

Fig. 3　EPR signal of BHAR

将 0.05 g 待测辛伐他汀样品装入 5 mm 外径 EPR 样品管中，抽真空后充氮气或氧气，在线加热 50 ℃，功率 20 mW，每 30 分钟检测 1 次 EPR 信号强度变化。

样品制备、烘干过程中难以完全隔离氧气，因此 0 h 的样品存在初始 EPR 信号。新制的 Sim-I、Sim-II 湿品分别与 BHA 混合烘干后在氮气气氛中在线加热 6 h，每 30 分钟测量 BHAR 的信号强度。由于该过程没有氧气参与，不存在样品氧化[19]，不会引发产生新的 BHAR，随着时间推移，样品中原有 BHAR 会逐渐聚合猝灭，BHAR 信号下降（图 4-a、4-b）。将新制 Sim-I 湿品与 BHA 混合烘干，在氧气气氛中加热，发现 BHAR 信号强度随着时间增加（图 4-c），说明在该过程中，样品在持续发生氧化。而将新制的 Sim-II 湿品与 BHA 混合烘干后在氧气中加热，BHAR 信号仅有少量的增加（图 4-d），说明 Sim-II 比 Sim-I 更稳定，可能是 Sim-II 的样品中暴露在外的氧化位点更少。将新制的 Sim-I 样品常温干燥储存 6 个月，样品明显氧化发黄，将该样品同样与 BHA 混合后在氧气气氛中加热，发现 BHAR 信号随着加热时间仅有略微的增加（图 4-e），说明该过程中只有少量样品发生氧化。原因可能是 Sim-I 在无抗氧剂保护的情况下长时间储存后，发生氧化变质，仍然暴露在外的氧化位点减少。将新制的 Sim-II 样品常温干燥储存 6 个月后与 BHA 混合后，在氧气气氛中加热，发现 BHAR 信号随着加热时间先上升再下降（图 4-f），说明该过程中先发生氧化，一段时间后该过程结束。原因可能是 Sim-II 更加稳定，在无抗氧剂保护的情况下长时间储存后，仍存在较多的氧化位点，在氧气中加热后加速氧化，BHAR 信号上升，暴露的氧化位点反应完全后，不会再引发新的 BHAR，BHAR 信号下降。

2.5　DFT 计算确认氧化位点

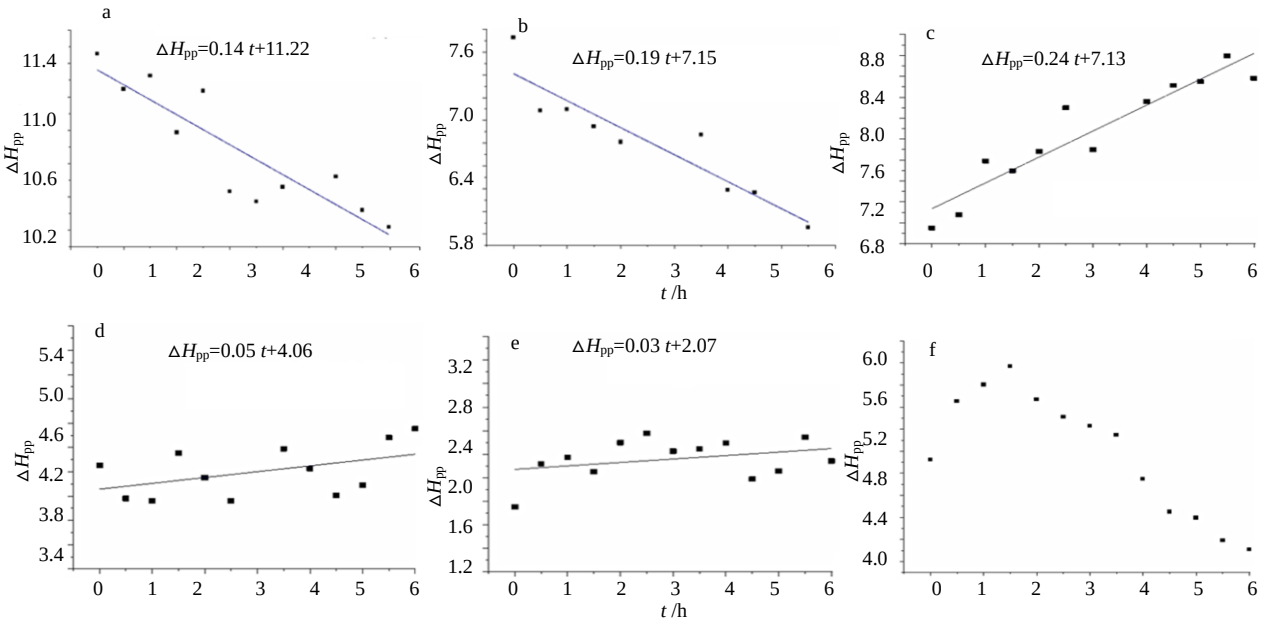
Sim-I 与 Sim-II 相比，分子结构和晶体结构完全相同，只有晶习差异，即各晶面占比多少的差异。由于辛伐他汀的氧化机制和产物并未见明确报道，难以为药物原料和制剂过程中优势晶型、优势晶习的开发提供理论指导，因此为了研究晶习是如何影响辛伐他汀的氧化稳定性，首先要确定辛伐他汀的氧化位点。实验利用 DFT 计算方法从分子层面分析辛伐他汀的氧化位点，为本研究提供理论支持。

辛伐他汀分子结构见图 5。首先依据 H 原子的类型选择辛伐他汀分子中 7 个可能氧化的位点（图 5 中绿色原子为可能被氧化脱氢的 H 原子），分别计算该分子脱氢前后的能量差，即为这 7 个位点的 H 原子键解离能（BDE），计算公式[20]为：

$$BDE=E_{radical}+E_{H\ radical}E_{ground\ state} \quad (1)$$

其中 $E_{ground\ state}$ 为基态分子的自由能，$E_{radical}$ 为基态分子脱 H 后形成自由基的自由能，$E_{H\ radical}$ 为氢原子的自由能

对于同一分子，基态分子的自由能和氢原子的自由能不变，因此为了对比 7 个位点的脱氢 BDE，仅需对比这 7 个位点的 $E_{radical}$ 即可。7 个位点的 $E_{radical}$ 结果见表 1。以 H23A 所在位点的脱氢 BED 为参照，设为 0 kcal/mol，其他位点的脱氢 BED 与其差值设为ΔBDE，则$\Delta BDE=\Delta E_{radical}$。



a-新制 Sim-I 湿品与 BHA 混合烘干后在氮气气氛中加热 b-新制 Sim-II 湿品与 BHA 混合烘干后在氮气气氛中加热 c-新制 Sim-I 湿品与 BHA 混合烘干后在氧气气氛中加热 d-新制 Sim-II 湿品与 BHA 混合烘干后在氧气气氛中加热 e-变质 Sim-I 样品与 BHA 混合烘干后在氧气气氛中加热 f-变质 Sim-II 样品与 BHA 混合烘干后在氧气气氛中加热

a-new Sim-I is mixed and dried with BHA and then heated in nitrogen atmosphere b-new Sim-II is mixed and dried with BHA and then heated in nitrogen atmosphere c-new Sim-I is mixed and dried with BHA and then heated in oxygen atmosphere d-new Sim-II is mixed and dried with BHA and then heated in oxygen atmosphere e-deteriorated Sim-I is mixed and dried with BHA and then heated in oxygen atmosphere f-deteriorated Sim-II is mixed and dried with BHA and then heated in oxygen atmosphere

图 4 BHAR 信号强度随着加热时间的变化

Fig. 4 Change of signal strength of BHAR with time

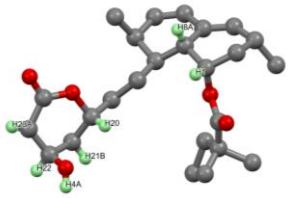


图 5 辛伐他汀分子结构和可能的氧化位点

Fig. 5 Molecular structure and possible oxidation sites of simvastatin

根据表 1 结果明显可以看出，BDE 最小的位点是 H8A，说明脱去该位点的 H 所需能量最小，因此该位点最活泼、最易被氧化。该位点与 Simões 等[19]提出的辛伐他汀在氧气中加热分解过程涉及六氢萘片段氧化的结论相一致。

2.6 晶习对辛伐他汀稳定性的影响

依据辛伐他汀的晶面分析可以看出，Sim-I 和 Sim-II 之间有差异的晶面中，(023)晶面（图 6）正好经过了上述最活泼、易氧化的位点，即 H8A 原子（在图 6、7 中用绿色标出）所在位点裸露。其他的晶面中，(002)面（图 7-a）中主要裸露的基团为酯基和烷基，(004)面（图 7-b）中主要裸露的基团为烷基，(012)面（图 7-c）中主要裸露的基团为烷基和内酯环，(014)面（图 7-d）中主要裸露的基团为烷基和醚基。这些基团都是较为稳定的基团，不易被氧化。因此(023)晶面裸露越多，则氧化稳定性就越差。

表 1 辛伐他汀分子 7 个位点的脱氢 BDE

Table 1 Dehydrogenation BDE at 7 sites of simvastatin

H[a]	E_{radic}（Hartree）	ΔBDE/(kcal·moL^{-1})
H23A	−1 350.699 1	0.0
H22	−1 350.687 2	7.5
H4A	−1 350.698 6	0.3
H20	−1 350.708 7	−6.0
H21B	−1 350.689 6	6.0
H8A	−1 350.716 1	−10.6
H1	−1 350.692 4	4.2

a-不同位点 H 原子的命名来自图 5（1 cal＝4.2 J）

a-the names of H atoms at different sites are from Fig. 5 (1 cal＝4.2 J)

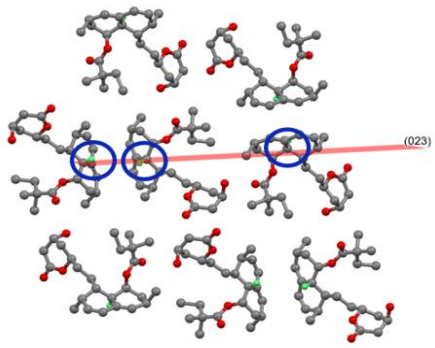
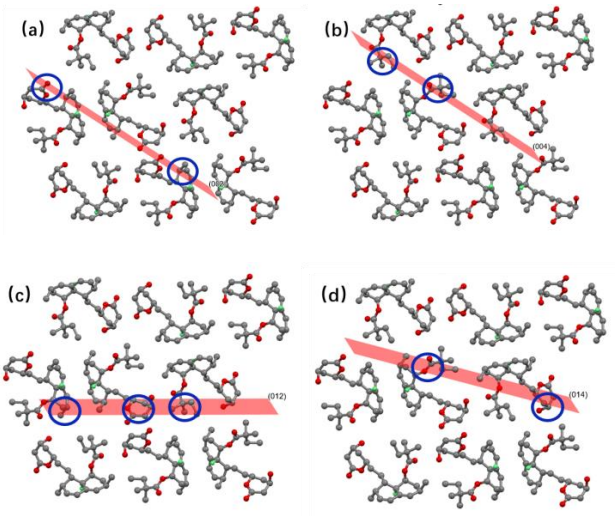


图 6　辛伐他汀晶体沿(023)晶面的表面结构

Fig. 6　Surface structure of simvastatin crystal along (023) crystal plane



a-(002) 晶面　b-(004)晶面　c-(012) 晶面　d-(014) 晶面

a-(002) crystal plane　b-(004) crystal plane　c-(012) crystal plane　d-(014) crystal plane

图 7　辛伐他汀晶体不同晶面的表面结构

Fig. 7　Surface structure of different crystal planes of simvastatin crystal

通过对比两种晶习的 PXRD 图，可以发现两者晶面所占比例有差异，Sim I 中(023)面占比大于 Sim Ⅱ，即(023)晶面裸露更多，含 H8A 的晶面所占比例多于 Sim II，因此该晶习氧化稳定较差，与 EPR 和量化计算的结论一致。

3　讨论

辛伐他汀在室温下只有 1 种已知的稳定晶体结构[21]，因此通过对辛伐他汀原料药本身进行物理改性的空间很小，目前只能通过额外添加抗氧剂的方法提高辛伐他汀的氧化稳定性。EPR 用于研究辛伐他汀的氧化稳定性，无需对样品进行研磨、溶解等一系列操作，避免了样品二次降解等误差，是一种准确高效的检测手段。EPR 结果表明晶习对辛伐他汀氧化稳定性有较大影响，DFT 计算和 PXRD 结果表明，晶习对其氧化稳定性影响的原因是晶习不同导致各晶面占比不同，活泼氧化位点的暴露比例不同，活泼氧化位点暴露越多的晶习越不稳定，而将活泼位点更多地保护在晶体内部的晶习更加稳定。

本研究通过将 PXRD 技术与 EPR 技术和 DFT 计算相结合发现，改变辛伐他汀晶习也可以改变辛伐他汀的氧化稳定性。本研究探究了晶习对氧化稳定性的影响机制，为药物原料和制剂过程中优势晶型、优势晶习的研发和控制提供一种新的、有效的检测手段和新的研究思路。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 杜蓉, 刘辉. 辛伐他汀胶囊中抗氧剂的优化 [J]. 中国药师, 2010, 13(3): 394-395.

[2] Zhang F, Aaltonen J, Tian F, *et al*. Influence of particle size and preparation methods on the physical and chemical stability of amorphous simvastatin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 71(1): 64-70.

[3] Ambike A A, Mahadik K R, Paradkar A. Physico-chemical characterization and stability study of glassy simvastatin [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2005, 31(9): 895- 899.

[4] Graeser K A, Strachan C J, Patterson J E, *et al*. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin [J]. *Crystal Growth Design*, 2008, 8 (1): 128-135.

[5] Luo Y, Xu L, Tao X, *et al*. Preparation, characterization, stability and *in vitro-in vivo* evaluation of pellet-layered simvastatin nanosuspensions [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(7): 936-946.

[6] Borka L, Haleblian J K. Crystal polymorphism of pharmaceuticals [J]. *Acta Pharm Jugosl*, 1990, 40(1/2): 71-94.

[7] Datta S, Grant D J. Crystal Structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(1): 42-57.

[8] Modi S R, Dantuluri A K, Puri V. Impact of crystal habit on biopharmaceutical performance of celecoxib [J]. *Crystal Growth Design*, 2013, 13(7): 2824-2832.

[9] 郝甜媛, 刘欢, 陈常青. 晶型转化对药物稳定性的影响研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 457-460.

[10] Frisch G W T M J, Schlegel H B, Scuseria G E, *et al*. Gaussian 09 (Revision D.01) [Z]. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2013.

[11] Bukovec P, Meden A, Smrkolj M, *et al*. Influence of crystal

habit on the dissolution of simvastatin single crystals [J]. *Acta Chim Slov*, 2015, 62(4): 958-966.

[12] Bukovec P, Benkič P, Smrkolj M, *et al*. Effect of crystal habit on the dissolution behaviour of simvastatin crystals and its relationship to crystallization solvent properties [J]. *Pharmazie*, 2016, 71(5): 263-268.

[13] Hammond R B, Pencheva K, Roberts K J, *et al*. Quantifying solubility enhancement due to particle size reduction and crystal habit modification: Case study of acetyl salicylic acid [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(8): 1967-1973.

[14] Cejka J, Kratochvil B, Cisarova I, *et al*. Simvastatin [J]. *Acta Crystallogr C*, 2003, 59(Pt 8): o428-o430.

[15] 郑金琪, 郑国钢, 李会林, 等. 梯度洗脱 HPLC 测定辛伐他汀片的含量和有关物质 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(9): 702-705.

[16] Malenović A, Jančić-Stojanović B, Ivanović D, *et al*. Forced degradation studies of simvastatin using microemulsion liquid chromatography [J]. *J liquid Chromatogr Related Technol*, 2010, 33(4): 536-547.

[17] Qian C, Wang G, Wang X, *et al*. Formation of protein sub-visible particles during powder grinding of a monoclonal antibody [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, 149: 1-11.

[18] 韩后良, 王依健, 秦丽丽. 辛伐他汀片的含量测定中研磨对含量结果的影响 [J]. 医学信息, 2014, 27(3): 449.

[19] Simões R G, Diogo H P, Dias A, *et al*. Thermal stability of simvastatin under different atmospheres [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(1): 241-248.

[20] Andersson T, Broo A, Evertsson E. Prediction of drug candidates' sensitivity toward autoxidation: Computational estimation of CH dissociation energies of carbon- centered radicals [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(7): 1949- 1955.

[21] Hušák M, Kratochvíl B, Jegorov A, *et al*. Simvastatin: Structure solution of two new low-temperature phases from synchrotron powder diffraction and ss-NMR [J]. *Struct Chem*, 2010, 21(3): 511-518.

[责任编辑 解学星]