Box-Benhnken法优化超临界CO_2抗溶剂法制备辛伐他汀固体分散体

王明明, 秦 联, 孙 赞, 葛驰宇, 马 强, 黄巧燕, 沈正加*

(江苏食品药品职业技术学院, 江苏 淮安 223001)

摘要: 辛伐他汀是一类羟甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂, 用作降低血脂和抗动脉粥样硬化, 但是其水溶性差, 生物利用度低严重影响了临床效果。本实验设计应用超临界CO_2抗溶剂法制备辛伐他汀固体分散体, 采用Box-Benhnken响应曲面法优化处方工艺参数, 改善辛伐他汀制剂的溶出特性和生物利用度。Box-Benhnken响应面法优化实验方案中以辛伐他汀的体外累积溶出度 (因变量) 为评价指标, 考察超临界CO_2抗溶剂技术制备中的压强、温度、载体种类、CO_2流出速率四种影响因素 (自变量) 对辛伐他汀固体分散体制备工艺的影响。接下来, 对优选工艺条件下辛伐他汀分散体进行粒度、红外吸收光谱、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC)、X-ray衍射 (X-ray diffraction, XRD) 和扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM) 表征分析, 在此基础上进一步研究了产品的体外溶出特性及大鼠口服相对生物利用度。动物实验经江苏食品药品职业技术学院实验动物伦理委员会批准 (批准号: JSSPYPCAC2024)。结果显示, Box-Benhnken响应面法实验设计临界CO_2抗溶剂技术制备辛伐他汀固体分散体的最优工艺参数为压力12.00 Mpa, 温度35.0 ℃, CO_2流速3.3 L·min^{-1}, F-127∶PVP K23-27 (1∶10, *w*/*w*), 制备的固体分散体呈疏松的粉末状, SEM下显示为鳞片状叠加的聚集态, 激光粒度测定D50值为0.78 μm, DSC和XRD显示辛伐他汀在分散体中以无定型形式存在, 60 min体外累积溶出度值89.87%, 大鼠口服相对生物利用度226.6%。综上所述, 本研究成功应用超临界CO_2抗溶剂法制备辛伐他汀固体分散体, 采用Box-Benhnken响应面法简化实验步骤并优化工艺路线, 制得的辛伐他汀固体分散体溶出速率快, 累积溶出度高, 可作为开发新型具有高生物利用度口服辛伐他汀制剂的处方策略。

关键词: 超临界抗溶剂; 辛伐他汀; 固体分散体; Box-Benhnken; 聚乙烯吡咯烷酮

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1938-10

The optimization of Box-Benhnken method for supercritical CO_2 antisolvent process to prepare simvastatin solid dispersions

WANG Ming-ming, QIN Lian, SUN Zan, GE Chi-yu, MA Qiang, HUANG Qiao-yan, SHEN Zheng-jia*

(*Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, Huai'an 223001, China*)

Abstract: Simvastatin is a class of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors used to lower blood lipids and prevent atherosclerosis, but its poor water solubility and low bioavailability seriously affect clinical efficacy. In this experiment, simvastatin solid dispersions were prepared using supercritical CO_2 antisolvent method, and the prescription process parameters were optimized by Box-Benhnken response surface methodology, to improve the dissolution characteristics. The Box-Benhnken response surface methodology optimization experimental scheme took *in vitro* cumulative dissolution degree of simvastatin (dependent variable) as the evaluation index, investigated the influence of four factors (independent variables) including pressure, temperature, carrier type, and CO_2 outflow rate on the preparation of simvastatin solid dispersions by supercritical CO_2 antisolvent technology. Next, the particle size (PZ), infrared (IR) absorption spectrum, differential scanning

收稿日期: 2024-10-25; 修回日期: 2025-01-15.

基金项目: 淮安市自然科学研究项目(HAB2024065); 江苏省2023年大学生创新实践项目 (G-2023-0781).

*通讯作者 E-mail: 20231038@jsfpc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1040

calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM) characterization were performed on the preferred process conditions for simvastatin dispersion. Based on these findings, further research was conducted on the *in vitro* dissolution properties of the product as well as the relative bioavailability after oral administration to rats. Animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Jiangsu College of Food and Drug Engineering (No. JSSPYPCAC2024). The results showed that the optimal process parameters for preparing simvastatin solid dispersions by critical CO_2 antisolvent technology were pressure 12.00 Mpa, temperature 35.0 ℃, CO_2 flow rate 3.3 L·min^{-1}, F-127/PVP K23-27 (1∶10, *w*/*w*). The prepared solid dispersion was in a loose powder form, which appears as overlapping flaky aggregates under SEM. The laser particle size analysis showed a D50 value of 0.78 μm. DSC and XRD indicated that simvastatin existed in an amorphous form within the dispersion. The *in vitro* cumulative dissolution value after 60 minutes was 89.87%, and the relative bioavailability of oral administration to rats was 226.6%. In summary, this study successfully applied supercritical CO_2 antisolvent method to prepare simvastatin solid dispersions, simplified the experimental steps and optimized process routes using Box-Benhnken response surface methodology. The prepared simvastatin solid dispersions exhibited fast dissolution rates and high cumulative dissolution degrees, which can be used as a prescription strategy for developing novel oral simvastatin formulations with high bioavailability.

Key words: supercritical antisolvent; simvastatin; solid dispersion; Box-Benhnken; polyvinyl pyrrolidone

辛伐他汀 (simvastatin, $C_{25}H_{38}O_5$) 为小分子羟甲基戊二酰辅酶A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 可有效抑制内源性固体胆固醇的合成, 降低血脂水平, 对动脉血、肾脏、肝脏中的总胆固醇含量, 极低密度脂蛋白胆固醇, 低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯均起作用, 适用于高脂血症及冠心病患者, 可延缓动脉粥样硬化的进展, 降低死亡的风险性[1-5]。辛伐他汀分子以脂溶性的碳链为主要结构, 易溶于乙醇、乙腈等有机溶剂, 几乎不溶于水, 生物药剂学分类体系将辛伐他汀归为II类药物 (低溶解性/高渗透性)[6,7]。通过药物制剂的优化和设计, 可以促进药物在体内的有效吸收和释放, 提高药物使用的疗效和安全性。

固体分散体 (solid dispersion, SD) 技术是一类新型的改善药物溶出和生物利用度的药物制剂方式, 通过将药物以分子、无定型及微晶等形式高度分散于惰性载体中, 实现增加难溶性药物溶出、延缓药物释放、提高药物稳定性和液体药物固体化的用途[8-11]。许多工业技术可被用于制备固体分散体, 如喷雾干燥、流化床技术、冷冻干燥、热熔挤出、溶剂共沉淀等。但这类技术制备的产品往往存在均一性低、稳定性差、有机溶剂难以除去的缺点。超临界抗溶剂技术 (supercritical fluid anti-solvet, SAS) 是近十几年来发展起来的绿色可控的药物传递体系 (drug delivery system, DDS) 微粒制备技术, 应用精密数控高压密封制粒设备制备药物微观尺度颗粒, 以绿色溶剂超临界流体二氧化碳替代甲醇、乙腈、水等传统溶剂, 制得的药物产品具备纯度高、污染小、粒度均一、粒径小的优点[12-16]。同时, 为了进一步解决实验中实验参数的波动和不确定性对实验结果的影响, 考虑选择Box-Behnken Design (BBD) 响应面法, 这是一种建立在单因素筛选设计的基础上深入优化模型的高级试验设计 (design of experiment, DOE) 技术, BBD响应面法通过添加二次平方项, 优化响应变量的水平, 减少实验次数, 极大限度的确定每个因子的最优设置, 可获得精度更高、效果更佳的结果[17-21]。

本文以超临界CO_2抗溶剂法制备辛伐他汀固体分散体, 采用BBD响应面法优化制备工艺, 通过粒径 (particle size, PZ)、红外吸收光谱 (infrared absorption, IR)、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC)、X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)、扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM) 对SAS工艺制得的辛伐他汀固体分散体进行表征并与市售产品和原料药进行比较, 应用溶出度试验和大鼠血药浓度试验, 考察固体分散体制剂中辛伐他汀的体外累积溶出特性及在大鼠体内的口服生物利用度, 为辛伐他汀的SAS工艺制备药物制剂前体及中间体的研发提供相对完整的科学参考资料。

材料与方法

仪器 超临界微粒制备系统 (Helix, 美国Applied Separations公司); 智能溶出度仪 (RC12AD, 天津天大天发科技有限公司); 射线粉末衍射仪 (Semerlab SE X, 日本理学公司); 差示扫描量热仪 (DSC800)、傅里叶变换红外光谱仪 (Spectrum 3, 美国PerkinElmer公司); 环境扫描电子显微镜 (FEI quanta 400FEG, 英国OXFORD公司); 激光粒度分析仪 (BT-9300HT, 丹东百特仪器有限公司); 高效液相色谱仪 (1260 infinity, 美国Agilent公司); 双光束紫外可见分光光度计 (UV-1900,

日本 Shimadzu 公司); 冷冻干燥机 (Scientz-18N/C, 宁波新芝生物科技有限公司); 旋涡混匀器 (Vortex 2, 德国 IKA 公司); 超声波清洗机 (KH-100SPV, 昆山禾创有限公司); 纯化水机 (Select Fusion 40/80, 英国瑞泰公司); 精密真空干燥箱 (SXZ-090, 昆山松鑫电子有限公司)。

试药和试剂 纯度 98% 辛伐他汀原料药 (批号 C15793061)、聚乙烯醇吡咯烷酮 (PVP K23-27, 批号 C14490415)、泊洛沙姆 407 (F-127, 批号 C16857262) 购自中国麦克林; 辛伐他汀片 (批号 240307, 中国俞氏药业); 辛伐他汀标准品 (批号 100601-201003, 中国中检计量有限公司); 分析纯无水乙醇 (批号 20231125, 中国恒天工贸有限公司); 色谱纯乙腈 (批号 20211123, 中国国药集团化学试剂有限公司); 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.0, 实验室自制)。

实验动物 健康无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 20 只, 鼠龄 6～7 周, 重 250 ± 20 g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 合格证号: SCXK (苏) 2021-0013。动物实验经江苏食品药品职业技术学院实验动物伦理委员会批准 (批准号: JSSPYPCAC2024)。

SAS 工艺流程 SAS 制备辛伐他汀固体分散体的设备流程见图 1 所示, 实验操作按如下步骤进行: ① 实验前检查超临界系统的气密性、安全性和稳定性, 确保气密性良好, 仪器运行正常; ② 将辛伐他汀原料药、PVP K23-27 和 F-127 按实验比例 (固定加入量: 辛伐他汀 0.2 g, PVP K23-27 1.0 g) 溶于无水乙醇中, 振荡器振荡 10 min 至溶液澄清; ③ 开启仪器, 设置实验温度, 预热结晶釜, 调节 CO_2 气瓶气阀设置进样压力, 打开结晶釜釜顶入口, 维持 5 min 至结晶釜内温度和压力保持恒定; ④ 将物料溶液由高压输液泵以设定体积流量泵入结晶釜中与超临界 CO_2 流体充分混合, 溶质过饱和析出, 打开节流阀, 含溶剂的 CO_2 流体在分离釜中实现回收, 经减压升温后, CO_2 气体则经转子流量计排出; ⑤持续通入 CO_2 保持动态平衡 30 min, 关闭进气口阀门, 打开排气阀门, 待釜内气体排空后, 取出结晶釜, 收集釜内干燥微粒进行测定。

色谱条件的选择 采用 Hypersil C18 反相硅胶色谱柱 (300 mm × 4.6 mm, 10 μm); 流动相乙腈∶0.03 mol·L^{-1} 磷酸二氢钠 (pH 7.0) (60∶40, *v*/*v*); 进样量 20 μL; 流速 1.0 mL·min^{-1}; 紫外检测波长 238 nm, 等度洗脱。

标准曲线的绘制 精密称取辛伐他汀对照品约 50 mg 置于 50 mL 量瓶中, 乙腈定容振摇混匀, 作为标准品母液。分别精密吸取上述母液 0.00、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mL 置于 50 mL 量瓶中, 流动相溶液稀释定容至刻度, 得到系列质量浓度为 0.0、10.0、20.0、40.0、80.0、120.0、160.0、200.0 μg·mL^{-1} 的溶液。238 nm 处测定色谱峰峰面积 *A*, 以质量浓度 (*C*, μg·mL^{-1}) 为横坐标, 峰面积值 (*A*) 为纵坐标, 进行一元线性拟合, 得到标准曲线回归方程为: $Y = 0.015 + 0.03X$, $R^2 = 0.993$。

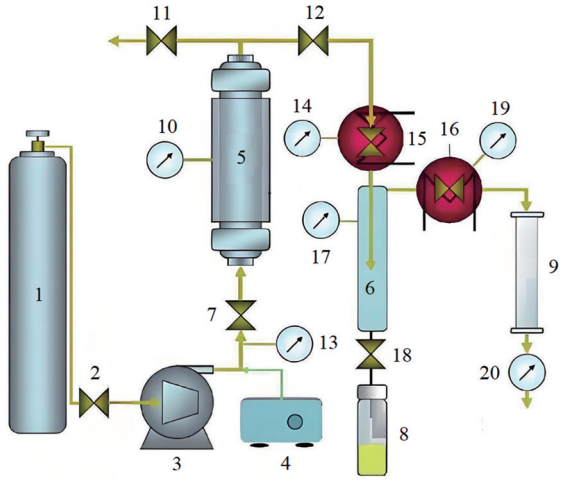


Figure 1 Flowchart of the supercritical CO_2 antisolvent device. 1: CO_2 cylinder; 2, 7, 11, 12, 18: Gas throttling valve; 3: High-pressure pump; 4: Peristaltic pump; 5: Crystallization kettle; 6: Separation kettle; 8: Waste liquid bottle; 9: Washing gas device; 10, 13, 14, 17, 19, 20: Pressure gauge; 15, 16: Gas throttling valve with heating sleeve

体外释药度的测定 参照中国药典 2020 版第四部通则 0931 溶出度与释放度测定法篮法测定 SAS 辛伐他汀固体分散体的体外释放度。精密称取 SAS 辛伐他汀固体分散体 200.0 mg, 填装 0#空胶囊, 置于转篮中, 以 0.01 mol·L^{-1} 磷酸二氢钠缓冲液 (pH = 7.0) 900.0 mL 为溶出介质, 转速 50 ± 1 r·min^{-1}, 于 37 ± 0.5 ℃下依法操作, 分别于时间点 5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、120 min 取样 10.0 mL, 并补充空白介质 10.0 mL。另取辛伐他汀片和辛伐他汀原料药物理混合粉末研细装胶囊, 按上述步骤, 同法操作, 作为对照实验。样品经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 20.0 μL, 于 238 nm 处测定峰面积 *A*, 按照标准曲线和累积溶出度计算公式分别计算不同样品于每个时间点处的溶出度和累积释放百分率。

累积溶出度的计算 根据公式 (1) 计算累积溶出度:

$$\text{累积溶出度 } \Psi_i = C_i + (C_1+C_2+C_3+\cdots+C_{i-1})\, V_2/V_1 \quad (1)$$

其中, Ψ_i 表示辛伐他汀第 *i* 次的计算累积溶出度; C_i 表示辛伐他汀第 *i* 次的溶出度测得值; V_1 表示溶出杯的总介质体积 (mL); V_2 表示每次补液量 (mL)。

单因素实验 参照 SAS 实验流程制备辛伐他汀

固体分散体, 考察超临界工艺中的压力、温度、CO_2流出速率、载体种类4因素对辛伐他汀固体分散体累积溶出度的影响。

大鼠血药浓度的测定 选取18只健康雄性SD大鼠, 随机分为3组, 每组6只。实验前, 大鼠禁食12 h, 口服给药, 给药剂量20 mg·kg^{-1}, 第一组给药辛伐他汀原料药 (对照组), 第二组给药辛伐他汀片剂 (实验组), 第三组给药辛伐他汀固体分散体 (实验组), 各实验组大鼠完全进食后需及时灌胃补充1 mL纯化水。在指定的时间间隔 (0.17、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、12、16、20、24 h) 从大鼠的尾部静脉采集血液样本 (约0.3 mL) 到肝素化试管中。将试管置于4 ℃下5 000 r·min^{-1}离心10 min以获得血浆, 取上层血浆至干净离心管中, −20 ℃保存待测。取冷冻保存的血浆样品上清液100 μL解冻, 加入乙腈1 mL, 35 ℃水浴氮气吹干, 加入流动相500 μL涡旋30 s, 10 000 r·min^{-1}离心5 min, 精密移取20 μL上清液注入HPLC, 按色谱条件项测定各组辛伐他汀血药含量。

相对生物利用度的计算 绘制各辛伐他汀制剂的大鼠血药浓度−时间曲线, 以梯度法计算曲线下面积 (area under the curve, AUC), 根据公式 (2) 计算相对生物利用度 (F)。

$$F = AUC_t \times D_r / (AUC_r \times D_t) \times 100\% \quad (2)$$

其中, F表示相对生物利用度; AUC表示测得血药浓度曲线下面积; D表示给药剂量; t表示实验组; r表示对照组。

Box-Behnken试验设计 在单因素试验的基础上, 以SAS中的实验压力、实验温度、CO_2流出速率、载体种类4因素作为自变量, 各因素设置3个水平, 以60 min累积溶出度计算结果为因变量, 设计四因素三水平设计表, 各因素水平条件选取如表1所示。

Table 1 Box-Behnken experimental design factors and levels for simvastatin solid dispersions

Level	Factor			
	A	B	C	D
	Pressure /Mpa	Temperature /℃	Flow rate of CO_2/L·min^{-1}	Carrier
1	12	35	0.5	F-127∶PVP (1∶10, *w*/*w*)
2	16	42	2.0	F-127∶PVP (1∶5, *w*/*w*)
3	20	50	3.5	PVP

统计学方法 应用Design-Expert 8.0.6软件中BBD响应面法构建多项式模型并分析处理结果数据, 采用方差分析 (ANOVA) 比较数学模型以及各项的显著性, $P < 0.05$表明模型或考察项显著且具有统计学意义。

结果

1 高效液相色谱分析

辛伐他汀色谱图如图2所示, 辛伐他汀的保留时间为9.85 min, 理论塔板数大于6 000, 色谱峰峰型尖锐对称, 分离度大于1.5, 无杂峰干扰, 无前延和拖尾现象, 辛伐他汀片中的辅料未见色谱峰流出, 分散体中辅料F-127和PVP K 23-27未见辅料色谱峰流出, 表明在该色谱条件下辛伐他汀的专属性好, 可对辛伐他汀精确定性和定量。

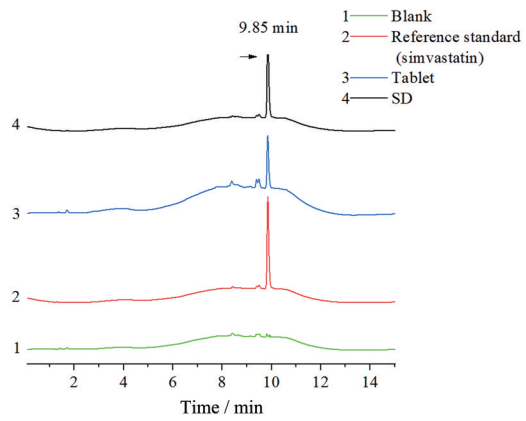


Figure 2 Chromatogram of simvastatin dispersion

2 单因素参数的影响

单因素的影响如图3所示, 压力在5.0～30.0 Mpa内, 辛伐他汀的累积溶出度先增加后减少 (图3A), 这可能是由于CO_2是辛伐他汀的非良性溶剂, 随着压力的增加, CO_2流体的密度增加导致辛伐他汀在超临界CO_2流体中的溶解度逐渐增大, 辛伐他汀在溶剂乙醇中的过饱和度降低, SAS抗溶剂效应减弱, 此时制备的产品颗粒小, 松散性大, 易于溶出, 随着压力进一步增大, 小颗粒易于聚集成大颗粒, 因此, 高压下产品的溶出度反而下降, 故选择合适的压力范围为12.0～20.0 Mpa; 温度在20.0～60.0 ℃内, 辛伐他汀的溶出度逐步增加 (图3B), 温度高于50.0 ℃后, 溶出度降低, 这可能由于温度的升高使得超临界流体密度降低, 辛伐他汀在超临界CO_2中的溶解度降低, SAS抗溶剂作用增强, 进一步影响药物溶液体系的稳定性, 制备出分散体颗粒较大导致溶解度变差, 故选择适宜的温度范围为35.0～50.0 ℃; CO_2流速在0.50～5.00 mL·min^{-1}内, 辛伐他汀的累积溶出度呈现先增加后减少的现象 (图3C), 这是由于低流速条件下, 单位时间内流入釜内的超临界流体的量少, 辛伐他汀固体分散体生成的速率受到限制, 产品生成量和流速呈现正相关, 随着单位时间内流入釜内超临界CO_2的量增加, 辛伐他汀达到过饱和状态, SAS抗溶剂作用增强, 分散体易于生成, 当溶剂流量继

续增加, 辛伐他汀的过饱和度降低, SAS抗溶剂作用减弱, 分散体不易形成, 故选择合适的流速范围为0.50～3.50 mL·min^{-1}; 载体种类: PVP K23-27作为分散体主要载体, F-127作为辅助载体混合, 随着F-127百分含量的增加, 辛伐他汀的累积溶出度和固体分散体粒径先微弱增加后陡然降低 (图3D), 这是由于F-127是一类非离子型表面活性剂, 低浓度下可促进辛伐他汀在介质中的溶解和溶出, 高浓度下, 溶液黏度增加, 溶出速率受限, 同时微粒间易聚集结块凝结, 使得分散体不易松散, 故选择F-127/PVP K23-27的浓度比例范围为0～0.2。综上所述, 辛伐他汀在SAS工艺下生成分散体实质是当溶剂从良性溶剂到非良性溶剂转变时, 辛伐他汀分子以非结晶性形式再析出的过程, 受SAS工艺中的压力、温度、CO_2流速和辅料等影响因素的综合作用。

3 Box-Behnken试验结果

应用Design-Expert 8.0.6软件设计Box-Behnken响应面, 以辛伐他汀固体分散体的累积溶出度 (Ψ) 作为唯一因变量, 以表1中压力 (A)、温度 (B)、CO_2流速 (C) 和载体种类 (D) 4因素为自变量, 绝对因素数选默认值0, Blocks为默认值1, 区块中心点次数为默认值55, 软件设计出29次实验组合, 每种组合的组合方案和实验测得值如表2所示。

4 Box-Behnken响应面量效关系表达式

以辛伐他汀固体分散体的累积溶出度 (Ψ) 作为唯一因变量, 以压力 (A)、温度 (B)、CO_2流速 (C) 和载体种类 (D) 4因素为自变量, 经Box-Behnken响应面多项式二次方拟合后得出累计溶出度数学表达式: Ψ (%) = $76.09 + 8.333\times10^{-4}A + 2.09B + 0.37C - 5.42D + 0.99AB + 0.65AC - 1.43AD + 1.04BC + 0.15BD + 1.83CD - 3.27A^2 - 3.00B^2 - 1.01C^2 + 6.12D^2$。

5 Box-Behnken响应面方差分析

由表3方差分析中得知, 拟合多项式数学模型的$F = 81.97$, $P < 0.000\,1$表明该模型是极显著的, 由噪音和误差引起该模型失拟的可能性仅为0.01%。表中P值代表各因素的显著性, $P < 0.05$代表该因素是显著的, $P > 0.10$表示该因素不显著, 一般来说, P值越小, 显著性越好, 该因素对模型的贡献度越大, 显著项多, 模型的拟合度越好, 显著性少, 则模型需要进一步优化和调整。在该模型中, 因素B、D、AB、AD、BC、CD、A^2、B^2、C^2、D^2均为显著项, 表明单次项中温度、载体类型均对累积溶出度结果影响显著, 二次项中温度、压力、CO_2流速和载体类型对累积溶出度结果影响均显著,

Table 2 Box-Behnken experimental design combinations and results

Group	A Pressure /Mpa	B Temperature /℃	C Flow rate of CO_2/L·min^{-1}	D Carrier	Dissolution (Ψ)/%
1	16.00	50.00	2.00	0	87.27
2	12.00	42.50	2.00	0	82.38
3	16.00	35.00	0.50	0.1	71.56
4	12.00	42.50	0.50	0.1	71.29
5	16.00	35.00	3.50	0.1	69.66
6	16.00	42.50	0.50	0	88.61
7	12.00	42.50	2.00	0.2	75.52
8	12.00	35.00	2.00	0.1	68.5
9	16.00	42.50	2.00	0.1	76.59
10	16.00	50.00	0.50	0.1	72.43
11	16.00	42.50	2.00	0.1	77.14
12	20.00	42.50	2.00	0.2	72.62
13	16.00	42.50	2.00	0.1	75.01
14	16.00	42.50	2.00	0.1	75.22
15	16.00	42.50	3.50	0	84.91
16	20.00	42.50	3.50	0.1	73.41
17	12.00	42.50	3.50	0.1	72.07
18	20.00	50.00	2.00	0.1	73.34
19	20.00	35.00	2.00	0.1	66.52
20	16.00	42.50	2.00	0.1	76.51
21	16.00	35.00	2.00	0	82.84
22	12.00	50.00	2.00	0.1	71.37
23	16.00	35.00	2.00	0.2	70.65
24	20.00	42.50	2.00	0	85.22
25	16.00	50.00	3.50	0.1	74.67
26	16.00	50.00	2.00	0.2	75.68
27	20.00	42.50	0.50	0.1	70.03
28	16.00	42.50	3.50	0.2	77.65
29	16.00	42.50	0.50	0.2	74.05

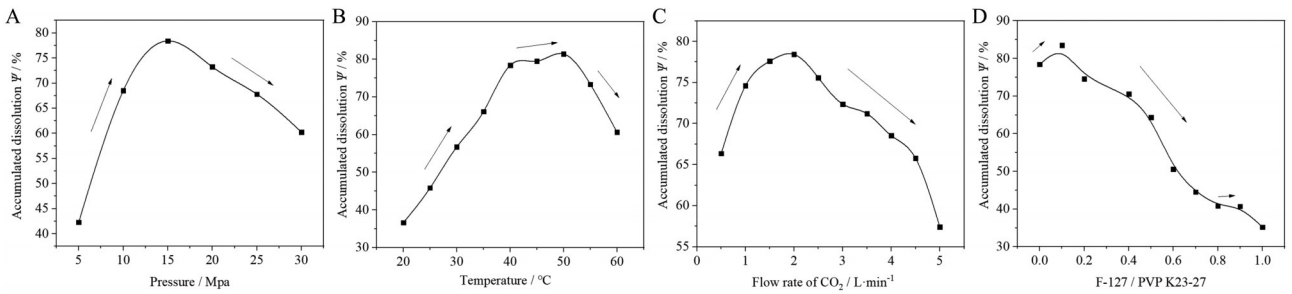


Figure 3 Impact of single-factor supercritical fluid anti-solvet (SAS) on the preparation of simvastatin solid dispersions. A: Pressure; B: Temperature; C: Flow rate of CO_2; D: Carrier

交互项中温度和压力项, 压力和载体项, 温度和CO_2流速项, CO_2流速和载体类型项均显著影响试验结果, 由于拟合方程中二次项和交互项相对于一次项的影响更为显著, 因此二项式拟合模型符合实际工艺过程。失拟性 $F = 0.87$, $P = 0.609\ 0$, 大于0.10, 不显著, 表明拟合度良好。拟合系数 $R^2 = 0.987\ 9$, 调整 $R^2 = 0.975\ 9$, 均接近于1, 表明模型拟合度高, 预测 $R^2 = 0.946\ 4$, 表明该模型具有可预测性, 预测结果与真实值接近。精密度值为33.446 > 4, 表明模型的信噪比高, 结果准确。方差分析结果表明, 该数学模型可应用于SAS制备辛伐他汀固体分散体的工艺条件优化。

6 响应面交互作用分析

双因素交互的三维响应面图和二维等高线图如图4所示, 固定两个自变量值, 绘制其余两自变量间的交互作用对溶出度值的影响。设置 *C* 值为2.0 mL·min^{-1}, *D* 值为0.20, 则 *AB* 间的交互作用如图4A所示; 设置 *B* 值为42.50 ℃, *D* 值为0.20, 则 *AC* 间的交互作用如图4B所示; 设置 *A* 值15.00 Mpa, *D* 值为0.2, 则 *BC* 间的交互作用见图4C所示。总之, 在3D曲面图中, 曲面的曲率越大, 曲线越陡, 表明两因素间的交互作用越强, 在等高线图中, 同一等高线任意点的累积溶出度值均相等, 等高线越接近椭圆, 表明两因素间的交互作用越强。具有交互作用的项为 *AB*、*AC* 和 *BC* 项, 不存在交互作用项为 *AD*、*BD*、*CD* 项, 非交互项曲线结果未在图中展示。

7 最优试验工艺验证

在确立SAS制备辛伐他汀固体分散体数学模型表达式的基础上, Design expert 8.0.6软件中设定压力范围值12.0～20.0 Mpa, 温度范围值设定35.0～50.0 ℃, CO_2流速范围值0.50～3.50 L·min^{-1}, 载体比例0～0.2, 累积溶出度范围值66.32%～100%, 通过软件优化后的最优工艺条件为: 工作压力12.00 Mpa, 工作温度35.0 ℃, CO_2流速3.30 L·min^{-1}, F-127∶PVP K23-27 (1∶10, *w*/*w*), 在此实验条件下辛伐他汀固体分散体的累积溶出度的模型预测值92.59%。在优选工艺条件下制备4批辛伐他汀固体分散体, 对优选工艺结果进行验证, 4批产品溶出度平均值为89.87%, 相对标准偏差RSD = 2.11%, 与模型预测值接近。

8 最优工艺条件下辛伐他汀固体分散体理化及表征特性分析

8.1 IR分析 辛伐他汀原料药、辛伐他汀片、F-127/PVP/辛伐他汀物理混合样品和SAS辛伐他汀固体分散体 (辛伐他汀∶F-127∶PVP = 2∶1∶10) 按1∶100的比例经KBr压片 (20.0 Mpa), 测得各样品红外光谱见图5A所示, 图中显示PVP在1 785 cm^{-1}处有弱吸收峰, 为酰胺键伸缩振动峰; 纯度98%辛伐他汀原料药特征峰表现为, 3 546 cm^{-1}处显示强而尖的-OH伸缩振动吸收峰, 2 954 cm^{-1}处显示强而尖的分裂峰, 为-CH的伸缩振动峰, 1 695 cm^{-1}处显示强而尖的单峰, 为羰基C=O吸收峰; 辛伐他汀片、辛伐他汀物理混合体和辛伐他汀分散体的红外特征图谱基本相同, 与PVP和辛伐他汀原料比对后未发现峰的增加、消失或明显位移, 表明辛伐他汀分散体中辛伐他汀与辅料间未发生化学反应。

8.2 DSC分析 称取适量 (约5.00 mg) 样品置于铝坩埚中, 以空铝坩埚为参比, 温度范围50～250 ℃, 升温速率10 ℃·min^{-1}, N_2作为吹扫气和保护气, 采用自动进

Table 3 Quadratic model variance analysis. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	*F*	*P*	Significance
Model	901.96	14	64.43	81.97	< 0.000 1	***
A	8.33E-006	1	8.33E-006	1.06E-005	0.997 4	
B	52.21	1	52.21	66.43	< 0.000 1	***
C	1.61	1	1.61	2.05	0.173 9	
D	352.73	1	352.73	448.79	< 0.000 1	***
AB	3.90	1	3.90	4.96	0.042 8	*
AC	1.69	1	1.69	2.15	0.164 6	
AD	8.24	1	8.24	10.48	0.006 0	*
BC	4.28	1	4.28	5.45	0.035 0	*
BD	0.09	1	0.09	0.11	0.740 1	
CD	13.32	1	13.32	16.95	0.001 0	*
A^2	69.51	1	69.51	88.45	< 0.000 1	***
B^2	58.23	1	58.23	74.09	< 0.000 1	***
C^2	6.68	1	6.68	8.50	0.011 3	*
D^2	242.76	1	242.76	308.86	< 0.000 1	***
Residual	11.00	14	0.79			
Lack of fit	7.55	10	0.76	0.87	0.609 0	
Pure error	3.45	4	0.86			
Cor total	912.96	28				

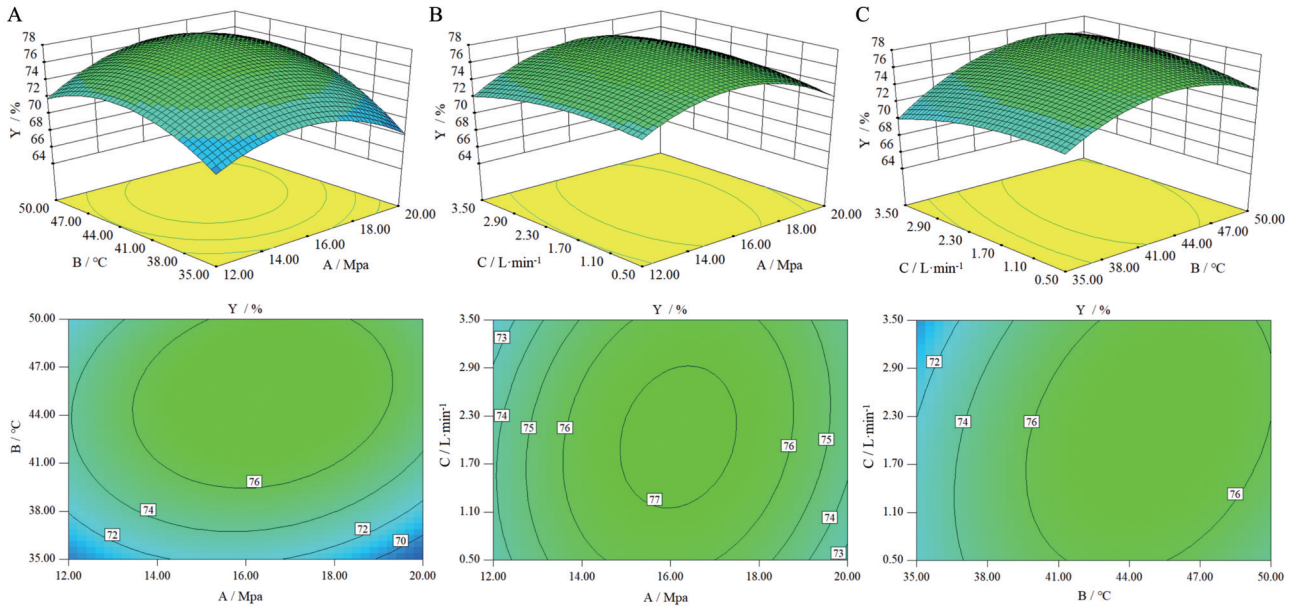


Figure 4 Box-Behnken response surface interactions

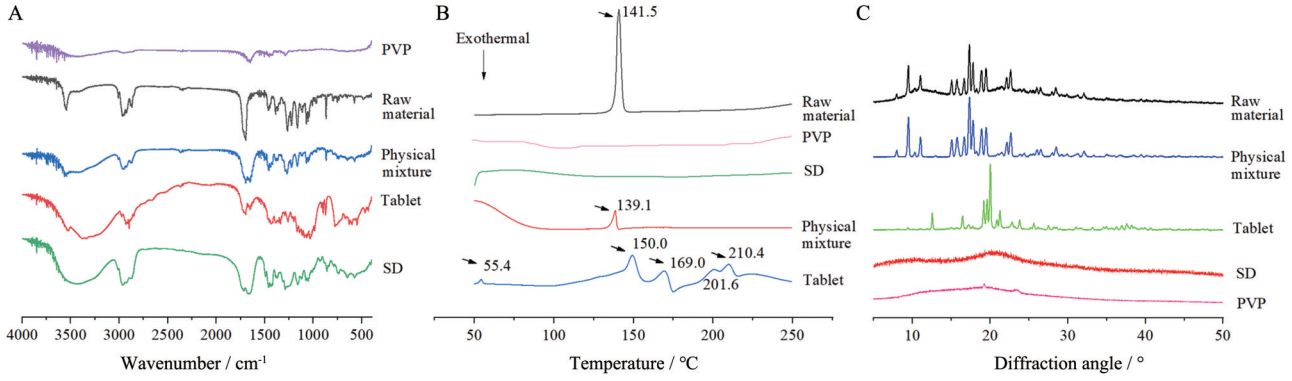


Figure 5 Characterization analysis. A: Infrared (IR) absorption spectrum; B: Differential scanning calorimetry (DSC) spectrogram; C: X-ray diffraction (XRD) spectrogram. SD: Solid dispersion; PVP: Polyvinyl pyrrolidone

样同步热分析模式, 测定结果如图5B所示。辛伐他汀原料仅在141.5 ℃处有特征吸收峰, 峰型尖锐, 为典型的晶体吸热熔化现象。辛伐他汀与PVP的物理混合物在139.1 ℃处仅存一处特征热吸收峰, 与辛伐他汀原料比对为同一峰。辛伐他汀片存在多个热吸收峰, 分别为55.4、150.0、169.0、201.6、210.4 ℃, 在140 ℃附近无吸收峰, 表明片剂中辛伐他汀的晶型不同于原料中辛伐他汀晶型, 固体分散体中, 辛伐他汀的热吸收峰完全消失, 表明分散体中辛伐他汀已经不存在晶体形态。

8.3 XRD分析 取样品粉末适量, 均匀铺散在样品座10 mm凹槽中, 设置电压20 kV, 采集角度5～50°, 结果如图5C所示。辛伐他汀原料和辛伐他汀物理混合物在5～50°间存在多个晶体衍射峰, 图谱基本一致, 表明通过物理均匀混合后辅料PVP和F-127对辛伐他汀晶型无影响, 辛伐他汀片的特征峰的峰位和峰型发生明显改变, 通过查阅文献得知, 辛伐他汀的晶型有Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和S型, 尚无法确定片剂中辛伐他汀和原料药辛伐他汀晶型的一致性, 同时辅料成分 (淀粉、微晶纤维素、PVP、枸橼酸、叔丁基对羟基茴香醚、羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁) 和压片工艺 (温度、压力、湿度等) 均会影响或改变晶型测定结果[22], 因此辛伐他汀片剂的X-ray结果不具备参考意义, 需综合辅料因素和辛伐他汀晶型因素深入研究, 辛伐他汀分散体中未观测到辛伐他汀晶体衍射特征峰, 表明辛伐他汀以无定型态或分子态存在于PVP辅料中。

8.4 粒度测定 设定超声功率50 W, 循环水流量4 000 mL·min^{-1}, 循环介质为纯化水, 将约0.5 g六偏磷酸钠分散剂加入循环分散器中充分分散并溶解30 s, 然后缓缓加入供试品, 当遮光率值达到14%～16%时,

记录D10、D50和D90, 每份样品平行检测3次, 取平均值, 各样品的平均粒度值如表4所示, 辛伐他汀原料和物理混合物在尺寸上基本一致, 这是由于PVP水溶性好, 在超声、搅拌和分散剂作用下完全溶解于水中。而片剂中的颗粒偏大, 这与市售辛伐他汀片剂中的非水溶性添加剂相关联, 固体分散体中颗粒尺寸小, 接近纳米级, 颗粒尺寸分布更均匀。

Table 4 Particle size summary

Sample	D10/μm	D50/μm	D90/μm
Raw material	2.44	11.26	23.49
Tablet	2.28	15.56	40.42
Physical mixture	2.66	12.02	21.78
SD	0.31	0.78	1.15

8.5 SEM形貌表征分析 采用10万倍扫描电镜观察经镀金处理后样品的微观形貌, 分别观测样品的单体形态 (图6A1～E1) 和聚集态 (图6A2～E2)。图6A1显示辛伐他汀原料单体呈现大小均匀的柱状颗粒, 图6B1显示PVP呈现球状或者凹陷态球状体, 图6C1显示辛伐他汀物理混合物呈现PVP球状微粒吸附辛伐他汀柱状颗粒的共分散形态, 图6D1显示辛伐他汀片粉末呈现形态无规则大小不一颗粒; 图6E2显示辛伐他汀分散体在20 μm电镜标尺下的聚集状态, 表明经SAS技术处理后, PVP和辛伐他汀的形态被重塑, 无肉眼可见边界, 单颗粒尺寸缩小10^1～10^2数量级。

9 最优工艺条件下辛伐他汀固体分散体体外释药性分析

各样品辛伐他汀的累积溶出曲线如图7A所示, 辛伐他汀固体分散体中辛伐他汀的溶出速度和溶出量相对于原料和片剂均有显著提升, 表现为溶出速度更快, 累积溶出率更高。30 min时, 固体分散体的累积溶出度快速到达高点78.4%, 而原料和片剂的累积溶出度分别为10.7%和26.7%; 60 min时, 固体分散体的累积溶出度为87.9%, 而原料和片剂的累积溶出度分别为13.6%和36.9%; 120 min时, 固体分散体的累积溶出度为92.7%, 而原料和片剂的累积溶出度分别为14.9%和48.9%。上述结果表明, 固体分散剂技术可有效地促

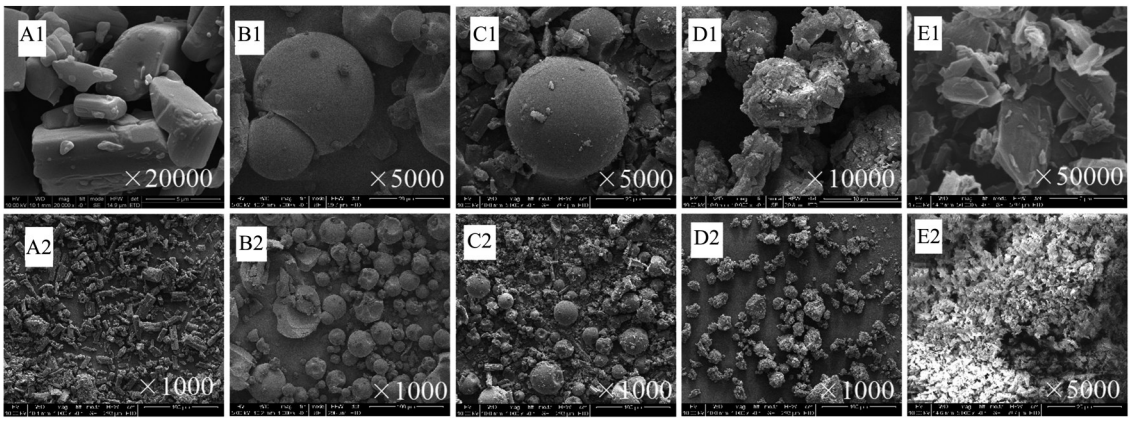


Figure 6 Scanning electron microscopy (SEM) images for single crystal (1) and agglomerated state (2). A1: Simvastatin raw material, 20 000×, 5 μm; A2: Simvastatin raw material, 1 000×, 100 μm; B1: PVP raw material, 5 000×, 20 μm; B2: PVP raw material, 1 000×, 100 μm; C1: Simvastatin physical mixture, 5 000×, 20 μm; C2: Simvastatin physical mixture, 1 000×, 100 μm; D1: Simvastatin tablets, 10 000×, 10 μm; D2: Simvastatin tablets, 1 000×, 100 μm; E1: Simvastatin dispersion, 50 000×, 2 μm; E2: Simvastatin dispersion, 5 000×, 20 μm

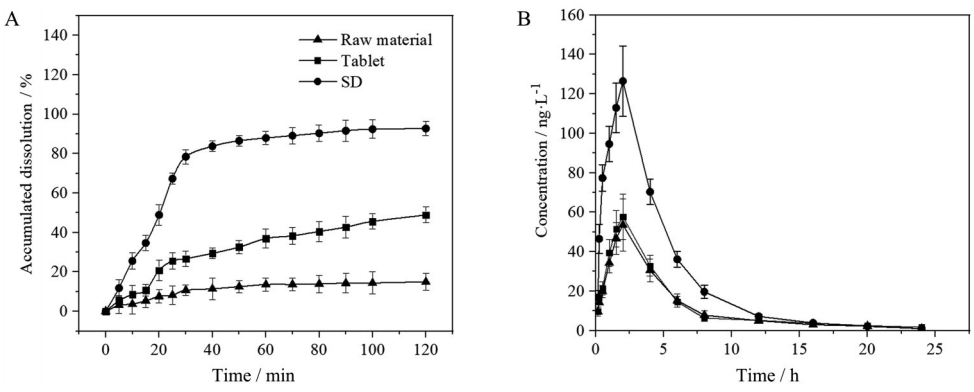


Figure 7 Dissolution and bioavailability. A: Cumulative dissolution curve. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$; B: Plasma concentration-time profile of simvastatin in rats after oral administration. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

进辛伐他汀微粒水中快速溶出, 同时辅料PVP K23-27和F-127能够增溶促溶。

10 生物利用度

各辛伐他汀制剂的大鼠血药浓度−时间曲线如图7B所示, 测得辛伐他汀原料的AUC_{0-24}为276.805 ng·mL^{-1}·h^{-1}, 片剂为292.331 ng·mL^{-1}·h^{-1}, 固体分散体为627.119 ng·mL^{-1}·h^{-1}。大鼠口服辛伐他汀片剂的相对生物利用度为105.6%, 固体分散体的相对生物利用度为226.6%, 结果表明, 与辛伐他汀片剂相比, 通过SAS工艺制备的辛伐他汀固体分散体生物利用度明显提高。

讨论

本研究采用PVP K23-27和F-127构建固体分散体混合型药物载体骨架, 以超临界CO_2抗溶剂技术制备了辛伐他汀固体分散体, 在单因素试验筛选的基础上, 通过Box-Behnken曲面设计优化实验工艺参数, 得到超临界CO_2抗溶剂技术制备辛伐他汀/PVP-K23-27/F-127的最佳工艺条件: 工作压力12.00 Mpa, 工作温度35.0 ℃, CO_2流速3.3 L·min^{-1}, F-127∶PVP K23-27 (1∶10, *w*/*w*), 在此实验条件下辛伐他汀固体分散体的累积溶出度的模型预测值92.59%。在优选工艺条件下制备4批辛伐他汀固体分散体, 对优选工艺结果进行验证, 4批产品40 min累积溶出度平均值为89.87%, 相对标准偏差RSD = 2.11%, 与模型预测值接近, 通过对SAS制得辛伐他汀固体分散体的IR、DSC、XRD、SEM、PZ分析, 表明分散体中的辛伐他汀在PVP载体中以无定型态存在, 产品粒度小且分散均匀。在此基础上进一步考察了最优工艺条件下辛伐他汀固体分散体体外释药性, 固体分散体中的辛伐他汀120 min时的累积溶出度达到92.7%, 值得注意的是本研究中溶出度测定相比中国药典 (2020版) 辛伐他汀胶囊的测定有所改动, 剔除加入0.5%十二烷基硫酸钠, 主要是考虑到该成分作为强效阴离子表面活性剂会增加辛伐他汀的溶出从而影响结果的比对, 改动后发现片剂和原料药中辛伐他汀的溶出量显著降低。最后, 通过大鼠实验研究了辛伐他汀口服的相对生物利用度为226.6%。

综上所述, 本文以SAS技术和Box-Behnken曲面法优化联用成功制备了辛伐他汀固体分散体, 该产品在理化特性表征、体外溶出度和生物利用度方面均展现出相对于辛伐他汀片剂更优良的特性, 可作为辛伐他汀口服固体用药新的制剂前体和中间产物, 对于难溶性药物辛伐他汀剂型改良及促进体内吸收有重要意义。本实验设计不足的是, 在实验过程发现了辛伐他汀存在多种晶型, 不同晶型的理化特性和溶出吸收特性可能存在一定的差异性, 但目前尚无法确定购买原料药和片剂的辛伐他汀晶型, 及不同晶型对溶出度和生物利用度的影响, 后续将进一步开展辛伐他汀晶型及新型工艺开发的拓展研究工作, 为难溶性药物新剂型的开发提供参考依据。

作者贡献: 王明明负责确定选题、拟定论文框架和论文撰写、论文修改; 沈正加负责资金来源、仪器设备管理、试剂供给; 黄巧燕、秦联负责实验操作、图谱修改、数据完善; 孙赞负责实验动物饲养、血样采集、数据分析; 马强、葛驰宇负责技术支持和指导。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] van Tits LJ, Smilde TJ, van Wissen S, et al. Effects of atorvastatin and simvastatin on low-density lipoprotein subfraction profile, low-density lipoprotein oxidizability, and antibodies to oxidized low-density lipoprotein in relation to carotid intima media thickness in familial hypercholester [J]. J Investig Med, 2004, 52: 177-184.

[2] Tzolos E, Dweck MR. Threshold effect for lipoprotein(a) in aortic stenosis [J]. Heart, 2021, 107: 1367-1368.

[3] Lau CPY, Fung CSH, Wong KC, et al. Simvastatin possesses antitumor and differentiation - promoting properties that affect stromal cells in giant cell tumor of bone [J]. J Orthop Res, 2020, 38: 297-310.

[4] Fu YJ, Liu ZN, Song YX. Clinical study on the treatment of angina pectoris in coronary heart disease with metoprolol succinate tablets combined with simvastatin tablets [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2018, 34: 4.

[5] Li W, Li LQ, Qu LP, et al. Effects and mechanism research of Di′aoxinxuekang combined with simvastatin on atherosclerotic mice [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2024, 35: 798-804.

[6] Wang SZ, Li RR, Yue X, et al. Determination of the equilibrium solubility and apparent oil-water partition coefficient of simvastatin in different dissolution media [J]. China Pharm (中国药业), 2016, 25: 4.

[7] Sovová H, Kučera J, Jež J. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO_2—II. Extraction of grape oil [J]. Chem Eng Sci, 1994, 49: 409-414.

[8] Sarbu T, Styranec T, Beckman EJ. Non-fluorous polymers with very high solubility in supercritical CO_2 down to low pressures [J]. Nature, 2000, 405: 165.

[9] Yeung LK, Lee CT Jr, Johnston KP, et al. Cheminform abstract: catalysis in supercritical CO_2 using dendrimer-encapsulated palladium nanoparticles [J]. J Cheminform, 2010, 33: 2290-2291.

[10] Sergei VD, Richard AB. Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO_2 systems [J].

Angew Chem Int Ed Engl, 2003, 42: 148-150.

[11] Kawanami H, Sasaki A, Matsui K, et al. A rapid and effective synthesis of propylene carbonate using a supercritical CO_2-ionic liquid system [J]. Chem Commun (Camb), 2003, 34: 896-897.

[12] Dillow AK, Dehghani F, Hrkach JS, et al. Bacterial inactivation by using near- and supercritical CO_2 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 10344-10348.

[13] Anitescu C, Doneanu V. Isolation of coriander oil: comparison between steam distillation and supercritical CO_2 extraction [J]. Flavour Fragr J, 1997, 12: 173-176.

[14] Bennion DB, Bachu S. Drainage and imbibition relative permeability relationships for supercritical CO_2/brine and H_2S/brine systems in intergranular sandstone, carbonate, shale, and anhydrite rocks [J]. SPE Reservoir Eval Eng, 2008, 11: 487-496.

[15] Wu XK, Wang ZX, Huang DC, et al. The current situation and prospects of supercritical antisolvent granulation equipment [J]. Chem Ind Eng Prog (化工进展), 2012, 31: 7.

[16] Lan HQ, Zhang L, Zhuang-Wu Y, et al. Preparation of chitosan microparticles by SAS-A [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci) (厦门大学学报 (自然科学版)), 2010, 49:139-143.

[17] Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods [J]. Anal Chim Acta, 2007, 597: 179-186.

[18] Yenda P, Katari NK, Ettaboina SK, et al. An effective and stability-indicating method development and optimization utilizing the Box-Behnken design for the simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, and aspirin in tablet formulation [J]. Biomed Chromatogr, 2023, 37: e5585.

[19] Mahajan R, Ravi PR, Khan MS. Optimization of a HPLC-UV bioanalytical method using Box-Behnken design to determine the oral pharmacokinetics of neratinib maleate in Wistar rats [J]. Biomed Chromatogr, 2023, 37: e5731.

[20] Yang F, Li DQ, Song YT, et al. Box-Behnken response surface method for the synthesis of high-temperature and salt-resistant filter loss reducers [J]. J Appl Polym Sci, 2024, 141: e54799.

[21] Kouris PD, Brini A, Schepers E, et al. Optimizing catalytic depolymerization of lignin in ethanol with a day-clustered Box-Behnken design [J]. Ind Eng Chem Res, 2023, 62: 6874-6885.

[22] Zhang M, Li Y, Lou YJ, et al. Determination of the content of crystalline form I in simvastatin tablets by powder X-ray diffraction method [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2019, 39: 1457-1462.