

## 三磷酸腺苷二钠水溶液化学稳定性研究

李 丽 燕 崔 英 丽\*

(沈阳药学院)

**提要** 本实验在广泛 pH 范围对三磷酸腺苷二钠化学稳定性进行了研究。测定了不同温度、不同 pH 的速度常数,按 Arrhenius 方程测得不同 pH 的分解活化能及不同温度下最稳定的 pH。并证明柠檬酸根离子对三磷酸腺苷二钠水解反应有催化作用。

**关键词** 三磷酸腺苷二钠; 稳定性

三磷酸腺苷(ATP)及其二钠盐(ATP·2Na)属于核苷酸类药物。由于分子中具有高能磷酸脂键,在酶、稀酸、稀碱作用下易水解生成 ADP, AMP 等产物<sup>(1)</sup>。关于 ATP 及 ATP·2Na(无酶存在)水溶液稳定性报道不多,其中多数文献只作了定性报道<sup>(2~5)</sup>。文献<sup>(4,5)</sup>报道了 ATP 及 ATP·2Na 水解反应服从一级反应动力学规律,ATP·2Na 的速度常数  $K=1.7 \times 10^{-4} \text{min}^{-1}$  (pH 7.0~7.3, 100°C), ATP 活化能  $E=116 \text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (pH=7.3)。至于 ATP·2Na 在广泛 pH 范围,无酶存在下的活化能(E)及最稳定 pH 值至今国内外未见报道。为了保证 ATP·2Na 产品质量和注射剂质量,在广泛 pH 范围内对 (pH)<sub>m</sub> 与温度关系以及活化能与 pH 关系等几方面进行研究,对了解 ATP·2Na 化学稳定性十分必要。我们用经典恒温法对 ATP·2Na 水溶液稳定性进行了研究。

### 实 验 部 分

实验在 pH 2.23~8.32 范围内于七个不同 pH 下进行。柠檬酸一磷酸氢二钠缓冲液系统 pH 用 25 型酸度计测定,精度  $\pm 0.1 \text{pH}/3 \text{pH}$ 。

配制一定 pH 的 1% ATP·2Na 溶液于带塞试管内,管置于恒温 60, 70, 80, 90  $\pm 1^\circ\text{C}$  水浴中,每隔 10 分钟取样,冷却后进行纸层析<sup>(6)</sup>,在紫外灯下 ATP·2Na 斑点显紫色荧光,剪下斑点置 10 ml N/100 盐酸溶液中,在 40~50°C 水浴保温 2 小时,用垂熔漏斗滤去纸毛,在 260 nm 处测定吸收值计算含量<sup>(6)</sup>。

### 结 果

实验测得 ATP·2Na 在不同温度时,于 pH 2.0~pH 8.23 范围水解反应到某相应时间以  $\lg c$  对  $t$ (时间)作图所得直线有时发生转折(图 1)。

从图 1 可以看出,ATP·2Na 于 70°C, pH 4.10 水解反应在 70 分钟直线发生转折,转折前后水解反应皆为一级反应。后者速度常数增大( $K_1=1.416 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$ ,  $K_2=2.970 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$ )。经纸层析证明(图 2),水解 70 分钟前后出现斑点数目不同,前者三个斑点(A, B, C),后者四个斑点(A, B, C, D)其中 D 颜色和 R<sub>f</sub> 值与 A, B, C 不同。由此说明直线发生转折是由水解产物不同所致。

本文于 1984 年 9 月 14 日收到

\* 微生物制药专业 80 级学生

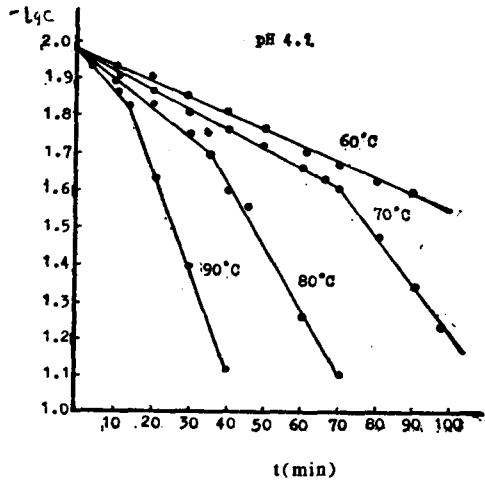


Fig 1. Semilogarithmic plot of concentration with time at different temperatures

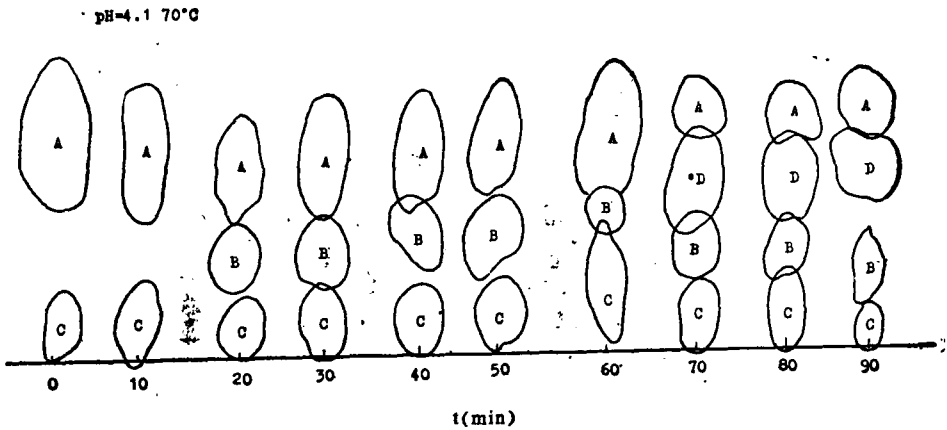


Fig 2. Paper chromatogram of decomposition at different time

利用直线发生转折前的  $\lg c$  对  $t$  (时间) 回归得不同 pH、不同温度的动力学方程。并作  $\lg k - \text{pH}$  图(表 1、图 3)。

从图 3 可以看出,不同温度时的最稳定 pH 不同。60°C 最稳定的 pH 为:  $(\text{pH})_{\text{m}} = 5.00$ 。不同 pH 的  $\lg k$  增大值不同,所以 70, 80, 90°C 出现两个最稳定 pH。70°C 时两个最稳定 pH 分别为:  $(\text{pH})_{\text{m}} = 3.40$  及  $(\text{pH})_{\text{m}} = 6.00$ 。温度增加  $(\text{pH})_{\text{m}} = 3.40$  不动,而  $(\text{pH})_{\text{m}} = 6.00$  向碱性方向移动。

以  $\lg k$  对  $\frac{1}{T}$  回归,得不同 pH 的 Arrhenius 方程,并以活化能(E)对 pH 作图(表 2, 图 4)。

从图 4 可以看出,不同 pH 溶液中 ATP·2 Na 分解活化能不同。曲线在 pH 3.40~7.10 范围于 pH=5.00 处活化能出现极大值。在 pH 2.23 及 pH 8.32 活化能皆大于 pH 5.00 的极大值。

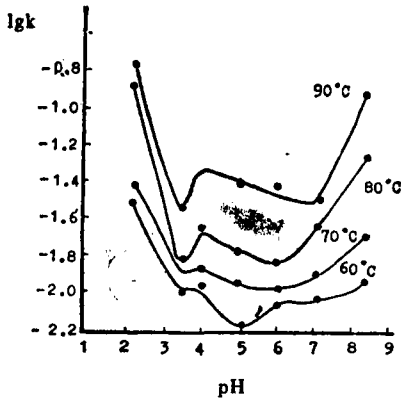


Fig 3. Semilogarithmic plot of decomposition rate constant with pH at different temperatures

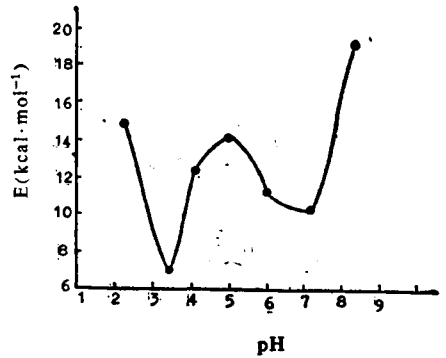


Fig 4. Plot of activation energy with pH

Tab 1. Decomposition rate constants of disodium adenosine triphosphate at different pH and temperatures

pH	60°C ± 1/k min <sup>-1</sup>	70°C ± 1/k min <sup>-1</sup>	80°C ± 1/k min <sup>-1</sup>	90°C ± 1/k min <sup>-1</sup>
2.23	0.03228	0.04237	0.14330	0.17020
3.45	0.01099	0.01273	0.01306	0.02878
4.10	0.01058	0.01417	0.02494	0.05053
5.01	0.00671	0.01168	0.01743	0.04198
5.99	0.00942	0.01060	0.01526	0.04125
7.12	0.00747	0.01313	0.01439	0.02998
8.32	0.01205	0.01920	0.05313	0.1221

Tab 2. Arrhenius equation of disodium adenosine triphosphate at different pH

pH	Arrhenius equation	Correlation coefficient	E (kcal·mol <sup>-1</sup> )
2.23	$\lg k = -3.248 \times 10^3/T + 8.2230$	-0.9518	14.863
3.45	$\lg k = -1.508 \times 10^3/T + 2.5152$	-0.8526	6.900
4.10	$\lg k = -2.726 \times 10^3/T + 6.1608$	-0.9798	12.4743
5.01	$\lg k = -3.075 \times 10^3/T + 7.0334$	-0.9833	14.0713
5.99	$\lg k = -2.478 \times 10^3/T + 5.3292$	-0.9126	11.3394
7.12	$\lg k = -2.236 \times 10^3/T + 4.5908$	-0.9667	10.235
8.32	$\lg k = -4.153 \times 10^3/T + 10.4875$	-0.9874	19.004

## 讨 论

1. ATP·2 Na 在 pH 2~8 范围水解反应是受酸碱催化的假一级反应，温度升高水解反应速度增大。分解活化能与 pH 有关，pH 5.00 时的速度常数最小活化能最大。pH 2.32 与 pH 8.32 相比，pH 8.32 活化能大，速度常数小(见图 3~4)。此规律符合化学反应动力学一般情况，活化能大，反应速度小。

2. pH 2.23 及 pH 8.32 的速度常数与活化能皆大于 pH 3.4~7.0 范围的速度常数与活化能，这是由于 ATP·2 Na 水解产物不同所致(见图 5, 6)。

3. 本实验在 pH 7.12 测得  $E = 10.24 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，从文献<sup>(5)</sup>查出 ATP 在 pH 7.3 时

$E=116 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $E=27.75 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) 两者结果相差较大 (ATP 与  $\text{ATP}\cdot 2 \text{ Na}$  水解机制一致), 原因是本实验用柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液调 pH, 文献<sup>(5)</sup>用  $1 \text{ N NaOH}$  溶液调 pH. 为此我们测定下列数据:

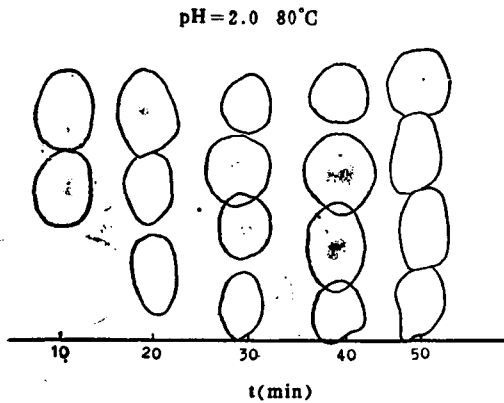


Fig 5. Paper chromatogram of decomposition at different time

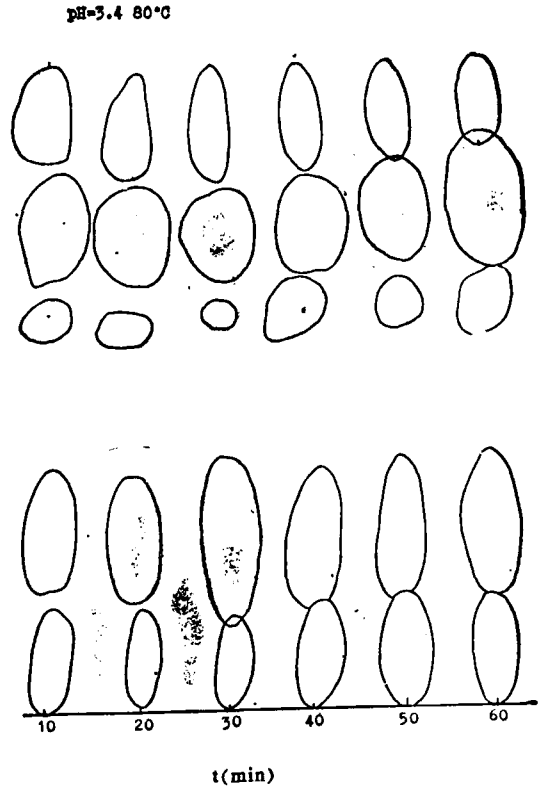


Fig 6. Paper chromatogram of decomposition at different time

柠檬酸 (pH 2.20), 1% ATP·2 Na  $k_1=2.64 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  (70°C)

盐酸 (pH 2.20), 1% ATP·2 Na  $k_2=1.36 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  (70°C)

$k_1$  大于  $k_2$ , 由此推论柠檬酸根离子降低了 ATP·2 Na 分解活化能, 起催化作用。

本文解决了 ATP·2 Na 水解动力学规律  $[K, E, (\text{pH})_m]$ , 对于 ATP·2 Na 原料生产工艺条件的制订, 注射剂灭菌温度、pH 及稳定剂加入的控制, 注射剂的贮存温度及贮存期的确定均有指导意义。

由于 ATP·2 Na 水解产物比较复杂, 对不同温度、pH 下 ATP·2 Na 水解产物未做确定, 有待研究。

### 参 考 文 献

1. 大连轻工业学院主编. 生物化学, 北京: 轻工业出版社, 1980:153.
2. Morell SA, et al. Stability of disodium adenosine triphosphate. *Science* 1951; 114:333.
3. The Merck Index. Seventh edition. 1968:21.
4. Бабакина ГС, идр. применение ионизирующих излучений для стерилизации инъекционных препаратов атф. *Хим Фарм Ж* 1981; (3):95.
5. Мунблит ВЯ, идр. Кинетика гидролиза водных растворов атф. *Кинет Катал* 1984; 25:485.
6. 天津市卫生局. 三磷酸腺苷二钠盐. 天津市药品检验标准. 1973; 3.

## A STUDY ON CHEMICAL STABILITY OF DISODIUM ADENOSINE TRIPHOSPHATE IN AQUEOUS SOLUTION

LI Li-Yan and CUI Ying-Li

(*Shenyang College of Pharmacy*)

**ABSTRACT** In the present experiment, the chemical stability of disodium adenosine triphosphate was studied in a large pH range. The rate constants at different temperatures and different pH values were determined. Kinetic equations and Arrhenius equations were obtained. Activation energy values for different pH as well as the pH value of maximum stability  $[(\text{pH})_m]$  at different temperatures were also obtained. It was shown that citric acid ions have catalytic effect on the hydrolysis of disodium adenosine triphosphate. The conventional isothermal kinetic method was used in this experiment.

**Key words** Disodium adenosine triphosphate; Stability