

# 台阶型变温加速试验——药物稳定性 预测的新方法

庞贻慧 方积乾 侯新朴

(北京医学院)

**提要** 本文提出一个药物稳定性预测的变温动力学新方法——台阶型变温法。它比其它七十年代的变温动力学方法,设备简单易行;比经典恒温动力学方法,则大大减少人力和时间。本法数据处理简单,可以计算,也可以图解,结果精度也高。文中以蔗糖酸催化水解、抗坏血酸水溶液的氧化及阿糖胞苷水解脱氨反应实验结果为例,说明在工作量大为减轻的情况下,对于活化能、指数前因子(频率因素)、以及常温速度常数或贮存期的预测,台阶法与经典法的差别无显著性意义。

药物稳定性的动力学预测已有20余年历史。本世纪五十年代提出的恒温加速试验法<sup>(1)</sup>奠定了动力学预测的理论基础,其效果已为许多工作所证实。恒温加速实验的基本内容是:在若干个较高的恒定温度下分别观测药物分解过程,找出分解速度常数与温度间的定量关系,据此推出室温下的分解速度常数或分解一定百分组成所需的时间,这一方法的缺点是工作量较大。

鉴于此,几乎同时,人们开始探索变温加速实验<sup>(2)</sup>,一个样品一次实验,可同时得到不同温度下的速度常数,活化能及指数前因子,大大节省了人力和时间。关于药物稳定性预测,Rogers<sup>(3)</sup>,Eriksen<sup>(4)</sup>,大草直也<sup>(5)</sup>及Zoglio<sup>(6)</sup>等提议令药物按预先设计的温度——时间曲线升温,可使数据处理不甚复杂,但必须具备特定的程序升温装置。为避免这类装置,七十年代Maulding<sup>(7)</sup>,Key<sup>(8)</sup>,Madsen<sup>(9)</sup>,Zoglio<sup>(10)</sup>等又提倡自由变温法,只需以手调变温便可进行试验,但数据分析却相当繁重,不得不借助于电子计算机。

为便于生产部门建立稳定性预测常规,能否发挥变温加速试验之长处,以较少的时间与工作量完成预测而既不需要程序升温装置,又不必借助电子计算机作数据处理?本文所述的台阶型变温加速试验法便是适应这样要求提出的。这个方法除用一至二个恒温槽外,无需其它设备,操作简单易行,数据处理可计算也可图解,较之Rogers、Eriksen等人的方法更为方便,较之Zoglio等人的方法精确度也高。文中以蔗糖、维生素C及阿糖胞苷为例,说明在工作量大为减轻的情况下,对于活化能、指数前因子以及室温速度常数或贮存期的预测,台阶法与恒温法的差别无显著意义。当台阶数适当增多和温度值适当分散时,预测的精度甚至可优于恒温法。

## 原 理

### 1. 变温动力学基本方程

根据反应速度方程:  $-dc/dt = kc^n$

恒温动力学的解为  $f(c_0) - f(c) = kt$  (1)

$k$  为速度常数,  $n$  为反应级数,  $f(c)$  为浓度函数, 对零级反应:  $f(c) = c$ , 对一级反应:  $f(c) = \ln c$ , 对  $n$  级反应 ( $n \neq 1$ ):  $f(c) = c^{1-n}/1-n$  等等。

在变温情况下:

$$f(c_0) - f(c) = \int_0^t k(T(t)) dt \quad (2)$$

式中  $k(T(t))$  表示速度常数  $k$  是开尔文温度  $T$  的函数, 而  $T$  又随时间  $t$  而变。

假设  $k$  和  $T$  服从 Arrhenius 方程, 即:

$$k(T(t)) = Ae^{-E/RT(t)} \quad (3)$$

式中  $A$  为指数前因子,  $E$  为活化能,  $R$  为气体常数 ( $R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  或  $R = 1.987 \text{ Cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), 代入(2)式则得:

$$f(c_0) - f(c) = \int_0^t Ae^{-E/RT(t)} dt \quad (4)$$

这就是一般变温动力学方法的基本方程。

## 2. 台阶型变温法基本方程

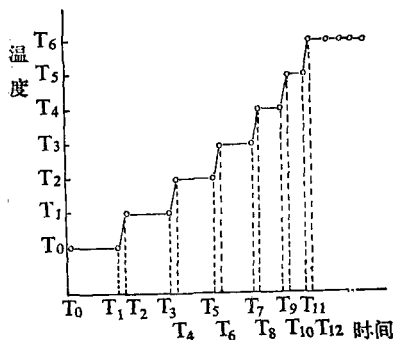


图 1 台阶型变温曲线示意图

台阶型升温曲线示意图, 见图(1), 时间由  $t_0$  开始经过  $t_1, t_2, t_3, \dots$  至  $t_{2m-1}$ , 这时温度由  $T_0$  经  $T_1, T_2, T_3, \dots$  至  $T_{m-1}$ , 其中  $t_{2i} \leq t \leq t_{2i+1}$  为恒温段, 而  $t_{2i+1} \leq t \leq t_{2i+2}$  为变温段。  $i = 0, 1, 2, \dots, m-1, m$  等于台阶数, 即恒温段数目。

不同时间取样分析反应物或生成物的浓度, 得到不同时间  $t_0, t_1, t_2, \dots$  时的相应浓度为  $c_0, c_1, c_2, \dots$  等。

如图 1 所示, 台阶型变温过程中, 恒温段的表达式为

$$T(t) = T_i \quad (5)$$

恒温段持续时间  $t_{2i+1} - t_{2i}$  的长短视药物在该温度下的稳

定情况而定, 只要  $f(c_{2i}) - f(c_{2i+1})$  相对于分析方法精度而言, 显著地异于零, 即可变温, 进入新的台阶。

由(4)式, 有

$$f(c_0) - f(c_{2i+1}) = \int_0^{t_{2i+1}} Ae^{-E/RT(t)} dt$$

$$f(c_0) - f(c_{2i}) = \int_0^{t_{2i}} Ae^{-E/RT(t)} dt$$

两式相减, 得

$$f(c_{2i}) - f(c_{2i+1}) = \int_{t_{2i}}^{t_{2i+1}} Ae^{-E/RT(t)} dt$$

以(5)式代入, 便得

$$f(c_{2i}) - f(c_{2i+1}) = Ae^{-E/RT_i}(t_{2i+1} - t_{2i})$$

或  $[f(c_{2i}) - f(c_{2i+1})]/(t_{2i+1} - t_{2i}) = Ae^{-E/RT_i} \quad (6)$

取对数:  $\ln\{[f(c_{2i}) - f(c_{2i+1})]/(t_{2i+1} - t_{2i})\} = \ln A - E/RT_i \quad (6')$

显然,  $\ln\{[f(c_{2i}) - f(c_{2i+1})]/(t_{2i+1} - t_{2i})\}$  是  $1/T_i$  的线性函数, 若在直角坐标系中作图, 诸点的排布接近直线, 斜率为  $-E/R$ , 截距为  $\ln A$ 。

事实上, (6)式也可以从恒温动力学角度导出。在任意恒温段( $t_{2i}$  至  $t_{2i+1}$ ), 令起始时刻  $t_0 = t_{2i}$ , 终末时刻  $t = t_{2i+1}$ , 起始浓度  $c_0 = c_{2i}$ , 终末浓度  $c = c_{2i+1}$ , 该温度下的速度常数为  $k_i$ , 则由(1)式应得:

$$f(c_{2i}) - f(c_{2i+1}) = k_i(t_{2i+1} - t_{2i}) \quad (7)$$

$$k_i = [f(c_{2i}) - f(c_{2i+1})] / (t_{2i+1} - t_{2i}) \quad (8)$$

代入(3)式, 也得(6)和(6')式

因此, 台阶型变温法既可看作一般变温法的特例, 又可看作经典恒温法的推广。

变温段时间一般很短, 当其浓度变化与恒温段比较可以忽略不计时, 测试点可以减少一半。然而, 对分解速度较快的样品, 则需分别测定  $c_{2i+1}$  和  $c_{2i+2}$ 。

### 3. 回归分析

$$\text{令 } y = \ln k \quad x = 1/T_i \quad (9)$$

由(6')、(7)两式, 根据  $m$  对实验得到的  $(k_i, T_i)$  数据, 估计回归方程

$$y = bx + a \quad (10)$$

中的系数  $b, a$  以及方差  $S_b^2, S_a^2$ 。其中

$$b = -E/R, \quad a = \ln A \quad (11)$$

利用所得回归方程, 可以外推室温 (例如  $20^\circ\text{C}$ ) 下的  $\ln k$  值, 记为  $y_0$ , 其方差记为  $S_{y_0}^2$ 。

进一步利用  $F$ -检验, 比较两种方法下的各种方差  $S_b^2, S_a^2$  和  $S_{y_0}^2$  等, 随即利用  $t$ -检验比较两种方法下的  $b$  和  $a$ , 即  $-E/R$  和  $\ln A$ 。关于回归计算的细节可参阅文献<sup>(11)</sup>

## 实 验

分别用台阶型变温法与经典恒温法测定蔗糖酸催化水解, 抗坏血酸水溶液中氧化及阿糖胞苷水解脱氨三个反应的活化能及指数前因子, 并预报  $20^\circ\text{C}$  时的  $k$  值及  $t_{0.9}$  (分解 90% 的时间)。

### 1. 样品溶液制备

(1) 蔗糖: 在 0.0002% 苯汞硝酸盐的溶液中配成 40% 的溶液, 与 1/2 体积的 0.005N HCl 混合均匀。

(2) 抗坏血酸: 用新鲜煮沸的蒸馏水配制 10% 溶液。

(3) 阿糖胞苷: 以醋酸(3.60M), 醋酸钠(0.36M)缓冲液为溶媒, 配制 0.04M 阿糖胞苷溶液, 准确调节 pH 在  $3.66 \pm 0.05$ 。

### 2. 按实验计划控制温度

蔗糖溶液分别用台阶型变温法及经典恒温法测定酸催化水解动力学参数。同一批号蔗糖溶液重复三次实验。台阶型变温由  $55^\circ\text{C}$  至  $85^\circ\text{C}$ , 按每隔  $5^\circ\text{C}$  一个台阶升温, 共 7 个台阶。每个台阶开始及终了时分别取样分析。经典恒温做  $55^\circ\text{C}, 60^\circ\text{C}, 65^\circ\text{C}, 70^\circ\text{C}$  及  $75^\circ\text{C}$  共 5 个恒温加速实验, 每个加速实验分别按一定的时间间隔取样 5~7 个, 分析含量。

抗坏血酸台阶型变温由  $60^\circ$  至  $78^\circ\text{C}$ , 每隔  $3^\circ\text{C}$  一个台阶, 共 7 个台阶。经典恒温做  $60^\circ\text{C}, 65^\circ\text{C}, 70^\circ\text{C}, 75^\circ\text{C}$  及  $80^\circ\text{C}$  5 个恒温加速实验。

阿糖胞苷台阶型变温由  $50^\circ\text{C}$  至  $80^\circ\text{C}$ , 每隔  $5^\circ\text{C}$  一个台阶, 共 7 个台阶。经典恒温作  $55^\circ\text{C}, 60^\circ\text{C}, 65^\circ\text{C}, 70^\circ\text{C}$  及  $80^\circ\text{C}$  5 个恒温加速实验。

### 3. 终止反应

按计划取样分析, 取样后立即终止反应再进行测定。阿糖胞苷和抗坏血酸, 以冷冻降温

法终止反应，蔗糖除降温外并加入定量的氢氧化钠溶液，以除去溶液中的催化剂氢离子。

### 4. 浓度测定

蔗糖用旋光法，抗坏血酸用碘量法，阿糖胞苷用紫外分光光度法（波长 260 nm 及 280 nm），计算公式：<sup>(12)</sup>  $C_{\text{阿糖胞苷}} = (0.927 A_{280} - 0.389 A_{260}) \times 10^{-4}$

## 结 果

由于所试三种化合物降解过程均系伪一级反应，浓度函数  $f(c)$  应取为  $\ln c$  或  $\lg c$ 。用回归分析处理实验数据，得到不同温度下的  $k$  值，并进而预报 20°C 时的  $k$  值及  $t_{0.9}$  值。（对于一级反应  $t_{0.9} = 0.1054/k$ ）

### 1. 蔗糖酸催化水解

同一批号三次实验结果列于表 1。

经统计检验回归具有显著性，( $\alpha = 0.01$ )。进一步检验台阶型变温与经典恒温两条回归直线的斜率  $b$  及预报 20°C 时的  $\lg k$  值，亦无显著性差异 ( $\alpha > 0.50$ )，从而说明这两条回归直线所反映的规律

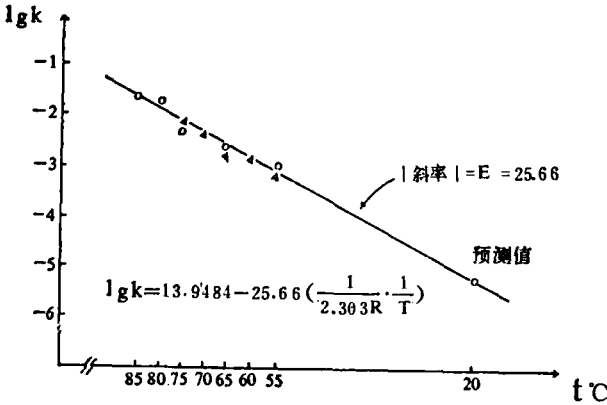


图 2 蔗糖酸催化水解试验结果

○ 台阶型变温法  
△ 恒温法

(数据见表 1, 第一、二行)

差别极不显著(图 2)。

表 1 蔗糖酸催化水解动力学参数值

实验次数	$\lg k (k: \text{min}^{-1})$							$A$ ( $\text{sec}^{-1}$ )	$E$ ( $k \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	预报 20°C $k(\text{min}^{-1})$	预报 20°C $t_{0.9}(\text{day})$
	55°C	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C	85°C				
1 台	4.9890	3.0871	3.3092	3.5306	3.7027	2.2326	2.3401	$8.88 \times 10^{12}$	25.66	$6.694 \times 10^{-6}$	11.0
1 恒	4.7986	3.0941	3.2057	3.5476	3.8008	—	—	$8.16 \times 10^{13}$	25.72	$5.615 \times 10^{-6}$	13.1
2 台	4.7544	3.1011	3.3355	3.5555	3.7461	3.8086	2.2772	$1.16 \times 10^{13}$	24.41	$7.528 \times 10^{-6}$	9.8
2 恒	4.7993	3.0955	3.3281	3.5363	3.8324	—	—	$3.87 \times 10^{13}$	25.17	$6.797 \times 10^{-6}$	10.8
3 台	4.8852	3.2098	3.4267	3.5442	3.6318	2.1617	2.3570	$3.49 \times 10^{13}$	25.02	$7.998 \times 10^{-6}$	9.2
3 恒	4.8403	3.0927	3.4526	3.5822	3.8062	—	—	$1.08 \times 10^{13}$	24.25	$9.103 \times 10^{-6}$	8.1

### 2. 抗坏血酸水溶液与阿糖胞苷水溶液的稳定性预测

我们分别用台阶型变温法及经典恒温法对同一批号抗坏血酸水溶液及阿糖胞苷水溶液进

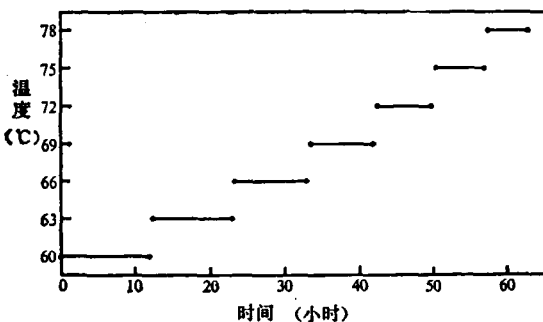


图 3 抗坏血酸变温试验试点图

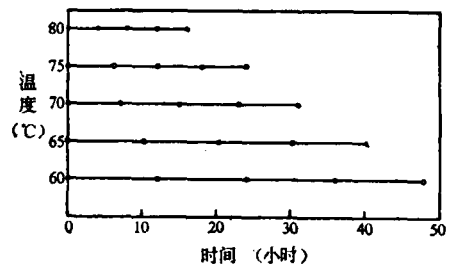


图 4 抗坏血酸恒温试验试点图

行稳定性预测试验, 试点图见图 3~6, 预测结果变温法与恒温法基本吻合。我们做了两种药物在两种方法下参数  $b$  和  $a$  的估计,  $\ln k$  值预测以及相应的方差, 得到  $E$ 、 $A$ 、 $20^\circ\text{C}$  时的  $k$  值及  $t_{0.9}$  值, 见表 2。统计检验结果见表 3。

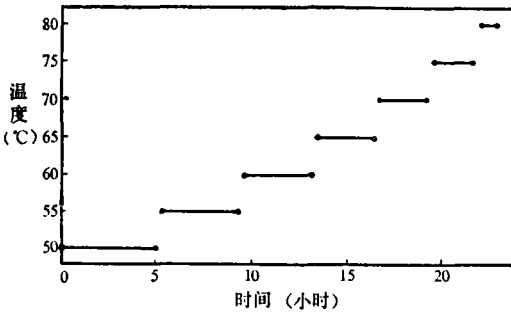


图 5 阿糖胞苷变温试验试点图

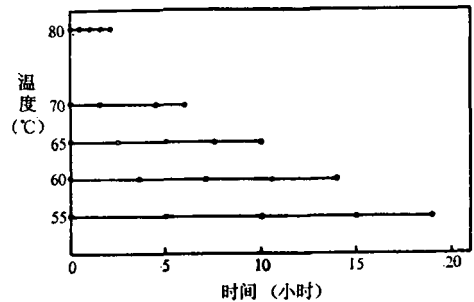


图 6 阿糖胞苷恒温试验试点图

表 2  $E$ 、 $A$  及  $k$   $20^\circ\text{C}$  的估计值

		$E$ ( $k \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$A$ ( $\text{sec}^{-1}$ )	20°C 预 测 值	
				$k$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	$t_{0.9}$ (day)
抗 坏 血 酸	台阶型变温法	20.31	$9.76 \times 10^6$	$2.503 \times 10^{-5}$	175.4
	恒 温 法	19.08	$1.40 \times 10^6$	$2.947 \times 10^{-5}$	149.0
阿 糖 胞 苷	台阶型变温法	20.49	$2.54 \times 10^8$	$4.771 \times 10^{-4}$	9.20
	恒 温 法	19.29	$0.39 \times 10^8$	$5.822 \times 10^{-4}$	7.54

表 3 各有关统计量及其临界值

项 目	$F_{\text{回}}$	$F_b$	$F_a$	$F_{y_0}$	$F_{1-0.05}$	$t_b$	$t_a$	$t_{y_0}$	$t_{1-\frac{0.05}{2}}$
抗坏血酸	2.861	2.972	2.989	2.864	9.01	0.664	0.716	0.361	2.306
阿糖胞苷	0.931	0.476	0.480	0.462	9.01	0.889	0.927	0.629	2.306

由表 3 可以看出, 所有统计量  $F$  均小于临界值  $F_{1-0.05}$ , 所有统计量  $t$  均远小于临界值  $t_{1-\frac{0.05}{2}}$ 。这就说明, 以台阶型变温法估计活化能、指数前因子以及  $20^\circ\text{C}$  时的速度常数与降解 10% 的时间, 结果与恒温法比较, 两者差别无显著意义。

## 讨 论

台阶型变温法的优点是不需要特殊的装置, 在一次实验中同时可得到药物稳定性的所有动力学参数, 所得结果与经典恒温法基本吻合。

台阶型变温法所得每个温度下的  $k$  值确有较大误差, 然而在总工作量小于恒温法的前提下, 台阶法可通过恒温段数目的增多和温度值的适当散开来补偿  $k$  不甚精确所带来的损失。这就是表 3 中统计量  $F$  和  $t$  的数值远小于临界值的原因。

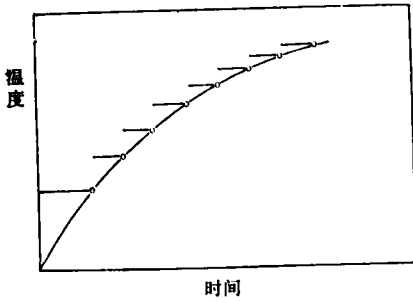


图 7 台阶变温与曲线变温示意图

本实验系用手调台阶变温。若采用简单程序升温装置<sup>(13)</sup>按台阶型变温,操作更显方便,可多作台阶,增加精度。

又,在同样分析测定条件和精度要求下,台阶法所需时间不长于其它变温法。这点可由图 7 看出,若某变温法按曲线变温,在若干个点上取样测定,那么我们就按照过这些点的水平线段作台阶型试验,其精度及时间的实际效果必不逊于该变温法。

台阶的长度,宜尽量缩短,以节约试验时间和增多温度段。但是,  $\ln k$  的绝对误差(或  $k$  的相对误差)又反比于  $f(c_{2i}) - f(c_{2i+1})$ , 因此,仅当两试点的浓度差别足够大时方能变温。

### 参 考 文 献

1. Garrett ER: Prediction of stability in pharmaceutical preparations 1, Color stability in a liquid multisulfa preparation. *J Am Pharm Assoc Sci* 44:515, 1955
2. Borchardt HJ, et al: The application of differential thermal analysis to the study of reaction kinetics. *J Am Chem Soc* 79:41, 1957
3. Rogers AR: An accelerated storage test with programmed temperature rise. *J Pharm Pharmacol Suppl* 15:101T, 1963
4. Eriksen SP, et al: Single-Step stability studies. *J Pharm Sci* 54:1029, 1965
5. 大草直也, 他: 薬剤の安定性予測に関する動力学的研究 (1) 非等温法による動力学的解析について *薬剂学* 28:17, 1968
6. Zoglio MA, et al: Linear nonisothermal stability studies. *J Pharm Sci* 57:2080, 1968
7. Maulding HV, et al: Flexible nonisothermal stability studies. *Ibid* 59:333, 1970
8. Key AI, et al: Use of an analog computer to simulate and interpret data of obtained from linear nonisothermal stability studies. *Ibid* 60:205, 1971
9. Madsen BW, et al: Integral Approach to Nonisothermal estimation of activation energy. *Ibid* 63:777, 1974
10. Zoglio MA, et al: Nonisothermal kinetic studies III Rapid nonisothermal-isothermal method for stability prediction. *J Pharm Sci* 64:1381, 1975
11. 沈阳药学院主编: 高等数学(下册), pp 374~393, 上海科学技术出版社 1979
12. Notari RE: Intermolecular and intramolecular catalysis in deamination of cytosine nucleosides. *J Pharm Sci* 59:28, 1970
13. 戴宗基: BJD-1 型程序升温仪. 北京医学院内部资料待发表

