

· 论著 ·

药物有效期预测及稳定性影响因素实验设计

陈建明¹, 邓莉¹, 王秀鑫², 黄硕¹, 高保安¹, 钟延强¹, 鲁莹¹, 丁雪鹰¹ (1. 第二军医大学药剂学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学药学本科 06级学员, 上海 200433)

[摘要] 目的 探索替莫唑胺作为药物稳定性学生实验的可行性, 建立预测其水溶液室温有效期的实验方法, 并考察 pH 对稳定性的影响。方法 用 HPLC 法测定替莫唑胺水溶液有效成分含量; 用一级反应速率方程及阿雷尼乌斯公式进行计算预测。结果 本品水溶液在高温条件下不稳定; 同时受 pH 影响较大, 在酸性条件下稳定, 在碱性条件下不稳定; 室温有效期约为 21 d。结论 本次实验药物选择合适, 实验操作简便, 快速准确, 适合学生操作, 可用于药剂学药物稳定性的实验教学。

[关键词] 替莫唑胺; 有效期; pH; 高效液相色谱法

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)01-0007-04

Experimental design for the prediction of drug validity duration and the investigation of influences on drug stability

CHEN Jian-ming¹, DENG Li¹, WANG Xiu-xin², HUANG Shou¹, GAO Bao-an¹, ZHONG Yan-qiang¹, LU Ying¹, DING Xue-ying¹ (1. Department of pharmaceutics, School of pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. 06 sessions of Undergraduate pharmacy Students, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the feasibility of temozolamide replacement of vitamin C and penicillin to evaluate the drug stability for students, experiment; to establish the experimental method to predict the validity duration of temozolamide at room temperature and examine the impact of pH on the validity duration. **Methods** The concentration of temozolamide was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC); the rate equation of first order reaction and Arrhenius equation were used to calculate the correlation parameters. **Results** Temozolamide was stable under the condition of acidic environment, not under the condition of high temperature, or alkaline environment, respectively; the pH value had a great impact on the drug stability; and the validity duration of temozolamide is about 21 days at room temperature. **Conclusion** The operation was simple and convenient, and temozolamide was suitable as a model drug to evaluate the drug stability for students, experiment.

[Key words] temozolamide; validity; pH; HPLC

大多数药学院校, 在测定药物稳定性和有效期的实验中一般会选择维生素 C 和青霉素 G 钾盐作为模型药物, 但这两种药物在实验中存在一定缺陷。维生素 C 虽然不稳定, 但其水溶液在密封条件下高温加热, 含量损失缓慢, 完成一个实验需要 5 天时间^[1], 对于学生实验来说时间过长, 同时维持 100

高温条件比较困难。青霉素 G 钾盐作为模型药物进行稳定性实验, 实验时间较短, 但是有一些学生因为体质原因, 对青霉素过敏^[2], 为实验安全考虑, 也不宜用于学生实验。

替莫唑胺是一种抗肿瘤药物^[3], 化学名为 3, 4-二氢-3-甲基-4-氧代咪唑并[5, 1-d]-1, 2, 3, 5-四嗪-8-酰胺, 结构式如图 1 所示。其水溶液对热不稳定,

pH < 5 时稳定, pH > 7 时易分解^[4], 没有不良反应的报道。本研究即以替莫唑胺为模型药物考察用于学生稳定性实验教学的可行性, 以便建立更方便、有效、安全的实验方法, 对现有药物稳定性教学实验进行改进。

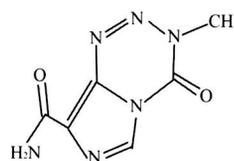


图 1 替莫唑胺结构式

1 原理

经预实验证实, 替莫唑胺的水解反应为一级反应。一级反应的速率方程为 $-dc/dt = kc$, 将其进行积

[作者简介] 陈建明 (1964-), 男, 副教授。Tel: (021) 81871291, E-mail: yjcjm@163.com.

分变形得: $\lg C = kt / (-2.303) + \lg C_0$ (式中: C_0 为 $t = 0$ 时替莫唑胺水溶液的浓度, k 为替莫唑胺水溶液的水解速度常数)。根据此直线的斜率即可求出 k 值。反应速度常数 k 与绝对温度 T 之间的关系为:

$$\lg k = (-E_a / 2.303R) / T + \lg A$$

式中: A —频率因子

E_a —活化能

R —气体常数 (8.315 焦耳·摩尔⁻¹·度⁻¹)

以 $\lg k$ 对 $1/T$ 作图求出 E_a 及 A 值, 将其代入原式即可求出 25 或任何温度下的水解速度常数及常温下的有效期。

2 仪器与药品

2.1 仪器 Agilent 1100 系列 HPLC; Agilent G1314A VWD 检测器; Agilent 1100 色谱工作站; BS124S 型电子天平 (德国赛多利斯公司); DK-S22 型电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); 普及型 pH-10 pH 计 (德国赛多利斯公司); 25 ml 容量瓶, 50 ml 容量瓶, 5 ml 注射器, 1 ml 移液管, 2 ml 移液管, 洗耳球, 5 ml 安瓿, 酒精喷灯, 镊子等。

2.2 药品 替莫唑胺及其对照品 (江苏天士力帝益药业有限公司提供); 甲醇 (AR, 国药集团, 批号: T20090521); 冰乙酸 (AR, 国药集团, 批号: T20080624); 盐酸 (AR, 国药集团, 批号: T20090403); 氢氧化钠 (AR, 国药集团, 批号: F20090616)。

3 方法和结果

3.1 测定方法

3.1.1 色谱条件 分析柱为 Kromasi C₁₈ 分析柱 (5 μ, 4.6 mm × 25 mm); 流动相为甲醇-0.5% 的乙酸水溶液 (10:90), 流速 1.0 ml/min, 进样量 20 μl, 柱温: 室温, 检测波长 329 nm^[5]。用两点法进行测定, 每次测得的峰面积都与标准液峰面积进行比较, 得到相对值。每个温度条件下不同时间药液的峰面积相对值与相应的零时的峰面积相对

值比较, 同理, 每个 pH 条件下不同时间药液的峰面积相对值与相应的零时的峰面积相对值比较, 得到 $\lg C$ 。

3.1.2 标准液配制 精密称取 25 mg 替莫唑胺标准品, 放入 25 ml 容量瓶中, 用蒸馏水溶解, 超声 2~3 min, 蒸馏水定容。移取 1 ml 溶液到 25 ml 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 得到标准液。

3.1.3 精密度试验 取标准液连续进样 5 次, 测得峰面积分别为 2668.3, 2670.2, 2664.5, 2671.8, 2669.7, 峰面积 RSD 为 0.103% ($n=5$)。

3.1.4 测试样品的稳定性 将标准液在 0、1、2、3、4 h 分别进样, 记录色谱图和峰面积, 计算峰面积 RSD 值, 为 0.412% ($n=5$)。

3.2 一级反应确定 替莫唑胺水溶液在 60、70、80、90 条件下得到数据进行整理计算, 求出 $\lg C$ 和 t , 将 $\lg C$ 和 t 进行回归, 线性关系见表 1, 可以认为替莫唑胺水解反应为一级反应。

3.3 有效期检测实验

3.3.1 药物水溶液的 pH 值 替莫唑胺蒸馏水溶液的 pH 值为 5.7。

3.3.2 药物水溶液配制 精密称取 25 mg 替莫唑胺粉末, 放入 50 ml 容量瓶中, 用蒸馏水溶解, 超声 2~3 min, 蒸馏水定容。用注射器吸取 3 ml 药液, 移入 5 ml 安瓿中, 分装 16 瓶, 用酒精喷灯封口。

3.3.3 恒温加热取样 将安瓿分别放入水温为 60、70、80、90 恒温水浴锅中, 每个水浴锅中放四支, 60、70、80 恒温水浴锅中样品每隔 1 h 取出一支, 90 恒温水浴锅中样品每隔 0.5 h 取出一支, 取出后迅速冷却至室温, 每支移取 2 ml 药液至 25 ml 容量瓶中用蒸馏水定容。根据测定方法项下色谱条件进行检测。

3.3.4 样品测定结果 60、70、80、90 恒温水浴加热的样品, 按测定方法项下色谱条件进行含量测定, 记录并整理数据, 将 $\lg C$ 与 t 进行线性回归, 得到回归方程, 直线方程斜率与 -2.303 相乘得到 k 值, 结果见表 1。

表 1 替莫唑胺不同温度下的回归方程及相应的 k 值

加热温度 ()	$\lg(C$ 相)				回归方程 y: $\lg C$ x: t	k (h ⁻¹)
	1 h (0.5 h) ¹⁾	2 h (1 h) ¹⁾	3 h (1.5 h) ¹⁾	4 h (2 h) ¹⁾		
60	-0.016 88	-0.02 793	-0.050 98	-0.067 23	$y = -0.016 9x + 0.001 1$ $r=0.995 1$	0.038 92
70	-0.034 09	-0.149 50	-0.279 17	-0.427 61	$y = -0.110 0x + 0.042 0$ $r=0.981 2$	0.253 33
80	-0.176 36	-0.444 30	-0.767 63	-1.165 64	$y = -0.292 3x + 0.073 7$ $r=0.989 6$	0.673 17
90	-0.193 02	0.512 00	0.921 95	1.414 68	$y = -0.711 7x + 0.103 3$ $r=0.986 8$	1.639 05

¹⁾ 90 取样时间间隔

3.3.5 常温下有效期计算 将 60、70、80、90 下计算的 $\lg k$ 值整理,与温度相对应列表,结果见表 2,并计算常温下有效期。

表 2 不同温度下的水解速率常数

T	333 K (60)	343 K (70)	353 K (80)	363 K (90)
1/T · 10 ³	3.003	2.915	2.838	2.755
lgk	-1.409 83	-0.596 31	-0.171 88	0.214 59

对数据进行线性回归,得到方程:

$$\lg k = -6.4734/T + 18.138 \quad r=0.9855$$

$$E_a = -6.4734 \times (-2.303) \times 8.315 = 123.962 \text{ mol/(L} \cdot \text{s)}$$

$$\begin{aligned} \lg k_{25}/k_{60} &= -E_a/2.303R(1/T_{25} - 1/T_{60}) \\ &= -1.239621/2.303 \times 8.315 \\ &\quad \{ (333 - 298)/298 \times 333 \} \\ &= -2.283 \end{aligned}$$

$$k_{25} = 2.028 \times 10^{-4} / \text{h}$$

室温有效期 $T_{0.9}$ (损失 10%所需的时间)

$$\begin{aligned} T_{0.9} &= 0.1054/k_{25} = 0.1054/2.028 \times 10^{-4} \\ &= 519.72 \text{ h} \approx 21 \text{ d} \end{aligned}$$

3.4 pH对稳定性影响实验

表 3 不同 pH条件下的回归方程及相应的 k值

pH	lg(C相)				回归方程		k(h ⁻¹)
	1h	2h	3h	4h	y: lgC	x: t	
1	-0.016 16	-0.037 95	-0.061 49	-0.078 80	y = -0.020 3x + 0.001 7	r = 0.998 1	0.046 75
3	-0.010 60	-0.017 52	-0.030 67	-0.038 63	y = -0.009 7x - 0.000 02	r = 0.996 4	0.022 34
5	-0.048 71	-0.123 03	-0.242 13	-0.346 14	y = -0.088 6x + 0.025 1	r = 0.987 6	0.204 05
7	-0.110 14	-0.232 27	-0.380 72	-0.533 29	y = -0.133 7x + 0.016 1	r = 0.997 4	0.307 91
9	-0.159 96	-0.309 49	-0.480 33	-0.659 57	y = -0.164x + 0.006	r = 0.999 3	0.377 69

将 $\lg k$ 值与 pH 相对应,得到表 4,并作图,结果见图 2。

表 4 70 不同 pH条件下水解速率常数

pH	1	3	5	7	9
lgk	-1.330 22	-1.650 92	-0.690 26	-0.511 58	-0.422 86

以 pH 为横坐标, $\lg k$ 为纵坐标作图,用趋势线将五个点连接起来,得到图 2。

由上图可以看出, pH 速度曲线符合典型的 S 型图^[6],说明不同 pH 对替莫唑胺水溶液的水解速度影响较大,在酸性条件下较碱性稳定,其中 pH = 3 较 pH = 1 稳定,在碱性条件下,随碱性越强越不稳定。初步测算,替莫唑胺水溶液最稳 pH (pH_m) 接近 3。

3.4.1 不同 pH 水溶液配制 用盐酸、氢氧化钠调节蒸馏水,用 pH 计测定 pH 分别为 1、3、5、7、9,配制各 pH 值的水溶液体积均为 100 ml。

3.4.2 不同 pH 药物溶液配制 精密称取 25 mg 替莫唑胺粉末,放入 50 ml 容量瓶中,分别用 pH 为 1、3、5、7、9 的水溶液溶解,超声 2~3 min,再用各自 pH 水溶液定容。用注射器吸取 3 ml 药液,移入 5 ml 安瓿中,每个 pH 药物溶液装 4 瓶,用酒精喷灯封口。

3.4.3 恒温加热取样 将安瓿放入水温为 70 的恒温水浴锅中,采用 70 的恒温水浴的依据为,预实验中在此温度下替莫唑胺水解速率相对于其他温度,较为适中,且温度容易控制。具体操作为,每隔 1 h 取出不同 pH 药液各一支,取出后迅速冷却至室温,每支移取 2 ml 药液至 25 ml 容量瓶中用蒸馏水定容。根据测定方法项下色谱条件进行检测。

3.4.4 实验结果 对 pH 为 1、3、5、7、9 恒温水浴加热的样品,按测定方法项下色谱条件进行含量测定,记录并整理数据,将 $\lg C$ 与 t 进行线性回归,得到回归方程,直线方程斜率与 -2.303 相乘得到 k 值,结果见表 3。

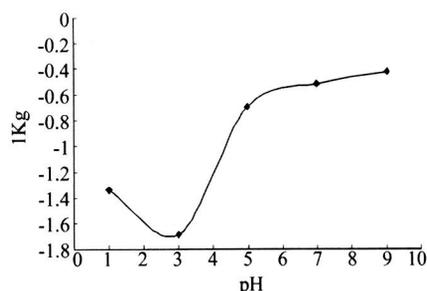


图 2 70 替莫唑胺水溶液 pH 速率图

3.5 教学实验方案 将学生分成两大组,一组进行有效期检测实验,另一组进行 pH 对稳定性影响实验。将有效期检测实验组的学生在分成 4 组,分别进行 60、70、80、90 条件下的实验,

具体操作如 3.3 有效期检测实验部分。将各组所得数据综合,进行有效期计算。将 pH 对稳定性影响实验得学生分成 5 组,分别进行 pH 为 1、3、5、7、9 条件下的实验,具体操作如 3.4 pH 对稳定性影响实验部分。将各组所得数据综合,绘制 pH 速率图。

4 讨论

本次实验方法简便安全可行,实验时间适中,数据准确,完全可以替代维生素 C 和青霉素 G 钾盐,进行学生实验的设计。

本次实验设计在原有实验基础上,加入了 pH 对药物有效期的影响实验,更加全面的与基础知识相结合。同时运用先进的检测方法,使学生熟悉现代仪器的操作,为今后科学研究打下良好的基础。

由于实验可操作性好,可以帮助学生巩固书本上的基础知识,提高实验操作技能、动手能力,逐步形成综合、归纳、分析和解决问题的能力,以培养学生的学科探究精神和良好的专业素质。因此,本实

验可用于药剂学药物有效期预测及稳定性影响因素的学生教学实验。

【参考文献】

- [1] 张传志,巩传国,赵吉兵. 维生素 C 注射液有效期的测定 [J]. 齐鲁药事, 2004, 23(8): 26.
- [2] 李翠英. 青霉素 G 在临床应用中应注意的几个问题 [J]. 中国校医. 1999, 13(2): 156.
- [3] Newlands Es, Steven MF, Wedge SR, *et al* Temozolomide: a review of discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials [J]. *Cancer Treat Rev*, 1997, 23(1): 35.
- [4] 陈华青. 替莫唑胺片的制备及含量测定 [J]. 广东药学报, 2002, 18(2): 116.
- [5] 周建军,谭贤英. 高效液相色谱法测定替莫唑胺溶解度及油水分配系数 [J]. 食品与药品, 2006, 8(6): 52.
- [6] 崔德福. 药剂学 [M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2007: 292.

[收稿日期] 2009-09-16

[修回日期] 2009-10-14

(上接第 6 页)

- [15] Maghsoodi M, Hassan-Zadeh D, Barzegar-Jalali M, *et al* Improved compaction and packing properties of naproxen agglomerated crystals obtained by spherical crystallization technique. *Drug Dev Ind Pharm*, 2007, 33: 1216.
- [16] Sano A, Kuriki T, Kawashima Y, *et al* Particle design of tolbutamide agglomerated crystals [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40: 3030.
- [17] Kawashima Y. Part I New processes-application of spherical crystallization to particulate design of pharmaceuticals for direct tableting and coating, and new drug delivery systems. In: powder technology and pharmaceutical processes [J]. *Handbook of Powder Technology*, 1994, 9: 493.
- [18] Kawashima Y, Okumura M, Takenaka H. The effects of temperature on the spherical crystallization of Salicylic acid [J]. *Powder Technol*, 1984, 39: 41.
- [19] Kawashima Y, Inai M, Takeuchi H, *et al* Improved flowability and compactibility of spherically agglomerated crystals of ascorbic acid for direct tableting designed by spherical crystallization process [J]. *Powder Technol*, 2003, 130: 283.
- [20] Jyothi K, Ake C R. Spherical crystallization of benzoic acid [J]. *Int J Pharm*, 2008, 348: 61.
- [21] Bausch A, Leuenberger H. Wet spherical agglomeration of proteins as a new method to prepare parenteral fast soluble dosage forms [J]. *Int J Pharm*, 1994, 101: 63.
- [22] Pawar A P, Paradkar A R, Kadam S S, *et al* Crystallo-co-agglomeration: A novel technique To obtain Ibuprofen paracetamol agglomerates [J]. *AAPS Pharma Sci Tech*, 2004, 5(3): 1.
- [23] Pawar A P, Paradkar A R, Kadam S S, *et al* Agglomeration of Ibuprofen with talc novel Crystallo-Co-Agglomeration technique [J]. *AAPS Pharma Sci Tech*, 2004, 5(4): 1.
- [24] Nokhodchi A, Bobourchian N, Dinarvand R. Dissolution and mechanical behaviors of recrystallized carbamazepine from alcohol solution in the presence of additives [J]. *J Cryst Growth*, 2005, 274: 573.
- [25] Vromans H. Studies on consolidation and compaction properties of lactose [D]. The Netherlands: University of Groningen, 1987.
- [26] Ali N, Maryam M, Davood H. Preparation of agglomerated crystals for improving flowability and compactibility of poorly flowable and compactible drugs and excipients [J]. *Powder Technol*, 2007, 175: 73.
- [27] Kawashima Y, Aoki S, Takenaka H. Spherical agglomeration of aminophylline crystals during reaction in liquid by the spherical crystallization technique [J]. *Chem Pharm Bull* 1982, 30(5): 1900.
- [28] Kawashima Y, Naito M, Lin S Y, *et al* An experimental study of the kinetics of the spherical crystallization of sodium theophylline monohydrate [J]. *Powder Technol*, 1983, 34(2): 255.
- [29] Blandin A F, Mangin D, Rivoire A, *et al* Agglomeration in suspension of salicylic acid fine particles: influence of some process parameters on kinetics and agglomerate final size. *Powder Technol*, 2003, 130: 316.
- [30] Smith H M, Puddington I E. Spherical agglomeration of barium sulphate [J]. *Can J Chem*, 1960, 38(10): 1911.

[收稿日期] 2009-06-19

[修回日期] 2009-10-26