

差示扫描量热法在药物定性分析中的应用

王杰晶¹, 李银峰², 李佩³, 张园园³, 靳朝东^{2*}

1. 河南大学, 河南 开封 475001

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

3. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 差示扫描量热法(DSC)是在程序控制温度下, 测量输给物质和参比物的功率差与温度关系的一种技术, 被广泛应用于药品的研究生产和质量测试的快速可靠的热分析方法, 该方法具有准确快速、样品用量少及易于操作等特点。综述了近年来差示扫描量热法在化学原料药、药物制剂、生物制品以及中药鉴定等方面的应用, 并展望了未来的发展前景。

关键词: 差示扫描量热法; 化学原料药; 药物制剂; 生物制品; 中药鉴定

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)05-0815-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.05.041

Application of differential scanning calorimetry in pharmaceutical qualitative analysis

WANG Jie-jing¹, LI Yin-feng², LI Pei³, ZHANG Yuan-yuan³, JIN Chao-dong²

1. Henan University, Kaifeng 475001, China

2. Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Differential scanning calorimetry (DSC) is a technology to measure the loss to the power of substance and reference substance poor relations with the temperature under the program control temperature, and it is widely used in pharmaceutical research production and quality test. This method is fast, accurate, and easy to operate with fewer samples. This article gives a short overview on the application of DSC in chemical raw medicine, pharmaceutical preparation, biological product, and identification of Chinese materia medica, and looking forward to the prospect of the development in future.

Key words: differential scanning calorimetry; chemical raw medicine; pharmaceutic preparation; biological product; identification of traditional Chinese medicine

差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)法是在程序控制温度下, 测量输给物质和参比物的功率差与温度关系的一种技术, DSC自1964年被提出以来, 被人们认识并广泛应用于石油、化工等行业, 1980年《美国药典》确定DSC作为药品纯度检验的标准方法使用, 人们逐渐意识到DSC在药物研发方面的作用, 由于此热分析方法具有准确快速、样品用量少及易于操作等特点, 其作为一种辅助技术被广泛的接受。伴随着相关技术的迅猛发展以及极高灵敏度和精密度的需求, 更多先进DSC仪器被研制出来, 如高灵敏度DSC(HSDSC),

满足更高灵敏度需求^[1]; 快速扫描DSC(Hyper DSC), 可以提供400~500 °C/min的高扫描速率^[2]; 调制式DSC(MDSC)可分开样品中可逆与不可逆过程的热量转移, 准确阐述各种转变的本质^[3]; 纳米级DSC(NanoDSC), 分析样品用量更少, 可少至130 μL或100 μg, 适用于痕量分析且可确保准确度。最近很多DSC还配备了全自动装样器和清洗设备, 由电脑控制, 提高了准确度, 降低了系统误差^[4]。本文着重综述了DSC在化学原料药、药物制剂、生物制品以及中药鉴定等方面定性分析的研究进展和应用。

收稿日期: 2013-03-03

作者简介: 王杰晶(1989—), 女, 药物分析专业, 主要研究方向为药物质量控制与研究。E-mail: wjj645@yahoo.com.cn

*通信作者 靳朝东 Tel: (022)23006877 E-mail: jinced@tjipr.com

1 在化学原料药中的应用

1.1 纯度测定

药品质量控制的重要环节是纯度的检查, DSC 可用来评估药物纯度, 当药物中含有微量杂质时, 会出现熔点降低并伴随有熔程变宽现象, 依据为范德霍夫方程^[5]。Kestens 等^[6]用 DSC 评估多环芳烃和氯霉素的纯度; Mathkar 等^[7]用 DSC 测定 16 种基准物质的纯度, 并都通过与其他测定纯度方法如液质联用、气质联用比较, 发现了 DSC 可检测与纯物质结构相近的杂质的优点, 以及在纯度检查方面适用范围窄的局限性。

1.2 药物热稳定性

药物的热稳定性及热分解历程的研究对药物的稳定性及药物的贮存有效期具有重要意义。通过 DSC 与热重法 (TG) 联合应用, 得到药物热分解过程, 使用先进的计算机软件, 依据热分析方程求出相关动力学参数, 即可推测出药物在不同温度下的预期寿命, 为药物的质量监控提供依据^[8]。王学杰等使用 DSC 与 TG 联用测定了甲磺酸帕珠沙星^[9]、司他夫定^[10]、加巴喷丁^[11]等药物的热稳定性及热分解历程, 并通过计算得到各药物的贮存条件。

1.3 药物多晶型

许多有机化合物包括药品都存在多晶型现象, 同一种药物的不同晶型, 在体内的溶解和吸收可能不同, 从而会对制剂的溶出和释放产生影响。且同一药物的不同晶型在某些条件下会发生转晶现象, 从而影响药物的有效性, 所以需要一种简单快速准确的方法来鉴别药物的晶型, 差示扫描量热法可通过得到的热分析曲线分析一种药物存在几种晶型, 各个晶型的熔点、熔融热、熔融过程以及晶型之间是否发生转晶, 非常适用于药物多晶型的分析。Karan 等^[12]研究发现硫酸奎宁存在 5 个晶型, 为晶型 O、I、II、III、IV, 将晶型 I、II、III、IV 分别置于一定温度的干烤箱内, 通过 DSC 和热重分析法 (TGA) 联用发现晶型 I、II 会发生固-固转变, 亚稳态的 IL、IIL 转变为稳定的 IH、IIH, 晶型 III 和 IV 发生去溶剂化转变为晶型 O。An 等^[13]通过 DSC 与 X 粉末衍射联合证实降血脂药阿托伐他汀具有 3 个晶型, 晶型 1 为非晶态, 晶型 3 为新晶型, 并且晶型 3 在室温下保存两年不会发生转晶现象。Lutker 等^[14]发现奥卡西平具有 3 个晶型, 通过 DSC 发现晶型 II 与晶型 III 在加热过程中易发生转晶, 转晶后样品通过拉曼光谱以及 X 粉末衍射证实为晶型 I。

2 在药物制剂中的应用

2.1 药物与赋形剂

药物的赋形剂也可影响药物的稳定性, 更早的预测药物与赋形剂之间的兼容性对药物研究来说是非常重要的。运用 DSC 可快速预测药物与赋形剂的兼容性, 将药物与赋形剂一起放入坩埚内, 通过对样品室进行高温或者高湿实验来模拟药物与赋形剂的长时间接触, 从得到的热分析图可判断药物与赋形剂在某种特定条件下是否会发生降解和相互反应等变化。McDaid 等^[1]运用高灵敏度 DSC 测试药物 A 与一般赋形剂的兼容性, 高灵敏度 DSC 结果显示药物 A 在潮湿环境下稳定, 若在干燥环境下, 以乳糖一水合物与硬脂酸镁为赋形剂时, 药物 A 稳定, 以硬脂酸镁为赋形剂且有水存在时, 药物 A 降解。将以硬脂酸镁为赋形剂的药物 A 贮存于 40 °C、75% 相对湿度的环境下 4 周, 药物 A 发生降解, 而单独将药物 A 贮存在于 40 °C、75% 相对湿度环境下或者以乳糖一水合物与硬脂酸镁为赋形剂的药物 A 贮存于干燥环境下 4 周, 药物 A 未发生降解。此实验结果表明高灵敏度 DSC 与传统的加速实验所得的结果一致, 说明高灵敏度 DSC 可以用来提前预测药物与赋形剂之间的兼容性, 并且 DSC 具有简单快速的特点, 在筛选赋形剂时, 可避免原料与时间的浪费。Javed 等^[15]、Pani 等^[16]、Singh 等^[17]分别通过 DSC 与其他技术如红外光谱等联合评估水飞蓟素、那格列奈、拉米夫定与不同的药物赋形剂之间的兼容性。

2.2 药物与脂质体相互作用

磷脂类的热分析图显示 3 个主要的相变, 第一个相变就是类脂膜从相对有序的胶晶态转变为无序的液晶态, 这种转变是由于保持层状结构的烃链溶解, 使膜的流动性增加, 双分子层厚度减小, 此相变非常迅速, 称为主相变; 第二个相变发生在主相变温度以下, 相变速度较主相变慢, 称为预相变, 仅能在一些磷脂中出现; 最后的相变特征不明显, 相变速度非常慢并且不显示大量的热力学信息。这 3 种相变分别有其相变温度、相变热焓以及半峰宽。脂质体相变焓依赖于脂质体的结构, 尤其是不饱和键的位置以及脂肪酸链的长度, 增加碳链的长度和饱和度, 会使主相变的焓值增加。Mady 等^[18]研究抗生素多柔比星 (DOX) 和脂质体 DPPC 之间的反应, 通过比较 DPPC 的 DSC 热分析图和 DPPC/DOX 的 DSC 热分析图, 发现 DPPC 的主相变温度较加入

DOX 的 DPPC 温度有些微的降低, DPPC/DOX 的预相变消失以及在 136 °C 增加了一个相变峰, 说明多柔比星对 DPPC 双分子层的酰基链有显著影响, DOX 与 DPPC 之间的反应会降低 DPPC 脂质体的塑性黏度和增加膜流动性。Zhao 等^[19]运用 DSC 分析 DPPC 与紫杉醇之间的反应, 并研究胆固醇的存在对分子间反应的影响。研究显示在 DPPC 中嵌入紫杉醇会使 DPPC 预相变消失, 主相变峰变宽, 且紫杉醇浓度越高主相变峰宽越宽。将紫杉醇嵌入 DPPC 双分子层中会降低双分子层相转变的协同性, 形成松散且有柔性的双分子层结构。而胆固醇的存在则会促进 DPPC/紫杉醇之间的反应。从 DSC 曲线上脂质体的相变温度、热焓以及半峰宽的改变可推测脂质体结构性质的变化, 因此可通过比较药物、磷脂脂质体以及药物磷脂脂质体的 DSC 曲线, 从 3 条热分析曲线的差异来考察药物与磷脂脂质体间的相互作用。

3 在生物制品中的应用

DSC 可用于研究蛋白质的热稳定性。由于加热而使蛋白质变性称为热变性, 蛋白质的热变性与其空间构象改变有关, 不同的蛋白质具有不同的空间构象, 蛋白质在生命活动中表现出的多种多样的生物功能, 完全取决于其特定的空间构象, 若蛋白质空间构象发生改变则会引起生理活性的改变。DSC 能直接给出蛋白质热变性过程的温度和能量变化, 是研究蛋白质构象变化和结构稳定性的一种非常有效的方法。Jiang 等^[20]运用 DSC 研究溶解酵素的稳定性, 发现溶解酵素在 pH 4.0 醋酸盐和 pH 2.5 甘氨酸盐中构象稳定, 具有良好的稳定性, 且其熔点和焓变分别为 77.2 °C、 3.5×10^5 J/mol 和 63.8 °C、 2.9×10^5 J/mol。但是在 pH 7.4 磷酸盐中, 溶解酵素随着温度的升高有聚合的趋势。Wen 等^[21]也通过实验验证了 DSC 可以作为一种手段用于评估蛋白质热稳定性以及蛋白质构象变化。DSC 同样适用于 DNA 热变性的研究, Mady 等^[22]应用 DSC 记录了质粒 DNA、聚乙烯亚胺 (PEI) 以及两者的复合物的热分析曲线, 质粒 DNA 有两个相变峰, 其中 94 °C 为 DNA 变性的相变峰, 而两者复合物的相变图上 94 °C 的相变峰消失, 说明 PEI 可防止质粒 DNA 变性或者由于 PEI 的存在质粒 DNA 变性需要更多的能量。通过研究蛋白质以及 DNA 等生物制品的热变性条件, 可以为寻找防止其变性的条件提供新的思路。

4 在中药鉴别中的应用

我国中药资源丰富, 中药材在我国医疗保健方面起着重要作用, 并且越来越受到国际的广泛关注。中药材的质量决定治疗效果, 而中药材质量的最根本问题, 是药材的真伪优劣。因此, 中药材的品质以及真伪鉴别是十分重要的。喻喜华等^[23]用 DSC 分别对不同产地的山茱萸及其伪品进行分析, 发现山茱萸与其伪品的差热曲线差异明显, 其中放热峰相差不大, 但焓变值相差较大, 说明 DSC 可用于山茱萸的真伪鉴别。李维峰等^[24]通过 DSC 分别对不同产地的丹参、甘草和赤芍的粉末、醇提物和水提物进行分析鉴别, 俞媛等^[25]通过 DSC 对伞形科的 15 个品种的中药材进行鉴别, 发现 DSC 法具有试样微量化、不用溶剂、曲线易于解析、快速简便等优点。DSC 通过真品与伪品、优品与劣品具有不同的热分析曲线来鉴别药材真伪, 简便直观, 为中药鉴别提供新的思路, 值得推广。

5 展望

DSC 是主要的热分析方法之一, 其在药物研制过程中对原料药的纯度、晶型、稳定性等方面的质量控制, 在药物制剂、生物制品以及中药鉴定方面, 都有着举足轻重的作用。由于 DSC 技术的不断发展, 使得其灵敏度和精密度得到不断提高, 且伴随着计算机技术的迅猛发展, 对热分析数据的处理更加容易和精准, 这使得 DSC 技术得到了更加广泛的关注。DSC 还具有操作简便、分析快速准确、灵敏度高、样品用量少且不需要繁杂的前处理工作及价格适中等特点, 使此技术被广泛的应用到各个实验室中。DSC 对化合物的理化性质和能量变化方面的监测能力使得其在药物研究领域越来越受欢迎, 其前景将会越来越好。

参考文献

- [1] McDaid F M, Barker S A, Fitzpatrick S, *et al.* Further investigations into the use of high sensitivity differential scanning calorimetry as a means of predicting drug-excipient interactions [J]. *Int J Pharm*, 2003, 252(1/2): 235-240.
- [2] McGregor C, Bines E. The use of high-speed differential scanning calorimetry (Hyper-DSC) in the study of pharmaceutical polymorphs [J]. *Int J Pharm*, 2008, 350(1/2): 48-52.
- [3] 张建策. 温度调制式差示扫描量热法及其应用 [J]. *贵州化工*, 2004, 29(1): 33-35.
- [4] Plotnikov V, Rochalski A, Brandts M, *et al.* An

- autosampling differential scanning calorimeter instrument for studying molecular interactions [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2002, 1(1): 83-90.
- [5] Giron D, Goldbronn C. Place of DSC purity analysis in pharmaceutical development [J]. *J Therm Anal Calorim*, 1995, 44(1): 217-251.
- [6] Kestens V, Zeleny R, Auclair G, *et al.* Differential scanning calorimetry method for purity determination: A case study on polycyclic aromatic hydrocarbons and chloramphenicol [J]. *Thermochim Acta*, 2011, 524(1/2): 1-6.
- [7] Mathkar S, Kumar S, Bystol A, *et al.* The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(3): 627-631.
- [8] Bruylants G, Wouters J, Michaux C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(17): 2011-2020.
- [9] 王学杰, 游金宗. 甲磺酸帕珠沙星的热分解机理及动力学 [J]. *分析科学学报*, 2011, 27(3): 297-301.
- [10] 王学杰, 游金宗. 司他夫定的热分解机理及动力学 [J]. *应用化学*, 2011, 28(6): 709-715.
- [11] 王学杰, 游金宗. 加巴喷丁的热分解过程及动力学 [J]. *化学试剂*, 2011, 33(6): 503-507.
- [12] Karan M, Chadha R, Chadha K, *et al.* Identification, characterization and evaluation of crystal forms of quinine sulphate [J]. *Pharmacol Pharm*, 2012, 3(2): 129-138.
- [13] An S G, Sohn Y T. Crystal forms of atorvastatin [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(6): 933-936.
- [14] Lutker K M, Matzger A J. Crystal polymorphism in a carbamazepine derivative: oxcarbazepine [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(2): 794-803.
- [15] Javed S, Kohli K, Ali M, *et al.* Solid state compatibility between silymarin and tablet excipients by thermal and non-thermal methods, its pH stability and solubility analysis [J]. *J Pharm Res*, 2012, 5(3): 1300.
- [16] Pani N R, Nath L K, Acharya S, *et al.* Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2011, 108(1): 219-226.
- [17] Singh A V, Nath L K. Evaluation of compatibility of tablet excipients and novel synthesized polymer with lamivudine [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2012, 108(1): 263-267.
- [18] Mady M M, Shafaa M W, Abbase E R, *et al.* Interaction of doxorubicin and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(3): 481-486.
- [19] Zhao L, Feng S S, Kocherginsky N, *et al.* DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane [J]. *Int J Pharm*, 2007, 338(1/2): 258-266.
- [20] Jiang G, Woo B H, Kang F, *et al.* Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres [J]. *J Controlled Release*, 2002, 79(1/3): 137-145.
- [21] Wen J, Arthur K, Chemmalil L, *et al.* Applications of differential scanning calorimetry for thermal stability analysis of proteins: qualification of DSC [J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101(3): 955-964.
- [22] Mady M M, Mohammed W A, El-Guendy N M, *et al.* Interaction of DNA and polyethylenimine: Fourier-transform infrared (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) studies [J]. *Int J Physic Sci*, 2011, 6(32): 7328-7334.
- [23] 喻喜华, 陈晓辉, 李泽运, 等. 山茱萸及其伪品的差示扫描量热法鉴别 [J]. *中成药*, 2011(7): 1197-1198.
- [24] 李维峰, 刘 益, 王玉蓉. 应用热分析法鉴别根茎类药材及其提取物 [J]. *中成药*, 2008, 30(1): 99-102.
- [25] 俞 媛, 张 华, 张晓然. DSC 曲线分析法对几种常用中药、中成药的真伪鉴别 [J]. *中国民康医学杂志*, 2005, 17(7): 344-346.