

经典恒温法和多元线性模型预测氯霉素亚砷涂剂的有效期

邵金彪^{1*},熊建华²,叶华³,范录平³,杨金招²(1.浙江永嘉县中医医院药剂科,浙江永嘉 325102;2.温州市人民医院药剂科,浙江温州 325000;3.温州市人民医院神经内科,浙江温州 325000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2202-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.14

摘要 目的:研究氯霉素亚砷涂剂(氯霉素-二甲基亚砷)的热降解动力学过程,并预测其有效期。方法:采用高效液相色谱法测定氯霉素亚砷涂剂在75、80、85、95℃恒温水浴中放置0、8、16、20、24 h的氯霉素含量;采用经典恒温法和多元线性模型两种方法预测制剂的有效期,同时比较两种方法的特点。结果:经典恒温法取20个数据经5次拟合可得回归方程为 $\lg K = -4.8253 \times (1/T) + 11.349$ ($r = 0.9990$), $K_{25^\circ\text{C}}$ 为 $1.47088 \times 10^{-5} \text{ h}^{-1}$, $t_{0.9}$ 为7 165.76 h,活化能为92.46 kJ/mol。多元线性模型取8个数据经1次拟合可得回归方程为 $\ln t = 1.016 \ln(\ln c_0 - \ln c) + 11.026550 \times 1/T - 25.8663$ ($r = 0.9942$), $t_{0.9}$ 为6 794.18 h,活化能为91.73 kJ/mol。氯霉素亚砷涂剂降解符合一级动力学方程。用经典恒温法和多元线性模型预测氯霉素亚砷涂剂的有效期分别为9.8、9.3个月。结论:氯霉素亚砷涂剂的有效期约为9.5个月;采用多元线性模型法预测有效期更简便。

关键词 氯霉素亚砷涂剂;经典恒温法;多元线性模型;氯霉素;有效期

Prediction of the Expiration Date of Chloramphenicol Sulfoxide Paint by Classical Constant Temperature Acceleration and Multivariate Linear Model

SHAO Jin-biao¹, XIONG Jian-hua², YE Hua³, FAN Lu-ping³, YANG Jin-zhao² (1. Dept. of Pharmacy, Zhejiang Yongjia County Hospital of TCM, Zhejiang Yongjia 325102, China; 2. Dept. of Pharmacy, Wenzhou People's Hospital, Zhejiang Wenzhou 325000, China; 3. Dept. of Neurology, Wenzhou People's Hospital, Zhejiang Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the thermal degradation kinetic process of Chloramphenicol sulfoxide paint (chloramphenicol-dimethyl sulfoxide) and predict its expiration date. METHODS: HPLC was conducted to determine the chloramphenicol content of Chloramphenicol sulfoxide paint with the constant temperature bath of 75, 80, 85, 95 °C for 0, 8, 16, 20, 24 h. Classical constant temperature acceleration and multivariate linear model were used to calculate the expiration date and the characteristics of 2 methods were compared. RESULTS: The regression equation was obtained through 5 fittings with 20 experiment data by classical constant temperature acceleration; it was $\lg K = -4.8253 \times (1/T) + 11.349$ ($r = 0.9990$), $K_{25^\circ\text{C}}$ was $1.47088 \times 10^{-5} \text{ h}^{-1}$, $t_{0.9}$ was 7 165.76 h and the activation energy was 92.46 kJ/mol. The regression equation was obtained through 1 fitting with 8 experiment data by multivariate linear model; it was $\ln t = 1.016 \ln(\ln c_0 - \ln c) + 11.026550 \times 1/T - 25.8663$ ($r = 0.9942$), $t_{0.9}$ was 6 794.18 h and the activation energy was 91.73 kJ/mol. The degradation of Chloramphenicol sulfoxide paint was in line with the first-class kinetics reaction. The expiration dates of Chloramphenicol sulfoxide paint predicted by classical constant temperature acceleration and multivariate linear model were 9.8 and 9.3 months, respectively. CONCLUSIONS: The expiration date of chloramphenicol sulfoxide paint is about 9.5 months. Multiple linear model is more convenient for the prediction of expiration date.

KEYWORDS Chloramphenicol sulfoxide paint; Classical constant temperature acceleration; Multivariate linear model; Chloramphenicol; Expiration date

氯霉素亚砷涂剂是《浙江省医疗机构制剂规范》(2005年版)^[1]中收入的一种外用制剂。其处方中的主药氯霉素系高效广谱抗生素,局部用于治疗敏感菌如大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、克雷伯菌属等所致的浅表皮感染^[2];处方的二甲基亚砷除有溶剂作用外还有抗炎杀菌、止痛、促进愈合和药物渗透的作用^[3]。该制剂在临床中广泛用于对氯霉素敏感的细菌所引起的各种化脓性皮肤病,效果显著。

目前,氯霉素亚砷涂剂的有效期在制剂规范中没有明确规定,国内外的文献也未见报道,我院将该制剂的有效期暂定为1年。为了确保该制剂安全有效地使用,笔者采用高效液相色谱法测定氯霉素亚砷涂剂中氯霉素的含量,以经典恒温法和多元线性模型两种方法预测制剂的有效期,同时比较两种

方法的特点,为临床制订该制剂的有效期提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-1500型高效液相色谱仪,包括1580型泵、UV-1575型紫外检测器、7725型六通进样器、Chromtech型色谱工作站(日本Jasco公司);DK-8AXX型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司);GM-0.33 II型隔膜真空泵(天津市腾达过滤器件厂);BS210S型电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

氯霉素亚砷涂剂(温州市人民医院自制,批号:20130801301,规格:2 g:100 ml);氯霉素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130555-200501,纯度:99.5%);二甲基亚砷(西陇化工股份有限公司,批号:1210262,药用级);甘油(南

*药师。研究方向:临床药学。E-mail:877525385@qq.com

昌白云药业有限公司,批号:20121105,药用级);甲醇为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(45:55, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:277 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取氯霉素对照品 2.5 mg,置于 50 ml 量瓶中,加纯化水溶解并稀释至刻度,摇匀即得质量浓度为 50 μg/ml 的对照品贮备液。取对照品贮备液 5 ml,置于 50 ml 量瓶中,加纯化水稀释至刻度,摇匀即得质量浓度为 5 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取氯霉素亚砷涂剂 0.25 ml,置于 50 ml 量瓶中,加纯化水至刻度,摇匀。精密量取 2.5 ml,置于 50 ml 量瓶中,加纯化水稀释至刻度,摇匀即得质量浓度为 5 μg/ml 的供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按氯霉素亚砷涂剂的制备方法制备不含氯霉素的阴性样品,照“2.2.2”项下方法制备成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,分别进样 20 μl,记录色谱。另将氯霉素亚砷涂剂置于 95 °C 恒温水浴 16 h,然后按“2.2.2”项下方法制备成溶液,进样测定,记录色谱。结果表明,氯霉素保留时间为 6.48 min,理论板数按氯霉素计为 2 676,对称性为 1.28,样品中的辅料、加速试验后出现的降解产物均对氯霉素的测定无干扰。色谱图见图 1。

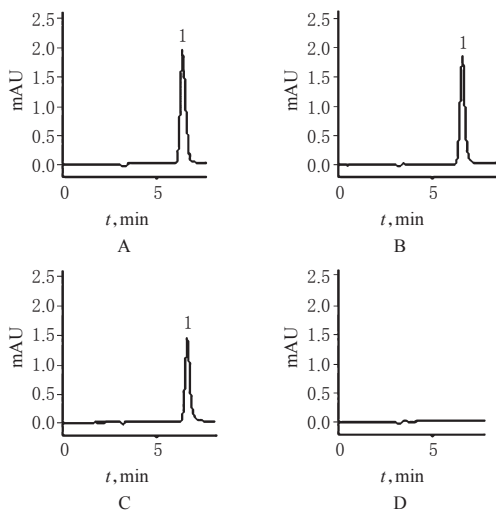


图 1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.95 °C 恒温水浴 16 h 后的供试品;D.阴性对照;1.氯霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference; B. test sample; C. test sample in 95 °C water for 16 h; D. negative control; 1. chloramphenicol

2.4 标准曲线的制备

精密量取对照品贮备液适量,分别用纯化水制备成氯霉素质量浓度为 1.25、2.5、5.0、10.0、15.0 μg/ml 的溶液,进样测定,记录色谱。以峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=2\ 228.40c-486.24$ ($r=$

0.999 4, $n=5$)。结果表明,氯霉素在 1.25~15.0 μg/ml 质量浓度范围内与其峰面积线性关系良好。

2.5 精密性与稳定性试验

精密量取氯霉素对照品溶液,连续进样 6 次,记录峰面积。结果,氯霉素峰面积的 RSD 为 0.41% ($n=6$),表明本方法精密性良好。另取氯霉素对照品溶液,室温放置,分别于 0、4、8、12、24 h 进样测定,记录峰面积。结果,放置 24 h 后氯霉素峰面积的 RSD 为 0.67% ($n=5$),表明对照品溶液 24 h 内稳定。

2.6 回收率试验

精密量取阴性对照溶液 0.5 ml,共 9 份,置于 100 ml 量瓶中,加纯化水稀释至刻度,摇匀。精密量取 2.5 ml,置于 50 ml 量瓶中,分 3 组,每组分别精密加入氯霉素对照品贮备液 4.0、5.0、6.0 ml(相当于氯霉素标示量的 80%、100%、120%),加纯化水稀释至刻度并摇匀,进样测定,记录峰面积,计算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果($n=3$)

加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
200.00	205.20	102.6	101.90	0.89
200.00	204.40	102.2		
200.00	201.80	100.9		
250.00	250.25	100.1	100.30	0.25
250.00	251.50	100.6		
250.00	250.75	100.3		
300.00	300.30	100.1	99.33	0.68
300.00	296.40	98.8		
300.00	297.30	99.1		

2.7 含量测定

将氯霉素亚砷涂剂分成 4 组,每组 5 瓶,轧盖密封,分别置于 75、80、85、95 °C 恒温水浴中。于 0、8、16、20、24 h 各取 1 瓶,冰水浴迅速冷却至室温,精密量取样品 0.25 ml,按“2.2.2”项下方法制备成溶液,进样测定,记录峰面积,计算样品中氯霉素的相对百分含量(c)及其对数值(lgc),结果见表 2。

表 2 不同温度和时间下氯霉素的含量变化($n=5$)

Tab 2 Changes of chloramphenicol content under different temperature and at different time($n=5$)

时间, h	75 °C		80 °C		85 °C		95 °C	
	c, %	lgc	c, %	lgc	c, %	lgc	c, %	lgc
0	100	2	100	2	100	2	100	2
8	97.42	1.988 6	95.70	1.980 9	94.00	1.973 1	87.80	1.943 5
16	95.33	1.979 2	92.10	1.964 3	88.51	1.947 0	75.20	1.876 2
20	94.10	1.973 6	90.40	1.956 2	85.90	1.934 0	70.10	1.845 7
24	92.87	1.967 9	88.20	1.945 5	83.10	1.919 6	66.80	1.824 8

2.8 反应级数的确定

将表 2 在不同温度条件下得到的数据用零级(c-t)、一级(lgc-t)、二级(1/c-t)动力学方程进行拟合,根据 r 来判断降解动力学过程。拟合分析结果见表 3。

表 3 拟合分析结果

方程	r			
	75 °C	80 °C	85 °C	95 °C
零级动力学方程	0.999 3	0.999 0	0.999 6	0.996 3
一级动力学方程	0.999 3	0.999 2	0.999 9	0.998 3
二级动力学方程	0.999 2	0.999 0	0.999 4	0.996 8

由表3结果显示,一级动力学方程的 r 最大,表明氯霉素亚砷涂剂的热力学降解符合一级动力学方程。

2.9 有效期的预测

2.9.1 经典恒温法 根据表3,按一级反应: $\lg c = -(K/2.303)t + \lg c_0$ (式中 t 为取样时间, c_0 为起始药物质量浓度, c 为 t 时间药物质量浓度, K 为速率常数)进行拟合,从斜率可求出各个温度下药物降解速率常数 K 及其对数值($\lg K$),结果见表4。

表4 经典恒温加速法的计算结果

Tab 4 Calculation results of classical constant temperature acceleration

T, K	$1/T, \times 10^{-3}$	回归方程	r	K, h^{-1}	$\lg K$
75+273.2	2.872	$\lg c = 1.9998 - 0.0013t$	0.9994	0.00299	-2.5238
80+273.2	2.831	$\lg c = 1.9996 - 0.0022t$	0.9992	0.00570	-2.2953
85+273.2	2.792	$\lg c = 2.0000 - 0.0033t$	0.9999	0.00760	-2.1192
95+273.2	2.716	$\lg c = 2.0003 - 0.0075t$	0.9996	0.01727	-1.7626

以 $\lg K$ 对 $1/T$ 进行回归,得Arrhenius方程,由此推算出25℃时的药物降解速率常数($K_{25^\circ C}$)及氯霉素的质量浓度下降10%时所需时间即贮存期($t_{0.9} = 0.1054/K$)。将表4中 $\lg K$ 对 $1/T$ 经回归处理后得Arrhenius方程: $\lg K = -4.8253 \times (1/T) + 11.349$ ($r = 0.9990$)。由Arrhenius方程求得 $K_{25^\circ C} = 1.47088 \times 10^{-5} h^{-1}$, $t_{0.9} = 0.1054/K = 7165.76 h$ (9.8个月),活化能为92.46 kJ/mol。

2.9.2 多元线性模型^[4] 根据药物降解反应恒温动力学的基本公式和Arrhenius公式得多元线性模型的基本公式 $\ln t = \ln[f(c_0) - f(c)] + E/(RT) - \ln A$ [式中, t 为取样时间, c_0 为起始药物质量浓度, c 为 t 时间药物质量浓度, $f(c)$ 为质量浓度函数, E 为活化能, R 为摩尔气体常数, T 为反应温度, A 为频率因子]。一级动力学过程中 $f(c) = \ln c$,则公式可变形为 $\ln t = \ln(\ln c_0 - \ln c) + E/R \times 1/T - \ln A$ 。在表2中各温度条件下,任选2个数据进行相应的数学变化,结果见表5。

表5 多元线性模型的计算结果

Tab 5 Calculation results of multivariate linear model

$T, ^\circ C$	t, h	$\ln t$	$\ln(\ln c_0 - \ln c)$	$1/T$
75	16	2.7726	-3.0446	0.002872
	24	3.1781	-2.6041	0.002872
80	8	2.0794	-3.1934	0.002831
	20	2.9957	-2.4100	0.002831
85	8	2.0794	-2.9743	0.002792
	24	3.1781	-1.6874	0.002792
95	8	2.0794	-1.9788	0.002716
	20	2.9957	-1.0333	0.002716

以 $\ln t$ 对 $\ln(\ln c_0 - \ln c)$ 、 $1/T$ 进行多元线性回归,得回归方程: $\ln t = 1.0161 \ln(\ln c_0 - \ln c) + 11.026550 \times 1/T - 25.8663$ ($r = 0.9942$)。以 $c = 0.9c_0$ 代入,由此方程推算出药物在25℃(298.2 K)时 $t_{0.9}$ 为6794.18 h(9.3个月),活化能为91.73 kJ/mol。该法预测的有效期及活化能与经典恒温加速法计算得到的结果基本一致。

3 讨论

笔者参照文献[5-8],分别以0.01%庚烷磺酸钠缓冲溶液-甲醇、乙腈-水-冰醋酸、乙腈-0.11 mol/L磷酸二氢钾、甲醇-水为

流动相,考察了不同流动相的组成和对比对氯霉素峰形和出峰时间的影响。结果发现,以甲醇-水(45:55)作为流动相,配比简单,对色谱柱损伤小,而且氯霉素色谱峰系统适用性指标也较好,测定结果不受辅料和降解产物的干扰。这提示本法作为氯霉素亚砷涂剂中氯霉素含量的测定方法,专属性强,结果准确可靠。

近年来,药学领域内逐渐形成了几种较为成熟的预测药物有效期的方法如经典恒温法、 $t_{0.9}$ 法、威布尔(Weibull)分布拟合法、初匀速法、台阶变温法、多元线性模型法等^[9]。本研究采用经典恒温法和多元线性模型预测氯霉素亚砷涂剂有效期,结果显示,4个温度下的 $\lg c$ 对 t 回归线性关系良好,氯霉素降解符合一级动力学。两种方法不仅计算得出的活化能均在热反应适用的活化能(42~126 kJ/mol)范围内,而且预测的有效期基本一致。研究显示,氯霉素的水解速度受贮存温度影响较为明显,氯霉素滴眼液在25℃下有效期为4.7个月^[9],与本研究预测的氯霉素亚砷涂剂有效期为9个多月相比,两者差异较大。其根本原因可能是氯霉素亚砷涂剂添加了甘油,延长了氯霉素的水解作用,从而延长了有效期。

经典恒温法预测有效期需要在若干个较高温度下测定各温度下的速率常数,方法虽然准确,但工作量大,需要20~25个数据并经4~5次拟合才能完成。多元线性模型则仅需取每个温度下的1~2个数据,不同温度下总共取7~8个数据就可得到一个多元方程,明显减少了取样点的数量。在反应级数已知的情况下,相对于经典恒温法,多元线性模型更为经济、简单、适用。

参考文献

- [1] 浙江省食品药品监督管理局.浙江省医疗机构制剂规范:2005版[S].2005:335.
- [2] 佟桂珍.复方氯霉素溶液中氯霉素的质量控制[J].中外医药,2012,31(21):122.
- [3] 张强,武凤兰.药剂学[M].北京:北京大学医学出版社,2005:22.
- [4] 汝玲,韩方璇,黄春新.经典恒温加速法和多元线性模型预测头孢米诺钠水溶液的稳定性[J].中国药房,2007,18(19):1500.
- [5] 刘照振,王俊秋,李文东.HPLC法测定复方氯霉素洗剂和氯柳酞中的氯霉素的含量[J].中国药房,2014,25(20):1910.
- [6] 倪晓霞,陈巧秀,郑绍忠,等.氯霉素滴眼液不同贮存条件下稳定性考察[J].中国药师,2011,14(4):579.
- [7] 涂初,蒋藤川.HPLC法测定氯霉素搽剂中氯霉素的含量[J].中国药师,2010,13(12):1832.
- [8] 肖森生,叶立红,姜华军,等.两种不同方法测定氯霉素二甲亚砷溶液中氯霉素含量[J].中国药业,2010,19(1):23.
- [9] 庞貽慧,鲁纯素.药物稳定性预测方法[M].北京:人民卫生出版社,1984:35.

(收稿日期:2014-09-17 修回日期:2014-11-21)

(编辑:邹丽娟)