

经典恒温加速试验法预测健脑益智胶囊的有效期

柳小莉 赵晓平 范小璇 侯 文 郭东艳

摘 要 **目的** 采用经典恒温加速试验预测健脑益智胶囊的有效期。**方法** 以葛根素含量为评价指标,根据 Arrhenius 指数定律,得出室温(25℃)时的反应速度常数及有效期。**结果** 健脑益智胶囊室温(25℃)时的反应速度常数 $K_{25^{\circ}\text{C}} = 9.32 \times 10^{-6}/\text{h}$,有效期 $t_{0.9} = 1.29\text{a}$ 。**结论** 经典恒温加速试验法预测健脑益智胶囊的有效期偏短,有待于结合长期留样法结果进一步确定健脑益智胶囊的有效期。

关键词 健脑益智胶囊 经典恒温试验法 葛根素 高效液相层析法 稳定性

[中图分类号] R91 [文献标识码] A

Forecast the Validity Duration of Jiannao Yizhi Capsules Using Classic Constant Temperature Accelerated Test Method. Liu Xiaoli, Zhao Xiaoping, Fan Xiaoxuan, Hou Wen, Guo Dongyan. The Medicine College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi 712046, China

Abstract **Objective** To forecast the validity duration of Jiannao Yizhi capsules. Classic constant temperature accelerated test method and Arrhenius index law were applied with the content of puerarin as index. **Methods** Taking puerarin in Jiannao Yizhi capsules as the index of stability and according to Arrhenius index law to calculate the reacting speed constant and the effective time at 25℃. **Results** The reacting speed constant of Jiannao Yizhi capsules was $9.32 \times 10^{-6}/\text{h}$ at room temperature(25℃). The validity duration of Jiannao Yizhi capsules was 1.29a. **Conclusion** The validity duration of Jiannao Yizhi capsules was slightly short, waiting for combining the method of long-term keeping sample further to determine.

Key words Jiannao Yizhi capsules; Classic constant temperature accelerated test method; Puerarin; HPLC; Stability

健脑益智胶囊为陕西中医学院附属医院院内制剂,处方由水蛭、葛根、白茅根、郁金等药味组成。具有化痰利水,豁痰开窍的功效,临床上主要用于颅脑损伤后脑组织水肿和微循环障碍引起的各种症状。其中水蛭为方中君药,有效成分为水蛭素,水蛭素遇热不稳定,《中国药典》2010年版一部水蛭项下采用抗凝血酶活性进行定量。因处方中干扰因素较多,不能准确测定其抗凝效价的变化,因而选用臣药葛根中的有效成分葛根素为指标成分^[1,2],采用经典恒温加速试验法及高效液相色谱法对其进行含量测定,预测健脑益智胶囊的有效期。

材料与方法

1. 仪器:Agilent 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Al204 万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);BT25s 十万分之一电子天平(上海天美仪器有限公司);501 型超级恒温水浴锅(上海实验仪器有限公司);KH-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

2. 药材与试剂:健脑益智胶囊(陕西中医学院中药制剂室自制,批号为 20120819);葛根素对照品(中国药品生物制品检定研究院,供含量测定用,批号为 110752-200511);甲醇为层析纯;水为重蒸馏水。

3. 方法:(1)取样:取健脑益智胶囊 150 粒,分成 25 份,将各份样品置具塞试管中密封,分别放于 60、70、80、90、100℃ 超级恒温水浴锅中,按各设定时间取出,立即放入水中冷却,备用。(2)葛根素含量测定方法学考察:层析条件:层析柱为 Thermo BDS C₁₈ (5μm, 4.6 × 250nm),以甲醇-水(25:75)为流动相;检测波长 250nm;流速为 1.0ml/min;柱温为 25℃。(3)对照品溶液的制备:取对照品 0.87mg,精密称定,加 30%乙醇制成每 1ml 含 87μg 的溶液,即得。(4)供试品溶液的制备:取上述的具塞试管中健脑益智胶囊内容物约 1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 30%乙醇 50ml,密塞,称定重量,超声处理 30min,放冷,再称定重量,用 30%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45μm 微孔滤膜滤过,即得。(5)标准曲线的绘制:精密吸取对照品溶液(87μg/ml) 3ml,定容至 10ml 容量瓶中。分别精密吸取 2、4、6、8、10、12μl 注入液相色谱仪,按照优选的层析条件进行测定,以对照品溶液进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归。

结 果

1. 葛根素方法学考察结果:按照优选的色谱条件,以对照品溶液进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,

基金项目:陕西省科技厅基金资助项目(2011KTCL03-02)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医学院药学院(柳小莉、郭东艳);712000 咸阳,陕西中医学院附属医院(赵晓平、范小璇、侯文)

通讯作者:郭东艳,博士,教授,电子信箱:winter180@163.com

进行线性回归,标准曲线见表 1,不同温度和不同时间条件下,葛根素含量测定结果见表 2。以对照品溶液进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,可得回归方程为: $y = 110.87x - 7.12$, $R = 1$,说明葛根素浓度在 $0.0522 \sim 0.3132 \mu\text{g}$ 范围内,峰面积与浓度呈较好的线性关系。

表 1 葛根素对照品标准曲线

体积(μl)	2	4	6	8	10	12
峰面积	216.3	437.3	656.1	876.2	1102.5	1325.3

2. K 值的计算:以不同时间不同条件下葛根素含量的对数 $\lg C$ 对时间 t 作图,得到各温度下的回归方程,符合一级反应方程式 $\lg C = -kt/2.303 + \lg C_0$,可确定葛根素含量随时间变化符合化学动力学一级反应。再由回归方程斜率求出各温度下药物降解反应速度常数 K 值^[3],结果见表 2。

表 2 不同温度和不同时间条件下葛根素含量的测定结果^[3]

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (h)	含量 C (mg/g)	$\lg C$	回归方程
60	0	1.2940	0.1119	$\lg C = -0.0002t + 0.1184$ $R = 0.9803$ $K = 0.4606 \times 10^{-3}/h$
	96	1.2411	0.0938	
	192	1.2180	0.0857	
	288	1.1421	0.0577	
	384	1.0932	0.0386	
	480	1	0	
70	0	1.2940	0.1119	$\lg C = -0.0004t + 0.1167$ $R = 0.9866$ $K = 0.9212 \times 10^{-3}/h$
	48	1.2450	0.0952	
	96	1.1991	0.0788	
	144	1.1624	0.0654	
	192	1.0918	0.0381	
	240	1.0164	0.0071	
80	0	1.2940	0.1119	$\lg C = -0.0007t + 0.0951$ $R = 0.9437$ $K = 1.6121 \times 10^{-3}/h$
	24	1.1480	0.0599	
	48	1.1421	0.0577	
	72	1.0920	0.0382	
	96	1.0698	0.0293	
	120	1.0280	0.0120	
90	0	1.2940	0.1119	$\lg C = -0.0021t + 0.0962$ $R = 0.9537$ $K = 4.8363 \times 10^{-3}/h$
	12	1.1441	0.0584	
	24	1.0690	0.0290	
	36	1.0530	0.0224	
	48	1.0341	0.0145	
	60	0.9190	-0.0367	
100	0	1.2940	0.1119	$\lg C = 0.0068t + 0.1079$ $R = 0.9931$ $K = 15.6604 \times 10^{-3}/h$
	6	1.1291	0.0527	
	12	1.0870	0.0362	
	18	0.9862	-0.0060	
	24	0.8736	-0.0587	
	30	0.8007	-0.0965	

3. 反应活化能的计算:根据各温度下的 K 值得出 $\lg K$,结果见表 3。以 $\lg K$ 对 $1/T$ 作图,进行线性回归,得回归方程: $\lg K = -4669.6 \times 1/T + 10.639$, $r = 0.9929$ 。由 Arrhenius 指数定律: $\lg K = -E/2.303RT + \lg A$ 及直线斜率求出活化能 $E = 89.463 \text{ kJ/mol}$,在 $(41.84 \sim 125.52) \text{ kJ/mol}$ 范围内,说明用经典恒温法预测室温下葛根素的稳定性有实际意义。

表 3 温度与速度常数表

温度($^{\circ}\text{C}$)	$1/T \times 10^{-3}$	$K \times 10^{-3}/h$	$\lg K$
60	3.003	0.4606	-3.3367
70	2.915	0.9212	-3.0356
80	2.833	1.6121	-2.7926
90	2.755	4.8363	-2.3155
100	2.681	15.6604	-1.8052

4. 室温下有效期 $t_{0.9}$ 的计算:将回归方程 $\lg K = -4669.6 \times 1/T + 10.639$ ($r = 0.9929$),外推可得室温 25°C ($T = 273 + 25$) 时的 $K_{25^{\circ}\text{C}} = 9.32 \times 10^{-6}/h$,从而可计算出在室温 25°C 下有效成分减少 10% 所需的时间,即有效期 $t_{0.9}, t_{0.9} = 0.1054/K_{25^{\circ}\text{C}} = 11309h = 1.29a$ (年)。

讨 论

采用经典恒温加速试验法预测健脑益智胶囊的有效期,设置了试验的温度和时间,试验过程中可观察到,随着温度升高,时间延长样品颜色加深,其中 100°C 下样品的颜色最深。经高效液相层析法测得的含量随着温度升高,时间延长,葛根素含量逐渐降低。经试验,在密闭条件下,预测健脑益智胶囊有效期为 1.29 年,有效期时间偏短。关于健脑益智胶囊的有效期还有待于结合长期留样观察法结果进一步进行确定。

参考文献

1 潘平康,张超,吴海琴,等. 葛根素对大鼠脑缺血海马中 EPO 和 STAT-5 表达的影响[J]. 卒中与神经疾病,2013,20(3):137-140

2 梅志刚,王明智,刘晓洁,等. 葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、NF- κB p65 及 STAT3 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2013,28(1):113-117

3 洪清,袁曦,王友芳,等. 多元线性模型和经典恒温法预测天宁滴丸有效期[J]. 中国现代应用药学,2013,30(4):416-419

(收稿日期:2013-10-22)

(修回日期:2013-11-14)