

均匀设计法预测薄层色谱最佳展开剂配比*

南京中医学院中药系 杨卫贤

提要 本文应用均匀设计预测薄层色谱最佳展开剂配比,以氯仿—甲醇—氨水(0.9:5.8:1.5)为展开剂,采用双波长薄层扫描法测定了九分散和疏风活络丸中土的宁和马钱子碱的含量。平均回收率为97.2%,Cv%为1.2%(n=6)。

关键词 均匀设计 薄层扫描法 九分散 疏风活络丸

薄层扫描法在中成药分析中得到了广泛的应用,在进行薄层扫描测定时,如何选择合理的展开剂配比,使得样品组分能得到较好的分离,这是一个值得研究的问题,国内外已有不少文献报道^[1~4]。本文应用均匀设计预测薄层色谱最佳展开剂配比,用薄层扫描法测定了九分散和疏风活络丸中土的宁和马钱子碱的含量,获得了满意的结果。

基本原理

均匀设计^[5]是从全面试验中科学地选出部分点进行试验,而仍能得到基本上反映全面情况的试验结果。由于它不再考虑数据的“整齐可比”性,而是让试验点在试验范围内充分地“均匀分散”,这样其试验次数比正交设计要少,因而是一种值得采用的试验设计方法。

不过,均匀设计试验的分析不如正交试验方便,一般要用多项式回归分析^[6]的方法。

根据实验的具体要求,确定进行实验的因素和每个因素所取的水平数,然后选择相应的均匀设计表^[7]。按均匀设计表安排试验,得到n个试验结果,再用多项式函数拟合实验数据,得到回归方程。

这样,求最佳实验条件的问题,就变成求多元函数的极值问题。求解多元函数极值的方法较多^[8]。作者采用共轭梯度法,全部计算在PC-1500A微机上完成。

实验内容

一、仪器、药品及试剂

1. 岛津CS-930型双波长薄层扫描仪
2. 夏普PC-1500A袖珍微机
3. 硅胶GF₂₅₄薄层板(青岛海洋化工厂)
4. 定量毛细管(2 μ l、3 μ l)
5. 标准品:土的宁(E. Merck 进口),马钱子碱(Light 进口)。
6. 样品:疏风活络丸(3个批号),九分散(2个批号)。

二、最佳展开剂配比的选择

1. 标准液配制:精密称取土的宁、马钱子碱标准品适量,用甲醇溶解,制成浓度为0.40 mg/ml 标准液。

2. 试验设计:以氯仿—甲醇—氨水(4 mol/L)为薄层色谱展开系统。目的是选择最佳展开剂配比,使土的宁和马钱子碱分离最好(Rs最大)。安排三因素九水平的均匀设计并根据计算要求适当增加三个试验点,试验安排及测定结果见表1。

* 江苏省教委自然科学基金资助

表1 均匀设计实验结果

试验号	氯仿 (X ₁)	甲醇 (X ₂)	氨水 (X ₃)	R _s
1	2	6.5	3.5	1.80
2	2.5	8.5	2.5	1.92
3	3	6	1.5	1.68
4	3.5	8	0.5	0.60
5	4	5.5	4	0.72
6	4.5	7.5	3	0.36
7	5	5	2	0.48
8	5.5	7	1	1.32
9	6	9	4.5	0.24
10	2	9	2	2.16
11	2	6	1	1.92
12	2	6	1.5	2.04

3. 回归方程的建立：用逐步回归法建立了以下回归方程：

$$\hat{y} = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_1^2 + a_5X_2^2 + a_6X_3^2$$

其回归系数及方差分析结果如下：

$a_0 = 2.2991$
 $a_2 = 0.5934$
 $a_4 = 0.1810$
 $a_6 = -0.1240$
 $S = 0.4057$
 $R = 0.9282$

$a_1 = -1.6972$
 $a_3 = 0.4952$
 $a_5 = -0.04186$
 $U = 5.1228$
 $Q = 0.8232$
 $F = 5.186$

4. 最佳展开剂配比预测：建立回归方程以后，以均匀设计表中最好的实验条件为初值，用共轭梯度法寻找函数的极值，结合实验的具体情况，确定薄层色谱最佳展开剂配比(表2)。

表2 最佳展开剂配比预测

	X ₁	X ₂	X ₃	预测R _s	实测R _s
初值	2	9	2	2.07	2.16
第一次预测	1.8	6	1.1	2.28	2.16
第二次预测	1.5	5.9	1.2	2.62	2.40
第三次预测	0.9	5.8	1.5	3.42	3.24

三、样品中生物碱的含量测定

1. 样品液制备：取样品适量(疏风活络

丸剥去蜡壳，剪碎)，80℃干燥6小时，精密称重(疏风活络丸约3g，九分散约2g)，置具塞锥形瓶中，加乙醇30ml，浓H₂SO₄ 0.1ml，密塞，摇匀，放置过夜，过滤，滤液置分液漏斗中，加水稀释，并用浓氨水碱化(pH约10)，再用氯仿萃取四次(每次10ml)，合并氯仿萃取液，置水浴上蒸干，残渣用少量氯仿溶解并定容至2ml，供点样用。

2. 标准曲线测定：精密吸取土的宁、马钱子碱标准液2、3、4、5、6μl，在薄层板上点样，用氯仿—甲醇—氨水(0.9:5.8:1.5)为展开剂，展开15cm，取出挥干溶剂，在薄层扫描仪上进行测定，测定波长λ_s = 254nm，参比波长λ_R = 325nm，斑点面积积分值A与样品量C之间有较好的线性关系，回归方程为：

$A = 579.41 + 9541.83 \times C$
(r = 0.995)

$A = -963.23 + 8138.63 \times C$
(r = 0.993)

3. 样品测定：精密吸取样品液适量(疏风活络丸4μl，九分散2μl)，在薄层板上点样，按“标准曲线测定”项下方法展开，扫描测定，根据回归方程计算含量，结果见表3。

表3 样品测定结果(四次平均值)

样品批号	土的宁		马钱子碱	
	含量(%)	CV(%)	含量(%)	CV(%)
九分散	8504503	0.117	2.8	0.087
	8602504	0.054	3.0	0.060
疏风活络丸	880209	0.144	2.2	0.086
	841121	0.057	2.9	0.056
	850514	0.027	2.7	0.026

四、回收率试验

取样品适量，精密称定，加入一定量标准品，置具塞锥形瓶中，按“样品测定”项下

方法进行提取、展开、扫描测定，回收率结果见表4。

表4 回收率试验结果

结 果 样 品	组 分	士 的 宁					马 钱 子 碱				
		回 收 率 (%)			$\bar{x}(\%)$	CV%	回 收 率 (%)			$\bar{x}(\%)$	CV(%)
九 分 散		98.2	97.5	96.3	97.2	1.0	95.6	96.3	98.1	97.3	1.3
		95.8	97.6	97.9			97.2	97.6	99.0		
疏风活络丸		96.2	97.4	96.9	97.2	1.1	95.4	96.1	97.4	97.2	1.4
		98.3	95.9	98.5			99.0	98.5	96.5		

讨 论

1. 作者用均匀设计安排试验得到的实验结果用多项式回归方程拟合，方差分析结果 $F = 5.186 > F_{(4,95)}^{0.05}$ 4.95,在 $\alpha = 0.05$ 水平显著，相关系数 $R = 0.9282$ 。用最优化方法寻找最佳展开剂配比，不仅效率较高，而且结果也较可靠。

2. 采用酸性醇溶液冷浸提取,碱化后再用氯仿萃取制备样品液,方法较简便;应用双波长薄层扫描法测定，士的宁和马钱子碱在 $0.8 \sim 2.4 \mu\text{g}/\text{斑点}$ 范围内线性关系良好，平均回收率为97.2%，变异系数(Cv)为1.2% ($n = 6$)。

致谢：江苏淮阴中药厂徐建春同志提供疏风活络丸样品，谨致谢意。

参 考 文 献

[1] Sabate L. G. et al. J HRC de CC 1984, 7:104
[2] Srecko T. et al. Anal Chem 1974, 46:988
[3] 李荣士等：药物分析杂志 1986, 6(5):301
[4] 焦庆才等：药学报 1988, 23(7):521
[5] 方开泰：应用数学学报 1980, 3(4):363
[6] 陈久宇等编著：观测数据的处理方法,上海交通大学出版社, 1987
[7] 方开泰：概率统计通讯 1978, (1):56
[8] 范鸣玉等编：最优化技术基础,清华大学出版社 (北京), 1982

Selection of Optimal Mobile Phase Composition
for TLC Analysis by Uniform Design

Yang Wei-xian

(Nanjing College of Traditional Chinese Medicine)

Abstract

The simple and specific method — uniform design, was described for selection of optimal composition of the solvent system used in TLC analysis of Shufen Ghuoluo Wan and Jiufen San A method for the TLC-densitometric determination of strychnine and brucine has been established. The sample solutions and those of the mixed authentic alkaloids were spotted on a basic silica and got GF₂₅₄ plate and was developed by chloroform-methanol-ammonia spiris (0.9:5.8:1.5). The spots were scanned with a Shimadzu Dual-wavelength TLC Scanner CS-930 at $w_1 = 254 \text{ nm}$ and $w_2 = 325 \text{ nm}$ by reflection mode and zig-zag scanning. Satisfactory results were obtained

Key words Uniform Design TLC Scanning