

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102384907 B

(45) 授权公告日 2013.04.03

(21) 申请号 201110230297.7

(22) 申请日 2011.08.12

(73) 专利权人 河南科技大学

地址 471039 河南省洛阳市涧西区西苑路
48号

(72) 发明人 樊金玲 张麦茹 朱文学 李欣
唐浩国

(74) 专利代理机构 洛阳市凯旋专利事务所
41112

代理人 符继超

(51) Int. Cl.

G01N 21/78(2006.01)

(56) 对比文件

樊金玲等. 香草醛 / 硫酸比色法测定两种原
花色素含量的比较. 《食品科学》. 2007, 第 28 卷
(第 9 期), 467-472.

骆从艳等. PR-HPLC 测定光果甘草中光甘草

定的含量. 《农垦医学》. 2009, 第 31 卷 (第 4
期), 311-313.

徐岩等. 响应面法优化超声提取光果甘草中
光果甘草定的工艺研究. 《食品科技》. 2009, 第
34 卷 (第 12 期), 235-239.

闵杰等. PR-HPLC 测定不同产地光果甘草废
渣中光甘草定含量. 《中国现代应用药学》. 2010,
第 27 卷 (第 7 期), 637-640.

审查员 佟晓惠

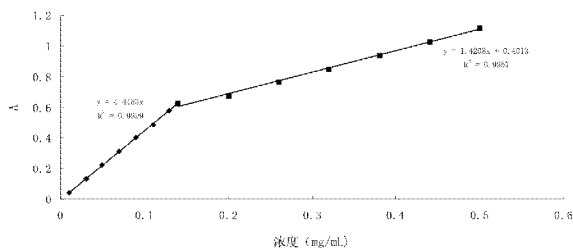
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

香草醛 - 硫酸比色法测定光甘草定含量的方
法

(57) 摘要

一种香草醛 - 硫酸比色法测定光甘草定含量的
方法, 显色液吸光度值信息的采集过程包括: 配
制浓度为 20mg/mL 的香草醛甲醇溶液、配制体
积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液、配制浓
度为 0.5mg/mL 的光甘草定标准溶液、配制浓度
范围在 0.01 ~ 0.5mg/mL 的光甘草定标准检测
溶液和采集吸光度值, 显色液在室温 60min 内
稳定可靠, 这为采集所述显色液的吸光度值信
息提供了保证, 最后建立线性回归方程。经回收
率实验和重现性实验证明: 本发明的方法分析
稳定, 重现性符合要求, 证明本发明的方法是
完全可靠的, 所述线性回归方程为以后待测光
甘草定含量的测定提供了定量标准, 可以获得
与高效液相色谱相同的检测结果和精度。



1. 一种香草醛 - 硫酸比色法测定光甘草定含量的方法, 该方法主要涉及到: 光甘草定的标准品纯度 HPLC $\geq 98\%$, 无水甲醇, 质量百分比浓度是 98% 的硫酸, 香草醛, 恒温水浴锅, 比色皿, 紫外可见分光光度计; 该方法通过 B 环具有间苯二酚结构且 C 环 C₂、C₃ 是单键的光甘草定与香草醛试剂发生反应并在质量百分比浓度是 98% 的硫酸酸性条件下使反应液显色, 再利用紫外可见分光光度计测定显色液在其最大吸收波长 534nm 下的吸光度值, 从而完成显色液吸光度值信息的采集过程: 在所述酸性条件下, 显色液的颜色深浅与光甘草定的含量呈显著线性正相关关系, 符合朗伯 - 比尔定律, 从而为光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程建立奠定了基础, 所述线性回归方程为以后待测样品中光甘草定含量的测定提供了定量标准; 其特征是:

所述显色液吸光度值信息的采集过程如下:

①配制浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液

用烧杯称取 2.0g 的香草醛, 向烧杯中加入少量无水甲醇以溶解香草醛, 将溶解后的香草醛甲醇溶液转移到 100 mL 的第一容量瓶中, 再用少量无水甲醇润洗烧杯 2-3 次, 并将润洗后的香草醛甲醇溶液也转移到第一容量瓶中, 再向第一容量瓶中加入无水甲醇溶液至 100 mL 刻度为止, 摇匀后得到浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液;

②配制体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液

用移液管准确量取 30 mL 质量百分比浓度是 98% 的硫酸并置于 100 mL 的第二容量瓶中, 再向第二容量瓶中加入 70 mL 的无水甲醇, 摇匀后得到体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液;

③配制浓度为 0.5 mg/mL 的光甘草定标准溶液

用烧杯称取 12.5 mg 光甘草定的标准品, 向烧杯中加入少量无水甲醇以溶解光甘草定的标准品, 将溶解后光甘草定的标准品甲醇溶液置于 25mL 的第三容量瓶中, 再用少量无水甲醇润洗烧杯 2-3 次, 并将润洗后光甘草定的标准品甲醇溶液也转移到第三容量瓶中, 再向第三容量瓶中加入无水甲醇溶液至 25 mL 刻度为止, 摇匀后得到浓度为 0.5 mg/mL 的光甘草定标准溶液;

④配制一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液

分别吸取③中光甘草定标准溶液一十四份, 所述一十四份 0.5 mg/mL 光甘草定标准溶液的吸取量依次为 0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.7 mL、0.9 mL、1.1 mL、1.3 mL、1.4 mL、2.0 mL、2.6 mL、3.2 mL、3.8 mL、4.4 mL 和 5.0 mL, 并分别置于一十四个 5 mL 容量瓶中, 再向一十四个 5 mL 容量瓶中依次加入无水甲醇至 5 mL 刻度为止, 摇匀后得到一十四份浓度依次为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL、0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液, 或简称为一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液;

⑤采集吸光度值

从上述④中得到的一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液中各吸取 0.5 mL 并分别加入到一十四个 10 mL 的具塞试管中, 然后对所述一十四个 10 mL 的具塞试管分别加入 2.5 mL 上述①中配制的浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液和 2.5 mL 上述②中配制的体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液, 然后对所述一十四个 10 mL 的

具塞试管进行封盖并摇晃混匀后置于 20 °C 水浴中保温 20 min 后取出, 每个具塞试管得到 5.5 mL 的澄清显色液, 共得到一十四份所述显色液; 从每个具塞试管中提取小于 1 / 3 的所述显色液去润洗比色皿, 利用紫外可见分光光度计采集所述显色液的吸光度值信息, 这样在使用同一比色皿情况下得到一十四份所述显色液的一十四个不同数值的吸光度值信息, 这一十四个不同数值的吸光度值信息称为一组, 在相同条件下共做三组平行试验以获取三组吸光度值信息; 将三组中相同浓度所述显色液所采集的三个吸光度值进行算术平均, 即得到三组相同浓度所述显色液的平均吸光度值, 按此方式能够得到三组中其它浓度所述显色溶液的平均吸光度值, 共得到一十四个平均吸光度值, 所述一十四个平均吸光度值与上述④中得到的一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液相对应;

所述光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程建立过程如下:

⑥ 以上述④中所述一十四份浓度依次为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL、0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液浓度为 x 轴, 以上述⑤中所述一十四个平均吸光度值为 y 轴建立光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程, 通过 EXECL 软件的计算所述线性回归方程由 $y=4.4483x$ 和 $y=1.4208x+0.4013$ 表示, 其中 $y=4.4483x$ 是光甘草定标准检测溶液在其浓度为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL 和 0.14 mg/mL 时的线性回归方程, 线性浓度范围: (0.01- 0.14) mg/mL, 相关系数 $R^2=0.9999$; $y=1.4208x+0.4013$ 是光甘草定标准检测溶液在其浓度为 0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 时的线性回归方程, 线性浓度范围: (0.14- 0.5) mg/mL, 相关系数 $R^2=0.9957$; 可以看出: $x=0.14$ mg/mL 是 $y=4.4483x$ 和 $y=1.4208x+0.4013$ 的分界拐点, 在所述分界拐点时两个线性曲线具有不同斜率。

香草醛 - 硫酸比色法测定光甘草定含量的方法

[0001] 技术领域

[0002] 本发明属于植物含量测定技术领域,尤其涉及到一种香草醛 - 硫酸比色法测定光甘草定含量的方法。

背景技术

[0003] 光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)中所特含的光甘草定(*Glabridin*)属于异黄酮类,光甘草定具有多种多样的药物活性而备受关注。光甘草定的分子式为 $C_{20}H_{20}O_4$, 分子量为 324.37。

[0004] 有资料表明,光甘草定可用来作美白祛斑化妆品中的添加剂,通过抑制酪氨酸酶和多巴色素互变酶 TRP-2 的活性,阻碍 5,6-二羟基吲哚 DHI 的聚合来阻止黑色素的形成,从而达到美白皮肤的效果。

[0005] 还有资料表明,光甘草定具有以下特性:

[0006] (1) 具有较强的抗氧化活性,清除氧自由基能力和维生素 E 相近;

[0007] (2) 具有抗菌、抗胞毒、抗乳腺癌细胞增殖作用,以及明显的降血压、降血脂和较强的保护神经作用,其应用前景十分广阔。

[0008] 目前关于分析光甘草定含量的方式采用的是高效液相色谱法,高效液相色谱法所使用的高效液相色谱仪价格昂贵,检测费用高,检测时间较长,对操作人员的要求也很高。

[0009] 虽然比色法是目前测定物质含量较为常用的定量分析方法,然而在香草醛 - 硫酸条件下使用比色法测定光甘草定含量的方法至今未见报道。

发明内容

[0010] 为解决上述问题,本发明提供了一种香草醛 - 硫酸比色法测定光甘草定含量的方法,该方法分为两大步骤,第一步骤是显色液吸光度值信息的采集过程,第二步骤是光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程建立过程,该方法所需要时间比高效液相色谱法大大缩短,并且显色液在室温 60min 内稳定可靠,非常适合大量待测光甘草定含量的集中检测。

[0011] 为实现上述发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0012] 一种香草醛 - 硫酸比色法测定光甘草定含量的方法,该方法主要涉及到:光甘草定的标准品纯度 HPLC $\geq 98\%$,无水甲醇,质量百分比浓度是 98% 的硫酸,香草醛,恒温水浴锅,比色皿,紫外可见分光光度计;该方法通过 B 环具有间苯二酚结构且 C 环 C_2 、 C_3 是单键的光甘草定与香草醛试剂发生反应并在质量百分比浓度是 98% 的硫酸酸性条件下使反应液显色,再利用紫外可见分光光度计测定显色液在其最大吸收波长 534nm 下的吸光度值,从而完成显色液吸光度值信息的采集过程:在所述酸性条件下,显色液的颜色深浅与光甘草定的含量呈显著线性正相关关系,符合朗伯 - 比尔定律,从而为光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程建立奠定了基础,所述线性回归方程为以后待测样品中光甘草定含量的测定提供了定量标准。

[0013] 所述显色液吸光度值信息的采集过程如下：

[0014] ①配制浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液

[0015] 用烧杯称取 2.0g 的香草醛，向烧杯中加入少量无水甲醇以溶解香草醛，将溶解后的香草醛甲醇溶液转移到 100 mL 的第一容量瓶中，再用少量无水甲醇润洗烧杯 2-3 次，并将润洗后的香草醛甲醇溶液也转移到第一容量瓶中，再向第一容量瓶中加入无水甲醇溶液至 100 mL 刻度为止，摇匀后得到浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液。

[0016] ②配制体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液

[0017] 用移液管准确量取 30 mL 质量百分比浓度是 98% 的硫酸并置于 100 mL 的第二容量瓶中，再向第二容量瓶中加入 70 mL 的无水甲醇，摇匀后得到体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液。

[0018] ③配制浓度为 0.5 mg/mL 的光甘草定标准溶液

[0019] 用烧杯称取 12.5 mg 光甘草定的标准品，向烧杯中加入少量无水甲醇以溶解光甘草定的标准品，将溶解后光甘草定的标准品甲醇溶液置于 25mL 的第三容量瓶中，再用少量无水甲醇润洗烧杯 2-3 次，并将润洗后光甘草定的标准品甲醇溶液也转移到第三容量瓶中，再向第三容量瓶中加入无水甲醇溶液至 25 mL 刻度为止，摇匀后得到浓度为 0.5 mg/mL 的光甘草定标准溶液。

[0020] ④配制一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液

[0021] 分别吸取③中光甘草定标准溶液一十四份，所述一十四份 0.5 mg/mL 光甘草定标准溶液的吸取量依次为 0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.7 mL、0.9 mL、1.1 mL、1.3 mL、1.4 mL、2.0 mL、2.6 mL、3.2 mL、3.8 mL、4.4 mL 和 5.0 mL，并分别置于一十四个 5 mL 容量瓶中，再向一十四个 5 mL 容量瓶中依次加入无水甲醇至 5 mL 刻度为止，摇匀后得到一十四份浓度依次为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL、0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液，或简称为一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液。

[0022] ⑤采集吸光度值

[0023] 从上述④中得到的一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液中各吸取 0.5 mL 并分别加入到一十四个 10 mL 的具塞试管中，然后对所述一十四个 10 mL 的具塞试管分别加入 2.5 mL 上述①中配制的浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液和 2.5 mL 上述②中配制的体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液，然后对所述一十四个 10 mL 的具塞试管进行封盖并摇晃混匀后置于 20 °C 水浴中保温 20 min 后取出，每个具塞试管得到 5.5 mL 的澄清显色液，共得到一十四份所述显色液；从每个具塞试管中提取小于 1 / 3 的所述显色液（即提取小于 5.5 / 3mL 的所述显色液）去润洗比色皿，利用紫外可见分光光度计采集所述显色液的吸光度值信息，这样在使用同一比色皿情况下得到一十四份所述显色液的一十四个不同数值的吸光度值信息，这一十四个不同数值的吸光度值信息称为一组，在相同条件下共做三组平行试验以获取三组吸光度值信息；将三组中相同浓度所述显色液所采集的三个吸光度值进行算术平均，即得到三组相同浓度所述显色液的平均吸光度值，按此方式能够得到三组中其它浓度所述显色溶液的平均吸光度值，共得到一十四个平均吸光度值，所述一十四个平均吸光度值与上述④中得到的一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/

mL 的光甘草定标准检测溶液相对应。

[0024] 所述光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程建立过程如下：

[0025] ⑥以上述④中所述一十四份浓度依次为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL、0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液浓度为 x 轴，以上述⑤中所述一十四个平均吸光度值为 y 轴建立光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程，通过 EXECL 软件的计算所述线性回归方程由 $y=4.4483x$ 和 $y=1.4208x+0.4013$ 表示，其中 $y=4.4483x$ 是光甘草定标准检测溶液在其浓度为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL 和 0.14 mg/mL 时的线性回归方程，线性浓度范围： $(0.01-0.14)$ mg/mL，相关系数 $R^2=0.9999$ ； $y=1.4208x+0.4013$ 是光甘草定标准检测溶液在其浓度为 0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 时的线性回归方程，线性浓度范围： $(0.14-0.5)$ mg/mL，相关系数 $R^2=0.9957$ ；可以看出： $x=0.14$ mg/mL 是 $y=4.4483x$ 和 $y=1.4208x+0.4013$ 的分界拐点，在所述分界拐点时两个线性曲线具有不同斜率。

[0026] 由于采用如上所述的技术方案，本发明具有如下优越性：

[0027] 1、本发明相对高效液相色谱法而言同样具有结果准确、精密度高等优点，代替了贵重的高效液相色谱仪，使得检测成本显著降低。

[0028] 2、本发明基于 B 环具有间苯二酚结构且 C 环 C_2 、 C_3 是单键的光甘草定与香草醛试剂发生反应并在酸性条件下生成深浅不同的红色络合物的显色溶液，显色溶液在 534nm 波长下具有最大光吸收率，利用紫外可见分光光度计采集测定显色溶液的吸光度值，符合朗伯 - 比尔定律，在此基础上建立光甘草定含量 - 吸光度值的线性回归方程。

[0029] 3、本发明的方法操作简便、快速，完成全部检测操作过程只需不到一小时，检测时间大大缩短，且显色液在室温 60min 内稳定可靠，从而非常适合对大量待测光甘草定含量的集中检测，尤其适合于工业提取和精制光甘草定过程中各生产阶段的动态检测。

附图说明

[0030] 图 1 是光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值标准曲线。

具体实施方式

[0031] 香草醛又称香兰素 (*Vanillin*)。有资料报道，香草醛是中药材定性鉴别和定量分析常用的显色剂，这一机理是基于：C 环 C_2 、 C_3 之间是单键且具有间苯二酚或间苯三酚 A- 环结构的黄酮类化合物，能与香草醛试剂发生反应生成红色络合物。

[0032] 光甘草定的 B 环具有间苯二酚结构且 C 环中 C_2 、 C_3 是单键，因而光甘草定与香草醛在酸性条件下也能显色生成红色络合物，这为本发明提供了基础条件。虽然基础条件成立，但显色反应的灵敏度与反应体系中酸的浓度相关，酸浓度低则水分大其灵敏度就差。经过单因素试验，本发明选择了质量百分比浓度是 98% 的浓硫酸作为反应体系的酸性条件，大大提高了显色反应的灵敏度及稳定性，而质量百分比浓度是 36.6% 的浓盐酸由于所含水分较大造成显色反应的灵敏度大大降低从而不合适用作此反应体系。

[0033] 本发明所用光甘草定的标准品从市场购得，所用光甘草定的标准品纯度

HPLC \geq 98%。

[0034] 本发明是一种香草醛 - 硫酸比色法测定光甘草定含量的方法,该方法通过 B 环具有间苯二酚结构且 C 环 C₂、C₃ 是单键的光甘草定与香草醛试剂发生反应并在质量百分比浓度是 98% 的硫酸酸性条件下使反应液显色,再利用紫外可见分光光度计测定显色液在其最大吸收波长 534nm 下的吸光度值,从而完成显色液吸光度值信息的采集过程:在所述酸性条件下,显色液的颜色深浅与光甘草定的含量呈显著线性正相关关系,符合朗伯 - 比尔定律,从而为光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程建立奠定了基础,所述线性回归方程为以后待测样品中光甘草定含量的测定提供了定量标准。

[0035] 本发明所述显色液吸光度值信息的采集过程如下:

[0036] ①配制浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液

[0037] 用烧杯称取 2.0g 的香草醛,向烧杯中加入少量无水甲醇以溶解香草醛,将溶解后的香草醛甲醇溶液转移到 100 mL 的第一容量瓶中,再用少量无水甲醇润洗烧杯 2-3 次,并将润洗后的香草醛甲醇溶液也转移到第一容量瓶中,再向第一容量瓶中加入无水甲醇溶液至 100 mL 刻度为止,摇匀后得到浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液。

[0038] 注意:①中几次所述少量无水甲醇溶液的加入量不一定相等,但无水甲醇在①中的总加入量必须严格控制在 100 mL。

[0039] ②配制体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液

[0040] 用移液管准确量取 30 mL 质量百分比浓度是 98% 的硫酸并置于 100 mL 的第二容量瓶中,再向第二容量瓶中加入 70 mL 的无水甲醇,摇匀后得到体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液。

[0041] 体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液为显色反应提供酸性环境。

[0042] ③配制浓度为 0.5 mg/mL 的光甘草定标准溶液

[0043] 用烧杯称取 12.5 mg 光甘草定的标准品,向烧杯中加入少量无水甲醇以溶解光甘草定的标准品,将溶解后光甘草定的标准品甲醇溶液置于 25mL 的第三容量瓶中,再用少量无水甲醇润洗烧杯 2-3 次,并将润洗后光甘草定的标准品甲醇溶液也转移到第三容量瓶中,再向第三容量瓶中加入无水甲醇溶液至 25 mL 刻度为止,摇匀后得到浓度为 0.5 mg/mL 的光甘草定标准溶液。

[0044] 注意:③中几次所述少量无水甲醇的加入量不一定相等,但无水甲醇在③中的总加入量必须严格控制在 25 mL。

[0045] ④配制一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液

[0046] 分别吸取③中光甘草定标准溶液一十四份,所述一十四份 0.5 mg/mL 光甘草定标准溶液的吸取量依次为 0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.7 mL、0.9 mL、1.1 mL、1.3 mL、1.4 mL、2.0 mL、2.6 mL、3.2 mL、3.8 mL、4.4 mL 和 5.0 mL,并分别置于一十四个 5 mL 容量瓶中,再向一十四个 5 mL 容量瓶中依次加入无水甲醇至 5 mL 刻度为止,摇匀后得到一十四份浓度依次为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL、0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液,或简称为一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液。

[0047] 上述④中应对一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液

做出不同标记,或是对一十四个 5 mL 容量瓶做出不同标记也可,以防混乱。

[0048] ⑤采集吸光度值

[0049] 从上述④中得到的一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液中各吸取 0.5 mL 并分别加入到一十四个 10 mL 的具塞试管中,然后对所述一十四个 10 mL 的具塞试管分别加入 2.5 mL 上述①中配制的浓度为 20 mg/mL 的香草醛甲醇溶液和 2.5 mL 上述②中配制的体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液,然后对所述一十四个 10 mL 的具塞试管进行封盖并摇晃混匀后置于 20 °C 水浴中保温 20 min 后取出,每个具塞试管得到 5.5 mL 的澄清显色液,共得到一十四份所述显色液;从每个具塞试管中提取小于 1 / 3 的所述显色液去润洗比色皿,利用紫外可见分光光度计采集所述显色液的吸光度值信息,这样在使用同一比色皿情况下得到一十四份所述显色液的一十四个不同数值的吸光度值信息,这一十四个不同数值的吸光度值信息称为一组,在相同条件下共做三组平行试验以获取三组吸光度值信息;将三组中相同浓度所述显色液所采集的三个吸光度值进行算术平均,即得到三组相同浓度所述显色液的平均吸光度值,按此方式能够得到三组中其它浓度所述显色溶液的平均吸光度值,共得到一十四个平均吸光度值,所述一十四个平均吸光度值与上述④中得到的一十四份浓度范围在 0.01 ~ 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液相对应。

[0050] 上述比色皿必须使用同一只,每采集一次吸光度值信息后要快速清洗该比色皿,只有在同一比色皿和同一紫外可见分光光度计下所采集的吸光度值才可能最大限度地减少测量误差。

[0051] 上述紫外可见分光光度计使用的型号是 UV-2800 型,它能够精确测定所述显色溶液的吸光度值。

[0052] 所述显色液在室温 60min 内稳定可靠,这为采集所述显色液的吸光度值信息提供了保证。

[0053] 本发明所述光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程建立过程如下:

[0054] ⑥以上述④中所述一十四份浓度依次为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL、0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的光甘草定标准检测溶液浓度为 x 轴,以上述⑤中所述一十四个平均吸光度值为 y 轴建立光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度值的线性回归方程,通过 EXECL 软件的计算所述线性回归方程由 $y=4.4483x$ 和 $y=1.4208x+0.4013$ 表示,其中 $y=4.4483x$ 是光甘草定标准检测溶液在其浓度为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL、0.09 mg/mL、0.11 mg/mL、0.13 mg/mL 和 0.14 mg/mL 时的线性回归方程,线性浓度范围:(0.01- 0.14)mg/mL,相关系数 $R^2=0.9999$;其中 $y=1.4208x+0.4013$ 是光甘草定标准检测溶液在其浓度为 0.14 mg/mL、0.2 mg/mL、0.26 mg/mL、0.32 mg/mL、0.38 mg/mL、0.44 mg/mL 和 0.5 mg/mL 时的线性回归方程,线性浓度范围:(0.14- 0.5) mg/mL,相关系数 $R^2=0.9957$;可以看出: $x=0.14$ mg/mL 是 $y=4.4483x$ 和 $y=1.4208x+0.4013$ 的分界拐点,在所述分界拐点时两个线性曲线具有不同斜率。

[0055] $y=4.4483x$ 和 $y=1.4208x+0.4013$ 为以后待测样品中光甘草定含量的测定提供了定量标准。

[0056] 图 1 是根据所述线性回归方程所建立的光甘草定标准检测溶液浓度 - 平均吸光度

值标准曲线,图中横坐标即 x 轴为光甘草定标准检测溶液的浓度范围,图中浓度(mg/mL)代表光甘草定标准检测溶液的浓度;图中纵坐标即 y 轴为平均吸光度值的范围,图中 A 代表平均吸光度值。

[0057] 所述线性回归方程的应用实例

[0058] 从光甘草定精制过程中随机抽取其样品 A 和样品 B,将样品 A 按上述③步骤配置成样品 A 待测溶液,然后再利用所述线性回归方程计算样品 A 待测溶液的浓度。

[0059] 将 0.5 mL 的样品 A 待测溶液加入到 10 mL 的具塞试管中,向具塞试管中依次加入 2.5 mL 浓度为 20 mg/mL 香草醛甲醇溶液和 2.5 mL 体积百分比浓度为 30% 的硫酸甲醇溶液,对具塞试管进行封盖并摇晃混匀,然后将具塞试管置于 20 °C 水浴中保温 20 min 后取出,得到样品 A 待测溶液的澄清显色液。

[0060] 从上述具塞试管中提取小于 1 / 3 的所述显色液去润洗比色皿,利用紫外可见分光光度计采集所述显色液的吸光度值信息,在相同条件下共做三组平行试验以获取三组不同数值的吸光度值信息。将三组不同数值的吸光度值进行算术平均,得到样品 A 待测溶液所述显色液的平均吸光度值,将平均吸光度值代入线性回归方程,计算出样品 A 待测溶液中光甘草定的浓度是 0.124 mg/mL。

[0061] 根据上述方式同样可以计算出样品 B 待测溶液中光甘草定的浓度是 0.221 mg/mL。

[0062] 回收率实验

[0063] 1. 回收率实验 1

[0064] 各取 5mL 浓度是 0.124 mg/mL 的样品 A 待测溶液六份并分别置于六个 10 mL 试管中,再向六个 10 mL 试管中依次加入浓度为 0.5 mg/mL 的光甘草定标准溶液 0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL 和 1.0 mL,对六个 10 mL 试管作出六个加入量标记,然后在六个作出标记的试管中分别加入无水甲醇至 10mL 刻度止,充分混匀后得到六份稀释的样品 A 溶液。

[0065] 上述六份样品 A 待测溶液中光甘草定的原含量值均为 $0.124\text{mg/mL} \times 5\text{mL} = 0.62\text{ mg}$,光甘草定标准溶液中光甘草定的加入值分别为 0 mg、0.1 mg、0.2 mg、0.3 mg、0.4 mg 和 0.5 mg。

[0066] 取所述六份稀释的样品 A 溶液各 0.5mL,按上述⑤的步骤并根据所述线性回归方程可以分别计算出所述六份稀释的样品 A 溶液中的光甘草定浓度,并计算出所述六份稀释的样品 A 溶液中的光甘草定的总测定值,总测定值分别为 0.620 mg、0.721 mg、0.819 mg、0.92 mg、1.022 mg 和 1.121 mg。

[0067] 用所述总测定值减去所述原含量值即为光甘草定标准溶液中光甘草定加入量的实测值,所述实测值和加入值的比值即为回收率,用 EXECL 软件求出所述回收率值之间的标准偏差,所述标准偏差和回收率算术平均值的比值就是回收率试验的相对标准偏差。

[0068] 具体结果详见下表:

[0069]

原含量 值 (mg)	加入 值 (mg)	总测 定值 (mg)	回收 率 (%)	回收率算术 平均值	标准偏 差 (%)	相对标准 偏差 (%)
0.62	0.1	0.721	101.0	100.24	0.50	0.50
0.62	0.2	0.819	99.5			
0.62	0.3	0.920	100.0			
0.62	0.4	1.022	100.5			
0.62	0.5	1.121	100.2			

[0070] 2. 回收率试验 2

[0071] 按上述方法可以做出样品 B 待测溶液的回收率试验。具体结果见下表：

[0072]

原含量 值 (mg)	加入值 (mg)	总测定 值 (mg)	回收 率 (%)	回收率算术平 均值	标准偏差 (%)	相对标准偏 差 (%)
1.105	0.1	1.202	99.0	99.80	0.88	0.88
1.105	0.2	1.308	99.0			
1.105	0.3	1.409	101.3			
1.105	0.4	1.502	99.5			
1.105	0.5	1.604	100.2			

[0073] 重现性试验

[0074] 重现性试验 1：

[0075] 各取 0.5mL 浓度是 0.124 mg/mL 的样品 A 待测溶液八份并分别置于八个 10 mL 具塞试管中，按上述⑤的步骤并根据所述线性回归方程可以分别计算出所述八份样品 A 待测溶液中光甘草定浓度的实测值，用 EXECL 软件求得八个实测值之间的标准偏差，所述标准偏差和实测值算术平均值的比值就是重现性试验的相对标准偏差，所述相对标准偏差为 1.72%。

[0076] 重现性试验 2：

[0077] 按上述方法测得八份样品 B 待测溶液中光甘草定浓度的实测值，并最终求得相对标准偏差为 1.24%。

[0078] 上述重现性试验 1 和 2 的具体结果总结见下表：

[0079]

	序号	实测值 (mg/mL)	实测值算术平均值	标准偏差 (%)	相对标准偏差 (%)
重现性试验 1	1	0.125	0.123	0.21	1.72
	2	0.124			
	3	0.123			
	4	0.119			
	5	0.124			
	6	0.126			
	7	0.122			
	8	0.121			
重现性试验 2	1	0.224	0.221	0.27	1.24
	2	0.217			
	3	0.221			
	4	0.224			
	5	0.221			
	6	0.224			
	7	0.217			
	8	0.220			

[0080] 通过具体应用例子及回收率试验和重现性试验表明,随机抽取的待测样品通过本发明方法,按照具体实施步骤,均能准确测定出待测样品中光甘草定的含量。回收率实验和重现性实验的结果说明了本发明的方法分析稳定,重现性符合要求,证明本发明的方法是完全可靠的,所述线性回归方程为以后待测样品中光甘草定含量的测定提供了定量标准。

[0081] 此外为了验证本发明的可靠性,通过高效液相色谱法对本发明的方法进行了验证,最终结果表明:本发明的方法具有准确性,本发明的方法可以获得与高效液相色谱相同的检测结果和精度。

[0082] 最后需要说明的是:

[0083] 1、本发明整个反应过程应处于无水状态;

[0084] 2、本发明操作过程快速简便、结果准确,得到的所述显色溶液在 60min 内稳定可靠;

[0085] 3、线性回归方程是在本发明设定条件下所得,按照本发明的方法进行等同替换均应涵盖在本发明的技术方案之中。

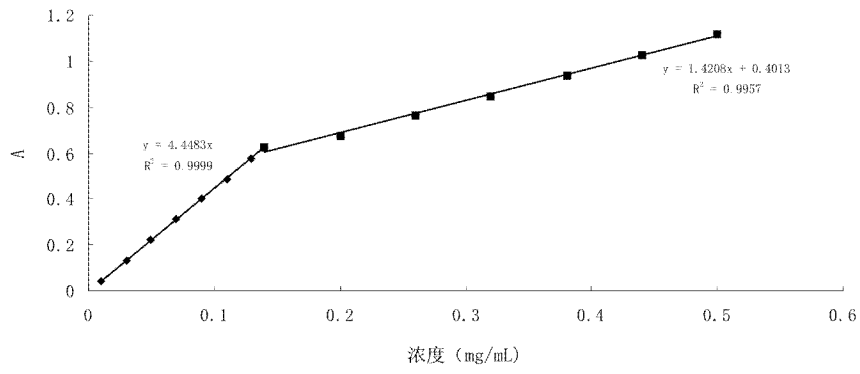


图 1