

(4) 72%硫酸溶液 量取28mL蒸馏水于烧杯中, 缓缓加72mL浓硫酸, 混匀, 放冷。

(5) 黄芪甲苷标准溶液 精确称取10mg黄芪甲苷, 溶于无水乙醇并定容至20mL (0.5mg/mL)。

3. 试验程序

(1) 样品处理 取试样100mL于蒸发皿中, 置沸水浴上蒸发至40mL左右时, 取下放冷转入分液漏斗中, 加入20mL正丁醇提取黄芪甲苷, 混摇2min, 静置分层, 放出下层水相于另一分液漏斗中, 再用20mL正丁醇提取, 去水相合并正丁醇相, 用20mL蒸馏水洗涤正丁醇, 共两次, 将正丁醇转入瓷蒸发皿中在水浴上蒸干, 用10mL无水酒精溶解, 定容至刻度。

(2) 测定 分别吸取黄芪甲苷标准溶液0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mL于10mL比色管中。各加入无水酒精至0.5mL混匀。吸取0.3mL处理好的样液于10mL比色管中, 加0.2mL无水酒精混匀。于标准管和样品管中分别加0.5mL8%香草醛混匀, 缓缓加入5mL72%硫酸, 摇匀。放入60℃水浴中保温20min, 取出摇匀, 再放入冰浴中冷却, 1h内采用分光光度计于波长544nm下, 用1cm比色皿测定吸光度。

4. 计算

$$\text{黄芪甲苷的含量 (mg/L)} = \frac{m \times 10}{0.3 \times 100} \times 1000$$

式中 m ——样品吸光度从标准曲线中查得的质量, mg

5. 注意事项

黄芪甲苷试剂可用中国药品生物制品检定所制备的化学对照品。

第三节 氨基酸

一、方法一 甲醛滴定法

1. 原理

氨基酸具有酸性的一COOH和碱性的一NH₂, 它们互相作用使

氨基成为中性的内盐，加入甲醛溶液时， -NH_2 与甲醛结合，其碱性消失。再用碱来滴定 -COOH ，并用间接的方法测定氨基酸的量。

2. 试剂

(1) 40%中性甲醛 用百里酚酞作指示剂，将甲醛用碱性溶液中和至淡蓝色。

(2) 0.1%百里酚酞乙醇溶液。

(3) 0.1mol/L氢氧化钠标准溶液 按测定大曲酸度方法中配制与标定。

3. 试验程序

吸取试样50mL于250mL具塞锥形瓶中，加入3滴百里酚酞指示剂，用0.1mol/L氢氧化钠标准溶液滴定至淡蓝色。加入中性甲醛20mL，摇匀，静置5min，此时蓝色已经消失，再用0.1mol/L氢氧化钠标准溶液滴定至淡蓝色，记录第二次滴定时消耗的碱液体积 V_1 (mL)。

4. 计算

$$\text{氨基酸态氮的含量 (g/L)} = \frac{c \times V_1 \times 0.014}{V} \times 1000$$

式中 c ——氢氧化钠标准溶液物质的量浓度，mol/L

V_1 ——滴定消耗氢氧化钠标准溶液的体积，mL

V ——试样体积，mL

0.014——氮的毫摩尔质量，g/mmol

5. 说明

(1) 用氢氧化钠标准溶液第一次滴定时用pH计控制滴定，pH7.5后加入中性甲醛，继续用氢氧化钠标准溶液滴定至pH9.2为终点较为正确。

(2) 取相同两份样品溶液，其中一份加入中性红指示剂3滴，用0.1mol/L氢氧化钠标准溶液滴定至琥珀色为终点，另一份加入百里酚酞指示剂3滴和甲醛20mL，静置1h后，用0.1mol/L氢氧化钠标准溶液滴定至淡蓝色为终点。

$$\text{氨基酸态氮的含量 (g/L)} = \frac{c \times (V_1 - V_2) \times 0.014}{V} \times 1000$$

式中 c ——氢氧化钠标准溶液的物质的量浓度, mol/L

V_1 ——用百里酚酞作指示剂时消耗氢氧化钠体积, mL

V_2 ——用中性红作指示剂时消耗氢氧化钠体积, mL

0.014——氮的毫摩尔质量, g/mmol

V ——试样体积, mL

二、方法二 茚三酮比色法

1. 原理

氨基酸在一定的pH条件下与茚三酮发生反应, 生成蓝紫色化合物, 可比色定量。

2. 试剂

(1) 2%茚三酮溶液 称取茚三酮0.5g, 溶于25mL热水中加入40mg氯化亚锡($\text{SnCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$)拌匀作防腐剂, 过滤, 定容至25mL。

(2) 磷酸盐缓冲液(pH8.04) 称取磷酸二氢钾0.045g, 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.27g溶于水中, 定容至100mL。

(3) 氨基酸标准液(20 $\mu\text{g/mL}$) 称取纯粹干燥的氨基酸0.2000g, 用水溶解并定容至100mL摇匀, 吸取此液1mL于100mL容量瓶中, 加水定容至100mL, 即得20 $\mu\text{g/mL}$ 标准液。

3. 试验程序

(1) 标准曲线绘制 精确吸取氨基酸标准液0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5mL(相当于0、10、20、30、40、50 μg 氨基酸), 分别置于25mL容量瓶中, 各加水至容积为4.0mL, 然后加入2%茚三酮溶液和缓冲液各1mL, 摇匀, 置水浴中加热15min, 取出, 迅速冷却至室温, 加水至刻度, 摇匀, 静置15min后, 采用分光光度计, 用1cm比色杯在570nm波长下测定吸光度, 绘制标准曲线。

(2) 样品测定 吸取试样2mL, 按标准曲线制作步骤操作, 测定吸光度并扣除样液空白值后, 从标准曲线上查得氨基酸的质量(μg), 按下式计算样品的氨基酸总量(以某种氨基酸计)。

$$\text{氨基酸总量 (mg/L)} = \frac{m}{V \times 1000} \times 1000$$

式中 m ——从标准曲线上查得氨基酸的质量, μg
 V ——试样体积, mL

第四节 多 糖

1. 原理

采用液相色谱法, 以D-木糖作为内标, 以乙腈、水和甲醇作为流动相, 使用示差折射检测器, 在10min内测定试样中的糖类(果糖、葡萄糖和蔗糖)的含量。

2. 试剂

(1) 乙腈。

(2) 甲醇。

(3) 糖标准溶液 称取D-木糖、D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖, 用水配成每微升 $5\mu\text{g}$ 的各种标样的混合溶液。另取D-木糖配成每微升含 $25\mu\text{g}$ 为内标溶液。

3. 仪器及条件

液相色谱仪: 具有示差折射检测器。

记录积分仪: 量程 4mV , 衰减0, 纸速 5cm/min 。

色谱柱: 日本岛津PNH2—10/S250不锈钢色谱柱。

流动相: $V(\text{乙腈}) : V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 82 : 12 : 6$ 。

4. 试验程序

(1) 校正因子 f_i 的测定 取标准混合糖液 $10\mu\text{L}$ 进入色谱柱, 记录色谱图, 确定各组分保留时间及峰面积, 测量内标物及各组分峰面积, 按下式计算各组分校正因子:

$$f_i = \frac{A_s}{A_i}$$

式中 A_s ——混合标样中内标物的峰面积
 A_i ——混合标样中组分 i 标准物的峰面积