

普通高等院校（中医药相关专业）实验教学指导

中药鉴定学 实验指导

胡本祥 主编



中药鉴定学是中医药院校中药学专业的专业课，是一门实践性较强的应用学科。本教材主要从中药的来源、性状、显微及理化四个方面介绍中药药材及中成药的鉴别方法，有些药材还要求进行浸出物检查、灰分检查、有效成分含量检测等实验……

陕西科学技术出版社
陕西师范大学出版总社有限公司

普通高等院校（中医药相关专业）实验教学指导

中药鉴定学 实验指导



◎主 编 胡本祥

◎副主编 颜永刚

◎主 审 王昌利 王西芳

陕 西 科 学 技 术 出 版 社
陕西师范大学出版总社有限公司

图书代号 JC14N1380

图书在版编目(CIP)数据

中药鉴定学实验指导 / 胡本祥主编. —西安: 陕西科学技术出版社, 2014. 9

ISBN 978 - 7 - 5369 - 6242 - 2

I. ①中… II. ①胡… III. ①中药鉴定学—实验—医学院校—教学参考资料 IV. ①R282.5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 210247 号

中药鉴定学实验指导

胡本祥 主编

责任编辑 / 都亚林 王奉文

责任校对 / 胡敬超

封面设计 / 鼎新设计

出版发行 / 陕西科学技术出版社

(西安市北大街 147 号 邮编 710003)

陕西师范大学出版总社有限公司

(西安市长安南路 199 号 邮编 710062)

网 址 / <http://www.snupg.com>

经 销 / 新华书店

印 刷 / 陕西省富平县万象印务有限公司

开 本 / 880mm × 1230mm 1/16

印 张 / 5

字 数 / 145 千

版 次 / 2014 年 9 月第 1 版

印 次 / 2014 年 9 月第 1 次印刷

书 号 / ISBN 978 - 7 - 5369 - 6242 - 2

定 价 / 12.00 元

读者购书、书店添货如发现印刷装订问题,请与陕西师范大学出版总社高教出版社联系调换。

电 话:(029)85303622(传真) 85307826

普通高等院校(中医药相关专业)实验教学指导

编委会

总主编 王昌利

副总主编 卫 昊

编委会 (按姓氏笔画排序)

卫 昊 王 薇 王昌利 李 娜

吴建华 张 拴 赵 勤 赵忠孝

胡本祥 郭东艳 崔春利 程虎印

《中药鉴定学实验指导》

编委会

- 主 编 胡本祥
副主编 颜永刚
编 委 (以姓氏笔画顺序排序)
刘 清 (陕西中医学院)
孙 涛 (陕西中医学院)
李 华 (咸阳市食品药品检验监测中心)
张 琳 (陕西中医学院)
胡本祥 (陕西中医学院)
颜永刚 (陕西中医学院)
主 审 王昌利 王西芳

总序

医药学类专业实践教学具有较强的学科综合性、技能实践性的特点,中医药学专业人才不仅要具有传统的中医药理论知识,更应具有良好的实践动手能力和科研创新能力,达到知识、能力、素质三者协调发展。实验教学是中医药学类专业教学的一个重要环节,是检验理论课教学内容的一种方法和手段,也是中医药学专业教学的重要环节和教学特色所在。

基于此,我们在中药学国家级专业综合改革试点项目、国家级特色专业建设点、陕西省专业综合改革试点项目、陕西省特色专业建设点、陕西省中药人才培养模式创新实验区等国家级、省级教育教学质量工程项目建设和陕西省中药饮片技术工程研究中心、陕西省中药基础与新药研究重点实验室、陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心等实验平台建设的基础上,组织相关院校专家共同编写了《普通高等院校(中医药相关专业)实验教学指导》。本教材在遵循上述教学理念的同时,实验内容编写突出实用性、系统性、可操作性、地域性等特点,引入部分陕西道地药材、“太白七药”的提取、鉴定与炮制等实验项目。同时,将实验教学和科学研究相结合,构建了新的知识框架体系,引入了部分科研方法,进行了知识更新,拓展了实验教学内容,突出了对学生实践能力和创新意识的培养。

本教材在编写过程中得到了第四军医大学、南京中医药大学、成都中医药大学、浙江中医药大学、江西中医药大学、辽宁中医药大学、甘肃中医学院、西藏民族学院、西安医学院、陕西国际商贸学院、杨凌职业技术学院、安徽中医药高等专科学校、陕西步长制药有限公司、咸阳市食品药品检测中心等单位及相关专家的大力支持,在此一并表示感谢。

由于学科知识交叉,编写时间仓促,编者水平有限,部分内容和方法还有待完善,需要在实践中进一步探索和总结,所以本套教材编写中难免存有错漏,恳请专家、同仁和使用者提出宝贵意见,以便修订完善。

王昌利

2014年8月

前言

中药鉴定学是中医药院校中药学专业的专业课,是一门实践性较强的应用学科。根据中药鉴定学教学大纲,结合教学实际情况,我们编写了《中药鉴定学实验指导》。

《中药鉴定学实验指导》是“十二五”规划教材《中药鉴定学》的配套教材,实践性强,通过对中药真伪优劣及其品质评价的实际操作训练,培养学生鉴别中药真伪优劣的能力,使其适应工作的需要,从而把学生培养成具有独立工作能力、操作熟练的高级中药鉴定人才。

本教材主要从中药的来源、性状、显微及理化四个方面介绍中药药材及中成药的鉴别方法,有些药材还要求进行浸出物检查、灰分检查、有效成分含量检测等实验。

胡本祥
2014年6月

目 录

第一章 中药鉴定方法	(1)
第二章 实验操作	(15)
实验一 显微测微及显微制片	(15)
实验二 绵马贯众、大黄、何首乌、牛膝、川牛膝实验	(17)
实验三 草乌、川乌、附子、白芍、赤芍、黄连实验	(18)
实验四 甘草、黄芪、当归、黄芩、党参、桔梗实验	(20)
实验五 人参、三七、川木香、白术、苍术实验	(22)
实验六 川贝母、浙贝母、半夏、山药、天麻实验	(23)
实验七 川木通、苏木、鸡血藤、沉香、降香实验	(25)
实验八 厚朴、肉桂、杜仲、黄柏实验	(27)
实验九 石韦、大青叶、番泻叶、艾叶、枇杷叶实验	(29)
实验十 辛夷、丁香、金银花、红花、西红花实验	(31)
实验十一 五味子、苦杏仁、乌梅、决明子、小茴香实验	(33)
实验十二 马钱子、槟榔、白豆蔻、砂仁实验	(35)
实验十三 麻黄、薄荷、泽兰、佩兰、石斛实验	(37)
实验十四 冬虫夏草、猪苓、茯苓、乳香、没药、血竭、冰片、五倍子实验	(39)
实验十五 动物类中药的鉴定	(41)
实验十六 矿物类中药的鉴定	(46)
实验十七 实训练习一(五苓散)	(48)
实验十八 实训练习二(银翘解毒丸)	(49)
实验十九 陕西特色七药的鉴定(一)	(51)
实验二十 陕西特色七药的鉴定(二)	(53)
实验二十一 未知生药混合粉末的鉴定(设计性试验)	(56)
实验二十二 生药的质量标准制定(综合性实验)	(57)

附录	(60)
附录一 常见试剂配制法	(60)
附录二 各类化学成分鉴定方法	(62)
附录三 偏光显微镜的使用	(66)
附录四 中药质量标准分析方法验证指导原则	(69)
附录五 报告范本	(72)

第一章 中药鉴定方法

一、中药鉴定的依据

中药鉴定的依据主要包括《中华人民共和国药典》和《中华人民共和国卫生部药品标准》，未被收入《中华人民共和国药典》和《中华人民共和国卫生部药品标准》的药品可依据各省市的地方药品标准及相关教材资料等。

二、药材取样方法

中药的取样方法是指选取供鉴定用的药材或中成药样品的的方法。取样要具有代表性，取样方法是否正确直接关系到检验结果的准确性。因此，必须重视取样的每个具体步骤。

①取样前应注意品名、产地、规格、等级及包件式样是否一致，并应检查包件的完整性、清洁程度、有无霉变及污染等情况。

②同批药品抽取鉴定用样品的原则如下：药材总包件在 100 件以下的取样 5 件；100 ~ 1 000 件，按 5% 取样；超过 1 000 件的按 1% 取样；不足 5 件的逐件取样；贵重药材，不论包件多少均逐件取样。对于破碎的或者药材直径在 1 cm 以下的药材一般抽取 100 ~ 500 g，粉末状药材取 20 g，贵重药材取 5 ~ 10 g。

③样品的处置。将所取样品混合拌匀，即为总样品。对个体较小的药材，应排成正方形，依对角线画“X”，使分为四等份，取用对角两份，再如上操作，反复数次至最后剩余的量足够完成所有必要的试验以及留样数为止，此为平均样品。个体较大的药材，可用其他适当方法取平均样品。平均样品的量一般不得少于实验所需用的 3 倍数，即 1/3 供实验室分析用，1/3 供复检用，其余 1/3 则为留样保存，保存期至少一年。

取样是检验工作中非常重要的环节，因为取样之后的一系列检验工作都是针对这个具体样品进行的，如果检样不具有代表性，则检验工作也不可获得正确的结论，从而造成很大的浪费。因此，必须认真对待取样工作。

三、药材鉴定

药材的鉴定包括来源、性状、显微、理化鉴别和检查，浸出物测定，水分测定，灰分测定，含量测定等主要项目。

(一) 来源鉴定

应用植物学(动物学或矿物学)的形态和分类方面的知识对生药进行基原鉴定，以确定其正确学名，保证生药的品种准确无误。

①要了解被鉴定标本的产地及生境，进行详细登记，为品种鉴定提供依据。

②观察植物形态。待鉴定的标本要完整，应有根、茎、叶、花、果实、种子，观察时应注意标本习性，是否属于木本、草本、灌木等；对根、茎、叶、花、果实和种子，特别是繁殖器官更应仔细观察，对一些对于鉴定品种特别重要的器官形态，做重点观察。如果待鉴定的标本不完整，无法确定时，应到产地实

地调查,采集完整标本,供鉴定用。

③核对文献。根据观察到的形态特征,可以查阅植物分类学方面的有关文献,加以分析对照,如《中国植物志》《中国高等植物图鉴》《中药志》《中药大辞典》等。如观察到的形态特征,初步能确定其科的可直接查阅该科的分属检索表;如已确定其属的,可直接查阅属的分种检索表,便可确定其品种。各文献对同一种植物的描述可能不完全一致,故应多核对几种文献。所查文献在主要鉴定特征上有分歧或不完善,不足以确定其种时,则应查阅原始文献,即第一次记载该种(新种)植物时的文献。

④核对标本。通过查阅、核对文献后,初步确定了待鉴定标本的学名,然后可到标本室与已定名的该种标本进行核对。如有条件,可与模式标本(发现该新种时被描述的标本)核对。如核对无误,即可确定种名。对一些难以定名的标本,可请专家或植物分类研究单位协助鉴定。

(二)性状鉴定

通过观察药材的形态、大小、表面、断面、质地、气味、水试、火试等,确认药材的性状特征。

1. 生药性状鉴定的内容

①形状。药材的形状与药用部位有关,每种药材的形状一般比较固定,是鉴定真伪的重要依据之一。如根类药材有圆柱形、圆锥形、纺锤形等;皮类药材有卷筒状、板片状等;种子类药材有圆球形、扁圆形等。如防风的根茎部分,俗称“蚯蚓头”;味连形如鸡爪;厚朴近根部的干皮,称“靴筒朴”;款冬花的花序基部连生,习称“连三朵”;海马的外形为“马头蛇尾瓦楞身”等。

②大小。药材的大小指长短、粗细、厚薄。要得出比较正确的大小数值,应观察较多的样品。如测量的大小与规定有差异时,可允许有少量高于或低于规定的数值。有些很小的种子类药材,如葶苈子、白芥子、车前子、菟丝子等,应在放大镜下测量;也可放在 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 方格纸上,每10粒紧密排列成一行,测量后求其平均值。

③颜色。各种药材的颜色均不相同,如丹参色红,黄连色黄,紫草色紫,乌梅色黑。药材因加工或贮藏不当,就会改变其固有的色泽,这表明质量发生了变化。很多药材的色调不是单一的,而是复合的。在描述药材颜色时,则应以后一种色调为主,如黄棕色,即以棕色为主。观察时一般在日光下进行。

④表面特征。指药材表面光滑或是粗糙,有无皱纹、皮孔、毛茸等。双子叶植物的根类药材顶部有的带有根茎;单子叶植物有的具膜质鳞叶;蕨类植物的根茎常带有叶柄残基和鳞片。皮类药材表面有地衣斑和皮孔;叶类药材有毛茸等。这些特征的有无和存在情况,常是鉴定药材的重要依据,应仔细观察。

⑤质地。指药材的软硬、坚韧、疏松、致密、黏性或粉性等特征。有些药材因加工方法不同,质地也不同。如盐附子易吸潮变软,黑顺片则质硬而脆;含淀粉的药材经蒸煮加工,则因淀粉糊化,干燥后质地变坚实,如白芍。在经验鉴定中,用于形容药材质地的术语很多,如“松泡”(南沙参)、“粉性”(贝母)、“油润”(当归)、“角质”(郁金)、“柴性”(黄柏)等。

⑥折断面。指药材折断时的现象,如易折断或不易折断,有无粉尘散落及折断时的断面特征。自然折断的断面应注意是否平坦,显纤维性、颗粒状或裂片状,断面有无胶丝,等等。折断面的观察是很重要的。如茅苍术易折断,断面久置能“起霜”;白术不易折断,断面放置不“起霜”;杜仲折断时有银白色紧密相连的胶丝;黄柏折断面显纤维性;牡丹皮折断面平坦显颗粒状。用刀片切成的横切面,便于观察皮部与木部的比例、维管束的排列形状、射线的分布以及异形构造等。如大黄根茎可见“星点”,何首乌可见“云锦花纹”,黄芪有“菊花心”,大血藤断面皮部有六处嵌入木部,鸡血藤有红棕色皮部与黄白色木部相间排列而形成的偏心性环纹,等等。

⑦气味。药材独特的气与味,是直接以鼻闻和口尝而鉴定的。含挥发性物质的药材,大多有特殊的气味,如肉桂、薄荷、丁香等有清香,而阿魏气臭,鱼腥草气腥。气味不明显的药材,可切碎后或用热

水浸泡一下再闻。山楂味酸,黄连味苦,党参味甜,五味子味辛、苦,等等。如药材的味道发生改变,就要考虑其品种和质量问题。注意剧毒药不宜口尝,毒性较小的生药尝时也要小心,取量要小,尝后立即漱口。

⑧水试。利用某些药材在水中的特殊现象来鉴定药材,如秦皮水浸液具蓝绿色荧光;车前子水浸泡后体积膨胀;沉香沉于水者为优;熊胆粉末在水面旋转后呈黄线下沉;牛黄的水浸液可染黄指甲而习称“挂甲”等。

⑨火试。利用某些药材火烧时产生特殊的气味、颜色、烟雾、响声等来鉴定药材。如麝香灼烧时,香气浓烈,无臭气,灰烬为白色;血竭粉末置滤纸上灼烧时,对光透视显血红色,无扩散的油斑,无残留的灰烬;乳香、没药火试冒浓烟,有香气等。

2. 不同药用部位的性状鉴定注意点

①根类药材。双子叶植物根类药材一般呈圆柱形或圆锥形,上端常连接短缩的根茎(称“芦头”);表面常较粗糙,多数有皮孔及支根痕;横断面呈放射状结构,形成层环大多明显,少数药材有异形构造。单子叶类植物根类药材多为须根或膨大成块状根,一般说来表面较光滑,断面无放射状结构。

②根茎类药材。蕨类植物根茎的表面常有鳞片或鳞毛,有的周围密布整齐的叶柄基;双子叶植物根茎断面呈放射状结构,中心有明显的髓;单子叶植物的根茎断面不呈放射状,环圈内外均散有维管束小点。蕨类植物根茎断面有的中心为木部,无髓;有的木部呈完整的环圈,中心有髓;有的为数个分体中柱断续排列呈环圈状。

③茎类药材。草质茎干缩后因维管束或机械组织的存在,常形成隆起的棱线及纵向凹沟;木质茎表面较粗糙,木栓层时有纵横裂纹,皮孔易察见。双子叶植物的横断面呈放射状结构,髓部较小,草质茎木部不发达,髓疏松或成空洞,木质茎木部发达,皮部薄;单子叶植物茎不呈放射状结构。

④皮类药材。皮类药材因所采部位、厚度及加工方法的不同可呈板片状、卷片状、槽状、筒状或双筒状,近根部处有的呈靴状。皮类药材的外表面较粗糙,有裂纹和皮孔,有时栓皮呈鳞片状剥落,有的附着灰白色地衣斑块,有的着生钉刺或毛刺;内表面一般平滑,颜色较深,常可见纵向细纹理(纤维束)或网状皱纹。折断面有的平坦或呈颗粒状(示有石细胞群),有的呈纤维状或裂片状且可层层撕离(示有纤维层),有的显油润(示有油室),还有的折断时有胶丝状物相连或粉尘等。

⑤木类药材。主要观察其形状、色泽、表面纹理与斑块、质地、气味以及横切面、切向纵切面与径向纵切面所呈现的年轮、射线等纹理。

⑥叶类药材。观察叶片的形状、大小、色泽、叶端、叶基、叶缘、叶脉、上下表面、质地以及叶柄的有无或长短。叶面的表面特征比较多样,有的具较厚的角质层、光滑无毛,有的一面或两面被毛;有的在放大镜下可见腺鳞;有的叶片对光透视可见透明的腺点(油室),有的有黑色条纹,小叶片的基部常不对称等。

⑦花类药材。观察花的形态、大小,各部分的形状、色泽、数目、排列、有无毛茸以及气味等,必要时湿润后在解剖镜下观察。以花序入药的,注意花序的类型及苞片或总苞片的形状。以单朵花入药的,注意其雄蕊类型、数目的多少、着生方式等。

⑧果实类药材。观察果实的类型、形状、大小、颜色、顶部、基部、表面、切断面的特征以及有无残存的萼片、花萼、柱基及果柄。果实类药材的表面有的具光泽或被粉霜,有的有隆起的棱线,有的有凹下的油点(油室),有的着生毛茸。对完整的果实,还应注意所含种子的数目、形状、大小、色泽及表面特征。

⑨种子类药材。观察种子的形状、大小、颜色及表面特征,如种脐、种脊、合点、珠孔位置和形状,各种纹理、突起、毛茸,种阜的有无以及纵横剖面,等等。剖去种皮后,注意有无胚乳。一般无胚乳种

子的内胚乳仅为一层透明膜状物,子叶发达,子叶富有油质或粉性;有胚乳种子的内胚乳有的富有油质,有的角质样。

⑩全草类药材。全草类药材的叶大多干缩或破碎,可湿润后摊平观察。若花、果实完整,可依原植物鉴定的方法进行。同一科属药材,可参照科属原植物形态特征的主要鉴定点进行鉴定。

(三)显微鉴定

显微鉴定是利用显微镜来观察生药的组织构造、细胞形态及其内含物或其他特征,鉴定药材的真伪和纯度的一种方法。常用于单凭性状不易识别的生药、性状相似不易区别的多来源生药和粉末生药。

鉴定时选择有代表性的样品,根据需要选择不同的显微制片技术,制备适合的显微标本片,然后进行观察。显微鉴定要根据观察的对象和目的,制作不同的显微制片,一般有粉末制片法、表面制片法、解离组织制片法、徒手切片法等。下面介绍实验室几种常用的制片方法:

1. 植物类生药显微标本常用的制作方法

(1) 粉末制片法

粉末制片是用于制备粉末状生药及中成药的显微鉴定标本片的方法。此法是鉴定生药最常用的方法之一,简便快速,主要鉴定细胞的形态特征。一般做临时观察用。常见的有两种方法:

①蒸馏水(或斯氏液)装片法。专门适用于观察淀粉粒。挑取粉末适量,置载玻片中央,然后滴加蒸馏水(或斯氏液)1~2滴。用牙签或解剖针拌匀,用镊子夹一洁净盖玻片沿液面从左至右轻轻放下,多余的试液用滤纸条吸去,保持装片洁净,即得。

②水合氯醛法(粉末透化法)。挑取适量粉末置载玻片上,滴加水合氯醛1~2滴,置酒精灯上加热,待液体渗入粉末内部,渐成透明状(透化),试液因加热而渐渐挥发至干燥,再滴加水合氯醛1~2滴,加热,透化,防止沸腾。然后滴加稀甘油1~2滴,用解剖针将粉末混匀,用镊子将一洁净盖玻片沿液面从左至右轻轻放下,液体受压而延展,充满盖玻片下方。多余的试液用滤纸条吸去,保持装片洁净,即得。切忌用滤纸条在盖玻片上擦拭,补加液体时应在空隙的相对边缘加入,以防气泡产生。

颜色很深的粉末,可先进行脱色处理。取待检粉末少许置小烧杯中或载玻片上,加少许3%过氧化氢溶液或次氯酸钠溶液,待颜色变浅色后,除去液体。或将粉末置小烧杯中,加入适量水合氯醛在酒精灯上加热,除去液体。滴加稀甘油1~2滴,即可供观察用。

(2) 表面制片法

表面制片法适用于观察叶片、花萼、花瓣、草质茎等表皮的显微特征。可观察表皮细胞形态、气孔类型、毛茸特征和着生情况等。

①材料的预处理。干材料可用冷水浸泡,如急用,可用温水浸泡,亦可煮沸,加速软化和恢复原样。鲜材料洗净即可。

②撕取方法。用刀片轻轻在表面浅划一刀,再用镊子从切口处撕取表皮,将表皮外表面向上置于载玻片上,以稀甘油装片即可观察。或用镊子将细小的叶脉挑起,顺着叶脉而起的表皮,可用刀片划开。

③削取方法。用于表皮不易与其以下组织分离的材料。用徒手切片的方法,使刀片与材料表面平行削取表皮,带1~2层表皮下组织亦可。如材料颜色过深,则应用水合氯醛液透化后再用稀甘油装片即可,或直接以稀甘油装片。

④整体封藏法。用于扁平且薄又难撕取的材料,如花瓣、花粉、孢子等。此法既可用于观察表皮,亦可用于观察叶肉组织等。将材料切成2~5 mm的小方块,一正一反置载玻片上,用水合氯醛液透化后,加稀甘油1~2滴,用镊子夹干净盖玻片沿液面从左至右轻轻放下,多余的试液用滤纸条吸去,保持装片洁净,即得。花粉、孢子等可用水合氯醛液直接透化后制成临时标本片。

(3) 解离组织制片法

解离组织制片法是利用化学试剂使组织中各细胞间的胞间层溶解而使细胞互相分离的一种制片方法。主要观察纤维、石细胞、导管及管胞的完整形态及主体形状。预处理:先将材料切成边长约2 mm的立方体或条状,然后再添加各种解离试剂,依所用的化学试剂不同可分为4种,即氢氧化钾法、硝酸法、氯酸钾法、浓硝酸法。木化程度较高的生药,可采用硝酸法、氯酸钾法与浓硝酸法;木化程度较低、薄壁细胞占大部分的生药,可采用氢氧化钾法。

①氢氧化钾法。主要适用于软或较硬的材料,也适用于薄壁组织多、木化程度低的生药。将约2 mm的长条状、细块状材料置小烧杯或表面皿中,加5%氢氧化钾试液适量,以淹没材料为度,置沸水浴中加热至用玻棒轻压材料才能离散(一般需10~20 min),材料较软呈透明状,小心倾去碱液。用滴管吸入蒸馏水或清水冲洗干净,取少许材料于载玻片上,用解剖针尽量撕开离散,滴加稀甘油1~2滴,装片镜检。

②硝酸法。适用于木化组织较多或较硬的材料。将处理好的材料放入烧杯中或表面皿中,加入10%硝酸与10%铬酸等量混合液,以淹没材料为度,室温放置或稍加热至材料用玻棒轻压即散为止,倾去酸液,小心用清水冲洗干净,取少许材料于载玻片上,用解剖针离散或捣开材料,滴加稀甘油1~2滴,轻放盖玻片,即得。

③氯酸钾法。将处理好的材料置于小烧杯或试管中,加50%(V/V)硝酸,适量投入少量氯酸钾粉,并在火焰上或沸水浴中加热,待产生的气泡平息后,再及时投入少量氯酸钾,以维持气泡稳定发生,时间为5~15 min即可。(注意每次投入的氯酸钾不可过多,温度不宜过高,否则产生大量气泡溢出杯外,在加热过程中,还能产生有毒的氯气。)

④浓硝酸法。将材料置于装有1~2 mL浓硝酸小试管中,在酒精灯上加热至微沸,见材料上下翻腾,有气泡即可。稍冷后用水洗涤。洗涤后即可取材料封片检查。注意安全或在通风处进行,因浓硝酸沸腾时会冒出大量黄色的有毒烟雾。

(4) 徒手切片法

徒手切片是利用刀片或徒手切片器固定材料直接切片,在显微镜下观察组织构造、细胞特征的制片方法。该方法简单易行,快速,能保持植物体原有结构和内含物,能及时得到观察结果,用途很广,适合于临时观察或显微化学实验,是生药显微鉴定的一项基本技能,必须掌握好,缺点是不适合长期保存。

①材料的预处理。将新鲜的材料或已软化的材料选择适当部位置于小烧杯中。可直接加水浸泡或酒精灯上加热煮软,一般沸腾后煮20~30 min。也可以将材料放入玻璃质干燥器中,放入含0.5%苯酚的水,密封,一般药材在12~24 h后可吸湿软化,供切片用。新鲜材料两端切平齐,一般要求为:长约3 cm,宽约1 cm,厚约2~5 cm为宜。

②切片。以左手拇指及食指夹住材料,中指略抵住药材,右手持刀,刀口向内,自左向右沿平面切片。注意切片要保持平整,刀口轻轻压住材料,切时要用臂力而不用腕力。亦可视材料不同,将较小的种子、果实类,较细的根类药材两端置于载玻片,以左手拇食二指轻轻按住,右手持刀片自上而下切薄片。

③选片。用毛笔轻轻将刀片上的切片移入盛有水的培养皿中,选取较薄的切片(常浮在水面上)置载玻片上。

④透化。在切片上滴加1~2滴水合氯醛试液,于酒精灯上加热,微沸后离开火焰,冷后再加热,当水合氯醛试液明显减少时,及时补充后再加热,直至切片透明。

⑤封片。滴加1~2滴稀甘油,用镊子夹洁净的盖玻片,从左至右沿液面轻轻放下,防止气泡产生,多余的液体用吸水纸置于旁边吸去,不要去擦拭盖玻片,保持盖玻片和载玻片洁净,以保证能清晰

观察显微特征。

(5) 机器切片法

①滑走切片法。滑走切片法是利用滑走切片机切片的一种简单的机械操作。适用于较硬的材料,材料不需要经过特殊的处理。

软化材料。30℃以下水浸泡1~2日,或用温水浸泡1~2h;如为鲜材料则不用软化,然后将材料切成长2~3cm,两端务必切平。

切片。调整切片刀,使刀口与材料平行,将处理好的材料固定在推进器上的夹子中,使其高出约0.5cm,在刻度盘上调节好需要切片的厚度(10~20 μm),然后在夹刀器上安装切片刀,调整刀锋与材料切面以及刀口与材料纵轴方向所成的角度,常为30~45°,旋动摇柄,使材料上升至其顶面离刀口0.5~1mm,即可切片。左手用毛笔蘸水加在材料切面上,右手牵动切片刀夹,使刀口由前向后移动切片,左手用毛笔将切片刀上的切片轻轻刷下,放在盛有清水的培养皿中,然后将刀推回。反复操作,挑选较薄而完整的切片,供临床观察用的薄片的透化、封藏同徒手切片法。供作永久切片的,则作染色处理。

脱水及染色步骤如下:

a. 将完整的切片置于清洁的载玻片上,加30%乙醇1~2滴,片刻后倾去,再加50%乙醇1~2滴,放置1min倾去,再加番红染色液1~2滴,放置2~3min。

b. 倾去番红染色液,加50%乙醇,继续以70%、80%、85%、90%、95%等浓度乙醇脱水,各约1~2min。每次倾去乙醇后,应将玻片四周的液体擦干,再依次加入浓度较高的乙醇。

c. 加入固绿染色液1~2滴,约1min。如上法加入无水乙醇2~3次,倾去后,再加1/2二甲苯与1/2无水乙醇,2/3二甲苯与1/3无水乙醇,无水二甲苯。无水二甲苯如有混浊,须退回95%酒精再脱水透明,直至切片透明清晰为止。

封片。在切片上滴加一滴加拿大树胶,用镊子夹住盖玻片在酒精灯火焰上通过,以去除水分,然后小心夹住盖玻片轻轻盖在切片上。

贴标签。载玻片的左边贴上标签,写上中文名、学名、日期等。

②石蜡切片法。石蜡切片法是利用石蜡能渗透到药材组织内部的原理,以石蜡作材料的填充剂和包埋剂,然后用切片机切片的方法。许多材料如根茎、根、皮以及叶、花、果实、种子等均可作石蜡切片。此法适用于教学用片及研究工作,一般材料切成8~20 μm ,所制作的切片可以长期保存。石蜡切片步骤较多,操作精细。前后需时间1~4周,其基本操作步骤如下:

取材→固定→冲洗→脱水→透明→浸蜡及包埋→切片→粘片→脱蜡→染色→封片→封藏。

a. 取材。选择有代表性的材料,用毛笔小心地洗净,干材料需用水浸泡使其恢复原状,如为坚硬的材料尚需软化处理(方法同徒手切片法),用刀切割,材料大小一般为0.5~1 cm^3 ,断面切平。

b. 固定。将准备好的新鲜材料或材料片块,投入固定液甲醛-冰醋酸-乙醇(F. A. A.)中,浸泡12~24h。

附:F. A. A. 固定液基本配方:

50%或70%乙醇	90 mL
冰醋酸	5 mL
甲醛	5 mL

c. 冲洗。洗涤剂一般用水或与固定剂中相近浓度的乙醇,将材料冲洗干净。一般需冲洗10~24h,多次更换冲洗液。一般用50%的乙醇冲洗3~4次或更多。

d. 脱水。将新鲜材料浸于各级不同浓度的乙醇中,以逐渐除去水分,使透明剂易渗入组织中。因用50%乙醇制固定液,故脱水用各级乙醇浓度为60%→70%→80%→95%→无水乙醇。乙醇用量为

材料的2~3倍,在70%~95%各级乙醇中,柔软材料为1~2 h,过于坚硬的材料3~4 h,无水乙醇中需2次,每次1 h,以利将水脱净。若脱水不彻底,则石蜡不能溶入组织中,从而使制片失败。

e. 透明。常用二甲苯作为透明剂,以使材料透明,便于浸蜡。在此过程中,为防止材料收缩变脆,应由低浓度向高浓度分级进行,一般用1/3二甲苯+2/3无水乙醇→1/2二甲苯+1/2无水乙醇→2/3二甲苯+1/3无水乙醇→无水二甲苯。材料经各级溶剂的时间一般约30 min。如材料尚未完全透明,则必须重新透明,材料完全透明时,细胞内均匀充满二甲苯,即可浸蜡。

f. 浸蜡。使石蜡慢慢溶于材料中,然后以石蜡代替透明剂而进入组织内,其过程如下:3/4二甲苯+1/4石蜡(2~3 h)→1/2二甲苯+1/2石蜡(2~3 h)→1/4二甲苯+3/4石蜡(2~3 h)→纯石蜡(2~3 h),每次2~3 h。

g. 包埋。种子类和叶类生药,可将熔化的石蜡连同透蜡后的材料一并倾入纸盒,然后用烧热的镊子将材料排好,注意材料的切面及间距。慢慢放入冷水中,将其凝固。其他的生药,可将熔化的石蜡倾入折好的纸盒中,石蜡在纸盒底层稍凝固时,将材料放入纸盒内,以烧热的镊子赶去材料周围的气泡,将纸盒半浸入冷水中,待石蜡表面凝结后,全部浸入冷水中,即成蜡块,供切片用。

h. 切片。将包埋有材料的蜡块切成适当大小(1 cm),粘固于小木块上,并将石蜡的碎屑熔粘于石蜡块周围,使石蜡块牢固地粘在固着装置上。切片时,将材料固定,装好切片刀,调整材料固着器,使材料平面与切片刀口平行,材料纵轴与刀口垂直,否则切片不正,移动夹刀使石蜡块表面刚好贴近刀口,旋紧固定器。再调整厚度测微计使所指刻度为所要厚度。然后转动切片机进行切片,通常切成10~15 μm厚薄的蜡带。切出的薄片需在显微镜下检查方向正确否,常以导管为基准检查。

i. 粘片。在洁净的载玻片上涂一小滴粘剂(1%甘油明胶溶液),涂匀,将蜡片放在液面上,置于烫片台上(50℃),将蜡片完全伸直后用解剖刀将材料在载玻片上的位置放好,倾去多余的液体,待其干燥后放于30℃温箱中一天。切片一般竖放于切片篮中,烘片。

j. 脱蜡。将粘有蜡片的玻片浸于无水二甲苯中,约10~15 min,使材料组织中浸入的石蜡完全溶去,以便染色。

k. 染色。常用番红和固绿二重染色法。染色结果是木质化细胞壁染成红色,纤维素细胞壁染成绿色。操作过程如下:1/2二甲苯+1/2无水乙醇→无水乙醇→95%乙醇→80%乙醇→70%乙醇→60%乙醇(不同级别乙醇每级1~2 min)→番红溶液(2~24 h)→50%乙醇→60%乙醇→70%乙醇→80%乙醇→95%乙醇(不同级别乙醇每级2 min)→固绿溶液(1 min),取出玻片并擦净残留液体,检查木化组织是否为红色,薄壁组织是否染成绿色→95%乙醇→无水乙醇(30 s)→无水乙醇(1~2 min)→1/2纯酒精+1/2二甲苯(3 min)→二甲苯(3 min)→二甲苯(5~30 min)→封片。如发现溶液或切片出现乳浊现象,说明脱水不完全,应重新脱水。

l. 封片。将玻片擦净残留液,滴加1~2滴加拿大树胶于材料上,用镊子夹住盖玻片在酒精灯火焰上通过,然后沿液面轻轻放下,须防止盖入气泡,置平面薄片盒内,自然干燥或恒温箱中干燥2~4 h,取出玻片,在左边贴上标签,写上中文名和学名,即成永久制片或石蜡制片。

注意:切片时,常见切片上有条纹、切片不能连接成蜡带或蜡带弯曲不直等,主要原因是刀片固定不紧或不正,刀口不锋利有缺口。如标本不完整,可能是浸蜡不透,或浸于二甲苯溶液内时间过长使组织变硬。如出现染色不正,主要原因是脱水不好或染色后分色不干净。如切片出现白雾状,看不清标本结构,主要原因是脱水不净或封片不严。总之,要根据情况分析,解决永久切片中出现的问题。

2. 动物类生药显微标本的制作方法

对于动物类中药如角、骨骼、齿、珍珠、石决明等的鉴定以及矿物类药材的断面观察,常用的显微制片方法有磨片法、切片法和粉末制片法三种。

①磨片法。此法适于坚硬的材料,如将动物的角、骨骼、齿、珍珠等药材制成20~30 μm的薄片,

在显微镜下观察其结构特征。

磨片分三种:a. 纵切面磨片,与生长线垂直方向的断面磨薄;b. 横切面磨片,与生长线平行方向的断面磨薄;c. 平行磨片,将材料依其自然的片状平放磨石上磨薄。方法如下:

选取合适的材料,根据欲观察纵或横切面的要求,锯成薄片,厚度一般不超过 0.5 cm。先把浓稠的加拿大树胶放在加热板上加热至 $150\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$,至用针挑起少量树胶立即变硬为止,取下,将材料磨平的一面粘贴在载玻片上磨毛的黏合面上,加压物,放冷即得。当黏合剂干硬固定后,在玻璃板上用水或油把磨砂调成糊状,用手指压住材料,在糊状磨砂上进行磨制。磨制时作圆形或直线方向磨动,先用粗磨砂(约 400~500 号)后用细磨砂(800~1000 号),把材料一直磨至厚度约 $30\text{ }\mu\text{m}$ 为止,薄片冲洗干净,充分干燥后用加拿大树胶封藏。

注意:磨片时,材料的两面均需磨制。磨片过程中用力要均匀,适度。尤其在用细磨砂时,用力更须注意,并随时在显微镜下检查是否合格。如无磨砂,也可采用不同的砂纸或磨石来代替。

②切片法。将欲观察的角类、骨骼、齿等,分上、中、下切成条状小块(约 $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 20\text{ mm}$),以沾水纱布湿润断面片刻,使材料稍软,然后用解剖刀将两端削平,可按照滑走切片法进行,最后用锋利刀片平稳地切下厚度约 $20\text{ } \sim 40\text{ }\mu\text{m}$ 的切片。选取薄而均匀的切片制成装片,临时观察用水合氯醛、甘油装片。半永久片用甘油明胶装片,永久片经脱水处理后用中性树胶封藏。

如组织中含有蛋白质成分,将动物切片滴加苦味酸液,组织即被染成黄色;滴加 Millon 试剂,组织即被染成橙红色。如组织中含有角蛋白,可将切片用橙黄 G-甲曙红-苯胺蓝染液染 5~10 min,水洗后,经脱水、透明,用甘油明胶或用加拿大树胶封藏,角蛋白被染成蓝色,角质蛋白被染成金黄色,角质透明蛋白被染成紫色。

③粉末制片法。动物角类药材的粉末制片,一般过 80~100 目筛后,用稀甘油或水合氯醛装片,即可观察其组织结构。如不易观察其细胞轮廓时,可沿盖玻片边沿滴加 5% 氢氧化钾溶液一滴,按粉末制片方法制作显微粉末片。

3. 中药显微标本常观察的细胞壁、细胞后含物

植物是由细胞构成的,在细胞由初生壁发展成次生壁过程中,其细胞壁发生了各种变化,常见的有薄壁细胞壁、木化细胞壁、木栓化细胞壁和纤维素细胞壁,掌握这些细胞壁的显微化学反应,对于判断细胞壁的类型是十分必要的。在生长过程中细胞的一些代谢产物会聚集在细胞腔中,形成了细胞的后含物,常见的有晶体、黏液质、挥发油及各类化学成分。

(1) 细胞壁

植物细胞壁是存在于植物细胞外围的一层厚壁,是区别于动物细胞的主要特征之一。由胞间层、初生壁、次生壁三部分构成。主要成分为多糖物质。细胞壁参与维持细胞的一定形态、增强细胞的机械强度,并且还和细胞的生理活动有关。部分植物细胞在停止生长后,其初生壁内侧继续积累的细胞壁层,位于质膜和初生壁之间。细胞壁内填充和附加了木质素,可使细胞壁的硬度增加,细胞群的机械力增加。

①薄壁细胞壁。胞壁薄、未木质化的组成植物基本组织的生活细胞类型。具有许多重要功能,如光合作用、贮藏、分泌等。

②木化细胞壁。细胞壁内填充和附加了木质素,可使细胞壁的硬度增加,细胞群的机械力增加。这样的填充木质素的过程就叫作木质化。

③木栓化细胞壁。细胞壁中增加了脂肪族化合物木栓质,它是一种简化的细胞,不易透气,也不易逐水,所以造成最后细胞内的原生质体完全消失。这样的填充脂肪族化合物的过程就叫作木栓化。

④纤维素细胞壁。细胞骨架的第三种纤维结构称作中等纤维或中间纤维(intermediate filament, IF),又称中间丝,为中空骨状结构,直径介于微管和微丝之间,其化学组成比较复杂,在不同细胞