




卫生部“十一五”规划教材

全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校配套教材·供药学类专业用

生药实验指导

主 编 刘塔斯

 人民卫生出版社

卫生部“十一五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材
全国高等学校配套教材
供药学类专业用

生药实验指导

主 编 刘塔斯

编者（以姓氏笔画为序）

王天志（四川大学华西药学院）	张朝晖（江苏大学药学院）
刘塔斯（湖南中医药大学）	陈 旭（桂林医学院）
毕志明（中国药科大学）	陈道峰（复旦大学药学院）
李玉山（沈阳药科大学）	陈随清（河南中医学院）
李晓波（上海交通大学药学院）	秦路平（第二军医大学）
李新中（中南大学湘雅医学院）	高建平（山西医科大学）
杨东辉（北京大学药学院）	郭巧艳（第二军医大学）
张长弓（华中科技大学同济医学院）	蔡少青（北京大学药学院）

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

生药实验指导/刘塔斯主编. —北京:
人民卫生出版社, 2007. 8

ISBN 978 -7 -117 -09030 -8

I : 生… II . 刘… III . 生药实验 - 高等
学校 - 教材 IV . R93 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 111257 号

生药实验指导

主 编: 刘塔斯

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010 - 67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010 - 67605754 010 - 65264830

印 刷: 北京蓝迪彩色印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 11

字 数: 254 千字

版 次: 2007 年 8 月第 1 版 2007 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978 -7 -117 -09030 -8/R · 9031

定 价: 17.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010 - 87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

前 言

《生药实验指导》是卫生部“十一五”规划教材《生药学》(第5版)的配套教材。其编写计划是紧密配合新版教材内容制订的,分别由主编、副主编及有关院校编委审阅编写后由主编汇总、定稿。

全书主要由第一、二篇及附录组成。

第一篇为方法与技术,主要内容为生药的基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定,生物鉴定的基本方法与技术,突出了生药品种和质量鉴定方法的基本原理、基本技能、基本技术。

第二篇为实验部分,共有37个实验,实验教学内容紧扣教材,根据教学及市场的需要,我们加强了生药的性状鉴别,强调了以理化鉴别方法学的学习为主,我们根据近年来各院校实验教学改革的需要,增加了设计性与综合性实验,旨在加强培养学生的系统学习、主动学习和创造性的学习,使其动手能力、分析问题和解决问题的能力得到提高,以适应新世纪药学事业发展的需要。这些实验教学内容可供4~7年制的药学学生使用,各院校可根据实际教学条件和教学计划的调整选择实验。

附录主要包括试剂、试纸的配制与制备,化学成分的预试方法,显微镜的应用与清洁等,供学生课前预习和课后复习参考。

本书内容丰富,比较全面系统,适用性广,可供医药院校药学专业、制药专业、药物制剂专业、营销专业本科及各个教育层次的学生使用,也可供相关专业研究生使用,是从事药学工作各类专业人员及医药工作爱好者的参考工具书。

在编写过程中,由于时间仓促和水平有限,教材中难免存在缺点和错误,敬请批评指正。

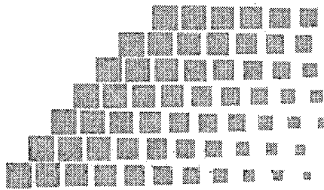
编者

2007年5月

目 录

生药实验规则	1
第一章 方法与技术	3
一、药材取样法	3
二、药材检定通则	3
三、原植物鉴定	5
四、生药性状鉴别	5
五、生药显微鉴别	7
六、显微描绘及绘图技术	14
七、中成药的显微鉴别	20
八、理化鉴定	22
九、生物技术鉴别	41
十、生药指纹图谱的制定	44
十一、生药质量标准的制定	46
十二、中药制剂质量标准的制定	48
第二章 实验	51
实验1 显微测微技术	51
实验2 显微描绘技术	53
实验3 生药水分及灰分测定	54
实验4 生药浸出物及挥发油含量测定	56
实验5 生药的薄层色谱鉴定	58
实验6 生药的化学定性鉴别	60
实验7 藻、菌、蕨类及裸子植物生药	63
实验8 双子叶植物生药(1)	67
实验9 双子叶植物生药(2)	69
实验10 双子叶植物生药(3)	73
实验11 双子叶植物生药(4)	75
实验12 双子叶植物生药(5)	79
实验13 双子叶植物生药(6)	82
实验14 双子叶植物生药(7)	85
实验15 双子叶植物生药(8)	87
实验16 双子叶植物生药(9)	90

实验 17	双子叶植物生药 (10)	93
实验 18	双子叶植物生药 (11)	98
实验 19	双子叶植物生药 (12)	101
实验 20	双子叶植物生药 (13)	105
实验 21	双子叶植物生药 (14)	108
实验 22	双子叶植物生药 (15)	111
实验 23	双子叶植物生药 (16)	114
实验 24	单子叶植物生药 (1)	116
实验 25	单子叶植物生药 (2)	120
实验 26	动物类生药 (1)	123
实验 27	动物类生药 (2)	126
实验 28	矿物类生药	129
实验 29	蛋白电泳鉴别	130
实验 30	中成药的显微鉴定 (综合性实验)	132
实验 31	中成药的鉴别 (综合性实验)	134
实验 32	生药的含量测定——高效液相色谱法	136
实验 33	生药的含量测定——气相色谱法	138
实验 34	生药的含量测定——紫外分光光度法	139
实验 35	生药的含量测定——薄层扫描法	140
实验 36	未知生药混合粉末的鉴别 (设计性实验)	141
实验 37	生药的质量标准制定 (综合性实验)	142
附录		145
附录 1	显微镜的使用及其清洁	145
附录 2	常用试剂及其配制法	148
附录 3	常用试纸的制备法	156
附录 4	各类化学成分鉴定方法	157
附录 5	偏光显微镜的使用	161
附录 6	中药质量标准分析方法验证指导原则	164
参考文献		168



生药实验规则

【实验目的】

实验目的是使学生通过实践加深理解,复习巩固课堂所学理论,学会鉴定生药的真伪、优劣的方法,通过基本理论的学习和基本技术的训练,掌握生药的经验鉴别方法和现代科学的鉴别方法,培养实际的工作能力和严肃认真的科学态度。

【实验主要内容】

1. 原植(动)物鉴定 主要鉴定生药的植(动)物来源,即生药来源的科名、属名、种名,应用植、动物分类的方法,对植、动物各器官进行鉴定,确定其分类地位与学名。

2. 性状鉴定 应用现代科学方法,结合经验鉴别方法,主要用眼看、手摸、鼻闻、口尝、水试、火试等手段,鉴别生药的形、色、气、味、质地、断面等特征,判断生药真伪和优劣。

3. 显微鉴定 是指将生药制成不同的显微制片,用显微镜观察其组织构造、细胞形状以及内含物的特征,判断生药真伪的鉴定方法。

4. 理化鉴定 是指利用生药所含的某种或某类化学成分,通过其物理或化学性质来鉴定生药的真伪、优劣的一种重要鉴定方法。

【实验注意事项】

(一) 实验前的准备工作

1. 根据实验进度表,预习与实验有关的课堂讲授内容,并阅读指定的参考文献。

2. 仔细阅读实验的内容,要求弄清实验的原理、方法及操作步骤。

3. 对于需同时进行的几项实验,预先思考实验的先后次序,以便实验时心中有数,不忙乱,不拖拉。

4. 准备好各种自备的实验用品,如铅笔(H、HB各1支)、橡皮擦、直尺、报告纸等。

(二) 实验中的要求

1. 遵守实验室规则,保持实验室安静。

2. 实验认真,观察仔细,真实记录。

3. 由于实验时间有限,实验时应当妥善安排好自己的工作,注意力应集中在主要的问题上,不要花很多时间去钻研一些次要问题,一时解决不了的次要问题,可留待课外时间去解决。

4. 实验开始前,教师进行讲解和提问时,应当注意听取,并做必要的记录。

5. 在实验过程中,应当随时将观察所得现象、测量和称量的数据及结果等写在报告纸上;应当养成能随时做出准确、清楚、整齐的记录而不需要誊抄的良好习惯,测量及称量数据,禁止用另外纸片记录。

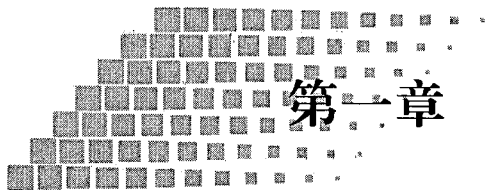
(三) 实验完毕时的要求

1. 按照教师指定时间交实验报告。

2. 把实验用仪器、用具等收拾干净放在指定的位置,实验桌面上应随时保持整洁,非实验必要物品一律不许放在桌面或桌架上。

3. 值日生负责最后清扫实验室地面、清理桌面、擦净黑板及指定的其他工作,污物缸内废物到达缸高度 $1/2$ 以上时,应及时清除。

4. 实验完毕时,应检查水源、电源是否关好,离开实验室前应关好门窗。



第一章 方法与技术

一、药材取样法

从大量样品中取出少量样品进行分析,称为取样。取样必须注意要有科学性、真实性、代表性。其基本原则是均匀、合理。一般应该注意:

1. 取样前,应注意品名、产地、规格等级及包件式样是否一致,检查包装的完整性,清洁程度以及有无水渍,霉变或其他物质污染等情况,详细记录。凡有异常情况的包件,应单独检验。

2. 从同批药材包件中抽取检定用样品,原则如下:药材总包件数在 100 件以下的,取样 5 件;100~1 000 件,按 5% 取样;超过 1000 件的,超过部分按 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。

3. 对破碎的、粉末状的或大小在 1cm 以下的药材,可用采样器抽取样品,每一包件至少在不同部位抽取 2~3 份样品,包件多的,每一包件的取样量一般按下列规定:一般药材 100~500g,粉末状药材 25g,贵重药材 5~10g,个体大的药材,根据实际情况抽取代表性的样品。如药材的个体较大时,可在包件不同部位(包位大的应从 10cm 以下的深处)分别抽取。

4. 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,依对角线划“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。

二、药材检定通则

药材的检定包括“性状”、“鉴别”、“检查”、“浸出物测定”、“含量测定”等项目。检定时应注意下列有关的各项规定。

1. 取样应按上述“药材取样法”的规定进行。

2. 为了正确检定药材,必要时可用符合《中国药典》规定的相应药材标本作对照。

3. 供检定的药材如已切碎,除“性状”项已不完全相同外,其他各项应符合规定。

4. “性状”系指药材的形状、大小、色泽、表面特征、质地、断面(包括折断面或切断面)特征及气味等。

(1) 形状是指干燥药材的形态。观察时一般不需预处理,如观察很皱缩的全草、叶或花类,可先浸湿使软,展平。观察某些果实、种子时,如有必要可浸软后,取下果皮或种皮,以观察内部特征。

(2) 大小是指药材的长短、粗细(直径)和厚度。一般应测量较多的供试品,可允许有少量高于或低于规定的数值。测量时可用毫米刻度尺。对细小的种子,可放在有毫米方格线的纸上,每10粒种子紧密排成一行,测量后求其平均值。

(3) 药材的色泽,一般应在日光灯下观察。如用两种色调复合描述色泽时,以后一种色调为主。例如黄棕色,即以棕色为主。

(4) 观察表面特征、质地和断面时,供试品一般不作预处理。如折断面不易观察到纹理,可削平后进行观察。

(5) 检查气味时,可直接嗅闻,或在折断、破碎或搓揉时进行。必要时可用热水湿润后检查。

(6) 检查味感时,可取少量直接口尝,或加开水浸泡后尝浸出液。有毒的药材如需尝味时,应注意防止中毒。

5. “鉴别”系指检定药材真实性的方法,包括经验鉴别、显微鉴别及理化鉴别。

(1) 经验鉴别系指用简便易行的传统方法观察颜色变化、浮沉情况以及爆鸣、色泽等特征。

(2) 显微鉴别系指用显微镜观察药材切片、粉末或表面等的组织、细胞特征。照药材及成方制剂显微鉴别法项下的方法制片观察。

(3) 理化鉴别系指用化学或物理的方法,对药材中所含某些化学成分进行的鉴别试验。

1) 如用荧光法鉴别:将药材(包括断面、浸出物等)或经酸、碱处理后,置紫外光灯下约10cm处观察所产生的荧光。除另有规定外,紫外光灯的波长为365nm。

2) 如用微量升华法鉴别:取金属片,置石棉网上,金属片上放一高约8mm的金属圈,圈内放置适量药材粉末,圈上覆盖载玻片,在石棉网下用酒精灯缓缓加热,至粉末开始变焦,去火待凉,载玻片上有升华物凝集。将载玻片反转后,置显微镜下观察结晶形状、色泽,或取升华物加试液观察反应。

3) 光谱和色谱鉴别:常用的有紫外-可见分光光度法、红外分光光度法、薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱法等。

6. “检查”系指对药材的纯净程度、有害或有毒物质进行的限量检查,包括水分、灰分、杂质、毒性成分、重金属及有害元素、农药残留量等。

7. “浸出物测定”系指用水或其他适宜的溶剂对药材中可溶性物质进行测定的方法。进行测定时,需要粉碎的药材,应按各该项下规定的要求粉碎过筛,并注意混合均匀。

8. “含量测定”系指用化学的、物理的或生物的方法,对药材含有的有效成分、指标成分或类别成分进行的测定,包括挥发油及主成分的含量、生物效价测定等。测定方法

常用光谱法和色谱法等。检查和测定的方法按各药材项下规定的方法或指定的有关的方法进行。

三、原植物鉴定

应用植物学(或动物学或矿物学)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、果实和种子,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,对一些鉴定品种特别重要的器官形态,作重点观察。如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,可以查阅有关的植物分类学方面的文献,加以分析对照,如《中国植物志》、《中国高等植物图鉴》、《中国药用植物志》、《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。所查文献在主要鉴别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,能与模式标本(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。

四、生药性状鉴别

生药的性状鉴别主要采用眼看、手摸、鼻闻、口尝、水试、火试等简便的方法进行。

1. 生药性状鉴别的内容

(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,是鉴别真伪的重要依据之一。如根类药材有圆形、圆锥形、纺锤形等;皮类药材的卷筒状、板片状等;种子类药材有圆球形、扁圆形等。老药工对药材的经验鉴别有丰富的经验。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1mm方格的纸上,每10粒紧密排成一行,测量后求其平均值。

(3) 颜色:各种药材的颜色是不相同的,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,也预示质量发生了变化。很多药材的色调不是单一的,而是复合的色调。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。这些特征的有无和存在情况,常是鉴别药材的重要依据,应仔细观察。

(5) 质地:是指药材的软硬、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;含淀粉多的药材如经蒸煮加工,则因淀粉糊化,干燥后而质地坚实如白芍。在经验鉴别中,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平坦,还是显纤维性、颗粒性或裂片状,断面有无胶丝等。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性。用刀片切成横切面,以便观察皮部与木部的比例、维管束的排列形状、射线的分布以及异型构造等。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。

(7) 气味:药材独特的气与味,是直接以鼻闻和口尝而鉴别的。含挥发性物质的药材,大多有特殊的香气,如肉桂、薄荷、丁香等。阿魏气臭,鱼腥草气腥,气不明显的药材,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,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,取量要少。

(8) 水试:利用某些药材在水中的特殊现象来鉴别药材,如秦皮水浸液具蓝绿色荧光;车前子水浸泡,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;牛黄的水浸液染指甲而习称为“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、响声等来鉴别药材。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别注意点

(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,断面不呈放射状。

(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成环圈状。

(3) 茎类药材:草质茎干缩后因维管束或机械组织的存在,常形成纵向隆起的棱线及凹沟;木质茎表面较粗糙,木栓层时有纵横裂纹,皮孔易察见。双子叶植物茎的横

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(示含油室),也有折断时有胶丝状物相连或有粉尘等。

(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;有的在扩大镜下可见腺鳞;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,花各部分的形状色泽、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:观察果的类型、形状、大小、颜色、顶部、基部、表面和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。剥去种皮后,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,子叶富油质或粉性,有胚乳种子的内胚乳有的富油质,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别点进行鉴定。

五、生药显微鉴别

利用显微镜来观察生药的组织构造、细胞形状及其内含物或其他特征,鉴别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,以及粉末生药。

鉴别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。显微鉴别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,根据切片的部位不同,又分为横切片、径向纵切片、切向纵切片等。下面介绍实验室几种常用的制片方法:

(一) 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别标本片的方法。此法是鉴别

生药最常用方法之一,简便快速,主要鉴别细胞的形态特征。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,将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,滴加水合氯醛液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干,再滴加水合氯醛液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,用镊子夹干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。或取粉末置小烧杯中,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。

(二) 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 取材料用刀片在表面轻轻浅划一刀,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,可带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 用于扁平而薄又难撕取表皮的材料。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2~5mm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。

(三) 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2mm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。具体方法如下:

1. 氢氧化钾法 主用于软或稍硬的材料,也适于薄壁组织多,木化程度低的生药。

将约2mm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能离散,材料较软呈透明状(一般约需10~20min),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,并在火焰上或沸腾水浴中加热,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5~15min即可,应视材料的硬度和木化程度而定。至用玻棒挤压材料能离散为止,即可。注意,每次投入的氯酸钾不可过多,温度不宜太高。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1~2ml浓硝酸小试管中,在酒精灯上加热至微沸,见材料上下翻腾,起泡即可。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。

(四) 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,必须很好掌握,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20~30min。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12~24h后均可吸湿软化,以供切片用。新鲜材料两端削平,切成宽不超过1cm,长不超过3cm为宜。切成长约2~5cm的小段,切面削平。

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。

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,防止气泡的产生,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的干净,以保证能清晰观察显微特征。

(五) 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。

(1) 软化材料:60℃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。

(2) 切片:调整切片刀,使刀口与材料切面平行,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。供做永久切片的,则作染色处理。

(3) 脱水及染色:步骤如下:

1) 将完整的切片置清洁的载玻片上,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。

2) 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。

3) 固绿染色液1~2滴,约1min。如上法加无水乙醇2~3次,倾之后,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,纯二甲苯,到纯二甲苯如有混浊,须退回95%酒精再脱水透明,直至切片透明清晰为止。

(4) 封片:在切片上滴加一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,以去除水分,然后小心夹住盖玻片轻盖在切片上。

(5) 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,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→透明→封藏。

(1) 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 ,端面切平。

(2) 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	90ml
冰醋酸	5ml
甲醛	5ml

(3) 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% 乙醇洗涤 3 ~ 4 次或更多。

(4) 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 ~ 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 ~ 2h,过于坚硬的材料 3 ~ 4h,无水乙醇中需 2 次,每次 1h,以利将水脱净,若脱水不彻底,石蜡不能溶入组织中,从而使制片失败。

(5) 透明:用二甲苯作为透明剂,以使材料透明,便于浸蜡。常见的透明剂为二甲苯,在透明过程中,为防止材料收缩变脆,应由低浓度到高浓度分级进行,一般用:1/3 二甲苯 + 2/3 纯乙醇 → 1/2 二甲苯 + 1/2 纯乙醇 → 2/3 二甲苯 + 1/3 纯乙醇 → 纯二甲苯 → 纯二甲苯。材料经各级溶剂的时间一般为约 30min。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。

(6) 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 ~ 3h) → 1/2 二甲苯 + 1/2 石蜡(2 ~ 3h) → 1/4 二甲苯 + 3/4 石蜡(2 ~ 3h) → 纯石蜡(2 ~ 3 次),每次 2 ~ 4h。

(7) 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,使其凝固。其他的生药,可将熔化的石蜡倾入折好的纸盒中,在纸盒底层石蜡稍凝固时,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。

(8) 切片:将包埋有材料的蜡块切成适当大小(1cm),黏固于小木块上,并将石蜡碎屑熔粘于石蜡块四周,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,材料纵轴与刀口平直,否则切片不正,移动夹刀使石蜡块表面刚贴近刀口,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。

(9) 粘片:在洁净的载玻片上涂一小滴粘附剂(1% 甘油明胶溶液),涂匀,将蜡片放在液面上,置于烫片台上(50 $^{\circ}\text{C}$),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 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中一天。切片一般竖放,放于切片篮中,烘片。

(10) 脱蜡:将粘有蜡片的玻片浸于纯二甲苯中,约 10 ~ 15min,使材料组织中浸入的石蜡全部溶去,以便染色。

(11) 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 纯乙醇 → 纯乙醇 → 95% → 80% → 70% → 60% 乙醇(每级 1 ~ 2min) → 番红溶液(2 ~ 24h) → 50% → 60% → 70% → 80% → 95% 乙醇(每级 2min) → 固绿溶液(1min),取出擦净残留液体,检查木化组织是否为红色,薄壁组织是否染成绿色 → 95% 乙醇 → 纯乙醇(30s) → 纯乙醇(1 ~ 2min) → 1/2 纯酒精 + 1/2 二甲苯(3min) → 二甲苯(3min) → 二甲苯(5 ~ 30min) → 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。