

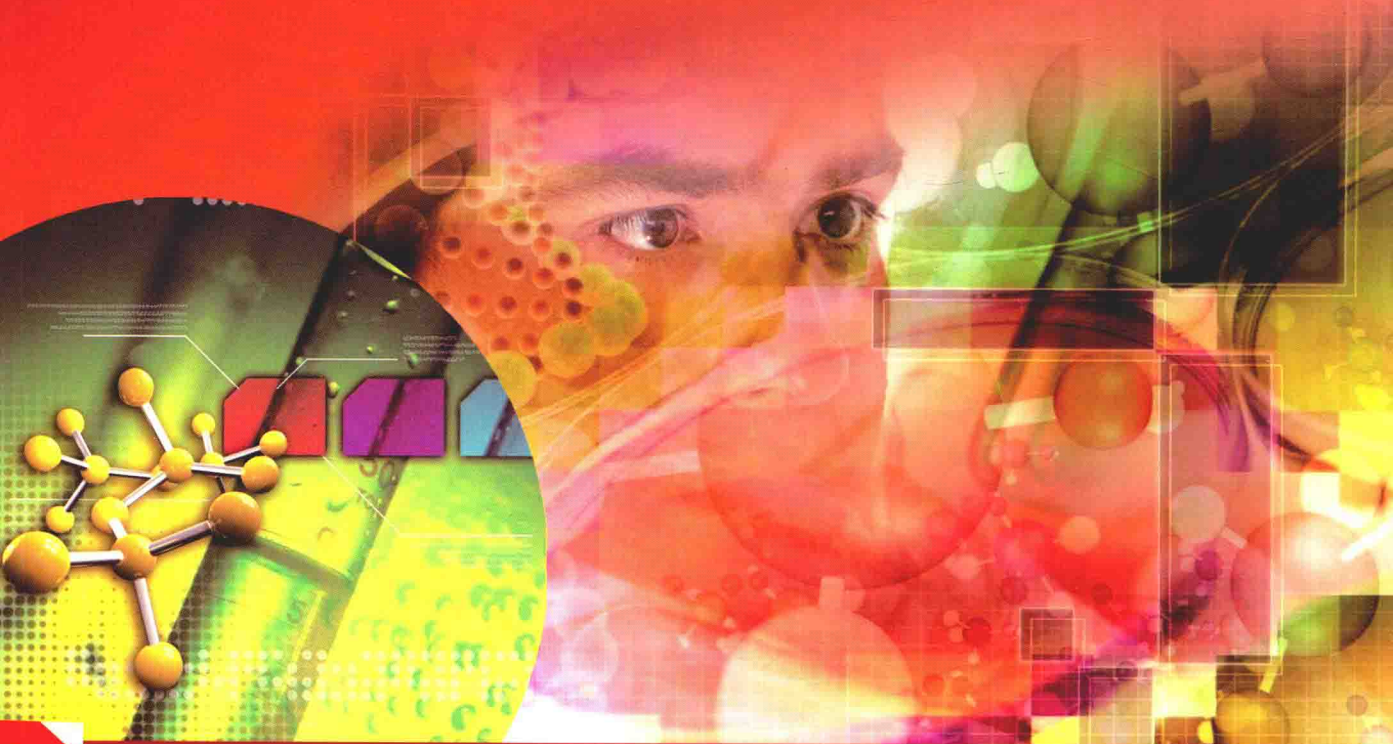


中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

供药学、临床药学、中药学等相关专业使用

药学综合实验指导

主编 李悦山 张超



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

供药学、临床药学、中药学等相关专业使用

药学综合实验指导

主 编 李悦山 张 超
副主编 郑国栋 张建业 陶移文
周 毅 吴文浩
编 委 (按姓氏笔画排序)
王 声 韦敏燕 孙明娜
杜玲然 李 欣 李悦山
吴文浩 张 羽 张 超
张建业 周 毅 郑国栋
郑雪花 陶移文

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

药学综合实验是为药学类专业开设的一门系统的综合性新实验课程。本书分为上下两篇,上篇为药学各学科综合实验及研究方法,共12个实验,包含生药学、药物化学、药物分析、药物制剂、药物代谢动力学、药理学、生物药学各药学科项下的实验内容;下篇为药学专业综合实验,共9个实验,从药物研发角度开展实验研究,突出体现药学多学科间相互交叉渗透、相互融合的特点,着重于综合实验能力的培养。

本书是广州医科大学药学院编写的系列实验教材之一,是对药学本科生实验教学的经验总结,可供药学、临床药学、中药学等相关专业本科生、研究生实验教学使用。

图书在版编目(CIP)数据

药学综合实验指导 / 李悦山, 张超主编. —北京: 科学出版社, 2016.9
中国科学院教材建设专业委员会规划教材 全国高等医药院校规划教材
ISBN 978-7-03-049601-0

I. ①药... II. ①李... ②张... III. 药理学-实验-医学院校-教学参考资料
IV. ①R9-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 195880 号

责任编辑: 胡治国 周 园 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

大厂书文印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年9月第一版 开本: 787×1092 1/16

2016年9月第一次印刷 印张: 9 1/2

字数: 266 000

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

随着科技进步、学科发展及社会对专业人才的需求，高等学校的教学改革需要不断探索和创新。培养学生综合素质和创新能力是高等教育适应现代经济社会发展，提高人才培养质量的总体目标，教学研究和教学改革是推进教学发展和提高教学质量的永恒主题。随着现代医药类专业教育模式的转变，药学类专业人才培养中需要多学科交叉，实验操作能力、知识的应用和实践能力是其突出特点。实验教学的课程体系、教学内容、教学要求及教学手段均发生了很大的变化，新理论、新技术、新方法不断出现并进入教学内容，学科间相互交叉渗透、相互融合进一步深化。因此教学理念的更新和重视实践教学改革的实现高层次人才培养的前提，加强实践教学环节是培养药学及相关专业学生综合素质和操作技能、动手能力和综合实践能力的重要保证。在多年药学专业实践教学经验总结的基础上，我们创新性地提出了建立药学综合实验课程并单独开课，规划课程和组织教学首先要有教材的建设，实践教学的教材编写直接影响高层次人才培养的质量。

在药学类专业教学体系中，在药类专业课结束后，开始进行毕业论文设计和毕业实习前，开设药学综合实验课程。从实验教学体系、内容、手段和方法的改革等方面总体设计探讨综合实验，有利于引导学生开展专题讨论，对已学知识和实践能力进一步巩固和加强，设计实验研究课题，完成综合实验项目，最终目的是引导学生开展毕业论文设计。

遵循教材建设的“三基”（基本理论、基本知识、基本技能）、“五性”（思想性、科学性、先进性、启发性、适用性）原则；注重创新能力和实践能力的培养，突出药学类专业特点，为学生知识、素质、能力协调发展创造条件；在药类专业层面体现跨学科的综合实验、综合操作技能训练，以新药研究思路将多学科领域中的实验技术、实验原理、操作技能等联系整合，通过专题研究和实验拓展学生的视野。对学生的要求也进一步提高，自主设计实验需要查阅文献，通过实验发现问题，组织团队合作，解决实际问题等。使实验室资源得到充分利用，并配合了国家级和省级药学实验教学示范中心的建设，促进了教学研究的发展和药学类专业仿真实验室建设。

全教材由上篇药学各学科综合实验及研究方法和下篇药类专业综合实验两部分组成，共21个综合实验项目。教材中不仅有我们近十年来的教学实践体会，而且部分实验，如陈皮、千金子等内容还包含我们的一些科研成果的总结和应用，是一部比较完整的药学类综合实验教材，对相关院校药专业实验教学有一定的参考意义，希望能受到使用者的欢迎。

本教材的编写及药学综合实验新课程体系的建立与实践研究课题受到广东省教育厅和广州市教育局有关项目的资助。教材编者均来自教学一线，涉及药学类专业各主要学科，对药学教学有丰富的经验，但各人对教学改革和综合实验教学模式的认识有所不同，教材中存在不足之处，衷心希望在本教材的使用过程中不断得到各方面的反馈信息，以便再版时修订、完善。

李悦山 张 超

2016年6月10日

目 录

上篇 药学各学科综合实验及研究方法

实验一 虎杖中蒽醌类化合物的提取分离及鉴定	1
第一节 虎杖的生药学鉴定	1
第二节 虎杖中蒽醌苷元的提取与分离	3
第三节 虎杖中蒽醌苷元的鉴定	4
实验二 陈皮中挥发油及黄酮类化合物的提取分离与测定	6
第一节 陈皮的生药学鉴定	6
第二节 陈皮挥发油的提取和鉴定	7
第三节 陈皮黄酮类成分的含量测定	9
实验三 千金子的生药学鉴定、主要成分及抗肿瘤活性评价	12
第一节 千金子的生药学鉴定	12
第二节 千金子主要成分的提取分离与结构鉴定	13
第三节 千金子单体化合物、流分的抗肿瘤活性研究	15
实验四 盐酸普鲁卡因的合成及含量测定	18
第一节 盐酸普鲁卡因的合成	18
第二节 紫外分光光度法测定盐酸普鲁卡因的含量	20
实验五 苯妥英钠的合成及含量测定	22
第一节 苯妥英钠的合成	22
第二节 苯妥英钠的含量测定	24
实验六 维生素 C 注射液的制备及质量研究	26
第一节 维生素 C 注射液的制备	26
第二节 维生素 C 注射液的质量研究	27
实验七 对乙酰氨基酚片的制备及质量研究	30
第一节 对乙酰氨基酚片的制备	30
第二节 对乙酰氨基酚片的质量研究	31
实验八 传出神经系统药物对血压和血流动力学的影响	34
实验九 对乙酰氨基酚家兔体内的药物动力学研究	37
实验十 人参、藜芦配伍对大鼠肝微粒体酶活性及 P450mRNA 表达的影响	42
实验十一 四环素的定向发酵和效价测定	46
实验十二 猪心辅酶 Q ₁₀ 的提取	49

下篇 药学专业综合实验

实验十三 曲克芦丁的合成、片剂制备和镇痛作用	52
第一节 槐米的生药学鉴定	52

第二节	芦丁的提取与精制	54
第三节	曲克芦丁的合成	55
第四节	曲克芦丁口腔崩解片的制备与质量评价	57
第五节	曲克芦丁片的含量测定	60
第六节	曲克芦丁的镇痛作用	61
实验十四	双氢青蒿素的合成、片剂制备和体内动力学研究	63
第一节	青蒿的生药学鉴定	63
第二节	青蒿素的提取和分离	65
第三节	双氢青蒿素的合成及含量测定	66
第四节	双氢青蒿素片剂的制备	67
第五节	双氢青蒿素在大鼠体内药物动力学研究	70
实验十五	小檗碱的合成、片剂制备和体外抗菌试验	73
第一节	黄连的生药学鉴定	73
第二节	盐酸小檗碱的提取和分离	75
第三节	盐酸小檗碱的合成	77
第四节	盐酸小檗碱及盐酸小檗红碱的含量测定	78
第五节	盐酸小檗碱片剂的制备	79
第六节	盐酸小檗碱的体外抗菌药效实验	82
实验十六	葛根素的提取分离、结构修饰及制剂与活性评价	85
第一节	葛根的生药学鉴定	85
第二节	葛根素的提取分离与鉴定	87
第三节	四乙酰葛根素的合成	89
第四节	四乙酰基葛根素的含量测定	90
第五节	葛根素注射剂的制备及质量评价	91
第六节	葛根素对氧自由基的清除和抗氧化性损伤作用研究	94
实验十七	莪术醇的提取分离、结构修饰及制剂与抗肿瘤活性评价	98
第一节	莪术的生药学鉴定	98
第二节	莪术中莪术醇的提取和鉴定	99
第三节	莪术醇磷酸酯单钠盐的合成	101
第四节	莪术醇亚微乳的制备与表征	103
第五节	莪术醇的体外抗肿瘤活性评价	106
实验十八	贝诺酯的合成与分析、分散片的制备与质量评价及药效学作用	109
第一节	贝诺酯的合成	109
第二节	贝诺酯的分析	111
第三节	贝诺酯分散片的制备与质量评价	113
第四节	贝诺酯的解热镇痛药效学研究	115
实验十九	酮洛芬及酮洛芬异丙酯的合成、含量测定、制剂及药效学作用	118

第一节	酮洛芬异丙酯(消旋体)的合成	118
第二节	酮洛芬异丙酯原料药的含量测定	120
第三节	酮洛芬异丙酯透皮制剂的制备与质量评价	121
第四节	酮洛芬异丙酯对实验动物的解热镇痛抗炎作用	125
实验二十	磺胺嘧啶锌的合成、含量测定、栓剂制备及药敏实验	128
第一节	磺胺嘧啶锌的合成	128
第二节	磺胺嘧啶锌的含量测定	130
第三节	磺胺嘧啶锌栓剂的制备与质量评价	131
第四节	磺胺嘧啶锌的药敏实验	134
实验二十一	硝苯地平的合成、杂质检查、缓释片制备及体内药动学研究	137
第一节	硝苯地平的合成	137
第二节	HPLC 法进行硝苯地平有关物质的检查	138
第三节	硝苯地平缓释片的制备与评价	140
第四节	硝苯地平缓释片的体内药动学和生物利用度评价	142

上篇 药学各学科综合实验及研究方法

实验一 虎杖中蒽醌类化合物的提取分离及鉴定

虎杖为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根。春、秋二季采挖，除去须根，洗净，趁鲜切短段或厚片，晒干。分布于西北、华东、华中、华南及西南等地，主含羟基蒽醌类成分及二苯乙烯类成分，主要有大黄素、大黄素甲醚、大黄酚和白藜芦醇等。

虎杖具有祛风利湿，散瘀定痛，止咳化痰等功效，用于关节痹痛、湿热黄疸、经闭，症瘕、水火烫伤、跌扑损伤、疮痍肿毒、咳嗽痰多。现代药理研究表明，虎杖还具有抗菌、抗病毒等作用。

本实验设计了 3 个内容，包括虎杖的生药学鉴定，虎杖中蒽醌苷元的提取与分离及虎杖中蒽醌苷元的鉴定。在教学过程中，可根据实际情况采用。

第一节 虎杖的生药学鉴定

一、实验目的

- (1) 掌握虎杖的性状与显微特征。
- (2) 熟悉根类及根茎类药材的鉴别要点。

二、实验原理

本实验参考《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015 版一部收载的虎杖药材的质量标准，根据药材的性状特征、显微特征及理化特征，对虎杖药材进行准确的鉴定。

三、仪器与材料

(一) 仪器

普通光学显微镜、超声波提取器、紫外灯、打粉机、薄层层析缸、点样毛细管、载玻片、盖玻片、硅胶 G 薄层板、量筒、移液管等。

(二) 材料与试剂

待鉴定药材、水合氯醛、乙醇、石油醚、甲酸乙酯、乙酸乙酯、甲酸、氯仿、氢氧化钠、蒸馏水、大黄素对照品、大黄素甲醚对照品等。

四、实验内容与步骤

(一) 性状鉴定

本品多为圆柱形短段或不规则厚片，长 1~7cm，直径 0.5~2.5cm。外皮棕褐色，有纵

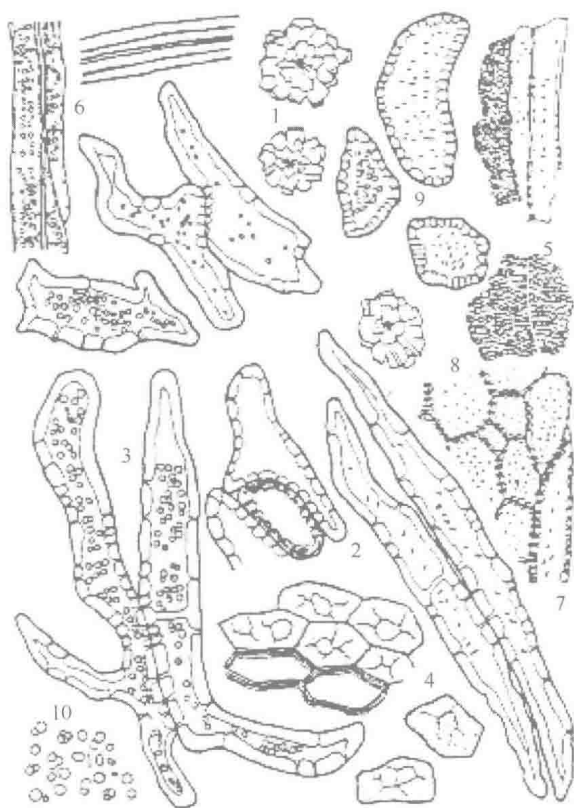


图 1-1 虎杖的粉末特征

1. 草酸钙簇晶; 2. 皮层纤维; 3. 分枝状石细胞; 4. 木栓细胞; 5. 具缘纹孔导管碎片; 6. 韧皮纤维; 7. 木纤维; 8. 木射线细胞; 9. 石细胞; 10. 淀粉粒

皱纹和须根痕，切面皮部较薄，木部宽广，棕黄色，射线放射状，皮部与木部较易分离。根茎髓中有隔或呈空洞状。质坚硬。气微，味微苦、涩。

(二) 显微鉴定

本品粉末橙黄色。草酸钙簇晶极多，较大，直径 $30\sim 100\mu\text{m}$ 。石细胞淡黄色，类方形或类圆形，有的呈分枝状，分枝状石细胞常 $2\sim 3$ 个相连，直径 $24\sim 74\mu\text{m}$ ，有纹孔，胞腔内充满淀粉粉粒。木栓细胞多角形或不规则形，胞腔充满红棕色物。具缘纹孔导管直径 $56\sim 150\mu\text{m}$ 。粉末特征见图 1-1。

(三) 理化鉴定

(1) 取本品粉末 5g，加乙醇 25ml，浸渍 2h，滤过，滤液蒸干，残渣加水约 5ml，充分搅拌，取上清液，加氯仿 10ml，振摇提取，分取氯仿液，蒸干，加氢氧化钠试液 2 滴，显樱红色。

(2) 取(1)项下氯仿提取后的水液，加乙酸乙酯 10ml，振摇提取，分取乙酸乙酯液，蒸干，残渣加水约 5ml，再用乙醚 5ml 提取。分取乙醚液，挥干，残渣加乙醇 1ml 使溶解，取少量点于滤纸上，晾干，置紫外光灯(365nm)下观察，显亮蓝色荧光；取水层，加三氯化铁试液 2 滴，显污绿色。

(3) 取本品粉末 0.1g，加甲醇 10ml，超声处理 15min，滤过，滤液蒸干，残渣加 2.5mol/L 硫酸溶液 5ml，水浴加热 30min，放冷，用三氯甲烷振摇提取 2 次，每次 5ml，合并三氯甲烷液，蒸干，残渣加三氯甲烷 1ml 使溶解，作为供试品溶液。另取大黄素对照品、大黄素甲醚对照品，加甲醇制成每毫升各含 1mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法(TLC)(《中国药典》2015 年版四部通则 0502)实验，吸取供试品溶液 $4\mu\text{l}$ 、对照品溶液各 $1\mu\text{l}$ ，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点；置氨蒸气中熏后，斑点变为红色。

五、注意事项

(1) 理化鉴定(1)项中，上清液用氯仿萃取时，应避免用力振摇，防止出现乳化现象，影响分离效果。

(2) 理化鉴定(1)项中，乙醇浸渍提取时间较长，可采用超声提取替代，同法处理，实验结果亦好。

六、讨论与思考

(1) 根与根茎类药材的性状与显微鉴别的要点是什么？

(2) 如何克服乳化现象？

(3) 粉末鉴定观察淀粉粒时，为何用水装片而不用水合氯醛装片？

参 考 文 献

国家药典委员会. 2015. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社
衣洪福. 2002. 虎杖的质量研究. 上海: 第二军医大学

第二节 虎杖中蒽醌苷元的提取与分离

一、实 验 目 的

- (1) 掌握 pH 梯度萃取法分离酸性成分的方法。
- (2) 熟悉脂溶性成分和水溶性成分分离的方法。

二、实 验 原 理

本实验根据虎杖中的羟基蒽醌类化合物(图 1-2)及二苯乙烯类成分均可溶于乙醇, 故采用乙醇将它们提取出来。羟基蒽醌类苷元成分能溶于乙醚等弱亲脂性溶剂, 采用乙醚使苷元和苷类成分分离, 又利用羟基蒽醌类化合物酸性强弱不同, 用 pH 梯度萃取法进行分离。

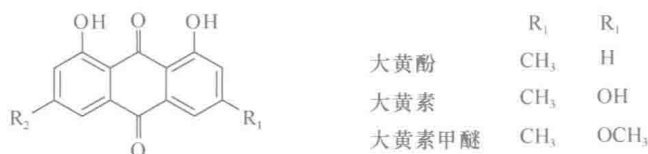


图 1-2 虎杖中主要的蒽醌类成分

- (1) 大黄酚: 金黄色片状结晶(丙酮)或针状结晶(乙醇), 能升华。可溶于苯、氯仿、乙酸、乙醇、NaOH 水溶液, 不溶于水。
- (2) 大黄素: 橙黄色针状结晶, 能升华, 易溶于乙醇, 可溶于 NH₄OH、Na₂CO₃ 和 NaOH 水溶液, 几乎不溶于水。
- (3) 大黄素甲醚: 砖红色针状结晶, 能升华, 易溶于 NaOH 溶液, 可溶于苯、氯仿、吡啶、甲苯, 不溶于水。

三、仪 器 与 材 料

(一) 仪 器

烘箱、旋转蒸发仪、圆底烧瓶、烧杯、量筒、冷凝管、锥形瓶、抽滤瓶、布氏漏斗等。

(二) 材 料 与 试 剂

虎杖药材、滤纸、乙醇、乙醚、氢氧化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、盐酸、蒸馏水等。

四、实 验 内 容 与 步 骤

- (1) 虎杖中蒽醌类成分的提取。
- (2) 游离蒽醌苷元的分离。
- (3) 不同酸性蒽醌苷元的分离(pH 梯度萃取)。

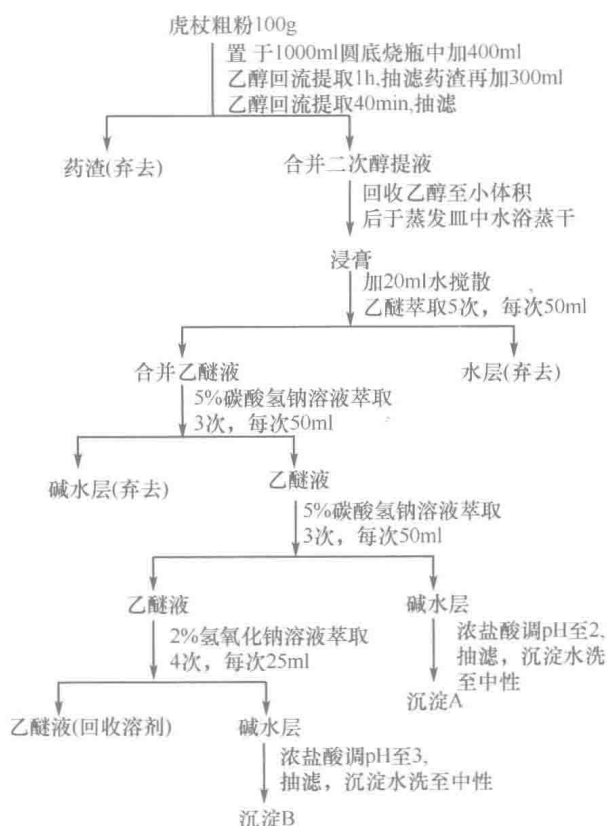


图 1-3 虎杖中茵蓎苷元的提取与分离流程图的原因。

提取与分离流程图见图 1-3。

五、注意事项

- (1) 药材醇提浸膏在回收乙醇时务必回收完全, 以免因乙醇残留而影响后面的萃取过程。
- (2) 两相萃取时, 不可猛力振摇, 只能轻轻旋转摇动, 以免造成严重乳化现象而影响分层。
- (3) 沉淀抽滤时, 可用双层滤纸抽滤, 防止抽滤过程中因滤纸破裂而造成样品损失。
- (4) 得到的沉淀 A、B 应适当干燥后称重, 并计算各自收率。

六、讨论与思考

- (1) 什么是 pH 梯度萃取法, 适用于哪些物质的分离? 试分析本次试验中 pH 萃取法应该注意哪些事项?
- (2) 回流提取及常压蒸馏回收溶剂之前, 为什么加入沸石?
- (3) 试分析本次试验中沉淀 A、B 收率高低的原因。

参考文献

吴立军. 2011. 天然药物化学. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社

第三节 虎杖中茵蓎苷元的鉴定

一、实验目的

- (1) 掌握茵蓎类成分的理化鉴别方法。
- (2) 熟悉茵蓎类成分的性质。

二、实验原理

本实验根据从虎杖中制备得到的化合物主要是羟基茵蓎类成分, 故分别采用茵蓎类成分的颜色反应及薄层鉴别反应对制备得到的化合物予以鉴别及初步的纯度分析。

三、仪器与材料

(一) 仪器

紫外-可见分光光度仪、紫外灯、薄层层析缸、点样毛细管、硅胶 G 薄层板、试管、量筒、移液管等。

(二) 材料与试剂

乙醇、乙酸镁、石油醚、乙酸乙酯、三氯化铁、大黄素对照品等。

四、实验内容与步骤

(一) 颜色反应

取以上沉淀 A、B 少量，分别置于二支试管中，加 10ml 乙醇溶解后备用。

(1) 取 A、B 乙醇溶液各 2ml，分别置于二支试管中，加 2%NaOH 溶液数滴，观察颜色变化。

(2) 取 A、B 乙醇溶液各 2ml，分别置于二支试管中，滴加 1%乙酸镁的乙醇溶液数滴，观察颜色变化。

(3) 取 A、B 乙醇溶液各 2ml，分别置于二支试管中，滴加 1%三氯化铁的乙醇溶液数滴，观察颜色变化。

(二) 薄层鉴定

取以上沉淀 A、B 乙醇溶液作为供试品溶液，另取大黄素对照品用适量乙醇溶解作为对照品溶液。照 TLC(《中国药典》2015 年版四部通则 0502) 实验，吸取供试品溶液及对照品溶液分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以石油醚-乙酸乙酯(2:1) 为展开剂，展开，取出，晾干，先置可见光下观察色斑，然后置紫外灯下观察荧光斑点，接着再用 2%NaOH 喷洒显色，按比例画图并计算比移值。

五、注意事项

(1) 硅胶 G 薄层板，使用前应置烘箱中 105℃活化 30min 以上。

(2) 供试品溶液及对照品溶液薄层点样时，点样浓度适当即可，既要防止点样量过稀影响显色结果，又要防止点样量过浓影响分离效果。

六、讨论与思考

(1) TLC 法鉴定 A、B 时，解释二者比移值的大小关系？

(2) 解释并分析颜色反应(1)、(2)、(3)的现象与化学结构之间的关系？

(3) 如何根据 TLC 鉴定结果初步分析 A、B 的纯度？

参考文献

吴立军. 2011. 天然药物化学. (第 6 版). 北京: 人民卫生出版社

张勉, 王磊, 黄澜, 等. 2014. 中药虎杖商品药材的定性鉴别与定量分析(英文). 中国药学(英文版), 13(2): 106-111

(郑国栋 郑雪花 李悦山)

实验二 陈皮中挥发油及黄酮类化合物的提取分离与测定

陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮。药材分为“陈皮”和“广陈皮”。采摘成熟果实，剥取果皮，晒干或低温干燥。陈皮主产于福建、浙江、广东、广西、江西、湖南、湖北、四川等地，主含挥发油及黄酮类成分，主要有柠檬烯、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素等。

陈皮具有止咳化痰、理气健脾、和胃止呕等功效，用于胸脘胀满，食少吐泻，咳嗽痰多。

现代药理学研究表明，陈皮还具有抗肿瘤、抗诱变、抗炎、抗氧化、抗菌及心血管保护作用。

本实验设计了 3 个内容，包括陈皮的生药学鉴定，陈皮挥发油的提取和鉴定及陈皮黄酮类成分的含量测定。在教学过程中，可根据实际情况采用。

第一节 陈皮的生药学鉴定

一、实验目的

- (1) 掌握陈皮的性状与显微特征。
- (2) 熟悉果皮类药材的鉴别要点。

二、实验原理

本实验参考《中国药典》2015 版一部收录的陈皮药材的质量标准，根据药材的性状特征、显微特征及理化特征，对陈皮药材进行准确的鉴定。

三、仪器与材料

(一) 仪器

普通光学显微镜、超声波提取器、分析天平、紫外灯、打粉机、薄层层析缸、点样毛细管、载玻片、盖玻片、硅胶 G 薄层板等。

(二) 材料与试剂

待鉴定药材、水合氯醛、甲醇、甲苯、乙酸乙酯、甲酸、氢氧化钠、三氯化铝、蒸馏水、橙皮苷对照品、川陈皮素对照品等。

四、实验内容与步骤

(一) 性状鉴定

陈皮常剥成数瓣，基部相连，有的呈不规则的片状，厚 1~4mm。外表面橙红色或红棕色，有细皱纹和凹下的点状油室；内表面浅黄白色，粗糙，附黄白色或黄棕色筋络状维管束。质稍硬

而脆；气香，味辛、苦。广陈皮常3瓣相连，形状整齐，厚度均匀，约1mm。点状油室较大，对光照视，透明清晰，质较柔软。

(二) 显微鉴定

本品粉末黄白色至黄棕色，中果皮薄壁组织众多，细胞形状不规则，壁不均匀增厚，有的成连珠状。果皮表皮细胞表面观多角形、类方形或长方形，垂周壁稍厚，气孔类圆形，直径18~26 μm ，副卫细胞不清晰；侧面观外被角质层，靠外方的径向壁增厚。草酸钙方晶成片存在于中果皮薄壁细胞中，呈多面体形、菱形或双锥形，直径3~34 μm ，长5~53 μm ，有的一个细胞内含有由两个多面体构成的平行双晶或3~5个方晶。橙皮苷结晶大多存在于薄壁细胞中，黄色或无色，呈圆形或无定形团块，有的可见放射状条纹，螺旋导管、孔纹导管和网纹导管及管胞较小。粉末特征见图2-1。

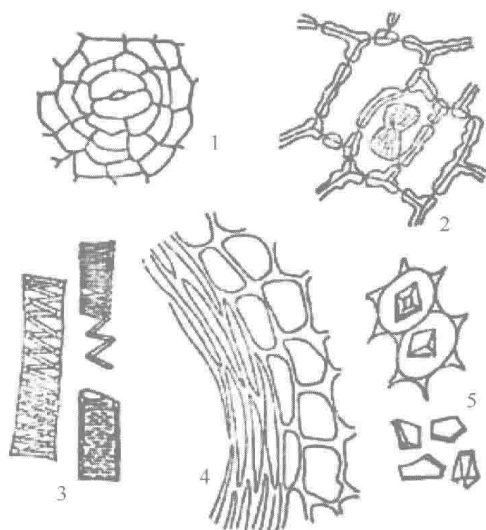


图 2-1 陈皮的粉末特征

1. 果皮表皮细胞及气孔；2. 中果皮细胞及橙皮苷结晶；3. 螺旋及网纹导管；4. 油室碎片；5. 薄壁细胞及草酸钙方晶

(三) 理化鉴定

取本品粉末0.5g，加甲醇10ml，超声30min，滤过，作为供试品溶液。另取橙皮苷及川陈皮素对照品，加甲醇制成饱和溶液，作为对照品溶液。照TLC(《中国药典》2015年版四部0502)实验，吸取上述两种溶液各2 μl ，分别点于同一用0.5%氢氧化钠溶液制备的硅胶G薄层板上，以乙酸乙酯-甲醇-水(100:17:13)为展开剂，展至约3cm，取出，晾干，再以甲苯-乙酸乙酯-甲酸水(20:10:1:1)的上层溶液为展开剂，展至约8cm，取出，晾干，喷以三氯化铝试液，置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

五、注意事项

- (1) 橙皮苷溶解性不好，制备橙皮苷对照品甲醇溶液时，可适当超声辅助溶解。
- (2) 薄层层析所用硅胶G薄层板，用高效薄层板替代，实验结果更好。

六、讨论与思考

- (1) 果皮类药材的性状与显微鉴别的要点是什么？
- (2) 薄层层析点板展开后，为何喷以三氯化铝试液显色？

参考文献

- 陈朗迪. 2014. 不同品种来源陈皮的分析鉴定研究. 广州: 广州医科大学
国家药典委员会. 2015. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社

第二节 陈皮挥发油的提取和鉴定

一、实验目的

- (1) 掌握水蒸气蒸馏法提取挥发油的方法。

(2) 熟悉气相色谱-质谱联用(GC-MS)法鉴定挥发油的方法。

二、实验原理

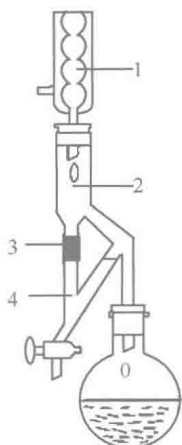


图 2-2 挥发油提取测定装置图

1. 冷凝管; 2. 挥发油提取器; 3. 油层; 4. 水层

陈皮富含挥发油成分, 主要成分有 *d*-柠檬烯、 β -月桂烯等。本实验参考《中国药典》2015 版四部挥发油测定法, 采用水蒸气蒸馏法进行陈皮挥发油的提取(图 2-2), 并结合 GC-MS 法对其挥发油成分进行鉴定。

三、仪器与材料

(一) 仪器

GC-MS 联用仪、挥发油提取器、分析天平、加热套、气相色谱柱、量筒、移液枪、微孔滤膜、圆底烧瓶、冷凝管等。

(二) 材料与试剂

陈皮药材、无水硫酸钠、蒸馏水等。

四、实验内容与步骤

(一) 陈皮挥发油的提取

取陈皮药材适量, 打成粗粉, 称取 200g, 置于 5000ml 圆底烧瓶中, 加入 2000ml 蒸馏水, 振荡混合后, 浸泡约 12h, 连接挥发油测定器与回流冷凝管, 自冷凝管上端加水使充满挥发油测定器的刻度部分, 并溢流入烧瓶时为止。置电热套中或用其他适宜方法缓缓加热至沸, 并保持微沸约 5h, 至测定器中油量不再增加, 停止加热, 放置片刻, 开启测定器下端的活塞, 将水缓缓放出, 至油层上端到达刻度 0 线上面 5mm 处为止。放置 1h 以上, 再开启活塞使油层下降至其上端恰与刻度 0 线平齐, 读取挥发油量, 并计算挥发油的得率(%)。

(二) 陈皮挥发油的鉴定

1. GC-MS 色谱条件 HP-5S 石英毛细管色谱柱(0.25mm×30m, 0.25 μ m); 升温程序为: 初始温度 60 $^{\circ}$ C, 第一阶段以 1 $^{\circ}$ C/min 的速度上升到 80 $^{\circ}$ C 并保持 10min, 第二阶段以 5 $^{\circ}$ C/min 上升到 250 $^{\circ}$ C; 第三阶段以 20 $^{\circ}$ C/min 上升到 300 $^{\circ}$ C 并保持 1min; 载气为高纯度 He, 载气体积流量 1ml/min, 进样量为 5 μ l, 分流比为 10:1, 进样口温度为 270 $^{\circ}$ C。

2. GC-MS 质谱条件 离子源为 EI, 电离电压, 进样口温度为 270 $^{\circ}$ C, 检测器温度为 270 $^{\circ}$ C, 质量扫描范围 m/z 30~550 amu, 溶剂延迟 4min, 质谱数据库 NIST08s.L 和 NIST08.LIB。

3. 陈皮挥发油的鉴定 精密量取得到的陈皮挥发油 20 μ l, 加 980 μ l 正己烷溶解, 微孔滤膜过滤。采用 GC-MS 法进行挥发油成分的鉴定。

陈皮挥发油成分鉴定结果记录见表 2-1。

表 2-1 陈皮挥发油成分鉴定结果

序号	保留时间(min)	化合物名称	分子式	相对分子质量	百分含量%
1					
2					

续表

序号	保留时间(min)	化合物名称	分子式	相对分子质量	百分含量%
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

五、注意事项

(1) 陈皮挥发油提取时, 药材打成粗粉或剪成小块即可, 注意防止打粉过细使粉末漂浮而影响提取效果。

(2) 陈皮挥发油提取前, 最好提前浸泡约 12h, 以利于挥发油的提取。

(3) 水蒸气蒸馏法得到的陈皮挥发油, GC-MS 法分析前, 可先采用无水硫酸钠脱水处理。

六、讨论与思考

(1) 水蒸气蒸馏法提取挥发油时, 如果油水不分层应如何处理?

(2) 水蒸气蒸馏法提取挥发油时, 若得到的挥发油比重大于水应如何处理?

参考文献

国家药典委员会. 2015. 中华人民共和国药典(四部). 北京: 中国医药科技出版社

梁小霞. 2016. 广陈皮质量综合考察分析研究. 广州: 广州医科大学

第三节 陈皮黄酮类成分的含量测定

一、实验目的

(1) 掌握紫外可见分光光度法(UV 法)测定总黄酮类成分含量的方法。

(2) 熟悉高效液相色谱法(HPLC 法)测定单体成分含量的方法

二、实验原理

除挥发油外, 黄酮类成分是陈皮主要的有效成分, 其黄酮类成分主要有两大类型: 一类是二氢黄酮苷类成分, 主要有橙皮苷等; 另一类是多甲氧基黄酮类成分, 主要有川陈皮素等。本实验采用 UV 法对陈皮中的多甲氧基总黄酮进行测定, 采用 HPLC 法对陈皮中的橙皮苷和川陈皮素的含量进行测定。橙皮苷和川陈皮素的结构见图 2-3。

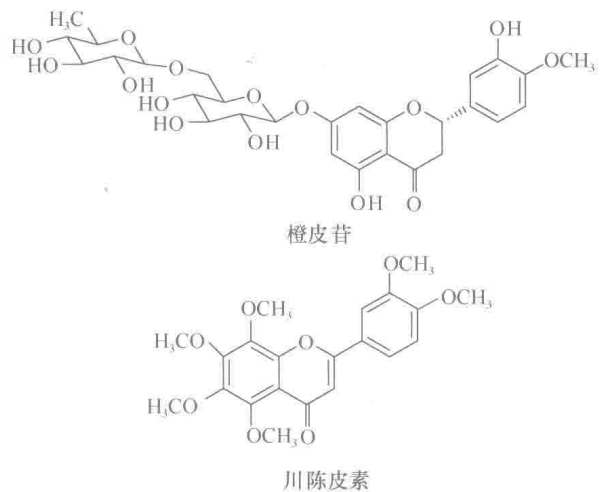


图 2-3 橙皮苷和川陈皮素的结构式

三、仪器与材料

(一) 仪器

紫外可见分光光度仪、高效液相色谱仪、超声波提取器、分析天平(万分之一)、分析天平(十万分之一)、液相色谱柱、量筒、移液管、移液枪、锥形瓶、容量瓶、抽滤瓶、布氏漏斗、滤纸等。

(二) 材料与试剂

陈皮药材、甲醇、乙酸乙酯、乙腈(色谱纯)、双蒸水、橙皮苷对照品、川陈皮素对照品等。

四、实验内容与步骤

(一) UV 法测定陈皮中多甲氧基总黄酮类成分的含量

1. 供试品溶液的制备 取陈皮药材粉末 0.5g, 置于 100ml 锥形瓶中, 加入乙酸乙酯 50ml, 超声提取 30min, 抽滤, 取滤液。同法进行二次提取, 抽滤, 取滤液。分别量取两次滤液各 10ml, 置于 50ml 容量瓶中, 用乙酸乙酯定容至刻度, 摇匀后从中量取 4ml 溶液置于 10ml 容量瓶中, 用乙酸乙酯定容至刻度, 摇匀即得。

2. 对照品溶液的制备 精密称定对照品川陈皮素 5mg, 置于 50ml 容量瓶中, 加乙酸乙酯溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品储备液。

3. 标准曲线的制定 分别精密量取混合对照品储备液 300 μ l、500 μ l、700 μ l、900 μ l、1100 μ l、1300 μ l 置于 10ml 容量瓶中, 用乙酸乙酯稀释配制成 6 个浓度水平。以 330nm 为检测波长, 采用 UV 法, 分别对不同浓度的对照品溶液进行测定, 每个浓度重复测定 3 次, 取平均值。分别以对照品 1~6 的浓度 $X(\mu\text{g/ml})$ 为横坐标、吸光度值 Y 为纵坐标进行回归计算。

4. 含量测定 精密量取供试品溶液适量, 采用 UV 法, 在 330nm 处测定其吸光度值, 重复测定 3 次, 根据标准曲线, 以川陈皮素为参考, 计算陈皮中多甲氧基总黄酮类成分的百分含量。

(二) HPLC 法测定陈皮中橙皮苷与川陈皮素的含量

1. 供试品溶液的制备 取陈皮药材粉末(过三号筛)0.5g, 精密称定, 置于 100ml 的具塞锥形瓶中。加入 50ml 甲醇, 连同锥形瓶一起精密称定(误差控制在 $\pm 0.01\text{g}$ 内)。超声提取 30min(320W, 40kHz), 放冷, 按初始重量补足甲醇, 抽滤, 分别取滤液 10ml 置于 25ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀即得。

2. 对照品溶液的制备 分别精密称定对照品橙皮苷 12mg、川陈皮素 5mg, 置 25ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成混合对照品储备液。

3. 标准曲线的制定 精密量取混合对照品储备液, 用甲醇稀释配制成 6 个浓度水平。分别对不同浓度的对照品溶液进行 HPLC 测定, 每个重复测定 3 次, 取平均值。分别以对照品 1~6 的质量浓度 $X(\mu\text{g/ml})$ 为横坐标、峰面积值 Y 为纵坐标进行回归计算。

4. HPLC 色谱条件 色谱柱: DIKMA Diamonsil C_{18} 色谱柱(250mm \times 4.6mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水; 流速: 1ml/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μ l; 检测波长: 283nm 及 330nm 双波长检测; 梯度洗脱条件: 0~15min, 25%~50%乙腈溶液; 15~35min, 50%~60%乙腈溶液; 35~40min, 60%~85%乙腈溶液。

5. 含量测定 取供试品溶液适量, 根据确定的色谱条件, 采用 HPLC 法测定其中橙皮苷与川陈皮素的含量, 重复测定 3 次, 根据标准曲线, 计算陈皮中橙皮苷与川陈皮素的百分含量。