

供药学类专业用

生药学实验指导

郑俊华 主编

北京医科大学出版社

SHENGYAOXUE SHIYAN ZHIDAO

图书在版编目 (CIP) 数据

生药实验指导/郑俊华主编. —北京: 北京医科大学出版社, 2001.6

供药学类专业用

ISBN 7-81071-166-0

I. 生… II. 郑… III. 生药学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. R93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 23928 号

北京医科大学出版社出版发行

(100083 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内)

责任编辑: 赵 蔚

责任校对: 何 力

责任印制: 张京生

北京东方圣雅印刷有限公司印刷 新华书店经销

开本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 13.25 字数: 334 千字
2001 年 7 月第 1 版 2001 年 7 月第 1 次印刷 印数: 1-3000 册
定价: 19.80 元

版权所有 不得翻印

目 录

上篇 基本技术与方法

第一章 生药性状鉴定和显微鉴定的基本技术与方法	(1)
第一节 制片技术	(1)
一、生药的临时制片法	(1)
二、生药的永久制片法	(1)
第二节 绘图技术	(2)
一、生药绘图的基础知识和有关规定	(2)
二、常用的生药绘图技术	(3)
第三节 显微测量及显微定量技术	(4)
一、显微测量	(4)
二、显微常数测定	(5)
三、显微定量	(6)
第四节 生药摄影和显微照相及幻灯片制作技术	(10)
一、生药摄影技术	(10)
二、显微照相技术	(13)
三、幻灯片的制作	(15)
第五节 扫描电子显微镜操作技术	(16)
一、扫描电镜的主要构造及其基本原理	(16)
二、扫描电镜的样品制作	(17)
三、扫描电镜的操作步骤	(18)
第二章 生药理化分析的基本技术与方法	(20)
第一节 基本技术	(20)
一、荧光试验	(20)
二、微量升华技术	(20)
三、分光光度法	(21)
(一) 紫外分光光度法	(21)
(二) 比色法	(23)
(三) 红外分光光度法	(23)
(四) 原子吸收分光光度法	(23)
四、色谱法	(24)
(一) 纸色谱法	(25)
(二) 薄层色谱法	(27)
(三) 柱色谱法	(31)

(四) 高效液相色谱法	(34)
(五) 气相色谱法	(38)
(六) 毛细管电泳色谱法	(42)
第二节 基本方法	(48)
一、常规检查	(48)
(一) 水分测定法	(48)
(二) 灰分测定法	(48)
(三) 浸出物测定法	(49)
(四) 农药残留量测定法	(50)
(五) 重金属检查法	(50)
(六) 砷盐检查法	(51)
二、化学成分的定性和定量分析	(53)
(一) 糖类成分	(53)
(二) 苷类成分	(54)
(三) 生物碱类成分	(60)
(四) 挥发油类成分	(62)
(五) 鞣质类成分	(63)
(六) 脂类成分	(64)
三、生物检定法	(64)
第三章 生药及其制剂质量标准的制定	(65)
第一节 生药(药材)质量标准的制定	(65)
第二节 中药制剂质量标准的制定	(68)
第四章 生物技术在生药学中的应用	(70)
第一节 生药的 DNA 分子指纹鉴定	(70)
第二节 药用植物的愈伤组织培养	(71)
第三节 药用植物的悬浮细胞培养	(73)
第四节 药用植物的毛状根培养	(75)
第五节 生药化学成分的生物转化	(76)

下篇 实验

实验一 显微制片	(80)
实验二 显微测量和绘图	(84)
实验三 生药化学成分的定性实验(一)	(89)
实验四 生药化学成分的定性实验(二)	(91)
实验五 生药化学成分的定性实验(三)	(93)
实验六 生药中水分、灰分和浸出物的测定	(95)
实验七 生药中挥发油的测定	(97)
实验八 薄层色谱在生药鉴定中的应用	(99)
实验九 蒽醌类成分的含量测定(大黄)	(100)

实验十	黄酮类成分的含量测定(黄芩-HPLC法)	(100)
实验十一	皂苷类成分的含量测定(黄芪)	(101)
实验十二	强心苷类成分的含量测定(紫花洋地黄)	(102)
实验十三	生物碱类成分的含量测定	(103)
实验十四	鞣质类成分的含量测定(地榆 拳参 五倍子)	(106)
实验十五	根类生药的鉴定(怀牛膝 川牛膝 黄芩 甘草 黄芪 人参 当归 党参 桔梗 百部 麦冬)	(108)
实验十六	根茎类生药的鉴定(大黄 黄连 生姜 石菖蒲 半夏 川贝母 浙贝母 天麻)	(122)
实验十七	茎木类及皮类生药的鉴定	(134)
一、	茎木类生药(关木通 络石藤 青风藤 沉香)	(134)
二、	皮类生药(肉桂 厚朴 黄柏 香加皮)	(139)
实验十八	叶类生药的鉴定(大青叶 番泻叶 洋地黄叶)	(146)
实验十九	花类生药的鉴定(洋金花 金银花 红花 丁香 海金沙 松花粉 蒲黄)	(151)
实验二十	果实类生药的鉴定(五味子 小茴香 补骨脂 陈皮)	(157)
实验二十一	种子类生药的鉴定(苦杏仁 马钱子 砂仁 槟榔)	(161)
实验二十二	全草类生药的鉴定(麻黄 薄荷 颠茄草)	(165)
实验二十三	藻菌类生药的鉴定(茯苓 猪苓)	(170)
实验二十四	动物类生药的鉴定(蟾酥 斑蝥 牛黄 麝香)	(172)
实验二十五	矿物类生药的鉴定(朱砂 石膏 雄黄 琥珀)	(177)
实验二十六	中成药的显微鉴定	(181)
实验二十七	药材质量标准的制定	(182)
实验二十八	中药制剂质量标准的制定	(183)
实验二十九	(一) 植物基因组总 DNA 的分离	(184)
	(二) 多聚酶链式反应(PCR)	(185)
实验三十	药用植物的愈伤组织培养	(186)
实验三十一	药用植物的悬浮细胞培养	(187)
实验三十二	药用植物的毛状根培养	(188)
实验三十三	生药化学成分的生物转化	(189)

附 录

一、	实验报告的书写要求及格式	(190)
二、	常用试剂及配制方法	(192)
三、	气相色谱法固定液	(194)
四、	生物技术实验室的布局、仪器及设备	(198)
五、	常用参考文献及参考书	(201)

上篇 基本技术与方法

第一章 生药性状鉴定和显微鉴定的基本技术与方法

第一节 制片技术

在显微镜下观察标本，必须经过制片。显微制片技术常用有临时制片法和永久制片法两大类。临时制片法，因取材和做法不同，又可分为表皮制片法、组织解离法、粉末制片法及徒手切片法。一般来说临时制片只作临时观察用，不能永久保存。永久制片法常用有石蜡切片法、滑动切片法及冰冻切片法等。切片可永久保存和观察。临时制片的标本也可做成永久制片，作永久保存和观察。

一、生药的临时制片法

1. 表皮制片法 系将表皮细胞组织制成显微观察片的一种方法。适用于观察叶片、花瓣、花萼和其它器官表皮的细胞形状、气孔、腺毛、非腺毛的类型和角质层的纹理以及各种细胞内含物等的显微特征。表面制片法步骤：①擦净玻片。②取材：若取新鲜表皮可直接撕取，若为干燥标本，可将材料软化后再撕取表皮。③制片观察。④清洗制片。有关操作的具体步骤和要求，请参考下篇实验一。

2. 粉末制片法 将生药粉末制成显微观察片的一种方法。该法适用于破碎和粉状生药及粉末制成的中成药。粉末制片法的步骤：①粉碎过筛。②擦净玻片。③制片观察。④清洗制片。有关操作的具体步骤和要求，请参考下篇实验一。

3. 组织解离法 是借某些解离药物的作用，将组织软化并解散分离成细胞的一种制片法。此法适用于观察导管、管胞、纤维、石细胞等细胞的完整形状和类型，也很有利于测量其细胞的大小、长度，以及显微照相和显微绘图。解离制片法的步骤：①解离液的配制；②解离；③制片观察；④清洗制片。若按解离药物方法常用有氢氧化钾法、氯酸钾法和铬酸-硝酸解离法等。有关操作步骤和要求，请参看下篇实验一。

4. 徒手切片法 系用手捏住新鲜或固定的材料，用锋利的剃须刀或保安刀片切成薄片的一种方法。其主要优点是不用切片机，徒手直接切片，简便易行，节约时间，节省经费，且可以制片观察标本，尤其是新鲜标本，可立即观察细胞内的自然结构和天然色彩。操作步骤为：①取材；②切片；③制片观察；④清洗制片。详细步骤和要求，请参看下篇实验一。

二、生药的永久制片法

常用有石蜡切片法、滑动切片法及冰冻切片法。本法适用于切各种材料，虽然操作技术较复杂，但是切片薄（2~10 μ m）而均匀，有利于很清楚观察各器官组织的详细结构，而且可连续切片，成批制片，尤其适用于某一个器管内部结构的连续观察。操作步骤为：①蜡块

制备；②上机切片；③染色制片。各步骤都有复杂的技术和要求，具体做法和要求，请看下一篇实验一。

第二节 绘图技术

绘图是生药学习 and 研究工作的一项基本技能。生药的各种形状和结构，除用文字来描述之外，均需附图说明，才能有利对各种鉴别特征作进一步的理解。生药绘图的方法常分有徒手绘图法和显微描绘法两种。若按绘图工具则可分为铅笔绘图法和墨线绘图法及彩色绘图法三种。绘制一张合格的生药图，必须具有一定的基础知识和绘图技术。

一、生药绘图的基础知识和有关规定

生药图是实物的形象记录，要求形象逼真，结构清楚。对生药的生态图和生药性状图，还要求富有立体感。要达到以上要求，必须掌握一定的基础知识和有关规定。

1. 要有准确的比例关系 对各种标本的形状和结构，必须先量出其长度、宽度的比例关系，同时还需清楚与邻近物体和结构的比例关系，才能画出正确的平面图。

2. 要有一定的透视知识 各种标本的外部都有立体形态，内部都有立体结构，如分支的前后交叉，叶序、花序和花冠的排列、方晶和簇晶的侧面以及导管的加厚方式等均有明显的立体感。因此，要绘制富有立体感的图形还必须具有一定的透视知识和配影技术。透视知识就是要求仔细观察物体在上下、左右、内外的不同形状和结构。最简单的表示方法是前大后小（前长、后短），前盖后，外明内暗（近明远暗）等透视常识。上下、左右要以各标本的特点而定。生药标本常有两侧对称、上粗下细的规律性。前大、后小即画前侧图要稍大，线条要画得稍长；画后侧图稍小，线条要画得稍短。透视方向要一致，透视的引线最后要消失在一个终点上。同时还得具有取位的知识，即画立体图，不能取正位，因正位看不到侧面，即无透视线，因此画不出立体结构来。必须取偏向一侧的位置，因侧位才能看到侧面的透视线，有利画出立体图。但对圆形、类圆形或圆柱形及圆锥形的标本，因边缘圆滑，侧面透视为一个面，无法用线条表示其立体感，常可用打点配影的方式表示投射光的影印来衬托其立体感。但投射光的方向要来自一个方向，以近明远暗的规律显示其立体感。否则无一定方向的打点也可表示具有色素或朱砂点、芝麻点（油室或树脂道）或砂晶等特征。

3. 要有认色、配色和用色的基础知识 彩色绘图首先必须学会认色、配色和用色的有关基础知识。**认色**：就是要求了解颜色的种类和最基本的三原色。常用颜料有水彩色、广告色、水粉色和油画色等。绘制生药图多用水彩色和广告色。在颜色中最基本的颜色是三原色，即红、黄、蓝三色（黑和白一般不认为是颜色，但在配色时很有用处）。**配色**：就是要利用三原色配成各种颜色，如红色 + 黄色可配成→橘红色或橘黄色；黄色 + 蓝色→绿色或蓝绿色；红色 + 蓝色→紫色、紫红色或紫蓝色；红色 + 黑色→红棕色或褐红色；红色 + 黑色 + 黄色→棕色、棕褐色或红棕色。黑色 + 白色→灰色、灰黑色或灰白色；各种色 + 白色可配成各种淡色，如粉红色、淡黄色、天蓝色、淡绿色、淡棕色、浅褐色、淡紫色等等。各种色 + 黑色即可配成各种深色，如深绿色、深蓝色、深紫色等等。若为双色，常以第二色为主，稍带第一色，如紫红色，以红色为主，在红色中稍带点紫色如玫瑰红色。红紫色则以紫为主，稍带有红色。**用色**：就是能根据实物的自然色泽着色。要尽量利用不同颜色来显示不同部位和不同层次的颜色和光泽。

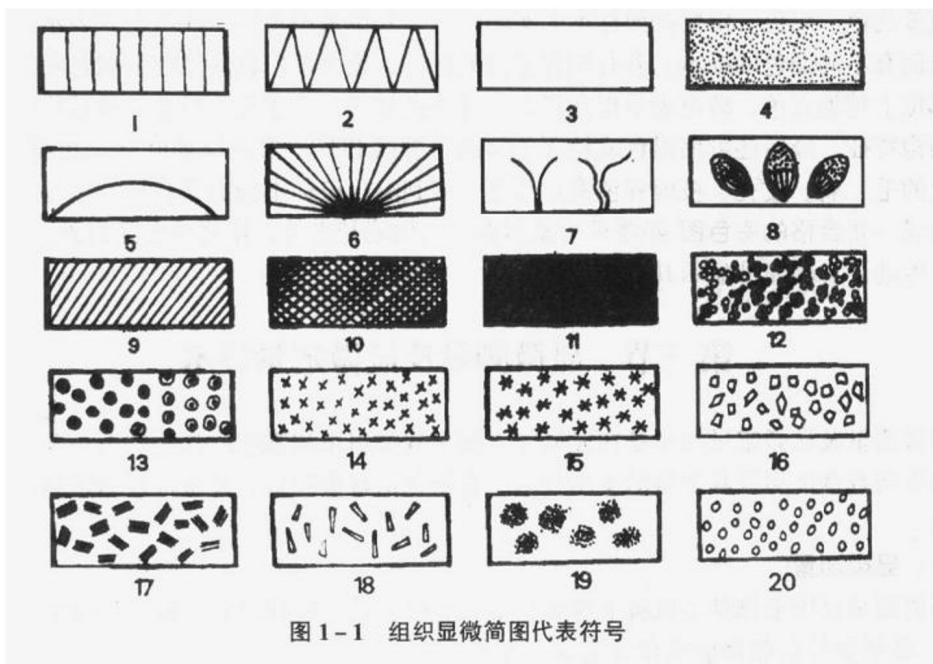
生药绘图常有以下规定：

1. 铅笔图和墨线图均以线条表示结构，以小圆点来衬托立体感或表示某些色素或晶体的特征。**线条要求** 粗细均匀，圆滑，流畅，明暗一致，不许用直尺或其它圆规或曲线板等工具来画线，必须徒手作图，以表现生药的自然形态和结构。**打点要求** 圆，细小，均匀，圆滑，疏密有序，不许圆点上带勾和重叠。更不许像像素描图一样用涂影和画斜线的方式表示影印来衬托其立体感。

2. 构图或着色，一定要按照实际标本的形态、结构和色泽来绘画，不许像画美术画似的可任意加工和夸张，以显示个人特色。**绘图要求** 形态逼真，结构清楚，色泽自然，显示其自然状态。

3. 图的各部位要画引线和注字，引线可用直尺画实线或虚线表示。引线内端要指准部位，外端注字或注序号。**引线要求** 细、直、短、均匀、不交叉，以免误指。**注字或注号** 要求准确无误。图下要注明标本名称和放大倍数。

4. 画显微组织简图时，要采用国际上通用的代表符号来绘图，不用注字即可明了该器官组织的结构。常用各组织和细胞内含物的代表符号（图 1-1）。



1. 表皮 2. 木栓层 3. 皮层或薄壁组织 4. 韧皮部 5. 形成层 6. 木质部 7. 射线
8. 维管束 9. 厚壁或厚角组织 10. 纤维 11. 石细胞 12. 分泌组织 13. 树脂道
14. 晶体 15. 簇晶 16. 方晶或棱晶 17. 针晶 18. 柱晶 19. 砂晶 20. 淀粉粒

二、常用的生药绘图技术

生药绘图技术，常用有铅笔绘图法、墨线绘图法和彩色绘图法，以下作简要介绍。

1. 铅笔绘图法 铅笔绘图是实验绘图的最常用方法，也是其它绘图法的基础。绘制各种图都要先画成铅笔草图。铅笔绘图法的步骤和要求：①选择典型药材标本或完整的显微制片。②根据各项比例关系，勾画轮廓图。③根据各项特征或结构，再画成草图。④打点衬托

立体感。⑤画引线和注字（各项步骤的具体画法和要求可参考下篇实验二）。

绘成一张合格的铅笔图要求形象逼真，结构清楚，注字正确无误，图形整齐、美观。

2. 墨线绘图法 系用特制的小蘸笔，蘸上绘图墨汁在透明硫酸纸上画墨线图的一种方法。因墨黑，线点清楚，反差较强，有利拍照和制版印刷。因此，各种书籍和论文出版的附图均需要用墨线图，不能用铅笔图。主要步骤和要求：①绘好铅笔草图。②照铅笔草图在透明硫酸纸上用绘图墨汁画成墨线图。③画引线并在各引线上贴上注字或号码。若用注号，要提供图注说明文稿，说明图内各引线数号的代表名称，有利出版社排版时打字用（各项步骤的具体画法和要求，请参考下篇实验二）。绘成一张合格的墨线图除了比铅笔绘图的要求更高之外，还要求线条和打点浓淡一致，并附图注说明文稿。

3. 彩色绘图法 系采用各种颜色绘制彩图的方法。如出版彩色图谱，彩色插图或绘制彩色挂图及制作彩色投影片时都必须采用这种方法。彩色图最大的优点是有色泽，更易显示图像的自然形象，尤其是画花类、果实和种子类药材时，比铅笔图和墨线图更易表现出具有不同色泽的鉴别特征。绘彩色图常用的工具有多种颜料（多用水彩和广告色）、毛笔、白色绘图纸等。主要绘图步骤：①画好铅笔草图。②用颜料着色。一般先打底色，先浅后深，用深色覆盖浅色。用色一定要按照标本的实际颜色，并尽量用不同深浅颜色来表示有不同层次或正反面有不同颜色的标本。若有明显光泽的标本，也可用白色或比原有颜色较淡的颜色在适当部位上稍加点色，即可表示出光泽来。③重点加工。为了更明确地显示其特有的形态和主要结构特征，最后还可用黑色或较深色勾画轮廓线和其重要特征如叶脉、花瓣上的细脉，茎枝上的毛、刺、皮孔、枝痕和色素点等等，有利突出该标本的显著特征。

画成一张合格的彩色图除要求形象逼真、结构清楚之外，还要求色泽自然，色彩协调、美观、生动。有利充分显示其自然色泽。

第三节 显微测量及显微定量技术

显微测量及显微定量技术是在显微镜下测量各类组织和细胞后含物的大小及其含量，用来鉴别生药真伪优劣及其含量的实用技术。常用包括显微测量、显微常数测定和显微定量三种技术。

一、显微测量

显微测量是用来测量显微镜下所见标本长度的方法。所使用的仪器为显微量尺（也称测微尺）。显微量尺由载台量尺和目镜量尺组成。

1. 载台量尺 又称镜台测微尺，是一块特制的载玻片，其中央具有带刻度的标尺。标尺全长1mm，分为10大格，每大格再分为10小格，共100小格，每小格的长度为0.01mm，若标尺的长度为2mm，分为200小格，每小格的长度仍为0.01mm，即 $10\mu\text{m}$ （ $1\mu\text{m} = 0.001\text{mm}$ ）。标尺外围有一黑色环，便于在显微镜下寻找标尺。这个标尺用圆形盖玻片封藏。当盖玻片上落有灰尘或使用油镜后需要擦拭时，要用擦镜纸和专用清洁剂擦拭。

2. 目镜量尺 又称目镜测微尺，是一块带有刻度的圆形玻璃片。目镜量尺有直线式（也称尺式）和网式两种。直线式目镜量尺的标尺是在一条5mm长的标尺上精确平分成5大格，每大格再分成10小格，共50小格。用于测量标本的长度。网式目镜量尺的标尺是刻成方格的网状，其方格数目、大小有多种规格，常用的是在一个边长为5mm的正方形内划分成 10×10 个小方格，可同时测量标本的长度和宽度。

3. 显微量尺的使用方法

(1) 目镜量尺的标定：目镜量尺的刻度在不同显微镜或不同放大倍数的物镜下使用时，每小格所代表的实际长度不同，因此在使用前需用载台量尺进行标定。就是用载台量尺计算出目镜量尺每小格所代表的实际长度（ μm ）。

(2) 测量标本长度：利用目镜量尺测量标本所占的格数，即可计算出显微镜下标本的实际长度。以上的具体标定、测量方法和要求请参考下篇实验二。

二、显微常数测定

显微常数测定是鉴别叶类、全草类生药常用的一项显微技术。包括气孔数、气孔指数、栅表比、脉岛数和脉端数。现将较为常用的气孔指数、栅表比及脉岛数介绍如下。

1. 气孔指数 (stomata index) 是指叶子表面单位面积的气孔数与表皮细胞数（包括气孔）的比例。同种植物叶子表面的气孔指数相当恒定，在生药鉴定上有较大的实用意义。气孔指数用百分数表示，计算方法见公式 (1)。

公式 (1)：

$$\text{气孔指数 (\%)} = \frac{\text{单位面积气孔数}}{\text{单位面积表皮细胞数} + \text{单位面积气孔数}} \times 100\%$$

计算气孔指数时，分别撕取叶片中段的上下表皮，经水合氯醛透化后装片。对不易撕取表皮的叶片，也可直接剪取叶片中部约 5mm^2 的小片，用水合氯醛透化后装片。统计 10~20 个平方毫米的气孔数和表皮细胞数。再用目镜量尺测量并计算出每个视野的面积，求出每平方毫米内的气孔数和表皮细胞数。或用网式目镜量尺，统计 10~20 个平方毫米内的气孔数和表皮细胞数，将统计数据代入公式(1)，即可求出气孔指数。计算气孔指数时要注意以下几点：

(1) 当对两种生药进行对比鉴别时，所选叶片的叶龄、叶面位置应完全相同才有鉴别意义。

(2) 在进行气孔计数时，气孔的两个保卫细胞及一个气孔按一个单位计算。

(3) 测量次数应有 10~20 次，再取其平均值。在视野边沿的气孔或细胞要有一半在设定的框内才能计算。

(4) 对叶的上下表面要分别计算。

2. 栅表比 (palisade ratio) 为每个上表皮细胞覆盖下的栅栏细胞的平均值。不同植物的栅表比值较为恒定，它是叶类生药可靠的鉴定方法之一。可用来鉴定一些同属不同种植物的叶子。测定栅表比可用完整叶、叶的碎片或粉末来进行。测定时，选取 2mm^2 面积的叶片或细碎粉末，用水合氯醛加热透化，装片，在显微镜下观察，统计 4 个表皮细胞下的栅栏细胞数目，包括被表皮细胞覆盖超过一半的栅栏细胞，重复测定不同部位 5~10 次，然后用公式

(2) 计算出每个表皮细胞下栅栏细胞平均值。

公式 (2)：

$$\text{栅表比} = \frac{4 \text{ 个上表皮细胞下的栅栏细胞数}}{4}$$

3. 脉岛数 (vein - islet number) 脉岛是指最末端叶脉包围的叶片小面积。脉岛数是叶片单位面积中脉岛的数目，以每平方厘米个为单位。脉岛数与叶片本身的大小及生长年龄无关，但随植物种类而易。因此，可用于不同叶类生药的鉴别。

脉岛数的测定方法：将叶片用水合氯醛透化，对色深或晶体多，不利透化的种类，在浸水前可先用5%氯化钠水溶液脱色，或用10%的盐酸除去草酸钙结晶。若还不够透明，可将叶片放入带盖并盛有50%的水合氯醛溶液的培养皿内，于60℃恒温箱中透化6~8小时，即可达到透明要求。取透化好的叶片，在其中脉和边缘间中心部位（约1/2处）切取4mm²的小块，用水合氯醛装片，用载台量尺选择4个相邻的1mm²，即2mm×2mm的正方形或4mm×1mm的长方形，拍摄成照片或用显微描绘器绘图，然后计数。计数时要仔细地寻找每一个可以找到的脉岛。如果脉岛被设计的边框切开，可从方框左侧一边算起，左边的进，右边的不进。被方框上下边切开的脉岛也按上法计算。所得脉岛数除以4即可得每平方毫米叶片中的平均脉岛数。

三、显微定量

显微定量是测定生药混合粉末（以下称检品）中某一单味生药百分含量的一种方法。过去多用英国生药学家Wallis建立的石松孢子法（*Lycopodium method*），目前也采用山东中医药大学石俊英等建立的直接定量法。

用于显微定量的生药必须具备的条件是：检品中的单味生药必须具有特殊形态分子，并可与其它生药的特征相区别，且能对抗机械力和常用显微试剂的作用，并能制成可在显微镜下观察的标本。

特殊形态分子的类型大致有三种：**分散的颗粒分子**：大小较均匀，形状相似，如淀粉粒、孢子和花粉粒等。**线状或杆状分子**：有相同的形状和一致的厚度，如毛茸、纤维等。**小片状分子**：由一层细胞组成，有一致的厚度，如石细胞、表皮细胞等。上述三种类型的特殊分子，其颗粒总数、总长度或总面积与它们的总重量成正比关系。

1. 石松孢子法 石松孢子是蕨类植物石松 *Lycopodium clavatum* L. 的成熟孢子，为黄色粉末，水分含量稳定，约为5%，有易于流动和对显微试剂稳定的特点；孢子直径近似，平均值为25μm。利用比重法和面积测定计算，每毫克石松孢子数平均为94000个，利用这个数值作为重量指示物，可对检品中的单味生药进行定量分析。

在对单味生药进行定量分析之前，必须对被测单味生药进行种的鉴定。然后精确称取一定量的石松孢子和检品，用适当黏度的混悬剂均匀拌合，倾入有塞试管中，配制成一定体积。取1滴（约0.05ml）混悬液制成标本片，在高倍镜下观察，统计石松孢子数和颗粒性特殊分子的颗粒数或杆状、线状特殊分子的总长度或小片状特殊分子的总面积。根据检品重量及石松孢子的重量，即可计算出单味生药的百分含量。具体计算方法见公式（3）和公式（4）。公式（3）可用来计算单味生药的特殊分子数，公式（4）可用来计算检品中单味生药的百分含量。

$$\text{公式 (3):} \quad P = \frac{n \times w \times 94000}{s \times m}$$

$$\text{公式 (4):} \quad X = \frac{n \times w \times 94000 \times 100}{s \times m \times P}$$

式中，P：单味生药每毫克中特殊分子数；
 n：25（或10）个视野中特殊分子数；
 w：所取石松孢子的毫克数；
 s：相同视野中的石松孢子数；

m: 检品 (或单味生药) 的毫克数;

X: 检品中单味生药的百分含量。

现以含有生姜的检品为例介绍具体操作方法如下:

(1) 单味生药 (生姜) 每毫克中淀粉粒 (特殊分子) 数的测定。

1) 纯生姜粉末 (过 100 目筛) 备用。

2) 按 1995 年版药典附录 IV H 项的要求测定检品的水分含量。

3) 精确称取生姜粉末 25.1mg 石松孢子 22.1mg, 置于洁净的玻璃板上, 混匀。

4) 加入一定量的混悬剂 (常用橄榄油、花生油或甘油:西黄芪胶:水 = 2:1:2) 调和均匀, 使其成为稀薄的浆状混悬液。沿玻璃板一角将混悬液倾入带塞试管中, 再用少量混悬剂分次将残留物冲洗至试管中, 调节至一定体积 (以用 1 滴混悬液制成标本片, 在高倍镜下观察, 一个视野内能观察到 10~20 个石松孢子为宜)。

5) 缓缓振摇试管, 使混悬液均匀, 同时防止气泡产生。用内径为 2mm 的干燥吸管吸取混悬液, 在两块载玻片上各加 1 滴, 用细玻璃棒或细针均匀摊开, 使面积略小于盖玻片, 盖上盖片, 水平放置片刻, 使粉末均匀下沉。用同法再制备另外两个标本片, 以备重复测定之用。

6) 按图 1-2 所示, 观察 25 个视野 (本次只选取 10 个视野), 统计各视野中石松孢子和生姜淀粉粒总数。用第二、三、四张标本片重复统计, 求其平均值即为每毫克生姜所含的淀粉粒数。四次误差不得大于 20%。

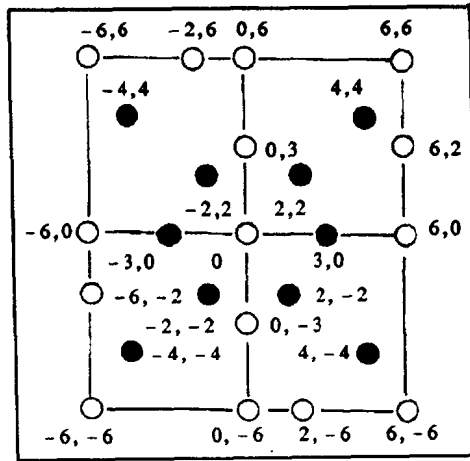


图 1-2 石松孢子法视野选择坐标图

“○+●”为选取 25 个视野时使用

“●”为选取 10 个视野时使用

10 个视野的统计数为 $n = 25 + 28 + 40 + 32 + 22 + 26 + 31 + 34 + 36 + 26 = 300$

$s = 10 + 9 + 13 + 8 + 6 + 7 + 11 + 12 + 10 + 9 = 95$

7) 将实验数据代入公式 (3) 即可求出每毫克生姜的淀粉粒数。

已知: $m = 25.1$ $n = 300$ $s = 95$ $w = 22.1$ 每毫克石松孢子数为 94000 个

$$P = \frac{300 \times 22.1 \times 94000}{95 \times 25.1} = 261362 \text{ (个)}$$

(2) 检品中生姜的含量测定。

1) 称取石松孢子 22.5mg, 检品 (生姜含量为未知的) 538.3mg。

2) 将上述石松孢子和检品按 (1) 法制成标本片。重复观察 4 次, 按公式 (4) 计算, 求其平均值即为检品中的生姜含量。

10 个视野的统计结果为:

生姜淀粉粒数 $n = 25 + 41 + 25 + 37 + 31 + 26 + 27 + 36 + 28 + 29 = 305$

石松孢子数 $s = 7 + 18 + 8 + 16 + 12 + 9 + 10 + 14 + 11 + 12 = 117$

3) 计算: 已知 $n = 305$ $w = 22.5$ 每毫克石松孢子数为 94000

$$s = 117 \quad m = 538.3 \quad P = 261362$$

将以上数据代入公式 (4)

$$X = \frac{305 \times 22.5 \times 94000 \times 100}{117 \times 538.3 \times 261362} = 3.92 \quad \text{即该检品的生姜含量为 } 3.92\%$$

石松孢子法显微定量技术, 必须运用石松孢子为参比物来测定检品中某一单味生药或某一混杂物的含量, 所以是一种间接的显微定量技术。由于选用的石松孢子大小、直径、含水量均较稳定, 所以使用该法有一定的准确性。但是, 由于该法在每次试验中称量、制片、计数次数较多, 常易造成误差。尤其是石松孢子不是常用生药, 常不易买到而不能使用, 这可能是长期没有得到推广使用的主要原因。在无其它形态定量法以前, 仍为一种可用的方法。

2. 直接定量法 此法不用石松孢子为参比物, 而是直接测定检品中某一单味生药或某一混杂物的百分含量的一种显微定量法, 因此称为直接定量法。该法较为方便, 是目前形态定量的另一种方法。

使用该方法的检品所必须具备的条件、具体步骤同石松孢子法, 即通过公式 (5) 和公式 (6) 可分别计算出单味生药的特殊分子数和检品中某一单味生药的百分含量。

$$\text{公式 (5) } P = \frac{NAV}{A'V'W} \quad \text{公式 (6) } X = \frac{NAV \times 100}{A'V'WP}$$

式中, P: 单味生药的特殊分子数;

N: 25 (或 10) 个视野中特殊分子之和;

A: 盖玻片的面积 (mm^2);

V: 混悬剂定容体积 (ml);

A': 25 (或 10) 个视野面积之和 (mm^2);

V': 盖玻片下混悬液体积 (ml);

W: 检品重量 (mg);

X: 单味生药的含量 (%)。

现以测定含有金银花的检品中金银花的百分含量为例, 介绍具体操作方法如下:

(1) 金银花特殊分子 (花粉粒) 数测定。

1) 正确鉴定金银花生药, 并粉碎成过 100 目的粉末。

2) 混悬剂的制备: 称取水合氯醛 50g, 加蒸馏水 15ml, 甘油 10ml, 充分混匀备用。

3) 混悬液的制备: 精确称取金银花粉末 (512mg), 混悬剂定容至一定体积 (10ml)。

4) 制片: 在制片前先用游标卡尺 (精密度为 0.02mm 的) 测量并计算盖玻片面积。用

带刻度的微量吸管吸取混悬液，滴于载玻片上，每片 0.07ml（18mm × 18mm 的盖玻片为 0.04ml），自中央盖上盖片，共做 6 片。装片量要准确，分布要均匀，无气泡，不外溢。

5) 观察计数：按图 1-3 选取 25 个（或 10 个）视野，统计金银花的花粉粒数。用镜台量尺测算出一个视野的面积。用公式（5）即可算出每毫克金银花的花粉粒数。重复观察 6 片，每片误差不得大于 20%，求其平均值即为每毫克金银花中的特殊分子数。

6) 计算：已知 $N = 534$ $A = 324$ $V = 10$ $A' = 32$ $V' = 0.07$ $W = 512$

将以上数据代入公式（5） $P = \frac{534 \times 324 \times 10}{32 \times 0.07 \times 512} = 1509$

(2) 检品（混合粉末）中金银花的含量测定。

1) 取检品或按处方比例配制含金银花的混合粉末，粉碎并过 100 目筛。称取该粉末 503mg。

2) 按上述方法制片观察，统计 25（或 10）个视野中金银花的花粉粒数，再用公式（6）计算金银花的百分含量。重复观察 6 片，每次误差不得大于 20%，求其平均值即为该混合粉末中金银花的百分含量。

3) 计算：已知 $N = 274$ $A = 324$ $V = 10$ $A' = 32$ $V' = 0.07$ $W = 503$ $P = 1509$

将以上数据代入公式（6） $X = \frac{274 \times 324 \times 10 \times 100}{32 \times 0.07 \times 503 \times 1509} = 52.2$

该混合粉末中金银花的含量为 52.2%。

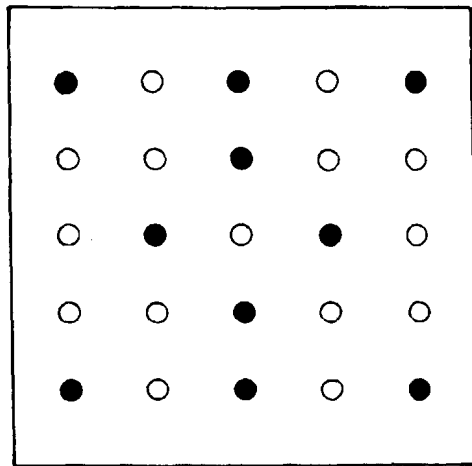


图 1-3 直接定量法视野选择图示

“○+●”为选取 25 个视野时使用

“●”为选取 10 个视野时使用

以上两种方法的主要优点是可用于粉末定量，尤其适用于粉末制剂中某个代用品或掺杂品的含量测定。但都有共同的缺点：制片观察较多，较费时间，而且有较大的误差。

第四节 生药摄影和显微照相及幻灯片制作技术

一、生药摄影技术

生药摄影主要包括原动植物标本和药材性状的摄影。其目的是将生药的原动植物、药材的外部形态、结构及色泽如实地记录下来，以便于教学和科研。生药摄影要求形象真实、结构清晰并有立体感。

1. 相机的选择和结构 照相机种类很多,生药摄影最好用单反式、有内测光的相机,因为这类相机具有视差小、镜头可换、附件多等特点,便于操作。有内测光系统可使曝光更加准确。另外配备三角架、闪光灯、近拍镜、接圈、滤色镜等常用附件。相机结构(图 1-4)。

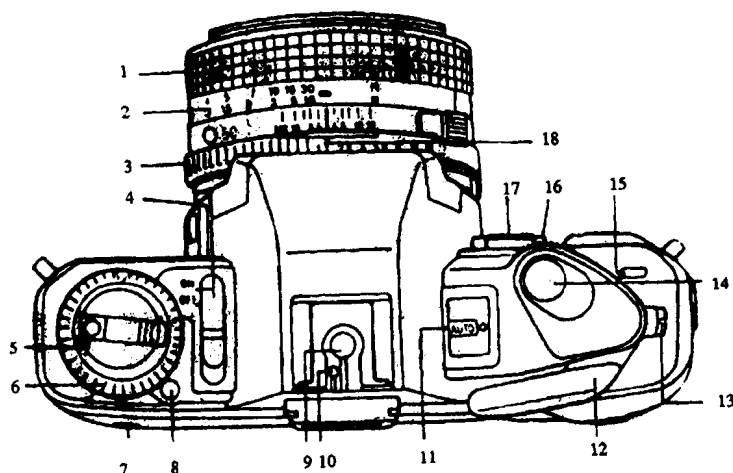


图 1-4 照相机的构造

1. 调焦环 2. 距离刻度 3. 光圈调节环 4. 电源开关 5. 倒片手柄 6. 感光度调整环
7. 感光调整显示窗 8. 感光度调整环锁定钮 9. 闪光灯主触点 10. 闪光灯副触点
11. 快门速度显示窗 12. 过片手柄 13. 计数器 14. 快门按钮 15. 装片指示窗
16. 快门设定环 17. 自拍器 18. 景深表

2. 常用感光材料

(1) 常用感光材料的种类

1) 黑白胶卷

全色片：对光谱中各色光均感光，多作负片用，即冲洗后影像与原景物相反。用作底版印放照片。

色盲片：又称正片、拷贝片，只对蓝紫光敏感，适用于反拍黑白文字、制作幻灯片。色盲片可在红色安全灯下操作。

2) 黑白相纸：黑白相纸可分为印相和放大两大类，又据反差的不同，分为 1、2、3、4 号，号数越大反差越强，可根据胶卷的反差和使用的目的选择使用。