



天津中医药大学

现代中药分析实验讲义

(供中药专业使用)

天津中医药大学中药学院
分析化学教研室

2015年4月

目 录

实验项目一：加味香连丸的 TLC 鉴别	3
实验项目二：紫外分光光度法测定加味香连丸中黄连生物碱的含量	5
实验项目三：复方丹参滴丸中龙脑的含量测定	6
实验项目四：中药制剂中橙皮苷的含量测定	8
实验项目五：HPLC 综合实验——清颗粒测定(1)	9
实验项目六：HPLC 综合实验——清颗粒测定(2)	12

天津中医药大学

《现代中药分析》实验讲义

所属课程	现代中药分析 核心课程	学时	36
适用专业	中药学 1004 中药制药 1005		
课程英文名称	Analysis of Chinese Medicinal Preparation Experiment		

一、实验课程简介

《中药制剂分析》是一门以中医药理论为指导，运用现代分析理论和方法研究中成药制剂质量的综合应用性学科，是中药专业的核心主干课程之一。

二、实验课程目标

通过实验，加深对中药制剂分析基本理论、基本知识的理解，正确、熟练地掌握中药制剂分析常用的法定方法及规范化的操作技能。

《现代中药分析实验》是《化学分析》、《仪器分析》、《中药学》、《方剂学》、《中药炮制》、《中药鉴定学》、《中药化学》和《中药制剂学》等相结合的一门具有很强实践性和综合性的应用科学。本课程实践教学既注重基本技能训练、又加强创新能力的培养。在实践教学内容的安排上，既有验证性实验，让学生掌握药物分析的一般方法与技术特点；又有综合性试验，使学生将理论知识和具体的药物分析测定技术融会贯通，掌握解决实际药物分析技术问题方法；还包括设计性试验，培养学生的研究创新能力。验证性、综合性和设计性试验分步骤逐步实施，使学生的理论和实验技能得到不断的进步。

三、实验项目

（一）实验项目一：加味香连丸的 TLC 鉴别

1、实验项目学时：6 学时

2、实验项目类型：验证性、综合性实验。

3、实验项目内容：1. 加味香连丸中黄连总碱的提取；黄连药味的薄层鉴别。

2. 加味香连丸中挥发油的提取；药味的薄层鉴别。

4、实验项目学习要求：（从运用知识、提高能力两个层次说明学习要求）

（1）运用知识：中药材及其复方制剂的 TLC 鉴别、中药有效部位的提取、对照液、供试液制备。TLC 基本操作技能练习。

(2) 提高能力：掌握中药提取、净化操作；5种 TLC 溶液配制操作；TLC 规范操作；鉴别中药真伪操作技能。提高 TLC 法鉴别中药的能力及有效部位提取能力。

5、主要仪器设备与材料：

千分之一天平、恒温水浴锅、层析缸、三用紫外分析仪、喷雾瓶、吹风机、加味香连丸、盐酸小檗碱对照品、黄连及木香对照药材，95%乙醇（AR）。

6、与理论课程的关系：本实验是在第二章鉴别基础知识教学基础上的实验教学。是中药鉴别主要方法的直接应用。是中国药典的最主要方法。

7、实验步骤

1) 取本品 60mg，研细，加乙醇 5ml，置水浴中加热回流 15 分钟，滤过，滤液补加乙醇使成 5ml，作为供试品溶液。另取黄连对照药材 50mg，同法制成对照药材溶液。再取盐酸小檗碱对照品，加乙醇制成每 1ml 含 0.04mg 的溶液。照薄层色谱法试验，吸取上述三种溶液各 2 微升，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以乙酸乙酯：氯仿：甲醇：氨水：二乙胺（8：2：2：1：0.5）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，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同的黄色荧光斑点；在与对照品色谱相应的位置上，显相同的一个黄色荧光斑点。

2) 取本品 0.5g，研细，加乙醚 5ml，放置 2 小时，时时振摇，滤过，滤液挥去乙醚，残渣加醋酸乙酯 0.5ml 使溶解，作为供试品溶液。另取木香对照药材 0.2g，加乙醚 5ml，同法制成对照药材溶液，照薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液各 2 微升，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以环己烷：丙酮（10：3）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 105℃ 烘约 5 分钟。供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同的紫红色至蓝紫色斑点。

8、数据处理：给出鉴定结论

如实记录,画出薄层板(黄连及木香)

9、思考题：

- 1) 定性鉴别需配置哪几种溶液？为什么？
- 2) 定性鉴别对量有哪些要求？

(二) 实验项目二：紫外分光光度法测定加味香连丸中黄连生物碱的含量

1、实验项目学时：6 学时

2、实验项目类型：验证性、综合性实验。

3、实验项目内容：1. 利用氧化铝色谱柱净化加味香连丸中黄连生物碱
2. 利用紫外分光光度法测定黄连总生物碱含量

4、实验项目学习要求：（从运用知识、提高能力两个层次说明学习要求）

(1) 运用知识：掌握用柱层析净化提取物的方法；掌握紫外分光光度法测定复方中某一类物质的方法。

(2) 提高能力：掌握中药提取、净化操作；UV-VIS 规范操作；提高 UV-VIS 法测定中药成分含量的能力。

5、主要仪器设备与材料：

1. 紫外-可见分光光度计
2. 小层析柱：高 13 cm，内径 8 mm，2 个
3. 中性 Al_2O_3 （150—200 目）
4. 样品：加味香连丸
5. 对照品：盐酸小檗碱

6、与理论课程的关系：本实验是在第四单元含量测定基础知识教学基础上的实验教学。是 UV-VIS 法测定中药成分含量方法的直接应用。是中国药典的主要方法。

7、实验步骤

1) 含量测定：

A、样品溶液配制：

取加味香连丸 0.5g，研成细粉，精密称取 0.1g(实验中称取多少写多少)，置 60ml 索氏提取器中加 95%乙醇 40ml 连续回流提取生物碱至无色。将提取液浓缩至 20ml，定量转移到 25ml 容量瓶中，用 95%乙醇至刻度。

精密吸取样品液 1.0ml 通过 Al_2O_3 柱,用 95%EtOH 至洗脱完全,收集洗脱液于 10ml 容量瓶中，连续加 95%乙醇至刻度，于 $\lambda_{\text{max}}350\text{nm}$ 处测定吸收度。

B、对照品溶液配制

用 95%乙醇溶液，配制对照品溶液浓度为 0.006mg/ml。

C、含量测定

应用外标一点法测定加味香连丸中总生物碱的含量。

8、数据处理

计算出 100g 加味香连丸中含有盐酸小檗碱多少克？

9、思考题

- 1) 如何判断生物碱已被提取完全？
- 2) 以测定小檗碱为例,除此方法外还有什么测定复方中黄连生物碱的方法？
- 3) 本实验中测定样品紫外吸收度时,以什么作为空白对照液？为什么？

(三) 实验项目三：复方丹参滴丸中龙脑的含量测定

1、实验项目学时：6 学时

2、实验项目类型：验证性、综合性实验。

3、实验项目内容：

1. 色谱条件的选择；
2. 实验用溶液的配制,包括内标溶液、对照溶液及样品溶液的配制；
3. 利用内标法测定复方丹参滴丸中龙脑的含量。

4、实验项目学习要求：（从运用知识、提高能力两个层次说明学习要求）

(1) 运用知识：掌握气相色谱法测定中药制剂中成分含量的方法和原理；熟悉气相色谱仪进行含量测定的操作过程。熟悉气相色谱仪各种操作条件的选择应用。

(2) 提高能力：GC 的基本操作、仪器条件确定；提高运用 GC 进行药物含量测定的能力。

5、主要仪器设备与材料：

1. 安捷伦-6820 气相色谱仪（FID 检测器）、微量进样器；
2. SPB-5 毛细管色谱柱（弱极性）
3. 水杨酸甲酯（内标）、醋酸乙酯（AR）
4. 龙脑对照品（中国药品生物制品检定所）
5. 复方丹参滴丸（天士力有限公司生产）。

6、与理论课程的关系：本实验是在第四单元有关气相色谱法教学基础上的实

验教学。是中药含量测定重要方法的直接应用。是中国药典的主要方法。

7、操作步骤

1. 色谱条件

采用 SPB-5 毛细管色谱柱（弱极性），柱长 30m，内径 0.32mm，液膜厚度 0.25 μ m，分流进样 1 μ L（分流比 1:20）；柱温：初始温度 100 $^{\circ}$ C，保持 1min，以 8 $^{\circ}$ C / min 升至 180 $^{\circ}$ C，保持 1min；后进样口温度为 220 $^{\circ}$ C；前检测器温度为 300 $^{\circ}$ C；载气为 N₂，柱前压 100kPa 左右；H₂ 50kPa；空气 50kPa；FID 检测器。理论塔板数按龙脑峰计算不低于十万；R_S>1.5；对称性因子 T=0.95。

2. 校正因子测定

内标溶液配制 取水杨酸甲酯 125mg，置 25mL 量瓶中，加醋酸乙酯至刻度，制成每 1mL 含 5mg 的内标溶液。

对照溶液配制 取龙脑对照品 5mg，精密称定，置 10mL 量瓶中，加内标溶液至刻度，摇匀，作为龙脑对照溶液。

测定校正因子 取龙脑对照液 1 μ L 注入气相色谱仪，测定至少 5 次，计算校正因子。

3. 测定法

取合成冰片 5mg，精密称定，置 10mL 量瓶中，加入内标溶液使冰片溶解并稀释至刻度，摇匀，吸取 2 μ L，注入气相色谱仪，测定。按内标法计算含量。

8、注意事项

1. 实验前，必须对气相色谱仪整个气路系统进行检漏。如有漏气，及时处理。

2. 开机前先通气，实验结束，先降温、关机，后关气。

3. 由于样品中挥发性成分较多，样品干燥时，要注意方法和温度。

9、思考题

1. 在建立一个中药制剂的测定方法时，如何进行方法学考察？

2. 研究和设计中药制剂的分析方法时，应根据哪几方面内容？

(四) 实验项目四：中药制剂中橙皮苷的含量测定

1、实验项目学时：6 学时

2、实验项目类型：验证性、综合性实验。

3、实验项目内容：1. HPLC 仪器使用及基本操作；

2. 色谱条件的选择；

3. 实验用溶液的配制，包括橙皮苷对照品溶液及供试品溶液的制备；

4. 利用外标一点法进行定量分析。

4、实验项目学习要求：（从运用知识、提高能力两个层次说明学习要求）

(1) 运用知识：HPLC 的具体应用。掌握高效液相色谱仪的基本操作及定量方法；

(2) 提高能力：提高 HPLC 的基础操作能力、仪器条件选择能力；提高运用 HPLC 进行药物定量分析能力。

5、主要仪器设备与材料：

1. 高效液相色谱仪（紫外检测器）

2. C18 反相色谱柱（Hypersil ODS 5 μm \times 4.6 mm \times 250 mm）；

3. 微量进样器

4. 一次性注射器

5. 0.45 μm 微孔滤膜

6. 容量瓶 50、250 ml

7. 移液管，洗耳球；具塞三角瓶（50 ml）；超声波清洗器；天平；滤纸、培养皿；炮弹管。

8. 橙皮苷对照（中国药品生物制品检定所）

9. 陈皮（天津市饮片厂）

6、与理论课程的关系：：本实验是在第四单元有关高效液相色谱法教学基础上的实验教学。是中药含量测定重要方法的直接应用。是中国药典的主要方法。

7、操作步骤

1) 色谱条件：

色谱柱：C₁₈, 250 \times 4.6mm, 5 μm ；流动相：43% 甲醇；柱温：室温；流速：1ml/min；

检测：UVD，波长为 270nm；进样量：10 μ L。理论塔板数 $n > 3000$ 。

2) 橙皮苷对照品溶液的制备及测定：

取橙皮苷对照品 1.6mg，加甲醇置 100ml 容量瓶中，制成 0.016mg/ml 的溶液，作为对照品溶液。精密吸取 10 μ L 按上述色谱条件进样，测定对照品峰面积。

3) 供试品溶液的制备：

取中药复方，精密称取 0.3g 置锥形瓶中，加入甲醇 50ml，加塞称重，超声提取 15 分钟后继续称重并用甲醇补足减少的重量。用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤，取续滤液，作为供试品溶液。

4) 测定

精密吸取 10 μ L 供试品溶液，注入液相色谱仪，测定供试品中橙皮苷峰面积。

5) 计算

外标一点法计算 100 克中药复方中含有橙皮苷的克数（%）。

(五) 实验项目五：HPLC 综合实验——一清颗粒测定

1、实验项目学时：6 学时

2、实验项目类型：综合性实验。

3、实验项目内容：1. 实际运用 HPLC 仪器，解决实际问题
2. 一清颗粒中黄芩苷的含量测定

4、实验项目学习要求：（从运用知识、提高能力两个层次说明学习要求）

（1）运用知识：现代中药分析的特点以及一般程序，掌握中药分析方法学考察的基本内容。

（2）提高能力：提高运用 HPLC 进行药物定量分析能力。

5、主要仪器设备与材料：

1. 高效液相色谱仪（紫外检测器）
2. C18 反相色谱柱（Hypersil ODS 5 μ m \times 4.6 mm \times 250 mm）；
3. 微量进样器
4. 一次性注射器
5. 0.45 μ m 微孔滤膜
6. 容量瓶 50、250 ml

7. 移液管, 洗耳球; 具塞三角瓶 (50 ml); 超声波清洗器; 天平; 滤纸、培养皿; 炮弹管。

8. 对照品 (中国药品生物制品检定所)

9. 一清颗粒 (自制)

6、与理论课程的关系: 本实验是在第四单元有关高效液相色谱法教学基础上的实验教学。是中药含量测定重要方法的直接应用。是中国药典的主要方法。

7、实验步骤

1) 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Hypersil ODS (4.6 × 250 mm, 5 μm)

流动相: 甲醇-1%冰醋酸水溶液 (52:48, v/v) 或 (54:46, v/v)

检测波长: 280 nm

流速: 1 ml/min

柱温: 室温

进样量: 5 μl

按黄芩苷计算理论塔板数不低于 3000

2) 黄芩苷对照品溶液的制备

精密称取在 105℃干燥至恒重的黄芩苷对照品适量, 用 75%乙醇配制成浓度为 20.5 μg/ml 的黄芩苷对照品溶液, 于 4℃保存, 备用。

3) 供试品溶液的制备

取装量差异项下的内容物, 研细, 取约 0.1 g, 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加 70%乙醇 10 ml, 超声处理 20 分钟, 用 70%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

4) 阴性溶液的制备

取不含黄芩的药材粉末照供试品溶液同法制备。

5) 测定法

分别吸取阴性溶液、对照品溶液与供试品溶液各 5 μL 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

本品每袋 (7.5 g) 含黄芩以黄芩苷 (C₂₁H₁₈O₁₁) 计不得少于 30.0 mg。

8、黄芩苷含量测定的方法学考察

8.1 线性关系考察

本实验采用外标一点法，不做线性考察。

8.2 精密度试验

取同一对照品溶液 5 μl 注入高效液相色谱仪，连续进样 6 次，考察仪器精密度。

Table 8.1 The results of precision test

测定次数	保留时间 (t_R)	峰面积 (A)	峰面积平均值	RSD
1				
2				
3				
4				
5				
6				

8.3 重复性试验

取同一批号的一清颗粒供试品，按照 3.3 项下供试品溶液的配制方法，平行制备 6 份供试品溶液，各取 5 μl ，注入高效液相色谱仪，进样分析，考察方法的精密度。

Table 8.2 The results of reproducibility test of Baicalin

样品	W _{称重}	峰面积	黄芩苷含量	含量平均值	RSD
1					
2					
3					
4					
5					
6					

8.4 专属性试验

阴性溶液进样分析，与对照品溶液和供试品溶液色谱图对比，考察方法专属性。

8.5 稳定性试验

取同一份供试品溶液，分别于样品制备后 0、2、4、6、12 及 24 h 进样分析（依试验时间而定），考察方法稳定性。

8.6 加样回收试验

精密称取已知含量的供试品 6 份（依试验时间而定），按黄芩苷已知量的 1 倍加入对照品，与 3.3 项同法制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样分析，计算加样回收率。（依试验时间而定）

9、一清颗粒中黄芩苷的含量测定（可用重复性试验结果）

取同一批号的一清颗粒供试品，按照 3) 项下供试品溶液的配制方法，平行制备 3 份以上样品，计算每袋（7.5 g）中黄芩苷的含量（mg）。

（本次试验使用重复性试验结果计算一清颗粒中黄芩苷的含量）

含量测定结果计算公式：

$$C_X = C_R * A_X * D * 7.5 * / (A_R * W_{\text{称重}} * 1000)$$

C_X : mg/袋（7.5 g）

C_R : 对照品溶液浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）

A_R : 对照品溶液黄芩苷峰面积

A_X : 供试品溶液黄芩苷峰面积

D : 供试品溶液体积（本次试验为 50 ml）

$W_{\text{称重}}$: 供试品实际称重量

（六）实验项目六：HPLC 综合实验——一清颗粒测定

1、实验项目学时：6 学时

2、实验项目类型：综合性实验。

3、实验项目内容：1. 实际运用 HPLC 仪器，解决实际问题

2. 一清颗粒中黄芩苷的含量测定

4、实验项目学习要求：（从运用知识、提高能力两个层次说明学习要求）

（1）运用知识：现代中药分析的特点以及一般程序，掌握中药分析方法学考察的基本内容。

（2）提高能力：提高运用 HPLC 进行药物定量分析能力。

5、主要仪器设备与材料：

1. 高效液相色谱仪（紫外检测器）

2. C18 反相色谱柱（Hypersil ODS 5 μm \times 4.6 mm \times 250 mm）；

3. 微量进样器
4. 一次性注射器
5. 0.45 μm 微孔滤膜
6. 容量瓶 50、250 ml
7. 移液管，洗耳球；具塞三角瓶（50 ml）；超声波清洗器；天平；滤纸、培养皿；炮弹管。
8. 对照品（中国药品生物制品检定所）
9. 一清颗粒（自制）

6、与理论课程的关系：本实验是在第四单元有关高效液相色谱法教学基础上的实验教学。是中药含量测定重要方法的直接应用。是中国药典的主要方法。实验步骤及结果计算同实验项目五。

四、实验考核

（一）实验考核项目和比例：实验考核成绩由每次试验的预习报告、实验操作、实验报告完成情况、次数及其质量确定；实验缺勤 1/3，实验成绩以零分记并取消参加考试资格。

（二）考核项目评分依据：

序号	项目	成绩	说明
1	课前预习	10%	实验前必须写出报告并查考实验中涉及的基本内容、操及操作注意事项，经教师检查，方可参加实验。
2	实验操作	20%	
3	原始数据	5%	指导老师签字
4	实验报告	20%	要求独立完成报告，若发现抄袭，均按不及格处理。
5	数据处理	10%	独立完成数据处理、绘图等。
6	现象观察与讨论	25%	对实验中观察到的现象做必要的分析、讨论、得出结论。
7	思考题	10%	要求完成实验后的思考题。

(三)实验考核结果反馈:①反馈实验考核项目学生成绩;②反馈学生操作、讨论、实验报告的质量以及提高建议。

张玉萍 2015.8.8