

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Техника микроскопического и
микрохимического исследования
лекарственного растительного
сырья и лекарственных
растительных препаратов

ОФС.1.5.3.0003.15

Взамен ст. ГФ XI, стр. 277, стр.
282

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает единые требования к технике проведения микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, с целью дальнейшего определения их соответствия требованиям по показателю «Подлинность».

Термины и определения

Анатомо-диагностические признаки – совокупность признаков анатомического строения лекарственного растительного сырья, отличающих данное лекарственное растительное сырье/препарат от других видов при диагностике его подлинности.

Микроскопическое исследование – исследование, при котором в общей картине анатомического строения различных морфологических органов растений идентифицируются под микроскопом характерные анатомо-диагностические признаки; при этом руководствуются разделом «Микроскопия» соответствующей фармакопейной статьи или нормативной документации на исследуемый вид лекарственного растительного сырья/препарата.

Микрохимическое исследование – исследование, при котором проводят микрохимические реакции одновременно с микроскопическим анализом лекарственного растительного сырья/препарата, наблюдая их

результаты под микроскопом; при этом руководствуются разделом «Микроскопия» соответствующей фармакопейной статьи или нормативной документации на исследуемый вид лекарственного растительного сырья/препарата. Обычно микрохимическое исследование включает микрохимические реакции для обнаружения действующих и сопутствующих веществ: алкалоидов, дубильных веществ, слизи, инулина, крахмала и др.

Гистохимическое исследование – исследование, при котором проводят гистохимические реакции одновременно с микроскопическим анализом лекарственного растительного сырья (препарата); при этом руководствуются разделом «Микроскопия» соответствующей фармакопейной статьи или нормативной документации на исследуемый вид лекарственного растительного сырья/препарата. Обычно гистохимическое исследование включает гистохимические реакции, позволяющие провести окрашивание анатомических структур и тканей: эфиромасличных железок, вместилищ, одревесневших оболочек сосудов, механических волокон, кутинизированных оболочек (кутикулу, покрывающую эпидермис), опробковевших оболочек покровной ткани (пробку) и др.

Микропрепарат – препарат исследуемого объекта, подготовленный на предметном стекле с целью его дальнейшего изучения под микроскопом.

Поперечный срез – срез морфологического органа растительного объекта, выполненный перпендикулярно вертикальной оси этого морфологического органа. Обычно на поперечном срезе рассматривают диаметр сосудов, механических волокон, млечников, вытянутых вместилищ, структуру сосудисто-волоконистых пучков подземных органов, стеблей, черешков и т.д. в поперечном сечении.

Продольный срез – срез морфологического органа растительного объекта, выполненный параллельно вертикальной оси этого морфологического органа. Обычно на продольном срезе изучают длину сосудов, механических волокон и других вытянутых структур; характер утолщенности (перфорации) стенок этих структур; строение сосудисто-

волокнистых пучков подземных органов, стеблей, черешков и т.д. в продольном сечении.

«Давленный» микропрепарат – микропрепарат, полученный из морфологического органа растительного объекта путем раздавливания его на предметном стекле обратным концом препаровальной иглы или скальпелем с целью получения более тонкого слоя исследуемого объекта и возможности детального рассмотрения его структур. Обычно «давленные» микропрепараты готовят из плодов, подземных органов, коры, крупного порошка различных морфологических органов и др.

Общие положения

Техника приготовления микропрепаратов из лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов разнообразна и зависит от морфологической группы исследуемого объекта, а также от состояния лекарственного растительного сырья/препарата – цельного, измельченного или порошка.

Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов совпадает, поэтому она представлена по морфологическим группам.

Количественная оценка анатомо-диагностических признаков проводится во всех рассматриваемых морфологических группах лекарственного растительного сырья одинаково. Частота встречаемости анатомо-диагностических признаков обычно учитывается на эпидермисе листьев, черешков, лепестков, чашелистиков, цветоножек, стеблей, плодов, семян, плодоножек. При необходимости измеряется толщина лепестков и чашелистиков.

Для определения подлинности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов может быть также использован метод люминисцентной микроскопии. Преимуществом метода является возможность его применения для изучения сухого растительного материала,

из которого готовят толстые срезы или препараты порошка, и рассматривают их в падающем свете, при освещении препарата сверху, через опак-иллюминатор или объектив.

Люминисцентная микроскопия выполняется с помощью люминисцентных микроскопов или обычных биологических микроскопов, снабженных специальными люминисцентными осветителями.

Препараты в люминисцентном микроскопе рассматривают в ультрафиолетовом свете, наблюдая первичную (собственную) люминисценцию.

Для приготовления микропрепаратов используют сухое лекарственное растительное сырье или его порошок. Предварительное размачивание сырья исключается, так как это приводит к вымыванию веществ из клеток; допускается лишь непродолжительное размягчение во влажной камере.

Листья

Цельное сырье. Для анализа цельных листьев берут цельные листья или кусочки пластинки листа с краем и жилкой, кусочки листа от основания и верхушки, кусочки черешка (если лист имеет черешок).

Просветляют одним из двух способов:

1. Несколько кусочков сырья помещают в колбу или пробирку, прибавляют натрия гидроксида раствор 5 %, разведенный водой (1:1), и кипятят в течение 2 – 5 мин в зависимости от толщины и плотности объекта, не допуская сильного размягчения. Более жесткие листья (толокнянка, брусника, эвкалипт) кипятят до 5 мин, более хрупкие листья (крапива, чистотел) кипятят до 2 мин. Затем содержимое переливают в стеклянный стакан, жидкость сливают через 2 – 4 слоя марли, которой закрывают стакан, и сырье тщательно промывают водой, каждый раз сливая воду через ту же марлю. Содержимое стакана переносят в небольшом количестве воды в чашку Петри. Частицы сырья, оставшиеся на марле, смывают в ту же чашку Петри. Из воды кусочки вынимают скальпелем или лопаточкой и помещают на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата или глицерина

раствора 33 %.

2. Кусочки сырья кипятят в растворе хлоралгидрата, разведенного водой (1:1), в течение 5 – 10 мин (до просветления). Просветленный кусочек сырья помещают на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата или глицерина раствора 33 %.

Кусочки сырья, просветленные тем или иным способом и помещенные на предметное стекло, разделяют скальпелем или препаровальными иглами на две части, одну из них осторожно переворачивают. Кожистые и толстые листья раздавливают скальпелем или обратным концом препаровальной иглы. Кусочек черешка помещают на предметное стекло. Тонкие черешки раздавливают скальпелем или обратным концом препаровальной иглы для высвобождения эпидермиса. С толстых черешков снимают эпидермис с помощью препаровальных игл или бритвы, убирая грубые внутренние части черешка, мешающие получению хорошего микропрепарата эпидермиса. Объект накрывают покровным стеклом, при необходимости слегка сверху придавливают чистым обратным концом препаровальной иглы и слегка подогревают до удаления пузырьков воздуха, после охлаждения рассматривают лист с обеих сторон и эпидермис черешка под микроскопом сначала при малом, затем при большом увеличении. При разных увеличениях, пользуясь макро- и микровинтом, исследуют верхний и нижний эпидермис, а также глубинные структуры листа, расположенные под эпидермисом (паренхима, включения, сосуды и т.д.).

При анализе толстых и кожистых листьев (эвкалипт, толокнянка, брусника) готовят поперечные срезы. При необходимости также готовят поперечные срезы черешков. Для чего используют два способа размачивания.

1. Листья (черешки) кипятят в растворе хлоралгидрата в течение 10 мин.

2. При отсутствии хлоралгидрата выбранные листья (черешки) и их кусочки помещают в воду на 1 – 2 ч, после размачивания переносят в смесь

глицерин – вода – этанол (1 : 1 : 1), где выдерживают 1 – 2 сут до полного пропитывания тканей жидкостью. В этой жидкости материал можно хранить продолжительное время, для чего при приготовлении смеси к ней добавляют кристаллик фенола.

Из размоченных объектов делают срезы, зажимая кусочки листа (черешка) в бутылочную пробку (коровую) или сердцевину бузины. При использовании бутылочной пробки ее предварительно кипятят в воде 15 мин. Кусочек бузины или бутылочной пробки разрезают пополам и между двумя половинками зажимают кусочек листа. Для изготовления поперечных срезов поверхность кусочка следует подготовить так, чтобы она была строго перпендикулярна к оси черешка или жилке листа. Для поперечного среза из листа вырезают небольшой участок, так чтобы попала средняя или боковая жилка, срез ведут перпендикулярно к жилке. Готовые срезы помещают в чашку Петри с водой, откуда срезы вынимают, просматривают под микроскопом, отбирая удачные.

При использовании первого способа размачивания срезы для их изучения помещают на предметное стекло в раствор хлоралгидрата. При втором способе размачивания срезы требуют дополнительного просветления. Для чего их помещают в натрия гидроксида раствор 5 % на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и осторожно нагревают над пламенем горелки до полного просветления. После охлаждения микропрепарата с левой стороны покровного стекла помещают небольшой кусочек фильтровальной бумаги, а с правой начинают понемногу вводить пипеткой глицерина раствор 33 % до получения препарата с бесцветной включающей жидкостью. Полученный микропрепарат изучают под микроскопом.

Измельчённое сырьё. Для анализа берут кусочки пластинки листа с краем и жилкой, кусочки листа от основания и верхушки, кусочки черешка (если лист имеет черешок). Далее с выбранными кусочками поступают так же, как в случае с цельными листьями.

Порошок. Для изучения порошка можно использовать два способа

получения микропрепаратов.

1. На предметное стекло наносят 1 – 2 капли раствора хлоралгидрата и небольшое количество исследуемого порошка. Порошок берут кончиком препаровальной иглы, смоченной хлоралгидратом, тщательно размешивают, закрывают покровным стеклом и нагревают до удаления пузырьков воздуха. Затем стекло слегка придавливают ручкой препаровальной иглы, выступившую по краям жидкость удаляют полоской фильтровальной бумаги. Порошки кожистых листьев просветляют кипячением в натрия гидроксида растворе 5 %.

2. При отсутствии хлоралгидрата на предметное стекло наносят 1 – 2 капли натрия гидроксида раствора 5 % и небольшое количество порошка. Порошок берут кончиком препаровальной иглы, смоченной натрия гидроксида раствором 5 %, тщательно размешивают, закрывают покровным стеклом и нагревают над пламенем горелки до просветления. После охлаждения удаляют фильтровальной бумагой натрия гидроксида раствор с одной стороны покровного стекла, добавляя с противоположной стороны пипеткой глицерина раствор 33 %.

Цветки

Цельное сырье. Для анализа берут чашечку, венчик, тычинки, пестик, цветоножку, также, если есть, листочки обертки корзинки, прицветные листья и другие элементы цветка и соцветий, если таковые имеются. Способы просветления используют те же, что и для листьев. Для исследования пыльцы раздавливают пыльники тычинок обратным концом препаровальной иглы. Следует учесть, что тонкие лепестки кипятят в натрия гидроксида растворе 5 % не более 1 мин. Анализ цветоножки проводят аналогично анализу черешка листа. При необходимости делают поперечные срезы цветоножки.

Измельченное сырье. Для анализа берут кусочки чашечки, венчика, цветоножки, а также тычинки, пестик и другие элементы цветка и соцветий, если таковые имеются. Если сырье имеет небольшие размеры, то берут

цельные чашечку и венчик. Далее с выбранными кусочками поступают так же, как в случае с цельными цветками.

Порошок. Микропрепараты готовят аналогично микропрепаратам порошка листьев.

Травы

Цельные травы. Для анализа берут цельные листья или кусочки пластинки листа с краем и жилкой, кусочки листа от основания и верхушки, кусочки черешка (если лист имеет черешок); чашечку, венчик, тычинки, пестик и цветоножку, при необходимости другие элементы цветка и соцветий, если таковые имеются; кусочки стеблей, если есть, и при необходимости плоды. Используют способы просветления, описанные для листьев, цветков и плодов.

Для исследования стеблей их обрезки кипятят в натрия гидроксида растворе 5 % в течение 3 – 5 мин в зависимости от толщины и грубости объектов. Эпидермис снимают скальпелем или препаровальными иглами; из остальных тканей готовят микропрепарат, раздавливая объект скальпелем на предметном стекле в хлоралгидрата растворе или глицерина растворе 33 %. При необходимости готовят поперечные срезы, для чего используют методику приготовления поперечных срезов черешка листа, учитывая, что при помещении кусочков стеблей между двумя половинками пробки необходимо сделать бритвой соответствующие углубления для предотвращения сдавливания тканей исследуемого объекта.

Измельченное сырье. Выбирают кусочки листьев, цветков, стеблей, плодов или при их небольших размерах цельные перечисленные объекты. Далее с ними поступают так же, как в случае с цельной травой.

Порошок. Микропрепараты готовят аналогично микропрепаратам листьев.

Плоды и семена

Цельное сырье. Готовят препараты кожуры семени и околоплодника с поверхности или поперечные срезы.

Препараты кожур и околоплодника с поверхности. 2 – 3 семени или плода кипятят в пробирке в натрия гидроксида растворе 5 % в течение 2 – 3 мин и тщательно промывают водой. Объект помещают на предметное стекло, препаровальными иглами отделяют кожуру семени или ткани околоплодника и рассматривают их в растворе хлоралгидрата или глицерина растворе 33 %.

Ткани мезокарпия и эндокарпия рассматривают в давленных препаратах и на срезах. Давленные препараты получают при использовании обратного конца препаровальной иглы или скальпеля путем надавливания на объект в заключающей среде на предметном стекле.

Для приготовления срезов сухие плоды и семена предварительно размягчают, поместив их на 1 сут во влажную камеру (влажной камерой служит эксикатор с водой, в которую добавлено несколько капель хлороформа) или водяным паром в течение 15 – 30 мин или более в зависимости от твердости объекта.

Можно также использовать 2-й способ размачивания перед получением поперечных срезов, описанный в разделе «Листья», помещая при этом анализируемые объекты в воду на 1 сут, далее в смесь глицерин – вода – этанол (1:1:1) на 3 сут.

Мелкие плоды и семена запаивают в парафиновый блок размером 0,5×0,5×1,5 см. Кончиком нагретой препаровальной иглы расплавляют парафин и в образовавшуюся ямку быстро погружают объект. Поверхность объекта должна быть сухой. Срезы объекта делают вместе с парафином; срезы выбирают из парафина препаровальной иглой, смоченной жидкостью, и готовят микропрепараты в растворе хлоралгидрата или глицерина растворе 33 %.

Для изготовления срезов из мелких плодов и семян можно также использовать пробку бузины или бутылочную пробку. Техника приготовления срезов описана в разделе «Листья». Необходимо при этом в используемых половинках пробки делать углубления, соответствующие

размерам плодов и семян.

Измельченное сырье. Выбирают крупные кусочки плодов и семян. Получают препараты аналогично препаратам цельного сырья. Более удобно проводить анализ в давленных препаратах, для чего просветленные объекты раздавливают обратным концом препаровальной иглы или скальпелем на предметном стекле в заключающей жидкости.

Из более крупных кусочков при необходимости готовят поперечные срезы, заливая анализируемые объекты в парафиновый блок или используя пробку бузины или бутылочную пробку.

Порошок. Микропрепараты готовят аналогично микропрепаратам порошка листьев.

При исследовании строения клеток кожуры и околоплодника в порошке из плодов и семян, содержащих крахмал или незначительное количество жирного масла, препарат готовят в растворе хлоралгидрата при легком подогреве. При необходимости порошок обезжиривают и просветляют.

Для обезжиривания порошок сырья помещают в пробирку с притертой пробкой и заливают 2 – 3 раза смесью спирта с эфиром (1:3) и после настаивания каждый раз в течение 20 мин растворитель сливают. Вместо смеси спирта с эфиром для обезжиривания можно использовать ксилол или эфир.

Для просветления 0,5 – 1 г порошка насыпают в фарфоровую чашку, прибавляют 5 – 10 мл азотной кислоты разведенной 16 % и кипятят в течение 1 мин, затем жидкость процеживают через ткань и порошок промывают горячей водой. Остаток на ткани собирают лопаточкой обратно в фарфоровую чашку, обливают 5 – 10 мл натрия гидроксида раствора 5 %, кипятят в течение 1 мин, снова процеживают через ту же ткань и промывают горячей водой. После этого порошок рассматривают в глицерина растворе 33 % под микроскопом.

Крахмал

1. Цельные плоды или кусочки плодов, размоченные по второму способу, или полученные срезы, или порошок сырья на кончике препаровальной иглы, смоченном заключающей жидкостью, помещают в 2 – 3 капли воды или глицерина раствора 33 % на предметном стекле и рассматривают крахмальные зерна. Из цельного, измельченного и дробленого сырья делают давленные препараты. При изучении крахмальных зерен определяют их форму, строение, размеры измеряют окулярным микрометром.

2. Цельные плоды или кусочки плодов, размоченные по второму способу, или полученные срезы, или порошок сырья на кончике препаровальной иглы, смоченном реактивом, помещают в 2 – 3 капли раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и наблюдают крахмальные зерна. Из цельного, измельченного и дробленого сырья готовят давленные препараты, в которых рассматривают крахмал. Крахмальные зерна приобретают синее или сине-фиолетовое окрашивание. Необходимо учитывать, что окраска исчезает при нагревании. Приготовленный препарат следует анализировать сразу после его приготовления, так как окраска сохраняется недолго.

Жирное и эфирное масло

1. Эфирные масла наблюдаются без применения красителей в виде капель светло-желтого, темно-желтого, зеленовато-желтого, коричневатокрасного цвета.

2. Жирные и эфирные масла обнаруживают по реакции окрашивания с раствором Судана III. Для чего цельные плоды, кусочки плодов, готовые срезы или порошок на кончике препаровальной иглы, смоченном реактивом, помещают в 2 – 3 капли раствора Судана III, накрывают покровным стеклом и нагревают. Из цельного, измельченного и дробленого сырья готовят давленные препараты в используемом реактиве. Капли жирного или эфирного масла окрашиваются в оранжево-розовый или оранжево-желтый цвет.

3. Для отличия эфирных масел от жирных масел объекты погружают в 2 – 3 капли раствора метиленового синего. Через несколько минут их рассматривают в воде или глицерине. Эфирное масло окрашивается в синий цвет.

Слизь. Цельные и измельченные плоды измельчают в порошок. Для обнаружения слизи готовят препарат порошка в растворе черной туши, для чего порошок сырья на кончике препаровальной иглы, смоченном в используемом реактиве, помещают в 2 – 3 капли раствора черной туши, тщательно перемешивают, накрывают покровным стеклом и тотчас рассматривают под микроскопом (малое увеличение); слизь заметна в виде бесцветных масс на черном фоне.

Кора

Цельное сырье. Готовят поперечные или продольные срезы коры. Кусочки коры размером (2 – 3) см × (0,5 – 1) см кипятят в колбе или пробирке с водой в течение 5 мин. Размягченные куски выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в растворе хлоралгидрата или глицерина в растворе 33 %. При необходимости готовят препараты в соответствующих реактивах для выявления различных структур или веществ.

Измельченное сырье. Соскоб коры или мелкие кусочки кипятят в течение 3 – 5 мин в натрия гидроксида в растворе 5 %, промывают водой и готовят микропрепараты, раздавливая объект скальпелем в растворе хлоралгидрата или глицерина в растворе 33 %.

Одревесневшие элементы определяют по реакции, описанной для цельной коры.

Наличие крахмала, дубильных веществ, производных антрацена определяют в соскобе сухой коры.

Порошок. Готовят несколько микропрепаратов аналогично микропрепаратам порошка листьев для выявления анатомо-диагностических признаков коры и содержащихся в ней веществ по методикам, описанным

ниже.

Одревесневшие (лигнифицированные) элементы. К срезу на предметном стекле прибавляют несколько капель раствора флороглюцина и 1 каплю серной кислоты раствора 25 %. Через 1 мин жидкость удаляют полоской фильтровальной бумаги, срез заключают в раствор хлоралгидрата или глицерина и закрывают покровным стеклом (рассматривают без подогревания); одревесневшие механические элементы окрашиваются в малиново-красный цвет.

Для окраски одревесневших элементов можно использовать также раствор сафранина. Срезы помещают в сафранина раствор на 30 мин (в закрытом бюксе или на часовом стекле), промывают сначала спиртом этиловым 50 %, затем подкисленным спиртом этиловым (на 100 мл спирта этилового прибавляют 2 капли хлористоводородной кислоты концентрированной) и заключают на предметном стекле в глицерин. Одревесневшие оболочки окрашиваются в красный цвет.

Крахмал. Для обнаружения крахмала делают соскоб сухой коры и рассматривают его в растворе Люголя. Крахмальные зерна окрашиваются в синий цвет.

Дубильные вещества. Наличие дубильных веществ устанавливают, нанося 1 каплю железа(III) аммония сульфата раствора 1 % (раствора квасцов железоаммониевых) или железа(III) хлорида раствора 3 % на внутреннюю поверхность сухой коры; появляется черно-синее или черно-зеленое окрашивание.

Производные антрацена. Наличие производных антрацена определяют, нанося 1 – 2 капли натрия гидроксида раствора 10 % на внутреннюю поверхность коры (крово-красное окрашивание), или проводят микросублимацию описанным ниже способом.

Почки

Цельное сырье. Готовят препараты с поверхности из цельных почек, а также поперечных и продольных срезов.

Микропрепараты готовят из цельных почек, рассматривая их с поверхности на поперечных и продольных срезах. Поперечные срезы следует делать в средней, т.е. медиальной части почки, определяя место среза по длине почки. При необходимости выполняют поперечный срез в базальной части почки и/или радиальное продольное сечение.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят на поперечных и продольных срезах, препаратах с поверхности кроющих чешуй с целью обнаружения кутикулы, эфирного масла, слизи, смолистых веществ, лигнифицированных оболочек клеток.

Корни, корневища, клубни, луковицы, клубнелуковицы

Цельное сырье. Готовят поперечные и продольные срезы. Небольшие куски подземных органов помещают в холодную воду и выдерживают около 1 сут, затем помещают в смесь этилового спирта 95 % и глицерина (1:1) на 3 сут. Размоченные объекты выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в растворе хлоралгидрата или глицерина растворе 33 % и рассматривают анатомо-диагностические признаки сначала при малом, затем при большом увеличении.

С соскобом сухих подземных органов проводят необходимые микрохимические реакции, описанные ниже.

Измельченное сырье. Кусочки подземных органов кипятят в течение 3 – 5 мин в натрия гидроксида растворе 5 %, тщательно промывают водой и готовят микропрепараты, раздавливая кусочки в глицерина растворе 33 % или растворе хлоралгидрата.

С соскобом или порошком подземных органов проводят необходимые микрохимические реакции, описанные ниже.

Порошок. Микропрепараты порошка готовят аналогично микропрепаратам порошка листьев. Для выявления содержащихся действующих веществ готовят препараты по методикам, описанным ниже.

Инулин. Для обнаружения инулина на предметное стекло помещают

около 0,1 г порошка (соскоба), 1 – 2 капли α -нафтола спиртового раствора 20 % (или резорцина раствора, или тимола спиртового раствора 20 %) и 1 каплю серной кислоты концентрированной; появляется красновато-фиолетовое окрашивание (от резорцина и тимола – оранжево-красное). О наличии инулина можно делать выводы только при отсутствии крахмала.

Наличие одревесневших элементов, крахмала, слизи, жирного и эфирного масла, дубильных веществ, производных антрацена определяют, как указано в разделах «Плоды и семена» и «Кора».

Количественная характеристика анатомо-диагностических признаков лекарственного растительного сырья

Используется при описании конкретных анатомо-диагностических признаков лекарственного растительного сырья/препаратов, впервые вводимых в практику медицинского применения в процессе разработки на него фармакопейных статей или нормативной документации, а также при проведении анализа лекарственного растительного сырья/препаратов по разделу «Микроскопия», в тех случаях, когда указаны размеры анатомо-диагностических признаков и частота их встречаемости. Особенно важна количественная характеристика анатомо-диагностических признаков при анализе лекарственного растительного сырья/препаратов с целью его отличия от других родственных видов, которые нередко имеют похожие анатомо-диагностические признаки, но имеют другие количественные характеристики.

Определение размеров анатомо-диагностических признаков. Для снятия размеров анатомо-диагностических признаков пользуются объект-микроскопом и окуляр-микроскопом. Единицей для измерения микроскопических объектов служит микрометр (мкм), ранее использовался микрон (μ), составляющие одну тысячную долю миллиметра. Окуляр-микроскоп вкладывается в окуляр, его шкала может быть различной в зависимости от объектива. Объект-микроскоп имеет шкалу размером 1 мм, разделенную на 100 частей, то есть одно деление равно 0,01 мм или 10 мкм.

Объект-микрометр ставят на столик микроскопа, а шкалу ставят так, чтобы она совпала со шкалой окуляр-микрометра. Определив значение одного деления окуляр-микрометра, снимают объект-микрометр и при том же объективе измеряют требуемый объект.

Пример 1. При совмещении шкал окуляр- и объект-микрометров обнаружено, что 50 делений окуляр-микрометра совпадает с 10 делениями объект-микрометра.

$$50 \text{ делений окуляр-микрометра} = 10 \text{ делений объект-микрометра} \times 10 \text{ мкм} = 100 \text{ мкм}$$

Цена деления окуляр-микрометра составляет:

$$1 \text{ деление окуляр-микрометра} = \frac{100 \text{ мкм}}{50} = 2 \text{ мкм}$$

При измерении простого волоска установлено, что его высота составляет 10 делений окуляр-микрометра. Реальный размер этого волоска составит: $10 \cdot 2 \text{ мкм} = 20 \text{ мкм}$.

Пример 2. 40 делений окуляр-микрометра точно совпадают с 9 делениями объект-микрометра. Цена деления окуляр-микрометра соответствует:

$$1 \text{ деление окуляр-микрометра} = \frac{9 \cdot 10 \text{ мкм}}{40} = 2 \text{ мкм}$$

При измерении диаметра эфиромасличной железки установлено, что он составил 5 делений окуляр-микрометра. Реальный размер эфиромасличной железки соответствует: $5 \cdot 2 \text{ мкм} = 10 \text{ мкм}$.

Определение частоты встречаемости анатомо-диагностических признаков на единицу площади (1 мм^2) органа, ткани (эпидермиса). Для определения частоты встречаемости сначала необходимо вычислить площадь поля зрения микроскопа (при той же комбинации объектива и окуляров, при которой будет проводиться подсчет) по формуле:

$$S = \pi r^2,$$

где S – площадь поля зрения микроскопа, мм^2 ;
 r – радиус поля зрения микроскопа, мм;

d – диаметр поля зрения микроскопа, мм;
 $\pi = 3,1416$.

Диаметр (d) поля зрения микроскопа измеряется объект-микрометром. Зная цену деления объект-микрометра (см. маркировку на пластинке объект-микрометра), легко вычислить диаметр поля зрения микроскопа. Затем подсчитывают количество изучаемых структурных элементов (анатомо-диагностических признаков) в поле зрения микроскопа (при условии, что изучаемая ткань или орган занимают все поле зрения микроскопа). Количество изучаемых структурных элементов (анатомо-диагностических признаков) на единицу площади в 1 мм^2 определяют по формуле:

$$N = n \cdot 1 (\text{мм}^2)/S,$$

где N – количество изучаемых структурных элементов (анатомо-диагностических признаков) на единицу площади в 1 мм^2 ;

n – количество изучаемых структурных элементов (анатомо-диагностических признаков) в поле зрения микроскопа;

S – площадь поля зрения микроскопа, мм^2 .

Отношение $1 (\text{мм}^2)/S$ является постоянным коэффициентом для данной оптики, на который можно умножать подсчитанное количество структурных элементов в поле зрения, не составляя каждый раз уравнения.

Пример. $d = 420 \text{ мкм} = 0,42 \text{ мм}$; $r = 210 \text{ мкм} = 0,21 \text{ мм}$;

$$r^2 = 0,0441 \text{ мм}^2; S = 3,1416 \cdot 0,0441 = 0,138 \text{ мм}^2.$$

В поле зрения подсчитано 52 устьица. Количество устьиц (N) на площадь 1 мм^2 вычисляют:

$$N = 52 \cdot 1/0,138 = 52 \cdot 7,25 = 373.$$

Таким образом, на площадь эпидермиса листа в 1 мм^2 приходится 373 устьица. 7,26 – постоянный коэффициент для данной оптики.

Измерение толщины объекта (лепестков и чашелистиков)

При измерении толщины пользуются микрометрическим винтом микроскопа. Сначала наводят на резкость верхнюю поверхность измеряемого объекта, а затем нижнюю. Отмечают разность в обоих положениях

микровинта по делениям, которые на нем имеются. Эти деления обычно соответствуют микрометрам. При применении иммерсионных объективов эта разность равна толщине объекта, при объективах сухих систем ее надо умножить на 1,5, т.е. на соотношение между показателями преломления стекла и воздуха.

Люминесцентная микроскопия

Метод люминесцентной микроскопии применяется (когда это целесообразно) для определения подлинности лекарственного растительного сырья. Преимуществом метода является возможность его применения для изучения сухого растительного материала, из которого готовят толстые срезы или микропрепараты порошка, и рассматривают их в падающем свете, при освещении препарата сверху, через опак-иллюминатор или объектив.

Люминесцентная микроскопия выполняется с помощью люминесцентных микроскопов или обычных биологических микроскопов, снабженных специальными люминесцентными осветителями.

Приготовление микропрепаратов. Для приготовления микропрепаратов используют высушенное лекарственное растительное сырье или его порошок. Предварительное размачивание сырья исключается, так как это приводит к вымыванию веществ из клеток; допускается лишь непродолжительное размягчение во влажной камере.

Листья. Готовят обычно микропрепараты из порошка листьев, которые рассматривают без включающей жидкости. Наиболее яркая люминесценция характерна для одревесневших элементов – сосудов жилки, механических волокон, а также для кутикулы и кутинизированных оболочек различных эпидермальных образований (волосков, железок и др.). В эпидермальных клетках часто содержатся флавоноиды, обуславливающие коричневую, желтую или зеленовато-желтую люминесценцию. Клетки мезофила содержат различные включения – желтые, голубые, зеленовато-желтые, коричневые – в зависимости от их химического состава. Хлорофилл в высушенном растительном материале не люминесцирует. Кристаллы

оксалата кальция также не обладают люминесценцией.

При необходимости приготовления среза лист предварительно размягчают во влажной камере и с помощью бритвы делают толстый срез (2-3 мм), который закрепляют на предметном стекле пластилином. Более тонкие срезы помещают во включающую жидкость и накрывают покровным стеклом.

В качестве включающей жидкости используют воду, глицерин, поливинилового спирта раствор 5 %, нефлуоресцирующее вазелиновое масло.

Включающая жидкость не должна растворять содержащиеся в препарате люминесцирующие вещества.

Травы. При анализе трав готовят микропрепараты листьев. При необходимости приготовления препарата стебля его размягчают во влажной камере и готовят срезы. Толстые срезы (2 – 3 мм) закрепляют на предметном стекле с помощью пластилина и рассматривают без включающей жидкости, тонкие – помещают в подходящую жидкость и накрывают покровным стеклом. Наиболее яркую люминесценцию имеют одревесневшие элементы проводящих пучков – сосуды и механические волокна, склеренхимные клетки, встречающиеся в коре и сердцевине стебля. В клетках эпидермиса и коры часто встречаются флавоноиды; у некоторых видов сырья в клетках обкладки, вокруг проводящих пучков, содержатся алкалоиды, которые обладают разнообразным свечением: синим, голубым, зеленым, зеленовато-желтым, золотисто-желтым, оранжево-красным в зависимости от состава.

Цветки. Чаще готовят микропрепараты из порошка цветков или отдельных частей цветка (соцветия), которые рассматривают обычно без включающей жидкости. В цветках часто содержатся флавоноиды, каротиноиды и другие вещества, имеющие флуоресценцию. Отчетливо видны пыльцевые зерна, имеющие желтое, зеленовато-желтое или голубоватое свечение.

Плоды. Готовят обычно поперечные срезы плода после

предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают во включающей жидкости или без нее в зависимости от толщины среза. Для плодов характерна люминесценция тканей околоплодника (экзокарпия, механических клеток мезокарпия, проводящих пучков). Отчетливо видны секреторные каналы – ярко светится их содержимое; клетки выстилающего слоя обычно имеют желтовато-коричневую люминесценцию. В содержимом каналов нередко видны ярко люминесцирующие кристаллические включения, чаще всего желтого или желто-зеленого цвета.

Семена. Готовят обычно поперечные срезы семени после предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают их во включающей жидкости или без нее в зависимости от толщины среза. Обращают внимание на характер люминесценции семенной кожуры, в которой отчетливо выделяются склеренхимные слои. Клетки эпидермиса, содержащие слизь, обычно имеют сине-голубое свечение. Эндосперм и ткани зародыша, богатые жирным маслом, характеризуются голубой люминесценцией.

Кора. Кору предварительно размягчают во влажной камере, готовят толстые поперечные срезы (до 3 – 5 мм), которые закрепляют на предметном стекле пластилином, и рассматривают без включающей жидкости; тонкие срезы заключают в жидкость. Для некоторых видов сырья характерна люминесценция пробкового слоя коры: оболочки клеток пробки светятся интенсивно синим, их содержимое – темно-красным (антоцианы). Яркое и разнообразное свечение имеют механические элементы (лубяные волокна и каменистые клетки): голубое, зеленовато-голубое, желтовато-зеленое. Люминесценция паренхимы коры зависит от химического состава. Антрацен-производные обуславливают яркое оранжевое или огненно-оранжевое свечение. Дубильные вещества обладают свойством «тушить» люминесценцию, поэтому ткани, содержащие дубильные вещества, темно-коричневого, почти черного цвета.

Препарат, приготовленный из порошка коры или соскоба,

рассматривают без включающей жидкости. В нем наиболее ярко видны механические элементы.

Почки. Микропрепараты готовят из цельных почек, рассматривая их с поверхности на поперечных и продольных срезах. Поперечные срезы следует делать в средней, т.е. медиальной части почки, определяя место среза по длине почки. При необходимости выполняют поперечный срез в базальной части почки и/или радиальное продольное сечение.

Качественные микрохимические и гистохимические реакции проводят на поперечных и продольных срезах, препаратах поверхности кроющих чешуй с целью обнаружения кутикулы, эфирного масла, слизи, смолистых веществ, лигнифицированных оболочек клеток.

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы. Готовят поперечные срезы, распилы, микропрепараты порошка или соскоба. Срезы готовят из материала, предварительно размягченного во влажной камере, распилы (из толстых корней и корневищ) – из сухого материала с помощью тонкой пилы или фрезы. С помощью бритвы с поверхности распила снимают тонкий слой для удаления слоя клеток, покрытых пылью. Толстые срезы и распилы (до 3 – 5 мм) закрепляют на предметном стекле пластилином и рассматривают без включающей жидкости. Слой пробки у подземных органов обычно тусклый, почти черный. Ярко люминесцируют древесина (у корней и корневищ) и проводящие пучки, а также склеренхимные элементы. Их свечение очень разнообразно: от буровато-зеленого, желто-зеленого до светло-голубого и интенсивно синего в зависимости от вида сырья. Еще более разнообразна люминесценция паренхимы тканей и различных секреторных образований (вместилищ, каналов, ходов, млечников, различных идиобластов), что определяется их химическим составом. В секреторных образованиях встречаются кристаллические включения кумаринов, алкалоидов, флавоноидов, обладающие яркой люминесценцией.

В микропрепаратах порошка видны отдельные сосуды, группы механических волокон, каменистые клетки, отдельные секреторные

образования или их обрывки, ярко люминесцирующие клетки паренхимы, содержащие те или иные вещества.

Микропрепараты в люминесцентном микроскопе рассматривают в ультрафиолетовом свете, наблюдая первичную (собственную) люминесценцию.