

ПРОЕКТ

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

«2.8.23. МАКРОСКОПИЧЕСКИЙ И МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ»

Разработана на основе Европейской Фармакопеи

*Введена в действие с 2011 года
приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь
от 2011 года №*

*взамен статьи ГФ РБ, том 1, стр. 228
«#2.8.3. Техника макроскопического и
микроскопического анализа»
от 01.01.2007 г.*

#МАКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Макроскопический анализ сводится к изучению внешнего вида лекарственного растительного сырья, определению размеров отдельных частей, органолептических показателей (цвета, запаха), морфологических диагностических признаков.

Размеры сырья определяются с помощью измерительной линейки: для крупных объектов (более 3 см) — 3-5 измерений, для мелких — 10-20 измерений. Мелкие семена и плоды измеряют на миллиметровой бумаге и рассчитывают среднее значение.

Определяют цвет сырья поверхности на изломе или в разрезе при дневном освещении.

Запах определяют при растирании между пальцами на изломе или при растирании в ступке.

Морфологические диагностические признаки определяют для всех видов сырья. Высушенные и смятые части сырья предварительно размягчают во влажной камере или путем погружения на несколько минут в горячую воду, после чего раскладывают на стеклянной пластинке, тщательно расправляя. Рассматривают невооруженным глазом или с помощью лупы (10 ×).

Листья (Folia) — лекарственное сырье, представляющее собой высушенные или свежие листья или отдельные листочки сложного листа. Диагностическими признаками являются: тип листьев (простые или сложные), форма и размеры листовой пластинки и черешка, характер края, жилкование, опушенность.

Цветки (Flores) — лекарственное сырье, представляющее собой высушенные отдельные цветки или соцветия, а также их части. Диагностическими признаками являются: тип соцветия, опушенность, форма и размеры цветка, строение околоцветника (число, форма и характер срастания чашелистиков и лепестков), число и строение тычинок и пестиков, характер завязи и цветоложа.

Травы (Herbae) — лекарственное сырье, представляющее собой высушенные или свежие надземные части травянистых растений (стебли с листьями и цветками, отчасти с бутонами и незрелыми плодами). Диагностические признаки для листьев и цветков указаны выше. Для стеблей: тип ветвления, форма поперечного сечения, размеры (длина и диаметр у основания), характер поверхности, опушенность, листорасположение.

Плоды (Fructus) — высушенные или свежие простые или сложные плоды (соплодия) и их части. Диагностическими признаками являются: консистенция околоплодника (перикарпия), характер поверхности, размеры (длина, толщина, поперечник плода), расположение остатков частей цветка и др.

Семена (Semina) — цельные семена или отдельные семядоли. Исследуются сухими. Диагностические признаки: форма, размеры (длина, толщина, поперечник), характер поверхности, цвет, запах, форма, размеры и расположение зародыша, наличие и форма рубчика или семяшва.

Кора (Cortices) — лекарственное сырье, представляющее собой наружную часть стволов, ветвей и корней деревьев и кустарников, расположенную к периферии от камбия. Диагностические признаки: размеры и форма кусков, особенности наружной и внутренней поверхности и излома.

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы (Radices, Rhizomata, Bulbi, Tubera, Bulbotubera) — высушенные или свежие подземные органы многолетних растений, очищенные или отмытые от земли, освобожденные от остатков стеблей и листьев. Диагностические признаки: форма, особенности наружной поверхности и излома, размер, цвет поверхности и на свежем изломе, запах.

Сборы (Species) — смесь нескольких видов измельченного (реже цельного) лекарственного растительного сырья, иногда с добавлением солей, эфирных масел. Сырье, используемое для приготовления сборов, должно соответствовать требованиям нормативной документации на каждый вид сырья.

Анализ зависит от морфологической группы исследуемого объекта, а также от состояния сырья — цельного или измельченного. Размер лекарственного растительного сырья указывают в частных статьях.

Общие требования к измельченному лекарственному растительному сырью, в том числе значения и допустимые нормы при ситовом анализе, описаны в общей статье «Сборы», если не указано иное в частных фармакопейных статьях. Степень измельчения указывают в скобках, например, измельченное сырье с частицами, проходящими сквозь сито с размером стороны отверстия 5600 мкм, обозначают как измельченное сырье (5600).

МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Микроскопический анализ зависит от морфологической группы испытуемого сырья, а также от состояния сырья — цельного или измельченного.

ЛИСТЬЯ, ТРАВЫ, ЦВЕТКИ

Цельное и измельченное сырье. При исследовании цельного сырья берут кусочки пластинки листа с краем и жилкой; у трав берут лист, иногда также кусочек стебля и цветок, у цветков — чашечку и венчик. При исследовании резаного сырья берут несколько различных кусочков.

Просветление можно проводить двумя способами.

I. Несколько кусочков сырья помещают в колбу или пробирку, прибавляют раствор 25 г/л *натрия гидроксида Р* и кипятят в течение 1—2 мин. Затем содержимое выливают в чашку Петри (или фарфоровую), жидкость сливают и сырье тщательно промывают *водой Р*. Из воды кусочки сырья вынимают скальпелем или лопаточкой и помещают на предметное стекло в каплю *раствора хлоралгидрата Р1* или *раствора глицерина Р*.

II. Кусочки кипятят в *растворе хлоралгидрата Р1*, разведенного *водой Р* (1:1, об/об), в течение 5—10 мин (до просветления). Просветленный кусочек сырья помещают на предметное стекло в каплю *раствора хлоралгидрата Р1* или *глицерина Р*, разделяют скальпелем или препаровальной иглой на две части, одну из них осторожно переворачивают. Объект накрывают покровным стеклом, слегка подогревают до удаления пузырьков воздуха и, после охлаждения, рассматривают лист с обеих сторон под микроскопом сначала при малом, затем при большом увеличении. При приготовлении микропрепаратов из толстых листьев их предварительно раздавливают скальпелем.

Для исследования стеблей их отрезки кипятят в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р*, тщательно промывают *водой Р*, снимают эпидермис скальпелем или препаровальными иглами и рассматривают его с поверхности; из остальных тканей готовят препарат, раздавливая объект скальпелем на предметном стекле в *растворе хлоралгидрата Р1* или *растворе глицерина Р*.

При необходимости приготовления поперечных срезов листьев и стеблей их кипятят в *растворе хлоралгидрата Р1* в течение 10 мин и делают срезы, зажимая кусочки листа в пробку или сердцевину бузины. Готовые срезы помещают в *воду Р* и далее используют для приготовления микропрепаратов, рассматривая их в *растворе хлоралгидрата Р1*.

Исследование при дополнительном измельчении. Для микроскопического испытания лекарственное растительное сырье дополнительно измельчают (355) (2.9.12), если в частной статье не указано иное.

Наиболее широко используемой средой для заключения в нее дополнительно измельченного сырья является *раствор хлоралгидрата Р*. Однако в этом реактиве не всегда хорошо видны некоторые элементы, в таком случае могут быть использованы иные среды, например, 50% (об/об) *раствор глицерина Р*, позволяющий обнаружить зерна крахмала. При необходимости в частной статье может быть отмечено использование специфических реактивов, например, *реактива молочной кислоты Р* (использование которого позволяет обнаруживать различные диагностические признаки), *раствора рутения красного Р* (позволяющий увидеть присутствие слизи в клетках), или *глицерина Р* (в котором видны крахмал и инулин) и других.

Использование раствора хлоралгидрата. 2-3 капли *раствора хлоралгидрата Р* помещают на предметное стекло. Небольшое количество порошка суспендируют в растворе и накрывают покровным стеклом. Препарат очень аккуратно нагревают на плитке или на газовой микрорелке до кипения и кипятят в течение непродолжительного времени, при необходимости с помощью пипетки добавляют реактив, охлаждают и просматривают под микроскопом. Нагревание повторяют до тех пор, пока крахмальные зерна и водорастворимое

содержимое клеток не станет невидимым. Просматривают полученный препарат под микроскопом. Так как хлоралгидрат склонен к кристаллизации в виде длинных нитей, для предотвращения этого после нагревания удаляют покровное стекло, к препарату прибавляют 1 каплю 10% (об/об) смеси *раствора хлоралгидрата Р* и *глицерина Р*, накрывают чистым покровным стеклом и просматривают под микроскопом.

Использование 50% (об/об) раствора глицерина. 2 капли 50% (об/об) раствора глицерина Р помещают на предметное стекло. Небольшое количество порошка суспендируют в растворе и накрывают покровным стеклом. Просматривают под микроскопом.

ПЛОДЫ, СЕМЕНА

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

Препараты поверхности кожуры и околоплодника. 2-3 семени или плода кипятят в пробирке в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р* в течение 2—3 мин и тщательно промывают *водой Р*. Объект помещают на предметное стекло, препаровальными иглами отделяют кожуру семени или ткани околоплодника и рассматривают их в *растворе хлоралгидрата Р1* или *растворе глицерина Р*.

Срезы. Для приготовления срезов сухие плоды и семена предварительно размягчают, поместив их на сутки 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.

Мелкие плоды и семена запаивают в парафиновый блок размером около 0,5 см × 0,5 см × 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 глицерина Р* или *растворе хлоралгидрата Р1*.

Диагностические признаки: форма и строение клеток экзокарпия (эпидермиса), наличие и строение трихом, расположение и форма механических элементов в мезокарпии, число и расположение эфиромасличных каналов, проводящих пучков, наличие кристаллических включений.

Исследование при дополнительном измельчении. Препарат готовят так же, как указано в разделе «*Листья, травы, цветки*».

КОРА

Цельное сырье и измельченное сырье. Готовят поперечные или продольные срезы коры. Кусочки коры размером около 2—3 см × 0,5—1 см кипятят в колбе или пробирке с *водой Р* 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 Р1* или *растворе глицерина Р*. При необходимости готовят препараты в соответствующих реактивах для выявления различных структур или веществ.

Диагностические признаки: толщина, окраска и характер пробки, наличие колленхимы, толщина первичной и вторичной коры, ширина сердцевинных лучей, особенности расположения и количество лубяных волокон, каменных клеток, клеток с эфирным маслом, включения кристаллов оксалата кальция, млечники.

Соскоб коры или мелкие кусочки кипятят в течение 3—5 мин в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р*, промывают *водой Р* и готовят микропрепараты, раздавливая объект скальпелем в *растворе глицерина Р* или *растворе хлоралгидрата Р1*.

Исследование при дополнительном измельчении. Препарат готовят так же, как указано в разделе «*Листья, травы, цветки*».

КОРНИ, КОРНЕВИЩА, КЛУБНИ, ЛУКОВИЦЫ, КЛУБНЕЛУКОВИЦЫ

Цельное сырье. Готовят поперечные и продольные срезы. Небольшие куски подземных органов помещают в холодную *воду Р* и выдерживают около суток, затем помещают в смесь *спирт Р — глицерин Р* (1:1, об/об) на 3 сут. Размоченные объекты выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в *растворе хлоралгидрата Р1* или *растворе глицерина Р* и рассматривают диагностические признаки сначала при малом, затем при большом увеличении.

Диагностические признаки: особенности строения эпидермы или перидермы, расположение и строение механических, проводящих, секреторных тканей, кристаллы оксалата кальция, запасные вещества.

Измельченное сырье. Кусочки подземных органов кипятят в течение 3—5 мин в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р*, тщательно промывают *водой Р* и готовят микропрепараты, раздавливая кусочки в *растворе глицерина Р* или *растворе хлоралгидрата Р1*.

Исследование при дополнительном измельчении. Препарат готовят так же, как указано в разделе «*Листья, травы, цветки*».

МИКРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Микрохимический анализ может проводиться одновременно с микроскопическим анализом.

Крахмал. Готовят два препарата — в *растворе Люголя Р* и в *воде Р*; от йода крахмальные зерна окрашиваются в синий цвет. В воде определяют их форму, строение. Также для идентификации зерен крахмала проводят испытание в поляризованном свете (между перекрестными призмами Николя) — на зернах обнаруживается черный крестик.

Жирное и эфирное масло. Для обнаружения жирного и эфирного масла готовят препарат в *растворе судана III Р* и подогревают; капли жирного или эфирного масла окрашиваются в оранжево-розовый цвет.

Слизь. Для обнаружения слизи готовят препарат порошка в *растворе черной туши Р* и тотчас рассматривают под микроскопом (малое увеличение); слизь заметна в виде бесцветных масс на черном фоне. Либо помещают 2 капли *раствора рутения красного Р* на предметное стекло, небольшое количество порошка суспендируют в жидкости и накрывают покровным стеклом, через 1 мин дают впитаться капле *воды дистиллированной Р* между предметным и покровным стеклами; слизь окрашивается в фиолетово-красный цвет.

Одревесневшие (лигнифицированные) элементы. Небольшое количество порошка помещают на предметное стекло, прибавляют 1-2 капли 10% (об/об) спиртового раствора *флороглюцинола Р*, перемешивают и выдерживают до почти полного испарения растворителя, прибавляют 1-2 капли *кислоты хлористоводородной Р*, накрывают препарат покровным стеклом и немедленно просматривают под микроскопом; красное окрашивание указывает на присутствие лигнина. Для окраски одревесневших элементов можно использовать также

раствор 10 г/л *сафранина Р*. Срезы помещают в раствор 10 г/л *сафранина Р* в спирте (50% об/об) *Р* на 30 мин (в закрытом бюксе или на часовом стекле), промывают сначала спиртом (50% об/об) *Р*, затем подкисленным спиртом (на 100 мл 96% спирта *Р* прибавляют 2 капли хлористоводородной кислоты *Р*) и заключают на предметном стекле в глицерин *Р*; одревесневшие оболочки окрашиваются в красный цвет.

Дубильные вещества. Наличие дубильных веществ устанавливают, нанося 1 каплю раствора 10 г/л *железа (III) аммония сульфата Р* или раствора 30 г/л *железа (III) хлорида Р* на внутреннюю поверхность сухой коры; появляется черно-синее или черно-зеленое окрашивание.

Производные антрацена. Наличие производных антрацена определяют, нанося 1-2 капли раствора 50 г/л *натрия гидроксида Р* на внутреннюю поверхность коры (красное окрашивание) или проводя микросублимацию описанным ниже способом. На предметное стекло ставят трубку диаметром 1,5 см и высотой 2 см. Внутрь стеклянной трубки помещают небольшое количество порошка (или соскоба) испытуемого образца, сверху накрывают другим предметным стеклом, ставят на асбестовую сетку, закрепленную в штативе, и подогревают. Пламя горелки следует держать от предметного стекла на расстоянии 5—7 см. На поверхность стекла, которое служит для улавливания сублимата, помещают кусочки фильтровальной бумаги и смачивают время от времени холодной водой. Через некоторое время на нижней стороне стекла появляется налет. Под микроскопом в сублимате видны тонкие желтые иголки, которые в ультрафиолетовом свете (люминесцентный микроскоп) имеют яркое желтое или оранжево-красное свечение. В растворе 50 г/л *калия гидроксида Р* в 96% спирте *Р* сублимат растворяется с появлением красного окрашивания.

Инулин. Для обнаружения инулина на предметное стекло помещают около 0,1 г порошка образца, 1-2 капли раствора *β-нафтола Р1* (или раствора *резорцина Р* или раствора *тимола Р*) и 1 каплю кислоты *серной Р*; появляется красновато-фиолетовое окрашивание (от резорцина — оранжево-красное). О наличии инулина можно делать выводы только при отсутствии крахмала.

Использование реактива молочной кислоты. Помещают 2-3 капли реактива *молочной кислоты Р* на предметное стекло, небольшое количество порошка суспендируют в жидкости, накрывают покровным стеклом, препарат очень аккуратно нагревают на плитке или на газовой микрогорелке до кипения и кипятят в течение непродолжительного времени, при необходимости с помощью пипетки добавляют реактив, охлаждают и просматривают под микроскопом. Лигнифицированные структуры окрашиваются в ярко-желтый цвет; структуры, содержащие целлюлозу, остаются бесцветными. Зерна крахмала окрашиваются в более или менее насыщенный фиолетовый цвет; некоторые секреты (например, эфирные масла, смолы) окрашиваются в оранжевый цвет; пробка окрашивается в красный цвет.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Метод люминесцентной микроскопии применяется (где 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 препараты порошка, и рассматривают их в падающем свете при освещении препарата сверху через опак-иллюминатор или объектив.

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

Приготовление микропрепаратов

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. Готовят обычно препараты из порошка листьев, которые рассматривают без включающей жидкости. Наиболее яркая люминесценция характерна для одревесневших элементов — сосудов жилки, механических волокон, а также 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 мезофилла 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 Р*, *глицерин Р*, раствор 50 г/л *поливинилового спирта Р*, нефлуоресцирующее *вазелиновое масло Р*. 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 препараты из порошка цветков или отдельных частей цветка (соцветия), которые рассматривают обычно без включающей жидкости. В цветках часто содержатся флавоноиды, каротиноиды и другие вещества, обладающие флуоресценцией. 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 красновато-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.

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы. Готовят поперечные срезы, распилы, препараты 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 древесины (у корней и корневищ) и проводящие пучки, а также склеренхимные элементы. Их свечение весьма разнообразно: от буровато-зеленого, желто-зеленого до светло-голубого и интенсивно-синего в зависимости от вида сырья. Еще более разнообразна люминесценция паренхимных 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 препаратах порошка видны отдельные сосуды, группы механических волокон, каменистые клетки, отдельные секреторные образования и их обрывки, ярко люминесцирующие клетки паренхимы, содержащие те или иные вещества.

Препараты в люминесцентном микроскопе рассматривают в ультрафиолетовом свете, наблюдая первичную (собственную) люминесценцию.[#]