**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения** |  | **ОФС.1.5.3.0003** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.5.3.0003.15** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает единые требования к проведению микроскопического и микрохимического анализа лекарственных средств растительного происхождения, в том числе лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, а также лекарственных средств животного происхождения.

**Термины и определения**

*Анатомо-диагностические признаки*−совокупность признаков анатомического строения исследуемого образца, отличающих его от других видов при идентификации.

*Микроскопическое исследование* ***–*** исследование, при котором в общей картине анатомического строения исследуемого образца идентифицируются под микроскопом характерные анатомо-диагностические признаки; при этом руководствуются разделом «Микроскопия» соответствующей фармакопейной статьи.

*Микрохимическое исследование* ***–*** исследование, при котором проводят микрохимические реакции одновременно с микроскопическим анализом исследуемого образца, наблюдая их результаты под микроскопом. 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 исследуемого образца. Обычно гистохимическое исследование включает гистохимические реакции, позволяющие провести окрашивание анатомических структур и тканей: эфиромасличных желёзок, 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 исследуемого образца, выполненный перпендикулярно вертикальной оси этого морфологического органа. Обычно на поперечном срезе рассматривают диаметр сосудов, механических волокон, млечников, вытянутых вместилищ, структуру сосудисто-волокнистых пучков подземных органов, стеблей, черешков и т.д. в поперечном сечении.

*Продольный срез* ***–*** срез морфологического органа исследуемого образца, выполненный параллельно вертикальной оси этого морфологического органа. Обычно на продольном срезе изучают длину сосудов, механических волокон и других вытянутых структур; характер утолщённости (перфорации) стенок этих структур; строение сосудисто-волокнистых пучков подземных органов, стеблей, черешков и т.д. в продольном сечении.

*«Давленый» микропрепарат* ***–*** микропрепарат, полученный из морфологического органа исследуемого образца 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 «давленые» микропрепараты готовят из плодов, подземных органов, коры, крупного порошка различных морфологических органов и др.

**Общие положения**

Особенности приготовления микропрепаратов из лекарственного растительного сырья, лекарственных средств природного происхождения зависят от морфологической группы исследуемого объекта, а также от состояния исследуемого образца − цельный, измельчённый или порошок.

***Способы просветления***

1. Несколько кусочков исследуемого образца помещают в колбу или пробирку, прибавляют натрия гидроксида раствор 5 %, разведённый водой (1:1), и кипятят в течение 2−5 мин в зависимости от толщины и плотности объекта, не допуская сильного размягчения. Более жёсткие исследуемые образцы (толокнянки обыкновенной листья, брусники обыкновенной листья, эвкалипта прутовидного листья) кипятят до 5 мин, более хрупкие исследуемые образцы (крапивы двудомной листья, чистотела большого листья) кипятят до 2 мин. Затем содержимое переливают в стеклянный стакан, жидкость сливают через 2−4 слоя марли, которой закрывают стакан, и сырьё тщательно промывают водой, каждый раз сливая воду через ту же марлю. Содержимое стакана переносят в небольшом количестве воды в чашку Петри. Частички исследуемого образца, оставшиеся на марле, смывают в ту же чашку Петри. Из воды кусочки вынимают скальпелем или лопаточкой и помещают на предметное стекло в 0,05 мл хлоралгидрата раствора водно-глицеринового или глицерина раствора 33 %.

2. Кусочки исследуемого образца кипятят в хлоралгидрата растворе водно-глицериновом, разведённом водой (1:1), в течение 5−10 мин (до просветления). Просветлённый кусочек исследуемого образца помещают на предметное стекло в 0,05 мл хлоралгидрата раствора водно-глицеринового или глицерина раствора 33 %.

***Способы размягчения***

1. Исследуемый образец кипятят в хлоралгидрата растворе водно-глицериновом в течение 10 мин.

2. При отсутствии хлоралгидрата раствора водно-глицеринового выбранный исследуемый образец и кусочки образца 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.

***Способы приготовления микропрепаратов порошков***

1. Порошок исследуемого образца на кончике препаровальной иглы, смоченном в хлоралгидрата растворе водно-глицериновом, помещают в 0,10-0,15 мл хлоралгидрата раствора водно-глицеринового на предметном стекле, тщательно перемешивают, накрывают 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. Порошок исследуемого образца на кончике препаровальной иглы, смоченном в натрия гидроксида растворе 5 %, помещают в 0,10-0,15 мл натрия гидроксида раствора 5 % на предметном стекле, тщательно перемешивают, накрывают покровным стеклом и нагревают до удаления пузырьков воздуха. После охлаждения удаляют фильтровальной бумагой натрия гидроксида раствор с одной стороны покровного стекла, добавляя с противоположной стороны пипеткой глицерина раствор 33 %.

3. Способ приготовления микропрепаратов порошков, содержащихся в лекарственных препаратах в твёрдых лекарственных формах должен быть описан в фармакопейной статье.

**Микроскопическое исследование**

***Листья***

*Цельное сырьё.* 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).

Кусочки сырья, просветлённые одним из двух способов и помещённые 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 прутовидный, толокнянка обыкновенная, брусника обыкновенная) готовят поперечные срезы. При необходимости также готовят поперечные срезы черешков. Для чего используют два способа размачивания.

Из размоченных объектов делают срезы, зажимая кусочки листа (черешка) в бутылочную пробку (коровую) или сердцевину бузины. При использовании бутылочной пробки её 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 поперченного 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 хлоралгидрата раствор водно-глицериновый. При способе размачивания 2 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 микропрепарата 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 1 или 2 способ получения микропрепаратов.

***Цветки***

*Цельное сырьё.* Для анализа берут чашечку, венчик, тычинки, пестик, цветоножку, также, если есть, листочки обёртки корзинки, прицветные листы и другие элементы цветка и соцветий, если таковые имеются. Просветляют одним из двух способов. 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.

*Измельчённое сырьё.* Для анализа берут кусочки чашечки, венчика, цветоножки, а также тычинки, пестик и другие элементы цветка и соцветий, если таковые имеются. Если сырьё имеет небольшие размеры, то берут цельные чашечку и венчик. Далее с выбранными кусочками поступают так же, как в случае с цельными цветками.

*Порошок.* Для изучения порошка можно использовать 1 или 2 способ приготовления микропрепаратов.

***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 один из двух способов просветления.

Для исследования стеблей их обрезки кипятят в натрия гидроксида растворе 5 % в течение 3−5 мин в зависимости от анатомической структуры объектов. Эпидермис снимают скальпелем или препаровальными иглами; из остальных тканей готовят микропрепарат, раздавливая объект скальпелем на предметном стекле в хлоралгидрата растворе водно-глицериновом 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.

*Измельчённое сырьё.* 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.* Для изучения порошка можно использовать 1 или 2 способ приготовления микропрепаратов.

***Плоды и семена***

*Цельное сырьё.* Готовят микропрепараты кожуры семени и околоплодника с поверхности или поперечные срезы.

Для приготовления микропрепаратов кожуры и околоплодника с поверхности 2−3 семян 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 хлоралгидрата растворе водно-глицериновом или глицерина растворе 33 %.

Ткани мезокарпия и эндокарпия рассматривают в «давленых» микропрепаратах и на срезах. «Давленые» микропрепараты получают при использовании обратного конца препаровальной иглы или скальпеля путём 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 твёрдости объекта.

Можно также использовать способ размачивания 2 перед получением поперечных срезов, 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 хлоралгидрата растворе водно-глицериновом или глицерина растворе 33 %.

Для изготовления срезов из мелких плодов и семян можно также использовать пробку бузины или бутылочную пробку. При использовании бутылочной пробки её предварительно кипятят в воде 15 мин. В используемых половинках пробки делать углубления, соответствующие размерам плодов и семян. Готовые срезы помещают в чашку Петри с водой, откуда срезы вынимают, просматривают под микроскопом, отбирая удачные.

*Измельчённое сырьё.* Выбирают крупные кусочки плодов и семян. Получают микропрепараты аналогично микропрепаратам цельного сырья. Более удобно проводить анализ в «давленых» микропрепаратах, для чего просветлённые 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.* Для изучения порошка можно использовать 1 или 2 способ приготовления микропрепаратов.

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

Для обезжиривания порошок сырья помещают в пробирку с притёртой 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 разведённой 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.

***Кора***

*Цельное сырьё.* 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. Размягчённые куски выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в хлоралгидрата растворе водно-глицериновом или глицерина растворе 33 %.

*Измельчённое сырьё.* Соскоб коры или мелкие кусочки кипятят в течение 3 − 5 мин в натрия гидроксида растворе 5 %, промывают водой и готовят микропрепараты, раздавливая объект скальпелем в хлоралгидрата растворе водно-глицериновом или глицерина растворе 33 %.

*Порошок.* Для изучения порошка можно использовать 1 или 2 способ приготовления микропрепаратов.

***Почки***

*Цельное сырьё.* Готовят микропрепараты 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.

***Корни, корневища, клубни, луковицы, клубнелуковицы***

*Цельное сырьё.* 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 хлоралгидрата растворе водно-глицериновом или глицерина растворе 33 % и рассматривают анатомо-диагностические признаки сначала при малом, затем при большом увеличении.

*Измельчённое сырьё.* 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 хлоралгидрата растворе водно-глицериновом.

*Порошок.* Для изучения порошка можно использовать 1 или 2 способ приготовления микропрепаратов.

**Микрохимическое и гистохимическое исследование**

***Лигнин, крахмал, секреторное наполнение, пробка.*** Небольшое количество исследуемого образца распределяют в 0,10−0,15 мл молочной кислоты реактива на предметном стекле и накрывают покровным стеклом. Микропрепарат очень осторожно нагревают до кипения, поддерживая слабое кипение в течение короткого времени и обеспечивая при этом достаточное количество хлоралгидрата раствора водно-глицеринового или раствора глицерина 33 %. При необходимости, включающую жидкость восполняют с помощью клиновидной стеклянной пипетки. Охлаждают и рассматривают под микроскопом. Лигнифицированные элементы окрашиваются в ярко жёлтый цвет; элементы, содержащие целлюлозу, остаются бесцветными. Крахмальные зёрна окрашиваются в светло- или тёмно-фиолетовый цвет; некоторые секреторные накопления (например, эфирные масла, смолы, маслянистые смолы) окрашиваются в оранжевый цвет, а пробка - в красный цвет.

***Крахмал***

1. Цельный или измельчённый исследуемый образец, размягчённый способом 2, или полученные срезы, или порошок образца на кончике препаровальной иглы, смоченном водой или глицерина раствором 33 %, помещают в 0,10-0,15 мл воды или глицерина раствора 33 % на предметном стекле и рассматривают крахмальные зёрна. Из цельного, измельчённого и дроблёного сырья делают «давленые» микропрепараты. При изучении крахмальных зёрен определяют их форму, строение, размеры измеряют окулярным микрометром.

2. Цельный или измельчённый исследуемый образец, размягчённый способом 2, или полученные срезы, или порошок образца на кончике препаровальной иглы, смоченном раствором Люголя, помещают в 0,10-0,15 мл раствора Люголя на предметном стекле, накрывают покровным стеклом и наблюдают крахмальные зёрна. Из цельного и измельчённого исследуемого образца готовят «давленый» микропрепарат, в которомрассматривают крахмал. Крахмальные зерна приобретают синее или сине-фиолетовое окрашивание. Необходимо учитывать, что окраска исчезает при нагревании. Приготовленный микропрепарат следует анализировать сразу после его приготовления, так как окраска сохраняется недолго.

3. Для обнаружения крахмала делают соскоб сухой коры, подземного органа и рассматривают его в растворе Люголя. Крахмальные зёрна окрашиваются в синий или сине-фиолетовый цвет.

***Жирное и эфирное масло***

1. Эфирные масла наблюдаются без применения красителей в виде капель светло-жёлтого, тёмно-жёлтого, зеленовато-жёлтого, коричневато-красного цвета.

2. Цельный или измельчённый исследуемый образец, размягчённый способом 2, или полученные срезы, или порошок образца на кончике препаровальной иглы, смоченном судана III раствором водно-глицериновым, помещают в 0,10-0,15 мл судана III раствора водно-глицеринового на предметном стекле, накрывают покровным стеклом и нагревают. Из цельного и измельчённого исследуемого образца готовят «давленый» микропрепарат в используемом реактиве. Капли жирного или эфирного масла окрашиваются в оранжево-розовый или оранжево-жёлтый цвет.

3. Небольшое количество исследуемого образца погружают в метиленового синего спиртовой раствор 0,02 % на 3-5 мин. На предметное стекло помещают в 0,10−0,15 мл глицерина раствора 33 %, исследуемый образец, выдержанный в метиленового синего спиртовом растворе 0,02 %, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Эфирное масло окрашивается в синий цвет в отличие от жирного масла.

***Слизь***

1. Порошок исследуемого образца на кончике препаровальной иглы, смоченном раствором чёрной туши, помещают в 0,10-0,15 мл раствора чёрной туши на предметном стекле, тщательно перемешивают, накрывают покровным стеклом и тотчас рассматривают под микроскопом (малое увеличение); слизь заметна в виде бесцветных масс на чёрном фоне.

2. Порошок исследуемого образца на кончике препаровальной иглы, смоченном рутения красного раствором 0,08 %, помещают в 0,10-0,15 мл рутения красного раствора 0,08 % на предметном стекле, тщательно перемешивают, накрывают покровным стеклом. По истечении около 1 мин наносят 0,05 мл воды, позволяя проникнуть ей между предметным и покровным стеклом. Рассматривают под микроскопом. Слизь окрашивается в фиолетово-красный цвет.

***Дубильные вещества***

На внутреннюю поверхность сухого исследуемого образца наносят 0,05 мл железа(III) аммония сульфата раствора 1 % (раствора квасцов железоаммониевых) или железа(III) хлорида раствора 3 %; появляется чёрно-синее или чёрно-зеленое окрашивание.

***Производные антрацена***

1. На внутреннюю поверхность сухого исследуемого образца наносят 0,05-0,10 мл натрия гидроксида раствора 10 %; появляется красное или тёмно-красное окрашивание.

2. На предметное стекло ставят трубку диаметром 1,5 см и высотой 2 см. Внутрь стеклянной трубки помещают небольшое количество порошка (или соскоба) исследуемого образца, сверху накрывают другим предметным стеклом, ставят на асбестовую сетку, закреплённую 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 налёт. Под микроскопом в сублимате видны тонкие жёлтые иголочки, которые в ультрафиолетовом свете (люминесцентный микроскоп) имеют яркое жёлтое или оранжево-красное свечение. В натрия гидроксида растворе 10 % сублимат растворяется с красным окрашиванием.

***Инулин***

Около 0,1 г измельчённого в порошок исследуемого образца помещают на предметное стекло, прибавляют 0,05−0,10 мл β-нафтола (резорцина или тимола) в спиртовом растворе 20 % и 0,05 мл серной кислоты концентрированной и рассматривают под микроскопом. Инулин окрашивается в красновато-фиолетовый цвет, при использовании резорцина или тимола − в оранжево-красный. О наличии инулина судят только при отсутствии крахмала.

***Одревесневшие (лигнифицированные) элементы***

Полученные срезы исследуемого образца или его порошок на кончике препаровальной иглы, смоченном флороглюцина раствором спиртовым 10 %, помещают в 0,10-0,15 мл флороглюцина раствора спиртового 10 % на предметном стекле, перемешивают и выдерживают до полного испарения раствора. Прибавляют 0,05 мл серной кислоты раствора 25 %, накрывают микропрепарат покровным стеклом и сразу рассматривают под микроскопом. Красное окрашивание указывает на наличие лигнина (одревесневших механических элементов).

Люминесцентная микроскопия

Метод люминесцентной микроскопии применяют (где это целесообразно) для идентификации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. Преимуществом метода является возможность его применения для изучения сухого исследуемого образца, из которого готовят толстые срезы или микропрепараты порошка и наблюдают первичную (собственную) люминесценцию. Люминесцентную микроскопию выполняют с помощью люминесцентных микроскопов или обычных биологических микроскопов, снабжённых специальными люминесцентными осветителями.

*Приготовление микропрепаратов.* Для приготовления микропрепаратов используют высушенный исследуемый образец или его порошок. Предварительное размачивание исследуемого образца 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 лигнифицированных элементов (сосуды жилки, механические волокна), а также кутикулы и кутинизированных оболочек различных эпидермальных образований (волоски, желёзки и др.). В эпидермальных клетках часто содержатся флавоноиды, обусловливающие коричневую, жёлтую или зеленовато-жёлтую люминесценцию. Клетки мезофилла в зависимости от их химического состава содержат различные включения - жёлтые, голубые, зеленовато-жёлтые, коричневые. Хлорофилл и кристаллы кальция оксалата в высушенном исследуемом образце не люминесцируют. При необходимости приготовления среза лист предварительно размягчают во влажной камере и с помощью бритвы делают толстый срез (2-3 мм). Более тонкие срезы помещают в хлоралгидрата раствор водно-глицериновый или раствор глицерина 33 % и накрывают покровным стеклом.

В качестве включающей жидкости используют воду, глицерина раствор 33 %, поливинилового спирта раствор 5 %, нефлуоресцирующее вазелиновое масло. Включающая жидкость не должна растворять содержащиеся в микропрепарате люминесцирующие вещества.

*Травы.* При анализе трав готовят микропрепараты листьев. При необходимости приготовления микропрепарата стебля его размягчают во влажной камере и готовят срезы. Толстые срезы (2-3 мм) закрепляют на предметном стекле и рассматривают без включающей жидкости; тонкие срезы помещают в подходящую жидкость и накрывают покровным стеклом. Наиболее яркую люминесценцию имеют лигнифицированные 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, обладающие в зависимости от состава разнообразным свечением: синим, голубым, зелёным, зеленовато-жёлтым, золотисто-жёлтым, оранжево-красным.

*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, обладающие флюоресценцией. Отчетливо видны пыльцевые зёрна, имеющие жёлтое, зеленовато-жёлтое или голубоватое свечение.

*Плоды*. Готовят обычно поперечные срезы плода после предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают во включающей жидкости или без неё 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 жёлтого или жёлто-зеленого цвета.

*Семена*. Готовят обычно поперечные срезы семени после предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают их во включающей жидкости или без неё в зависимости от толщины среза. Обращают внимание на характер люминесценции семенной кожуры, в которой отчётливо 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 и рассматривают без включающей жидкости; тонкие срезы заключают в жидкость. Для некоторых видов сырья характерна люминесценция пробкового слоя коры: оболочки клеток пробки имеют интенсивно синее свечение, их содержимое - тёмно-красное (антоцианы). Яркое и разнообразное свечение имеют механические элементы (лубяные волокна и каменистые клетки): голубое, зеленовато-голубое, желтовато-зелёное. Люминесценция паренхимы коры зависит от химического состава. Антраценпроизводные обусловливают ярко-оранжевое или красновато-оранжевое свечение. Дубильные вещества обладают свойством "тушить" люминесценцию, поэтому ткани, содержащие дубильные вещества, тёмно-коричневого, почти чёрного, цвета.

Микропрепарат, 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, микропрепараты порошка или соскоба. Срезы готовят из материала, предварительно размягчённого 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 и рассматривают без включающей жидкости. Слой пробки у подземных органов обычно тусклый, почти чёрный. Ярко люминесцируют древесина (у корней и корневищ) и проводящие пучки, а также склеренхимные элементы. Их свечение весьма разнообразно: от буровато-зелёного, жёлто-зелёного до светло-голубого и интенсивно-синего в зависимости от вида сырья. Еще более разнообразна люминесценция паренхимных тканей и различных секреторных образований (вместилища, каналы, ходы, млечники, различные идиобласты), что определяется их химическим составом. В секреторных образованиях встречаются кристаллические включения кумаринов, алкалоидов, флавоноидов, обладающих яркой люминесценцией.

В микропрепаратах порошка видны отдельные сосуды, группы механических волокон, каменистые клетки, отдельные секреторные образования и их обрывки, ярко люминесцирующие клетки паренхимы, содержащие те или иные вещества.