



ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2

ТЕМА: Мікроскопічний аналіз лікарської сировини

Мета: навчитись проводити мікроскопічний аналіз лікарської рослинної сировини різних типів

Хід роботи: ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Необхідність у мікроскопічному дослідженні виникає при аналізі здрібненої лікарської рослинної сировини (різаної, порошкової, пресованої, гранульованої), а також при необхідності відрізнити лікарську рослинну сировину від можливих домішок, зовнішній вигляд яких подібний до офіційної сировини. Мікроскопічний аналіз не може бути остаточним критерієм ідентифікації рослинної сировини. Тільки в сукупності з іншими методами аналізу (макроскопічним, хімічним, хроматографічним, люмінесцентним) можливо ідентифікувати об'єкт дослідження.

Прилади та реактиви

Для проведення мікроскопічного аналізу використовують ряд оптичних приладів і допоміжних інструментів. Основними є мікроскоп, лупа, об'єктивний і окулярний мікрометри. Зрізи сировини готують з використанням набору ботанічних інструментів.

Реактиви для мікроскопічного дослідження можна розділити на дві групи: 1) індиферентні та просвітлюючі; 2) реактиви для мікрохімічних реакцій. У якості індиферентних та просвітлюючих рідин використовують воду, гліцерин, суміш гліцерин-вода (1:2), розчин хлоральгідрату 5 %, водний розчин лугів, розчин перекису водню. Мікропрепарати, виготовлені за різною технікою, вміщують у просвітлюючу рідину, яку нанесено на предметне скло, і накривають покривним склом.

Підготовка зразка

Аналіз подрібненої сировини починають із зовнішнього огляду, який проводять на сухому матеріалі візуально або за допомогою лупи $\times 10$, краще при денному освітленні. Визначають колір, опушення, наявність будь-яких додаткових ознак, перевіряють запах при розтиранні шматочків сировини між пальцями, визначають морфологічну групу лікарської рослинної сировини.

ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ ПРИРОДНИХ ЕКОСИСТЕМ



Сушу рослинну сировину потрібно розм'якшити перед роботою. З урахуванням особливостей об'єкта застосовують холодне розмочування, кип'ятіння, розм'якшення у водних парах вологої камери та модифікації цих способів.

Види розмочування

Холодне розмочування. Досліджувану суху сировину заливають у колбі сумішню води і гліцерину (2:1) або води, гліцерину і спирту (1:1:1) з додаванням фенолу або іншого консерванту. Протягом 1–2 діб розм'якшується дрібне насіння, плоди, листки, квітки, трава. Шматочки грубих частин рослини (кору, плоди, насіння, підземні органи, шкірясті листки, товсті стебла) мацерують 3–5 діб. Також ці об'єкти можна залишити на 1–3 год для набухання, а потім перенести у суміш гліцерину і спирту (1:1) на 1–3 доби. Для ущільнення тканин рослинний матеріал можна замочити 20–30 хв у спирт або суміші спирт – гліцерин (2:1).

Розм'якшування у водяній парі. Головною відмінністю є відсутність контакту лікарської рослинної сировини з водою. Спосіб тривалий, але він забезпечує збереження структури тканин та запобігає вимиванню, сублімації, надмірному набряканню або ослизненню вмісту клітин. Розм'якшування проводять у вологій камері, наприклад, в ексікаторі або колбі з водою. Сировина у камері знаходиться у чашці або у стаканчику й зволожується парою води. М'які і тонкі об'єкти залишають в атмосфері камери на добу, щільні та шкірясті – на 2 та більше діб.

Розм'якшування у воді. Найбільш простий і швидкий спосіб полягає у кип'ятінні сировини у воді. Тонкі листки й квітки не вимагають складної й довгої підготовки. Їх звичайно розм'якшують, занурюючи в гарячу воду. Невеликі шматочки рослинного матеріалу довжиною 1–2 см звичайно кип'ятять 3–5 хв; кору й підземні органи рослин залежно від щільності й ступеня лігніфікації тканин – 20–30 хв. Плоди та насіння не кип'ятять, а розпарюють: їх поміщають у марлевому мішечку на 15–30 хв у пари киплячої води так, щоб вони не були занурені у воду.

Варто пам'ятати, що шляхом вимочування або кип'ятіння сировини у воді з клітин видаляється водорозчинний вміст. Крохмальні зерна клейстеризуються при кип'ятінні у воді.

Розм'якшування у розчині лугу. Для розм'якшення й одночасного просвітлення шматочки листової пластинки (із



ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ ПРИРОДНИХ ЕКОСИСТЕМ

краєм листка, ділянкою головної жилки) поміщають у порцелянову чашку або хімічний стаканчик і кип'ятять в 3–5 % розчині натрію (калію) гідроксиду протягом 2–5 хв залежно від товщини об'єкта. Рідину зливають, а сировину промивають водою. Оброблений матеріал залишають у воді і готують з нього препарат з поверхні. Препарати шкірки плодів і насіння готують після кип'ятіння в 5 % розчині калію гідроксиду протягом 15–20 хв, з наступним роздавлуванням і розшаруванням тканин.

Розм'якшування у розчині хлоральгідрату. Для швидкого приготування зрізів кору й підземні органи розм'якшують кип'ятінням у розчині хлоральгідрату протягом 10–20 хв.

Мацерація тканин

У деяких випадках потрібне руйнування тканин (дезінтеграція). Для вивчення окремих елементів провідних пучків і механічних тканин шматочки сировини довжиною 1–2 см або грубий зіскрібок нагрівають (обережно, під тягою!) у пробірці в суміші 2 мл кислоти азотної конц. та 0,3 г калію хлорату (бертолетової солі) до утворення піни і залишають на кілька хвилин до висвітлення шматочків. Сировину промивають декілька разів водою, поміщають на предметне скло, розділяють препарувальною голкою на окремі елементи й переглядають у гліцерині.

При дослідженні сировини, що містить секреторні ходи, молочники, вмістища зі смолою або ефірною олією, для поділу тканин без руйнування тонких оболонок клітин застосовують наступні способи: а) кип'ятіння в 3–5 % розчині лугу протягом 30 хв; б) нагрівання сировини в колбі зі шліфом в 25 % розчині аміаку протягом 40 хв. Після кип'ятіння частки сировини промивають водою, перекладають на предметне скло й розділяють тканини препарувальною голкою.

Приготування тимчасових мікропрепаратів для вивчення

Після попередньої підготовки з сировини готують мікропрепарати за різноманітною технікою, яка залежить від стану сировини та її належності до певної морфологічної групи (листки, кора, підземні органи).

Приготування препаратів з поверхні. Для приготування мікропрепаратів з поверхні дрібні листки використовують цілими, від великих беруть окремі частки з найважливішими діагностичними елементами: край листка, зубчик, ділянка



ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ ПРИРОДНИХ ЕКОСИСТЕМ

головної жилки, верхівку й основу листка. Листок або його частини поміщають на предметне скло в розчин хлоральгідрату або гліцерину. Якщо об'єкт збирається у складочки, предметне скло у воді підводять під шматочки сировини та виймають їх голкою на скло. Якщо листок треба розглянути із двох сторін, шматочок листової пластинки ріжуть на дві частини скальпелем на предметному склі; одну частину обережно перевертають і поміщають обидві частини поруч. З товстого і шкірястого листа при необхідності готують роздавлені препарати або поперечні зрізи. При аналізі різаного листа вибирають кілька шматочків з великою жилкою й краєм листка.

Препарати квіток для мікроскопічного аналізу готують із окремих частин суцвіття (квітки, листочки обгортки) і частин квітки (пелюстки, чашолистки), розглядаючи їх з поверхні. Для ідентифікації плодів і насіння готують поперечні зрізи. Для мікродіагностики кори й підземних органів з попередньо розм'якшеної сировини готують поперечні, рідше повздовжні зрізи.

Приготування зрізів. Для вивчення тканин і органів щільної структури готують поперечні зрізи. Зрізи готують переважно від руки, за допомогою бритви або леза. Великі й щільні об'єкти (корінь, кореневища, кору, плоди, насіння, товсті шкірясті листки) просто тримають у руці. Дрібні об'єкти, які важко тримати пальцями, або тонкі, що гнуться при натисненні леза, затискають у серцевину бузини, коркову пробку або заливають у парафін.

Приготування препаратів рослинних порошоків. Мікропрепарати рослинних порошоків усіх морфологічних груп сировини готують однаково. На предметне скло спочатку поміщають 2–3 краплі хлоралгідрату, а потім на кінчику скальпеля або зволоженої препарувальної голки вносять частки порошку, перемішують препарувальною голкою до рівномірного змочування всіх часток рідиною, накривають покривним склом і придавлюють ручкою голки. Надлишок рідини видаляють смужкою фільтрувального паперу. Якщо рідини під склом замало, її додають піпеткою поруч із покривним склом (вона швидко затягається під скло).

Мікропрепарати прогривають над невеликим полум'ям пальника або на електроплитці до повного просвітління тканин, не допускаючи висихання. Тримати препарат при

ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ ПРИРОДНИХ ЕКОСИСТЕМ



прогріванні потрібно похило, під кутом 10–50, так з об'єкта краще видаляються пухирці повітря. Не можна допустити різкого закипання рідини, бо частки порошку не просвітлюються, а препарат заповнюється пухирцями повітря.

При дослідженні порошку кори, підземних органів, плодів або насіння мікропрепарат готують у розчині хлоралгідрату для вивчення головних діагностичних ознак, слизу, алейронових зерен, кристалів та ін. Для виявлення крохмалю препарат готують у воді або гліцерині без нагрівання.

Вимірювання об'єктів у мікроскопічному аналізі

Використовують мікроскопи з окулярним мікрометром для вимірювання розмірів малих об'єктів. Окулярний мікрометр являє собою круглу скляну пластинку зі шкалою завдовжки 1 см, розділену на 100 частин. Окуляр-мікрометр поміщають усередину окуляра на його діафрагму, для цього попередньо відгвинчують очну лінзу окуляра. У мікроскоп видно не лише об'єкт, але й поділки шкали окуляра-мікрометра.

Для визначення розміру об'єкта у мікрометрах варто визначити ціну однієї поділки окуляра-мікрометра і помножити на неї відповідні цифри, отримані при вимірі об'єкта. Ціна поділки залежить від збільшення об'єктива мікроскопа. Тому для кожної комбінації об'єктива й окуляра визначають нову ціну поділки за допомогою об'єктивного мікрометра.

Об'єктивний мікрометр являє собою предметне скло, на якому вигравіювано міліметр, розділений на 100 поділок по 10 мікрометрів у кожній.

Для встановлення ціни поділки окуляра-мікрометра поміщають об'єктивний мікрометр на столик мікроскопа і домагаються сполучення зображення його шкали з зображенням шкали окуляра-мікрометра. Потім зіставляють будь-які початкові штрихи обох шкал і визначають, скільки поділок об'єктивного мікрометра припадає на відоме число поділок окуляра-мікрометра. За відношенням першої і другої цифр, помножених на ціну однієї поділки об'єктивного мікрометра, рівну 10 мікронам, одержують величину однієї поділки окуляра-мікрометра в мікрометрах.

Приклад. 10 поділок окуляра-мікрометра дорівнюють у точності 15 поділкам об'єктива-мікрометра, що відповідає 150 мікрометрам. Таким чином, ціна однієї поділки окуляра-мікрометра складає 15 мікрометрів.

ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ ПРИРОДНИХ ЕКОСИСТЕМ ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА



Завдання 1. Провести розм'якшування сировини у воді та у розчині луку.

Завдання 2. Виготовити тимчасовий препарат з поверхні рослини.

Завдання 3. Виготовити тимчасовий препарат квіток.

Завдання 4. Виготовити тимчасовий препарат зрізу стебла.

Завдання 5. Виготовити тимчасовий препарат зрізу кореня.

Завдання 6. Виготовити тимчасовий препарат рослинного порошку.

Завдання 7. Розрахувати ціну поділки окуляр-мікрометра, якщо 10 поділок окуляр мікрометра відповідає 10 поділкам об'єктива-мікрометра.

Завдання 8. Розрахувати ціну поділки окуляр-мікрометра, якщо 10 поділок окуляр мікрометра відповідає 12 поділкам об'єктива-мікрометра.

Питання кінцевого рівня:

1. Загальні правила проведення мікроскопічного аналізу лікарської сировини.
2. Які прилади використовують при мікроскопічному аналізі лікарської рослинної сировини?
3. Які реактиви використовують при проведенні мікроскопічного аналізу рослинної сировини?
4. Як проводять підготовку зразків?
5. Як проводять розм'якшування сировини?
6. Які критерії вибору того чи іншого методи розм'якшення?
7. Як проводять розділення тканин?
8. Як готують тимчасові мікропрепарати?
9. Як готують препарати рослинних порошоків?
10. Як проводять вимірювання при мікроскопічному дослідженні лікарської рослинної сировини?