

2. ГОСТ Р ИСО 5725-1-02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения».

3. ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Часть 3.// Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. – М.: Госстандарт. – 28 с.

4. Евдокимова О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пастушьей сумки // Журнал «Традиционная медицина». – 2011. – №1 (24). – С. 50–53.

5. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве / Под ред. проф. Береговых В.В. – М.: Издательский дом «Русский врач», 2005. – С. 73–97.

6. ОФС 42-0113-09 Валидация аналитических методик.

7. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др. Разработчики: В.Л. Багирова, А.И. Гризодуб, Т.Х. Чибилев и др. – М., 2007. – 48 с.

8. Точкова Т.В., Бубенчикова В.Н. Спектрофотометрический метод количественного определения флавоноидов в цветках липы.// Ресурсоведческое и фитохимическое изучение лекарственной флоры СССР. – Научные труды, том XXIX. 1991. – С. 150–155.

Адрес автора

К.фарм.н. Евдокимова О.В., доцент кафедры фармаци.

oevdokimova2010@mail.ru

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА PAEONIA

Н.В. Бобкова

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Кафедра фармакогнозии (г. Москва)

Pharmacognostic study of medicinal plants of the genus *Paeonia*

N.V. Bobkova

First MG MU them. IM Medical Academy, Department of Pharmacognosy (Moscow, Russia)

РЕЗЮМЕ

Цель: Совершенствование характеристик подлинности и сравнительный фармакогностический анализ сырья пиона уклоняющегося и пиона молочноцветкового.

Методы исследования: экспериментальные (макроскопический, микроскопический, качественный химический).

Результаты: Описаны морфолого-анатомические признаки корней двух видов пиона. Определены различия внешних и анатомо-диагностических признаков и химического состава пиона уклоняющегося разных мест произрастания и пиона молочноцветкового.

Выводы: Предложены характеристики подлинности для цельных и измельченных корневищ и корней пиона уклоняющегося и корней пиона молочноцветкового.

Ключевые слова: Пион уклоняющийся, пион молочноцветковый, микроскопический анализ, тонкослойная хроматография.

RESUME

Purpose: To improve the characteristics of identification and compare pharmacognostical analysis of raw materials of *Paeonia anomala* L. and *Paeonia lactiflora* Pall.

Methods of analysis: experimental (macroscopic, microscopic analysis, chemical identification).

Results: The morphological and anatomical signs of underground organs of two species of *Paeonia* have been described. Differences have been determined between external and anatomical diagnostic signs and chemical composition of raw materials of and depending on its cultivation place.

Resume: The characteristics of identification for fractional and intact underground organs of *Paeonia anomala* L. and *Paeonia lactiflora* Pall.

Keywords: *Paeonia anomala* L., *Paeonia lactiflora* Pall., microscopic analysis, thin-layer chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

Растения рода *Paeonia* сем. Пионовые (*Paeonaceae*) являются сырьевыми источниками во многих странах.

В России для заготовки корневищ и корней, а также травы используется Пион уклоняю-

щийся (*Paeonia anomala* L.). В странах Дальнего Востока – Китае, Корее и Японии – пион молочноцветковый (*Paeonia lactiflora* Pall.) [2, 4].

Корни пиона молочноцветкового включаются в состав многокомпонентных таблетированных лекарственных средств традиционной

китайской медицины. Проблема идентификации сырья в подобных препаратах с помощью микроскопического и хроматографического анализа весьма актуальна [1].

Представляют интерес и вопросы сравнительного изучения корней двух видов пиона в плане качественного химического состава и определения характеристик их подлинности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовались образцы высушенных корневищ и корней культивируемых растений пиона уклоняющегося, собранные в Московской и Горно-алтайской автономной областях в сентябре 2010 г., а также образцы корней пиона молочноцветкового, привезенные из КНР.

Исследования морфологических и анатомо-диагностических признаков осуществлялось в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей «Корни, корневища, клубни, луковицы, клубнелуковицы» и «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» [3]. Из корней готовили продольные и поперечные срезы. Проводились гистохимические реакции с раствором флороглюцина и соляной кислотой, раствором Судана III и раствором Люголя [3]. Измерения проводились с помощью окуляр-микрометра. Исследования и фотоснимки выполнялись на микроскопах «ЛОМО МИКМЕД – 1» (окуляр 7х и объективы: 3,7х, 10х, 20х, 40х) и «МИКМЕД – 6» (окуляр 10х и объективы: 4х, 10х, 40х, 100х) с помощью цифровой фотокамеры Canon Digital IXUS 80 IS; обработка снимков проводилась с использованием программы Microsoft Office Picture Manager.

Для проведения качественных реакций использовали водные извлечения из ЛРС в соотношении 1:10. Для проведения тонкослойной хроматографии – этанольные (95 %) извлечения в соотношении 1:5.

В качестве неподвижной фазы использовались пластинки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А-УФ (Россия). Хроматографирование проводили в системах растворителей: хлороформ-этилацетат-этанол-муравьиная кислота (40:5:10:0,2) – система 1 и этилацетат-ацетон-вода-муравьиная кислота (5:3:2:1) – система 2. Детектирование хроматограмм осуществлялось 1 % раствором хлорида железа (III) (обнаружение метилсалицилата), 1 % раствором железистоаммониевых квасцов (дубильные вещества), УФ-светом (365 нм) и диазотиро-

ванным реактивом (фенольные соединения). В качестве образцов сравнения использовался раствор метилсалицилата и раствор танина.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный морфологический анализ сырья пиона уклоняющегося и пиона молочноцветкового выявил значительные отличия в их внешних признаках. Что объясняется, главным образом, специфической первичной обработкой сырья китайского происхождения (корни перед сушкой нарезаются и провариваются в воде).

Сырье пиона уклоняющегося представляет собой смесь корневищ и корней различной формы, снаружи – темно-коричневого или желтовато-бурого цвета, продольно-морщинистые. Излом неровный, беловато-желтоватый, по краю иногда лиловый. На изломе видны: снаружи тонкий слой перидермы, белый слой коры, резко выступающие желтоватые клиновидные участки древесины с темно лиловыми точками и светлые сердцевинные лучи. Запах сильный, своеобразный. Вкус сладковато-жгучий, слегка вяжущий.

Сырье пиона молочноцветкового представляет собой нарезанные поперек куски корней в виде круглых или овальных пластинок диаметром от 1 до 4 см (рис. 1). Снаружи видны участки сохранившейся пробки серовато-лилового цвета. На срезах заметна зона коры в виде кольца и ксилема в виде беловатых выступающих лучей и колец. Запах слабый своеобразный. Вкус сладковатый.

Следующим этапом нашей работы было сравнительное изучение анатомо-диагностических признаков корней пиона уклоняющегося и пиона молочноцветкового.



Рис. 1. Корни пиона молочноцветкового (КНР).

В ходе исследования было установлено, что основные анатомо-диагностические признаки поперечных срезов корней двух видов пионов совпадают.

Корни имеют вторичное строение. Непрерывная линия камбия разделяет корень на достаточную узкую коровую зону и древесинную часть.

Покровная ткань – пробка – состоит из 3–7 рядов прямоугольных клеток с утолщенными темно окрашенными клеточными стенками.

Под пробкой находится феллодерма, состоящая из нескольких слоев достаточно крупных тангентально удлинённых клеток со слегка утолщенными стенками и иногда заметными порами.

На срезах корня пиона уклоняющегося, собранного в Московской области в коре нами были обнаружены каменные клетки – диагностический признак ранее не описанный и в других исследуемых образцах сырья не встречающийся. Каменные клетки – склереиды – размером от 20 до 40 мкм располагаются одиночно или группами по 3–7 штук, по форме – изодиаметричные или слегка удлинённые, округло-многоугольные с сильно утолщенной слоистой клеточной стенкой, пронизанной порами и сильно одревесневшей (рис. 2), что подтверждает реакция с флороглюцином и соляной кислотой – клетки окрашиваются в ярко малиновый цвет.

При проведении реакции с раствором Судана III именно в клетках феллодермы обнаруживаются оранжевые маслянистые капли, что предположительно может быть эфирным маслом. Капли многочисленнее и крупнее в корнях пиона уклоняющегося.

К центру от камбия расположена древесина, состоящая из клеток паренхимы, сосудов ксилемы и трахеид. Паренхимные клетки образуют широкие многорядные сердцевинные лучи, чередующиеся с проводящими элементами ксилемы – сосудами и трахеидами, радиально расходящимися в виде узких полосок или островков. На некоторых срезах у линии камбия молодые участки ксилемы и флоэмы могут формировать проводящие пучки, широкие в верхней части и сужающиеся к центру.

На продольных срезах корней через ксилему видно строение ее проводящих элементов. Сосуды широкополостные, членистые с заметными остатками перфорационных пластин и щелевидными порами клеточной стенки. Трахеиды узкополостные, веретеновидные с пористыми одревесневшими стенками.

Для корней пиона уклоняющегося была обнаружена особенность, которая отсутствова-

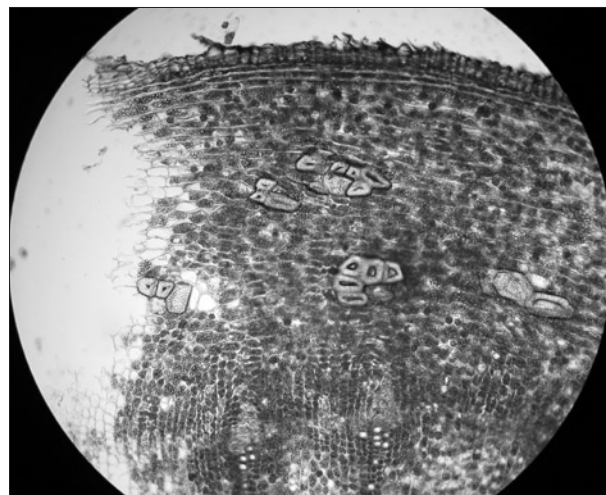


Рис. 2. Поперечный срез корня пиона уклоняющегося (Московская область). Ув.х100.

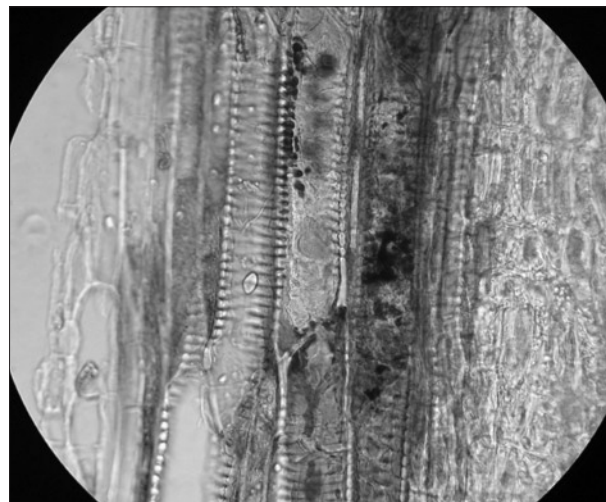


Рис. 3. Продольный срез корня пиона уклоняющегося (Горно-Алтайская автономная область). Сосуды древесины. Ув.х1000.

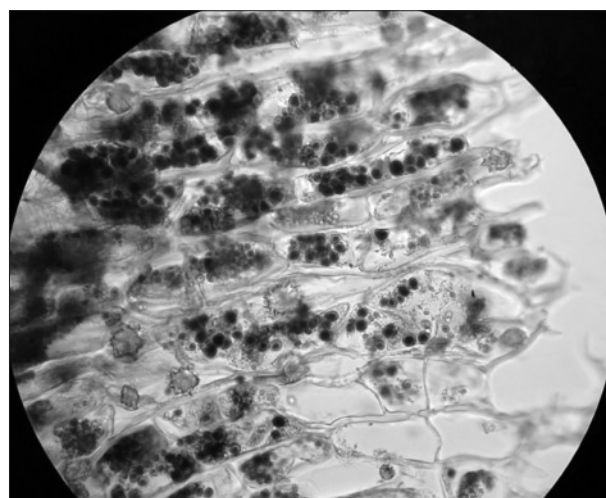


Рис. 4. Поперечный срез корня пиона уклоняющегося (Московская область). Друзы оксалата кальция. Зерна крахмала (р-в Люголя). Ув.х400.

ла в корнях пиона молочноцветкового. В некоторых сосудах ксилемы находилось желто-оранжевое, розовато-красное или малиновое содержимое в виде стекловидного или смолянисто-застывшего налета, не растворяющегося ни в этаноле, ни в хлороформе, ни в щелочном растворе (рис. 3).

По всему корню в клетках паренхимы наблюдаются многочисленные остроконечные друзы оксалата кальция размером от 15 до 25 мкм (рис. 4).

В паренхимных клетках всех зон корня пиона очередноцветкового видны многочисленные крахмальные зерна. Они – преимущественно простые, округлой, овальной, яйцевидной или неправильно шарообразной формы размером от 5 до 12 мкм, реже – двусложные, без заметных щелей и трещин (рис. 4).

В корнях пиона китайского происхождения крахмал также присутствует во всех паренхимных клетках. Однако за счет специфической первичной обработки крахмал клейстеризуется и проявляется в виде беловатого аморфного содержимого, приобретающего сине-фиолетовый цвет при проведении гистохимической реакции с реактивом Люголя.

Было проведено микроскопическое исследо-

вание порошка корней всех объектов исследования и определены специфические анатомо-диагностические признаки сырья с размером частиц 1 мм. Микропрепараты готовились по методике измельченного сырья – давленый препарат.

Диагностическое значение имеют: фрагменты паренхимной ткани, состоящие из округлых и удлинённых клеток паренхимы с многочисленными дузами оксалата кальция; участки сосудов ксилемы с пористым вторичным утолщением клеточных стенок, контур сосудов с характерным зубчатым контуром поверхности; коричневые участки пробки, состоящие из прямоугольных или полигональных клеток.

В ходе проведения качественных реакций на сырье двух видов пиона наиболее значимыми оказались реакции на полисахариды, вещества фенольной природы и дубильные вещества. Результаты представлены в табл. 1.

В результате осаждения полисахаридов из водных экстрактов 95 % этанолом полисахариды были обнаружены во всех видах сырья. Наиболее обильный осадок наблюдался у сырья пиона уклоняющегося алтайского сбора.

При проведении реакций на фенольный гидроксил с 1 % раствором FeCl_3 в сырье пиона уклоняющегося появлялось яркое черно-фиолетовое

Таблица 1

Результаты качественных реакций на сырье пиона уклоняющегося и пиона молочноцветкового

БАВ	Реактив	Водное извлечение из корней пиона уклоняющегося (Моск. обл.)	Водное извлечение из корней пиона уклоняющегося (Горно-Алтайск. обл.)	Водное извлечение из корней пиона молочноцветкового
Дубильные вещества	Железо-аммонийные квасцы	++	+++	— — +
Фенольные соединения	FeCl_3	++	+++	—
Полисахариды	95 % этанол	+	+++	+++

Таблица 2

Хроматографическая характеристика фенольных соединений сырья пиона уклоняющегося и пиона молочноцветкового

№	Системы, R_f		Реактив, цвет пятен				Свидетель, R_f	Объекты исследования		
	1	2	УФ	FeCl_3	Диазоп-р-в	Железо-амм. квасцы		P.anomala Моск.обл.	P.anomala Алтай	P.lactiflora
1	0,9				Желтый			+	+	
2	0,84				Оранжевый			+	+	
3	0,57				Серый			+	+	
4	0,42				Розовый			+	+	+
5	0,38			Фиолетовый			Метил-салицилат 0,38	+	+	
6	0,23		Голубое свечение					+		
7		0,86				Черный	Танин 0,86	+	+	
8		0,74				Голубой		+	+	+
9		0,66				Голубой			+	

окрашивание. В сырье китайского происхождения оно практически отсутствовало.

При проведении реакции на дубильные вещества они хорошо обнаруживались в извлечениях из сырья Пиона уклоняющегося и практически отсутствовало в сырье китайского происхождения.

Более подробный сравнительный анализ проводился методом тонкослойной хроматографии. Результаты представлены в табл. 2.

Метилсалицилат был обнаружен в сырье пиона уклоняющегося двух мест произрастания. Наиболее яркая зона адсорбции, соответствующая метилсалицилату, наблюдалась у сырья, собранного в Горно-Алтайской автономной области. В сырье китайского происхождения метилсалицилата обнаружить не удалось.

Был подтвержден идентичный состав фенольных соединений в двух образцах сырья пиона уклоняющегося. В сырье пиона молочнокветкового была обнаружена лишь одна зона адсорбции.

При детектировании пластинки УФ-светом в сырье пиона уклоняющегося, собранного в Московской области, обнаруживалась зона адсорбции ярко-голубой флуоресценции. В других видах сырья такого вещества обнаружено не было.

Зона адсорбции, соответствующая танину обнаружена в сырье пиона уклоняющегося разных мест произрастания. Качественный состав дубильных веществ корней двух видов пиона несколько отличается. Сырье китайского происхождения вновь оказалось значительно беднее (лишь одна зона адсорбции).

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе проведенного сравнительного морфологического изучения корней пиона уклоняющегося и пиона молочнокветкового выявлено значительное отличие внешних признаков исследованных видов сырья, объясняющееся специфической первичной обработкой сырья китайского происхождения.

В результате микроскопического изучения корней двух видов пиона установлены основные сходные анатомо-диагностические признаки. К ним относятся наличие широких сердцевидных лучей; лучевое расположение сосудов ксилемы; наличие многочисленных друз оксалата кальция; строение сосудов ксилемы.

Выявлены различия в анатомическом строении корней пиона уклоняющегося и пиона молочнокветкового. В корнях пиона уклоняющегося в сосудах ксилемы обнаружено ярко-

красное содержимое, отсутствующее в корнях пиона молочнокветкового. Корни пиона молочнокветкового характеризуются наличием неструктурированного клейстеризованного крахмала в клетках паренхимы. Обнаружено отличие некоторых анатомо-диагностических признаков в корнях пиона уклоняющегося различных мест произрастания.

В ходе проведения качественных реакций и хроматографического исследования установлено отличие качественного состава веществ фенольной природы в корнях пиона уклоняющегося и пиона молочнокветкового. Наличие полисахаридов обнаружено во всех объектах исследования. Наличие метилсалицилата обнаружено в корнях пиона уклоняющегося и не зависит от места произрастания. Однако корни пиона уклоняющегося, заготовленные в Московской области, характеризуются некоторым отличием в составе фенольных соединений от сырья, заготовленного в Горно-Алтайской области.

Установлены новые характеристики подлинности сырья пиона уклоняющегося для разделов «Микроскопия. Цельное и измельченное сырье» и «Качественные реакции», в него могут быть включены реакции на полисахариды, фенольные соединения и ТСХ, доказывающая присутствие метилсалицилата.

Анатомо-диагностические признаки порошка корней пиона молочнокветкового могут быть использованы для идентификации его в многокомпонентных лекарственных средствах традиционной восточной медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобкова Н.В., Ермакова В.А., Самылина И.А. Установление подлинности природного сырья в многокомпонентном препарате «Вентеронова» // Фармация №2, 2011. – С. 19–23.
2. Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с.
3. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. – М.: Медицина, 1987, вып.1. – 336 с.
4. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. – V.I, 2005. – 234 p.

Адрес автора

К.фарм.н. Бобкова Н.В.
Кафедра фармакогнозии, Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова
bobkovamma@mail.ru