

## **ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ СКУМПИИ КОЖЕВЕННОЙ (COTINUS COGGYGRIA SCOP.)**

**Гриценко А.И., Губанова Л.Б., Попова О.И.**

*Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, e-mail: art.gritsenko@gmail.com*

**В настоящей статье обсуждаются результаты применения различных методов при определении дубильных веществ в листьях скумпии кожевенной (CotinuscogygriaScop.). Объектом исследования служили высушенные образцы сырья листьев скумпии кожевенной, заготовленные в 2014 году в фазу цветения растения на юго-восточном склоне горы Машук в городе Пятигорске Ставропольского края. Проведено количественное определение дубильных веществ по методике ГФ XI для анализа листьев скумпии кожевенной. Разработана методика количественного определения дубильных веществ в листьях скумпии кожевенной методом спектрофотометрии в пересчете на танин. Проведена сравнительная оценка определения дубильных веществ в листьях скумпии кожевенной двумя методами: перманганатометрии и спектрофотометрии. Метод спектрофотометрии рекомендован для включения в современную нормативную документацию на данный вид сырья.**

**Ключевые слова:** дубильные вещества, листья скумпии кожевенной, перманганатометрия, спектрофотометрия.

## **APPLICATION OF VARIOUS METHODS WITH DETERMINING TANNINS IN LEAVES OF A SKUMPIYA TANNING (COTINUS COGGYGRIA SCOP.)**

**Gritsenko A.I., Gubanova L.B., Popova O.I.**

*Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute, branch GBOU VPO «Volgograd State Medical University», Pyatigorsk, e-mail: art.gritsenko@gmail.com*

**This article discusses the results of applications of various methods when determining tannins in leaves of a skumpiya tanning (CotinuscogygriaScop.). As object of research the dried-up samples of raw materials of leaves of a skumpiya tanning, the blossomings of a plant were prepared in 2014 in a phase on a southeast slope of the mountain Mashuk in the city Pyatigorsk of Stavropol Area. Quantitative definition of tannins by the SP XI technique for the analysis of leaves of a skumpiya tanning is carried out. The technique of quantitative definition of tannins in leaves of a skumpiya tanning by a spektrophotometry method in terms of tannin is developed. The comparative assessment of definition of tannins in leaves of a skumpiya tanning is carried out by two methods: permanganatometry and spektrophotometry. The method of a spektrophotometry is recommended for inclusion in modern regulating documentation for this type of raw materials.**

**Keywords:** tannins, leaves of skumpiya tanning, permanganatometry, spektrophotometry.

К группе дубильных веществ (ДВ) относятся вещества растительного происхождения, которые представляют собой сложные органические соединения, являющиеся производными многоатомных фенолов с разнообразной химической структурой, начиная от простейших производных полифенолов и заканчивая более сложными высокомолекулярными производными, так называемыми флобафенами и фlobатанинами. ДВ обладают вяжущим, противовоспалительным и кровоостанавливающим действием, поэтому поиск новых растительных источников ДВ, а также разработка и модификация методик их количественного определения в лекарственном растительном сырье (ЛРС) весьма актуальны [5,8].

В литературе имеется много сведений об определении ДВ в ЛРС методом перманганатометрии [4,5,7,10]. Метод Левенталя показал сравнительно хорошую

воспроизводимость. Однако он характеризуется некоторой завышенностью результатов, что обусловлено субъективностью определения конца титрования по появлению золотисто-желтой окраски; сильной зависимостью результатов от интенсивности перемешивания титруемого раствора и освещения; зависимостью расхода перманганата калия от скорости титрования; неприемлемостью применения единого пересчетного коэффициента для растительного сырья, содержащего танино-катехиновую смесь [9]. Физико-химические методы сейчас чаще всего включают в современную нормативную документацию (НД) на ЛРС. Метод спектрофотометрии основан на образовании окрашенных комплексов ДВ с железом-тарtratным реактивом [1,5]. Метод потенциометрического титрования позволяет не только оценить количественное содержание суммы дубильных веществ в ЛРС, но и дифференцировать конденсированные и гидролизуемые группы танинов [7]. Применение спектрофотометрического и потенциометрического методов выявило наибольшую сходимость результатов определения ДВ, причем с наименьшей погрешностью. Среди хроматографических методов высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) позволяет установить качественный и количественный состав отдельных компонентов [5]. Метод перманганатометрического титрования, включенный в Государственную Фармакопею (ГФ) X и XI изданий – метод Левенталя, измененный А.Л. Курсановым, основан на способности ДВ быстро окисляться в сильно разбавленном кислом растворе в присутствии индикатора индигосульфокислоты [3]. Однако, согласно данным литературы, наряду с ДВ происходит окисление и других групп биологически активных веществ (БАВ) – флавоноидов, витаминов, органических кислот, сахаров и др., что сильно завышает результаты определения. Метод Левенталя многие исследователи считают приблизительным, его можно использовать для полуколичественного определения, а также для предварительного знакомства с ЛРС. Кроме того, существующая НД на ЛРС скумпии кожевенной заметно устарела [2]. Таким образом, необходимо учитывать возможности физико-химических методов анализа при разработке дополнений и изменений существующих НД на ЛРС, содержащее ДВ.

**Цель** настоящей работы – разработка методики количественного определения дубильных веществ методом спектрофотометрии в листьях скумпии кожевенной, а также сравнительный анализ перманганатометрического определения по сравнению со спектрофотометрическим.

#### **Материал и методы**

Объектом исследования служили высушенные образцы сырья листьев скумпии кожевенной, заготовленные в 2014 году в фазу цветения растения на юго-восточном склоне горы Машук в городе Пятигорске Ставропольского края. Масса аналитической пробы для

анализа была отобрана в соответствии с ОФС 42-0013-03 «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб». Для извлечения суммы ДВ из ЛРС, согласно данным литературы, в качестве экстрагента чаще всего используют воду. Экспериментально установлены оптимальное соотношение ЛРС и экстрагента для извлечения ДВ – 2:250, а также наилучшее время экстракции, за которое будет извлекаться максимальное количество БАВ данной группы, – 30 мин (табл.1).

**Таблица 1**

Влияние соотношения «сырье-экстрагент» и времени экстракции на извлечение ДВ из листьев скумпии кожевенной

Соотношение «сырье – экстрагент», г/мл	Время экстракции, мин	Содержание ДВ*, %
2:200	20	23,23/25,47
2:250	25	29,41/27,70
2:300	30	21,47/29,16
2:400	35	16,47/28,01
2:500	40	14,62/26,74

*\*Примечание – через знак «/» приведены значения содержания дубильных веществ в зависимости от соотношения «сырье-экстрагент» и времени экстракции.*

В стандартной методике ГФ XI указано, что извлечение фильтруют после охлаждения. Однако, согласно правилам изготовления извлечений из ЛРС, содержащего ДВ, фильтрование проводят в горячем виде. ДВ хорошо растворимы в горячей воде и плохо в холодной, что может привести к выпадению их в осадок при охлаждении извлечения. Поэтому было проведено сравнение содержания ДВ в извлечении при фильтровании в горячем виде и после полного охлаждения (табл. 2). Данные показывают, что фильтрование извлечения необходимо проводить в горячем виде.

**Таблица 2**

Содержание ДВ в зависимости от способа фильтрования\*

Условия фильтрования	Содержание ДВ, %
Горячее извлечение	27,58
Охлажденное извлечение	23,02

*\*Примечание: в таблице представлено среднее значение 3-х определений.*

*Получение извлечения.* Точную навеску сырья (около 2 г), измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещали в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливали 250 мл кипящей воды очищенной и кипятили с обратным холодильником на электрической плите с закрытой спиралью в течение 30 минут при периодическом

перемешивании. Полученное извлечение процеживали через вату, не дожидаясь охлаждения, так, чтобы частицы сырья не попали в мерную колбу вместимостью 250 мл. Объем раствора в колбе довели до метки водой очищенной (раствор А).

*Определение методом перманганатометрии.* Аликвоту (раствор А) в количестве 25 мл переносили в коническую колбу вместимостью 750 мл, прибавляли 500 мл воды очищенной, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании 0,02М раствором калия перманганата до золотисто-желтого окрашивания.

Параллельно проводили контрольный опыт.

Содержание дубильных веществ (X,%) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X\% = \frac{(V_o - V_{к.о.}) \times K \times T \times W \times 100\% \times 100}{a \times V_a \times (100 - B)};$$

где  $V_o$  и  $V_{к.о.}$  – объемы титрованного раствора калия перманганата 0,02М, израсходованные на титрование в основном и контрольном опытах соответственно, мл;

$K$  – поправочный коэффициент титрованного раствора;

$T$  – титр 0,02М раствора калия перманганата по танину, г/мл;

$W$  – общий объем извлечения, полученный из взятой на анализ массы сырья, мл;

$a$  – масса навески сырья, взятая на анализ, г;

$V_a$  – аликвота извлечения, взятая для титрования, мл;

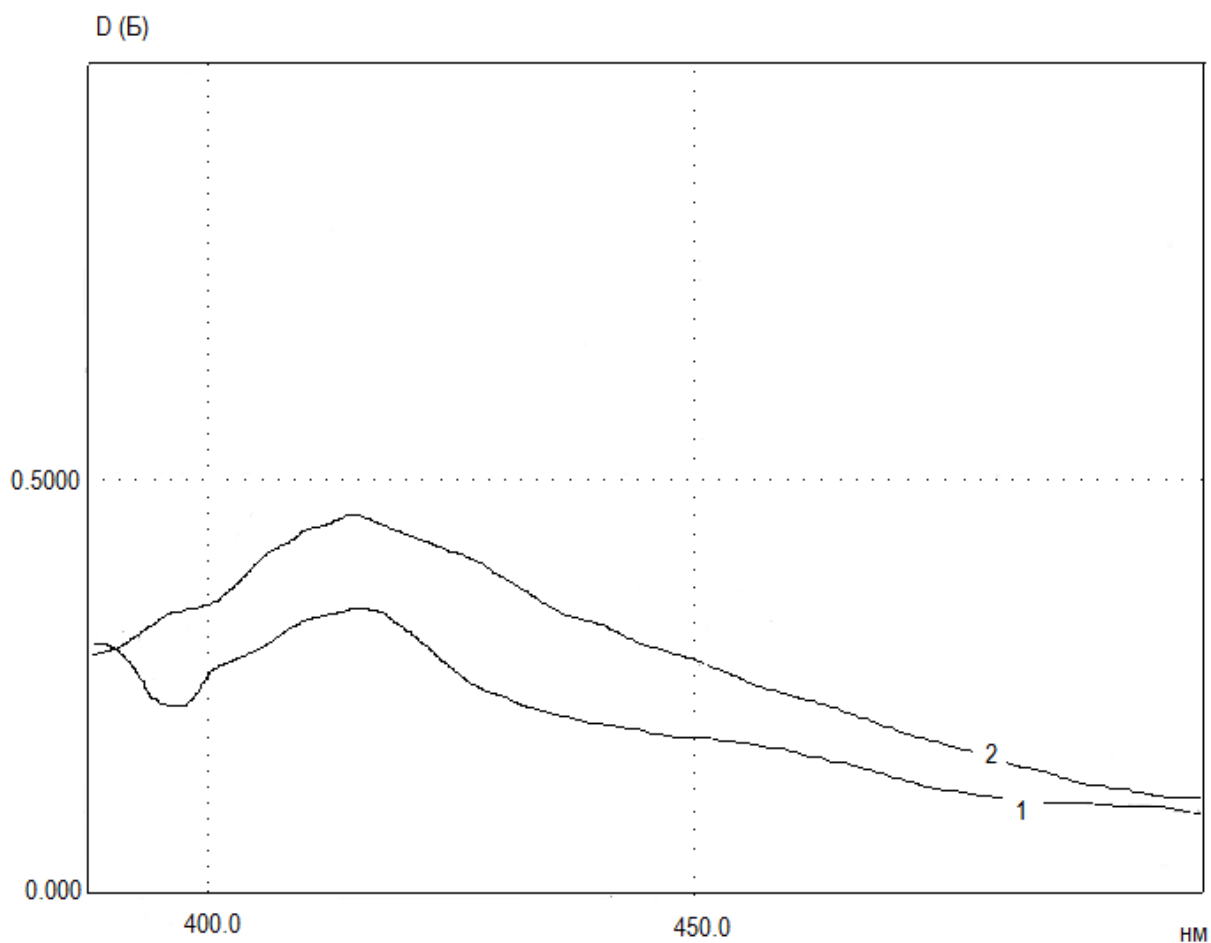
$B$  – влажность сырья, %.

Согласно современным представлениям, истинное содержание ДВ можно определить методом спектрофотометрии, в основе которого лежит измерение оптической плотности водного извлечения из ЛРС, после взаимодействия с 2 % водным раствором аммония молибдата при длине волны  $420 \pm 2$  нм. Аналогичный максимум отмечен для раствора стандартного образца (СО) танина в воде (рис. 1). Это дало возможность использовать длину волны  $420 \pm 2$  нм в качестве аналитической для разработки методики количественного определения ДВ в сырье методом спектрофотометрии.

*Методика определения дубильных веществ методом спектрофотометрии.* Около 15 мл извлечения (раствор А) центрифугировали в течение 5 минут при 3000 об/мин. 5 мл центрифугата переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 10 мл 2 % водного раствора аммония молибдата и содержимое колбы довели до метки водой очищенной. Через 15 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 420 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения

использовали раствор, состоящий из 5 мл центрифугата, доведенных водой очищенной до метки в мерной колбе вместимостью 100 мл.

На рисунке 1 приведены спектры поглощения растворов комплексов СО танина и извлечения из листьев скумпии кожевенной после реакции с аммония молибдатом.



*Рис.1. Спектры поглощения растворов комплексов СО танина (1) и извлечения из листьев скумпии кожевенной (2) после реакции с аммония молибдатом*

Содержание дубильных веществ (X,%) в пересчете на танин и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \times a_0 \times W_{x1} \times W_{x2} \times V_{a0} \times 100\% \times 100}{A_0 \times a_x \times V_{ax} \times W_{01} \times W_{02} \times (100 - B)}$$

где  $A_0$  и  $A_x$  – значения оптических плотностей растворов СО танина и анализируемого образца соответственно;

$a_0$  и  $a_x$  – массы навесок СО танина и листьев скумпии кожевенной соответственно, г;

$W_0$  и  $W_x$  – мерные колбы, использованные для разведения навесок СО танина и анализируемого образца соответственно, мл;

$V_{a0}$  и  $V_{ax}$  – аликвоты растворов СО и анализируемого образца соответственно, мл.

$B$  – влажность сырья.

*Приготовление СО танина:* 0,1 г СО танина (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяли в воде очищенной, после чего содержимое колбы доводили до метки тем же растворителем (раствор Б). Аликвоту в количестве 6 мл переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 10 мл 2 % водного раствора аммония молибдата и содержимое колбы доводили до метки водой очищенной. Через 15 минут измеряли светопоглощение полученного раствора при длине волны 420 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 6 мл раствора Б СО танина, доведенного водой очищенной до метки в мерной колбе вместимостью 100 мл.

### Результаты исследований и их обсуждение

Результаты определения ДВ в листьях скумпии кожевенной с использованием различных методик представлены в таблице 3, статистическая обработка экспериментальных данных – в таблице 4.

**Таблица 3**

Содержание ДВ в листьях скумпии кожевенной, определенное различными методами

Метод	Содержание суммы ДВ*, %
Перманганатометрия	28,28±0,81
Спектрофотометрия	19,77±0,35

\*Среднее значение 6 определений.

**Таблица 4**

Метрологическая характеристика методик определения дубильных веществ ( $p=95$  %,  $n=6$ )

Х <sub>ср</sub>	S <sub>хср</sub>	Δх	Х <sub>ср</sub> ±Δх	ε, %
Перманганатометрия				
28,275	0,3153	0,8104	28,28±0,81	2,86
Спектрофотометрия				
19,77	0,1360	0,3495	19,77±0,35	1,77

Обе методики валидированы по показателям «линейность» и «правильность», а также была проведена внутрилабораторная воспроизводимость. Анализируя химизм реакций и химический состав листьев скумпии кожевенной, мы пришли к выводу, что метод спектрофотометрии более избирателен по сравнению с титриметрическим методом и отличается большей достоверностью. Таким образом, для изучаемого ЛРС – листья скумпии кожевенной, целесообразно включить в проект НД метод спектрофотометрии для определения суммы ДВ в пересчете на танин.

## Выводы

1. Проведено количественное определение ДВ по методике ГФ XI для анализа листьев скумпии кожевенной. Установлены оптимальные параметры получения извлечения (соотношение сырья и экстрагента, время экстракции и фильтрация извлечения без охлаждения).
2. Разработана методика количественного определения дубильных веществ в листьях скумпии кожевенной методом спектрофотометрии в пересчете на танин.
3. Проведена сравнительная оценка определения ДВ в листьях скумпии кожевенной двумя методами: перманганатометрии и спектрофотометрии. По результатам исследования метод спектрофотометрии наиболее объективно отражает содержание ДВ в исследуемом сырье и рекомендован для включения в современную НД на данный вид сырья.

## Список литературы

1. Боровикова Н.А., Селезнев Н.Г., Попов Д.М. Спектрофотометрическое количественное определение дубильных веществ в коре дуба, соплодиях ольхи и в водных извлечениях из данного сырья // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. – 2010. – № 11. – С. 19-23.
2. ГОСТ 4564-79. Лист скумпии. Технические условия.
3. Государственная фармакопея. – XI изд. – М., 1987. – Вып. 1. – С. 286–287.
4. Гринько Е.Н. Обоснование выбора метода количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье // Здоровье и образование в XXI веке: сб. науч. тез. и ст. – М.: РУДН, 2010. – Т. 12, № 2. – С. 172-173.
5. Гринько Е.Н. Требования Российской и Европейской фармакопей к методикам определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье // Фармация. – 2010. – № 5. – С. 49-53.
6. Разаренова К.Н., Жохова Е.В. Сравнительная оценка содержания дубильных веществ в некоторых видах рода *Geranium*L. флоры Северо-запада // Химия растит. сырья. – 2011. – № 4. – С. 187-192.
7. Рудакова Ю.Г., Дмитриев А.Б., Попова О.И. Содержание дубильных веществ в спиртовом извлечении травы дубровника белого (*Teucrium polium*L.) и определение его антиоксидантной активности // Хим. растит. сырья. – 2014. – № 1. – С. 203-208.

8. Самылина И.А., Антонова Н.П., Рудакова И.П. Исследования по разработке фармакопейного метода определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье // Фармация. – 2009. – № 6. – С. 3-6.
9. Сравнение химико-аналитических методов определения танидов и антиоксидантной активности растительного сырья / Е.И. Рябинина, Е.Е. Зотова, Е.Н. Ветрова и др. // Аналитика и контроль. – 2011. – Т.15, № 2. – С. 202-208.
10. Тринеева О.В., Сливкин А.И. Применение различных методов при определении дубильных веществ в листьях крапивы // Фармация. – 2014. – № 1. – С. 16-20.

**Рецензенты:**

Коновалов Д.А., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии, зам. директора по НИР, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск;

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.