

УДК 615.322:582.682.4'6

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В КОРНЯХ ЩАВЕЛЯ КОНСКОГО МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В СРАВНЕНИИ С МЕТОДОМ ПЕРМАНГНАТОМЕТРИИ

© 2004 г. Н.А. Данилова, Д.М. Попов

*НИИ фармации ММА им. И.М. Сеченова*

В результате экспериментального исследования подобраны оптимальные условия экстракции дубильных веществ из корней щавеля конского. С помощью метода спектрофотометрии разработана методика количественного определения дубильных веществ в корнях щавеля конского. При сравнении результатов, полученных методом перманганометрии спектрофотометрии, установлено, что метод спектрофотометрии является наиболее точным.

В корнях щавеля конского дубильные вещества конденсированного типа, представленные эпикатехингаллатом, галлокатехинами, эпикатехином, катехингаллатом являются одними из основных действующих веществ (10-12%) [1,2,3,6,7].

В НД на корни щавеля конского (ВФС 42-1077-81) отсутствует методика количественного определения дубильных веществ.

В ГФХ, XI изд. (т.1) основным методом определения дубильных веществ является метод перманганатометрии (на все виды сырья, содержащие дубильные вещества). Но данная методика дает завышенные результаты, поскольку идет одновременное окисление различных веществ.

Поэтому возникает необходимость поиска нового метода и разработки методики количественного определения дубильных веществ в корнях щавеля конского, существенно отличающейся от предыдущих.

В настоящее время наиболее точным и эффективным, не требующим больших затрат времени, является спектрофотометрический метод определения, основанный на измерении оптической плотности окрашенных продуктов взаимодействия катехинов с железом-тарtratным реактивом в присутствии 0,1М фосфатного буфера с рН 8,2.

Таким образом, цель работы заключалась в разработке более перспективной методики количественного определения дубильных веществ в корнях щавеля конского с использованием спектрофотометрического метода.

В процессе работы была изучена цветная реакция, условия ее проведения для установления длины волны в максимуме поглощения, что является обязательным для разработки методики количественного определения дубильных веществ методом спектрофотометрии. Для разработки методики также

является обязательным определение устойчивости во времени образующихся цветных продуктов, определение с помощью калибровочного графика выполнения закона Ламберта-Бугера-Бера и, таким образом, установление возможности выбранной длины волны для количественного определения дубильных веществ в корнях щавеля конского.

В качестве стандарта выбрали кислоту галловую, которая по химическому строению является сходной с катехинами (конденсированными дубильными веществами) и является более доступной, чем катехины.

Калибровочная кривая зависимости между оптической плотностью продуктов взаимодействия кислоты галловой с железом-тарtratным реактивом в присутствии фосфатного буфера и концентрацией растворов кислоты галловой в интервале концентраций от 0,005 до 0,04 г/мл носит линейный характер.

Наименьшее определяемое количество кислоты галловой 0,05 мг/мл. Исследуемый максимум может применяться как аналитический, поскольку зависимость оптической плотности, измеренной при длине волны 545 нм от концентрации кислоты галловой в растворе подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера.

Спектрофотометрический контроль показал, что спектры поглощения продуктов реакции дубильных веществ и раствора кислоты галловой с железом-тарtratным реактивом в присутствии фосфатного буфера практически совпадают, максимум наблюдается при длине волны 545 нм, что позволяет определять дубильные вещества с использованием метода спектрофотометрии (рис.1).

Спектры поглощения продуктов взаимодействия раствора кислоты галловой и водного извлечения из корней щавеля конского с железом-тарtratным реактивом в присутствии фосфатного буфера.

Большинство из описанных методов определения ка-

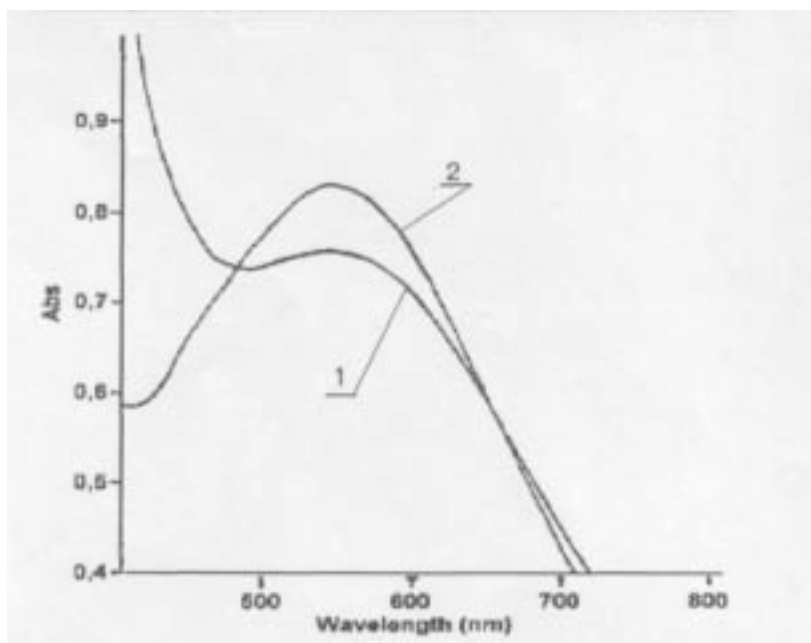


Рис. 1. Спектры поглощения: 1- водное извлечение из корней шавеля конского; 2- водный раствор кислоты галловой.

техинов включает хроматографическое разделение экстрактов анализируемых образцов с применением для идентификации и последующей количественной оценки образцов индивидуальных катехинов, выделяемых препаративно в лабораторных условиях. Такие методы трудоемки, а получаемые результаты не всегда воспроизводимы вследствие легкой окисляемости катехинов [5].

В нашем эксперименте исследовали возможность определения суммы катехинов по известной реакции фенольных оксигрупп с железом-тарtratoм реактивом. Реакция достаточно специфична, так как примеси нефенольной природы с железом-тарtratoм комплексом не реагируют.

За основу разрабатываемой методики взят спектрофотометрический метод количественного определения комплекса катехинов в фармацевтических препаратах из листьев чая [5].

При подборе оптимальных условий экстракции дубильных веществ из корней шавеля конского изу-

чались следующие факторы: тип экстрагента, измельченность сырья, условия нагревания, время экстрагирования, соотношение сырья и экстрагента, кратность экстракции.

При установлении типа экстрагента исследовали воду и этанол различных концентраций (20 %, 40 %, 50 %, 70 %, 96 %) (табл.1).

По данным табл.1 наиболее полное извлечение дубильных веществ из сырья происходит при использовании в качестве экстрагента воды.

При выборе оптимальной степени измельченности сырья использовали сита с диаметром отверстий 0,5 мм; 1 мм; 2 мм; 3 мм (табл.2).

Исходя из данных табл.2, видно, что максимальное извлечение дубильных веществ из корней шавеля конского достигается при использовании сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм.

При изучении оптимальной температуры экстрак-

Таблица 1

Зависимость извлечения дубильных веществ из корней шавеля

Тип экстрагента	Содержание дубильных веществ, %				
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4	Серия 5
Вода	6,9	5,4	6,1	6,7	7,5
Этанол 20%	6,5	4,7	5,7	5,6	6,9
Этанол 40%	6,2	4,5	4,4	4,9	6,2
Этанол 50%	5,7	4,2	4,0	4,2	5,7
Этанол 70%	5,4	3,1	3,3	3,1	5,1
Этанол 96%	3,2	2,5	2,9	1,8	4,3

Таблица 2

**Зависимость извлечения дубильных веществ из корней щавеля**

Измельченность сырья, мм	Содержание дубильных веществ, %				
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4	Серия 5
0,5	4,7	2,1	2,8	2,5	4,3
1,0	5,0	2,6	3,2	3,7	4,9
2,0	5,9	3,7	4,7	5,2	6,1
3,0	1,3	2,0	1,9	1,5	2,2

Таблица 3

**Зависимость извлечения дубильных веществ из корней щавеля**

Температурный режим экстрагирования	Содержание дубильных веществ, %				
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4	Серия 5
Водяная баня, Температура 100°C	6,10	5,30	3,80	6,60	6,90
Огонь	4,40	4,10	1,60	4,50	5,50
Без нагревания	1,70	1,05	0,62	2,10	1,30

Таблица 4

**Зависимость извлечения дубильных веществ из корней щавеля конского от времени экстрагирования**

Время экстрагирования, мин.	Содержание дубильных веществ, %				
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4	Серия 5
15	4,2	3,9	5,9	4,7	4,6
30	3,3	2,2	4,4	3,6	1,6
45	4,5	2,6	5,2	4,3	2,8
60	3,9	1,7	6,3	4,6	4,6

Таблица 5

**Зависимость извлечения дубильных веществ из корней щавеля**

Соотношение сырья и экстрагента	Содержание дубильных веществ, %				
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4	Серия 5
0,1:100	3,9	2,8	3,1	4,8	3,7
0,5:100	4,2	3,5	4,2	5,6	3,7
1,0:100	4,4	4,8	5,5	5,9	5,4

ции использовали следующие режимы: извлечение на кипящей водяной бане, огне, без нагревания (перемешивание) (табл.3).

Результаты исследований показали, что оптимальное извлечение дубильных веществ достигается

ся при нагревании на кипящей водяной бане.

При установлении оптимального времени экстракции проводили извлечение из сырья в течение 15 мин., 30 мин., 45 мин., 60 мин.

Для наиболее полного извлечения дубильных веществ из корней щавеля конского целесообразно использовать экстракцию в течение 15 мин. (табл.4).

При выборе соотношения сырья и экстрагента изучены следующие варианты: 0,1:100; 0,5:100; 1:100.

Оптимальное извлечение дубильных веществ достигается при соотношении сырья и экстрагента 1,0:100 (табл.5).

Затем проводили изучение полноты извлечения дубильных веществ из сырья щавеля конского в зависимости от кратности экстракции. Учитывали ранее определенные факторы: экстрагент-вода, измельчение - до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, нагревание на кипящей водяной бане, время нагревания 15 мин., соотношение сырья и экстрагента 1,0:100. Экспериментом установлено, что наиболее полное извлечение дубильных веществ из сырья происходит при использовании трехкратной экстракции.

С целью проверки полученных результатов проводили исследование шротов корней, оставшихся после экстракции, методом ТСХ. В шротах, оставшихся после проведения однократной и двукратной экстракций, были обнаружены дубильные вещества, что доказывает их неполное извлечение из сырья. В шротах, оставшихся после проведения трехкратной и четырехкратной экстракции, дубильные вещества не обнаружены. Таким образом, доказана целесообразность проведения трехкратной экстракции дубильных веществ из корней щавеля конского.

**МЕТОДИКА**

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляют 100 мл воды и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 200 мл. Промывают вату с сырьем два раза по 20 мл, доводят в колбе водой до метки, перемешивают. Затем фильтруют через бумажный фильтр (раствор А).

К 10 мл раствора А прибавляют 0,5 мл 10% свинца ацетата, перемешивают, оставляют на 5 мин. Затем добавляют 1 мл 5% раствора натрия гидрофосфата, перемешивают, оставляют на 5 мин. Фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу, вместимостью 50 мл, промывают остаток на фильтре 5 мл воды (раствор Б).

Около 0,02 г кислоты галловой (точная навеска) растворяют в 50 мл горячей воды в мерной колбе вместимостью 100 мл. Доводят водой до метки, перемешивают (раствор стандарта).

В три мерные колбы вместимостью 50 мл помещают по 10 мл раствора А, раствора стандарта, воды. В каждую из трех колб, а также в мерную колбу с раствором Б добавляют по 5 мл фосфатного буфера и 12,5 мл железо-тарtratного реактива, доводят водой до меток, перемешивают.

В результате получают следующие растворы: в первой колбе анализируемый раствор, во второй колбе – стандартный раствор кислоты галловой, в третьей колбе – раствор сравнения 1, в четвертой колбе – раствор сравнения 2.

Измеряют оптическую плотность анализируемого раствора относительно раствора сравнения 2 и стандартного раствора относительно раствора сравнения 1 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 545 нм.

Процентное содержание дубильных веществ рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times m_{\text{ст}} \times 200 \times 50 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 25 \times 200 \times (100 - W)} = \frac{D \times m_{\text{ст}} \times 20000}{D_0 \times m \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность анализируемого раствора; D<sub>0</sub> – оптическая плотность стандартного раствора, равная 0,3505; m<sub>ст</sub> – масса стандартного раствора, г; m – масса навески сырья, г; W – потеря в массе сырья при высушивании; 20000 – разведения.

Метод перманганатометрии являлся традиционным для количественного определения дубильных веществ, но он имеет ряд недостатков: способность калия перманганата окислять многие природные соединения, относящиеся к различным классам по химическому строению, различный пересчетный коэффициент для разных групп соединений, растянутость перехода окраски раствора при титровании [4].

Таблица 6

**Результаты определения содержания дубильных веществ в корнях**

№ образца	Состояние сырья		Содержание дубильных веществ, %
		Спектрофотометрия	Метод перманганатометрии
1	цельное	5,5	10,2
2	цельное	5,0	11,7
3	цельное	6,9	10,5
4	цельное	7,5	12,1

Таким образом, данный метод не позволяет объективно оценить содержание дубильных веществ в корнях щавеля конского, особенно при содержании менее 10%. Значительно возрастает ошибка определения за счет сопутствующих веществ [4].

Данные перманганатометрического определения представлены в табл.6.

Таким образом, на основании полученных данных установлено, что метод спектрофотометрии является наиболее оптимальным, поскольку возможно более точное определение дубильных веществ в сырье щавеля конского.

## ВЫВОДЫ

1. В процессе эксперимента изучены условия экстракции дубильных веществ из корней щавеля конского, подобраны оптимальные условия экстракции дубильных веществ из данного сырья.
2. Разработана методика количественного определения дубильных веществ в корнях щавеля конского методом спектрофотометрии.
3. При сравнении результатов, полученных методом перманганатометрии и спектрофотометрии, определено, что метод спектрофотометрии является наиболее точным.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас лекарственных растений СССР/ Под ред. акад. Цицина и др. – М., 1962. – С.343-344.
2. Акопов И.Э. Важнейшие отечественные лекарственные растения и их применение. – М., 1986. – С.201.
3. Багрий А.К. Полифенольные соединения некоторых видов щавелей // Дисс. на соиск. уч. ст. канд. фарм. наук. – М., 1965. – С.47-55.
4. Гончаров Н.Ф. Фармакогностическое изучение лапчатки серебристой, лапчатки гусиной, лапчатки прямостоячей // Дисс. на соиск. уч. ст. канд. фарм. наук. – Курск, 1990. – С.65-70.
5. А.Я.Цейтина, М.Б.Жданова, Э.А.Петрова. Определение комплекса катехинов в фармацевтических препаратах из листьев чая // Фармация. - №1, 1971. - С.50-51.
6. Шмид О.И. Природные дубильные вещества / Биохимические методы анализа растений. - М., 1960. – С.239.
7. Шпанько Д.Н. Влияние антропогенных факторов на элементный состав лекарственных растений Кемеровской области, содержащих дубильные вещества // Дисс. на соиск. уч. ст. канд. фарм. наук, 1998. – С. 30.