



УДК 615. 322: 582.929.4

ИЗУЧЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН ФЛОРЫ СРЕДНЕЙ ПОЛОСЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ**THE STUDY OF TANNING AGENTS OF PLANTS OF THYMUS GENUS OF EUROPEAN RUSSIA MIDLAND FLORA****В.Н. Бубенчикова¹, Ю.А. Старчак²
V.N. Bubenchikova¹, Yu.A. Starchak²**¹Курский государственный медицинский университет
305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3²Орловский государственный университет, медицинского институт
302026, г. Орел, ул. Комсомольская, 95,¹Kursk State Medical University,
305041, Kursk, Karl Marx Str., 3²Oryol State University Medical Institute
302026, Orel, Komsomolskaya str., 95

e-mail: fg.ksmu@mail.ru

e-mail: yuliya-starchak@yandex.ru

Ключевые слова: дубильные вещества, тимьян, качественный состав, перманганатометрия, комплексонометрия.

Key words: tanning agents, Thymus, qualitative composition, permanganatometry, trilonometry.

Резюме. В статье приведены данные по изучению дубильных веществ растений рода тимьян флоры средней полосы Европейской части России, которые в растениях данного рода практически не изучены. Качественными реакциями установлено наличие дубильных веществ преимущественно конденсированной группы. Определены оптимальные условия экстракции дубильных веществ: степень измельчения сырья 2 мм, экстрагент – спирт этиловый 40%, экстракция до наступления равновесия, время экстракции – 45 минут. Содержание дубильных веществ определяли двумя методами: перманганатометрическим и комплексонометрическим. Содержание дубильных веществ, определенных перманганатометрическим методом колеблется от 12.04±0.20% (тимьян двуликий) до 22.68±0.30% (тимьян блошиный), а комплексонометрическим методом от 6.54±0.15% (тимьян двуликий) до 11.15±0.48% (тимьян ползучий). Установлено, что комплексонометрический метод является более точным по сравнению с перманганатометрическим.

Summary. The article presents the data about the studying of tannins of the Thymus genus plants of a midland flora of European Russia, which are virtually unknown in plants of this kind. Qualitative tests revealed the presence of condensed group tannins mainly. The optimal conditions for extraction of tannins: fineness of raw materials is 2 mm, extractant is an ethyl alcohol 40%, the extraction time is 45 minutes, to the extraction equilibrium. The content of tannins was determined by two methods: permanganatometry and chelatometry. The content of tannins, which were determined by permanganatometry, ranges from 12.04±0.20% (Thymus dimorphus) to 22.68±0.30% (Thymus pulegioides) and by the complexometric method is from 6.54±0.15% (Thymus dimorphus) to 11.15±0.48% (Thymus serpyllum). It was determined that chelatometric method is more accurate than permanganatometric one.

Введение

Во флоре средней полосы Европейской части России произрастает 7-8 видов из рода тимьян [Маевский П.Ф., 2006], среди которых в официальной медицине используется только тимьян ползучий в качестве отхаркивающего, противовоспалительного и противомикробного средства [Государственная фармакопея СССР, 1990]. Однако, запасы тимьяна ползучего на данной территории, особенно в областях Центрального Черноземья истощены, он встречается единично. В связи с чем, при заготовке сырья чабреца заготовители, как правило, не различают виды, т.к. они трудно дифференцируются и поэтому растительное сырьё зачастую представлено другими видами или их сочетанием. Однако, химический состав других видов рода тимьян изучен не достаточно, сведения о содержании в них биологически активных веществ носят фрагментарный характер, не обоснована их возможность использования в официальной медицине. Фармакологическая активность травы тимьяна ползучего связана с присутствием различных классов биологически активных веществ: эфирного масла, тритерпеновых соединений, фенольных соединений [Растительные ресурсы России, 2011]. Среди фенольных соединений интерес представляют дубильные вещества, обладающие



противовоспалительной и антимикробной активностями, которые в растениях рода тимьян практически не изучены.

Цель работы

Целью работы явилось установление наличия дубильных веществ и их количественного содержания в траве растений рода тимьян флоры Средней полосы Европейской части России.

Материалы и методы

Объекты исследования: трава тимьяна ползучего, тимьяна блошиного, тимьяна Маршалла, тимьяна мелового, тимьяна Палласа, тимьяна двуликого, тимьяна Черняева, заготовленные в Курской, Орловской, Белгородской, Брянской и Воронежской областях в 2011-2014 годах в период массового цветения растений.

Методы исследования. Для качественного определения дубильных веществ готовили водные извлечения из травы растений рода тимьян в соотношении 1:10. Качественное определение дубильных веществ проводили реакциями с желатиной, с бромной водой, формальдегидом и кислотой хлористоводородной, с железом-аммонийными квасцами [Лекарственные растения государственной фармакопеи, 2003; Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А., 2008].

Для количественного определения дубильных веществ использовали 2 метода: фармакопейный - перманганатометрический и комплексонометрический [Государственные стандарты союза ССР, 1980; Государственная фармакопея СССР, 1987].

Результаты исследования

При проведении качественных реакций наблюдали помутнение при добавлении к водным извлечениям по каплям свежеприготовленного раствора желатины 1% и раствора кислоты хлористоводородной 10%; образование кирпично-красных осадков с раствором формальдегида и кислоты хлористоводородной; образование осадка с бромной водой; образование чёрно-зелёного окрашивания с 1% раствором железом-аммонийных квасцов, что свидетельствует о наличии в траве изучаемых растений рода тимьян дубильных веществ преимущественно конденсированной группы.

На первом этапе количественного определения дубильных веществ использовали перманганатометрический метод. При этом нами было установлено, что их содержание в траве растений рода тимьян колеблется от $12.04 \pm 0.26\%$ (тимьян двуликий) до $22.68 \pm 0.30\%$ (тимьян блошиный) (таблица 4).

Однако, фармакопейный метод не позволяет объективно оценивать содержание дубильных веществ в лекарственном растительном сырье, особенно при содержании около 10% и менее, так как значительно возрастает ошибка за счёт способности калия перманганата окислять и другие биологически активные вещества, содержащиеся в траве растений рода тимьян и относящиеся по химическому строению к различным классам биологически активных веществ. На точность результатов влияет также пересчётный коэффициент, различный для разных групп фенольных соединений и растений, нечёткий переход окраски при титровании, степень разведения титруемых растворов и т.д. Поэтому для объективной оценки качества сырья растений рода тимьян по содержанию дубильных веществ нами использован и комплексонометрический метод [Государственные стандарты союза ССР, 1980]. Выбор этого метода обоснован тем, что он позволяет проводить определение дубильных веществ в присутствии полифенольных и других сопутствующих веществ. Данный метод основан на способности дубильных веществ осаждаться солями тяжёлых металлов. Он заключается в том, что дубильные вещества осаждаются цинком аммиачным раствором, далее осадок выделяется центрифугированием, комплекс цинк – дубильные вещества разрушается кислотой с последующим титрованием выделившихся катионов цинка раствором трилона Б в присутствии индикатора ксиленового оранжевого [Государственные стандарты союза ССР, 1980].

Определение оптимальных условий экстракции дубильных веществ проводили на одном образце тимьяна Маршалла, как наиболее распространённого в областях Средней полосы Европейской части России в сравнении двумя методами: перманганатометрическим и комплексонометрическим.



При этом изучены следующие стадии: экстрагирование суммы дубильных веществ, очистка полученного комплекса цинк-дубильные вещества.

Наиболее продолжительной стадией при количественном анализе дубильных веществ является их количественная экстракция. Данный процесс зависит от ряда факторов, в частности, от измельченности сырья, времени экстракции, температуры экстракции, типа растворителя, соотношения сырьё-растворитель [Пономарев В.Д., 1978].

Измельченность сырья оказывает большое влияние на процесс экстрагирования. Проведенные нами исследования по изучению влияния степени измельченности сырья на количественную экстракцию дубильных веществ показали, что максимальное извлечение дубильных веществ из травы тимьяна ползучего достигается при степени измельчения сырья 2.0 мм (табл. 1).

Таблица 1
Table 1

**Зависимость выхода дубильных веществ от величины измельченности
травы тимьяна Маршалла**
Dependence of the output tannins on the size of of crushed herbs Thimus Marschallianus Willd

Степень измельченности сырья, мм	Содержание суммы дубильных веществ, %	
	Комплексонометрический метод	Перманганатометрический метод
1	8.33	12.59
2	13.62	15.04
3	8.19	10.68

Для экстрагирования суммы дубильных веществ из растительного сырья в литературе описано применение кипящей воды очищенной и спирто-водных растворов [Государственные стандарты союза ССР, 1980; Государственная фармакопея СССР, 1987]. Нами проведено изучение оптимального экстрагента для извлечения суммы дубильных веществ. Из таблицы 2 видно, что оптимальным растворителем, обеспечивающим максимальный выход суммы флавоноидов, является спирт этиловый 40%.

Для извлечения суммы дубильных веществ нами использована экстракция с нагреванием на кипящей водяной бане до наступления равновесия, которое в данном случае наступает через 45 минут при соотношении сырьё-растворитель 2:250 (табл. 3).

Таблица 2
Table 2

**Влияние экстрагента на полноту экстракции дубильных веществ
из травы тимьяна Маршалла**
**Influence of on the completeness of extraction of extracting tannins from the herb Thimus
Marschallianus Willd**

Экстрагент	Содержание суммы дубильных веществ, %	
	Комплексонометрический метод	Перманганатометрический метод
Вода	11.20	12.50
Спирт этиловый 20%	12.63	13.67
Спирт этиловый 30%	12.85	14.01
Спирт этиловый 40%	13.62	15.04
Спирт этиловый 50%	12.09	13.33
Спирт этиловый 70%	6.53	12.03
Спирт этиловый 90%	4.47	9.53

Таблица 3
Table 3

**Влияние времени экстракции на полноту измельчения дубильных
веществ из травы тимьяна Маршалла**
**Influence of extraction time on the completeness grinding tannins from the herb
Thimus Marschallianus Willd.**

Время экстракции	Содержание суммы дубильных веществ, %	
	Комплексонометрический метод	Перманганатометрический метод
30 минут	8.39	9.69
45 минут	13.62	15.04
60 минут	9.34	10.70



Описанные выше исследования позволили разработать методику количественного определения дубильных веществ в траве растений рода тимьян.

Методика количественного определения дубильных веществ в траве растений рода тимьян

Аналитическую пробу сырья, измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 2.0 (точная навеска) измельчённого сырья, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 250 мл спирта этилового 40%, колбу взвешивают с погрешностью ±0.01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 минут, периодически смывая частицы сырья со стенок колбы встряхивая смеси. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 40%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

10 мл извлечения помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл реактива осаждения (раствор цинка оксида 1% в аммиачном буферном растворе), смесь перемешивают стеклянной палочкой, палочку промывают 5 мл воды очищенной, которую присоединяют к основной смеси. Через 30 минут смесь центрифугируют в течение 5-10 минут с частотой вращения 5-6 тысяч об/мин, жидкость с осадка сливают, осадок в пробирке взмучивают в 20 мл раствора аммиака 0.25%, присоединяя его к центрифугируемой смеси. После центрифугирования промывную жидкость сливают и отбрасывают. Осадок в пробирке промывают 20 мл спирта этилового 96%, растворяют в 3 мл раствора кислоты уксусной 30%. Раствор количественно переносят в колбу вместимостью 250 мл с помощью 100 мл воды очищенной, жидкость нейтрализуют 25 мл раствора натрия гидрокарбоната 5%, прибавляют 0.5 мл раствора ксиленового оранжевого и титруют раствором трилона Б 0.01М до изменения красно-фиолетовой окраски раствора в желтую (1 мл раствора трилона Б 0.01 М соответствует 0.0013 г танина).

Содержание дубильных веществ в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times k \times 0,0013 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 10 \times (100 - W)}$$

где:

V – объём раствора трилона Б, израсходованного на титрование, в миллилитрах;

K – поправка к титру раствора трилона Б 0,01 М;

m – навеска сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Примечание:

1) Приготовление реактива осаждения 1 г оксида цинка, взвешивают с точностью до 0.01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в смеси 10 мл водного аммиака 25% с 2.5 г аммония хлорида и доводят объём раствора водой очищенной до метки.

2) Приготовление раствора трилона Б 0.01 М. 3.9 г трилона Б, взвешенного с точностью до 0.01 г, растворяют в 250 мл воды очищенной, фильтруют в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой очищенной до метки. Титр полученного раствора устанавливают по 0.01 М раствора цинка.

Разработанной методикой проанализированы различные образцы растений рода тимьян в сравнении с методом перманганатометрии (табл. 4).

Таблица 4

Table 4

Содержание дубильных веществ в растениях рода тимьян
The content of tannins in the plant genus thyme

Растение, время и место сбора	Содержание дубильных веществ, %	
	Перманганатометрический метод	Комплексонометрический метод
1	2	3
Тимьян Палласа Белгородская обл. 2012 г.	14.70±0.59	9.50±0.39
Тимьян меловой Белгородская обл. 2011 г.	13.70±0.59	7.60±0.28
Тимьян ползучий	16.02±0.72	11.15±0.48



Продолжение таблицы 4

Тимьян блошинный Брянская обл. 20 г.	22.68±0.30	9.10±0.10
Тимьян Маршалла Белгородская обл. 2011 г.	14.00±0.34	8.50±0.02
Тимьян двуликий Курская обл. 2013г.	12.04±0.20	6.54±0.15
Тимьян Черняева Курская обл. 2014г.	12.37±0.22	9.34±0.24

Содержание дубильных веществ, определённое двумя методами показало, что наибольшее содержание дубильных веществ было определено перманганатометрическим методом (12.04%-22.68%), а комплексонометрический метод по сравнению с перманганатометрическим даёт результаты почти в 2 раза ниже (6.54%-11.15%). Указанное расхождение результатов анализа двумя методами можно объяснить различной избирательностью этих методов к дубильным веществам в смеси с сопутствующими веществами. Для того, чтобы показать, что комплексонометрический метод является более объективным в определении дубильных веществ по отношению к перманганатометрическому, нами было проведено титрование раствором перманганата калия фильтров травы тимьяна Маршалла, полученных после осаждения и отделения дубильных веществ реактивом осаждения. В результате титрования в фильтрате найдено 3.52 % веществ, не осаждаемых реактивом осаждения. Далее, было интересным исследовать состав центрифугатов после осаждения дубильных веществ в методе комплексонометрии. Получение центрифугаты нейтрализовали кислотой серной до слабокислой реакции и экстрагировали их этилацетатом. Полученные этилацетатные извлечения и исходные извлечения хроматографировали на бумаге и тонких слоях сорбента в различных системах растворителей. Хроматографический анализ подтвердил, что фенольные соединения (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины) остаются в центрифугах данный метод позволяет определять дубильные вещества в присутствии других фенольных соединений.

Выводы

1. Проведено изучение дубильных веществ растений рода тимьян Флоры средней полосы Европейской части России. Установлено наличие дубильных веществ преимущественно конденсированной группы.
2. Количественное определение дубильных веществ проведено двумя методами: перманганатометрическим и комплексонометрическим. Установлено, что комплексонометрический метод является более точным по сравнению с перманганатометрическим. Содержание дубильных веществ, определенных комплексонометрическим методом колеблется от 6.54±0.15% (тимьян двуликий) до 11.15±0.48% (тимьян ползучий). Данные результаты позволяют рекомендовать комплексонометрический метод для определения дубильных в траве растений рода тимьян.

Литература

- Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. 2008. Фенольные соединения и полисахариды подмаренника цепкого *Galium aparine* L.). Человек и его здоровье, 3: 117-121.
- Буданцев А.Л. 2011. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 4. Семейства *Caryophyllaceae* – *Lobeliaceae*. СПб.- М., Изд-во Товарищество научных изданий КМК, 630.
- Государственная фармакопея СССР. 1987. Вып. 1. Общие методы анализа. МЗ СССР, 11-е изд., доп. М., Изд-во Медицина, 336.
- Государственная фармакопея СССР. 1990. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. МЗ СССР, 11-е изд., доп. М., Изд-во Медицина, 400.
- Государственные стандарты союза ССР. 1980. Лекарственное растительное сырье. Москва, Изд-во стандартов, 42-56.
- Самылиной И.А., Северцева В.А. 2003. Лекарственные растения Государственной фармакопеи. Фармакогнозия. М. С, 534.
- Маевский П.Ф. 2006. Флора средней полосы европейской части России. М., Товарищество научных изданий КМК. С, 600.
- Пономарев В.Д. 1978. Экстрагирование лекарственного растительного сырья. М., Медицина. С, 204.



Literature

Bubenchikova V.N., Starchak Y.A. 2008. Fenol'nye soedinenija i polisaharidy podmarennika cepkogo (*Galium aparine* L.). [Phenolic compounds and polysaccharides catchweed bedstraw (*Galium aparine* L.)], *Chelovek i ego zdorov'e*, 3: 117-121. (in Russian).

Budantsev A.L. 2011. Rastitel'nye resursy Rossii: Dikorastushhie cvetkovye rastenija, ih komponentnyj sostav i biologicheskaja aktivnost'. T. 4. Semejstva Caprifoliaceae - Lobeliaceae. [Plant Resources of Russia: Wild flowering plants, their composition and biological activity. T. 4. Family Caprifoliaceae - Lobeliaceae.]. St.-Petersburg-Moscow, *Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK*, 630. (in Russian).

Gosudarstvennaja farmakopeja SSSR. 1987. Vyp. 1. Obshhie metody analiza. [The State pharmacopoeia of the USSR. 1987. Vol. 1. General methods of analysis.] *MZ SSSR*, 11th ed., enlarged Moscow, *Medicina*, 336. (in Russian).

Gosudarstvennaja farmakopeja SSSR. 1990. Vyp. 2. Obshhie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. [The State pharmacopoeia of the USSR. 1990. Vol. 2. General methods of analysis. Medicinal herbs.] *MZ SSSR*, 11th ed., enlarged Moscow, *Medicina*, 400.

Gosudarstvennye standarty sojuza SSR. 1980. Lekars(tvennoe rastitel'noe syr'e. [State standards of the USSR. Medicinal herbs.] 1980. Moscow, *izdatel'stvo standartov*, 42-56. (in Russian).

Samylina I.A., Severtsev V.A. 2003. Lekarstvennye rastenija Gosudarstvennoj farmakopei. Farmakognozija. [Medicinal plants of the State Pharmacopoeia. Pharmacognosy.]. Moscow, 534. (in Russian).

Majewski P.F. 2006. Flora srednej polosy evropejskoj chasti Rossii. [Flora of middle belt of the European part of Russia.]. Moscow, *Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK*, 600. (in Russian).

Ponomarev V.D. 1978. Jekstragirovanie lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ja. [Extraction of medicinal plants.]. Moscow, *Medicina*, 204. (in Russian).