

УДК 582.998.1:543.422.3:54.062

**О СОДЕРЖАНИИ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В СОЦВЕТИЯХ
БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЁРТЫХ****ABOUT THE CONTENT OF TANNINS IN INFLORESCENCES
OF TAGETES PATULA L.****Н.М. Червонная, О.А. Андреева, И.И. Харченко
N.M. Chervonnaya, O.A. Andreeva, I.I. Harchenko***Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России
Россия, 357532, г. Пятигорск, проспект Калинина, 11**Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a branch of the Volgograd State Medical University
Russia, 357532, Pyatigorsk, Kalinin Av., 11**E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru*

Аннотация. Методом ВЭЖХ установлено наличие танина, галловой кислоты и ЭГКГаллата в соцветиях бархатцев распростёртых. С помощью качественных реакций выявлена локализация этих веществ в обёртках соцветий. Количественное содержание дубильных веществ в водном и 40%-ном спиртовом извлечении определяли перманганатометрически (метод 1) и спектрофотометрически (метод 2). Расчёты показывают, что в водном извлечении их содержание составляет $0.45 \pm 0.02\%$ (метод 1) и $0.18 \pm 0.01\%$ в пересчёте на галловую кислоту (метод 2), а в 40%-ном спиртовом извлечении – $0.7 \pm 0.03\%$ и $0.32 \pm 0.01\%$ соответственно.

Resume. By using HPLC we have established the presence of tannin, gallic acid, and epigallocatechin gallate in *Tagetes patula* L. inflorescences. With the use of qualitative responses we have revealed the localization of these substances in spathes. Qualitative content of tannins in water and 40% alcohol extracts was determined by using permanganometry (method 1) and spectrophotometry (method 2). The calculations showed that their content in water extract amounted to $0.45 \pm 0.02\%$ (method 1) and $0.18 \pm 0.01\%$ in terms of gallic acid (method 2), and the content in 40% alcohol extract amounted to $0.7 \pm 0.03\%$ and $0.32 \pm 0.01\%$ respectively.

Ключевые слова: бархатцы распростёртые, дубильные вещества, количественное определение, перманганатометрический метод, спектрофотометрический метод.

Keywords: *Tagetes patula* L. (Asteraceae), tannins, quantitative determination, permanganometry, spectrophotometry.

Введение

Бархатцы распростёртые – *Tagetes patula* L. (Asteraceae) – декоративные растения, широко распространённые на Северном Кавказе, отвары из цветков издавна применяются в народной медицине при лечении некоторых заболеваний [Василенко, 1990]. Изучение биологической активности различных субстанций, выделенных из соцветий, показало их способность стимулировать и нормализовать процессы желчеобразования и желчевыделения [Терехов, 2006], влиять на систему глутатиона, и, следовательно, восстанавливать антиоксидантные и детоксикационные процессы в клетках желудка [Папаяни, 2012]. Перечисленные виды биологической активности, в первую очередь, связывают с флавоноидами и фенолокислотами, которые присутствуют в изученных объектах [Терехов, 2006; Папаяни, 2012]. Определённый вклад в фармакологическую активность этих субстанций, безусловно, могут вносить и другие вещества, входящие в их состав.

Цель

Целью данного исследования явилось изучение количественного содержания дубильных веществ в соцветиях бархатцев распростёртых.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования нами использованы соцветия бархатцев распростёртых, собранные в сентябре 2015 года в ботаническом саду.

Наличие в сырье дубильных веществ определяли методом ВЭЖХ.



С этой целью использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф фирмы “GILSTON”, модель 305, ФРАНЦИЯ; инжектор ручной, модель RHEODYNE 7125 USA. Неподвижной фазой явилась металлическая колонка размером 4,6х250 мм KROMASIL C18, размер частиц 5 микрон, а подвижной – система: метанол-вода-фосфорная кислота концентрированная, в соотношении 400:600:5. Скорость подачи элюента 0,8 мл\мин. Детектирование осуществляли с помощью УФ-детектора “GILSTON” UV/VIS модель 151, при длине волны 254 нм. Для компьютерной обработки результатов была применена программа Мультихром для “Windows”.

Соцветия *Tagetes patula* (10 г) трижды экстрагировали 40%-ным спиртом этиловым на водяной бане в колбе с обратным холодильником в течение 45 минут. Объединённые извлечения упаривали под вакуумом досуха и сушили до постоянной массы. Навеску полученного сухого экстракта (г) вновь нагревали с 20 мл 70%-ного спирта этилового в колбе с обратным холодильником на водяной бане в течение 1 часа, после чего полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объёмом 25 мл и доводили спиртом этиловым 70 % до метки. Параллельно готовили серию 0,05 % растворов сравнения в 70% спирте этиловом: танина, галловой кислоты, эпикатехина, катехина, эпигаллокатехингаллата. По 20 мкл исследуемого раствора и растворов сравнения вводили в хроматограф и хроматографировали в приведенных выше условиях. Данные анализа представлены на рисунке 1 и в таблице 1.

Место локализации дубильных веществ в соцветиях определяли с помощью качественных реакций. Анализ подвергали 40% спиртовые извлечения, полученные экстракцией обёртки и цветков по вышеописанной методике. Результаты приведены в таблице 2.

Количественное определение суммы дубильных веществ проводили в водном и 40%-ном спиртовом извлечениях из обёрток соцветий бархатцев двумя способами – перманганатометрическим [Иванов, Денисенко, 2014] и спектрофотометрическим, описанным в работе [Патент РФ № 243928].

Перманганатометрический метод (метод 1). Точную навеску (около 2г) измельчённого сырья (обёртки соцветий бархатцев) просеивали через сито диаметром 3 мм, помещали в коническую колбу объёмом 500 мл, заливали 250 мл экстрагента (водой или 40%-ным спиртом этиловым) и кипятили с обратным холодильником на кипящей водяной бане 30 минут при периодическом помешивании. Содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры, а жидкую фазу процеживали в коническую колбу вместимостью 250 мл и доводили соответствующим растворителем до метки. Далее 25 мл полученного раствора переносили в коническую колбу объёмом 1 л, прибавляли 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании раствором перманганата калия (0,02 моль/л) до золотисто-жёлтого цвета. Параллельно проводили контрольный опыт. Содержание дубильных веществ в процентах рассчитывали по формуле:

$$X_1 = \frac{(V_1 - V_0) \cdot 0.004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m_{\text{нав}} \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad (1),$$

где:

V_1 – объём раствора перманганата калия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, в миллилитрах;

V_0 – объём раствора перманганата калия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора перманганата калия (0,02 моль/л) в пересчёте на танин, в граммах;

$m_{\text{нав}}$ – масса навески сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах; 250 – общий объём извлечения в миллилитрах.

Далее проводили осаждение дубильных веществ реактивом осаждения (1% раствор желатина в 10% растворе натрия хлорида). Образовавшийся осадок отфильтровывали, 25 мл фильтрата титровали раствором перманганата калия по вышеописанной методике. Расчет оставшихся в растворе окислившихся веществ проводили по формуле (2):

$$X_2 = \frac{(V_2 - V_0) \cdot 0.004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m_{\text{нав}} \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad (2),$$

где:

V_2 – объём раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения после осаждения

Концентрацию дубильных веществ (X_3) определяли по формуле (3):

$$X_3 = X_1 - X_2$$

Результаты представлены в таблице 3.

Спектрофотометрический метод (метод 2). Определение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре «Аквилон» СФ-103. Около 2 г (точная навеска) измельчённого сырья – обёрток соцветий бархатцев распротёртых, просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещали в колбу вместимостью 500 мл, заливали 250 мл нагретым до кипения экстрагентом

(водой или 40% спиртом этиловым) и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут при периодическом перемешивании. Охлаждали до комнатной температуры, доводили водой до 250 мл, процеживали через вату (первые 50 мл фильтрата отбрасывали). Затем 1 мл извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой до метки (раствор 1). Измеряли оптическую плотность раствора 1 при длине волны 277 нм. В качестве растворов сравнения использовали воду или 40% спирт этиловый, соответственно. Далее проводили осаждение дубильных веществ. Для этого 30 мл извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 7 мл реактива осаждения, взбалтывали 60 минут, отстаивали, фильтровали. 1 мл полученного фильтрата переносили в колбу объемом 50 мл, доводили до метки соответствующим растворителем (раствор 2). Измеряли оптическую плотность раствора 2 при длине волны 277 нм. В качестве растворов сравнения использовали соответственно воду или 40%-ный спирт этиловый.

Суммарное содержание дубильных веществ в растворе 1 в пересчёте на галловую кислоту рассчитывали по формуле:

$$X_4 = \frac{D \cdot 250 \cdot 50 \cdot 100}{m_{\text{нав}} \cdot V_a \cdot 508 \cdot (100 - W)} \quad (4),$$

где:

X_4 – содержание суммы дубильных веществ в пересчёте на галловую кислоту, %;

D – оптическая плотность раствора 1;

$m_{\text{нав}}$ – масса навески сырья, г;

V_a – объём аликвотной пробы, мл; 250 – общий объём извлечения, мл; 508 – удельный показатель поглощения галловой кислоты (оптическая плотность 1% раствора галловой кислоты 1 мг/мл); 50 – объём колбы, мл; W – влажность сырья, %,

Содержание дубильных веществ, после добавления реактива осаждения, в пересчёте на галловую кислоту (X_5), в обертках соцветий бархатцев распротёртых определяли как разницу между содержанием дубильных веществ в растворах 1 и 2.

$$X_5 = \frac{(D_1 - D_2) \cdot 250 \cdot 50 \cdot 100}{m_{\text{нав}} \cdot V_a \cdot 508 \cdot (100 - W)} \quad (5)$$

где:

X_5 – содержание осаждаемых дубильных веществ в пересчёте на галловую кислоту, %;

D_1 – оптическая плотность раствора 1;

D_2 – оптическая плотность раствора 2.

Результаты и их обсуждение

Известно, что дубильные вещества редко накапливаются в соцветиях. Основное место их локализации – корни, корневища, древесина, плоды, листья. Однако танины обнаружены в соцветиях некоторых растений, в том числе и в бархатцах, относящихся к семейству Asteraceae. В календуле лекарственной и ромашке аптечной их количество варьирует в пределах 0.25–1.87% [Патент РФ №252227]. Методом ВЭЖХ, нами установлено наличие этих веществ также и в соцветиях бархатцев распротёртых (рисунк 1, таблица 1), причём среди них преобладают гидролизуемые дубильные вещества.

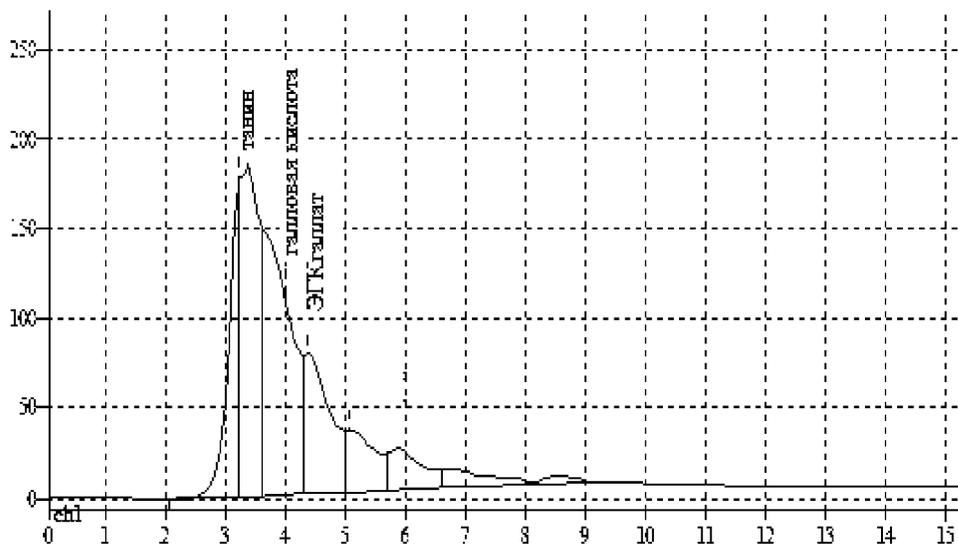


Рис. 1. Хроматограмма ВЭЖХ 40%-водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев распротёртых
 Fig. 1. The HPLC chromatogram of a 40% aqueous-alcoholic extract of blossoms of *Tagetes patula* L.

Таблица 1
Table. 1

**Результаты исследования дубильных веществ соцветий
бархатцев распротертых методом ВЭЖХ**
The results of the study of tannins blossoms of *Tagetes patula* L. open by HPLC

№ п/п	Идентифицированное вещество	Время удерживания (мин)
1.	Танин	3.293
2.	Галловая кислота	3.885
3.	Эпигаллокатехингаллат	4.322

С помощью качественных реакций установлено (таблица 2), что дубильные вещества практически отсутствуют в цветках, в основном они сосредоточены в обёртках соцветий.

Таблица 2
Table. 2

**Результаты качественных реакций на наличие дубильных веществ
соцветий бархатцев распротертых**
The results of the qualitative reactions for the presence of tannins blossoms of *Tagetes patula* L.

Реакция	Аналитический эффект	
	Обёртка соцветия	Цветки соцветия
1%-ный раствор желатина на 10%-ном растворе натрия хлорида	Белый осадок	Появление белой мути
1%-ный раствор хинина сульфата	Белый аморфный осадок	Очень слабый осадок
Раствор железо-аммонийных квасцов	Чёрно-зелёное окрашивание раствора	Окрашивание отсутствует

Результаты количественного определения дубильных веществ в обёртках соцветий *Tagetes patula* L., полученные методами 1 и 2 приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3
Table. 3

**Перманганатометрическое определение содержания дубильных веществ
(в пересчете на танин) в обёртках соцветий *Tagetes patula* L.**
**Permanganometric determination of tannins (in terms of tannin)
to the wrappers inflorescences of *Tagetes patula* L.**

Исследуемый объект	№	Содержание дубильных веществ, %	Метрологические характеристики
Водное извлечение	1	0.457	$X_{cp}=0.450$ $S_x=0.0086$ $\Delta X=0.0222$ $X \pm \Delta X=0.45 \pm 0.0222$ $E_{отн}, \%=4.9$
	2	0.483	
	3	0.452	
	4	0.439	
	5	0.463	
	6	0.421	
40% извлечение	1	0.685	$X_{cp}=0.70$ $S_x=0.0134$ $\Delta X=0.0344$ $X \pm \Delta X=0.7 \pm 0.0344$ $E_{отн}, \%=4.93$
	2	0.713	
	3	0.727	
	4	0.673	
	5	0.741	
	6	0.657	

Таблица 4
Table. 4

**Спектрофотометрическое определение содержания дубильных веществ
(в пересчете галловую кислоту) в обертках соцветий дубильных веществ**
**Spectrophotometric determination of tannins content (in terms of Gallic acid)
in the wrappers of inflorescences tannins**

Исследуемый объект	№	Содержание дубильных веществ, %	Метрологические характеристики
Водное извлечение	1	0.185	$X_{cp}=0.18$ $S_x=0.0035$ $\Delta X=0.0091$ $X \pm \Delta X=0.18 \pm 0.0091$ $E_{отн}, \%=4.97$
	2	0.179	
	3	0.189	
	4	0.191	
	5	0.167	
	6	0.183	
40% извлечение	1	0.319	$X_{cp}=0.32$ $S_x=0.0057$ $\Delta X=0.0147$ $X \pm \Delta X=0.32 \pm 0.0147$ $E_{отн}, \%=4.63$
	2	0.297	
	3	0.313	
	4	0.327	
	5	0.317	
	6	0.339	

Более высокие результаты количественного содержания дубильных веществ в исследуемом сырье, полученные методом 1, можно объяснить тем, что перманганатометрический метод позволяет определить сумму дубильных веществ осаждаемых желатином, а второй – спектрофотометрический в большей степени отражает количественное содержание гидролизуемых дубильных веществ, которые в данном сырье являются доминирующими. Однако оба метода показали, что спирт этиловый 40% является лучшим экстрагентом дубильных веществ, чем вода.

Выводы

1. Методом ВЭЖХ установлено наличие в соцветиях бархатцев распростертых танина, галловой кислоты, эпигаллокатехингаллата.
2. Дубильные вещества сосредоточены в основном в обёртках соцветий *Tagetes patula* L. (Asteraceae).
3. Спирт этиловый 40% позволяет выделить дубильных веществ из оберток соцветий бархатцев распростертых в полтора раза больше, чем вода.
4. В обертках соцветий *Tagetes patula* L. количественное содержание дубильных веществ, осаждаемых желатином, в пересчете на танин составило $0.70 \pm 0.01\%$ (по данным перманганатометрического метода), а в пересчете на галловую кислоту – $0.32 \pm 0.01\%$ (по данным спектрофотометрического метода).
5. Результаты количественного содержания дубильных веществ, полученные перманганатометрическим и спектрофотометрическим методами вполне согласуются с данными литературы о содержании танинов из соцветий некоторых других видов Asteraceae.

Список литературы References

- Василенко Ю.К. 1990. Гепатозащитные свойства препаратов из бархатцев распростертых. Хим.-фарм. журнал. 24 (1): 53-56.
- Vasilenko Y.K. 1990. Gepatozaschitnie svoystva preparatov iz Tagetes patula [Gepatozaschitny properties of medicines from barkhatets open]. Him.-farm. journal. 24 (1): 53-56. (in Russian)
- Иванов В.В., Денисенко О.Н. 2014. Количественное определение дубильных веществ в траве горца сахалинского, интродуцированного в условиях кавказских минеральных вод, различными аналитическими методами. Современные проблемы науки и образования, 6. Электронный журнал. URL: www.science-education.ru/120-16511
- Ivanov V.V., Denisenko O.N. 2014. Kolichestvennoe opredelenie dubil'nykh veshchestv v trave gortsa sakhalinskogo, introdutsirovannogo v usloviyakh kavkazskikh mineral'nykh vod, razlichnymi analiticheskimi metodami [Quantitative definition of tannins in a grass of the mountaineer Sakhalin, introduced in the conditions of Caucasus Mineralnye Vody region, various analytical methods]. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya, 6. Elektronnyy zhurnal. URL: www.science-education.ru/120-16511 (in Russian)
- Марахова А.И., Федоровский Н.Н., Самылина И.А., Сорокина А.А., Баурин П.А. 2014. Способ отдельного выделения дубильных веществ и флавоноидов из лекарственного растительного сырья. Патент РФ №2522227.
- Marahova A.I., Fedorovskii N.N., Samylina I.A., Sorokina A.A., Baurin P.A. 2014 Sposob razdel'nogo vydeleniya dubil'nykh veshchestv i flavonoidov iz lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya [Way of separate release of tannins and flavonoids from medicinal vegetable raw materials]. Patent RF №2522227. (in Russian)
- Папаяни О.И., Доркина Е.Г., Терехов А.Ю., Сергеева Е.О., Духанина И.В., Тираспольская С.Г. 2012. Изучение химического состава и влияния экстракта из цветков бархатцев распростёртых на про/антиоксидантное равновесие в желудке крыс при вольтареновой гастропатии. Современные проблемы науки и образования.(1)
- Parayani O.I., Dorkina E.G., Terekhov A.U., Sergeeva E.O., Duhanina I.V., Tiraspol'skaya S.G. 2012. Izuchenie himicheskogo sostava i vliyaniya extracta iz Tagetes patula na pro/antioxodantnoe ravnovesie v zjeludke kryis pri vol'tarenovoy gastropatii [Studying of the chemical composition and influence of extract from flowers of the barkhatets spread on about / antioxidant balance in a stomach of rats at a voltarenovy gastropatiya]. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya (1). (in Russian)
- Самылина И.А. Гринько Е. Н., Абоянц Р. К. 2010. Способ определения дубильных веществ в растительном сырье. Патент РФ № 243928. Электронный документ. URL <http://www.findpatent.ru/patent/243/2439568.html5>.
- Samylina I.A. Grin'ko E. N., Aboyants R. K. 2010. Sposob opredeleniya dubil'nykh veshchestv v rastitel'nom syr'e [Way of definition of tannins in vegetable raw materials]. Patent RF № 243928. Elektronnyy dokument. URL :<http://www.findpatent.ru/patent/243/2439568.html>. (in Russian)
- Терехов А.Ю. 2006. Изучение защитного действия биологически активных веществ из цветков *Tagetes patula* L. при экспериментальных токсических поражениях печени. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Пятигорск, 2006, 24.
- Terekhov A.U. 2006. Izuchenie zaschitnogo deystviya biologicheskii aktivnykh veschestv iz tzvetkov Tagetes patula L. pri eksperimental'nykh toxicheskikh porazheniyakh pecheni [Studying of protective effect of biologically active agents from flowers of *Tagetes patula* L. at experimental toxic damages of a liver]. Abstract. Dis. ... cand. Pharm. Sciences. Pyatigorsk, 24. (in Russian)