

## Оценка эквивалентности методов определения дубильных веществ, используемых для анализа лекарственного растительного сырья

Н.П. Антонова, А.М. Калинин, С.С. Прохвятилова, Е.П. Шефер, Т.Е. Матвеевкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

**Резюме:** Проведена сравнительная оценка фармакопейных методов количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье, вошедших в проект общей фармакопейной статьи «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье» для Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания: титриметрического метода Государственной фармакопеи СССР XI издания и спектрофотометрического метода Европейской фармакопеи. Определены их основные метрологические характеристики с использованием в качестве образца лекарственного растительного препарата коры дуба. Исследовано качество 9 образцов лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества как основную группу биологически активных веществ, двумя фармакопейными методами. Показано, что содержание дубильных веществ зависит от используемого метода испытания, нормы содержания дубильных веществ для каждого метода отличаются. Проведены опыты с добавками пирогаллола. Рассмотрен один из модифицированных методов количественного определения дубильных веществ, являющийся изменением титриметрического метода Государственной фармакопеи СССР XI издания с целью увеличения выхода дубильных веществ из сырья; сделан вывод о необходимости внесения изменения в норматив содержания дубильных веществ для модифицированного метода.

**Ключевые слова:** дубильные вещества; методы количественного определения дубильных веществ; титриметрия; спектрофотометрия; проект ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье» для Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания; модифицированный метод определения дубильных веществ.

**Библиографическое описание:** Антонова НП, Калинин АМ, Прохвятилова СС, Шефер ЕП, Матвеевкова ТЕ. Оценка эквивалентности методов определения дубильных веществ, используемых для анализа лекарственного растительного сырья. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2015; (1): 11–15.

### EQUIVALENCE ASSESSMENT OF QUANTITATIVE TANNINS DETERMINATION METHODS, USED FOR ANALYSIS OF HERBAL DRUGS

N.P. Antonova, A.M. Kalinin, S.S. Prohvatilova, E.P. Shefer, T.E. Matveenkova  
Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

**Abstract:** The article describes results of comparative evaluation of two pharmacopoeial methods used for quantitative determination of tannins in herbal drugs: the titrimetric method of the State Pharmacopoeia of the USSR (XIth edition) that is described in the draft general monograph «Determination of tannins in herbal drugs» to be included in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII edition, and the spectrophotometric method of the European Pharmacopoeia. Basic metrological characteristics of the methods were determined using oak bark as sample herbal drug. Both methods were used to test the quality of 9 herbal drug samples in which tannins were present as the main group of biologically active substances. It was revealed that the determined amount of tannins depends on the method used; and content limits are different for the two methods. Experiments were undertaken with the addition of pyrogallol. A modification of the titrimetric method of the State Pharmacopoeia of the USSR (XIth edition) was considered with a view of increasing tannins yield from herbal drugs; conclusions were made regarding the need to change the tannins limit for the modified method.

**Key words:** tannins; assays of tannins; titrimetry; spectrophotometry; draft general monograph «Determination of tannins in herbal drugs» to be included in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII edition; modified method of tannins determination.

**Bibliographic description:** Antonova NP, Kalinin AM, Prohvatilova SS, Shefer EP, Matveenkova TE. Equivalence assessment of quantitative tannins determination methods, used for analysis of herbal drugs. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2015; (1): 11–15.

Дубильными веществами (ДВ) называют водорастворимые полифенольные соединения, обладающие молекулярной массой от 500 до 3000, способные «дубить» кожу. Эта способность основана на взаимодействии с белками кожи, при этом полифенолы меньшей молекулярной массы ею не обладают [1, 2].

Извлечения ДВ из растительного сырья представляют собой смесь лабильных полифенолов, имеющих сложную структуру, поэтому их анализ является трудной задачей [1].

В основном различают два больших класса ДВ. К первому классу – гидролизуемым ДВ – относятся гликозиды галловой кислоты (галлотанины) и гликозиды эллаговой кислоты (эллаготанины). Второй класс – конденсированные ДВ (так называемые проантоцианидины) – представлен полимерами флаван-3-ол мономерных субъединиц, таких как (+)-катехин, (-)-эпикатехин и их галлаты [3, 4]. Также выделяют третий, менее изученный класс – флоротанины – полимеры, со-

стоящие из субъединиц флороглюцина, встречающиеся только в морских бурых водорослях [4, 5].

В растениях гидролизуемые и конденсированные ДВ встречаются одновременно, с преобладанием одного класса. На накопление и состав ДВ могут влиять возраст и фаза развития растения, климат, почвенные условия, высотный фактор, освещение, влажность [6], время сбора и способы сушки [7] и т.п.

В организме человека ДВ осаждают белки, образуют хелатные комплексы с металлами и выступают в роли антиоксидантов [8]. Лекарственное растительное сырье (ЛРС), содержащее ДВ, и лекарственные растительные препараты (ЛРП) на их основе применяют в качестве вяжущего и противовоспалительного средства (что связано с формированием защитной пленки при осаждении белков), а также при отравлениях тяжелыми металлами (так как последние неактивны в составе хелатного комплекса). Антиоксидантная активность ДВ пока не находит широкого применения в медицине.

Первые опыты по выделению ДВ из растительного сырья были проведены в конце XVIII столетия [1]. С тех пор описано более 100 различных способов количественного определения ДВ.

В Государственной фармакопее СССР X издания (ГФ X) был включен метод перманганатометрии в присутствии индикатора индигосульфокислоты, основанный на способности ДВ быстро окисляться перманганатом калия, расчет содержания дубильных веществ осуществляется в пересчете на танин [9]. Измененный вариант (увеличение объема экстрагента и отказ от многократного извлечения) метода включен в Государственную фармакопею СССР XI издания (ГФ XI) [10]. Недостатками указанного метода являются: неспецифичность, так как перманганат калия, являясь сильным окислителем, реагирует помимо дубильных веществ и с другими соединениями (например, флавоноидами, антраценпроизводными, аскорбиновой кислотой и т.д.), и недостаточная четкость установления конечной точки титрования.

В Европейскую фармакопею (ЕФ) включен спектрофотометрический метод, основанный на реакции взаимодействия ДВ с раствором фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот в присутствии натрия карбоната с образованием окрашенного комплекса после осаждения ДВ кожным порошком. В качестве стандарта используется пирогаллол, на который осуществляется пересчет дубильных веществ [11]. Методика ЕФ является более специфичной, чем методика ГФ XI, однако кожный порошок кроме ДВ может осаждать из раствора и другие соединения (например, алкалоиды, галловую и эллаговую кислоты) [12], что оказывает влияние на результаты анализа.

При разработке проекта общей фармакопейной статьи «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье» для ГФ XIII в него были включены титриметрический метод ГФ XI и спектрофотометрический метод ЕФ.

Производители лекарственных растительных препаратов (ЛРП) периодически предлагают модификации методов количественного определения ДВ. В основе рассматриваемой нами модификации методики лежит использование в качестве экстрагента вместо воды буферных растворов с целью увеличения выхода определяемых веществ.

Цель данной работы заключалась в исследовании качества ЛРС и ЛРП с использованием нескольких методов количественного определения ДВ: метода титриметрии ГФ XI, метода спектрофотометрии ЕФ, модифицированного титриметрического метода; и в оценке эквивалентности основных существующих методов количественного определения ДВ на основе этого исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали анализатор спектрофотометрический Agilent 8453, мерную посуду класса точности 1, химические реактивы класса чистоты «ОСЧ» и стандартный образец Пирогаллола производства Sigma с содержанием пирогаллола  $\geq 98\%$ .

Метрологические характеристики рассчитывались согласно общей фармакопейной статье «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» ГФ XI [8]. Также определялось относительное стандартное отклонение (%RSD) по формуле:

$$\%RSD = \frac{s \times 100\%}{\bar{x}}$$

В качестве объекта исследования было использовано ЛРС, отобранное от «ангро», в дальнейшем используемое для производства лекарственных растительных препаратов (ЛРП), содержащее ДВ как основную группу биологически активных веществ: «Дуба кора», «Толкнянки листья», «Черники плоды», «Черники побеги», «Лапчатки корневища», «Бадана корневища», «Зверобоя трава», «Брусники листья» и «Ольхи соплодия».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

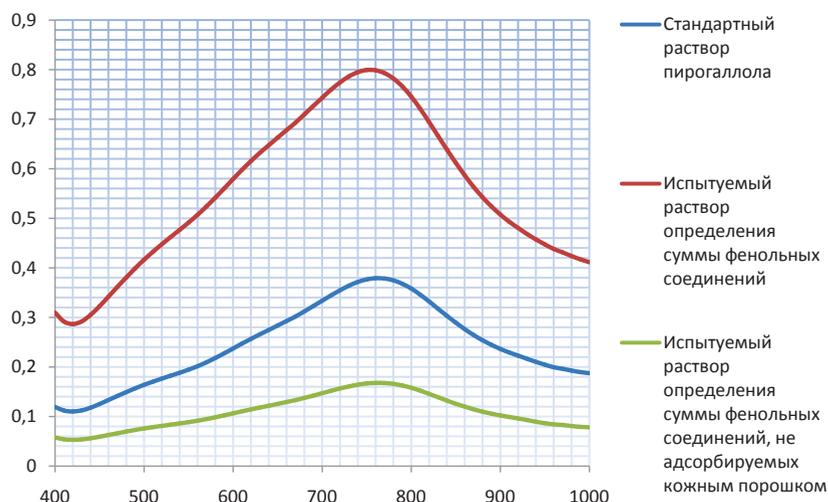
На первом этапе работы оценивались основные метрологические характеристики используемых методов в сравнительном аспекте на образцах одного и того же вида ЛРС. Для этого определили содержание ДВ в 10 навесках коры дуба титриметрическим методом ГФ XI и спектрофотометрическим методом ЕФ. При использовании спектрофотометрической методики нами получены спектры испытуемых растворов и стандартного раствора пирогаллола, на которых четко обнаруживается характерный максимум поглощения при 760 нм (рисунок 1). Затем провели статистическую обработку полученных результатов (таблица 1).

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что относительная погрешность при использовании спектрофотометрической методики ЕФ определения содержания ДВ ниже; оба метода отвечают критерию сходимости.

Затем была проведена оценка содержания ДВ с использованием двух фармакопейных методик на остальных 8 образцах ЛРС. Полученные результаты представлены в таблице 2. Для метода спектрофотометрии при этом учитывалось не только содержание ДВ, осаждаемых кожным порошком, но и общее содержание фенольных соединений.

Показано, что получаемые с помощью перманганатометрического метода ГФ XI результаты значительно выше результатов, получаемых спектрофотометрическим методом ЕФ (рисунок 2).

Об этом свидетельствуют и нормы, установленные для одного и того же ЛРС разными методами. Так, по ГФ XI содержание ДВ в дуба коре должно быть не менее



**Рис. 1.** Спектры стандартного раствора пи-рогаллола и испытуемых растворов, приго-товленных из коры дуба (по оси абсцисс – дли-на волны; по оси ординат – оптическая плот-ность)

Таблица 1

**ОСНОВНЫЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДОВ АНАЛИЗА**

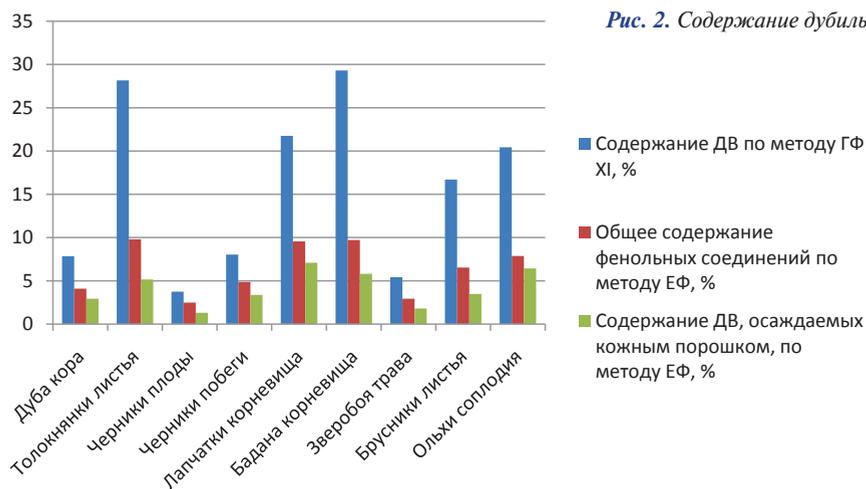
Метод	f	$\bar{x}$ , %	s2	s	P, %	t(p,f)	$\Delta x$	$\Delta \bar{x}$	$\epsilon$	$\bar{\epsilon}$	%RSD
ГФ XI	9	7,84	0,00530	0,073	95	2,26	0,165	0,052	2,11	0,67	0,93
ЕФ	9	2,93	0,00027	0,021	95	2,26	0,049	0,005	1,66	0,18	0,72

Таблица 2

**СОДЕРЖАНИЕ ДВ В ИССЛЕДОВАННОМ ЛРС**

№№	ЛРС	Содержание ДВ по методу ГФ XI, %	Общее содержа-ние фенольных со-единений по мето-ду ЕФ, %	Содержание фенольных со-единений, осаждаемых кож-ным порошком, по методу ЕФ, %
1	Дуба кора	7,84 (не менее 8,0)	4,10	2,93 (не менее 3,0)
2	Толокнянки листья	28,16 (–)	9,80	5,15 (–)
3	Черники плоды	3,75 (–)	2,49	1,31 (не менее 1,0)
4	Черники побеги	8,03 (–)	4,87	3,37 (–)
5	Лапчатки корневища	21,76 (–)	9,56	7,09 (не менее 7,0)
6	Бадана корневища	29,31 (не менее 20,0)	9,72	5,81 (–)
7	Зверобоя трава	5,42 (–)	2,94	1,80 (–)
8	Брусники листья	16,70 (–)	6,54	3,49 (–)
9	Ольхи соплодия	20,43 (не менее 10,0)	7,87	6,44 (–)

Примечание: в скобках приведены нормы содержания ДВ в соответствии с ГФ XI и ЕФ; (–) – нормы не установлены



**Рис. 2.** Содержание дубильных веществ в исследованном ЛРС

### РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ОПЫТАХ С ДОБАВКАМИ ПИРОГАЛЛОЛА К ИСПЫТУЕМОМУ РАСТВОРУ (МЕТОД ГФ XI)

Количество добавленного пирогаллола, мг	Содержание ДВ по методу ГФ XI, %		Ошибка, %
	теоретическое	фактическое	
0	7,84	7,84	0
50	12,95	12,97	+0,15
100	18,41	18,32	-0,49
150	23,87	23,59	-1,17

Таблица 4

### РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ОПЫТАХ С ДОБАВКАМИ ПИРОГАЛЛОЛА К ИСПЫТУЕМОМУ РАСТВОРУ (МЕТОД ЕФ)

Количество добавленного пирогаллола, мг	Общее содержание фенольных соединений по методу ЕФ, %		Ошибка, ±
	теоретическое	фактическое	
0	4,10	4,10	0
50	5,88	5,54	-5,8
100	7,75	7,25	-6,5
150	9,61	8,70	-9,5

Таблица 5

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ОБРАЗЦОВ ДУБА КОРЫ

	Содержание ДВ, измеренное по методике ГФ XI, %	Содержание ДВ, измеренное по методике производителя, %
образец препарата 1	6,6	8,6
образец препарата 2	7,4	8,8

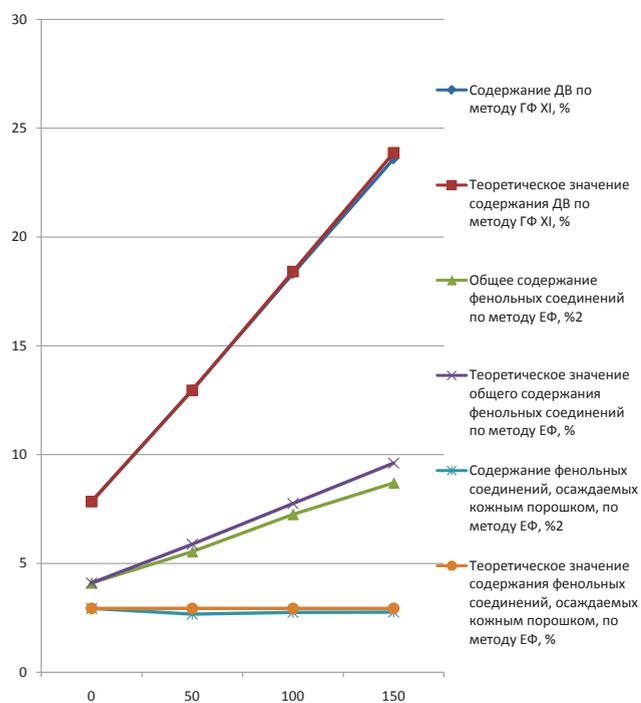


Рис. 3. Результаты количественного определения в опытах с добавками пирогаллола к испытуемому раствору (по оси абсцисс — количество добавленного пирогаллола, мг; по оси ординат — содержание определяемых веществ, %)

8%, по ЕФ содержание ДВ, осаждаемых кожным порошком, должно быть не менее 3%.

В испытанном образце дуба коры содержание ДВ было установлено в количестве 7,8% методом ГФ XI и 2,9% методом ЕФ. Согласно этим данным, несмотря на разные числовые результаты, оба этих метода показали, что испытанные образцы дуба коры не соответствуют нормам качества, соответствующим этим методам. Таким образом, показано, что если сырье является некачественным, то содержание определяемых веществ остается ниже нормы при использовании разных методов.

На третьем этапе работы были проведены опыты с добавками: к навеске ЛРС добавлялось определенное количество пирогаллола. Результаты (таблицы 3 и 4) показали, что при линейном изменении количества добавленного пирогаллола так же линейно изменялись и результаты количественного определения методом ГФ XI и общего содержания ДВ, определенного методом ЕФ.

По результатам опытов с добавками был построен график зависимости результатов количественного определения ДВ от массы навески добавленного пирогаллола (рис. 3). Были рассчитаны коэффициенты корреляции, которые составили 0,999 для тех случаев, когда изменялось аналитическое значение. Таким образом, показано, что оба метода количественного определения ДВ отвечают критерию линейности.

В рамках проведения экспертизы качества ЛРП отмечено, что некоторые производители ЛРП включают в проекты фармакопейных статей предприятия (ФСП) видоизмененные методики количественного определения ДВ. Нами проведено исследование одного из таких методов. Этот метод был предложен отечественным производителем ЛРП. На всех стадиях пробоподготовки экстрагент (вода) заменяется на тетраборатный буферный раствор с рН 9,18. Исследование этого метода проводилось на образцах ЛРП «Дуба кора» этого производителя. Результаты представлены в таблице 5.

По ГФ XI норма содержания ДВ в коре дуба должно быть не менее 8%, по методике производителя норма содержания ДВ оставалась без изменения — не менее 8%. Таким образом, сырье, не соответствующее по содержа-

нию ДВ норме ГФ XI, соответствовало ей при использовании модифицированного метода. Учитывая, что использование другого растворителя увеличивает получаемое значение ДВ, норма содержания должна быть увеличена примерно на 1,5% и составить «не менее 9,5%». В связи с этим использование видоизмененных методов возможно только с пересмотром норм качества по содержанию биологически активных веществ.

### ВЫВОДЫ

Метод спектрофотометрии с осаждением ДВ кожным порошком является более специфичным с точки зрения понятия «дубильные вещества», так как он основан на способности ДВ взаимодействовать с белками кожи.

Сравнительная оценка двух фармакопейных методов показала, что результаты испытаний, полученные методом перманганатометрии по ГФ XI, в 2–5 раз выше, чем результаты, полученные методом ЕФ, так как в растворе окисляются и другие соединения помимо ДВ. Оба метода обладают сходимостью и линейностью.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Блажей А, Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М.: Мир; 1977.
2. Bate-Smith EC, Swain T. Flavonoid compounds. Comparative Biochemistry 1962; (3A): 755–809.
3. Laghi L, Parpinello GP, Del Rio D, Calani L, Mattioli AU, Versari A. Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach. Food Chem 2010; 121(3): 783–788.
4. Amarowicz R. Tannins: the new natural antioxidants? European J of Lipid Science and Technology 2007; 19(6): 549–551.
5. Koivikko R. Brown algal phlorotannins: Improving and applying chemical methods. Ph. D. [thesis]. Turku; 2008.
6. Иванова С.Д. Дубильные вещества, сапонины, антраценпроизводные и флавоноиды в лекарственных растениях : учеб.-метод. пособие. М.: [б. и.], 1967.
7. Чумбалов Т.К. Химическое исследование дубильных и сопутствующих им веществ некоторых растений Казахстана. автореф. ... д-ра хим. наук. Ташкент: [б. и.], 1966.
8. Hagerman AE. Tannin Handbook. Miami University, Oxford; 2002.
9. Государственная фармакопея СССР. 10-е изд. М.: Медицина; 1968.
10. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. Вып. 1, 2. М.: Медицина; 1998.
11. European Pharmacopoeia. 8th edition. Strasbourg: EDQM; 2013.
12. Heron J. The tannins of hops. J of the Federated Institutes of Brewing 1996; 2(3): 161–183.

### ОБ АВТОРАХ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

*Антонова Наталья Петровна.* Начальник лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств, канд. биол. наук.

*Калинин Артем Михайлович.* Эксперт 2-й категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств.

*Прохватилова Светлана Степановна.* Главный эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств, канд. фарм. наук.

*Шефер Елена Павловна.* Главный эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств, канд. фарм. наук.

*Матвеевкова Татьяна Евгеньевна.* Эксперт 1-й категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств.

### АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

Антонова Наталья Петровна; Antonova@expmed.ru

Статья поступила 26.12.2014 г.

Включение титриметрического метода в проект ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье» для ГФ XIII является обоснованным, так как этот метод имеет ряд достоинств: он дешев, прост и, кроме того, нормы содержания ДВ, включенные в фармакопейные статьи на ЛРС и ЛРП в ГФ XI, были установлены с использованием этого метода.

При сравнительной оценке результатов испытаний, полученных перманганатометрическим по ГФ XI, спектрофотометрическим по ЕФ и модифицированным титриметрическим методами, установлено, что методы не эквивалентны по полученным результатам и позволяют оценивать качество ЛРС по содержанию ДВ только в рамках норм, установленных для каждого метода отдельно.

Модификация существующих методов, направленная на увеличение экстракции ДВ из сырья, должна сопровождаться эквивалентным увеличением нормы содержания дубильных веществ.

### REFERENCES

1. Blazej A, Shutyi L. Phenolic compounds of plant origin. Moscow: Mir; 1977 (in Russian).
2. Bate-Smith EC, Swain T. Flavonoid compounds. Comparative Biochemistry 1962; (3A): 755–809.
3. Laghi L, Parpinello GP, Del Rio D, Calani L, Mattioli AU, Versari A. Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach. Food Chem 2010; 121(3): 783–788.
4. Amarowicz R. Tannins: the new natural antioxidants? European J of Lipid Science and Technology 2007; 19(6): 549–551.
5. Koivikko R. Brown algal phlorotannins: Improving and applying chemical methods. Ph. D. [thesis]. Turku; 2008.
6. Ivanova S.D. Tannins, saponins, hydroxyanthracene derivatives and flavonoids in medicinal plants: teaching aid. Moscow, 1967.
7. Chumbalov T.K. Chemical study of tannins and accompanying substances of some plants of Kazakhstan. Tashkent, 1966.
8. Hagerman AE. Tannin Handbook. Miami University, Oxford; 2002.
9. The State Pharmacopoeia of the USSR. 10th ed. Moscow: Meditsina; 1968 (in Russian).
10. The State Pharmacopoeia of the USSR. 11th ed. V. 1, 2. Moscow: Meditsina; 1998 (in Russian).
11. European Pharmacopoeia. 8th edition. Strasbourg: EDQM; 2013.
12. Heron J. The tannins of hops. J of the Federated Institutes of Brewing 1996; 2(3): 161–183.

### AUTHORS:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

*Antonova NP.* Head of Laboratory of herbal medicines and homeopathic medicines. Candidate of Biological Sciences.

*Kalinin AM.* 2nd category expert of Laboratory of herbal medicines and homeopathic medicines.

*Shefer EP.* Chief expert of Laboratory of herbal medicines and homeopathic medicines. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

*Prohvatilova SS.* Chief expert of Laboratory of herbal medicines and homeopathic medicines. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

*Matveenkova TE.* 1st category expert of Laboratory of herbal medicines and homeopathic medicines.

Принята к печати 23.01.2015 г.