

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПЛОДАХ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

О.В. Тринеева*, канд. фарм. наук, Н.С. Шикунова,
А.И. Сливкин, докт. фарм. наук, профессор
Воронежский государственный университет;
394006, Россия, Воронеж, Университетская площадь, 1

*E-mail: trineevaov@mail.ru

Проведен сравнительный анализ различных методик определения дубильных веществ в плодах облепихи крушиновидной, из которых наиболее предпочтительна спектрофотометрическая, основанная на измерении оптической плотности спиртового извлечения из плодов при длине волны 275 ± 2 нм. Разработана и валидирована методика количественного определения дубильных веществ в плодах облепихи в пересчете на танин. Исследовано влияние способа консервации на стабильность дубильных веществ в плодах.

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, *Hipporhae rhamnoides* L., плоды свежие, замороженные, высушенные, дубильные вещества, определение.

К группе дубильных веществ (ДВ) относятся сложные органические соединения, производные многоатомных фенолов с разнообразной химической структурой – от простейших производных полифенолов до более сложных высокомолекулярных их производных, называемых флобафенами и флотанинами. ДВ оказывают вяжущее, противовоспалительное и кровоостанавливающее действие. Методы количественного определения ДВ можно разделить на титриметрические [1–5] (перманганатометрия и комплексонометрия), гравиметрические, спектральные (основаны на измерении собственного поглощения суммы данных биологически активных веществ (БАВ) в различных растворителях, а также на поглощении окрашенных продуктов реакций с разнообразными цветореагентами) [1–3, 6–9], электрохимические (потенциометрическое и кулонометрическое титрования, кондуктометрия) [10–14] и хроматографические (ТСХ и ВЭЖХ) [15–16]. Наиболее перспективными в настоящее время считаются 3 последние группы методов.

Облепиха крушиновидная (ОК) – *Hipporhae rhamnoides* L. – является ценным лекарственным растением. Предварительное количественное определение суммы ДВ в плодах облепихи методом перман-

ганатометрии по методике общей фармакопейной статьи – ОФС из Государственной фармакопеи – ГФ XIII издания [1] показало значительное их содержание, в связи с чем данный показатель необходимо учитывать при разработке проектов ФС на плоды облепихи крушиновидной.

Цель работы – адаптация и сравнительная характеристика существующих методов определения суммы ДВ для плодов ОК, а также разработка методики их количественного определения методом прямой спектрофотометрии.

Экспериментальная часть

Объектами исследования служили свежие, замороженные и высушенные измельченные и цельные плоды дикорастущей облепихи крушиновидной, собранные в Воронежской обл. Сушку плодов проводили при $t=60^\circ\text{C}$ до остаточной влажности не более 20%. Заморозку осуществляли в условиях морозильной камеры при $t=-18^\circ\text{C}$.

Для определения ДВ в сырье получали извлечение по следующей методике. Около 1,0 г (точная навеска) сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, заливают 125 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным воздушным холодильником в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Жидкость процеживают через несколько слоев марли в коническую колбу, не дожидаясь охлаждения (охлаждение сопровождается снижением растворимости ДВ в воде), чтобы частицы сырья не попали в колбу.

Для определения ДВ методом перманганатометрии отбирали 5 мл полученного извлечения в коническую колбу для титрования вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл воды, 5 мл индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании раствором калия перманганата (0,02 моль/л) до появления золотисто-желтого окрашивания. Параллельно про-

водили контрольный опыт: к 5 мл индигосульфокислоты прибавляли 105 мл воды и титровали калия перманганатом (0,02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания. Содержание суммы ДВ (X_1) в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X_1, \% = \frac{(V_0 - V_K) \cdot 0,004157 \cdot 125 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{(V_0 - V_K) \cdot 0,004157 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где V_0 – объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, мл; V_K – объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; 004157 – количество ДВ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата (0,02 моль/л) в пересчете на танин, г; а – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Для получения более точных результатов был применен желатиновый метод, в котором в качестве осадителя ДВ используют желатин.

Отбирали 20 мл полученного извлечения, переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и добавляли 20 мл 1% раствора желатина в 10% растворе натрия хлорида, доводили водой до метки. Перемешивали и образовавшийся осадок отфильтровывали, отбрасывая первые порции фильтрата. Далее поступали согласно методике перманганатометрического определения. Содержание ДВ, осажденных желатином (X_3), в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X_3 = X_1 - X_2,$$

где X_1 – сумма ДВ, определенная перманганатометрически; X_2 – сумма веществ, окисляемых перманганатом калия, после осаждения ДВ желатином, рассчитанная по следующей формуле:

$$X_2, \% = \frac{(V_0 - V_K) \cdot 0,004157 \cdot 125 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 20 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{(V_0 - V_K) \cdot 0,004157 \cdot 125 \cdot 50 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)}.$$

Однако для плодов облепихи желатиновый метод оказался непригодным, так как при добавлении раствора желатина к водному извлечению выражен-

ный осадок не образуется. Поэтому для включения в НД может быть рекомендован метод перманганатометрии только для определения суммы окисляемых полифенольных соединений. Более перспективен метод спектрофотометрии для определения суммы ДВ в пересчете на тот или иной представитель группы данных БАВ. В основе метода спектрофотометрии лежит измерение оптической плотности спиртоводного извлечения из лекарственного растительного сырья (ЛРС) при длине волны 275 ± 2 нм [6]. В настоящее время данный метод считается более избирательным для ДВ, а следовательно, и более объективным. При изучении спектров поглощения водных извлечений в диапазоне длин волн 200–500 нм было установлено, что водные извлечения, разведенные 70% этанолом в соотношении 1:10, имеют максимум при длине волны 277 ± 1 нм. Аналогичный максимум отмечен для раствора РСО танина в 70% спирте (рис. 1). Это дало возможность использовать длину волны 277 ± 1 нм в качестве аналитической для разработки методики количественного

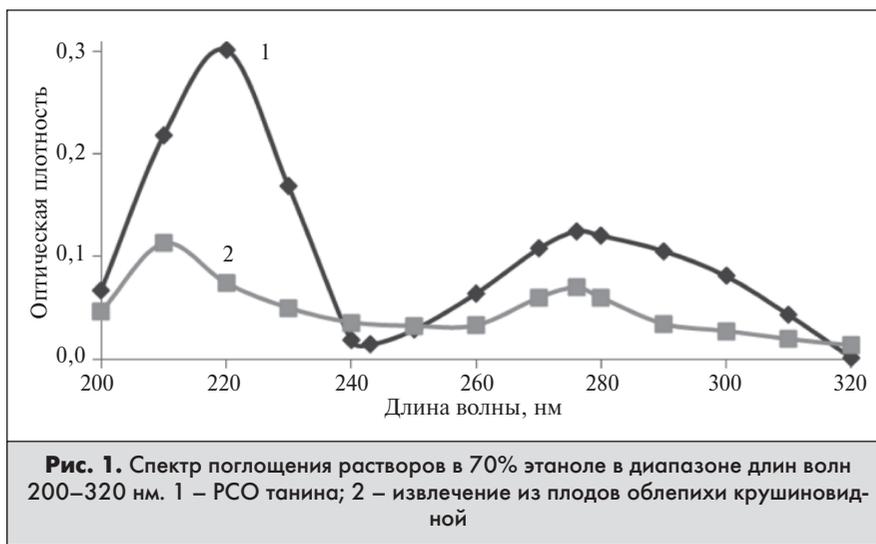


Рис. 1. Спектр поглощения растворов в 70% этаноле в диапазоне длин волн 200–320 нм. 1 – РСО танина; 2 – извлечение из плодов облепихи крушиновидной

Таблица 1

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ СЫРЬЯ И ЭКСТРАГЕНТА НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ

Соотношение сырья и экстрагента	Содержание ДВ, %
1:25	0,99
1:50	1,14
1:75	1,098
1:100	1,12
1:125	1,18
1:150	1,22
1:200	1,62
1:250	1,51

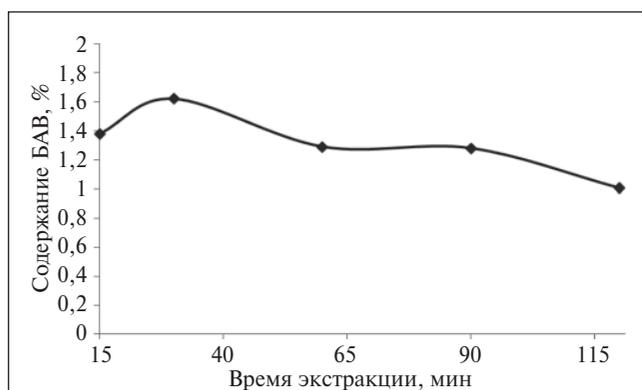


Рис. 2. Влияние времени экстракции на извлечение дубильных веществ из плодов облепихи

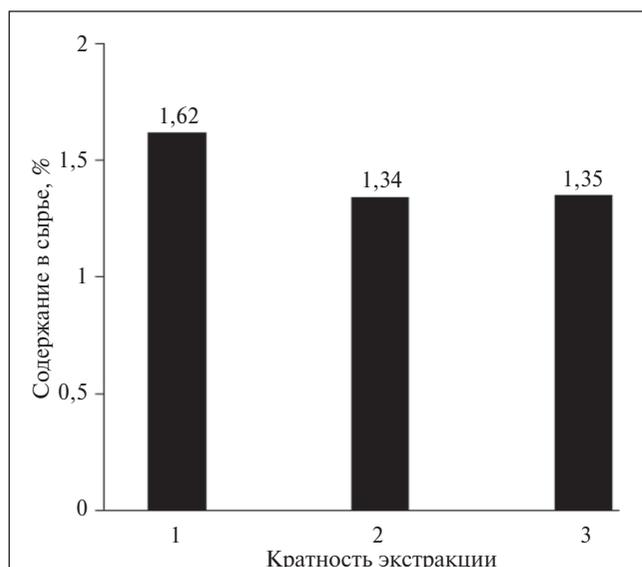


Рис. 3. Влияние кратности экстракции на извлечение дубильных веществ из плодов облепихи

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ
ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПЛОДАХ ОБЛЕПИХИ,
ОПРЕДЕЛЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДИК**

Используемая методика	Содержание суммы ДВ, %
Перманганатометрия	6,614±0,487
Перманганатометрия (желатиновый метод)	3,307±0,243
СФ-определение суммы ДВ в пересчете на танин	1,209±0,02
СФ-определение суммы ДВ в пересчете на галловую кислоту (значение удельного показателя поглощения)	0,838±0,084
СФ-определение суммы ДВ в пересчете на галловую кислоту (сравнение со стандартным образцом)	0,812±0,081
СФ-определение суммы ДВ с железо-тарtratным реактивом в пересчете на танин	0,061±0,006
СФ-определение суммы ДВ с железо-тарtratным реактивом в пересчете на кислоту галловую	0,15±0,01

Примечание. СФ – спектрофотометрический метод.

определения ДВ в плодах облепихи методом спектрофотометрии.

Следующим этапом исследования стала разработка спектрометрической методики количественного определения суммы ДВ в плодах ОК. Для извлечения суммы ДВ из ЛРС в качестве экстрагента наиболее часто используют воду. Экспериментальным путем установлено, что оптимальным соотношением ЛРС и экстрагента для извлечения ДВ является 1:200 (табл. 1), а наилучшее время экстракции, за которое будет извлекаться максимальное количество ДВ, составляет 30 мин (рис. 2).

При исследовании влияния кратности экстракции на выход ДВ в извлечение из плодов ОК установлено, что повышение кратности сопровождается снижением данного показателя. По-видимому, это связано со снижением времени контакта сырья с растворителем (рис. 3).

Методика количественного определения. 5 мл извлечения, полученного из плодов ОК, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки 70% этиловым спиртом. Измеряют оптическую плотность полученного раствора относительно спирта при длине волны 277±1 нм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора РСО танина. Содержание ДВ (X₄) в пересчете на танин (в процентах) и абсолютно-сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X_4, \% = \frac{A_x \cdot 0,05 \cdot 125 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 2,5 \cdot 1}{A_0 \cdot 5 \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25} = \frac{A_x \cdot 250}{a \cdot A_0 \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого извлечения при длине волны 277±1 нм; а – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; A₀ – оптическая плотность РСО танина при длине волны 277±1 нм.

Таблица 2

Приготовление РСО танина: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца танина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки 70% этиловым спиртом, 2,5 мл полученного разведения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят до метки 70% этиловым спиртом, 1,0 мл полученного разведения помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 70% этиловым спиртом. Измеряют оптическую плотность полученного раствора относительно 70% этилового спирта при длине волны 277±1 нм.

Известна методика спектрофотометрического количественного определения суммы ДВ в пересчете на кислоту галловую в боратном буферном растворе с рН=9,0 [17]. Недостатком данной методики является многократное разведение испытуемого раствора и использование буфера в качестве раствора сравнения [9]. Однако результаты, полученные по двум спектрофотометрическим методикам определения суммы ДВ (в пересчете на танин в водно-спиртовой среде и в пересчете на галловую кислоту в боратном буферном растворе с рН=9,0), оказались сопоставимыми (табл. 2).

В литературе описаны способы спектрофотометрического количественного определения ДВ, основанные на образовании окрашенных комплексов ДВ с железо-тарtratным реактивом [2, 7]. Данные методики не могут быть рекомендованы для анализа плодов облепихи, так как аналитический максимум на спектре поглощения извлечения с реактивом оказывался bathochromно сдвинут на 35 нм относительно ожидаемого (545 нм), в результате чего были получены заниженные результаты.

Таким образом, наиболее предпочтительным для количественного определения суммы ДВ в плодах ОК оказался метод спектрофотометрии, в основе которого лежит измерение оптической плотности спиртоводно-го извлечения из ЛРС при длине волны 275 ± 2 нм. Средняя ошибка определения составляла около 2 %, что в 3–5 раз меньше ошибки при использовании других методов. Результаты определения содержания ДВ в плодах ОК при помощи различных методик представлены в табл. 2.

При проведении валидационных исследований разработанной методики были установлены такие характеристики, как предел определения, линейность, межлабораторная воспроизводимость. Содержание суммы ДВ в пересчете на танин в образцах ЛРС составило $1,142 \pm 0,019\%$ (принятое опорное значение). Линейность определяли на семи уровнях концентраций. Критерий приемлемости – коэффициент

корреляции не менее 0,995. Межлабораторную воспроизводимость методики устанавливали в условиях, при которых не менее шести независимых результатов измерений получали одним и тем же методом в разных лабораториях разными операторами с использованием различного оборудования. Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95%, вычисленное значение RSD – 2,095% и относительного доверительного интервала среднего значения – 2,392% не превышали критериев приемлемости – 5%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 3). Другие харак-

Таблица 3

ВАЛИДАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПЛОДАХ ОБЛЕПИХИ

Характеристика	Статистические характеристики		Результаты		
	Линейность	Уравнение прямой		$y = 0,0607x - 0,0348$	
Наклон (a)		0,0607			
Отрезок на оси ординат b		0,0348			
Коэффициент корреляции		0,9992			
Диапазон линейности (1 г ДВ в пересчете на танин в 1 мл раствора)		$1,041 - 20,837 \cdot 10^{-6}$			
Предел определения, г/мл	Количество грамм ДВ в пересчете на танин в 1 мл извлечения		$1,041 \cdot 10^{-6}$		
Повторяемость	Проба	Hitachi U-1900 (Япония)		СФ-2000 (Россия)	
		Оптическая плотность	Содержание ДВ, %	Оптическая плотность	Содержание ДВ, %
	1	0,3350	1,15765	0,3398	1,1742
	2	0,3370	1,16456	0,3380	1,1680
	3	0,3210	1,10927	0,3238	1,1189
	4	0,3270	1,13000	0,3244	1,12102
	5	0,3350	1,15765	0,3596	1,2426
	6	0,3220	1,11273	0,3143	1,0861
	Наименьшее значение, %				
			1,10927	1,0861	
	Наибольшее значение, %				
			1,16456	1,2426	
	Среднее значение, %				
			1,14185	1,1518	
	Доверительный интервал (p=95%), %				
			$1,14185 \pm 0,01940$	$1,1518 \pm 0,05812$	
	Стандартное отклонение, %				
		2,392	5,540		
Коэффициент вариации, %					
		2,095	4,810		

теристики линейности (наклон прямой, отрезок на оси ординат) приведены в табл. 3. Согласно полученным результатам, разработанная методика валидна и пригодна для использования в целях стандартизации данного ЛРС.

С целью выбора оптимальных условий хранения плодов облепихи и исследования стабильности ДВ разработанная методика была использована для анализа свежих, замороженных и высушенных (цельных и измельченных) плодов. Установлено, что при высушивании и в процессе хранения замороженного ЛРС в течение 6 мес происходит снижение содержания ДВ в плодах (рис. 4). Полифенолы подвержены процессам окисления, происходящим при повышенных температурах и контакте с кислородом воздуха, за счет большого количества фенольных гидроксиллов в молекулах. На основании полученных результатов можно предположить, что, вероятнее всего, основным местом концентрирования ДВ в плодах облепихи является косточка, так как ее измельчение способствует увеличению выхода ДВ в извлечение примерно в 4 раза по сравнению с высушенными цельными плодами. Таким образом, высушенные измельченные плоды облепихи могут быть рекомендованы в качестве источника не только витаминов, но и комплекса полифенольных соединений.

Выводы

1. Проведена адаптация и сравнительная характеристика существующих методик определения суммы дубильных веществ для плодов облепихи. Наиболее предпочтительной является спектрофотометрическая методика, в основе которой лежит измерение оптической плотности спиртоводного извлечения из ЛРС.

2. Разработана и валидирована методика спектрофотометрического количественного определения дубильных веществ в плодах облепихи, которая может быть включена в современную НД.

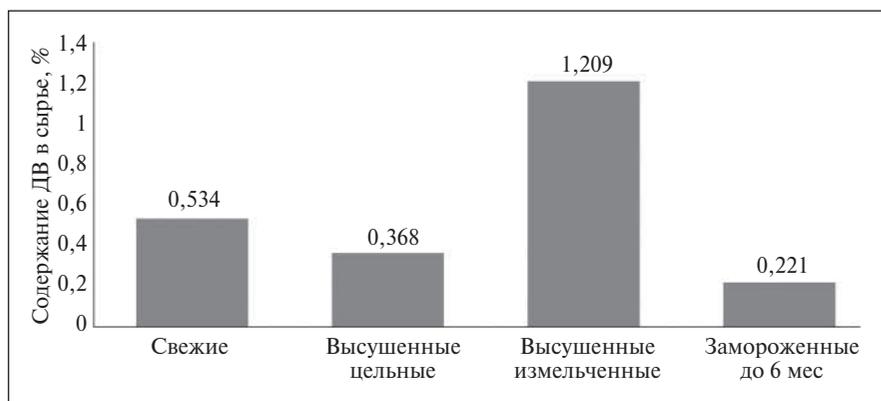


Рис. 4. Влияние способа консервации плодов облепихи на содержание дубильных веществ

3. Установлено содержание дубильных веществ в плодах облепихи различными способами консервации (свежих, высушенных, замороженных).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. ОФС «Определение дубильных веществ в лекарственном растительном сырье». (<http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/splisok-obschih-farmakopeynih-statей>). (дата обращения 11.10.2015).
2. Данилова Н.А., Попов Д.М. Количественное определение дубильных веществ в корнях щавеля конского методом спектрофотометрии в сравнении с методом перманганатометрии. Вестник ВГУ. Сер.: Химия, Биология, Фармация, 2004; 2: 179–182.
3. Гринько Е.Н. Требования Российской и Европейской фармакопей к методикам определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье. Фармация, 2010; 5: 49–53.
4. ГОСТ СССР 4565-79. Лист сумаха.
5. ГОСТ СССР 4564-79. Лист скумпии.
6. Разаренова К.Н., Жохова Е.В. Сравнительная оценка содержания дубильных веществ в некоторых видах рода *Geranium* L. флоры северо-запада. Химия растительного сырья, 2011; 4: 187–192.
7. 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 биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2010; 11: 19–23.
8. Мальцева А.А., Чистякова А.С., Сорокина А.А. и др. Количественное определение дубильных веществ в траве горца почечуйного. Вестник ВГУ. Сер.: Химия, Биология, Фармация, 2013; 2: 203–205.
9. Самылина И.А., Абянц Р.К., Гринько Е.Н. Способ определения дубильных веществ в растительном сырье. Патент РФ 2439568 от 12.10.2010 г.
10. Рябина Е.И., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И. Потенциометрическое определение дубильных веществ в лекарственном растительном сырье. Фармация, 2012; 8–10.
11. Сорокина А.А., Марахова А.И. Потенциометрия как метод контроля качества лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества, и препаратов на его основе. Фармация, 2014; 2: 49–53.
12. Марахова А.И., Станишевский Я.М., Потапов В.Т., Сорокина А.А. Разработка и валидация методики потенциометрического определения суммы дубильных веществ в траве зверобоя. Разработка и регистрация лекарственных средств, 2014; 3 (8): 138–141.
13. Абдуллина С.Г., Агапова Н.М., Зиятдинова Г.К. и др. Кулонометрическое определение дубильных веществ в лекарственном растительном сырье. Фармация, 2010; 4: 13–15.
14. Авторы: Коренман Я.И., Новикова Н.А., Нифталиев С.И. Способ раздельного определения таннина и катехинов (в пересчете на галловую кислоту) в чае. Патент РФ 2127878 от 20.03.1999 г.
15. Чумакова В.В., Мезенова Т.Д., Попова О.И. Определение галловой кислоты в траве лопуха анисового методом планарной хроматографии. Химия растительного сырья, 2011; 4: 269–271.
16. Попов И.В., Андреева И.Н., Гаврилин М.В. Определение таннина в сырье и препаратах кровохлебки лекарственной методом ВЭЖХ. Химико-фармацевтический журнал, 2003; 7 (37): 24–26.
17. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Р 4.1.1672-03. М., 2004: 94–95.

Поступила 13 сентября 2015 г.

INVESTIGATIONS FOR DETERMINATION OF TANNING AGENTS IN SEA BUCKTHORN (*Hippophae rhamnoides*) FRUITS

O.V. Trineeva, PhD; N.S. Shikunova; Professor A.I. Slivkin, PhD

Voronezh State University; 1, Universtitetskaya Square, Voronezh 394006, Russia

SUMMARY

Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) is a valuable medicinal plant. The State Pharmacopoeia contains no articles on its fruits. Different procedures for determination of tanning agents in the sea buckthorn fruits were comparatively analyzed to work out a current normative document. The spectrophotometric determination procedure, the basis for which is that the optic density of hydroalcoholic extraction from the fruits is measured at a wavelength of 275 ± 2 nm, is most preferable. The mean determination error is about 2%, which is 3-5 times lower than that in the application of other procedures. A procedure was developed and validated for quantification of tanning agents in the sea buckthorn fruits, calculated with reference to tannin. Preservation was investigated for its impact on the stability of tanning agents in the fruits. Dried ground fruits are recommended as a source of a complex of polyphenolic compounds.

Key words: sea buckthorn; *Hippophae rhamnoides* L.; fresh, frozen fruits; tanning agents; determination.

REFERENCES

1. The Government of the Russian Federation Pharmacopoeia XIII ed. OFS «Determination of tannins in herbal drugs» (<http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakopeynh-statey>). (Date of treatment 10.11.2015) (in Russian).
2. Danilova N.A., Popov D.M. Quantification of tannins in the roots of sorrel horse by spectrophotometry in comparison with the method permanganometry. Herald of the Voronezh State University, Ser.: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2004; 2: 179–182 (in Russian).
3. Grinko E.N. The requirements of the Russian and European Pharmacopoeia methods for the determination of tannins in herbal drugs. Farmatsiya, 2010; 5: 49–53 (in Russian).
4. GOST USSR 4565-79. Leaf sumac. Technical conditions (in Russian).
5. GOST USSR 4564-79. Leaf smoke tree. Technical conditions (in Russian).
6. Razarenova K.N., Zhokhova E.V. Comparative evaluation of the content of tannins in some species of the genus *Geranium* L. Flora northwest. Chemistry grow. Materials, 2011; 4: 187–192 (in Russian).
7. Borovikova N.A., Selezenev N.G., Popov D.M. The spectrophotometric quantification of tannins in the bark of oak, alder stems and water extracts from this raw material // Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry, 2010; 11: 19–23 (in Russian).
8. Maitseva A.A., Chistyakova A.S., Sorokina A.A. et al. Quantification of tannins in the grass mountaineer pochechuynogo. Herald of the Voronezh State University, Ser.: Chemistry, Biology, Pharmacy, 2013; 2: 203–205 (in Russian).
9. Samylina I.A., Aboyants R.K., Grinko E.N. The method for determining the tannins in the plant material. Patent 2439568 on 12.10.2010 (in Russian).
10. Ryabinina E.I., Zotova E.E., Ponomareva N.I. Potentiometric determination of tannins in herbal drugs. Farmatsiya, 2012; 2: 8–10 (in Russian).
11. Sorokina A.A., Marakhova A.I. Potentiometry as a method of quality control of medicinal plant raw materials containing tannin, and preparations based on it. Farmatsiya, 2014; 2: 49–53 (in Russian).
12. Marakhova A.I., Stanishewski Y.M., Potapov V.I., Sorokina A.A. Development and validation of methods of potentiometric determination of the amount of tannins in the grass St. John's wort. Development and registration of medicines, 2014; 3 (8): 138–141 (in Russian).
13. Abdullina S.G., Agapova N.M., Ziyatdinova G.K. et al. Coulometric-defined division of tannins in herbal drugs. Farmatsiya, 2010; 4: 13–15 (in Russian).
14. Korenman Ya.I., Novikov N.A., Niftaliyev S.I. The method for the separate determination of the tannin and catechin (calculated as gallic acid) in tea. Patent 2127878 of 20.03.1999 (in Russian).
15. Chumakova V.V., Mezenova T.D., Popova O.I. Determination of gallic acid in the grass lofanta anise planar chromatography method. Raises Chemicals, raw materials, 2011; 4: 269–271 (in Russian).
16. Popov I.V., Andreev I.N., Gavrilin M.V. Determination of tannin in raw materials and preparations burnet HPLC. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2003; 7: (37): 24–26 (in Russian).
17. Guidelines on how to control the quality and safety of biologically active additives to food. P 4.1.1672-03. Moscow, 2004: 94–95 (in Russian).