

## FATTY OILS: DETERMINATION OF THE LEVELS OF HEAVY METALS

I.V. Gravel, PhD; Professor I.P. Rudakova, PhD; Professor I.A. Samylina, PhD

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991, Russian Federation

## SUMMARY

Informational and analytical studies were conducted to determine heavy metals in the fatty oils used in medicine and food industry. Pharmacopoeias recommend calorimetry for the total determination of heavy metals and an atomic absorption method for the quantification of individual metals. The safety of fatty oils in food industry is evaluated on the basis of the respective State Standards. The quantitative determination of individual metals uses atomic emission, inversion voltammetry, and inductively coupled plasma atomic emission in addition to calorimetry and atomic absorption spectrometry.

**Key words:** fatty acids; heavy metals; methods of analysis; pharmacopoeias.

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 615.322:547.98].07

## СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДУБИЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

**А.М. Калинин\***, **Т.Н. Боковикова**, доктор фармацевтических наук,  
**Н.П. Антонова**, кандидат биологических наук

Научный центр экспертизы средств медицинского применения;

Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Обобщены данные по стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и растительных препаратов (ЛРП), содержащих дубильные вещества. Описаны структурные единицы молекулярного строения и их особенности, способы выделения дубильных веществ, методы качественного и количественного определения, применяемые в фармакопейном анализе и в научно-исследовательских работах. Методы количественного определения дубильных веществ рассмотрены в соответствии с групповой принадлежностью дубильных веществ и их физико-химическими свойствами. Рассмотрены вопросы, связанные с использованием стандартных образцов для анализа дубильных веществ.

**Ключевые слова:** дубильные вещества, выделение, методы идентификации и методы количественного анализа.

\*E-mail: artem.kalinin.m@gmail.com

Дубильные вещества (ДВ) представляют собой водорастворимые полифенолы, обладающие вязким вкусом, способные осаждать белки и имеющие молекулярную массу в пределах от полутысячи до нескольких тысяч а.е.м. [1]. Способность связываться с белками определила их первоначальное использование и название – ДВ служили для дубления кожи. Этим вызвано требование к растворимости их в воде и ограничение по молекулярной массе: водорастворимые полифенолы с меньшей молекулярной массой не связываются с белками, в то время как полифенолы с большой молекулярной массой не растворяются в воде [2].

ДВ разделяют на 3 группы. 1-я группа – конденсированные ДВ, или конденсированные проантоцианидины. При взаимодействии с минеральными кислотами они образуют окрашенные конденсированные соединения, а при окислении в присутствии

кислорода – антоцианидины [1]. Структурной единицей этой группы является флаван-3-ол (рис. 1), при этом в растениях присутствуют как олигомеры, состоящие из 2–5 структурных единиц флаван-3-ола, так и полимеры, молярная масса которых может достигать 20000 [3].

Полимеры флаван-3-ола не растворимы в воде, поэтому, исходя из определения этой группы биологически активных веществ, они не могут быть отнесены к ДВ. Однако в исследовательских целях такие соединения также рассматриваются как ДВ. Подобное допущение возникло в XX веке в процессе изучения этой группы веществ.

2-я группа – гидролизуемые ДВ [3]. Они представлены сложными эфирами галловой кислоты с глюкозой (рис. 2).

3-я группа – флоротанины – была открыта значительно позже 2 других и содержит меньшее количество веществ [3]. Структурной единицей флоротанинов является флороглюцинол (рис. 3).

Присутствующие в растениях ДВ представляют собой смесь мономеров, олигомеров и полимеров, различных по структуре и составу. В зависимости от используемого растворителя экстрагируются разные компоненты этой смеси. Например, в настоящее время в нашей стране растительные препараты, содержащие ДВ, используются в медицине в виде отваров, поэтому фармакопейные методы предполагают извлечение действующих веществ водой при нагревании [4]. В то же время для научных и исследовательских целей используются метиловый и этиловый спирты, ацетон и другие растворители, как правило, в смеси с водой [5].

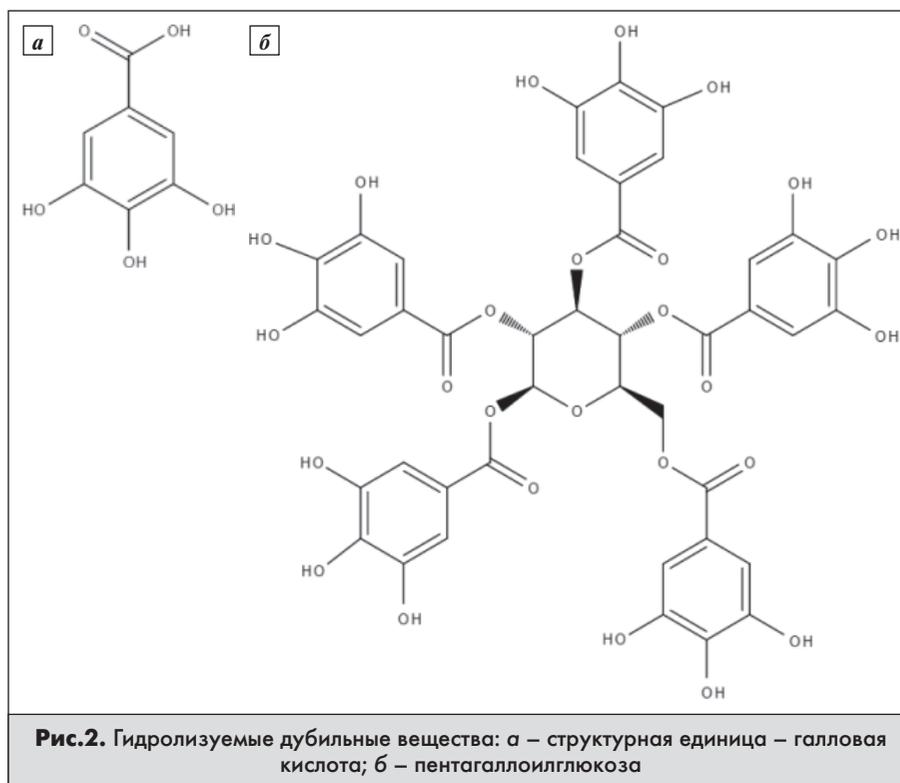
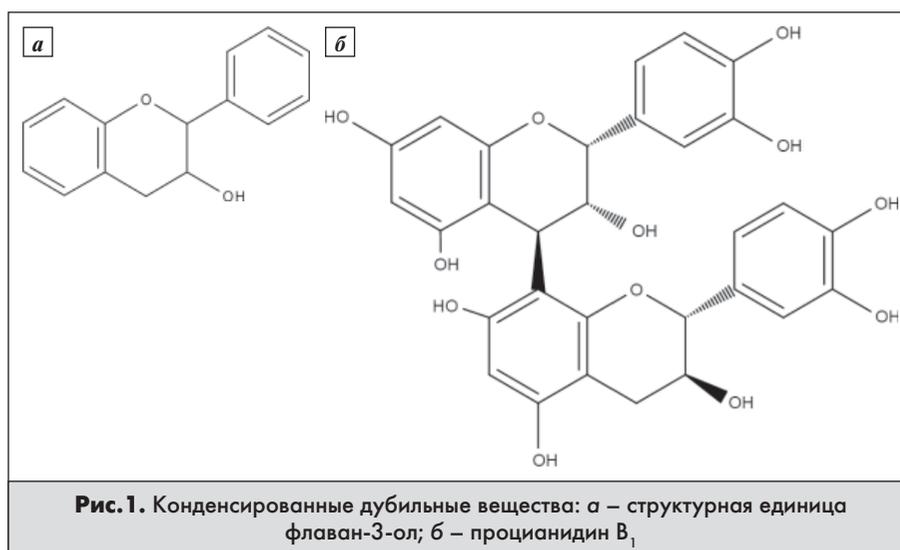
Для целей идентификации ДВ применяются качественные реакции, тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Наиболее часто для открытия ДВ в ЛРС и ЛРП используются качественные реакции с солями железа (III): железо-аммониевыми квасцами или хлоридом железа. При этом окраска продуктов реакции указывает на принадлежность открываемых ДВ к той или иной группе: черно-синее окрашивание в присутствии гидролизуемых ДВ, а черно-зеленое – конденсированных ДВ.

Отдельные методики ТСХ описаны для конденсированных и гидролизуемых ДВ. В качестве стандартных веществ используются структурные единицы ДВ, отдельные ДВ и очищенные экстракты растений. Для обнаружения ДВ, как правило, применяются растворы солей железа [6].

Гидролизуемые ДВ могут быть разделены посредством ВЭЖХ, что позволяет оценить качественный состав конкретного препарата или количественное содержание определенного вещества. Описаны методики нормально-фазовой и обращенно-фазовой ВЭЖХ для гидролизуемых ДВ [7] с использованием различных детекторов: ультрафиолетовых, электрохимических, масс-селективных [8]. Применение

ВЭЖХ для анализа конденсированных ДВ затруднено ввиду невозможности разделения полимерных ДВ с большой молярной массой [7]. В связи с этим на стадии пробоподготовки используется кислотнокатализируемое расщепление молекул конденсированных ДВ в присутствии нуклеофила (так называемый тиолиз, если в роли нуклеофила выступает бензил меркаптан) [8]. В результате тиолиза образуются мономеры, соответствующие структурным единицам исходного ДВ.

В исследовательских целях для установления точной структуры больших полимерных структур конден-



сированных ДВ применяются также спектроскопия ядерного магнитного резонанса и времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией [9].

Описано более 100 методов количественного определения ДВ, что вызвано важностью ДВ для пищевой промышленности в XVIII–XIX веках и повышенным интересом к ДВ в конце XX – начале XXI века, а также наличием определенных недостатков у каждого из этих методов. В настоящее время используемые методы количественного определения ДВ могут быть разделены на 3 группы [7]: методы, основанные на взаимодействии с фенольными гидроксильными группами ДВ; методы, основанные на способности ДВ осаждать белки; методы, уникальные для каждой группы ДВ.

В 1-й группе методов используются реакции окисления фенольных групп, содержание ДВ определяется в основном титриметрическим или спектрофотометрическим методами. В качестве титранта, как правило, используется раствор перманганата калия, точка эквивалентности устанавливается по окрашиванию раствора индикатором [4] или потенциометрически [10, 11]. Спектрофотометрические методики основаны на образовании окрашенных продуктов реакции (чаще всего с солями железа) и установлении величины оптической плотности в максимуме поглощения при соответствующей длине волны.

Ко 2-й группе относятся модификации спектрофотометрических методик, сутью которых является определение светопоглощения раствора, содержащего окрашенные продукты реакции, до и после осаждения ДВ белками, по разности этих значений устанавливается количество ДВ, способных к взаимодействию с белками [4]. Возможен другой вариант подобной методики, когда ДВ осаждаются до взаимодействия с солями железа, преципитат отделяется, растворяется в среде с высоким значением

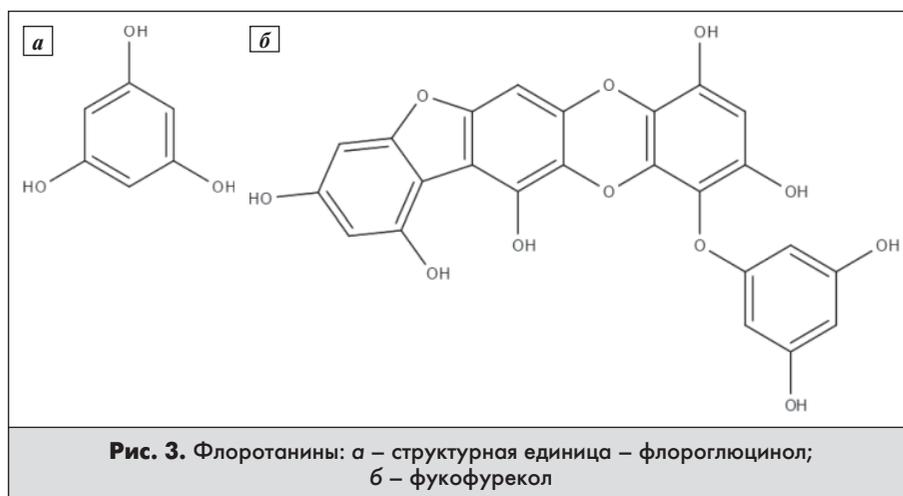
pH, полученный раствор используется для образования окрашенных продуктов реакции, с последующим спектрофотометрическим их определением [7]. Для осаждения используются кожный порошок, казеин и другие вещества [4, 12]. К этой группе относится также метод радиальной диффузии. Суть его заключается в следующем: из агарозы и белка готовится густой гель, который заливается в чашки Петри. В слое геля создаются небольшие лунки, в которые помещаются аликвоты экстракта из растительного сырья или раствора ДВ. Через несколько суток оцениваются сформировавшиеся вокруг лунок кольца преципитации. Их диаметр пропорционален содержанию ДВ в испытуемом образце [13].

Среди методов для определения конденсированных ДВ необходимо отметить кислотно-бутанольный и ванилиновый. При использовании подкисленного бутанола в результате окислительной деполимеризации конденсированных ДВ образуются окрашенные антоцианидины. При взаимодействии конденсированных ДВ с ванилином также образуются окрашенные продукты. Это позволяет для дальнейшего анализа исследуемых ДВ применить спектрофотометрический метод [14].

Специфичность методов определения гидролизуемых ДВ обусловлена возможностью расщеплять эти ДВ на составляющие части, например получить свободную галловую кислоту, содержание которой определяется спектрофотометрически по продуктам реакций с роданином или йодатом калия [15, 16].

Методики ВЭЖХ, используемые для количественного определения ДВ, отличаются в зависимости от исследуемой группы ДВ.

В связи с тем, что содержащиеся в ЛРС ДВ представляют собой смесь различных веществ, использование образцов стандартных веществ в их анализе связано с определенными трудностями. Структурные фрагменты ДВ или простые по строению ДВ могут быть использованы в качестве стандартных веществ, но так как в ЛРС, как правило, содержатся ДВ 2 основных групп, а связь между количеством структурных фрагментов и биологической активностью не всегда прямо пропорциональная, подобный подход может снижать верность определения. Более объективным является использование очищенных экстрактов растений, но при этом существенно возрастают стоимость и трудоемкость анализа.



ОФС «Определение содержания ДВ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ РФ XIII изд. предлагает 2 метода количественного определения ДВ. 1-й метод – перманганатометрия – указывает на антиоксидантную активность отвара, полученного из исследуемого препарата, 2-й метод – спектрофотометрический – позволяет оценить содержание ДВ с точки зрения способности осаждения белков. В фармакопейных методах используют пересчет содержания ДВ на танин (перманганатометрическая методика) и на пирогаллол (спектрофотометрическая методика). При этом нормативы содержания ДВ в ЛРС устанавливаются отдельно для каждой методики, что является особенностью стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих ДВ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДВ представляют собой полифенолы, различающиеся структурными единицами, в зависимости от растворимости в воде и молекулярного веса способные осаждать белки. Для идентификации ДВ применяются качественные реакции, ТСХ, ВЭЖХ. Основными методами количественного определения ДВ являются титриметрия, спектрофотометрия и ВЭЖХ. В качестве стандартных образцов для анализа ДВ могут быть использованы структурные единицы ДВ, мономеры и извлечения из ЛРС.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Haslam E. Plant Polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge: Cambridge University Press., 1989; 230.
2. Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance. Hemingway R.W., Laks P.E., editors; Branham S.J., associate editor. New York: Springer Science+Business Media, 1992; 1053.
3. Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology. Gross G.G., Hemingway R.W., Yoshida T., editors; Branham S.J., associate editor. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 1999; 926.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание М., 2015. (Интернет). Доступно по адресу: <http://femb.ru/feml> (цитировано 14 июня 2016) (Russian State Pharmacopoeia. XIII-ed. Moscow, 2015. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian). (cited 2016 June 14)

5. Chavan U.D., Amarowicz R. Effect of various solvent systems on extraction of phenolics, tannins and sugars from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Int. Food Res. J.* 2013; 20 (3): 1139–44.
6. Cimpoiu C. Analysis of some natural antioxidants by thin-layer chromatography and high performance thin-layer chromatography. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 2006 June; 29: 1125–42.
7. Hagerman A.E. The Tannin Handbook Miami University Oxford, 2002 Available from: <http://www.users.miamioh.edu/hagermae> (cited 2016 June 14). (Internet).
8. Scioneaux A.N., Schmidt M.A., Moore M.A., Lindroth R.L., Wooley S.C., Hagerman A.E. Qualitative variation in proanthocyanidin composition of populus species and hybrids: genetics is the key. *J. Chem. Ecol.*, 2011; 37: 57–70.
9. Zhang L.L., Lin Y.M. HPLC, NMR and MALDI-TOF MS analysis of condensed tannins from *Lithocarpus glaber* leaves with potent free radical scavenging activity. *Molecules.*, 2008; 13: 2986–97.
10. Марахова А.И., Станишевский Я.М., Потапов В.И., Сорокина А.А. Разработка и валидация методики потенциометрического определения суммы дубильных веществ в траве зверобоя. Разработка и регистрация лекарственных средств, 2014; 8: 140–3. (Marakhova A.I., Stanishevskiy Ya.M., Potapov V.I., Sorokina A.A. Development and validation of method for potentiometric determining the amount of tannins in hypericum herb. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, 2014; 8: 140–3 (in Russian)).
11. Позднякова Т.А., Бубенчиков Р.А. Валидация методики количественного определения суммы дубильных веществ в траве герани сибирской (*Geranium Sibyricum* L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2014. 12(11): 15–9. (Pozdnyakova T.A., Bubenchikova R.A. Validation of a procedure to quantify the amount of tannins in the Siberian geranium (*Geranium sibiricum* L.) herb. *Voprosy Biologicheskoi. Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii.*)
12. Бузук Г.Н., Фомичева А.Р., Корожан Н.В., Родионова Н.Н. О возможности применения казеина для количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье. Вестник фармации, 2011; 44–54: 12–7. (Buzuk G.N., Fomichova A.R., Korozhan N.V., Rodionova N.N. About the possibility of casein using for quantitative analysis of tannins in plant raw material. *Vestnik farmacii*, 2011; 44–54: 12–7 (in Russian)).
13. Hagerman A.E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ecol.*, 1987; 13 (3): 437–49. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01880091>
14. Mbugua D., Pell A.N. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2001; 91: 21–40.
15. Inoue K.H., Hageman A.E. Determination of gallotannin with rhodanine. *Anal. Biochem.* 1988; 169 (2): 363–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269788902965>
16. Hartzfeld P.W., Forkner R., Hunter M.D., Hagerman A.E. Determination of hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 1785–90.

Поступила 10 августа 2016 г.

## STANDARDIZATION OF RAW MEDICINAL PLANT MATERIAL AND HERBAL DRUGS CONTAINING TANNINS

A.M. Kalinin; T.N. Bokovikova, PhD; N.P. Antonova, PhD

Research Center for Examination of Medical Products; 8, Petrovsky Boulevard, Build. 2, Moscow 127051, Russian Federation

### SUMMARY

The paper summarizes data on the standardization of raw medicinal plant materials and herbal drugs containing tannins. It describes molecular structural units and their features, methods for extraction of tannins, and those for qualitative and quantitative determination, which are used in pharmacopoeial analysis and researches. Assays for tannins are considered according to their group and physicochemical properties. The issues associated with the use of standard samples for tannin analysis are considered.

**Key words:** tannins, extraction, identification methods and assays.