

УДК 615.322

## ОПТИМИЗАЦИЯ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОРНЯХ СОЛОДКИ

Б. В. Бровченко<sup>1\*</sup>, В. А. Ермакова<sup>2</sup>, А. Н. Кузьменко<sup>2</sup>, И. А. Самылина<sup>2</sup>,  
И. И. Краснюк (мл.)<sup>2</sup>

**Резюме.** Проведена сравнительная оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки методами УФ-спектрофотометрии (ГФ РФ XIII) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Разработана пробоподготовка для ВЭЖХ-метода количественного определения глицирризиновой кислоты в образцах отечественного производства. Экспериментально установлена малая селективность УФ-спектрофотометрии при определении глицирризиновой кислоты и показана перспективность метода ВЭЖХ для стандартизации сырья солодки.

**Ключевые слова:** глицирризиновая кислота, сырье солодки, моноаммония глицирризинат, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), УФ-спектрофотометрия, пробоподготовка, селективность метода, количественное определение, лекарственное растительное сырье.

### OPTIMIZATION OF HPLC METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYCYRRHIZIC ACID IN LICORICE ROOTS

B. V. Brovchenko<sup>1\*</sup>, V. A. Ermakova<sup>2</sup>, A. N. Kuzmenko<sup>2</sup>, I. A. Samylina<sup>2</sup>, I. I. Krasnyuk (Jr.)<sup>2</sup>

**Abstract.** Comparative evaluation of glycyrrhizic acid content in licorice roots by methods of UV-spectrophotometry (GF RF XIII) and high-performance liquid chromatography (HPLC) was carried out. Sample preparation for HPLC method of quantitative determination of glycyrrhizic acid in samples of domestic production is developed. Small selectivity of UV-spectrophotometry at determination of glycyrrhizic acid is experimentally established and perspective of HPLC method for standardization of licorice raw materials is shown.

**Keywords:** glycyrrhizic acid, licorice raw materials, monoammonium glycyrrhizinate, high-performance liquid chromatography (HPLC), UV spectrophotometry, sample preparation, selectivity of the method, quantitative determination, medicinal plant raw materials.

1 – ООО «АЗТ Фарма К.Б.», 121552, Россия, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А

2 – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8

1 – LLC «AZT PHARMA K.B.», 15A, 3-rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

2 – Sechenov First State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: b.brovchenko@bk.ru

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальной является оптимизация методов контроля качества растительных лекарственных средств (в том числе исходного сырья), используемых для контроля серийной продукции и надежного выявления фальсификатов.

Развитие методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) расширяет возможности её использования для анализа лекарственного растительного сырья.

Солодка давно и широко используется в лечебной практике. Известна своими целебными свойствами благодаря содержащимся в её корнях тритерпеновым сапонинам, флавоноидам, глицирризиновой кислоте и другим биологически активным соединениям (БАС). Количественное содержание глицирризиновой

кислоты (ГК) согласно ФС.2.5.0040.15 «Солодки корни» ГФ РФ XIII издания [1] проводится методом УФ-спектрофотометрии (не менее 6%) [2], в то время как в зарубежных фармакопеях Европейского союза, США, Китая и Японии [3–6] для стандартизации сырья солодки используется метод ВЭЖХ и содержание ГК нормируется на уровне 2–4%. Следует отметить, что в РФ используется сырье солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). За рубежом наряду с указанными видами солодки используют корни других видов, например солодки вздутой (*Glycyrrhiza inflata* Bat.)

### Цель исследования

Разработать ВЭЖХ-методику для стандартизации сырья и препаратов солодки, применяемых в отечественной фармацевтической практике. Провести сравнительную оценку содержания

ГК в корнях солодки методом УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ. Оценить селективность метода УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

### Объекты и методы исследования

В качестве объекта исследования были взяты образцы корней солодки производства ОАО «Красногорсклексредства» (серия 141116), в качестве эталона сравнения использовался стандартный образец моноаммонийной соли кислоты глицирризиновой USP CRS (СО ГК). Исследования проводили на УФ-спектрофотометре Shimadzu UV-1800 с двухлучевой оптической схемой, спектральным диапазоном 190–1100 нм, с детектором – кремниевым фотодиодом и шириной щели 1 нм, а также на ВЭЖХ-системе Alliance, Empower 2 (Waters, США), снабженной спектрофотометрическим детектором и колонкой Luna-Omega C18, 4,6x250 мм (Phenomenex, США), заполненной полнопористым октадецилсиланом, с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и раствора 0,5% ортофосфорной кислоты в соотношении 40:60 при расходе элюента 1 мл/мин. Детектирование осуществляли при 254 нм, объем вводимой пробы составлял 10 мкл.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемый объект был проанализирован фармакопейным методом УФ-спектрофотометрии по ФС.2.5.0040.15 «Солодки корни». Далее изучали хроматографические характеристики стандартного образца моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты (СО ГК). В ходе исследования готовили раствор СО ГК из расчета содержания ГК в корнях солодки не менее 6% в следующей концентрации: 0,0165 г стандартного образца аммония глицирризината помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл метанола, доводили до метки метанолом и перемешивали (концентрация – 660 мкг/мл). УФ-спектр раствора СО ГК не отличался от спектра испытуемого раствора (рисунок 1). Данное исследование проводили для уста-

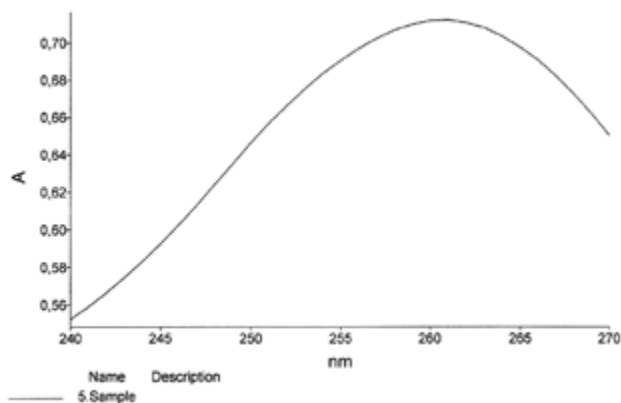


Рисунок 1. УФ-спектр раствора СО ГК

новления возможности использования метода пробоподготовки по ГФ XIII при количественном определении ГК методом ВЭЖХ. При сравнении максимумов поглощения на УФ-спектрофотометре испытуемого раствора и раствора СО ГК спектры не отличались друг от друга. Далее проводили сравнительное изучение экстракции ГК фармакопейным способом при помощи методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ с целью определения погрешности первого и возможности использования фармакопейного метода пробоподготовки для второго. В результате было установлено, что метод УФ-спектрофотометрии определяет содержание ГК на уровне 10%, а ВЭЖХ – на уровне 2%. Исследования проводили в шести повторностях. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты определения содержания ГК методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ

№ п/п	Навеска, г	УФ-спектрофотометрия		ВЭЖХ	
		Поглощение	Содержание ГК, %	Площадь пика, мВ·с	Содержание ГК, %
1	2,0233	0,5801	8,93	176,242	1,86
2	2,1402	0,8167	11,88	217,883	2,16
3	2,3343	0,9110	12,15	230,578	2,10
4	1,8865	0,6219	10,26	175,809	1,98
5	2,3475	0,7126	9,45	233,945	2,12
6	2,5395	1,0150	12,44	260,597	2,18
Среднее			<b>10,85</b>		<b>2,06</b>
Ст. откл.			<b>1,50</b>		<b>0,12</b>
RSD, %			<b>13,81</b>		<b>5,81</b>

Стоит отметить, что при определении содержания ГК методом ВЭЖХ в растворах, полученных фармакопейным способом пробоподготовки, на хроматограммах наблюдался дополнительный пик на 3,345 минуты, который был значительно больше пика искомого компонента (рисунок 2). На хроматограмме СО ГК дополнительного пика не наблюдалось (рисунок 3). При использовании фармакопейного способа пробоподго-



Рисунок 2. Хроматограмма испытуемого раствора

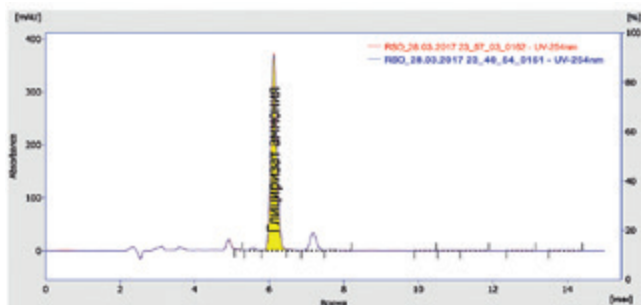


Рисунок 3. Хроматограмма раствора СО ГК

товки в процессе экстракции из корней солодки, кроме глицирризиновой кислоты, в раствор дополнительно экстрагируется сумма веществ, поглощающих в диапазоне длин волн от 250 до 270 нм.

Результаты, полученные методом УФ-спектрофотометрии, соответствуют требованию ФС.2.5.0040.15 и превышают нормированное содержание ГК в корнях солодки в 1,5–2 раза; данные ВЭЖХ дают результат в 2–3 раза меньше нормы, установленной ФС. Нужно отметить, что метод выделения моноаммонийной соли ГК, изложенный в ГФ XIII, не в полной мере полноценен и существует целый ряд исследований по его модификации [9, 10]. Для установления более точного содержания ГК в корнях солодки было принято решение применить метод ВЭЖХ, как более селективный, и на основании литературных данных подобрать способ пробоподготовки, обеспечивающий наилучшую экстракцию ГК. В ходе анализа литературных сведений [7, 8, 11] установлено, что наилучшие результаты экстрагирования были получены при использовании водно-метанольной смеси в соотношении 50:50. В приведенных литературных источниках указано, что сырьем для исследований служили корни солодки Коржинского (*Glycyrrhiza korshinskyi* Grig.), не являющейся официальным видом в РФ. Учитывая этот факт, нами при разработке методики ВЭЖХ для оценки качества сырья и препаратов солодки, разрешенных в РФ, экспериментально были подобраны условия экстракции и экстрагенты. В исследовании апробированы следующие водно-метанольные смеси: соотношение метанол : вода – 50:50; 70:30; 30:70. Экстракцию проводили при комнатной температуре на УЗ-бане дважды по 30 минут с перерывом 10 минут.

При проведении испытаний готовили по пять навесок (около 0,5 г). Для анализа точную навеску измельченных корней солодки, около 0,5 г, с размером частиц, проходящих сквозь сито 0,2 мм, помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 100 мл соответствующего растворителя, закрывали пробкой, перемешивали, маркировали в соответствии с установленным кодом раствора. Помещали в УЗ-баню и обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут. По

истечении установленного времени колбу вынимали из ванны, давали раствору остыть при комнатной температуре в течение 10 минут, затем снова обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут. При охлаждении растворов в перерывах между экстрагированиями воду в бане заменяли на свежую комнатной температуры. Такой подход к экстрагированию был определен в ходе анализа данных литературы, согласно которым наилучший результат был достигнут при двукратной обработке ультразвуком с перерывом для охлаждения образцов [8]. Все растворы после их соответствующей обработки отстаивали в течение 10 минут. Далее, используя автоматический дозатор вместимостью 10 мл, отбирали 5 мл испытуемого раствора из центра соответствующей конической колбы, переносили в пластиковый шприц Лурье, который был соединен с фильтрующей насадкой PVDF диаметром 15 мм и размером пор 0,45 мкм (CHROMAFIL P-45/15 MS, Macherey-Nagel, кат. № 729 044). Пробу фильтровали, отбрасывая первый миллилитр. Фильтрат использовали в хроматографическом анализе. В указанных условиях пик глицирризиновой кислоты фиксируется на хроматограмме на 6,456 минуты при эффективности  $6500 \pm 350$  т.т. и коэффициенте асимметрии 0,85–1,0. Время хроматографирования – 15 мин. С каждым экстрагентом извлечение проводили в пяти повторностях, а хроматографирование каждой пробы проводили дважды и затем усредняли полученные результаты.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как описано выше, при использовании фармакопейного способа пробоподготовки в процессе экстракции из корней солодки, кроме глицирризиновой кислоты, в раствор дополнительно экстрагируется сумма веществ, поглощающих в диапазоне длин волн от 250 до 270 нм, это дает основание считать, что метод УФ-спектрофотометрии является интегральным и дает завышенный результат совокупности экстрагированных веществ. Об этом свидетельствует и метод ВЭЖХ: на приведенных примерах хроматограмм дополнительный пик значительно больше пика искомого компонента. Подтверждением этому является достаточно большой разброс значений содержания ГК при её количественном определении в корнях солодки разными методами (таблица 1): среднее значение УФ-спектрофотометрии – 10,85% (минимум составляет 8,93%, максимум – 12,44%, разброс значений – 32%); ВЭЖХ – 2,06% (минимум составляет 1,85%, максимум – 2,19%, разброс значений – 16%).

Как уже было сказано выше, для определения наилучшей экстракции ГК были подобраны три соотношения растворителей (метанол/вода) – 50:50; 70:30; 30:70. Растворители готовили, точно отмеривая мерным цилиндром количества, приливая метанол к воде. Для проведения испытаний подготавливали по пять

навесок (около 0,5 г) и экстрагировали на УЗ-бане при описанных выше условиях. Хроматографирование по каждой навеске вели в двух повторностях, полученные данные усредняли. Данные по количественному содержанию глицирризиновой кислоты выбранным методом представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты определения ГК с использованием указанных типов экстрагентов

Метанол/ вода 70:30	Навеска, г	Содержа ние ГК, %	Метанол/ вода 50:50	Навеска, г	Содержа ние ГК, %	Метанол/ вода 30:70	Навеска, г	Содержа ние ГК, %
1	0,5117	5,02	1	0,5022	5,64	3-1	0,4980	5,54
2	0,4931	5,39	2	0,5050	5,57	3-2	0,4933	5,67
3	0,4997	5,34	3	0,5105	5,65	3-3	0,5015	5,69
4	0,4967	5,47	4	0,4912	5,62	3-4	0,4912	5,82
5	0,4997	5,52	5	0,4982	5,64	3-5	0,5086	5,81
Среднее значение		<b>5,35</b>			<b>5,62</b>			<b>5,70</b>
Стат. откл.		<b>0,19</b>			<b>0,04</b>			<b>0,10</b>
RSD, %		<b>3,51</b>			<b>0,76</b>			<b>1,84</b>

Как видно из таблицы, максимальное содержание ГК достигается при использовании в качестве экстрагента смеси метанол : вода в соотношении 30:70.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе разработки ВЭЖХ-методики для стандартизации сырья солодки проведена сравнительная оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки методом УФ-спектрофотометрии (ГФ XIII) и предложенным методом ВЭЖХ с использованием пробоподготовки по ГФ XIII. Установлено, что фармакопейный метод дает завышенные результаты (более 10% ГК от нормы); предложенный метод ВЭЖХ показывает содержание ГК в корнях солодки около 2%, что свидетельствует о большей селективности метода.

Ввиду сложности пробоподготовки фармакопейного метода и наличия в экстракте дополнительной суммы веществ разработана методика ВЭЖХ, в рамках которой экспериментально обоснованы оптимальные условия экстракции ГК из сырья солодки, применяемо в отечественной фармацевтической практике.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности использования метода ВЭЖХ для оценки качества сырья и препаратов солодки, а также включения его в нормативную документацию.

## ЛИТЕРАТУРА

1. ФС 2.5.0040.15. Солодки корни // Государственная фармакопея РФ. XIII изд. – М., 2015.
2. ФС 573. Корень солодки // Государственная фармакопея СССР. X изд. – М.: Медицина, 1968.
3. The United States Pharmacopeia, USP30 NF25. 2009. V. 2. Liquorice. P. 2263.
4. European Pharmacopoeia 7th edition: Liquorice root – Liquiritiae radix 01/2011: 0277.
5. Pharmacopoeia of the people's republic of China. 2005. V. 1. P. 207–209.
6. The Japanese Pharmacopoeia, 14<sup>th</sup> ed. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan Part 2. 2002. P. 932–933.
7. Гаврилин М. В., Сенченко С. П., Тамирян А. М., Печенова А. В. Совершенствование способов оценки качества корней и сиропа солодки // Химия растительного сырья. 2009. № 4. С. 147–150. [Gavrilin M. V., Senchenko S. P., Tamiryana A. M., Pechenova A. V. Improvement of methods for assessing the quality of licorice roots and syrup // Chemistry of plant raw materials. [Perfection of methods for assessing the quality of roots and licorice syrup // Chemistry of plant raw materials.] 2009. № 4. P. 147–150.]
8. Hennell J. R., Lee S., Khoo C. S. The determination of glycyrrhizic acid in Glycyrrhiza uralensis Fisch. ex DC. (Zhi Gan Cao) root and the dried aqueous extract by LC-DAD // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. V. 47. P. 494–500.
9. Столярова О. В., Балтина Л. А., Михайлова Л. Р. и др. Оптимизация метода получения моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты из корней солодки уральской Glycyrrhiza uralensis Fisch.) сибирских популяций // Химия в интересах устойчивого развития. 2008. Т. 16. № 5. С. 571–576. [Stolyarova O. V., Baltina L. A., Mikhailova L. R. etc. Optimization of the method of obtaining monoammonium salt of glycyrrhizic acid from the roots of the Ural licorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch.) Siberian populations // Chemistry for sustainable development. [Optimization of the method for obtaining the monoammonium salt of glycyrrhizic acid from the roots of the licorice of the Ural Glycyrrhiza uralensis Fisch.) Of Siberian populations // Chemistry for Sustainable Development.] 2008. V. 16. № 5. P. 571–576.]
10. Wang P., Li S. F. Y., Lee H. K. Simultaneous analysis of glycyrrhizin, paeoniflorin, quercetin, ferulic acid, liquiritin, formononetin, benzoic acid and isoliquiritigenin in the Chinese proprietary medicine Xiao Yao Wan by HPLC // J. Chromatograph. A. 1998. V. 811. № 1–2. P. 219–224.
11. Кондратенко Р. М., Балтина Л. А., Михайлова Л. Р., Данилов В. Т., Габбасов Т. М., Муринов Ю. И., Толстиков Г. А. Получение глицирризиновой кислоты и ее практически важных солей из экстракта солодкового корня // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т. 39. № 2. С. 33. [Kondratenko R. M., Baltina L. A., Mikhailova L. R., Danilov V. T., Gabbasov, T. M., Murinov Y.I., Tolstikov G.A. Preparation of glycyrrhizic acid and its salts are practically important from the extract of licorice root // Chemical-pharmaceutical journal. [The preparation of glycyrrhizic acid and its practically important salts from the extract of licorice root // Khimiko-pharmaceutical magazine.] 2005. V. 39. № 2. P. 33.]