

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-87-91
УДК 615.32: 547.9: 543.544

Оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки и продуктах их переработки методом ВЭЖХ-УФ

Б. В. Бровченко^{1*}, В. А. Ермакова², Д. О. Боков^{2,3}, И. А. Самылина², Н. Б. Лазарева²

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

2 – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

3 – ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Россия, Москва, Устьинский проезд, 2/14

*Контактное лицо: Бровченко Богдан. E-mail: b.brovchenko@bk.ru

Статья получена: 12.03.2019. Статья принята к печати: 01.04.2019

Резюме

Введение. Актуальной формой фасовки корней солодки для получения водных извлечений являются фильтр-пакеты. Новые формы переработки корней солодки обеспечивают надлежащие технологические свойства сырья для фильтр-пакетов.

Цель. Проведение сравнительной оценки содержания глицирризиновой кислоты (ГК) в корнях солодки (КС), производимых в РФ и в сырье солодки различных способов переработки методом ВЭЖХ-УФ.

Материалы и методы. Объектами исследований послужили измельченные КС, фасованные в пакеты, промышленного производства и лабораторно-промышленные образцы крупномолотый порошок (КП), гранулах резано-прессованных (ГРП) и композиции, предлагаемой для фасовки в фильтр-пакеты. Определено содержание ГК проводили на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1200, оснащенной фотодиодным детектором (Agilent Technologies, США). Неподвижная фаза – колонка Phenomenex Luna® C18(2) 250×4,6 мм. Состав подвижной фазы – 5% водный раствор ортофосфорной кислоты: ацетонитрил – (60:40). Скорость потока 1,0 мл/мин, изократический режим элюирования. Температура колонки 30 °С. Объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование проводили при длине волны 254 нм; время хроматографирования – 15 мин.

Результаты их обсуждения. Определено содержание ГК в КП, ГРП и композиции порошка и резано-прессованных гранул – в соотношении 80:20 (композиция). Установлено, что содержание ГК варьирует в КС в диапазоне – 7,08–9,17%, КП – 3,87–3,90%, ГРП – 6,88–7,08% и композиции – 4,44–4,88%.

Заключение. Применение ВЭЖХ-УФ метода для стандартизации корней солодки отечественного производства и корней различных форм переработки является весьма перспективным. Методика может рекомендоваться к включению в Государственную Фармакопею Российской Федерации последующего издания, что позволит гармонизировать требования к качеству отечественного сырья солодки с требованиями зарубежных фармакопей.

Ключевые слова: глицирризиновая кислота, корни солодки, моноаммония глицирризинат, ВЭЖХ-УФ, количественное определение, крупный порошок, гранулы резано-прессованные, композиция.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Бровченко Б. В., Ермакова В. А., Боков Д. О., Самылина И. А., Лазарева Н.Б. Оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки и продуктах их переработки методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(2): 87–91.

Evaluation of Glycyrrhizic Acid Content in Licorice Roots and Products of its Processing by HPLC-UV Method

Б. В. Бровченко^{1*}, В. А. Ермакова², Д. О. Боков^{2,3}, И. А. Самылина², Н. Б. Лазарева²

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

2 – I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

3 – Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14, Ustyinsky pr., Moscow, 109240, Russia

*Corresponding author: Bogdan V. Brovchenko. E-mail: b.brovchenko@bk.ru

Received: 12.03.2019. Accepted: 01.04.2019

Abstract

Introduction. The actual form of packaging licorice roots for water extraction are filter paper sachets. New forms of licorice root processing provide the proper technological properties of raw materials for filter paper sachets.

Aim. A comparative assessment of the glycyrrhizic acid (GA) content in licorice roots (LR), produced in the Russian Federation and in licorice raw materials of various processing methods by HPLC-UV.

Materials and methods. The objects of research were crushed LR, packaged in packs of industrial production and laboratory-industrial samples of coarse powder (CP), cut-pressed granules (CPG) and compositions proposed for packaging in filter paper sachets. The determination of GA content was carried out on an Agilent 1200 high performance liquid chromatography system equipped with a photodiode array detector (Agilent Technologies, USA). The stationary phase is column Phenomenex Luna® C18 (2) 250×4.6 mm. The composition of the mobile phase – 5% orthophosphoric acid water solution: acetonitrile (60:40). A flow rate – 1.0 ml/min, isocratic elution mode. The temperature of the column – 30 °C. The sample injected volume – 10 µl. Detection was performed at a wavelength of 254 nm; run time – 15 minutes.

Results and discussion. The GA content in CP, CPG and the composition of CP and CPG – was determined in the ratio of 80:20 (composition). It was established that the GA content varies in the LR in the range – 7.08–9.17%, CP – 3.87–3.90%, CPG – 6.88–7.08%, and the composition – 4.44–4.88%.

Conclusion. The use of HPLC-UV method for the standardization of licorice roots of domestic production and the roots of various forms of processing is very promising. The technique can be recommended for inclusion in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation of a subsequent edition, which will allow harmonizing the quality requirements of domestic licorice raw materials with the requirements of foreign pharmacopoeias.

Keywords: glycyrrhizic acid, licorice roots, monoammonium glycyrrhizinate, HPLC-UV, quantitative determination, coarse powder, cut-pressed granules, composition.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Brovchenko B. V., Ermakova V. A., Bokov D. O., Samylyna I. A., Lazareva N. B. Evaluation of glycyrrhizic acid content in licorice roots and products of its processing by HPLC-UV method. *Drug development & registration.* 2019; 8(2): 87–91.

ВВЕДЕНИЕ

Корни солодки в настоящее время являются наиболее используемым в медицине видом лекарственного растительного сырья. Широкий спектр фармакологической активности обусловлен химическим составом данного вида сырья, а именно наличием различных групп биологически активных соединений (БАС), наибольший интерес из которых представляют тритерпеновые сапонины: глицирризиновая кислота и ее производные [1–4]. Корни солодки используются в качестве сырья для приготовления отваров, в производстве различных сборов и многочисленных лекарственных средств.

Популярной формой фасовки лекарственных растительных субстанций для получения водных извлечений являются фильтр-пакеты [5]. Производство корней солодки, фасованных в фильтр-пакеты по традиционной технологии, до настоящего времени не осуществлялось, так как для этого вида сырья характерна выраженная волокнистая структура, ухудшающая сыпучесть порошка и снижающая его насыпную плотность. Для решения этой задачи на ОАО «Красногорсклексредства» была разработана новая форма переработки сырья солодки: в виде крупного порошка (КП) с размером частиц 2–0,2 мм; гранул резано-прессованных (ГРП) и композиции порошка и резано-прессованного сырья – КП:ГРП в соотношении 80:20 (композиция). Согласно ОФС.1.4.1.0022.15 гранулы резано-прессованные – лекарственная форма, представляющая собой кусочки цилиндрической, округлой или неправильной формы, полученные из лекарственного растительного сырья и предназначенные для получения водных извлечений [6]. Композиция по своим технологическим свойствам (размер частиц, насыпная плотность, сыпучесть и др.) отвечает требованиям необходимым для фасовки корней солодки в фильтр-пакеты [7]. Сравнительный анализ качественного химического состава КП, ГРП и Композиции методом ТСХ подтвердил их идентичность [8].

Цель исследования

Целью данного исследования явилось определение количественного содержания ГК в КС, КП, ГРП и композиции методом ВЭЖХ-УФ.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований послужили измельченные корни солодки (КС), фасованные в пакеты, производства ОАО «Красногорсклексредства» (серии под обозначением «КРПС»), ЗАО «Здоровье» (серия под обозначением «ЗД»), ООО «Лекра-СЭТ» (серия под обозначением «ЛС»); лабораторно-промышленные образцы КП, ГРП и композиции, предлагаемой для фасовки в фильтр-пакеты по 1,5-2,0 г (под соответствующими обозначениями – «КП», «ГРП», «К»).

Определение содержания ГК проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. Методика была разработана с учетом основных физико-химических свойств ГК и матрицы – лекарственного растительного сырья. Подбор оборудования, подвижной и неподвижной фаз осуществлялся в соответствии с критериями приемлемости и доступности для контрольно-аналитических лабораторий в РФ. Валидация методики проводилась в соответствии с [10, 11].

Для анализа использовалась система высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1200, оснащенной фотодиодноматричным детектором (Agilent Technologies, США). Неподвижная фаза – С18 как наиболее подходящая для анализа ГК, исходя из её физико-химических свойств; колонка Phenomenex Luna® C18(2) 250x4,6 мм, заполненная сорбентом с размером частиц 5 мкм с предколонкой C18, 4x3,0 мм. Состав подвижной фазы – 5% водный раствор ортофосфорной кислоты: ацетонитрил – (60:40). Скорость потока 1,0 мл/мин, изократический режим элюирования. Температура колонки 30 °С. Объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование проводили при длине волны 254 нм. Время хроматографирования – 15 мин.

В качестве стандартного образца использовалась соль глицирризиновой кислоты – глицирризинат аммония кислоты (Ammonium Glycyrrhizate USP, Catalog # 1029929, Lot F0L228, США).

Реактивы для экспериментального исследования применяли с маркировкой чистоты «ХЧ», «ЧДА», «ОСЧ».

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика приготовления раствора для анализа. Около 0,5 г (точная навеска) измельченной пробы, размером частиц проходящих сквозь сито 0,2 мм помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 100 мл растворителя (метанол : вода для хроматографии в соотношении 30:70), закрывают пробкой, перемешивают и обрабатывают ультразвуком в течение 30 минут при 35 кГц. По истечении установленного времени, колбу вынимают из УЗ-ванны, дают раствору остыть в течение 10 мин, затем снова обрабатывают ультразвуком в течение 30 минут. При охлаждении раствора, в перерывах между экстрагированиями, воду в бане заменяют на свежую, с комнатной температурой. Дают раствору отстояться 10 мин. С помощью механического дозатора отбирают 5 мл раствора из центра колбы и фильтруют через фильтр типа «Миллипор» из поливинилиденфторида (0,45 мкм, PVDF, «Millipore», США) или аналогичный, отбрасывая первый мл фильтрата [12].

В качестве стандартного раствора использовали 0,66 мг/мл раствор ГК в метаноле и воде для хроматографии (30:70).

Содержание глицирризиновой кислоты в 1 г сырья в % (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_x \times a_0 \times 100 \times P}{S_0 \times a_x \times 25},$$

где S_x – площадь пика глицирризиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – средняя площадь пика глицирризиновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора; a_x – навеска препарата, мг; a_0 – навеска стандартного образца, мг; P – содержание основного вещества в стандартном образце, %.

Все определения проводили в трехкратной повторности. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась в соответствии с ОФС 1.1.0013.15 ФФ XIV [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения содержания ГК в КС, КП, ГРП и композиции представлены в таблицах 1–4. Типичные хроматограммы представлены на рисунке 1.

Таблица 1. Содержание глицирризиновой кислоты в корнях солодки

Table 1. The content of glycyrrhizic acid in licorice roots

Серия	Содержание, %	Среднее значение, %	С ст. откл.	RSD%
КРЛС 131116	7,08	7,08	0,006	0,08
	7,07			
	7,08			
КРЛС 141216	7,82	7,80	0,025	0,32
	7,77			
	7,8			
КРЛС 111017	9,15	9,17	0,021	0,23
	9,19			
	9,16			
КРЛС 141217	8,16	8,16	0,006	0,07
	8,17			
	8,16			
КРЛС 101118	7,79	7,75	0,035	0,45
	7,72			
	7,75			
КРЛС 20218	7,65	7,63	0,020	0,26
	7,61			
	7,63			
ЗД 031117	7,48	7,48	0,006	0,08
	7,48			
	7,49			
ЛС 01122016	7,58	7,58	0,006	0,08
	7,58			
	7,59			

Таблица 2. Содержание глицирризиновой кислоты в крупном порошке

Table 2. The content of glycyrrhizic acid in coarse powder

Серия	Содержание, %	Среднее значение, %	С ст. откл.	RSD%
КП 040217	3,80	3,79	0,015	0,40
	3,77			
	3,79			
КП 050217	3,91	3,90	0,012	0,30
	3,89			
	3,89			
КП 070217	3,86	3,87	0,010	0,26
	3,88			
	3,87			

Таблица 3. Содержание глицирризиновой кислоты в гранулах резано-пресованных

Table 3. The content of glycyrrhizic acid in cut-pressed granules

Серия	Содержание, %	Среднее значение, %	С ст. откл.	RSD%
ГРП 011216	6,85	6,88	0,030	0,44
	6,91			
	6,88			
ГРП 021216	7,02	7,01	0,006	0,08
	7,01			
	7,01			
ГРП 031216	7,09	7,08	0,010	0,14
	7,07			
	7,08			

Таблица 4. Содержание глицирризиновой кислоты в композиции

Table 4. The content of glycyrrhizic acid in the composition

Серия	Содержание, %	Среднее значение, %	С ст. откл.	RSD%
КП 040217/ ГРП 011216	4,87	4,88	0,006	0,12
	4,88			
	4,88			
КП 050217/ ГРП 021216	4,45	4,44	0,006	0,13
	4,44			
	4,44			
КП 070217/ ГРП 031216	4,49	4,50	0,006	0,13
	4,50			
	4,50			

Результаты определения содержания ГК свидетельствуют о том, что наибольшее ее количество обнаружено в образцах ГРП (7,08%) и в КС (9,17%). Достаточно высокое содержание ГК установлено в Композиции (4,88%), а наиболее низкое – в КП (3,79%).

Эти результаты вполне согласуются с технологическими особенностями производства КП и ГРП, а

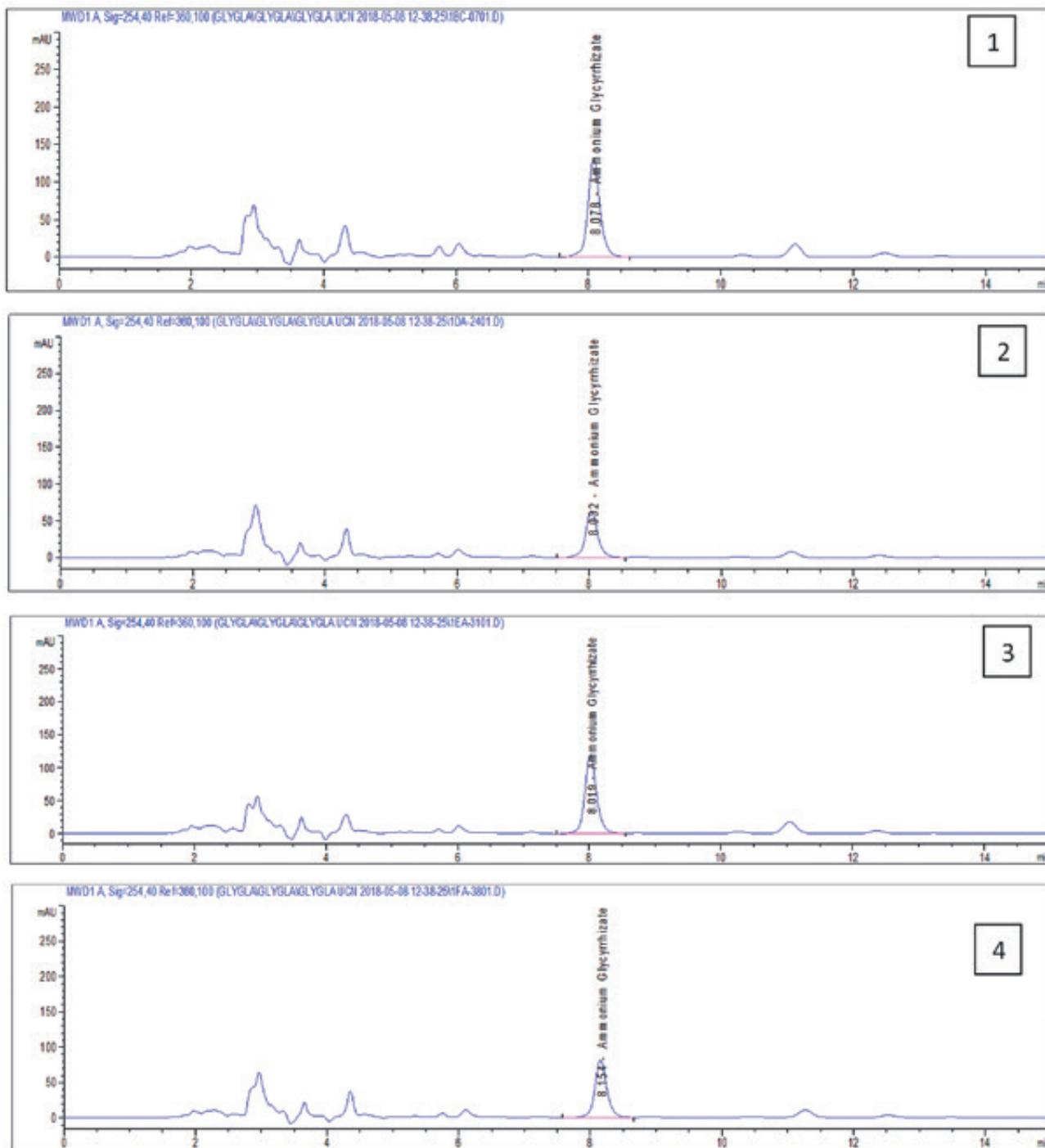


Рисунок 1. Типичные ВЭЖХ-УФ хроматограммы: 1 – КРЛС 131116; 2 – КП 040217; 3 – ГРП 011216; 4 – композиция (КП 040217 / ГРП 011216)

Figure 1. Typical HPLC-UV chromatograms: 1 – KRLS 131116; 2 – CP 040217; 3 – CPG 011216; 4 – composition (CP 040217 / CPG 011216)

именно в производстве ГРП используется фракция измельченного сырья с размером частиц 0,31–0,18 мм, в которую попадают наиболее хрупкие части корней, как правило, более богатые БАС, в том числе и ГК. Композиция – КП : ГРП в соотношении 80:20 отвечает всем технологическим характеристикам, необходимым для производства фильтр-пакетов и содержит достаточное количество ГК [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнительное определение содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки различных форм переработки. Установлено, что содержание ГК варьирует в КС в диапазоне – 7,08–9,17%, КП – 3,87–3,90%, ГРП – 6,88–7,08% и композиции – 4,44–4,88%. Представлена возможность использования

композиции (КП 80: ГРП 20) для производства корней солодки, фасованных в фильтр-пакеты.

Метод ВЭЖХ-УФ позволяет проводить идентификацию и количественное определение только ГК (без сопутствующих соединений), в то время как суммарный показатель, регламентирующий качество сырья в ГФ IV (содержание ГК – не менее 6%), получаемый при помощи метода спектрофотометрии, несколько завышен и с недостаточной точностью отражает истинное содержание ГК в сырье. Таким образом, указанный ВЭЖХ-УФ метод является перспективным для стандартизации корней солодки и различных форм их переработки и может рекомендоваться к включению в Государственную Фармакопею Российской Федерации последующего издания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Поддерживается «Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров».

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang C. L., Zhang R. Y., Han Y. S. et al. Chemical studies of coumarins from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Yao Hsueh Hsueh Pao*. 1991; 26(2): 147–151.
2. Sabbioni C., Mandrioli R., Ferranti A., Bugamelli F., Saracino M. A., Forti G. C., Raggi M. A. Separation and analysis of glycyrrhizin, 18 β -glycyrrhetic acid and 18 α -glycyrrhetic acid in liquorice roots by means of capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1081(1): 65–71.
3. Baltina L. A. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Current medicinal chemistry*. 2003; 10(2): 155–171.
4. Kinoshita T., Tamura Y., Mizutani K. The isolation and structure elucidation of minor isoflavonoids from licorice of *Glycyrrhiza glabra* origin. *Chem. Pharm. Bull.* 2005; 53: 847–849.
5. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (accessed 25.02.2019).
6. ОФС.1.4.1.0022.15 Гранулы резано-прессованные. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 2. Москва. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019).
7. Ермакова В. А., Бровченко Б. В. Изучение технологических показателей порошка корней солодки и резано-прессованного сырья. *В научно-практической конференции Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине*. 2017: 43.
8. Ермакова В. А., Бровченко Б. В., Бобкова Н. В. Изучение характеристик подлинности различных видов переработки сырья солодки. *Сборник I Съезд натуротерапевтов России*. Москва. 2009: 125.
9. ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 1. Москва. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019).
10. Валидация аналитических методик ГФ XIV, ОФС.1.1.0012.15 Государственная Фармакопея РФ XIII. Том 1. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019).
11. Береговых В. В. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. М.: *Литерра*. 2008: 132.
12. Тутельян В. А., Эллер К. И. и др. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи. М.: *Династия*. 2010: 180.

ACKNOWLEDGMENT

The publication has been prepared with the support of the «Sechenov First Moscow State Medical University Program 5-100».

REFERENCES

1. Wang C. L., Zhang R. Y., Han Y. S. et al. Chemical studies of coumarins from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Yao Hsueh Hsueh Pao*. 1991; 26(2): 147–151.
2. Sabbioni C., Mandrioli R., Ferranti A., Bugamelli F., Saracino M. A., Forti G. C., Raggi M. A. Separation and analysis of glycyrrhizin, 18 β -glycyrrhetic acid and 18 α -glycyrrhetic acid in liquorice roots by means of capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1081(1): 65–71.
3. Baltina L. A. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Current medicinal chemistry*. 2003; 10(2): 155–171.
4. Kinoshita T., Tamura Y., Mizutani K. The isolation and structure elucidation of minor isoflavonoids from licorice of *Glycyrrhiza glabra* origin. *Chem. Pharm. Bull.* 2005; 53: 847–849.
5. The state register of medicines. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (accessed 25.02.2019) (in Russ.).
6. GPM.1.4.1.0022.15 Cut-pressed granules. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 2. Moscow. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019) (in Russ.).
7. Ermakova V. A., Brovchenko B. V. The study of technological indicators of powder licorice roots and shredded pressed raw materials. *V scientific-practical conference Modern aspects of the use of plant materials and raw materials of natural origin in medicine*. 2017: 43. (in Russ.).
8. Ermakova V. A., Brovchenko B. V., Bobkova N. V. Study of the characteristics of authenticity of various types of processing licorice raw materials. Collection I Congress of naturotherapists of Russia. Moscow. 2009: 125. (in Russ.).
9. GPM.1.1.0013.15 «Statistical processing of chemical experiment results» State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 1. Moscow. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019) (in Russ.).
10. Validation of analytical techniques SP XIV, PM.1.1.0012.15 State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII. Volume 1. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019).
11. Beregovykh V. V. Validation of analytical methods for drug manufacturers. M.: *Literra*. 2008: 132. (in Russ.).
12. Tutelyan V. A., Eller K. I. et al. Methods of analysis of minor biologically active substances of food. M.: *Dynasty*. 2010: 180. (in Russ.).