

УДК 615.322: 547.9+543.544

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ СОЛОДКИ

© 2005 г. М.В. Егоров, В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, В.А. Быков

Самарский государственный медицинский университет

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (г. Москва)

С использованием ТСХ (“Силуфол УФ 254” и “Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ”) разработаны методики качественного анализа корней солодки и солодки экстракта жидкого. Детекцию доминирующих веществ – глицирризиновой кислоты (тритерпеновый сапонин) и ликуразида (флавоноид) осуществляют путем просмотра хроматографических пластинок в видимом свете, УФ-свете (254 нм) и последующего проявления диазореактивом. Обоснована целесообразность использования в методиках качественного анализа сырья и препаратов государственных стандартных образцов ликуразида и глицирама.

Разработаны методики количественного спектрофотометрического определения (аналитическая длина волны при 258 нм) глицирризиновой кислоты в корнях солодки и экстракте солодки жидком с использованием государственного стандартного образца глицирама.

Содержание глицирризиновой кислоты в сырье и экстракте солодки жидком находится в интервале от 7,50 % до 15,23 % (корни) и от 7,08 % до 13,91 % (экстракт).

Ошибка единичного определения разработанных методик составляет $\pm 4,92\%$ (корни) and $\pm 4,78\%$ (жидкий экстракт).

В настоящее время особую актуальность приобретают исследования в плане расширения ассортимента доступных широким слоям населения препаратов на основе лекарственного растительного сырья. В этом отношении особый интерес представляют виды солодки (солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.), солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), на основе корней которых выпускается целый ряд препаратов (экстракты густой, сухой, экстракт-концентрат, сироп солодкового корня и др.). Однако создание современных препаратов возможно лишь на основе методик, отвечающих параметрам валидации [10, 11]. С учетом этого обстоятельства, а также такого явления, как фальсификация лекарственных средств, особую актуальность приобретают исследования, направленные на совершенствование методик качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья (ЛРС) и фитопрепаратов [1-5].

Кроме того, при решении этой проблемы необходимо учитывать то обстоятельство, что методики качественного и количественного анализа должны соответствовать принципу унификации или гармонизации в ряду: сырье-субстанция-лекарственная форма [10, 11].

В ходе исследований учеными Самарского государственного медицинского университета и Всероссийского института лекарственных и ароматических

растений (ВИЛАР) разработан Государственный стандартный образец (ГСО) глицирам (ФС 42-0034-00), причем при этом исправлена химическая структура глицирама и изучены особенности физико-химических свойств глицирризиновой кислоты [6-9]. Ранее харьковскими учеными для целей стандартизации флавоноидных препаратов (ликвиритон, флакарбин) предложено использовать ГСО ликуразида. Следовательно, появились объективные предпосылки для совершенствования методик качественного анализа сырья и препаратов солодки с использованием хроматографических методов, в частности, ТСХ, и соответствующих ГСО.

Цель настоящей работы – исследование по разработке методик качественного и количественного анализа сырья и препаратов солодки (жидкий экстракт).

Для достижения поставленной цели нами были изучены условия хроматографического разделения сапонинов и флавоноидов корней солодки, позволяющие обнаруживать доминирующие БАС – глицирризиновую кислоту и ликуразид. Для достоверного определения веществ нами предложено использовать государственные стандартные образцы. Так, для определения глицирризиновой кислоты используется стандарт глицирам (ФС 42-0034-00), а для флавоноидов – ликуразид. Использование данных стандартов позволяет исключить ошибки при иден-

тификации диагностических веществ и, следовательно, обеспечивать валидацию методик качественного анализа сырья и препаратов солодки. Использование в качестве ГСО глицирама объясняется тем, что глицирризиновая кислота – вещество нестабильное, что препятствует использованию данного соединения в качестве государственного стандартного образца.

При использовании пластинок “Силуфол УФ 254” и “Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ” (система растворителей хлороформ – метанол – вода, 26:14:3) ликуразид обнаруживается на хроматограмме в виде доминирующего желтого или желтовато-оранжевого пятна с величиной R_f около 0,5, а глицирризиновая кислота – в виде фиолетового флуоресцирующего пятна (254 нм) с величиной R_f около 0,3 (на уровне ГСО глицирама). При этом обнаруживаются также пятна ликвиритина (R_f около 0,6), ононина (R_f около 0,7), ликвиритигенина и изоликвиритигенина (R_f около 0,8), а также формонетина (R_f около 0,9) (рис. 1).

МЕТОДИКА КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА СОЛОДКИ КОРНЕЙ

К 2,0 г измельченного сырья (с точностью до 0,01 г) прибавляют 20 мл 40 % этилового спирта и извлекают при нагревании на водяной бане в течение 15 минут. Затем полученное извлечение фильтруют через фильтр (красная полоса).

На линию старта пластинок “Силуфол УФ-254” или “Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ” микропипеткой наносят 0,01 мл полученного фильтрата и затем рядом 0,02 мл (20 мкг) 0,1 % раствора ГСО глицирама и 0,02 мл (20 мкг) 0,1% раствора ликуразида. Пластинку с нанесенными пробами помещают в вертикальную камеру, которую предварительно насыщают не менее 24 ч смесью растворителей: хлороформ-метанол– вода в соотношении 26:14:3, и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 13 см (силуфол) или 9 см (сорбфил), пластинку вынима-

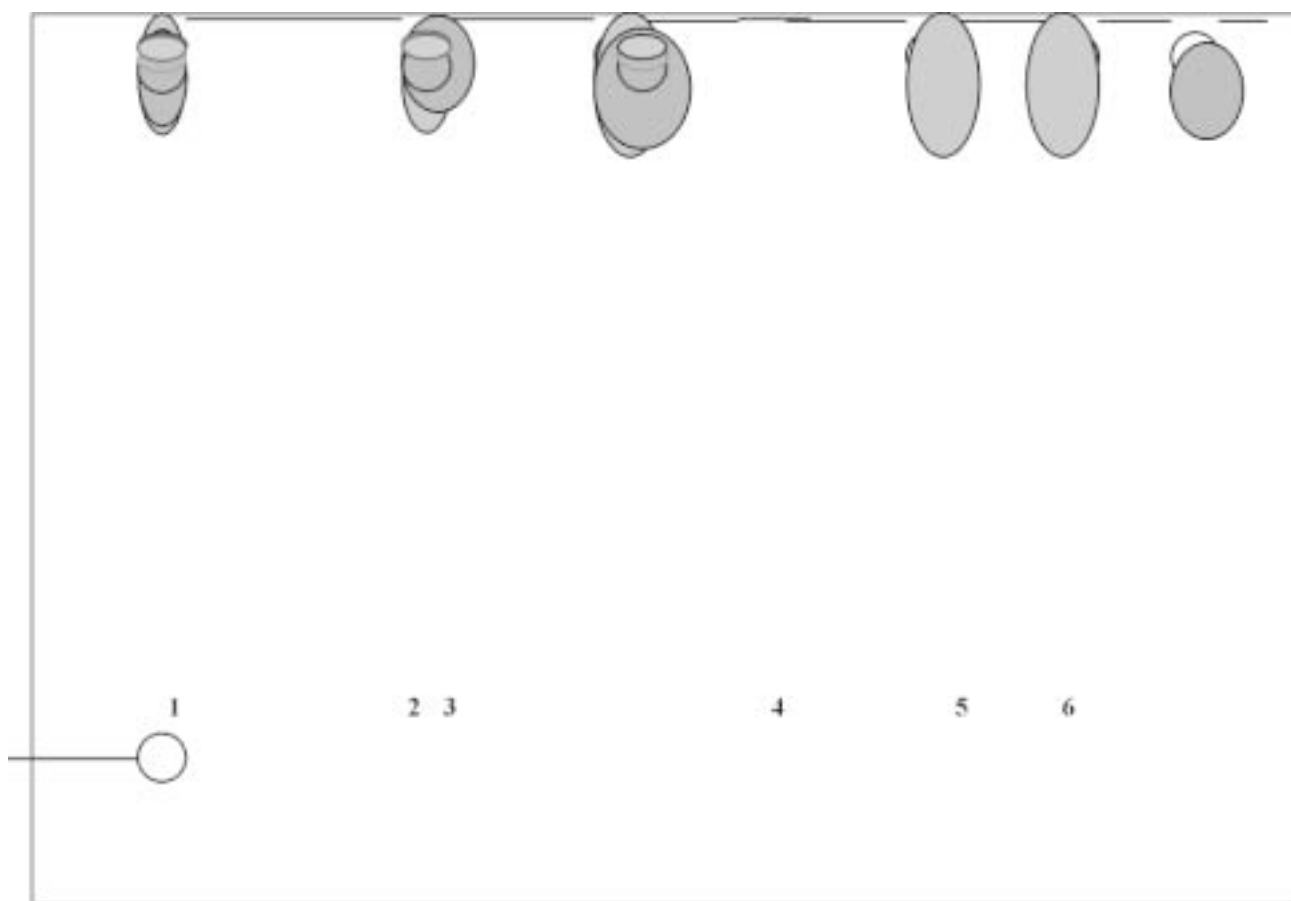
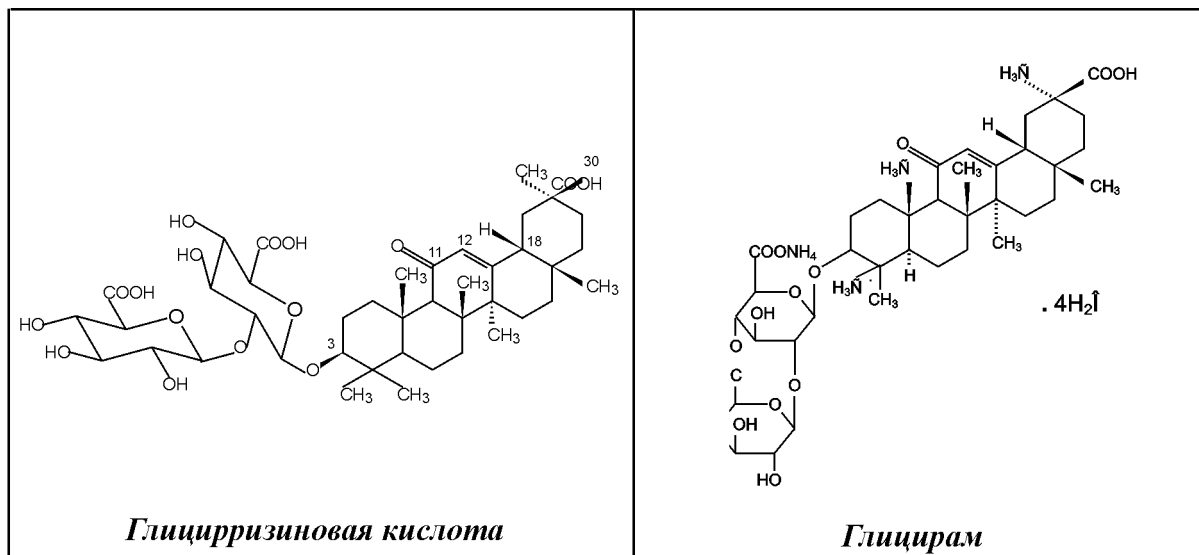
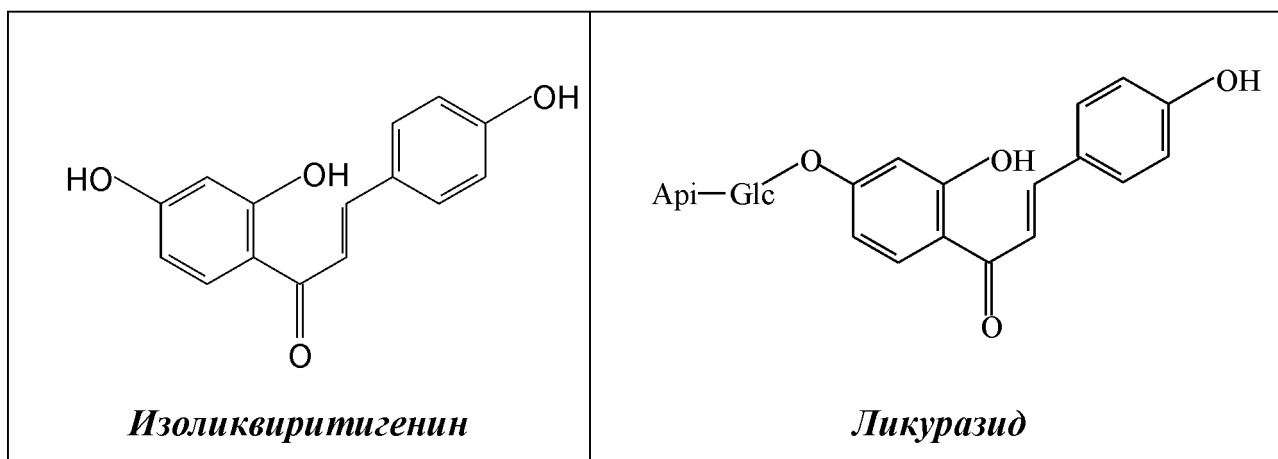


Рис. 1. ТСХ-анализ сырья препаратов солодки. Условия хроматографирования: “Силуфол УФ 254” (система растворителей: хлороформ-метанол-вода, 26:14:3). Сапонины корней солодки: 1) водно-спиртовое извлечение солодки голей; 2) водно-спиртовое извлечение солодки уральской; 3) экстракт солодки жидкий; 4) глицирам; 5) глицирризиновая кислота; 6) ликуразид.



Флавоноиды (халконы) корней солодки



ют из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин и просматривают в видимом свете и в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме на уровне пятна ГСО ликуразида должно обнаруживаться пятно желтого цвета с величиной R_f около 0,5 (ликуразид), а также фиолетовое флуоресцирующее пятно с R_f около 0,3 (глицирам). Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным раствором диазобензолсульфокислоты в насыщенном растворе карбоната натрия, помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 110 °С в течение 5 мин. На хроматограмме извлечения на уровне пятна ГСО ликуразида должно проявиться оранжевое пятно с R_f около 0,5, соответствующее пятну ликуразида; допускается наличие других пятен.

Подготовка пластинок. Пластины “Силуфол УФ 254” 15 × 15 см или “Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ” (ТУ 26-11-17-89) разрезают поперек линий накатки соответственно на 2 части размером 15 × 7,5 см или

на 2 части 10 × 5 см (сорбфил) и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 ч.

Приготовление раствора диазобензолсульфокислоты. 0,01 г диазобензолсульфокислоты (ГФ X, стр. 876) растворяют в 10 мл 10 % раствора натрия карбоната.

Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора ГСО глицирама. Около 0,025 г (точная навеска) ГСО глицирама (ФС 42-0034-00) растворяют в мерной колбе вместимостью 25 мл в 10 мл 50 % спирта. Доводят объем раствора до метки 50 % спиртом и перемешивают. Срок годности раствора 1 месяц.

Приготовление раствора ГСО ликуразида. Около 0,025 г (точная навеска) ГСО ликуразида растворяют в мерной колбе вместимостью 25 мл в 10 мл 95 % спирта. Доводят объем раствора до метки 95 % спиртом и перемешивают. Срок годности раствора 1 месяц.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА СОЛОДКИ КОРНЕЙ

Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу коническую со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл 96% этилового спирта. В колбу вносят 20 мл 3 % ацетонового раствора кислоты трихлоруксусной и нагревают на водяной бане в течение 30 минут. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр, колбу промывают двумя порциями ацетона по 5 мл и выливают в общий объем. К полученному фильтрату прибавляют по каплям раствор аммиака концентрированный, не встряхивая колбу, до появления обильного осадка (рН от 8,3-9 по универсальному индикатору).

Раствор с осадком переносят на фильтр. Колбу и фильтр промывают 10 мл ацетона. Осадок с фильтром переносят в колбу, в которой проводилось осаждение, и растворяют в 50 мл воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б ГСО глицирама.

Содержание глицирризиновой кислоты в пересчете на глицирам и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 250 \times 25 \times 5 \times 100 \times 100}{m \times l \times D_0 \times 50 \times 25 \times (100 - W)}$$

$$= \frac{D \times m_0 \times 250000}{m \times D_0 \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора (Б) при длине волны 258 нм;

D₀ – оптическая плотность раствора ГСО глицирама (Б) при длине волны 258 нм;

m – масса сырья в граммах;

m₀ – масса ГСО глицирама в граммах;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Примечание. Приготовление раствора ГСО глицирама.

0,025 г глицирама растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в 15 мл 50 % этилового спирта и доводят объем раствора 50% этиловым спиртом до метки (р-р А).

5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят водой до метки. Срок годности раствора 1 месяц.

Метрологические характеристики методики качественного определения глицирризиновой кислоты в сырье солодки голой рассчитаны из результатов анализа в 11 независимых повторностях (табл. 1).

Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью составляет 4,92 % (табл. 1).

Опыты с добавками ГСО глицирама к навеске сырья и к экстракту показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА СОЛОДКИ ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО

2,00 мл экстракта солодкового корня жидкого помещают в колбу коническую со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 20 мл спирта 95%, перемешивают 5 мин. В колбу через обратный холодильник вносят 25 мл 3 % ацетонового раствора кислоты трихлоруксусной и продолжают нагревание в течение 10 мин, после чего прибавляют 30 мл 3 % ацетонового раствора кислоты трихлоруксусной и охлаждают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр, колбу промывают двумя порциями 3 % ацетонового раствора кислоты трихлоруксусной по 10 мл, фильтруя через тот же фильтр.

К полученному фильтрату прибавляют по каплям раствор аммиака концентрированный до появления обильного осадка (рН от 8,3 до 8,6 по универсальному индикатору). Раствор с осадком переносят на беззольный фильтр, помещенный в воронку Бюхнера. Колбу и фильтр промывают 50 мл ацетона в три приема. Осадок с фильтром переносят в колбу, в которой проводилось осаждение, растворяют в 50 мл воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б ГСО глицирама.

Примечание. Приготовление раствора ГСО глицирама

0,025 г глицирама растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в 15 мл 50 % этилового спирта

Метрологические характеристики методики количественного определения глицирризиновой кислоты в сырье солодки голой

f	\bar{x}	S	$P, \%$	$t(P, f)$	Δx	$E, \%$
10	10,37	0,2287	95	2,23	$\pm 0,51$	$\pm 4,92$

Метрологические характеристики методики количественного определения глицирризиновой кислоты в экстракте солодки жидком

f	\bar{x}	S	$P, \%$	$t(P, f)$	Δx	$E, \%$
10	8,15	0,1746	95	2,23	$\pm 0,39$	$\pm 4,78$

и доводят объем раствора 50 % этиловым спиртом до метки (р-р А).

5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят водой до метки. Срок годности раствора 1 месяц.

Содержание глицирризиновой кислоты в жидком экстракте в пересчете на глицирам в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 250 \times 25 \times 5 \times 100}{V \times 1 \times D_0 \times 50 \times 25} = \frac{D \times m_0 \times 2500}{V \times D_0}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора (Б) при длине волны 258 нм;

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО глицирама (Б) при длине волны 258 нм;

V – объем препарата, в мл

m_0 – масса ГСО глицирама в граммах;

Примечание. Приготовление 3 % ацетонового раствора кислоты трихлоруксусной. 3 г кислоты трихлоруксусной (ТУ 421-С14/499-077-92) растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 70 мл ацетона и объем раствора доводят ацетоном до метки.

Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет 4,78 % (табл. 2).

Опыты с добавками ГСО глицирама в жидкий экстракт показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики.

Следовательно, использование в методике коли-

чественного анализа ГСО глицирама позволяет объективно оценивать уровень содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки и экстракте солодки жидком.

Содержание глицирризиновой кислоты в сырье и экстракте солодки жидком находится в интервале от 7,50 % – до 15,23 % (корни) и от 7,08 % до 13,91 % (экстракт).

ВЫВОДЫ

1. Обоснована целесообразность использования в методиках качественного и количественного анализа государственных стандартных образцов ликуризида и глицирама.
2. Разработаны унифицированные методики качественного и количественного анализа корней солодки и экстракта жидкого с использованием ТСХ и спектрофотометрии. Содержание глицирризиновой кислоты в сырье и экстракте солодки жидком находится в интервале от 7,50 % – до 15,23 % (корни) и от 7,08 % до 13,91 % (жидкий экстракт).
3. Метрологические характеристики методики количественного определения глицирризиновой кислоты в корнях солодки и экстракте солодки жидком свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения составляет 4,92 % и 4,78 % соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арзамасцев А.П., Багирова В.Л., Садчикова Н.П. Стратегия в области совершенствования фармакопейного анализа лекарственных средств // Человек и лекарство: Тез. докл. 6-го Росс. Нац. Конгр. – Москва, 2000. – С. 599.
2. Арзамасцев А.П., Дорофеев В.Л., Садчикова Н.П. Государственные стандартные образцы лекарственных веществ (проект общей фармакопейной

статьи) // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2000. – № 3. – С. 24-26.

3. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Багирова В.Л. Основные аспекты совершенствования фармакопейного анализа // Хим.-фармац. журн. – 2000. – № 5. – С. 47-49.

4. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация фармакопейных методов (проект общей фармакопейной статьи) // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2001. – № 1. – С. 28-29.

5. Багирова В.Л., Садчикова Н.П., Ковалева Е.А. О стандартизации лекарственных средств на современном этапе // Хим.-фармац. журн. – 2000. – № 11. – С. 46-48.

6. Быков В.А., Запесочная Г.Г., Куркин В.А. и др. Новая концепция создания лекарственных препаратов на основе корней солодки // III Российский национальный конгресс “Человек и лекарство”: Тезисы докладов. М., 1996. – С. 12.

7. Запесочная Г.Г., Быков В.А., Комплексная технология препаратов солодки – *Glycyrrhiza* L. // Химия, технология, медицина: Труды Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений. – М., 2000. – С. 124-131.

8. Запесочная Г.Г., Звонкова Е.Н., Куркин В.А. и др. Некоторые свойства глицирризиновой кислоты // Химия природных соединений. – 1994. – № 6. – С. 772-780.

9. Запесочная Г.Г., Куркин В.А., Бибикина Н.Е. и др. ВЭЖХ в анализе сырья и препаратов солодки – *Glycyrrhiza* L. // Современные тенденции развития фармации: Тезисы докладов научно-практической конференции, посвященной 80-летию Самарского государственного медицинского университета, фармацевтической службы Самарской области и Самарского аптечного склада. Самара: СамГМУ, 1999. – С. 80-85.

10. Самылина И.А. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств // Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты: Материалы 1-го Международного научного конгресса. – М.: Институт традиционных методов лечения МЗ РФ и др., 1994. – С. 203.

11. Самылина И.А., Грицаенко И.С., Горчакова Н.К. Основные направления исследований лекарственных растений на современном этапе // Современные аспекты изучения лекарственных растений: Научные труды, Т. 34. – М., 1995. – С. 3-6.