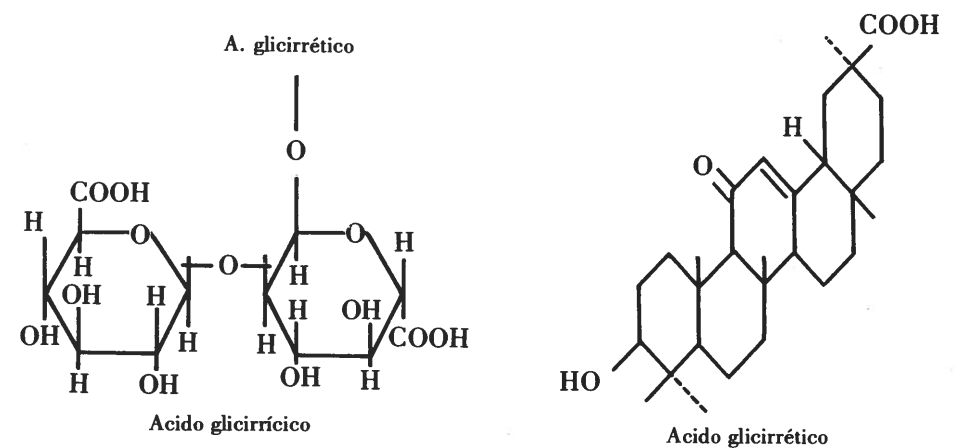


DETERMINACION DE LOS ACIDOS GLICIRRICO Y GLICIRRETICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE ALTA PRESION DE FASE INVERTIDA

Por F. Salto
M.^a J. Arín

INTRODUCCION

El ácido glicirrónico (G) es el constituyente dulce del extracto de regaliz. Se trata de un glicósido compuesto de ácido glicirrético (GR) unido a dos moléculas de ácido hexurónico. Dichos ácidos tienen interés tanto en el campo farmacéutico como en la industria de alimentación.



Para el análisis del ácido glicirrónico se han descrito métodos de cromatografía en papel, capa fina y cromatografía de gases, en los que la valoración cuantitativa resulta muy laboriosa^{1,3}.

An. Fac. Vet. León, 1979, 25, 43-47.

Muy recientemente se ha publicado un trabajo que emplea cromatografía de alta presión de intercambio iónico² y elución en gradiente de concentración de ClO₄Na.

El objeto del presente trabajo es describir un nuevo método de determinación simultánea del ácido glicirrónico y la parte no sacárida de su molécula, el ácido glicirrónico, mediante cromatografía de alta presión de fase invertida.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos

El ácido glicirrónico se obtuvo a partir de extracto de regaliz amoniacal puro «Merck», mediante sucesivas recristalizaciones en ácido acético primero y posteriormente en agua-metanol (8:2) v en caliente. El producto así obtenido se utilizó como patrón (P. f. = 210°C con descomposición).

El ácido glicirrónico fue suministrado por SIGMA y se empleó sin posterior purificación.

El resto de los productos químicos fueron adquiridos a diferentes casas comerciales, todos ellos de calidad «reactivos análisis» y empleados tal como se recibieron.

Aparatos

Se ha utilizado una bomba Constametric II (Laboratorio Data Control), un inyector de «lazo» Rheodyne de 20 µl, un detector UV III Modelo 1203 (LDC) a 250 nm y un registrador Sargent-Welch Modelo XKR. La columna empleada ha sido del tipo octadecilsilica «Partisil» PXS 10/25 (30 cm, 4 mm d.i.) suministrada por Whatman.

Como fase móvil se ha empleado mezclas de metanol-agua en proporciones que oscilaron entre 60 y 80 % v/v que a su vez contienen ácido acético en proporciones que oscilan entre 0 y 0,5 % p/v.

Preparación de las disoluciones de los ácidos glicirrónico y glicirrónico

Se han preparado disoluciones de los ácidos glicirrónico y glicirrónico en metanol en concentraciones que van de 0,2 a 1 mg/ml.

Tratamiento del plasma

0,5 ml de plasma se agitan con 5 ml de metanol durante 30 minutos. (En las disoluciones patrones los ácidos iban disueltos en metanol). Seguidamente se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos. La capa superior se filtra por una membrana Sartorius 0,8 µ SM 11.104. El residuo se vuelve a tratar con otros 5 ml de metanol repitiéndose el tratamiento. La mezcla de filtrados se

lleva a sequedad a presión reducida. El residuo se disuelve en 5 ml de metanol.

Método de determinación

Se preparan disoluciones de los ácidos glicirrónico y glicirrónico a concentraciones que oscilan entre 2 y 100 µ g/ml. De cada una de las disoluciones se inyectaron 20 µl realizándose el cromatograma empleando como fase móvil agua-metanol al 70 % v, con un contenido en ácido acético del 0,25 % a una sensibilidad de 0,008 AUFS. Se midieron las alturas de los picos (y) para cada concentración (x). A partir de los valores x e y se obtuvieron las correspondientes ecuaciones de regresión lineal mediante el método de los mínimos cuadrados. Las ecuaciones obtenidas fueron las siguientes:

$$\begin{array}{lll} \text{Acido glicirrónico} & y = 0,096 + 0,129 & r = 0,996 \\ \text{Acido glicirrónico} & y = 0,161 + 0,196 & r = 0,996 \end{array}$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Aunque los ácidos glicirrónico y glicirrónico son compuestos iónicos y pueden separarse mediante cromatografía de intercambio iónico² utilizando como fase móvil agua y perclorato sódico 0,1 M con un gradiente lineal del 7 % por minuto, a la temperatura de 40°C, el empleo de la cromatografía en fase invertida presenta varias ventajas. Se puede realizar a temperatura ambiente y no es necesario emplear gradiente.

Los tiempos de retención de los ácidos glicirrónico y glicirrónico son función de los contenidos en metanol de la fase móvil. Igualmente, la presencia de ácido acético en la fase móvil modifica grandemente los volúmenes de retención. En la Tabla I están recogidos los valores de los volúmenes de retención de los ácidos glicirrónico y glicirrónico por la columna de octadecilsilica Partisil PXS 10/25 para diferentes composiciones de la fase móvil.

TABLA I
Volúmenes de retención (ml) de los ácidos glicirrónico y glicirrónico sobre la columna Partisil PXS 10/25 para diferentes composiciones de la fase móvil

	0 % AcH		0,25 % AcH		0,5 % AcH	
% MeOH	G	GR	G	GR	G	GR
80	2,6	6,24	3,51	6,21	3,64	6,24
75	2,6	10,66	4,16	10,14	4,24	9,94
70	2,6	18,20	5,98	20,28	5,46	16,12
65	2,6	35,36	8,32	33,8	9,36	38,43

Exactitud de las determinaciones

Las cantidades de los ácidos glicirrónico y glicirético inyectadas son proporcionales a las alturas de los picos correspondientes tal y como se ha descrito en la parte experimental. Para establecer la exactitud de los resultados obtenidos a partir de la ecuación de regresión, los valores de las alturas de los picos cromatográficos obtenidos con diferentes cantidades de ácido glicirrónico y glicirético inyectados, se substituyen en la ecuación para determinar los valores de las concentraciones de dichos ácidos y posteriormente se comparan con los realmente puestos. El error encontrado es del orden del 2,5 %.

Se ha demostrado la posibilidad de la determinación de los ácidos glicirrónico y glicirético en extractos de regaliz y en líquidos fisiológicos mediante cromatografía en fase invertida. En la Fig. 1 puede observarse la separación de los ácidos glicirrónico y glicirético en una muestra de plasma tratada tal y como se ha indicado en la parte experimental.

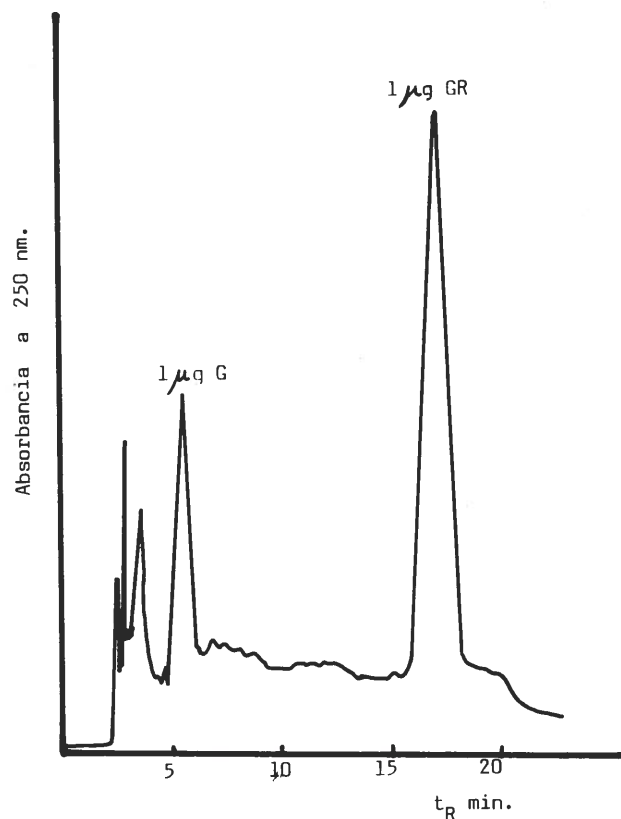


Figura 1.-Separación de los ácidos glicirrónico y glicirético en una muestra de plasma.

RESUMEN

Se describe un método para la determinación simultánea de los ácidos glicirrónico y glicirético mediante cromatografía líquida de alta presión. La columna empleada es del tipo ODS, «Partisil» PXS 10/25. La fase móvil es una disolución acuosa con el 70 % v. de metanol y que a su vez es del 0,25 % en ácido acético. El método es aplicable a líquidos biológicos.

DETERMINATION OF GLYCYRRHIZIC AND GLYCYRRHETIC ACIDS BY REVERSE PHASE CHROMATOGRAPHY

SUMMARY

A method is described for the simultaneous determinations of glycyrrhizic and glycyrrhetic acids by means of HPLC. The column used is of the ODS «Partisil» PXS 10/25 type. The mobile phase is an aqueous solution with 70 % by volume methanol, which in its turn is 0,25 % in acetic acid. The method can be applied to biological liquids.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BONATI, A. (1963).-Controllo cromatografico dell'acido glicirizico e di suoi derivati. *Firoterapia*, **34/1**: 19.
- 2) SAKIYA, Y., AKADA, Y., KAWANO, S. and MIYAUCHI, Y. (1979).-Rapid Estimation of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic Acid in Plasma by High-Speed Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **27/5**: 1.125-1.129.
- 3) SOLTESZ, J. (1968).-Preparation of 18 β -glycyrrhetic acid free of impurities. *Acta Pharm. Hung.*, **38**: 136-144.