

# Nuevo método de determinación del contenido de ácido glicirricico en el extracto de raíz de regaliz

por

J. MARTIN y M.<sup>a</sup> C. GARCIA RUMBAO

Premio «ABELLO, S. A.»

## RESUMEN

Se han puesto a punto dos nuevos métodos de determinación cuantitativa de ácido glicirricico en *Radix liquiritiae*. Se basan en la extracción del producto natural con metanol/agua y posterior análisis directo del glucósido utilizando cromatografía en capa fina-densitometría y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) respectivamente. Estos métodos se han comparado con otros dos descritos en los que el análisis se efectúa sobre el producto de hidrólisis del ácido glicirricico, el ácido glicirretinico. De todos ellos resulta el más ventajoso el método que utiliza la cromatografía líquida de alta eficacia por su superior exactitud, precisión y menor tiempo de análisis.

## SUMMARY

Two new methods for the quantitative determination of glycyrrhizinic acid in *Radix liquiritiae* are described. After the extraction of the source material with methano water, the crude extract is analysed by using thin layer chromatography-densitometry and high performance liquid chromatography respectively. These methods have been compared with two others cited in the literature wich performed the analysis over the hydrolisis product of glycyrrhizinic acid, the glycyrrhetic acid. Among them, the HPLC has been proved to be the most accurate, reproducible and the less time consuming.

## I. INTRODUCCIÓN

*Radix liquiritiae*, la raíz de *Gliciriza glabra* L., es uno de los medicamentos más antiguos conocidos. Fue utilizada por egipcios, griegos y romanos, contra catarros y resfriados, abscesos, asma y contra la sed. Es asimismo uno de los productos principales utilizados en las medicinas china y japonesa atribuyéndosele propiedades

analgésicas y antiinflamatorias. La consideración de que disfruta aún hoy día en Europa se manifiesta en el hecho de que es oficial en la mayoría de las farmacopeas.

Los componentes farmacológicamente más importantes son los flavonoides, liquiritina e isoliquiritina y el triterpeno glicirricina (sal potásica, amónica o cálcica del ácido glicirricínico) debido a este hecho y a que diversos derivados de este compuesto poseen notables actividades terapéuticas (carbenoxolona), se explica la importancia de la determinación cuantitativa de ácido glicirricínico en la raíz de regaliz.

Existen actualmente cerca de 50 métodos que se ocupan de este análisis, lo que pone de relieve las dificultades que se presentan en la determinación cuantitativa de este producto. Esto se debe fundamentalmente a su compleja composición habiéndose aislado actualmente 18 triterpenos (1), 25 flavonoides (2) y otros diversos tipos de sustancias (3).

La literatura acerca del análisis cuantitativo del ácido glicirricínico en *Radix liquiritiae* ha sido revisada hasta 1964 por Murawjew y Ponomarjew (4) y más recientemente por Vondenhof y col. (5), Thieme y Hartmann (6), Zwaving (7) y Ferrero y Specchia (8). Otros autores (9) han estudiado críticamente este problema con el fin de su aplicación a farmacopeas.

Murawjew y Ponomarjew (4) dividen los métodos utilizados hasta 1964 en los tres grupos siguientes:

a) Aislamiento del ácido glicirricínico con determinación cuantitativa del mismo por métodos gravimétricos, volumétricos o en cromatografía de papel y posterior determinación fotométrica.

b) Determinación del ácido glicirretínico, obtenido por hidrólisis del ácido glicirricínico por métodos: polarográficos, colorimétricos o gravimétricos (la hidrólisis del ácido glicirricínico conduce a ácido glicirretínico y dos moles de ácido glucurónico, ver. fig. 1).

c) Determinación indirecta de la parte azúcar del glucósido (ej. con el reactivo de Fheling).

Los métodos surgidos a partir de esa fecha, están basados en su gran mayoría, en la detección del ácido glicirretínico por medios espectrofotométricos directos o bien a través de derivados adecuados (9); en éstos se somete comúnmente al producto crudo de hidrólisis a una posterior purificación cromatográfica, ya sea a través de columna (10) o en capa fina unidimensional (11) o bidimensional como el método de la DAB-7 DDR o el de Thieme y Hardmann (6). Más recientemente, se han descrito métodos que utilizan la cromatografía de gases a través de los derivados trimetilsililados o metilados del ácido glicirretínico (5, 12-14), así como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) del producto hidrolizado (15), así como sin hidrolisis

zar utilizando columnas de intercambio aniónico (16-19) o de fase reversa (20).

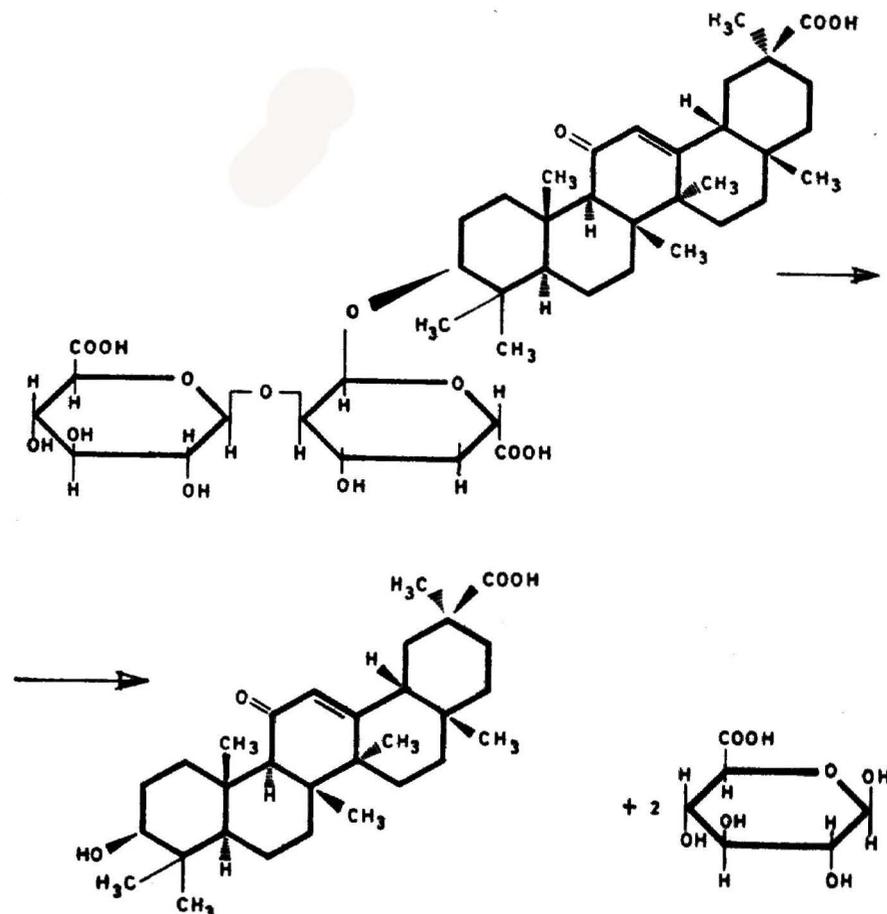


Fig. 1.—Hidrólisis del ácido glicirricínico.

De las variaciones obtenidas con los distintos métodos citados dan una idea los valores obtenidos por Steinegger y Marty (9) sobre la misma raíz que varían entre el 2,94 por 100 y el 7,67 por 100, usando cuatro métodos distintos o los obtenidos por Vondenhof y col. (5), que obtienen contenidos en ácido glicirricínico entre el 4,9 por 100 y el 16,8 por 100 usando métodos que van desde el clásico gravimétrico hasta el gas-cromatográfico del derivado trimetilsililado.

Esta disparidad de resultados puede explicarse por los siguientes motivos:

i) Diferentes disolventes empleados para la extracción: esto puede dar lugar, por una parte, a no agotar totalmente la raíz si no se utiliza el disolvente ideal, y por otra parte, cuando se usan disolventes ácidos (es habitual emplear mezclas de etanol o acetona con ácidos inorgánicos) a la hidrólisis parcial del ácido glicirricínico a su aglicón originando en ambos casos resultados en defecto.

ii) Cuando el análisis se efectúa sobre el producto de hidrólisis, las condiciones experimentales influyen en el rendimiento de la operación. Así, Vondenhoff y col. (5) indican que al medio de hidrólisis debe añadirse de un 10 a un 30 por 100 de dioxano para que la reacción se realice de modo cuantitativo, aunque reconocen que el ácido glicirretínico se descompone por efecto térmico en las paredes del recipiente. Proske (21) opina que ningún método de los conocidos proporciona rendimientos precisos en la hidrólisis del glucósido, indicando que los rendimientos máximos alcanzados por ellos varían entre el 82 y el 85 por 100 incluyendo la separación final por CCF. Este hecho conduce igualmente a resultados inferiores a los reales.

iii) Influencia decisiva poseen los diferentes métodos de detección finales utilizados. Así, los métodos no selectivos tales como las gravimetrías, volumetrías, polarografías y espectrofotometrías realizadas directamente sobre los crudos sin purificaciones exhaustivas, dan lugar a valores muy altos ya que la mayor parte de los triterpenos pentacíclicos y otros productos que componen la raíz, poseen grupos funcionales (carboxilo, carbonilo alfa-beta no saturado, etc.) y polaridad similar a los de los ácidos glicirricínico y glicirretínico. Son evidentemente mucho más precisos los que utilizan una detección final más selectiva, esto es, los métodos cromatográficos ya sea en capa fina, papel o de gases o líquidos. Así, los autores que han estudiado en conjunto todos los métodos opinan que el mejor es el que utiliza la cromatografía de gases a través del derivado metilado (5) o bien la purificación por CCF del producto hidrolizado y posterior determinación espectrofotométrica (7, 9). Por otra parte, la rapidez, la posibilidad del análisis directo sin recurrir a hidrólisis ni formación de derivados y el potente poder de resolución de la cromatografía líquida de alta eficacia, parecen indicar que esta técnica es la más adecuada para este tipo de análisis.

A la luz de la información bibliográfica disponible, de nuestra propia experiencia y de lo anteriormente expuesto, se pretende en este trabajo realizar una contribución al análisis cuantitativo del ácido glicirricínico, el *Radix liquiritiae*, insistiendo fundamentalmente en los siguientes aspectos:

a) Encontrar el método de extracción idóneo, que sea capaz de extraer la mayor cantidad posible de ácido glicirricínico y no dé lugar a la aparición de productos de hidrólisis y/o descomposición.

b) Efectuar la detección final del método analítico por técnicas cromatográficas, muy selectivas, utilizando técnicas instrumentales: GC, HPLC y CCF-densitometría.

c) Siempre que sea posible efectuar el análisis directo del ácido glicirricínico sin tener que recurrir a procedimientos hidrolíticos que pueden no ser totales, pueden descomponer el ácido glicirretínico formado y conducen en cualquier caso a alargar innecesariamente el tiempo de análisis.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Estudio de los métodos de extracción

De los numerosos métodos citados en la literatura (22) se han escogido en este trabajo tres que pueden considerarse típicos y que se encuentran detallados en la parte experimental. Se han estudiado los siguientes aspectos de la extracción:

- Número de extracciones necesarias para agotar la raíz.
- Presencia de otros componentes que puedan interferir en la etapa final de análisis.
- Cantidad total de ácido glicirricínico extraído.

En la tabla I se encuentran los resultados obtenidos.

El análisis final se ha efectuado por HPLC como se indica en el apartado 2.4, figura 7. El método B es el descrito por Sticher y Soldati (20) aunque a temperatura ambiente en vez de a 40° C como in-

TABLA I

Estudio de los métodos de extracción: Método A, agua a reflujo; método B, agua/metanol, a temperatura ambiente; método C, acetona/ácido sulfúrico 1 por 100 a temperatura ambiente

|                | A. glicirricínico<br>total extraído<br>(%) | % sobre el total obtenido en las<br>diferentes extracciones |         |         |
|----------------|--|---|---------|---------|
|                |  | Primera   | Segunda | Tercera |
| Método A ..... | 4,13                                       | 92  | 6       | 2       |
| Método B ..... | 4,35                                       | 80  | 15      | 5       |
| Método C ..... | 3,98                                       | 91  | 8,5     | 0,5     |

dican estos autores. Nosotros hemos comprobado experimentalmente que se llega a los mismos resultados a las dos temperaturas.

De los datos indicados en la tabla I se pueden extraer las siguientes conclusiones:

i) Con tres extracciones sucesivas puede considerarse totalmente agotada la raíz, especialmente en los métodos A y C.

ii) Los tres métodos dan lugar a cromatogramas muy similares, no observándose en ninguno de ellos otros componentes que puedan interferir en el análisis.

iii) En la columna 1.<sup>a</sup> se observa que se obtiene un resultado más alto con el método B. Esta diferencia es significativa teniendo en cuenta la precisión de los métodos utilizados (ver. 2.5).

Estos hechos experimentales pueden explicarse por las condiciones térmicas y por los distintos disolventes utilizados en las tres extracciones. El método B utiliza unas condiciones más suaves, y aunque en la primera extracción da lugar a una menor cantidad de ácido glicirrónico extraído, el conjunto de las tres da un resultado globalmente mayor que por los otros dos métodos. Estos, utilizando en un caso agua a ebullición y en el otro acetona/ácido sulfúrico 1 por 100 a temperatura ambiente, aunque agotan antes la raíz, dan lugar a un resultado global más bajo probablemente debido a hidrólisis parcial del ácido glicirrónico.

A la vista de estos resultados, se ha utilizado en este trabajo y en las experiencias que a continuación se describen, el método de extracción B.

## 2.2. Cromatografía en capa fina-densitometría

Se han probado una serie de eluyentes para el extracto de regaliz con el fin de dilucidar cuál da lugar a una mejor separación del producto en estudio del resto de los componentes de la muestra. De entre los probados sólo se consigue la elución del ácido glicirrónico con los siguientes: *n*-butanol 7:metanol 3:agua 1; *n*-butanol 5:amoníaco 3N 2:etanol 1; *n*-butanol 6:ácido acético glacial 1:agua 8 y *n*-butanol 2:ácido acético glacial 1:agua 1, siendo con éste último con el que se consigue la mejor resolución, dando lugar el ácido glicirrónico a un *R<sub>f</sub>* aproximado 0,2.

Para la cuantificación del compuesto, una vez desarrollada la placa, algunos autores (23) han seguido la técnica de la elución de la mancha con etanol y lectura espectrofotométrica, siendo como indican ellos, el tiempo de análisis de alrededor de doce horas. Nos ha parecido más conveniente en este trabajo efectuarla por densitometría que tiene como ventaja fundamental el corto tiempo de análisis,

y que según nuestro conocimiento no se encuentra para este compuesto, descrita en la bibliografía.

Para aumentar el poder de resolución se han elegido placas de silicagel para nanocromatografía (HPTLC) aplicando en cada caso cantidades de muestra equivalentes a 100-500 ng./mancha.

Las lecturas se efectúan a 252 nm. ya que éste es el máximo de reflectancia UV (ver fig. 2) y efectuando el barrido en el sentido del

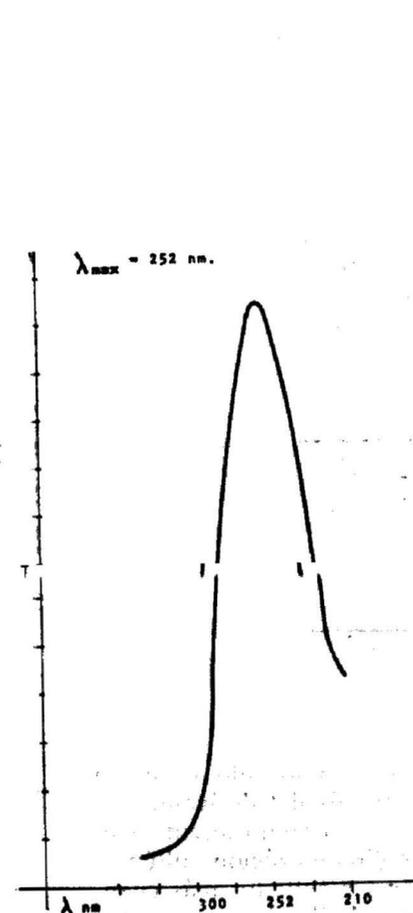


Fig. 2.—Espectro de reflectancia U. V. de ácido glicirrónico. Rendija: 6 × 0,7 mm. Velocidad de barrido mm/min. Atn. 0,5 V.

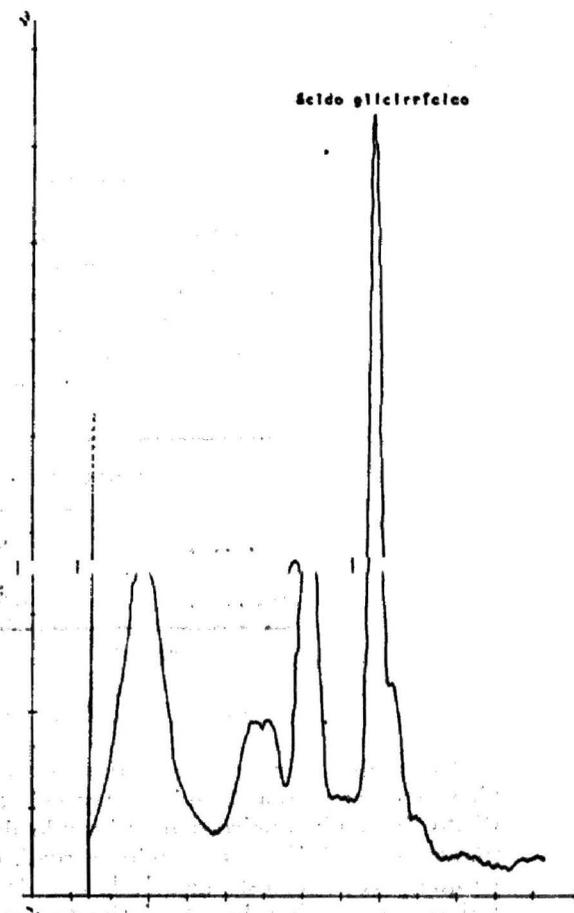


Fig. 3.—Densitograma de extracto de regaliz en el modo de reflectancia.  $\lambda = 252$  nm.

cromatograma. En la figura 3 puede observarse un típico densitograma de un extracto metanólico acuoso de regaliz en que cabe destacar el solapamiento de picos, lo que indica la falta de resolución de los componentes de la mezcla.

La disposición de las manchas correspondientes a la muestra y a las diferentes disoluciones «standard» se efectúa según la técnica del par de datos (24) y el cálculo de concentración de la muestra se realiza por interpolación gráfica en la recta de calibrado formada representando concentración frente a alturas de las manchas «standard». En estos niveles de concentración las alturas dan lugar a mejores rectas que otros parámetros que caracterizan el pico cromatográfico (ver tabla II).

TABLA II

Cuantificación del ácido glicirrónico por densitometría. Coeficiente de correlación de las rectas de calibrado formadas representando: alturas ( $h$ ), áreas ( $A$ ) o áreas al cuadrado ( $A^2$ ) frente a concentración ( $c$ ).  $n = 5$

|               | Coeficiente de correlación ( $r$ ) |
|---------------|------------------------------------|
| $h/c$ .....   | 0,9974                             |
| $A/c$ .....   | 0,9973                             |
| $A^2/c$ ..... | 0,9943                             |

### 2.3. Cromatografía de gases

El análisis por cromatografía de gases se ha realizado según la técnica descrita por Vondenhof y col. (5) a través del derivado metilado del ácido glicirrónico utilizando diazometano como agente metilante. La hidrólisis del crudo se realiza con dioxano/ácido sulfúrico ya que parece ser esta mezcla la que da lugar a resultados más cuantitativos. Se ha elegido este derivado antes que el sililado ya que conduce a una mayor repetitividad del método analítico. Se utiliza como «standard» interno oleanolato de metilo y en la figura 4 puede verse un cromatograma de gases efectuado en las condiciones indicadas en la parte experimental.

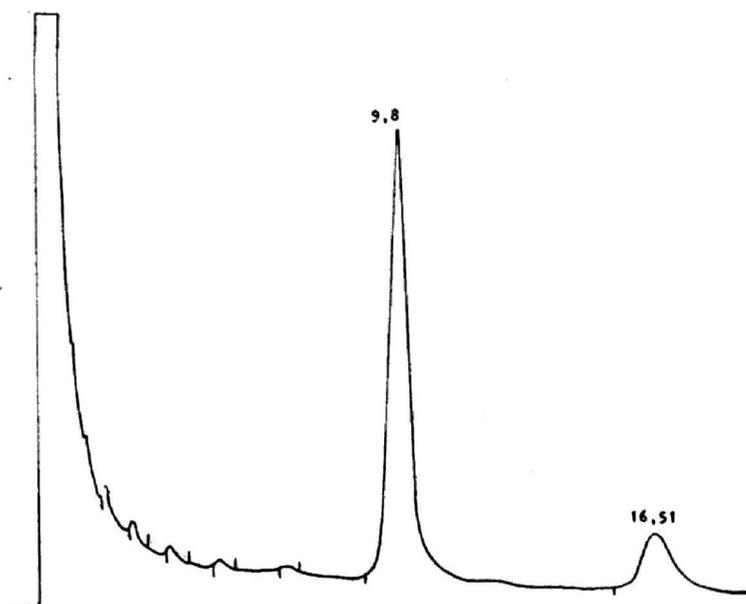


Fig. 4.—Cromatograma correspondiente al análisis de un crudo de regaliz hidrolizado y metilado.  $t_R = 9,80$  oleanolato de metilo (S. I.),  $t_R = 16,51$  glicirretato de metilo. Las condiciones cromatográficas se indican en la parte experimental.

### 2.4. Cromatografía líquida de alta eficacia

Esta técnica aplicada a este problema ha sido estudiada por diversos autores (15-20) obteniendo, a nuestro juicio, los mejores resultados Sticher y Soldeti (20), quienes han utilizado fase reversa para la separación y que después de un intensivo estudio han llegado a las conclusiones siguientes:

— Utilizando como eluyente mezclas alcohol/agua, se obtienen picos anchos con muchas colas.

— La adición a estas mezclas de ácido acético en proporciones cercanas al 5 por 100 hace aumentar notablemente el número de platos teóricos.

Encuentran como eluyente ideal la mezcla ternaria metanol:agua:ácido acético glacial (50:44:6) a un flujo de 2 ml./min.; sin embargo, en el cromatograma que obtienen aparece solapado al pico co-

rrespondiente a ácido glicirrónico otro de menor intensidad no obteniendo por lo tanto una total resolución.

Teniendo en cuenta estos resultados se han fijado en este trabajo los siguientes parámetros:

- i) Utilizar una columna de fase reversa.
- ii) Efectuar la detección con un detector de longitud de onda fija a 254 nm. Este valor se encuentra muy cercano al máximo de absorción, 248 nm. (20).
- iii) Realizar la separación en condiciones isocráticas que simplifican el método y son más seguras para análisis cuantitativos.

#### Mezclas metanol-agua-ácido acético

Puede verse en la figura 5 un cromatograma obtenido con el extracto metanólico del proceso de extracción B utilizando las condiciones de Sticher y Soldeti pudiéndose apreciar la separación incompleta de los componentes de la mezcla. Un cambio en las proporcio-

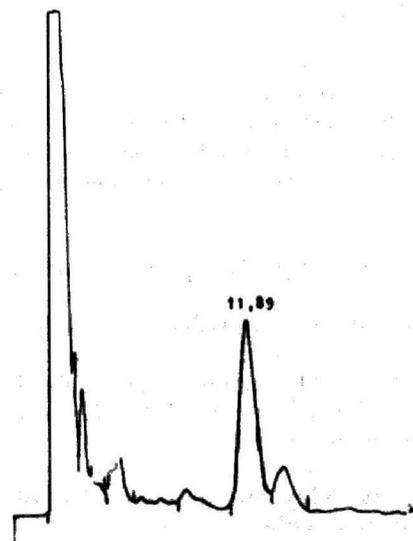


Fig. 5.—Cromatograma de extracto metanólico de regaliz. Columnas:  $\mu$ -Bondapak C-18. Eluyente metanol: agua, ácido acético glacial (50:44:6). Flujo: 1 ml/min. Detección: U. V. 254 nm. Acido glicirrónico: pico a  $t_R = 11,89$ .

nes del solvente, disminución del flujo, o adición de reactivos de par iónico (hidróxido de tetrabutilamonio) no mejoran sensiblemente el aspecto del cromatograma.

#### Mezclas acetonitrilo:agua a diferentes pH

El cambio de metanol a acetonitrilo en el eluyente conduce a una resolución total del ácido glicirrónico en la mezcla. Tal como puede observarse en la figura 6 el pH del medio tiene una marcada influencia en el aspecto del cromatograma. El tiempo de retención del compuesto disminuye sensiblemente al aumentar el pH debido probablemente al paso de éste a su forma aniónica más polar.

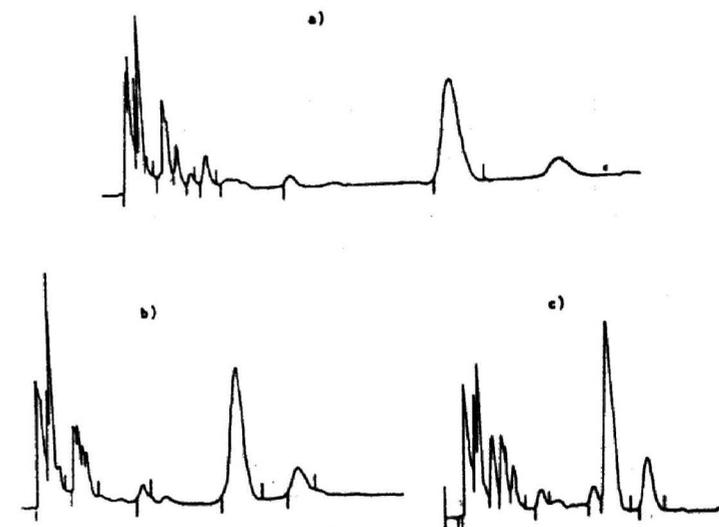


Fig. 6.—Influencia del pH. Columna:  $\mu$ -Bondapak C-18. Flujo: 1,8 ml/min. Eluyente: acetonitrilo 30 por 100,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  0,1 M 70 por 100, pH ajustado a a) 4; b) 4,5; c) 5, con NaOH 40 por 100.

Se llega al mejor compromiso entre resolución y tiempo de análisis, utilizando el eluyente: acetonitrilo 30 por 100:  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  70 por 100 ajustado a pH 5,5 con NaOH 40 por 100 a un flujo de 1 ml/min. En estas condiciones el límite de detección a la longitud de onda utilizada se sitúa en 100 ng./ml. Un típico cromatograma obtenido en estas condiciones se muestra en la figura 7.

La cuantificación se realiza obteniendo una recta de calibrado con disoluciones patrones de concentración de 30 a 170  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La mejor

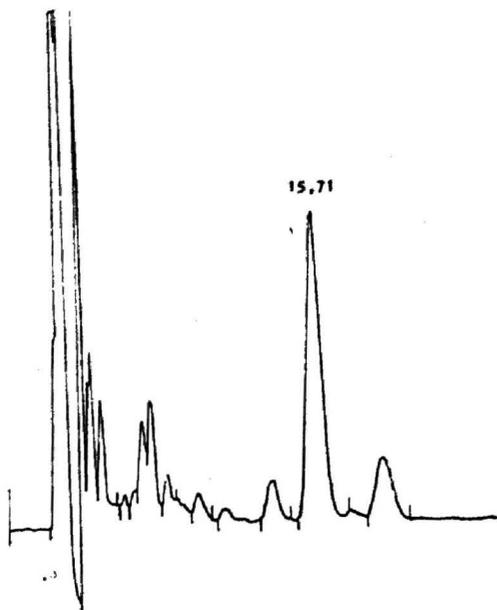


Fig. 7.—Cromatograma (HPLC) del extracto metanólico acuoso de raíz de regaliz. Columna  $\mu$ -Bondapak C-18. Flujo: 1 ml/min. Eluyente: acetonitrilo 30 por 100,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  0,1 M 70 por 100, pH = 5,5. Ácido glicirrónico: pico de  $t_R = 15,71$ .

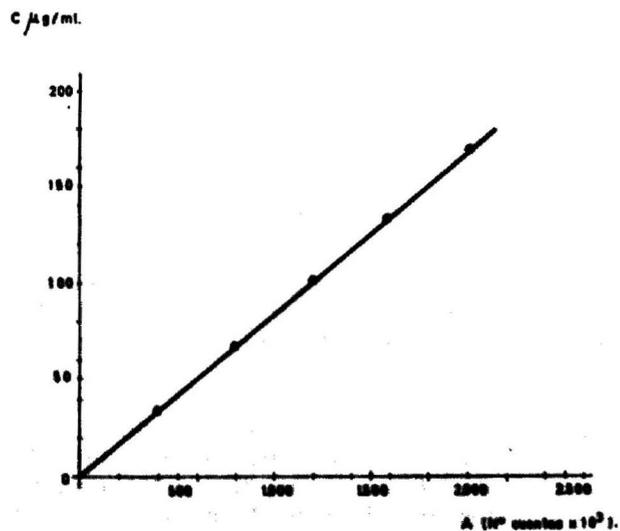


Fig. 8.—Recta de calibrado para la valoración de ácido glicirrónico en extracto de regaliz. Las condiciones cromatográficas son las de la figura 7.

rectificación se obtiene utilizando las áreas obtenidas por integración electrónica. En la figura 8 puede verse una típica recta de calibrado; nótese la bondad de la rectificación ( $r = 0,99996$ ).

2.5. *Discusión de resultados*

En la tabla III pueden verse los resultados obtenidos usando cuatro métodos distintos sobre la misma raíz de regaliz. El método por CCF-Densitometría es el que se describe en el apartado 2.2. El método de Orellana (11) se basa en la hidrólisis del crudo, posterior purificación del ácido glicirrónico por CCF, elución del compuesto de la placa y cuantificación directa por espectrofotometría U. V. El análisis por cromatografía de gases se realiza según se indica en 2.3. El método por HPLC utiliza las condiciones cromatográficas que se indican en la figura 7.

TABLA III

Comparación de los métodos de análisis

|                         | Contenido en ácido glicirrónico (%) |
|-------------------------|-------------------------------------|
| CCF-densitometría * ... | 5,10                                |
| de Orellana * .....     | 2,04                                |
| C. G. * .....           | 2,45                                |
| HP C ** .....           | 4,06                                |

\* Media de 2 determinaciones.  
 \*\* Media de 8 determinaciones.

Como puede observarse en la tabla III los dos métodos que utilizan la hidrólisis del crudo de extracción y posterior determinación del ácido glicirrónico dan resultados más bajos que en los que la detección final se realiza sobre los glucósidos. Dada la excelente resolución que se consigue con HPLC (ver fig. 7) es posible afirmar que en estos casos (método de Orellana y CG) se obtienen resultados en defecto debido probablemente a dos razones: pirólisis parcial del ácido glicirrónico en el proceso de hidrólisis y falta de obtención de un rendimiento cuantitativo en este mismo proceso. El hecho de ha-

berse encontrado un valor más alto por densitometría que por HPLC es debido probablemente a la falta de resolución de la cromatografía en capa fina (ver fig. 3).

En conjunto puede valorarse el método que aquí presentamos utilizando la cromatografía líquida de alta eficacia como el que conduce a resultados más fiables de los comprobados en este trabajo, y en conjunto el más conveniente por las siguientes razones:

a) El análisis se efectúa directamente sobre el glucósido, con las ventajas que esto lleva referentes al número mínimo de manipulaciones y corto tiempo de análisis.

b) La excelente resolución que se consigue con las condiciones cromatográficas que presentamos permiten asegurar que no existen interferencias de otros componentes presentes en el producto natural, lo cual da idea, conjuntamente con el estudio sobre métodos de extracción del apartado 2.1 de la exactitud del método.

c) La precisión del método es altamente satisfactoria como se desprende de la tabla IV.

TABLA IV

*Precisión del método. Determinaciones efectuadas sobre la misma raíz con 8 extracciones diferentes. Método de extracción: B. Método de análisis, HPLC. Condiciones cromatográficas como en la figura 7.*

|                             | Contenido en ácido glicirricico (4) |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Determinación número 1..... | 4,013                               |
| » » 2.....                  | 4,047                               |
| » » 3.....                  | 4,078                               |
| » » 4.....                  | 4,045                               |
| » » 5.....                  | 4,075                               |
| » » 6.....                  | 4,059                               |
| » » 7.....                  | 4,073                               |
| » » 8.....                  | 4,050                               |
| Media ± D. S.               | 4,055 ± 0,023                       |

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Aparatos y reactivos

Se utilizan para la cromatografía en capa fina nanoplacas de silicagel GF<sub>254</sub> de 10 × 10 cm. (Merck ref. 724). La lectura de las placas se realiza con un espectrofotómetro de cromatogramas Zeiss PMQ-3 acoplado a un registrador Servogor 210. Se utilizan para la aplicación microcapilares de 1 µl. Minicaps (Hirschmann Laborglass) con un aplicador Evachrom.

La cromatografía de gases se realiza con un cromatógrafo Hewlett-Packard mod. 5830 A acoplado a un terminal de datos mod. 18850 A. Se utilizan columnas de vidrio de 2,5 m. con fase estacionaria SE-30 al 4 por 100 sobre Chromosorb W-HP 80-100 mesh. El gas portador es nitrógeno y el detector dual de ionización de llama (FID).

Para la cromatografía líquida se utiliza un cromatógrafo Hewlett-Packard mod. 1081 A acoplado a un terminal de datos-integrador mod. 3380 A. Se utiliza como columna una de fase reversa µ-Bondapak C-18 (Waters Assoc.) de 25 cm. de longitud y tamaño de partícula 10 µm. El detector es del tipo U. V. de longitud de onda fija a 254 nm. (lámpara de mercurio).

Como material de partida se utiliza una raíz de regaliz de origen español que ha sido pulverizada en un molino. Se utiliza para la extracción el polvo que pasa el tamiz de 80 mesh.

El ácido glicirricínico que se utiliza como «standard» se ha aislado por nosotros y purificado por recristalización repetida en ácido acético y etanol/agua. P. F. = 210° c. d. CCF: una mancha. HPLC: un solo pico.

El acetónitrilo utilizado en HPLC es para cromatografía (Lichrosolv, Merck ref. 16) el resto de los reactivos y disolventes utilizados es calidad analítica o superior.

#### 3.2. Métodos de extracción

Método A. Unos 500 mg. de raíz pulverizada pesados exactamente se tratan en un balón de 100 ml. con 40 ml. de agua a reflujo durante dos horas. Una vez enfriada la mezcla de reacción, se centrifuga a 5.000 rpm durante diez minutos. Se decanta el sobrenadante y el residuo se lava con 10 ml. de agua que se incorporan al sobrenadante. El residuo se trata por dos veces más con la misma cantidad de disolvente y en las mismas condiciones, reuniéndose al final todos los líquidos de extracción.

Método B. Se pesan exactamente 2 g. de raíz pulverizada en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 40 ml. de metanol 80 por

100 y se somete la mezcla a agitación mecánica durante una hora a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se filtra por succión a través de placa porosa (poro 4) y se lava el precipitado con 10 ml. de metanol al 80 por 100. Sobre el residuo se repite dos veces más la extracción reuniendo al final todos los líquidos claros.

Método C. Se trata 1 g. de raíz pulverizada exactamente pesada con 40 ml. de acetona/ácido sulfúrico 1 por 100 (1:1) con agitación mecánica, durante dos horas, a temperatura ambiente en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Al cabo de este tiempo se trasvasa esta mezcla a un tubo de centrifuga y se centrifuga durante diez minutos a 5.000 rpm. Se decanta el sobrenadante y el residuo se lava con 10 ml. del mismo disolvente. Al residuo se le somete de nuevo a dos extracciones más utilizando las mismas condiciones. Al final, se reúnen todos los líquidos de extracción.

### 3.3. *Cromatografía en capa fina-densitometría*

Se llevan los líquidos de extracción tal como se obtienen en el apartado anterior con metanol, a un volumen final de tal forma que se obtenga una concentración en ácido glicirricico cercana a los 250 ng/ml. Se preparan soluciones «standard» que contengan 200, 250 y 300 ng/ml. de ácido glicirricico por ml. de metanol y se aplican por duplicado en la placa de silicagel siguiendo la técnica del par de datos. Una vez secada la mancha se eluyen con el eluyente apropiado en un tanque previamente saturado una distancia de alrededor de 15 cm.

La lectura se realiza a 252 nm. en el modo de reflectancia y en el sentido del desarrollo del cromatograma y con las siguientes condiciones experimentales: rendija 6 × 0,7 mm. Velocidad de barrido: 30 mm/min. Amplificación: 0,2 V.

### 3.4. *Cromatografía de gases*

Introducir en un balón de 250 ml., 1 g. de raíz de regaliz exactamente pesado y añadir 80 ml. de ácido sulfúrico al 3 por 100 y 40 ml. de una mezcla dioxano/agua (1:1). Conectar un refrigerante de reflujo y hervir la mezcla por espacio de tres horas. Al cabo de este tiempo, dejar enfriar a unos 50° C, añadir 50 ml. de cloroformo y hervir durante 15 minutos. Dejar enfriar de nuevo la mezcla a temperatura ambiente y extraer en continuo con cloroformo durante una hora y media. Secar la fase clorofórmica sobre sulfato sódico anhidro, filtrar y evaporar el disolvente a presión reducida. Añadir al residuo 5 ml. de una disolución de diazometano en éter y agitar durante treinta minutos. Añadir 1 ml. de ácido acético, agitar durante treinta

minutos y eliminar los disolventes volátiles con ayuda de vacío. Añadir al residuo 25 ml. de agua y extraer con 3 × 10 ml. de éter etílico. Reunir los extractos etéreos previamente filtrados a través de sulfato sódico anhidro, añadir 1 ml. de una disolución de oleanolato de metilo (1 mg/ml) y llevar a un volumen total de 50 ml.

Solución «standard» interna: Llevar 50 mg. de glicirretato de metilo y 50 mg. de oleanolato de metilo exactamente pesados a 50 ml. de éter.

Condiciones cromatográficas:

Columna SE-30 4 por 100 sobre Chromosorb W-HP 80-100 mesh, 2,5 m.

Cantidad inyectada: 0,5 µl.

Temperatura horno: 290° C.

Temperatura inyector: 320° C.

Temperatura FID: 320° C.

Flujo: 30 ml/min. de nitrógeno.

La cuantificación se realiza con la técnica del «standard» interno.

### 3.5. *Método de Orellana*

Se sigue la técnica operatoria citada en la ref. 11 excepto que en la precipitación del glicirricinato triamónico se utilizan amoniaco gas en lugar de una solución acuosa de hidróxido amónico como agente precipitante.

### 3.6. *Cromatografía líquida de alta eficacia*

Los líquidos de extracción se llevan a un volumen tal que se obtenga una concentración de ácido glicirricínico de alrededor de 0,1 mg/ml. Se inyectan 20 µl. en la columna a través de una válvula tipo «loop» y en las condiciones experimentales que se indican en 2.4.

### *Agradecimientos*

Agradecemos a la Sra. M.<sup>a</sup> Dolores Astiaso Palacio su inestimable ayuda en la elaboración del manuscrito.

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) BEATON, J. M. y SPRING, F. S.: «J. Chem. Soc.», 1956, 2417; ELGAMAL, M. H. A., FAYEZ, M. B. E. y SNATZKE, G.: «Tetrahedron», 21, 2109 (1965);

- CANONICA, L., RUSSO, G. y BONATI, A.: «Gazz. Chim. Ital.», 96, 772 (1966); CANONICA, L., RUSSO, G. y BOMBARDELI, E.: «Gazz. Chim. Ital.», 96, 833, 1966; CANONICA, L., DANIELI, B., MANITTO, P. y RUSSO, G.: «Gazz. Chim. Ital.», 96, 843, (1966); CANONICA, L., DANIELI, B., RUSSO, G. y BONATI, A.: «Gazz. Chim. Ital.», 97, 769 (1967); CANONICA, L., DANIELI, B., MANITTO, P., RUSSO, G. y BOMBARDELI, E.: «Gazz. Chim. Ital.», 97, 1347 (1967); CANONICA, L., DANIELI, B., MANITTO, P., RUSSO, G. y BONATI, A.: «Gazz. Chim. Ital.», 97, 1359 (1967); CANONICA, L., DANIELI, B., MANITTO, P., RUSSO, G., BOMBARDELI, E. y BONATI, A.: «Gazz. Chim. Ital.», 98, 712 (1968); VAN HULLE, C., BRAECKMAN, P. y VANDEWALLE, M.: «Pharm. Wbl.», 106, 501 (1971).
- (2) SHIRODA, J. y UEEDA, S.: «Chem. Ber.», 67, 434 (1934); SHIBATA, S. y SAITOH, T.: «Chem. Pharm. Bull.» (Tokyo), 16, 1932 (1968); MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. y THOMAS, M. B.: *The Systematic identification of Flavonoids*, Springer Verlag, 1970; VAN HULLE, C., BRAECKMAN, P. y VANDEWALLE, M.: «Planta Med.», 20, 278 (1971); ELGAMAL, N. H. A. y FAYEZ, M. B. E.: «Indian J. Chem.», 10, 128 (1972); BHARADWAJ, D. K., MURARI, K., SESHADRI, T. R. y SINGH, R.: «Phytochem.», 15, 352 (1976); SAITOH, T., KINOSHITA, T. y SHIBATA, S.: «Chem. Pharm. Bull.» (Tokyo), 24, 1242 (1976); BHARADWAJ, D. K., MURARI, K., SESHADRI, T. R. y SINGH, R.: «Phytochem.», 15, 1182 (1976).
- (3) REIMERS, W.: «Naturwiss.», 51, 193 (1964).
- (4) MURAWJEW, I. A. y PONOMARJEW, W. D.: «Pharm. Zentr.», 105, 153 (1965).
- (5) VONDENHOF, T. H., GLOMBITZA, K. W. y STEINER, W.: «Sci. Pharm.», 41, 155 (1978).
- (6) THIEME, H. y HARTMANN, U.: «Pharmazie», 29, 50 (1974).
- (7) ZWAVING, J. H.: «Pharm. Wbl.», 110, 873 (1975).
- (8) FERRERO, F. y SPECCHIA, V.: «Rass. Chim.», 29, 227 (1977).
- (9) STEINEGGER, E. y MARTY, S.: «Pharm. Acta. Helv.», 51, 374 (1976).
- (10) GERRITSMAN, K. W. y VAN DER VIJVER, L. M.: «Pharm. Wbl.», 101, 733 (1966).
- (11) DE VIGORANA, M.: «An. Real Acad. Farmacia Madrid», 88, 167 (1972).
- (12) LARRY, D., FURRELL, M. J. y HARRILL, P. G.: «J. Assoc. Offic. Anal. Chem.», 53, 606 (1970).
- (13) LARRY, D.: «J. Assoc. Offic. Anal. Chem.», 55, 570 (1972).
- (14) VENTURA, P., VISCONTI, M. y PIFFERI, G.: «Boll. Chim. Farm.», 117, 217 (1978).
- (15) KILLACKY, J., ROSS, M. S. F. y TURNER, T. D.: «Planta Med.», 30, 210 (1976).
- (16) OGAWA, S., YOSHIDA, A. y MITANI, Y.: «Yakugaku Zasshi.», 96, 122 (1976).
- (17) ACADA, Y. y TANASE, Y.: «Yakugaku Zasshi.», 96, 1085 (1976); C. A. 85: 149175 y.
- (18) OGAWA, S., YOSHIDA, A. y MITANI, Y.: «Yakugaku Zasshi.», 96, 1085 (1976); C. A. 86: 90056 x.
- (19) ACADA, W., SAKIYA, Y., KAWANO, S. y ADACHI, S.: «Chem. Pharm. Bull.», 26, 1240 (1978).

- (20) STICHER, O. y SOLDATI, F.: «Pharm. Acta. Helv.», 53, 46 (1978).
- (21) PROSKE, G.: «Arch. Pharm.», 308, 832 (1975).
- (22) SPECCHIA, V.: «Rass. Chim.», 28, 227 (1976).
- (23) KURONO, G. y SASAKI, S.: «Yakugaku Zasshi.», 90, 497 (1970).
- (24) BETHKE, H., SANTI, W. y FREI, R. W.: «J. Chromatog. Sci.», 12, 392 (1974).