مقاله پژوهشی

مجله دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، جلد دوم، شماره (۳،۲) بهار، تابستان و پائیز ۱۳۷۰

تعیین مقدار گلیسیریزین و اسید گلیسیره‌تیک در ریشه‌های شیرین بیان[1] بوسیله HPLC

دکتر جلیل افشار* - دکتر عباس دل آذر
دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

خلاصه

اکثر روشهای تعیین مقدار گلیسیریزین در ریشه‌های شیرین بیان و عصاره‌های حاصل از آنها غیر اختصاصی و متکی بر روشهای غیرمستقیم می‌باشند. نتایج حاصله از این روشها غالباًبه دور از واقعیت بوده و غیرقابل اطمینان هستند. در این مقاله تعیین مقدار گلیسیریزین در نمونه‌های گیاهی بدون اقدام به هیدرولیز این ماده بطور مستقیم بوسیله HPLC انجام گرفته است. در نتیجه مشکلاتی که در این رابطه مطرح بوده و سبب تغییر قابل ملاحظه نتایج میگردیده مرتفع شده است. در این روش جداسازی ایده‌آل گلیسیریزین از دیگر اجزای موجود در عصاره تام ریشه گیاه با استفاده از فاز معکوس صورت گرفته و نتایج تعیین مقدار رضایت بخش و قابل تکرار بوده است. با این روش، مقدار گلیسیریزین در نمونه‌های مختلف موجود در بازار در محدوده ۵/۴ - ۲/۱۵ درصد تعیین گردیده است.

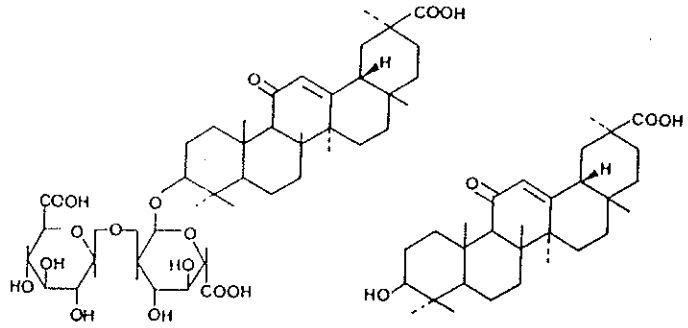
بمنظور مقایسه نتایج این روش با روش غیرمستقیم که براساس هیدرولیز گلیسیریزین و برآورد اسید گلیسیره‌تیک حاصل از آن می‌باشد، شرایط مناسبی نیز برای HPLC ژنین در عصاره کلی هیدرولیزشده گیاه ارائه شده است و نهایتاً تعیین مقدار بر این اساس هم صورت پذیرفته و نتایج حاصل از آن با روش مستقیم مقایسه گردیده است.

مقدمه

اهمیت درمانی گلیسیریزین، عمده‌ترین ترکیب شیمیایی شیرین بیان از زمانهای قدیم توسط مصریها، یونانیها و رومیها شناخته شده و امروزه نیز بوسیله تحقیقات فارماکولوژیکی و بالینی مورد تایید قرار گرفته است. بطوریکه بعنوان یک داروی بهبود دهنده زخمهای پپتیک و ضد التهاب و نیز به جهت خاصیت شبه کورتیزون در درمان بیماری آدیسون بکار رفته است. علاوه بر این به جهت طعم شیرین بعنوان عامل معطر کننده و پوشاننده طعم تلخ و نامطبوع بعضی از داروها مورد استفاده میباشد. خواص سورفکتانتی گلیسیریزین که جزء ساپونینها تری ترپنی محسوب می‌شود باعث تسهیل جذب داروهای کم محلول مانند گلیکوزیدهای آنتراکینونی می‌گردد. گذشته از مصارف درمانی گلیسیریزین، این ماده بصورت خالص و یا داخل عصاره تام، موارد مصرف زیادی در صنایع غذایی و غیره دارد که از آن جمله میتوان به ساخت آدامسها، شکلاتها، سیگارتها، توتونهای پیپ، آدامسهای محتوی نیکوتین، مشروبات الکلی و نیز تهیه محتویات کپسولهای آتش نشانی اشاره نمود (۱).

ریشه شیرین بیان علاوه بر فلاوونوئیدها، محتوی مخلوط پیچیده‌ای از ساپونینها تری ترپنی بوده که فراوانترین آنها اسید گلیسیریزیک یا مشتق دی گلوکورونیک اسید گلیسیره‌تیک می باشد. تری ترپنها دیگری نیز ازگیاه جدا شده و ساختمان آنها تعیین گردیده است (۲ و ۳). با این وجود اسید گلیسیره‌تیک و ملح آمونیم اسید گلیسیریزیک در بازار تجارت حائز اهمیت می‌باشد.

1. Glycyrrhiza glandulifera, Glycyrrhiza glabra



اسید بتا گلیسیره‌تیک گلیسیریزین

نظر بر اینکه مصرف گلیسیریزین در فرآورده‌های دارویی و یا غذایی سبب دفع یون پتاسیم و احتباس یون سدیم و آب می‌گردد و در اثر استفاده طولانی منجر به ادم و عوارض مختلف نظیر افزایش فشار خون می‌شود، لذا تعیین مقدار این ماده در محصولات مختلف دارویی و غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

تعیین مقدار گلیسیریزین از مدتها پیش مورد توجه بوده و تکنیکهای متعدد و متنوعی را برای برآورد این ماده در ریشه‌های گیاه و با عصاره و یا سایر فرآورده‌های آن بکار گرفته‌اند. از آن جمله می‌توان به روشهای زیر اشاره نمود.

روش گراویمتری که در این روش گلیسیریزین را پس از ترسیب بوسیله یک اسید معدنی قوی تعیین مقدار می نمایند. با استفاده از کولوریمتری FUCHS(۴)، اسیدهای ارونیک آزاد شده از گلیسیریزین را پس از هیدرولیز در حضور نافتورزورسینول و اسید کلریدریک غلیظ اندازه‌گیری می‌نمایند. علاوه بر آن رنگ تولید شده بوسیله ژنین یعنی اسید گلیسیره‌تیک با وانیلین سلفوریک نیز بدین منظور بکار گرفته میشود و بالاخره از روشهای کولوریمتری میتوان به کوپلاژ متیلن بلو با خصلت بازی و اسید گلیسیره‌تیک اشاره نمود که ترکیب رنگی تولید شده مبنای تعیین مقدار گلیسیریزین بعد از هیدرولیز اسیدی میگردد (۵).

کروماتوگرافی نیز به همین منظور مورد استفاده قرار گرفته بطوریکه سطح لکه تولید شده پس از ایجاد رنگ اسید گلیسیره‌تیک با آنیزآلدئید سولفوریک محاسبه و اساس تعیین مقدار قرار می‌گیرد (۵).

فتودانسیتومتری لکه‌های گلیسیریزین بر مبنای شدت رنگ تولید شده در حضور سولفات سریوم نیز برای تعیین مقدار مستقیم مورد استفاده بوده است (۷).

گاز کروماتوگرافی نیز پس از هیدرولیز گلیسیریزین به اسید گلیسیره‌تیک و متیلاسیون عامل کربوکسیل ژنین و تری متیل سیلیلاسیون عامل الکلی برای تعیین مقدار بکار رفته است (۸).

در اغلب روشهای HPLC تعیین مقدار ژنین پس از هیدرولیز روی فاز معکوس صورت می‌گیرد (۹).

اختلاف نتایج حاصله از روشهای ذکر شده قابل ملاحظه است، زیرا اغلب این روشها اختصاصی نیستند. روش گراویمتری به هنگام ترسیب گلیسیریزین بسیاری از مواد عصاره رسوب می‌کند و TLC رسوب حاصله بطور وضوح نشان می‌دهد که علاوه بر گلیسیریزین ترکیبات زیادی از جمله فلاوونوئیدها نیز رسوب کرده‌اند.

روش‌های کولوریمتری نیز اختصاصی نبوده و ترکیبات زیادی از عصاره مانند فنل‌ها، استروئیدها و روغن‌های فرار می‌توانند با وانیلین سولفوریک وارد واکنش شود و همچنین در مورد معرف متیلن بلو، سایر اسیدهای آلی موجود در عصاره قادرند با معرف کوپله شده و نتایج تعیین مقدار را تغییر بدهند.

بطور کلی روشهائی که بر پایه هیدرولیز گلیسیریزین و تعیین مقدار اسید گلیسیره‌تیک استوار هستند نتایج قابل اعتمادی را ارائه نمی‌دهند، زیرا وجود اسید گلیسیره‌تیک آزاد در عصاره، انجام یک هیدرولیز کامل و در نهایت استخراج تمامی ژنین آزاد شده از عواملی هستند که میتوانند باعث تغییر نتایج و غیرقابل تکرار بودن نتیجه روش را سبب بشوند.

با در نظر گرفتن معایب روشهای فوق‌الذکر به نظر می‌رسد کاربرد HPLC برای دوزاژ مستقیم گلیسیریزین در صورتی که بتوان شرایط ایده‌آلی از نظر جداسازی و Rt مناسب

فراهم کرد روش با ارزشی برای تعیین مقدار این ماده محسوب بشود. زیرا بکارگیری روش مستقیم تعیین مقدار گلیسیریزین سبب میشود بسیاری از عوامل موثر در تغییر نتایج از جمله هیدرولیز، استخراج ژنین، کاربرد واکنشهای رنگی غیراختصاصی حذف گردیده و زمان لازم برای انجام تعیین مقدار به حداقل ممکن کاهش بیابد.

بخش تجربی

مواد بکار رفته

انواع ریشه شیرین‌بیان از منابع متفاوت تهیه گردیده شد.*[1] استاندارد گلیسیریزین و اسید گلیسیره‌تیک از شرکت Sigma فراهم گردید. مواد شیمیایی بکار برده شده و همچنین حلالهای نوع HPLC grade ساخت کارخانه مرک آلمان بودند.

تجهیزات

دستگاه HPLC Shimadzu LC - 8A شامل قسمتهای زیر :

- پمپ پره پاراتیو LC - 8A
- دتکتور SPD - 6AV visible - UV
- انتگراتور C - R4A
- Column Oven CTO - 6A
- Injector ساخت کارخانه Rheodyne

شرایط HPLC

- جداسازی گلیسیریزین از عصاره تام اولیه ریشه شیرین‌بیان بترتیب زیر صورت گرفته است :

ستون: نوع Shim - pack CLC - CN (6.0mm ID x 15 Cm)

فاز متحرک : مخلوطی به نسبت ۳ حجم دی اکسان و ۷ حجم بافر فسفاته به غلظت 10 mM/L با pH = ۲/۶

دمای ستون : ۴۰ درجه سانتیگراد

جریان حلال : ۱/۵ ml/min

دتکتور UV : ۲۵۴ nm

حجم تزریق : ۲۰ میکرولیتر

- شرایط جداسازی اسید گلیسیره‌تیک در عصاره هیدرولیز شده شیرین‌بیان عبارت بودند از :

ستون : نوع Shim-pack CLC - C8 (6.0 mm ID× 15 Cm)

فاز متحرک : مخلوطی به نسبت ۸ حجم متانول و ۲ حجم بافر فسفاته به غلظت ۱۰mM/L با pH = ۲/۶

دمای ستون : ۲۵ درجه سانتیگراد

جریان حلال : ۱ ml/min

دتکتور UV : ۲۵۴ nm

حجم تزریق : ۲۰ میکرولیتر

تهیه محلول استاندارد گلیسیریزین

۱۰۰ میلی گرم از استاندارد گلیسیریزین را بدقت توزین نموده و در مخلوطی به نسبت ۳ به ۷ دی اکسان و بافر فسفاته (pH = ۲/۶) حل نموده و در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری به حجم می‌رسانیم. ده میلی لیتر آنرا از صافی چینی با منافذ۲ میکرون عبور می‌دهیم از این محلول ۲۰ میکرولیتر تحت شرایط ذکر گردیده به دستگاه HPLC تزریق می‌کنیم. برای حصول اطمینان از تکرارپذیری آزمایش عمل تزریق را چندبار انجام داده و مشاهده گردید که خطا بسیار ناچیز و همواره نتایج ثابت می‌باشد. از اینرو دستگاه را براساس سطح زیر منحنی و غلظت محلول استاندارد کالیبره نموده و به این ترتیب آماده برای تعیین مقدار گلیسیریزین در عصاره‌های گیاهی می‌گردد.

تعیین مقدار گلیسیریزین در نمونه‌های گیاهی

یک گرم از پودر شیرین‌بیان را به دقت توزین نموده و با ۵۰ میلی لیتر اتانول ۵۰٪ بمدت یکساعت داخل بن ماری جوشان رفلاکس می‌نماییم. پس از خنک نمودن مخلوط عصاره هیدروالکلی صاف گردیده و تفاله بار دیگر با ۵۰ میلی‌لیتر از همان حلال تحت شرایط فوق استخراج می‌گردد (۷). عصاره‌های حاصل را روی هم افزوده و در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم رسانیده و ۱۰ میلی لیتر از آنرا با صافی چینی ۲ میکرونی صاف نموده و ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تحت شرایط ذکر شده تزریق می‌کنیم. عمل تزریق چندبار تکرار شد و ملاحظه گردید که نتایج تعیین مقدار کاملاً

---

۱. منابع تهیه عبارت از: الف -باغ بوتانیک دانشکدهٔ داروسازی تبریز
ب- گیاهان جمع‌آوری شده از مزارع اطراف ارومیه

یکسان و بدون تغییر می‌باشد.

تهیه محلول استاندارد اسید گلیسیره‌تیک

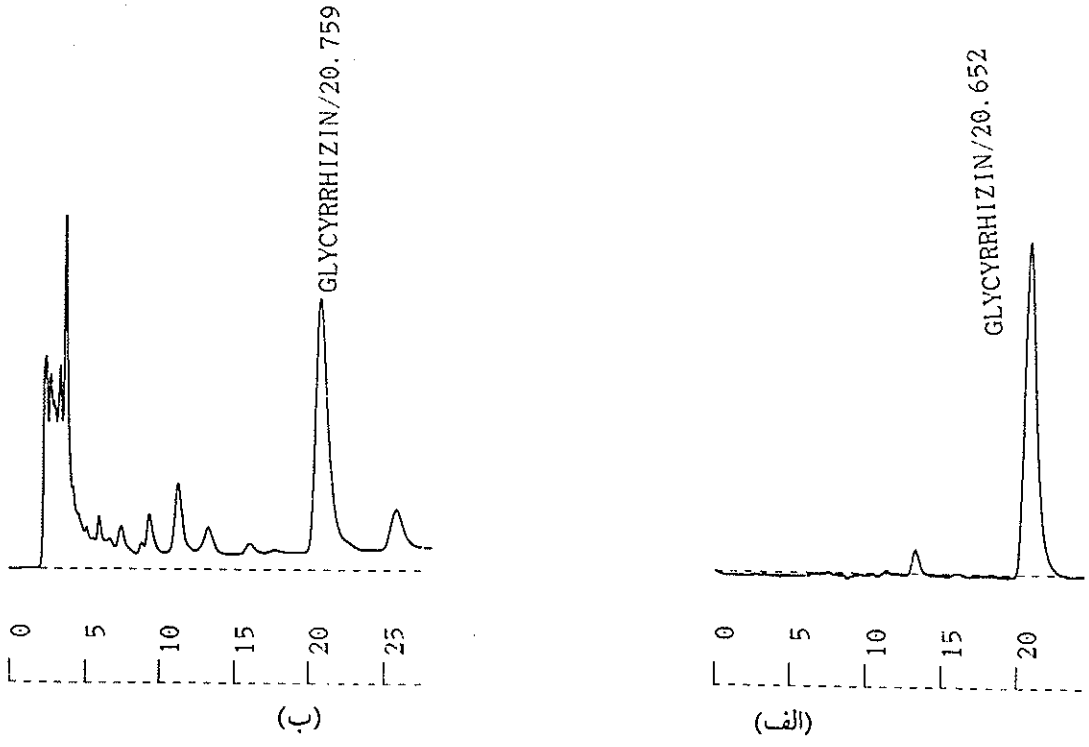
۴۰ میلی گرم از استاندارد اسید گلیسیره‌تیک را در مخلوطی به نسبت ۸ به ۲ از متانول و بافر فسفاته (pH = ۲/۶) حل نموده و در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم می‌رسانیم. ۱۰ میلی لیتر آنرا از صافی چینی با منافذی به قطر ۲ میکرون عبور داده و از صاف شده ۲۰ میکرولیتر تحت شرایط ذکر شده، به دستگاه HPLC تزریق می‌کنیم. عمل تزریق چندین بار تکرار شده و همواره نتایج یکسانی حاصل میشود. دستگاه همانند طریقه ذکر شده برای گلیسیریزین کالیبره می‌گردد.

هیدرولیز عصاره تام شیرین‌بیان و تعیین مقدار اسید گلیسیره‌تیک

۳ گرم پودر شیرین‌بیان را بدقت توزین نموده و با ۲۰ میلی لیتر دی‌اکسان ۵۰٪ مخلوط می‌نماییم و سپس آنرا بمدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری جوشان& رفلاکس می‌کنیم. ۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۵٪ (w/v) بدان افزوده و رفلاکس در بن ماری جوشان را بمدت ۳ ساعت دیگر ادامه می‌دهیم. پس از توقف حرارت و خنک نمودن مخلوط ۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم بدان افزوده و حرارت را بمدت ۱۵ دقیقه دیگر در تحت رفلاکس ادامه داده و سپس مخلوط حاصل را پس از خنک نمودن صاف نموده و با ۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم، باقیمانده روی کاغذ صافی را شستشو می‌دهیم. کل مخلوط صاف شده را وارد آمپول دکانتاسیون نموده و فاز کلروفرمی را جدا و فاز مائی را مجدداً دوبار و هر بار با ۳۰ میلی لیتر کلروفرم شستشو می‌دهیم. فازهای کلروفرمی را جمع‌آوری و بوسیله سولفات سدیم آنیدر خشک می‌کنیم (۹). پس از آن کلروفرم را بوسیله تبخیر در خلاء خارج نموده و باقیمانده خشک را در اتانول حل می‌نماییم و در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری به حجم می‌رسانیم. ۱۰ میلی لیتر از آنرا از صافی چینی با منافذی به قطر ۲ میکرون عبور داده و از آن ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق می‌کنیم. نتایج تکرار عملیات تعیین مقدار کاملاً یکسان و بدون تغییر می‌باشند.

نتیجه و بحث

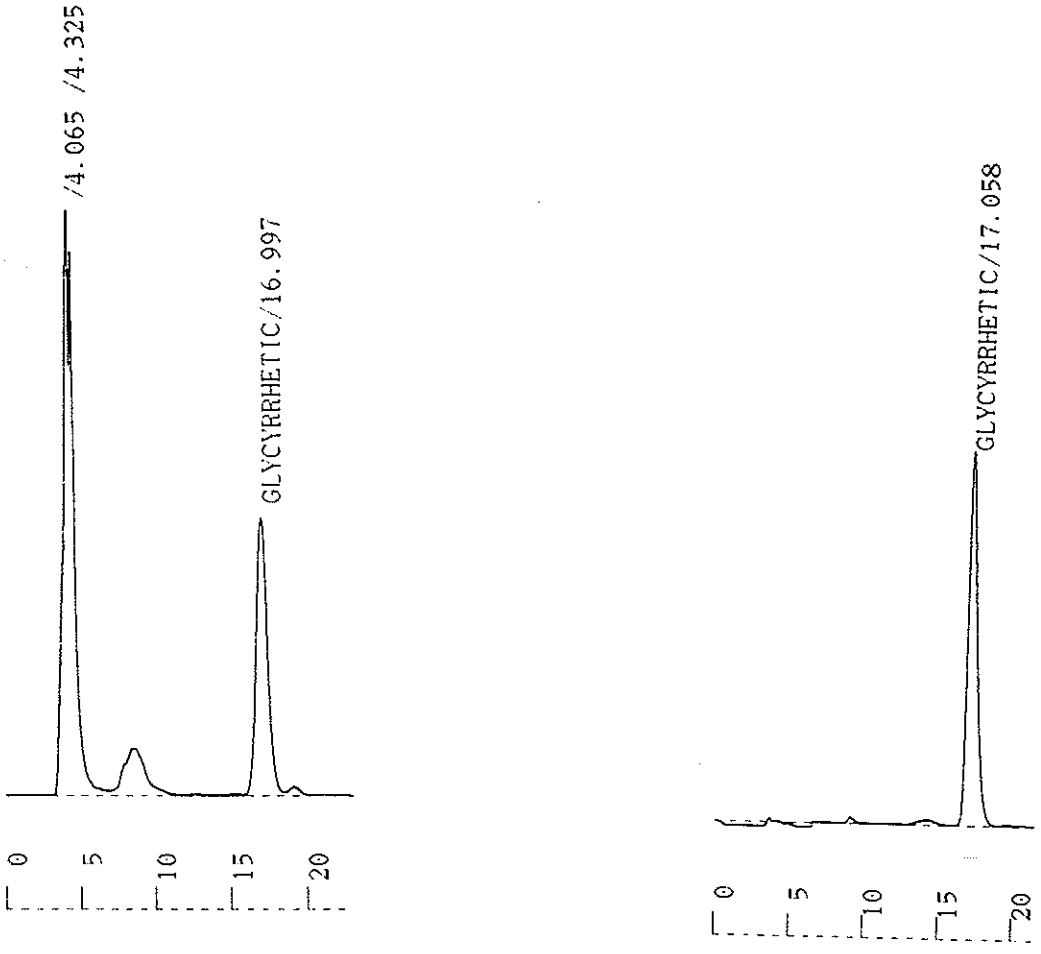
تعیین مقدار گلیسیریزین به طریقه مستقیم نتایجی در محدوده ۵/۴ - ۲/۱۵ درصد در انواع شیرین‌بیان بدست می‌دهد. شکل ۱ طیفهای حاصل از HPLC گلیسیریزین استاندارد و عصاره هیدروالکلی را نشان می‌دهد.



شکل ۱ - طیف‌های حاصل از HPLC گلیسیریزین استاندارد (الف) و عصاره هیدروالکلی ریشه شیرین‌بیان (ب)

با بکارگیری این روش نتایجی که همواره برای یک نمونه خاص حاصل می‌گردد مقدار ثابتی است. با مروری بر روشهای قبلی تعیین مقدار گلیسیریزین مانند گراویمتری و کولوریمتری مشاهده می‌گردد که نتایج بدست آمده از این روشها در اغلب موارد اختلاف زیادی با یکدیگر داشته و بعلت اختصاصی نبودن روش غالباً مقادیر بالاتری حاصل می‌گردد.

طیفهای بدست آمده از HPLC اسید گلیسیره‌تیک استاندارد و عصاره هیدرولیز شده گیاهی در شکل ۲ آورده شده است.



(ب) (الف)

شکل ۲ - طیفهای حاصله از HPLC اسید گلیسیره‌تیک استاندارد (الف) و عصاره هیدرولیز شده شیرین بیان (ب)

نتایج حاصل از روش غیرمستقیم، مقدار اسید گلیسیره‌تیک را در محدوده ۱/۱ - ۰/۴۵ درصد برای نمونه‌های مختلف ریشه شیرین‌بیان بدست می‌دهد. این نتایج علاوه بر اینکه همواره برای یک نمونه مشخص متغیر بوده بلکه غیرواقعی نیز می‌باشد، چراکه وزن ژنین ۵۷٪ وزن گلیکوزید مربوطه است و از این رو انتظار می‌رفت که مقدار ژنین در محدوده ۳ - ۱/۲ درصد بدست آید ولیکن انحراف از این محدوده قابل توجه است. انحرافات مشاهده شده ناشی از مرحله استخراج و هیدرولیز بوده و به هیچ وجه متوجه مرحله تعیین مقدار ژنین حاصله بوسیله HPLC نمیگردد زیرا این روش کاملاً اختصاصی و دقیق میباشد.

بمنظور بررسی دقیق‌تر علت انحراف نتایج مشاهده شده در نمونه‌ای از پودر ریشه شیرین‌بیان ابتدا مقدار گلیسیریزین و اسید گلیسیره‌تیک آزاد اندازه‌گیری گردید و سپس پودر مورد آزمایش تحت هیدرولیز قرار گرفته و مجدداً اقدام به تعیین مقدار اسید گلیسیره‌تیک آزاد شده و گلیسیریزین هیدرولیز نشده در داخل مخلوط هیدرولیز و تفاله پودر مورد استفاده گردید. ارقام و نتایج حاصله از این بررسی نشان می‌دهند که مقدار گلیسیریزین در نمونه قبل از هیدرولیز ۵/۲۴۹۶ درصد (با احتساب معادل اسید گلیسیره‌تیک آزاد) بعبارت دیگر حدوداً دو برابر معادل آن بعد از هیدرولیز ۲/۵۳۷ درصد می‌باشد. با در نظر گرفتن اینکه گلیسیریزین هیدرولیز نشده در این بررسی جزء نتایج حاصله منظور گردیده، لذا باید پذیرفت که نیمی از گلیسیریزین موجود در ابتدای عملیات در طول زمان هیدرولیز تجزیه شده و از بین می‌رود. به همین جهت در فرآورده‌های مختلف بخصوص در محصولاتی که فاقد گلیسیریزین اعلام می‌گردند باید برای احتراز از نتایج غیرواقع کنترل و تعیین مقدار گلیسیریزین بطور مستقیم انجام بگیرد.

منابع

1. Tyler, V.E.; Brady, L.R.; Robbers, J.E. Pharmacognosy; 9th edition;Lea & Febiger,Philadelphia, 1988; pp 68-69.
2. Elgamal, M.H.A.; EL - Tawil, B.A.H. Planta medica, 1975; 27, 159.
3. Elgamal, M.H.A.; Fayez, M.B.E. Acta chiln. Acad . sci. Hung. 1968; 58, 75.
4. Fuchs, L.; Trauner - Adelpoller, J. Scientica Pharm. 1948; 1, 2.
5. habib, A.A.M.; EL - Sebakhy, N.A.; Kadry, H.A.J. Pharm. Sci. 1979; 68, (10), 12.
6. Jeannes, A.; Tetau, M. Plantes Med. et Phytother. 1971; 5, 214.
7. Takino, Y.; Koshioka, M.; Shiokawa, M.; Ishii, Y.; Maruyama, S.; Higashino, M.; Hayashi, T. Planta Medica, 1979; 36, 74.
8. Bombardelli, E.; Gabbeti, B.; Martinelli, E.M.; Mustch, G. Fitoterapia, 1979; 1, 11.
9. Killacky, J.; Ross, M.S.F.; Turner, T.D. Planta Medica, 1976; 30, 310.

Title : Quantitative determination of Glycyrrhizine and Glycyrrhetic acid in roots of Liquorice[1] by HPLC

AUthors : DJ. Afshar and A.Delazar

Address : Department of Pharmacognosy, College of pharmacy, Medical Sciences University of Tabriz, Tabriz Iran.

Abstract

Most of the methods of determination of Glycyrrhizine in the roots of Liquorice are non - specific and relying on indirect methods. The results obtained from these methods are usually unreal and unreliable. In this paper Glycyrrhizine iv various Liquorice roots was estimated directly by HPLC without hydrolysing Glycyrrhizine to its aglycone. Hence the existing problems that considerably change results are eliminated. In this method, Glycyrrhizine was separated from other components of total extract using reverse phase high performance liquid chromathography and the results of determinations have been satisfactory and reproducible. The Glycyrrhizine content was 2.15 - 5.4 percent in the various liquorice roots.

Also suitable condition is reported for HPLC of Glycyrrhetic acid in hydrolyzed total extract. Therefore Glycyrrhizine was also determinated by indirect method. This method is based on hydrolysing Glycyrrhizine and estimating Glycyrrhetic acid . Results of direct method are compared with this method.

1. Glycyrrhiza gladulifera, Glycyrrhiza glabra