



Determinación de glicirricina en alimentos empleando técnicas cromatográficas

Apellidos, nombre	García Martínez, Eva (evgarmar@tal.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de Alimentos
Centro	ETSIAMN. Universitat Politècnica de València

1 Resumen de las ideas clave

La raíz de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) es una de las hierbas medicinales más consumidas en Europa, Asia y Estados Unidos. La glicirricina se encuentra en la raíz de la planta de regaliz, es el principio activo más importante y se utiliza en la industria de alimentos principalmente como edulcorante y saborizante, y en la industria farmacéutica por su actividad antiinflamatoria, antivírica, antialérgica y hepatoprotectora. Sin embargo, su consumo a altas concentraciones incrementa la presión sanguínea y favorece la retención de agua y de cloruro sódico.

En este objeto de aprendizaje vamos a describir cómo separar e identificar glicirricina en distintas muestras de alimentos empleando cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por otro lado, mediante un ejemplo práctico en un alimento, se calculará la concentración de glicirricina a partir de los datos de las áreas de los picos obtenidas por HPLC y se valorará su mención en el etiquetado.

2 Introducción

La raíz de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) es una de las hierbas medicinales más consumidas en Europa, Asia y Estados Unidos (Figura 1). Debido a su actividad expectorante, se usa en numerosas preparaciones farmacológicas y debido a su sabor dulce se añade a muchas infusiones para mejorar su sabor. Es nativa del Mediterráneo y se encuentra distribuida en climas templados y subtropicales. Se trata de una planta de la familia Fabaceae, de más de 2 m de altura, perenne, y se cultiva en Europa, Irán, Afganistán e India. Su uso en medicina tradicional se extiende a países como China, Marruecos, Tailandia, Turquía o India. Así, las raíces se emplean como afrodisiacos, diuréticos, en el tratamiento de bronquitis, tos, fiebre, gastroenteritis...



Figura 1. Raíz de Regaliz (*Glycyrrhiza glabra*)

2.1 Propiedades químicas y fisiológicas de la glicirricina. Riesgos de su consumo

La glicirricina o ácido glicírrico (Figura 2) tiene estructura de saponina, se encuentra en la raíz de la planta de regaliz, del que es el principio activo más importante (2-15%). Este triterpeno se forma al unirse el ácido glicirretínico con el ácido O-β-D-glucuronosil-(1,2)-β-D-glucurónico; su sal de amonio es un potente edulcorante, hasta 100 veces más dulce que la sacarosa. Por ello se utiliza en la industria de alimentos principalmente como edulcorante y saborizante, y en la industria farmacéutica como compuesto antiinflamatorio, antivírico, antialérgico y hepatoprotector.

Sin embargo, su consumo a altas concentraciones incrementa la presión sanguínea y favorece la retención de agua y de cloruro sódico. Los efectos adversos se manifiestan en dosis que oscilan entre los 100 y 400 mg/día (equivalentes a 50-200 g de dulces con un contenido de 0.2% de glicirricina). Según estudios in vivo y evidencia clínica, se acepta como dosis diaria 0.015-0.229 mg glicirricina /kg peso corporal/día (Isbrucker y Burdock, 2006). Por lo tanto, el contenido en glicirricina de los alimentos ha de ser cuidadosamente evaluado.

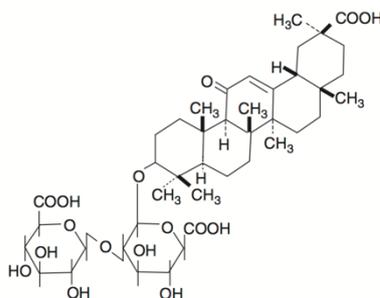


Figura 2. Estructura química de la glicirricina

Debido a los efectos adversos que puede producir el consumo abusivo de regaliz, en julio de 2005 (RD 892/2005, de 22 de julio) se modificó la Normativa General de Etiquetado, Presentación y Publicidad de los productos alimenticios (RD 1334/1999 de 31 julio), en lo que respecta a los productos alimenticios que contienen ácido glicirricico y su sal amónica. Así, en cuanto al etiquetado de productos que contengan esta sustancia, se tendrá que recoger de manera obligatoria las siguientes indicaciones (Reglamento UE 1169/2011 del parlamento europeo y del Consejo de 25 octubre de 2011) sobre la información alimentaria facilitada al consumidor:

- ✓ **“Contiene regaliz”**: esta leyenda debe aparecer en dulces y bebidas que contengan ácido glicirricico o su sal de amonio, por adición de la sustancia o sustancias en sí, o de la planta del regaliz “*Glycyrrhiza glabra*”, con una concentración ≥ 100 mg/kg ó 10 mg/L, a menos que la palabra “regaliz” ya conste en la lista de ingredientes o en la denominación del alimento.
- ✓ **“Contiene regaliz: las personas que padezcan hipertensión deben evitar un consumo excesivo”**: esta leyenda debe aparecer en dulces que contengan ácido glicirricico o su sal amónica por adición de la sustancia o sustancias en sí, o de la planta de regaliz “*Glycyrrhiza glabra*”, en una concentración ≥ 4 g/kg y en bebidas en una concentración ≥ 50 mg/L, o ≥ 300 mg/L en el caso de las bebidas que contengan más de un 1.2 % de alcohol.

2.2 Técnicas de análisis

Las técnicas cromatográficas consisten en la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Todas las técnicas cromatográficas

dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre esas dos fases. Según lo anterior, son posibles varios tipos de cromatografía, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: pueden ser sólido-líquido (capa fina, papel o columna), o bien líquido-líquido o gases-líquido (fase vapor).

- La cromatografía en capa fina (CCF) es la técnica de análisis más común para la determinación de glicirricina, especialmente cuando se requieren análisis cualitativos y cuantitativos rápidos, y de bajo coste. En CCF se utiliza una placa recubierta con el adsorbente (fase estacionaria) en forma de una capa delgada, de espesor constante, adherida sobre un soporte rígido, que puede ser una placa de vidrio, aluminio o poliéster. Hay adsorbentes que contienen un indicador de fluorescencia para facilitar la identificación de muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloreados, se requerirán otras técnicas de revelado.

El eluyente (fase móvil) ascenderá por capilaridad por la placa y arrastrará los componentes en forma diferenciada a lo largo de ésta, produciendo "manchas". El grado de elución de las sustancias dependerá tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado.

- Por otra parte, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna donde por acción de una bomba, se hace pasar una mezcla de compuestos en un sistema disolvente, comúnmente conocido como fase móvil. La fase móvil pasa, a un flujo especificado, a través de una columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria. La separación de los compuestos ocurre en base a la interacción de éstos con la fase móvil y la fase estacionaria. La utilización de diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar.

3 Objetivos

Con este objeto de aprendizaje se persigue que los alumnos sean capaces de:

- Separar e identificar la glicirricina en distintas muestras de alimentos mediante cromatografía en capa fina (CCF).
- Aplicar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar, identificar y cuantificar el contenido en glicirricina de distintas muestras de alimentos.
- Calcular la concentración de glicirricina a partir de los datos de las áreas de los picos obtenidas por HPLC.
- Indicar correctamente su aparición en el etiquetado de un alimento.

4 Desarrollo

A continuación, vamos a describir el material necesario y las metodologías analíticas para cuantificar la glicirricina por dos técnicas cromatográficas: CCF y HPLC. Además, se detallará cómo calcular su contenido a partir de la resolución de un supuesto práctico.

4.1 Material y reactivos

Para llevar a cabo la determinación de glicirricina que se describe en este artículo se necesitará el siguiente material:



Material e instrumentación:

- Balanza analítica
- Espátula
- Pinzas
- Matraces aforados de 10 mL
- Matraz Erlenmeyer de 50 mL
- Vaso de precipitados de 100 mL
- Placa calefactora con agitación
- Probeta 25 mL
- Centrifuga
- Baño refrigerante
- Tubos de centrifuga
- Micropipetas de 10 y 1 mL y 2 μ L
- Jeringa y filtros de jeringa de nylon de 0.45 μ m.
- Embudo Butchner y Kitasatos para la filtración de la fase móvil
- Sistema de desgasificación de la fase móvil: baño ultrasonidos
- Viales de inyección
- Equipo cromatográfico: HPLC con detector UV-visible
- Cámara cromatográfica
- Cromatoplaca (silicagel 60)
- Estufa
- Disolvente eluyente (cloroformo:metanol:ácido acético glacial: agua (8: 4: 1.5: 1)
- Reactivo revelador (Mezcla 1:1 de una disolución de 1 g de vainillina disuelta en 100 mL de etanol al 95% y una disolución de 5 mL de ácido sulfúrico disuelto en 100 mL de etanol 95%).

Reactivos químicos:

- | | |
|-------------------------|-------------------|
| • Cloroformo | • Ácido sulfúrico |
| • Ácido acético glacial | • Vainillina |
| • Metanol | • Acetonitrilo |
| • Etanol | • Agua ultrapura |
| • Glicirrizina | |

4.2 Procedimiento experimental

Preparación de los extractos

Pesar entre 0.5-1 g de muestra triturada, traspasar a un matraz de 50 mL y añadir 20 mL de etanol:agua (1:1 v/v). Mantener la mezcla en agitación a 60 °C durante 20 min, enfriar y centrifugar durante 10 min a 3000 rpm. Tomar el sobrenadante.

Preparación del patrón de glicirricina

Preparar una disolución concentrada de 2000 ppm (disolución madre): para ello disolver 20 mg del patrón Glicirricina en 10 mL de agua bidestilada.

4.2.1. Separación de la glicirricina mediante CCF

Los extractos diluidos en etanol (50%) de las muestras se analizarán mediante CCF para separarlos de otros fitoconstituyentes presentes. Emplear como disolvente la mezcla cloroformo:metanol:ácido acético glacial: agua (8:4:1.5:1). En la figura 3 se resumen los pasos que se describen a continuación.

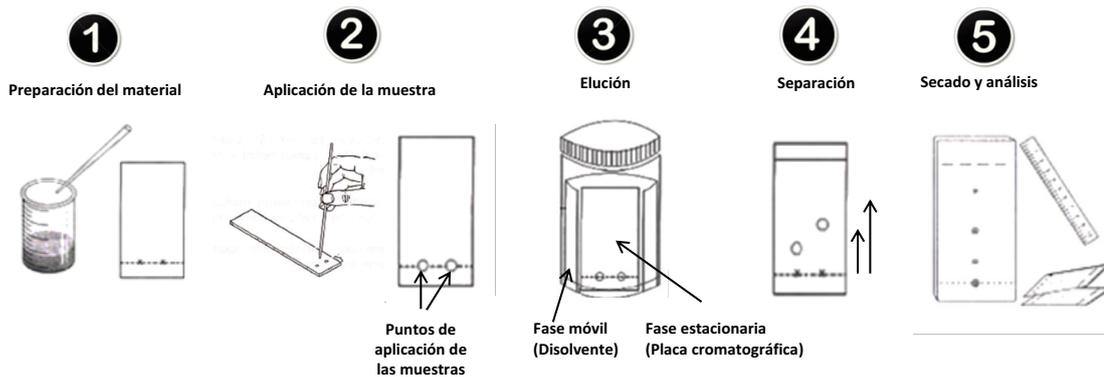


Figura 3. Análisis por cromatografía en capa fina

1. En una placa de CCF trazar con lápiz una línea a 2 cm del borde inferior y 2.5 cm de los bordes derecho e izquierdo. Señalar sobre ella varios puntos equidistantes.
2. Depositar en la cromatoplaquea con una micropipeta 2 μL , la solución standard de glicirricina, y el extracto de las muestras anteriormente obtenido. Al tocar brevemente la placa con la micropipeta el líquido se absorbe en la placa por capilaridad. Pinchar brevemente tres veces en el punto para conseguir una mancha de pequeño tamaño.
3. Para desarrollar el cromatograma, depositar la placa en una cubeta de cromatografía a la que previamente se ha añadido una pequeña cantidad del eluyente. Hay que tener cuidado de que el nivel de eluyente esté por debajo del punto donde ha sido "pinchado" el producto. Tapar la cubeta y dejar que el eluyente ascienda por capilaridad. Los cromatogramas se desarrollan por cromatografía ascendente usando como eluyente una disolución de cloroformo:metanol:ácido acético glacial: agua (8: 4: 1.5: 1). El disolvente arrastra la muestra a su paso, separando sus componentes. Las distintas moléculas tienen distinta polaridad, es decir, distinta afinidad por la fase móvil y por la estacionaria, por lo que se mueven a velocidades diferentes y alcanzan alturas diferentes sobre la placa.
4. Antes de que el frente del disolvente ascienda por capilaridad hasta el otro extremo de la placa, ésta se saca de la cubeta con unas pinzas y con un lápiz se hace una señal indicando hasta dónde ha llegado el eluyente.
5. Tras dejar evaporar el disolvente de la placa en una estufa, revelar la placa y medir la distancia recorrida por la muestra y compararla con el patrón, tal y como se describe a continuación.

Revelado de las placas cromatográficas

El siguiente paso es el revelado de las placas cromatográficas, para ello, pulverizar ligeramente los cromatogramas desarrollados con el agente revelador en spray (vainilla-sulfúrico) y secar a 100 $^{\circ}\text{C}$ hasta el completo desarrollo del color.

Identificación de glicirricina

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como relación de frentes (R_f), y tiene un valor constante para

cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Para calcular el Rf se aplica la siguiente expresión (Figura 4, ecuación 1):

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (a)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (b)}} \quad (\text{ec.1})$$

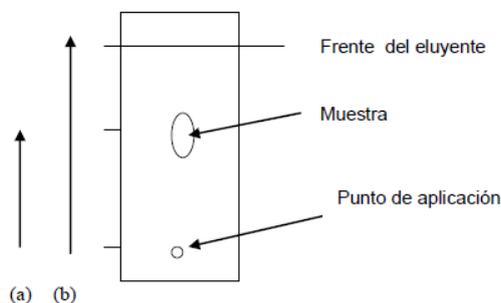


Figura 4. Relación de frentes (Rf)

4.4.2. Determinación de glicirricina por HPLC

Preparación de disoluciones patrón

A partir de la disolución de glicirricina de 2000 ppm preparada anteriormente (disolución madre), preparar disoluciones de 1000, 500, 400, 300 y 100 ppm.

Inyección de las muestras y de las disoluciones patrón

- Filtrar a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.45 μm tanto el sobrenadante procedente de la extracción de la muestra, como las disoluciones de patrón de glicirricina.
- Recoger el filtrado en un vial de inyección.
- Introducir el vial en el muestreador automático.

Condiciones cromatográficas

- Fase estacionaria: columna C18 (250 x 4.6mm) con tamaño de partícula 5 μm
- Volumen de inyección: 20 μL
- Detección : UV 254 nm
- Fase móvil: A, acetonitrilo:agua:ácido acético glacial (35:64:1,v/v/v); y B, metanol. Flujo 1 mL/min.
- Programación:

Tiempo (min)	Composición fase móvil (%)	
	A	B
0	99	1
10	90	10
13	80	20
15	70	30
20	60	40
30-45	50	50

4.3 Interpretación de los resultados mediante la resolución de un supuesto práctico

Vamos a imaginar que hemos extraído la glicirricina de unas muestras de caramelos de regaliz, según hemos explicado en el apartado 4.2 y hemos preparado las correspondientes disoluciones patrón de glicirricina según 4.4.2.

1. Identificación

En primer lugar se inyecta en el sistema cromatográfico la disolución madre de glicirricina (2000 ppm). El cromatograma obtenido nos permite comprobar el tiempo de retención (t_R) del compuesto (Figura 5).

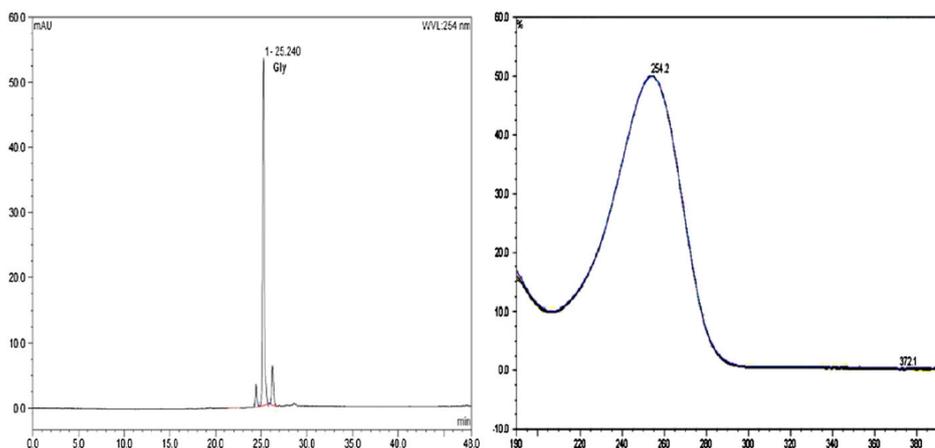


Figura 5. Cromatograma obtenido por HPLC(izquierda) y espectro UV a 254 nm (derecha) de la disolución patrón de glicirricina (2000 ppm)

Como puede observarse en la Figura 5, en este caso se obtiene que el tiempo de retención para la glicirricina es de 25 min. La posterior identificación de esta sustancia en la muestra se realiza por comparación de los t_R del patrón con los picos de los cromatogramas obtenidos.

2. Cuantificación

La determinación del contenido en glicirricina en las muestras se realiza por el método del patrón externo. Para ello, en primer lugar se inyectan las disoluciones patrón preparadas de 2000, 1000, 500, 400, 300 y 100 ppm de glicirricina.

- A partir de los cromatogramas obtenidos se calculan las áreas de los picos correspondientes para cada concentración.
- La representación de las áreas de los picos frente a los valores de concentración nos permite obtener la recta de calibrado, que será utilizada para calcular la concentración de esta sustancia en las muestras (Figura 6).

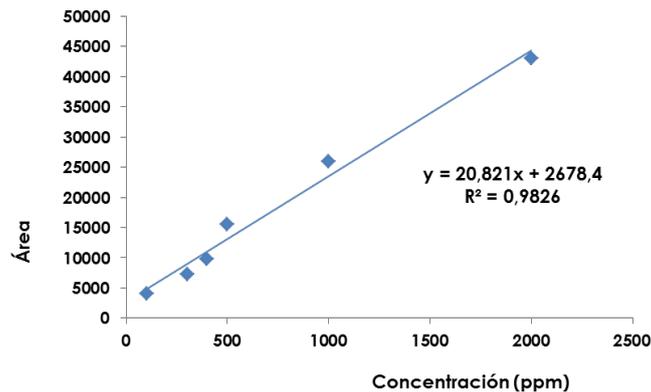


Figura 6. Recta de calibrado de patrón glicirricina obtenida

A continuación, se inyecta el extracto de la muestra y se analiza el cromatograma obtenido (Figura 7). En el cromatograma podemos identificar el pico correspondiente a la glicirricina y obtener su área.

- Sustituyendo el valor del área del pico correspondiente a la glicirricina en la muestra de caramelo, en las ecuaciones de la recta de calibrado, podemos calcular la concentración de glicirricina en el extracto de muestra inyectado en el cromatógrafo.

Veámoslo más claro resolviendo el ejemplo:

$$\text{Área (y)} = 25040 \rightarrow y = 20821x + 2678,4 \rightarrow \text{concentración (x)} = 1073,99 \text{ mg/L}$$

- Por último, para determinar la concentración de glicirricina en el caramelo (mg/ por 100 mg) tenemos que considerar las diferentes diluciones realizadas en el protocolo analítico.

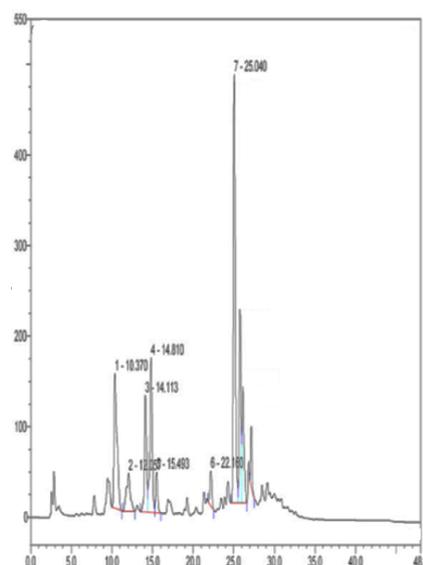


Figura 7. Ejemplo de cromatograma de una muestra de caramelo de regaliz

- Así en nuestro ejemplo, si hemos pesado 1 g de caramelo y hemos extraído con 20 mL de disolvente:

$$\text{Glicirricina} = \frac{1073.99 \text{ mg}}{\text{L}} \times \frac{0.021 \text{ L}}{0.001 \text{ kg}} = 22554 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \approx 22.5 \frac{\text{g}}{\text{kg}}$$

Con los resultados obtenidos, ¿cree que sería necesario indicar alguna mención en la etiqueta del producto?

Según hemos comentado en el apartado 2.1, puesto que el valor obtenido de glicirricina en el caramelo de regaliz es superior a 4 g/Kg, según el Reglamento UE 1169/2011, debe indicarse en la etiqueta del producto: “*Contiene regaliz: las personas que padezcan hipertensión deben evitar un consumo excesivo*”.

5 Cierre

En este objeto de aprendizaje se ha descrito el procedimiento para extraer y determinar la cantidad de glicirricina en alimentos mediante dos técnicas cromatográficas diferentes, por lado mediante cromatografía en capa fina, y por otro, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Además, mediante un ejemplo práctico se ha explicado cómo realizar los cálculos para obtener la concentración de glicirricina en g/kg a partir de los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico y se ha valorado la mención a indicar en la etiqueta del alimento, tal y como lo exige la correspondiente legislación.

6 Bibliografía

- [1] Belitz, H. D., Grosch, W. (2012). Química de los Alimentos. Ed Acribia.
- [2] RD 1334/1999 de 31 julio y RD 892/2005, de 22 de julio. Norma General del Etiquetado, Presentación y Publicidad de los productos alimenticios
- [3] Reglamento UE 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 octubre de 2011.
- [4] Bakshi, DNG., Sensarma, P., Pal, DC. (eds). (2001). Lexicon of Medicinal Plants in India. Naya Prokash: Calcutta, India, vol 2, pp 269-271.
- [5] Harinder, PS., Makkar, PS., Becker, K. (eds). (2007). Saponins. In: Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Springer Protocols: New York, USA, 393, pp 93-100.
- [6] Isbrucker, RA., Burdock, GA. (2006). Risk and safety assessment on the consumption of licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. Regulatory Toxicol Pharmacol 46: 167–192.