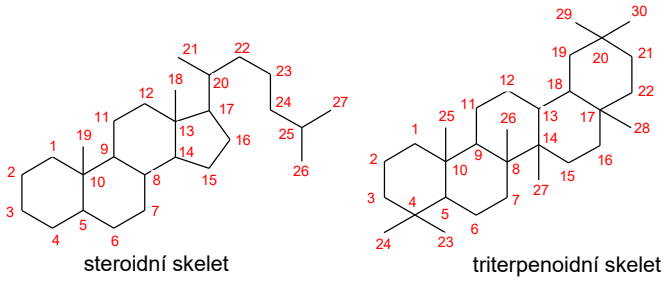
1.1.SAPONINY

Saponiny jsou přírodní látky, které dostaly název podle toho, že při protřepávání s vodou silně pění. Povrchová aktivita a srážení s bílkovinami a cholesterolem jsou také pravděpodobně příčinou jejich hemolytických vlastností, které znemožňují parenterální podání. Terapeuticky se využívají hlavně jako expektorancia a diuretika.

Saponiny se nacházejí v rostlinném materiálu jako glykosidy, které mohou být hydrolyzovány na lipofilní aglykon – sapogenin a cukernou složku. Tuto tvoří vedle glukosy, rhamnosy, galaktosy a xylosy také uronové kyseliny. Cukry (převážně jako oligosacharidy) jsou vázány nejčastěji přes hydroxyl v poloze C-3. Biogeneticky je sapogenin odvozen od kyseliny mevalonové, přičemž důležitým prekurzorem je skvalen.

Podle typu aglykonu lze saponiny dělit na steroidní a triterpenoidní.



V přírodě jsou, co do počtu, častější triterpenoidní saponiny. Nalézají se v rostlinách čeledí Fabaceae, Asteraceae, Araliaceae a v mnoha dalších. Steroidní saponiny jsou v přírodě méně rozšířené a nacházejí se u jednoděložných rostlin, zejména v čeledích Liliaceae, Dioscoreaceae, Agavaceae aj.

Základní skelet steroidních saponinů tvoří cyklopentanoperhydrofenanthren, čímž je dána příbuznost s dalšími nativními steroidy (steroidní hormony, žlučové kyseliny a kardioaktivní glykosidy).

Steroidní saponiny jsou rozpustné ve vodě a dalších polárních rozpouštědlech. Vliv stereochemie na aktivitu saponinů není tak důležitý, jako např. u kardioaktivních glykosidů. Přírodní sapogeniny se liší pouze v konfiguraci na C-3, C-5 a C-25. Podle bočního řetězce rozlišujeme spirostanový a furostanový typ steroidních saponinů.

Jsou velmi důležitým zdrojem látek se steroidním skeletem, užívaných pro výrobu steroidních hormonů.

Pentacyklické triterpenoidní saponiny, na rozdíl od steroidních saponinů, se velmi vzácně vyskytují v jednoděložných rostlinách, ale jsou běžné u dvouděložných Polygonaceae, Primulaceae, Hippocastanaceae a Caryophyllaceae. Jsou nerozpustné ve vodě, mírně v ethanolu za tepla. Triterpenoidní sapogeniny mohou být zařazeny do tří skupin: β-amyrinové, α-amyrinové a lupeolové.

1.1.1. KVALITATIVNÍ REAKCE SAPONINŮ

K důkazu saponinů se používají dva základní typy reakcí: srážecí a barevné. Nevýhodou těchto reakcí je, že nejsou specifické pouze pro saponiny. Poskytují je i ostatní triterpeny a steroidy přítomné v droze. Proto je nutné saponiny z drogy nejdříve vyizolovat.

1.1.1.1. Srážecí reakce

Saponiny tvoří komplexní sloučeniny s cholesterolem a srážejí se hydroxidem hořečnatým, hydroxidem barnatým, solemi mědi a olova a Nesslerovým zkoumadlem (tetrajodortuťnatan draselný $K_2[HgI_4]$).

1.1.1.2. Barevné reakce

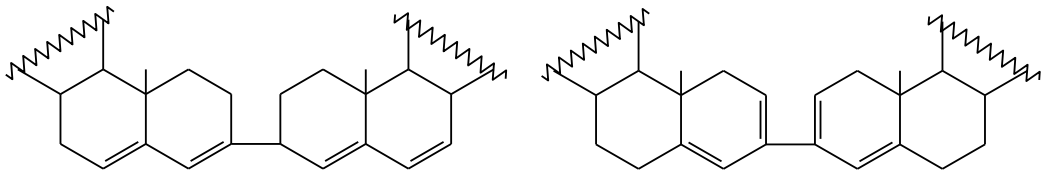
Nejčastěji se používají koncentrované kyseliny, zejména kyselina sírová nebo její směs s 96% ethanolem. Při těchto reakcích dochází většinou k dehydrogenaci, k vytvoření dalších dvojných vazeb a tím ke vzniku barevných sloučenin. Sloučenina se jeví barevná, jestliže z bezbarvého světla, které na ni dopadá, jednu část pohltí a druhou odrazí. A právě tato odražená část, která už neobsahuje paprsky všech vlnových délek, protože byly pohlceny sloučeninou, vyvolává v našem oku na sítnici barevný vjem. Pokud byla např. pohlcena oranžová složka bezbarvého světla, bude se nám sloučenina jevit v doplňkové barvě modrozelené. Zejména sloučeniny s vazbami C=C, C=N, C=O a N=N, dále pak sloučeniny s konjugovaným systémem dvojných vazeb nebo s připojenými aromatickými kruhy mají schopnost pohlcovat určitou složku na ně dopadajícího světla a tak se jevit v doplňkové barvě.

Salkowského reakce

S koncentrovanou kyselinou sírovou poskytuje mikrosublimát rozpuštěný v chloroformu žluté zabarvení, které přechází do různých barevných odstínů v závislosti od použité drogy.

Liebermann-Burchardova reakce

S anhydridem kyseliny octové a koncentrovanou kyselinou sírovou vznikají různé barevné odstíny v závislosti na použitém mikrosublimátu.



Barevné produkty Liebermann-Burchardovy reakce podle Watanabeho

Rosenthalerova reakce

S 1% roztokem vanilinu v koncentrované kyselině chlorovodíkové po mírném zahřátí vznikají různé barevné odstíny červené a fialové.

Lafonsova reakce

Provádí se přímo na řezu kůrou, nebo kořenem saponinové drogy. Po navlhčení řezu směsí koncentrované kyseliny sírové a 96% ethanolu (1:1) vzniká v buňkách pletiva červené zabarvení, které přechází do fialova.

Pro důkaz saponinů lze využít také jejich specifickou vlastnost hemolyzovat červené krvinky. Hemolytické působení není zcela výsadní vlastností saponinů, přestože v mnoha případech je jediným vodítkem pro jejich důkaz a kvantitativní hodnocení. Ve styku se saponiny se červené krvinky porušují, dochází k uvolnění hemoglobinu a k hemolýze. Hemolýzu lze provádět na krevní želatině nebo na krevním agaru. Saponiny extrahované z drogy ve styku s krevní želatinou nebo krevním agarem vytvářejí tzv. hemolytický dvůrek, tj. difundují do želatiny nebo agaru a způsobují hemolýzu krvinek, což se projeví zjasněním červené barvy agaru.

1.1.2. KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ SAPONINŮ

Při stanovení saponinů v drogách se používaly metody fyzikální (stanovení čísla pěnivosti), metody chemické (např. titrační stanovení kyseliny glycyrrhizové) a metody biologické (stanovení hemolytického indexu – stanovení množství hemolytických jednotek). Dnes se často využívají metody kapalinové chromatografie.

1.1.2.1. Stanovení čísla pěnivosti podle Koflera

Jednou z nejnápadnějších vlastností saponinů, jimiž se liší od ostatních glykosidů, je povrchová aktivita. Saponinové roztoky mají proti vodě značně snížené povrchové napětí a vyznačují se silnou pěnivostí. Povrchová aktivita jejich roztoků klesá s koncentrací a je značně závislá na průvodních složkách. Proto lze hodnocení saponinových drog podle povrchového napětí jejich extraktů použít jen omezeně, v relativním měřítku. Číslo pěnivosti je hodnota, kterou můžeme zhruba vyjádřit kvalitu saponinových drog. Číslo pěnivosti udává největší zředění výluhu drogy, který po protřepání vytvoří ve zkumavce prstenec pěny vysoký 1 cm.

1.1.3. DROGY S OBSAHEM SAPONINŮ

1.1.3.1. Primulae radix – Prvosenkový kořen (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek s kořeny druhu *Primula veris* L., prvosenka jarní, nebo *Primula elatior* (L.) Hill., prvosenka vyšší, Primulaceae. Droga hořké chuti.

Obsah: 5 – 10 % triterpenoidních pentacyklických saponinů, jejichž aglykony jsou deriváty priverogeninu A a B (*Primula veris*) a protoprimulageninu A (*Primula elatior*).

Zkoušky totožnosti:

1. 0,1g práškované drogy se smíchá s 5 ml teplé vody a po vychladnutí se protřepe. Vytvořená pěna je patrná ještě po hodině (saponiny).

2. 0,5 g práškované drogy se ve zkumavce protřepává s 5 ml acetonu 5 minut, po 30 minutách stání se výluh přefiltruje. K filtrátu se přidá stejný objem koncentrované kyseliny chlorovodíkové a zahřeje se k varu. Roztok se musí barvit cihlově červeně.

3. Důkaz saponinů na krevním agaru viz Saponariae radix.

1.1.3.2. Saponariae radix – Kořen mydlice lékařské

Jsou to usušené podzemní části druhu *Saponaria officinalis* L., mydlice lékařská, Caryophyllaceae.

Obsah: 2,5 – 5 % směsi saponinů označovaných jako saporubin, dále triterpenové saponasidy A, B, C, D, jejichž aglykony jsou gypsogenin a kyselina gypsogeninová.

Zkoušky totožnosti:

1. Příčný řez drogou navlhčíme 96% kyselinou sírovou, vzniká žluté zabarvení, které přechází přes pomerančovou až do růžovofialové (saponiny, modifikovaná Salkowského reakce).

2. Důkaz saponinů na krevním agaru: 1,0 g práškované drogy se zahřeje k varu s 10,0 ml izotonického fosfátového pufru. Po ochlazení se směs zfiltruje. V agarové plotně se korkovrtem vyřežou otvory o průměru asi 10 mm. Tyto se naplní filtrátem z drogy. Saponin difunduje do krevního agaru a vytvoří v něm hemolytický dvůrek. Jeho velikost se vyhodnotí po 2 až 24 hodinách.

1.1.3.3. Polygalae (Senegae) radix – Senegový kořen (ČL 2009)

Jsou to usušené kořeny druhu *Polygala senega* L., vítod senega, Polygalaceae.

Obsah: 6 až 12 % triterpenoidních saponinů, hlavně senegasaponiny A, B, C, D, lišící se v cukerné složce; hlavní aglykony jsou presenegin a tenuifolin.

Zkoušky totožnosti:

1. K práškované droze se přidá několik kapek koncentrované kyseliny sírové, vznikne žluté zabarvení, které po 30 minutách přechází do růžové (saponiny, Salkowského reakce).

2. Důkaz saponinů na krevním agaru viz Saponariae radix.

3. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se vaří 15 minut pod zpětným chladičem s 10 ml ethanolu 70% (V/V), zfiltruje se a nechá se ochladit.

Porovnávací roztok. 10 mg escinu se rozpustí v ethanolu 70% (V/V) a zředí se jím na 10 ml.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze. Horní vrstva směsi objemových dílů kyseliny octové ledové, vody a butan-1-olu (10 : 40 : 50).

Nanášení. 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl a 40 µl porovnávacího roztoku, do proužků 20 mm × 3 mm.

Vyvíjení. Po dráze 12 cm.

Sušení. Při 100 °C až 105 °C.

Detekce A. Postříká se anisaldehydem a znovu se zahřívá při 100 °C až 105 °C, dokud se na chromatogramu zkoušeného roztoku neobjeví červené skvrny (saponiny).

Hodnocení A. V dolní a střední části chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři až pět červeně zbarvených skvrn odpovídajících polohou šedofialovým skvrnám escinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Detekce B. Vrstva se posříká asi 10 ml roztoku kyseliny fosfomlybdenové v ethanolu bezvodém a zahřívá se při 100 °C až 105 °C, dokud se skvrny saponinů nezbarví modře.

Hodnocení B. Intenzita a velikost skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku se pohybuje mezi intenzitou a velikostí proužků escinu na chromatogramech po nanesení 10 a 40 µl porovnovácího roztoku.

1.1.3.4. Verbasci flos – Diviznový květ (ČL 2009)

Je to usušená květní koruna druhů *Verbascum thapsus* L.*,* divizna malokvětá, *Verbascum densiflorum* Bertol. (syn. *V. thapsiforme* Schrad), d. velkokvětá a *Verbascum phlomoides* L., d. sápovitá, Scrophulariaceae.

Obsah: kyselé a neutrální saponiny, flavonoidy a iridoidy.

Zkoušky totožnosti:

1. Důkaz saponinů na krevním agaru viz Saponariae radix.

2. 1,0 g práškované drogy se vaří 1 minutu s 15 ml vody. Zfiltruje se. Filtrát se smíchá s 1 ml kyseliny chlorovodíkové 35% a vaří se 1 minutu; vzniká zelenomodré zabarvení a po několika minutách se tvoří zákal a pak černá sraženina (iridoidy).

3. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 5 minut ve vodní lázni při 60 °C za míchání. Po ochladnutí se zfiltruje.
Porovnávací roztok: 1 mg kyseliny kávové, 2,5 mg hyperosidu a 2,5 mg rutosidu se rozpustí v methanolu a zředí se jím na 10 ml.
Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.
Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, kyseliny mravenčí bezvodé, butan-2-onu, ethyl-acetátu (10 : 10 : 30 : 50).
Nanášení: 30 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku do proužků.
Vyvíjení: Po dráze 15 cm.
Sušení: Při 100 °C až 105 °C.
Detekce: Horká vrstva se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu (10 g/l) v methanolu a pak roztokem makrogolu 400 (50 g/l) v methanolu. Suší se na vzduchu 30 minut a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.
Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je nad startem žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutosid), nad ní další žlutohnědě fluoreskující skvrna (hyperosid) a ve vrchní části zelenomodře fluoreskující skvrna (kyselina kávová).
Na chromatogramu zkoušeného roztoku je nejvýše žlutě až žlutozeleně fluoreskující skvrna a pod ní jsou patrné další namodrale nebo nazelenale fluoreskující skvrny (flavonoidy nebo fenylpropanoidy).

1.1.3.5. Herniariae herba – Průtržníková nať

Je to celá nebo řezaná sušená nať druhu *Herniaria glabra* L., průtržník lysý, a *Herniaria hirsuta* L, průtržník chlupatý, Caryophyllaceae (nově Ilecebraceae).
Obsah: 3 – 9 % neutrálních saponinů, 0,4 % kyselých saponinů, kumarin methylumbelliferon (herniarin).

Zkoušky totožnosti:
1. Mikrosublimací asi při 100 °C vzniká sublimát, který se rozpustí ve vodě a přidá se 1 kapka zředěného roztoku amoniaku. Roztok ve filtrovaném záření rtuťové výbojky modře fluoreskuje (methylumbelliferon).
2. Důkaz saponinů na krevním agaru viz Saponariae radix.

1.1.3.6. Ononidis radix – Jehlicový kořen (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený kořen druhu *Ononis spinosa* L., jehlice trnitá, Fabaceae.

Obsah: saponiny, flavonoidy, silice.

Zkoušky totožnosti:

1. Mikrosublimací při přibližně 100 °C vzniká sublimát, sestávající se z hvězdicovitě uspořádaných jehlic, které se kapkou lihového roztoku vanilinu po chvíli zbarví modrofialově (onokol).

2. Příčný řez kořenem se navlhčí kapkou zředěného roztoku amoniaku, barví se žlutě.

3. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se smíchá s 15 ml methanolu a vaří se 30 minut pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 10 mg resorcinolu a 50 mg vanilinu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu F_{254} pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethanolu 96%, dichlormethanu a toluenu (10 : 45 : 45).

Nanášení: 20 µl do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce A: Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a 365 nm.

Hodnocení A: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je nad startem skvrna patrná při 254 nm (resorcinol) a blízko čela chromatogramu je skvrna viditelná při 254 nm (vanilin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní modrá skvrna viditelná při 365 nm, lokalizovaná jako resorcinol porovnávacího roztoku. Jsou ještě patrné další méně intenzivně zabarvené skvrny.

Detekce B: Vrstva se postříká anisaldehydem (v následujícím pořadí se smíchá 0,5 ml anisaldehydu, 10 ml kyseliny octové ledové, 85 ml methanolu a 5 ml kyseliny sírové 96%), zahřívá se 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je nad startem červená skvrna (resorcinol), blízko čela je šedofialová skvrna (vanilin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v poloze nad resorcinolem fialová skvrna (onokol).

2. Důkaz saponinů na krevním agaru viz Saponariae radix.

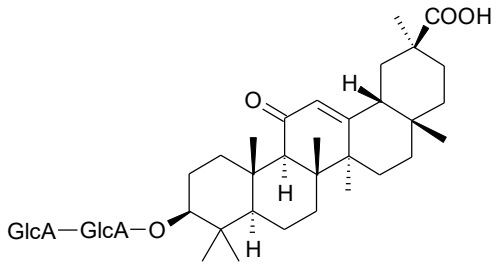
Extrahovatelné látky. Nejméně 15 %; 2,00 práškované drogy (250) se smíchají se směsí 8 g vody a 12 g ethanolu 96% a nechá se 2 h stát za častého protřepávání, zfiltruje se a 5 g filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek po odpaření se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C; zbytek po vysušení váží nejméně 75 mg.

1.1.3.7. Liquiritiae radix – Lékořicový kořen (ČL 2009)

Je to usušený neloupaný nebo loupaný, celý nebo řezaný kořen a výběžky druhu *Glycyrrhiza glabra* L., lékořice lysá a/nebo *Glycyrrhiza inflata* Bat., l. nadmutá a/nebo *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., l. uralská, Fabaceae.

V označení na obalu se uvede, zda je droga loupaná nebo neloupaná.

Obsah: Nejméně 4,0 % kyseliny glycyrrhizové, počítáno na vysušenou drogu. Dále jsou přítomné flavonoidy a chalkony.



glycyrrhizová kyselina

Zkoušky totožnosti

1. 0,5 g práškované drogy se povaří s 5 ml vody a po vychladnutí se zfiltruje, filtrát třepáním pění a pěna je do 1 hodiny ještě patrná (saponiny).
2. K 0,05 g práškované drogy se přidá 5 ml koncentrované kyseliny sírové, droga i kyselina se zbarví oranžově, později červeně (glycyrrhizin).
3. 3. Důkaz saponinů na krevním agaru viz Saponariae radix.
4. 0,02 g práškované drogy se polije 2,0 ml roztoku kyseliny sírové 50%. Kyselina se zbarví intenzivně oranžově žlutě (flavonoidní glykosid liquiritin).

5. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,50 g práškované drogy se v 50ml baňce s kulatým dnem smíchá se 16,0 ml vody a 4,0 ml kyseliny chlorovodíkové (250 g/l HCl 35%), zahřívá se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. Filtr a baňka se suší 60 minut při 105 °C. Filtr se vloží zpět do baňky, přidá se 20,0 ml diethyletheru a zahřívá se 5 minut na vodní lázni při 40 °C pod zpětným chladičem, po ochlazení se zfiltruje a filtrát se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml diethyletheru.

Porovnávací roztok: 5,0 mg kyseliny glycyrrhetové a 5,0 mg thymolu se rozpustí v 5,0 ml diethyletheru.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu F_{254} pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů amoniaku 26%, vody, ethanolu 96% a ethyl-acetátu (1 : 9 : 25 : 65).

Nanášení: 10 µl do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu, 5 minut.

Detekce A: Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Hodnocení A: Na chromatogramu zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku je v dolní polovině skvrna zhášející fluorescenci (kyselina glycyrrhetová).

Detekce B: Postříká se anisaldehydem (v následujícím pořadí se smíchá 0,5 ml anisaldehydu, 10 ml kyseliny octové ledové, 85 ml methanolu a 5 ml kyseliny sírové 96%), zahřívá se 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině fialová skvrna (kyselina glycyrrhetová) a v horní třetině červená skvrna (thymol).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v dolní polovině fialová skvrna odpovídající polohou skvrně kyseliny glycyrrhetové na chromatogramu porovnávacího roztoku a v horní třetině žlutá skvrna (isoliquiritigenin) v poloze odpovídající poloze thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Stanovení obsahu kyseliny glycyrrhizové titračně:

2,0 g drogy se smísí ve varné baňce na 100 ml s 20 ml 3% roztoku kyseliny dusičné v acetonu a zahřívá se na vodní lázni, jejíž teplota nesmí překročit 60 °C, pod

zpětným chladičem 10 minut. Ochlazený extrakt se zfiltruje na Büchnerově nálevce. Extrakce acetonovým roztokem kyseliny dusičné na vodní lázni se opakuje ještě třikrát. Droga se potom promývá ještě takovým množstvím acetonu, aby celkový objem acetonových extraktů byl 100 ml. Pak se tento extrakt vlije do kádinky o objemu 200 ml. Přidá se 40 ml ethanolu 60% a za stálého míchání se po kapkách přidává 10 ml 25% amoniaku. Po smíchání směs ochladíme ledem na 15 °C. Vznikající sraženina (amonná sůl kyseliny glycyrrhizové), kterou zachytíme na dvojitém skládaném filtru, se odsaje a promývá se acetonem, dokud není protékající aceton bezbarvý (50-100 ml). Sraženina se nechá na filtru vysušit na vzduchu a potom se dosuší v sušárně při 60 °C. Poté se sraženina kvantitativně rozpustí v 50,0 ml vody a k vodnému roztoku se přidá 20 ml neutrálního formaldehydu. Nechá se 1 hodinu stát a pak se titruje 0,1 M roztokem hydroxidu sodného na fenolftalein do červeného zabarvení. Současně se provádí slepý pokus. 1 ml 0,1 M roztoku hydroxidu sodného udává 0,0273 mg kyseliny glycyrrhizové.

Stanovení obsahu kapalinou chromatografií:

Zkoušený roztok: 1,000 g práškované drogy (180) se ve 150ml zabroušené kuželové baňce smíchá se 100,0 ml roztoku amoniaku 17,5% *RS* (8 g/l) a vloží se na 30 min do ultrazvukové lázně. Část supernatantní tekutiny se odstředí a 1,0 ml se zředí amoniakem 17,5% *RS* (8 g/l) na 5,0 ml. Roztok se zfiltruje přes filtr 0,45 µm a filtrát se použije jako zkoušený roztok.

Roztok A. 0,130 g amonium-glycirrhizátu pro HPLC CRL se rozpustí v amoniaku 17,5% *RS* (8 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 5,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% *RS* (8 g/l) na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 10,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% *RS* (8 g/l) na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 15,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% *RS* (8 g/l) na 100,0 ml.

Kolona. Stacionární fáze: silikagel oktadecylsilylovaný.

Mobilní fáze. Směs objemových dílů roztoku kyseliny octové ledové *R*, acenonitrilu *R* a vody *R* (6 + 30 + 64).

Průtoková rychlost. 1,5 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

Nástřik. 10 µl.

Sestrojí se kalibrační křivka za použití koncentrací porovnávacích roztoků (g/100 ml) na ose x a odpovídajících ploch píků na ose y. Za použití retenčních časů a ploch píků na chromatogramech porovnávacích roztoků se identifikuje a stonoví plocha píku kyseliny glycyrrhizové na chromatogramu zkoušeného roztoku. Obsah kyseliny glycyrrhizové se vypočítá podle vzorce

$$A \times \frac{5}{m} \times B \times \frac{822}{840}$$

V němž značí:

A - koncentraci amonium-glycyrrhizátu ve zkoušeném roztoku odečtenou z kalibrační křivky v g/ 100 ml;

B - deklarovaný obsah amonium-glycyrrhizátu pro HPLC CRL v procentech;

m - hmotnost zkoušené drogy v gramech;

822 - molekulovou hmotnost kyseliny glycyrrhizové;

840 - molekulovou hmotnost amonium-glycyrrhizátu (bezvodého).

Droga se používá pro přípravu:

Liquiritiae extractum fluidum ethanolic normatum (ČL 2009) – **Lékořicový extrakt tekutý ethanolický standardizovaný**. Obsah – 3,0 – 5,0 % kyseliny glycyrrhizové.

Liquiritiae extractum siccum ad saporandum (ČL 2009) – **Lékořicový extrakt suchý pro aromata**. Obsah – 5,0 – 7,0 % kyseliny 18β-glycyrrhizové.