

УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ *QUILLAJA SAPONARIA MOLINA*

Н. В. Мироненко¹, Т. А. Брежнева¹, В. Ф. Селеменев¹, А. А. Столповская²

¹ Воронежский государственный университет

² Научно-исследовательский институт СК

Поступила в редакцию 25.09.2014 г.

Аннотация. разработана методика УФ-спектрофотометрического определения тритерпеновых сапонинов *Quillaja saponaria Molina*. Установлена природа максимумов поглощения, построены соответствующие градуировочные зависимости. Проведена метрологическая оценка полученных результатов.

Ключевые слова: тритерпеновые сапонины *Quillaja saponaria Molina*, УФ-спектрофотометрическое определение, калибровочные функции, регрессионные параметры, метрологические характеристики.

Abstract. The technique of UF- spectrophotometry determination the triterpen saponins by *Quillaja saponaria Molina* is developed. The nature of maximum of absorption is established, the corresponding calibration dependences are constructed. The metrological assessment of the received results is carried out.

Keywords: triterpen saponins *Quillaja saponaria Molina*, UF- spectrophotometry determination, calibration functions, regression parameters, metrological characteristics.

Возрастающее с каждым годом число синтетических препаратов не снижает перспективу использования природных соединений. Благодаря широкому спектру биологической активности (адаптогенное, антиоксидантное, противомикробное, диуретическое, гемолитическое, гипогликемическое и др. действия) лидирующее положение среди подобных веществ занимают тритерпеновые сапонины *Quillaja saponaria Molina*, семейства *Rosaceae* [1]. Общая структурная формула приведена на рисунке 1.

Водный экстракт из коры дерева *Quillaja saponaria* содержит около 30 индивидуальных сапонинов – производных квиллайевой кислоты, однако основную массу составляют соединения, структурные фрагменты которых приведены в таблице 1 [2-4].

В странах Европы и США разработан обширный комплекс методов выделения и очистки сапонинов *Quillaja saponaria*, однако используемые способы количественного определения до-

статочно противоречивы. Shuman M., а также Rodriguez-Diaz M. с сотрудниками, авторы работ [4-5], рассматривают возможность применения УФ-спектроскопии как одного из самых распространенных и общедоступных методов и указывают максимум поглощения 280 ± 2 нм. В публикациях [6-9] приводится максимум 205-210 нм, в зависимости от используемого растворителя сдвигающийся до 220 нм, с плечом в области 280 нм. Исходя из вышеуказанного разработана методика количественного определения тритерпеновых сапонинов *Quillaja saponaria Molina* методом УФ-спектроскопии является целью настоящей работы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования являлся товарный образец сапонины *Quillaja saponaria Molina* производства Бельгия. Состав образца и его чистоту определяли в предварительных экспериментах методом тонкослойной хроматографии. Использовали систему растворителей хлороформ-метанол-вода (62:32:6) [5,10]. Детектирующий реагент - концентрированная серная кислота капельно.

© Мироненко Н. В., Брежнева Т. А., Селеменев В. Ф., Столповская А. А., 2015

После проявления хроматографической пластины было обнаружено одно пятно со значением $R_f=0.4$, соответствующее одному из наиболее распространенных сапонинов экстракта из *Quillaja saponaria Molina* – сапонину Quil A-17 (табл.1).

Таблица 1.
Структурные фрагменты в молекулах сапонинов – производных квиллайевой кислоты

Индивидуальный сапонин	R ₁	R ₂	R ₃	Молекулярная масса, г/моль
Quil A-17	C ₉ H ₁₂ O ₉	C ₆ H ₁₂ O ₅	C ₅ H ₁₀ O ₅ (апиоза)	2321
Quil A-18	C ₉ H ₁₂ O ₉	H	C ₅ H ₁₀ O ₅ (апиоза)	2174
Quil A-21	H	H	C ₅ H ₁₀ O ₅ (апиоза)	2012
Quil A-22	H	H	C ₅ H ₁₀ O ₅ (ксилоза)	2012

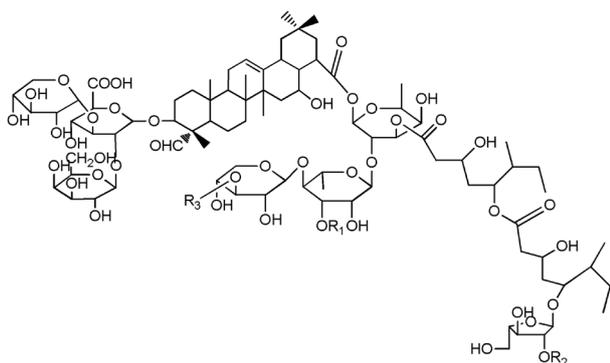


Рис 1. Общая структурная формула сапонинов *Quillaja saponaria Molina*.

Регистрацию спектральных характеристик осуществляли с помощью спектрофотометра СФ-56. Исходные растворы сапонины готовили растворением точной навески образцов с последующим приготовлением серии рабочих растворов путем разбавления исходных до нужной концентрации. Рабочий диапазон концентраций составил 0.05-0.6 мг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установление природы УФ-поглощения и определения соответствующих функциональных групп соединений гликозидной природы является необходимым условием для их дальнейшего

исследования: область научных работ, проводимых с тритерпеновыми сапонидами, чаще всего включает проведение полного или частичного гидролиза, а также получение производных, обладающих различной биологической активностью [1-2,5]. Подобные манипуляции связаны непосредственно с углеводными остатками молекулы, количество и природа которых может значительно различаться в структурах индивидуальных сапонинов. Поэтому особое внимание целесообразно уделять функциональным группам наиболее устойчивой части молекулы – ее агликону.

Поскольку большинство тритерпеновых сапонинов имеет максимум поглощения в области, типичной для этого класса соединений- 200-350 нм, нами был снят УФ-спектр водного раствора сапонины Quil A-17 с концентрацией 0.13 мг/мл в указанном диапазоне длин волн (рис.2).

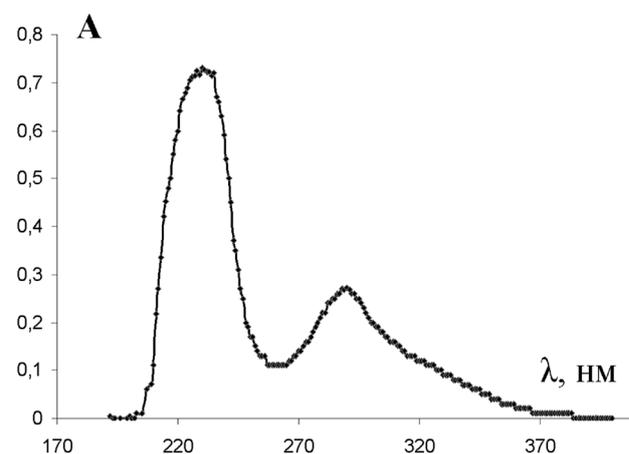


Рис. 2. УФ-спектр сапонины Quil A-17, С-0.13 мг/мл.

На полученной кривой поглощения обнаружены два максимума различной интенсивности - 227 и 285 нм. Значение молярного коэффициента ($\epsilon=5800$ л/моль·см⁻¹), а также данные литературы [10-12] позволяют отнести максимум 227 нм к переходу $n \rightarrow \sigma^*$ с переносом заряда в двойной связи конденсированной системы колец агликона-квиллайевой кислоты.

Для большинства гликозидных соединений аналогичный максимум приходится на 200-205 нм - область, сопоставимую с границей рабочего диапазона большинства спектрофотометров. Однако в случае квиллайевой кислоты и ее различных производных наблюдается батохромный сдвиг до 227 нм, обусловленный экзоцикличностью двойной связи по отношению к общей системе колец,

а также эффектами сопряжения кислородсодержащих групп, двойной связи и сверхсопряжения метильных групп [12-13] (рис.3). О возможном взаимном влиянии боковых групп (метильных, карбонильных), мезомерном и индуктивном эффектах, формирующих сверхсопряжение в агликонах сапонинов тритерпеновой и стероидной природы, впервые указано в работе [14].

Область 270-290 нм, предположительно, соответствует переходу $n \rightarrow \pi$ поглощения альдегидной группы агликона [11-12]. Известно, что при подкислении растворов карбонильных соединений указанный максимум, значения молярного коэффициента поглощения которого обычно не превышают $100 \text{ л/моль}\cdot\text{см}^{-1}$, исчезает из-за блокировки неподеленной пары электронов кислорода. Вид спектральных кривых водных растворов сапонины Quil A-17, снятых в диапазоне значений $\text{pH}=2\div 5$ (рис.4), позволил отметить отсутствие явной зависимости от величины pH в данном диапазоне как местоположения максимума, так и его интенсивности, что в совокупности с аномально высокими для поглощения альдегидной группы значениями молярного коэффициента ($\epsilon=1900 \text{ л/моль}\cdot\text{см}^{-1}$) подтверждает взаимное влияние CH_3 -, СНО-группы, двойной связи и формирование единой полностью сопряженной хромофорной системы (рис.3) [12-15].

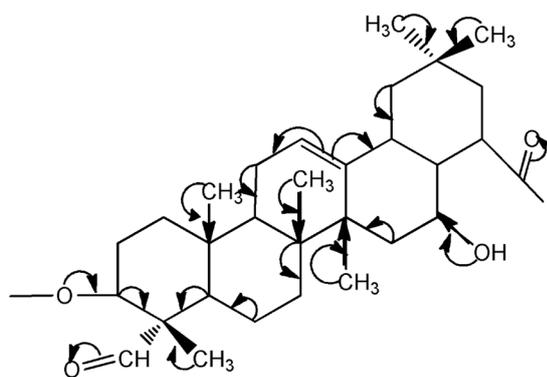


Рис. 3. Эффекты сопряжения (мезомерный и индуктивный) в молекуле агликона – квиллаевой кислоты.

УФ-спектры сапонины, снятые в щелочной области значений $\text{pH}=7-10$ и в растворителях с диапазоном полярности $P=6.0-10.2$, ограниченной растворимостью образцов сапонины, также показали устойчивость обоих максимумов как по местоположению, так и по интенсивности.

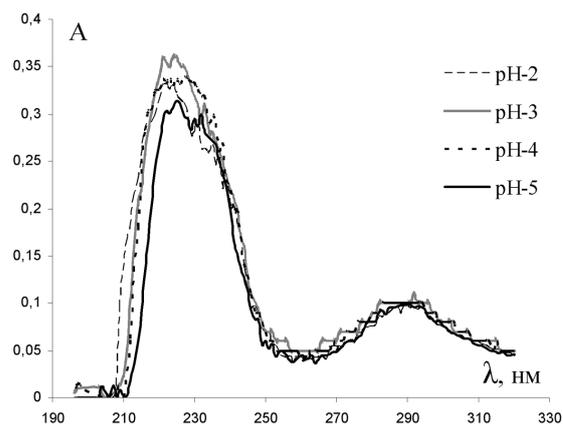


Рис. 4. УФ-спектр сапонины Quil A-17, С-0.05 мг/мл.

Поскольку УФ-спектр сапонины Quil A-17 имеет два четких, стабильных и достаточно разделенных максимума поглощения, то необходимо статистически оценить пригодность каждого из них для количественного определения гликозидов группы *Quillaja saponaria*.

Используя полученные спектральные характеристики и основываясь на результатах измерения оптической плотности серии рабочих растворов сапонины были построены градуировочные зависимости при $\lambda=227 \text{ нм}$ и $\lambda=287 \text{ нм}$ в диапазоне концентраций $0.025-0.2 \text{ мг/мл}$ и $0.1-0.5 \text{ мг/мл}$ соответственно. Получены следующие линейные калибровочные функции вида $y=bx+a$: $A=6.01C-0.02$ (1), $A=2.19C-0.05$ (2).

Для оценки градуировочных функций (проверки наличия и учета систематической ошибки) проверяли значимость коэффициентов a . С этой целью вычисляли дисперсию разности между опытными и рассчитанными значениями $y(A)$ по следующей формуле [16]:

$$S_y = \sqrt{\frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2} = \sqrt{\frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^N (y_i - (a + by_i))^2} \quad (3),$$

где S_y - остаточное стандартное отклонение, y_i , \hat{y}_i - расчетные и опытные значения оптической плотности A , N – количество проведенных параллельных измерений.

Используя принцип распространения погрешностей, оценили влияние дисперсии значений $A(y)$ на величины a и b и рассчитали их дисперсии $S_{a,b}$ и доверительные интервалы $\Delta a, b$ по следующим формулам:

$$S_b^2 = \frac{S_y^2}{\sum (X_i - \bar{x})^2}, \Delta b = \pm (P \cdot f) s_b \quad (4),$$

$$S_a^2 = \frac{S_y^2 \sum X_i^2}{m \sum (X_i - \bar{x})^2}, \Delta a = \pm (P \cdot f) s_a \quad (5),$$

где X_i , \bar{X} – опытные и среднее значения концентрации сапонина. Для определения значимости констант использовали уравнение невзвешенной регрессии Юдена, полученные результаты сравнивали с табличным значением $t(P, f)$ [16, 17]:

$$\left. \begin{aligned} t_a &= \frac{|a|}{S_a} \\ t_b &= \frac{|b|}{S_b} \end{aligned} \right\} \cong t(P, f = m - 1) \quad (6)$$

Значения регрессионных параметров калибровочных кривых приведены в таблице 2.

По результатам расчетов коэффициенты a не значимы в обеих градуировках, следовательно, экспериментальные шумы и другие случайные влияния не вносят ощутимого эффекта в сигнал. Сравнение дисперсии воспроизводимости S и дисперсии адекватности S_y по критерию Фишера [17], проведенное на основании однородных значений стандартного отклонения результатов измерений и рассчитанных величин остаточных стандартных отклонений S_y , показало адекватность выбранных градуировочных моделей.

Полученные значения доверительных интервалов коэффициентов b позволили для представленных градуировочных кривых построить регрессионные полосы, имеющие классический вид – симметричные кривые, сужающиеся при приближении к средним значениям концентрации (рис.5). Пределы количественного определения рассчитывали по формуле:

$$X_{\min} = \frac{2t(P, f)\bar{X}S_y/\pi}{Y - a + t(P, f)S_y/\sqrt{\pi}} \quad (7)$$

Для оценки качества градуировочных моделей вычисляли стандартные отклонения, рабочий диапазон концентраций, относительную погреш-

ность, значения которых приведены в таблице 3. Отсутствие систематической погрешности, низкая ошибка анализа (4.3% и 5.8%), высокий коэффициент корреляции обеих градуировочных кривых свидетельствуют о высокой точности и правильности полученных результатов.

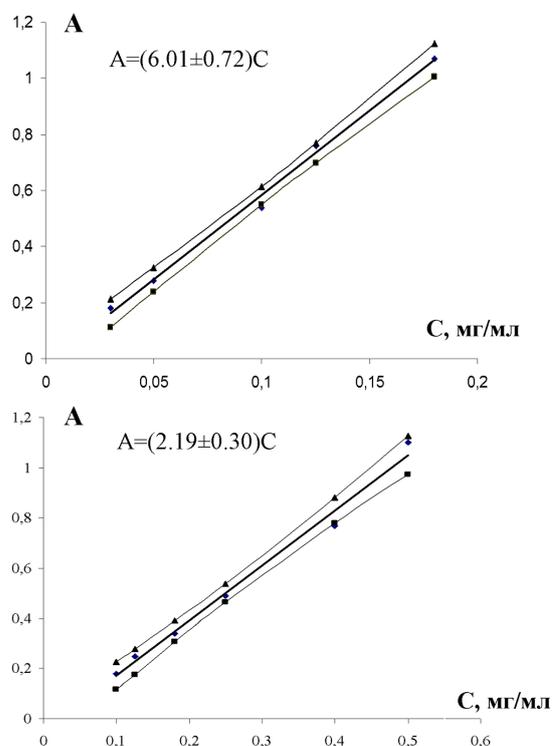


Рис. 5. Полосы регрессии для градуировочных кривых (1) и (2).

Условные обозначения:

S -стандартное отклонение результатов (дисперсия воспроизводимости), мг/мл; S_c -стандартное отклонение методики $S_c = S_y/a$, мг/мл;

Таблица 2.

Значения регрессионных параметров градуировочных моделей (1) и (2).

Уравнение градуировки	$S_y \cdot 10^2$	$S_b \cdot 10$	$S_a \cdot 10^2$	Δb	Δa	t_a	t_b	$t(P, f)$ табл.
$y=6.01x-0.02$	3.1	2.6	2.9	0.72	0.01	0.6	23.1	2.78
$y=2.19x-0.05$	4.2	1.2	3.5	0.30	0.02	1.3	18.8	2.78

Таблица 3.

Метрологические характеристики градуировочных кривых (1) и (2).

Градуировочные кривые	$S \cdot 10^2$	$S_c \cdot 10^3$	r	$\varepsilon, \%$	Предел обнаружения сапонинов, мг/мл	Рабочий диапазон концентрации сапонинов, мг/мл
$A=(6.01 \pm 0.72)C$ (1)	4.3	5.2	0.99	4.3	0.012	0.03-0.25
$A=(2.19 \pm 0.30)C$ (2)	3.6	8.6	0.98	5.8	0.037	0.10-0.50

г- коэффициент корреляции; ε , %- относительная ошибка метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика УФ-спектрофотометрического определения тритерпеновых сапонинов *Quillaja saponaria* Molina. Рассчитаны метрологические характеристики полученных градуировочных кривых.

Установлено, что при работе с растворами с концентрацией сапонинов менее 0.2 мг/мл целесообразно определять оптическую плотность при $\lambda=227$ нм и рассчитывать их содержание по градуировке (1), преимуществом которой является высокий коэффициент чувствительности и, как следствие, низкий предел обнаружения. Несмотря на то, что относительная ошибка при расчете по градуировке (2) несколько выше (5.8%), при концентрации сапонинов свыше 0.1 мг/мл рационально измерять оптическую плотность при $\lambda=287$ нм и использовать градуировку (2), поскольку разбавление растворов до рабочих концентраций градуировки (1) значительно увеличит относительную ошибку анализа (с учетом разбавления - 8-9%).

Полученные экспериментальные результаты позволили успешно применять уравнения градуировки для определения тритерпеновых сапонинов методом УФ-спектрофотометрии не только в широком интервале концентраций, а также в средах с диапазоном pH=2-10 и в растворителях с интервалом полярности $P=6.0-10.2$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guclu-Ustundag O. Saponins: properties, applications and processing / O. Guclu-Ustundag, G. Mazza // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. — 2007. — №47, V.3. — P. 231-258.
2. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom / J.-P. Vincken [et al.] // *Phytochemistry*. — 2007. — № 68. — P. 275-297.
3. Bankefors J. Structural classification of *Quillaja* saponins by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry in combination with multivariate analysis, proof of concept / J. Bankefors, L. I. Nord, L.T. Kenne // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. — 2008. — № 90. — С. 178-187.
4. Mitra S. Micellar Properties of *Quillaja* Saponin. 1. Effects of Temperature, Salt, and pH on Solution Properties / S. Mitra, S. R. Dunga // *Journal Agricultural and Food Chemistry*. — 1997. — № 45. — P. 1587-1595.
5. Topical anti-inflammatory activity of quillaic acid from *Quillaja saponaria* Mol. and some derivatives / M. Rodríguez-Díaza [et al.] // *Journal of pharmacy and pharmacology*. — 2011. — №63. — P. 718-724
6. United State Patent Number 5,650,398A/ Drug delivery enhancement via modified saponins / Charlotte A. Kensil [et al.]; Cambridge Biotech Corporation. — US 08/459,502; заявл. 02.06.1995; опубл. 22.07.1997. — 40p.
7. Lee Hu. J. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography / H. J. Lee, S. Hendrich, S. Murphy // *Journal Agricultural and Food Chemistry*. — 2002. — № 50. — P. 2587-2594.
8. Exposure of tilapia pituitary cells to saponins: Insight into their mechanism of action / B. Levavi-Sivana [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology*. — 2005. — № 140, Part C. — P. 79-86.
9. United States Patent Number: 5,817,314 / *Quillaja* saponin adjuvant and vaccine formulation containing same / H. Daejeon [et al.] / LG Chemical Ltd., Seoul, Rep. of Korea. — Appl. No. 750,461; заявл. 12.08.1996, опубл. 06.10.1998. — 12 p.
10. Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice / J. Fleck [et al.] // *Vaccine*. — 2006. — №24. — P. 7129-7134.
11. Казицина Л.А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектроскопии в органической химии : учебное пособие для студ. хим. спец. ун-тов / Л.А. Казицина, Н.Б. Куплетская. — М. : Изд-во Московского ун-та, 1979. — 236 с.
12. Браун Д. Спектроскопия органических веществ / Д. Браун, А. Флойд, М. Сейнзбери ; пер. с англ. А.А. Кирюшкина. — М.: Мир, 1992. — 300с.
13. Нейланд О.Я. Органическая химия: Учебник для студ. хим. специальностей вузов / О.Я. Нейланд. — М. : Высш.шк., 1990. — 750с.
14. Bioactive Saponins and Glycosides. XIV.1) Structure Elucidation and Immunological Adjuvant Activity of Novel Protojubilogenin Type Triterpene Bisdesmosides, Protojubilosides A, B, and B1, from the Seeds of *Zizyphus jujuba* var. *spinosa* (*Zizyphi Spinosi* Semen) / H. Matsuda [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. — 1999. — № 47. — P. 1744-1748.
15. Формально-кинетический подход к описанию необменной сорбции тритерпенового сапонины сорбентом MN-200 / Е.В. Ворфоломеева [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2011. — Т. 11, Вып. 2. — С. 184-189.

16. Шараф М.А. Хемометрика / М.А. Шараф, Д.Л. Иллман, Б.Р. Ковальски ; Перевод с англ. А.Н. Мариничева, А.К. Чарыкова; под ред. И.А. Ибрагимова, А.К. Чарыкова. - Л. : Химия, 1989 . - 269 с.

17. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии / К. Дёрффель ; пер. с нем. Л.Н. Петровой ; под ред. и с предисл. Ю.П. Адлера.- М. : Мир, 1994 . - 267с.

Мироненко Наталья Владимировна — ассистент кафедры аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета; тел. 8(473) 290-47-40, e-mail: natashamir@yandex.ru

Mironenko Natalia V. — assistant of chair analytical chemistry department of chemistry Voronezh State University; phone 8(473) 290-47-40, e-mail: natashamir@yandex.ru

Брежнева Татьяна Александровна — к.фарм.н, доц. кафедры фармхимии и фармтехнологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; тел. 8(473) 274-15-85

Brezhneva Tatyana A. — associate professor of chair pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology pharmaceutical department of Voronezh State University; phone 8(473) 274-15-85

Селеменев Владимир Федорович — д.х.н., проф., заведующий кафедрой аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета; тел. 8(473) 220-83-62, e-mail: common@anchem.vsu.ru

Selemenov Vladimir F. — professor, head of chair analytical chemistry department of chemistry Voronezh State University; phone 8(473) 220-83-62, e-mail: common@anchem.vsu.ru

Столповская Альбина Александровна — научный сотрудник ВФ ГУП научно-исследовательского института «Синтезкаучук»

Stolpovskaya Albina A. — research worker of research institute of «Synthesize caoutchouc»