

## РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ *SAPINDUS MUKOROSI*

Н. В. Мироненко, Т. А. Крысанова, В. Ф. Селеменев, А. С. Калмыкова

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 2.09.2021 г.

**Аннотация.** Разработаны способы идентификации и количественного определения тритерпеновых сапонинов методами хроматографии и спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях.

Разработан способ идентификации методом ТСХ и оценена возможность его применения для количественного определения сапонинов в водных растворах. Выбор оптимальной элюирующей системы осуществлялся на основании расчетных параметров: селективности разделения  $\alpha$ , высоты, эквивалентной теоретической тарелке  $H$ , числа теоретических тарелок  $N$ . С использованием денситограмм получена градуировочная зависимость концентрации сапонинов от площади пиков вида  $S=3600C-2646$ . Установлено, что метод ТСХ быстрый, нетрудоемкий и позволяет сразу идентифицировать индивидуальные сапонины и определять их содержание в выделяемых фракциях. Данный метод целесообразно применять на этапах выделения и очистки сапонинов от примесных веществ.

Отработана методика количественного анализа сапонинов с ванилином и серной кислотой. Максимум поглощения наблюдался при длине волны 480 нм, которая была выбрана в качестве аналитической. Определение сапонинов через продукты взаимодействия с серной кислотой осложняется постоянной систематической ошибкой, высокой относительной погрешностью определения и низким коэффициентом детерминации. Методика может давать завышенные результаты, т.к. комплекс с серной кислотой могут образовывать и других органические соединения в исследуемых фракциях (липиды, стеринны и т.д.).

Был получен дифференциальный спектр поглощения водного раствора сапонины *Mukorossi*. Установлено, что дифференциальный минимум второй производной спектра при 229 нм обусловлен наличием свободных карбонильных групп в молекуле сапонины. Полосы при 227-230 нм соответствуют  $\pi$ - $\pi^*$  переходам и определяются только в областях больших концентраций, давая суммарный неразделенный максимум в общем спектре. Четкий и достаточно разделенный дифференциальный минимум при длине волны 229 нм позволяет количественно определить гликозиды группы *Sapindus mukorossi*. Относительно малое значение стандартного отклонения методики, низкая относительная погрешность, максимальный множественный коэффициент детерминации, сравнительно невысокая относительная ошибка анализа свидетельствует о высокой точности и правильности полученных результатов анализа сапонинов методом УФ-спектрофотометрии. Метод дифференциальной спектроскопии достаточно прост и позволяет селективно определять гликозиды в выделяемых фракциях.

**Ключевые слова:** сапонины, методы определения, спектроскопия, хроматография.

Тритерпеновые гликозиды образуют одну из важнейших групп вторичных метаболитов растений. В течение последних десятилетий эти соединения были объектами пристального исследования, позволившего выявить их уникальное структурное многообразие и широкий спектр фармакологической активности [1]. Обнаружение у тритерпеновых сапонинов рострегулирующих свойств, а также их высокого содержания и скорости биосинтеза

в интенсивно растущих органах и тканях свидетельствует о возможном участии этих веществ в регуляции физиолого-биохимических процессов, лежащих в основе роста, развития, стрессоустойчивости растений. К важным свойствам сапонинов можно отнести их комплексообразование со стеринами клеточных мембран, которое приводит к увеличению их проницаемости и вызывает потерю важных физиологически активных веществ [2-4]. Связывание со стеринами обуславливает некоторые виды биологической активности сапонинов: их ти-

отоксические [3, 4], антифунгальные свойства [3,5], токсичность к опухолевым клеткам [5, 6], а также гемолитическую активность. В *Sapindus mukorossi* также содержатся тритерпеновые сапонины. Это чрезвычайно ценное лекарственное растение, распространенное в тропических и субтропических регионах Азии [7]. Разработка методик идентификации и количественного определения сапонинов всегда вызывает определенные затруднения, вызванные наличием в составе действующих веществ не одного, а суммы индивидуальных сапонинов, отличающихся числом сахарных остатков, а значит, полярностью и растворимостью в различных растворителях. Присутствие в конечных фракциях сопутствующих соединений различного состава, а также разнообразие их молекулярных структур ограничивает применение уже известных способов их определения, но отработанных и успешно применяемых на образцах сапонинов, выделенных из других растений. **Цель настоящей работы** - разработать или усовершенствовать методики анализа сапонинов *Sapindus mukorossi*.

### ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлся образец суммы сапонинов мыльного дерева *mukorossi* [7], структуры которых изображены на рис. 1.

Средняя молекулярная масса сапонинов = 924 г/моль, значение рН 1% водного раствора составляет 5.9 ед. Растворимость в воде не превышает 40 мг/мл.

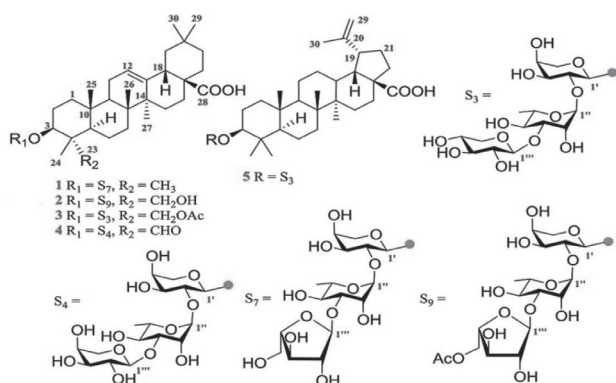


Рис. 1. Структурные формулы сапонинов *Sapindus mukorossi*

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследование фракции проводили с использованием спектральных и хроматографических методов анализа [8].

Определение сапонинов методом ТСХ (C=2.5 мг/мл) выполняли на пластинах марки «Сорбфил» Россия (Краснодар). На стартовую линию пластины

(10×10см) с закрепленным слоем силикагеля наносили с помощью микрошприца (V=10 мкл) водные растворы сапонинов *Sapindus mukorossi*. Пластины подсушивали на воздухе, затем помещали в камеру со смесью растворителей: н-бутанол – вода – уксусная кислота (4:5:1) (верхний слой); хлороформ – этанол – вода – уксусная кислота (30:20:3:0.2) (нижний слой); 40% р-р уксусной кислоты в хлороформе – этанол – вода (60:45:10); петролейный эфир – хлороформ – ацетон (20:20:5); петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота (30:3.3:0.33); бутанол – этанол – аммиак (7:2:5); хлороформ – этанол – вода (18:11:2.7) (нижний слой); хлороформ – этанол (10:1) и хроматографировали при комнатной температуре восходящим методом [9-10]. Элюирование заканчивали по достижении подвижной фазы линии фронта, располагаемой на высоте 9 см. Затем пластины обрабатывали 25%-ным раствором фосфорно-молибденовой кислоты и термостатировали при температуре 115 °С в течение 5 минут. Для количественного анализа методом отдельных навесок готовили серию водных растворов сапонинов с концентрациями 1.0-3.0 мг/мл и проводили операции, указанные выше [11]. Для количественной интерпретации данных ТСХ использовали программу Sorbfil TLC View.

Для регистрации спектральных характеристик (C=0.4-1.0 мг/мл) оптическую плотность водного раствора сапонины измеряли в кварцевых кюветках с l=1.00 см на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 (PC), Япония (шаг регистрации 0.1 нм, режим – slow).

Для определения гликозидов в видимой области спектра брали навески 0.0025 – 0.0625 г, растворяли в мерных колбах объемом 25 мл. Затем из каждой колбы брали аликвоту 5 мл и помещали в пробирку, приливали 3 мл концентрированной серной кислоты (98%) и добавляли точную навеску (0.0200 г) ванилина. Полученный раствор, содержащий сапонины с концентрированной серной кислотой и ванилином, нагревали далее в течение 10 минут на кипящей водяной бане [12]. Оптимальное время нагрева и соотношение испытуемый раствор-кислота подбирали экспериментально. Наблюдали окрашивание раствора в бурый цвет. Затем раствор охлаждали. Оптическую плотность раствора сапонины измеряли в кварцевых кюветках с L=1.00 см на спектрофотометре [13-15].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В литературных источниках [11,12] не приведены условия хроматографирования сапонинов

данного вида, поэтому в задачи входила разработка методики идентификации и оценка возможности их количественного определения наиболее часто применяемым для анализа данных соединений методом ТСХ.

Процесс разделения в тонкослойной хроматографии в основном зависит от подвижной фазы. Выбор её состава определяется элюирующей способностью растворителей, их полярностью, а также протонодонорными и протон-акцепторными свойствами [16-19]. Полярность подвижной фазы является ключевым свойством, позволяющим управлять хроматографическими процессами [20, 21]. Изменение состава ПФ – наиболее экономичный способ повышения качества хроматографической методики. Полученные хроматограммы, содержащие по три зоны сапонинов, использовали для расчета основных параметров хроматографирования (брали средние результаты) [22-25].

Выбор оптимальной элюирующей системы осуществляли на основании расчетных параметров: селективности разделения  $\alpha$ , высоты, эквивалентной теоретической тарелке  $H$ , числа теоретических тарелок  $N$ . Указанные параметры рассчитывали по формулам (1)-(5).

$$\alpha = \frac{\left(\frac{1}{R_{f1}} - 1\right)}{\left(\frac{1}{R_{f2}} - 1\right)}, \quad (1)$$

где  $\alpha$  – селективность разделения,  $R_f$  – подвижность хроматографируемого компонента.

Поскольку было обнаружено три зоны сапонинов, в качестве одного из факторов эффективности хроматографического разделения использовали разрешающую способность, которую находили по формуле:

$$R_s = \frac{\Delta X}{\frac{W_1 + W_2}{2}}, \quad (2)$$

где  $\Delta X$  – расстояние между центрами пятен, мм;  $W$  – ширина пятна, мм.

Расчет числа теоретических тарелок  $N$  и высоты  $H$  проводили по следующим формулам:

$$N = 16 \left(\frac{LR_f}{w}\right)^2, \quad (3)$$

$$H = \frac{L}{N}, \quad (4)$$

где  $L$  – расстояние от фронта растворителя до линии старта, мм;  $W$  – ширина пятна, мм. Полярность Снайдера рассчитывали по формуле:

$$P' = \frac{P'_1 a + P'_2 b + P'_3 c + \dots}{n}, \quad (5)$$

где  $P'$  – индекс полярности Снайдера;  $P'_1, P'_2, P'_3, \dots$  – индексы полярности Снайдера растворителя;  $a, b, c, \dots$  – доля растворителя,  $n$  – число растворителей в элюирующих системах. Результаты расчетов приведены в табл. 1.

Из данных таблицы следует, что самые высокие значения числа теоретических тарелок наблюдаются для подвижной фазы №3.

Сравнивая элюенты №3 и №4 можно отметить, что уменьшение концентрации уксусной кислоты и этанола в системе сильно ухудшило эффективность хроматографической системы: величина  $N$  уменьшается в 3 раза, при этом резко увеличивается ВЭТТ, т.е. хроматографические зоны становятся более размытыми. Анализ фактора – индекса полярности Снайдера показывает, что на изменение хроматографических характеристик влияет не столько его величина, сколько природа компонентов ПФ. Например, для небольшой разницы величины индекса (4.93-5.05) число теоретических тарелок меняется в несколько раз, т.е. общей закономерности не наблюдается.

Лучшее качество хроматографических зон достигнуто в системе №1 (высокий индекс полярности Снайдера и показатель числа теоретических тарелок, низкий показатель ВЭТТ), но в данной системе были идентифицированы только две индивидуальные зоны сапонинов. Это позволяет предположить, что на разделение оказывает влияние как природа растворителей, так и состав сапонинной фракции.

Таблица 1

Значения хроматографических параметров разделяемых сапонинов в различных элюирующих системах

Система		Хроматографические параметры					
		$R_f$	$R_s$	$N$	$H$ , мм	$\alpha$	$P'$
1	н-бутанол – вода – уксусная кислота (4:5:1)	0.40	5.33	769	0.068	2.59	7.26
		0.63		1907	0.027		
2	бутанол – этанол – аммиак (7:2:5)	0.22	4.00	310	0.258	2.18	6.15
		0.38	1.00	1643	0.049	1.14	
		0.41		1913	0.042		
3	40% р-р уксусной к-ты в хлороформе – этанол – вода (60:45:10)	0.55	2.00	818	0.064	1.20	5.05
		0.67		2158	0.024		
4	хлороформ – этанол – вода – уксусная кислота (30:20:3:0.2)	0.39	1.67	203	0.315	2.17	4.93

Низкое значение шумов хроматограммы и высокий множественный коэффициент детерминации позволяет считать оптимальным условием сглаживание треков по 3 точкам. С использованием денситограмм была построена градуировочная зависимость концентрации сапонины от площади пика вида  $S=3600C-2446$ , значения для которой получены с помощью программы Sorbfil TLC View.

В литературных источниках [26-28] была приведена методика количественного анализа сапонины с ванилином и серной кислотой. Данный метод определения тритерпеновых сапонинов, как простой, быстрый и достаточно удобный, был широко востребован для оценки сапониновых препаратов. Предложенная в литературе [27,28] методика не получила экспериментальной воспроизводимости, поэтому одним из этапов исследования являлся поиск оптимальных условий определения сапонинов в видимой области спектра.

Нами были установлены оптимальные параметры:

1. концентрация серной кислоты – 5М;
2. концентрация ванилина – 2.5 мг/мл;
3. время нагревания на водяной бане – 10 минут;
4. время сохранения устойчивой окраски раствора – 60 минут.

Полученный раствор имел бурю окраску, которая была стабильна в течение часа. На рисунке 3 представлены продукты взаимодействия сапонинов с концентрированной серной кислотой и ванилином при нагревании.

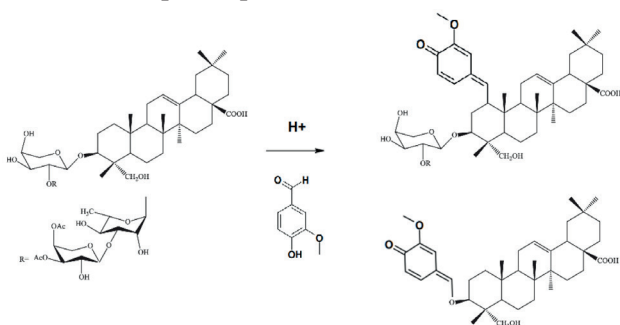


Рис. 3. Продукты взаимодействия сапонинов с концентрированной серной кислотой и ванилином [3].

Максимум поглощения наблюдался при длине волны 480 нм, которая была выбрана в качестве аналитической при разработке способа количественного определения сапонинов. Получили уравнение градуировочного графика  $A=0.38C-0.23$  ( $\varepsilon=160\text{л/моль}\cdot\text{см}$ ).

Поскольку большинство тритерпеновых сапонинов имеет максимум поглощения в области, типичной для этого класса соединений – 200-350 нм, нами был снят спектр водного раствора сапонины *Mukorossi* в указанном диапазоне длин волн (рис. 4).

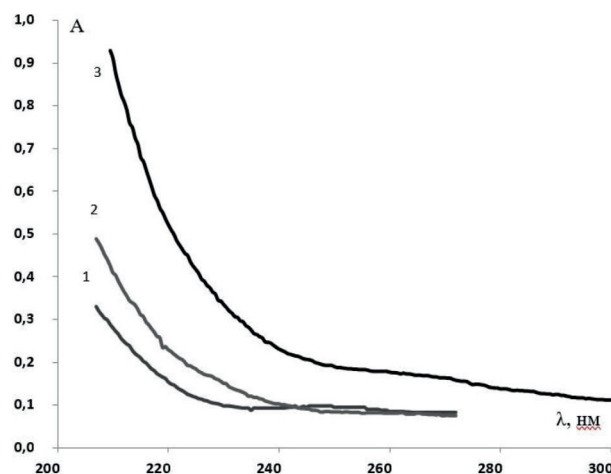


Рис. 4. УФ-спектр сапонины *Sapindus mukorossi* (концентрация сапонины – 1-0.2 мг/мл, 2-0.4 мг/мл, 3-1.0 мг/мл).

Отсутствие явно выраженных максимумов не позволяет сделать однозначного вывода о его природе. Для подробного анализа спектров и повышения их чувствительности в случае исследования таких сложных молекул гликозидной структуры требуются дополнительные методы и приемы, одним из которых является дифференциальная спектрофотометрия. На рисунке 5 представлен дифференциальный спектр сапонины.

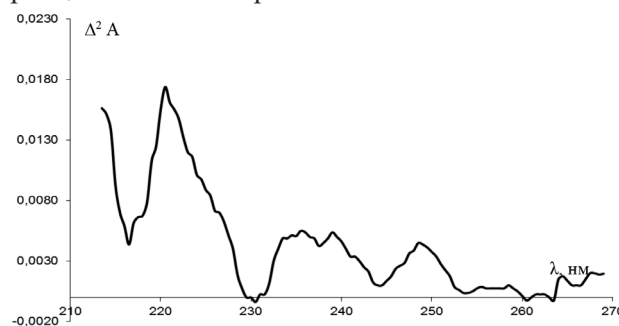


Рис. 5. Дифференциальный спектр сапонины,  $C=1.0$  мг/мл.

Дифференциальный минимум второй производной спектра при 229 нм обусловлен наличием свободных карбонильных групп в молекуле сапонины [31-33]. Полосы при 227-230 нм соответствуют  $\pi-\pi^*$  переходам и определяются только в областях больших концентраций, давая суммарный неразделенный максимум в общем спектре [34].

Четкий и достаточно разделенный дифференциальный минимум при длине волны 229 нм позволяет количественно определить гликозиды группы *Sapindus mukorossi*.

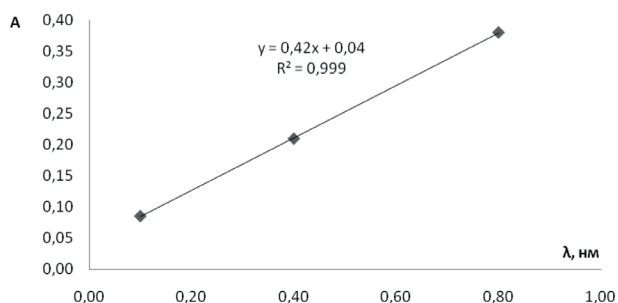


Рис. 6. Градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации сапонина в водном растворе при  $\lambda = 229$  нм.

Градуировочная зависимость описывается уравнением  $A=0.43C + 0.04$  ( $\epsilon = 900$  л/моль·см). В таблице 2 представлены основные метрологические характеристики методик.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метод ТСХ быстрый, нетрудоемкий и позволяет сразу идентифицировать индивидуальные сапонины и определить их содержание в выделяемых фракциях, а также их соотношение. Данный метод целесообразно применять на этапах выделения и очистки сапонинов от примесных веществ для получения наиболее достоверных и воспроизводимых результатов [35]. При низком пределе количественного определения и значительных временных затратах на проведение анализа этот способ значительно уступает спектрофотометрическим способам определения сапонинов. Методика определения в видимой области является унифицированной для всех сапонинов и применяется в условиях отсутствия альтернативных способов количественного определения [36-38]. Определение сапонинов через продукты взаимодействия с серной кислотой осложняется постоянной систематической ошибкой, высокой относительной погрешностью определения и низким множественным коэффициентом

детерминации. Методика может давать завышенные результаты, т.к. комплекс с серной кислотой могут образовывать и других органические соединения в исследуемых фракциях (липиды, стерин и т.д.) [39,40]. К недостаткам следует отнести и необходимость работы с концентрированной серной кислотой. Относительно малое значение стандартного отклонения методики, низкая относительная погрешность, максимальный коэффициент детерминации, сравнительно невысокая относительная ошибка анализа свидетельствует о высокой точности и правильности полученных результатов анализа сапонинов методом УФ-спектрофотометрии. Метод дифференциальной спектроскопии достаточно прост и позволяет селективно определить гликозиды в выделяемых фракциях.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kasai R., Fujino H., Kuzuki T. // *Phytochemistry*. 1986. Vol. 25. №. 4, pp. 871-876.
2. Анисимов М. М., Чирва В.Я. // *Успехи современной биологии*. 1980. Т. 6. №3. С. 351-364.
3. Попов А. М. // *Вестник РАН*. 2006. №6. С. 92-104.
4. Куркин В.А. *Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов*. Самара: ООО «Офорт» СамГМУ, 2004, 1180 с.
5. Калинин В.Л., Левин В.С. *Химическая морфология: тритерпеновые гликозиды Holo-thuriodea*. Владивосток, 1994, 284 с.
6. Калинин В.Л., Прокофьева Н.Г., Лихатская Г.Н. // *Токсикология*. 1996. Т. 34. №4. С. 475-483.
7. Yao H.K, Hui C.H, Li-Ming YK, Ya-Wen H, Kuo-Hsiung L., Fang-Rong C. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. №12, pp.4722-4727.
8. Hostettmann K., Marston A. *Chemistry and pharmacology of natural products – Saponins*.

Таблица 2

Сравнительная характеристика методов определения гликозидов *Sapindus mukorossi*

Методика	Диапазон рабочих концентраций	Предел обнаружения	$\epsilon$ , %	$R^2$	Время анализа
Тонкослойная хроматография	5.0-25.0 мг/пр.	3.0 мг/пр.	12.0	0.89	1.5-2 часа
УФ-спектрофотометрия	0.10-2.50 мг/мл	0.03 мг/мл	0.5	0.99	20-30 минут
Спектрофотометрия в видимой области	1.0-3.3 мг/мл	0.5 мг/мл	4.0	0.71	1.5-2 часа

- Cambridge. Cambridge University Press, 1995, p. 548
9. Хайс И., Мацек К. Хроматография на бумаге. Москва, ИЛ. 1962, 852 с.
  10. Ахрем. А.А., Кузнецова А.И. Тонкослойная хроматография. Москва, Наука, 1964, 175 с.
  11. Хорлин А.Я., Бакиновский Л.В., Васьковский В.Е., Веньяминова А.Г., Оводов Ю.С. // Известия АН СССР. сер. хим. 1963. С. 2008.
  12. Основы аналитической химии. В 2 т. Т.1: учебник для студ. Учреждений высш. образования / под ред. Ю.А. Золотова. Москва, Издательский центр "Академия", 2014, 400 с.
  13. Бухаров В.Г., Щербак С.П., Бещекова А.П. // Химия природных соединений. 1971. №1. С. 33-38.
  14. Tschesche R., Schuze H. // Chemische Berichte. 1974. Vol. 107, pp. 2710-2719.
  15. Jurzysta M., Gorski P. // XI Zjazd P.T. Bioch. Bialystok 9-12. IX. 1973, p. 81.
  16. Kuo Y. H., Huang H. C., Kuo L. I. M. Y. et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. Vol. 53. № 12, pp. 4722-4727.
  17. Kasai R., Fujino H., Kuzuki T. et al. // Phytochemistry, 1986. Vol. 25. № 4, pp. 871-876.
  18. Chakraborty A., Amudha P., Geetha M., Surjit Singh N. // International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2010. Vol. 1 № 3, pp. 1-8.
  19. Glombitza K.-W., Gielsdorf W., Eckhardt G., Koch M.L. // Planta med. 1975. № 27, pp.127-138
  20. Толстикова Т.Г., Толстиков А.Г., Толстиков Г.А. // Вестник РАН. 2007. Т. 77. №10. С. 867-874.
  21. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П., Кондратенко Р.М., Толстикова Т.Г. Солодка: Биоразнообразие, химия, применение в медицине, Новосибирск, 2007, 311 с.
  22. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии. Москва, Мир, 1994, 267 с.
  23. Кельнер Р. Аналитическая химия. Проблемы и подходы : в 2 т. Москва, Мир : АСТ, 2004, Т. 1, 728 с, Т. 2, 607 с.
  24. Большова Т.А. Основы аналитической химии. В 2 т. Т.1: учебник для студ. Учреждений высш. Образования. Москва, Издательский центр "Академия", 2014, 400с.
  25. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение. Учебное пособие. 2-е изд. Изд-во Саратовск. ун-та, 2006, 112 с.
  26. Qingwen Hu, Ying-Ying Chen, Qi-Yang Jiao, // J. Phytochemistry. 2018. Vol. 147, pp. 1-8.
  27. Chirva V., Kintya P., Sosnovskii V.A., Krivenchuk P.E., Zyкова N.Y. // Chemistry of Natural Compounds. 1970. № 6, pp. 213-215.
  28. Yao HK, Hui CH, Li-Ming YK, Ya-Wen H, Kuo-Hsiung L, Fang-Rong C, et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, pp.161-165.
  29. Sharma A., Sati S.C., Sati O.P., et al. // Journal of Chemistry. 2013. Vol. 10, pp. 12-26.
  30. Varma R., Varma R.S., Wardi A.H. //Journal of Chromatography. 1973. Vol. 77, pp. 222-227.
  31. Sun C., Wang J., Duan J., Zhao G., Weng X., Jia, L. // Forests. 2017. Vol. 8. №12, p. 491.
  32. Shibata S., Tanaka O., Nagai N., Ishii T. // Chem. Pharm. Bull. 1963 Vol. 11, p. 762.
  33. Yosioka I., Matsuda A., Kitagawa I. // Chem. Pharm. Bull. 1967. № 15, pp. 547-548.
  34. Nakayama K., Fujino H., Kasai R., Tanaka O. // Chemicaland Pharmaceutical Bulletin. 1986. Vol. 34, pp. 3279-3283.
  35. Нгуен Тхань Ван, Мироненко Н. В., Брежнева Т. А., Селеменев В. Ф., Бережнова Т. А., Преображенская Н. С. // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2018. № 1. С. 15-21.
  36. Hiai S., H. Oura, T. Nakajima // Planta Medica. 1975. № 2, pp. 131-138.
  37. Пирожкова Н.М., Краснов Е.А., Кинтя П.К. // Химия природных соединений. 1980. №6. С. 846-847.
  38. Деканосидзе Г.Е., Чирва В.Я., Сергиенко Т.В. Биологическая роль, распространение и химическое строение тритерпеновых гликозидов. Тбилиси, Мецниереба, 1984, 349 с.
  39. Shah Md.A. H., Dutta K., Deka D. C // Department of Chemistry. 2014. Vol. 5. №4, pp. 43-50.
  40. Анисимов М.М., Чирва В. Я // Успехи современной биологии. 1980. № 6. с. 351-364.

*Воронежский государственный университет  
Калмыкова А. С., магистрант кафедры аналитической химии  
E-mail: kalmykova.anastasiya@yandex.ru*

*Voronezh State University  
Kalmykova A. S., Master, analytical chemistry department  
Kalmykova.anastasiya@yandex.ru*

Мироненко Н. В., Крысанова Т. А., Селеменев В. Ф., Калмыкова А. С.

Мироненко Н. В., к.х.н., ассистент каф. аналитической химии  
E-mail: natashamir@yandex.ru

Mironenko N. V., PhD, Assistant Professor of the Department of Analytical Chemistry  
E-mail: natashamir@yandex.ru

Селеменев В. Ф., д.х.н., проф. каф. аналитической химии  
E-mail: common@chem.vsu.ru

Selemenev V. F., PhD., DSci, Full Professor., department of Analytical Chemistry  
E-mail: common@chem.vsu.ru

Крысанова Т. А., к.х.н., доц. кафедры аналитической химии

Krysanova T. A., PhD, Associate Professor, dept. of Analytical Chemistry

## DEVELOPMENT OF METHODS FOR IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF TRITERPENE SAPONINS *SAPINDUS MUKOROSI*

N. V. Mironenko, T. A. Krysanova, V. F. Selemenev, A. S. Kalmykova

*Voronezh State University*

**Abstract.** Methods of identification and quantitative determination of triterpene saponins by chromatography and spectroscopy in the visible and ultraviolet regions have been developed.

A method of identification by the TLC method has been developed and the possibility of its application for the quantitative determination of saponins in aqueous solutions has been evaluated. The choice of the optimal elution system was carried out on the basis of the calculated parameters: separation selectivity, height equivalent to the theoretical plate, the number of theoretical plates. The calibration dependence of the saponin concentration on the peak area of the form S=3600C-2450 was obtained using densitograms. It is established that the TLC method is fast, labor-intensive and allows you to immediately identify individual saponins and determine their content in the isolated fractions. It is advisable to use this method at the stages of isolation and purification of saponins from impurity substances.

A method of quantitative analysis of saponins with vanillin and sulfuric acid has been developed. The absorption maximum was observed at a wavelength of 480 nm, which was chosen as an analytical one. The determination of saponins through products of interaction with sulfuric acid is complicated by a constant systematic error, a high relative error of determination and a low correlation coefficient. The technique can give overestimated results, because the complex with sulfuric acid can form other organic compounds in the studied fractions (lipids, sterols, etc.).

A differential absorption spectrum of an aqueous solution of saponin *Mukorossi* was obtained. It is established that the differential minimum of the second derivative of the spectrum at 229 nm is due to the presence of free carbonyl groups in the saponin molecule. The bands at 227-230 nm correspond to  $\pi$ - $\pi^*$  transitions and are determined only in areas of high concentrations, giving a total undivided maximum in the general spectrum. A clear and sufficiently separated differential minimum at a wavelength of 229 nm makes it possible to quantify the glycosides of the *Sapindus mukorossi* group. The relatively small value of the standard deviation of the technique, the low relative error, the maximum correlation coefficient, the relatively low relative error of the analysis indicates the high accuracy and correctness of the obtained results of the analysis of saponins by UV spectrophotometry. The method of differential spectroscopy is quite simple and allows the selective determination of glycosides in the isolated fractions.

**Keywords:** saponins, determination methods, spectroscopy, chromatography.

### REFERENCES

1. Kasai R., Fujino H., Kuzuki T., *Phytochemistry*, 1986, Vol. 25, No. 4, pp. 871-876.
2. Anisimov M.M., Chirva V.Ya., *Successes of modern biology*, 1980, Vol. 6, No. 3, pp. 351-364.

3. Popov A.M., *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2006, No 6, pp. 92-104.
4. Kurkin V.A. *Pharmacognosy: A textbook for students of pharmaceutical universities*. Samara: LLC "Etching" SamSMU, 2004, 1180 p.

5. Kalinin V.L., Levin V.S. Chemical morphology: Holo-thuriodea triterpene glycosides. Vladivostok, 1994, 284 p.
6. Kalinin V.L., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N. Toxicology, 1996, Vol. 34, No. 4, pp. 475-483.
7. Yao HK, Hui CH, Li-Ming YK, Ya-Wen H, Kuo-Hsiung L, Fang-Rong C. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, No.12, pp. 4722-4727.
8. Hostettmann K., Marston A. Chemistry and pharmacology of natural products – Saponins. Cambridge. Cambridge University Press, 1995, p. 548
9. Hayes I., Matsek K., Chromatography on paper. Moscow, IL, 1962, 852 p.
10. Akhrem. A.A., Kuznetsova A.I., Thin-layer chromatography. Moscow, Nauka, 1964, 175 p.
11. Horlin A.Ya., Bakinovskiy LV, Vaskovskiy VE, Venyaminova AG, Ovodov Yu.S. Izv. ANSSSR, ser. chem. 1963. p. 2008.
12. Zolotov Yu.A. Fundamentals of analytical chemistry. In 2 vols. Vol. 1: textbook for students. Moscow, Publishing Center "Academy", 2014, 400 p.
13. Bukharov V.G., Shcherbak S.P., Beschekova A.P., Chemistry of nature. 1971, No.1, pp. 33-38.
14. Tschesche R., Schuze H. Chemische Berichte, 1974, Vol. 107, pp.2710-2719.
15. Jurzysta M., Gorski P. XI Zjazd P.T., Bioch. Bialystok 9-12. IX. 1973, p. 81.
16. Kuo Y. H., Huang H. C., Kuo L. I. M. Y., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, Vol. 53, No. 12, pp. 4722-4727.
17. Kasai R., Fujino H., Kuzuki T., Phytochemistry, 1986, Vol. 25, No. 4. pp. 871-876.
18. Chakraborty A., Amudha P., Geetha M., Surjit Singh N., International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2010, Vol. 1, No. 3, pp. 1-8.
19. Glombitza K.-W., Gielsdorf W., Eckhardt G., Koch M.L., Planta med., 1975, № 27, pp.127-138
20. Tolstikova T.G., Tolstikov A.G., Tolstikov G.A., Bulletin of the Russian Academy of Sciences, 2007, Vol. 77, No10, pp. 867-874.
21. Tolstikov G.A., Baltina L.A., Grankina V.P., Kondratenko R.M., Tolstikova T.G., Licorice: Biodiversity, chemistry, application in medicine. Novosibirsk, 2007, 311 p.
22. Derffel K. Statistics in analytical chemistry. Moscow, Mir, 1994, 267 p.
23. Kellner R. Analytical chemistry. Problems and approaches: in 2 volumes. Moscow, Mir: AST, 2004. Vol. 1, 728 p., Vol. 2, 607 p.
24. Bolshova T.A. Fundamentals of analytical chemistry. In 2 vols. Vol. 1: textbook for students. Institutions of higher education. Moscow, Publishing Center "Academy", 2014, 400 p.
25. Sumina E.G., Shtykov S.N., Tyurina N.V. Thin Layer Chromatography. Theoretical Foundations and Practical Application. Tutorial. 2nd ed. Publishing house Saratovsk. un-ta, 2006, 112 p.
26. Qingwen Hu, Ying-Ying Chen, Qi-Yang Jiao, J. Phytochemistry, 2018, Vol. 147, pp. 1-8.
27. Chirva V., Kintya P., Sosnovskii V.A., Krivenchuk P.E., Zykova N.Y., Chemistry of Natural Compounds, 1970, No. 6, pp. 213-215.
28. Yao H.K, Hui C.H, Li-Ming Y.K, Ya-Wen H, Kuo-Hsiung L, Fang-Rong C., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, pp.161-165.
29. Sharma A., Sati S.C., Sati O.P., Journal of Chemistry, 2013, Vol. 10, pp. 12-26.
30. Varma R., Varma R.S., Wardi A.H., Journal of Chromatography, 1973, Vol. 77, pp. 222-227.
31. Sun C., Wang, J., Duan J., Zhao G., Weng X., Jia L., Forests, 2017, Vol. 8, No. 12, p. 491.
32. Shibata S., Tanaka O., Nagai N., Ishii T. Chem. Pharm. Bull., 1963, Vol. 11, p. 762.
33. Yosioka I., Matsuda A., Kitagawa I. Chem. Pharm. Bull., 1967, № 15, pp. 547-548.
34. Nakayama K., Fujino H., Kasai R., Tanaka O. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, Vol. 34, pp. 3279-3283.
35. Nguyen Thanh Van, Mironenko N. V., Brezhneva T. A., Selemenev V. F., Berezhnova T. A., Preobrazhenskaya N. S. Bulletin of the Voronezh State university. Ser. Chemistry. Biology. Pharmacy, 2018, No. 1, pp. 15-21.
36. Hiai S., H. Oura, Nakajima T. Planta Medica, 1975, No. 2, pp.131-138.
37. Pirozhkova N.M., Krasnov E.A., Kintya P.K., Chemistry of Natural Resources, 1980, No. 6, pp. 846-847.
38. Dekanosidze G.E., Chirva V.Ya., Sergienko T.V., Biological role, distribution and chemical structure of triterpene glycosides. Tbilisi: Metsniereba, 1984, 349 p.
39. Halim S.Md.A., Dutta K., Chandra D.D. Department of Chemistry., 2014, Vol. 5, No. 4, pp. 43-50.
40. Anisimov MM, Chirva V.Ya. Usp. sovrem biology, 1980, No. 6, pp. 351-364.