

JOANNA MILALA, BOGUSŁAW KRÓL

ZASTOSOWANIE TLC I HPLC W ANALIZIE JAKOŚCIOWEJ SAPONIN

Streszczenie

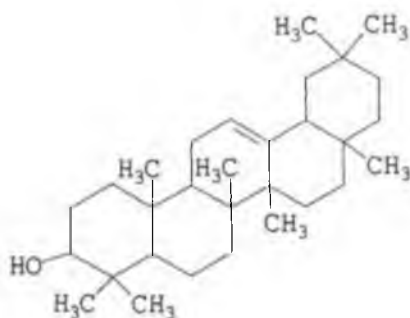
Metodą chromatografii cieczowej cienkowarstwowej TLC porównano skład jakościowy wybranych saponin i produktów ich hydrolizy kwasowej (aglikonów). Dobrano warunki rozdziału: glicyryzyny, saponiny białej i saponin z buraka cukrowego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC z zastosowaniem metanolu, jako głównego rozpuszczalnika.

Stwierdzono, że zastosowanie chromatografii cieczowej TLC i HPLC umożliwia udokumentowanie ogromnego zróżnicowania składu jakościowego i ilościowego badanych saponin. Dobry rozdział saponin z grupy glukuronidów metodą HPLC uzyskuje się przy elucji metanolem w fazie z dodatkiem TBA (wodorotlenek tetrabutylamonowy) o indywidualnie dobranym udziale metanolu.

Wstęp

Saponiny (łac. *sapo-mydło*) są to glikozydy pochodzenia roślinnego wykazujące silne właściwości pianotwórcze. Zalicza się je do grupy wtórnych metabolitów przemian biochemicznych roślin. Pod względem budowy chemicznej saponiny należą do glikozydów triterpenoidowych lub steroidowych, które w wyniku wyczerpującej hydrolizy kwasowej, zasadowej lub enzymatycznej ulegają rozpadowi na aglikony (*sapogeniny*) oraz składniki cukrowe (pentozy, heksozy lub kwasy uronowe).

Podstawowym aglikonem saponin triterpenoidowych jest β -amyryna (rys. 1), która może mieć różne podstawniki (grupy: hydroksylowe, karboksylowe, ketonowe, metoksyłowe i estrowe). Występowanie przy aglikonach różnych grup funkcyjnych, a także możliwość różnych połączeń między cukrowcami i aglikonem, sprawia, iż w przyrodzie znajduje się olbrzymia ilość saponin różniących się strukturą i właściwościami [3, 4, 6]. Dokładnie poznanymi i opisanymi w literaturze są saponiny wyizolowane z soi, korzenia żeń-szeń, mydlnicy lekarskiej, lucerny.



Rys. 1. Chemiczna struktura β -amyryny.

Fig. 1. Chemical structures of β -amyryn.

Chemiczną strukturę wybranych saponin triterpenoidowych przedstawiono w tab. 1 [1, 6, 7].

Wyodrębnianie i oczyszczanie poszczególnych saponin z surowców roślinnych jest trudne, ponieważ mają one silne właściwości adsorpcyjne, powlekające, pieniające, łatwo tworzą związki kompleksowe z barwnikami, cholesterolem i innymi związkami chemicznymi. Ponadto bardzo trudno ulegają krystalizacji. Wykazują też różną podatność na działanie kwasów i zasad.

Do klasycznych metod wykrywania i oznaczania saponin należą następujące metody [4]:

- biologiczne, a zwłaszcza hemoliza erytrocytów,
- fizykochemiczne, w tym próba dotycząca zdolności pianotwórczej,
- chemiczne jak np. próby ze stężonym kwasem siarkowym, trichlorkiem antymonu, waniliną, które są podstawą do jakościowych i ilościowych oznaczeń kolorymetrycznych.

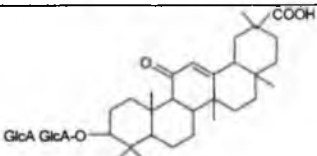
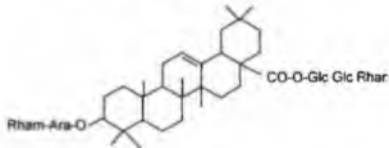
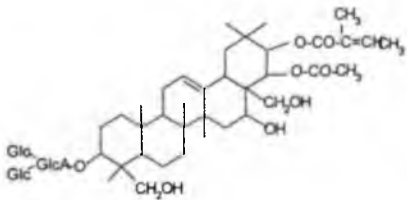
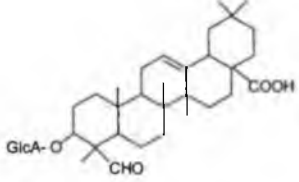
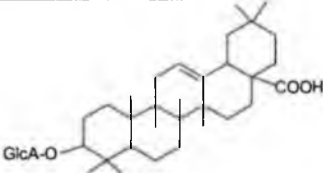
Próby z hemolizą erytrocytów są uciążliwe i obarczone błędem ze względu na różną aktywność hemolityczną poszczególnych saponin. Natomiast spektrofotometryczne metody analityczne są mało przydatne do oznaczania tej grupy związków, głównie ze względu na różną intensywność tworzenia barwnych połączeń i brak odpowiednich wzorców.

Od dawna przy oczyszczaniu i w analityce saponin znajdują zastosowanie metody chromatograficzne – szczególnie TLC i HPLC. Do rozdzielania saponin metodą HPLC stosuje się różne fazy ruchome zawierające najczęściej acetonitryl przy elucji izokracycznie i w gradiencie [1, 2].

Tabela 1

Chemiczna struktura saponin triterpenoidowych.

Chemical structures of triterpene saponins.

Saponina Saponin	Struktura / Structure	Aglikon Aglycone	Występowanie Occurrence
Glicyryzyna (Glycyrrhizic acid)		Kwas glicyretynowy (Glycyrrhetinic acid)	Lukrecja Liquorice (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)
Hederakozyd (HederacosideC)		Hederagenina (Hederagenin)	Bluszcz Ivy (<i>Hedera helix</i>)
Escyna (β-Escin)		Protoescygenina (Protoescigenin)	Kasztanowiec Horse-chestnut (<i>Aesculus hippocastanum</i>)
Gipsogenina (Gypsogenin-3-glucuronide)		Gipsogenina (Gypsogenin)	Łyszczec (<i>Gypsophila sp.</i>)
Saponina buraczana (Sugar beet saponin)		Kwas oleanolowy (Oleanolic acid)	Burak cukrowy Sugar beet (<i>Beta alba</i>)

Źródło: opracowanie własne wg [1,6,7]

Cel pracy

Celem pracy było porównanie jakościowego składu saponin, z wybranych źródeł, metodą chromatografii cienkowarstwowej i dobranie warunków rozdzielania niektórych saponin metodami HPLC z zastosowaniem w fazie ruchomej metanolu jako rozpuszczalnika – tańszego i mniej toksycznego od powszechnie stosowanego acetonitrylu.

Materiały i metody badań

Materiał badawczy stanowiły:

- handlowe preparaty saponin: glicyryzyna (glicyrrhizic acid – SIGMA), saponina biała (saponin white pure – MERCK), saponina czysta (Saponin rein DAB – FLUKA),
- saponiny wyodrębnione z handlowych produktów farmaceutycznych: hederyna z syropu Hedelix, escyna z żelu Aescin,
- saponiny wyodrębnione z produktów cukrowniczych: soku surowego, soku gęstego i wysłodków,
- kwas oleanolowy (oleanolic acid – SIGMA).

Wyodrębnianie saponin z produktów farmaceutycznych i cukrowniczych prowadzono przez trzykrotną ekstrakcję butanolem odpowiednich wodnych roztworów w temp. pokojowej, po czym ekstrakty butanolowe przemywano wodą i po oddestylowaniu butanolu, saponiny rozpuszczano w bezwodnym metanolu.

Roztwory metanolowe wszystkich badanych saponin (1–5 mg/ml) poddano bezpośrednio analizie TLC. Ponadto glicyryzynę, saponinę białą, saponiny z soku surowego i gęstego poddano hydrolizie w roztworze 1M HCl, w środowisku 50% MeOH, w zatopionych ampułkach, we wrzącej łaźni wodnej, w czasie 90 min oraz analogicznie z użyciem 0,5 M H₂SO₄, po czym oznaczano skład jakościowy saponin i aglikonów metodą TLC w dwóch układach rozwijających.

Chromatografię cienkowarstwową wykonano na płytkach chromatograficznych (DC – Alufolien Kieselgel 60 F254 MERC) 20x20 cm pokrytych 0,2 cm warstwą żelu krzemionkowego. Fazą ruchomą dla saponin był: octan etylu-kwas octowy-woda (7:2:2, v/v/v) dla produktów hydrolizy benzen-metanol (9:1 v/v).

Po rozwinięciu chromatogramy suszono w suszarce, spryskiwano odczynnikami aldehyd anyżowy – kwas octowy lodowaty – metanol – stężony H₂SO₄ (0.5:10:85:5, v/v/v/v) i ogrzewano w temp. 110°C przez 5 min.

Analizie HPLC poddano saponiny z trzech różnych źródeł, będące glukuronidami: glicyryzynę, saponinę białą, saponiny z buraka cukrowego.

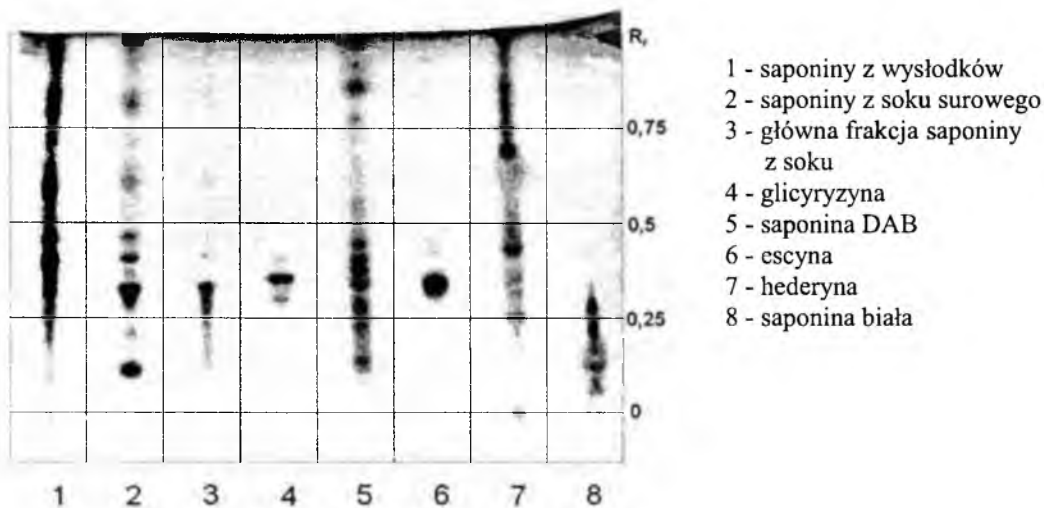
Analizę chromatograficzną prowadzono z użyciem chromatografu firmy Knauer z systemem sterowania obróbki danych EuroChrom 2000, z zastosowaniem detektora

UV o długości fali 206 nm i kolumny Lichrosorb RP-18 250×4,6 mm. Chromatografię prowadzono z szybkością przepływu 0,8 ml/min w fazie metanol-woda (75:25, v/v) oraz chromatografię w odwróconej fazie z dodatkiem TBA (wodorotlenek tetrabutylamonowy) o składzie:

- 70% metanolu 30% wody z dodatkiem 3mM/l TBA i kwasu H_3PO_4 do pH = 4,
- 75% metanolu 25% wody z dodatkiem 3mM/l TBA i kwasu H_3PO_4 do pH = 4,
- 85% metanolu 15% wody z dodatkiem 3mM/l TBA i kwasu H_3PO_4 do pH = 4.

Wyniki i dyskusja

Wyniki chromatografii cienkowarstwowej badanych saponin przedstawiono na rys. 2. i 3., a uzyskane wartości R_f saponin zawiera tab. 2. Chromatogramy TLC (rys. 2) świadczą o dużym zróżnicowaniu badanych saponin pod względem zabarwienia plam (od brązowych do różowofioletowych), co wskazuje na istotne różnice jakościowe i ilościowe. Z porównania położenia plam saponin wzorcowych na płytce (glicyryzyny, saponiny białej i escyny) i plam pozostałych saponin wynika, iż zakres R_f od 0,15 do 0,65 odpowiada grupie związków o charakterze saponin, zaś plamy o R_f od 0,65 do 0,91 odnoszą się do prosapogenin i innych substancji. W większości badane saponiny występują jako grupa kilku związków o R_f 0,15-0,65. Saponina DAB z drzewa kwilajowego (*Quillaja saponaria*) i saponiny otrzymane z wysłodków i soku surowego charakteryzują się dużym zróżnicowaniem jakościowym (rys. 2). Z rys. 2. wynika też, iż saponiny z soku jako dominujący składnik zawierają saponinę o $R_f = 0,34$ zaś saponiny z wysłodków jako główny składnik saponinę o $R_f = 0,43$.



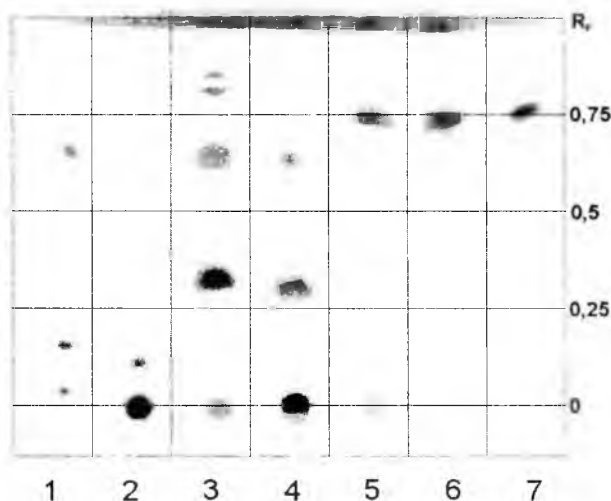
Rys. 2. Chromatogram TLC badanych saponin w układzie 1.

Fig. 2. TLC chromatogram of examined saponins in mobile phase 1.

Tabela 2

Wartości R_f dla badanych saponin i prosapogenin.
Value R_f of examined saponins and prosapogenins.

Saponina Saponins	Zakres R_f Range of R_f	R_f i barwa głównego składnika Colour of main constituent
Saponiny z wysłodków Saponins of beet pulp	0.21-0.91	0.43 ciemnofioletowy - dark-violet
Saponiny z soku Saponins of juice	0.21-0.91	0.34 fioletowy - violet
Osad z soku w metanolu Methanolic sediment from juice	0.21-0.36	0.34 fioletowy - violet
Glicyryzyna Glycyrrhizic acid	0.30-0.52	0.38 różowy - pink
Saponina DAB Saponin DAB	0.15-0.91	0.35 brunatny - brown
Escyna β -Escin	0.30-0.39	0.36 ciemnofioletowy - dark-violet
Hederyna Hederyn	0.26-0.78	0.65 brązowy - brown
Saponina biała White saponin	0.15-0.35	0.28 brązowy - brown



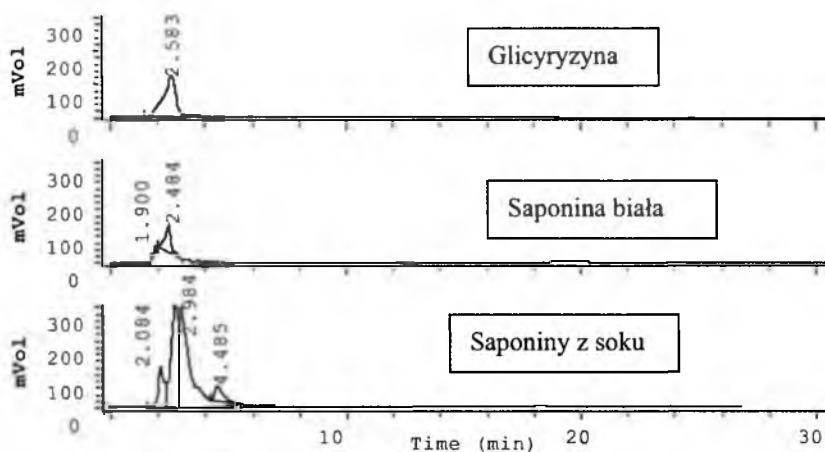
- 1 - saponina biała po hydrolizie 1M HCl, 4 - glicyryzyna po hydrolizie 0,5M H₂SO₄,
 2 - saponina biała po hydrolizie 0,5M H₂SO₄, 5 - saponiny z soku gęstego po hydrolizie 1M HCl,
 3 - glicyryzyna po hydrolizie 1M HCl, 6 - saponiny z soku surowego po hydrolizie 1M HCl,
 7 - kwas oleanolowy.

Rys. 3. Chromatogram saponin po hydrolizie w układzie 2.

Fig. 3. TLC chromatogram of hydrolysed saponins in mobile phase 2.

Chromatogramy TLC produktów hydrolizy glicyryzyny, saponiny białej, saponiny z soku gęstego i surowego przedstawiono na rys. 3. Wszystkie saponiny poddane działaniu 1M HCl uległy wyczerpującej hydrolizie. Głównym aglikonem saponin z buraka cukrowego jest kwas oleanolowy.

Następnie podjęto próbę doboru fazy ruchomej do rozdzielania: glicyryzyny, saponiny białej, saponin buraka cukrowego (z soku surowego), z zastosowaniem techniki HPLC, z użyciem fazy metanol-woda (75:25, v/v) oraz chromatografii w odwróconej fazie. Wyniki analiz HPLC przedstawiono na rys. 4, 5, 6. Z rys. 4. wynika, że w fazie metanol-woda (75:25, v/v) glicyryzyna, saponina biała i saponiny buraka cukrowego (z soku) nie ulegają zadowalającemu rozdzielaniu na składniki.

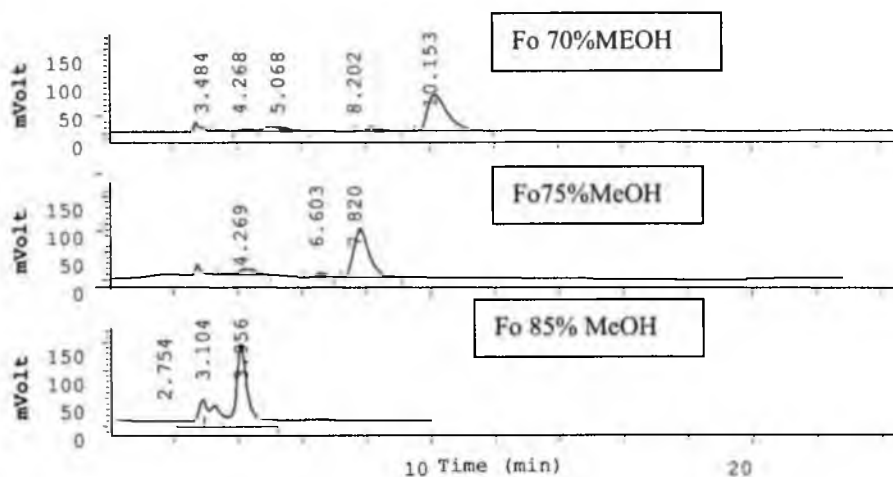


Rys. 4. Chromatogram HPLC badanych saponin w fazie metanol: woda 75:25 (liczby nad pikami podają czasy retencji).

Fig. 4. HPLC chromatogram of examined saponins in phase methanol : water 75:25 (number over pik indicates retention time).

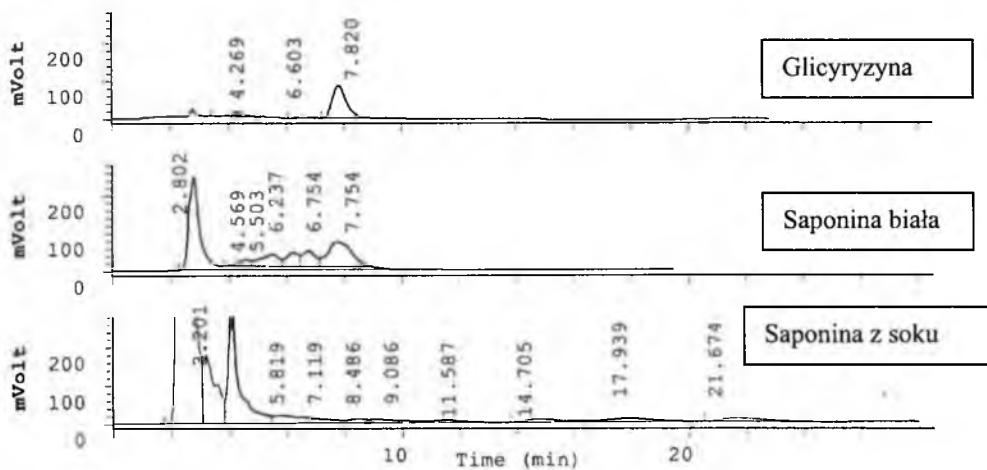
Na rys. 5. przedstawiono wyniki rozdzielania glicyryzyny w fazie z dodatkiem 3mM/l TBA i udziale metanolu odpowiednio: 70, 75, 85%. Z rys. 5. wynika, że najkorzystniejszą fazą do rozdzielania glicyryzyny jest faza o składzie 75% metanolu 25% wody, 3 mm TBA o pH 4. W tych warunkach otrzymuje się trzy ostre piki. Zmniejszenie bądź zwiększenie udziału metanolu w fazie ruchomej wpływa niekorzystnie na rozdzielanie. W przypadku chromatografii w odwróconej fazie o 70% udziale metanolu piki poprzedzające pik główny stają się rozmyte, wydłuża się też czas analizy, natomiast w przypadku chromatografii w odwróconej fazie z 85% metanolu nie następuje dokładny rozdział typu „base line”.

Na rys. 6. przedstawiono rozdzielanie trzech badanych saponin o charakterze glikuronidów w fazie ruchomej wyznaczonej dla glicyryzyny.



Rys. 5. Chromatogram HPLC glicyryzyny w fazie z TBA o różnym udziale metanolu (liczby nad pikami podają czasy retencji).

Fig. 5. HPLC chromatogram of glycyrrhizic acid in phase with TBA and different methanol content (number over pik indicates retention time).



Rys. 6. Chromatogram HPLC badanych saponin w fazie z TBA o 75% udziale metanolu (liczby nad pikami podają czasy retencji).

Fig. 6. HPLC chromatogram of examined saponins in phase with TBA and 75% methanol content (number over pik indicates retention time).

W tych warunkach rozdziela się dobrze również saponina biała, a znacznie gorzej saponiny z surowego soku z buraków. Dalsze badania wykazały, że do rozdzielenia saponin z buraka cukrowego korzystne jest stosowanie chromatografii w odwróconej fazie z 85% udziałem metanolu.

Wnioski

1. Technika TLC jest korzystna ze względu na stosunkowo prosty i zarazem niedrogi sposób analizy. Przydatna jest podczas wyodrębniania i oczyszczania saponin oraz do szybkiej oceny składu preparatów saponin.
2. Technika HPLC umożliwia analizę ilościową roztworów o niskich stężeniach saponin.
3. Do rozdzielania saponin z grupy glukuronidów metodą HPLC w odwróconej fazie niezbędne jest dostosowanie fazy ruchomej do poszczególnych saponin.

LITERATURA

- [1] M. Burnouf-Radosevich, N.E. Delfel.: High-performance liquid chromatography of triterpene saponins. *J. Chrom.*, **368**, 1986, 433.
- [2] E. Max Henry, D. Pauthe-Dayde, M. Rochd.: Extraction and high-performance liquid chromatographic determination of gypsogenin 3,O-glucuronide. *J. Chrom.*, **519**, 1990, 109.
- [3] M. Jurzysta, S. Burda, W. Oleszek, M. Płoszyński.: Studies on *Medicago lupulina* saponins. Isolation and chemical characterization of blossom saponins. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **56**, 1987, 101.
- [4] J. Muszyński: *Farmakognozja*. PZWL, Warszawa 1957.
- [5] W. Oleszek: Solid Phase Ekstraktion.: Fractionation of alfaalfa saponins. *J. Sci. Food. Agric.*, **44**, 1988, 43.
- [6] H. Schiweck, G. Steinle, E. Fischer.: Bestimmung des Saponingehaltes in Zuckerfabrikprodukten und Verhalten Während des Prozesses. *Proceedings 19th Gen Assambley, Comm. Tech. Sucrierie*, Cambridge, 1991, 441.
- [7] O. Tanaka.: Improvement of taste of natural sweeteners. *Pure and Applied Chemistry JUPAC*, **69**, 1997, 675.

DETECTION AND DETERMINATION OF SAPONINS WITH APPLICATION OF DIFFERENT CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

S u m m a r y

Qualitative composition of selected saponins and products of their acid hydrolysis were compared by TLC method. The conditions of separation of glycyrrhizic acid, white saponin, and sugar beet saponins by HPLC method with the use of methanol as a main solvent were elaborated.

The use of liquid chromatography TLC and HPLC makes it possible to prove the huge differentiation of composition of qualitative and quantitative composition of examined saponins. Good separation of saponins from group of glucuronides was achieved with methanol elution in phase method with addition of TBA (tetrabutylammonium hydroxide). ☒