ELŻBIETA ANDRZEJEWSKA

METODA OZNACZANIA SAPONIN W NIEKTORYCH ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Państwowego
Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr *M. Nikonorow*

Metoda ekstrakcji saponin z chałwy oraz półilościowego ich oznaczania techniką chromatografii cienkowarstwowej.

WSTĘP

Nazwą „saponina" określa się heterozydy roślinne obniżające napięcie powierzchniowe między heterogennymi układami. Są to bezazotowe związki organiczne o budowie glukozydowej, charakterystyczne dla świata roślinnego [2, 3, 5, 9, 15, 16]. Dotychczas otrzymano i ustalono budowę niektórych saponin. Część cukrową stanowi zazwyczaj łańcuch złożony z cukrów prostych, natomiast aglukon, zwany sapogeniną, ma charakter sterydowy lub trójterpenowy. Zależnie od struktury aglukonu (sapogeniny) rozróżnia się saponiny trójterpenowe i sterydowe oraz sterydo-alkaloidowe.

Ze względu na zbliżone właściwości chemiczne mogą być one wykrywane podobnymi reakcjami jakościowymi [5, 15, 17]. W badaniach ilościowych trzeba posługiwać się metodami bardziej zróżnicowanymi [1, 2, 4—7, 10, 11, 16, 18, 19].

Charakterystycznymi cechami biologicznymi saponin są: działanie hemolityczne, drażniące, przeciwgrzybicze oraz toksyczne uzależnione od gatunku zwierząt doświadczalnych i stosowanej metody.

Wszystkie saponiny posiadają zdolność pienienia się w roztworach wodnych. Obniżając napięcie powierzchniowe roztworów ułatwiają resorpcję innych związków w przewodzie pokarmowym, a jednocześnie wykazują powinowactwo do lipidów oraz mają zdolność wiązania się z cholesterolem, sterolami i innymi składnikami komórkowymi.

Objawy zatrucia ostrego występują w postaci wymiotów, biegunek a niekiedy krwotocznego zapalenia przewodu pokarmowego. Po wchłonięciu do krwi wywołują hemolizę wskutek wiązania cholesterolu w otoczce krwinek.

Saponiny ułatwiają emulgowanie tłuszczów. Szereg saponin stosuje się w lecznictwie jako środki wykrztuśne [3, 5, 8, 11, 15, 17].

W przemyśle spożywczym stosowano dodatek saponin do napojów, obecnie wszystkie ustawodawstwa zabraniają tego. Niektóre zezwalają jedynie na dodatek do chałwy saponin pochodzących z korzenia mydlnicy lekarskiej. W krajach, w których to jest zabronione [np. Austria, Szwajcaria, Francja] używa się białko jaja kurzego [12].

W Polsce, w uzupełnieniu do Zarządzenia Min. Zdrow. i Op. Społ. z dn. 4 VI 1971 r. „w sprawie wykazu dozwolonych substancji dodatkowych i zanieczyszczeń w środkach spożywczych i używkach oraz na ich powierzchni" (Dz. Urz. Min. Zdrow. i Op. Społ. Nr 15 z dnia 15 VIII 71 r. poz. 73), w 1972 roku zezwolono na dodatek 0,25% korzenia mydlnicy do chałwy. Zgodnie z aktualnymi przepisami technologicznymi ilość dodanych saponin nie może przekroczyć 0,03% w gotowej chałwie [20].

Ponadto saponiny występują jako naturalny składnik w cukrze białym buraczanym oraz nasionach soi. W ostatnich latach zwrócono uwagę na te produkty i wykonano prace w kierunku jakościowego i ilościowego zbadania zawartych w nich saponin [2, 9, 19].

Opracowana niegdyś metoda wykrywania obecności saponin w napojach jest aktualna do dzisiaj [13, 14]. Wobec braku metod oznaczania saponin dodawanych do chałwy, celem pracy było umożliwienie kontroli ich ilości i zgodności z obowiązującymi przepisami technologicznymi.

W związku z powyższym zbadano chałwę, korzeń mydlnicy lekarskiej oraz ziarno sezamowe, w którym jak przypuszczano również mogą występować saponiny jako składnik naturalny.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Zasada metody polega na odtłuszczeniu odpowiednio przygotowanej próby, ekstrakcji saponin 70% metanolem, reekstrakcji fenolem oraz na indentyfikacji i określeniu ilości saponin techniką chromatografii cienkowarstwowej.

Przedmiotem badań była chałwa sezamowa — produkt stanowiący mieszaninę napowietrzonej masy karmelowej, przesyconej miazgą jąder nasion sezamu z dodatkiem substancji smakowo-zapachowych.

Jako substancję pianotwórczą do napowietrzania masy karmelowej stosuje się wodny ekstrakt z korzenia mydlnicy lekarskiej.

OPIS METODY

Odczynniki*

1) aceton cz.d.a.,
2) alkohol metylowy cz.d.a.,
3) eter etylowy (do narkozy),
4) magnezu węglan cz.d.a.,
5) amonu siarczan cz.d.a.,
6) fenol cz.d.a.,
7) alkohol absolutny,
8) sodu siarczan bezwodny cz.d.a. (wyprażony w temp. 105°C przez 1 h),
9) alkohol etylowy 96% cz.d.a.,
10) alkohol n-butylowy I-rzęd. cz.d.a.,
11) amoniakalna woda cz.d.a.,
12) chloroform cz.d.a.,
13) antymonu trójchlorek cz.d.a.,
14) żel krzemionkowy do chromatografi cienkowarstwowej f-my Merck (grubość ziaren 10—40 μ),
15) saponina biała f-my Merck (roztwory wzorcowe zawierające w 1 μl — 1 μg saponiny).

*) Odczynniki przedestylowane.

Aparatura i sprzęt

1) płytki do chromatografii o wym. 20 × 20 × 0,5,
2) suszarka elektryczna „Fen",
3) koszyczek z blachy perforowanej o wym. 20,5 × 20,5 × 14,5 cm,
4) komory do chromatografii o wymiarach 24 × 17 × 22 cm z płytą szklaną szczelnie przylegającą,
5) rynienki szklane do chromatografii o dł. 20,5 cm,
6) mikropipety 0,1 cm.

Ekstrakcja saponin z chałwy

Odważano 20 g próby uprzednio rozdrobnionej (utartej) chałwy i odtłuszczano acetonem w aparacie *Soxhletta* przez 6 h. Odtłuszczoną próbę (po odparowaniu acetonu) przenoszono do zlewki poj. 400 cm^3 i zalewano 150 cm^3 70% metanolu. Zlewkę umieszczano w łaźni wodnej w temp. 65°C i ekstrahowano saponiny przez 12 h przy stałym mieszaniu mieszadłem elektrycznym (w czasie ekstrakcji sukcesywnie uzupełniano ilość rozpuszczalnika w zlewce). Następnie odwirowywano ekstrakt przy ok. 3000 obr./min w ciągu 10 min. Otrzymany roztwór dekantowano i sączono przez watę szklaną a pozostały osad przemywano 70% metanolem i wirowano ponownie w takich samych warunkach. Połączone ekstrakty metanolowe odparowywano na łaźni wodnej w temp. 65°C do objętości ok. 100 cm^3. Ewentualne pozostałości substancji tłuszczowych i pigmentów usuwano przez wytrząsanie ekstraktu (1 min) z eterem etylowym w obj. 100 cm^3. Po rozdzieleniu się warstw (ok. 1 h) odrzucano warstwę eterową, a warstwę wodną odparowywano w celu usunięcia resztek eteru i uzupełniano wodą destylowaną do objętości 95 cm^3. Do tak przygotowanego ekstraktu dodawano węglan magnezowy w celu doprowadzenia do pH 7, a następnie 20 g siarczanu amonu i mieszano aż do rozpuszczenia. Roztwór przenoszono ilościowo do rozdzielacza, dodawano 12 cm^3 płynnego fenolu i wytrząsano w czasie 2 min. Po dokładnym rozdzieleniu się warstw (ok. 1 h) odrzucano warstwę wodną (saponiny przeszły do fenolu). Warstwę fenolową rozcieńczano 30 cm^3 alkoholu absolutnego i sączono przez znajdujący się na sączku siarczan sodowy, popłukując sączek 10 cm^3 alkoholu absolutnego. Uzyskany przesącz przenoszono do rozdzielacza i dodawano kolejno 50 cm^3 wody destylowanej i 100 cm^3 eteru etylowego.

Roztwory wytrząsano w ciągu 2 min i pozostawiano w rozdzielaczu na 16 h w celu rozdzielenia się warstw (saponiny przeszły do warstwy wodnej). Warstwę eterową odrzucano a warstwę wodną odparowywano do sucha na łaźni wodnej w temp. 65°C. Pozostałość rozpuszczano w wodzie destylowanej i przenoszono ilościowo do probówki (kolbki miarowej) z korkiem szlif. poj. 10 cm^3.

Chromatografia roztworów saponin

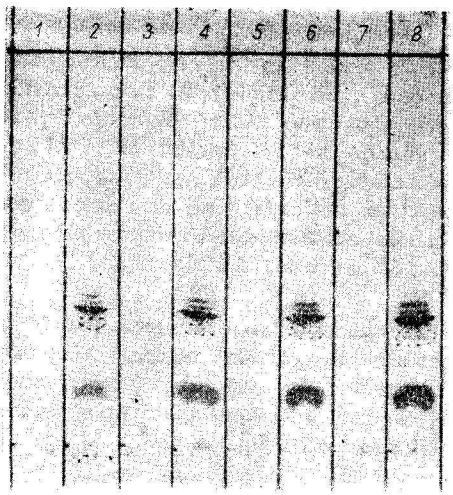
Przygotowanie płytek do chromatografii: 25 g żelu krzemionkowego + 50 cm^3 wody destylowanej wytrząsano w kolbie stożkowej z korkiem szlif. i pokrywano 5 płytek uzyskując grubość warstwy 0,25 mm. Pokryte płytki suszono przez 10 min na powietrzu, a następnie aktywowano przez 30 min w temp. 110°C. Przed nanoszeniem roztworów zaznaczano na płytkach tory o szer. 2 cm (zgodnie z kierunkiem pokrywania płytek).

Rozwijanie chromatogramów: na płytkę w odległości 2 cm od dolnej krawędzi, nanoszono mikropipetą roztwory substancji wzorcowej (10 µl 15 µl, 20 µl, 25 µl) i ekstraktu z chałwy (10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl) stosując podsuszanie powietrzem (Fen). Po wysyceniu komory mieszaniną rozpuszczalników stanowiących fazę roz-

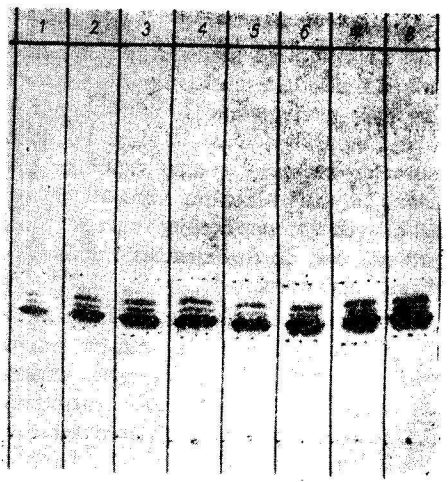
wijającą o następującym składzie: alkohol n-butylowy I-rzęd. — alkohol etylowy — 25% amoniakalna woda (70: 20 : 50), wstawiano płytkę do rynienki, do której uprzednio nalano 20 cm^3 rozpuszczalników fazy rozwijającej i rozwijano chromatogram techniką jednokierunkową, wstępującą do wysokości 150 mm. Czas rozwijania chromatogramów wynosił 3 h. Po wyjęciu płytki z komory, chromatogram suszono przez 10 min ciepłym powietrzem (Fen), a następnie pozostawiano na 20 min w celu odparowania resztek rozpuszczalników. Wysuszoną płytkę spryskiwano roztworem trójchlorku antymonu w chloroformie (25 g $SbCl_3$ + 75 g (50,6 cm^3) chloroformu), ogrzewano w suszarce elektrycznej przez 10 min w temp. 120°C. Na płytce stwierdzano obecność dwóch plam: o różowofioletowym zabarwieniu i wartościach Rf 0,23—0,25, plama saponin z korzenia mydlnicy lekarskiej i o szarym zabarwieniu plama substancji towarzyszącej, pozostająca w punkcie startu. Wywołane chromatogramy oglądano w świetle UV przy długości fali 365 nm. Uzyskiwano fluoryzację plamy saponin pochodzących z korzenia mydlnicy lekarskiej. Plama fluoryzowała w kolorze jasnoróżowym.

W celu sprawdzenia odzyskiwalności metody wykonano oznaczenia w próbach fortyfikowanych, do których wprowadzano 100 mg substancji wzorcowej. Postępowano ściśle wg opisanej metody i uzyskano odsetek odzysku saponin wynoszący ok. 90%. Najmniejsza wykrywalna opisaną metodą ilość saponin wynosi 5 µg.

Niezależnie od wyżej opisanych plam saponin, na chromatogramach stwierdzano obecność dużej plamy o zabarwieniu brunatnym i wartościach Rf 0,09—0,1, oraz pięciu mniejszych plam (ryc. 1).



Ryc. 1.



Ryc. 2.

Ryc. 1. Chromatogram saponin wyizolowany z chałwy. Linią przerywaną zaznaczono plamę saponin z korzenia mydlnicy lekarskiej. Powyżej widoczne są plamy saponin z nasion sezamu. Na torach nieparzystych widoczne są plamy saponiny wzorcowej (White saponin). Nad linią startu — duża plama (Rf 0,09—0,1) pochodząca z zanieczyszczeń produktu.

Ryc. 2. Chromatogram pięciu plam saponin wyizolowanych z odłuszczonych i uprażonych nasion sezamu.

Biorąc pod uwagę chemiczne podobieństwo nasion sezamu do nasion soi, można przypuszczać, że pięć plam układających się powyżej plamy saponin z korzenia mydlnicy pochodzi z saponin prawdopodobnie znajdujących się w nasionach se-

zamu. W celu sprawdzenia powyższego spostrzeżenia, opisaną metodą zbadano odłuszczone i uprażone nasiona sezamu. Na chromatogramie stwierdzono obecność pięciu plam o następującej barwie i wartościach Rf:

1) niebieskiej — Rf 0,38,
2) brunatnofioletowej — Rf 0,37,
3) zielonej — Rf 0,35,
4) brunatnoszarej — Rf 0,33,
5) brunatnoróżowej — Rf 0,31,

przy czym plama o zabarwieniu niebieskim fluoryzowała w świetle UV przy długości fali 365 nm dając barwę różową (cielistą) (ryc. 2).

Wykonując jednocześnie próby jakościowe na obecność saponin, potwierdzono powyższe przypuszczenie.

Opisaną metodą określano ilość saponin w suchym, sproszkowanym korzeniu mydlnicy lekarskiej. Uzyskano średnią wartość wynoszącą 73,55 g/kg, co stanowi 7,36%.

WNIOSKI

1. Opisana metoda umożliwia identyfikację oraz określenie ilości saponin znajdujących się w chałwie, pochodzących z korzenia mydlnicy lekarskiej.
2. Metodę tą można wykorzystać także do określania ilości saponin znajdujących się w korzeniu mydlnicy lekarskiej. Ze względu na różną zawartość saponin należałoby analizować każdą partię korzenia, przeznaczoną do produkcji chałwy.
3. Porównując wielkość oraz natężenie barwy plamy saponin z korzenia mydlnicy lekarskiej oraz plam z nasion sezamu, można wnioskować, że jest ich więcej w nasionach sezamu niż w korzeniu mydlnicy lekarskiej.

Э. Анджеевска

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ САПОНИН В НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Резюме

Разработано полуколичественный метод определения количества сапонин в халве, к которой добавлено водную вытяжку из корня Saponaria officinalis L.

Метод основан на обезжирении пробы ацетоном, экстракции сапонин 70% метанолом, реэкстракции фенолом а также на идентификации и определении количества сапонин техникой тонкослойной проматографии, применяя подвижную фазу в следующим составе: П-бутиловый (бутанол 1) этиловый спирт — 25%-ая аммячная вода (70:20:50).

Самая низкая обнаяуживаемость сапонин составляет 5 мг при рекуперативности 90%.

Определено также количество сапонин в сухом порошкообразным Radix Saponaria officinalis обнаруживая в среднем 7,36%.

Кроме того этим методом исследовано облущиванные и обжаренные сезамовые зерна, в которых по всей вероятности находятся тоже сапонины. Выполняя одновременно характеристические качественные реакции подтверждалось предположение, что сезамовые зерна содержат сапонины.

E. Andrzejewska

A METHOD FOR DETERMINATION OF SAPONINS IN CERTAIN FOOD PRODUCTS

Summary

The author elaborated a semiquantitative method for determination of the amount of saponins in halva since an aqueous extract of *Saponaria officinalis* L root is added to this food.

The method is based on removal of fat from the sample with acetone, extraction of saponins with 70% methanol, re-extraction with phenol and identification and quantitative determination by the method of thin-layer chromatography using the following movable phase: n-butyl primary alcohol — ethyl alcohol — 25% ammonia water (70 : 20 : 50). The lowest detectable amount of saponins was 5 μg with a 90% recovery.

Saponins were determined also quantitatively in dry powdered root of *S. officinalis* and a mean value of 7.36% was found.

Besides that, the method was applied for investigating husked and roasted sesame seeds since it was supposed that they too contain saponins. Characteristic qualitative reactions for saponins were done at the same time confirming the supposition that saponins are present in sesame seeds.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bennet R. D., Heftmann E.:* Thin-layer chromatography of steroidal sapogenins. J. Chromatogr., 1962, 9, 353. — 2. *Birk K., Bondi A., Gestetner B., Ishaaya I.:* A thermostable haemolityc factor in soybeans. Nature, 1963, 197, 1089. — 3. *Bagiński S., Mowszowicz J.:* Krajowe rośliny trujące. PWN, Warszawa, 1963, 42. — 4 *Borkowski B., Pasich B.:* Chromatografia cienkowarstwowa trójterpenoidów. Farm. polska, 1963, 19, 435. — 5. *Borkowski B.:* Zarys farmakognozji. PZWL, Warszawa ,1970, 65, 270. — 6. *Czyszewska S.:* Otrzymywanie saponin z korzeni łyszczca wiechowatego *(Gypsophila paniculata L.)* i mydlnicy lekarskiej *(Saponaria officinalis L.)* Biul. Inst. Rośl. Leczn., 1958, 3, 226. — 7. *Coulson C. B.:* Triterpenoid saponins from lucerne and other species. J. Sci. Fd Agric. 1958, 9, 281. — *Dadlez J., Kubikowski D.:* Farmakologia i toksykologia leków. PZWL, Warszawa, 1970, 19, 388, 591. — 9. *Hanzas P. C., Barr W. W.:* Millipore-antimony pentachloride colorimetric method for rapid determination of saponin in refined beet sugar. J. Am. Soc. Sug. Beet Technol., 1969, 15, 495. — 10. *Kashman J., Bergmann E. D.:* Thin-layer chromatography of tetra — and pentacyclic triterpenes. J. Chromatogr., 1964, 14, 275.

11. *Kirkor D.:* Saponiny i ich chromatografia. Biul. Inst. Leków, 1970, 2, 235. — 12. *Krauze S.:* Bromatologia, PZWL, Warszawa, 1967, 214. — 13. *Krauze S., Bożyk Z., Piekarski L.:* Podręcznik laboratoryjny analityka żywnościowego, PZWL, Warszawa, 1962, 576. — 14. *Leach A. E.:* Food inspection and analysis. John Wiley § Sons, Inc., New York, 1941, 1014. — 15. *Rumińska A.:* Rośliny lecznicze, PWN, Warszawa, 1973, 29. — 16. *Shany S., Birk Y., Gestetner B., Bondi A.:* Preparation, characterisation and some properties of saponins from lucerne tops and roots. J. Sci. Fd Agric., 1970, 21, 131. — 17. *Szymczyk F.:* Analiza toksykologiczna, PZWL, Warszawa, 1959, 267, 270. — 18. *Stahl E.:* Thin-layer chromatography, a laboratory handbook, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1969, 346, 857.
— 19. *Wolf W. J., Thomson B. W.:* Thin layer and anion exchange chromatography of soybean saponins. J. Am. Oil Chem. Soc., 1970, 47, 86. — 20. *Wyczański S.:* Technologia cukiernictwa. WPLS, Warszawa, 1965, III, 25.

Dn. 15 II 1974 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.