

УДК 547.91

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМОФОРОВ ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© *Н.В. Мироненко^{1*}, И.В. Шкутина², А.С. Калмыкова¹, В.Ф. Селеменев¹*

¹ Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394006 (Россия), e-mail: natashamir@yandex.ru

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, ул. Литовская, 2, Санкт-Петербург, 194100 (Россия)

Проведен подробный анализ спектров поглощения моно- и бидесмозидных тритерпеновых гликозидов. Высказано предположение об отнесении максимума в области 198–208 нм к поглощению двойной связи в циклогексеновом кольце агликона. Второй менее выраженный максимум при длине волны 280 нм наблюдается в спектре сапонина *Quillaja Saponaria* и практически полностью отсутствует в спектре сапонина *Mukorossi Sapindus*. Идентификация данного максимума крайне затруднительна, поскольку его наличие может быть обусловлено как альдегидной группой в составе агликона, так и гидроксильными и карбоксильными группами в молекулах углеводов.

С использованием метода дифференциальной спектrophотометрии предложен и обоснован способ разложения УФ-спектра сапонинов на составляющие компоненты. Проведен спектральный анализ, включающий отнесение полос поглощения к функциональным группам исследованных соединений. Рассмотрена возможность оценки изменения спектральных свойств растворов гликозидов при изменении кислотности среды. Установлена возможность bathochромного смещения максимума поглощения агликоновой части сапонина в зависимости от микроокружения (структуры углеводной части) и изменения pH раствора. Показано, что полосы при 274, 280.5 нм соответствуют n-π* переходам карбонильных и карбоксильных групп и определяются только в областях больших концентраций в растворах сапонина *Quillaja Saponaria*. На основании полученных результатов предложены градуировочные модели количественного определения сапонинов в растворах. Проведен регрессионный анализ градуировочных уравнений, рассчитаны основные статистические показатели.

Ключевые слова: сапонин, дифференциальная спектrophотометрия, агликон, карбонильная группа, регрессионный анализ.

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.

Введение

Мироненко Наталья Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры естественнонаучных дисциплин, ассистент кафедры аналитической химии, e-mail: natashamir@yandex.ru

Шкутина Ирина Викторовна – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры общей и медицинской химии им. проф. В.В. Хорунжего, e-mail: irn55@mail.ru

Калмыкова Анастасия Сергеевна – студент, e-mail: natashamir@yandex.ru

Селеменев Владимир Федорович – доктор химических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии, e-mail: natashamir@yandex.ru

Органические вещества растительного происхождения – гликозиды пентациклического ряда, обладающие широкой палитрой биологической активности, вызывают значительный интерес исследователей с медицинской точки зрения [1–3]. Наряду с затруднениями в разработке унифицированных схем их получения из исходного сырья, одной из не менее важных проблем является вопрос их идентификации и количественного определе-

* Автор, с которым следует вести переписку.

ния. В ряде публикаций последних лет обсуждаются возможности определения структуры сапонинов методом ЯМР-спектроскопии, использование которого в рутинных анализах крайне затруднительно и экономически невыгодно. Метод ВЭЖХ, наиболее часто применяемый при количественном определении сапонинов разных групп, выделенных из растительного сырья, требует тщательной пробоподготовки (многократной очистки экстракционными и сорбционными методами) и индивидуальной отработки условий элюирования гликозидов в зависимости от их структуры и молекулярной массы (полярности). Метод УФ-спектрофотометрии (прямой и дифференциальной) давно зарекомендовал себя как базовый при определении подавляющего большинства органических соединений в растворе. Возможности метода, как и способы его реализации, достаточно широки – от прямого определения (с использованием растворов стандартных образцов, агликонов гликозидов) [4] до метода дифференциальной спектрометрии. Перспективы применения спектрального анализа в настоящее время значительно возросли: в химии биомакромолекул УФ-спектроскопия используется при анализе структурных и функциональных свойств органических веществ. В ряде работ, особенно последнего десятилетия, показана принципиальная возможность исследования вклада хромофорных групп белков в общий спектр поглощения [5, 6]. Изучение изменений спектральных характеристик позволило провести анализ конформационных состояний белковой глобулы, основу которых составляют слабые специфические и неспецифические внутримолекулярные взаимодействия. В ряде случаев такие изменения структур сопровождаются процессами ассоциации и самосборки надмолекулярных систем, что обеспечивает правильность (порядок) сборки и возможность регуляции этого процесса [7]. В связи с этим интерес представляет рассмотрение пространственной ориентации молекул поверхностно-активных веществ гликозидной структуры. Исследование спектральных характеристик молекул сапонинов на основе вклада хромофорных групп в общий спектр поглощения позволит не только решить проблему аналитического аспекта – обоснованно разрабатывать и применять методики спектрального анализа, но и сделать попытку изучения механизма взаимодействий, протекающих в растворе и на границе фаз, в частности, явлений ассоциации, комплексообразования с другими соединениями [8–10].

Экспериментальная часть

При приготовлении растворов для исследования брали навески 10–500 мг сапонины на аналитических весах (с точностью ± 0.0002 г), растворяли в мерных колбах объемом 50.0 мл. Оптическую плотность приготовленных серий водных растворов тритерпенового сапонины с концентрациями 0.2–10.0 мг/мл измеряли через 2 ч после их приготовления. Измерения проводили в растворах с различным значением показателя кислотности среды pH. Предварительно pH-метр калибровали в соответствии с инструкциями изготовителя, используя два стандартных буферных раствора (pH=3.56 и 6.86) при температуре 25 ± 1 °C. После калибровки прибора электроды промывали водой, а затем исследуемым раствором сапонины.

Спектры поглощения растворов в диапазоне 190–350 нм регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 (PC), Япония, спектральная ширина щели – 0.5 нм, шаг сканирования – 0.5 нм, скорость сканирования соответствовала режиму Slow. Измерения проводили в стандартной кварцевой кювете с оптической длиной пути 10 мм. Увеличение разрешения в спектрах поглощения достигалось вычислением первой и второй производной методом скользящего среднего (среднее арифметическое значений оптической плотности на установленном диапазоне). Необходимые расчеты выполнены с помощью программных средств Microsoft Excel.

Обсуждение результатов

Объектами исследования являлись образцы тритерпеновых сапонинов: *Quillaja Saponaria*, выделенных из мыльного дерева, производства США (Acros Organics), и *Sapindus Mukorossi*, различающиеся по природе функциональных групп, молекулярной массе, количеству и структуре углеводных цепочек. Структурные формулы сапонинов приведены на рисунке 1.

В таблице 1 указаны некоторые физико-химические характеристики изучаемых гликозидов.

В состав углеводной цепочки сапонины *Quillaja* входит глюкуроновая кислота (pK=3.18), карбоксильная группа которой может находиться в растворе в зависимости от pH среды в молекулярной и диссоциированной форме (рис. 2).

В литературных источниках встречаются противоречивые данные о способах количественного определения гликозидов различной полярности в растительных фракциях спектральными методами [1, 2, 12, 13].

Одной из причин возникающих затруднений может быть схожесть спектров поглощения этих соединений, в частности, представленных на рисунке 3. Известно, что ряд веществ группы β -амирина (содержащих в составе агликона конденсированную систему циклогексановых колец) имеют максимум поглощения на границе рабочего диапазона большинства используемых спектрофотометров (в области 190 и менее нм). Но представленная в [12, 13] возможность его батохромного смещения, а также проведенный с учетом литературных данных подробный анализ спектральных характеристик сапонинов и их агликонов, позволили отнести локальный максимум к поглощению двойной связи в циклогексановом кольце агликона молекулы гликозида [14–16]. При этом в случае поглощения бидесмосида, сапонины *Quillaja Saponaria*, максимум приходится на область 198–208 нм, а максимум сапонины с одной углеводной цепочкой – *Mukorossi* (мондесмосида) сдвинут в коротковолновую область, за пределы диапазона рабочих длин волн (рис. 3 и 4). Можно предположить, что индуцирование батохромного сдвига данного локального максимума, а также величина его молярного коэффициента поглощения зависят от возникающих эффектов сопряжения в молекуле, структурно определяемых числом и строением углеводных остатков, наличием и типом функциональных групп-заместителей в циклической системе агликона [14–16].

Таким образом, наличие и структура углеводных остатков, а также их расположение в структуре молекулы (наличие эффекта сопряжения) могут являться критерием принципиальной возможности определения сильно полярных высокомолекулярных структур сапонинов в водных растворах и спиртовых извлечениях из растительного сырья методом прямой спектрофотометрии [4, 12].

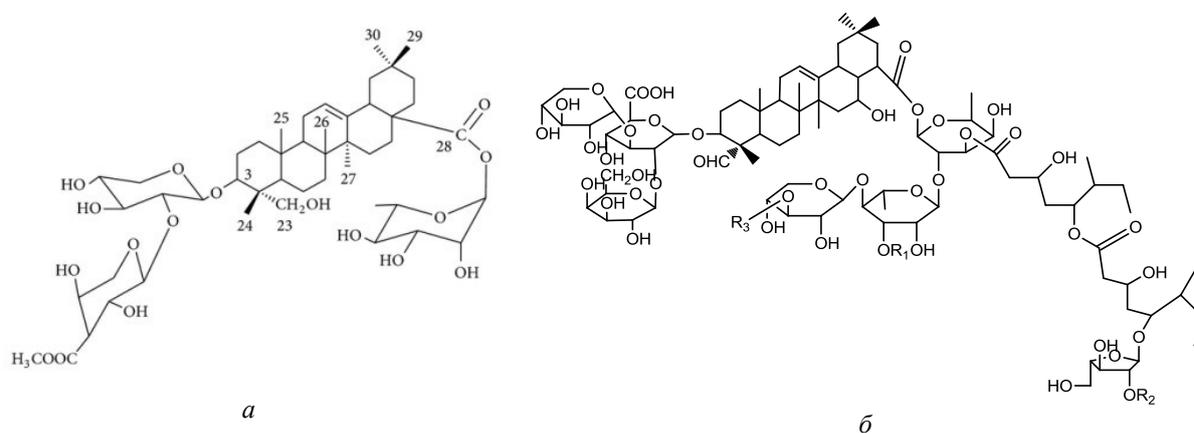


Рис. 1. Структурные формулы сапонинов: а – *Sapindus Mukorossi*, б – *Quillaja Saponin*

Таблица 1. Характеристики сапонинов *Quillaja* и *Mukorossi* [1, 2]

Характеристики	<i>Quillaja Saponaria</i>	<i>Mukorossi Sapindus</i>
Молекулярная масса, г/моль	2321	1081
pH водных растворов	4.5	4.4
Растворимость, мг/мл H ₂ O	40	30
Структура углеводных цепочек	бидесмосид	мондесмосид
Критическая концентрация мицеллообразования, ммоль/л (литературные данные, экспериментальные данные указаны в скобках [11])	0.22 (0.20–0.30)	0.22–0.30 (0.50–0.83)

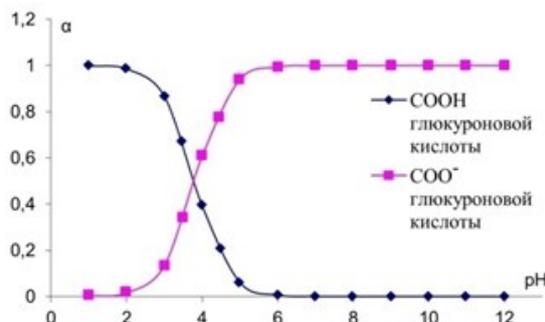


Рис. 2. Диаграмма состояния сапонины

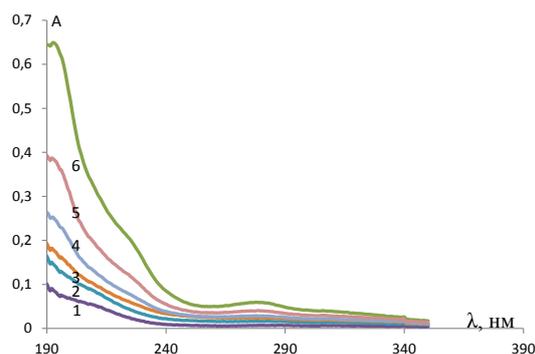


Рис. 3. УФ-спектры поглощения *Quillaja Saponaria* (концентрация сапонина – 1 – 0.05 мг/мл, 2 – 0.1 мг/мл, 3 – 0.15 мг/мл, 4 – 0.2 мг/мл, 5 – 0.3 мг/мл, 6 – 1 мг/мл)

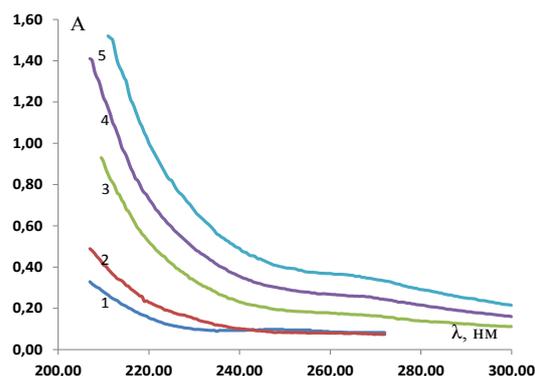


Рис. 4. УФ-спектр сапонина *Sapindus Mukorossi* (концентрация сапонина – 1 – 0.2 мг/мл, 2 – 0.4 мг/мл, 3 – 1 мг/мл, 4 – 1.5 мг/мл, 5 – 2 мг/мл)

Установлено, что градуировочные модели (уравнения) для каждого вида сапонинов строго индивидуальны. На чувствительность методики и ее систематическую погрешность влияет однородность структур состава сапонинной фракции, его чистота (наличие примесных продуктов), а также молекулярное строение исследуемых веществ.

Второй менее выраженный максимум ($\epsilon=1800$ моль/л·см⁻¹) при длине волны 280 нм наблюдается в спектре сапонина *Quillaja Saponaria* и практически полностью отсутствует в спектре сапонина *Mukorossi Sapindus* (рис. 3 и 4). Идентификация данного максимума крайне затруднительна, поскольку его наличие может быть обусловлено как альдегидной группой в составе агликона [15, 16], так и гидроксильными и карбоксильными группами в молекулах углеводов. Более вероятно формирование суперпозиции полос поглощения нескольких хромофоров функциональных групп в структурах гликозидов [5].

Одним из возможных способов идентификации полос поглощения макромолекул является их разложение на составляющие компоненты и проведение исследования их спектральных характеристик [5, 6]. Такая попытка была предпринята в работе [12], посвященной сапонинам – производным олеаноловой кислоты. В ней не указывается влияние углеводных компонентов молекул на спектр поглощения и на количественное определение сапонинов в растворе. Однако с учетом поверхностной активности сапонинов, обусловленной процессами ассоциации в растворах, возможно получение результатов, отличных от аддитивных спектральных характеристик сапогениновой и углеводных частей вследствие нарушения системы меж- и внутримолекулярных взаимодействий.

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 приведены дифференциальные спектры поглощения сапонина *Quillaja Saponaria*.

Поскольку спектр сапонина состоит из вкладов отдельных хромофоров, его дифференциальный спектр достаточно сложен для анализа. Кроме гетерогенности, создаваемой различного вида хромофорными группами, в молекуле сапонина возникает гетерогенность вследствие вклада одинаковых хромофорных групп, находящихся в различном структурном состоянии и имеющих по-разному смещенные спектры поглощения.

Анализ второй производной спектров поглощения сапонинов *Quillaja* (рис. 4) и *Mukorossi*, представленных в таблице 2, позволил обнаружить три плохо разрешенные полосы поглощения в области длин волн 190–205 нм. Помимо максимума 196.0 нм, присутствующего в основном спектре, выявлен меньший по интенсивности, плохо разрешенный максимум при $\lambda=193.0$ нм и максимум при $\lambda=205.0$ нм. Известно, что с увеличением числа конденсированных колец, образующих делокализованную систему π -электронов, происходит длинноволновое смещение спектров, соответствующих этим переходам. Появление алкильного заместителя в цикле приводит к сдвигу спектра поглощения в направлении больших длин волн и возрастанию

его интенсивности (в результате смещения электронной плотности вдоль оси связи при действии индуктивного и резонансного механизмов). Судя по полученным результатам, чем более разветвленная структура заместителей в молекуле гликозида, тем сильнее выражен bathochromный эффект. В спектрах сапонина *Mukorossi* кривая спектра в этой области ниспадающая, и максимум сминут влево (рис. 4). Из [15–17] известно, что карбонильная группа поглощает в двух областях: при $\lambda=190$ и $\lambda=274\text{--}280$ нм с меньшей энергией перехода. Таким образом, в спектре сапонина максимумы при 193.0, 196.0 нм отвечают за поглощение карбонильных (карбоксильных) групп и двойной связи в цикле агликона (сапогенина). Полоса поглощения при $\lambda=205.0$ нм, судя по данным литературы, может быть отнесена к поглощению эфиров жирных кислот (дигидроксиметилоткановой кислоты в молекуле бидесмозида). В общем спектре наблюдается один суммарный максимум (рис. 3), определение по которому сапонинов в пересчете на агликон некорректно в случае наличия карбонильных (и карбоксильных) групп в структурах углеводов.

Дифференциальные максимумы при 274.0, 280.5 нм обусловлены поглощением карбонильных и карбоксильных групп в молекуле сапонинов *Quillaja*. Можно предположить, что в спектре бидесмозида (гликозида *Quillaja*) количество групп и их взаимное влияние (за счет внутримолекулярных водородных связей) настолько велико, что приводит к выраженному максимуму в недифференцированном спектре. Полосы при 274, 280.5 нм соответствуют $n\text{--}\pi^*$ переходам и определяются только в областях больших концентраций [12–14]. Увеличение интенсивности полос поглощения (при концентрации 0.8 мг/мл и более, рис. 5) также может быть связано с образованием внутримолекулярных водородных связей при формировании ассоциатов (мицелл) в водном растворе [11, 18–20].

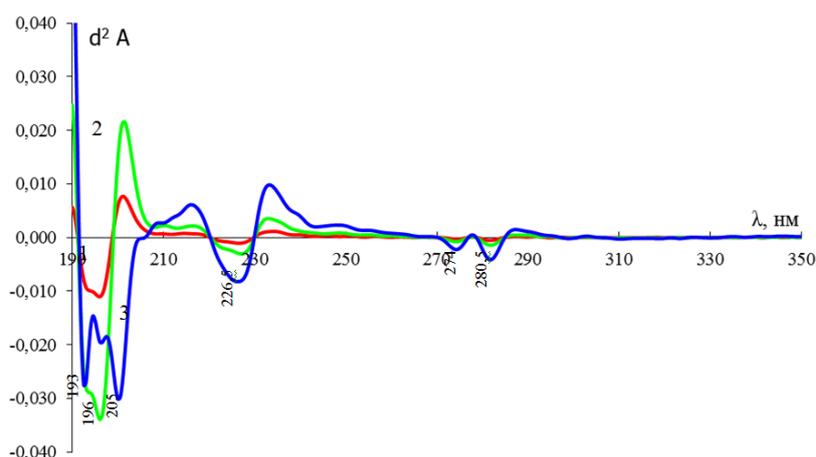


Рис. 5. Дифференциальный спектр сапонина *Quillaja Saponaria*, $C=1.0$ мг/мл (1), $C=0.4$ мг/мл (2), $C=0.8$ мг/мл (3)

Таблица 2. Положение и идентификация некоторых пиков в дифференцированных по второй производной спектрах поглощения хромофоров гликозидных соединений (QS-*Quillaja Saponaria*, SM-*Sapundus Mukorossi*)

Длина волны, нм d^2A	Коэффициент экстинкции, моль/л·см ⁻¹	Отнесение полосы ($n\text{--}\pi^*$, $\pi\text{--}\pi^*$ переходы)
193.0(QS)	3092	двойная связь в циклических системах; карбонильная, карбоксильная группы; жирные кислоты, эфиры жирных кислот
196.0(QS)	2930	
200.5(QS)	2119	
226.5(QS)	805	сопряженные карбонильные и/или карбоксильные группы (сумма слабых по интенсивности полос поглощения), сложноэфирные связи (в том числе гликозидные)
226.5(SM)	1217	
233.5(SM)	985	
234.5(SM)	956	
239.0(SM)	837	
248.5(SM)	678	поглощение карбоксильных (в структуре квиллайевой кислоты) и карбонильных групп (в цикле агликона)
256.0(SM)	635	
274.0(QS)	265	
280.5(QS)	267	

Дифференциальный максимум при 226.5 нм, наблюдаемый в спектрах сапонина *Quillaja Mukorossi* (табл. 2), обусловлен наличием сопряженных групп С=О в углеводной цепочке молекулы сапонина. Известно, что сопряженные карбонильные группы (в жирных кислотах) определяются батохромным сдвигом полосы $\pi\text{-}\pi^*$ (от 180 до 193–196 нм) и гипсохромным сдвигом $n\text{-}\pi$ перехода – от 279 до 226.5 нм (т.е. сближению полос поглощения в спектре). Максимумы поглощения при 233.5 нм, 234.5 нм, 239.0 нм выражены слабо и могут представлять собой суперпозицию полос, отнесенных к поглощению карбонильных и карбоксильных групп в свободном и сопряженном состоянии.

Для соединений, имеющих в структуре молекул гетероатомы, связанные кратной связью, возможно появление батохромных и гипсохромных, а также гипер- и гипохромных эффектов при изменении рН среды. Полученные спектры, приведенные на рисунке 6, позволили выявить ряд изменений, происходящих в растворе сапонинов при изменении кислотности среды.

Известно, что для полос поглощения, соответствующих карбоксильным группам, длинноволновый сдвиг в УФ-области свидетельствует об уменьшении диссоциации, коротковолновый – об ее увеличении [16]. На рисунке 6 видно, что при уменьшении кислотности среды раствора на кривых при $\lambda = 196$ нм наблюдаются одновременно два эффекта – гипсохромный и гиперхромный, косвенно подтверждающие отнесение этого экстремума к поглощению карбоксильных групп (глюкуроновой кислоты). Максимум поглощения при 280.5 нм в диапазоне рН = 1.3–4.7 остается неизменным, однако при дальнейшем увеличении рН раствора наблюдается аналогичный вышеуказанному эффект, позволяющий также отнести его к запрещенным $n\rightarrow\pi$ переходам карбоксильных групп в структуре гликозидов.

Максимум при 226.5 нм (в виде плеча), относящийся к поглощению карбонильных и карбоксильных групп (сопряженные), при подкислении среды батохромно смещается. Однако при увеличении рН за счет гиперхромного эффекта ближайшего (при 196 нм) экстремума возникает суперпозиция (наложение) полос, и их эффективное разрешение возможно только при дифференцировании спектров (кривые 1 и 2). Причиной возникающих изменений может быть блокировка неподеленной пары электронов кислорода за счет протонирования в кислой среде [5, 6].

Таким образом, анализ спектральных характеристик гликозидных соединений при различных значениях рН растворов позволяет не только уточнить наличие тех или иных функциональных групп, но также оценить целесообразность использования локальных максимумов для построения градуировочных кривых при количественном определении в растворах.

Уточненные длины волн в дифференцированных спектрах поглощения позволили применить их в качестве аналитических при разработке методик количественного определения сапонинов в водных растворах. Два разделенных максимума поглощения сапонина *Quillaja* дают возможность применять их для количественного определения. Максимум в области 264 нм в дифференцированном спектре сапонинов *Mukorossi* (табл. 2) был использован для построения градуировочной кривой.

В таблице 3 приведены уравнения градуировочных графиков и основные метрологические параметры полученных кривых.

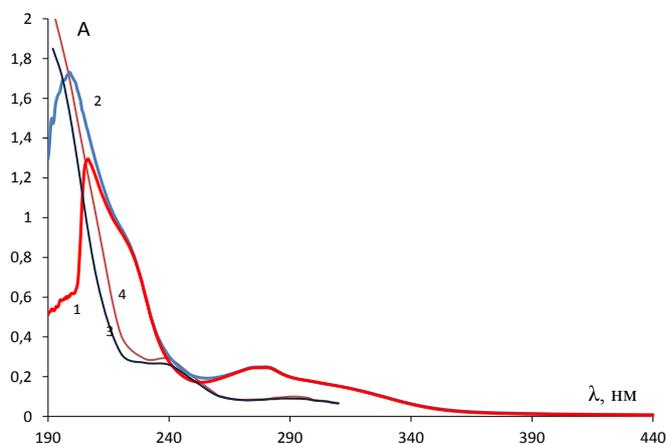


Рис. 6. УФ-спектры поглощения сапонина при значениях рН: 1 – рН=1.30; 2 – рН=4.71; 3 – рН=9.65; 4 – рН=12.85

Таблица 3. Метрологические параметры градуировочных кривых

Параметры моделей	<i>Quillaja Saponaria</i>	<i>Sapindus Mukorossi</i>
Уравнение градуировки	$\lambda=193.0$ нм $D=29.55C+0.02$ $\lambda=274.5$ нм $D=2.08C+0.11$	– $\lambda=264.5$ нм $D=0.43C+0.04$
Коэффициент корреляции	$\lambda=193.0$ нм $R^2=0.94$ $\lambda=274.5$ нм $R^2=0.96$	– $\lambda=264.5$ нм $R^2=0.99$
Относительная ошибка анализа, %	$\lambda=193.0$ нм $\varepsilon=5.3$ $\lambda=274.5$ нм $\varepsilon=7.5$	– $\lambda=264.5$ нм $\varepsilon=5.5$
Рабочий диапазон концентраций сапонинов, мг/мл	$\lambda=193.0$ нм $C=0.007-0.05$ $\lambda=274.5$ нм $C=0.04-0.7$	– $\lambda=264.5$ нм $C=0.1-2.5$
Предел обнаружения, мг/мл	$\lambda=193.0$ нм $C=0.0017$ $\lambda=274.5$ нм $C=0.0063$	– $\lambda=264.5$ нм $C=0.01$

Из таблицы 3 следует, что коэффициент чувствительности имеет высокие значения в уравнении градуировки сапонины *Quillaja* с разветвленной структурой. Меньшее его значение было установлено в работах [12, 13] для гликозидов – производных олеаноловой кислоты, имеющих в структуре одну углеводную цепочку. Возможно, гликозиды – бидесмозиды могут иметь несколько максимумов поглощения в спектре с различными значениями коэффициентов чувствительности в зависимости от их структурных характеристик.

Был проведен регрессионный анализ полученной градуировочной зависимости. 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 $y(D)$ по следующей формуле:

$$S_y = \sqrt{\frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2} = \sqrt{\frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^N (y_i - (ac_i))^2} \quad (1)$$

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

Приложение принципа распространения погрешностей позволило оценить влияние дисперсии значений D (y) на величины a и b и рассчитать их дисперсии $S_{a,b}$ и доверительные интервалы $\Delta a, b$ по следующим формулам:

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

$$S_a^2 = \frac{S_y^2 \sum X_i^2}{m \sum (X_i - \bar{X})^2}, \Delta a = \pm(P, f) S_a \quad (3)$$

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

$$\left. \begin{aligned} t_a &= \frac{|a|}{S_a} \\ t_b &= \frac{|b|}{S_b} \end{aligned} \right\} \leq t(P, f = m - 1) \quad (4)$$

Пределы количественного определения рассчитывали по формуле

$$X_{\min} = \frac{2t(P, f) \bar{X} S_y / \sqrt{n}}{Y - a + t(P, f) S_y / \sqrt{n}} \quad (5)$$

Значения регрессионных параметров градуировочных кривых приведены в таблице 4.

По результатам расчетов коэффициент a не значим в уравнении 1, следовательно, инструментальные и экспериментальные шумы, равно как и другие случайные влияния, не вносят ощутимого эффекта в сигнал.

Таблица 4. 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.
$y=29.55x+0.02$	2.5	6.20	1.5	1.59	0.040	0.9	47.7	2.57
$y=2.08x+0.11$	1.0	0.18	0.4	0.04	0.009	2.3	113.5	2.23
$y=0.43x+0.04$	0.39	0.9	0.1	0.04	0.05	3.6	47.8	4.30

S_y – остаточное стандартное отклонение, $S_{a,b}$ – дисперсии, Δa и Δb – доверительные интервалы, t_a и t_b – критерии Стьюдента.

Отсутствие систематической погрешности, низкая ошибка анализа (5.3 и 7.5%), высокий коэффициент корреляции градуировочных кривых подтверждают высокую точность и правильность полученных результатов.

Выводы

В настоящей работе установлена возможность определения сапонинов на границе вакуумной ультрафиолетовой области, хотя большинство современных спектрофотометров в ней имеют высокую шумовую компоненту и требуют тщательной подготовки образцов растворов и проведения холостых экспериментов. Также полученные результаты могут выступать в качестве реперных точек для дальнейших экспериментальных исследований по разработке условий батохромного смещения данного экстремума и его последующего практического применения. Исследования показали, что относительная ошибка при расчете по градуировке (2) несколько выше (8.1%). Однако при концентрации сапонинов свыше 0.1 мг/мл целесообразно измерять оптическую плотность при $\lambda=274.5$ нм и применять градуировку (2), поскольку разбавление растворов до рабочих концентраций градуировки (1) существенно увеличит относительную ошибку анализа (с учетом разбавления – 9%). Полученные результаты могут быть использованы при контроле содержания гликозидов во фракциях, выделенных из растительного сырья.

Список литературы

1. Cao G.-D., Lou H.-X., Hu Q., Chen Y.-Y., Jiao Q.-Y., Khan A., Li F., Han D.-F. Triterpenoid Saponins from the pulp of *Sapindus Mukorossi* and their antifungal activities // *Phytochemistry*. 2018. Vol. 147. Pp. 1–8. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.12.004.
2. Guclu-Ustundag O., Mazza G., Balsevich J. Saponins: properties, applications and processing // *Critical reviews in food science and nutrition*. 2007. Vol. 47. Pp. 231–258. DOI: 10.1080/10408390600698197.
3. Diddi S., Maitra S. Studies on the ability of aqueous extract of *Sapindus Mukorossi* to solubilize polyaromatic hydrocarbons and complex hydrocarbon mixtures // *Applied Environmental Science*. 2017. Vol. 12. N7. Pp. 1387–1399.
4. Патент №2413951 (РФ). Способ определения тритерпеновых сапонинов в растительном сырье и лекарственных препаратах / Н.В. Мироненко, Т.А. Брежнева, В.Ф. Селеменев. – 2011.
5. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Рубан М.К. Анализ вклада хромофоров боковых групп аминокислот в спектр поглощения гемоглобина // *Журнал прикладной спектроскопии*. 2013. Т. 80. №6. С. 907–913.
6. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г. Разложение УФ-спектра поглощения гемоглобина на спектры поглощения протетических групп и апобелка с помощью аддитивной модели // *Биофизика*. 2015. Т. 60. №2. С. 253–261.
7. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. М., 1974. 268 с.
8. Мироненко Н.В., Селеменев В.Ф. Сорбционные взаимодействия в системе ПАВ-тритерпеновый сапонин-активированный уголь // *Журнал физической химии*. 2018. Т. 92. №11. С. 1765–1770. DOI: 10.1134/s0044453718110274.
9. Мироненко Н.В., Брежнева Т.А., Бутырская Е.В., Селеменев В.Ф. Квантовохимический подход к обоснованию механизма сорбции тритерпенового сапониона высокоосновным анионообменником АВ-17-2П в хлороформе // *Журнал общей химии*. 2012. Т. 82. №9. С. 1505–1510.
10. Шкутина И.В., Мироненко Н.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф. Кинетические особенности сорбции соединений гликозидной и пептидной структуры на сверхшитом сорбенте MN-200 // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2015. Т. 15. №6. С. 850–858.
11. Мироненко Н.В., Брежнева Т.А., Пояркова Т.Н., Селеменев В.Ф. Определение некоторых поверхностно-активных характеристик растворов тритерпеновых сапонинов – производных олеановой кислоты // *Химико-фармацевтический журнал*. 2010. Т. 44. №3. С. 49–50.
12. Мироненко Н.В., Брежнева Т.А., Селеменев В.Ф. УФ-спектрофотометрическое определение тритерпеновых сапонинов – производных олеаноловой кислоты // *Химия растительного сырья*. 2011. №3. С. 153–157.
13. Мироненко Н.В., Брежнева Т.А., Михина И.А., Селеменев В.Ф. Сравнительный анализ методик количественного определения тритерпеновых сапонинов – производных олеаноловой кислоты // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2009. Т. 75. №5. С. 19–23.
14. Браун Д., Флорид А., Сейнзбери М. Спектроскопия органических веществ. М., 1992. 300 с.

15. Казицина Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектрологии в органической химии. М., 1979. 236 с.
16. Анисимова Н.А. Идентификация органических соединений: учебное пособие. Горно-Алтайск, 2009. 95 с.
17. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев, 1981. 208 с.
18. Ламри Р., Билтонен Р. Структура и стабильность биологических макромолекул. М., 1973. 584 с.
19. Бахшиев Н.Г. Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий. Л., 1972. 263 с.
20. Balakrishnan S., Varughese S., Deshpande A.P. Micellar characterisation of saponin from *sapindus mukorossi* // *Ten-side Surfactants Detergents*. 2006. Vol. 43. N5. Pp. 262–268. DOI: 10.3139/113.100315.

Поступила в редакцию 3 марта 2021 г.

После переработки 26 мая 2021 г.

Принята к публикации 30 мая 2021 г.

Для цитирования: Мироненко Н.В., Шкутина И.В., Калмыкова А.С., Селеменев В.Ф. Исследование возможности применения метода дифференциальной спектрофотометрии для анализа перекрывающихся полос поглощения хромофоров тритерпеновых сапонинов и их количественного определения в водных растворах // *Химия растительного сырья*. 2021. №4. С. 267–276. DOI: 10.14258/jcrpm.2021049268.

Mironenko N.V.^{1*}, *Shkutina I.V.*², *Kalmykova A.S.*¹, *Selemenev V.F.*¹ INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF USING THE METHOD OF DIFFERENTIAL SPECTROPHOTOMETRY FOR THE ANALYSIS OF OVERLAPPING ABSORPTION BANDS OF TRITERPENE SAPONINS CHROMOPHORES AND THEIR QUANTITATIVE DETERMINATION IN AQUEOUS SOLUTIONS

¹ Voronezh State University, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394006 (Russia), e-mail: natashamir@yandex.ru

² Saint Petersburg State Pediatric Medical University, ul. Litovskaya, 2, St. Petersburg, 194100 (Russia)

A detailed analysis of the absorption spectra of mono- and bidesmoside triterpene glycosides was performed. It is suggested that the maximum in the region of 198–208 nm is attributed to the absorption of the double bond in the cyclohexene ring of the aglycone. The second less seen maximum at a wavelength of 280 nm is observed in the spectrum of saponin *Quillaja Saponaria* and is almost completely absent in the spectrum of saponin *Mukorossi Sapindus*. Identification of this maximum is extremely difficult, since its presence can be due to both the aldehyde group in the aglycone and the hydroxyl and carboxyl groups in the carbohydrate molecules.

Using the method of differential spectrophotometry, a method for decomposing the UV spectrum of saponins into its constituent components is proposed and justified. A spectral analysis was performed, including the assignment of the absorption bands to the functional groups of the studied compounds. The possibility of estimating changes in the spectral properties of glycoside solutions with changes in the acidity of the medium is considered. The possibility of a bathochromic shift of the maximum absorption of the aglyconic part of saponin depending on the microenvironment (the structure of the carbohydrate part) and changes in the pH of the solution is established. It is shown that the bands at 274, 280.5 nm correspond to $n-\pi^*$ transitions of carbonyl and carboxyl groups and are determined only in the regions of high concentrations in *Quillaja Saponaria* saponin solutions. Based on the results obtained, calibration models for the quantitative determination of saponins in solutions are proposed. The regression analysis of the calibration equations is carried out, the main statistical indicators are calculated.

Keywords: saponin, differential spectrophotometry, aglycone, carbonyl group, regression analysis.

* Corresponding author.

Referenses

1. Cao G.-D., Lou H.-X., Hu Q., Chen Y.-Y., Jiao Q.-Y., Khan A., Li F., Han D.-F. *Phytochemistry*, 2018, vol. 147, pp. 1–8. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.12.004.
2. Guclu-Ustundag O., Mazza G., Balsevich J. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2007, vol. 47, pp. 231–258. DOI: 10.1080/10408390600698197.
3. Diddi S., Maitra S. *Applied Environmental Science*, 2017, vol. 12, no. 7, pp. 1387–1399.
4. Patent 2413951 (RU). 2011. (in Russ.).
5. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. *Zhurnal prikladnoy spektroskopii*, 2013, vol. 80, no. 6, pp. 907–913. (in Russ.).
6. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Artyukhov V.G. *Biofizika*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 253–261. (in Russ.).
7. Izmaylova V.N., Rebinder P.A. *Strukturoobrazovaniye v belkovykh sistemakh*. [Structure formation in protein systems]. Moscow, 1974, 268 p. (in Russ.).
8. Mironenko N.V., Selemenov V.F. *Zhurnal fizicheskoy khimii*, 2018, vol. 92, no. 11, pp. 1765–1770. DOI: 10.1134/s0044453718110274. (in Russ.).
9. Mironenko N.V., Brezhneva T.A., Butyrskaya Ye.V., Selemenov V.F. *Zhurnal obshchey khimii*, 2012, vol. 82, no. 9, pp. 1505–1510. (in Russ.).
10. Shkutina I.V., Mironenko N.V., Stoyanova O.F., Selemenov V.F. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*, 2015, vol. 15, no. 6, pp. 850–858. (in Russ.).
11. Mironenko N.V., Brezhneva T.A., Poyarkova T.N., Selemenov V.F. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2010, vol. 44, no. 3, pp. 49–50. (in Russ.).
12. Mironenko N.V., Brezhneva T.A., Selemenov V.F. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2011, no. 3, pp. 153–157. (in Russ.).
13. Mironenko N.V., Brezhneva T.A., Mikhina I.A., Selemenov V.F. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov*, 2009, vol. 75, no. 5, pp. 19–23. (in Russ.).
14. Braun D., Floyd A., Seynzberi M. *Spektroskopiya organicheskikh veshchestv*. [Spectroscopy of organic substances]. Moscow, 1992, 300 p. (in Russ.).
15. Kazitsina L.A., Kupletskaya N.B. *Primeneniye UF-, IK-, YaMR- i mass-spektroskopii v organicheskoy khimii*. [Application of UV, IR, NMR and mass spectroscopy in organic chemistry]. Moscow, 1979, 236 p. (in Russ.).
16. Anisimova N.A. *Identifikatsiya organicheskikh soyedineniy: uchebnoye posobiye*. [Identification of organic compounds: a tutorial]. Gorno-Altaysk, 2009, 95 p. (in Russ.).
17. Demchenko A.P. *Ul'trafiioletovaya spektrofotometriya i struktura belkov*. [Ultraviolet spectrophotometry and protein structure]. Kiev, 1981, 208 p. (in Russ.).
18. Lamri R., Biltonen R. *Struktura i stabil'nost' biologicheskikh makromolekul*. [Structure and stability of biological macromolecules]. Moscow, 1973, 584 p. (in Russ.).
19. Bakhshiyev N.G. *Spektroskopiya mezhmolekulyarnykh vzaimodeystviy*. [Spectroscopy of intermolecular interactions]. Leningrad, 1972, 263 p. (in Russ.).
20. Balakrishnan S., Varughese S., Deshpande A.P. *Tenside Surfactants Detergents*, 2006, vol. 43, no. 5, pp. 262–268. DOI: 10.3139/113.100315.

Received March 3, 2021

Revised May 26, 2021

Accepted May 30, 2021

For citing: Mironenko N.V., Shkutina I.V., Kalmykova A.S., Selemenov V.F. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 4, pp. 267–276. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021049268.