

Disciplina de fizică farmaceutică (cond.: șef de lucrări dr. M. Olariu, doctor în fizică)
Disciplina de farmacognozie (cond.: prof. dr. G. Răcz, doctor farmacist)
ale I.M.F. din Tirgu Mureș

DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE SAPONINE DIN PRODUSE VEGETALE PRIN METODA ÎMPRAȘTIERII LUMINII

M. Olariu, K. Csedő, E. Bachner

În lipsa unor metode chimice satisfăcătoare, pentru dozarea saponinelor din extracte vegetale se apelează îndeosebi la metode biologice sau fizice bazate pe anumite proprietăți comune saponinelor. Metodele biologice, bazate pe acțiunea hemolitică a saponinelor (4, 9, 11), sau pe pro-

prietatea lor de toxicitate (5, 9), sînt cele mai utilizate în practica curentă deoarece tehnica necesară este foarte simplă. Neajunsul acestor metode constă în precizia scăzută a determinărilor și în durata relativ mare a operațiilor necesare. Metodele fizice descrise în literatură (1, 7, 8, 9) sînt nespecifice. În lucrarea de față prezentăm o metodă combinată, în sensul că efectul biologic este analizat prin intermediul unui fenomen fizic.

Principiul metodei și tehnica folosită

Pentru dozarea saponinelor din extracte vegetale, metoda de față, ca și metoda clasică (11), se bazează pe compararea acțiunii hemolitice a produsului vegetal cu acțiunea hemolitică a unor soluții etalon de saponină. Deosebirea constă în modul de observare a procesului de hemoliză provocat de prezența saponinelor. Acest proces este evaluat cantitativ, pe cale grafică, cu ajutorul unei metode propuse de noi (6), bazată pe fenomenul de împrăștiere a radiației laser (3) pe eritrocitele aflate în suspensie într-un mediu apos. Mediul de suspensie fiind o soluție hipotonă de ser fiziologic, chiar în lipsa saponinei apare un proces de hemoliză. Acesta este observat prin intermediul unor curbe de împrăștiere a luminii înregistrate automat, care descriu scăderea în timp a numărului de eritrocite nehemolizate. Panta acestor curbe reprezintă viteza de hemoliză, parametru care crește în prezența saponinei și care se determină pe cale grafică. Măsurînd viteza de hemoliză pentru o serie de probe standard conținînd soluție de saponină în concentrații cunoscute, se trasează o curbă de etalonare pe baza căreia putem determina cantitativ conținutul de saponine din diferite probe preparate în mod identic dar în care soluția de saponină este înlocuită cu extractul vegetal analizat.

Concentrația saponinelor în probele standard a fost cuprinsă în intervalul 0,02 % — 1 %, domeniu în care se încadrau concentrațiile de saponină din extractele vegetale analizate. Pentru prepararea acestor soluții am utilizat saponină pură de fabricație MERCK, dizolvată în ser fiziologic. Suspensiile eritrocitare au fost preparate la o concentrație de 0,5 % NaCl, utilizîndu-se eritrocite umane grupa A (II), spălate în ser fiziologic. Concentrația clorurii de sodiu se alege astfel încît procesul de hemoliză să decurgă într-un interval de timp potrivit față de viteza hîrtiei la înregistrator (1—4 minute de la momentul introducerii eritrocitelor). Volumul necesar pentru observații fiind de aproximativ 20 ml, suspensiile eritrocitare au fost preparate astfel; 18,5 ml soluție hipotonă de NaCl, 1 ml masă eritrocitară diluată cu ser fiziologic în raportul 1:25 și 0,5 ml soluție standard de saponină (respectiv 0,5 ml extract vegetal). În acest fel, față de probele standard preparate inițial, în suspensiile supuse determinărilor concentrația saponinelor este de fapt mai mică de 40 de ori. Pentru fiecare serie de observații am înregistrat și cite o curbă martor obținută pentru o suspensie preparată în condiții identice dar fără conținut de saponină. Extractele vegetale analizate au fost obținute prin metoda clasică de extracție, prin fierbere cu ser fiziologic.

Instalația de împrăștiere utilizată a fost construită după modelul Wippler-Scheibling (2, 10), adaptată fiind pentru utilizarea laserului ca

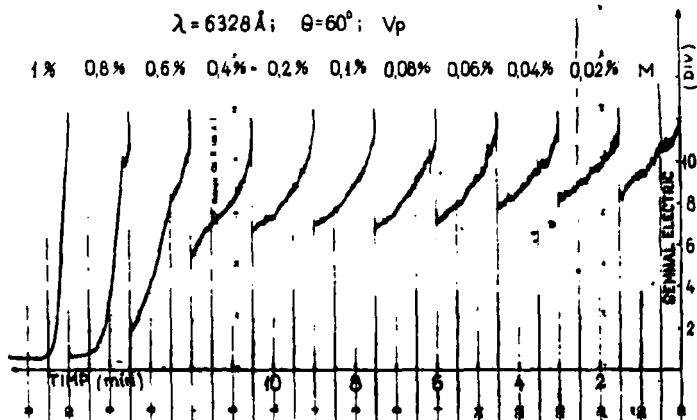


Fig. nr. 1: Curbe de împrăștiere a luminii înregistrate pentru o serie de probe standard conținând saponină în concentrații diferite.

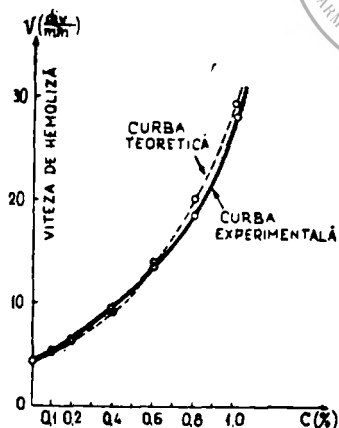


Fig. nr. 2: Curba de etalonare care descrie modul de variație a vitezei de hemoliză în funcție de concentrația saponinei.

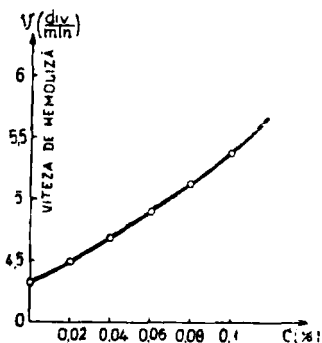


Fig. nr. 3: Curbă de etalonare obținută pentru cazul particular în care seria de probe standard a fost preparată pentru concentrații mici.

sursă de lumină, partea de amplificare și înregistrare a semnalului fiind luată de la un fotogoniograf construit la Institutul de fizică, București. Am utilizat un laser He-Ne, model LG-750.1 de fabricație I.F.A. București. Pentru observații, unghiul de împrăștiere a fost fixat la 60° .

Rezultate și discuții

În fig. nr. 1 prezentăm înregistrările obținute pentru o serie de probe standard cu conținut de saponină cunoscut. Curbele reprezintă variația în timp a semnalului de împrăștiere a luminii. Scăderea în timp a intensității semnalului descrie procesul de hemoliză, panta acestor curbe caracterizând viteza cu care se desfășoară hemoliza. Se observă ușor faptul că panta curbelor crește odată cu creșterea conținutului de saponine. Diagrama din fig. nr. 1 conține și curba M, care corespunde unei probe mar-tor, fără conținut de saponină. Determinând pe cale grafică panta acestor curbe, putem stabili modul de variație a vitezei de hemoliză în funcție de concentrație, așa cum am procedat în fig. nr. 2. Curba obținută se utilizează ca și curbă de etalonare pentru determinarea concentrațiilor în cazul probelor necunoscute. Remarcăm faptul că viteza de hemoliză nu crește liniar cu concentrația saponinei, de unde rezultă că utilizarea unei curbe de etalonare este absolut necesară, concentrația într-o probă necunoscută neputând fi determinată prin simpla raportare a vitezei de hemoliză la valoarea obținută pentru o singură probă etalon. Analiza rezultatelor primite arată că viteza de hemoliză variază exponențial cu concentrația, funcția matematică fiind de forma; $v = 4,33 \cdot \exp. (1,93 \cdot C)$. Curba teoretică trasată în fig. nr. 2 după această funcție are o formă foarte apropiată de cea obținută pe baza valorilor experimentale, coeficientul de corelare avind valoarea de 0,9975. Cu alte cuvinte, curba teoretică se suprapune peste cea experimentală într-o proporție de 99,75 %.

Curba din fig. nr. 2 s-a obținut pentru un interval relativ mare de concentrații. Pentru determinări mai precise, acolo unde se lucrează cu probe necunoscute asemănătoare (de exemplu extracte aparținând aceleiași specii de plante), se pot stabili curbe de etalonare pentru domenii de concentrații mai mici. Ca exemplu, în fig. nr. 3 redăm un astfel de caz particular, în care curba a fost obținută pentru intervalul 0—0,1 %.

Pentru a stabili prezența saponinei și concentrația ei în diferite extracte vegetale, se prepară probe în condiții identice cu celea pentru care a fost trasată curba de etalonare, cu deosebirea că în locul soluției de saponină se introduce extractul analizat. Păstrând neschimbați parametrii elctrici la instalație, se înregistrează curbele de împrăștiere a luminii. În fig. nr. 4 redăm ca exemple înregistrările obținute pentru cinci extracte vegetale diferite. Calculind panta acestor curbe, am trecut valorile obținute pe curba de etalonare (așa cum se vede în fig. nr. 5), de unde am stabilit pe cale grafică valorile concentrațiilor. În mod intenționat, în fig. nr. 4 am prezentat și un exemplu de înregistrare ce corespunde unui extract fără conținut de saponină (curba „e“). Mai mult, este vorba de un extract care conține substanțe cu efect stabilizant (antihemolitic).

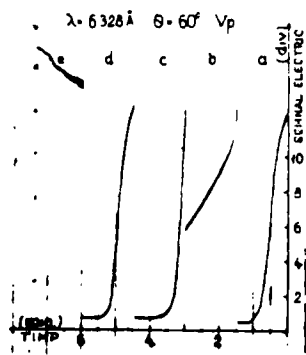


Fig. nr. 4. Curbe de împrăștiere a luminii înregistrate pentru extracte vegetale; a—Saponariae brae radix., c—Extr. Hippocásalbae radix., b—Saponariae rütani siccum., d—Saponariae albae radix (din Iran), e—Quercus cortex.

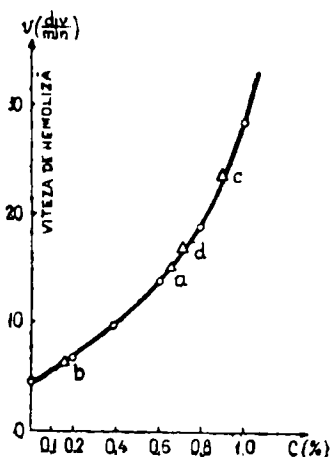


Fig. nr. 5: Plasarea pe curba de etalonare a valorilor vitezelor de hemoliză obținute pentru extractele vegetale analizate, de unde rezultă concentrațiile corespunzătoare în saponine; a—0,63%, b—0,18%, c—0,91%, d—0,73%.

Concluzii:

Din rezultatele obținute rezultă următoarele:

- metoda prezentată permite determinarea calitativă și cantitativă a saponinelor;
- față de metoda clasică, timpul de efectuare a determinărilor se reduce de la aproximativ 24 ore la câteva minute;
- sensibilitatea metodei este îmbunătățită datorită modului de observare a procesului de hemoliză;
- metoda se pretează în special acolo unde se efectuează serii mari de determinări, deoarece curba de etalonare trebuie trasată ori de câte ori se schimbă singele;
- dezavantajul metodei constă în faptul că tehnica utilizată este relativ complicată și costisitoare;
- ca și în cazul metodei clasice, nu pot fi analizate extracte care pe lângă saponină conțin și substanțe cu efect stabilizant (ex. substanțe tanante). De asemenea, saponinele nehemolizante nu sînt sesizate de metodă.

Bibliografie

1. Franck H. P.: Dtsch. Apoth. Ztg. (1975), 115, 1206; 2. Ghiță L., Ghiță C.: Studii și cercetări de fizică (1963), 5, 725; 3. Kerker M.: The Scattering of light. Academic Press, New York—London, 1969; 4. Kar-

ting Th. și colab.: *Planta Medica* (1972), 21, 29; 5. Karma H., Schantz M.: *Sci. Pharm.* (1966), 27, 6; 6. Olariu M., Nicolaescu I., Opreșor I., Rocsin M.: *Rev. med.* (1978), 2, 179; 7. Pohl P., Hädrich W.: *Dtsch. Apoth. Ztg.*, (1976), 116, 625; 8. Schlemmer W.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* (1966), 106, 1315; 9. Wichtl M.: *Die Pharmakognostisch Chemische Analyse*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt an Main, 1971; 10. Wippler C., Scheibling G.: *J. Chim. Phys.* (1954), 51, 201; 11. *** *Farmacopeea Română*, Ediția a IX-a, Ed. medicală, București, 1976.

Sosit la redacție: 28 februarie 1980

M. Olariu, K. Csedő, E. Bachner



**DETERMINATION OF SAPONIN CONTENT OF VEGETAL PRODUCTS
THROUGH LIGHT SPREADING**

The method is based on the haemolytic action of saponins, the process of haemolysis being observed through the technique of laser radiation spreading on the erythrocytes in suspension in a hypotonic aqueous medium. This method allows the graphic evaluation of the speed of haemolysis, a parameter which increases in the presence of saponins. The concentration of saponins is determined according to a curve of graduation previously drawn for a series of standard tests of known concentrations. In comparison with the traditional methods, the advantage of this technique is in the considerable reduction of the time of determinations (at most 10 minutes), as well as the elimination of subjective errors in observing the process of haemolysis, which raises the sensibility of determinations.
