

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Departamento de Bioquímica. - Madrid

Estudios sobre saponinas

VII. - Método físico-químico de valoración

por

J. L. Fontán-Candela y R. Portilla

(Recibido para publicar el 17 de noviembre de 1956)

Los métodos biológicos de dosificación de saponinas, basados en el poder hemolítico de estas sustancias, presentan inconvenientes debido a variaciones en la cantidad de colesterol y hemoglobina que existe en los eritrocitos, cambios en la resistencia de los hematíes con el tiempo transcurrido desde que se extrajeron, la edad, sexo y dieta de los animales, que hacen debilitar la eficacia de la reacción, llegando a suministrar unos errores que por métodos físicos o químicos no se producirían. Además, el empleo de los hematíes siempre precisa en cada análisis la comparación con una cantidad de saponina conocida, por lo que tratamos de obtener un método más simplificado, orientando la labor investigadora de dosificación al terreno físico-químico.

Material y métodos

El hecho descubierto por WASICKY (2), de que al agitar un extracto de *Polígala brasileira* con una solución de Sudán III en alcohol bencílico se produce una coloración rosada, fué el punto de partida de nuestro trabajo, al atribuir esta coloración a las saponinas presentes. Realizamos experiencias con diversas sustancias de propiedades y constitución moleculares afines a los saponósidos, solubles en agua, e igualmente comprobamos que existe especificidad, según se observa en el cuadro I.

CUADRO I

Sustancias	Resultado obtenido
Sacarosa al 1 %	Sin color
Fructosa > >	> >
Manosa > >	> >
Arabinosa > >	> >
Glicocola > >	> >
Arbutina > >	> >
Peptona 5 %	> >
Acido colánico	> >
Acido desoxicólico	> >
Extracto de <i>Hedera helix</i>	Positivo
Extracto de <i>Fourcroea gigantea</i>	Positivo

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SAPONINA.

Se emplea saponina «Gehe» cuya pureza, determinada cromatográficamente por uno de nosotros (1), es alta. Se pesan 0,25 gr. Con objeto de que la cantidad de espuma que pueda formarse sea mínima, y no perturbe el enrase del matraz, se efectúa la disolución en un embudo de decantación que contenga la saponina, al que se va añadiendo agua y una vez agitado cuidadosamente, sin contacto con el aire, se deja salir la solución formada. Se lava el embudo con agua y se completa a 100 c. c. De esta forma se abrevia grandemente el tiempo requerido para formar la disolución. Se conserva en la nevera y en el momento de utilizarla se agita para homogeneizar. Siempre se opera con una solución 1/10 de la anterior.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SUDÁN III.

Se pesan 0,25 g. de Sudán III «British Drug Houses». Se disuelven en alcohol bencílico al agitar. Se filtra para eliminar pequeñas trazas que quedan sin disolver. Se completa a 100 c. c. de solución.

Operando con una cantidad fija de saponina (100 μ g.) y cantidades crecientes de Sudán III hallamos los resultados descritos en el cuadro II y representados en la gráfica. Se observa en la figura que con más cantidad de 100 μ g. de Sudán no aumenta la sensibilidad; sin embargo, cuando se opera con mayor cantidad de saponina la saturación se produce más adelante. En la región comprendida entre cero y veinte μ g. de Sudán las lecturas no son reproducibles. Al fijar las condiciones para el

CUADRO II

μ gr. de Sudán III	Lecturas
23,8	14
47,6	32
71,4	48
95,2	70
119,0	75
162,0	75

trabajo sistemático escogimos, sin embargo, la cantidad de 125 μ g. de Sudán, puesto que con ella las lecturas se efectúan en la zona más sensible del celofotómetro.

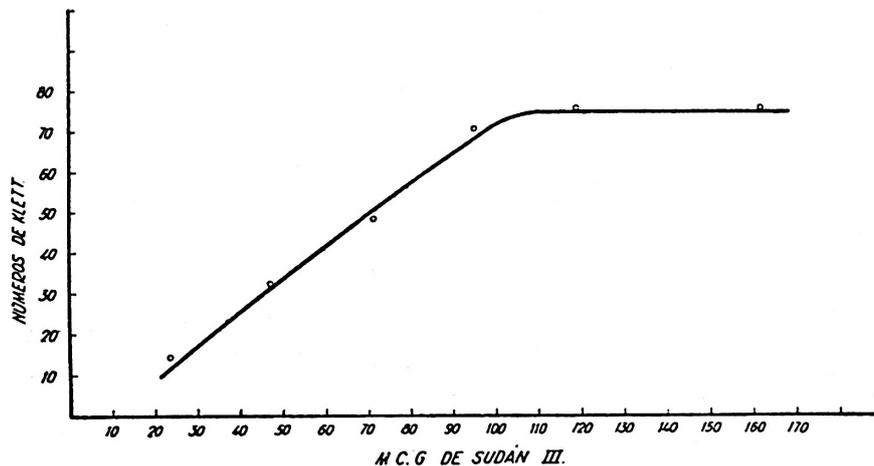
TÉCNICA DE LA OPERACIÓN.

Las lecturas se realizan con un fotocolorímetro Klett-Sumerson y filtro verde. Los tubos del aparato tienen que estar completamente secos, a 110° C., pues la menor cantidad de agua origina burbujas, estables en el seno del líquido.

Se introduce en los tubos del celofotómetro 0,05 c. c. de Sudán III de la solución preparada, con una micropipeta de 0,1 c. c. de capacidad, cuidando apoyar la punta en el fondo del tubo para que no se disperse el colorante. Si queda alguna fracción por las paredes es muy difícil posteriormente su disolución.

A continuación se añade desde una microbureta la solución de saponina, haciéndolo suavemente y resbalando por las paredes del tubo. Se observa que esta solución va reuniéndose en una fase superior al Sudán. La fase de Sudán queda en forma de elipsoide, que es la más favorable para la exacta repetibilidad de los resultados. Se completa a 10 c. c. con agua destilada, arrastrando lo mejor posible las trazas de saponina que hubieran podido quedar adheridas a las paredes, y con cuidado de no producir espuma, así como de que no se aminore el contacto entre colorante y saponina. Una vez en el tubo las soluciones, se agitan, invirtiéndole cinco veces, sin producir movimientos violentos que pudieran dar origen a la formación de espuma.

La agitación se debe realizar siempre del mismo modo para que las partículas de Sudán lleguen a homogeneizarse. También podía emplearse un artificio mecánico de agitación. A los cinco minutos se lee en el celofotocolorímetro. Observamos que con menos de veinticinco μ g. de saponina los tubos tenían una lec-



tura incierta, pues quedaba colorante por las paredes. Con mayor cantidad de saponina se rebaja la tensión superficial del colorante y se disuelve más. En resumen: la zona de trabajo en estas condiciones se extiende desde 25 a 120 μg . de saponina. Realizando varias lecturas con crecientes concentraciones de la solución de saponina hallamos que sigue la ley de BEER, encontrando un incremento de 1 μg . de saponina para 0,687 números del celofotómetro.

Con digitonina se encuentran los mismos resultados, así como con diversos extractos brutos de plantas, tanto los que contienen saponinas esteroídicas como triterpénicas, por lo que creemos que es de empleo general.

Seguimos trabajando sobre el esclarecimiento del comportamiento físico-químico de esta reacción, teniendo en cuenta principalmente la tensión superficial.

Resumen

Huyendo de los inconvenientes que presentan los métodos biológicos para valoración de saponinas, se ha investigado una reacción colorimétrica que sigue la Ley de Beer y posee especificidad.

La técnica sólo precisa un celofotómetro y se produce a la temperatura normal al agitar una solución acuosa con 25-120 μg . de saponina con 125 μg . de sudán III en 50 mm^2 de alcohol bencílico. Cada gamma de saponina incrementa 0,687 n.º del celofotómetro Klett (con filtro verde).

Summary

Studies on saponins. VII. Physico-chemical method of evaluation

We present the first physico-chemical method of evaluating saponins. As against the inconveniences presented by the biological ones, this offers simplicity, speed, and possibility of repetition.

It is based on the exaltation produced on treating a solution of Sudán III in benzy alcohol with another of saponin and its measurement by colorimetry.

It seems specific for the saponosides as experiments in substances of related properties and molecular forms demonstrate.

The reaction follows Beer's law, being fulfilled within the interval of 25-120 μ gr of saponin. The most convenient concentration of Sudan III, corresponding to the greatest sensitivity to the same amount of saponin is that of 125 μ gr. The Kleit-Summerson celophotometer is used, an increase of 1 μ gr of saponin being found for numbers 0.687 of the apparatus.

The rules respecting the filling and agitating of the tubes should be strictly adhered to. Thus the readings will be exact.

At present, we are working to make clear the theoretical basis of the reaction, noting mainly surface tension and colloidal phenomena.

Bibliografía

- (1) FONTÁN-CANDELA, J. L. : *Anal. real Soco esp. fis. quím.* LI, B, 432, 1955.
- (2) WASICKY, R. : *Rev. Soc. Brasileira Quimica*, 11, 51, 2942.

