

# **Saponiiniseoksen hyödyntäminen pesuaineissa**

Pro Gradu -tutkielma

Turun Yliopisto

Kemian laitos

Luonnonyhdisteiden kemia

Maria Hokkanen

Marraskuu 2020

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

MARIA HOKKANEN: Saponiiniseoksen hyödyntäminen pesuaineissa

Pro gradu –tutkielma, 46 s.

Marraskuu 2020

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

---

Saponiinit ovat glykosidisia yhdisteitä, jotka koostuvat aglykonista ja niihin liittyneistä sokereista. Aglykonit voivat olla triterpeenejä, steroideja tai steroidialkaloideja. Riippuen siitä, onko aglykoniin liittynyt yksi, kaksi vai kolme sokeriketjua, niitä kutsutaan mono-, bi- tai tridesmosidisaponiineiksi. Nimi saponiini tulee latinan kielen sanasta *sapo*, joka tarkoittaa saippuaa. Saponiineja sisältäviä kasveja onkin käytetty saippuoina jo satojen vuosien ajan. Saponiinit ovat rakenteeltaan hyvin erilaisia, minkä vuoksi niillä on lukuisia biologisia, fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia. Amfiifiilisen rakenteensa vuoksi saponiinit ovat pinta-aktiivisia aineita. Tällaisilla yhdisteillä on vaahdonmuodostus-, emulsionmuodostus- ja pesuaineominaisuuksia. Saponiinit muodostavat misellejä vesiliuoksissa, kun niiden konsentraatio ylittää kriittisen misellinmuodostuskonsentraation.

Tässä työssä selvitettiin mahdollisuutta hyödyntää kotimaisten kasvien sisältämiä saponiineja pesuaineissa. Kirjallisuuteen pohjautuen tutkittaviksi kasveiksi valittiin kaura (*Avena sativa*), sokerijuurikas (*Beta vulgaris*) ja rohtosuopayrtti (*Saponaria officinalis*). Saponiinien uuttumista tutkittiin eri uuttoliuottimilla, jonka jälkeen valittiin sopivin. Raakauutteita puhdistettiin pylväskromatografisesti ja preparatiivisella korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC). Saponiinit karakterisoitiin analysoimalla näytteet korkean resoluution ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia-diodirividetektorisähkösumutus-ionisaatio-Orbitrap-massaspektrometrilla. Molekyyli-ionien tarkkoja massoja ja niistä määritettyjä molekyylikaavoja verrattiin kirjallisuudesta löytyneisiin karakterisointeihin saponiineihin. Työn eri vaiheissa saatuja näytteitä testattiin Kiillolla.

Uuttotestien perusteella saponiineja tunnistettiin rohtosuopayrtistä ja sokerijuurikkaasta, jotka valittiin suuremman mittakaavan uuttoon. Raakauutteet eivät kuitenkaan pärjänneet hyvin pyykinpesutesteissä. Pylväskromatografisesti rohtosuopayrtin raakauutteesta saatiin eroteltua epäpuhtauksia jonkin verran, mutta sokerijuurikkaan raakauutteesta ei. Preparatiivisella HPLC:llä rohtosuopayrtin pylväsfraktiosta saatiin melkein puhdas saponiiniseos, mutta saanto oli alhainen. Vaahtoavuus- ja pintajännitystesteissä parhaimmat tulokset saatiin puhdistetulla saponiiniseoksella, vaikka sen pitoisuus oli alhaisin. Fraktioidun raakauutteen vaahtoavuus- ja pintajännitystestien tuloksia sekä raakauutteen tehottomuutta pesutesteissä selittävät todennäköisesti sen alhainen saponiinipitoisuus. Vaikka näytteet sisältävät saponiineja, joilla oletetaan olevan pesevä vaikutus, ne sisältävät paljon myös muita yhdisteitä, jotka häiritsevät pesureaktioita.

Asiasanat: kromatografia, massaspektrometria, saponiini

## Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	1
2. Materiaalit ja menetelmät.....	15
2.1 Materiaalit.....	15
2.1.1 Kasvimateriaalit.....	15
2.1.2 Reagenssit.....	16
2.2 Menetelmät.....	16
2.2.1 Uutot.....	16
2.2.2 Pylväskromatografia.....	17
2.2.3 Preparatiivinen HPLC.....	18
2.2.4 UPLC-DAD–ESI-Orbitrap-MS-analyysi.....	19
2.2.5 Pesutestit.....	20
3. Tulokset.....	21
3.1 Uttoliuottimen vaikutus saponiinien uuttumiseen.....	21
3.2 Rohtosuopayrtin ja sokerijuurikkaan pylväskromatografinen fraktioiminen.....	25
3.3 Rohtosuopayrtin fraktioidun raakauutteen preparatiivinen HPLC-puhdistus.....	28
3.4 Vaahdonmuodostus-, pintajännitys- ja pyykinpesutestit.....	30
3.5 Saponiinien tunnistaminen.....	31
4. Johtopäätökset.....	43

## Lyhenteet

API	apiose apioosi
ARA	arabinose arabinoosi
CMC	critical micelle concentration kriittinen misellikonsentraatio
DAD	diode array detector diodirividetectori
DDMP	2,3-dihydro-2,5 dihydroxy-6-mehtyl-4H-pyran-4-one 2,3-dihydro-2,5-dihydroksi-6-metyyli-4H-pyran-4oni
EIC	extracted ion chromatogram suodatetun ionin kromatogrammi
ESI	electrospray ionization sähkösumutusionisaatio
FUK	fucose fukoosi
GAL	galactose galaktoosi
GLUK	glucose glukoosi
GLUKHA	glucuronic acid glukuronihappo
HPLC	high-performance liquid chromatography korkean erotuskyvyn nestekromatografia
IPP	isopentenyl pyrophosphate isopentenyylipyrofosfaatti
KSYL	xylose ksyloosi
KVIN	quinovose kvinovoosi
LC	liquid chromatography nestekromatografia

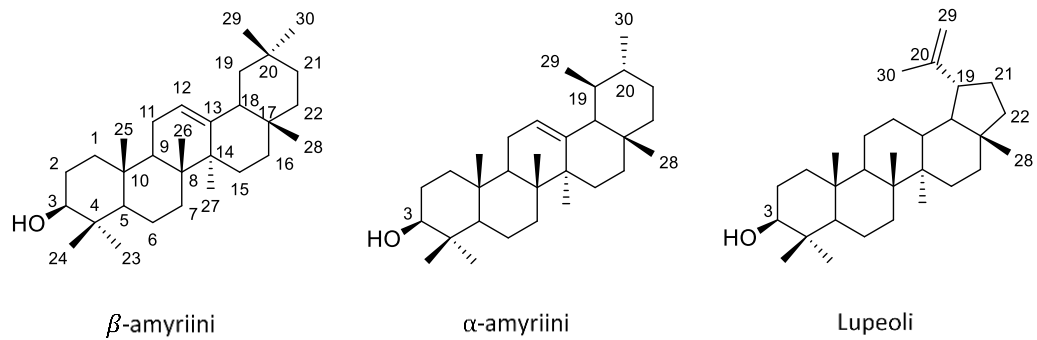
MS	mass spectrometry massaspektrometria
RAM	rhamnose ramnoosi
UDP	uridine-5'-diphosphate uridiini-5'-difosfaatti
UPLC	ultra performance liquid chromatography ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia
UV	ultraviolet ultravioletti

## 1. Johdanto

Saponiinit ovat glykosideja, jotka koostuvat aglykonista ja sokeriosasta. Aglykonია kutsutaan myös geniiniksi tai sapogeniiniksi. Pooliton aglykoni ja pooliset sokerit tekevät saponiineista hyvin amfiifiilisiä. Saponiinit jaetaan kolmeen eri luokkaan aglykonin perusteella: triterpeen-, steroidi-, sekä steroidalalkaloidisaponiineihin. Saponiineja esiintyy erityisesti putkilokasveissa, mutta niitä on löydetty myös merieläimistä. Nimi saponiini tulee latinan kielen sanasta *sapo*, joka tarkoittaa saippuaa. Saponiineja sisältäviä kasveja onkin käytetty saippuoina jo satojen vuosien ajan. Useat kasvit on myös nimetty tämän käyttötarkoituksen mukaan, kuten esimerkiksi rohtosuopayrtti (*Saponaria officinalis*) ja kiinansaippuamarja (*Sapindus mukurossi*). Erityisesti Lähi-Idässä ja Aasiassa saponiini-pitoisia kasveja on käytetty myös kansanparannuksessa. (Hostettmann and Marston, 1995)

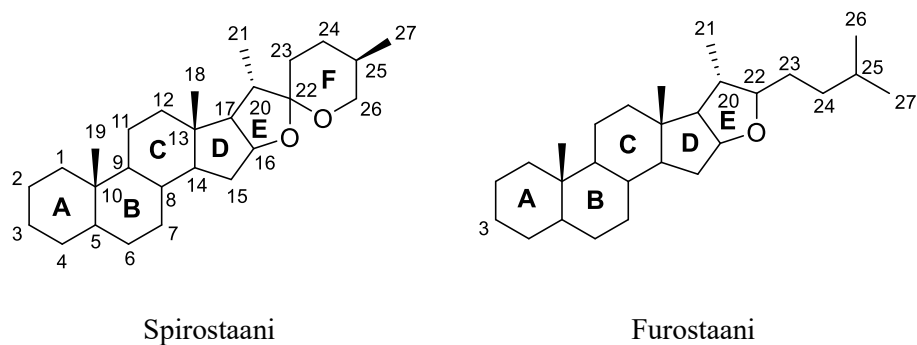
Saponiinit jaetaan tyypillisesti kahteen luokkaan niiden sokeriketjujen perusteella. Monodesmosidisisissa saponiineissa on yksi sokeriketju liittyneenä aglykonin C-3-hiileen eetterisidoksella. Bidesmosidisisissa saponiineissa on kaksi sokeriketjua. Toinen niistä on liittynyt C-3-hiileen eetterisidoksella, ja toinen on liittynyt C-28-hiileen esterisidoksella tai C-26-hiileen eetterisidoksella (Hostettmann and Marston, 1995). Näiden lisäksi on löydetty saponiineja, joissa aglykoniin on liittynyt kolme sokeriketjua eli ne ovat tridesmosidisia (Oleszek et al., 1992). Yleisimmät saponiineissa esiintyvät sokerit ovat D-glukoosi, D-galaktoosi, D-glukuronihappo, D-galakturonihappo, L-ramnoosi, L-arabi-noosi, D-ksyloosi ja D-fukoosi. Sokerit voivat olla myös asyloituja ja ne voivat esiintyä pyranoosi- tai furanoosimuodossa. Sokeriketjut voivat olla lineaarisia tai haarautuneita. (Hostettmann and Marston, 1995)

Triterpeenisisaponiiniinien aglykoni koostuu 30 hiilestä ja se on joko tetra- tai pentasykli-nen. Pentasykliset triterpeenit ovat  $\beta$ -amyriinien (olean-12-äänipohjaisia),  $\alpha$ -amyriinien tai lupeolin johdannaisia (kuva 1). Karakterisoiduista triterpeenisisaponiineista yli puolet ovat  $\beta$ -amyriinijohdannaisia, joista yleisin aglykoni on oleanolihappo. Triterpeenisisapogeniineille tärkeitä rakenteita ovat C-12:sta tyydyttymättömyys, C-23:n, C-28:n tai C-30:n metyyliryhmien funktionalisointi, sekä C-2:n, C-7:n, C-11:sta, C-15:sta, C-16:sta ja C-19:sta polyhydroksylointi. Tetrasykliset triterpeenit ovat dammareenien johdannaisia. Tunnetuista triterpeenisisaponiineista suurin osa on bidesmosidisia ja sokeriketjut ovat liittyneet C-3- ja C-28-hiiliin. (Hostettmann and Marston, 1995)



**Kuva 1.** Triterpeeniasapogeeniiniinien pääryhmät.

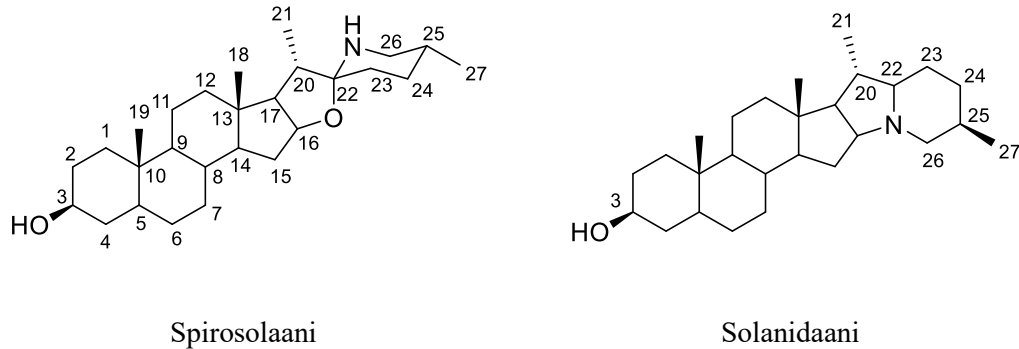
Steroidisaponiinien aglykoneissa on 27 hiiltä ja useimmat niistä ovat spirostaani- tai furostaani-pohjaisia (kuva 2). Spirostaanissa on E- ja F-renkaiden muodostama ketospirokettaaliryhmä. Niistä muodostuvat saponiinit ovat monodesmosidisia ja sokeriketju on liittynyt aglykonin C-3-hiileen. Furostaanissa F-rengas on auennut ja saponiineissa sokeriketjut ovat liittyneet aglykonin C-3- ja C-26-hiiliin ja ne luokitellaan bidesmosidiseksi (Hostettmann and Marston, 1995). Furostaanityyppisten steroidisaponiinien C-26-hiileen liittyneen sokerimolekyylin poistaminen johtaa kuitenkin F-renkaan spontaaniin sulkautumiseen, jolloin muodostuu vastaava spirostaanityyppinen saponiini. Furostaanityyppisiä saponiineja pidetäänkin vastaavien spirostaanityyppisten saponiinien ”kantasaponiineina” (Kalinowska et al., 2005).



**Kuva 2.** Yleisimmät steroidisapogeeniinit.

Steroidialkaloidisaponiinien aglykoneissa on 27 hiiliatomia ja yksi typpi-atomi. Ne ovat joko spirosolaani- tai solanidaanipohjaisia (kuva 3). Spirosolaanisapogeeniineissa typpi on sekundäärisessä asemassa ja ne ovat spirostaanien atsa-analogeja. Solanidaaniasapogeeniini-

neissa tyyppi on tertiäärisessä asemassa. Steroidialkaloidisaponiinit ovat monodesmosidiisiä ja sokeriketju on liittynyt aglykonin C-3-hiileen (Hostettmann and Marston, 1995). Steroidialkaloidiglykosidien luokittelu saponiineiksi ei kuitenkaan ole yksimielistä. Aglykonin sisältämän tyyppien takia ne voidaan myös luokitella erilliseksi yhdisteryhmäksi (Vincken et al., 2007).

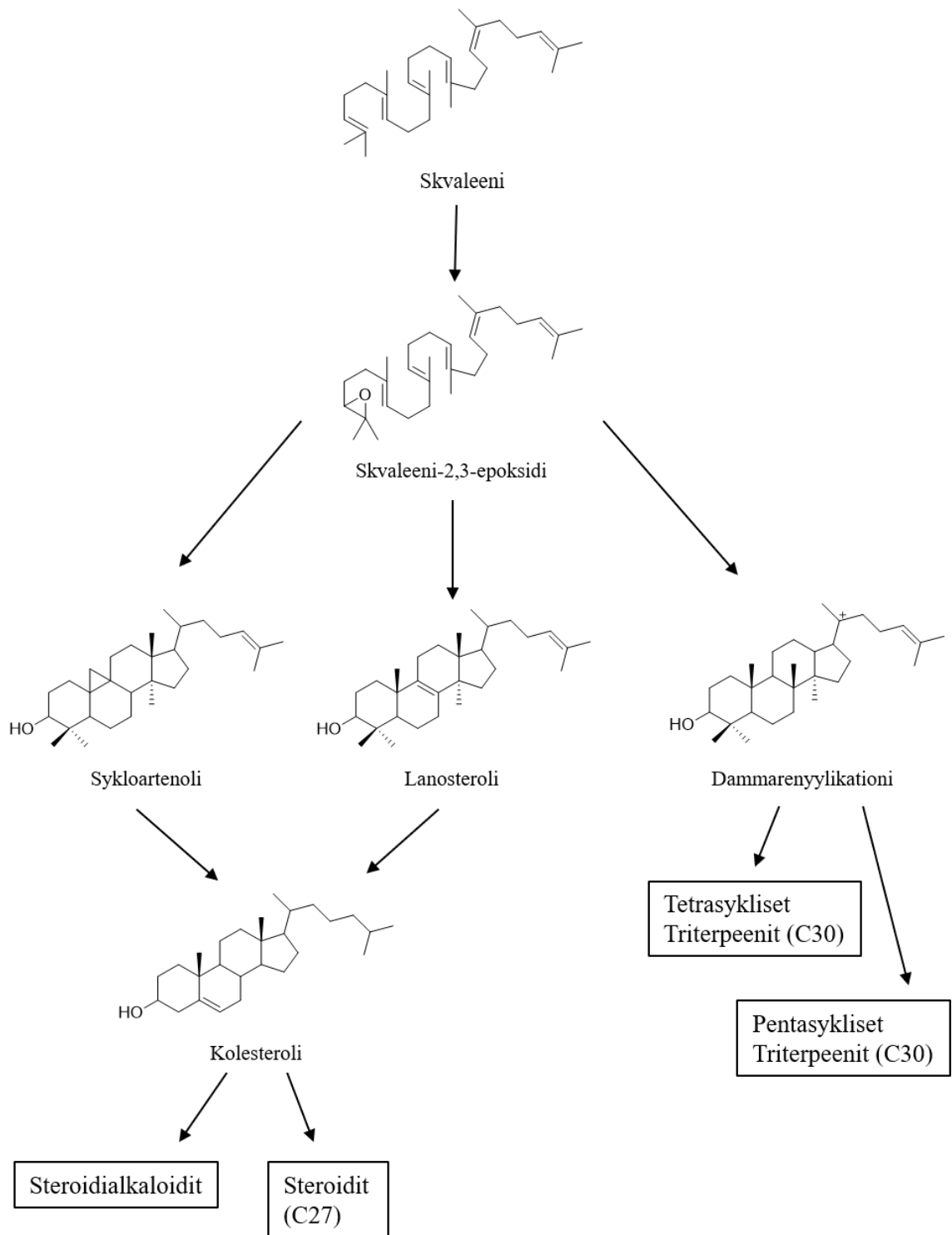


**Kuva 3.** Steroidialkaloidisapogeniinit.

Luonnossa esiintyvien terpenoidien prekursorina pidetään yleisesti isopentenyylipirofosfaattia (IPP) ja saponiinien biosynteesi alkaa skvaleenin syntetisoimisella IPP:stä. Sen jälkeen skvaleeniepoksidaasi katalysoi skvaleenin hapettumista skvaleeni-2,3-epoksidaasiksi (Kalinowska et al., 2005). Tämä toimii sekä triterpeeni- ja steroidisapogeniinien prekursorina. Triterpeenit muodostuvat skvaleeni-2,3-epoksidaasista tuoli-tuoli-tuoli-syklisaation kautta. Eri entsyymit katalysoivat tetrasyklisen karboniumionin järjestymistä joko tetra- tai pentasyklisiksi triterpeeneiksi. Steroidisapogeniinit muodostuvat skvaleeni-2,3-epoksidaasista tuoli-vene-tuoli-syklisaation kautta, jossa siitä muodostuu joko sykloartenolia (kasveissa) tai lanosterolia (eläimissä ja sienissä) eri entsyymien katalysoimana (Haralampidis et al., 2002). Nämä muuntuvat sen jälkeen kolesteroliksi, josta muodostuu steroideja. Steroidialkaloidit muodostuvat tyypittömällä liittämällä steroideihin (Hostettmann and Marston, 1995). Sapogeniinien biosynteesireitti on esitetty kuvassa 4.

Syklisaatioreaktioiden, uudelleenjärjestymisen ja hajoamisreaktioiden takia sapogeniinit ovat rakenteeltaan hyvin erilaisia. Lisäksi muut modifikaatiot, kuten oksidaatio- ja glykosylaatioreaktiot lisäävät niiden monimuotoisuutta. Aglykoneihin on liittynyt eri määrä erityyppisiä substituentteja, kuten hydroksyyli-, karbonyyli-, metyyli- ja karboksyyli-ryhmiä. Lisäksi kaksoissidosten määrä ja paikka vaihtelevat. Yhteistä kaikille aglykoneille on kuitenkin C-3-hiileen liittynyt hydroksyyli-ryhmä. (Vincken et al., 2007)





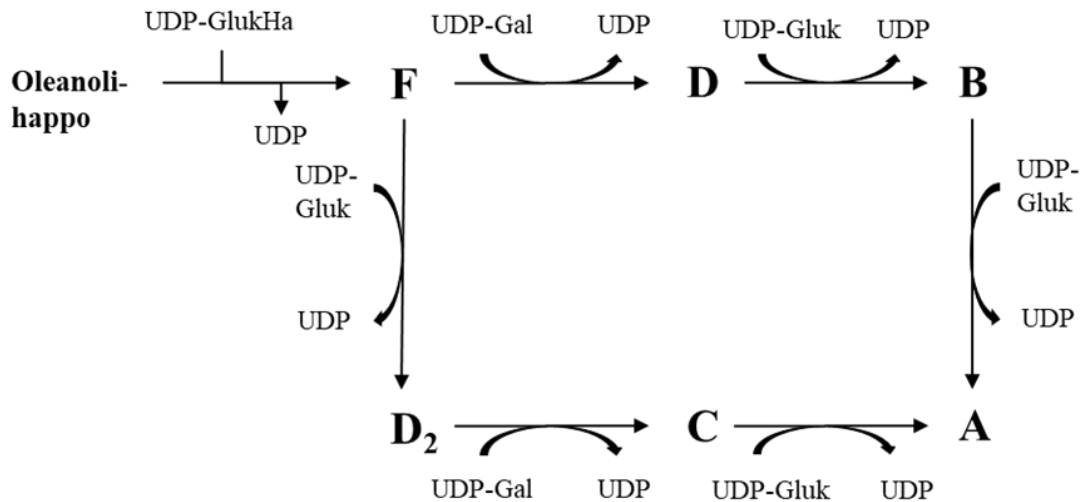
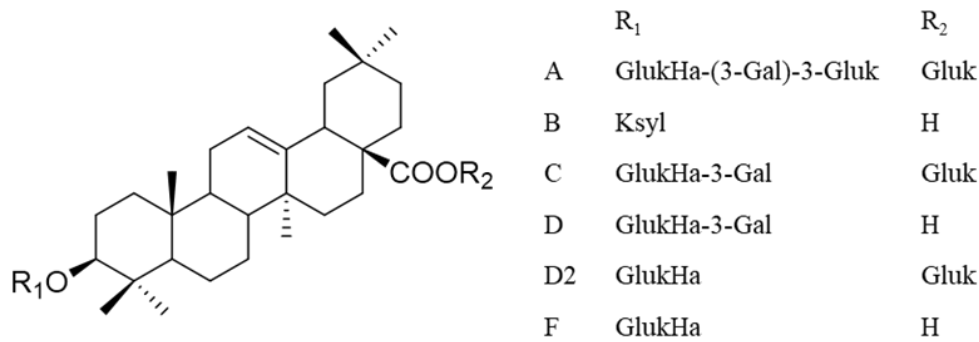
**Kuva 4.** Triterpeenien ja steroidien biosynteesi. Mukailtu kirjasta Hostettmann ja Marston, 1995.

Saponiinien sokeriketjujen on yleisesti ajateltu muodostuvan niin, että ensin aglykoniin liitetään yksi sokeri. Tästä muodostuvaan tuotteeseen lisätään seuraava sokeri ja niitä liitetään yksi kerrallaan, kunnes yhdiste on valmis. Sokerien liittäminen tapahtuu erilaisten

transferaasientsyymien katalysoimana. Steroidi- ja steroidialkaloidisaponiinien glykosylointia on tutkittu huomattavasti enemmän kuin triterpeenisisaponiinien glykosylointia (Haralampidis et al., 2002). Triterpeenisisaponiineille spesifisiä entsyymejä on raportoitu vain muutamia, kun taas steroidisaponiineille spesifisiä entsyymejä on karakterisoitu lukuisia (Kalinowska et al., 2005).

Tarhakehäkukasta (*Calendula officinalis*) tunnistettujen saponiinien muodostumista on tutkittu [<sup>14</sup>C]-merkkiainetutkimuksilla. Tutkimuksessa löydettiin glukuronosyyli transferaasi, joka katalysoi 3-*O*-β-D-glukuronipyranosidin (saponiini F) muodostumista oleanolihaposta ja uridiinidifosfaatti-glukuronihaposta (UDP) (Wojciechowski, 1975). Entsyymien havaittiin olevan spesifinen oleanolihapolle, sillä reaktiota ei tapahtunut käytettäessä vastaavia oleaniiniryhmän aglykoneja substraatteina. Tämän jälkeen 3-*O*-β-D-glukuronipyranosidista muodostui joko saponiini D galaktoosin liittyessä C-28-hiileen tai saponiini D<sub>2</sub> C-3-sokeriketjun pidentyessä glukoosin liittymisellä. Saponiini D:n sokeriketjuja pidentämällä muodostui ensin saponiini B ja siitä saponiini A. Saponiini D<sub>2</sub>:sta muodostui saponiini C ja siitä saponiini A. Tarhakehäkukan saponiinien muodostuminen on esitetty kuvassa 5. Tarhakehäkukasta löydettiin myös spesifinen glukosyyli transferaasi, sillä sen akseptoriksi ei käynyt oleanolihappo ja saponiini F:n karboksyyli ryhmän glukosylointi oli paljon nopeampi reaktio kuin saponiinien D tai B karboksyyli ryhmien glukosylointi. (Wojciechowski, 1975)

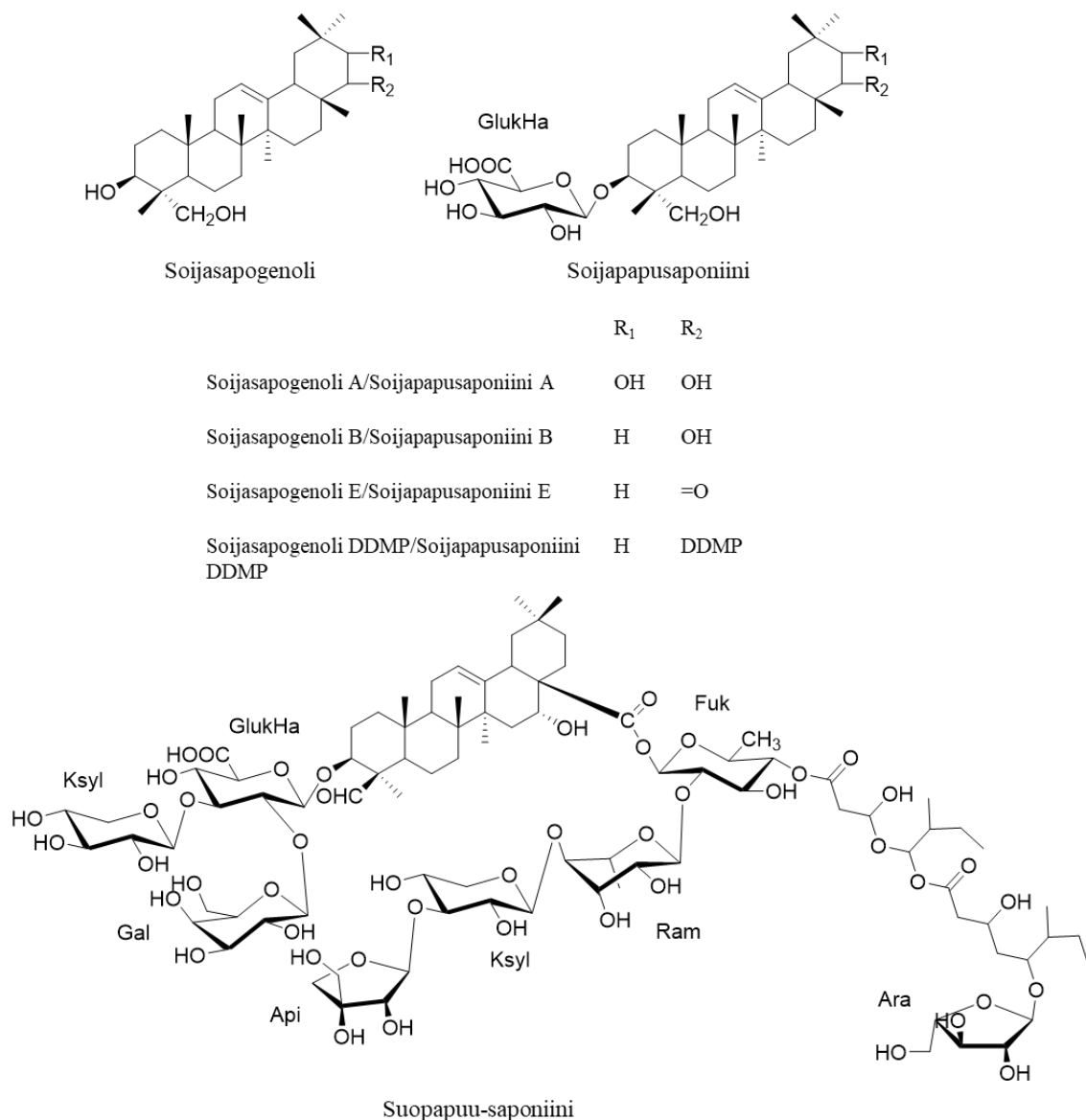
Soijapavuista tunnistettujen saponiinien muodostumista on tutkittu entsyymitutkimuksilla (Kurosawa et al., 2002). Soijapapujen saponiinit jaetaan neljään ryhmään aglykonin perusteella: soijasapogenolit A, B, E, sekä 2,3-dihydro-2,5-dihydroksi-6-metyyli-4H-pyran-4oni (DDMP) (kuva 6). Soijapapujen saponiinit ovat erilaisia myös sokeriketjuiltaan. Kaikille soijapavuista karakterisoiduille saponiineille on kuitenkin yhteistä C-3-hiileen liittynyt glukuronihappo. Tutkimuksessa löydettiin entsyymi, joka katalysoi glukuronihapon liittymistä soijasapogenoli A:han, B:hen ja E:hen UDP-glukuronihapon toimiessa sokeridonorina. Soijasapogenoli B:n havaittiin olevan paras akseptori tutkitulle entsyymille. Reaktiota ei tapahtunut, kun substraattina käytettiin muita oleaniinityyppejä triterpeenejä tai flavonoideja. Entsyymien aktiivisuus oli alhainen, kun sokeridonorina käytettiin UDP-glukoosia tai UDP-galaktoosia. Tulosten perusteella entsyymi katalysoi spesifisesti glukuronihapon liittymistä soijasapogenoleihin. (Kurosawa et al., 2002)



**Kuva 5.** Kesätarhakukasta tunnistetut saponiinit A-F sekä niiden biosynteesi. Gluk = Glukoosi, GlukHa = Glukuronihappo, Ksyl = Ksyloosi, Gal = Galaktoosi, UDP = Uridiinidifosfaatti. Mukailtu artikkelista Kalinowska et al. 2005.

Steroidisaponiinien muodostuminen ei ole aivan yhtä yksiselitteistä kuin triterpeenisisaponiinien. Steroidisapogeeniinit muodostuvat kolesterolista peräkkäisillä hapetusreaktioilla (furostaanit) ja myöhemmin sterolisivuryhmän sykliisaatiolla spiroketaalirenkaaksi (spirostaanit). On kuitenkin esitetty, että C-26-hiilen glukosylointi tapahtuisi jo aikaisessa vaiheessa, jolloin F-renkaan muodostuminen estyisi. Bidesmosidiset furostaanityyppiset steroidisaponiinit muodostuisivat siten furostaani-26- $\beta$ -D-glukosidin C-3-hydroksyylin glykosylaatiolla. Vastaavat spirostaanityyppiset saponiinit muodostuisivat sen jälkeen C-26-hydroksyyliin liittyneen glukoosin entsyymaattisella poistamisella, mikä johtaisi spontaaniin F-renkaan sykliisaatioon. (Kalinowska et al., 2005)

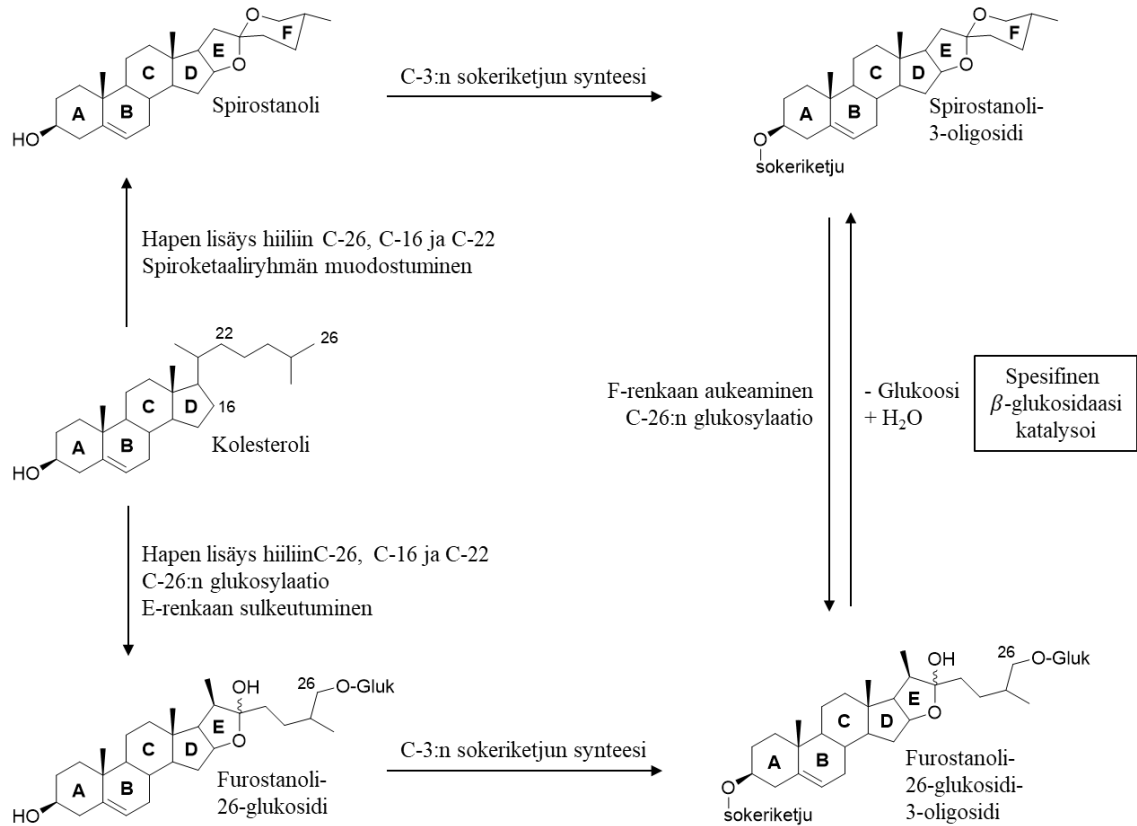
On myös mahdollista, että synteesi tapahtuu päinvastaisesti. Tällöin spiroketaalirenkas sykliisoituisi heti kolesterolin hapetusreaktioiden jälkeen (Kalinowska et al., 2005). Tämän jälkeen muodostuneen spirostaanisapogeeniinin C-3-hydroksyyli glykosyloituisi,



**Kuva 6.** Triterpeeniasaponiinien rakenteita. Api = Apioosi, Ara = Arabinoosi, Fuk = Fuukoosi, Gal = Galaktoosi, GlukHa = Glukuronihappo, Ksyl = Ksyloosi ja Ram = Ramnoosi ja DDMP = 2,3-dihydro-2,5-dihydroksi-6-metyyli-4H-pyran-4oni. Soijasapogenolit ja saponiinit: Kurasowa et al., 2002; Suopapuu-saponiini: Yang et al., 2013.

jolloin muodostuisi monodesmosidinen spirostaanisaponiini. Tämän F-renkaan aukeaminen ja sen C-26-hydroksyylin glykosylointi johtaisi vastaavan furostaanisaponiinin muodostumiseen. Entsymaattiset tutkimukset steroidiasaponiinien glykosylaatiosta tukevat jälkimmäistä synteesireittiä. Furostaanityyppisiä steroidiasaponiineja syntetisoivista kasveista on löydetty spesifisiä glukosyyli transferaaseja, jotka katalysoivat spirostaanisapogeniini-

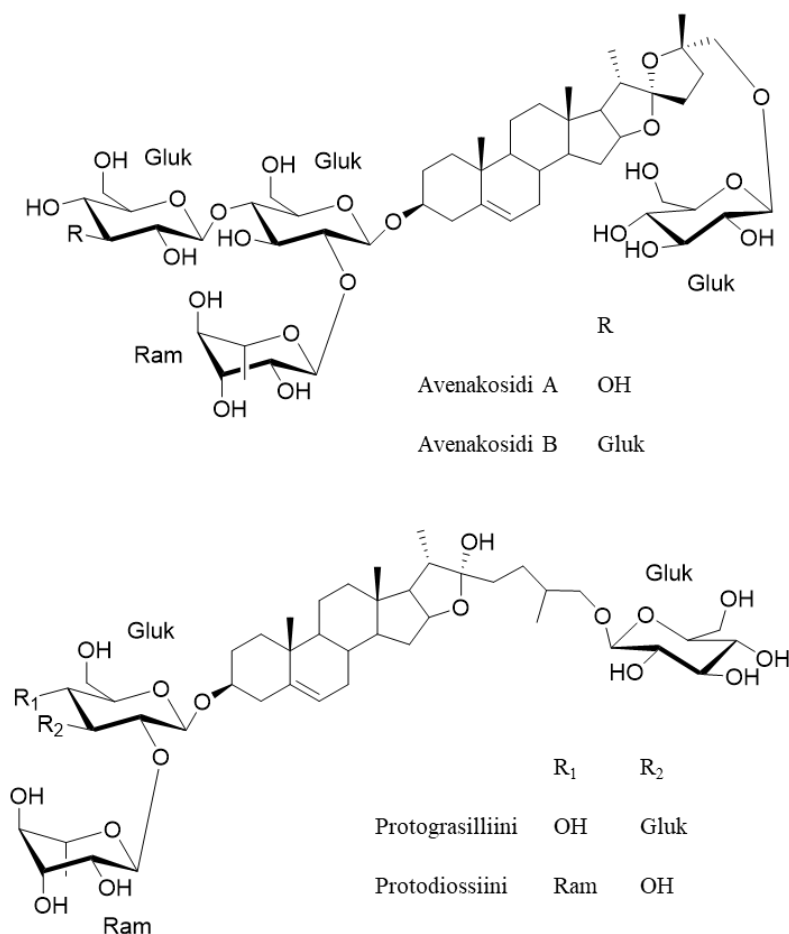
nien glukosylaatiota. Voidaan siis olettaa, että furostaanityyppiset steroidisaponiinit muodostuvat spirostaanityyppisistä. (Kalinowska et al., 2005) Steroidisaponiinien mahdolliset biosynteesireitit on esitetty kuvassa 7.



**Kuva 7.** Steroidisaponiinien furostaani- ja spirostaanityyppien mahdolliset biosynteesireitit kolesterolin hapetusreaktioiden jälkeen. Gluk = Glukoosi. Mukailtu artikkelista Kalinowska et al. 2005.

Furostaanisaponiinit ovat biologisesti inaktiivisia ja toimivat todennäköisesti steroidisaponiinien varastomuotona. Kun kasvi joutuu puolustamaan itseään, furostaanisaponiinit muuttuvat entsyymien katalysoimana spirostaanisaponiineiksi, jotka ovat hyvin myrkyllisiä. Entsyymejä, jotka katalysoivat C-26-hydroksyylin glukoosin irtoamista, kutsutaan glykosyylihydrolaaseksi tai glykosidaaseiksi (Kalinowska et al., 2005; Osbourn, 1996). Juuri tälle reaktiolle spesifisiä glykosyylihydrolaaseja on löydetty saponiineja sisältävistä kasveista, kuten kaurasta (*Avena sativa*) (Gus-Mayer et al., 1994), jamssista (*Dioscorea caucasica*) (Gurielidze et al., 2004) ja kostuskasvista (*Costus speciosus*) (Inoue and Ebizuka, 1996; Inoue et al., 1996).

Kauran saponiinit avenakosidi A ja B (kuva 8) sijaitsevat vakuolissa (Kesselmeier and Urban, 1983), kun taas  $\beta$ -glukosidaasi avenakosidaasi sijaitsee kloroplastissa (Nisius, 1988). Mekaaninen rasite tai patogeenin hyökkäys kasviin aiheuttaa solukon hajoamisen ja saponiinien ja entsyymien jaottelu eri soluelimiin hajoo. Tällöin entsyymi ja saponiinit pääsevät vuorovaikutukseen toistensa kanssa. Avenakosidaasi katalysoi C-26-hiilessä olevan glukoosin irtoamista avenakosidi A:sta ja B:stä, jolloin muodostuvat monodesmosidiset 26-desgluko-avenakosidi A ja B. Muodostuneet saponiinit ovat sienille myrkyllisiä (Osborn, 1996). Avenakosidaasi on eristetty ja puhdistettu pimeässä kasvatetuista kauran taimista ja sen on havaittu olevan spesifinen  $\beta$ -sokereille (Gus-Mayer et al., 1994).



**Kuva 8.** Steroidisaponiinien rakenteita. Gluk = Glukoosi ja Ram = Ramnoosi. Lähde: Kalinowska et al., 2005.

Jamssin lehdillä tehdyt värjäystutkimukset osoittavat, että furostaanityyppiset saponiinit sijaitsevat kasvin epidermissä, kun taas niille spesifinen  $\beta$ -glukosidaasi sijaitsee mesofyllissä (Gurielidze et al., 2004). Entsyymi ja sille sopivat substraatit on siis jaoteltu

eri osiin jamssin lehdissä. Tutkimuksissa kostuskasvin (*Costus speciosus*) juurakoista on löydetty furostaanityypisille saponiineille spesifinen  $\beta$ -glukosidaasi (Inoue and Ebizuka, 1996; Inoue et al., 1996). Entsyymien aktiivisuutta testattiin kahdella steroidisaponiinilla, protograsilliinilla ja protodiossiinilla (kuva 8), sekä kolmella kaupallisella  $\beta$ -glukosidilla (Inoue and Ebizuka, 1996). Molemmat steroidisaponiinit olivat hyviä substraatteja, mutta toiset  $\beta$ -glukosidit eivät. Havaittiin myös, että spirostaanityyppinen steroidisaponiini diosgeniini inhiboi entsyymiä voimakkaasti. Tulosten perusteella tutkittu  $\beta$ -glukosidaasi on hyvin spesifinen entsyymi, joka tunnistaa sekä spirostaani- että furostaaniyhdisteitä ja katalysoi furostaaniglykosidien C-26-glukoosin irroittamista.

Kaikki kasvit sisältävät steroliglykosyyli transferaaseja, joita tarvitaan steroidiglykosidien muodostumisessa (Haralampidis et al., 2002). Näiden lisäksi saponiineja sisältävistä kasveista on löydetty glykosyyli transferaaseja, jotka ovat spesifejä steroidisaponiinien muodostumiselle. Näiden entsyymien toiminta tukee näkemystä, että spirostaanisaponiinit ovat furostaanisaponiinien biologisia prekursoreita. Tulosten perusteella voidaan myös havaita korrelaatiota kasvin tuottamien sapogeenien ja entsyymien välillä. (Kalinowska et al., 2005)

Kaurasta (*Avena sativa*) karakterisoitujen saponiinien avenakosidi A:n ja B:n aglykoni on pseudospirostanoli nuatigeniini ja niiden rakenteissa on haarautuneet sokeriketjut, jotka ovat liittyneet C-3-hiileen (Kalinowska et al., 2005). Steroidisaponiinien muodostumista kaurassa on tutkittu [ $^{14}\text{C}$ ] -merkkiainetutkimuksilla (Kalinowska and Wojciechowski, 1986; Kalinowska and Wojciechowski, 1987). Tutkimuksissa löydettiin spesifinen entsyymi, joka katalysoi glukoosin liittymistä nuatigeniiniin, jolloin muodostui nuatigeniini-3-O- $\beta$ -D-glukopyranosidi. Entsyymien ei havaittu glukosyloivan nuatigeniinin C-26-hiilen hydroksyyli ryhmää. Osittain puhdistetulla entsyymillä tehdyt testit osoittivat, että UDP-glukoosi toimi parhaana sokeridonorina nuatigeniinin glukosylaatioissa (Kalinowska and Wojciechowski, 1988). Entsyymien havaittiin glukosyloivan myös muita 3- $\beta$ -OH-steroidisapogeeniineja, sekä joitain steroidialkaloideja. Aktiivisuutta ei kuitenkaan havaittu testatuilla 3- $\alpha$ -OH-steroideilla. Voidaan siis olettaa, että substraatin  $\beta$ -konfiguraatio on tärkeä entsyymien aktiivisuuden kannalta.

Kahden eri parsalajikkeen (*Asparagus officinalis*, *Asparagus plumosus*) glykosyyli transferaaseja on tutkittu [ $^{14}\text{C}$ ] -merkkiainetutkimuksilla (Paczkowski and Wojciechowski, 1988; Paczkowski et al., 1990). Molemmista kasveista on löydetty kaksi eri glykosyyli transferaasia: toinen katalysoi sitosterolin glukosylaatiota ja toinen

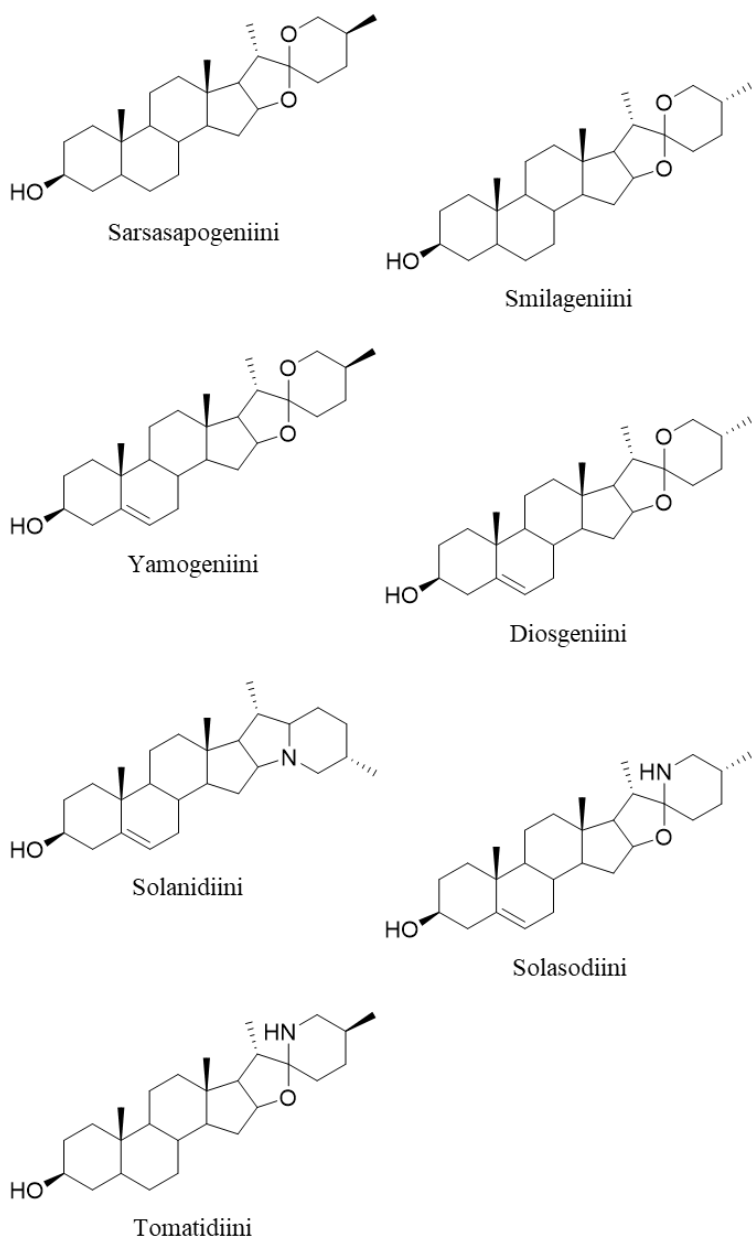
steroidisapogeeniini glykosylaatiota. Parsasta (*Asparagus officinalis*) löydetyn glykosyyli transferaasin havaittiin katalysoivan parhaiten sarsasapogeeniiniin ja smilageniiniin glykosylaatiota (Paczkowski and Wojciechowski, 1988). Sarsasapogeeniini ja sen 25-epimeeri smilageniini ovat molemmat 5- $\beta$ -H-yhdisteitä (kuva 9). Muut testatut aglykonit eivät olleet yhtä hyviä substraatteja. Olennaista entsyymille toiminnalle ovat ei-planaarinen rakenne ja mahdollisesti myös heterosyklinen rengassysteemi. (Paczkowski and Wojciechowski, 1988). Unelmasta (*Asparagus plumosus*) löydetyn glykosyyli transferaasin havaittiin katalysoivan parhaiten yamogeeniiniin ja sen 25-epimeerin, diosgeniiniin, glykosylaatiota (kuva 9) (Paczkowski et al., 1990). Muita hyviä substraatteja olivat isonuatigeniini ja tigogeeniini. Entsyymille toimimisen kannalta olennaista lienee planaarinen rakenne. Lisäksi tutkittiin, katalysoiko löydetty entsyymi bidesmosidisten saponiiniin muodostumisesta. Havaittiin, että entsyymi ei katalysoinut yamogeeniini-26-monoglukoosidin glykosylaatiota yamogeeniini-3,26-diglukoosidiksi. Tulokset tukevat näkemystä, jonka mukaan spirostaanisaponiinit muodostuvat ennen furostaanisaponiineja. (Paczkowski et al., 1990)

Steroidialkaloidisaponiineille spesifisiä glykosyyli transferaaseja on löydetty muun muassa perunasta (*Solanum tuberosum*) ja tomaatin lehdistä (*Lycopersicon esculentum*) (Zimowski, 1994). Perunasta eristettiin ja puhdistettiin entsyymi, joka katalysoi solanidiiniin (kuva 9) glukosylaatiota UDP-glukoosin läsnä ollessa. Entsyymille havaittiin katalysoivan myös tomatidiiniin ja solasodiiniin (kuva 9) glukosylaatiota. Reaktiota ei tapahtunut, kun substraatteina käytettiin 3-OH-steroideja, joilta puuttui rengastyyppi. Testattuja yhdisteitä olivat muun muassa kolesteroli ja diosgeniini. Glykosylaatiota ei tapahtunut UDP-galaktoosin läsnä ollessa, mutta sen ei havaittu myöskään inhiboivan reaktiota. Tulosten perusteella eristetty entsyymi on hyvin spesifinen steroidialkaloideille (Stapleton et al., 1991). Tomaatin lehdistä eristettiin ja puhdistettiin entsyymi, joka katalysoi tomatidiini johdannaisen, 3 $\beta$ -D-monogalaktopyranosidin, muodostumista UDP-galaktoosin läsnä ollessa. Tomatidiiniin lisäksi entsyymi pystyi katalysoimaan solasodiiniin glykosylaatiota, mutta solanidiini tai kolesteroli eivät käyneet substraateiksi. Kyseinen entsyymi on tomatidiinille spesifinen galaktosyyli transferaasi (Zimowski, 1994).

Saponiineilla on lukuisia biologisia, fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia, johtuen niiden erilaisista ja monimuotoisista rakenteista. Biologisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi antibakteriaaliset, antiviraaliset, ja antikarsinogeeniset ominaisuudet. Saponiinit



ovat tyypillisesti maultaan kitkeriä ja ärsyttävät kurkkua ja niitä on pyritty poistamaan ruoka-aineista. (Oleszek and Hamed, 2010)



**Kuva 9.** Steroidisapogeniiniin ja steroidialkaloidisapogeniiniin rakenteita. Lähde: Kalinowska et al., 2005.

Amfifiilisen rakenteensa vuoksi saponiinit ovat pinta-aktiivisia aineita. Tällaisilla yhdisteillä on vaahdonmuodostus-, emulsionmuodostus- ja pesuaineominaisuuksia (Oleszek and Hamed, 2010). Pinta-aktiivisina aineina saponiinit muodostavat misellejä vesiliuksissa, kun niiden konsentraatio ylittää kriittisen misellinmuodostuskonsentraa-

tion (Oakenfull, 1986). Saponiineja sisältävien kasvien raakauutteiden vaahdonmuodostus vaihtelee suuresti (Góral and Wojciechowski, 2020). Lisäksi on suurta eroa siinä, miten kirjallisuudessa saponiinien esiintyminen raportoidaan; joidenkin kasvien on vain mainittu sisältävän saponiineja, kun taas toisista kasveista saponiineja on karakterisoitu tarkasti. Testattaessa 45:n eri potentiaalisesti paljon saponiineja sisältävien kasvien raakauutteiden vaahdonmuodostusta ja pintajännitystä niiden välillä on havaittu merkittäviä eroja (Góral and Wojciechowski, 2020). Tutkimuksessa vaahdon korkeus mitattiin ajanhetkellä 0 ja sen jälkeen 10 minuutin ajan. Korkein vaahto hetkellä 0 min oli havaittavissa seuraavilla uutteilla: kaunokaisen kukat (*Bellis perennis*), rohtosuopayrtin juuret (*Saponaria officinalis*), kultapiiskun yrtit (*Solidago virgaurea*) ja kvinoan siemenet (*Chenopodium quinoa*) (Góral and Wojciechowski, 2020). Vain kolmella näytteellä vaahdot pysyivät muuttumattomina 10 minuutin ajan. Nämä olivat rohtosuopayrtti, hevoskastanjan siemenet (*Aesculus hippocastanum*) ja kvinoa. Pintajännitystestissä kauran siementen (*Avena sativa*) uute alensi pintajännitystä eniten. Toiseksi ja kolmanneksi parhaat tulokset saatiin rohtosuopayrtin ja kvinoan uutteilla. (Góral and Wojciechowski, 2020)

Saponiinien kyky muodostaa stabiileja vaahtoja riippuu myös niiden rakenteesta (Boettcher and Drusch, 2016). Kuuden eri saponiiniseoksen vaahdonmuodostustestissä havaittiin selviä eroja. Tutkimuksessa vertailtiin suopapuun kuoresta (*Quillaja saponaria*), harsokasvista, kamellian siemenistä (*Camellia oleifera*), hevoskastanjoista (*Aesculus hippocastanum*), lakritsikasvista (*Glycyrrhiza glabra*) ja okarennokin hedelmistä (*Tribulus terrestris*), eristettyjä saponiiniseoksia. Näistä kaksi ensimmäistä sisältävät bidesmosidisiä triterpeenisisaponiineja, kolme seuraavaa monodesmosidisiä triterpeenisisaponiineja ja viimeinen steroidisisaponiineja. Lakritsikasvin saponiinien sokerien lukumäärä on selvästi muita triterpeenisisaponiineja alhaisempi. Voimakkain vaahdonmuodostus, sekä sen pysyvyys havaittiin suopapuun, harsokasvin, kamellian ja hevoskastanjojen saponiineilla (Boettcher and Drusch, 2016). Lakritsikasvilla konsentraation kaksinkertaistaminen tuotti yhtä hyviä tuloksia. Okarennokin saponiinit eivät muodosta neet vaahtoa. Tulosten perusteella saponiinien vaahdonmuodostukseen vaikuttavat niin aglykonin rakenne kuin siihen liittyneiden sokerien määrä. Triterpeenisisaponiinit muodostavat pysyviä vaahtoja vesiliuoksissa, mutta steroidisisaponiinit eivät. Sokeriketjujen määrällä ei ole suurta vaikutusta vaahdonmuodostukseen. Liittyneiden sokerien lukumäärä vaikuttaa kuitenkin saponiinien liukoisuuteen ja siten vaahtoavuuteen. (Boettcher and Drusch, 2016)

Kasvin raakauutteen muodostamaan vaahtoon vaikuttavat myös kasvin osa ja kasvukauden vaihe (Góral et al., 2018). Rohtosuopayrtin raakauutteen vaahtonmuodostusta testattiin keräämällä sitä kasvukauden eri vaiheissa ja erottelemalla siitä juuret, lehdet, varret ja kukat. Puolet kasvimateriaaleista kuivattiin ennen uuttoa ja toinen puolet uutettiin sellaisenaan. Tuoreiden kasvimateriaalien uutteista paras vaahtonmuodostus havaittiin kukilla (Góral et al., 2018). Juuriuutteen vaahtonmuodostus oli selvästi huonoin kukinta-aikana kesäkuussa. Heinäkuussa selvästi huonoin vaahtonmuodostus havaittiin varsiuutteella. Tuoreiden kasviuutteiden vaahtonpysyvyys oli kuitenkin yleisesti heikko, poikkeuksena kukkien uute, jonka vaahto pysyi muuttumattomana tarkastelun ajan. Kuivattujen kasvimateriaalien uutteiden vaahtonmuodostuksessa ei havaittu suuria eroja kasvukauden eri vaiheissa. Vaahtonpysyvyydessä juurien uute poikkesi selvästi muista ollen paras toukokuussa ja kesäkuussa kerätyistä materiaaleista. Heinäkuun näytteistä paras vaahtonpysyvyys havaittiin kukkien uutteella. Tulosten perusteella voidaan olettaa, että rohtosuopayrtin sisältämien saponiinien pitoisuus vaihtelee eri kasvin osien välillä ja kasvukauden aikana. (Góral et al., 2018)

Suopapuun (*Quillaja saponaria*) sisältämät ”suopapuu-saponiinit” muodostavat stabiileja emulsioita öljyn ja veden seoksissa. Ne pystyvät alentamaan pintajännitystä öljyn ja veden rajapinnalla ja muodostamaan nanokokoisia öljytippoja (Bai et al., 2016). Emulsioita pidetään kineettisesti stabiileina, kun öljytipat ovat tarpeeksi pieniä ja faasit eivät enää erotu toisistaan. Suopapuu-saponiinien muodostamia emulsioita stabiloi elektrostaattinen repulsio (Yang et al., 2013). Elektrostaattista repulsiota mitataan zeta-potentiaalilla, joka quillaja-saponiineilla on negatiivinen. Aglykonin sisältämä karboksyyli-ryhmä lienee syynä negatiiviseen arvoon. Suopapuu-saponiinien muodostamien emulsioiden stabiilisuus riippuu voimakkaasti pH:sta ja ionisesta voimasta (Yang et al., 2013). Happamissa olosuhteissa karboksyyli-ryhmät protonoituvat, jolloin elektrostaattinen repulsio ei pysty pitämään tippoja erillään, mikä johtaa aggregaatioon. Kun ionista voimaa kasvatetaan (>300 mM NaCl), varaukselliset ryhmät vuorovaikuttavat ionien kanssa ja elektrostaattinen repulsio vähenee. Tämän takia emulsio muuttuu hiutalemaiseksi. (Yang et al., 2013)

Rohtosuopayrtin, suopapuun ja soijapapujen saponiinit muodostavat misellejä vesiliuoksissa (Oakenfull, 1986). Misellien kokoon vaikuttaa saponiinien rakenne. Rohtosuopayrtin ja soijapapujen saponiinit muodostavat dimeerisiä misellejä, kun taas suopapuun saponiinit muodostavat isoja 50 molekyylin aggregaatteja. Saponiinit muodostavat misellejä myös sappihappojen kanssa ja myös niiden rakenne riippuu saponiinien rakenteesta.

Rohtosuopayrtin ja suopapuun saponiinit muodostavat säikeisiä rakenteita aglykonien pinoutuessa lomittain sappihappojen anionien kanssa. Soijapapujen saponiinit muodostavat löysiä rakenteita, jotka läpäisevät paljon vettä (Oakenfull, 1986). Saponiinien misellienmuodostukseen vaikuttaa myös lämpötila, pH ja suolan konsentraatio. Suopapuu-saponiinien (kuva 7) kriittiseksi misellikonsentraatioksi (CMC) on määritetty 0,5–0,8 g/L normaalilämpötilassa. Lämpötilan tai pH:n nostaminen nostaa myös cmc:ta, mutta suolan konsentraation nostaminen laskee cmc:tä. Misellien koko kasvaa voimakkaasti lämpötilan kasvaessa. PH:n tai suolan konsentraatio ei vaikuta misellien kokoon (Mitra and Dungan, 1997).

Tämä työ tehtiin yhteistyössä Kiillon kanssa ja tarkoituksena oli selvittää kotimaisten saponiineja sisältävien kasvien käytettävyyttä pyykinpesuaineissa. Nykypäivänä kuluttajat vaikuttavat olevan yhä tietoisempia käyttämistään tuotteista ja niiden sisältämistä yhdisteistä. He haluavat ostaa tuotteita, jotka sisältävät luonnollisia raaka-aineita, kun taas luokittelemattomat pesukemikaalit eivät innosta tekemään ostopäätöstä. Lisäksi kestävä kehitys ja uusiutuvien raaka-aineiden käyttö ovat monelle kuluttajalle tärkeitä arvoja. Työssä selvittiin kirjallisuuteen pohjautuen, mitä kotimaisia kasveja voisi hyödyntää saponiinien lähteinä. Tämän jälkeen luotiin menetelmää saponiinien eristämiseksi ja puhdistamiseksi. Työn aikana eri vaiheissa saaduista näytteistä tehtiin vaahtoavuus-, pintajännitys- ja pesuainetestejä.

## **2. Materiaalit ja menetelmät**

### **2.1 Materiaalit**

#### **2.1.1 Kasvimateriaalit**

Kirjallisuuden perusteella saponiinien lähteiksi valittiin kaura (Önning et al., 1993), rohtosuopayrtti (Hostettmann and Marston, 1995) ja sokerijuurikas (Mikołajczyk-Bator et al., 2016). Kauraa ostettiin yksityiseltä tuottajalta. Siitä eroteltiin juuret, varret, ohuet varret ja jyvät. Rohtosuopayrttiä kerättiin Turusta. Siitä eroteltiin juuret, varret ja lehdet. Sokerijuurikkaat sekä niistä sokerien erottelussa muodostunut leike saatiin Sucros oy:ltä. Juurikkaista eroteltiin juuret. Kaikki kasvimateriaalit pakastettiin ja kylmäkuivattiin. Ne jauhettiin tehosekoittimella ja hienompaa jauhetta jauhettiin kuulamylyllä noin 1,5 ml:n verran.

## 2.1.2 Reagenssit

Kasvien uutoissa käytettiin analyyttistä metanolia (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Ranska) ja A-laatuista etanolia (Altia Oyj, Rajamäki, Suomi). Neste-nesteuutoissa käytettiin dietyylieetteriä (Sigma-Aldrich, Israel) ja butanolia (Fischer Scientific, Loughborough, U.K). Pylväskromatografiassa käytettiin eluenteina kloroformia (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Ranska) ja analyyttistä metanolia (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Ranska). Preparatiivisessa korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (HPLC) käytettiin HPLC-laatuista metanolia (Honeywell, Charlotte, USA) ja 1 % muurahaishappoa (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Ranska). Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia-diodirividetektorimassaspektrometrilla tehdyissä analyyseissä (UPLC-DAD-MS) eluenteina käytettiin LC-MS-laatuista asetonitriiliä (Honeywell, Charlotte, USA) ja 0,1 % LC-MS-laatuista muurahaishappoa. Vesi puhdistettiin Millipore Synergy -vedenpuhdistajalla (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa).

## 2.2 Menetelmät

### 2.2.1 Uutot

Saponiinien uutumista valituista kasveista testattiin metanolin ja etanolin vesiliuoksilla (2:8, 1:1, 8:2, 1:0, v/v) parhaimman uuttoluotoksen löytämiseksi. Kasvimateriaaleina käytettiin kauran ja rohtosuopayrtin kuulamyllyllä jauhettuja osia. Jokaisesta eri uuttoluotoksen ja kasvimateriaalin yhdistelmästä tehtiin kaksi vertailunäytettä. Kasvimateriaaleja punnittiin 10 mg:aa eppendorf-putkiin, joihin lisättiin 1,0 ml:aa uuttoluotinta. Näytteitä maseroitiin uuttoluotoksessa yön yli, jonka jälkeen niitä ravisteltiin tasoravistelijassa (280 rpm) kolme tuntia. Uuttoluotin dekantoiitiin ja uuttojäännökseen lisättiin 1,0 ml:aa uuttoluotinta. Näytteitä ravisteltiin ja uuttoluotin dekantoiitiin, kuten edellä. Uutteista haihdutettiin orgaaninen faasi ja ne kylmäkuivattiin. Kuivatut uutteet liuotettiin 1,0 ml:aan vettä ja ne analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä (kohta 2.2.4). Sokerijuurikkaan juurien ja leikkeen uuttoa testattiin metanolin vesiliuoksella (2:8, v/v), kuten edellä. Uutteista haihdutettiin orgaaninen faasi ja ne kylmäkuivattiin. Kuivatut uutteet liuotettiin 1,0 ml:aan vettä ja ne analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä (kohta 2.2.4).

Uuttoliuottimien testauksen jälkeen kasvimateriaalit uutettiin valitulla uuttoliuottimella. Rohtosuopayrtin uuttoa varten sen eri osat yhdistettiin. Kasvimateriaalia maseroitiin etanolin vesiliuoksessa (2:8, v/v) viikko, jonka jälkeen sitä ravisteltiin tasoravistelijassa (280 rpm) vuorokausi. Uuttoliuos dekantoitiin ja uuttojäännökseen lisättiin etanolin vesiliuosta (2:8, v/v). Utto toistettiin viisi kertaa. Utteista haihdutettiin orgaaninen faasi, ne kylmäkuivattiin ja punnittiin. Rohtosuopayrtin utteet yhdistettiin, uudelleen liuotettiin veteen ja kylmäkuivattiin. Sokerijuurikkaan leikettä maseroitiin etanolin vesiliuoksessa (2:8, v/v) neljä viikkoa. Utto tehtiin, kuten edellä ja se toistettiin 13 kertaa. Utteista haihdutettiin orgaaninen faasi, ne kylmäkuivattiin ja punnittiin. Sokerijuurikkaan utteet yhdistettiin, uudelleen liuotettiin veteen ja kylmäkuivattiin.

Raakauutteiden puhdistamista neste-nesteuutolla testattiin käyttämällä rohtosuopayrtin raakauutetta. Ensin testattiin rasvanpoistoa dietyylieetterillä. Raakauutetta punnittiin  $3 \times 1$  mg eppendorf-putkiin. Niihin lisättiin 0,5 ml:aa vettä ja 0,5 ml:aa dietyylieetteriä. Näytteitä ravisteltiin ja eetterifaasi pipetoitiin pois. Vesifaasit analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä (kohta 2.2.4). Seuraavaksi testattiin neste-nesteuuttoa butanolilla. Raakauutetta punnittiin  $3 \times 1$  mg eppendorf-putkiin. Niihin lisättiin 0,5 ml:aa vettä ja 0,5 ml:aa butanolia. Uttoa testattiin myös jo eetterillä uutetulla materiaalilla. Eetteriuuttojen vesifaaseihin lisättiin 0,5 ml:aa butanolia. Näytteitä ravisteltiin ja butanolifaasi pipetoitiin pois. Vesifaasit analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä (kohta 2.2.4).

## 2.2.2 Pylväskromatografia

Pylväskromatografiassa stationäärifaasina käytettiin silikageeliä (Silikageeli kolonnikromatografiaa varten, 60, Sigma-Aldrich, Sveitsi). Silikageeli valmistettiin turvottamalla jauhetta kloroformin ja metanolin liuoksessa (8:2, v/v). Geeli applikoitiin lasipylvääseen ( $40 \times 4$  cm) ja sitä tasapainotettiin kloroformin ja metanolin liuoksella (80:20, v/v). Pylvään läpi pumpattiin eri eluenteja 5 ml/min -virtauksella Perkin Elmer series 200 LC-pumpulla. Kerättyjen fraktioiden tilavuus oli 500 ml:aa.

Rohtosuopayrtin raakauutetta punnittiin 9,00 g:aa ja se liuotettiin veteen. Liuos applikoitiin lasipylväässä olevan silikageelin päälle. Fraktioinnissa käytetyt eluentit on esitetty taulukossa 1. Fraktiot analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä (kohta 2.2.4). Rohtosuopayrttiuutteen fraktiointi toistettiin kolme kertaa. Ensimmäisen fraktioinnin tulosten perusteella

protokollaa muutettiin ja fraktiointien 2–4 eluentit on esitetty taulukossa 2. Fraktioinneissa 2–4 käytettiin 9,00 g:aa raakautetta liuotettuna veteen. Toisen fraktioinnin fraktiot analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä.

Sokerijuurikkaan raakautetta punnittiin 7,00 g:aa ja se liuotettiin veteen. Uute ei kuitenkaan liennut kokonaan, vaan jäi sameaksi. Fraktiointi suoritettiin, kuten edellä (taulukko 2). Fraktiot analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä. Fraktioista haihdutettiin orgaaninen faasi. Valitut fraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin.

**Taulukko 1.** Rohtosuopayrttiuutteen ensimmäisessä fraktioinnissa käytetyt eluentit ja niiden tilavuudet.

fraktion nro	eluentit	v:v
1	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	80:20:0
2	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	79:26:1
3	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	78:32:2
4	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	77:38:3
5	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	76:44:4
6	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	75:50:5
7	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	40:50:5
8	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	0:50:5
9	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	0:25:5
10	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	0:0:1

**Taulukko 2.** Rohtosuopayrttiuutteen fraktioinneissa 2–4 sekä sokerijuurikas uutteen fraktioinnissa 1 käytetyt eluentit ja niiden tilavuudet.

fraktion nro	eluentit	v:v
1	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	40:50:5
2	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	0:50:5
3	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	0:25:5
4	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O	0:0:1

### 2.2.3 Preparatiivinen HPLC

Rohtosuopayrtin pylväskromatografisesti puhdistettua fraktiota puhdistettiin preparatiivisella HPLC-menetelmällä. Laitteisto koostui pumpusta (Waters Delta 600 LC), injektorista (Waters 600 controller), kolonnista, diodirividetektorista (Waters 2998 PDA) ja fraktionkerääjästä (Waters Fraction Collector III). Käytetty kolonni oli 327 × 33 mm, käsin täytetty CiChrorep RP-18 (40–63 µm) -materiaalilla (Merck K6aA, Darmstadt,

Germany). Eluentin virtausnopeus oli 8,0 ml/min. Eluenteina käytettiin HPLC-laatuista metanolia (A) ja 1 % muurahaishapon vesiliuosta (B). Puhdistuksen gradientti on esitetty taulukossa 3.

Fraktionkerääjällä kerättiin automaattisesti 120 fraktiota, joiden tilavuus oli 8 ml:aa. Ensin tehtiin testiajo parhaan keruuvälin selvittämiseksi. Keräämistä intensiteetin perusteella ei voitu käyttää, sillä saponiinit eivät ole UV-aktiivisia. Valittua fraktiota punnittiin 508 mg:aa 10 ml:n lasipulloon ja liuotettiin 3 ml:aan vettä. Näyte suodatettiin 0,2 µm:n PTFE-suodattimella. Pullo ja suodatin huuhdeltiin vielä 0,5 ml:lla vettä. Fraktioista joka neljäs analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä (kohta 2.2.4).

Valittua fraktiota puhdistettiin kaksi rinnakkaista kertaa. Näytettä punnittiin kummallakin kerralla 806 mg:aa. Se liuotettiin 4,5 ml:aan vettä ja suodatettiin 0,2 µm:n PTFE-suodattimella. Pullo ja suodatin huuhdeltiin vielä 0,5 ml:lla vettä. Fraktiot kerättiin välillä 180–260 min. Neljännen puhdistuksen fraktioista 30–70 joka toinen analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä. Fraktioista haihdutettiin orgaaninen faasi, valitut fraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin. Yhdistetyt fraktiot punnittiin ja analysoitiin UPLC-DAD-MS:llä.

**Taulukko 3.** Preparatiivisessa HPLC-menetelmässä käytetty gradientti, A= metanoli, B=1 % muurahaishapon vesiliuos

aika (min)	A (%)	B (%)
0	0	100
5	0	100
180	40	60
220	60	40
240	80	20
260	80	20
270	0	100
300	0	100

#### 2.2.4 UPLC-DAD-ESI-Orbitrap-MS-analyysi

Näytteet analysoitiin Acquity UPLC-DAD-laitteistolla (Waters Corp., Milford, MA, USA), johon oli yhdistetty hybridi kvadrupoli-Orbitrap-massaspektrometri (Q Exactive<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Germany). Ionisaatiomenetelmänä käytettiin sähkösumutus-ionisaatiota negatiivisella moodilla (H-ESI II, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Saksa). UV- ja MS-dataa kerättiin 0–16 minuutin ajan



*m/z*-alueelta 150–2000 Da ja aallonpituusalueelta 190–500 nm. Desolvaatiokaasuvirtaus oli 1000 l/h ja kartiokaasuvirtaus 100 l/h. Desolvaatiolämpötila oli 650 °C. Kapillaarijännite oli 3,4 kV. Kartiojännite oli 30 V. Käytetty kolonni oli 100 mm × 2,1 mm i.d, 1,7 µm Acquity UPLC BEH C18 -kolonni (Waters Corp.). Eluentin virtausnopeus oli 0,4 ml/min. Eluenteina käytettiin asetonitriiliä (A) ja 0,1 % muurahaishapon vesiliuosta (B). Analyysin gradientti on esitetty taulukossa 4. Data käsiteltiin Xcalibur-ohjelmistolla (Thermo Fisher Scientific).

**Taulukko 4.** UPLC-DAD-ESI-Orbitrap-MS-analyysissä käytetty gradientti, A=asetonitriili, B=0,1 % muurahaishapon vesiliuos.

aika (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
1	25	75
9	37	63
11,5	95	5
12	95	5
14	10	90
16	10	90

### 2.2.5 Pesutestit

Kiillolle toimitettiin näytteitä työn eri vaiheissa. Uuttojen jälkeen rohtosuopayrtin raakauutetta toimitettiin 15 g:aa ja sokerijuurikkaan raakauutetta 4 g:aa. Pylväskromatografisesti fraktioitua rohtosuopayrttiä toimitettiin 4 g:aa ja preparatiivisella HPLC-menetelmällä puhdistettuja saponiineja noin 100 mg:aa. Näytteistä tehtiin pintajännitys-, vaahtoavuus- ja pesutestejä Kiillon protokollan mukaisesti. Vaahtoavuustestit tehtiin täyttämällä 100 ml:n mittalasi täyteen testattavaa liuosta ja kääntämällä sitä ylösalaisin 10 kertaa. Vaahdon korkeus mitattiin viivoittimella hetkellä 0 s, 10 s, 30 s, 60 s ja 120 s. Pintajännitys mitattiin Force Tensiometer – K6 -mittarilla. Näytteiden yhteensopivuutta pesuaineiden kanssa testattiin lisäämällä 50 g:aan pyykinpesunestettä 4 %:a näytettä.

Rohtosuopayrtin ja sokerijuurikkaan raakauutteista valmistettiin 0,2 % liuokset vaahtoavuus- ja pintajännitystestejä varten. Rohtosuopayrtin raakauute liukeni veteen (20 °C) hyvin ja melko nopeasti. Sokerijuurikkaan raakauute ei liennut hyvin veteen pitkän sekoituksen jälkeen, mikä on ollut havaittavissa muissakin työn vaiheissa. Veden lämpötilan nostamisella (30 °C) ei ollut vaikutusta raakauutteiden liukoisuuteen.

Fraktioidusta raakauutteesta valmistettiin 0,1 % liuos ja puhdistetuista saponiineista 0,05 % liuos vaahtoavuus- ja pintajännitystestejä varten. Molemmat näytteet liukenivat veteen hyvin (20 °C).

### 3. Tulokset

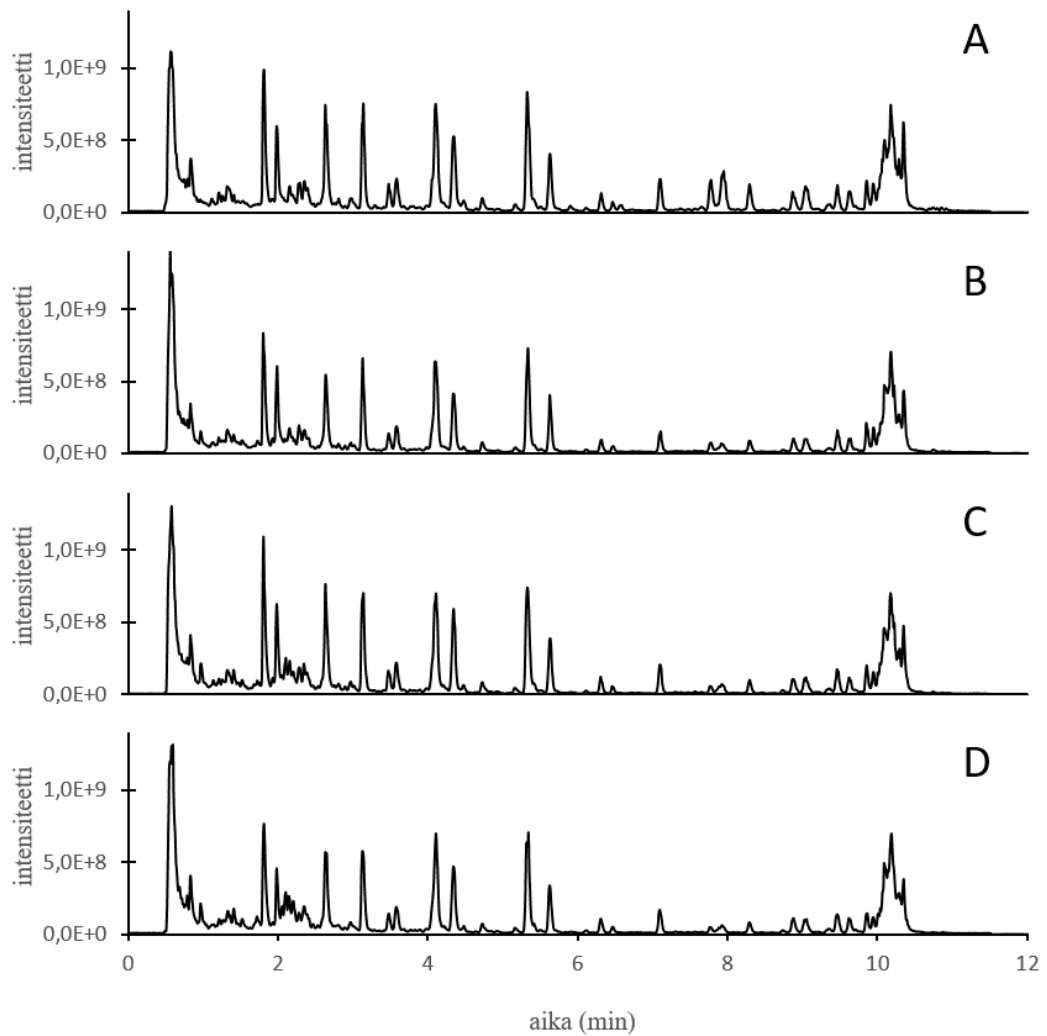
#### 3.1 Uttoliuottimen vaikutus saponiinien uuttumiseen

Uttoliuotinvertailussa uuttoliuottimista metanolin ja etanolin vesiliuokset (2:8, 1:1, 8:2, v/v), sekä metanoli osoittautuivat melkein yhtä tehokkaiksi (kuvat 10 ja 11). 100 % etanolin ei havaittu uuttavan saponiineja. Ensin uutoissa päätettiin käyttää metanolin vesiliuosta (2:8, v/v), koska sen havaittiin olevan hieman etanolin vesiliuosta (2:8, v/v) tehokkaampi ja saponiinien uuttamista sokerijuurikkaasta testattiin sillä. Jotta orgaanisen liuottimen määrä olisi mahdollisimman pieni, valittiin metanolin ja veden suhteeksi 2:8. Jatkossa uuttoliuottimeksi valittiin kuitenkin etanolin vesiliuos (2:8, v/v), koska kehitettäessä menetelmää kaupalliseen sovellutukseen haluttiin välttää myrkyllisiä orgaanisia liuottimia.

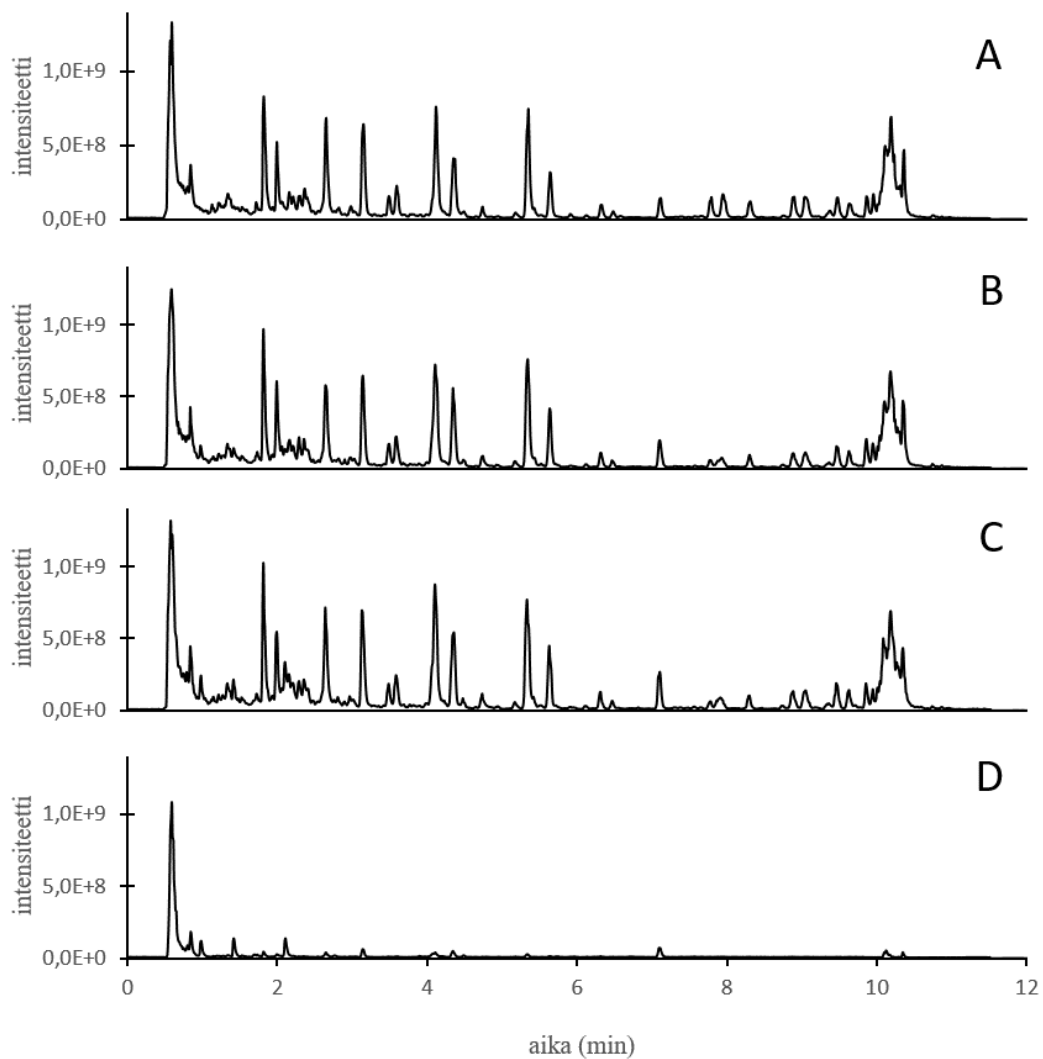
Rohtosuopayrtin lehtien, juurien ja varsien havaittiin sisältävän runsaasti eri saponiiniyhdisteitä. Eri kasvinosissa havaittiin myös samoja yhdisteitä, joten ne päätettiin yhdistää koko kasvimateriaalin uuttoa varten. Rohtosuopayrtin raakauutteen kokonaismassa oli  $m = 80,16$  g. Sokerijuurikkaan juurien ja leikkeen havaittiin sisältävän saponiiniyhdisteitä. Samoja yhdisteitä havaittiin molemmissa materiaaleissa ja ne yhdistettiin koko kasvimateriaalin uuttoa varten. Sokerijuurikkaan uuttojen kokonaissaanto oli  $m = 33,6$  g. Kaurasta ei tunnistettu tunnettuja saponiineja, joten sitä ei uutettu suuremmassa mittakaavassa. Rohtosuopayrtin ja sokerijuurikkaan raakauutteiden kokonaisionikromatogrammit on esitetty kuvissa 12 ja 13 ja niihin on merkitty niistä tunnistetut saponiinit (taulukot 6 ja 7).

Rohtosuopayrtin raakauutteen ja sen neste-nesteuuttojen tuloksia vertailtiin suodatettujen kromatogrammien (Extracted ion chromatogram, EIC) avulla. Vertailu tehtiin raakauutteesta tunnistetuista saponiineista. Merkittäviä eroja ei havaittu saponiinien jakautumisessa veden ja dietyylieetterin tai veden ja butanolin välillä. Kuvassa 14 on esitetty raakauutteen sekä nestenesteuuttojen vesifaasien kokonaisionikromatogrammit. Epäpuhtaudet eivät olleet uuttuneet dietyylieetteriin, kuten toivottiin. Butanoliuutossa saponiinit

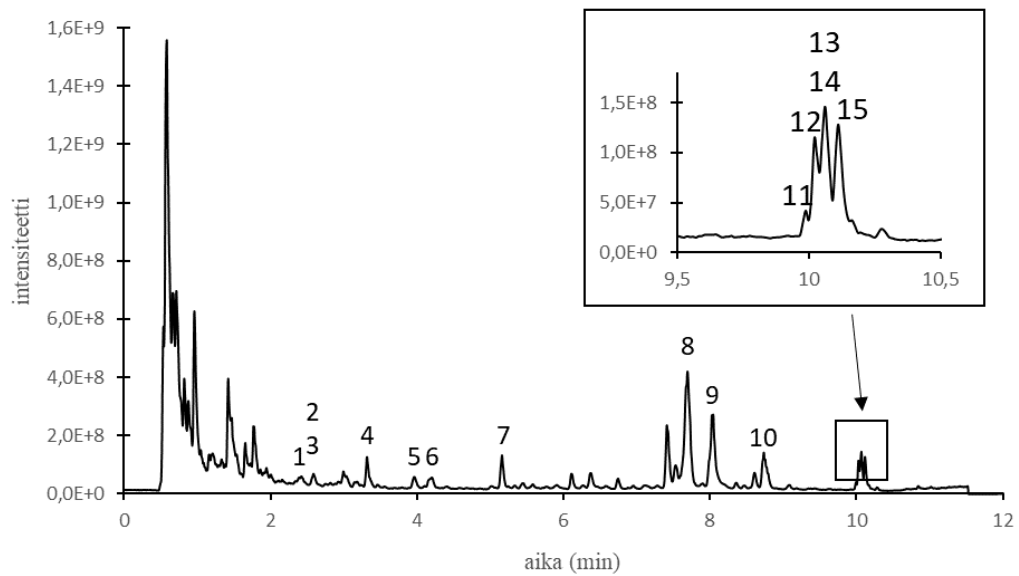
jakautuivat vesifaasiin toisin kuin oletettiin. Tulosten perusteella raakauutteen puhdistus päätettiin aloittaa pylvaskromatografialla ilman esipuhdistusta nestenesteuutoilla.



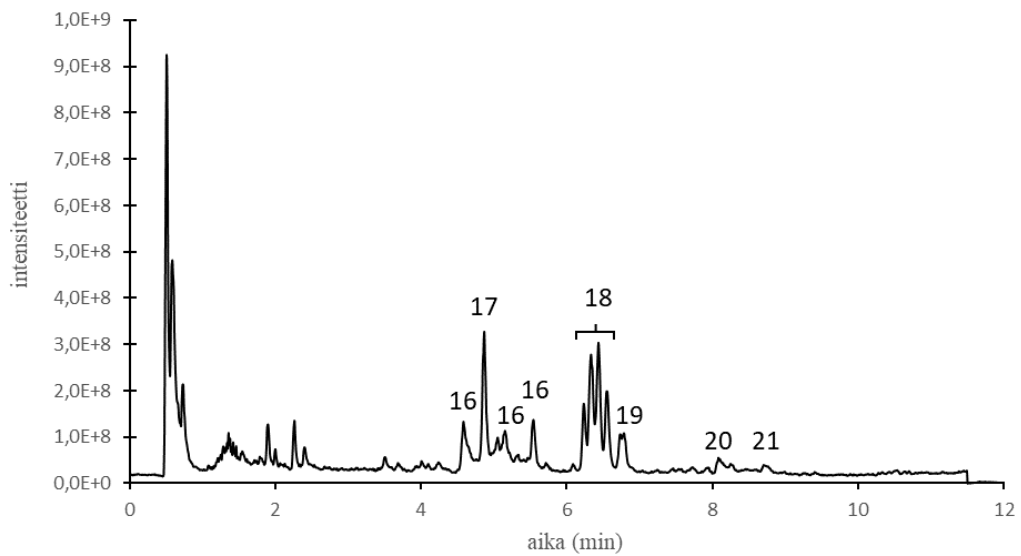
**Kuva 10.** Rohtosuopayrtin juuren metanolilla ja sen eri vesiliuoksilla tehtyjen uuttestien kokonaisonikromatogrammit. A = 20 % metanolin vesiliuos (2:8, v/v), B = 50 % metanolin vesiliuos (1:1, v/v), C = 80 % metanolin vesiliuos (8:2, v/v) ja D = 100 % metanoli.



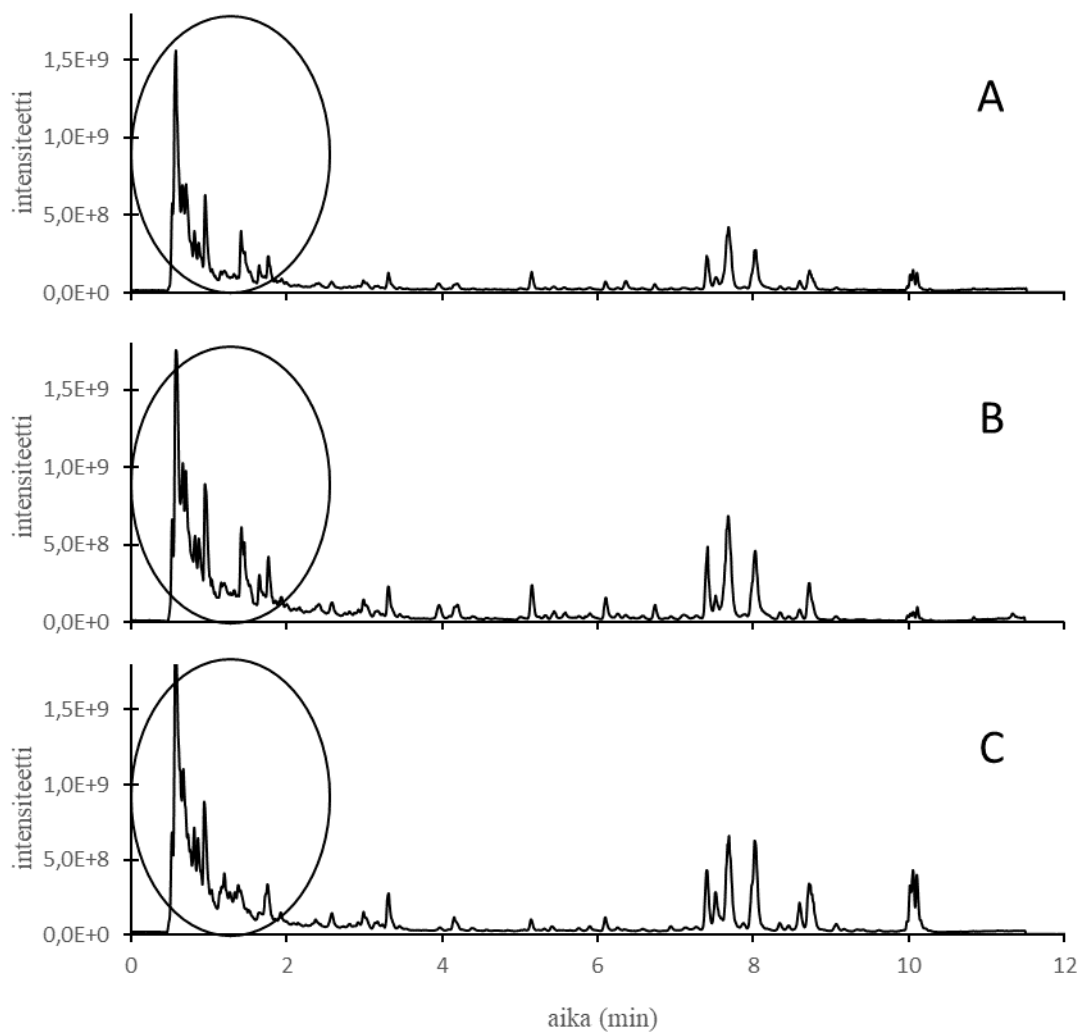
**Kuva 11.** Rohtosuopayrtin juuren etanolilla ja sen eri vesiliuksilla tehtyjen uuttestien kokonaisionikromatogrammit. A = 20 % etanolin vesiliuos (2:8, v/v), B = 50 % etanolin vesiliuos (1:1, v/v), C = 80 % etanolin vesiliuos (8:2, v/v) ja D = 100 % etanoli.



**Kuva 12.** Rohtosuopayrtin raakauutteen kokonaisionikromatogrammi (1 mg/ml). Kuvaan on merkitty siitä tunnistetut tunnetut saponiinit 1–15 (taulukko 6).



**Kuva 13.** Sokerijuurikkaan raakauutteen kokonaisionikromatogrammi (1 mg/ml). Kuvaan on merkitty siitä tunnistetut tunnetut saponiinit 17 ja 19–21, sekä saponiineiksi oletetut yhtisteet 16 ja 18 (taulukko 7).

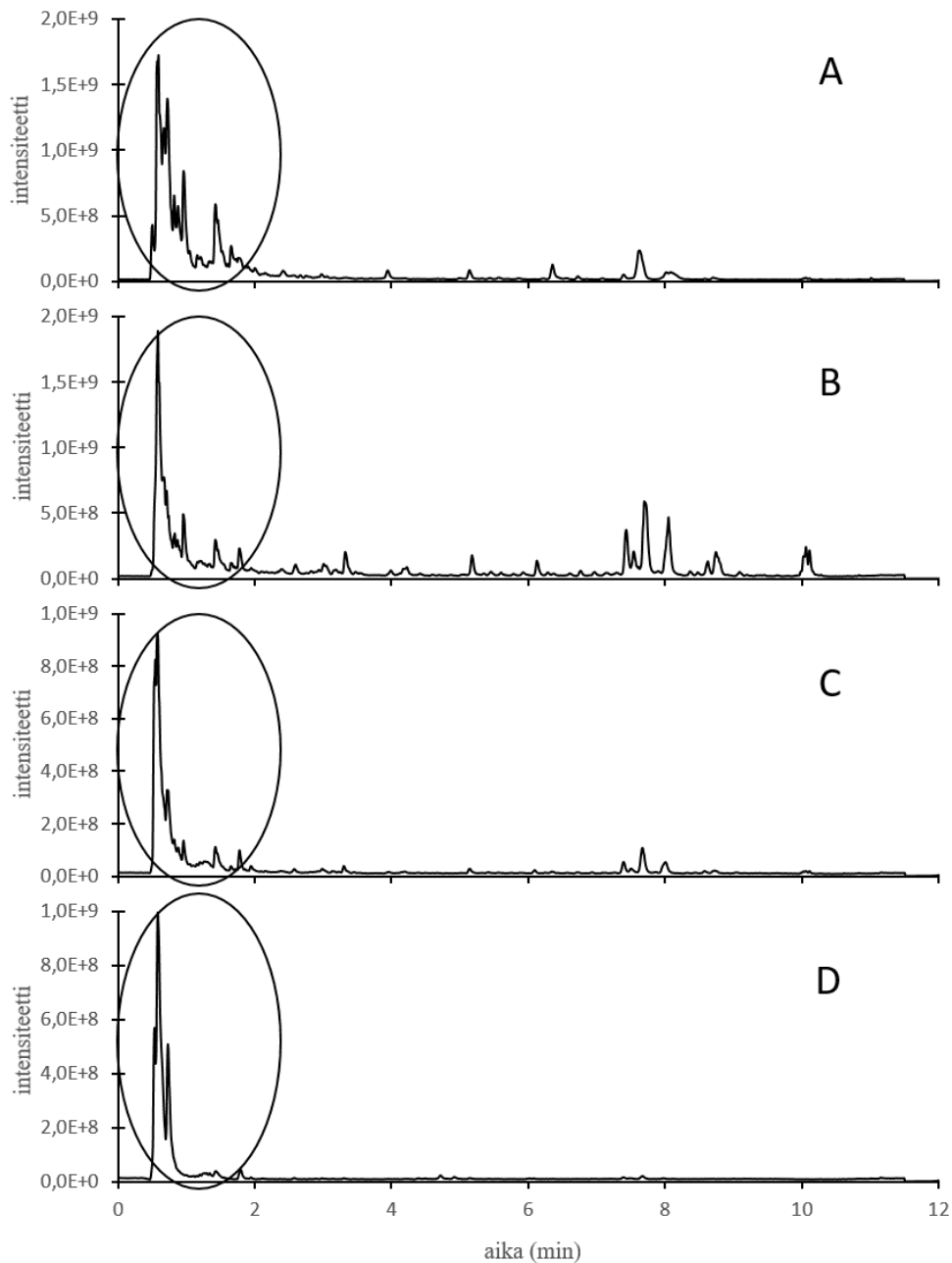


**Kuva 14.** Rohtosuopayrtin nestenesteuuttojen kokonaisionikromatogrammit. A = raakauute (1 mg/ml), B = raakauutteen dietyylieetteriuuton vesifaasi (1 mg raakauutetta + 0,5 ml dietyylieetteriä + 0,5 ml vettä), C=raakauutteen butanoliuuton vesifaasi (1 mg raakauutetta + 0,5 ml butanolia + 0,5 ml vettä). Kuvaan on merkitty ei-halutut yhdisteet.

### 3.2 Rohtosuopayrtin ja sokerijuurikkaan pylväskromatografinen fraktioiminen

Rohtosuopayrtin raakauutteen ensimmäisen fraktioinnin UPLC-DAD-MS-analyysien tulosten perusteella saponiineja havaittiin fraktioissa 8, 9 ja 10. Parhaiten saponiinit eluoi- tuivat fraktiossa 8. Kloroformin ei havaittu eluoivan saponiineja, joten fraktiointiproto-

kollaa muutettiin lyhyemmäksi niin, että vain ensimmäisessä fraktiossa käytettiin eluentina kloroformin, metanolin ja veden liuosta (40:50:5). Oletettiin, että saponiinit eluoutuivat vasta toisessa fraktiossa.



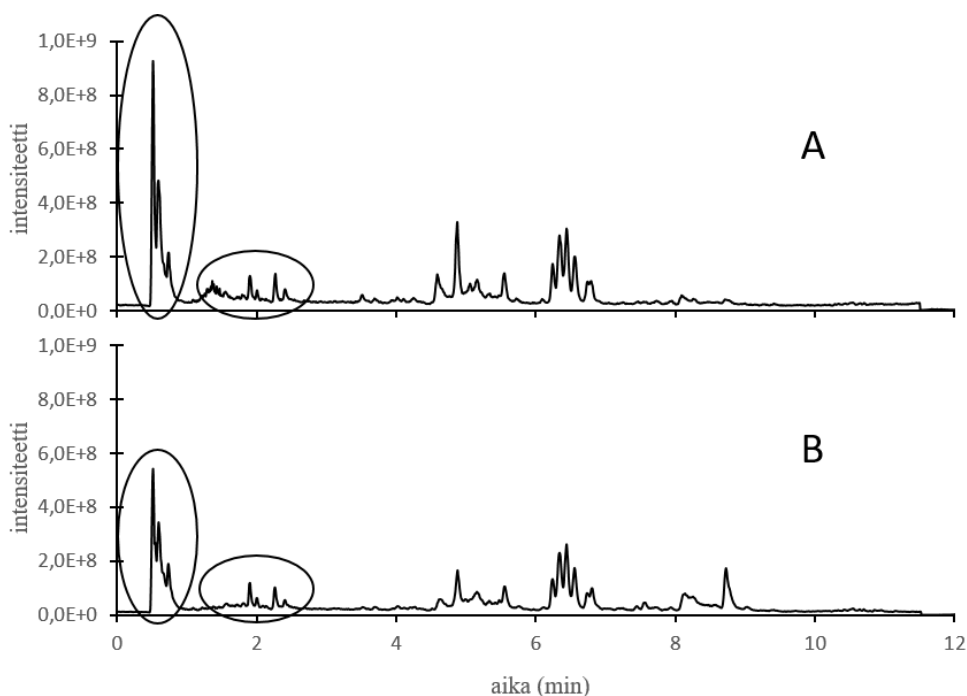
**Kuva 15.** Rohtosuopayrtin yhdistettyjen pylväskromatografiafraktioiden kokonaisioni-kromatogrammit. A = fraktiot 1, B = fraktiot 2, C = fraktiot 3, D = fraktiot 4. Kuvaan on merkitty ei-halutut yhdisteet.

Toisen fraktioinnin tulosten perusteella havaittiin kuitenkin, että saponiineja oli eluoinut jonkin verran jo ensimmäiseen fraktioon. Parhaiten saponiinit eluoutuivat fraktioon

kaksi, kuten oletettiin. Fraktiossa kolme havaittiin vielä vähäisiä määriä saponiineja, mutta fraktiossa neljä ei ollut enää saponiineja (kuva 15). Kloroformin suhde metanoliin olisi pitänyt oletettavasti olla suurempi, jotta saponiinit olisivat pidättyneet kolonnissa. Pylväskromatografialla saponiineista saatiin eroteltua ei-haluttuja yhdisteitä, mutta ei niin hyvin kuin oletettiin.

Rohtosuopayrtin fraktiointien 1–4 fraktiot yhdistettiin: fraktiot 1–7 (1. fraktiointi) + fraktiot 1 (2.-4. fraktiointi), fraktio 8 (1. fraktiointi) + fraktiot 2 (2.-4. fraktiointi), fraktio 9 (1. fraktiointi) + fraktiot 3 (2.-4. fraktiointi). Yhdistettyjen metanolin vesiliuoksella (50:5, v/v) eluotujen fraktioiden saanto oli:  $m = 14,04$  g. Näitä fraktioita päätettiin jatkopuhdistaa preparatiivisella HPLC-menetelmällä.

Sokerijuurikkaan pylväsfraktiointi ei toiminut odotetusti. Uute ei liennut veteen, eikä veden ja metanolin liuokseen, vaan jäi sameaksi. Lisäksi se sakkasi voimakkaasti pylväässä. UPLC-DAD-MS-analyysien perusteella sokerijuurikkaan fraktiot 2–4 yhdistettiin. Kylmäkuivauksen jälkeen fraktiot punnittiin. Fraktioiden 2–4 saanto oli noin puolet lähtömateriaalista;  $m = 3,10$  g. Saponiineista ei kuitenkaan saatu eroteltua ei-haluttuja yhdisteitä (kuva 16). Päätettiin, ettei sokerijuurikasta fraktioita enempää, eikä sitä puhdisteta preparatiivisella HPLC:llä.



**Kuva 16.** Sokerijuurikkaan raakuutteen (A) sekä yhdistettyjen pylväskromatografiafraktioiden 2–4 (B) kokonaisionikromatogrammit. Kuvaan on merkitty ei-halutut yhdisteet.



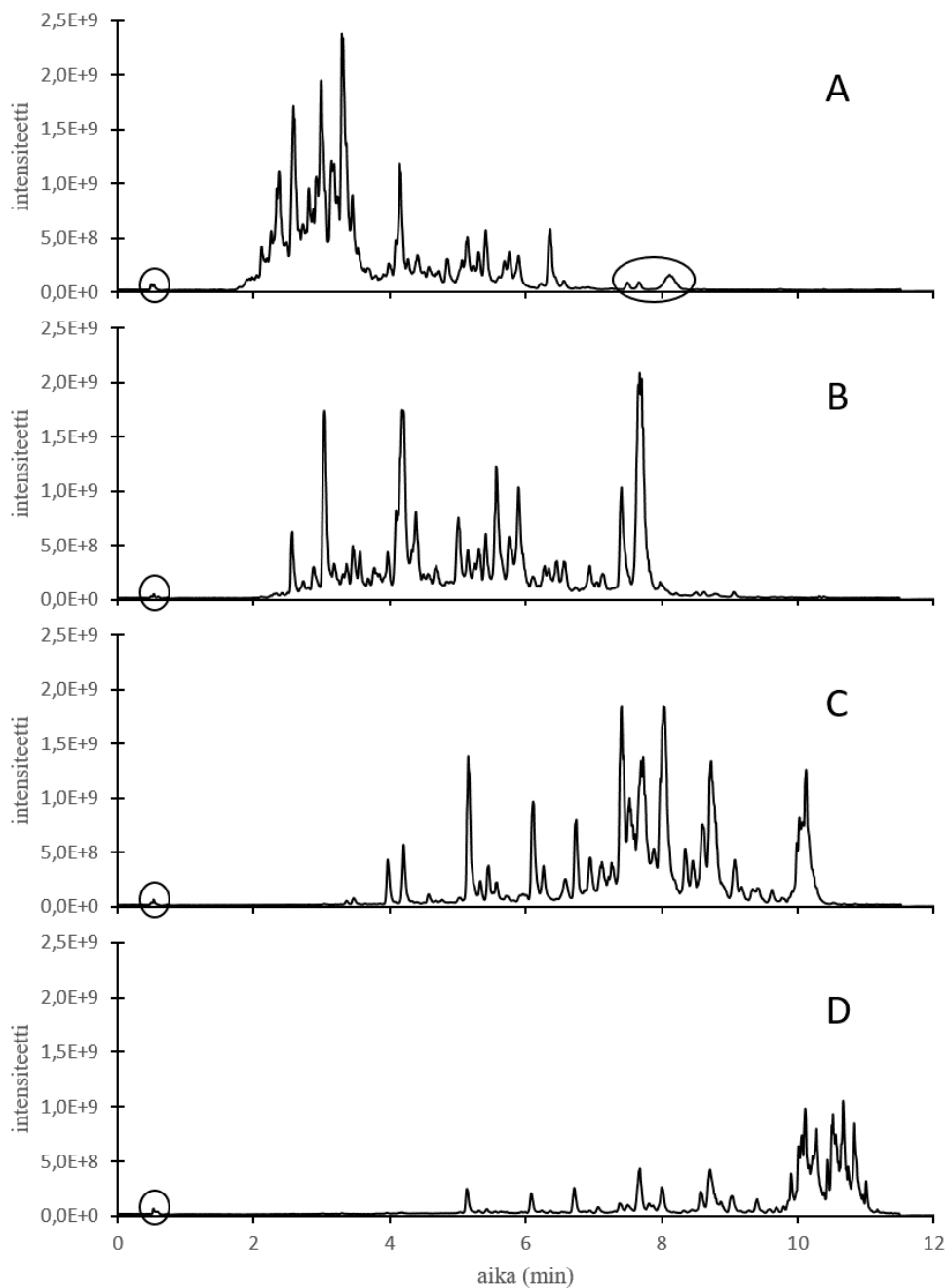
### 3.3 Rohtosuopayrtin fraktioidun raakauutteen preparatiivinen HPLC-puhdistus

Testipuhdistuksessa havaittiin, että saponiinit eluoituivat 210 ja 250 minuutin välillä. Tämän perusteella toisessa ja kolmannessa puhdistuksessa fraktionkerääjä asetettiin keräämään välillä 180–260 min, jotta saponiinit saatiin varmasti talteen. Kolmannen puhdistuksen UPLC-DAD-MS-analyysien perusteella fraktiot yhdistettiin. Jokaisen puhdistuksen fraktiot yhdistettiin erikseen niin, että kustakin puhdistuksesta yhdistettiin fraktiot 32–47, 48–53, 54–62 ja 63–70. Fraktiot 1–31 ja 71–80 kustakin puhdistuksesta hävitettiin. Kylmäkuivauksen jälkeen yhdistetyt fraktiot punnittiin ja niiden massat on esitetty taulukossa 5.

Yhdistettyjen fraktioiden UPLC-DAD-MS-analyysien perusteella havaittiin, että saponiineista oli saatu erotettua ei-haluttuja yhdisteitä hyvin. Lisäksi havaittiin, että HPLC-menetelmällä pystyttiin erottelemaan myös saponiineja toisistaan (kuva 17). Tämän ansiosta fraktioista pystyttiin tunnistamaan myös uusia saponiineja, joita raakauutteesta ei ollut havaittu (taulukko 8). Saponiinien kokonaissaanto jäi kuitenkin hyvin alhaiseksi (n. 7 %).

**Taulukko 5.** Preparatiivisella HPLC-menetelmällä puhdistettujen ja kylmäkuivattujen fraktioiden massat.

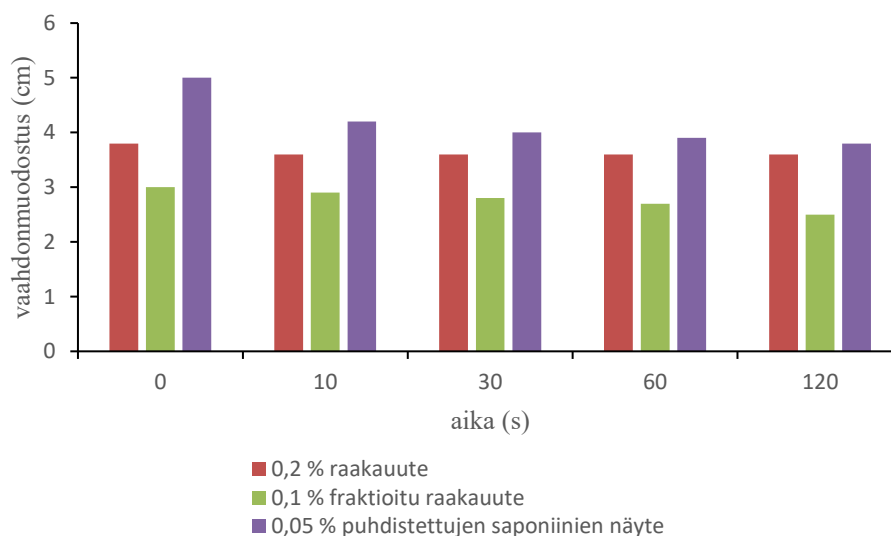
fraktiointi (nro)	fraktio (nro)	massa (mg)
1	32–47	5,9
1	48–53	2,8
1	54–62	24
1	63–70	1,3
2	32–47	10,0
2	48–53	3,7
2	54–62	37,5
2	63–70	1,5
3	32–47	11,6
3	48–53	4,5
3	54–62	36,7
3	63–70	1,6



**Kuva 17.** Preparatiivisella HPLC-menetelmällä puhdistettujen, yhdistettyjen ja kylmäkuivattujen kolmannen puhdistuksen fraktioiden kokonaisionikromatogrammit (1 mg/ml): A = fraktiot 32–47, B = fraktiot 48–53, C = fraktiot 54–62 ja D = fraktiot 63–70. Kuvaan on merkitty ei-halutut yhdisteet.

### 3.4 Vaahdonmuodostus-, pintajännitys- ja pyykinpesutestit

Sokerijuurikkaan raakautetta sisältävän näytteen vaahdonmuodostus oli heti laskeva. Rohtosuopayrtistä valmistetuista näytteistä 0,05 % puhdistettuja saponiineja sisältävän liuoksen vaahdonmuodostus oli paras. Toiseksi paras vaahdonmuodostus oli 0,2 % raakautteen liuoksella ja huonoin 0,1 % fraktioidun raakautteen liuoksella. Puhdistettuja saponiineja sisältävällä näytteellä saatiin siis parhaimmat tulokset vaahdonmuodostustestissä, vaikka sen pitoisuus oli alhaisin. Fraktioidun raakautteen tulokset olivat melkein yhtä hyvät kuin raakautteen, vaikka ensimmäisen pitoisuus oli puolet pienempi kuin jälkimmäisen. Vaahdonmuodostustestin tulokset on esitetty kuvassa 18. Pintajännitystestissä puhdistettuja saponiineja sisältävällä näytteellä saatiin parempi tulos (56,1 mN/m) kuin fraktioidulla raakautteella (62,2 mN/m), vaikka sen pitoisuus oli puolet pienempi. Raakautteella pintajännitystä ei testattu.



**Kuva 18.** Rohtosuopayrtin raakautteen, fraktioidun raakautteen ja puhdistettujen saponiinien vaahdonmuodostus mittalasiltestissä. Vaahdonkorkeus  $\pm 0,2$  cm.

Näytteiden toimivuutta pesuaineissa testattiin raakautteilla. Rohtosuopayrtin raakauute liukeni pyykinpesunesteeseen hyvin, mutta sokerijuurikkaan raakauute sakkasi voimakkaasti. Näiden seosten sekä pelkän pyykinpesunesteen vaahdonmuodostusta testattiin 30 °C:ssa vedessä. Havaittiin, että pelkän pyykinpesunesteen vaahdonmuodostus oli

paras. Raakauutteita sisältävistä liuoksista parempi vaahdonmuodostus oli rohtosuopayrtin raakauutetta sisältävällä näytteellä. Varsinaisessa pyykinpesutestissä raakauutteita sisältävillä pesuaineilla ei saatu hyviä tuloksia. Pelkkä hanavesikin pesi joissain tapauksissa tehokkaammin. Rohtosuopayrtin raakauutetta sisältävä pesuaine oli tehokkaampi kuin sokerijuurikkaan raakauutetta sisältävä pesuaine.

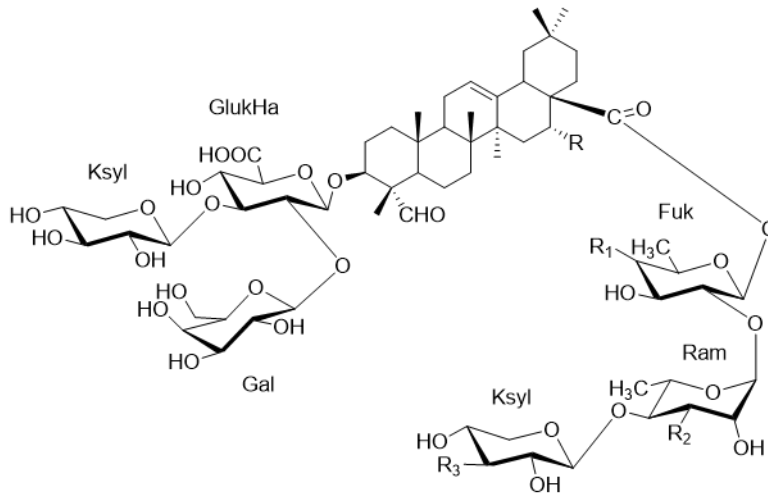
Vaahdonmuodostus- ja pintajännitystestien tulokset antavat olettaa, että puhdistettujen saponiinien pesuteho olisi testatuista näytteistä paras. Saponiinien alhainen kokonaisuus (7 %) preparatiivisessa HPLC-puhdistuksessa viittaa siihen, että saponiinien pitoisuus rohtosuopayrtin raakauutteessakin on alhainen. Alhainen saponiinipitoisuus selittää myös fraktioidun raakauutteen vaahtoavuus- ja pintajännitystestien tuloksia sekä raakauutteen tehottomuutta pesutesteissä. Vaikka näytteet sisältävät saponiineja, joilla oletetaan olevan pesevä vaikutus, ne sisältävät paljon myös muita yhdisteitä, jotka häiritsevät pesureaktioita.

### 3.5 Saponiinien tunnistaminen

Saponiinit tunnistettiin alustavasti kasvimateriaaleista uuttestien UPLC-DAD-MS-mittauksista saatujen tarkkojen massojen avulla. Ionien massojen avulla laskettiin yhdisteiden tarkka massa ja ennustettiin niiden molekyylikaava. Massoja ja molekyylikaavoja verrattiin kirjallisuudesta löytyneisiin karakterisoiuihin saponiineihin. Saponiinit tunnistettiin tarkemmin raakauutteista ja preparatiivisella HPLC-menetelmällä puhdistetuista fraktioista. Tunnistettujen saponiinien rakenteet on esitetty kuvissa 19–23.

Rohtosuopayrtin raakauutteesta tunnistettiin yhteensä 15 tunnettua saponiinia. Kaikki tunnistetut saponiinit ovat bidesmosidisiä triterpeenisisaponiineja. Tunnistetut saponiinit ovat saponiini 2 (1) (Moniuszko-Szajwaj et al., 2013), saponiini 1 (2) (Lu et al., 2015), saponariosidi F/I (3) (Jia et al., 1999; Koike et al., 1999), saponiini 6 (4) (Lu et al., 2015), saponariosidi C/D (Jia et al., 1999) (5), saponariosidi F/I (6) (Jia et al., 1999; Koike et al., 1999), saponariosidi C/D (7), saponiini 12 (8) (Lu et al., 2015), saponiini 4 (9), saponiini 5 (10) (Moniuszko-Szajwaj et al., 2016), saponiini 11 (11) (Lu et al., 2015), saponiini 1 (12) (Moniuszko-Szajwaj et al., 2016), saponariosidi A (13) (Jia et al., 1998), saponariosidi B/saponiini 13/saponiini 3 (14) (Jia et al., 1998; Lu et al., 2015; Moniuszko-Szajwaj et al., 2016), saponiini 2 (15) (Moniuszko-Szajwaj et al., 2016). Saponariosidi

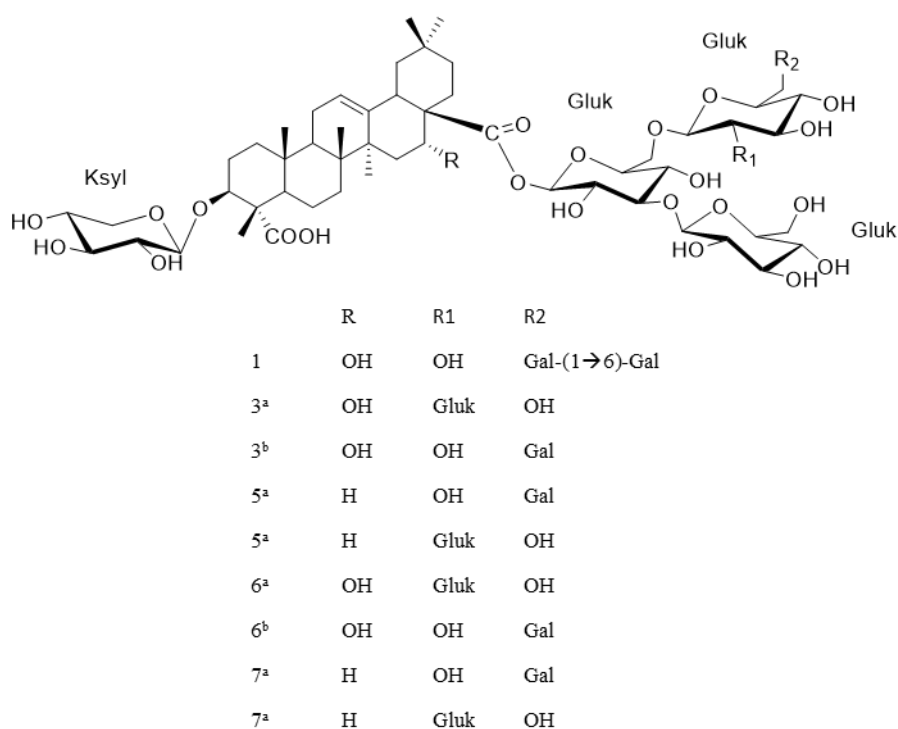
B:tä, saponiini 13:a ja saponiini 3:a ei pystytty erottelemaan toisistaan, sillä niillä kaikilla on sama molekyylikaava. Saponariosidi C:llä ja D:llä, sekä F:llä ja I:llä on keskenään sama molekyylikaava, joten niitä ei pystytty erottelemaan toisistaan. Niitä vastaavat molekyyli-ionit havaittiin kuitenkin selvästi kahdella eri retentioajalla, joten voitiin olettaa, että molemmat yhdisteet löytyvät raakauutteesta. Taulukossa 6 on esitetty rohtosuopayrtin raakauutteesta tunnistetut tunnetut saponiinit.



	R	R1	R2	R3
2	OH	OH	Gluk	OH
4	OH	Gal	6-O-aset.Gluk	OH
8	H	OH	Gluk	Ksyl
9	OH	4-O-aset.Kvin	OH	Gluk
10	OH	4-O-aset.Kvin	6-O-aset.Gluk	OH
11	H	OH	6-O-aset.Gluk	OH
12	OH	Ksyl-(1→3)-4-O-aset.Kvin	OH	Gluk
13	OH	Ksyl-(1→3)-4-O-aset.Kvin	OH	Ksyl
14 <sup>a</sup>	OH	4-O-aset.Kvin	OH	Ksyl
14 <sup>b</sup>	OH	Ksyl-(1→3)-4-O-aset.Kvin	OH	OH
14 <sup>c</sup>	H	OH	6-O-aset.Gluk	Ksyl
15	OH	Ksyl-(1→3)-4-O-aset.Kvin	6-O-aset.Gluk	OH

**Kuva 19.** Rohtosuopayrtin raakauutteesta tunnistettujen saponiinien 2, 4 ja 8–15 rakenteet. Yhdisteellä 14 on useampi mahdollinen rakenne: a = Jia et al., 1998, b = Lu et al., 2015, c = Moniuszko-szajwaj et al., 2016. aset. = asetyyli, Fuk = Fukoosi, Gal = Galaktoosi, Gluk = Glukoosi, GlukHa = Glukuronihappo, Ksyl = Ksyoosi, Ram = Ramnoosi ja Kvin = Kvinovoosi.

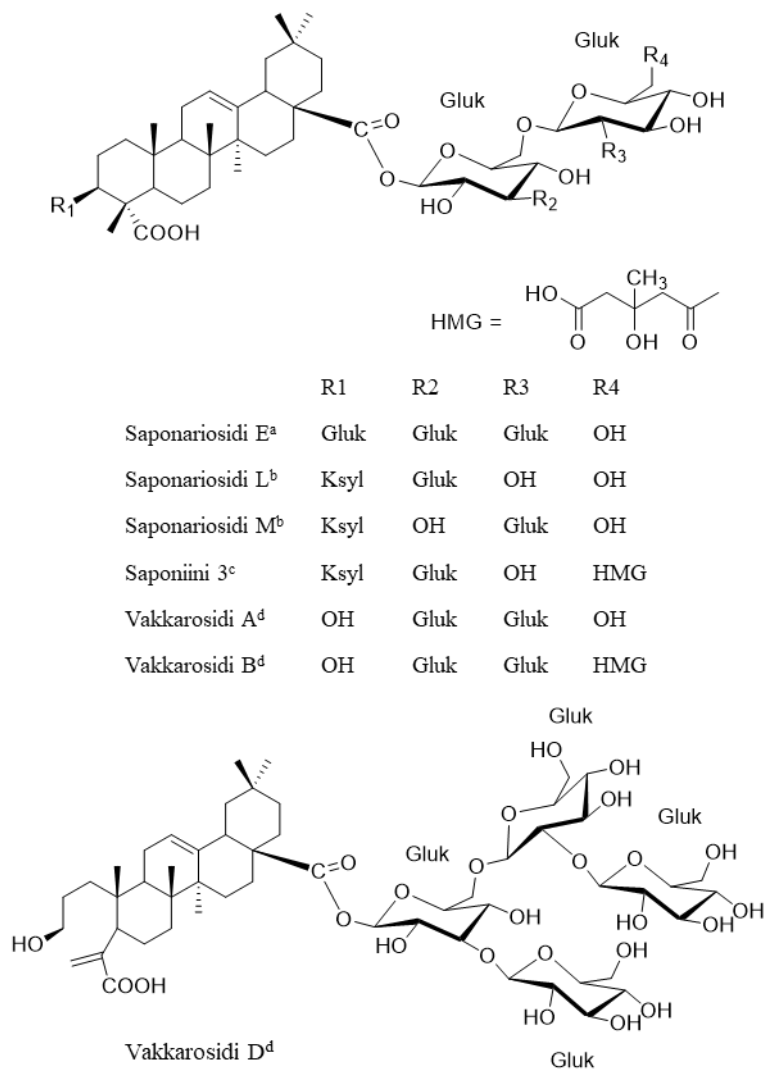
Sokerijuurikkaan raakauutteesta tunnistettiin yhteensä neljä tunnettua saponiinia, sekä kaksi saponiinia, joita ei ole kirjallisuuden mukaan karakterisoitu tarkasti. Kaikki tunnistetut yhdisteet ovat triterpeenisisaponiineja. Tunnistetut saponiinit ovat betavulgarosidi 6 (17), betavulgarosidi 8 (19), betavulgarosidi 1 (20) ja betavulgarosidi 3 (21) (Mikołajczyk-Bator et al., 2016). Kaksi muuta saponiinia on karakterisoitu diokso-laani-heksoosi-uronihappo-hederageniiniksi (16) ja diokso-laani-heksoosi-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>-uro-nihappo-hederageniiniksi (18) (Mikołajczyk-Bator et al., 2016). Taulukossa 7 on esitetty sokerijuurikkaan raakauutteesta alustavasti tunnistetut tunnetut saponiinit sekä saponi-neiksi oletetut yhdisteet.



**Kuva 20.** Rohtosuopayrtin raakauutteesta tunnistettujen saponiiniinien 1, 3 ja 5–7 rakenteet. Yhdisteillä 3, 5, 6 ja 7 on kaksi mahdollista rakennetta: a = Jia et al., 1999, b = Koike et al., 1999. Gal = Galaktoosi, Gluk = Glukoosi ja Ksyl = Ksyloosi.

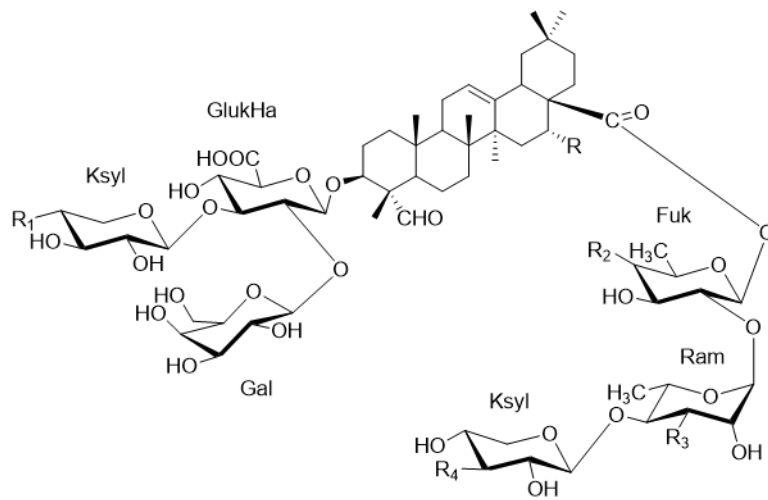
Preparatiivisella HPLC-menetelmällä puhdistetuista rohtosuopayrtin fraktioista tunnistettiin samat 15 saponiinia kuin raakauutteestakin. Lisäksi tunnistettiin 11 uutta tunnettua saponiinia. Tunnistetuista saponiineista bidesmosidisiä triterpeenejä oli kahdeksan ja monodesmosidisiä triterpeenejä kolme. Tunnistetut saponiinit ovat saponariosidi E (Jia et al., 1998), saponariosidi L tai M (Koike et al., 1999), saponiini 3, saponiini 4, saponiini





**Kuva 22.** Preparatiivisella HPLC-menetelmällä kolmannella kerralla puhdistetuista fraktioista tunnistettujen saponiinien rakenteita. Gluk = Glukoosi HMG = 3-hydroksyyli-3-metyyliglutaroyyli ja Ksyl = Ksyloosi. a = Jia et al., 1999, b = Koike et al., 1999, c = Moniuszko-Szajwaj et al., 2013 ja d = Koike et al., 1998.





	R	R1	R2	R3	R4
Saponiini 3 <sup>a</sup>	OH	OH	OH	Gluk	Ksyl
Saponiini 4 <sup>a</sup>	OH	OH	OH	6-O-aset.Gluk	Ksyl
Saponiini 5 <sup>a</sup>	OH	OH	Gal	Gluk	OH
Saponiini 8 <sup>a</sup>	OH	Gal	OH	Gluk	OH
Saponiini 7 <sup>a</sup>	OH	OH	Gal	Gluk	Ksyl
Saponiini 10 <sup>a</sup>	H	OH	OH	Gluk	OH

**Kuva 23.** Preparatiivisella HPLC-menetelmällä kolmannella kerralla puhdistetuista frak-  
tioista tunnistettujen saponiinien rakenteita. aset. = asetyyli, Fuk = Fukoosi, Gal = Galak-  
toosi, Gluk = Glukoosi, GlukHa = Glukuronihappo, Ksyl = Ksyloosi ja Ram = Ramnoosi.  
a = Lu et al., 2015.

Taulukko 6. Rohtosuopayrtin raakauutteesta tunnistetut saponiinit 1–15 sekä niiden retentioajat, molekyylikaavat ja UPLC-DAD-MS-mittauksista saatu MS-data.

nro	yhdiste	retentioaika (min)	molekyyli-kaava	[M–H] <sup>-</sup>	muut <i>m/z</i> -arvot	havaittu tarkka massa	laskettu tarkka massa	virhe (ppm)	viitteet
1	Saponiini 2	2,58	C <sub>65</sub> H <sub>104</sub> O <sub>35</sub>	1443,6315	744,31484 (M+46–2H) <sup>2-</sup> ; 721,31191 (M–2H) <sup>-</sup>	1444,6387	1444,6362	-1,7804	Moniuszko-Szajwaj et al., 2013
2	Saponiini 1	2,99	C <sub>70</sub> H <sub>110</sub> O <sub>37</sub>	1541,6670	793,33318 (M+46–2H) <sup>2-</sup> ; 770,32920 (M–2H) <sup>2-</sup>	1542,6743	1542,6730	-0,8634	Lu et al., 2015
3	Saponariosidi F/I	2,99	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>30</sub>	1281,5765	663,28838 (M+46–2H) <sup>2-</sup> ; 640,28552 (M–2H) <sup>2-</sup> ; 445,24494 (C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> O <sub>9</sub> ); 583,21954	1282,5838	1282,5833	-0,3797	Jia et al., 1999, Koike et al., 1999
4	Saponiini 6	3,31	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> O <sub>43</sub>	1745,7299	1149,53422; 895,36454 (M+46–2H) <sup>2-</sup> ; 872,36073 (M–2H) <sup>2-</sup>	1746,7371	1746,7364	-0,4076	Lu et al., 2015
5	Saponariosidi C/D	3,96	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	1265,5810	655,29065 (M+46–2H) <sup>2-</sup> ; 632,28732 (M–2H) <sup>2-</sup> ; 575,19719; 529,19136	1266,5883	1266,5884	0,0853	Jia et al., 1999
6	Saponariosidi F/I	4,2	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>30</sub>	1281,5761	1119,52380 (M–162) <sup>-</sup> ; 1165,53007 (M–162+46) <sup>-</sup> ; 663,28831 (M+46–2H) <sup>2-</sup>	1282,5834	1282,5833	-0,0912	Jia et al., 1999, Koike et al., 1999
7	Saponariosidi C/D	5,16	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	1265,5783	655,28949 (M+46–2H) <sup>2-</sup> ; 632,28660 (M–2H) <sup>2-</sup>	1266,5856	1266,5884	2,1933	Jia et al., 1999
8	Saponiini 12	7,69	C <sub>75</sub> H <sub>118</sub> O <sub>40</sub>	1657,7130	955,5465; 851,35638 (M+46–2H) <sup>2-</sup> ; 828,35295 (M–2H) <sup>2-</sup> ; 706,41472; 660,40908	1658,7203	1658,7200	-0,1791	Lu et al., 2015
9	Saponiini 4	8,04	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> O <sub>42</sub>	1729,7349	887,36707 (M+46–2H) <sup>2-</sup> ; 864,36327 (M–2H) <sup>2-</sup> ; 682,35803	1730,7422	1730,7415	-0,3796	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016

10	Saponiini 5	8,73	C <sub>80</sub> H <sub>124</sub> O <sub>43</sub>	1771,7458	908,37285 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 885,36931 (M-2H) <sup>2-</sup>	1772,7530	1772,7521	-0,5427	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
11	Saponiini 11	9,99	C <sub>72</sub> H <sub>112</sub> O <sub>27</sub>	1567,6813	806,34053 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 783,33733 (M-2H) <sup>2-</sup> ; 663,33982	1568,6885	1568,6886	0,0561	Lu et al., 2015
12	Saponiini 1	10,02	C <sub>83</sub> H <sub>130</sub> O <sub>46</sub>	1861,7738	953,38690 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 930,38451 (M-2H) <sup>2-</sup>	1862,7811	1862,7838	1,4672	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
13	Saponariosidi A	10,06	C <sub>82</sub> H <sub>128</sub> O <sub>45</sub>	1831,7638	938,38173 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 915,37876 (M-2H) <sup>2-</sup>	1832,7710	1832,7732	1,1884	Jia et al., 1998
14	Saponariosidi B/ Saponiini 13/ Saponiini 3	10,06	C <sub>77</sub> H <sub>12</sub> O <sub>41</sub>	1669,7208	872,36078 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 849,35704 (M-2H) <sup>2-</sup>	1700,7281	1700,7309	1,6511	Jia et al., 1998, Lu et al., 2015, Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
15	Saponiini 2	10,11	C <sub>85</sub> H <sub>132</sub> O <sub>47</sub>	1903,7832	974,39246 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 951,38843 (M-2H) <sup>2-</sup>	1904,7907	1904,7944	1,9467	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016

Taulukko 7. Sokerijuurikkaan raakauutteesta tunnistetut saponiinit 17 ja 19–21, saponiineiksi oletetut yhdisteet 16 ja 18 sekä niiden retentioajat, molekyylikaavat ja UPLC-DAD-MS-mittauksista saatu MS-data.

nro	yhdiste	retentioaika (min)	molekyyli-kaava	[M-H] <sup>-</sup>	muut m/z-arvot	havaittu tarkka massa	laskettu tarkka massa	virhe (ppm)	viitteet
16	Dioks-Heks-UrHa-hederageniini	4,58	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>21</sub>	969,4327	507,21524 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 556,67418	970,4399	970,4426	2,7147	Mikołajczyk-Bator et al., 2016
17	Betavulgarosidi 6	4,87	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>22</sub>	971,4492	508,22342 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 809,43277; 557,68223; 449,27571	972,4565	972,4568	0,3625	Mikołajczyk-Bator et al., 2016
16	Dioks-Heks-UrHa-hederageniini	5,16	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>21</sub>	969,433	507,21528 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 941,43867; 449,27577; 327,21758	970,4402	970,4426	2,4056	Mikołajczyk-Bator et al., 2016

16	Dioks-Heks-UrHa-hederageniini	5,55	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>21</sub>	969,4337	507,21590 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 807,41755; 556,67448; 449,27578; 327,21772	970,4409	970,4426	1,6843	Mikołajczyk-Bator et al., 2016
18	Dioks-Heks-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -UrHa-hederageniini	6,24–6,56	C <sub>46</sub> H <sub>66</sub> O <sub>20</sub>	937,4079	659,47439; 329,23311	938,4152	938,4150	-0,2904	Mikołajczyk-Bator et al., 2016
19	Betavulgarosidi 8	6,79	C <sub>46</sub> H <sub>68</sub> O <sub>20</sub>	939,4237	492,21093 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 777,40717; 659,47460; 492,21092; 329.23332	940,4310	940,4306	-0,4067	Mikołajczyk-Bator et al., 2016
20	Betavulgarosidi 1	8,09	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>20</sub>	953,4390	499,21918 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 548,67775; 327,21796	954,4463	954,4463	-0,0236	Mikołajczyk-Bator et al., 2016
21	Betavulgarosidi 3	8,71	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>20</sub>	955,4544	500,22666 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 793,43932; 679,40742; 329,23365	956,4617	956,4619	0,2379	Mikołajczyk-Bator et al., 2016

Taulukko 8. Preparatiivisella HPLC-menetelmällä kolmannella kerralla puhdistetuista fraktioista tunnistetut yhdisteet sekä niiden retentioajat, molekyylikaavat ja UPLC-DAD-MS-mittauksista saatu MS-data. 3.1 = fraktiot 32–47, 3.2 = fraktiot 48–53, 3.3 = fraktiot 54–62, 3.4 = fraktiot 63–70.

fraktio	yhdiste	retentioaika (min)	molekyyli-kaava	[M-H]	muut m/z-arvot	havaittu tarkka massa	laskettu tarkka massa	virhe (ppm)	viitteet
3.1	Saponiini 7	2,34	C <sub>81</sub> H <sub>128</sub> O <sub>46</sub>	1835,7556	940,37793 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 917,37555 (M-2H) <sup>2-</sup>	1836,7629	1836,7682	2,8599	Lu et al., 2015
3.1	Saponiini 5/8	2,38	C <sub>76</sub> H <sub>120</sub> O <sub>42</sub>	1703,7151	874,35743 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 851,35386 (M-2H) <sup>2-</sup>	1704,7224	1704,7259	2,0138	Lu et al., 2015
3.1	Saponariosidi F/I	2,92	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>30</sub>	1281,5729	663,28680 (M+46-2H) <sup>2-</sup>	1282,5802	1282,5833	2,4193	Jia et al., 1999, Koike et al., 1999
3.1	Saponiini 3	2,92	C <sub>75</sub> H <sub>118</sub> O <sub>41</sub>	1673,7058	859,35193 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 836,34881 (M-2H) <sup>2-</sup>	1674,7131	1674,7153	1,3065	Lu et al., 2015
3.1	Saponariosidi F/I	2,99	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>30</sub>	1281,5727	663,28669 (M+46-2H) <sup>2-</sup>	1282,5800	1282,5833	2,5987	Jia et al., 1999,

									Koike et al., 1999
3.1	Saponiini 1	2,99	C <sub>70</sub> H <sub>110</sub> O <sub>37</sub>	1541,6639	793,33153 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 770,32731 (M-2H) <sup>2-</sup>	1542,6712	1542,6730	1,1785	Lu et al., 2015
3.1	Saponiini 6	3,15	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> O <sub>43</sub>	1745,7251	895,36254 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 872,35954 (M-2H) <sup>-</sup>	1746,7324	1746,7364	2,3232	Lu et al., 2015
3.1	Saponiini 6	3,32	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> O <sub>43</sub>	1745,7256	895,36317 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 872,35956 (M-2H) <sup>-</sup>	1746,7328	1746,7364	2,0598	Lu et al., 2015
3.1	Saponiini 4	5,42	C <sub>77</sub> H <sub>120</sub> O <sub>42</sub>	1715,7181	880,35924 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 857,35487 (M-2H) <sup>2-</sup>	1716,7254	1716,7259	0,2872	Lu et al., 2015
3.2	Saponiini 2	2,57	C <sub>65</sub> H <sub>104</sub> O <sub>35</sub>	1443,6248	744,31245 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 721,30984	1444,6321	1444,6362	2,8506	Moniuszko-Szajwaj et al., 2013
3.2	Saponariosidi F/I	3,05	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>30</sub>	1281,5716	663,28600 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 640,28334	1282,5789	1282,5833	3,4407	Jia et al., 1999, Koike et al., 1999
3.2	Saponariosidi C/D	3,98	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	1265,7556	655,28883 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 632,28571 (M-2H) <sup>2-</sup> ; 1085,51523; 617,36906	1266,5849	1266,5884	2,7381	Jia et al., 1999
3.2	Saponariosidi F/I	4,19	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>30</sub>	1281,5716	663,28642 (M+46-2H) <sup>2-</sup>	1282,5789	1282,5833	3,4563	Jia et al., 1999, Koike et al., 1999
3.2	Saponariosidi E	4,69	C <sub>60</sub> H <sub>96</sub> O <sub>30</sub>	1295,5893	670,29464 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 647,29247 (M-2H) <sup>2-</sup>	1296,5953	1296,5990	2,7865	Jia et al., 1999
3.2	Vakkarosidi A/D	5,02	C <sub>54</sub> H <sub>85</sub> O <sub>25</sub>	1133,5367		1134,5440	1134,5461	1,8580	Koike et al., 1998
3.2	Saponiini 4	5,42	C <sub>77</sub> H <sub>120</sub> O <sub>42</sub>	1715,7169	880,35842 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 857,35435 (M-2H) <sup>2-</sup>	1716,7242	1716,7259	0,9571	Lu et al., 2015
3.3	Saponariosidi C/D	3,97	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	1265,5769	655,28821 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 632,28546 (M-2H) <sup>2-</sup> ; 1898,86729 (3M-2H) <sup>2-</sup>	1266,5842	1266,5884	3,3223	Jia et al., 1999
3.3	Saponariosidi C/D	5,15	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	1265,5765	655,28904 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 1898,86726 (3M-2H) <sup>2-</sup>	1266,5838	1266,5884	3,6302	Jia et al., 1999
3.3	Saponariosidi L/M	5,46	C <sub>53</sub> H <sub>84</sub> O <sub>24</sub>	1103,5261	1655,79253 (3M-2H) <sup>2-</sup> ; 1149,53110 (M+46-H) <sup>-</sup> ; 574,26269 (M+46-2H) <sup>2-</sup>	1104,5334	1104,5355	1,9130	Koike et al., 1999

3.3	Saponiini 3	6,26	C <sub>59</sub> H <sub>92</sub> O <sub>28</sub>	1247,5672	623,28085 (M-2H) <sup>2-</sup>	1248,5744	1248,5778	2,7015	Moniuszko-Szajwaj et al., 2013
3.3	Vakkarosidi A/D	6,75	C <sub>54</sub> H <sub>85</sub> O <sub>25</sub>	1133,5365	1700,80878 (3M-2H) <sup>2-</sup> ; 1179,54133 (M+46-H) <sup>-</sup>	1134,5438	1134,5461	2,0255	Koike et al., 1998
3.3	Saponiini 4	7,12	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> O <sub>42</sub>	1729,7307	887,36531 (M+46-3H) <sup>2-</sup> ; 864,36209 (M-2H) <sup>2-</sup>	1730,7380	1730,7415	2,0471	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.3	Saponiini 10	7,55	C <sub>70</sub> H <sub>110</sub> O <sub>36</sub>	1525,6672	785,33372 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 762,33016 (M-2H) <sup>2-</sup>	1526,6745	1526,6781	2,3207	Lu et al., 2015
3.3	Saponiini 10	7,7	C <sub>70</sub> H <sub>110</sub> O <sub>36</sub>	1525,6679	785,33384 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 762,33021 (M-2H) <sup>2-</sup>	1526,6752	1526,6781	1,8950	Lu et al., 2015
3.3	Saponiini 12	7,7	C <sub>75</sub> H <sub>118</sub> O <sub>40</sub>	1657,7099	851,35466 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 828,35169 (M-2H) <sup>2-</sup>	1658,7172	1658,7204	1,9069	Lu et al., 2015
3.3	Vakkarosidi B	7,7	C <sub>60</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	1277,5781	638,28635 (M-2H) <sup>2-</sup>	1278,5853	1278,5884	2,3682	Koike et al., 1998
3.3	Saponiini 4	8,03	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> O <sub>42</sub>	1729,7317	887,36573 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 864,36206 (M-2H) <sup>2-</sup>	1730,7390	1730,7415	1,4635	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.3	Saponiini 10	8,46	C <sub>70</sub> H <sub>110</sub> O <sub>36</sub>	1525,6671	785,33359 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 762,32986 (M-2H) <sup>2-</sup>	1526,6744	1526,6781	2,4059	Lu et al., 2015
3.3	Saponiini 5	8,73	C <sub>80</sub> H <sub>124</sub> O <sub>43</sub>	1771,7480	908,37081 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 885,36882 (M-2H) <sup>2-</sup>	1772,7553	1772,7521	-1,8119	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.3	Saponiini 12	8,73	C <sub>75</sub> H <sub>118</sub> O <sub>40</sub>	1657,7104	851,35558 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 828,35179 (M-2H) <sup>2-</sup>	1658,7176	1658,7204	1,6296	Lu et al., 2015
3.3	Saponiini 11	9,99	C <sub>72</sub> H <sub>112</sub> O <sub>37</sub>	1567,6781	806,33918 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 783,33570 (M-2H) <sup>2-</sup>	1568,6854	1568,6886	2,0514	Lu et al., 2015
3.3	Saponiini 1	10,03	C <sub>83</sub> H <sub>130</sub> O <sub>46</sub>	1861,7719	953,38634 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 930,38316 (M-2H) <sup>2-</sup>	1862,7792	1862,7838	2,4818	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.3	Saponariosidi A	10,08	C <sub>82</sub> H <sub>128</sub> O <sub>45</sub>	1831,7616	938,38146 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 915,37856 (M-2H) <sup>2-</sup>	1832,7689	1832,7732	2,3615	Jia et al., 1998
3.3	Saponariosidi B/ Saponiini 13/ Saponiini 3	10,08	C <sub>77</sub> H <sub>120</sub> O <sub>41</sub>	1699,7271	872,36059 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 849,35661 (M-2H) <sup>2-</sup>	1700,7344	1700,7309	-2,0238	Jia et al., 1998, Lu et al., 2015, Moniuszko-Szajwaj et al., 2016

3.3	Saponiini 2	10,12	C <sub>85</sub> H <sub>132</sub> O <sub>47</sub>	1903,7820	974,39200 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 951,38793 (M-2H) <sup>2-</sup>	1904,7892	1904,7944	2,7027	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.4	Saponariosidi C/D	5,14	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	1265,5772	655,28881 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 632,26650 (M-2H) <sup>2-</sup>	1266,5845	1266,5884	3,0776	Jia et al., 1999
3.4	Vakkarosidi A/D	6,72	C <sub>54</sub> H <sub>85</sub> O <sub>25</sub>	1133,5362	1179,54091 (M+46-H) <sup>-</sup> ; 1700,80821 (3M-2H) <sup>2-</sup>	1134,5434	1134,5461	2,3252	Koike et al., 1998
3.4	Saponiini 10	7,69	C <sub>70</sub> H <sub>110</sub> O <sub>36</sub>	1525,6674	785,33353 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 762,32992 (M-2H) <sup>2-</sup>	1526,6747	1526,6781	2,1897	Lu et al., 2015
3.4	Saponiini 12	7,69	C <sub>75</sub> H <sub>118</sub> O <sub>40</sub>	1657,7092	851,35401 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 828,35107 (M-2H) <sup>2-</sup>	1658,7165	1658,7204	2,3169	Lu et al., 2015
3.4	Vakkarosidi B	7,69	C <sub>60</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	1277,5767	638,28601 (M-2H) <sup>2-</sup>	1278,5839	1278,5884	3,4710	Koike et al., 1997
3.4	Saponiini 4	8,0	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> O <sub>42</sub>	1729,7311	887,36540 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 864,36171 (M-2H) <sup>2-</sup>	1730,7384	1730,7415	1,8102	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.4	Saponiini 5	8,72	C <sub>80</sub> H <sub>124</sub> O <sub>43</sub>	1771,7411	908,37063 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 885,36753 (M-2H) <sup>2-</sup>	1772,7484	1772,7521	2,0804	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.4	Saponariosidi A	10,07	C <sub>82</sub> H <sub>128</sub> O <sub>45</sub>	1831,7609	938,38115 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 915,37836 (M-2H) <sup>2-</sup>	1832,7681	1832,7732	2,7761	Jia et al., 1998
3.4	Saponariosidi B/ Saponiini 13/ Saponiini 3	10,07	C <sub>77</sub> H <sub>120</sub> O <sub>41</sub>	1699,7192	872,36025 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 849,35671 (M-2H) <sup>2-</sup>	1700,7264	1700,7309	2,6389	Jia et al., 1998, Lu et al., 2015, Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.4	Saponiini 2	10,12	C <sub>85</sub> H <sub>132</sub> O <sub>47</sub>	1903,7813	974,39140 (M+46-2H) <sup>2-</sup> ; 951,38725 (M-2H) <sup>2-</sup>	1904,7886	1904,7944	3,0387	Moniuszko-Szajwaj et al., 2016
3.4	Quillajahappo/ Gypsogeenihappo	11,01	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>5</sub>	485,3266	971,66111 (2M-H) <sup>-</sup>	486,3338	486,3345	1,4352	

## 4. Johtopäätökset

Työ oli hyvin mielenkiintoinen, sillä tämä on tietääksemme ensimmäinen saponiineja tutkiva työ Suomessa. Kasvien ja niiden sisältämien yhdisteiden hyödyntäminen kulutus- tuotteissa on myös hyvin ajankohtaista. Työssä onnistuttiin eristämään ja tunnistamaan saponiineja rohtosuopayrtistä ja sokerijuurikkaasta. Saponiinien pitoisuus uutteisissa jäi kuitenkin alhaiseksi. Erilaisen uuttomenetelmän käyttö voisi parantaa saantoa. Saponiinien erottelu rohtosuopayrtistä onnistui hyvin, mutta sokerijuurikkaasta ei. On mahdollista, että sokerijuurikkaan leike sisältää sokerinerotusprosessin jälkeen liukene- mattomia yhdisteitä, jotka aiheuttavat sakkaamista pylväskromatografiassa ja häiritsevät fraktioitumista. Lisäksi suurempi kloroformin osuus ensimmäisessä fraktiossa voisi tehostaa ei-haluttujen yhdisteiden erottumista saponiineista.

Vaahoavuus- ja pintajännitystestien tulokset ovat yhteneväisiä tutkimuksen kanssa, jossa on havaittu rohtosuopayrtin raakauutteen muodostavan stabiilimpia vaahtoja ja alentavan pintajännitystä paremmin kuin sokerijuurikkaan raakauute (Góral and Wojciechowski, 2020). Pyykinpesutesteissä raakauutteet osoittautuivat tehottomiksi, minkä voidaan olettaa johtuvan niiden sisältämistä muista pesureaktioita häiritsevistä yhdisteistä. Pyykinpesutestit puhdistetuilla saponiineilla antaisivat todellisempaa tulosta saponiinien pesutehosta. Tätä varten uuttoa ja pylväsfraktiointia olisi tehostettava saannon parantamiseksi. Lisäksi vaahdonmuodostus- ja pintajännitystestejä pitäisi toistaa tulosten luotettavuuden takaamiseksi.



## Lähdeluettelo

- Bai, L.; Huan, S.; Gu, J.; McClements, D. J. Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 703– 711.
- Boettcher, S.; Drusch, S. Interfacial Properties of Saponin Extracts and Their Impact on Foam Characteristics. *Food Biophys.* **2016**, *11*, 91– 100.
- Góral, I.; Jurek, I.; Wojciechowski, K. How Does the Surface Activity of Soapwort (*Saponaria officinalis* L.) Extracts Depend on the Plant Organ? *Journal of Surfactants and Detergents*, **2018**, *21*, 797– 807.
- Góral, I.; Wojciechowski, K. Surface activity and foaming properties of saponin-rich plants extracts. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *279*, 102145.
- Gurielidze, K.; Gogoberidze, M.; Dadeshidze, I.; Vardosanidze, M.; Djaoshvili, M.; Lomkatsi, N. Tissue and subcellular localization of oligofurostanosides and their specific degrading  $\beta$ -glucosidase in *Dioscorea caucasica* Lipsky. *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 555– 559.
- Gus-Mayer, S.; Brunner, H.; Schneider-Poetsch, H.; Rüdiger, W. Avenacosidase from oat: purification, sequence analysis and biochemical characterization of a new member of the BGA family of  $\beta$ -glucosidases. *Plant Mol. Biol.* **1994**, *26*, 909– 921.
- Haralampidis, K.; Trojanowska, M.; Osbourn, A. E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2002**, *75*, 31– 49.
- Hostettmann, K.; Marston, A. *Saponins; Chemistry and Pharmacology of Natural Products*; Cambridge University Press: Great Britain, **1995**, 1– 548.
- Inoue, K.; Ebizuka, Y. Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O- $\beta$ -glucosidase from *Costus speciosus* rhizomes. *FEBS Lett.* **1996**, *378*, 157– 160.
- Inoue, K.; Shimomura, K.; Kobayashi, S.; Sankawa, U.; Ebizuka, Y. Conversion of furostanol glycoside to spirostanol glycoside by  $\beta$ -glucosidase in *Costus speciosus*. *Phytochemistry*, **1996**, *41*, 725-727.
- Jia, Z.; Koike, K.; Nikaido, T. Major triterpenoid saponins from *Saponaria officinalis*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1368– 1373.
- Jia, Z.; Koike, K.; Nikaido, T. Saponarioside C, the first  $\alpha$ -D-galactose containing triterpenoid saponin, and five related compounds from *Saponaria officinalis*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 449– 453.
- Kalinowska, M.; Wojciechowski, Z. A. Enzymatic synthesis of nuatigenin 3 $\beta$ -D-glucoside in oat (*Avena sativa*) leaves. *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 2525– 2529.
- Kalinowska, M.; Wojciechowski, Z. A. Subcellular localization of udpg: Nuatigenin glucosyltransferase in oat leaves. *Phytochemistry*, **1987**, *26*, 353– 357.
- Kalinowska, M.; Wojciechowski, Z. A. Substrate specificity of partially purified UDP-glucose: nuatigenin glucosyltransferase from oat leaves. *Plant Science*, **1988**, *55*, 239– 245.

- Kalinowska, M.; Zimowski, J.; Pączkowski, C.; Wojciechowski, Z. A. The formation of sugar chains in triterpenoid saponins and glycoalkaloids. *Phytochemistry Reviews*, **2005**, *4*, 237– 257.
- Kesselmeier, J.; Urban, B. Subcellular localization of saponins in green and etiolated leaves and green protoplasts of oat (*Avena sativa* L.). *Protoplasma*, **1983**, *114*, 133– 140.
- Koike, K.; Jia, Z.; Nikaido, T. New triterpenoid saponins and sapogenins from *Saponaria officinalis*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1655– 1659.
- Koike, K.; Jia, Z.; Nikaido, T. Triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*. *Phytochemistry*, **1998**, *47*, 1343– 1349.
- Kurosawa, Y.; Takahara, H.; Shiraiwa, M. UDP-glucuronic acid:soyasapogenol glucuronosyltransferase involved in saponin biosynthesis in germinating soybean seeds. *Planta*, **2002**, *215*, 620– 629.
- Lu, Y.; Van, D.; Deibert, L.; Bishop, G.; Balsevich, J. Antiproliferative quillaic acid and gypsogenin saponins from *Saponaria officinalis* L. roots. *Phytochemistry*, **2015**, *113*, 108– 120.
- Mikołajczyk-Bator, K.; Błaszczuk, A.; Czyżniewski, M.; Kachlicki, P. Identification of saponins from sugar beet (*Beta vulgaris*) by low and high-resolution HPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2016**, *1029-1030*, 36– 47.
- Mitra, S.; Dungan, S. R. Micellar Properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of Temperature, Salt, and pH on Solution Properties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1587– 1595.
- Moniuszko-Szajwaj, B.; Masullo, M.; Kowalczyk, M.; Pecio, Ł.; Szumacher-Strabel, M.; Cieślak, A.; Piacente, S.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Highly Polar Triterpenoid Saponins from the Roots of *Saponaria officinalis* L. *Helv. Chim. Acta*, **2016**, *99*, 347– 354.
- Moniuszko-Szajwaj, B.; Pecio, L.; Kowalczyk, M.; Simonet, A. M.; Macias, F. A.; Szumacher-Strabel, M.; Cieślak, A.; Oleszek, W.; Stochmal, A. New Triterpenoid Saponins from the Roots of *Saponaria officinalis*. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 1687– 1690.
- Nisius, A. The stromacentre in *Avena* plastids: an aggregation of  $\beta$ -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta*, **1988**, *173*, 474– 481.
- Oakenfull, D. G. Aggregation of Saponins and Bile Acids in Aqueous Solution. *Aust. J. Chem.* **1986**, *39*, 1671– 1683.
- Oleszek W.; Hamed A. In *Saponin-Based Surfactants*; Johansson, I., Kjellin, M., Eds.; Surfactants from Renewable Resources; John Wiley & Sons, Incorporated: Hoboken, **2010**, 239– 250.
- Oleszek, W.; Jurzysta, M.; Płoszynski, M.; Colquhoun, I. J.; Price, K. R.; Fenwick, G. R. Zahnic Acid Tridesmoside and Other Dominant Saponins from Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Aerial Parts. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 191– 196.
- Osborn, A. Saponins and plant defence - A soap story. *Trends Plant Sci.* **1996**, *1*, 4– 9.

- Paczkowski, C.; Wojciechowski, Z. A. The occurrence of UDPG-dependent glucosyltransferase specific for sarsasapogenin in *Asparagus officinalis*. *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 2743–2747.
- Paczkowski, C.; Zimowski, J.; Krawczyk, D.; Wojciechowski, Z. A. Steroid-specific glucosyltransferases in *Asparagus plumosus* shoots. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 63–70.
- Stapleton, A.; Allen, P. V.; Friedman, M.; Belknap, W. R. Purification and Characterization of Solanidine Glucosyltransferase from the Potato (*Solanum Tuberosum*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1187–1193.
- Vincken, J.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, **2007**, *68*, 275–297.
- Wojciechowski, Z. A. Biosynthesis of oleanolic acid glycosides by subcellular fractions of *Calendula officinalis* seedlings. *Phytochemistry*, **1975**, *14*, 1749–1753.
- Yang, Y.; Leser, M. E.; Sher, A. A.; McClements, D. J. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocoll.* **2013**, *30*, 589–596.
- Zimowski, J. Characterization of UDP-galactose: tomatidine galactosyltransferase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Acta Biochim. Pol.* **1994**, *41*, 202–204.
- Önning, G.; Asp, N.; Sivik, B. Saponin content in different oat varieties and in different fractions of oat grain. *Food Chem.* **1993**, *48*, 251–254.