

В. А. Храмов<sup>1</sup>, А. А. Спасов<sup>2</sup>, М. П. Самохина<sup>2</sup>

## О ХИМИЧЕСКОМ СОСТАВЕ СУХИХ ЭКСТРАКТОВ ЛИСТЬЕВ *Gymnema sylvestre*

<sup>1</sup> Волгоградский государственный технический университет;

<sup>2</sup> Волгоградский государственный медицинский университет;

Исследованы 3 сертифицированных препарата сухих экстрактов *Gymnema sylvestre* в гравиметрических процентных концентрациях: “25 %”, “50 %”, “75 %”. После экстракции водно-спиртовой смесью супернатанты всех препаратов подвергались анализу на наличие в них фенолокислот, аминокислот с использованием восходящей тонкослойной хроматографии. В исследуемых образцах выявлено значительное количество разнообразных органических соединений, в том числе и относящихся к классу растительных фенолов. Наличие последних подтверждено с помощью реакции с хлоридом железа(III), а также диазореакцией Паули. С помощью нингидриновой реакции в экстрактах обнаружено некоторое количество аминокислот. При этом установлено, что наибольшее их содержание было в 50 % препарате (0,15 моль/кг). Помимо этого выявлена особенность аминокислотного состава *Gymnema sylvestre*, характеризующаяся отсутствием аминокислоты – пролина. Согласно сертификату молярная концентрация гимнемовых кислот в препаратах составляет 0,12 моль/кг, что сопоставимо с концентрацией найденных в процессе эксперимента фенолокислот и аминокислот. Таким образом, в процессе очистки сухих экстрактов *Gymnema sylvestre* для получения чистых препаратов гимнемовых кислот следует ориентироваться на снижение содержания сопутствующих соединений.

В листьях кустарника *Gymnema sylvestre* (ASCLEPI-ACIAE) содержится комплекс пентациклических три-терпенов – гимнеминов или гимнемовых кислот. Последние давно известны, как естественные детергенты насекомых и травоядных животных [1]. Механизм отпугивающего действия гимнемовых кислот, по-видимому, связан с подавлением чувствительности рецепторов сладкого вкуса и появлением горечи пищевого продукта [2].

В последнее время обнаружено, что гимнемовые кислоты являются весьма перспективными фармакологическими агентами [3, 4]. В частности, оказалось, что гимнемовые кислоты обладают выраженным гипогликемическим эффектом, и могут быть использованы в терапии сахарного диабета [3 – 6]. Не менее важно, что экстракты листьев *Gymnema sylvestre* в дозе 25 – 100 мг/кг приводят к заметному снижению уровня триацилглицеринов, холестерина и ЛПОНП. По своему антиатеросклеротическому потенциалу такие экстракты сопоставимы со стандартным гипогликемическим агентом – клофибратом [7]. Очевидно, однако, что используемые грубые экстракты листьев *Gymnema sylvestre*, помимо действующего начала – гимнемовых кислот – содержат разнообразные органические соединения: углеводы, аминокислоты, растительные фенолокислоты и тому подобное. При использовании сухих экстрактов гимнемовых кислот примеси сопутствующих компонентов могут существенно влиять на фармакологические эффекты препаратов гимнемовых кислот.

Цель настоящей работы – изучить содержание некоторых органических соединений в экстрактах *Gymnema sylvestre*, сопутствующих гимнемовым кислотам.

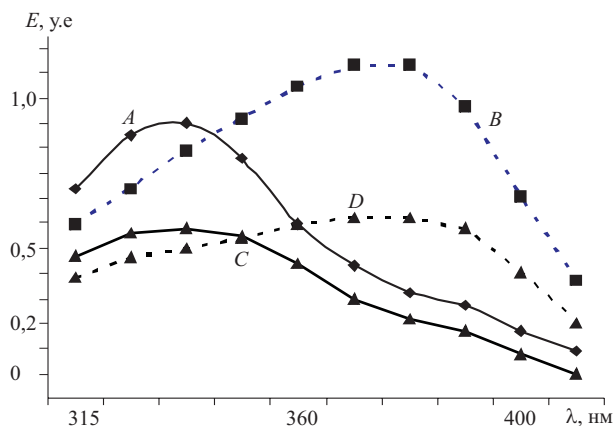
### Экспериментальная часть

Аналізу подверглись три сертифицированных препарата сухих экстрактов *Gymnema sylvestre* (фирма СКС “Альянс”, № сертификата анализа ГYM-030706 от 1.06.2003) в гравиметрических процентных концентрациях: “25 %”, “50 %”, “75 %”. Все препараты (темно-зеленые порошки) в количестве 100 мг экстрагировались 5 мл водно-спиртовой смеси (1:1) в течение 1 ч, с периодическим доведением до кипения в водяной бане. По окончании экстракции пробы центрифугировались (5000 об/мин, 5 мин) и прозрачные коричнево-зеленые супернатанты подвергались дальнейшему анализу.

### I. УФ-А абсорбирующие компоненты экстрактов *Gymnema sylvestre*

Разбавленные в 20 – 40 раз аликвоты супернатантов колориметрировались в УФ-А спектре (315 – 400 нм). Такие спектры для препаратов “25 %” и “50 %” представлены на рис. 1 (сплошные линии). Подщелачивание проб 4 % раствором гидроксида натрия приводило к смещению максимума поглощения в длинноволновую часть спектра на 30 – 40 нм (рис. 1, пунктирные линии), визуальное при этом наблюдалось появление желтого окрашивания супернатантов.

При восходящей хроматографии на бумаге Whatman № 1 в системе бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1, а также при тонкослойной хроматографии на пластинках “Силуфол” и “Сорбфил” в системе СНCl<sub>3</sub>–CH<sub>3</sub>OH–CH<sub>3</sub>COOH (5:1:1) исходных экстрактов (10 – 20 мкл) обнаруживалось флуоресцирующее в ультрафиолете (при 365 нм) сине-зеленое пятно ( $R_f$  на “Силуфол”=0,74). Кроме того, на хроматограмме обнаруживалось ярко-красное пятно (в ультрафиолетовых лучах), движущееся с фронтом растворителя,



**Рис. 1.** Спектры поглощения препаратов *Gymnema sylvestre* “25 %” и “50 %”. По оси абсцисс – длина волны; по оси ординат – оптическая плотность 0,5 мг/мл растворов образцов. А – оптическая плотность препарата “25 %”; В – оптическая плотность препарата “25 %” в щелочной среде; С – оптическая плотность препарата “50 %” в нейтральной среде; D – оптическая плотность препарата “50 %” в щелочной среде

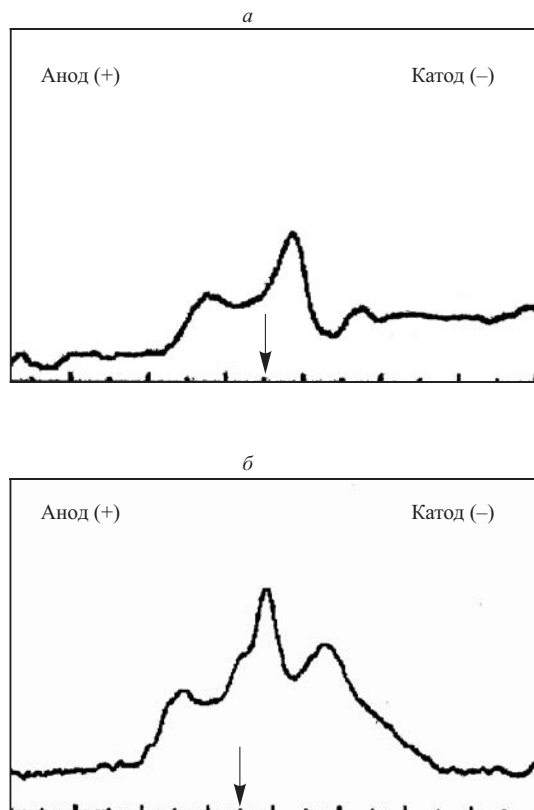
идентифицированное как хлорофилл. Что касается пятна синне-зеленого цвета, изменяющего цвет до желто-зеленого в парах аммиака то по хроматографической подвижности можно предположить, что это кофеил-хинная (хлорогеновая кислота), соединение довольно распространенное в растительном мире [8] и относящееся к группе так называемых гидроксикоричных кислот и кумаринов. Эта группа, в свою очередь, включается в обширный класс очень распространенных в растительном царстве химических веществ [9], которые предлагается обозначать просто как “фенольные соединения” в [10].

## II. Аминокислоты экстрактов *Gymnema sylvestre*

С помощью нингидриновой реакции в экстрактах обнаружено некоторое количество аминокислот, которые идентифицированы как аминокислоты. В связи с присутствием в экстрактах фоновых окрашенных соединений (хлорофилл, продукты деградации фенолов и т.п.) возникли определенные трудности в проведении нингидриновой реакции. Тем не менее, обнаружено, что наибольшее содержание аминокислот было в “50 %” препарате 0,15 моль/кг. В препарате “75 %”, уровень аминокислот определить не удалось из-за высокой мутности проб, однако, очевидно, что он был заметно ниже, чем в первых двух препаратах.

Электрофорез на бумаге (ацетатный буфер pH = 5,5) показал наличие в препаратах нейтральных, кислых (по-видимому, аспарагиновой кислоты) и основных (предположительно, аргинин или лизин) аминокислот.

Хроматография на бумаге, а также ТСХ (“Силуфол”, “Сорбфил”) в системе Патриджа выявила не менее 6 зон индивидуальных аминокислот ( $R_f$  0,22; 0,28; 0,35; 0,45; 0,57; 0,65). Особенность аминокислотного состава *Gymnema sylvestre* – видимое отсутствие аминокислоты пролина, как правило, обнаруживаемого в растительных экстрактах. Кроме того, экстракты “25 %” и “75 %” препаратов *Gymnema sylvestre* под-



**Рис. 2.** Денситограмма препаратов *Gymnema sylvestre*: “25 %” препарат *Gymnema sylvestre* (а); “50 %” препарат *Gymnema sylvestre* (б). Примечание: Стрелкой обозначено место старта. Условия электрофореза в тексте

вергались электрофорезу на бумаге в 0,04 M ацетатном буфере pH 5,5 в течение 2 мин (напряжение 300 В). После высушивания электрофореграммы обрабатывались 0,5 % ацетоновым раствором нингидрина. После прогрева электрофореграмм проявлялись красно-фиолетовые пятна. Последние денситометрировались на хромоскане Gouze Leoebl (Англия). На представленных денситограммах (рис. 2) четко видны три пика, соответствующие кислым, основным и нейтральным (средний пик) аминокислотам, содержащимся в “25 %” и “50 %” препаратах *Gymnema sylvestre*. Идентификация конкретных аминокислот в исследуемых экстрактах, на наш взгляд, представляет чисто академический интерес. С практической точки зрения более существенно то обстоятельство, что суммарный уровень аминокислот в препаратах был довольно высок.

Согласно сертификату содержание суммы гимнемовых кислот в исследуемых препаратах находилось на уровне 10 % от сухого веса (определено гравиметрически), то есть молярная концентрация этих соединений в препаратах составляет примерно 0,12 моль/кг. Эта величина сопоставима с концентрацией найденных нами фенольных соединений и аминокислот. Поскольку точное измерение уровня гимнемовых кислот представляет определенные трудности, в процессе очистки препарата, возможно, следует ориентироваться на снижение содержания сопутствующих соедине-

ний. Например, если в процессе очистки снижается спектральное поглощение в УФ-А-диапазоне – это, очевидно, свидетельствует об уменьшении доли УФ-поглощающих растительных фенолов. Кроме того, сопутствующие фенольные соединения и аминокислоты, возможно, сами обладают определенным фармакологическим эффектом. Известно, например, кардиопротекторное действие феруловой кислоты или гипогликемический эффект производных хлорогеновой кислоты [11]. Что касается антиоксидантного действия растительных фенольных соединений, то количество источников по этому вопросу за последние годы исчисляется сотнями.

Не исключено также, что сопутствующие примеси оказывают отрицательное действие на фармакологический эффект гимнемовых кислот. В любом случае целесообразность исследования химического состава примесей в неочищенных фармацевтических композициях очевидна. Используя в качестве стандарта химически чистый препарат хлорогеновой кислоты (Koch. Light, Англия), мы по оптической плотности при 330 нм количественно определили содержание УФ-А абсорбирующего компонента в исследуемых образцах: 25 % – 0,13 моль/кг; 50 % – 0,16 моль/кг; 75 % – 0,17 моль/кг в пересчете на стандартную хлорогеновую кислоту.

Таким образом, в исследуемых экстрактах *Gymnema Sylvestre* найдено сравнительное высокое содержание УФ-А поглощающего соединения, по хроматогра-

фической подвижности это, предположительно, хлорогеновая кислота, либо какое-то аналогичное гидроксипроизводное коричной кислоты. Наличие фенольного производного с *орто*-гидроксифункциями подтверждено с помощью реакции с хлоридом железа (III): появление сине-зеленого окрашивания. Наконец, экстракты всех трех препаратов давали цветную реакцию Паули, что также подтверждает наличие в них фенольных производных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дж. Харборн, *Введение в экологическую биохимию*, Б. М. Граевский (ред.), Мир, Москва (1985).
2. M. S. Granich (ed.), *J. Insect Physiol.*, **20**, 435 – 439 (1974).
3. K. R. Shanmugasundaram (ed.), *J. Ethnopharmacol.*, **7**, 205 – 34 (1983).
4. L. F. Wang (ed.), *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **76**, 1017 – 1023 (1998).
5. Y. Ogawa (ed.), *Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi.*, **45**, 8 – 18 (2004).
6. K. R. Shanmugasundaram (ed.), *Pharmacol. Res. Commun.*, **13**, 475 – 486 (1981).
7. A. Bishayee (ed.), *Phytother. Res.*, No. 8, 118 – 120 (1994).
8. В. А. Храмов, Н. В. Дмитриенко, *Хим.-Фарм. журн.*, **34**(11), 34 – 35 (2000).
9. А. Блажий, Л. Шутый, *Фенольные соединения растительного происхождения*, Мир, Москва (1977).
10. Б. А. Барабой, *Растительные фенолы и здоровье человека*, Наука, Москва (1984).
11. А. А. Дьяков, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Волгоград (2002).

Поступила 11.05.06

## CHEMICAL COMPOSITION OF THE DRY EXTRACT OF *GYMNEMA SYLVESTRE* LEAVES

V. A. Khramov<sup>1</sup>, A. A. Spasov<sup>2</sup>, and M. P. Samokhina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Technical University, Volgograd, Russia

<sup>2</sup> Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Three certified medicinal preparations of *Gymnema sylvestre* dry extracts have been studied in gravimetric percentage concentrations of 25, 50, and 75%. After the extraction with water – alcohol solution, supernatants of all preparations were analyzed for the presence of phenolic and amino acids using TLC in the ascending mode. A considerable amount of various organic compounds, including plant phenols, was detected in the samples. The presence of these phenols was confirmed by the characteristic reaction with iron(III) chloride and the Pauli's diazo reaction. A small amount of amino acids was detected in extracts by means of ninhydrin reaction; their maximum content (0.15 mole/kg) was found in 50% preparation. Along with this, a special feature of the amino acid composition of *Gymnema sylvestre* is the complete absence of proline. According to the drug certificate, molar concentration of gymnemic acids in medical preparations is 0.12 mole/kg, which is comparable with the content of phenolic and amino acids determined in the course of experiments. Thus, in purifying *Gymnema sylvestre* dry extracts, one should pay attention to the possible reduction of the content of these components.