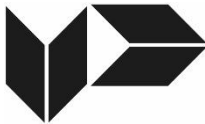


(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 244952 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437250**

(22) Data zgłoszenia: **2021.03.09**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.09.12 BUP 37/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.04.08 WUP 15/2024**

(51) MKP:

**A61K 36/185** (2006.01)

**A61P 3/08** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**B01D 11/02** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy  
we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ROBERT KUPCZYŃSKI, Dobrzykowice, PL**

**ANTONI SZUMNY, Wrocław, PL**

**PIOTR KUROPKA, Bystre, PL**

**ANNA ZWYRZYKOWSKA, Wrocław, PL**

**PRZEMYSŁAW BĄBELEWSKI, Wrocław, PL**

**NATALIA PACHURA, Bardo Śląskie, PL**

**RENATA NOWACZYK, Wrocław, PL**

**BOGDAN JAROSZ, Wrocław, PL**

**JORDAN SYCZ, Wałbrzych, PL**

**MACIEJ WŁODARCZYK, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:

**Sposób otrzymywania frakcji saponinowych oraz zastosowanie mieszaniny związków saponinowych**

**PL 244952 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania frakcji saponinowych z zielonych części europejskich odmian ostrokrzewu. Przedmiotem jest również zastosowanie mieszaniny związków saponinowych, wpływających korzystnie na regulację gospodarki cukrowej.

Liczne badania epidemiologiczne wskazują, że nadwaga i otyłość są ważnymi czynnikami wpływającymi na gospodarkę węglowodanową i mogą przyczynić się do występowania ryzyka zespołu metabolicznego, chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów, a nawet przedwczesnej śmierci [1]. Termin zespołu metabolicznego używany jest w szczególności w odniesieniu do chorób sercowo-naczyniowych (CVD – ang. cardiovascular diseases), niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD – ang. non-alcoholic fatty liver disease) oraz cukrzycy typu 2 (T2D – type 2 diabetes) [2]. Na przykładzie badań przeprowadzonych w ubiegłych dziesięcioleciach w USA dotyczących napojów słodzonych cukrem (SSB – ang. sugar-sweetened beverages), stwierdzono istotny związek między spożyciem dużej zawartości węglowodanów prostych, a przyrostem masy ciała oraz ryzykiem występowania cukrzycy czy chorób układu sercowo-naczyniowego [3,4]. W kilku innych badaniach na modelu zwierzęcym, stwierdzono, że niezależnie od występowania otyłości u szczurów, duża zawartość szybko wchłanianych cukrów takich jak glukoza czy fruktoza może prowadzić do występowania chorób metabolicznych, niezależnie od bilansu energetycznego spożywanych składników diety [5]. Cukrzyca lub hiperglikemia to choroby powszechnie występujące na świecie. Cukrzyca wraz z niekontrolowaną hiperglikemią może prowadzić do chorób układu sercowo-naczyniowego, stanów zapalnych, insulinooporności, retinopatii, nefropatii czy neuropatii [6,7]. Za stany chorobowe związane z zaburzeniem gospodarki węglowodanowej uważa się występowanie tzw. zaburzeń przedcukrzycowych takich jak zmniejszone wydzielanie insuliny z komórek beta-trzustki, zwiększone wydzielanie glukagonu oraz wchłaniania zwrotnego glukozy przez nerki czy obniżone działanie inkretyn w jelicie cienkim i upośledzenie wychwytu glukozy w tkankach obwodowych. Obecnie dostępne terapie hipoglikemizujące ukierunkowane są na jeden lub więcej z wymienionych czynników ryzyka wystąpienia cukrzycy oraz hiperglikemii [8]. W badaniach na modelu szczurzym wykazano, jak spożycie cukru moduluje kontrolę apetytu poprzez różne mechanizmy działania na metabolizm organizmu. Na przykładzie glukozy jako głównego wskaźnika zapotrzebowania energetycznego wykazano modulacje kluczowych półproduktów metabolizmu powstających w podwzgórzowej kaskadzie sygnalizacyjnej (tj. Kinaza białkowa aktywowana AMP i malonylo-CoA), które odpowiedzialne są za regulację głodu i wydatku energetycznego u szczurów karmionych dietą wysokocukrową. W tym przypadku spożycie diety wysokocukrowej prowadzi do podwyższenia poziomu glukozy, a w konsekwencji nadprodukcji malonylo-CoA, który z kolei oddziałuje na sygnalizację układu neuropeptydów anorektyczno-oreksogennych, hamując zapotrzebowanie na energię [9]. W badaniach [5] stwierdzono, że cukier oprócz indukcji samej patogenezy otyłości, może wpływać na zmiany w metabolizmie niezależnie od bilansu energetycznego podawanej diety, a także mechanizmów adaptacyjnych szczurów polegających na przyroście tkanki tłuszczowej w celu zachowania homeostazy całego organizmu. Wnioski te zostały oparte o obserwację podwyższonego poziomu trójglicerydów i frakcji lipoprotein o małej gęstości w osoczu krwi, a także wzrostu funkcji wydzielniczych komórek  $\beta$ -trzustki i akumulację lipidów w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokocukrową [5]. Metabolizm glukozy w wątrobie regulowany jest przez produkcję insuliny oraz zapotrzebowanie energetyczne organizmu, co zapewnia transport glukozy bezpośrednio przez żyłę wrotną do krążenia ogólnoustrojowego z pominięciem wątroby [10], natomiast metabolizm fruktozy jest zgoła inny. Krótkoterminowe badania eksperymentalne sugerują, że fruktoza, która jest składnikiem zarówno sacharozy, jak i wysokofruktozowego syropu kukurydzianego dodawanego w dużych ilościach do żywności, może wywierać szczególnie niekorzystny wpływ na metabolizm węglowodanowy w porównaniu z glukozą [11]. Początkowa fosforylacja fruktozy pobranej z pokarmu jest w dużej mierze katalizowana przez fruktokinazę, która nie jest regulowana przez zapotrzebowanie energetyczne wątroby. W konsekwencji następuje jej niekontrolowany wychwyt przez komórki wątroby, gdzie znaczna jej ilość jest metabolizowana właśnie tam, a tylko niewielki procent dociera do krążenia ogólnoustrojowego [12]. Akumulacja cząsteczek fruktozy w wątrobie z kolei prowadzi do zwiększonej lipogenezy de novo (DNL – ang. De novo lipogenesis) [13]. Ten złożony i silnie regulowany szlak metaboliczny zwiększa podaż lipidów poprzez zmożoną syntezę kwasów tłuszczowych i zapobieganie ich utlenieniu [4,10]. Podwyższony poziom lipidów w wątrobie sprzyja wydzielaniu lipoprotein o małej gęstości co skutkuje zwiększeniem stężenia triglicerydów, a także może

sprzyjać insulinooporności poprzez zwiększenie równocześnie poziomu diacyloglicerolu (DAG), który aktywuje kinazę białkową C (PKC) i prowadzi do fosforylacji seryny w receptorze insulinowym upośledzając tym samym jej działanie [14]. W badaniach Jean-Marc Schwarz [15] wykazano, że spadek DNL i wynikająca z niego redukcja tłuszczu w wątrobie były głównym czynnikiem wpływającym na poprawę metabolizmu oraz kondycji układu sercowo-naczyniowego [15]. Celem terapii farmakologicznych jest przede wszystkim obniżenie i doprowadzenie do unormowanego poziomu glikemii w organizmie chorego i tym samym zapobiegnięcie rozwojowi powikłań związanych z chorobami metabolicznymi [16]. Na rynku istnieją różne kategorie leków przeciwcukrzycowych przyjmowanych doustnie i wchłanianych przez przewód pokarmowy, takie jak inhibitory  $\alpha$ -glukozydazy, które spowalniają wchłanianie glukozy poprzez opóźnianie degradacji polisacharydów w przewodzie pokarmowym, analogi insuliny, pochodne sulfonilomocznika, biguanidy, meglitynid, tiazolidyny (TZD) czy inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego (SGLT2) i dipeptydylopeptydazy-4 (DPP-4) [17]. Do popularnych preparatów hipoglikemicznych zaliczyć można środki zawierające substancje czynną pramlintyd, który moduluje trawienie w żołądku, opóźniając tym samym wchłanianie glukozy do krwiobiegu, substancję wiążącą kwasy żółciowe jak kolesewelam, który obniża poziom cholesterolu i modyfikuje uwalnianie peptydów żołądkowo-jelitowych [17–20]. Innym kierunkiem walki z cukrzycą oraz chorobami metabolicznymi jest modyfikowana insulina ludzka. Modyfikacje insuliny koncentrują się przede wszystkim na zmianach w farmakokinetyce, w celu przyspieszenia albo wydłużenia jej działania [21]. Niewątpliwie poważnym problemem podejścia farmakologicznego oraz insulinoterapii są skutki uboczne jakie towarzyszą długotrwałemu przyjmowaniu leków syntetycznych oraz wysoki koszt leczenia co skłania do opracowania alternatywnego podejścia w leczeniu cukrzycy i chorób zespołu metabolicznego opartych przede wszystkim o profilaktykę zapobiegania zaburzeń metabolicznych przez spożywanie żywności o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych, a także zmianę trybu życia [16,17,22]. Innym podejściem w walce z cukrzycą oraz chorobami zespołu metabolicznego są terapie oparte na ziołolecznictwie czy tzw. fitomedycynie. Ziołolecznictwo należy do podgrupy uzupełniających się wzajemnie, alternatywnych terapii leczniczych – CAM (ang. complementary and alternative medicine) [8]. Rośliny lecznicze są nadal stosowane w dzisiejszych czasach i szacuje się, że około jedna czwarta leków na receptę na całym świecie wytwarzana jest z surowców zielarskich (WHO). Wielu chorych uważa wciąż tego typu terapię za bezpieczniejsze ze względu na niezadowalające wyniki oraz koszty leczenia farmakologicznego, a także skutki uboczne stosowania leków syntetycznych [23]. Wykorzystanie surowców ziołowych nie musi ograniczać się tylko do zastosowań dietetycznych, tradycyjne leki ziołowe mogą być używane w połączeniu z innymi konwencjonalnymi lekami alopacyjnymi lub jako ich substytut [24,25]. Do sporządzania leków naturalnych wykorzystuje się najczęściej części roślin leczniczych takie jak kwiaty, owoce, nasiona, liście, jagody, kora czy korzenie [26]. W kilku pracach badawczych poświęconych fitochemii wybranych gatunków roślin leczniczych wykazano skuteczność działania konkretnych ziół w trakcie różnych stadiów leczenia cukrzycy. Do roślin o udowodnionym działaniu hipotensyjnym czy hipoglikemicznym można wskazać kurkuminę, która poprawia funkcjonowanie komórek beta-trzustki, cynamon, który został zastosowany jako środek obniżający nadciśnienie tętnicze czy ekstrakt z liści Aloe Vera zwiększający poziom insuliny w regenerowanych komórkach beta-trzustki [27–32]. W ostatnich latach przeprowadzono również kilka badań klinicznych z udziałem ludzi, w których wykazano, że rośliny lecznicze takie jak chwast lukrecji (*Scoparia dulcis*), cynamonowiec wonny (*Cinnamomum cassia*), figowiec groniasty (*Ficus racemosa*) oraz nasiona z portulaka pospolitego (*Portulaca oleracea* L.) mogą wpływać w sposób pozytywny na regulację metabolizmu węglowodanowego [28,31,32]. W pracy Graziela A. Klein [33] wykazano wpływ naparu z yerba mate na obniżenie glukozy w osoczu u badanych ochotników eksperymentu, a także frakcję lipidową w surowicy krwi. Istnieje w literaturze patentowej kilka przykładów zastrzeżonych kompozycji ziół jako środków pomagających w profilaktyce i leczeniu otyłości oraz chorób związanych z zaburzeniem gospodarki węglowodanowej. Należy nadmienić, że zgłoszenia patentowe odnoszące się do zastosowania ziół w kontekście leczenia zespołu metabolicznego, cukrzycy oraz niealkoholowego stłuszczenia wątroby, opierając się głównie na specyficznych kompozycjach i mieszankach roślin leczniczych oraz ich ekstraktów.

Amerykański patent US005886029A ujawnia kombinację składników leczniczych takich jak (-)epikatechina i kwas gymnemowy (bloker receptorów smakowych) zapewniających obniżenie stężenia glukozy w surowicy krwi oraz regenerację komórek trzustki, które następnie zaczynają samodzielnie wytwarzać insulinę. Dodano również ekstrakty pomocnicze z takich gatunków roślin jak

Cynamonowiec tamala (*Cinnamomum tamala*), czapetka kuminowa (*Syzygium cumini*), kozieradka pospolita (*Trigonella foenum-graceum*), miódla indyjska (*Azadirachta indica*), figowiec groniasty (*Ficus racemosa*).

Kolejny amerykański patent US20050037094A1 ujawnia zastosowanie kompozycji zawierającej ekstrakty z korzenia szalwii miltorrhiza (*Radix salviae miltorrhizae*) i żeń-szenia chińskiego (*Panax notoginseng*) oraz dodatku borneolu, jako remedium w leczeniu chorób układu krążeniowo-naczyniowego spowodowanego między innymi zaburzeniami związanymi z zespołem metabolicznym.

W patencie US20150190446A1 zawarto mieszankę ekstraktów pozyskanych z liści różnych gatunków morwy (*Morus*), pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*) oraz z ekstraktów z *Artemisia judaica*, które zostały wykorzystane w leczeniu cukrzycy typu II oraz chorób współistniejących.

Takson *Ilex* (*Aquifoliaceae*) obejmuje kilkaset gatunków i podgatunków (<http://www.theplantlist.org/tpl/search?q=ilex&csv=on> dostęp 30 marca 2020). Najbardziej rozpowszechniony spośród nich (zarówno pod względem wielkości upraw/występowania jak i zastosowania) jest gatunek paragwariensis, znany pod nazwą mate, Yerba mate, chimarrão, caá mate. Napary lub maceraty z *I. paragwariensis* są bardzo popularne, jako substytut kawy lub herbaty [34]. Oprócz zawartości pobudzającej kofeiny, mają w swoim składzie dodatkowo szereg metabolitów wtórnych, wykazujących pozytywny efekt biologiczny. Zarówno sproszkowana roślina, ekstrakty oraz frakcje z niej pozyskane, są obecne na rynku jako suplementy diety lub jako żywność funkcjonalna. Za najistotniejsze uważa się aktywności regulujące poziom lipidów, przeciwcukrzycowe oraz syndrom metaboliczny [35]. Znane są również doniesienia literaturowe, w tym oparte na meta-analizach, w których koreluje się bardzo wysokie stężenia kwasów mono i di-kawoilochinowych z zarówno prewencją jak i łagodzeniem przebiegu chorób sercowo-naczyniowych [36]. Udowodniono również, że przyjmowanie naparu z *I. paragwariensis* zapobiega utlenieniu lipoprotein o niskiej gęstości w osoczu. Jednocześnie powoduje efekt obniżenia poziomu cukru dla cukrzycy typu II [37].

Napoje oraz frakcje pozyskane z *I. paragwariensis* posiadają udowodnione właściwości hamujące przyrost nadmiernej masy ciała [38]. Obecnie mechanizm supresji apetytu powodowany podażą *I. paragwariensis*, jest niejasny.

W Europie uprawia lub hoduje się kilkadziesiąt odmian, z czego najbardziej rozpowszechnione są gatunek *aquifolium* (kolczasty) i *Meserveyae* (meserveae) kultywarów Alaska, Golden van Tol, Blue Angel, Golden Girl i Blue Boy. Ich szczegółowy skład chemiczny jak i aktywności biologiczne nie są dotychczas przebadane. Nieoczekiwanie okazało się, że frakcje saponinowe wyodrębnione z europejskich odmian ostrokrzewu, posiadają właściwości pozytywnie wpływające na gospodarkę cukrową organizmu.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania frakcji saponinowych, otrzymywanych z zielonych części roślin ostrokrzewu, charakteryzujący się tym, że wysuszone, sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu takich jak *Ilex aquifolium* albo *Ilex meserveyae*, które zawierają na 100 g suchej masy co najmniej 0,177 g kudiosidu N; co najmniej 0,163 g matesaponiny 3; co najmniej 0,232 g latifolosidu L, co najmniej 0,235 g ilexosidu XV, dwukrotnie maceruje się co najmniej 12 godzin rozpuszczalnikiem polarnym jakim jest metanol. Tak przygotowane ekstrakty łączy się, filtruje, i wytrąca substancje balastowe (głównie związki fenolowe) solą octanu ołowiu (II) w rozpuszczalniku polarnym jakim jest metanol w celu doczyszczenia frakcji właściwej. Kolejno wyciąg odwirowuje się, a możliwe pozostałości jonów ołowiu wytrąca się za pomocą roztworu kwasu nieorganicznego, jakim jest kwas siarkowy (VI). Wyciąg ponownie odwirowuje się, oddziela od osadu i zubożętnia. Kolejno supernatant rozcieńcza się i ekstrahuje za pomocą kolumny ekstrakcyjnej, po czym frakcję saponinową wymywa się z kolumny ekstrakcyjnej rozpuszczalnikiem polarnym jakim jest metanol, następnie zatęża się ją na wyparce próżniowej i poddaje procesowi liofilizacji, w wyniku czego uzyskuje się sproszkowaną frakcję będącą mieszaniną bogatą w saponiny.

Korzystnie jest, gdy wysuszone, sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu zawierają na 100 g suchej masy: kudiosid N od 0,177 do 0,41 g, matesaponina 3 od 0,163 do 0,395 g, latifolosidu L od 0,232 do 0,457 g, ilexosid XV od 0,235 do 0,555 g.

Korzystnie jest, gdy do otrzymywania mieszaniny używa się gatunku *Ilex aquifolium* odmiany Alaska.

Korzystnie także jest, gdy do otrzymywania mieszaniny używa się gatunku *Ilex aquifolium* odmiany Golden van Tol.

Korzystnie również jest, gdy do otrzymywania mieszaniny używa się gatunku *Ilex aquifolium* odmiany *Ferox Argentea*.

Korzystnie także jest, gdy do otrzymywania mieszaniny używa się gatunku *Ilex meserveae* odmiany *Blue Angel*.

Korzystnie również jest, gdy do otrzymywania mieszaniny używa się gatunku *Ilex meserveae* odmiany *Golden Girl*.

Korzystnie także jest, gdy do maceracji używa się 70% roztwór metanolu.

Korzystnie również jest, gdy do wytrącenia substancji balastowych używa się 30 g soli octanu ołowiu (II) w 70% metanolu.

Korzystnie także jest, gdy do ekstrakcji frakcji saponinowej używa się kolumny ekstrakcyjnej ze złożem odwróconym SPE, J.T. Baker.

Korzystnie również jest, gdy do wymywania frakcji saponinowej używa się 100% metanolu.

Istotą wynalazku jest również mieszanina związków saponinowych otrzymana sposobem będącym istotą wynalazku do zastosowania w leczeniu i profilaktyce chorób, takich jak hipercholesterolemia, hiperlipidemia mieszana i inne hiperlipidemie.

Istotą wynalazku jest również mieszanina związków saponinowych otrzymana sposobem będącym istotą wynalazku do zastosowania w leczeniu i profilaktyce chorób, takich jak cukrzyca insulinozależna, cukrzyca insulinoniezależna oraz cukrzyca związana z niedożywieniem.

Zaletą wynalazku jest możliwość łatwej izolacji bioaktywnego materiału z dostępnych lokalnie roślin, jak również jego całoroczna dostępność, niezależna od pory roku.

Stosując sposób według wynalazku z 60 g suchej masy roślinnej otrzymuje się ponad 1,5 g frakcji saponinowej (2,5%), o aktywności regulującej gospodarkę cukrową.

Przedmiot wynalazku został bliżej opisany w przykładach wykonania, które nie ograniczają zakresu ochrony.

Przykład 1. Liście *Ilex aquifolium* (bezodmianowa), natychmiast po zbiorze zamrożono i poddano liofilizacji, po czym sproszkowano, tak przygotowanych liści *I. meserveae* (60 g) ekstrahowano dwukrotnie, w temperaturze pokojowej, za pomocą 600 ml 70% metanolu. Następnie ekstrakty połączono, przefiltrowano, i dodano roztworu 30 g octanu ołowiu (II) w 70% metanolu w celu wytrącenia substancji balastowych (głównie związków fenolowych). Wyciąg odwirowano. Możliwe pozostałości jonów ołowiu wytrącono za pomocą rozcieńczonego roztworu kwasu siarkowego (VI), wyciąg ponownie odwirowano, oddzielono od osadu i zobojętniono. Supernatant rozcieńczono i ekstrahowano za pomocą kolumny ekstrakcyjnej ze złożem odwróconym (SPE, J. T. Baker). Frakcja saponinowa została wymyta z kolumny ekstrakcyjnej minimalną ilością czystego metanolu, następnie została zatężona na wyparce próżniowej i ostatecznie zliofilizowana. Uzyskano 1.5 g sproszkowanej frakcji wzbogaconej w saponiny, co odpowiadało 2.5% wyjściowej suchej masy liści.

Warunki pomiaru:

Analizę wykonano na chromatografii UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Sci) połączonej z detektorem ESI-qTOF. Rozdziały uzyskano na Kinetex C-18 (150 x 2,1 mm, 2,6  $\mu$ m; Phenomenex) przy przepływie 0,3 mL/min oraz temperaturze kolumny 30°C. Elucje warunkowały dwa rozpuszczalniki: woda (A) oraz acetonitryl (B) z 0,1% dodatkiem kwasu mrówkowego. Gradient elucji przedstawiał się następująco: 0→1 min. (2→30% B), 1→31 min. (30→60% B), 31→31,5 min. (60→100% B), 31,5→35,5 min. (100% B). Ekstrakty rozcieńczano mieszaniną woda/acetonitryl (1:1) do uzyskania końcowych stężeń 0,02 mg/mL. Objętość iniekcji wynosiła 5  $\mu$ l. Detektor pracował w trybie ujemnym. Główne parametry instrumentalne przedstawiały się następująco: zakres skanowania 50–2220 m/z, ciśnienie nebulizera 1,5 bara, przepływa azotu 7,0 L/min, napięcie kapilary 2,2 kV, energia kolizji 10 eV vs. 30 eV. Analizę otrzymanych widm masowych przeprowadzono przy użyciu Data Analysis (Bruker Daltonics). Ze względu na fakt, że do tej pory brak jest szczegółowych publikacji opisujących skład saponin *I. aquifolium* lub *meserveae*, ich analizy dokonano na podstawie porównania z dobrze opisanymi saponinami *I. paraguariensis*.

Tabela 1. UHPLC-ESI-MS saponin Ilex aquifolium bezodmianowa.

Nr	numer związku przypisany w pracy [31]	zmierzona [M-H] <sup>-</sup> [m/z]	wzór sumaryczny	Ilex aquifolium bezodmianowa	
				Rt [min]	Udział procentowy [%]
1.	<b>kudinoside N (SA)</b>	1235.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>27</sub>	6.78	16.4
2.	<b>matesaponin 3 (UA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	7.40	15.8
3.	<b>latifoloside L (PA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	8.06	22.3
5.	<b>ilexoside XV (SA)</b>	927.50	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	8.26	22.2
9.	matesaponin 4 (UA)	1219.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub>	9.11	3.1
9a.	matesaponin 2 (UA)	1219.61	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>17</sub>	9.21	7.1
13.	matesaponin 1 (UA)	1057.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	10.82	10.7
16.	ilekudinoside A	1057.56	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	9.45	2.4

Tabela 2. Identyfikacja głównych saponin Ilex aquifolium bezodmianowa.

Związek chemiczny	Interpretacja fragmentacji MS/MS	nazwa
1 Rt=6,8min; obl. [M-H] <sup>-</sup> = 1235,6061, błąd 0,5 ppm; wzór sumaryczny: C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>27</sub>	911 [M-(Hex+Hex)-H] <sup>-</sup> 765 [M-(Hex+Hex)-dxHex-H] <sup>-</sup> 749 [M-(Hex+Hex)-Hex-H] <sup>-</sup> 731 [M-(Hex+Hex)-Hex-18-H] <sup>-</sup> 603 [M-(Hex+Hex)-Hex-dxHex-H] <sup>-</sup> 471 [M-(Hex+Hex)-Hex- (dxHex+Pen)-H] <sup>-</sup>	kudinoside N (SA)
2 Rt=7,4min; obl. [M-H] <sup>-</sup> = 1073,5538, błąd -0,1 ppm; wzór sumaryczny: C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	749 [M-(Hex+Hex)-H] <sup>-</sup> 731 [M-(Hex+Hex)-18-H] <sup>-</sup> 453 [M-(Hex+Hex+18)- (dxHex+Pen)-H] <sup>-</sup>	matesaponin 3 (UA)
3 Rt=8,0min/8,1min obl. [M-H] <sup>-</sup> = 1073,5538, błąd -0,3 ppm; wzór sumaryczny: C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	911 [M-Hex-H] <sup>-</sup> 765 [M-Hex-dxHex-H] <sup>-</sup> 749 [M-Hex-Hex-H] <sup>-</sup> 731 [M-Hex-Hex-18-H] <sup>-</sup> 603 [M-Hex-(Hex+dxHex)-H] <sup>-</sup> 471 [M-Hex-(Hex+dxHex)-Pen-H] <sup>-</sup>	latifoloside L (PA)
5 Rt=8,3min; obl. [M-H] <sup>-</sup> = 927,4959, błąd 0,2 ppm; wzór sumaryczny: C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	765 [M-Hex-H] <sup>-</sup> 603 [M-Hex-Hex-H] <sup>-</sup> 471 [M-Hex-Hex-Pen-H] <sup>-</sup>	ilexoside XV (SA)
9 i 9a Rt=9,1min; obl. [M-H] <sup>-</sup> = 1219,6117, błąd -0,2 ppm; wzór sumaryczny: C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub>	895 [M-(Hex+Hex)-H] <sup>-</sup> 749 [M-(Hex+Hex)-dxHex-H] <sup>-</sup> 733 [M-(Hex+Hex)-Hex-H] <sup>-</sup> 715 [M-(Hex+Hex)-Hex-18-H] <sup>-</sup> 587 [M-(Hex+Hex)-(Hex+dxHex)-H] <sup>-</sup> 569 [M-(Hex+Hex)-(Hex+dxHex)- 18-H] <sup>-</sup> 455 [M-(Hex+Hex)-(Hex+dxHex)- Pen-H] <sup>-</sup>	matesaponin 4 i 2 (UA) (UA)
13 RT=10,8min; obl. [M-H] <sup>-</sup> = 1057,5589, błąd 0,1 ppm; wzór sumaryczny: C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	733 [M-(Hex+Hex)-H] <sup>-</sup> 587 [M-(Hex+Hex)-dxHex-H] <sup>-</sup> 455 [M-(Hex+Hex)-dxHex-Pen-H] <sup>-</sup>	matesaponin 1 (UA)
16 RT=11,85min; obl. [M-H] <sup>-</sup> = 1057,5589, błąd 0,5 ppm; wzór sumaryczny: C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	895 [M-Hex-H] <sup>-</sup> 749 [M-Hex-dxHex-H] <sup>-</sup> 733 [M-Hex-Hex-H] <sup>-</sup> 715 [M-Hex-Hex-18-H] <sup>-</sup> 587 [M-Hex-(Hex+dxHex)-H] <sup>-</sup> 569 [M-Hex-(Hex+dxHex)-18-H] <sup>-</sup> 455 [M-Hex-(Hex+dxHex)-Pen-H] <sup>-</sup>	ilekudinoside A (OA)
Identyfikacja saponin oparta na 1) bazie danych o saponinach w rodzinie Aquifoliaceae, 2) ścieżce fragmentacyjnej MS/MS. Aglikony (nazwy ang.): IG-B—ilexgenin B, OA—oleanolic acid, PA—pomolic acid, SA—sioresinolic acid, UA—ursolic acid. Strata fragmentacyjna jednostki cukru: dxHex—deoksyheksoza, Hex—heksoza, Hex(Ac)—acetyloheksoza, Pen—pentoza.		

Przykład 2. Liście *Ilex aquifolium* Alaska, natychmiast po zbiorze zamrożono i poddano liofilizacji, po czym sproszkowano, tak przygotowanych liści *I. meserveae* (60 g) ekstrahowano dwukrotnie, w temperaturze pokojowej, za pomocą 600 ml 70% metanolu. Następnie ekstrakty połączone, przefiltrowano, i dodano roztworu 30 g octanu ołowiu (II) w 70% metanolu w celu wytrącenia substancji balastowych (głównie związków fenolowych). Wyciąg odwirowano. Możliwe pozostałości jonów ołowiu wytrącono za pomocą rozcieńczonego roztworu kwasu siarkowego (VI), wyciąg ponownie odwirowano, oddzielono od osadu i zubożono. Supernatant rozcieńczono i ekstrahowano za pomocą kolumny ekstrakcyjnej ze złożem odwróconym (SPE, J. T. Baker). Frakcja saponinowa została wymyta z kolumny ekstrakcyjnej minimalną ilością czystego metanolu, następnie została zatężona na wyparce próżniowej i ostatecznie zliofilizowana. Uzyskano 1.34 g sproszkowanej frakcji wzbogaconej w saponiny, co odpowiadało 2.23% wyjściowej suchej masy liści.

Skład frakcji przedstawiono w Tabeli 3 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1).

Tabela 3. UHPLC-ESI-MS saponin *Ilex aquifolium* Alaska.

Nr	numer związku przypisany w pracy [31]	zmierzona [M-H] <sup>-</sup> [m/z]	wzór sumaryczny	<i>Ilex aquifolium</i> Alaska	
				Rt [min]	Udział procentowy [%]
1.	<b>kudinoside N (SA)</b>	1235.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>27</sub>	6.78	16.1
2.	<b>matesaponin 3 (UA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	7.40	14.9
3.	<b>latifoloside L (PA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	8.06	22.4
5.	<b>ilexoside XV (SA)</b>	927.50	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	8.26	21.6
9.	matesaponin 4 (UA)	1219.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub>	9.11	2.8
9a.	matesaponin 2 (UA)	1219.61	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>17</sub>	9.21	7.3
13.	matesaponin 1 (UA)	1057.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	10.82	10.9
16.	ilekudinoside A	1057.56	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	9.45	4.0

Przykład 3. Liście *Ilex aquifolium* Ferox Argentea, natychmiast po zbiorze zamrożono i poddano liofilizacji, po czym sproszkowano, tak przygotowanych liści *I. meserveae* (60 g) ekstrahowano dwukrotnie, w temperaturze pokojowej, za pomocą 600 ml 70% metanolu. Następnie ekstrakty połączone, przefiltrowano, i dodano roztworu 30 g octanu ołowiu (II) w 70% metanolu w celu wytrącenia substancji balastowych (głównie związków fenolowych). Wyciąg odwirowano. Możliwe pozostałości jonów ołowiu wytrącono za pomocą rozcieńczonego roztworu kwasu siarkowego (VI), wyciąg ponownie odwirowano, oddzielono od osadu i zubożono. Supernatant rozcieńczono i ekstrahowano za pomocą kolumny ekstrakcyjnej ze złożem odwróconym (SPE, J. T. Baker). Frakcja saponinowa została wymyta z kolumny ekstrakcyjnej minimalną ilością czystego metanolu, następnie została zatężona na wyparce próżniowej i ostatecznie zliofilizowana. Uzyskano 1.12 g sproszkowanej frakcji wzbogaconej w saponiny, co odpowiadało 1.86% wyjściowej suchej masy liści.

Skład frakcji przedstawiono w Tabeli 4 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1).

Tabela 4. UHPLC-ESI-MS saponin *Ilex aquifolium* Ferox Argentea.

Nr	numer związku przypisany w pracy [31]	zmierzona [M-H] <sup>-</sup> [m/z]	wzór sumaryczny	<i>Ilex aquifolium</i> Ferox Argentea	
				Rt [min]	Udział procentowy [%]
1.	<b>kudinoside N (SA)</b>	1235.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>27</sub>	6.78	15.8
2.	<b>matesaponin 3 (UA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	7.40	13.2
3.	<b>latifoloside L (PA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	8.06	23.6
5.	<b>ilexoside XV (SA)</b>	927.50	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	8.26	22.8
9.	matesaponin 4 (UA)	1219.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub>	9.11	3.7
9a.	matesaponin 2 (UA)	1219.61	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>17</sub>	9.21	7.6
13.	matesaponin 1 (UA)	1057.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	10.82	10.1
16.	ilekudinoside A	1057.56	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	9.45	3.2

Przykład 4. Liście *Ilex aquifolium* Golden van Tol, natychmiast po zbiorze zamrożono i poddano liofilizacji, po czym sproszkowano, tak przygotowanych liści *I. meserveae* (60 g) ekstrahowano dwukrotnie, w temperaturze pokojowej, za pomocą 600 ml 70% metanolu. Następnie ekstrakty połączone, prze-filtrowano, i dodano roztworu 30 g octanu ołowiu (II) w 70% metanolu w celu wytrącenia substancji balastowych (głównie związków fenolowych). Wyciąg odwirowano. Możliwe pozostałości jonów ołowiu wytrącono za pomocą rozcieńczonego roztworu kwasu siarkowego (VI), wyciąg ponownie odwirowano, oddzielono od osadu i zobojętniono. Supernatant rozcieńczono i ekstrahowano za pomocą kolumny ekstrakcyjnej ze złożem odwróconym (SPE, J. T. Baker). Frakcja saponinowa została wymyta z kolumny ekstrakcyjnej minimalną ilością czystego metanolu, następnie została zatężona na wyparce próżniowej i ostatecznie zliofilizowana. Uzyskano 1.23 g sproszkowanej frakcji wzbogaconej w saponiny, co odpowiadało 2.05% wyjściowej suchej masy liści.

Skład frakcji przedstawiono w Tabeli 5 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1).

Tabela 5. UHPLC-ESI-MS saponin *Ilex aquifolium* Golden van Tol.

Nr	numer związku przypisany w pracy [31]	zmierzona [M-H] <sup>-</sup> [m/z]	wzór sumaryczny	<i>Ilex aquifolium</i> Golden van Tol	
				Rt [min]	Udział procentowy [%]
1.	<b>kudinoside N (SA)</b>	1235.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>27</sub>	6.78	16.9
2.	<b>matesaponin 3 (UA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	7.40	15.6
3.	<b>latifolioside L (PA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	8.06	22.1
5.	<b>ilexoside XV (SA)</b>	927.50	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	8.26	22.4
9.	matesaponin 4 (UA)	1219.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub>	9.11	3.2
9a.	matesaponin 2 (UA)	1219.61	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>17</sub>	9.21	7.1
13.	matesaponin 1 (UA)	1057.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	10.82	10.4
16.	ilekudinoside A	1057.56	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	9.45	2.3

Przykład 5. Liście *Ilex meserveae* Blue Angel, natychmiast po zbiorze zamrożono i poddano liofilizacji, po czym sproszkowano, tak przygotowanych liści *I. meserveae* (60 g) ekstrahowano dwukrotnie, w temperaturze pokojowej, za pomocą 600 ml 70% metanolu. Następnie ekstrakty połączone, prze-filtrowano, i dodano roztworu 30 g octanu ołowiu (II) w 70% metanolu w celu wytrącenia substancji balastowych (głównie związków fenolowych). Wyciąg odwirowano. Możliwe pozostałości jonów ołowiu wytrącono za pomocą rozcieńczonego roztworu kwasu siarkowego (VI), wyciąg ponownie odwirowano, oddzielono od osadu i zobojętniono. Supernatant rozcieńczono i ekstrahowano za pomocą kolumny ekstrakcyjnej ze złożem odwróconym (SPE, J. T. Baker). Frakcja saponinowa została wymyta z kolumny ekstrakcyjnej minimalną ilością czystego metanolu, następnie została zatężona na wyparce próżniowej i ostatecznie zliofilizowana. Uzyskano 1.03 g sproszkowanej frakcji wzbogaconej w saponiny, co odpowiadało 1.71% wyjściowej suchej masy liści.

Skład frakcji przedstawiono w Tabeli 6 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1).

Tabela 6. UHPLC-ESI-MS saponin *Ilex aquifolium* Blue Angel.

Nr	numer związku przypisany w pracy [31]	zmierzona [M-H] <sup>-</sup> [m/z]	wzór sumaryczny	<i>Ilex meserveae</i> Blue Angel	
				Rt [min]	Udział procentowy [%]
1.	<b>kudinoside N (SA)</b>	1235.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>27</sub>	6.78	16.4
2.	<b>matesaponin 3 (UA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	7.40	15.2
3.	<b>latifolioside L (PA)</b>	1073.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	8.06	23.3
5.	<b>ilexoside XV (SA)</b>	927.50	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	8.26	21.3
9.	matesaponin 4 (UA)	1219.61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub>	9.11	3.3
9a.	matesaponin 2 (UA)	1219.61	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>17</sub>	9.21	7.2
13.	matesaponin 1 (UA)	1057.56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	10.82	10.5
16.	ilekudinoside A	1057.56	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	9.45	2.8

Przykład 6. Liście *Ilex meserveae* Golden Girl, natychmiast po zbiorze zamrożono i poddano liofilizacji, po czym sproszkowano, tak przygotowanych liści *I. meserveae* (60 g) ekstrahowano dwukrotnie, w temperaturze pokojowej, za pomocą 600 ml 70% metanolu. Następnie ekstrakty połączono, przefiltrowano, i dodano roztworu 30 g octanu ołowiu (II) w 70% metanolu w celu wytrącenia substancji balastowych (głównie związków fenolowych). Wyciąg odwirowano. Możliwe pozostałości jonów ołowiu wytrącono za pomocą rozcieńczonego roztworu kwasu siarkowego (VI), wyciąg ponownie odwirowano, oddzielono od osadu i zubożono. Supernatant rozcieńczono i ekstrahowano za pomocą kolumny ekstrakcyjnej ze złożem odwróconym (SPE, J. T. Baker). Frakcja saponinowa została wymyta z kolumny ekstrakcyjnej minimalną ilością czystego metanolu, następnie została zatężona na wyparce próżniowej i ostatecznie zliofilizowana. Uzyskano 1.15 g sproszkowanej frakcji wzbogaconej w saponiny, co odpowiadało 1.91% wyjściowej suchej masy liści.

Skład frakcji przedstawiono w Tabeli 7 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1).

Tabela 7. UHPLC-ESI-MS saponin *Ilex aquifolium* Golden Girl.

Nr	numer związku przypisany w pracy [31]	zmierzona [M-H] <sup>-</sup> [m/z]	wzór sumaryczny	<i>Ilex meserveae</i> Golden Girl	
				Rt [min]	Udział procentowy [%]
1.	<b>kudinoside N (SA)</b>	1235,61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>27</sub>	6,78	16,6
2.	<b>matesaponin 3 (UA)</b>	1073,56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	7,40	14,1
3.	<b>latifolioside L (PA)</b>	1073,56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	8,06	22,9
5.	<b>ilexoside XV (SA)</b>	927,50	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	8,26	21,6
9.	matesaponin 4 (UA)	1219,61	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub>	9,11	2,9
9a.	matesaponin 2 (UA)	1219,61	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>17</sub>	9,21	7,4
13.	matesaponin 1 (UA)	1057,56	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	10,82	10,3
16.	ilekudinoside A	1057,56	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	9,45	4,2

## Wyniki badań

### Metodyka:

Badaniu poddane były dwie grupy szczurów rasy Zucker (nokautowanych), stanowiącej model badawczy oporności insulinowej, nietolerancji glukozy, syndromu metabolicznego i genetycznej otyłości oraz trzy grupy szczurów rasy Wistar, po 12 osobników w każdej grupie.

### Szczury nokautowane rasy Zucker:

- grupa kontrolna Z – skarmiane dietą kontrolną
- grupa badana Z – skarmiane dietą wzbogaconą o frakcje saponinowe wyizolowane z *I. aquifolium* (bezodmianowa), w dawce 10 mg/kg masy ciała

### Szczury rasy Wistar:

- grupa kontrolna I – referencyjna – przyjmowała normalną dietę,
- grupa kontrolna II – skarmiana była wysokocholesterolową dietą o podwyższonej podaży cholesterolu w ilości 20 g/100 g karmy,
- grupa badana – przyjmująca preparat saponinowy wyizolowany z *I. aquifolium* (bezodmianowa), w dawce 10 mg/kg masy ciała wraz z podwyższoną podażą cholesterolu w ilości 20 g/100 g karmy.

Czas trwania skarmiania wynosił 8 tygodni. Rejestrowano zużycie paszy, wody oraz masa ciała. Badania krwi zostały wykonane po 8 tyg. Parametry biochemiczne krwi wykonano zgodnie z zaleceniami IFCC. W dniu zakończenia badań zwierzęta poddano eutanazji. W badaniach histopatologicznych post mortem wykazano duży wzrost zawartości glikogenu w hepatocytach w diecie wysokotłuszczowej dla szczurów rasy Wistar. Podaż frakcji saponinowej w diecie szczurów skarmianych dietą obniżała w sposób widoczny poziom glikogenu zgromadzonego w wątrobie. Dieta wysokotłuszczowa wywołała spadek zawartości komórek kubkowych w nabłonku jelita biodrowego. Jest to typowa dla tego typu diety zmiana degeneracyjna. W grupie badanej szczurów rasy Wistar przyjmującej preparat saponinowy stwierdzono histopatologicznie istotnie mniejsze zmiany degeneracyjne komórek kubkowych. W badaniach parametrów biochemicznych krwi u szczurów nokautowanych rasy Zucker stwierdzono spadek stężenia glukozy (o 18%) jak również stężenia insuliny (o 32%). Dla szczurów rasy Wistar również zaobserwowano istotny spadek stężenia glukozy (o 29%) jak i stężenia insuliny (o 19%). Wyniki te mogą świadczyć o zmniejszonej insulinooporności.

Tabela 8. Wybrane parametry krwi badanych grup dla szczurów modyfikowanych rasy Zucker.

	Glukoza (mmol/L)	Insulina (pg/mL)
Grupa kontrolna Z	6,55	4495
Grupa badana Z	5,39	3066

Tabela 9. Wybrane parametry krwi badanych grup dla szczurów rasy Wistar.

	Glukoza (mmol/L)	Insulina (pg/mL)
Grupa kontrolna I	4,01	51
Grupa kontrolna II	8,61	98
Grupa badana	6,11	79

## Wykaz literatury:

1. Yang, Q.; Zhang, Z.; Gregg, E.W.; Flanders, W.D.; Merritt, R.H., F. B. Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among US adults. *JAMA internal medicine*, **2014**, 174, 516–524.
2. Stanhope, K.L. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **2016**, 53, 52–67.
3. Bray, G.A. *The battle of the bulge: a history of obesity research*; Dorrance Publishing Company: 2007.
4. Maersk, M.; Belza, A.; Stødkilde-Jørgensen, H.; Ringgaard, S.; Chabanova, E.; Thomsen, H.; Pedersen, S.B.; Astrup, A.; Richelsen, B. Sucrose- sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. *The American journal of clinical nutrition* **2012**, 95, 283–289.
5. Oliveira, D.T.d.; Fernandes, I.d.C.; Sousa, G.G.d.; Santos, T.A.P.d.; Paiva, N.C.N.d.; Carneiro, C.M.; Evangelista, E.A.; Barboza, N.R.; Guerra-Sá, R. High-sugar diet leads to obesity and metabolic diseases in ad libitum-fed rats irrespective of caloric intake. *Archives of endocrinology and metabolism* **2020**, 64, 71–81.
6. Schulze, M.B.; Manson, J.E.; Ludwig, D.S.; Colditz, G.A.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Sugar-Sweetened Beverages, Weight Gain, and Incidence of Type 2 Diabetes in Young and Middle-Aged Women. *JAMA* **2004**, 292, 927–934, doi:10.1001/jama.292.8.927.
7. Skyler, J.S. The Economic Burden of Diabetes and the Benefits of Improved Glycemic Control: The Potential Role of a Continuous Glucose Monitoring System. *Diabetes Technology & Therapeutics* **2000**, 2, 7–12, doi:10.1089/15209150050214069.
8. Chaudhury, A.; Duvoor, C.; Reddy Dendi, V.S.; Kraleti, S.; Chada, A.; Ravilla, R.; Marco, A.; Shekhawat, N.S.; Montales, M.T.; Kuriakose, K. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in endocrinology* **2017**, 8, 6.
9. Lane, M.D.; Cha, S.H. Effect of glucose and fructose on food intake via malonyl-CoA signaling in the brain. *Biochemical and biophysical research communications* **2009**, 382, 1–5.
10. Cox, C.L.; Stanhope, K.L.; Schwarz, J.M.; Graham, J.L.; Hatcher, B.; Griffen, S. C.; Bremer, A.A.; Berglund, L.; McGahan, J.P.; Havel, P.J., et al. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks reduces net fat oxidation and energy expenditure in overweight/obese men and women. *European Journal of Clinical Nutrition* **2012**, 66, 201–208, doi:10.1038/ejcn.2011.159.
11. Malik, V.S.; Popkin, B.M.; Bray, G.A.; Després, J.-P.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Sugar-Sweetened Beverages and Risk of Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. A meta-analysis **2010**, 33, 2477–2483, doi:10.2337/dc10-1079.
12. Teff, K.L.; Grudziak, J.; Townsend, R.R.; Dunn, T.N.; Grant, R.W.; Adams, S.H.; Keim, N.L.; Cummings, B.P.; Stanhope, K.L.; Havel, P.J. Endocrine and metabolic effects of

- consuming fructose-and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2009**, 94, 1562–1569.
13. Taskinen, M.-R.; Packard, C.J.; Borén, J. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Nutrients* **2019**, 11, 1987.
  14. Adiels, M.; Olofsson, S.-O.; Taskinen, M.-R.; Borén, J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2008**, 28, 1225–1236.
  15. Schwarz, J.-M.; Noworolski, S.M.; Erkin-Cakmak, A.; Korn, N.J.; Wen, M.J.; Tai, V.W.; Jones, G.M.; Pali, S.P.; Velasco-Alin, M.; Pan, K. Effects of dietary fructose restriction on liver fat, de novo lipogenesis, and insulin kinetics in children with obesity. *Gastroenterology* **2017**, 153, 743–752.
  16. Kahn, S.E.; Cooper, M.E.; Del Prato, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet* **2014**, 383, 1068–1083.
  17. Choudhury, H.; Pandey, M.; Hua, C.K.; Mun, C.S.; Jing, J.K.; Kong, L.; Ern, L.Y.; Ashraf, N.A.; Kit, S.W.; Yee, T.S. An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus: A systematic review. *Journal of traditional and complementary medicine* **2018**, 8, 361–376.
  18. Marina, A.L.; Utzschneider, K.M.; Wright, L.A.; Montgomery, B.K.; Marcovina, S.M.; Kahn, S.E. Colesevelam improves oral but not intravenous glucose tolerance by a mechanism independent of insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function. *Diabetes Care* **2012**, 35, 1119–1125.
  19. Matsuda, M.; Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity research & clinical practice* **2013**, 7, e330–e341.
  20. Pullman, J.; Darsow, T.; Frias, J.P. Pramlintide in the management of insulinusing patients with type 2 and type 1 diabetes. *Vascular health and risk management* **2006**, 2, 203.
  21. Bird, S.R.; Hawley, J.A. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. *BMJ open sport & exercise medicine* **2017**, 2.
  22. DeWitt, D.E.; Hirsch, I.B. Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review. *Jama* **2003**, 289, 2254–2264.
  23. Olsen, S.A. A review of complementary and alternative medicine (CAM) by people with multiple sclerosis. *Occupational Therapy International* **2009**, 16, 57–70.
  24. Izzo, A.A. Interactions between Herbs and Conventional Drugs: Overview of the Clinical Data. *Medical Principles and Practice* **2012**, 21, 404–428, doi:10.1159/000334488.
  25. Karimi, A.; Majlesi, M.; Rafieian-Kopaei, M. Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. *Journal of nephro pharmacology* **2015**, 4, 27.
  26. Tabuti, J.R.S.; Kukunda, C.B.; Kaweesi, D.; Kasilo, O.M.J. Herbal medicine use in the districts of Nakapiripirit, Pallisa, Kanungu, and Mukono in Uganda. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **2012**, 8, 35, doi:10.1186/1746-4269-8-35.
  27. Alinejad-Mofrad, S.; Foadoddini, M.; Saadatjoo, S.A.; Shayesteh, M. Improvement of glucose and lipid profile status with Aloe vera in pre-diabetic subjects: a randomized controlled-trial. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* **2015**, 14, 1–7.
  28. Anderson, R.A.; Zhan, Z.; Luo, R.; Guo, X.; Guo, Q.; Zhou, J.; Kong, J.; Davis, P.A.; Stoecker, B.J. Cinnamon extract lowers glucose, insulin and cholesterol in people with elevated serum glucose. *Journal of traditional and complementary medicine* **2016**, 6, 332–336.
  29. Chuengsamarn, S.; Rattanamongkolgul, S.; Luechapudiporn, R.; Phisalaphong, C.; Jirawatnotai, S. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. *Diabetes care* **2012**, 35, 2121–2127.
  30. Howard, M.E.; White, N.D. Potential benefits of cinnamon in type 2 diabetes. *American Journal of Lifestyle Medicine* **2013**, 7, 23–26.
  31. Senadheera, S.P.A.S.; Ekanayake, S.; Wanigatunge, C. Anti-hyperglycaemic effects of herbal porridge made of *Scoparia dulcis* leaf extract in diabetics—a randomized crossover clinical trial. *BMC complementary and alternative medicine* **2015**, 15, 1–9.

32. Gul e, R.; Karim, S.; Khurhsid, R.; Saeed-ul-Hassan, S.; Tariq, I.; Sultana, M.; Rashid, A.J.; Shah, S.H.; Murtaza, G. Hypoglycemic activity of *Ficus racemosa* bark in combination with oral hypoglycemic drug in diabetic human. *Acta Pol Pharm* **2013**, *70*, 1045–1049.
33. Klein, G.A.; Stefanuto, A.; Boaventura, B.C.; de Moraes, E.C.; Cavalcante, L.d.S.; de Andrade, F.; Wazlawik, E.; Di Pietro, P.F.; Maraschin, M.; da Silva, E.L. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition* **2011**, *30*, 320–332.
34. Gan, R.-Y.; Zhang, D.; Wang, M.; Corke, H. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. *Nutrients* **2018**, *10*, 1682.
35. Correa, V.G.; Corrêa, R.C.G.; Vieira, T.F.; Koehnlein, E.A.; Bracht, A.; Peralta, R.M. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil): a promising adjuvant in the treatment of diabetes, obesity, and metabolic syndrome. *Nutraceuticals and Natural Product Derivatives: Disease Prevention & Drug Discovery* **2019**, 167–181.
36. Junior, E.L.C.; Morand, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health—A review. *Journal of Functional Foods* **2016**, *21*, 440–454.
37. Riachi, L.G.; De Maria, C.A.B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. *Journal of Functional Foods* **2017**, *38*, 308–320.
38. Stuby, J.; Gravestock, I.; Wolfram, E.; Pichierri, G.; Steurer, J.; Burgstaller, J.M. Appetite-suppressing and satiety-increasing bioactive phytochemicals: A systematic review. *Nutrients* **2019**, *11*, 2238.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania frakcji saponinowych, otrzymywanych z zielonych części roślin ostrokrzewu, **znamienny tym**, że wysuszone, sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu takich jak *Ilex aquifolium* albo *Ilex meserveae*, które zawierają na 100 g suchej masy co najmniej 0,177 g kudinolidu N; co najmniej 0,163 g matesaponiny 3; co najmniej 0,232 g latifolidu L, co najmniej 0,235 g ilexosidu XV dwukrotnie maceruje się co najmniej 12 godz. rozpuszczalnikiem polarnym, jakim jest metanol, następnie tak przygotowane ekstrakty łączy się, filtruje, i wytrąca substancje balastowe, głównie związki fenolowe, solą octanu ołowiu (II) w rozpuszczalniku polarnym jakim jest metanol, w celu doczyszczenia frakcji właściwej, po czym wyciąg odwirowuje się, a możliwe pozostałości jonów ołowiu wytrąca się za pomocą roztworu kwasu nieorganicznego, jakim jest kwas siarkowy (VI), wyciąg ponownie odwirowuje się, oddziela od osadu i zubożętnia, kolejno supernatant rozcieńcza się i ekstrahuje za pomocą kolumny ekstrakcyjnej, po czym frakcję saponinową wymywa się z kolumny ekstrakcyjnej rozpuszczalnikiem polarnym jakim jest metanol, następnie zatęża się ją na wyparce próżniowej i poddaje procesowi liofilizacji, w wyniku czego uzyskuje się sproszkowaną frakcję będącą mieszaniną bogatą w saponiny.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wysuszone, sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu zawierają na 100 g suchej masy: kudinolid N od 0,177 do 0,41 g, matesaponina 3 od 0,163 do 0,395 g, latifolidu L od 0,232 do 0,457 g, ilexosid XV od 0,235 do 0,555 g.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do otrzymywania używa się gatunku *Ilex aquifolium* odmiany Alaska.
4. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do otrzymywania używa się gatunku *Ilex aquifolium* odmiany Golden van Tol.
5. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do otrzymywania używa się gatunku *Ilex aquifolium* odmiany Ferox Argentea.
6. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do otrzymywania używa się gatunku *Ilex meserveae* odmiany Blue Angel.
7. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do otrzymywania używa się gatunku *Ilex meserveae* odmiany Golden Girl.

8. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do maceracji używa się 70% roztwór metanolu.
9. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do wytrącenia substancji balastowych używa się 30 g soli octanu ołowiu (II) w 70% metanolu.
10. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do ekstrakcji frakcji saponinowej używa się kolumny ekstrakcyjnej ze złożem odwróconym SPE, J.T. Baker.
11. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do wymywania frakcji saponinowej używa się 100% metanolu.
12. Mieszanina związków saponinowych otrzymana sposobem według zastrzeżenia 1 do zastosowania w leczeniu i profilaktyce chorób, takich jak cukrzyca insulinozależna, cukrzyca insulinozależna oraz cukrzyca związana z niedożywieniem.