

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233572**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419621**

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2016**

(51) Int.Cl.

**A61K 8/49 (2006.01)**

**A61K 8/92 (2006.01)**

**A61K 8/9789 (2017.01)**

**A61Q 19/00 (2006.01)**

(54)

**Sposób otrzymywania preparatu do pielęgnacji skóry  
oraz preparat do pielęgnacji skóry**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**04.06.2018 BUP 12/18**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**29.11.2019 WUP 11/19**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet  
MARIi CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL  
UNIwersytet MEDYCZNY W LUBLINIE,  
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**SŁAWOMIR DRESLER, Lublin, PL  
ROMAN PADUCH, Lublin, PL  
MACIEJ STRZEMSKI, Puławy, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Maria Brodzicka**

**PL 233572 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatu do pielęgnacji skóry z ekstraktów z korzenia żmijowca włoskiego *Echium italicum L.*, będących źródłem biologicznie aktywnych substancji jak: alantoina, szikonina, czy też polifenole. Preparat otrzymany sposobem według wynalazku znajduje zastosowanie do pielęgnacji skóry po zranieniach, oparzeniach różnej etiologii, zakażeniach bakteryjnych czy grzybiczych.

Znane jest zastosowanie alantoiny jako substancji czynnej w różnego rodzaju preparatach dermatologicznych i pielęgnacyjnych w postaci maści lub zasypek służących do pielęgnacji skóry, zarówno dorosłych, jak i dzieci, a nawet niemowląt.

Znane jest również zastosowanie alantoiny w kosmetyce, przykładowo do produkcji nawilżających i zmiękczających skórę emulsji płynnych, kremów, żeli pod prysznic, antyperspirantów, a także kosmetyków pielęgnacyjnych dla dzieci. Jak podaje Fedoreyev i wsp. w artykule „Production of alantoin, rabsosidin and rosmarinic acid in callus cultures of the seacoastal plant *Mertensia maritima* (Boraginaceae)” (Plant Cell Tiss. Organ. Cult., 2012, 110:183–188) alantoina znalazła zastosowanie w ponad 1300 preparatach kosmetycznych.

Alantoina stosowana w większości dostępnych na rynku preparatów pozyskiwana jest na drodze syntezy chemicznej. Jest to proces względnie skomplikowany. Z kolei znane sposoby wyizolowania alantoiny z ekstraktów roślin powszechnie występujących w Polsce takich jak żywokost lekarski, ograniczają się do otrzymywania tylko alantoiny, jako głównej substancji aktywnej występującej w tym surowcu, stąd preparaty zawierające alantoinę pochodzącą z tego rodzaju źródeł, np. maść żywokostowa czy żele żywokostowe, często pozbawione są innych komponentów o działaniu leczniczo pielęgnacyjnym.

Inną substancją aktywną pochodzenia roślinnego mającą istotne znaczenie dla funkcjonowania prawidłowych mechanizmów naprawczych skóry jest szikonina.

Jak podają m.in. Papageorgiou i wsp., w artykule „*The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products*” (Angew. Chem. Int. Ed., 1999, 38:270–300); Ge i wsp., w artykule „*Effects of rare earth elements on the growth of Arnebia euchroma cells and the biosynthesis of shikonin*” (Plant Growth Regul., 2006, 48:283–290); Chen i wsp., w artykule „*Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives*” (Phytother. Res., 2002, 16:199–209) czy też Zare i wsp., w artykule „*Bioprocess engineering of Echium italicum L.: induction of shikonin and alkannin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures*” (Plant Cell Tiss. Organ. Cult., 2010, 100:157–164), szikonina wykazuje silną aktywność przeciwzapalną, przeciwnowotworową, przeciwzakrzepową oraz przeciwbakteryjną, zwłaszcza w stosunku do bakterii Gram-dodatnich.

Teresa Bujak w artykule p.t. „Maści aloesowe z wyciągami ziół chińskich” (Pol. J. Cosmetol. 2014, 17(3):231–237) opisuje, że szikonina ma silne właściwości przeciwbakteryjne, a korzeń nawrotu czerwonokorzeniowego, który obfituje w ten związek, stosowany jest przez medycynę azjatycką jako lek na egzemy skóry.

Yoo i wsp., w artykule „*Lithospermum erythrorhizon extract protects keratinocytes and fibroblasts against oxidative stress*” (J. Med. Food, 2014, 00(0):1–8) wykazali, że ekstrakt z nawrotu, bogaty w szikoninę działał ochronnie na ludzkie komórki skóry, zabezpieczając je przed stresem oksydacyjnym wywołanym nadtlenkiem wodoru i w konsekwencji opóźniał procesy jej starzenia.

Innym źródłem roślinnym do pozyskiwania szikoniny jest wyciąg z korzeni *Alcanna tinctoria*. Należy jednak podkreślić, że szikonina, na skalę przemysłową, pozyskiwana jest metodami biotechnologicznymi, a uzyskiwanie metabolitów w kulturach *in vitro*, powoduje względnie wysokie koszty prowadzenia takiego procesu.

Innym ważnym składnikiem preparatów dermatologicznych czy kosmetyków do pielęgnacji skóry są witaminy, a zwłaszcza witamina F, będąca mieszaniną nienasyconych linolenowych kwasów tłuszczowych wchodzących m.in. w skład olejów roślinnych. Jak podaje Ando i wsp., w artykule „*Linolenic acid and  $\alpha$ -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin*” (Arch. Dermatol. Res., 1998, 290(7):375–81), kwasy te odgrywają w organizmie człowieka bardzo ważną rolę fizjologiczną w procesie regeneracji nabłonka i tkanki łącznej skóry, co bezpośrednio wpływa na utrzymanie skóry w dobrej kondycji. Wykazano również, że niedobór witaminy F prowadzi wręcz do różnego rodzaju zmian skórnych takich jak, nadmierne łuszczenie naskórka, suchość skóry, łojotok czy skłonność do trądziku.

Celem wynalazku było opracowanie, prostego, ekologicznego i ekonomicznego sposobu pozyskiwania biologicznie aktywnych substancji głównie alantoiny i szikoniny, wzbogaconych o polifenolowe substancje antyoksydacyjne z jednego, łatwo dostępnego, naturalnego surowca, służących do opracowania prostego składu preparatu o dużej skuteczności w regeneracji i pielęgnacji uszkodzonej skóry.

Sposób otrzymywania preparatu do pielęgnacji skóry z wykorzystaniem korzenia żmijowca włoskiego *Echium italicum L.* do otrzymywania ekstraktów zawierających alantoinę i szikoninę wraz z mieszaniną polifenoli, według wynalazku charakteryzuje się tym, że uprzednio oczyszczony, oddzielony od kory, wysuszony, zmielony i przesiany przez sito o średnicy oczek nie większej niż 1,6 mm, korzeń *Echium italicum L.*, zwilża się alkoholem etylowym i po odparowaniu alkoholu zalewa rozpuszczalnikiem polarnym w postaci wody destylowanej w stosunku wagowym korzeń/woda jak 1 do 4, wytrząsa przez co najmniej 4 godziny, a następnie ekstrahuje się w procesie kawitacji z użyciem łaźni ultradźwiękowej przez 30–60 minut, w temperaturze 35–45°C, powtarzając proces kilkukrotnie i po odwirowaniu części stałych otrzymuje się ekstrakt o zawartości od 0,25 do 0,35 g alantoiny w 100 ml roztworu. Dodatkowo ekstrakt zawiera mieszaninę polifenoli których zawartość wynosi od 75 do 120 mg ekwiwalentu kwasu galusowego na 100 ml ekstraktu.

Oddzieloną od korzenia *Echium italicum L.* korę, przygotowaną jak uprzednio korzeń, zalewa się tłoczonym na zimno olejem lnianym w stosunku wagowym kora korzenia/olej jak 1 do 10 i wytrząsa nieustannie przez 48–72 godzin, po czym części stałe mieszaniny odfiltrowuje się, otrzymując ekstrakt o zawartości szikoniny w ilości od 0,2 do 0,3 g na 100 ml olejowego ekstraktu wraz z zestawem cennych nienasyconych kwasów tłuszczowych i witamin pochodzących z oleju. W końcowym etapie, wodny ekstrakt zawierający alantoinę i polifenole emulguje się z lipofilnym podłożem maściowym, korzystnie z euceryną, w stosunku wagowym 1:1, ciągle rozcierając w porcelanowym moździerzu podgrzanym w łaźni wodnej 60–75°C, a po uzyskaniu homogennej postaci, dodaje się ekstrakt olejowy szikoniny w stosunku wagowym do poprzednich składników o połowę mniejszym, i po uzyskaniu homogennego mazidła chłodzi do temp. 8–7°C, otrzymując postać zestalonej maści.

Preparat otrzymany sposobem według wynalazku, na podłożu lipofilnej maści z mieszaniną biologicznie aktywnych substancji jak alantoina, szikonina, czy polifenole pochodzące z korzenia *Echium italicum L.*, a także witamin wchodzących w skład oleju lnianego według wynalazku charakteryzuje się tym, że składniki takie jak, podłoże maściowe; wodny ekstrakt z korzenia *Echium italicum L.* o zawartości alantoiny w granicach od 0,25 do 0,35 g na 100 g ekstraktu wraz z mieszaniną polifenoli w ilości od 75 do 120 mg wyrażonej jako ekwiwalent kwasu galusowego w 100 g ekstraktu oraz ekstrakt olejowy z zawartością szikoniny w granicach od 0,2 do 0,3 g na 100 g ekstraktu wraz z zestawem nienasyconych kwasów tłuszczowych i witamin, występują w proporcjach wagowych jak, 1:1:0,5.

Zaletą wynalazku jest prosty, ekologiczny i ekonomiczny sposób pozyskiwania z zastosowaniem dwójakiego rodzaju ekstrakcji korzeń – woda i kora korzenia – olej lniany, dwóch biologicznie aktywnych substancji – alantoiny i szikoniny wraz z cennymi polifenolami o właściwościach antyoksydacyjnych z jednego, łatwo dostępnego naturalnego surowca zawierającego optymalnie wysokie zawartości wymienionych substancji.

Preparat według wynalazku ma prosty skład, z zawartością substancji aktywnych alantoiny i szikoniny wspomaganych dodatkowo przez antyoksydanty i składniki oleju lnianego jak, nienasycone kwasy tłuszczowe i witaminy, głównie witaminę F. Przeprowadzone badania wykazały dużą skuteczność preparatu w pielęgnacji skóry, a zarazem brak jego właściwości toksycznych.

Wynalazki przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

#### Przykład 1

300 g uprzednio oczyszczonego, oddzielonego od kory, wysuszonego, zmielonego i przesianego przez sito o średnicy oczek 1,6 mm korzenia *Echium italicum L.*, zwilżono alkoholem etylowym i po odparowaniu alkoholu zalano 1200 ml wody destylowanej i wytrząsano przez co najmniej 4 godziny, po czym w procesie kawitacji z użyciem łaźni ultradźwiękowej o mocy ultradźwięków 240 W oraz częstotliwości 35 kHz przeprowadzano ekstrakcję w ciągu 30 minut, w temperaturze 45°C, powtarzając proces kilkukrotnie. Następnie, części stałe mieszaniny oddzielono od roztworu poprzez przefiltrowanie mieszaniny przez jałową gazę. Z użyciem elektroforezy kapilarnej w odniesieniu do wzorca alantoiny o czystości  $\geq 98\%$ , określono zawartość alantoiny na poziomie 0,25 g w 100 g wodnego ekstraktu. Dodatkowo, metodą Folina-Cicalteau oznaczono całkowitą zawartość związków polifenolowych na poziomie 75 mg ekwiwalentu kwasu galusowego na 100 g ekstraktu.

W drugim etapie 50 g oddzielonej od korzenia *Echium italicum* L. kory, uprzednio wysuszonej, zmielonej i przesianej przez sito o średnicy oczek 1,5 mm, zwilżono alkoholem etylowym i po odparowaniu alkoholu zalano, 500 ml tłoczonego na zimno oleju lnianego i wytrząsano nieustannie przez 48 godzin, po czym części stałe mieszaniny odwirowano z prędkością 5000 rpm przez 10 minut.

Otrzymany supernatant dodatkowo przefiltrowano przez jałową gazę poprzez przelanie ekstraktu olejowego przez kilkakrotnie złożoną i umieszczoną w lejku gazę jałową. W otrzymanym ekstrakcie metodą spektrofotometryczną przy długości fali 530 nm w odniesieniu do wzorca szikoniny o czystości  $\geq 98\%$  określono zawartości szikoniny w ilości 0,3 g na 100 g ekstraktu.

W końcowym etapie, 200 ml wodnego ekstraktu zawierającego alantoinę zemulgowano z 200 g euceryny, ciągle rozcierając w porcelanowym moździerzu podgrzanym w łaźni wodnej do 75°C, a po uzyskaniu homogennej postaci dodano 100 g ekstraktu olejowego, a następnie po uzyskaniu homogennego mazidła ochłodzono je do temp. 7°C, otrzymując postać zestalonej maści o wiśniowo-czerwonej barwie.

#### Przykład 2

200 g uprzednio oczyszczonego, oddzielonego od kory, wysuszonego, zmielonego i przesianego przez sito o średnicy oczek 1,5 mm korzenia *Echium italicum* L., zwilżono alkoholem etylowym i po odparowaniu alkoholu zalano 800 ml wody destylowanej i wytrząsano przez co najmniej 4 godziny, po czym w procesie kawitacji z użyciem łaźni ultradźwiękowej o mocy ultradźwięków 240 W oraz częstotliwości 35 kHz przeprowadzano ekstrakcję w temperaturze 35°C w ciągu 60 minut, powtarzając proces kilkakrotnie. Następnie, części stałe mieszaniny odwirowano z prędkością 5000 rpm przez 10 minut, po czym z użyciem elektroforezy kapilarnej w odniesieniu do wzorca allantoiny o czystości  $\geq 98\%$ , określono zawartość alantoiny na poziomie 0,35 g w 100 g wodnego ekstraktu. Dodatkowo, metodą Folina-Cicalteau oznaczono całkowitą zawartość związków polifenolowych na poziomie 120 mg ekwiwalentu kwasu galusowego na 100 g ekstraktu.

W drugim etapie 100 g oddzielonej od korzenia *Echium italicum* L. kory, uprzednio wysuszonej, zmielonej i przesianej przez sito o średnicy oczek 1,6 mm, zwilżono alkoholem etylowym i po odparowaniu alkoholu zalano 1000 ml tłoczonego na zimno oleju lnianego i wytrząsano nieustannie przez 72 godziny. Części stałe mieszaniny odsączono na jałowej gazie a otrzymany supernatant dodatkowo przefiltrowano przez kilkakrotnie złożoną jałową gazę. W otrzymanym ekstrakcie określono zawartości szikoniny metodą spektrofotometryczną, przy długości fali 530 nm w odniesieniu do wzorca szikoniny o czystości  $\geq 98\%$ , w ilości 0,2 g na 100 g ekstraktu.

W końcowym etapie, 100 g wodnego ekstraktu zawierającego alantoinę zemulgowano ze 100 g euceryny, ciągle rozcierając w porcelanowym moździerzu podgrzanym w łaźni wodnej do 60°C, a po uzyskaniu homogennej postaci dodano 50 g ekstraktu olejowego i ochłodzono do temp. 8°C, otrzymując postać zestalonej maści o wiśniowo-czerwonej barwie.

#### Przykład 3

Skład preparatu do pielęgnacji skóry:

- 50 g lipofilnej maści stanowiącej podłoże w postaci euceryny,
- 50 g ekstraktu wodnego korzeni *E. italicum* L. o zawartości alantoiny 0,35 g/100 g ekstraktu i zawartości polifenoli na poziomie 75 mg ekwiwalentu kwasu galusowego na 100 g ekstraktu,
- 25 g ekstraktu olejowego kory korzeni *E. italicum* L. o zawartości szikoniny 0,2 g/100 g wraz z zestawem cennych nienasyconych kwasów tłuszczowych i witamin.

#### Przykład 4

Skład preparatu do pielęgnacji skóry:

- 250 g lipofilna maść stanowiąca podłoże w postaci euceryny,
- 250 g ekstraktu wodnego korzeni *E. italicum* L. o zawartości alantoiny 0,25 g/100 g ekstraktu i zawartości polifenoli na poziomie 120 mg ekwiwalentu kwasu galusowego na 100 g ekstraktu,
- 125 g ekstraktu olejowego kory korzeni *E. italicum* L. o zawartości szikoniny 0,3 g/100 g ekstraktu wraz z zestawem cennych nienasyconych kwasów tłuszczowych i witamin.

W kolejnym przykładzie badano wpływ preparatu na żywotność komórek skóry, wyrażoną poprzez aktywność dehydrogenazy bursztynianowej oraz stabilność błon komórkowych z wykorzystaniem ludzkich fibroblastów skóry właściwej.

#### Przykład 5

1 g preparatu według wynalazku, rozpuszczono w 5 ml roztworu wodno-etanolowego w proporcji 1:1, z użyciem łaźni ultradźwiękowej o mocy 240 W oraz częstotliwości 35 kHz ogrzanej do temperatury 35°C. Z otrzymanego roztworu sporządzono kilka roztworów o stężeniach: 25, 50, 75, 100, 125 oraz

150  $\mu\text{g/ml}$ , które wykorzystano do badań z użyciem hodowli komórkowych i analiz metodami spektrofotometrycznymi jak, MTT opartej na ocenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej żywych komórek oraz NR oceniającej stabilność błon komórkowych.

Wpływ preparatu o różnych stężeniach na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej żywych komórek ludzkich fibroblastów skóry właściwej oraz stabilność ich błon przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Stężenie ( $\mu\text{g/ml}$ )	Metoda	
	MTT	NR
	Wynik w %	
Kontrola	100 $\pm$ 0,79	100 $\pm$ 3,66
25	102,76 $\pm$ 1,15	97,56 $\pm$ 1,84
50	102,95 $\pm$ 0,57	101,52 $\pm$ 2,70
75	103,54 $\pm$ 0,76	100,00 $\pm$ 4,88
100	104,33 $\pm$ 3,96	100,91 $\pm$ 1,51
150	105,12 $\pm$ 2,43	100,30 $\pm$ 2,43

Przedstawione wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem stężenia preparatu wzrasta aktywność dehydrogenazy bursztynianowej będącej odzwierciedleniem pozytywnego wpływu preparatu na zwiększenie żywotności komórek badanych fibroblastów, co pośrednio świadczy o pielęgnacyjnych właściwościach preparatu w zakresie regeneracji uszkodzonej skóry.

Wyniki testu NR nie wykazują wpływu preparatu na stabilność błon komórkowych, co potwierdza fakt braku toksycznych właściwości preparatu.

Dodatkowo, w przykładzie wykazującym brak toksyczności preparatu, wykonano obserwację komórek ludzkich fibroblastów pod mikroskopem, z wykorzystaniem metody May-Grünwald-Giemsa, w której zabarwione jądra komórkowe widoczne są ciemno niebieskim kolorze, zaś cytoplazma w kolorze czerwono-fioletowym.

Obrazy mikroskopowe zamieszczono na rysunku, na którym widoczne są zdrowe komórki ludzkich fibroblastów wybarwione metodą May-Grünwald-Giemsa, ciemniejsze obszary to jądra komórkowe zaś jaśniejsze wokół nich to cytoplazma.

Fig. 1 przedstawia obraz kontrolny – bez zastosowania preparatu według wynalazku, zaś fig. 2 i fig. 3 – komórki ludzkich fibroblastów potraktowane roztworem preparatu odpowiednio o stężeniach – 25  $\mu\text{g/ml}$  i 75  $\mu\text{g/ml}$ . Wizualizacja efektu działania preparatu na zdrowe komórki ludzkich fibroblastów nie wykazała istotnych różnic w morfologii tych komórek w stosunku do kontroli.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania preparatu do pielęgnacji skóry z wykorzystaniem korzenia żmijowca włoskiego *Echium italicum L.* do otrzymywania ekstraktów alantoiny i szikoniny wraz z polifenolami, **znamienny tym**, że uprzednio oczyszczony korzeń *Echium italicum L.* oddziela się od kory, suszy, miele, przesiewa przez sito o średnicy oczek nie większej niż 1,6 i zwilża alkoholem etylowym, a po odparowaniu alkoholu zalewa rozpuszczalnikiem polarnym w postaci wody destylowanej w stosunku wagowym korzeń/woda jak 1 do 4, wytrząsa przez co najmniej 4 godziny, a następnie ekstrahuje się w procesie kawitacji z użyciem łaźni ultradźwiękowej przez 30–60 minut, w temperaturze 35–45°C, powtarzając proces kilkukrotnie i po odwirowaniu części stałych otrzymuje się ekstrakt o zawartości od 0,25 do 0,35 g alantoiny w 100 g roztworu, dodatkowo ekstrakt zawiera polifenole których zawartość wynosi od 75 do 120 mg

ekwiwalentu kwasu galusowego na 100 g ekstraktu, zaś oddzieloną od korzenia *Echium italicum* L. korę, przygotowaną jak uprzednio korzeń, zalewa się tłoczonym na zimno olejem lnianym w stosunku wagowym kora korzenia/olej jak 1 do 10 i wytrząsa nieustannie przez 48–72 godzin, po czym części stałe mieszaniny odfiltruje się, otrzymując ekstrakt olejowy o zawartości szikoniny w ilości od 0,2 do 0,3 g na 100 g ekstraktu wzbogacony o zestaw nienasyconych kwasów tłuszczowych i witamin, pochodzących z oleju, przy czym w końcowym etapie, wodny ekstrakt zawierający alantoinę i polifenole emulguje się z lipofilnym podłożem maściowym, korzystnie z euceryną, w stosunku wagowym 1:1, ciągle rozcierając w porcelanowym moździerzu podgrzanym w łaźni wodnej do temperatury 60–75°C, a po uzyskaniu homogennej postaci dodaje się ekstrakt olejowy szikoniny w stosunku wagowym do poprzednich składników o połowę mniejszym, i po uzyskaniu homogennego mazidła chłodzi do temp. 8–7°C, otrzymując postać zestalonej maści.

2. Preparat do pielęgnacji skóry, na podłożu lipofilnej maści w postaci euceryny, będący homogeniczną mieszaniną biologicznie aktywnych substancji jak alantoina, szikonina czy polifenole pochodzące z korzenia *Echium italicum* L. oraz zestawem nienasyconych kwasów tłuszczowych i witamin zawartych w tłoczonym na zimno oleju lnianym, **znamienny tym**, że składniki takie jak, podłoże maściowe; wodny ekstrakt z korzenia *Echium italicum* L. o zawartości alantoiny w granicach od 0,25 do 0,35 g na 100 g ekstraktu wraz z mieszaniną polifenoli w ilości od 75 do 120 mg wyrażonej jako ekwiwalent kwasu galusowego w 100 g ekstraktu oraz ekstrakt olejowy z zawartością szikoniny w granicach od 0,2 do 0,3 g na 100 g ekstraktu wraz z zestawem nienasyconych kwasów tłuszczowych i witamin, występują w proporcjach wagowych jak, 1:1:0,5.

## Rysunki

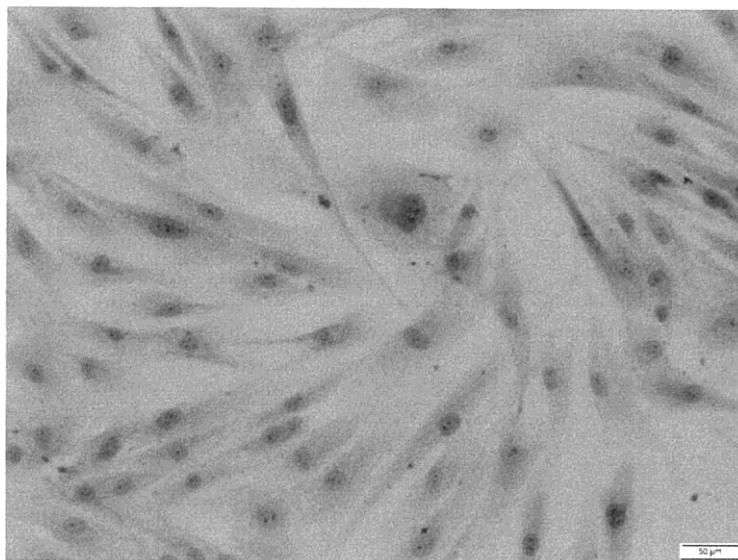


Fig.1

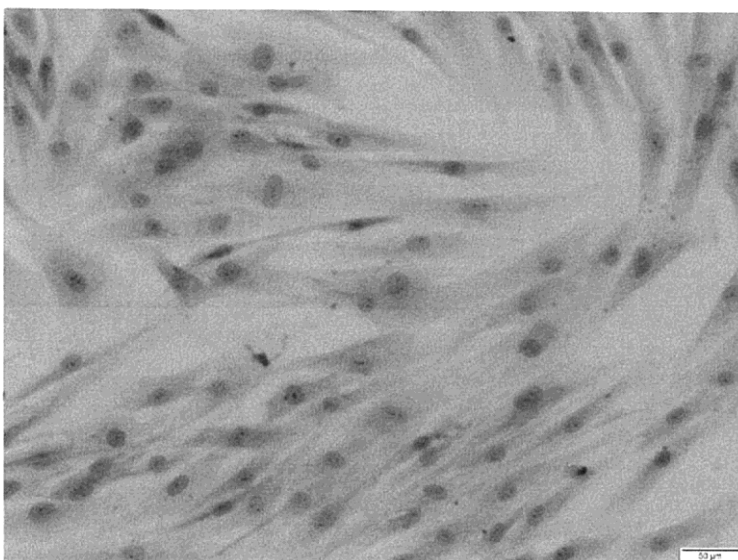


Fig. 2

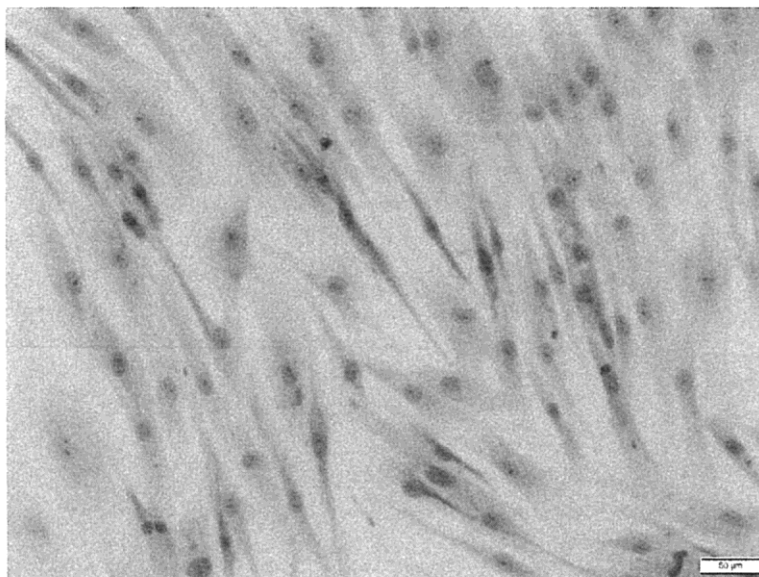


Fig.3