

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244950 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437123**

(22) Data zgłoszenia: **2021.02.25**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.08.29 BUP 35/2022**

(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 WROCLAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ANTONI SZUMNY, Wrocław, PL
ROBERT KUPCZYŃSKI, Dobrzykowice, PL
PIOTR KUOPKA, Bystre, PL
ANNA ZWYRZYKOWSKA, Wrocław, PL
PRZEMYSŁAW BĄBELEWSKI, Wrocław, PL
NATALIA PACHURA, Bardo Śląskie, PL
RENATA NOWACZYK, Wrocław, PL
KATARZYNA WIŃSKA, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania frakcji terpenoidowych oraz zastosowanie mieszaniny związków terpenoidowych

PL 244950 B1

Opis wynalazku

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

Liczne badania epidemiologiczne wskazują, że nadwaga i otyłość są ważnymi czynnikami wpływającymi na gospodarkę węglowodanową i mogą przyczyniać 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 modulację 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 β -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 wychwyty 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 tłuszczo-

wych 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 α -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 terapie 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 szałwii 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 mieszanekę 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 terpenoidowe wyodrębnione z europejskich odmian ostrokrzewu, posiadają właściwości pozytywnie wpływające na gospodarkę cukrową organizmu.

Istotą sposobu według wynalazku jest to, że wysuszone, sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu takich jak *Ilex aquifolium* albo *Ilex meserveyae*, które zawierają na 100 g suchej masy: co najmniej 0,043 g β -amyryny, co najmniej 0,174 g α -amyryny; co najmniej 0,04 g lupeolu; co najmniej 0,087 g (3 β)-lup-20(29)-enu,3,28-bis, co najmniej 0,009 g ursolowego kwasu i izomeru kwasu ursolowego co najmniej 0,009 g, maceruje się co najmniej 12 godzin rozpuszczalnikiem niepolarnym, takim jak dichlorometan, po czym rozpuszczalnik odparowuje się i dodaje heksanu i oczyszcza się, wstępnie ekstrahując trzykrotnie mieszaniną woda : polarny rozpuszczalnik organiczny taki jak metanol, następnie po wymyciu, frakcję organiczną odparowuje się i poddaje oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej, wymywając mieszaniną rozpuszczalników niepolarnego i polarnego, takich jak heksan i eter dietylowy, w wyniku czego otrzymuje się na pierwszej frakcji triacyloglicerole, będące odpadem oraz na kolejnych frakcjach triterpeny będące mieszaniną związków terpenoidowych.

Korzystnie jest, gdy sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu zawierają na 100 g suchej masy: β -amyryna od 0,043 do 0,28 g, α -amyryna od 0,174 do 0,64 g; lupeol od 0,04 do 0,24 g; (3 β)-lup-20(29)-ene,3,28-bis od 0,087 do 0,27 g, ursolowy kwas od 0,009 do 0,096 g i jego izomer kwasu ursolowego od 0,009 do 0,112 g.

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

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

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

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

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

Korzystnie także jest, gdy do wstępnego oczyszczania używa się mieszaniny woda : metanol w stosunku (20:80).

Korzystnie również jest, gdy do oczyszczania frakcji terpenowej na kolumnie chromatograficznej używa się wypełnienia Kieselgel 60 230–400 Mesh Merck.

Korzystnie także jest, gdy do wymywania poszczególnych frakcji używa się mieszaninę heksan: eter dietylowy w stosunku 80:1 ze zwiększającą się polarnością.

Z kolei istotą zastosowania mieszaniny związków terpenoidowych określonej w istocie powyżej jest zastosowanie jej w leczeniu i profilaktyce chorób takich jak cukrzyca insulinozależna, cukrzyca insulinoniezależna oraz cukrzyca związana z niedożywieniem oraz w regulacji gospodarki cukrowej organizmu.

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 ze 100 g suchej masy roślinnej otrzymuje się ponad 1,6 g frakcji triterpenopidowej, o aktywności regulującej gospodarkę cukrową.

Rysunek przedstawia struktury dominujących w ekstrakcie triterpenów, gdzie Wzór 1 to α -amyryna, Wzór 2 to β -amyryna, Wzór 3 to lupeol, Wzór 4 to lup-20(29)-en-3 β ,28-diol, Wzór 5 to kwas ursulowy, Wzór 6 to izomer kwasu ursulowego. Przedmiot wynalazku został bliżej opisany w przykładach wykonania, które nie ograniczają zakresu ochrony.

Przykład 1: Do 100 g suchych, zmielonych (<0,5 mm) liści *I. aquifolium* bezodmianowa dodaje się 350 mL dichlorometanu i pozostawia na 24 godziny i odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Pozostałość rozpuszcza się w 50 mL heksanu i przemywa trzykrotnie 50 mL mieszaniną metanol : woda 80:20 z dodatkiem 20 μ L 2M kwasu solnego 37%. Po odwirowaniu i odparowaniu uzyskuje się 5,1 g oleistej, zielonej pozostałości. Następnie rozdziela się ją na kolumnie chromatograficznej (Kieselgel 60, 230–400 Mesh Merck) wymywając frakcję będącą odpadem, tj. woski i triacyloglicerole, rozpuszczalnikiem heksan : eter dietylowy 80:1. Kolejno, zwiększenie polarności fazy ruchomej, poprzez zwiększenie udziału eteru dietylowego w mieszaninie do 1:1, powoduje wypłukanie frakcji terpenoidowych. Po wstępnej identyfikacji (TLC i GC-MS) zagęszcza się je na wyparce próżniowej do sucha, uzyskując 1,2 g białej, bezpostaciowej frakcji.

Profil wyższych terpenoidów oceniano stosując metodę derywatywacji z silylacją N,O-Bis (trimetylosilyl)otrifluoroacetamidu (BSTFA) na GC-MS (Shimadzu QP 2020, Shimadzu, Kyoto, Japonia). Roztwór przefiltrowano i odparowano na wyparce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie do próbki dodano 500 μ L pirydyny i 50 μ L BSTFA. Mieszaninę przeniesiono do wialki i ogrzewano przez 25 minut w temperaturze 70°C. Separację uzyskano za pomocą kolumny kapilarnej Zebron ZB-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Analizę GC-MS przeprowadzono według następujących parametrów: Skanowanie wykonywano w zakresie od 40 do 1050 m/z w jonizacji strumieniem elektronów (EI) przy napięciu 70 eV, w trybie 10 skanów s⁻¹. Analizy wykonano z użyciem helu jako gazu nośnego przy przepływie 1,0 mL min⁻¹ w proporcji 1:20 i następującym programie: 100°C przez 1 minutę, wzrost temperatury o 2,0°C min⁻¹ od 100 do 190°C; wzrost temperatury o 5°C min⁻¹ od 190 do 300°C. Temperatura dozownika wynosiła 280°C. Związki były identyfikowane przy użyciu dwóch różnych metod analitycznych, które można porównać: czasy retencji z autentycznymi związkami chemicznymi (Supelco C7 – C40 Saturated Alkanes Standard) i otrzymane widma masowe, z dostępną biblioteką (Willey NIST 17, indeks dopasowania >90%).

Dodatkowo frakcje terpenoidowe identyfikowano wykonując widma ¹³C i ¹H NMR. Strukturę chemiczną dominujących w mieszaninie składników składniki potwierdzono wykonując stosowne widma magnetycznego rezonansu jądrowego (Bruker, CDCI3, 600 MHz). Na widmach ¹³C zidentyfikowano następujące sygnały diagnostyczne: a) dla α -amyryny: 154,30; 124,25, 78,60 ppm; b) dla β -amyryny: 145,02; 122,38; 78,11 ppm; c) dla lupeolu: 150,98; 108,32; 79,02 ppm; d) dla kwasu ursulowego: 176,20; 138,09; 79,04; 55,30 ppm oraz dla jego izomer: 180,09; 144,81; 122,65; 78,30.

Tabela 1. Skład procentowy frakcji terpenoidowych *Ilex aquifolium*, bezodmianowa.
Skład wyrażono jako pochodne TMS, ze względu na metodykę oznaczenia.

RI exp.	RI lit.	RT	Nazwa	<i>Ilex aquifolium</i> bezodmianowa [%]
2835	2832	20.65	all-trans-skwalen	ślady
3162	3141	24.93	α -Tokoferol, TMS	1.35
3361	3370	27.78	(3 β)-Olean-18-en-3-ol, (O-TMS)	3.31
3370	3344	27.93	β -Sitosterol (TMS)	6.38
3384	3353	28.16	β-Amyryna (TMS)	10.65
3397	3385	28.37	Germanikol (TMS)	2.08
3420	3406	28.79	α-Amyryna (TMS)	29.81
3427	3435	28.93	Lupeol (TMS)	16.77
3508	3523	30.50	Lupenyly octan	1.14
3530	3540	30.99	Uwaol, 2O-TMS	3.13
3563	3560	31.73	(3β)-Lup-20(29)-ene, 3,28-bisTMS	14.59
3580	3588	32.11	Betulinowy kwas (bisTMS)	1.62
3596	3591	32.46	Oleanowy kwas (TMS)	0.69
3643	3657	33.60	Ursolowy kwas (TMS)	2.88
3650	n.a.	33.75	Izomer kwasu ursulowego (TMS)	4.97

gdzie RI exp. To eksperymentalny indeks retencji wyznaczony wg n-alkanów na kolumnie ZB-5; RI lit. to indeks retencji odczytany w bazie danych NIST17; RT to czas retencji.

Przykład 2. Do 100 g suchych, zmielonych (<0,5 mm) liści *I. aquifolium* odmiany Alaska dodaje się 350 mL chloroformu i pozostawia na 24 godziny i odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Pozostałość rozpuszcza się w 50 mL heksanu i przemywa trzykrotnie 50 mL mieszaniny metanol : woda 80:20 z dodatkiem 20 μ L 2M kwasu solnego 37%. Po odwirowaniu i odparowaniu uzyskuje się 5,3 g oleistej, zielonej pozostałości. Następnie rozdziela się ją na kolumnie chromatograficznej (Kieselgel 60, 230–400 Mesh Merck) wymywając frakcją będącą odpadem, tj. woski i triacyloglicerole, rozpuszczalnikiem heksan : eter dietylowy 80:1. Kolejno, zwiększenie polarności fazy ruchomej, poprzez zwiększenie udziału eteru dietylowego w mieszaninie do 1:1, powoduje wypłukanie frakcji terpenoidowych. Po wstępnej identyfikacji (TLC i GC-MS) zagęszcza się uzyskując 1,6 g białej, bezpostaciowej frakcji.

Skład tak uzyskanej frakcji przedstawia się w Tabeli 2 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1):

Tabela 2. Skład procentowy frakcji terpenoidowych w *Ilex aquifolium* Alaska.
Skład wyrażono jako pochodne TMS, ze względu na metodykę oznaczenia.

RI exp.	RI lit.	RT	Nazwa	<i>Ilex aquifolium</i> Alaska [%]
2835	2832	20.65	all-trans-Skwalen	0.69
3162	3141	24.93	α -Tokoferol, TMS	2.21
3361	3370	27.78	(3 β)-Olean-18-en-3-ol, (O-TMS)	ślady
3370	3344	27.93	β -Sitosterol (TMS)	7.67
3384	3353	28.16	β-Amyryna (TMS)	9.05
3397	3385	28.37	Germanikol (TMS)	2.69
3420	3406	28.79	α-Amyryna (TMS)	28.97
3427	3435	28.93	Lupeol (TMS)	17.34
3508	3523	30.50	Lupenyly octan	0.75
3530	3540	30.99	Uwaol, 2O-TMS	2.35
3563	3560	31.73	(3β)-Lup-20(29)-ene, 3,28-bisTMS	12.13
3580	3588	32.11	Betulinowy kwas (bisTMS)	1.90
3596	3591	32.46	Oleanowy kwas (TMS)	1.00
3643	3657	33.60	Ursolowy kwas (TMS)	5.22
3650	n.a.	33.75	Izomer kwasu ursulowego (TMS)	6.54

gdzie RI exp. To eksperymentalny indeks retencji wyznaczony wg n-alkanów na kolumnie ZB-5; RI lit. to indeks retencji odczytany w bazie danych NIST17; RT to czas retencji.

Przykład 3. Do 100 g suchych, zmielonych (<0,5 mm) liści *I. aquifolium* odmiany *Ferox argentea* dodaje się 350 mL chloroformu i pozostawia na 24 godziny i odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Pozostałość rozpuszcza się w 50 mL heksanu i przemywa trzykrotnie 50 mL mieszaniny metanol : woda 80:20 z dodatkiem 20 μ L 2M kwasu solnego 37%. Po odwirowaniu i odparowaniu uzyskuje się 4,3 g oleistej, zielonej pozostałości. Następnie rozdziela się ją na kolumnie chromatograficznej (Kieselgel 60, 230–400 Mesh Merck) wymywając frakcją będącą odpadem, tj. woski i triacyloglicerole, rozpuszczalnikiem heksan : eter dietylowy 80:1. Kolejno, zwiększenie polarności fazy ruchomej, poprzez zwiększenie udziału eteru dietylowego w mieszaninie do 1:1, powoduje wypłukanie frakcji terpenoidowych. Po wstępnej identyfikacji (TLC i GC-MS) zagęszcza się uzyskując 1,3 g białej, bezpostaciowej frakcji.

Skład tak uzyskanej frakcji przedstawiono w Tabeli 3 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1):

Tabela 3. Skład procentowy frakcji terpenoidowych w *Ilex aquifolium Ferox Argentea*.
Skład wyrażono jako pochodne TMS, ze względu na metodykę oznaczenia.

RI exp.	RI lit.	RT	Nazwa	<i>Ilex aquifolium Ferox Argentea</i> [%]
2835	2832	20.65	all-trans-Skwalen	1.15
3162	3141	24.93	α -Tokoferol, TMS	0.69
3361	3370	27.78	(3 β)-Olean-18-en-3-ol, (O-TMS)	ślady
3370	3344	27.93	β -Sitosterol (TMS)	7.74
3384	3353	28.16	β-Amyryna (TMS)	11.55
3397	3385	28.37	Germanikol (TMS)	2.48
3420	3406	28.79	α-Amyryna (TMS)	34.68
3427	3435	28.93	Lupeol (TMS)	14.50
3508	3523	30.50	Lupenyłu octan	1.38
3530	3540	30.99	Uwaol, 2O-TMS	2.42
3563	3560	31.73	(3β)-Lup-20(29)-ene, 3,28-bisTMS	10.57
3580	3588	32.11	Betulinowy kwas (bisTMS)	1.44
3596	3591	32.46	Oleanowy kwas (TMS)	1.24
3643	3657	33.60	Ursolowy kwas (TMS)	3.80
3650	n.a.	33.75	Izomer kwasu ursulowego (TMS)	6.36

gdzie RI exp. To eksperymentalny indeks retencji wyznaczony wg n-alkanów na kolumnie ZB-5; RI lit. to indeks retencji odczytany w bazie danych NIST17; RT to czas retencji.

Przykład 4. Do 100 g suchych, zmielonych (<0,5 mm) liści *I. aquifolium* odmiany *Golden van Tol* dodaje się 350 mL chloroformu i pozostawia na 24 godziny i odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Pozostałość rozpuszcza się w 50 mL heksanu i przemywa trzykrotnie 50 mL mieszaniny metanol : woda 80:20 z dodatkiem 20 μ L 2M kwasu solnego 37%. Po odwirowaniu i odparowaniu uzyskuje się 4,3 g oleistej, zielonej pozostałości. Następnie rozdziela się ją na kolumnie chromatograficznej (Kieselgel 60, 230–400 Mesh Merck) wymywając frakcją będącą odpadem, tj. woski i triacyloglicerole, rozpuszczalnikiem heksan : eter dietylowy 80:1. Kolejno, zwiększenie polarności fazy ruchomej, poprzez zwiększenie udziału eteru dietylowego w mieszaninie do 1:1, powoduje wypłukanie frakcji terpenoidowych. Po wstępnej identyfikacji (TLC i GC-MS) zagęszcza się uzyskując 1,41 g białej, bezpostaciowej frakcji.

Skład tak uzyskanej frakcji przedstawia się w Tabeli 4 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1):

Tabela 4. Skład procentowy frakcji terpenoidowych w *Ilex aquifolium* Golden van Tol.
Skład wyrażono jako pochodne TMS, ze względu na metodykę oznaczenia.

RI exp.	RI lit.	RT	Nazwa	<i>Ilex aquifolium</i> Golden van Tol [%]
2835	2832	20.65	all-trans-Skwalen	0.14
3162	3141	24.93	α -Tokoferol, TMS	0.65
3361	3370	27.78	(3 β)-Olean-18-en-3-ol, (O-TMS)	ślady
3370	3344	27.93	β -Sitosterol (TMS)	8.47
3384	3353	28.16	β-Amyryna (TMS)	10.71
3397	3385	28.37	Germanikol (TMS)	2.22
3420	3406	28.79	α-Amyryna (TMS)	29.80
3427	3435	28.93	Lupeol (TMS)	13.84
3508	3523	30.50	Lupenylu octan	2.44
3530	3540	30.99	Uwaol, 2O-TMS	5.33
3563	3560	31.73	(3β)-Lup-20(29)-ene, 3,28-bisTMS	13.85
3580	3588	32.11	Betulinowy kwas (bisTMS)	2.39
3596	3591	32.46	Oleanowy kwas (TMS)	1.42
3643	3657	33.60	Ursolowy kwas (TMS)	3.77
3650	n.a.	33.75	Izomer kwasu ursulowego (TMS)	4.99

gdzie RI exp. To eksperymentalny indeks retencji wyznaczony wg n-alkanów na kolumnie ZB-5; RI lit. to indeks retencji odczytany w bazie danych NIST17; RT to czas retencji.

Przykład 5. Do 100 g suchych, zmielonych (<0,5 mm) liści *I. meserveae* odmiany Blue Angel dodaje się 350 mL chloroformu i pozostawia na 24 godziny i odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Pozostałość rozpuszcza się w 50 mL heksanu i przemywa trzykrotnie 50 mL mieszaniny metanol : woda (80:20 z dodatkiem 20 μ L 2M kwasu solnego 37%). Po odwirowaniu i odparowaniu uzyskuje się 3,3 g oleistej, zielonej pozostałości. Następnie rozdziela się ją na kolumnie chromatograficznej (Kieselgel 60, 230–400 Mesh Merck) wymywając frakcją będącą odpadem, tj. woski i triacyloglicerole, rozpuszczalnikiem heksan : eter dietylowy 80:1. Kolejno, zwiększenie polarności fazy ruchomej, poprzez zwiększenie udziału eteru dietylowego w mieszaninie do 1:1, powoduje wypłukanie frakcji terpenoidowych. Po wstępnej identyfikacji (TLC i GC-MS) zagęszcza się uzyskując 0,87 g białej, bezpostaciowej frakcji.

Skład tak uzyskanej frakcji przedstawia się w Tabeli 5 poniżej (wg metodyki opisanej w przykładzie 1):

Tabela 5. Skład procentowy frakcji terpenoidowych w *Ilex meserveae* Blue Angel.

Skład wyrażono jako pochodne TMS, ze względu na metodykę oznaczenia.

RI exp.	RI lit.	RT	Nazwa	<i>Ilex meserveae</i> Blue Angel [%]
2835	2832	20.65	all-trans-Skwalen	śl.
3162	3141	24.93	α -Tokoferol, TMS	1.78
3361	3370	27.78	(3 β)-Olean-18-en-3-ol, (O-TMS)	ślady
3370	3344	27.93	β -Sitosterol (TMS)	7.23
3384	3353	28.16	β-Amyryna (TMS)	10.72
3397	3385	28.37	Germanikol (TMS)	1.74
3420	3406	28.79	α-Amyryna (TMS)	27.98
3427	3435	28.93	Lupeol (TMS)	21.69
3508	3523	30.50	Lupenylu octan	0.93
3530	3540	30.99	Uwaol, 2O-TMS	2.74
3563	3560	31.73	(3β)-Lup-20(29)-ene, 3,28-bisTMS	12.24
3580	3588	32.11	Betulinowy kwas (bisTMS)	2.02
3596	3591	32.46	Oleanowy kwas (TMS)	0.99
3643	3657	33.60	Ursolowy kwas (TMS)	4.17
3650	n.a.	33.75	Izomer kwasu ursulowego (TMS)	4.95

gdzie RI exp. To eksperymentalny indeks retencji wyznaczony wg n-alkanów na kolumnie ZB-5; RI lit. to indeks retencji odczytany w bazie danych NIST17; RT to czas retencji.

Przykład 6. Do 100 g suchych, zmielonych (<0,5 mm) liści *I. meserveae* odmiany Golden Girl dodaje się 350 mL chloroformu i pozostawia na 24 godziny i odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Pozostałość rozpuszcza się w 50 mL heksanu i przemywa trzykrotnie 50 mL mieszaniny metanol : woda (80:20 z dodatkiem 20 μ L 2M kwasu solnego 37%). Po odwirowaniu i odparowaniu uzyskuje się 4,5 g oleistej, zielonej pozostałości. Następnie rozdziela się ją na kolumnie chromatograficznej (Kieselgel 60, 230–400 Mesh Merck) wymywając frakcję będącą odpadem, tj. woski i triacyloglicerole, rozpuszczalnikiem heksan : eter dietylowy 80:1. Kolejno, zwiększenie polarności fazy ruchomej, poprzez zwiększenie udziału eteru dietylowego w mieszaninie do 1:1, powoduje wypłukanie frakcji terpenoidowych. Po wstępnej identyfikacji (TLC i GC-MS) zagęszcza się uzyskując 1,05 g białej, bezpościowej frakcji.

Skład tak uzyskanej frakcji przedstawia się w Tabeli 6 poniżej (wg metodyki opisanej przykładowie 1):

Tabela 6. Skład procentowy frakcji terpenoidowych w *Ilex meserveae* Golden Girl. Skład wyrażono jako pochodne TMS, ze względu na metodykę oznaczenia.

RI exp.	RI lit.	RT	Nazwa	<i>Ilex meserveae</i> Golden Girl [%]
2835	2832	20.65	all-trans-Skwalen	0.26
3162	3141	24.93	α -Tokoferol, TMS	0.96
3361	3370	27.78	(3 β)-Olean-18-en-3-ol, (O-TMS)	ślady
3370	3344	27.93	β -Sitosterol (TMS)	5.25
3384	3353	28.16	β-Amyryna (TMS)	13.71
3397	3385	28.37	Germanikol (TMS)	1.19
3420	3406	28.79	α-Amyryna (TMS)	38.54
3427	3435	28.93	Lupeol (TMS)	14.84
3508	3523	30.50	Lupenylu octan	1.65
3530	3540	30.99	Uwaol, 2O-TMS	2.89
3563	3560	31.73	(3β)-Lup-20(29)-ene, 3,28-bisTMS	9.39
3580	3588	32.11	Betulinowy kwas (bisTMS)	1.77
3596	3591	32.46	Oleanowy kwas (TMS)	1.34
3643	3657	33.60	Ursolowy kwas (TMS)	5.14
3650	n.a.	33.75	Izomer kwasu ursulowego (TMS)	3.07

gdzie RI exp. To eksperymentalny indeks retencji wyznaczony wg n-alkanów na kolumnie ZB-5; RI lit. to indeks retencji odczytany w bazie danych NIST17; RT to czas retencji.

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 terpenoidowe 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 terpenoidowy 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 terpenoidowej w diecie szczurów skarmianych dietą obniżał 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 terpenoidowy stwierdzono histopatologicznie istotnie mniejsze zmiany degeneracyjne komórek kubkowych. W badaniach parametrów biochemicznych krwi u szczurów nokautowanych rasy Zucker stwierdzono istotny spadek stężenia glukozy (o 45%) jak również stężenia insuliny (o 26%). Dla szczurów rasy Wistar również zaobserwowano istotny spadek stężenia glukozy (o 26%) jak i stężenia insuliny (o 32%). Wyniki te mogą świadczyć o zmniejszonej insulinooporności.

Tabela 7. 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	3,59	3307

Tabela 8. 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	6,31	66

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.; Palii, 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 β -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.

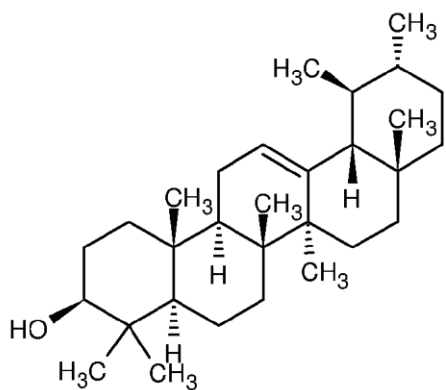
26. Tabuti, J.R.S.; Kukunda, C.B.; Kaweesi, D.; Kasilo, O.M.J. Herbal medicine use in the districts of Nakapiripirit, Pallisa, Kanungu, and Mukono in Uganda. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **2012**, *8*, 35, doi:10.1186/1746-4269-8-35.
27. Alinejad-Mofrad, S.; Foadoddini, M.; Saadatjoo, 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 Morais, 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

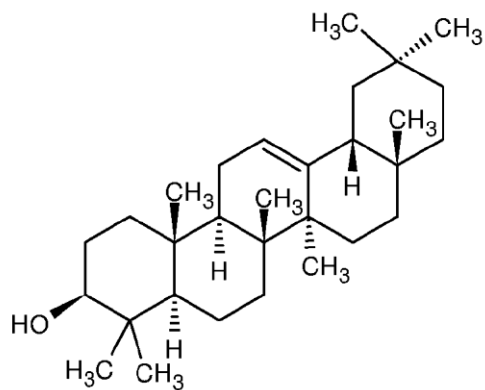
1. Sposób otrzymywania mieszaniny frakcji terpenoidowych, otrzymywanych z zielonych części roślin ostrokrzewu, **znamienny tym**, że wysuszone, sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu takich jak *Ilex aquifolium* albo *Ilex mesereveae*, które zawierają na 100 g suchej masy: co najmniej 0,043 g β -amyryny, co najmniej 0,174 g α -amyryny; co najmniej 0,04 g lupeolu; co najmniej 0,087 g (3 β)-lup-20(29)-enu,3,28-bis, co najmniej 0,009 g ursolowego kwasu i izomeru kwasu ursolowego co najmniej 0,009 g, maceruje się co najmniej 12 godziny rozpuszczalnikiem niepolarnym, takim jak dichlorometan, po czym rozpuszczalnik odparowuje się i dodaje heksanu i oczyszcza się, wstępnie ekstrahując trzykrotnie mieszaniną wodną : polarny rozpuszczalnik organiczny taki jak metanol, następnie po wymyciu, frakcję organiczną odparowuje się i poddaje oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej, wymywając mieszaniną rozpuszczalników niepolarnego i polarnego, takich jak heksan i eter dietylowy w wyniku

- czego otrzymuje się na pierwszej frakcji triacyloglicerole, będące odpadem oraz na kolejnych frakcjach triterpeny będące mieszaniną związków terpenoidowych.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu zawierają na 100 g suchej masy: β -amyryna od 0,043 do 0,28 g, α -amyryna od 0,174 do 0,64 g; lupeol od 0,04 do 0,24 g; (3 β)-lup-20(29)-ene,3,28-bis od 0,087 do 0,27 g, ursolowy kwas od 0,009 do 0,096 g i jego izomer kwasu ursulowego od 0,009 do 0,112 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 wstępnego oczyszczania używa się mieszaniny woda : metanol w stosunku (20:80).
 9. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do oczyszczania frakcji terpenowej na kolumnie chromatograficznej używa się wypełniania Kieselgel 60 230–400 Mesh Merck.
 10. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do wymywania poszczególnych frakcji używa się mieszaninę heksan : eter dietylowy w stosunku 80:1 ze zwiększającą się polarnością.
 11. Mieszanina związków terpenoidowych otrzymana sposobem określonym w zastrzeżeniu 1 do zastosowania w leczeniu i profilaktyce chorób takich jak cukrzyca insulinozależna, cukrzyca insulinoniezależna oraz cukrzyca związana z niedożywieniem oraz w regulacji gospodarki cukrowej organizmu.

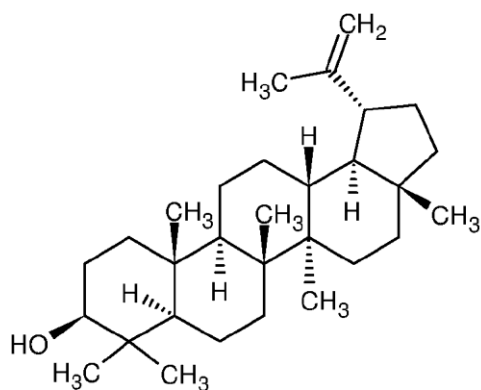
Rysunki



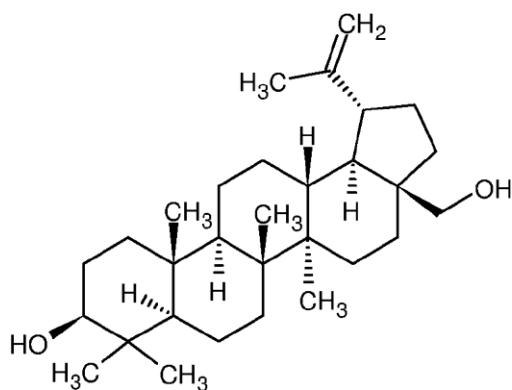
Wzór 1



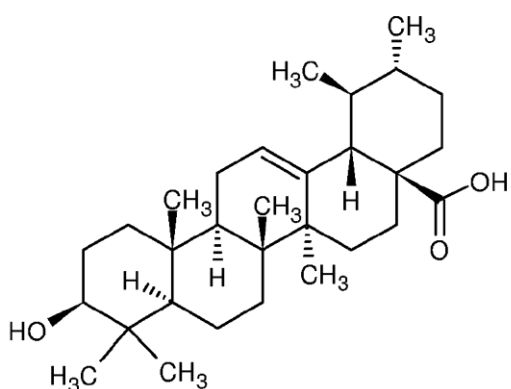
Wzór 2



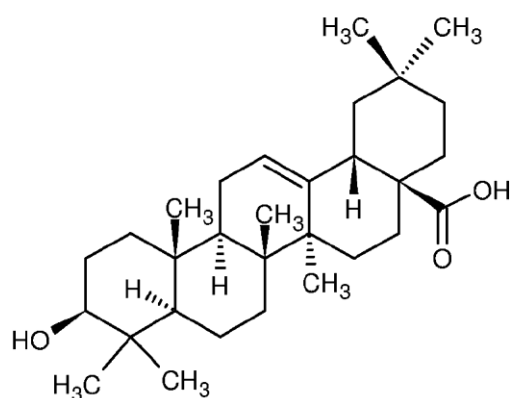
Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5



Wzór 6