RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239752**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **421739**

(22) Data zgłoszenia: **29.05.2017**

(51) Int.Cl.
A61K 36/31 (2006.01)
A01G 31/00 (2018.01)
A01G 24/10 (2018.01)
B01D 11/02 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania substancji bioaktywnych z *Lepidium sativum* oraz ich zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
03.12.2018 BUP 25/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
03.01.2022 WUP 01/22

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU, Toruń, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
BOGUSŁAW BUSZEWSKI, Stary Toruń, PL
PAWEŁ POMASTOWSKI, Przysiek, PL
KATARZYNA RAFIŃSKA, Golub-Dobrzyń, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Grzegorz Ćwikliński

PL 239752 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania substancji bioaktywnych z *Lepidium sativum* oraz ich zastosowanie, zwłaszcza otrzymywania ekstraktów o właściwościach antybakteryjnych oraz wysokiej zawartości związków biologicznie aktywnych, szczególnie polifenoli i flawonoidów.

Rośliny stanowią bogate źródło związków biologicznie aktywnych, które znajdują powszechne zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, w przemyśle agrochemicznym jako biopestycydy, w przemyśle spożywczym jako dodatki do żywności nadające kolor, smak, zapach lub właściwości prozdrowotne. Wśród metabolitów wtórnych produkowanych przez komórki roślinne szczególne znaczenie mają związki fenolowe, flawonoidy, alkaloidy, saponiny i glukozynolany, które wykazują działanie antybakteryjne, przeciwzapalne lub antynowotworowe. Nabierają szczególnego znaczenia w kontekście w związku z rosnącą odpornością bakterii chorobotwórczych na antybiotyki preparaty pochodzenia naturalnego coraz częściej zastępują antybiotyki, zwłaszcza w leczeniu infekcji skórnych, błon śluzowych jamy ustnej czy gardła.

Lepidium sativum (pieprzyca siewna zwana zwyczajowo w Polsce również rzeżuchą) to roślina należąca do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*). W nasionach *L. sativum* zidentyfikowano takie związki fenolowe jak: kwas galusowy, protokatechinowy, kumarowy, kawowy, heksozyd kwasu kumarowego, heksozyd kwasu kawowego, heksozyd kwasu ferulowego, heksozyd kwasu sinapinowego, heksozyd kwasu waniliowego, kwas kawoilochinowy, kwas kumaroilochinowy, heksozyd kamferolu, heksozyd kwercetyny, glukuronid kamferolu, kwercetyna (Zia-Ul-Haq i wsp., 2012).

Z publikacji naukowych wiadomo, że ekstrakt świeżych liści *Lepidium sativum* wykazuje działanie antybakteryjne przeciw *Bacillus subtilis* oraz *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, ale jest mniej efektywny w stosunku do *Escherichia coli*. Działanie antybakteryjne zależy w dużej mierze od wieku użytych roślin. Antywirusowe działanie przeciw wirusowi Columbia SH wykazano w testach na myszach. Ekstrakt z *L. sativum* w badaniach na linii *Salmonella typhimurium* jako organizmie testowym niwelował mutagenny wpływ wielu pestycydów (Nath i wsp., 1992; Jansen, 2004).

Podstawowym problemem w uzyskiwaniu substancji bioaktywnych z roślin jest ich mała ilość w przeliczeniu na jednostkę masy, zazwyczaj poniżej 1% suchej masy.

Istnieje wiele nowoczesnych metod pozwalających na podniesienie poziomu syntezy metabolitów wtórnych w komórkach roślinnych, w tym nawożenie prekursorami, elicytacja oraz permeabilizacja błon komórkowych. Szczególnie popularne w hodowlach kultur komórek i tkanek roślinnych jest zastosowanie elicytorów, czynników indukujących biochemiczne reakcje obronne roślin, które powodują wzmożoną syntezę oraz akumulację metabolitów wtórnych lub indukcję syntezy nowych związków. Elicytory mogą być biotyczne albo abiotyczne. Elicytory biotyczne to związki pochodzenia biologicznego takie jak polisacharydy pochodzące ze ścian komórkowych roślin, grzybów lub innych patogennych mikroorganizmów, a także pektyny, celulozy, chityna. Elicytory abiotyczne to czynniki fizyczne jak: uszkodzenia mechaniczne, promieniowanie UV, wysokie zasolenie, stres wodny, susza, ozon, zbyt niska/wysoka osmolarność oraz chemiczne, do których zaliczamy pestycydy czy związki nieorganiczne.

Wśród elicytorów abiotycznych związki srebra są często stosowane w hodowli roślinnych kultur *in vitro*. W publikacji Xing i wsp. (Molecules 20: 309–324, 2015) wykazano skuteczność jonów srebra w indukcji syntezy kwasów fenolowych oraz tanszinonów w kulturze korzeni włosowatych *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Tiosiarczan srebra o stężeniu 15 μM skutecznie podnosił poziom syntezy związków fenolowych w kulturze korzeni włośnikowych *Salvia miltiorrhiza* (Yan i wsp., 2006). Badania prowadzone na kulturze komórek *Agastache rugosa* wskazują, że azotan srebra w stężeniu 30 mg/l prowadzi do wzrostu poziomu ekspresji genów ścieżki fenylopropanoidowej, tzn. biorących udział w syntezie metabolitów wtórnych oraz wzrostu poziomu syntezy samego kwasu rozmarynowego (Park et al., 2016). Jony srebra okazały się również niezwykle skuteczne w pobudzaniu komórek kultury zawiesinowej *Silybum marianum* L. Gaertn (Compositae) do produkcji sylimaryny tj. mieszaniny flawolignanów. Ag^+ o stężeniu 0,8 mM inicjowało 30-krotny wzrost produkcji tych związków (Ashtiani i wsp., 2010). Natomiast Ag^+ o stężeniu 15 μM podnosiło poziom syntezy kwasu litospermowego B (LAB) w kulturze korzeni włośnikowych *Salvia miltiorrhiza*. Zawartość tego związku wzrastała z 5,4% do 18,8% suchej masy (Xiao i wsp., 2010).

W opisie patentowym US7264951 ujawniono sposób wytwarzania z dużą wydajnością taksolu, baccatin III oraz taksanu w liniach komórkowych cisa (*Taxus* sp.) przez zastosowanie chlorku srebra

oraz azotanu srebra. Związki te dodawano do pożywki w stężeniu niższym od 200 μM. Zawiesinę komórek *Taxus chinensis* traktowano 50 mM roztworem tiosiarczanu srebra uzyskiwanym poprzez mieszanie tiosiarczanu sodu, względnie potasu z azotanem srebra. W zależności od rodzaju zastosowanej pożywki obserwowano nawet pięciokrotny wzrost stężenia taksolu (z 21 mg/l do 103 mg/l).

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania substancji bioaktywnych z *Lepidium sativum* poprzez skiełkowanie nasion *Lepidium sativum* w roztworze $AgNO_3$ w stężeniu od 50 mg/l do 150, korzystnie od 80 do 120 mg/l, najkorzystniej 100 mg/l, oraz dalszą uprawę hydroponiczną przez co najmniej siedem dni w roztworze o takim samym stężeniu, w zakresie temperatury od 16°C do 24°C, korzystnie w temperaturze 21°C utrzymując w cyklu dobowym sekwencję oświetlania zakresie od 8 h do 16 h korzystnie od 14 h do 16 h i kolejno liofilizację zebranego materiału roślinnego, a potem statyczną ekstrakcję otrzymanego liofilizatu etanolem o stężeniu od 70% do 96% przy temperaturze od 30°C do 60°C, przy ciśnieniu od 5 MPa do 15 MPa, przez czas co najmniej 3 minuty, a następnie odparowanie etanolu i otrzymanie suchego ekstraktu jako końcowego produktu.

Korzystnie, gdy statyczną ekstrakcję otrzymanego liofilizatu przeprowadza się dwukrotnie etanolem o stężeniu 96% w temperaturze około 50°C, i ciśnieniu 10 MPa, przez około 5 minut.

Istotą wynalazku jest to, że substancje bioaktywne otrzymanych zgodnie ze sposobem wyżej określonym mają zastosowanie w leczeniu zmian skórnych, atopowego zapalenia skóry powodowanego zakażeniami bakteriami *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Escherichia coli* a także jako składniki roztworu lub zawiesiny w wodnej lub niewodnej cieczy, emulsji płynnej typu olej w wodzie lub wodzie w oleju, syropu lub pastylek do zastosowania w leczeniu stanów zapalnych jamy ustnej i gardła.

Nieoczekiwanie okazało się, że biomasa hodowanych roślin jest około dwukrotnie większa w porównaniu do uprawy kontrolnej bez dodatku azotanu srebra. Zawartość związków fenolowych w ekstraktach pozyskanych z hodowanych w przedstawiony sposób roślin była ponad trzykrotnie wyższa w porównaniu do ekstraktów pozyskiwanych z roślin kontrolnych.

Przykład realizacji wynalazku.

Nasiona rzeżuchy siewnej (*Lepidium sativum*) sterylizuje się 70% roztworem alkoholu etylowego oraz 5% roztworem podchlorynu sodu, a następnie płucze w sterylnej wodzie dejonizowanej. Zdezynfekowane nasiona przenosi się do uprawy hydroponicznej z zastosowaniem azotanu srebra o stężeniu 100 mg/l. Po 7 dniach a następnie ważono.

Liofilizat poddawano ekstrakcji wspomaganej temperaturą i ciśnieniem z zastosowaniem następujących parametrów: rozpuszczalnik 96% etanol, temperatura – 50°C, ciśnienie – 10 MPa, czas statycznej ekstrakcji – 5 min, liczba cykli – 2, czas płukania 100 s.

Otrzymane ekstrakty zbadano na zawartości suchej masy, związków fenolowych, białek, lipidów oraz potencjał antyoksydacyjny wyrażony jako IC50 – stężenie suchej masy ekstraktu zdolne do redukcji 50% DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu).

Suchą biomasę otrzymuje się poprzez odparowanie obecnego w ekstrakcie etanolu. Do oceny zawartości związków fenolowych wykorzystano metodę spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika Folin-Ciocalteou i wyrażono jako równoważnik kwasu galusowego. 300 μL ekstraktu dodawano do podwójnie dejonizowanej wody oraz odczynnika Folin-Ciocalteu. Po ośmiu minutach inkubacji dodawano 300 μl 20% węglanu sodu. Absorbancję mierzono za przy długości fali λ = 765 nm, po 30 minutach w ciemności. Zawartość wyrażano jak równoważnik kwasu galusowego w mg/g suchej masy ekstraktu.

Zawartość flawonoidów oceniano metodą spektrofotometryczną według procedury Rouphael i wsp. (2016) z zastosowaniem chlorku glinu. 0,5 ml ekstraktu mieszano z taką samą objętością 2% $AlCl_3$, a następnie rozcieńczano 96% etanolem do 3 ml. Jako blank stosowano roztwór składający się 0,5 ml ekstraktu, a zamiast 0,5 ml chlorku glinu dodawano 0,5 ml 96% etanolu i rozcieńczano do 3 ml. Roztwór mieszano, inkubowano przez 40 minut, a następnie odczytywano przy λ = 415 nm. Całkowitą zawartość flawonoidów w ekstrakcie wyrażano jako ekwiwalent rutyny (RE). Przedziały zawartości związków fenolowych, flawonoidów oraz całkowitej zdolności antyoksydacyjnej przedstawiono w tabeli 1.

Zawartość białek w otrzymanych ekstraktach mierzono za pomocą urządzenia DirectDetect firmy Merck, które działa na zasadzie spektroskopu z transformacją Fouriera z zakresu bliskiej podczerwieni. Ocena zawartości białka odbywa się poprzez pomiar zawartości wiązań amidowych w łańcuchach białkowych. Ekstrakty pozyskane z roślin hodowanych w obecności $AgNO_3$ o stężeniu od 50 mg/l do

150 mg/l charakteryzują się wielokrotnie wyższą zawartością białek (od 30 do 40 mg/g suchej masy ekstraktu) w porównaniu do roślin kontrolnych (ok. 2 mg/g suchej masy).

	Ekstrakt z roślin kontrolnych	Ekstrakt z roślin poddawanych działaniu $AgNO_3$
Zawartość fenoli i polifenoli (mg kwasu galusowego/g s.m.)	10-15	35-47
Zawartość flawonoidów (mg rutyny/g s.m.)	12-14	25-28
DPPH (IC50 mg/ml)	12,43	4,78

T a b e l a 1. Charakterystyka ekstraktów *Lepidium sativum*

Świadczy to o tym, że rośliny pobierają jony srebra, które indukują syntezę metabolitów wtórnych.

Zawartość srebra w liofilizacie oznaczono przez zmineralizowanie go kwasem azotowym, które wynosi od 1,0 mg/g do 1,5 mg/g suchej masy rośliny. Analiza uzyskanych ekstraktów za pomocą atomowej spektroskopii absorpcyjnej (AAS) wykazała jedynie śladowe ilości srebra w otrzymanych ekstraktach na poziomie 6,25 μg/g suchej masy.

Właściwości antybakteryjne badano dwiema metodami: poprzez pomiar stref przejaśnienia oraz oznaczanie minimalnego stężenia hamującego wyrażonego jako mg suchej masy ekstraktu przedstawiono w tabeli.

	Minimalne stężenie hamujące (mg/ml)		Strefa zahamowania (mm)	
	Ekstrakt kontrola	Ekstrakt $AgNO_3$	Ekstrakt kontrola	Ekstrakt $AgNO_3$
Staphylococcus aureus	5	0,6	-	31
Pseudomonas aeruginosa	5	1,25	-	38
Klebsiella pneumoniae	5	1,25	-	35
Escherichia coli	2,5	0,6	-	42

T a b e l a 2. Właściwości antybakteryjne ekstraktów *Lepidium sativum*

Uzyskany ekstrakt wykazuje działanie antybakteryjne wobec takich szczepów bakterii jak *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Escherichia coli* co udowodniono poprzez oznaczenie minimalnego stężenia hamującego oraz pomiar stref przejaśnienia. Jednocześnie proces ekstrakcji wspomaganej temperaturą i ciśnieniem pozwala uzyskać ekstrakt zawierający jedynie śladowe ilości jonów srebra, co jest korzystne ze względu na brak ich toksycznych właściwości.

Nieoczekiwanie okazało się, że sposób według wynalazku zapewnia uzyskać niezwykle niski poziomu srebra w końcowym produkcie, z jednoczesnym zachowaniem właściwości antybakteryjnych. Jest to bardzo korzystne, gdyż ogranicza potencjalne toksyczne działanie ekstraktu, na co wskazują liczne badania o niekorzystny wpływie związków srebra na komórki eukariota.

Ekstrakcja prowadzona według wynalazku w zakresie temperatur i ciśnienia uzyskanych z roślin liofilizatów dostarcza ekstraktu charakteryzującego się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym oraz wysoką zawartością flawonoidów, związków fenolowych i polifenolowych. Preparaty można wytworzyć metodami dobrze znanymi w stanie techniki.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania substancji bioaktywnych z *Lepidium sativum*, **znamienny tym**, że kiełkowanie nasion *Lepidium sativum* prowadzi się w roztworze $AgNO_3$ w stężeniu od 50 mg/l do 150 mg/l, oraz dalszą uprawę hydroponiczną przez co najmniej siedem dni w roztworze o takim samym stężeniu, w zakresie temperatury od 16°C do 24°C, korzystnie w temperaturze 21°C utrzymując w cyklu dobowym sekwencję oświetlania zakresie od 8 h do 16 h korzystnie od 14 h do 16 h i kolejno liofilizację zebranego materiału roślinnego, a potem statyczną ekstrakcję otrzymanego liofilizatu etanolem o stężeniu od 70% do 96% przy temperaturze od 30°C do 60°C, przy ciśnieniu od 5 MPa do 15 MPa, przez czas co najmniej 3 minuty, a następnie odparowanie etanolu i otrzymanie suchego ekstraktu jako końcowego produktu.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kiełkowanie nasion *Lepidium sativum* prowadzi się w roztworze $AgNO_3$ w stężeniu od 80 mg/l do 120 mg/l przy temperaturze 21°C.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kiełkowanie nasion *Lepidium sativum* prowadzi się w roztworze $AgNO_3$ w stężeniu około 100 mg/l przy temperaturze 21°C.
4. Sposób według zastrz. 1 albo 2 albo 3, **znamienny tym**, że statyczną ekstrakcję otrzymanego liofilizatu przeprowadza się dwukrotnie etanolem o stężeniu 96% w temperaturze około 50°C, i ciśnieniu 10 MPa, przez około 5 minut.
5. Substancje bioaktywne otrzymanych zgodnie ze sposobem określonym w zastrzeżeniach od 1 do 5 do stosowania w leczeniu zmian skórnych, atopowego zapalenia skóry powodowanego zakażeniami bakteriami *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Escherichia coli* a także jako składniki roztworu lub zawiesiny w wodnej lub niewodnej cieczy, emulsji płynnej typu olej w wodzie lub wodzie w oleju, syropu lub pastylek do zastosowania w leczeniu stanów zapalnych jamy ustnej i gardła.