

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244949 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437122**

(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 3/06 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, 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 244949 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 lipidowej.

Choroby cywilizacyjne, w tym podwyższony poziom cholesterolu jak również skorelowane z nim nadciśnienie tętnicze stanowią istotną przyczynę pogorszenia komfortu życia, jak i śmierci coraz większej części współczesnych społeczeństw. Wg danych szacunkowych Głównego Urzędu Statystycznego, ponad 50% Polaków umiera na choroby układu krążenia (Statystyka zgonów i umieralności z powodu chorób układu krążenia, <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ludnosc/ludnosc/statystyka-zgonow-i-umieralnosci-z-powodu-chorob-ukladu-krazenia.22,1.html> dostęp 20 marca 2020). Najczęściej wymienianymi przyczynami tego stanu rzeczy jest coraz mniejsza aktywność ruchowa Polaków [1,2], jak również niewłaściwy dobór diety [3]. Rosnący problem braku intensywnej aktywności fizycznej i chorób sercowo-naczyniowych został zauważony na świecie [46], gdzie w wysoko rozwiniętych krajach przewiduje się wciąż rosnącą tendencję ich udziału w przyczynie zgonów [6,7].

Udowodniono, że powstawanie blaszek miażdżycowych jest związane ściśle z poziomem lipidów we krwi. Zaliczają się do nich głównie: cholesterol i jego estry, triglicerydy, fosfolipidy czy wolne kwasy tłuszczowe. Z kolei ze względu na ich bardzo małą polarność we krwi frakcje lipidowe transportowane są we krwi w połączeniu z białkami w postaci chylomikronów, lipoprotein o bardzo małej (VLDL), pośredniej (IDL) małej (LDL) i dużej gęstości (HDL) [8]. Należy podkreślić w tym miejscu, że większa część cholesterolu jest pochodzenia endogennego [9]. Chociaż podstawą leczenia hiperlipoproteinemii jest unormowanie masy ciała i dobór zbilansowanej diety to stosowana jest przede wszystkim klasyczna farmakoterapia.

Regulacja poziomu lipidów i cholesterolu w przypadku osób, u których stwierdzono znaczne przekroczenia stężeń odbywa się obecnie przy zastosowaniu: a) inhibitorów biosyntezy cholesterolu (głównie reduktazy hydroksymetyloglutarylo-Co-A), np. Atorwastatyna, Fluwastatyna, Pitawastatyna czy Prawastatyna; b) inhibitorów wchłaniania cholesterolu np. Ezetymib; c) wymienników jonowych (np. cholestyramina) i estrów etylowych kwasów tłuszczowych; d) fibratów np. fenofibrat, gemfibrozyl; e) pochodnych kwasu nikotynowego. Za działające najszybciej uważa się te z grupy statyn [10]. Uzupełnieniem leków stosowanych w klasycznej farmakoterapii, szczególnie dla lżejszych lub początkowych stadiów zaburzeń gospodarki lipidowej wydają się być związki pochodzenia roślinnego. Należą one zarówno do grupy leku ziołowego jak i środka spożywczego (w tym suplementu diety). Ich mechanizm działania odbywa się najczęściej analogicznie do substancji syntetycznych. W klasycznej fitoterapii miażdżycy stosuje się roślinne antisclerotica i metabolica. Należą do nich np. czosnek i jego preparaty (hamowanie odkładania cholesterolu, zwiększanie frakcji HDL) [11,12]; liść i ziele karczocha (działanie obecnej w jego składzie cynaryny [13]); olej z ogórecznika (w tym zawarty w jego składzie kwas γ -linolenowy) czy ekstrakty z kory sosny nadmorskiej (*Pinus maritima*), które dzięki wysokiej zawartości fenolokwasów przeciwdziałają powstawaniu oxy-LDL [14]. Na polskim rynku leków ziołowych i suplementów obecne są także wysokoproantocyjanidynowe wyciągi z guazumy (*Guazuma ulmifolia*), murai (*Murraya koenigi*), mlecza warzywnego (*Sonchus oleraceus*) czy mieszanki złożone (kwiatostan głogu, ziele krwawnika, owoc głogu, ziela karczocha [15]. Udowodnioną skuteczność w obniżeniu cholesterolu miały również balsamowiec indyjski *Commiphora wightii* [16], koper [17], psianka podłużna *Solanum melongena* [18], bazylija azjatycka *Ocimum tenuiflorum* [19] czy oliwki europejskiej *Olea europaea* [20].

Szeroko stosowanymi preparatami naturalnym są również frakcje fitosteroli (głównie β -sitosterol i pochodne z soi), które hamują wychwyt cholesterolu z jelit [21]. Stosowanie w dawce 1.5 do 2.4 g obniża do 10% poziom cholesterolu całkowitego we krwi [22]. Fitosterole obecnie są stosowane w postaci kapsułek lub oleju (jako olej z nasienia dyni, ale też jako dodatki do pieczywa, margaryn, jogurtów etc.). Szczegółowe doniesienia przeglądowe, dotyczące ekstraktów obniżających poziom cholesterolu w ostatnich latach zostały opublikowane przez Saravanan i Ignacimuthu [23], oraz Dai, Lu i in. [24], a także Eslami i Shidfar [25].

Otrzymywanie oraz zastosowanie roślinnych ekstraktów o charakterze przeciwcholesterolowym było i jest przedmiotem ochrony patentowej.

Patent amerykański US8337915B2 ujawnia zastosowanie ekstraktu z owoców kopru kozieradki *Trigonella foenum-graecum* jako mieszaniny związków obniżających stężenie cholesterolu we krwi. Z kolei publikacja WO2011147028A2 opisuje farmaceutyczne i nutraceutyczne metody leczenia chorób sercowo-naczyniowych, przy wykorzystaniu kompozycji zawierających ekstrakty ze skórki jabłek.

Kolejny amerykański patent US6589572B2 ukazuje użycie mieszanego ekstraktu żeń-szenia *Panax notoginseng* oraz szawii czerwonej *Salvia miltiorrhiza* jako mieszaniny obniżającej i utrzymującej ciśnienie krwi na zasadniczo niskim poziomie.

Patent US7780996B2 ukazuje zastosowanie ekstraktu liściokwiatu garbnikowatego *Emblica officinalis* jako produkt do profilaktycznego i terapeutycznego leczenia chorób wieńcowych, miażdżycy, niedoczynności i nadczynności tarczycy.

Publikacja WO2011090271A2 przedstawia kompozycję występującą w ekstrakcie z nasion liczi chińskiego *Litchi chinensis*, mającą pozytywny wpływ na zapobieganie i leczenie stłuszczenia wątroby lub otyłości.

Z kolei w publikacji WO2011056061A1 ujawniono wpływ polarnego ekstraktu pozyskanego z *Alternanthera bezszypułkowej*, *Alternanthera sessilis* na obniżanie poziomu triglicerydów w osoczu i/lub zwiększanie poziom lipoprotein o wysokiej gęstości w osoczu.

Ochroną patentową objęte są również ekstrakty złożone, np. z karczocha, kawy i oliwki europejskiej, które ujęte w amerykańskim patencie US9248157B2 stosuje się w leczeniu zespołu metabolicznego.

Natomiast chiński patent CN102772741A dotyczy tradycyjnej kompozycji medycyny chińskiej, w skład której wchodzi m.in.: żółtaczek indyjski *Etroplus maculatus*, *Atractylodes macrocephala*, kłącze kolcorośli *Smilax glabra*, ardyzji japońskiej *Ardisia japonica*, Ku Shen *Sophora flavescens* i kurkumy *Curcuma zedoaria*. Kompozycja ta ma działanie lecznicze przy niewydolności śledziony, miażdżycy, chorobach wieńcowych, a także zawałach serca.

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 [26]. 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, przeciw-cukrzycowe oraz syndrom metaboliczny [27]. 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 [28]. 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 [29].

Napoje oraz frakcje pozyskane z *I. paragwariensis* posiadają udowodnione właściwości hamujące przyrost nadmiernej masy ciała [30]. 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 *Mezerwy* (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 lipidową organizmu.

Korzystnie jest, gdy zawiera 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.

Istotą sposobu według wynalazku jest to, że wysuszone, sproszkowane liście europejskich odmian ostrokrzewu takich jak *Ilex aquifolium* albo *Ilex meserveae*, 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 ursulowego co najmniej 0,009 g, maceruje się co najmniej 12 godz. 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 ursulowego 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 wypełniania 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 otrzymanych jak w istocie powyżej jest zastosowanie jej w leczeniu i profilaktyce chorób powodowanych wysokim stężeniem cholesterolu we krwi, takich jak hipercholesterolemia, hiperlipidemia mieszana i inne hiperlipidemie.

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 triterpenoidowej, o aktywności regulującej gospodarkę lipidową. Ponadto dodatkową zaletą w tym procesie jest możliwość otrzymania frakcji saponinowej i polifenolowej.

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 ursolowy, 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 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 wyplukanie 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 (trimetylosilylilo)trifluoroacetamidu (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, CDCl₃, 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. Skład wyrażono jako pochodne TMS, ze względu na metodykę oznaczenia.

RI exp.	RI lit.	RT	Nazwa	Ilex aquifolium 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	Lupenyłu 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. ¹	RI lit. ²	RT ³	Nazwa	Ilex aquifolium 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	Lupenyłu 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 wyplukanie 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. ¹	RI lit. ²	RT ³	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	Lupenylu 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 wyplukanie 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. ¹	RI lit. ²	RT ³	Nazwa	<i>Ilex aquifolium</i> Golden van Tol [%]
2835	2832	20.65	all-trans-Skwalen	014
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. ¹	RI lit. ²	RT ³	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 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 1,05 g białej, bezpostaciowej 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. ¹	RI lit. ²	RT ³	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	Lupenyłu 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 trzy grupy szczurów rasy Wistar, po 12 osobników w każdej grupie. Dwie grupy stanowiły grupy kontrolne I i II oraz jedna grupa stanowiła grupę badaną:

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 4 i 8 tyg. Parametry biochemiczne krwi wykonano zgodnie z zaleceniami IFCC. W dniu zakończenia badań zwierzęta poddano eutanazji. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono statystycznie istotne zmiany w parametrach fizjologicznych badanych szczurów. W przypadku zastosowania diety wysokocholesterolowej, w odniesieniu do grupy kontrolnej II (podwyższona podaż cholesterolu w ilości 20 g/100 g karmy), oznaczono statystycznie istotnie niższy poziom cholesterolu całkowitego we krwi jak również jego frakcji HDL w grupie badanej. Po 8 tygodniach skarmiania

preparatem spadek stężenia cholesterolu wynosił odpowiednio 27% oraz 13% dla frakcji lipidów o niskiej gęstości. Wynik ten wskazuje na działanie regulujące gospodarkę lipidową organizmu.

Co najistotniejsze, w przeprowadzonych badaniach histopatologicznych post mortem nie wykazano znacznych złogów cholesterolu ani innych zmian degeneracyjnych zarówno w obrębie dużych naczyń wokół serca (tętnicy płucnej i aorty oraz żył) jak i naczyń wieńcowych serca.

Tabela 7. Wybrane parametry krwi badanych grup.

	Cholesterol całkowity (mmol/L) po 4 tyg.	Cholesterol całkowity (mmol/L) po 8 tyg.	LDL (mmol/L) po 8 tyg.
Grupa kontrolna I	1,57	1,39	0,67
Grupa kontrolna II	2,34	2,41	0,93
Grupa badana	2,07	1,75	0,81

Wykaz literatury:

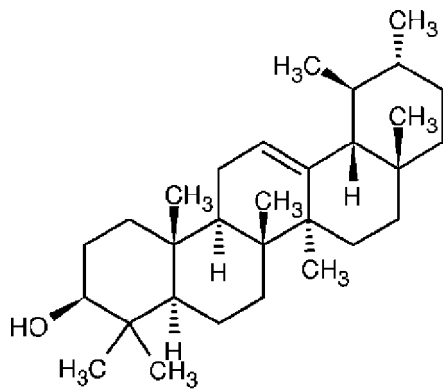
1. Surma, S.; Szyndler, A.; Narkiewicz, K. Świadomość wybranych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego w populacji młodych osób. *Choroby Serca i Naczyń* 2017, 14, 186–193.
2. Urych, I. Nowe wyzwania edukacji dla bezpieczeństwa: aktywność fizyczna „lekarstwem” na wybrane zagrożenia czasu pokoju w XXI wieku. *Zeszyty Naukowe AON* 2013, 384–407.
3. Piejko, L.; Nowak, Z.; Nawrat-Szołtysik, A.; Kopec, D. Wybrane zachowania zdrowotne a jakość diety pacjentów z rozpoznaną chorobą niedokrwienną serca i po przebytych zawałach serca. *Rozprawy naukowe Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu* 2017, 59, 30–37.
4. Kubota, Y.; Evenson, K.R.; MacLehose, R.F.; Roetker, N.S.; Joshi, C.E.; Folsom, A.R. Physical activity and lifetime risk of cardiovascular disease and cancer. *Medicine and science in sports and exercise* 2017, 49, 1599.
5. Barengo, N.C.; Antikainen, R.; Borodulin, K.; Harald, K.; Jousilahti, P. Leisure-time physical activity reduces total and cardiovascular mortality and cardiovascular disease incidence in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society* 2017, 65, 504–510.
6. Lear, S.A.; Hu, W.; Rangarajan, S.; Gasevic, D.; Leong, D.; Iqbal, R.; Casanova, A.; Swaminathan, S.; Anjana, R.M.; Kumar, R. The effect of physical activity on mortality and cardiovascular disease in 130 000 people from 17 high-income, middle-income, and low-income countries: the PURE study. *The Lancet* 2017, 390, 2643–2654.
7. Studziński, K.; Tomasik, T.; Krzysztoń, J.; Józwiak, J.; Windak, A. Effect of using cardiovascular risk scoring in routine risk assessment in primary prevention of cardiovascular disease: an overview of systematic reviews. *BMC cardiovascular disorders* 2019, 19, 11.
8. Mutschler, E.; Malinowska, B.; Drożdżik, M.; Kocić, I.; Pawlak, D.; Geisslinger, G.; Kromer, H.K.; Menzel, S.; Ruth, P.; Grotthus, B. Mutschler *farmakologia i toksykologia: podręcznik*; MedPharm Polska: 2016.
9. Kapourchali, F.R.; Surendiran, G.; Goulet, A.; Moghadasian, M.H. The role of dietary cholesterol in lipoprotein metabolism and related metabolic abnormalities: a minireview. *Critical reviews in food science and nutrition* 2016, 56, 2408–2415.
10. Kang, J.G.; Park, C.-Y. Anti-obesity drugs: a review about their effects and safety. *Diabetes & metabolism journal* 2012, 36, 13.
11. Ried, K. Garlic lowers blood pressure in hypertensive individuals, regulates serum cholesterol, and stimulates immunity: an updated meta-analysis and review. *The Journal of nutrition* 2016, 146, 389S–396S.
12. Bayan, L.; Koulivand, P.H.; Gorji, A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna journal of phytomedicine* 2014, 4, 1.

13. Christaki, E.; Bonos, E.; Florou-Paneri, P. Nutritional and functional properties of Cynara Crops (Globe Artichoke and Cardoon) and their potential applications: a review. *International Journal of Applied Science and Technology* 2012, 2.
14. Malekahmadi, M.; Firouzi, S.; Daryabeygi-Khotbehsara, R.; Islam, S.M.S.; Norouzy, A.; Moghaddam, O.M.; Soltani, S. Effects of pycnogenol on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological research* 2019, 104472.
15. Lamer-Zarawska, E.; Kowal-Gierczak, B.; Niedworok, J. *Fitoterapia i leki roślinne; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: 2007.*
16. Das, S.; Datta, A.; Bagchi, C.; Chakraborty, S.; Mitra, A.; Tripathi, S.K. A comparative study of lipid-lowering effects of guggul and atorvastatin monotherapy in comparison to their combination in high cholesterol diet-induced hyperlipidemia in rabbits. *Journal of dietary supplements* 2016, 13, 495–504.
17. Belguith-Hadriche, O.; Bouaziz, M.; Jamoussi, K.; El Feki, A.; Sayadi, S.; Makni-Ayedi, F. Lipid-lowering and antioxidant effects of an ethyl acetate extract of fenugreek seeds in high-cholesterol-fed rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 2010, 58, 2116–2122.
18. Fraikue, F.B. Unveiling the potential utility of eggplant: a review. In *Proceedings of Conference Proceedings of INCEDI*; pp. 883–895.
19. Pingale, S.; Firke, N.P.; Markandetya, A. Therapeutic activities of *Ocimum tenuiflorum* accounted in last decade: a review. *J Pharm Res* 2012, 5, 2215–2220.
20. Hadrich, F.; Mahmoudi, A.; Bouallagui, Z.; Feki, I.; Isoda, H.; Feve, B.; Sayadi, S. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. *Chemico-biological interactions* 2016, 252, 54–60.
21. Saeidnia, S.; Manayi, A.; Gohari, A.R.; Abdollahi, M. The story of beta-sitosterol—a review. *European journal of medicinal plants* 2014, 590–609.
22. Ferguson, J.J.; Stojanovski, E.; MacDonald-Wicks, L.; Garg, M.L. Fat type in phytosterol products influence their cholesterol-lowering potential: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Progress in lipid research* 2016, 64, 16–29.
23. Saravanan, M.; Ignacimuthu, S. Hypocholesterolemic effect of Indian medicinal plants—a review. *Medicinal chemistry* 2015, 5, 40–49.
24. Dai, L.; Lu, A.; Zhong, L.L.; Zheng, G.; Bian, Z. Chinese Herbal Medicine for Hyperlipidaemia: A Review Based on Data Mining from 1990 to 2016. *Current vascular pharmacology* 2017, 15, 520–531.
25. Eslami, O.; Shidfar, F. Soy milk: A functional beverage with hypocholesterolemic effects? A systematic review of randomized controlled trials. *Complementary therapies in medicine* 2019, 42, 82–88.
26. 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, doi:10.3390/nu10111682.
27. 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*, ed. MF Ullah and A. Ahmad, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey-USA 2019, 167–181.
28. Cardozo Junior, E.L.; 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, doi:10.1016/j.jff.2015.12.010.
29. 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, doi:10.1016/j.jff.2017.09.020.
30. 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, doi:10.3390/nu11092238.

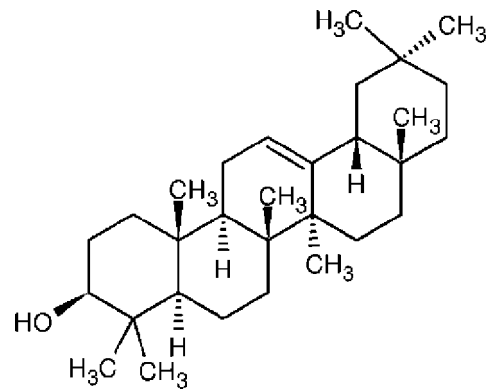
Zastrzeżenia patentowe

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 meserveae*, 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 godz. 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.
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 ursolowego 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 powodowanych wysokim stężeniem cholesterolu we krwi, takich jak hipercholesterolemia, hiperlipidemia mieszana i inne hiperlipidemie.

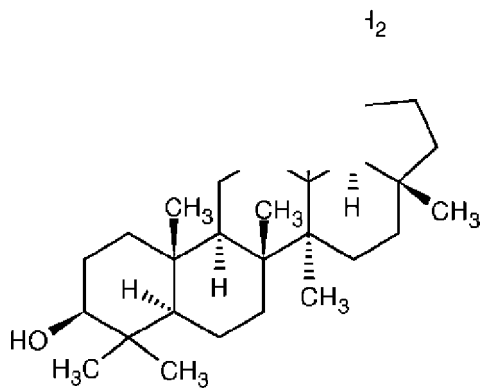
Rysunki



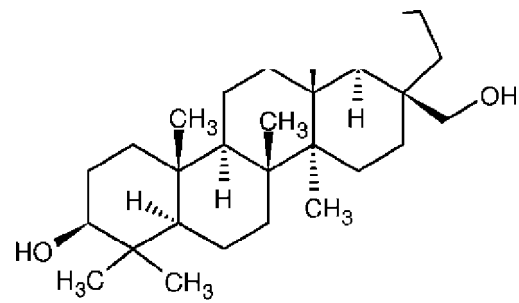
Wzór 1



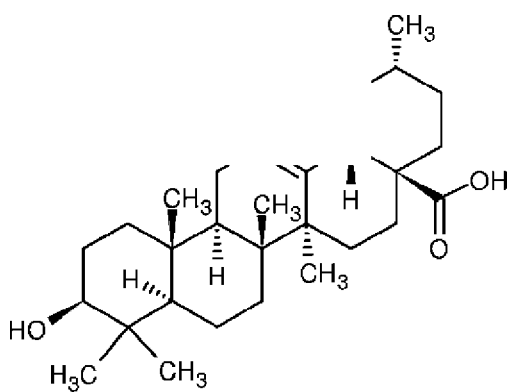
Wzór 2



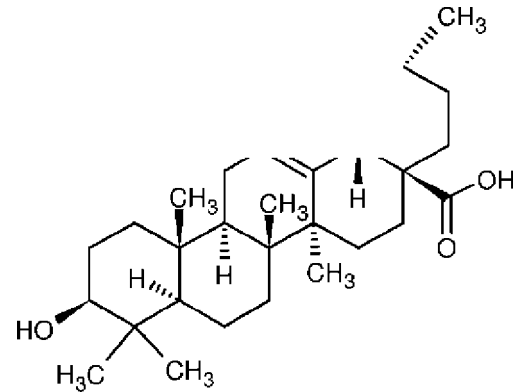
Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5



Wzór 6