

UDC 615.451.13:582.912.4:547.56

DOI: 10.15587/2519-4852.2020.222511

PROFIL FITOCHEMICZNY I AKTYWNOŚĆ FARMAKOLOGICZNA

SUCHY WYCIĄG Z LIŚCI ARCTOSTAPHYLOS UVA-URSI MODYFIKOWANY

Z FENYLALANINĄ

N. Chaika, O. Koshovyi, A. Raal, I. Kireyev, A. Zupanets, V. Odyntsova

Choroby układu moczowego i nerek zajmują czołowe miejsce w strukturze chorób na całym świecie.

Liście *Arctostaphylos uva-ursi* są jednym z najczęściej stosowanych rodzajów surowców roślinnych leczniczych (MPM) o działaniu moczopędnym i uroantyseptycznym. Jednak wywar z liści *Arctostaphylos uva-ursi* ma pewne wady: czas trwania procesu wytwarzania postaci dawkowania, brak standaryzacji przed użyciem, niedokładność dawkowania i krótki czas przechowywania postaci dawkowania, co prowadzi do niskiej komplementarności tego środka, dlatego istotne jest opracowanie standaryzowanych ekstraktów z tego surowca.

Cel. Celem badania był odczynnik fitochemiczny suchego ekstraktu modyfikowanego fenylalaniną z liści *Arctostaphylos uva-ursi* w celu ustalenia możliwości stworzenia nowego leku moczopędnego.

Materiały i metody. Przedmiotem badań był suchy ekstrakt z liści *Arctostaphylos uva-ursi*, modyfikowany fenylalaniną. Badania fitochemiczne związków fenolowych i saponin przeprowadzono metodą HPLC i spektrofotometrii. Oznaczenie aktywności moczopędnej przeprowadzono metodą EB.

Berkhina na szczurach niekrewniaczych. Oznaczenie aktywności przeciwzapalnej otrzymanych ekstraktów przeprowadzono metodą obrzęku karagenowego u białych szczurów. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów przeprowadzono metodą dyfuzji do agaru.

Wyniki. W ekstraktach uzyskanych metodą HPLC zidentyfikowano glikozyd fenolu (arbutyna), 2 kwasy fenolokarboksylowe (galusowy i elagowy), 6 flawonoidów, 8 saponin i określono ich zawartość ilościową. Spośród flawonoidów dominującymi były hiperozyd i katechina; spośród saponin dominującymi były kwas ursolowy, uwalol i lupeol. W uzyskanych ekstraktach zawartość głównych grup związków fenolowych określono metodą spektrofotometrii.

Suchy ekstrakt z *Arctostaphylos uva-ursi*, modyfikowany fenylalaniną, wykazał wyraźne działanie moczopędne, przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe (w odniesieniu do *St. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *C. albicans*).

Wnioski. Określono skład chemiczny, działanie moczopędne, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwzapalne suchego ekstraktu z liści *Arctostaphylos uva-ursi* modyfikowanego fenylalaniną. Uzyskany suchy ekstrakt charakteryzuje się lepszą rozpuszczalnością, biodostępnością i farmakodynamiką, dlatego jest obiecującą substancją do tworzenia nowych leków w różnych formach dawkowania.

Słowa kluczowe: *Arctostaphylos uva-ursi*, liście, ekstrakt, modyfikacja, związki fenolowe, saponiny, aktywność farmakologiczna

Copyright © 2020, N. Chaika, O. Koshovyi, A. Raal, I. Kireyev, A. Zupanets, V. Odyntsova.

Jest to artykuł w otwartym dostępie, udostępniany na licencji CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

1. Wprowadzenie

Choroby układu moczowego i nerek zajmują czołowe miejsce w strukturze chorób na świecie. Na Ukrainie co czwarta osoba jest podatna na choroby układu moczowego. Objawy przewlekłych chorób nerek i pęcherza moczowego są charakterystyczne dla 10% populacji Ukrainy. Wywar z liści *Arctostaphylos uva-ursi* jest tradycyjnie stosowany w leczeniu tych chorób [1–3].

Liście *Arctostaphylos uva-ursi* są jednym z najszerzej stosowanych rodzajów surowców roślinnych leczniczych (MPRM) o działaniu moczopędnym i uroantyseptycznym. Metoda otrzymywania wywaru z liści *Arctostaphylos uva-ursi* jest dobrze znana [4, 5]. Należy jednak zauważyć, że wywar z liści *Arctostaphylos uva-ursi* ma pewne wady: czas trwania procesu wytwarzania postaci dawkowania, brak standaryzacji przed użyciem, niedokładne dawkowanie i krótki

okres przydatności postaci dawkowania. Wszystko to prowadzi do niskiej komplementarności tego leku i w konsekwencji do odmowy stosowania takich leków przez większość pacjentów [7, 8].

Środki galenowe i suche surowce *Arcto-staphylos uva-ursi* są częścią wielu leków i suplementów funkcjonalnych. Na bazie BAS *Arctostaphylos uva-ursi* na rynku farmaceutycznym Ukrainy prezentowane są następujące leki: *Nephrophyt*, *Detox-iphyt*, *Phytonephrol*, *Herbatka moczopędna nr 1*, *Prostaplex*, *Nalewka Pankova* i *Cysto Fink* [4, 10], ale wszystkie są złożone. Jednocześnie na rynku ukraińskim nie ma standaryzowanego krajowego leku galenowego lub nowogalenicznego opartego na tym surowcu, więc stworzenie nowych zmodyfikowanych ekstraktów *Arctostaphylos uva-ursi*, które byłyby skuteczne i miałyby lepsze właściwości farmakologiczne, jest pilnym zadaniem współczesnej nauki farmaceutycznej.

Głównymi substancjami czynnymi liści

Arctostaphylos uva-ursi i jego preparatów są proste fenole, kwasy hydroksycynamonowe, flawonoidy i garbniki. Pochodne hydrochinonu reprezentowane są przez arbutynę, metyloarbutynę i pirozyd [6]. Liście *Arctostaphylos uva-ursi* zawierają kwasy fenolowe (galusowy i elagowy – do 6%), flawonoidy (myricynę, hiperozyd i kwercetynę), glikozydy irydoidowe (asperulozyd, monotropeinę i unedozyd) [7–9].

Wcześniej [11] uzasadniono technologię otrzymywania suchej nalewki, której istota polega na zastąpieniu rozpuszczalnika suchą substancją pomocniczą (sacharozą, mannitolem, sorbitolem itp.). Otrzymany lek ma korzystne parametry technologiczne: zadowalające właściwości objętościowe, niższą higroskopijność i stabilność magazynowania, dlatego osiągnięcia te wykorzystano przy opracowaniu schematu otrzymywania suchego modyfikowanego ekstraktu *Arctostaphylos uva-ursi*. Amino kwasy w ekstraktach są zdolne do tworzenia koniugatów, soli i kompleksów z innymi grupami BAS, co zmienia ich właściwości fizykochemiczne, wpływ na biodostępność, rozpuszczalność i całkowity efekt farmakologiczny. Modyfikacja leków galenowych różnymi aminokwasami prowadzi do poprawy farmakodynamiki i pojawienia się nowych efektów farmakologicznych [12].

W związku z tym stworzenie modyfikowanych ekstraktów *Arctostaphylos uva-ursi* Badania liści, badanie ich składu chemicznego i aktywności farmakologicznej w celu opracowania nowych standaryzowanych substancji, które charakteryzowałaby się dobrymi właściwościami farmakotechnologicznymi, farmakodynamiką i możliwością wykorzystania w produkcji różnych postaci leków, stanowią pilne zadanie współczesnej farmacji.

Celem badania byłaby analiza fitochemiczna suchego ekstraktu z liści *Arctostaphylos uva-ursi* modyfikowanego fenoloalaniną w celu ustalenia możliwości stworzenia nowego leku moczopędnego i przeciwdrobnoustrojowego.

2. Planowanie (metodologia) badań

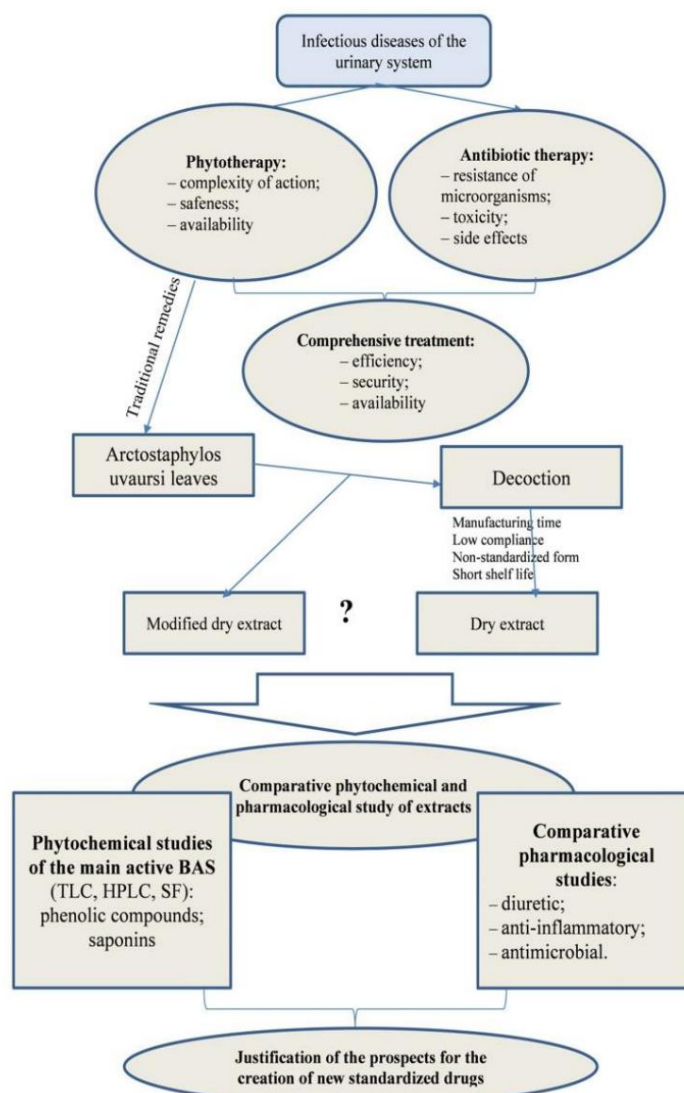
Z liści *Arctostaphylos uva-ursi* przemysł farmaceutyczny pozyskuje suchy ekstrakt modyfikowany fenoloalaniną oraz suchy ekstrakt z wywaru z tego surowca.

Przeprowadziliśmy badania porównawcze fitochemiczne (związki fenolowe i saponiny) i farmakologiczne (działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwdrobnoustrojowe i moczopędne) otrzymanych substancji, które wykazały perspektywę wykorzystania otrzymanej substancji do stworzenia nowego leku (rys. 1).

3. Materiał i metody

Przedmiotem badań był suchy ekstrakt z liści *Arctostaphylos uva-ursi*, modyfikowany fenoloalaniną.

Liście *Arctostaphylos uva-ursi* L. (Spreng) zostały potraktowane



Rys. 1. Schemat uzasadnienia trafności i planowania eksperymentu w badaniu ekstraktów *Arctostaphylos uva-ursi*

w ogrodzie botanicznym Uniwersytetu Medycznego we Lwowie im. Danyła a Halickiego. Okazy bonowe nr 2015-2019 zdeponowano w Katedrze Farmakognozji (Narodowy Uniwersytet Farmaceutyczny w Charkowie, Ukraina). Tożsamość rośliny ustalono przy pomocy konsultacyjnej dr hab. T. Gontowej [13].

Przygotowanie próbki, analiza HPLC-DAD i kwantyfikacja. 50,0 mg (dokładnie odważona ilość) ekstraktów *Arctostaphylos uva-ursi* odważono w 5,0 ml probówce pomiarowej i uzupełniono do kreski 90% wodnym metanolem. Po 30 minutach w próbce ultradźwiękowej próbkę pozostawiono w temperaturze pokojowej na 3–4 godziny. Następnie próbkę ponownie umieszczono w próbce ultradźwiękowej na 15 minut, po czym roztwór przefiltrowano przez filtr teflonowy o średnicy porów 0,45 µm w fiolce do analizy [14, 15]. Do analizy wykorzystano substancje standardowe wyprodukowane przez firmę Sigma-Aldrich USA (B9757, O5504, U6753, U6628, L5632 A4256, G7384, E2250, R5143, 83388, Y0001931, Q4951, 17793, C1251, PHL83773).

Badania związków fenolowych ekstraktów *Arctostaphylos uva-ursi* przeprowadzono metodą HPLC na chromatografie cieczowym Shimadzu LC20 Prominence w module

ukł ad wyposażony w czterokanał ową pompę LC20AD, termostat kolumny STO20A, automatyczny próbnik SIL20A w następujących warunkach: (2), rozmiar 250 mm x 4,6 mm, rozmiar cząstek 5 µm; temperatura kolumny - 35 °C; dł ugość fali detekcji - 330 nm (dla kwasów hydroksykortynowych, flawonoidów glikozydowych), 370 nm (dla aglikonów flawonoidowych), 280 nm (dla tanin), 340 nm (kumaryny); szybkość przepł ywu fazy ruchomej - 1 ml/min; objętość wstrzykiwanej próbki - 5 µl; faza ruchoma: Eluent A: 0,1% roztwór kwasu trifluorooctowego w wodzie; Eluent B: 0,1% roztwór kwasu trifluorooctowego w acetonitrylu (Tabela 1).

Identyfikację związków fenolowych przeprowadzono na podstawie czasu retencji wzorców oraz charakterystyki widmowej UV (rys. 2) [16, 17].

Skł ad jakościowy i zawartość ilościową saponin badano metodą chromatografii cieczowej wysokosprawnej (HPLC) na chromatografie cieczowym Shimadzu LC20 Prominence w systemie moduł owym wyposażonym w pompę 4-kanał ową LC20AD, termostat kolumny CTO20A, automatyczny próbnik SIL20A, detektor diodowy SPD20A i stację Chem Station LC20 w następujących warunkach chromatograficznych: kolumna chromatograficzna X-Bridge C18 o wymiarach 150 × 4,6 mm i wielkości cząstek 5 µm (firma Waters); temperatura kolumny - 30 °C; dł ugość fali detekcji - 205 nm; natężenie przepł ywu fazy ruchomej - 1,0

ml/min; objętość wtrysku - 20 µl; faza ruchoma - metanol do HPLC: 0,2% roztwór octanu amonu (pH 6,75) w stosunku 80:20; sposób elucji - izokratyczny.

Identyfikację skł adników przeprowadzono na podstawie czasu retencji i zgodności widm UV z substancjami odniesienia [14].

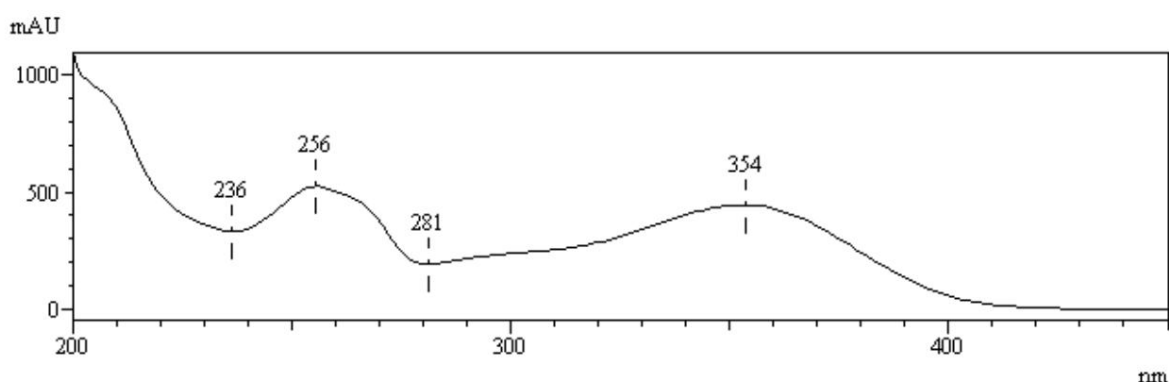
Saponiny triterpenowe wykrywano przy 205 nm na podstawie ich maksimum absorpcji przy 200-210 nm.

Oznaczenia ilościowe poszczególnych skł adników w ekstraktach etanolowych surowca wykonano wykorzystując roztwory zewnętrzne próbek odniesienia (tab. 2 i rys. 3).

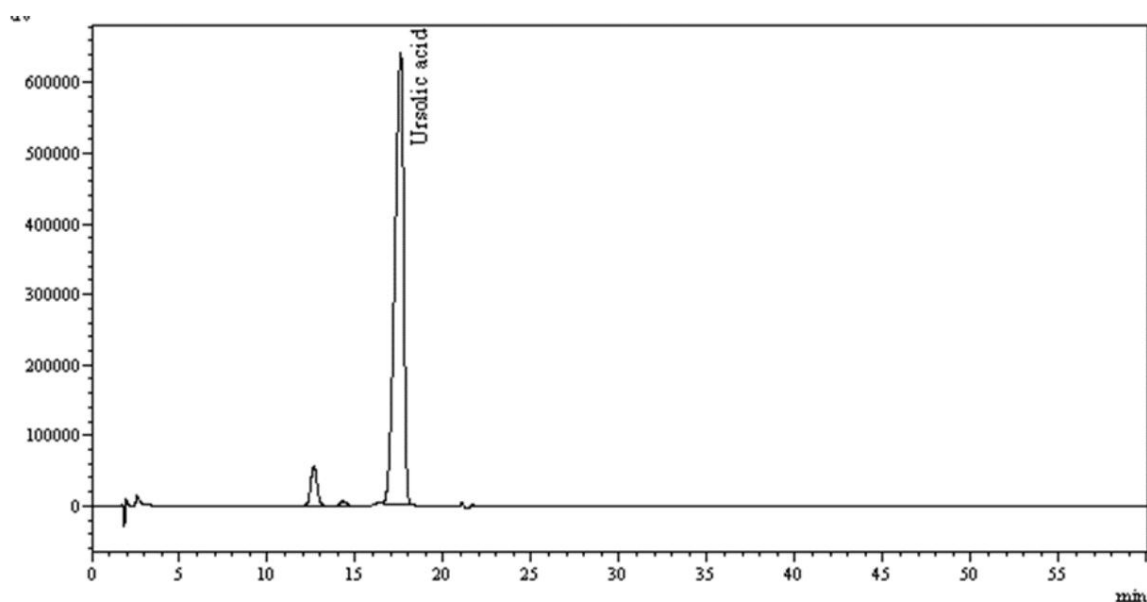
Tabela 1

Warunki chromatografii w analizie związków fenolowych

Czas chromatografii (min.)	Eluent A, %	Eluent B, %
0-5	95	5
5-35	95 75	5 25
35-40	75	25
40-60	75 50	25 50
60-65	50 20	50 80
65-70	20	80
70-85	95	5



Rys. 2. Widmo UV hiperozydu



Rys. 3. Chromatogram standardu kwasu ursolowego

Tabela 2

Analiza chromatograficzna roztworów próbek odniesienia (rozdział 2)

Związki	Czas retencji, min	Kwas euskaficzny	λ_{maks} , nm
8,53 Kwas tormentynowy	12,68		200
Betulina Kwas oleandrowy		Kwas	200
ursolowy	14,57		200, 234, 322
Uwaol Lupeol	16,25		200
	17,29		200
	22,80		200
	48,13		203, 230

Zawartość substancji w wyciągach pływających obliczano według wzoru:

$$X = \frac{A_{mP} \cdot \frac{m}{V}}{A_{V} \cdot 100'}$$

gdzie A_{mP} – jest powierzchnią pików substancji na chromatogramie roztworu testowego; A_{st} – jest powierzchnią pików substancji na chromatogramie roztworu odniesienia; m – jest masą próbki wzorcowej substancji w roztworze próbki odniesienia, mg; V_{st} – jest rozcieńczeniem roztworu odniesienia, ml; P – jest czystością próbki odniesienia, %.

Zawartość ilościowa podstawowych grup BAS w ekstraktach *Arctostaphylos uva-ursi* oznaczano metodą spektrofotometrii absorpcyjnej na spektrofotometrze Evolution TM 60S UV-Visible (Thermo Fisher Scientific, USA) [18, 19]. We wszystkich ekstraktach *Arctostaphylos uva-ursi* substancje ekstrakcyjne oznaczano wagowo [5] po całkowitym wysuszeniu w temperaturze pokojowej z uwzględnieniem strat podczas suszenia; sumę pochodnych kwasu hydroksycynamonowego oznaczano metodą spektrofotometrii bezpośredniej (jako kwas chlorogenowy, $\lambda = 325$ nm) [20, 21]; flawonoidy oznaczano ilościowo metodą spektrofotometrii różniczkowej z chlorkiem glinu (jako rutyna, $\lambda = 410$ nm) [4, 19]; polifenole oznaczano ilościowo metodą spektrofotometrii bezpośredniej (jako kwas galusowy, $\lambda = 270$ nm) zgodnie z metodą Koshoviy i in. [14]. Wszystkie badania wykonywano trzykrotnie.

Aktywność moczopędna. Oznaczenie aktywności moczopędnej przeprowadzono metodą E.B. Berkhina [22] na szczurach niekrewniaczych o masie ciała 150-220 g, które utrzymywano w standardowych warunkach na normalnej diecie ze swobodnym dostępem do wody i pożywienia. Zwierzęta podzielono na trzy grupy po 5 szczurów w każdej. Działanie moczopędne wyciągów oceniano na podstawie ilości wydalanej moczu 2 i 4 godziny po rozpoczęciu eksperymentu. Przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzęta trzymano przez 2 godziny bez pożywienia ze swobodnym dostępem do wody. Wyciągi testowe podawano doustnie w postaci roztworów wodnych w dawkach 25, 50, 75 i 100 mg/kg na 60 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Badanie przeprowadzono przy obciążeniu wodą wynoszącym 3% masy ciała zwierzęcia. Szczury kontrolne otrzymywały odpowiednią objętość roztworu soli fizjologicznej. Opieka nad zwierzętami była zgodna z postanowieniami Europejskiej konwencji o ochronie zwierząt kręgowych wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych (Strasburg, 1986).

Aktywność przeciwpalna. Oznaczenie aktywności przeciwpalnej uzyskanych wyciągów przeprowadzono zgodnie z wytycznymi badania leków pod redakcją Stefanowa OV [23] na białych szczurach o wadze

180–220 g. Ekstrakt testowy podawano doustnie w postaci roztworu wodnego w dawkach 25, 50, 75 i 100 mg/kg na 60 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Zwierzętom wstrzykiwano odpowiednią objętość soli fizjologicznej. Lekiem referencyjnym był diklofenak sodowy w skutecznej dawce 8 mg/kg. Ostre zapalenie aseptyczne powtórzone podając szczurom 1% roztwór karageniny podopodszewowo w objętości 0,1 ml na zwierzę 1 godzinę po podaniu leków badawczych. Pomiary obrzęku łap u szczurów z ostrym wysiękowym zapaleniem wykonywano przy użyciu mechanicznego onkomometru według AS Zakharevsky'ego w dynamice obrzęku karageniny - po 1, 2, 3, 4 godzinach. Aktywność przeciwwysiękową badanych wyciągów określono na podstawie zdolności do zmniejszania rozwoju obrzęku w porównaniu z grupą patologii kontrolnej, co obliczono i wyrażono w procentach [24]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej kompleksów *Arctostaphylos uva-ursi* z aminokwasami przeprowadzono metodą dyfuzji do agaru w laboratorium biochemii mikroorganizmów i pożywek Instytutu Mikrobiologii i Immunologii im. II Miecznikowa pod kierownictwem dr. Osolodchenko TP Zgodnie z zaleceniami WHO do oceny aktywności leku wykorzystano szczepy referencyjne *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Candida albicans* 653/885 ATCC. Do badań wykorzystano 1% roztwory ekstraktów, rozpuszczalnikiem był roztwór soli fizjologicznej [15, 14, 18].

Analiza statystyczna. Właściwości statystyczne zmiennych losowych o n-wymiarowym rozkładzie normalnym podane są za pomocą ich macierzy korelacji, które można obliczyć z macierzy oryginalnych. Materiał badań farmakologicznych opracowano metodą statystyki wariacyjnej z obliczeniem średniej arytmetycznej i jej błędów standardowych; wiarygodność porównywanych wartości oszacowano stosując kryteria Studenta, Wilcozona, Manna-Whitneya z poziomem prawdopodobieństwa 0,05 na komputerze przy użyciu programów Statistica 6.0 i Word Excel [4, 25].

4. Wyniki badań

Aby otrzymać ekstrakty, 100 g liści *Arcto-staphylos uva-ursi*, rozdrobnić na cząstki o wielkości 2–3 mm, umieszczono w kolbie, napełnionej 500 ml 50% roztworem alkoholu etylowego, ekstrahowano przez noc w temperaturze pokojowej. Ekstrakcję powtórzono ponownie z nową porcją ekstrahenta (500,0 ml). Otrzymane ekstrakty połączono, wywarzono przez noc, przefiltrowano i wysterylizowano. Do 400 ml filtratu dodano 1,485 g fenylalaniny i roztwór wywarzono przez noc. Filtrat odparowano przez odparowanie rotacyjne do suchego ekstraktu. Z liści *Arctostaphylos uva-ursi* za pomocą znanej klasycznej technologii uzyskano wywar [4], który następnie wysuszono w próżniowym urządzeniu obrotowym do suchego ekstraktu.

Zawartość głównych BAS o charakterze fenolowym i saponin w otrzymanych ekstraktach oznaczono metodą HPLC (tab. 3, ryc. 4, 5).

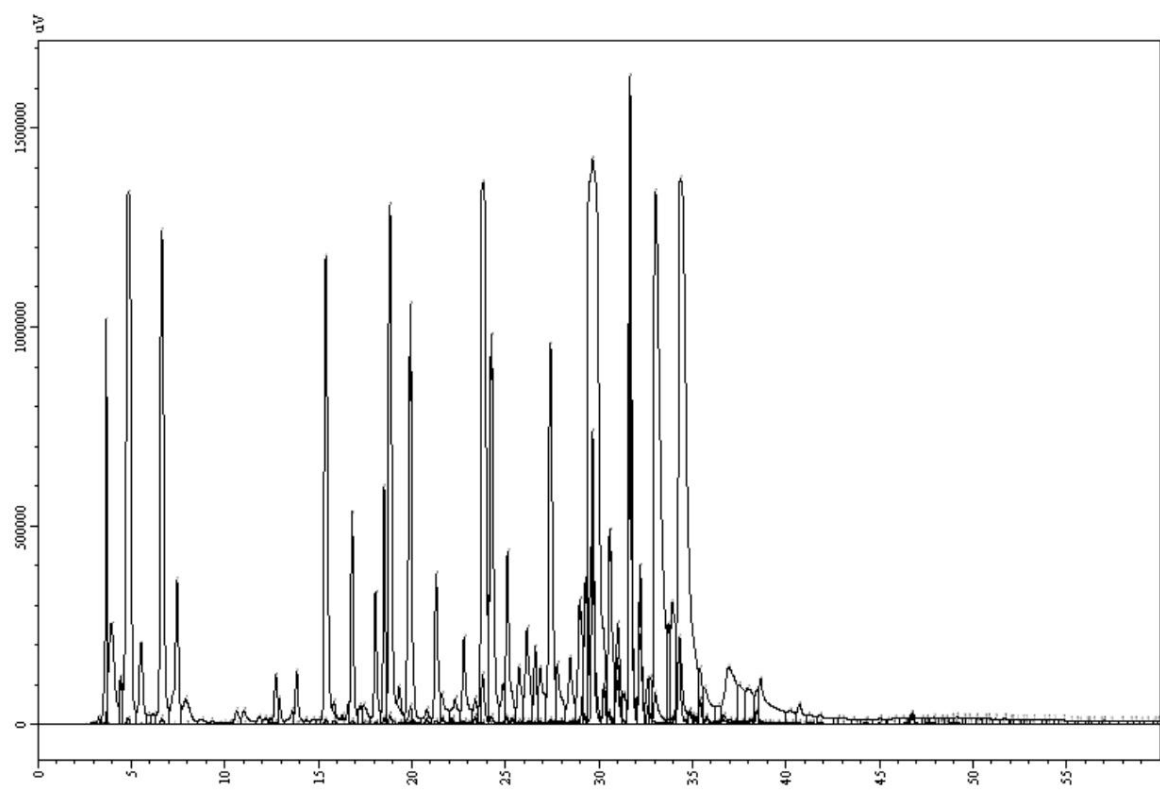
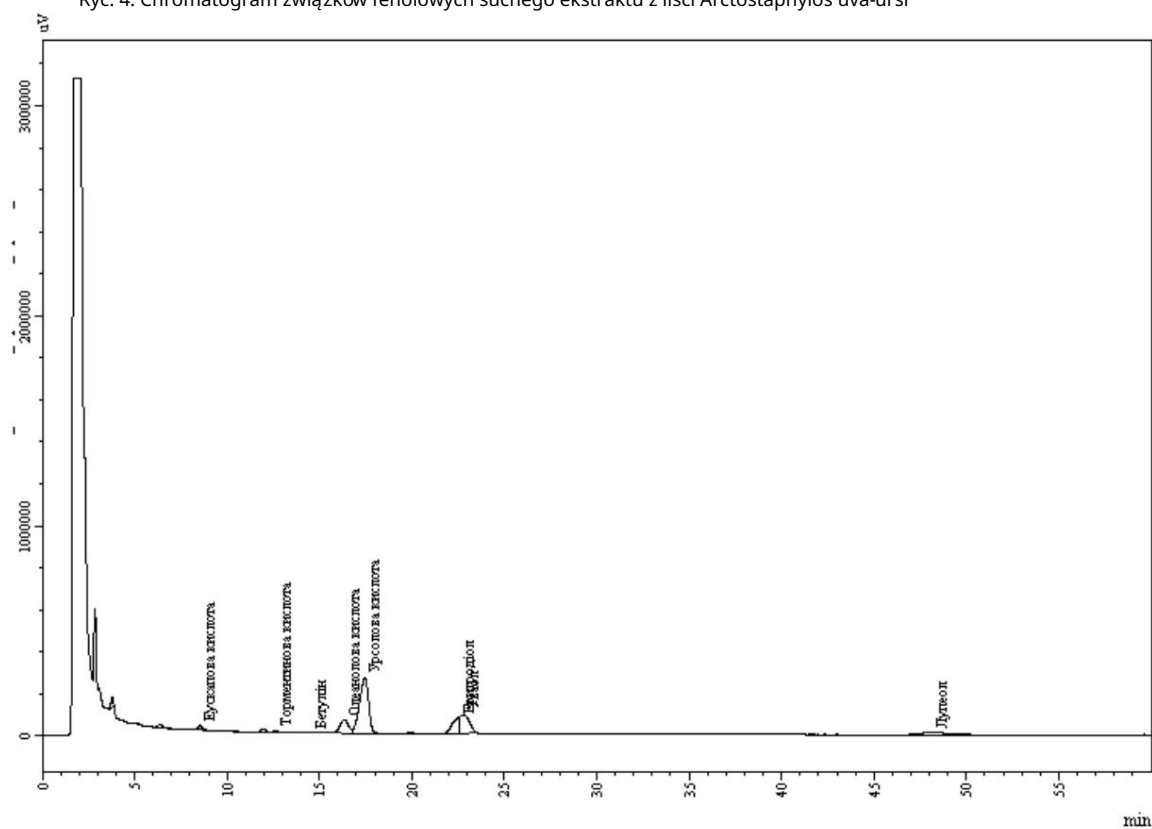
Ryc. 4. Chromatogram związków fenolowych suchego ekstraktu z liści *Arctostaphylos uva-ursi*Ryc. 5. Chromatogram saponin suchego ekstraktu z liści *Arctostaphylos uva-ursi*

Tabela 3

Wyniki analizy HPLC suchych ekstraktów z liści *Arctostaphylos uva-ursi*

Substancja	Zawartość substancji, mg/100 g	
	Suchy wyciąg z wywaru z liści <i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Suchy ekstrakt z liści <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> z fenyloalaniną
Arbutyna	2956,72±57,9	2819,81±49,8
Kwasy fenolowe		
Kwas galusowy	147,31±4,2	140,49±3,9
Kwas elagowy	64,33±1,2	61,33±1,7
Flawanoidy		
Rutyna	11,82±0,03	11,23±0,02
Hiperosyd	446,23±13,2	425,57±12,7
Kwercytryna	14,55±0,5	13,87±0,02
Kwercetyna	3,58±0,01	3,44±0,02
Izokwercytryna	0,01	0,01
Katechina	277,57±5,5	264,72±6,3
Saponiny		
Kwas ursolowy	1067,47±83,2	1018,06±73,8
Kwas euskapinowy	38,53±0,72	36,747±0,63
Kwas tormentynowy	17,49±0,05	16,68±0,04
Uvaol	347,63±10,4	331,54±9,6
Kwas oleanolowy	164,52±5,7	156,90±7,1
Erytrodiol	160,34±8,1	152,91±7,5
Betulina	130,82±5,8	124,76±4,5
Lupeol	369,52±11,5	352,41±12,4

W uzyskanych ekstraktach metodą spektrofotometrii oznaczono zawartość głównych grup BAS (tab. 4, ryc. 6, 7).

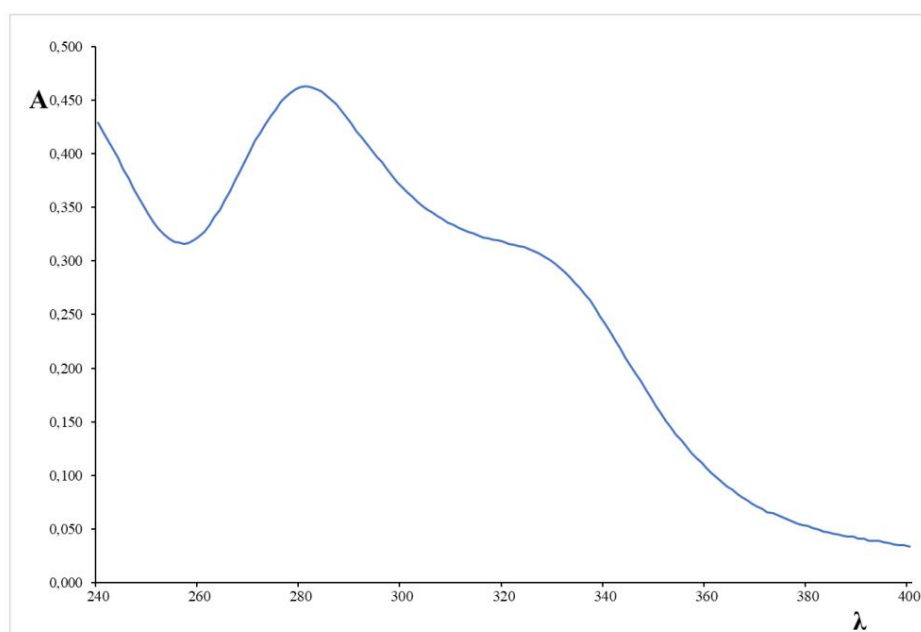
Wśród ziół owych środków moczopędnych szczególne miejsce zajmują rośliny zawierające arbutynę, takie jak *Arctostaphylos uva-ursi*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Pyrola elliptica* itp. Oprócz działania moczopędnego, surowce roślinne lecznicze zawierające arbutynę mają działanie przeciwpalne, przeciwbakteryjne i antyoksydacyjne. Wiadomo, że wyciągi z liści *Arctostaphylos uva-ursi* ze względu na zawartość pochodnych hydrochinonu mają działanie moczopędne.

ty [26, 27]. Wskazane jest jednak eksperymentalne udowodnienie, że kompleksy z fenyloalaniną, potencjalizują działanie moczopędne.

Wyniki uzyskane w badaniu aktywności diuretycznej podano w tabeli 5.

Wyniki badania aktywności przeciwpalnej ekstraktu z liści *Arctostaphylos uva-ursi* przedstawiono na ryc. 8.

Wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z liści *Arctostaphylos uva-ursi* podano w tabeli 6.

Ryc. 6 Widmo absorpcji oryginalnego ekstraktu z liści *Arctostaphylos uva-ursi*

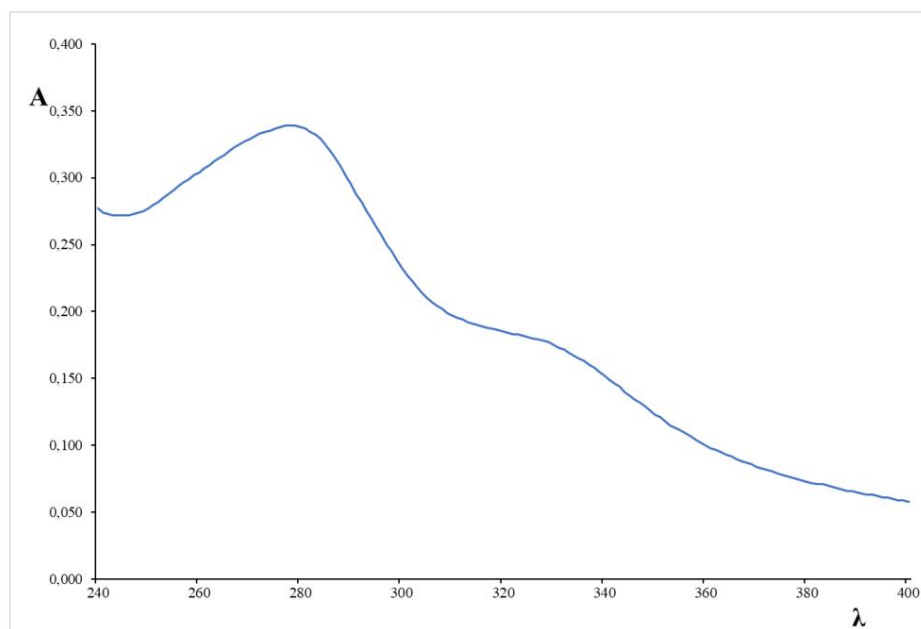
Ryc. 7 Widmo absorpcji ekstraktu z liści *Arctostaphylos uva-ursi* modyfikowanego fenyloalaniną

Tabela 4

Zawartość głównych grup BAS w suchych wyciągach z liści *Arctostaphylos uva-ursi*

Grupa BAS	Zawartość substancji, %	
	Suchy ekstrakt z wywaru z liści <i>Arcto-staphylos uva-ursi</i>	Suchy ekstrakt z liści <i>Arcto-staphylos uva-ursi</i> z fenyloalaniną
Suma związków pochodnych hydrochinonu (w przeliczeniu na arbutynę)	6,98±0,05	5,06±0,04
Kwasy hydroksycynamonowe (w odniesieniu do kwasu chlorogenowego)	2,88±0,02	3,15±0,02
Flawanoidy (w kategoriach rutyny)	4,30±0,06	3,05±0,03
Suma związków fenolowych (w przeliczeniu na kwas galusowy)	17,68±0,09	19,80±0,06

Tabela 5

Działanie moczopędne ekstraktów z liści *Arctostaphylos uva-ursi*

Zł ożony	Dawka, mg/kg	Diureza przez			
		2 godziny		4 godziny	
		(M ± m), ml	w % do kontrolowania	(M ± m), ml	w % do kontrolowania
Kontrola		0,90±0,15	100	1,22±0,26	100
Wyciąg z suchych liści <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> z fenyloala-9	25	1,12±0,15*	124	1,54±0,12*.#	126
	50	1,24±0,11*	138	1,57±0,12*	129
	75	1,49±0,06*.#	166	1,74±0,13*.#	143
	100	1,43±0,14*.#	159	1,88±0,14*.#	154
Suchy wyciąg z de-1,30±0,11 konsystencji liści <i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	25	1,09±0,16	111		107
	50	1,25±0,09*	139		124
	75	1,23±0,21*	137		127
	100	1,22±0,14*	136	1,56±0,21	128

Uwaga: * – p 0,05 w odniesieniu do zwierząt kontrolnych; # – p 0,05 w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych, którym podawano suchy wyciąg z wywaru z liści *Arctostaphylos uva-ursi*

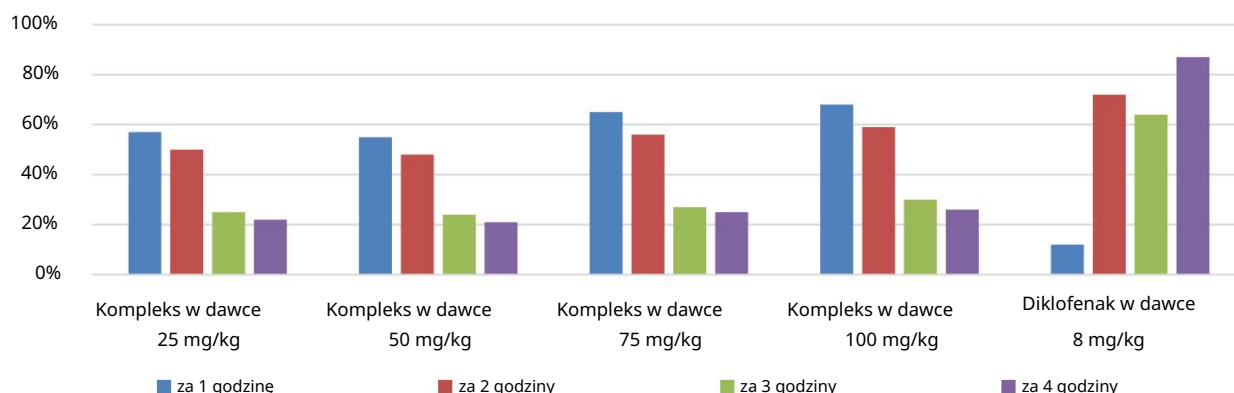
Aktywność przeciwzapalna kompleksu *Arctostaphylos uva-ursi* z fenyloalaniną, %Ryc. 8. Działanie przeciwzapalne kompleksu ekstraktu *Arctostaphylos uva-ursi* z fenyloalaniną

Tabela 6

Wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej suchych wyciągów z liści *Arctostaphylos uva-ursi*

Mikroorganizm	Strefa zahamowania wzrostu, mm		
	Wyciąg z wywaru z <i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Ekstrakt z liści <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> z fenyloalaniną	Chlorofilek
Gronkowiec zł ocisty ATCC25923	21,0±1,0	18,0±1,0	20±0,2
Pałeczka okrężnicy ATCC 25922	20,0±1,0	17,7±0,6	14±0,2
Odnoga pospolita ATCC 4636	22,0±1,0	20,0±1,0	Wzrost
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	22,0±1,0	23,7±0,6	Wzrost
Bacillus subtilis ATCC 6633	20,0±1,0	19,3±1,5	Wzrost
Candida albicans ATCC 885/653	23,0±1,0	22,3±1,5	Wzrost

5. Dyskusja wyników

Z liści *Arctostaphylos uva-ursi* opracowano metodę otrzymywania suchego ekstraktu modyfikowanego z dodatkiem fenyloalaniny oraz suchego ekstraktu z wywaru tego surowca. Uzyskane ekstrakty z liści *Arctostaphylos uva-ursi* to zwykłe suche sypkie proszki o brązowej barwie i specyficznym zapachu. Wydajność suchego ekstraktu modyfikowanego z fenyloalaniną wyniosła 15,9%, suchego ekstraktu z wywaru - 16,8%. Podstawowy schemat otrzymywania suchego ekstraktu modyfikowanego zaproponowano po raz pierwszy, w przeciwieństwie do poprzednich badań [6, 24, 26] do ekstrakcji użyto 50% etanolu, który jest optymalnym ekstrahentem z punktu widzenia ekonomicznego i zapewnia wystarczającą ekstrakcję BAS.

Fenologlikozyd (arbutyna), 2 kwasy fenolowe (galusowy i elagowy), 6 flawonoidów i 8 saponin zostały zidentyfikowane w uzyskanych ekstraktach metodą HPLC i określono ich zawartość ilościową. Spośród flawonoidów dominowały hyperozydy i katechiny, spośród saponin – kwas ursolowy, uwaol i lupeol. Zawartość wszystkich zidentyfikowanych związków w ekstrakcie modyfikowanym była niższa w porównaniu z ekstraktem na bazie wywaru. Jeśli chodzi o zidentyfikowane związki fenolowe, to były one już wcześniej znajdowane w ekstraktach z tego surowca [8, 9, 26, 29], ale ich obecność i ilość będą miały kluczowe znaczenie w przyszłości w opracowywaniu metod kontroli jakości. Niemniej jednak niektóre

po raz pierwszy odkryto saponiny, mianowicie kwas euskaowy i tormentynowy oraz erytrodiol [29, 31].

Podczas rozpuszczania suchego modyfikowanego ekstraktu *Arctostaphylos uva-ursi* w wodzie powstaje klarowny ciemnobrązowy roztwór, w przeciwieństwie do oryginalnego ekstraktu uzyskanego z 50% etanolu, w którym występuje zarówno opalizacja, jak i niewielka ilość osadu. Sugeruje to, że rozpuszczalność związków fenolowych wzrasta wraz z dodatkiem aminokwasów ze względu na tworzenie się bardziej hydrofilowych koniugatów i kompleksów. Ponadto z ogólnych widm UV ekstraktów (rys. 5, 6) można zauważyć, że w widmie grup aromatycznych występują przesunięcia hipo- i hiperchromowe, co również wskazuje na tworzenie się koniugatów i kompleksów. Jednak kompleksy te nie są stabilne, ponieważ nie są wykrywane przez chromatografię HPLC w środowisku kwaśnym.

Zawartość związków pochodnych hydrochinonu (w przeliczeniu na arbutynę), kwasów hydroksycynamonowych (w przeliczeniu na kwas chlorogenowy), flawonoidów (w przeliczeniu na rutynę) oraz ilość związków fenolowych (w przeliczeniu na kwas galusowy) w otrzymanych ekstraktach oznaczono metodą spektrofotometryczną. Jak widać z otrzymanych wyników, zawartość wszystkich tych grup BAS w ekstrakcie modyfikowanym jest niższa niż w ekstrakcie z wywaru, natomiast jego aktywność przeciwzapalna i moczopędna przewyższa ekstrakt z wywaru. Sugeruje to, że dodatek

Zawartość fenyloalaniny potęguje działanie związków fenolowych *Arctostaphylos uva-ursi*.

Zgodnie z wynikami naszych badań, jednorazowe dożoły podanie suchego wyciągu z liści *Arctostaphylos uva-ursi* z fenyloalaniną doprowadziło do zwiększenia aktywności moczopędnej we wszystkich wybranych dawkach testowych po 2 i 4 godzinach obserwacji. Najskuteczniejsze okazały się dawki 75 mg/kg i 100 mg/kg, po wprowadzeniu których ilość wydalanego moczu u zwierząt doświadczalnych wzrosła statystycznie istotnie po 2 godzinach odpowiednio o 66 i 59% ($p = 0,05$), a po 4 godzinach o 43 i 54% ($p = 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną.

Pojedyncze podanie suchego wyciągu z wywaru z liści *Arctostaphylos uva-ursi* w ciągu 2 godzin od rozpoczęcia eksperymentu wykazało o znaczący wzrost oddawania moczu przy dawkach 50, 75 i 100 mg/kg w porównaniu z grupą kontrolną, co było o wartością mniejszą niż u zwierząt otrzymujących roztwór suchych liści *Arctostaphylos uva-ursi*

ekstrakt z fenyloalaniną.

Podczas badania właściwości przeciwzapalnych ekstraktów stwierdzono, że suchy ekstrakt z liści *Arctostaphylos uva-ursi* modyfikowany fenyloalaniną wykazuje maksymalne działanie przeciwwysiękowe przy dawce 75 i 100 mg/kg o 65 i 68% w ciągu 1 godziny oraz o 56 i 59%, odpowiednio, po 2 godzinach obserwacji.

W momencie końcowej oceny wyników, tj. po 4 godzinach trwania eksperymentu, aktywność przeciwwysiękowa zmniejszyła się w grupach zwierząt, którym podawano ten wyciąg we wszystkich dawkach i był o kilkakrotnie niższa niż w grupie zwierząt, którym podawano diklofenak.

Na podstawie wyników badania aktywności przeciwwysiękowej można założyć prawdopodobny mechanizm działania badanego suchego wyciągu z liści *Arctostaphylos uva-ursi* z fenyloalaniną. Mechanizm działania przeciwzapalnego tego wyciągu jest realizowany poprzez szlak leukotrienowy, gdzie największy wpływ na powstawanie obrzęku mają mediatory zapalne, takie jak aminy biogenne i kininy, a szczytową aktywność tych mediatorów obserwuje się od pierwszej do drugiej godziny.

Z tabeli 6 wynika, że suchy ekstrakt z liści *Arctostaphylos uva-ursi*, modyfikowany fenyloalaniną, wykazał aktywność przeciwko *St. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *C. albicans* na poziomie ekstraktu z wywaru z liści *Arctostaphylos uva-ursi*, jednak aktywność wywaru jest nieco wyższa, ale jest on bardziej aktywny przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Otrzymane ekstrakty wykazują szerszy zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej w porównaniu z lekiem referencyjnym Chlorophyllipt. Naszym zdaniem taniny są odpowiedzialne za aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów *Arctostaphylos uva-ursi* w warunkach eksperymentalnych [9] i są one gorzej ekstrahowane 50% etanolem, a dodatkowo ich stężenie nieznacznie spada po dodaniu fenyloalaniny, co tłumaczy większe działanie przeciwdrobnoustrojowe wywaru. Wcześniej badano aktywność ekstraktów *Arctostaphylos uva-ursi* otrzymanych z 95% etanolem wobec 25 szczepów mikroorganizmów [30], w większości spektrum aktywności ekstraktów otrzymanych z 50% etanolem jest podobne, ale wykryto dodatkową aktywność wobec *C. albicans*.

Ograniczenia badania. Podczas badania ekstraktów metodą HPLC liczba substancji standardowych była ograniczona, więc nie wszystkie substancje w ekstraktach mogły zostać zidentyfikowane. W badaniu wykorzystano tylko archiwalne szczepy mikroorganizmów, podczas gdy interesujące byłoby przetestowanie aktywności względem szczepów klinicznych uzyskanych od prawdziwych pacjentów.

Perspektywy dalszych badań. Aby tworzyć nowe leki, w oparciu o badania fitochemiczne, konieczne jest opracowanie i walidacja metod kontroli jakości dla uzyskanego modyfikowanego ekstraktu z liści *Arctostaphylos uva-ursi*.

Otrzymany zmodyfikowany ekstrakt jest obiecującą substancją do tworzenia nowych leków w różnych formach dawkowania, dlatego też opracowanie stałych form dawkowania z wykorzystaniem ekstraktu stanowi obiecujący obszar rozwoju tego tematu.

Biorąc pod uwagę skład chemiczny uzyskanego zmodyfikowanego ekstraktu oraz dane z piśmiennictwa [28], możliwe jest, że będzie on miał działanie hipoglikemiczne i hipolipemiczne i będzie obiecującym środkiem w korekcie zespołu metabolicznego.

6. Wnioski

Określono skład chemiczny, działanie moczopędne, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwzapalne suchego wyciągu z liści *Arctostaphylos uva-ursi* modyfikowanego fenyloalaniną.

Fenologlikozyd (arbutyna), 2 kwasy fenolowe (galusowy i elagowy), 6 flawonoidów i 8 saponin zidentyfikowano w otrzymanych ekstraktach metodą HPLC i określono ich zawartość ilościową. Zawartość związków pochodnych hydrochinonu (w przeliczeniu na arbutynę, odpowiednio 6,98±0,05; 5,06±0,04 %), kwasów hydroksycynamonowych (w przeliczeniu na kwas chlorogenowy 2,88±0,02) oznaczono metodą spektrofotometrii w otrzymanych ekstraktach; 3,15±0,02 %, odpowiednio), flawonoidy (w przeliczeniu na rutynę 4,30±0,06; 3,05±0,03 %, odpowiednio) i suma związków fenolowych (w przeliczeniu na kwas galusowy 17,68±0,09; 19,80±0,06 %, odpowiednio). Ekstrakt suchy modyfikowany fenyloalaniną ma maksymalne działanie przeciwwysiękowe przy dawce 50 mg/kg, zmniejszając obrzęk o 57%.

Maksymalne działanie moczopędne ekstraktu zaobserwowano przy dawce 75 mg/kg, a po 2 godzinach diureza była większa o 60% w porównaniu ze szczurami kontrolnymi.

Otrzymany suchy ekstrakt charakteryzuje się lepszą rozpuszczalnością, właściwościami farmakotechnologicznymi i farmakodynamicznymi, przez co jest obiecującą substancją do tworzenia nowych leków w różnych formach dawkowania.

Konflikt interesów

Autorzy oświadczają, że nie występuje konflikt interesów.

szacuje się.

Finansowanie

Badania zostały sfinansowane przez Ministerstwo Ochrony Zdrowia Ukrainy ze środków budżetu państwa w ramach projektu nr 2301020 „Działalność naukowa i naukowo-techniczna w dziedzinie ochrony zdrowia” na temat „Nowoczesne podejścia do tworzenia nowych leków korygujących zespół metaboliczny”.

Odniesienia

1. Kotvitska, AA, Kubarieva, IV, Lekhmark, IB, Havrysh, NB, Zhirova, IV (2019). Międzynarodowe badanie doświadczeń w zakresie organizacji opieki medycznej i farmaceutycznej nad ludnością w sytuacjach kryzysowych. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, 9 (3), 7–12.
2. Iermolenko, T., Zupanets, I., Sakharova, T. (2013). Badanie farmakologiczne nowego leku urolitolitycznego Flarosukcyny w eksperymencie szczury niedojrzałe. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21 (2), 258–263.
3. Plekhanov, A., Dambaev, A. (2016). Zakażenia układu moczowego: epidemiologia, etiologia, patogenez, czynniki ryzyka, diagnostyka (recenzja). *Acta Biomedica Scientifica*, 1 (1), 70–74. doi: <http://doi.org/10.12737/21490>
4. MD Mashkovskii (2010). *Lekarstvennye sredstva*. Moskwa: OOO «Izd-vo Novaia Volna», 1216.
5. Derzhavna Farmakopeia Ukrainy. Tom. 1 (2015). Charków: Derzhavne pidpriemstvo «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv», 1128.
6. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2001). Pojedynczy etap ekstrakcji w analizie ilościowej arbutyny w liściach mącznicy lekarskiej (*Arctostaphylos uva-ursi*) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. *Analiza fitochemiczna*, 12 (5), 336–339. doi: <http://doi.org/10.1002/pca.602>
7. Radulović, N., Blagojević, P., Palić, R. (2010). Badanie porównawcze substancji lotnych liści *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Wiosna. i *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae). *Cząsteczki*, 15 (9), 6168–6185. doi: <http://doi.org/10.3390/molecules15096168>
8. Linderborg, K., Laaksonen, O., Kallio, H., Yang, B. (2011). Flawanoidy, cukry i kwasy owocowe mącznicy alpejskiej (*Arcto-staphylos alpina*) z fińskiej Laponii. *Food Research International*, 44 (7), 2027–2033. doi: <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.036>
9. Amarowicz, R., Pegg, RB, Kosińska, A. (2009). Rozdział kompleksu miozyny z taninami z liści mącznicy lekarskiej (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) metodą SE-HPLC – krótkie sprawozdanie. *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (5), 386–391. doi: <http://doi.org/10.17221/234/2008-cjfs>
10. Amarowicz, R., Pegg, RB (2013). Hamowanie proliferacji linii komórkowych ludzkiego raka przez związki fenolowe z surowego ekstraktu z liści mącznicy lekarskiej i jego frakcji. *Journal of Functional Foods*, 5 (2), 660–667. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.009>
11. Dmytriievskia, ID, Danylov, SA, Dmytriievskiy, DI (2011). Dotsilnist stvorennia ta rozrobka tekhnologii novoi likarskoi formy roslynnykh preparativ – sukha nastoika. *Ukrainskyi zhurnal klinichnoi ta laboratornoi medytsyny*, 6 (2), 4–8.
12. Koshevoi, ON (2011). Skład aminokwasowy i monosacharydowy liści *Salvia officinalis*. *Chemia związków naturalnych*, 47 (3), 492–493. doi: <http://doi.org/10.1007/s10600-011-9976-3>
13. Dobrochaeva, DN, Kotov, MI, Prokudin, Iu. N., Barbarich, AI (1999). *Opredelitel vysshikh rastenii Ukrainy*. Kijów: Naukova dumka, 548.
14. Myha, M., Koshovyi, O., Gamulya, O., Ilina, T., Borodina, N., Vlasova, I. (2020). Badania fitochemiczne liści *Salvia grandiflora* i *Salvia officinalis* w celu ustalenia perspektyw ich wykorzystania w praktyce medycznej i farmaceutycznej. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 1 (23), 23–28. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2020.197299>
15. Starchenko, G., Hrytsyk, A., Raal, A., Koshovyi, O. (2020). Profil fitochemiczny i aktywność farmakologiczna wody i Hydroetanolowe suche ekstrakty z *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Herb. Plants*, 9 (6), 751. doi: <http://doi.org/10.3390/plants9060751>
16. Ilina, T., Kashpur, N., Granica, S., Bazylko, A., Shinkovenko, I., Kovalyova, A. i in. (2019). Profile fitochemiczne i immunomodulacyjna aktywność in vitro ekstraktów etanolowych z roślin *Galium aparine* L., 8 (12), 541. doi: <http://doi.org/10.3390/plants8120541>
17. Gontova, T., Ilyinska, N., Golembiowska, O. (2016). Badanie składu składowego związków fenolowych otrzymane z odmiany *Dahlia Ken's Flame* herb. *Der Pharma Chemica*, 8 (18), 455–459.
18. Koshovyi, ON, Vovk, GV, Akhmedov, E. Yu., Komissarenko, AN (2015). Badanie składu chemicznego i aktywności farmakologicznej ekstraktów z liści szafarżki lekarskiej uzyskiwanych poprzez złóżone przetwarzanie. *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal*, 15 (1), 30–34.
19. Shinkovenko, IL, Kashpur, NV, Ilyina, TV, Kovalyova, AM, Goryacha, OV, Koshovyi, OM i in. (2018). Aktywność immunomodulacyjna ekstraktów i kompleksów związków biologicznie czynnych z *Galium verum* L. *Ceska a Slovenska Farmacie*, 67 (1), 25–29.
20. Mykhailenko, O., Gudžinskas, Z., Kovalyov, V., Desenko, V., Ivanauskas, L., Bezruk, I., Georgiyants, V. (2020). Wpływ czynników ekologicznych na akumulację związków fenolowych w gatunkach *Iris* z Łotwy, Litwy i Ukrainy. *Analiza fitochemiczna*, 31 (5), 545–563. doi: <http://doi.org/10.1002/pca.2918>
21. Zdoryk, OA, Khokhlova, KO, Georgiyants, V., Vyshnenska, LI (2014). Badanie stanu fizycznego i chemicznego włośności maści z ziół *ami*. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 18 (3), 248–252.
22. Berkhin, EB (1977). Metody izucheniia deistviia novykh khimicheskikh soedinenii na funktsiiu pochetk. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 11 (5), 3–11.
23. Stefanov, OV (red.) (2001). *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv*. Kijów, 528.
24. Beaux, D., Fleurentin, J., Mortier F. (1998). Wpływ ekstraktów z *Orthosiphon stamineus* Benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. i *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. U szczurów. *Badania fitoterapii*, 12 (7), 498–501. doi: [http://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1573\(199811\)12:7<498::aid-ptr343>3.0.co;2-2](http://doi.org/10.1002/(sici)1099-1573(199811)12:7<498::aid-ptr343>3.0.co;2-2)
25. Koshevoi, N., Zabolotny, A., Koshevaya, I., Kostenko, EM, Rozhnova, T. (2019). Badania wilgotnościomierza do materiałów sypkich i płynnych. XXIX Międzynarodowe Sympozjum Naukowe „Metrologia i Zapewnienie Metrologii” (MMA) 2019. doi: <http://doi.org/10.1109/mma.2019.8935983>
26. Kurkin, VA, Riazanova, TK, Platonov, IA, Pavlova, LV (2015). Ilościowe oznaczanie arbutyny w liściach *arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. *Chemia surowców roślinnych*, 1, 95–100.
27. Migas, P., Krauze-Baranowska, M. (2015). Znaczenie arbutyny i jej pochodnych w terapii i kosmetyce. *Phytochemistry Letters*, 13, 35–40. doi: <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.015>
28. Zagayko, AL, Kolisnyk, TY, Chumak, OI, Ruban, OA, Koshovyi, OM (2018). Ocena włośności przeciwołyściowych i obniżających poziom lipidów ekstraktu z liści *Vaccinium myrtillus* w modelu chomika. *Journal of Basic and Clinical Physiology i Farmakologia*, 29 (6), 697–703. doi: <http://doi.org/10.1515/jbcp-2017-0161>

29. Kutsik, RV, Zuzuk, BM, Nedostup, AT, Petsko, T. (2003). Toloknianska obyknovennaia Arctostaphylos uva-ursi (L.) Wiosna. (Analiticheskii obzor). Provizor, 18, 27–31.
30. Dykes, GA, Amarowicz, R., Pegg, RB (2003). Wzmocnienie dział ania przeciwbakteryjnego nizyny przez mącznicę lekarską (Arcto-ekstrakt z liści Staphylos uva-ursi. Food Microbiology, 20 (2), 211–216. doi: [http://doi.org/10.1016/s0740-0020\(02\)00107-7](http://doi.org/10.1016/s0740-0020(02)00107-7)
31. Jahodár, L., Grygarová, V., Budésínský, M. (1988). Triterpenoidy korzeni Arctostaphylos uva-ursi. Apteka, 43 (6), 442–443.

Data otrzymania 11.11.2020

Data przyjęcia 22.12.2020

Data publikacji 30.12.2020

Natalia Chaika, Studentka studiów podyplomowych, Katedra Farmakognozji, Narodowy Uniwersytet Farmaceutyczny, ul. Puszkinska 53, Charków, Ukraina, 61002

E-mail: pro-aqua_kharkov@ukr.net

Oleh Koshovyi, doktor nauk farmaceutycznych, profesor, kierownik katedry, Katedra Farmakognozji, Narodowy Uniwersytet Farmaceutyczny, ul. Puszkinska 53, Charków, Ukraina, 61002

E-mail: oleh.koshovyi@gmail.com

Raal Ain, dr, profesor, dyrektor, Instytut Farmacji, Wydział Lekarski, Uniwersytet w Tartu, Nooruse str., 1, Tartu, Estonia, 50411

E-mail: ain.raal@ut.ee

Igor Kireyev, MD, Profesor, Dyrektor, Instytut Edukacyjno-Naukowy Farmacji Stosowanej, Narodowy Uniwersytet Farmaceutyczny, ul. Puszkinska, 53, Charków, Ukraina, 61002

Adres e-mail: ivkireev1026@gmail.com

Anna Zupanets, Studentka studiów podyplomowych, Katedra Farmakognozji, Narodowy Uniwersytet Farmaceutyczny, ul. Puszkinska 53, Charków, Ukraina, 61002

E-mail: azupanets@gmail.com

Vira Odyntsova, doktor nauk farmaceutycznych, profesor, Katedra farmakognozji, farmakologii i botaniki, Zaporoski Państwowy Uniwersytet Medyczny, ul. Majakowska 26, Zaporozże, Ukraina, 69035

E-mail: odyntsova1505@gmail.com