Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

**Яромій Мар'яна Вячеславівна**

УДК 615.32:615.014.2:615.454.1:616.5

# ДИСЕРТАЦІЯ

## Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином

226 – Фармація, промислова фармація
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ М. В. Яромій

Наукова керівниця Половко Наталя Петрівна, доктор фармацевтичних наук, професор

Харків – 2025

# АНОТАЦІЯ

*Яромій М. В.* Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2025.

Дисертація присвячена розробці складу і технології м'якого лікарського засобу противірусної дії з речовинами природного проходження – мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким.

*У першому розділі* дисертаційної роботи за результатами аналізу даних літературних джерел показана актуальність пошуку природних активних фармацевтичних інгредієнтів і створення на їх основі оригінальних вітчизняних препаратів, які поєднують різні механізми фармакологічної дії та можуть ефективно використовуватися у фармакотерапії герпетичної інфекції та низки інфекційних захворювань шкіри. Проаналізовано та узагальнено літературні дані щодо джерел і методів отримання мангіферину й показано, що для отримання і дослідження мангіферину використовують переважно рослини*: Mangifera indica і Anemarrhena asphodeloides***.** Для екстракції та очищення як екстрагент (розчинник) використовують петролейний ефір, бензол, гексан, хлороформ, етилацетат, етанол, метанол і воду очищену. Мангіферин отримують після екстрагування сировини методом мацерації, твердофазної мікроекстракції та гідродистиляції, а також таких сучасних методів як екстракція за допомогою ультразвуку, надкритична та докритична екстракція рідиною.

Бібліосемантичний аналіз наукових джерел літератури показав, що мангіферин є перспективним АФІ для створення дерматологічних засобів завдяки широкому спектру фармакологічних властивостей, якими він володіє, а саме антибактеріальними, противірусними, протизапальними, знеболювальними, імуномодулювальними і антиоксидантними. Показано, що

мангіферин, отриманий з листя *M. indica*, а також із кореневища *A. Asphodeloides,* виявляє противірусну активність до вірусу простого герпесу 1 типу, антибактеріальну проти *S. aureus*, а також протигрибкову дію відносно *C. albicans*, *A. niger* і *A. flavus*.

Проаналізовано літературні джерела і показано можливість використання в складі дерматологічних засобів *Lespedeza bicolor*. Встановлено, що екстракти рослин роду *Lespedeza* проявляють антиоксидантну, протизапальну, репаративну, естрогенну, антимікробну, протигрибкову, антитирозиназну активність і запобігають карієсу.

Досліджено асортимент протигерпетичних ЛЗ, представлених на фармацевтичному ринку України. Результати аналізу продемонстрували, що серед ЛЗ досліджуваної групи переважна більшість це монопрепарати, які містять синтетичні противірусні АФІ, більшість з яких випускається у формі мазей та кремів. На фармацевтичному ринку наявні лише 5 рослинних препаратів системної дії для лікування герпесвірусної інфекції та лише один препарат для місцевого застосування. Результати дослідження є підґрунтям для пошуку й розроблення нових ефективних противірусних фітозасобів вітчизняного виробництва для місцевого лікування герпесу та інших інфекційних захворювань шкіри.

*У другому розділі* дисертаційної роботи викладена загальна методологія досліджень, яка полягає у створенні науково-методичного підходу до розробки складу і технології оригінального лікарського засобу на основі АФІ рослинного походження антивірусної, антибактеріальної, антиоксидантної, протизапальної і репаративної дії, і базується на послідовному проведенні маркетингових, фізико-хімічних, фармакотехнологічних, біологічних (мікробіологічних та фармакологічних) досліджень, що були використані при виконанні експериментальної роботи. Наведено характеристику напівпродукту леспедези екстракту водного рідкого (ЛЕВР), мангіферину та допоміжних речовин, які використовували у розробці м’якого лікарського засобу. Обрано та описано методики досліджень.

*У третьому розділі* експериментально обґрунтовано умови отримання ЛЕВР – трьохступенева ремацерація з настоюванням впродовж 60 хв за температури 95±5 °С при яких забезпечується максимальне вилучення сполук поліфенольної природи, флавоноїдів і танінів та розроблено технологічну схему і технологічну інструкцію (ТІ) виробництва проміжного продукту – ЛЕВР.

Досліджено фізико-хімічні властивості ЛЕВР, які підтверджують якість, закладені у специфікацію на проміжний продукт: опис, ідентифікація (полісахариди (фруктоза), речовини поліфенольної і флавоноїдної природи (кофейна, хлорогенова кислоти, рутин, кверцетин), таніни (пірогалол)), важкі метали, сухий залишок (не менше 18 %), кількісне визначення (флавоноїди у перерахунку на рутин (не менше 0,5 мг/1,0), таніни у перерахунку на пірогалол (не менше 35 мг/1,0)). Складено специфікацію, яку включено в проєкт МКЯ і технологічну інструкцію на екстракт – проміжний продукт – ЛЕВР. Мікробіологічні дослідження, проведені на базі Інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України під керівництвом завідувачки лабораторії біохімії та біотехнології, к.. біол. н., ст. н. співроб., Тетяни Осолодченко, продемонстрували чутливість тест-штамів *S. aureus* ATCC6538-P та *S. aureus* ATCC 6538-P та клінічних ізолятів *S. aureus* 16 і *S. epidermidis 14.* до ЛЕВР. Результати дослідження протизапальної активності на моделі опікової рани, які проводили на базі ЦНДЛ НФаУ під керівництвом заступника директора з наукової роботи ННІПФ Тетяни Юдкевич, показали, що застосування ЛЕВР сприяє зменшенню ознак запалення порівняно з тваринами контрольної групи.

*У четвертому розділі* дисертаційної роботи за результатами дослідження органолептичних, фізико-хімічних, фармакотехнологічних, мікробіологічних досліджень, мікроскопічного аналізу, дослідження осмотичної активності основи й динаміки вивільнення мангіферину запропоновано склад гелю з мангіферином і ЛЕВР.

Мікробіологічними дослідженнями, проведеними на базі Інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України під

керівництвом к. біол. наук, завідувачки відділом репродукції вірусів Світлани Загородньої експериментально встановлено, що гель з 5 % мангіферину проявляє значну віруцидну дію відносно ВПГ-1, а зниження титру вірусу герпесу знаходилося в межах 1,7–2,2 $\log_{10.}$ Визначено, що у досліджуваних розведеннях дослідний зразок незначно впливає на репродукцію вірусу герпесу та його інфекційність, адже зниження титру вірусу не перевищувало 1,1 $\log_{10}$. Встановлено, що у досліджених розведеннях дослідний зразок ефективно пригнічує репродукцію вірусу та розвиток ЦПД ВПГ-1 на клітинах Vero, а із збільшенням розведення противірусна активність збільшується.

Фармакотехнологічними дослідженнями обґрунтовано використання гідрофільних розчинників ПЕО-400 і 96 % етанолу та поверхнево-активної речовини твін-80 (полісорбат-80), суміш яких сприяє легкому змочуванню мангіферину з розчинником і утворенню однорідних дисперсій з розміром часток менше 0,1 мкм, не схильних до агломерації. Показано, що введення до складу гелевої основи 20 % ПЕО-400, 10 % етанолу 96 % та 1 % твін-80 забезпечує її абсорбційну здатність та підвищує швидкість вивільнення мангіферину.

Встановлено, що введення для складу гелевої основи ПЕО-400 підвищує її осмотичну активність. Основи, що містять 20% ПОЕ-400 здатні впродовж 8 годин абсорбувати близько 40 % води. Обґрунтована можливість використання методу абсорбційної спектрофотометрії для кількісного визначення мангіферину при проведенні біофармацевтичних досліджень. Обрано акцепторне середовище і показано здатність мангіферину вивільнятися в фосфатний буферний розчин з pH 6. Біофармацевтичними дослідженнями з використанням методу діалізу через напівпроникну мембрану, встановлено, що введення до складу гелевої основи 96 % етанолу і ПЕО-400 підвищує вивільнення мангіферину на близько 20 % порівняно з основами, що містили лише один із зазначених спів-розчинників. Доведено, що додаткове введення до складу гелю твін-80 призводить до більш інтенсивного і повного вивільнення АФІ.

За результатами мікробіологічних досліджень визначена ефективність обраних антимікробних консервантів калію сорбату та натрію бензоату. Обґрунтовано використання консерванту – 0,3 % калію сорбату.

Розроблено технологічний процес виробництва гелю під умовною назвою «Манголеспедин» в умовах виробничих аптек та фармацевтичних підприємств, який складається зі стадій: підготовка сировини (відважування, відмірювання компонентів гелю); приготування гелевої основи; приготування дисперсії мангіферину; солюбілізація олії; отримання гелю; фасування та маркування гелю; упакування контейнерів у пачки; упакування пачок у коробки. Визначено критичні параметри технологічного процесу виробництва гелю. Розроблено ТІ, технологію препарату апробовано в умовах низки виробничих аптек.

*У п'ятому розділі* дисертаційної роботи продемонстровано результати опрацювання методик ідентифікації мангіферину і БАС ЛЕВР у складі гелю з використанням хімічних реакцій, методу тонкошарової хроматографії і рідинної хроматографії та запропоновано для ідентифікації мангіферину і БАС ЛЕВР у складі гелю використовувати метод ТШХ.

Підібрано умови і запропоновано метод рідинної хроматографії для кількісного визначення суми активних речовин препарату – мангіферину і БАС ЛЕВР (гідроксикоричних кислот в перерахунку на кофейну кислоту та флавоноїдів в перерахунку на рутин). Визначено норми вмісту зазначених БАС, мангіферину – 4,75–5,25 % (у 100 г гелю); гідроксикоричних кислот в перерахунку на кофейну кислоту не менше 8 мг (у 100 г гелю) та флавоноїдів в перерахунку на рутин не менше 2,5 мг (у 100 г гелю).

За результатами дослідження показників якості розробленого гелю в процесі зберігання, обрано термін зберігання препарату – 2 роки за температури, що не перевищує 25 °С, в захищеному від світла місці у полімерних контейнерах. Складено специфікацію до проєкту МКЯ на лікарський препарат «Манголеспедин».

Мікробіологічними дослідженнями встановлена наявність вираженої антимікробної дії гелю відносно тест-штамів *S. aureus* АТСС 25923, *S. aureus*

ATCC 6538-P і *C. albicans* ATCC 885-653 та клінічних ізолятів *S.aureus* 16 і *S. epidermidis* 14. Встановлено, що за рівнем активності дослідний гель перевищує активність референтного препарату по відношенню до дослідних тест-штамів та клінічних ізолятів більшості мікроорганізмів.

Розроблено та апробовано технологію ЛЕВР та гелю «Манголеспедин» у виробничих відділах аптек № 5 ПП «Гармонія-2000», м. Чернівці, аптеки № 8 «Леда», м. Харків і аптеки № 80, м Слов'янськ. Результати роботи упроваджено до освітнього і наукового процесу низки фармацевтичних кафедр закладів вищої освіти України.

*Ключові слова*: мангіферин, лікарська рослинна сировина, леспедеза двоколірна, екстракти, дерматологічні захворювання, герпесвірусна інфекція, м'які лікарські форми, гелі, гелеві основи, технологія.

*Список публікацій здобувача*

1. Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 3. С. 23-32 DOI: https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.3.13548 (*Особистий внесок – планування та проведення дослідження, оброблення та узагальнення отриманих даних, підготовка статті; Половко Н. П. – участь у формуванні цілей плануванні експерименту та фармуванні висновків; Бевз Н. Ю. – участь у проведенні фіто-хімічних досліджень, обговорення результатів досліджень* ).

2. Яромій М. В., Половко Н. П. Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації. *Аннали Мечниковського інституту*. 2023. № 1. С. 52–58. DOI:10.5281/zenodo.7721743 (*Особистий внесок здобувача – аналіз, узагальнення літературних джерел, формування висновків, написання статті; Половко Н.П. – участь у формуванні цілей роботи та висновків*).

3. Вивчення противірусної дії м'якої лікарської форми / С. Д. Загородня, М. В. Яромій, Л. О. Артюх, Н. П. Половко. *Вісник фармації*. 2024. №

2(106). С. 58–64 DOI: https://doi.org/10.24959/nphj.24.155 (*Особистий внесок здобувача – участь у проведенні досліджень, оброблення та узагальнення отриманих даних, підготовка статті; Загородня С. Д. – організація і проведення мікробіологічних досліджень, обговорення результатів досліджень; Артюх Л. О. – участь у проведенні мікробіологічних досліджень, статистична обробка результатів; Половко Н. П. – участь у формуванні цілей та висновків*).

4. Обґрунтування вибору екстрагента для отримання вилучень наземної частини леспедеці двоколірної / К. Є. Кисельова, Н. Ю. Бевз, О. О. Михайленко, М. В. Яромій, Л. І. Вишневська. *Вісник фармації.* 2024. № 1 (105). С. 58–65. https://doi.org/10.24959/nphj.24.126 (*Особистий внесок здобувача – участь в аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експерименту та обговоренні результатів дослідження; Кисельова К.Є. – аналіз літературних джерел, планування та проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, формування висновків, підготовка статті до друку; Бевз Н. Ю. – участь у плануванні, проведенні та обговоренні результатів фізико-хімічних досліджень; Михайленко О. О. – участь у плануванні, проведенні та обговоренні результатів фіто-хімічних досліджень; Вишневська Л. І. – участь у формуванні цілей, плануванні експерименту та обговоренні результатів*).

5. Development of the composition of aqueous extract of Lespedeza bicolor and gel with extract and mangiferin / M. Yaromiy, N. Bevz, O. Mykhailenko, V. Kovalov, N. Polovko, Y. Marchenko. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2025. № 1 (53). P. 4–13. https://doi.org/10.15587/2519-4852.2025.322720 (Scopus) (*Особистий внесок здобувача – участь в аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експерименту, обговоренні результатів дослідження та підготовка статті; Бевз Н. Ю. – участь у плануванні, проведенні та обговоренні результатів фізико-хімічних досліджень; Михайленко О. О. – участь у обговоренні результатів фіто-хімічних досліджень; Ковальов В. – участь у проведенні та обговоренні результатів мікроскопічних досліджень*

*Марченко Я.С. – участь у проведенні та обговоренні результатів фармакотехнологічних досліджень; Половко Н.П. – участь у формуванні цілей та висновків досліджень*).

6. А.с. 123958 Україна. Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації / М. В. Яромій, Н. П. Половко № 123958; опубл. 19.02.2024. (*Особистий внесок здобувача – аналіз, узагальнення літературних джерел, формування висновків, участь у написанні наукового твору та оформлення авторського права на твір; Половко Н.П. – участь у формуванні цілей та висновків до твору та участь у оформленні авторського права на твір*).

7. Яромій М. В., Половко Н. П. Перспективи створення м'якого лікарського засобу з мангіферином для терапії герпесу. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали II Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 13 жовт. 2022 р.). Харків : НФаУ, 2022. С. 208.

8. Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар.участю (м. Тернопіль, 22–23 вересня 2022 р.). Тернопіль: ТНМУ, 2022. С. 77.

9. Яромій М. В., Половко Н. П. Використання мангіферину у фармації та медицині. *Сучасні досягнення фармацевтичної справи* : зб. наук. пр. Харків : НФаУ, 2022. Вип. 1. С. 253..

10. Яромій М. В., Бевз Н. Ю. Ідентифікація мангіферину в антигерпетичному гелі. *Youth Pharmacy Science* : матеріали III Всеукр.наук.-практ. конф. з міжнар. участю. (м. Харків, 7–8 груд. 2022 р.). Харків : НФаУ, 2022. С. 78.

11. Підбір методик ідентифікації та кількісного визначення мангіферину / М. В. Яромій, Ранія Хізрі, Н.П. Половко, Н.Ю. Бевз. *Modern*

*chemistry of medicines* : матеріали Міжнар. Internet-конф. (м. Харків, 18 трав. 2023 р.). Харків : НФаУ, 2023. С. 261.

12. Кисельова К. Є., Яромій М. В. Використання леспедези в народній і традиційній медицині. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція* : матеріали VI наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю (м. Харків, 16 листопада 2023 р.). Харків: НФаУ, 2023. С. 232.

13. Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обґрунтування складу гелю з мангіферином і леспедезою біколірною. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології*: матеріали III Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 24 листопада 2023 р.). Х.: НФаУ, 2023. С. 499

14. Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедези двоколірної *Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології* : зб. публікацій I Міжнар. наук.–практ. online конф., присвяч. 85-річчю з дня заснування каф. Біохімії (м. Харків, 7 берез. 2024 р.). Харків : НФаУ, 2024. С. 332–338.

15. Яромій М., Половко Н. Дослідження реологічних властивостей гелю з мангіферином і водним екстрактом леспедеці. *Науково-технічний прогрес і оптимізація економіки технологічних процесів створення лікарських препаратів*:матеріали X наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої пам’яті зав.каф. управління та фармації з технологією ліків, д-ра фарм.наук, проф. Т.А. Грошового (17 – 18 жовтня 2024 р.). Тернопіль : ТНМУ,2024. С. 203.

16. Яромій М. В., Ковальов В.В., Половко Н.П. Обґрунтування вибору гідрофільного неводного розчинника до складу гелю з мангіферином. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 25 жовтня 2024 р.). Харків : НФаУ, 2024. С. 348–351.

17. Яромій М.В., Юдкевич Т. К., Половко Н.П. Дослідження протизапальної активності водного екстракту леспедези двоколірної. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали XI Міжнар. наук.-практ.

конф. (м. Харків, 27 листопада 2024 р.). Харків : Вид-во НФаУ, 2024. С. 158–159.

## ANNOTATION

*Yaromiy M. V.* Development of the Composition and Technology of a Semi-Solid Dosage Form with Mangiferin. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for obtaining the Doctor of Philosophy degree in specialty 226 «Pharmacy, Industrial Pharmacy» (22 – Health Care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2025.

The dissertation focuses on the development of the composition and technology of an antiviral semi-solid dosage form with substances of natural origin – Mangiferin and Lespedeza Extract Water Liquid.

*The first chapter* of the dissertation, based on the results of literature data analysis, shows the relevance of the search for natural active pharmaceutical ingredients and the creation of original domestic medicines based on them. These medicines combine different mechanisms of pharmacological action and can be effectively used in the pharmacotherapy of herpes infection and a number of infectious skin diseases. The term paper analyzes and summarizes the literature data on the sources and methods of extracting mangiferin, indicating that plants such as *Mangifera indica* and *Anemarrhena asphodeloides* are the primary sources for obtaining and studying mangiferin. Petroleum ether, benzene, hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol and purified water as extractants (solvents) are used for extraction and purification. Mangiferin is obtained after extraction of raw materials by maceration, solid-phase microextraction and hydro-distillation, as well as such modern methods as ultrasonic extraction, supercritical and subcritical fluid extraction. A bibliographic analysis of scientific literature confirms that mangiferin is a promising active pharmaceutical ingredient (API) for the development of dermatological products due to its wide range of pharmacological properties, including antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, analgesic, immunomodulatory,

and antioxidant activities. Mangiferin extracted from the leaves of *M. indica* and the rhizome of *A. asphodeloides* has demonstrated antiviral activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1), antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, and antifungal activity against *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus flavus*.

The possibility of using *Lespedeza bicolor* in dermatological products is analyzed and confirmed. It has been established that extracts from plants of the *Lespedeza* genus exhibit antioxidant, anti-inflammatory, reparative, estrogenic, antimicrobial, antifungal, and antityrosinase activities and prevent dental caries.

The range of antiherpetic dosage forms (DFs) available on the Ukrainian pharmaceutical market was studied. The analysis results demonstrated that the vast majority of the DFs in the study group are monocomponent products containing synthetic antiviral APIs, most of which are produced in the form of ointments and creams. There are only five plant-based systemic medicines and only one topical medicine available on the pharmaceutical market for the treatment of herpesvirus infections. The research findings provide a basis for the search and development of new, effective antiviral phytomedicines of domestic production for the local treatment of herpes and other infectious skin diseases.

*The second chapter* outlines the general research methodology, which involves creating a scientific and methodological approach to developing the composition and technology of an original medicinal product. This product, based on plant-derived APIs, exhibits antiviral, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, and reparative effects. The methodology involves conducting marketing, physicochemical, pharmacotechnological, and biological (microbiological and pharmacological) studies used in the implementation of the experimental work. The characteristics of the intermediate product – Lespedeza extract water liquid (LEWL), mangiferin, and excipients used in the development of a soft dosage form – are provided, along with descriptions of the selected research methods.

*In the third chapter*, the conditions for extracting LEWL are experimentally justified. A three-stage remaceration with a 60-minute infusion at a temperature of 95

± 5 °C ensures maximum extraction of polyphenolic compounds, flavonoids, and tannins. A technological scheme and technological instructions (TI) for the production of the intermediate product (LEWL) are developed.

The physicochemical properties of LEWL confirming the quality of the extract are investigated and included in the product specification: description, identification of polysaccharides (fructose), polyphenolic and flavonoid substances (caffeic acid, chlorogenic acid, rutin, quercetin), tannins (pyrogallol), heavy metals, dry residue (at least 18%), and quantification of flavonoids (in terms of rutin (at least 0.5 mg/1.0)) and tannins (in terms of pyrogallol (at least 35 mg/1.0)). A specification included in the QCM draft and technological instruction for the extract - intermediate product - LEWL are composed.

Microbiological studies conducted at the Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine under the supervision of the Head of the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, PhD in Biology, Senior Researcher, Tatyana Osolodchenko, demonstrated the sensitivity of test strains *S. aureus* ATCC6538-P and *S. aureus* ATCC 6538-P and clinical isolates *S. aureus* 16 and *S. epidermidis* 14 to LEWL. The study results of the anti-inflammatory activity on a burn wound model, conducted at the Central Research Laboratory of the National University of Pharmacy, under the supervision of Tatiana Yudkevych, Deputy Director for Scientific Work of Educational and Scientific Institute of Applied Pharmacy, showed that the use of LEWL reduces signs of inflammation compared to animals in the control group.

*The fourth chapter*, based on the results of organoleptic, physicochemical, pharmaceutical technology, microbiological studies, microscopic analysis, osmotic base activity studies, and mangiferin release dynamics, proposes the composition of a gel containing mangiferin and LEWL.

Microbiological studies conducted at the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, under the supervision of PhD in Biology Svitlana Zagorodnaya, Head of the Department of Virus Reproduction, confirmed that a gel containing 5% mangiferin exhibits a significant

virucidal effect against HSV-1, and the reduction in herpes virus titer was in the range of 1.7 to 2.2 log10. In the studied dilutions, the prototype does not significantly affect the reproduction of herpes virus and its infectivity, since the reduction in herpes virus titer did not exceed 1.1 log10. Additionally, the prototype effectively inhibits virus reproduction and the development of HSV-1 cytopathic effect (CPE) on Vero cells, and with increasing dilution, the antiviral activity increases.

Pharmacotechnological studies substantiated the use of hydrophilic solvents (PEO-400 and 96 % ethanol) and the surfactant Tween-80. Their mixture facilitates easy wetting of mangiferin with the solvent and the formation of homogeneous dispersions with a particle size of less than 0.1 μm, not prone to agglomeration. The introduction of 20 % PEO-400, 10 % ethanol 96 % and 1 % tween-80 into the gel base provides its absorption capacity and increases the rate of mangiferin release. It was found that the introduction of PEO-400 into the gel base composition increases its osmotic activity. Bases containing 20 % PEO-400 are able to absorb approximately 40 % of water within 8 hours. The possibility of using the method of absorption spectrophotometry for the quantitative determination of mangiferin during biopharmaceutical studies has been substantiated. The acceptor medium was chosen and the ability of mangiferin to be released into a phosphate buffer solution with pH 6 was shown. Biopharmaceutical studies using the method of dialysis method through a semipermeable membrane have shown that the introduction of 96% ethanol and PEO-400 into the gel base increases the release of mangiferin by approximately 20% compared to the bases containing only one of these co-solvents. It has been proven that the additional introduction of ween-80 to the gel composition leads to a more intensive and complete release of the API. According to the results of microbiological studies, the effectiveness of the selected antimicrobial preservatives – potassium sorbate and sodium benzoate – was determined. The use of 0.3 % potassium sorbate was substantiated.

A technological process for producing the gel, provisionally named «Mangolespedin», was developed in the conditions of manufacturing pharmacies and pharmaceutical enterprises. This process consists of the following stages: preparation

of raw materials (weighing, measuring the components of the gel); preparation of the gel base; preparation of mangiferin dispersion; solubilisation of vegetable oil; obtaining the gel; packaging and labelling of the gel; packing containers into packs; packing packs into boxes. The critical parameters of the technological gel production process were determined. TI was developed, and the technology of the preparation was tested in the conditions of a number of manufacturing pharmacies.

*The fifth chapter* of the dissertation describes the development of methods for identifying mangiferin and bioactive compounds (BAC) of LEWL in the gel using chemical reactions, thin-layer chromatography (TLC), and liquid chromatography, and proposes to use the TLC method for identifying mangiferin and BAC of LEWL in the gel.

The conditions were selected, and a liquid chromatography method for quantifying mangiferin and BAC of LEWL (hydroxycinnamic acids in terms of caffeic acid and flavonoids in terms of rutin) – was proposed. The content norms of these BAC and mangiferin were determined: 4.75–5.25 % (per 100 g of gel); hydroxycinnamic acids in terms of caffeic acid not less than 8 mg (per 100 g of gel) and flavonoids in terms of rutin not less than 2.5 mg (per 100 g of gel).

According to the reseach results of the quality indicators of the developed gel during storage, the shelf life of the medical product was chosen – 2 years at a temperature not exceeding 25 °C, in a place protected from light in polymer containers. A specification for the QCM draft for the medicinal product «Mangolespedin» was compiled.

Microbiological studies established the presence of a pronounced antimicrobial effect of the gel against test strains of *S. aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 6538-P, and *C. albicans* ATCC 885-653 and clinical isolates of *S.aureus* 16 and *S. epidermidis*14. By level of activity, the experimental gel exceeds the activity of the reference product against the experimental test strains and clinical isolates of most microorganisms.

The technology for producing LEWL and the «Mangolespedin» gel was developed and tested in the pharmacy production departments No. 5 «Harmoniya-

2000», Chernivtsi, No. 8 «Leda», Kharkiv and No. 80, Sloviansk. The results of the research have been integrated into the educational and scientific process of a number of pharmaceutical departments of higher education institutions in Ukraine.

*Keywords:* mangiferin, medicinal plant-based raw material, Lespedeza bicolor, extracts, dermatological diseases, herpesvirus infection, soft dosage forms, gels, gel bases, technology.

**ЗМІСТ**

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 20
ВСТУП 21
РОЗДІЛ 1 ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ФІТОПРЕПАРАТУ З МАНГІФЕРНОМ ДЛЯ ЗОВНІШНЬОЇ ФАРМАКОТЕРАПІЇ ГЕРПЕСВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ. (Огляд літератури)..... 28
1.1 Теоретичне обґрунтування використання мангіферину в складі дерматологічного засобу……. 30
1.1.1 Будова, джерела отримання та властивості мангіферину 30
1.1.2 Методи отримання та ідентифікації мангіферину…… 33
1.1.3 Фармакологічні властивості та застосування мангіферину 37
1.2 Теоретичне обґрунтування використання екстракту леспедези двоколірної в складі дерматологічного засобу……. 45
1.2.1 Розповсюдженість та хімічний склад рослин роду *Lespedeza*…….. 45
1.2.2 Фармакологічні властивості та застосування вилучень леспедези в офіцинальній та народній медицині…… 46
1.3. Дослідження ринку протигерпетичних засобів місцевої дії 49
Висновки до розділу 1…….. 56
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДОЛОГІЇ ДОСЛІДЖЕННЯ. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ……... 59
2.1 Обґрунтування загальної методології досліджень…… 59
2.2 Об’єкти дослідження…… 61
2.2.1 Характеристика діючих речовин, лікарської рослинної сировини, проміжних продуктів (рідкого екстракту), експериментальних зразків гелю…… 61
2.2.2 Характеристика допоміжних речовин…….. 63
2.3 Методи досліджень…… 66
2.3.1 Фізичні, фізико-хімічні та фармакотехнологічні методи

дослідження…… 66
2.3.2 Методи ідентифікації та кількісного визначення біологічно активних речовин…… 71
2.3.3 Біологічні методи досліджень……... 88
2.3.4. Статистичний аналіз…… 95
Висновки до розділу 2……... 95
РОЗДІЛ 3 ОБҐРУНТУВАННЯ УМОВ ОТРИМАННЯ І ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСТРАКТУ ЛЕСПЕДЕЗИ ДВОКОЛІРНОЇ ВОДНОГО……. 97
3.1 Обґрунтування технології леспедези екстракту водного рідкого…… 97
3.1.1 Дослідження умов отримання леспедези екстракту водного рідкого……. 97
3.1.2 Обґрунтування технології леспедези екстракту водного рідкого…… 100
3.2 Розробка методик контролю якості та стандартизація леспедези екстракту водного рідкого……. 103
3.3 Обговорення результатів дослідження біологічних властивостей леспедези екстракту водного рідкого……. 110
3.3.1 Обговорення результатів дослідження антимікробної активності леспедези екстракту водного рідкого…… 111
3.3.2 Обговорення результатів дослідження протизапальної дії леспедези екстракту водного рідкого…….. 113
Висновки до розділу 3……... 116
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ДЕРМАТОЛОГІЧНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ У ФОРМІ ГЕЛЮ…… 118
4.1 Обґрунтування введення до складу м’якої лікарської форми мангіферину…… 118
4.2 Розробка складу і технології гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким…….. 123

4.2.1 Розробка складу гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким…… 123
4.2.2 Викладення технологічного процесу виробництва гелю з мангіферином і ЛЕВР……. 139
4.2.2.1 Опис технологічного процесу виготовлення гелю «Манголеспедин» в умовах виробничих аптек……. 139
4.2.2.2 Опис технологічного процесу промислового виробництва гелю «Манголеспедин»…….. 142
Висновки до розділу 4…….. 146
РОЗДІЛ 5 ДОСЛІДЖЕННЯ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ ГЕЛЮ……. 149
5.1 Розробка методики ідентифікації, кількісного визначення біологічно активних сполук та стандартизація гелю…… 149
5.1.1 Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення біологічно активних сполук в гелі……. 149
5.1.2 Дослідження показників якості в процесі зберігання та стандартизація гелю……. 158
5.2 Дослідження антимікробної активності гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким……. 164
Висновки до розділу 5…….. 166
ВИСНОВКИ…….. 169
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……. 172
ДОДАТКИ…….. 194

# ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТХ – анатомо-терапевтична хімічна класифікація

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

БАС – біологічно активна сполука

ВПГ – вірус простого герпесу

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ГІ – герпетична інфекція

ГНР – гідрофільний неводний розчинник

ГРО – гідрогенізована рицинова олія

ДР – допоміжні речовини

ДФУ – Державна фармакопея України

ЕЛ – екстракти леспедези

ЛЕВР – леспедези екстракт водний рідкий

ЛЗ – лікарський засіб

ЛРС – лікарська рослинна сировина

ЛФ – лікарська форма;

МГ – мангіферин

МКЯ – методика контролю якості

ПАР – поверхнево-активна речовина

ПЕО – поліетиленоксид

СРМ – стандартна робоча методика

ТІ – технологічна інструкція

ТН – торгівельне найменування

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ЦПД – цитопатична дія

ТАМС – загальна кількість аеробних мікроорганізмів

ТҮМС – загальна кількість аеробних мікроорганізмів

$ТЦД_{50}$ – доза, що інфікує 50% культур клітин

# ВСТУП

**Обґрунтування теми дослідження.** Актуальність пошуку нових ефективних засобів фармакотерапії герпетичної інфекції пов'язана з розповсюдженістю в світі, здатністю вірусу уражати практично всі органи і системи організму людини і спричиняти різні форми інфекції – гостру, латентну і хронічну рецидивуючу. На сьогодні не існує засобів і методів лікування, які дозволяють елімінувати вірус простого герпесу з організму людини, а лікування герпетичної інфекції складне і недостатньо ефективне. Сучасні методи лікування спрямовані на перешкоджання розвитку вірусу або відновленню тих порушень, які викликає активація вірусу герпесу в організмі. Виділяють два основні напрямки терапії герпесу – застосування етіопатогенетичної противірусної терапії та комплексний метод, який включає специфічну та неспецифічну імунотерапію в поєднанні з противірусною терапією.

Одним з перспективних напрямів є пошук природних АФІ і створення на їх основі оригінальних вітчизняних препаратів, які поєднують різні механізми противірусного захисту, з додатковими фармакологічними ефектами.

З огляду на це перспективною сировиною є мангіферин, який володіє численними фармакологічними ефектами і насамперед такими, як протизапальний, імуномодулювальний, знеболювальний, антиоксидантний і антибактеріальний. Експериментально підтверджено, що мангіферин виявляє антибактеріальну дію проти *S. aureus*, а також протигрибкову (*C. albicans*, *A. niger* і *A. flavus*) дію. Підтверджена противірусна активність мангіферину, отриманого з листя *Mangifera indica*, а також із кореневища *Anemarrhena asphodeloides* до вірусу простого герпесу 1 типу. Мангіферин за низької розчинності, проникності і біодоступності, має здатність проникати через роговий шар і переходити в епідермісу і дерми, що підтверджує перспективи його використання в дерматологічних лікарських засобах.

Для розширення спектру фармакологічної дії перспективним є використання леспедези двоколірної (*Lespedeza bicolor* Turch, Leguminosae).

Витяжки леспедези володіють антиоксидантною, репаративною, протизапальною і антимікробною активністю. З огляду на вищесказане, перспективним є розробка м'якої лікарської форми з мангіферином та екстрактом леспедези двоколірної для нашкірного застосування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт НФаУ «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини» (№ державної реєстрації НДР 0114U000945) і «Розробка і удосконалення складу та технології екстемпоральних лікарських засобів» (№ державної реєстрації НДР: 0114U000947) і проблемної комісії «Фармація» МОЗ і НАМН України.

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – обґрунтування складу, технології та дослідження м'якого лікарського засобу у формі гелю противірусної дії із мангіферином та леспедези екстрактом водним рідким.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати такі завдання:

- провести огляд, аналіз і узагальнення літературних джерел щодо джерел отримання і методів отримання, ідентифікації, фармакологічних властивостей та використання в медицині мангіферину;
- проаналізувати літературні джерела щодо фармакологічних властивостей рослин роду *Lespedeza M.* та їх вилучень, а також їх використання у фармацевтичній практиці;
- провести аналіз фармацевтичного ринку лікарських препаратів для зовнішньої терапії герпесвірусної інфекції;
- обґрунтувати та розробити технологію отримання леспедези екстракту водного та методик його стандартизації;
- теоретично та експериментально обґрунтувати склад і технологію м'якого лікарського засобу у формі гелю з мангіферином та ЛЕВР;
- провести фізико–хімічні, фармакотехнологічні, мікробіологічні дослідження гелю з мангіферином та ЛЕВР;

- розробити методики ідентифікації та кількісного визначення БАС в складі розробленого засобу, розробити проєкти МКЯ, встановити умови зберігання і термін придатності ЛЗ;
- здійснити апробацію опрацьованої технології отримання проміжного продукту ЛЕВР і гелю на підставі розроблених нормативних документів: технологічних інструкцій, проєктів технологічних регламентів та МКЯ;
- проаналізувати та узагальнити результати біологічних досліджень ЛЕВР і розробленого гелю з мангіферином та ЛЕВР.

*Об'єкт дослідження* – технологія водного екстракту леспедези двоколірної, фармацевтична розробка м'якого лікарського засобу противірусної дії у формі гелю з мангіферином та ЛЕВР.

*Предмет дослідження* – теоретичне та експериментальне обґрунтування складу і технології, методик контролю якості ЛЕВР та гелю з мангіферином і ЛЕВР; дослідження фізико-хімічних, фармако-технологічних (структурно-механічних, мікроскопічних, осмотичних) і біологічних властивостей; розроблення проєктів нормативних документів на ЛЕВР і лікарський препарат.

*Методи дослідження.* Для вирішення поставлених завдань були використані загальноприйняті методи дослідження: загальнонаукові (аналітичний, логічний методи, метод порівняння та системного аналізу, узагальнення даних (матеріали наукових баз даних (Scopus, PubMed, Web of Science, Google Scholar); методи маркетингового аналізу, загальноприйняті методи дослідження при розробці ЛЗ: органолептичні (зовнішній вигляд, колір, запах, однорідність тощо), фізичні і фізико-хімічні (потенціометричне визначення pH експериментальних зразків, ТШХ, спектрофотометрія, рідинна хроматографія), реологічні (структурна в'язкість, напруга і швидкість зсуву, тиксотропні властивості), біофармацевтичні (вивільнення діючих речовин in vitro), фармакотехнологічні методи дослідження показників якості розробленого засобу (опис, ідентифікація, однорідність, маса вмісту контейнера тощо); мікробіологічні (противірусна активність, антимікробна активність,

ефективність дії консервантів, мікробіологічна чистота ЛЗ); фармакологічні (визначення фармакологічної активності); статистичні методи оброблення результатів (програми Statistica (StatSoft, USA) та Excel (Microsoft, USA)).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше на підставі результатів фармакотехнологічних, фізичних, фізико-хімічних, реологічних, біофармацевтичних, мікробіологічних та фармакологічних досліджень науково обґрунтовано склад і раціональну технологію отримання водного екстракту леспедези двоколірної та оригінального препарату у формі гелю з мангіферином і ЛЕВР. Уперше з використанням сучасних методів досліджено фізико-хімічні, фармакотехнологічні, біофармацевтичні, мікробіологічні і фармакологічні властивості ЛЕРВ та гелю з мангіферином і ЛЕВР; запропоновано методики стандартизації, в т.ч. кількісного визначення БАС проміжного продукту та ЛЗ.

За результатами проведених досліджень отримано свідоцтво про авторське право на твір № 123958 «Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації» (опубл. 19.02.2024 р.) та отримано позитивне рішення про реєстрацію патенту України на корисну модель «Спосіб одержання засобу для лікування герпетичних уражень шкіри і слизових оболонок у формі гелю» (заявка u 2024 02039 від 18.04.2024).

**Практичне значення отриманих результатів.** На підставі проведених досліджень розроблено та запропоновано для практичної фармації фітосубстанцію – ЛЕВР; розроблено оригінальний лікарський засіб у формі гелю під умовною назвою «Манголеспедин» з мангіферином і ЛЕВР з підтвердженою противірусною, антимікробною і протизапальною дією. Розроблено проєкти МКЯ, технологічних регламентів і ТІ на виробництво проміжного продукту ЛЕВР і гелю «Манголеспедин» (додаток В), які апробовано в умовах виробничих аптек (додаток Г).

Окремі фрагменти роботи упроваджені в освітній і науковий процес: кафедр аптечної технології ліків, промислової технології ліків та косметичних засобів НФаУ (м. Харків); кафедри технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри

аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (м. Київ), кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського (додаток Д).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною завершеною науковою роботою. Дисертантом особисто проведено огляд, аналіз і узагальнення літературних джерел щодо тематики дослідження, обґрунтовано вибір АФІ та здійснено вибір ЛФ, проведено дослідження фармацевтичного ринку місцевих антигерпетичних засобів, проаналізовано асортимент та властивості потенційних допоміжних речовин, складено алгоритм виконання експериментальних досліджень. Здобувачкою особисто проведено експериментальні дослідження з обґрунтування умов отримання ЛЕВР, досліджено фізико-хімічні, фармакотехнологічні властивості екстракту і показники якості екстракту в процесі зберігання. Проведено фізико-хімічні, фармакотехнологічні та біотехнологічні дослідження з обґрунтування складу гелю з мангіферином і ЛЕВР, опрацьовано технологію виготовлення гелю в лабораторних умовах, досліджено вплив технологічних параметрів на основні показники якості досліджуваного гелю. Проведено статистичне оброблення, проаналізовано та узагальнено отримані результати.

Проведення біофармацевтичних досліджень аспірантом здійснено на базі кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету під керівництвом к. фарм. н., доцента Бевз Н. Ю. Надземну частину леспедези двоколірної заготовляли в Ботанічному саду ЛНУ ім. Івана Франка (Львів, Україна), зразки ідентифіковані ст.н.сп. М. І. Скібіцькою. Противірусну активність досліджували на базі Інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України під керівництвом к. біол. наук, завідувачки відділом репродукції вірусів С. Д. Загородньої. Антимікробну і протигрибкову активність досліджували та базі ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України» під керівництвом канд. біол. наук, ст. наук. співроб., завідувачки лабораторії біохімії та біотехнології Т. П. Осолодченко.

Дослідження фармакологічної активності ЛЕВР і гелю з мангіферином і ЛЕВР виконано на базі Навчально-наукового інституту прикладної фармації (ННІПФ) НФаУ під керівництвом заст. директора з наукової роботи Т. К. Юдкевич.

У всіх наукових працях, що були опубліковані у фахових наукових виданнях у співавторстві з Половко Н. П., Бевз Н. Ю., Осолодченко Т. П., Юдкевич Т. К., Загородною С. Д., Артюх Л. О., Михайленко О. О., Вишневською Л. І., Марченко Я. С., Ковальовим В. В., Кисельовою К. Є. дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки, рекомендації, які викладені у дисертації, виконані автором особисто.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основний зміст дисертаційної роботи викладено та обговорено на конференціях різного рівня: II Міжнародній науково-практичній конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, 2022 р.); IX науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м. Тернопіль, 2022 р.), III Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Youth Pharmacy Science» (м. Харків, 2022 р.,); Міжнародній Internet-конференції «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, 2023 р.,); VI науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (м. Харків, 2023 р.); III Міжнародній науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, 2023); I Міжнародній науково-практичій online конференції, присвяченій 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії «Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології» (м. Харків, 2024 р.); IV Міжнародній науково-практичній конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, 2024); X науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій пам’яті завідувача кафедри управління та фармації з технологією ліків, доктора фармацевтичних

наук, професора Т. А. Грошового «Науково-технічний прогрес і оптимізація економіки технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м. Тернопіль, 2024 р.); XI Міжнародній науково-практичній конференції, «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (м. Харків, 2024 р.).

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 218 сторінках машинописного тексту, складається із анотації, вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 168 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 38 таблицями та 42 рисунками. Список використаних джерел містить 195 найменувань, з них 46 кирилицею та 149 латиницею.

# РОЗДІЛ 1
# ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ФІТОПРЕПАРАТУ ДЛЯ ЗОВНІШНЬОЇ ФАРМАКОТЕРАПІЇ ГЕРПЕСВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ
## (Огляд літератури)

Інфікування вірусом простого герпесу (ВПГ), відомого як герпес, поширена у всьому світі. Наразі відомо 8 різновидів герпесвірусної інфекції. Найпоширенішими є віруси простого герпесу 1 та 2 типів (ВПГ-1 та ВПГ-2), які викликають герпетичне ураження шкіри й слизової оболонки ротової порожнини та статевих органів (літ). ВПГ-1, зазвичай, передається оральним шляхом і викликає інфекцію в порожнині рота або навколо нього (оральний герпес), але він також може спричинити генітальний герпес. ВПГ-2 передається переважно статевим шляхом і викликає генітальний герпес. В асоціації з іншими збудниками (папіломавірусами, хламідіями тощо) ВПГ-2 бере участь у розвитку неопластичних процесів в організмі людини, зокрема, раку шийки матки й раку передміхурової залози, індукує процеси атеросклерозу та може чинити фатальний вплив на перебіг вагітності, розвиток плода й новонародженої дитини [1].

Герпесвіруси здатні вражати всі органи й системи: шкіру, слизові оболонки, лімфатичні вузли, органи зору, легені, печінку, нервову систему. Як оральний, так і генітальний герпес здебільшого протікає безсимптомно або нерозпізнано, але може спричиняти хворобливі пухирі або виразки на місці інфікування, від легких до важких. Інфекція триває все життя, і симптоми можуть повторюватися протягом багатьох років [2].

За офіційними даними звіту Всесвітньої організації охорони здоров’я від 18 лютого 2022 року, 3,7 мільярда людей у віці до 50 років (67 %) мають ВПГ-1 у всьому світі, 491 мільйон людей у віці 15−49 років (13 %) у всьому світі мають ВПГ-2. 313 мільйонів жінок і 178 мільйонів чоловіків інфіковані ВПГ-2, оскільки передача вірусу герпесу статевим шляхом від чоловіка до жінки більш ефективна, ніж від жінки до чоловіка [3].

Особливостями герпесвірусної інфекції є пожиттєва персистенція вірусу після первинного інфікування, можлива реактивація в організмі на тлі імунної недостатності, із цим клінічні прояви безпосередньо пов’язані зі станом імунної системи організму людини [1].

У людей з ослабленим імунітетом, у тому числі з прогресуючою ВІЛ-інфекцією, герпес може мати більш серйозні симптоми та частіші рецидиви. Рідкісні ускладнення ВПГ-2 включають менінгоенцефаліт (інфекцію головного мозку) і дисеміновану інфекцію. Рідко інфекція ВПГ-1 може призвести до більш серйозних ускладнень, таких як енцефаліт (інфекція мозку) або кератит (інфекція очей) [2].

У зв’язку зі зростанням випадків вірусних інфекцій і особливо резистентних вірусних штамів наявні терапевтичні методи потребують вдосконалення, насамперед створенням нових противірусних засобів для боротьби з вірусними інфекціями.

З цієї точки зору багато природних продуктів і насамперед рослинних екстрактів, які широко використовуються як в традиційній, так і нетрадиційній медицині, мають високий терапевтичний потенціал. Наприклад, екстракти меліси, бразильського прополісу, олії меліси, м’яти, розмарину, кверцетин та мангіферин (МГ) продемонстрували інгібіторну активність проти ВПГ-1 [1]

Інтерес до природних фармакологічно активних сполук значно зріс в останні роки [4]. Експериментальні дослідження показали, що витяжки з ЛРС мають протизапальні, антипроліферативні, антимікробні, противірусні, антиангіогенні, антиоксидантні, протиракові властивості та сприяють відновленню тканин [5−7]. Крім того, не було встановлено жодних значних побічних ефектів з їх використанням [8−12].

Фітопрепарати володіють противірусною активністю та комплексною дією, включаючи місцеву протизапальну, знеболювальну, антибактеріальну, антимікробну дію, мають антиоксидантні, протизапальні, мембраностабілізуючі, аналгезуючі, антиалергічні та десенсибілізувальні властивості, що дозволяє ефективно використовувати їх при вірусних

інфекціях, які можуть ускладнюватися бактеріальною інфекцією і супроводжуються запаленням та болем.

Для визначення можливості використання в складі МЛЗ мангіферину нами було проаналізовано літературні джерела щодо його фармакологічної дії [13-15]. Аналіз показав, що мангіферин ефективний при аутоімунних запальних захворюваннях, таких як ревматоїдний артрит, дерматит і псоріаз [16, 17], а також володіє противірусною активністю [18, 19]. Слід зазначити, що мангіферин володіє широким спектром біологічних властивостей, зокрема антиоксидантними, противірусними, протираковими, протидіабетичними, імуномодулюючими, гепатопротекторними властивостями [22].

## 1.1 Теоретичне обґрунтування використання мангіферину в складі дерматологічного засобу

### 1.1.1 Будова, джерела отримання та властивості мангіферину

Мангіферин є природним ксантоновим глікозидом, виділеним з різних рослин, таких як Gentianaceae, Zingiberaceae і Mangiferaceae [4]. (рис.1.1).

Мангіферин зазвичай супроводжується ізомерним ізомангіферином (4-C-D-глюкопіранозил-1,3,6,7-тетрагідроксиксантон), метокси-похідна гомомангіферину (2-C-β-D-глюкопіранозил-1,6,7-тетрагідрокси-3-метокси-ксан-тон) і O-глікозильоване похідна неомангіферину (мангіферин-7-O-β -D-глюкопіранозид) [21].

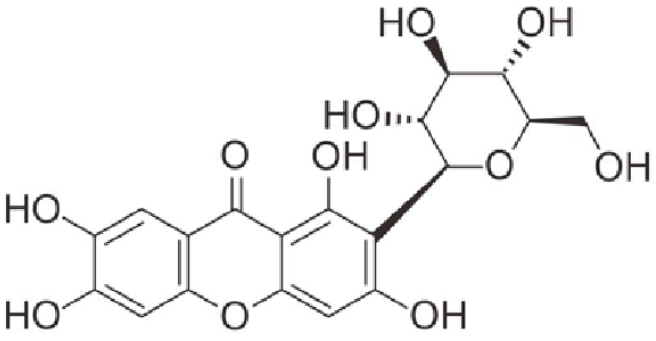
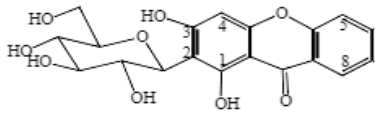
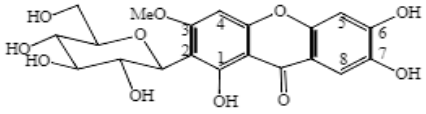



Рис. 1. 1 Хімічна структура мангіферину [4]

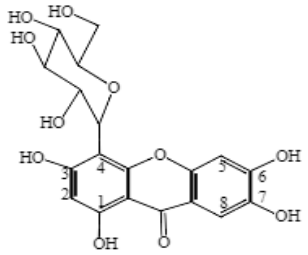
Ізомангіферин і гомомангіферин, які становлять 10 % від загальної кількості фенолів, також присутні в різних частинах дерева манго, таких як листя, шкірка манго та гілки [4] (рис.1.2).



а. Мангіферин



б. Гомомангіферин



в. Ізомагніферин

Рис. 1.2 Структури мангіферину та його ізоформ [4]

Поліфенольні сполуки є важливою і однією з найпоширеніших груп вторинних метаболітів наземних рослин. Поліфенольні сполуки синтезуються за стресових умов, забезпечуючи захист метаболітичних систем рослин від пошкоджуючої дії вільних радикалів, які утворюються внаслідок підвищеного вмісту в середовищі важких металів і ксенобіотиків [4]. Основними шляхами утворення фенольних сполук у рослинах, є ацетатний та шикіматний [23]. За кількістю фенольних кілець та за структурними елементами, що приєднуються до цих кілець, можна виділити кілька підкласів фенолів: прості феноли та бензохінони (катехол), фенольні кислоти (розмаринова та кавова кислоти), антоціани, фенілпропени (евгенол), кумарини, нафтохінони, ксантони, стильбеноїди (ресвератрол), антрахінони, флавоноїди (кверцетин та геністеїн), флаванони, ізофлавоноїди, лігнани, лігніни, поліфеноли (дубильні речовини) [23, 24]. Біосинтез стильбенів і ксантонів, як правило, пов'язаний з флавоноїдами. Однак, декарбоксилювання або β-окислення, які відбуваються на

певних етапах біосинтезу, призводять до втрати одного (у стильбенах) або двох (в ксантонах) атомів вуглецю в кінцевому продукті [23, 24].

Спочатку мангіферин був виділений як барвна сполука з Mangifera indica [4], і різні частини *Mangifera indica* (дерева манго) досі є його основним природним джерелом [25]. Серед різноманітних поліфенольних сполук, знайдених у *Mangifera indica*, мангіферин є основним компонентом. Мангіферин міститься в різних частинах *Mangifera indica* L, а саме в листі, плодах, корі, стеблах, серцевині і корінні [25, 26]. Листя мангового дерева містять в середньому, 2−5 % [27] або 2−11 % [28] мангіферину. Екстракт кори стовбура *M. indica*, який інтенсивно вивчався щодо його корисних властивостей, містить мангіферин як основну сполуку, але також багатий флаван-3-олами та феноловими кислотами [29].

Мангіферин присутній в різних родинах рослин у різних концентраціях у вигляді глікозиду. Рослинні джерела мангіферину включають: *Anemarrhena asphodeloides* (від 1 до 7 % сухої маси в кореневищах (TCM drug Zhimu) [30], *Aphloia theiformis, Arrabidaea patellifera, Arrabidaea samydoides, Bersama abyssinica, Bombax ceiba, Bombax malabaricum, Cratoxylum cochinchinense, Cyclopia genistoides, Cyclopia subtarnata, Iris domestica* і деякі інші *Iris sp*. [23, 31−33], *Gentiana lutiae, Gentianella nitida, Hypericum perforatum*, *Mangifera indica, Mangifera odorata, Polygala hongkongensis, Phaleria cumingii, Phaleria macrocarpa, Pyrrosia gralla, Rhizoma anemarrhena, Salacia oblonga, Salacia reticulate* (коріння (аюрведичні ліки), *Swertia chirata, Swertia macrosperma, Swertia mussotii, Trichomanes reniforme, Zizyphus cambodiana*. А також інші родини, в яких можна знайти мангіферин: *Bignoniaceae, Moraceae, Thymelaceae, Aphloiaceae, Malvaceae* [4]. Нещодавно з *Coffea pseudozanguebariae* (Rubiaceae) було виділено велику кількість мангіферину. Вміст понад 6 % мангіферину робить цю рослину одним із найбільш перспективних природних джерел цієї сполуки [4].

Ще одним джерелом мангіферину є популярний південноафриканський трав’яний чай – медовий чагарник, листя та квіти кількох видів *Cyclopia* з

*Fabaceae* [34]. Вміст мангіферину може досягати 4 % сухої маси, наприклад у *C. genistoides* [4].

Мангіферин та інші ксантони також зустрічаються в кількох таксонах птеридофітів, таких як родина папоротей *Aspleniaceae, Woodsiaceae і Trichomanes reniforme,* що цікаво з екологічної та хемотаксономічної точки зору, але немає жодних звітів про будь-яке медичне використання цих рослинних джерел [4, 31−33].

### 1.1.2 Методи отримання та ідентифікації мангіферину

Для виділення, визначення структури та кількісного аналізу мангіферину з різних джерел застосовуються кілька традиційних і сучасних методів. За останні роки досягнуто значного прогресу в цьому напрямку [22, 34−45]. Однак у переважній більшості опублікованих досліджень як матеріал для екстракції використовувалися три основні рослини: *M. indica, A. asphodeloides або Cyclopia species (переважно C. subternata and C. sessiliflora)* [22].

В якості екстрагентів (розчинників) для екстракції використовуються петролейний ефір, бензол, гексан, хлороформ, етилацетат, етанол, метанол і вода [22, 26, 27, 30, 34−45]

Активні інгредієнти листя манго можна вилучити кількома способами, такими як екстракція мацерацією, твердофазна мікроекстракція та гідродистиляція [35, 36]. Однак ці традиційні методи екстракції вимагають багато розчинників і часу. Нещодавні дослідження нових та екологічно чистих методів екстракції були розроблені для вилучення активних компонентів з рослин, таких як екстракція за допомогою ультразвуку, надкритична та докритична екстракція рідиною [37−39]. Серед них ультразвук є перспективним методом, який може підвищити ефективність екстракції завдяки ефекту акустичних кавітацій, що виникають у розчиннику при проходженні ультразвукової хвилі [40, 41]. Ультразвук також чинить механічну дію, що сприяє більшому проникненню розчинника в тканину і збільшує площу

поверхні контакту між твердою і рідкою фазами, а розчинник швидко дифундує з твердої фази в розчин [42]. Тому екстракція за допомогою ультразвуку успішно застосовується для_екстрагування багатьох природних продуктів [40, 41−44].

При дослідженні залежності впливу концентрації етанолу (20, 40, 60 %) та інших параметрів підібрано умови, за яких вихід мангіферину є максимальним: концентрація етанолу 44 %; співвідношення рідина: тверда речовина 38:1 (екстрагент:тверда речовина) (мл/г); температура екстракції 60 °С; і час екстракції 19,2 хв, ультразвукове опромінення потужністю 200 Вт. За оптимальних умов вихід мангіферину досягав 58,46 ± 1,27 мг/г. Отримані результати є корисними для повного використання листя манго, а також підтвердили, що екстракція за допомогою ультразвуку є потужним інструментом для вилучення важливих фітохімічних речовин з рослинних матеріалів [22].

Пропонується метод, при якому свіжовисушену на повітрі кору Mangifera indica L. послідовно екстрагували спочатку киплячим петролейним етером для видалення жиророзчинних речовин, а потім холодним ацетоном для видалення танінів і, далі 70 % етанолом [45]. Об’єднаний спиртовий екстракт концентрували за зниженого тиску, щоб виділити мангіферин у вигляді жовтого аморфного порошку [45−47].

Основним методом, який використовується для відділення та виділення мангіферину з екстрактів, є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Тонкошарова хроматографія (ТШХ) також використовувалася для відділення мангіферину від інших компонентів в екстрактах [47].

Описана технологія, згідно якої квіткові бруньки з Mangifera indica спочатку нарізали на дрібні шматочки, а потім висушували при кімнатній температурі та додатково подрібнювали. Подрібнені квіткові бруньки M. indica екстрагували петролейним ефіром (60−80 °С) в апараті Сокслета протягом 56 год для видалення будь-яких жиророзчинних речовин. Знежирені порошкоподібні квіткові бруньки екстрагували за допомогою апарату Сокслета

з необхідною кількістю етанолу (95 %) протягом 21 год та концентрували за зниженого тиску до утворення напівтвердої маси [45]. Напівтверду масу кілька разів знежирювали і розчиняли в етанолі за кімнатної температури. Етанольний екстракт далі концентрували за зниженого тиску, що дало жовтий аморфний порошок. Для виділення мангіферину [45] висушений спиртовий екстракт адсорбували на силікагелі (60−120) і хроматографували на колонці з силікагелем, наповненій петролейним ефіром (60-80 °C). Колонку елюювали сумішшю хлороформ:ацетон:мурашина кислота (8:1,5:0,5), що давало мангіферин у вигляді блідо-жовтого аморфного порошку. Під час кристалізації з використанням етанолу отримували блідо-жовті голчасті кристали мангіферину. Виділені блідо-жовті голчасті кристали мангіферину висушували. Виділену сполуку ідентифікували за допомогою ТШХ, ВЕРХ, ЯМР спектрофотометра. Також визначали температуру плавлення виділеної сполуки [48].

З використанням іншого методу листя та кору манго сушили в духовці при 40 °C, тоді як ядра та шкірку сушили сублімацією до постійної ваги. Висушені зразки подрібнювали до дрібного однорідного порошку. Порошок екстрагували протягом 3 год гексаном в апараті Сокслета для видалення жиророзчинних речовин. Після висушування матеріал додатково екстрагували тричі протягом 3 год метанолом, і розчини об'єднували і випарювали при 40 °C за допомогою роторного випаровування за зниженого тиску. Екстракти розчиняли в метанолі та аналізували за допомогою аналітичної високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), ВЕРХ-електророзпилювальної мас-спектрометрії (ESI-MS) і аналізу на основі ВЕРХ на основі гіпоксантину/ксантиноксидази [49].

У дослідженні Зоу та ін. 2013 р. був розроблений метод мікрохвильової екстракції для отримання мангіферину з листя манго. Деякі параметри, такі як концентрація етанолу, співвідношення рідини та твердої речовини, мікрохвильова потужність і час екстракції, були оптимізовані. Оптимальними умовами екстракції було використання 45 % етанолу, співвідношення

рідина/тверда речовина 30:1 (мл/г) і час екстракції 123 с при мікрохвильовому опроміненні потужністю 474 Вт. За оптимальних умов вихід мангіферину становив 36,10 ± 0,72 мг/г, значно вище, ніж при традиційній екстракції. Отримані результати вказують на те, що екстракція за допомогою мікрохвиль є перспективним методом для вилучення мангіферину з рослинних матеріалів і сприяє повному використанняю листя манго [50].

Для отримання екстрактів з листя манго (Mangifera indica) також використовували екстракцію розчинником за низького тиску і екстракцію надкритичною рідиною. Найвищий вихід склав 2,24% при 30 МПа та 323 К; вихід від екстракції розчинником за низького тиску (9,3 %) був майже втричі вищий, ніж від екстракції розчинником за низького тиску (3,6 %). Тонкошарова хроматографія показала, що екстракти листя манго, отримані обома методами містять кілька класів сполук, таких як алкалоїди, флавоноїди та терпеноїди. Екстракти листя манго отримували за допомогою $CO_2$ екстракції та перколяції етанолом [39].

В літературі описано метод екстракції, при якому зразки листя та кори заморожували при − 80 °C і ліофілізували при − 50 °C і 0,12 мбар у Freezone 4.5 (Канзас, США) до 3% вологості (d.b.) (24 та 48 год для листя та кори, відповідно). Екстракцію біологічно активних сполук проводили методом мацерації та мацерації з нагріванням, а також екстракцією ультразвуком та в мікрохвильовому приладі [51−53]. Згідно з Руїз-Монтанез та ін. 2014 [51]; як розчинники для мангіферину використовували суміш етанол-вода (8:2 об/об) і гексан у співвідношенні 1:10 (г проби:мл розчинника), за винятком методу нагрівання (1:20; г проби:мл розчинника). При екстракції методом холодної мацерації 10 г ліофілізованого порошку змішували з розчинником у колбі Ерленмейера, перемішували протягом 24 год на орбітальному шейкері 290400 (Boekel Scientific, Пансільванія, США), при 200 об/хв і 25 °C, у щоб збільшити розчинність матеріалу та швидкість масообміну [52]. Екстракцію при нагріванні проводили в безперервному екстракторі Сокслета VH-6 (NOVATECH, Гвадалахара, Мексика). 200 мл розчинника поміщали в кулькову

колбу об’ємом 250 мл, а зразок 10 г – у екстракційну камеру. При екстракції ультразвуком 10 г зразка додавали до розчинника при 25 °C, потім обробляли в ультразвуковому апараті Cleaner 1510 (Брансон, Сент-Луїс, США), застосовуючи постійну частоту 42 кГц протягом 30 хв у холодній бані. Тверді та рідкі частинки вібрують і прискорюються ультразвуковою дією; в результаті розчинена речовина швидко переходить із твердої фази в екстрагент для вилучення біоактивних сполук [52].

Отже, аналіз літературних джерел продемонстрував зацікавленність науковців в пошуку нових методів вилучення мангіферину з різних джерел отримання.

### 1.1.3 Фармакологічні властивості та застосування мангіферину

Вилучення з манго, як основного джерела мангіферину, традиційно використовувалися корінними жителями Болівії, Південної Гвіани, Антильських островів, Колумбії, Філіппін та Індії для лікування ряду захворювань. Мангіферин емпірично використовується проти діареї, блювоти, ревматизму, свербежу, астми та шлункових розладів.

У народній медицині широко використовується екстракт манго. Існує кілька повідомлень про традиційне використання ядра манго в різних частинах світу. На Фіджі свіже ядро манго вживають як ліки від дизентерії та астми, а сік манго використовують як краплі для носа при проблемах із носовими пазухами В Індії сухе насіння наноситься на голову для видалення лупи, а також як засіб проти діареї. Гарячі водні екстракти ядра манго застосовують як протиглистні засоби, афродизіаки, проносні та тонізуючі засоби [54].

Згодом було доведено, що мангіферин володіє численними фармакологічними властивостями, такими, як антибактеріальна [45, 55, 56] протипухлинна, імуномодулювальна [57−60], протидіабетична [61, 62], антиоксидантна, антигельмінтна та протиалергічна [23, 55, 63-66], антивікова, протизапальна, гепатопротекторна та знеболювальна [19, 23, 31, 67, 68].

Фармакологічні властивості мангіферину варіюють від антиоксидантних, протиінфекційних, протидіабетичних, антиатеросклеротичних і серцево-судинних ефектів до покращення когнітивної функції мозку. Мангіферин демонструє виняткову антиоксидантну активність та гепатопротекторну дію при ураженнях печінки, спричинених вільними радикалами, у мишей *in vivo* [17, 19, 69].

Мангіферин широко використовується як профілактичний засіб при серцево-судинних, нейродегенеративних захворюваннях, діабеті та раку [25]. Дослідження щодо імуномодулювальної активності мангіферину показали, що він модулює експресію кількох генів, які беруть участь у регуляції апоптозу, реплікації вірусу, пухлиноутворенні, запаленні та аутоімунних захворюваннях [70]. Ці результати свідчать про їх потенційну користь у лікуванні запальних захворювань та раку [71]. Було продемонстровано, що мангіферин захищає лімфоцити людини від пошкоджень у ДНК під впливом гамма-випромінювання, це підвищує можливість їх використання у пацієнтів, які проходять променеву терапію, або людей, які професійно піддаються радіації [72]. Крім того, результати досліджень вказують на те, що мангіферин є перспективним профілактичним засобом [57], з біоактивністю, яка включає антиоксидантну дію [73] і модуляцію експресії генів [74].

Основним механізмом дії мангіферину є його антиоксидантна активність і активність поглинання вільних радикалів. Антиоксидантна активність простежується при запальних та інфекційних станах, а також при цукровому діабеті [75, 76]. Чотири ароматичні гідроксильні групи у молекулі мангіферину визначають його сильні антирадикальні та антиоксидантні властивості [23]. Пероральне введення мангіферину (40 мг/кг/день) щурам з діабетом протягом 30 днів значно знижувало рівень цукру в крові, підвищення рівня інсуліну в плазмі та підвищувало антиоксидантні ферменти, такі як супероксиддисмутаза, каталаза і глутатіонпероксидаза у печінці щурів з діабетом порівняно з контрольною групою щурів [77].

У дослідженнях показано, що в результаті впливу кадмію хлориду на ендотеліальні клітини ниркових клубочків людини відбувалася секреція двох основних прозапальних цитокінів, IL-6 та IL-8, що призводило до запалення нирок. Однак мангіферин (75 мкМ) запобігав індукованій кадмієм секреції як IL-8, так і IL-6 ендотеліальними клітинами людських клубочків, і його можна використовувати для запобігання запаленню нирок [78].

Мангіферин захищає від окислювального стресу, регулюючи виробництво NLRP3 і Nrf2 в список умовних скорочень, послаблюючи ниркову дисфункцію та покращуючи морфологічні зміни у також CLP-індукованих септичних мишей, а також знижуючи рівні сироватки IL-1β та IL-18, запобігаючи апоптозу канальцевих епітеліальних клітин і придушення активації запалення NLRP3 у нирках [71, 76, 79−81].

У роботі [82] представлено детальний опис ренопротекторної активності мангіферину на основі експериментальних моделей. Всебічно вивчений вірогідний механізм дії, згідно з яким рено-захист може відбуватися завдяки наявності антиоксидантної, протизапальної, антиапоптотичної дії, і завдяки аутофагічній активації, імуномодуляції, регуляції ниркових транспортерів уратів і модуляції специфічних сигнальних шляхів. Крім того, рекомендовано комбінувати мангіферин з іншими гіпоглікемічними препаратами для індукування синергічних ефектів. Дослідження ефективності та безпеки мангіферину в клінічних випробуваннях також виправдані для підтвердження його лікувального потенціалу як терапевтичного засобу для лікування захворювань нирок у людей [83].

Вільні радикали є високореактивними молекулами, які беруть участь у патології черепно-мозкової травми та церебральної ішемії через окислювальний стрес і запалення. Мангіферин може проникати через гематоенцефалічний бар’єр для захисту нейронів. Різні дослідження показують, що він здатний захищати центральну нервову систему від окисного стресу, мітохондріальної дисфункції, нейрозапалення та апоптозу в моделях *in vitro* та *in vivo*. Додаткові факти підтверджують, що мангіферин відіграє певну роль у покращенні пам’яті

та пізнання у моделей щурів. Загалом нейропротекторна здатність дозволяє розглядати мангіферин як перспективний лікарський засіб для терапії хвороб Альцгеймера і Паркінсона [84, 85].

Крім того, мангіферин здатний модулювати експресію прозапальних сигнальних молекул, включаючи експресію TNF-α і COX-2, а також регулювати різні фактори транскрипції, такі як NF-κB і фактор 2, пов'язаний з NF-E2 (Nrf -2). Докладно описано дослідження щодо захисних ефектів мангіферину при пошкодженні ЦНС, експресії прозапальних цитокінів, окисному стресі та нейроповедінкових аномаліях, спричинених ліпополісахаридом у головному мозку [31].

Механізми, що лежать в основі нейрозапалення та оксидативного пошкодження головного мозку, є складними. Молоді дорослі щури-самці лінії Вістар піддавалися впливу середовища з високим рівнем стресу, і неврологічні та нервово-психічні захворювання, пов'язані з пошкодженням клітин і апоптозом, які спостерігалися в їх головному мозку, це такі як нейродегенеративні захворювання, депресія і шизофренія. Продемонстровано, що введення мангіферину (15, 30 та 60 мг/кг перорально) запобігає дисрегуляції гіпоталамо-гіпофізарно-надниркового механізму стресу, усуває нейрозапалення та оксидативне ушкодження [86].

Як складова традиційної китайської медицини, було продемонстровано, що мангіферин відіграє пряму і допоміжну роль в онкотерапії. Мангіферин ефективно пригнічує прогресування пухлинного клітинного циклу.

Ряд досліджень показали здатність мангіферину пригнічувати канцерогенез і ріст ракових клітин шляхом індукції апоптозу *in vitro* та *in vivo*. Мангіферин демонструє протилейкемічну та профілактичну дію на клітини лейкемії HL60. Мангіферин діє на кілька прозапальних факторів транскрипції, факторів росту, білків клітинного циклу, цитокінів, кіназ, молекул адгезії, хемокінів і запальних ферментів шляхом інгібування стадій ініціації, стимулювання та метастазування раку [86, 87].

Було підтверджено, що мангіферин ініціює зупинку клітинного циклу фази G2/M через регуляцію сигнального шляху CDK1-циклін B1. Синтез ДНК здійснюється під час S-фази клітинного циклу, і лікування мангіферином викликає затримку S-фази в клітинах колоректального раку HT29 і клітинах HeLa раку шийки матки [88]. Окрім інгібуючої дії на клітинний цикл, мангіферин індукує апоптоз пухлинних клітин. Ядерний фактор-κB (NF-κB) є фактором транскрипції, який індукує проліферацію ракових клітин [89].

Ряд досліджень сприяли розумінню основного молекулярного механізму мангіферину в онкотерапії [90–92]. У клітинах карциноми молочної залози людини MCF-7 мангіферин регулює сигнальний шлях циклін-залежної кінази 1-циклін Bl і індукує зупинку клітинного циклу фази G2/M, що пригнічує ріст злоякісних клітин. Крім того, експерименти *in vivo*, проведені на моделі щура з ксенотрансплантатом MCF-7, підтвердили результати *in vitro* [91]. Подібним чином, у клітинах карциноми легенів людини A549 мангіферин виявляє протипухлинні властивості, індукуючи зупинку клітинного циклу фази G2/M через пригнічення циклін-залежної кінази 1-циклін B1 сигнального шляху та індукуючи апоптотичну смерть клітин шляхом інгібування PKC-NF-κB [90].

Дільшара та ін. 2015 р. [93] визначили, що мангіферин значно знижує TNFα-індуковану активність MMP-9, знижує активність ядерного фактора-κB (NF-κB) і пригнічує ядерну транслокацію субодиниць NF-κB p65 і p50 в андроген-чутливих клітинах аденокарциноми простати людини. Було також показано, що він пригнічує експресію NF-κB (субодиниця p65) і IκBα в мононуклеарних клітинах периферичної крові (PBMC) у щурів із хронічним бронхітом, спричиненим сигаретним димом. Це значно знижує сироваткові рівні високочутливих С-реактивних білків (Hs-CRP) і TNFα, а також зменшує хронічне запальне пошкодження бронхіол у периферальних мононуклеарних клітинах крові [94].

Прабху та ін. 2006 р. [95] продемонстрували, що профілактичне лікування мангіферином (100 мг/кг) протягом 28 днів регулює систему захисту тканин від пошкодження серця. Було також продемонстровано, що мангіферин

покращував параметри серцевого кровотоку та порушення волокон залежно від дози після однієї внутрішньовенної ін'єкції мангіферину (5, 10 або 20 мг/кг) в експериментальній моделі [96,97]. Введення мангіферину (20 мг/кг протягом 4 тижнів) відновлює функцію серцевого викиду, зменшує накопичення TNF-α і розщепленої каспази-3, а також підвищує регуляцію Bcl-2 [98]. Крім того, мангіферин має терапевтичний ефект на ремоделювання лівого шлуночка після ін'єкції мангіферину і покращує роботу серця. Застосування мангіферину (50 або 100 мг/кг протягом 5 тижнів) також захищає від спричиненої доксорубіцином смертності та аномалії електрокардіограми, знижує експресію біохімічних маркерів серцевої токсичності, таких як дегідрогеназа та ізофермент креатинфосфокінази [99].

Гуо та ін. 2011 р. виявили, що мангіферин (50 і 150 мг/кг) полегшує гіпертригліцеридемію шляхом модулювання експресії генів, які беруть участь в окисленні ліпідів і ліпогенезі. Маса тіла, маса печінки, маса вісцерального жиру, сироваткові тригліцериди, концентрація вищих жирних кислот, рівні печінкових тригліцеридів, вміст вищих жирних кислот у печінці та м'язах значно знижуються після лікування мангіферином [100].

Мангіферин виявляє протизапальну активність. Дослідження з метою виявлення лікувального потенціалу мазі на основі мангіферину у щурів з ослабленим імунітетом показало, що мангіферин полегшує загоєння ран за рахунок швидкого закриття ран, організованого відкладення колагену та формування грануляційної матриці [101]. Він також залежно від дози інгібує запальні цитокіни, фактор некрозу пухлини альфа (TNFα), оксид азоту (NO) і NF-κBin в експериментах in vitro та in vivo на мишах, що свідчить про механізм протизапальної дії [67, 102].

Мангіферин використовується при декількох аутоімунних запальних захворюваннях, таких як ревматоїдний артрит, дерматит і псоріаз. Він також використовується в складі косметичних засобів, завдяки антиоксидантним і УФ-захисним властивостям [103−105].

Експериментально підтверджено, що мангіферин виявляє антибактеріальну дію проти двох видів бактерій: *Staphylococcus aureus* (грампозитивний) і *Salmonella typhi* (грамнегативний), а також протигрибкову (*S. cerevisiae, C. albicans, A. niger, A. flavus і T. aurantiacus*) та антипротозойну(*C. parvum*) дію [19].

Мангіферин володіє противірусною дією проти ВІЛ-1, ВПГ-1 і ВПГ-2 [18, 20, 21, 106].

У дослідженнях з використанням техніки культивування тканин вперше продемонстровано противірусну дію мангіферину та ізомангіферину проти вірусу простого герпесу I типу (ВПГ-I). За допомогою логарифмічного визначення інгібування ВПГ-I виявлено, що ізомангіферин дещо перевищував такі контрольні препарати, як ацикловір, ідоксуридин і циклоцитидин, у log на 0,27-0,50, і що мангіферин був нижчим, ніж ізомангіферин у log на 0,53. Противірусний ефект мангіферину та ізомангіферину, імовірно, пояснюється їх здатністю пригнічувати реплікацію вірусу в клітинах [20].

Дослідженнями противірусної активності мангіферину, екстрагованого з листя манго (*Mangifera indica*), проти вірусу простого герпесу типу 2 (ВПГ-2) *in vitro* встановлено, що 50 % ефективна концентрація проти утворення бляшок ВПГ-2 у клітинах HeLa становила 111,7 мікрограмів на мл$^{-1}$, а концентрації 33 і 80 мікрограмів на мл$^{-1}$ знижували продуктивність реплікації вірусу на 90 % (EC90) і 99 % (EC99), відповідно. Мангіферин безпосередньо не інактивував ВПГ-2. Результати тестів на додавання та видалення препарату свідчать про те, що мангіферин пригнічує пізню реплікацію ВПГ-2 [21].

Існує препарат Мангогерпін, крем для зовнішнього застосування 5 % у тубах (1 г містить мангіферину 0,05 г по 10,0 г) та капсули по 100 мг № 20 (1 капсула містить мангіферину 0,1 г) «BV Pharma Joint Venture Company (BV Pharma)», В'єтнам.

Препарат має противірусну активність щодо ДНК-вмісних вірусів (простого вірусу герпесу 1 і 2 типу, Varicella zoster, меншою мірою –

цитомкгаловірусу і вірусу імунодефіциту людини). Інгібує репродукцію вірусу простого герпесу на ранніх стадіях його розвитку.

Згідно з Ананд та ін. 2015 р., Голд-Сміт та ін. 2016 р. мангіферин демонструє мінімальну токсичність *in vitro* та *in vivo* [60, 107].

Дослідженнями ряду вчених встановлено, що розчинність мангіферину у воді становить лише 0,111 мг/мл. Крім того, Хан та ін. 2010 р. [108] продемонстрували, що пероральна біодоступність мангіферину становила лише 1,2 %. Це може бути пов’язано з його низькою ліпофільністю, поганою проникністю через кишкову мембрану, [109], високим метаболізмом першого проходження через печінку [110] та низьким пероральним всмоктуванням, головним чином через його погану розчинність [111].

Існує велика кількість досліджень, які повідомляють про незначне пероральне всмоктування мангіферину [112−114]. Ці дані разом свідчать про те, що, незважаючи на широкий спектр фармакологічної активності, мангіферин має низьку розчинність, трансмембранну проникність і біодоступність, що обмежує фармацевтичну розробку та застосування мангіферину. Тому необхідно розробити нові стратегії фармацевтичної розробки, щоб підвищити ефективність перорального застосування.

Дослідження виявили здатність мангіферину проникати через роговий шар і переходити в епідерміс і дерму. Оскільки коефіцієнт розподілу жиру та води мангіферину є відносно високим, пероральна абсорбція низька, що свідчить про те, що мангіферин краще всмоктується через шкіру. Зокрема, для доставки МГ на шкіру та слизові оболонки, уражені герпетичною інфекцією, необхідні м'які форми, що характеризуються біосумісністю та високою проникаючою здатністю [105, 115, 116].

## 1.2 Теоретичне обґрунтування використання екстракту леспедези двоколірної в складі дерматологічного засобу

### 1.2.1 Розповсюдженість та хімічний склад рослин роду Lespedeza

У фаховій літературі описано 152 види рослин роду *Lespedeza* Michx [117], більшість з яких (125 видів) зростає у Східній Азії, зокрема 70 з них – у Китаї, у південно-східній частині США зустрічається 15 видів роду *Lespedeza* [118.]. У межах країн Східної Європи 6 видів роду є дикорослими: *Lespedeza bicolor* Turcz., *L. cyrtobotrya* Miq., *L. davurica* (Laxm.) Schindl., *L. juncea* (L. fil.) Pers. (*L. hedysaroides* (Pall.) Kitag.), *L. sericea* Miq., *L. tomentosa* (Thumb.) Maxim., поширені в основному на Далекому Сході Росії [119].

У даний час офіцинальними видами роду вважаються *L. capitata, L. bicolor* та *L. hedysaroides.*

Лесподеза двоколірна – *Lespedeza bicolor* Turcz. – кущ, заввишки 1–1,5 м, з багатьма тонкими сильногалузистими, прутовидними, вгору притисненими гілками. Листя трійчато-складні, листочки еліптичні, округлі або видовжено-еліптичні, на верхівці з маленькою виїмкою і тонким шипиком. Молоді листки шовковисто опушені, дорослі – з рідкими притисненими білими волосками. Суцвіття пірамідальне, віникоподібне. Квітки червоні або рожево-фіолетові. Плід – однонасінний біб з мереживом жилок [119].

Рослини роду Лесподеза в дикорослому стані на території України не зустрічаються. *Lespedeza bicolor* культивується у парках майже скрізь, крім посушливих районів. Наукову інтродукцію *Lespedeza bicolor* здійснено у ботанічних садах університетів міст Києва, Львова, Дніпра та Чернівців, у Нікітському ботанічному саду й Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України.

Надземні органи *L. capitata* містять флавоноїди (близько 0,1 % у перерахунку на суху речовину) та дубильні речовини, останніх особливо багато у молодих листках [117]. У траві лесподези головчастої ідентифіковано флавонові глікозиди (гомоорієнтин, або ізоорієнтин, сапонаретин, вітексин, орієнтин); аглікони флавонолів (кверцетин, кемпферол); флавонолові глікозиди (ізорамнетин-3-рутинозид, рутин, кемпферол-3-рамноглюкозид), ди- С-глікозилфлавони (корлінозид, ізокорлінозид, ізошафтозид, неокорлінозид, неошафтозид, шафтозид); у листі – проціанідини В-1, В-3, В-6, С-2 [120, 121].

За хімічним складом до леспедези головчастої близькі *Lespedeza bicolor* та *L. hedysaroides* [119].

Основними діючими речовинами *Lespedeza bicolor* є флавоноїди (0,25–0,7%): аглікони флавонолів (кверцетин, кемпферол); флавонолові глікозиди (трифолін, ізокверцитрин, леспедин, та їх похідні); флавонові глікозиди орієнтин, гомоорієнтин, вітексин, ізовітексин [119, 122].

У корі стебел *Lespedeza bicolor* ідентифіковано ізофлаванони (7,4'-дигідрокси – 2'-метокси-6-геранілізофлаванон, 2',4'-дигідрокси-6''-метил-6''-(4'''-метилпент-3-еніл) пірано (3''2'': 6,7) – ізофлаванон); фенолокислоти (кавова кислота, протокатехова кислота), етиловий ефір кавової кислоти; тритерпеноїди (бетулінова кислота, бетулін); β-ситостерол; у серцевині стебла – ізофлавон даїдзеїн та халкон ізоліквиритигенін [123].

Трава *L. hedysaroides* містить до 2,5 % флавоноїдів, серед яких флавонолові глікозиди леспедин, кемпферол-3-О-робінозид, біокверцетин; флавонові глікозиди сапонаретин, вітексин, орієнтин, гомоорієнтин, ізовітексин; аглікони флавонолів кемпферол, кверцитин. Також виявлено катехіни та фенолкарбонові кислоти [119, 122, 124].

Як ЛРС використовується трава леспедези двоколірної — *Herba Lespedezae bicoloris,* зібрана у фазу цвітіння [119, 122].

### 1.2.2 Фармакологічні властивості та застосування вилучень леспедези в офіцинальній та народній медицині

*Lespedeza bicolor* у традиційній народній медицині використовують для лікування нефриту, азотемії, запалення, гіперпігментації, виснаження, діабету та розладів діурезу [125−128].

Крім того, екстракти леспедези (ЕЛ) мають антиоксидантну, антитирозиназну, протизапальну, естрогенну, антимікробну, протигрибкову активність і запобігають карієсу [125, 129]. Останні дослідження довели, що ЕЛ виявляють виражений ефект щодо поліпшення пам'яті при лікуванні

когнітивної дисфункції, спричиненої β-амілоїдом, на тваринних моделях [126, 130]. Крім того, екстракт був описаний як багатообіцяючий терапевтичний засіб для запобігання діабетичній нефропатії в моделях, індукованих метилгліоксалем, як in vitro, так і in vivo [131].

Науковцями відмічено, що ЕЛ зменшував спричинене гіперглікемією запалення, окиснювальний стрес, пошкодження, а також фіброз печінки [132]. Активність флавоноїдів, що поглинають вільні радикали, може бути використана в продуктах проти старіння шкіри, щоб захистити від деградації дермальний колаген, тоді як дренаж тканин може бути корисним для боротьби із целюлітом [133]. Екстракт пригнічував ріст клітин карциноми легенів LU-1 і раку простати LNCaP. Однак даних щодо сполук, які відповідають за біологічну активність екстракту, мало, і ще менше — щодо механізмів дії цих речовин. Раніше були виділені кілька поліфенольних сполук з кори стебла леспедези, які пригнічували ріст ракових клітин людини HTB-19, Kyse-30 і HEPG-2 [126]. Перші відомості щодо механізмів дії були отримані для птерокарпанів, куместанів і арилбензофуранів, нещодавно виділених з леспедези. Було виявлено, що ці природні сполуки сприяють загибелі клітин шляхом індукції зупинки клітинного циклу на стадії G1, зниження рівня Bcl-2 та індукції розщеплення PARP у клітинах раку крові Jurkat [134].

Для флавоноїдної фракції листя *Lespedeza capitata* було встановлено наявність антигіпертензивних властивостей за рахунок інгібування ангіотензин конвертуючого ензиму (проціанідини B-1, B-3, B-6, C-2) [121].

Для лікування захворювань нирок як гіпоазотемічні та натрійуретичні засоби запропоновані настоянка з трави леспедези головчастої – *Lespedeza capitata* (Леспенефрил) і водно-спиртовий розчин очищенного екстракту з трави леспедези двоколірної *Lespedeza bicolor* Turcz. Основні БАР настойки та екстракту охарактеризовані як глікозиди лютеоліну (оріентін, гомоорієнтин та ін.) [123].

Настойка і сума флавоноїдів *Lespedeza bicolor* Turcz. виявляють діуретичну, гіпоазотемічну, антистресову і протипухлинну дію, зменшують

вміст холестерину в крові. Флавоноїди леспедези двоколірної та засіб на її основі «Леспефлан» усувають порушення білково-енергетичного обміну на різних моделях гострої ниркової недостатності. Посилення білкового синтезу підтверджується зниженням активності аргінази й утворення сечовини у печінці.

Настойка з надземної частини *L. hedysaroides* чинить виражену діуретичну та гіпоазотемічну дію [119, 122].

*Lespedeza virgata* (Thunb.) DC. – рослина народної медицини, яка зростає в центральному Китаї та використовуються для лікування нефритів. Бутанольна фракція етанольного екстракту цієї рослини пригнічує розвиток патологічних змін клубочків щурів на експериментальний моделі нефропатії мінімальних змін, що може пояснюватись ефективною протидією окислювальному ушкодженню нирок за рахунок антиоксидантної дії екстракту [127, 135, 136].

Серед перспективних фармакологічних ефектів видів роду слід відзначити встановлену здатність етанольних екстрактів п’яти видів корейських леспедез, зокрема двоколірної, інгібувати активність шлунково-патогенних мікроорганізмів *Helicobacter pylori* та модифікувати продукування цитокінів [137].

*Lespedeza cyrtobotrya, L. buergeri, L.bicolor* і деякі інші види роду використовуються у китайській народній медицині для лікування легеневих інфекцій, збільшення діурезу або зупинки кровотеч; *L. pilosa, L. tomentosa, L. chinensis* застосовують при шлункових захворюваннях [138].

Препарат «Леспенефрил» у формі спиртової витяжки або ліофілізованого екстракту для ін’єкцій запропоновано як гіпоазотемічний засіб при нирковій недостатності [119, 122].

З трави леспедези двокольорової *Lespedeza bicolor* Turcz. – отримують водно-спиртовий розчин очищенного екстракту під назвою «Леспефлан», що чинить гіпоазотемічну, діуретичну та протизапальну дію [119].

З огляду на аналіз результатів досліджень, наведених в наукових джерелах, можна зробити висновок, що властивості вилучень з леспедези

двокольорової підтверджують перспективу їх використання у складі дерматологічних засобів.

## 1.3 Дослідження ринку протигерпетичних засобів місцевої дії

Аналіз асортименту протигерпетичних ЛЗ, представлених на вітчизняному фармацевтичному ринку станом на 01.02.2023 р., здійснювали за даними Державного реєстру ЛЗ України [139], класифікаційної системи АТС (Компендіум 2021) [140], Державного формуляра ЛЗ (випуск 13) [141]. Для проведення структурного аналізу ринку протигерпетичних ЛЗ місцевої дії було відібрано 4 групи за класифікаційною системою АТХ (АТС) (табл. 1.1). Варто зазначити, що перелік відібраних для маркетингового аналізу груп ЛЗ сформовано згідно з даними Державного формуляра ЛЗ випуску 13, а також на підставі вивчення інструкцій до медичного застосування ЛЗ, у яких зазначено, що препарат може застосовуватись для лікування інфекцій, спричинених ВПГ-1 та ВПГ-2 (Додаток Е).

Відповідно до міжнародної класифікації АТХ (АТС) для місцевого лікування ГІ застосовують ЛЗ з групи D06BB «Хіміотерапевтичні засоби для місцевого застосування, противірусні препарати», яка є найбільшою за кількістю ЛЗ (74,36 %); а також з груп D11AX «Інші дерматологічні препарати» (5,13%), S01AD «Засоби, що застосовуються в офтальмології, противірусні препарати» (7,69%) та R05X «Інші препарати, що застосовуються у разі кашлю та застудних захворювань» (12,82%) (табл.1.1) (рис.1.1).

*Таблиця1.1*

**Перелік основних груп лікарських засобів для місцевого лікування герпетичної інфекції, за даними державного реєстру ЛЗ України**

| № з/п | Код за АТС класифікацією | Діюча речовина | Кількість ТН | Форма випуску |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

*Продовження табл. 1.1*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | D06B Хіміотерапевтичні засоби для місцевого застосування<br>D06B B Противірусні засоби | | | |
| 1 | D06B B | Кислота гліциризинова | 2 | Спрей |
| 2 | D06B B03 | Ацикловір | 14 | Крем, мазь |
| 3 | D06B B06 | Пенцикловір | 6 | Крем |
| 4 | D06B B10 | Іміквімод | 3 | Крем |
| 5 | D06B B11 | Доканазол | 2 | Крем |
| 6 | D06B B10** | Денотивір | 1 | Крем |
| 7 | D06B B53 | Ацикловір, гідрокортизон | 1 | Крем |
| 2 | D11AX Інші дерматологічні препарати | | | |
| 1 | D11AX | Фладексан (екстракт трави десмодіуму канадського) у перера-хуванні на вміст суми флавоноїдів 30 % 20 мг | 2 | Мазь |
| 3 | S01 Засоби, що застосовуються в офтальмології<br>S01A D Противірусні засоби | | | |
| 1 | S01A D09 | Ганцикловір | 1 | Гель |
| 2 | S01A D10** | Оксолін | 2 | Мазь |
| 4 | R05X Інші препарати, що застосовуються у разі кашлю та застудних захворювань | | | |
| 1 | R05X | Оксолін | 5 | Мазь |

Для лікування інфекцій ВПГ-1 клінічно використовується значна кількість противірусних препаратів, серед яких ацикловір є препаратом першої лінії [142]. Незважаючи на його ефективність, тривале застосування ацикловіру індукує стійкі до ліків штами вірусу; тому настійно потрібні нові противірусні альтернативні препарати проти стійкого до лікарських засобів ВПГ-1 [143].

Як засвідчили результати маркетингового аналізу на фармацевтичному ринку України станом на 01.02.2023 р, ЛЗ для лікування ГІ наявні в різних ЛФ.

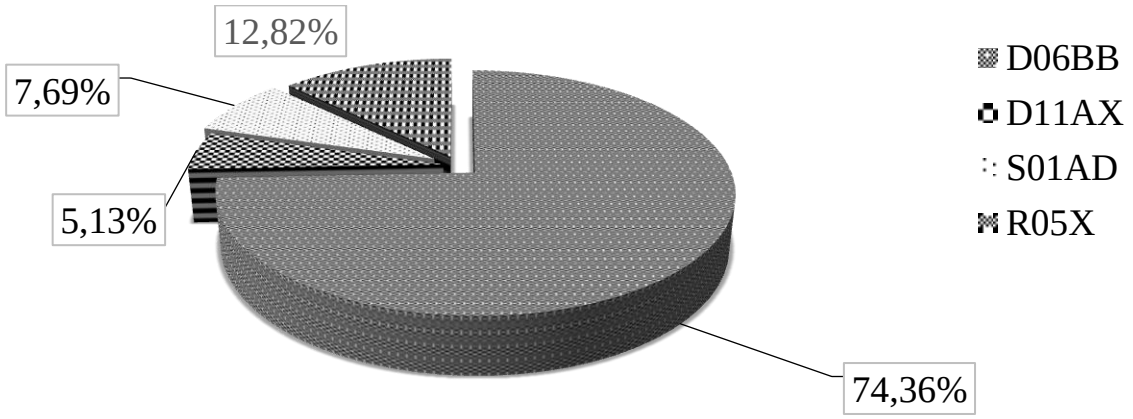



Рис. 1.1 Розподіл протигерпетичних засобів місцевої дії за фармакологічними групами, згідно АТС-класифікації, де: D06BB – Хіміотерапевтичні засоби для місцевого застосування. Противірусні засоби; D11AX – Інші дерматологічні препарати; S01A D – Засоби, що застосовуються в офтальмології. Противірусні засоби; R05X – Інші препарати, що застосовуються у разі кашлю та застудних захворювань.

Більшість ЛЗ становлять монокомпонентні препарати (97 %), комбіновані складають 3 % та представлені здебільшого комплексами рослинних компонентів (рис. 1.2)

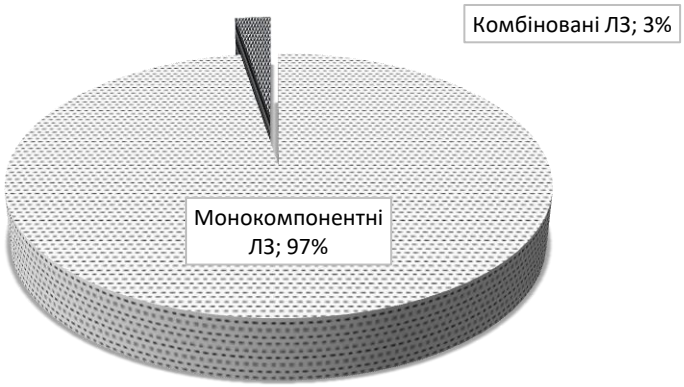



Рис. 1.2 Розподіл груп препаратів для лікування герпесвірусної інфекції за вмістом діючих речовин

Варто зазначити, що серед досліджуваних груп протигерпетичних засобів 87,18 % (34 ТН) препаратів відпускають без рецепту лікаря і лише 12,82 % (5 ТН) – за рецептом лікаря.

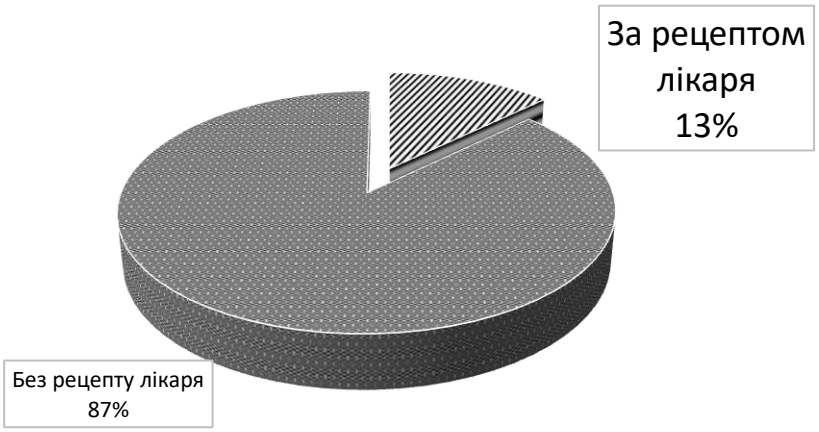



Рис.1.3. Розподіл груп препаратів для лікування герпесвірусної інфекції

Як засвідчили результати маркетингового аналізу, ЛЗ для лікування ГІ, на фармацевтичному ринку України представлені в різних формах випуску (рис. 1.4). спреї – 5,13 % (2 ТН), креми 58,97 % (23 ТН), мазі 33,33 % (13 ТН), гель - 2,57 % (1 ТН)

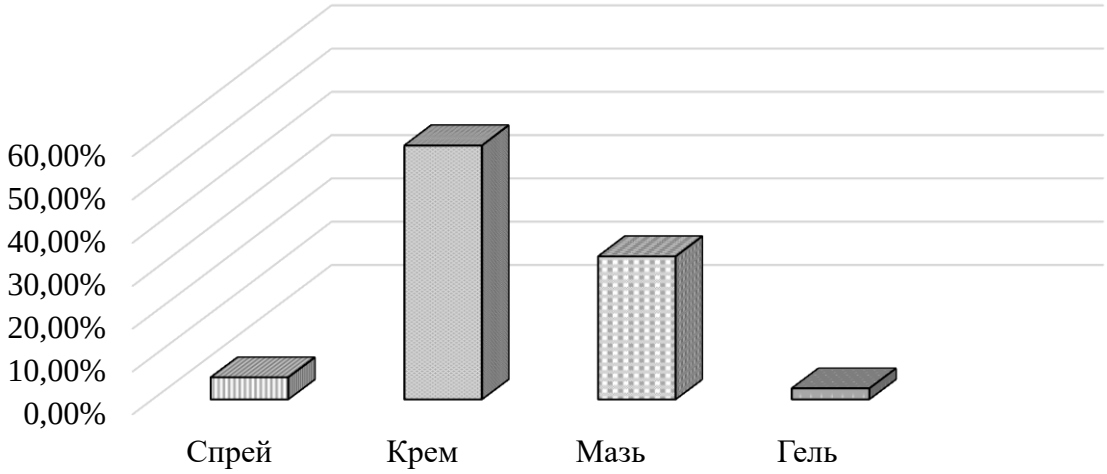



Рис. 1.4 Розподіл протигерпетичних лікарських засобів за формами випуску

Серед ЛЗ досліджуваної групи більшість засобів представлено у формі мазей та кремів, до складу яких входять синтетичні противірусні речовини.

До складу фітопрепаратів для лікування герпетичної інфекції входить обмежена кількість витяжок з ЛРС. Крім того, варто зауважити, що станом на 01.02.2023 р. на вітчизняному фармацевтичному ринку в сегменті

протигерпетичних ЛЗ присутній лише один препарат рослинного походження для місцевого застосування. Це препарат Фладекс-мазь, діючою речовиною якого є екстракт трави десмодіуму канадського виробництва ТЗОВ «ФК «Здоров'я»», Україна. Фладекс-мазь проявляє противірусну активність відносно вірусів лишаю пухирчастого (герпесу звичайного) і оперізуючого — Herpes simplex і Herpes zoster (додаток Е).

На фармацевтичному ринку України наявні лише 5 рослинних препаратів системної дії для лікування ГІ у різних ЛФ та лише один рослинний препарат для місцевого застосування (табл.1.2)

*Таблиця 1.2*

**Характеристика лікарських засобів рослинного походження для лікування герпевірусної інфекції, представлених на фармацевтичному ринку України**

| № п/п | Назва препарату, виробник | Форма випуску | Діючі речовини | Застосування |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **Коміновані лікарські засоби** | | | | |
| 1 | Протефлазід, ТОВ «НВК "Екофарм», Україна | краплі In bulk: № 35 (по 30 мл) In bulk: № 30 (по 50 мл у скляному флаконі)<br><br>Краплі по 10 мл, 30 мл, 50 мл у скляному флаконі,<br><br>супозиторії; по 5 супозиторіїв по 3 г у блістері | 1 мл крапель містить 1 мл рідкого екстракту Протефлазід (вміст флавоноїдів не менше 0,32 мг/мл у перерах. на рутин, вміст карбонових кислот не менше 0,30 мг/мл у перерах. на яблучну кислоту) із трави Щучки дернистої (Herba Deschampsia caespitosa L.) та трави Війника наземного (Herba Calamagrostis epigeios L.) (1:1)<br>1 супозиторій містить флавоноїди Протефлазіду, одержані із суміші (1:1) трави Щучки дернистої (Herba Deschampsia caespitosa L.) та трави Війника наземного (Herba Calamagrostis epigeios L.), не менше 1,8 мг | Здатний пригнічувати вірусоспецифічні ферменти тимідинкіназу і ДНК-полімеразу в клітинах, інфікованих ВПГ 1 і ВПГ 2 (Herpes simplex), що призводить до зниження здатності або повного блокування реплікації вірусних білків і перешкоджає розмноженню вірусів. Препарат стимулює продукування ендогенних альфа- і гамма- інтерферонів, що підвищує неспецифічну резистентність і нормалізує імунний статус організму. |

*Продовження табл. 1.2*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| 2 | Флавовір ТОВ «НВК "Екофарм», Україна | Сироп по 30 мл, або по 50 мл, або по 60 мл у флаконах з скла або пластику; по 1 флакону разом з дозуючою ємністю у пачці з картону | 1 мл сиропу містить: 0,02 мл рідкого екстракту Протефлазід, отриманого із суміші трав (1:1) Щучки дернистої (Herba Deschampsia caespitosa L.) та Війника наземного (Herba Calamagrostis epigeios L.) (розчинник екстракції – етанол 96 %), що еквівалентно не менше 0,0035 мг флавоноїдів у перерах. на рутин | |
| **Монокомпонентні** | | | | |
| 3 | Альтабор, ПАТ «НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна | таблетки по 20 мг, по 10 таблеток у блістері; по 2 блістери у пачці; по 20 або 60 таблеток у контейнерах пластикових з кришкою з контролем першого розкриття | 1 таблетка містить альтабору у перерахуванні на танінову кислоту та суху речовину 20 мг ДР - субстанція сухого екстракту суплідь вільхи сірої і вільхи клейкої, яка містить суміш елаготанінів моно- та олігомерного походження на основі фенолокислот (елагової, галової, дилактон валонієвої кислоти) | Механізм дії -індукція синтезу інтерферону, пригнічення активності нейрамінідази вірусу грипу, а також вірус-специфічної тимідинкінази вірусу герпесу, що призводить до припинення синтезу вірусної ДНК. Альтабор застосовують для профілактики та лікування грипу, гострих респіраторних вірусних інфекцій. |
| 4 | Еребра ПрАТ «Технолог», Україна | таблетки сублінгвальні по 0,02 г; по 10 таблеток у блістері; | 1 таблетка містить гіпораміну екстракту сухого (обліпихи крушиноподібної листя екстракту сухого, Hippophae rhamnoides L.), (6,5:1), екстрагент етанол – 70 %) з вмістом суми танінів у перерах. на казуаринін і абсолютно суху речовину 60 %) 20 мг | Механізм дії – інгібування вірусною нейрамінідази. ЛПЗ при грипі (А і В), парагрипі, РС-вірусній, аденовірусній та ін. гострих респіраторних вірусних інфекціях; ангінах на тлі гострих респіраторних вірусних захворювань; при гострих і рецидивуючих формах простого герпесу екстрагенітальної і генітальної локалізації, при оперізувальному лишаю, вітряній віспі та ЦМВ-інфекції. |
| 5 | Фладекс-мазь ТЗОВ «ФК «Здоров'я», Україна | Мазь 20 мг по 10 або 15 мг у тубі | Екстракт трави десмодіуму канадського родини бобових. ДР: флавоноїдні глікозиди 1 г мазі містить фладексану у перерах. на вміст суми флавоноїдів 30 % 20 мг | Місцева протизапальна, знеболювальна та протисвербіжна дія, має антиалергічні та десенсибілізуючі властивості, проявляє противірусну активність щодо вірусів лишаю пухирчастого і оперізуючого, а також стимулює репаративні процеси у шкірі. |

До комплексних фітопрепаратів належать препарати: протефлазид, флавовір (комбінація екстрактів трави щучки дернистої та трави війника наземного), до монопрепаратів – Альтабор (сухий екстракт суплідь вільхи сірої і вільхи клейкої), Еребра (екстракт листя обліпихи крушиноподібної). До монопрепаратів місцевої дії відноситься Фладексан-мазь. Усі фітопрепарати вітчизняного виробництва.

Рекомендовано поєднувати місцеву терапію у комбінації з використанням системних противірусних препаратів [144].

Також існує препарат Мангогерпін, «BV Pharma Joint Venture Company (BV Pharma)», В'єтнам крем 5 % у тубах (1 г містить мангіферину 0,05 г по 10,0 г) та капсули по 100 мг № 20. Препарати містять мангіферин, який отримують із трави копіїчника альпійського (*Hedysarum alpinum L.*), копіїчника жовтіючого (Hedysarumflavescens Rgl. et Schmalh.) родини метеликових або технічного мангіферину, який отримують з листя манго (*Mangifera indica L.)* родини сумахових. Препарат має противірусну активність щодо ДНК-вмісних вірусів (*Herpes simplex* I і II типу, *Varicella zoster*, меншою мірою – цитомегаловірусу і вірусу імунодефіциту людини). Інгібує репродукцію вірусу простого герпесу на ранніх стадіях його розвитку. Показаний для лікування первинних і рецидивуючих уражень шкіри і слизових оболонок, які спричинені вірусами *Herpes simplex* I і II типу, лікування вітряної віспи, оперізуючого лишаю, герпетиформної екземи Капоші, дерматозів вірусного генезу (червоного плескатого лишаю) [145].

Отже, герпетичне ураження шкіри та слизових оболонок, зумовлене ВПГ-1 та ВПГ-2, наразі є важливою медико-фармацевтичною, косметичною, а отже, і соціальною проблемою. Забезпечення населення ефективними, доступними та безпечними лікарськими засобами є одним з пріоритетних завдань фармації сьогодення, що свідчить про актуальність розробки інноваційних, безпечних і ефективних лікарських препаратів.

Висновки до розділу 1

1. Аналіз літературних джерел показав перспективи використання фітопрепаратів у терапії герпесвірусної інфекції. Мангіферин, отриманий з різних джерел та витяжки леспедези володіють противірусною активністю та додатковими фармакологічними ефектами (протизапальним, знеболювальним, антибактеріальним, антимікробним), мають антиоксидантні, мембраностабілізувальні та десенсибілізувальні властивості, що дозволяє ефективно використовувати їх при вірусних інфекціях, які можуть ускладнюватися бактеріальною інфекцією і супроводжуються запаленням та болем.

2. Проаналізовано і показано можливість використання в складі дерматологічних засобів *Lespedeza bicolor*. Встановлено, що екстракти рослин роду *Lespedeza* проявляють антиоксидантну, протизапальну, репаративну, естрогенну, антимікробну, протигрибкову, антитирозиназну активність і запобігають карієсу.

3. Огляд, аналіз і узагальнення літератури щодо джерел і методів отримання, фармакологічних властивостей та використання в медицині мангіферину продемонстрував доступність сировинної бази, широкий спектр фармакологічних властивостей і потенціал для використання в складі дерматологічних засобів. Перспективи створення топічних засобів підтверджуються здатністю мангіферину всмоктуватися через шкіру, за рахунок проникнення через роговий шар й транспорту в епідерміс і дерму. Встановлено, що мангіферин володіє антиоксидантною, протизапальною, антибактеріальну, протигрибковою, противірусною імуномодулювальною дією, необхідною для місцевих ЛЗ, призначених для терапії герпесу і низки інших інфекційно-папальних захворювань.

4. На підставі аналізу досвіду використання рослин роду Lespedeza в народній і традиційній медицині показано, що екстракти леспедези мають антиоксидантну, естрогенну, протизапальну, антимікробну, протигрибкову

активність, антитирозиназну активність і запобігають виникненню карієсу і є перспективною сировиною для створення дерматологічних засобів.

5. Дослідження ринку протигерпетичних ЛЗ продемонстрували, що серед ЛЗ досліджуваної групи переважна більшість це моно препарати, що містять синтетичні противірусні АФІ, більшість з яких випускається у формі мазей та кремів. Результати дослідження є підґрунтям для пошуку й розроблення нових ефективних противірусних фітозасобів вітчизняного виробництва для місцевого лікування ГІ.

6. Проаналізовано і показано можливість використання в складі дерматологічних засобів *Lespedeza bicolor*. Встановлено, що екстракти рослин роду *Lespedeza* проявляють антиоксидантну, протизапальну, репаративну, естрогенну, антимікробну, протигрибкову, антитирозиназну активність і запобігають карієсу.

*Основні положення даного розділу наведено в таких публікаціях*

1. Яромій М. В., Половко Н. П. Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації. *Аннали Мечниковського інституту.* 2023. № 1. С. 52–58. DOI:10.5281/zenodo.7721743

2. Яромій М. В., Половко Н. П. Перспективи створення м'якого лікарського засобу з мангіферином для терапії герпесу. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали ІІ Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 13 жовт. 2022 р.). Харків : НФаУ, 2022. С. 208.

3. Яромій М. В., Половко Н. П. Використання мангіферину у фармації та медицині. *Сучасні досягнення фармацевтичної справи* : зб. наук. пр. Харків : НФаУ, 2022. Вип. 1. С. 253.

4. Кисельова К. Є., Яромій М. В. Використання леспедези в народній і традиційній медицині. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та*

*їх фармакологічна корекція* : матеріали VI наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю (м. Харків, 16 листопада 2023 р.). Харків: НФаУ, 2023. С. 232.

5. А.с. 123958 Україна. Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації / М. В. Яромій, Н. П. Половко № 123958; опубл. 19.02.2024.

# РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДОЛОГІЇ ДОСЛІДЖЕННЯ. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

## 2.1 Обґрунтування загальної методології досліджень

Загальна методологія досліджень полягає у створенні науково-методичного підходу до розробки складу і технології оригінального лікарського засобу на основі АФІ рослинного походження антивірусної дії, яка базується на послідовному проведенні маркетингових, фізико-хімічних, фармако-технологічних, біофармацевтичних, біологічних (мікробіологічних та фармакологічних) досліджень, що були використані в процесі виконання експериментальної роботи.

На першому етапі здійснено аналіз даних літератури щодо світової практики поширення герпесвірусної інфекції; асортименту протигерпетичних ЛЗ (дані Державного реєстру ЛЗ України, класифікаційна система АТС (Компендіум), інструкції до медичного застосування ЛЗ); джерел та методів отримання, фармакологічних властивостей мангіферину; використання екстрактів рослин роду *Леспедеза* у медичній практиці та вирішено питання щодо розробки, вибору об’єкта дослідження, стратегії розробки, формування характеристики ЛЗ, що планується до розробки (рис.2.1)

За аналізом наукової літератури щодо різновидів і поширення герпесвірусної інфекції у світі метою нашої роботи було розробити склад і технологію оригінального лікарського засобу на основі АФІ рослинного походження, розробити і валідувати методики якісного і кількісного визначення діючих речовин в складі ЛЗ, провести дослідження специфічної фармакологічної активності розробленого засобу. Об’єктами дослідження були мангіферин, водний екстракт леспедези та гель антивірусної дії.

Другий етап складається з ряду експериментальних досліджень, що охоплюють фізико-хімічні та фармакотехнологічні дослідження з отримання

екстракту леспедези і гелю з леспедези екстрактом водним рідким (ЛЕВР) і мангіферином антивірусної активності, а також розробку методів ідентифікації

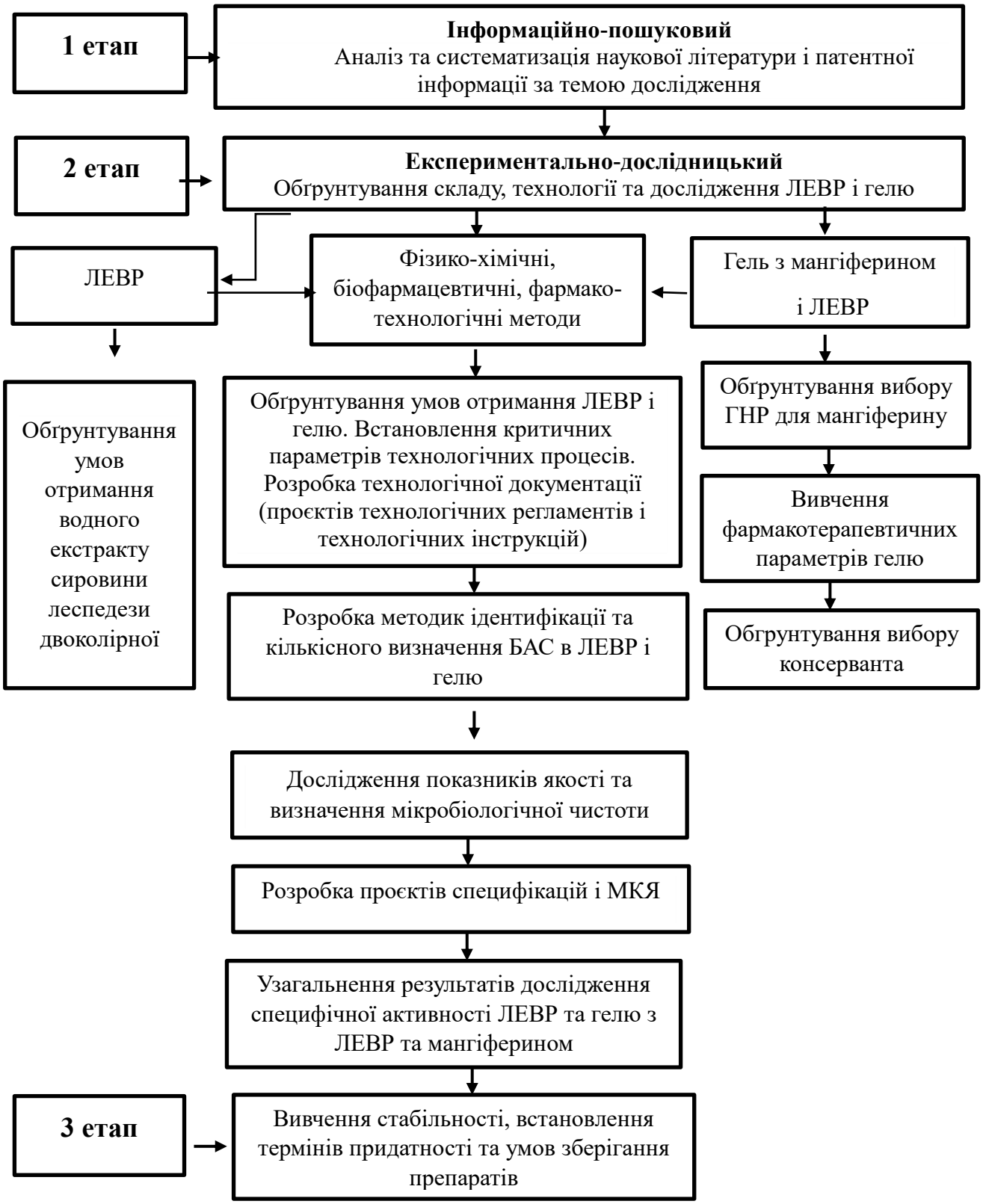



Рис 2.1 Узагальнений алгоритм проведення досліджень з розробки леспедези екстракту водного та гелю з мангіферином та водним екстрактом леспедези.

та кількісного визначення БАР в розробленому напівпродукті – ЛЕВР і досліджуваному гелі.

Метою другого блоку є отримання та дослідження водного екстракту леспедези та фармацевтична розробка гелю, яка складається з вибору АФІ та допоміжних речовин, оптимальної технології лікарської форми. При виконанні етапів другого блоку закладаються ефективність, якість і безпечність розробленого засобу.

Результатами другого блоку є дослідження умов отримання водного екстракту леспедези та розробка складу, технології та визначення показників якості лікарського засобу з мангіферином і екстрактом леспедези; розробка методик ідентифікації та кількісного визначення мангіферину, діючих речовин у водному екстракті леспедези та гелі противірусної дії; розробка НД (технологічної інструкції, проєктів МКЯ та технологічних регламентів).

На третьому завершальному етапі проводилася оцінка специфічної активності ЛЕВР та опрацьованого ЛЗ, вивчення стабільності та встановлення термінів придатності опрацьованих засобів.

## 2.2 Об’єкти дослідження

Об’єктами дослідження були: надземна частина леспедези двоколірної, водний екстракт леспедези двоколірної, мангіферин, гель з мангіферином та ЛЕВР, допоміжні речовини (ДР) та референс-зразки.

### 2.2.1 Характеристика діючих речовин, лікарської рослинної сировини, проміжних продуктів (рідкого екстракту), експериментальних зразків гелю

*Мангіферин* – світло-жовтий дрібнокристалічний порошок, отриманий із листя дерева манго (*Mangifera indica*), (виробник X’ian Pincredit Bio-Tech Co., Ltd, Китай, р. QC004). Субстанція містить 98,5% мангіферину:

Мангіферин (2-C-β-D-glucopyranosyl-1,3,6,7-тетрагідроксиксантон, 1,3,6,7-тетрагідрокси-2-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-три-гідрокси-6-(гідроксиметил)

оксан-2-їл]-9Н-ксантен-9-он), назва якого відповідно до IUPAC – 1,3,6,7-тетрагідрокси-2-[3,4,5-тригідрокси-6-(гідроксиметил)оксан-2-іл]ксантен-9-он (1S)-1,5-Anhydro-1-(1,3,6,7-tetrahydroxy-9-oxo9H-xanthen-2-yl)-d-glucitol, належить до ксантоноїдів, одного з класів природних сполук, які відносять до поліфенолів.

За фізико-хімічними властивостями мангіферин – світло-жовтий дрібнокристалічний порошок, розчинний у метанолі, гарячому 96 % етанолі, лугах і практично не розчинний у воді, хлороформі [31]. Молекулярна формула $C_{19}H_{18}O_{11}$. Молекулярна маса 422,35, температура плавлення 274°С. [146].

Розчинність у воді складає 1.44 мг/мл [108], log P – 0,59 log D (pH 7,4) – 0,80. Мангіферин є термостабільною молекулою [26].

*Леспедеза двоколірна* (*Lespedeza bicolor* Turcz., Leguminosae)

Об’єктом дослідження була повітряно-суха подрібнена надземна частина леспедези двоколірної (*Lespedeza bicolor* Turcz., родина Бобові), яка складається з суміші бутонів, квітів, листя і стебел. Сировину заготовляли у І декаді серпня 2022 р. у фенофазу масового цвітіння в колекції «Лікарські рослини» ботанічного саду ЛНУ ім. Івана Франка (Львів, Україна). Зразки, ідентифіковані ст. наук. співр. М. І. Скібіцькою. Зразки збережені в гербарії (LW) ЛНУ імені Івана Франка (LW0056630), Україна. Заготовлену сировину сушили за температури навколишнього середовища 20–24 °С, подрібнювали і використовували для ЛЕВР.

*Леспедези двоколірної екстракт водний рідкий*

Для отримання *водного екстракту* використовували надземну частину леспедези двоколірної (*Lespedeza bicolor* Turcz., Leguminosae). На першому етапі дослідження водні витяжки отримували шляхом настоювання сировини на водяній бані за співвідношення 1:10 з урахуванням коефіцієнта водопоглинання протягом 15 хв з подальшим настоюванням за охолодження протягом 45 хв. При обґрунтуванні умов екстрагування для отримання рідкого екстракту зразки отримували методом ремацерації з примусовим перемішуванням при температурі 95–100 ºС.

За зовнішнім виглядом досліджувані зразки – рідини від жовтого до жовтувато-коричнюватого забарвлення з характерним специфічним запахом.

*Дослідні зразки гелю* містили мангіферин, ЛЕВР та допоміжні речовини: карбопол, трометамол, воду очищену, ПЕО-400, етанол 96 %, кукурудзяну олію, полісорбат 80 (твін 80). Усі допоміжні речовини, які обрано для розробки гелю з ЛЕВР та мангіферином, дозволені до використання в складі ЛЗ і широко використовуються в фармацевтичній технології.

### 2.2.2 Характеристика допоміжних речовин

Для розробки складу ЛЗ використовували різні допоміжні речовини, що містяться в переліку допоміжних речовин, дозволених до застосування у складі ліків і затверджених наказом МОЗ [147].

*Гліцерин* – Гліцерин (Glycerolum, Glycerol, ДФУ 2.0, Т. 2) – сиропоподібна, маслянista на дотик, безбарвна або майже безбарвна, прозора рідина. Дуже гігроскопічний. Брутто-формула: C3H8O3 [56-81-5]; молекулярна маса: 92,1; хімічна назва – пропан-1,2,3-тріол. Вміст: не менше 98,0 % (м/м) і не більше 101,0 % (м/м), у перерахунку на безводну речовину. Змішується з водою і етанолом (96 %), мало розчинний в ацетоні, практично не розчинний у жирних і ефірних оліях [148].

*Пропіленгліколь* – Propyleneglycolum, ДФУ 2.0, Т. 2 – в’язка, прозора, безбарвна, гігроскопічна рідина. Брутто-формула: $C_3H_8O_2$ [57-55-6]; молекулярна маса: 76,1; хімічна назва – (RS)-пропан-1,2-діол. Змішується з водою та етанолом (96 %) [148]. Застосовується у виробництві лікарських та косметичних засобів як зволожувач і емолент; коригує реологічні, вологоутримувальні, осмотичні властивості в’язких систем, активує всмоктування діючих речовин в тканини шкіри [148-150].

*Поліетиленоксид-400* – Polyethylene Oxide (USPNF); (CAS №25322), син.: polyoxirane, polyoxyethylene, Polyox WSR. Хімічна формула $C_2nH_4n+2On+1$, n = 8.2 to 9.1; молярна маса 380–420 г/моль; густина 1.128 г/см$^3$; температура

плавлення 4–8°C (39– 6°F; 277–281 K; в'язкість 90,0 мм$^2$/с при 25 °C, 7,3 мм$^2$/с при 99 °C. Це безбарвна, прозора, в'язка, гігроскопічна рідина зі слабким характерним запахом і солодкуватим смаком. ПЕО-400 добре розчиняється у воді, ацетоні, бензолі, гліцерині, етанолі, хлороформі та ароматичних вуглеводнях. Він не змішується з аліфатичними вуглеводнями та діетиловим ефіром. Досить легко розчиняє лікарські речовини, мало- і важкорозчинні у воді (наприклад, кислоту бензойну і саліцилову, анестезин, камфору тощо). Завдяки високій осмотичній активності ПЕО-400 знайшов широке застосування в складі ЛЗ для першої фази ранового процесу, розчинів, призначених для обробки гнійних ранових поверхонь, а також як ДР, яка регулює абсорбційну здатність основи і підвищує швидкість вивільнення ЛР [149].

*Карбопол Ultrez 21* – Carbomera (Ph Eur), Carbomer (USPNF), Carbomers (BP) — група синтетичних високомолекулярних полімерів акрилової кислоти, зшитих аліловим етером сахарози або пентаеритриту. К. являють собою дрібні пухкі порошки білого кольору з розміром часток 2–7 мкм. Порошок К. з частинками 2–7 мкм у діаметрі не може бути подрібнений на менші частинки. Останнім часом отриманий гранульований К. з розміром частинок діаметром 180–245 мкм. Щільність (bulk) 1,76–2,08 г/ см$^3$; при 260 С — розкладається. Нормальний вміст вологи до 2% (додатково може поглинати вологу до 8–10 %). Вміст вологи не впливає на загусну здатність, проте робить його менш дисперсним. К. добре диспергуються у воді (при перемішуванні для запобігання утворенню грудок) з утворенням в'язких дисперсій зі складною матрицею хрестоподібних зв'язків, що ефективно утримують і легко вивільняють діючі речовини, мають низьке значення pH (пов'язано з наявністю у вихідному продукті 56–68 % кінцевих карбоксильних груп). К. утворюють стабільні водні дисперсії при значеннях pH, близьких до нейтральних (pH 6,0–10,0). Структурна в'язкість таких кислих колоїдних розчинів низька, але при нейтралізації отримуються гелі з високою структурною в'язкістю. При нейтралізації гідрогелів К. при pH від 6,0 до 11,0 перевагу мають органічні основи (триетаноламін, трометамол). Карбомери широко використовують у

виробництві різних ліків для внутрішнього та зовнішнього застосування: очних крапель, гелів, кремів, мазей, супозиторіїв, емульсій, суспензій, таблеток, драже, мікрокапсул, мікроклізм [149].

*Трометамол* (ДФУ 2.0, Т. 2) – IUPAC 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol. Є органічною сполукою з формулою $(HOCH_2)_3CNH_2$. CAS 77-86-1; Молекулярна маса 121,14; $C_4H_{11}NO_3$.Температура кипіння 219 С. Білий кристалічний порошок, розчинний у воді. Густина 1,328г/см$^3$ [148].

*Етанол (96 %)* (Ethanolum (96 per centum), ДФУ 2.0, Т. 2) – прозора, безбарвна, летка, легкозаймиста, гігроскопічна рідина. Брутто-формула: $C_2H_6O$; молекулярна маса: 46,07; вміст: не менше 95,1 % (об/об), 92,6 % (м/м) і не більше 96,9 % (об/об), (95,2 % (м/м) при температурі 20 ºС, розрахована з відносних густин із використанням алкоголеметричних таблиць. Змішується з водою і метиленхлоридом; горить блакитним бездимним полум'ям; кипить при температурі 78 ºС; відносна густина – від 0,805 до 0,812 г/см$^3$ . Застосовується як неводний розчинник [148].

*Полісорбат-80* (Твін-80, Tween 80, Polysorbatum 80) *(PhEur, USP, CAS №: 9005-65-6)* – суміш продуктів неповного ацилювання сорбіту та його ангідридів жирними кислотами, головним чином олеїновою кислотою, етоксильованих з приблизно 20 молями етиленоксиду на кожний моль сорбіту та ангідридів сорбіту. Маслянiста, в'язка, прозора або злегка опалесційна рідина жовтого або коричнево-жовтого кольору. Гідрофільно-ліпофільний баланс – 15,5, густина – 1,08 г / мл, pH 5 % водного розчину – 6,1, рекомендована концентрація – 1–5 % [151].

*Кукурудзяна олія* **–** олія кукурудзяна рафінована (Maydis oleum raffinatum, *PhEur*) – прозора оліеподібна рідина від світло-жовтого до жовтого кольору з характерним слабким запахом і солодкуватим смаком. Олію отримують із зародків чи насіння Zea mays L. методом пресування або екстракції, після чого піддають очищенню. Олія практично нерозчинна у воді й етанолі (96 %), змішується з вазеліновим маслом та метилен хлоридом; відносна густина

становить близько 0,920 г/см$^3$, йодне число – 111–133, температура застигання – від -10 °С до -15 °С; належить до напіввисихаючих олій [151,152].

*Калію сорбат* (Potassium Sorbate, *PhEur,* БрФ) – білий чи майже білий порошок або гранули. Брутто-формула: $C_6H_7KO_2$ [590-00-1]; молекулярна маса: 150,2; хімічна назва – калію (Е,Е)-гекса-2,4-дієноат. Вміст: 99,0 до 101,0 % у перерахунку на безводну речовину. Дуже добре розчинний у воді, частково розчинний у етанолі (96 %). Застосовують як антимікробний консервант [148].

*Вода очищена* (Aqua purificata, ДФУ 2.0, Т. 2) – прозора, безбарвна рідина без смаку і запаху. Брутто-формула: $H_2O$; молекулярна маса: 18,02; pH – 5,0–7,0 (потенціометрично) [148]. Вода очищена – це вода для приготування лікарських засобів, крім тих, які мають бути стерильними й апірогенними, якщо немає інших зазначень і дозволів компонентного уповноваженого органу. Отримують із води питної дистиляцією, іонним обміном або будь-яким іншим підхожим способом [148].

## 2.3 Методи досліджень

При виконанні роботи були використані сучасні органолептичні, фізико-хімічні, фармакотехнологічні, біохімічні, мікробіологічні, фармакологічні та статистичні методи досліджень. Дослідження проводили згідно з договорами про співпрацю в наукових та освітніх закладах України. Інформація про бази проведення досліджень наведен у відповідних розділах роботи.

### 2.3.1 Фізичні, фізико-хімічні та фармакотехнологічні методи дослідження

*Фізичні, фізико-хімічні та фармакотехнологічні методи дослідження леспедези екстракту водного рідкого*

Відповідно до вимог ДФУ 2.0 та ДФУ 1.2, екстракт контролювали за такими показниками якості: опис, ідентифікація, маса вмісту контейнера, мікробіологічна чистота, кількісне визначення [148,153-155].

*Визначення сухого залишку.* Сухий залишок досліджуваного екстракту визначають за методикою ДФУ 2.0, Т. 1 [153].

*Вміст важких металів* досліджували за методикою ДФУ 2.0, доп. 1 [155].

*Відносну густину* досліджували за методикою ДФУ 2.0, доп. 1 (*2.2.5*) [155].

*Об'єм вмісту контейнеру.* Випробування здійснюють на 10 пакованнях відповідно до ДСТУ 64-492-85. Об'єм вмісту контейнеру має бути від 97 до 103 мл.

*Фізичні, фізико-хімічні та фармакотехнологічні методи досліджень м'якої лікарської форми*

Відповідно до вимог ДФУ 2.0 та ДФУ 1.2, гель контролювали за такими показниками якості: опис, ідентифікація, однорідність, маса вмісту контейнера, мікробіологічна чистота, кількісне визначення. За необхідності додатково контролювали розмір часток, pH, реологічні властивості, герметичність контейнера тощо [148,153-155].

*Опис.* Контролювали зовнішній вигляд і характерні органолептичні властивості зразків МЛФ, а саме колір, консистенцію та ін. Для цього переглядали зразки гелів, нанесених на предметне скло шаром (2–4) мм з використанням кольорових стандартів [156].

*Запах* (ДФУ 2.0, 2.3.4.) [155].

*Визначення однорідності.* Однорідність зразків гелю визначали за методикою, наведеною в ДФУ 2.0, доп.1. [155].

*Маса вмісту контейнеру.* Випробування здійснюють на 10 пакованнях відповідно до ДСТУ 64-492-85. Маса вмісту контейнеру має бути від 9,7 до 10,3.

*Визначення термостабільності.* Для дослідження термостабільності МЛФ для кожного зразка використовували 5 скляних пробірок діаметром 15 мм і висотою 150 мм. Пробірки наповнюють (8–10) мл досліджуваних зразків і вміщають їх у термостат марки ТС-80 МГ із температурою (42,5 ± 2,5) °С на 7 діб. Після цього зразки переносять на 7 діб у холодильник із температурою (6 ±

2) °С і потім протягом 3 діб витримують їх при кімнатній температурі. Стабільність визначають візуально: якщо в жодній пробірці не спостерігають розшарування, то зразок вважають стабільним [156].

*Визначення колоїдної стабільності.* Для тесту використовували лабораторну центрифугу Т 62 з набором пробірок, ртутний термометр з інтервалом вимірюваних температур від 0 до 100 °С і ціною поділки 1 °С, а також секундомір і водяну баню. Пробірки наповнюють на 2/3 об'єму (приблизно 9 г) досліджуваними зразками (так, щоб маси пробірок з препаратом не відрізнялись більш, ніж на 0,02 г, і зважують з точністю до 0,01. Потім пробірки вміщають у водяну баню при температурі (42,5 ± 2,5) °С на 20 хв, після чого насухо витирають із зовнішнього боку і розміщують в гнізда центрифуги. Центрифугують протягом 5 хв зі швидкістю 6000 об/хв. Зразок вважають стабільним, якщо після центрифугування в пробірках не спостерігається розшарування. Якщо хоча б в одній із пробірок спостерігається розшарування зразка або виділення осаду, аналіз проводять повторно з новими порціями. Якщо при повторному тесті виявляють хоча б одну пробірку з розшаруванням, зразок вважають нестабільним [156].

*Структурно-механічні властивості* досліджували методом ротаційної віскозиметрії (ДФУ 2.0, т. 1, п. 2.2.10) [153]. Дослідження реологічних (структурно-механічних) властивостей експериментальних зразків гелю здійснювали реовіскозиметром Rheolab QC (Anton Paar, Австрія) з використанням системи коаксіальних циліндрів C-CC27/SS. Прилад відповідає вимогам стандарту ISO 3219. Реометр Rheolab QC оснащений програмним забезпеченням RheoPlus, яке дозволяє встановлювати необхідні умови виконання експерименту (діапазон швидкості зсуву, кількість точок виміру і тривалість виміру однієї точки, температуру). Вимірювання реологічної кривої проводили в три етапи: а) лінійне збільшення градієнта швидкості зсуву від 1 $s^{-1}$ до 350 $s^{-1}$ з 106 точками виміру і тривалістю виміру точки 1 s; б) постійний зсув при швидкості зсуву 350 $s^{-1}$, одна точка виміру тривалістю 1 s; в) лінійний спад градієнта швидкості зсуву від 350 $s^{-1}$ до 1 $s^{-1}$ з 106 точками виміру і тривалістю

виміру точки 1 s. Діапазон градієнта швидкості зсуву 1–350 $s^{-1}$ відповідає діапазону швидкості 0,78–271 об/хв. Температура дослідження реологічних властивостей зразків становила 25 ± 0,5 °С, кожен зразок термостатували упродовж 20 хв.

*Коефіцієнт динамічного розрідження* (плину) визначали при швидкостях зсуву 3,45 і 10,4 $s^{-1}$, що відповідають швидкості зсуву долоні при розподілі м'якої лікарської форми по поверхні і в'язкості системи при швидкостях зсуву 27,7 і 100 $s^{-1}$, які відповідають швидкостям при технологічній обробці в процесі її виготовлення [150]. На підставі отриманих результатів розраховували величини коефіцієнтів динамічного розрідження системи.

Коефіцієнти динамічного ($К_d$) розрідження розраховували за формулою.

$$K_d = \frac{\eta_П - \eta_К}{\eta_П} \cdot 100\%, \qquad (2.1)$$

де: $К_d$ − коефіцієнт динамічного розрідження;

$\eta_П$ – структурна в'язкість при мінімальних швидкостях зсуву;

$\eta_К$ – структурна в'язкість при максимальних швидкостях зсуву.

Для більш повної характеристики досліджуваних зразків були розраховані показники механічної стабільності (МС). Значення МС визначається як відношення величини напруги зсуву до руйнування ($\tau_1$ ) до величини напруги зсуву після руйнування ($\tau_2$ ) при швидкості зсуву 3,45 $s^{-1}$ [150].

*Механічна стабільність* (МС) характеризує ступінь руйнування структури в процесі незворотної деформації. Оптимальним значенням МС є 1 [150]. Значення МС експериментальних зразків гелю розраховують як відношення величини межі міцності структури перед руйнуванням ($\tau_1$) до величини межі міцності після руйнування ($\tau_2$):

$$МС = \tau_1 / \tau_2. \qquad (2.2)$$

Для дослідження екструзійних властивостей основ розраховують *коефіцієнт динамічного розрідження* за формулою:

$$Kd = \eta_{18,6} - \eta_{93,0} \text{ x } 100\% \ \eta_{18,6}, \qquad (2.3)$$

де: $\eta_{18,6}$ – в'язкість основи при швидкості зсуву 18,6 $с^{-1}$;

$\eta_{93,0}$ – в'язкість основи при швидкості зсуву 93,0 $с^{-1}$ [150].

*Визначення величини pH***.** Величину pH вимірювали згідно з ДФУ 2.0, 2.2.3. – потенціометрично за допомогою лабораторного приладу pH-150-MI (ТОВ «Вимірювальна техніка», Україна) [153].

*Мікроскопічні дослідження мангіферину, його дисперсії з обраними розчинниками та дослідні зразки гелів* здійснювали методом оптичної мікроскопії (ДФУ 2.0, том 1, п. 2.9.37) [153] за допомогою лабораторного мікроскопа Granum R-40 (Китай) з вбудованою цифровою відеокамерою DCM 310 та ахроматичним об´єктивом стандарту DIN: 40х. В комбінації з 10-кратним окуляром отримували збільшення мікроскопа: 400х. Для візуалізації зображень знімки виводили на екран та обробляли за допомогою програми Toup View 3,7.

*Вологоутримувальну здатність* дослідних зразків гелів досліджували ваговим експрес-методом за ДФУ 2.0 шляхом висушування інфрачервоним промінням на вологомірі торсійних терезів ВТ-500 [153].

Вологовміст визначають за формулою:

$$u = (G_{вол.} - G_{сух.}) / G_{вол.} \cdot 100\%, \qquad (2.4)$$

де: $G_{вол.}$ – маса матеріалу до висушування, г;

$G_{сух.}$ – маса висушеного матеріалу, г

*Дослідження осмотичної активності* гелів. Дослідження природили при температурі 34 ± 1 $^{o}$C (зразки витримували у термостаті ТС-80М-2) у дослідах *in vivo* методом діалізу через напівпроникну целофанову мембрану. Як мембрану використовували інертний целюлозний матеріал Cuprophan, Type 150 pm, шириною (11 ± 0,5) мкм [153]. Масу внутрішнього циліндра діалізатора, на який поміщали дослідні зразки, визначали на електронних вагах через кожну годину впродовж 8 годин експерименту. Кількість рідини, яку поглинають дослідні зразки (з наважкою 10,0 г), виражали у відсотках до зразків.

*Визначення кінетичних параметрів зразків* проводили методом діалізу через напівпроникну мембрану діалізатору, що складається з двох камер. На першу камеру з діаметром 50 мм, площею – 1963 мм$^2$, накладали регенеровану діалізну целюлозну мембрану Cuprophan (Medicell International Ltd., Лондон, Великобританія), поміщали наважку дослідного зразка (10,0 г), рівномірно розподіляли на поверхні мембрани і збирали діалізатор. В рецепторну камеру вносили діалізну рідину – фосфатний буферний розчин з pH 6,0 PI, який готували за ДФУ [153]. Діалізатор поміщали у термостат ТС-20 з температурою (34 ± 1) °С. Відбір проб (аліквот) проводили кожні 60 хв впродовж 5 год. У відібраних пробах визначали вміст мангіферину методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці.

*Маса вмісту паковання препарату.* Три контейнери разом з препаратом зважують, кожну окремо, з точністю 0,01 г. Контейнери ретельно звільняють від гелю, зробивши на них подовжній розріз ножицями, промивши кожен контейнер гарячою водою, старанно видаляючи залишки води фільтрувальним папером і знову зважують [155].

*Статистичний аналіз результатів дослідження* проводили відповідно до методик ДФУ 2.0, том 1, п. 5.3 [153].

### 2.3.2 Методи ідентифікації та кількісного визначення біологічно активних речовин

Аналітичні дослідження методом тонкошарової хроматографії проводили на хроматографічних пластинках Silica gel 60 фірми Merk, спектрофотометричні випробування здійснювали на спектрофотометрі Evolution 60s з використанням реактивів, що відповідають вимогам ДФУ [153].

*Методи ідентифікації та кількісного визначення біологічно активних речовин у ЛЕВР*

Для ідентифікації біологічно активних речовин водного екстракту леспедези використовували хімічні реакції та метод тонкошарової хроматографії (ТШХ).

*Хімічні реакції*

*Реакції на флавоноїди.* Для ідентифікації біологічно активних речовин водного екстракту використовували хімічні реакції. Перед проведенням випробувань 5,0 мл водного екстракту вміщують у мірну колбу на 25,0 мл і доводять водою до мітки.

*Ціанідинова проба в модифікації за Бріантом*: до 1 мл отриманого розчину вилучення (екстракту) додають 2-3 краплі кислоти хлоридної концентрованої та металічний магній, у результаті утворюється забарвлений в рожевий колір розчин.

*Реакція з 2 % спиртовим розчином алюмінію хлориду*: до 1 мл отриманого розчину додають 1 мл 2 % спиртового розчину алюмінію хлориду; утворюється яскраве зеленувато-жовте забарвлення.

*Реакція з 10 % спиртовим розчином лугу*: до 1 мл отриманого розчину екстракту додають 10 % спиртовий розчин калію гідроксиду; утворюється розчин жовтого кольору.

*Реакція з мінеральними кислотами*: до 1 мл отриманого розчину екстракту додають розчин сульфатної кислоти (1:4); утворюється розчин малинового забарвлення.

*Реакції на феноли і дубильні речовини.* До 1 мл отриманого розчину екстракту додають 2 мл 2 % розчину $FeCl_3$, утворюється синьо-зелене забарвлення.

*Реакції на вуглеводи.* Рівний об’єм реагентів мідно-тартратний 1 і мідно-тартратний 2 змішують разом і до 2 мл цього розчину додають 1 мл розчину вилучення і обережно кип’ятять. Цегляно-червоний осад з’являється в нижній частині пробірки, що свідчить про присутність відновлювальних цукрів.

*Метод ТШХ*

*Метод ідентифікації флавоноїдів*

*Випробовуваний розчин.* 0,1 мл екстракту доводять до 5,0 мл етанолу 40 % або 70 % (залежно від використовуваного розчинника).

*Розчин порівняння*. 2,5 мг *пірогалолу Р, 2,5 мг фруктози Р* розчиняють у 2,5 мл *метанолу Р*.

*Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю Р*.

*Рухома фаза: вода Р – мурашина кислота безводна Р – етилацетат Р (5:10:85).*

*Об'єм проби:* на лінію старту хроматографічної пластинки наносять *10 мкл випробуваного розчину* (на відстані 1,5 см від краю), *5 мкл розчину порівняння, смугами*.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування*: на повітрі, до зникнення запаху розчинника (сушать у витяжній шафі).

*Виявлення:* обробляють *анісового альдегіду розчином Р*, нагрівають за температури 100–105 °С протягом 5 хв до проявлення плям. Переглядають за денного світла.

*Випробовуваний розчин*. 0,1 мл спиртової витяжки леспедези двоколірної вміщують у мірну колбу місткістю 5,0 мл і доводять до об'єму 40 % або 70 % спиртом (залежно від використовуваного екстрагента).

*Розчин порівняння.* 1 мг рутину, 5 мг кверцетину, 5 мг хлорогенової кислоти і 5 мг кофейної кислоти розчиняють у 10 мл метанолу.

*Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю Р*.

*Рухома фаза: бутанол Р – оцтова кислота безводна Р – вода Р (4:1:2)*.

*Об'єм проби:* на лінію старту хроматографічної пластинки наносять *10 мкл випробуваного розчину, 5 мкл розчину порівняння, смугами*.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 12 см від лінії старту.

*Висушування*: на повітрі, до зникнення запаху розчинника 30 хвилин.

*Виявлення:* обробляють 5 % розчином алюмінію хлориду в метанолі, висушують у потоці теплого повітря і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

*Методика кількісного визначення флавоноїдів у ЛЕВР*

Для кількісної оцінки вмісту речовин флавоноїдної будови використовували метод абсорбційної спектрофотометрії у видимій ділянці після отримання забарвленого розчину водного екстракту леспедези двоколірної після взаємодії з розчином алюмінію (III) хлоридом в оцтовокислому середовищі.

*Випробовуваний розчин.* 0,5 мл водного екстракту вміщують в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 1,0 мл розчину 20 г/л алюмінію хлориду у метанолі, доводять об'єм 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної у метанолі до мітки та перемішують.

*Розчин порівняння.* 0,020 г рутину вміщують у мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняють у 25 мл метанолу та доводять розчин тим же розчинником до мітки. 1,0 мл отриманого розчину вміщують в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 1,0 мл розчину 20 г/л алюмінію хлориду у метанолі, об'єм 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної у метанолі до мітки та перемішують.

*Компенсаційний розчин.* 0,5 мл водного екстракту доводять розчином 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної у метанолі до об'єму 25,0 мл.

Оптичну густину випробовуваного розчину вимірюють через 30 хв після приготування за довжини хвилі 408 нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст суми флавоноїдів (X, мг) у перерахунку на рутин обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 5{,}0 \cdot 1{,}0 \cdot 1000}{A_0 \cdot V \cdot 50{,}0 \cdot 25{,}0} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 20}{A_0 \cdot V}, \qquad (2.5)$$

де: A – оптична густина випробуваного розчину;

$A_0$ – оптична густина розчину стандартного зразка рутину;

$m_0$ – маса наважки рутину, г;

V – об'єм екстракту, взятий для аналізу, мл.

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин у 1,0 г рідкого екстракту має бути не менше 0,5 мг.

Для оцінки запропонованої методики для визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів проведена низка паралельних вимірювань та для отриманих результатів проведена статистична обробка даних.

Для вивчення валідаційних характеристик використовували підхід до валідації БАС у рослинних препаратах описаних в літературі [157,158].

*Методика кількісного визначення танінів у ЛЕВР*

*Випробовуваний розчин.* 0,1 мл відповідного екстракту вміщують у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 0,1 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу, 2 мл насиченого розчину натрію карбонату, доводять об'єм водою до мітки та перемішують.

*Розчин порівняння.* 0,020 г пірогалолу вміщують у мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняють у 25 мл води та доводять розчин тим же розчинником до мітки. 0,1 мл отриманого розчину вміщують у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 0,1 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу, 2 мл насиченого розчину натрію карбонату, доводять об'єм водою до мітки та перемішують.

*Компенсаційний розчин.* Вода.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 710 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Вміст суми поліфенольних сполук (X, %) у перерахунку на пірогалол обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 20{,}0 \cdot 0{,}1 \cdot 100}{A_0 \cdot V \cdot 20{,}0 \cdot 50{,}0} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 2}{A_0 \cdot V}, \qquad (2.6)$$

де: A – оптична густина випробуваного розчину;

$A_0$ – оптична густина розчину стандартного зразка пірогалолу;

$m_0$ – маса наважки пірогалолу, г.

*Методика кількісного визначення сполук поліфенольної будови в ЛЕВР*

Кількісне визначення сполук поліфенольної будови проводили методом абсорбційної спектрофотометрії.

*Випробовуваний розчин.* Наважку 0,500 г водного екстракту доводять водою очищеною до об'єм 250,0 мл. Суміш фільтрують крізь фільтрувальний папір діаметром 125 мм. Відкидають перші 50 мл фільтрату.

*Сума поліфенолів*. 5,0 мл фільтрату доводять водою очищеною до 25,0 мл. Суміш 2,0 мл одержаного розчину, 1.0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву і 10,0 мл очищеної води доводять розчином 290 г/л натрію карбонату до об'єму 25,0 мл. Через 30 хв вимірюють оптичну густину розчину за довжини хвилі 760 нм ($A_1$), використовую чи як компенсаційний розчин *воду Р*.

*Стандартний розчин.* Безпосередньо перед випробуванням 50.0 мг *пірогалолу Р* розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 5,0 мл одержаного розчину доводять очищеною водою до об'єму 100,0 мл. Суміш 2,0 мл одержаного розчину, 1,0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву і 10,0 мл очищеної води доводять розчином 290 г/л натрію карбонату до об'єму 25,0 мл.

Через 30 хв вимірюють оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм ($A_2$), використовуючи як компенсаційний розчин воду Р.

Вміст суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол, у міліграмах, у перерахунку на суху речовину обчислюють за формулою:

$$x, \text{мг} = \frac{625 \cdot A_1 \cdot m_2}{A_2 \cdot m_1} \qquad (2.7)$$

де: $m_1$ – маса наважки рідкого екстракту, у грамах;

$m_2$ – маса пірогалолу, у грамах.

Вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол у 1,0 г рідкого екстракту має бути не менше 35 мг.

Для оцінки запропонованої методики для визначення кількісного вмісту суми поліфенолів проведена низка паралельних вимірювань та отримані результати метрологічно атестовані.

*Методика кількісного визначення мангіферину в діалізній рідині при проведенні біофармацевтичних досліджень*

Незважаючи на широке застосування селективних методів аналізу ЛП, як високоефективна рідинна хроматографія, спектрофотометричні методи зберігають важливе місце для контролю якості ЛЗ, фармакотехнологічних випробувань і вивчення стабільності нових лікарських форм, тому саме метод абсорбційної спектрофотометрії використовували при проведенні біофармацевтичних досліджень.

Для застосування в аналізі мангіферину методу абсорбційної спектрофотометрії, необхідно було вивчити характер спектру поглинання. Як розчинник використовували 70 % етанол, реєстрували абсорбційний спектр поглинання 0,004 % спиртового розчину мангіферину в ділянці від 220 нм до 400 нм (рис. 2.3).

Установлено, що абсорбційний спектр поглинання 0,004 % розчину мангіферину в 70 % етанолі характеризується наявністю чотирьох максимумів поглинання за довжин хвилі 241 нм, 259 нм, 320 нм і 373 нм. Максимуми поглинання за довжин хвилі 320 нм і 373 нм більш специфічні, але максимум при 373 нм більш інтенсивніший.

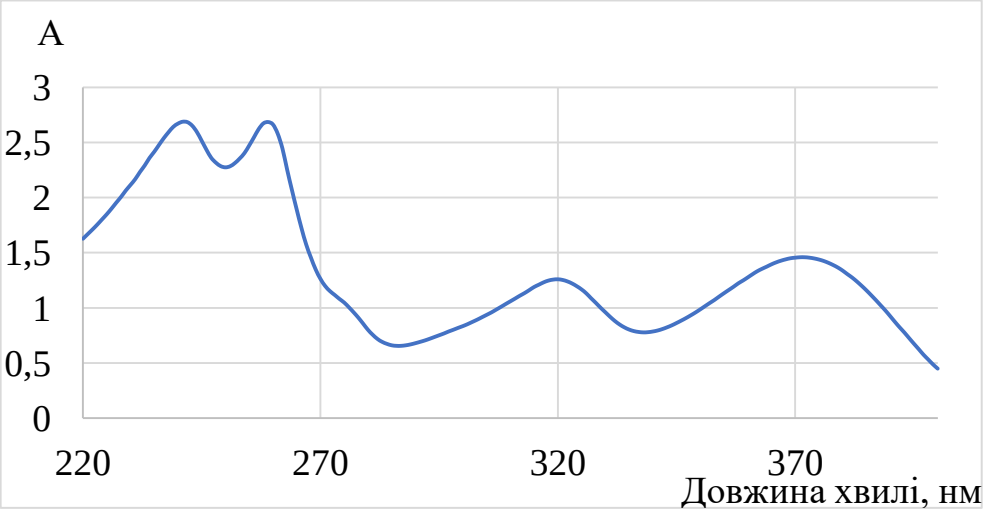



Рис. 2.3 Абсорбційний спектр поглинання 0,004 % спиртового розчину мангіферину

Для подальшого використання методу спектрофотометрії для ідентифікації та кількісної оцінки мангіферину в аналізі готових лікарських

засобів, доцільно було обрати аналітичну довжину хвилі і вивчити підпорядкування спиртових розчинів сполуки основному закону світлопоглинання за 373 нм.

*Методика виготовлення стандартних спиртових розчинів мангіферину*.

0,050 г (точну наважку СЗ мангіферину (містить 99,5 % мангіферину, виробник Shaanxi, Китай), вміщують в мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняють в 25 мл 70 % етанолу і доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки.

З отриманого розчину готували стандартні розчини розведенням різних об’ємів у мірних колбах місткістю 25,0 мл і доводили об'єм розчину етиловим спиртом 70 % до мітки. Вимірювали величину оптичної густини досліджуваних розчинів на спектрофотометрі Evolution 60s (Thermo Fisher Scientific, США) за довжини хвилі 373 нм. Як компенсаційний розчин використовували 70 % етанол (табл. 2.1, рис. 2.4). При роботі використовували аналітичні ваги «AXIS», (Польща), мірний посуд класу А і реактиви, що відповідають вимогам Державної Фармакопеї України [153].

*Таблиця 2.1*

**Визначення оптичної густини стандартних спиртових розчинів мангіферину різних концентрацій**

| № п/п | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **С, %** | ),0002 | ),0004 | 0,0006 | 0,0008 | ),0010 | 0,0012 | ),0014 | ),0016 | ),0018 | ),0020 |
| **А** | 0,097 | 0,173 | 0,268 | 0,344 | 0,435 | 0,508 | 0,591 | 0,672 | 0,759 | 0,842 |
| $A_{1\text{см}}^{1\%}$ | 485 | 433 | 447 | 430 | 435 | 423 | 422 | 420 | 422 | 421 |

Установлено, що підпорядкування спиртових розчинів мангіферину за довжини хвилі 373 нм закону Бугера-Ламберта-Бера спостерігається в межах концентрації сполуки від 0,002 мг/мл до 0,020 мг/мл (рис. 2.4)

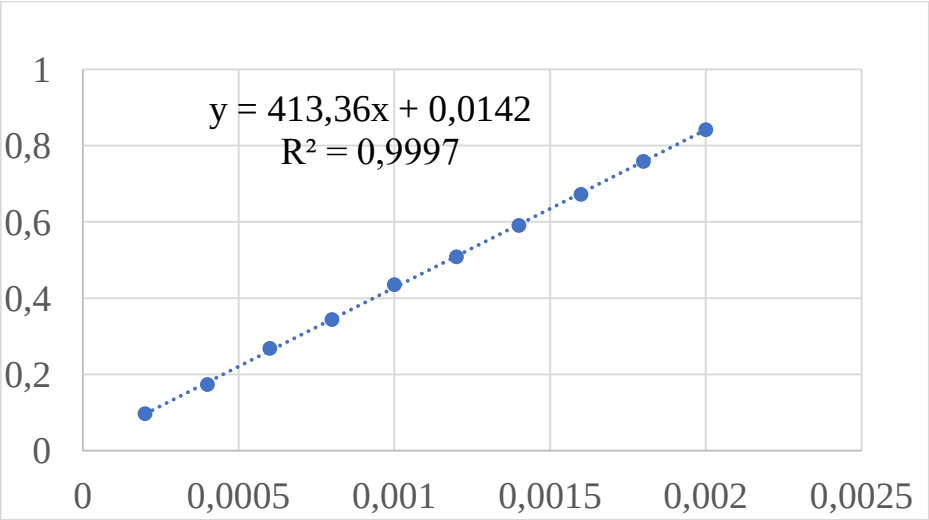



Рис. 2.4 Градуювальний графік залежності оптичної густини від концентрації стандартних спиртових розчинів мангіферину

Як показали результати подальших досліджень, спиртове вилучення з гелю характеризується наявністю максимумів поглинання за тих же довжин хвиль, що і розчин стандартного зразку мангіферину (рис. 2.5).

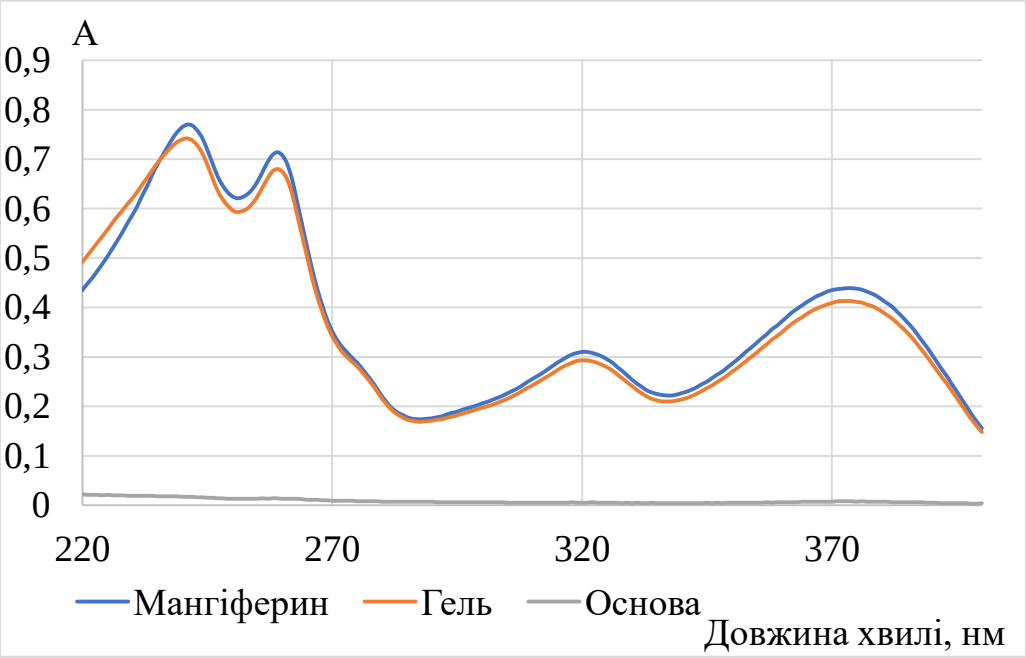



Рис. 2.5 Абсорбційні спектри поглинання спиртових розчинів: 1 – СЗ мангіферину, 2 – вилучення з гелю, 3 – основи

Вивченню валідаційних характеристик піддавали наступну методику кількісного визначення.

*Методика кількісного визначення.* Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* 1,000 г гелю вміщують в мірну колбу місткістю 50,0 мл, збовтують з 25 мл 70 % етанолу впродовж 15 хвилин і доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки. Отриманий розчин при необхідності фільтрують. 2,0 мл отриманого розчину доводять 70 % етанолом до 200,0 мл.

*Розчин порівняння.* 0.050 г (точна наважка) СЗ мангіферину вміщують в мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняють в 25 мл 70 % етанолу і доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки. 2,0 мл отриманого розчину доводять 70 % етанолом до 200,0 мл.

*Компенсаційний розчин.* 70 % спирт етиловий.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння на спектрофотометрі при довжині хвилі 373 нм.

Вміст мангіферину (х) у відсотках розраховують за формулою:

$$x = \frac{A_x \cdot m_o \cdot 50{,}0 \cdot 2{,}0 \cdot 200{,}0 \cdot 100 \cdot \%СЗ}{A_o \cdot m_н \cdot 50{,}0 \cdot 2{,}0 \cdot 200{,}0 \cdot 100} = \frac{A_x \cdot m_o \cdot 100 \cdot \%СЗ}{A_o \cdot m_н 100}, \qquad (2.8)$$

де $A_x$ – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_o$ – оптична густина розчину СЗ мангіферину;

$m_o$ – маса наважки СЗ мангіферину, г;

$m_н$ – маса наважки гелю, г.

Згідно з вимогами ДФУ [153,158] для оцінки коректності методики при виконанні аналізу в іншій лабораторії було розраховано загальну невизначеність методики аналізу. Розрахунки невизначеності пробопідготовки проводили, враховуючи вимоги ДФУ до гранично допустимих похибок для мірного посуду, вагів та приладів (табл. 2.2).

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не повинна перевищувати максимально допустиму невизначеність результатів аналізу $As_{max}$.

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0{,}40^2 + 0{,}17^2 + 0{,}61^2 + 0{,}10^2 + 0{,}02^2 + 0{,}17^2 + 0{,}61^2 + 0{,}10^2} = 0{,}99\%$$

*Таблиця 2.2*

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення мангіферину**

| Операція пробопідготовки | Параметр розрахункової формули | Невизначеність, % |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| розчин порівняння | | |
| 1) взяття наважки РСЗ мангіферину | $m_0$ | 0,2 мг/50 мг 100% = 0,40 |
| 2) доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 50,0 мл | 50,0 | 0,17 |
| 3) взяття аліквоти піпеткою 2,0 мл | 2,0 | 0,61 |
| 4) доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 200,00 мл | 200,0 | 0,10 |
| випробовуваний розчин | | |
| 5) взяття наважки гелю | $m_1$ | 0,2 мг/1000 мг 100% = 0,02 |
| 6) доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 50,0 мл | 50,0 | 0,17 |
| 7) взяття аліквоти піпеткою 2,0 мл | 2,0 | 0,61 |
| 8) доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 200,00 мл | 200,0 | 0,10 |

Повна прогнозована невизначеність запропонованої аналітичної методики складає:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0{,}99^2 + 0{,}70^2} = 1{,}21\% \leq max\Delta_{As}1{,}60\%.$$

Таким чином, хоча пробопідготовка впливає на результати аналізу $\Delta_{SP}$ 0,99% ≥ $\Delta_{SP_{max}}$0,51%, прогнозована повна невизначеність результатів методики кількісного визначення $\Delta_{As}$ не перевищує критичного значення $\Delta_{As_{max}}$1,60%, таким чином методика буде давати коректні результати і в інших лабораторіях.

Для того, щоб аналітична методика гарантувала достовірні та точні результати аналізу, передбачена процедура валідації аналітичних методик. Згідно з ДФУ запропонована методика кількісного визначення мангіферину була перевірена за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, діапазон застосування, точність, правильність та робасність [153].

*Лінійність* визначали в межах концентрацій від 80% до 120% від номінальної, обраної в межах, в яких спостерігається підпорядкування основному закону світлопоглинання. Для отримання розчинів з відомою концентрацією готували модельні суміші випробовуваного гелю та проводили визначення за запропонованою методикою. За отриманими даними будували графік залежності оптичної густини від концентрації аналізованого розчину (рис. 2.6).

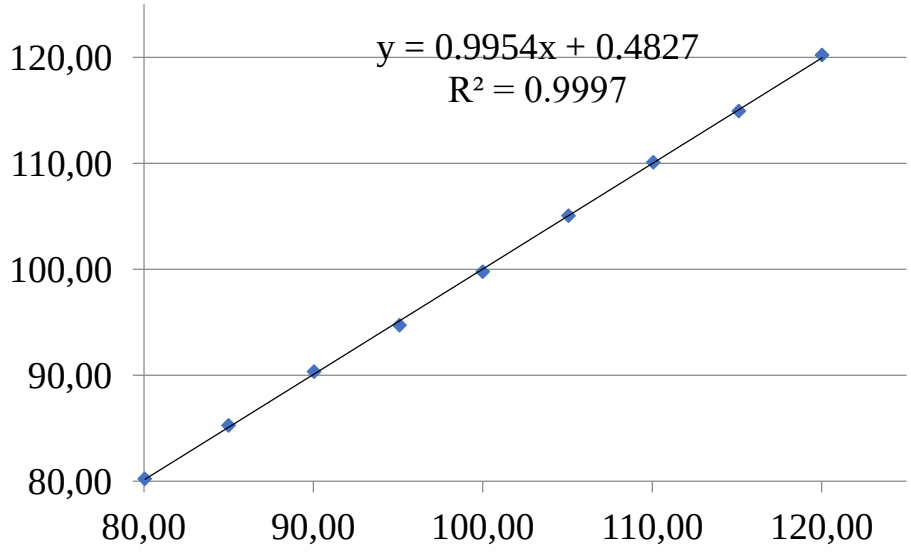



Рис. 2.6 Лінійна залежність оптичної густини від концентрації мангіферину в нормалізованих координатах

Як видно з даних, наведених у таблиці 2.3, методика лінійна у всьому

зазначеному діапазоні концентрацій. Отже, діапазон застосування методики складає 80–120 % від номінального вмісту мангіферину в лікарському засобі (табл.2.3).

*Таблиця 2.3*

**Метрологічні характеристики лінійної залежності**

| Найменування величини | Значення | Критерії | Висновок (відповідає чи ні) |
|---|---|---|---|
| b | 0,9954 | – | – |
| $S_b$ | 0,0060 | – | – |
| a | 0,4827 | 1) ≤ 1,8595* $s_a$;<br>2) якщо не виконується 1), то ≤ 2,60 | відповідає |
| $S_a$ | 0,6069 | – | – |
| $S_0$ | 0,2332 | ≤ 0,84 | відповідає |
| r | 0,9999 | ≥ 0,9981 | відповідає |

*Прецизійність* методики визначали на рівні збіжності. Для цього проводили дев’ять паралельних визначень (три наважки/три повтори). За отриманими результатами розраховували метрологічні характеристики (табл. 2.4).

*Таблиця 2.4*

**Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка**

| № модельного розчину | Введено у % до концентрації розчину порівняння (Хіфакт%) | Оптичні густини Ai (Ast=0,435) | Знайдено у % до концентрації розчину порівняння (Yi%) | Знайдено у % до введеного Zi=100(Yi/Xi) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

*Продовження табл. 2.4.*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 80,06 | 0,349 | 80,23 | 100,21 |
| 2 | 85,01 | 0,371 | 85,29 | 100,33 |
| 3 | 90,04 | 0,393 | 90,34 | 100,34 |
| 4 | 95,10 | 0,412 | 94,71 | 99,59 |
| 5 | 100,00 | 0,434 | 99,77 | 99,77 |
| 6 | 105,07 | 0,457 | 105,06 | 99,99 |
| 7 | 110,08 | 0,479 | 110,11 | 100,03 |
| 8 | 115,11 | 0,500 | 114,94 | 99,85 |
| 9 | 120,03 | 0,523 | 120,23 | 100,17 |
| середнє Z% | | | | 100,03 |
| відносне стандартне відхилення, Sz% | | | | 0,26 |
| відносний довірчий інтервал $\Delta_{As}$%=t(95%,8) · Sz | | | | 0,48 |
| критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As}$% | | | | 1,60% |
| систематична погрішність δ | | | | 0,03 |
| критерій невизначеності систематичної погрішності 1) δ≤Δas/(g)^0,5=0,72/√9, 2) якщо не виконується 1), то δ≤0,72 | | | | 0,24 |
| загальний висновок про методику коректна | | | | коректна |

В обох випадках однобічний довірчий інтервал Δx не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу, тому методика є точною на рівні збіжності.

Правильність і прецизійність методики визначали з результатів, отриманих з визначення лінійності. Як видно з даних таблиці 2.4, розраховані критерії практичної незначущості не перевищують максимально допустиму невизначеність аналізу.

Отже, розроблена методика спектрофотометричного кількісного визначення мангіферину може бути використана для визначення кількісного вмісту діючої речовини в діалізній (акцепторній) рідині про проведенні

біофармацевтичних досліджень на етапі фармацевтичної розробки м'якої лікарської форми.

*Методи ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в гелі*

*Хімічні методи ідентифікації*

Для ідентифікації мангіферину у досліджуваній м'якій лікарській формі використовували кольорові реакції і метод ТШХ

З хімічних методів ідентифікації запропоновано використовувати реакцію з розчином заліза (III) хлориду, що підтверджує в складі гелю речовин поліфенольної будови.

*Методика проведення реакції.* 0,5 г гелю збовтують з 10 мл води. До 2 мл отриманого розчину додають 0,5 мл розчину заліза (III) хлориду; утворюється осад темно-зеленого кольору.

Використовуючи властивості мангіферину [159], випробування проводили після вилучення діючої речовини з гелю 70% спиртом у порівнянні зі СЗ мангіферину з використанням нерухомої фази ТШХ-пластинок із шаром силікагелю та флуоресцентним індикатором $F_{254}$ (с. НХ04954354, Merk, Німеччина), рухомої – суміші розчинників н-бутанол : оцтова кислота : вода (80 : 20 : 10), детектування проводили шляхом переглядання хроматограм в УФ-світлі за довжин хвилі 254 нм та 365 нм (рис. 1 і 2).

*Ідентифікації мангіферину у складі гелю методом ТШХ*

Для ідентифікації мангефірину у складі гелю використовували метод ТШХ [160].

Вивчають послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробуваного розчину.

Випробування проводили у порівнянні зі СЗ мангіферину з використанням нерухомої фази – ТШХ-пластинок із шаром силікагелю та флуоресцентним індикатором $F_{254}$ (SUPELCO Analytical), рухомої – суміші розчинників н-бутанол : оцтова кислота : вода (8 : 2 : 10), детектування проводили шляхом переглядання хроматограм в УФ-світлі за довжин хвилі 254 нм та 365 нм. Після детектування хроматограм метанольним розчином

алюмінію хлориду ідентифікували біологічно активні сполуки рідкого водного екстракту леспедези, а саме флавоноїди (кверцетин і рутин) і гідроксикоричні кислоти (кавова і хлорогенова кислоти) [160].

*Випробовуваний розчин.* 1,0 г гелю збовтують з 30 мл 70 % етилового спирту впродовж 10 хв і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 50,0 мл.

*Розчин порівняння (а).* 5 мг мангіферину розчиняють у 5 мл спирту етилового 70 %.

*Розчин порівняння (b).* 1 мг рутину, 5 мг кверцетину, 5 мг хлорогенової кислоти і 5 мг кофейної кислоти розчиняють у 10 мл метанолу.

*Пластинка.* ТШХ-пластинка з шаром силікагелю Р та флуоресцентним індикатором ($F_{254}$) або ідентичну.

*Рухома фаза:* н-бутанол Р – оцтова кислота льодяна Р – вода Р (80:20:10).

*Нанесення:* 5 мкл, смугами 10 мм.

*Відстань, що має пройти рухома фаза*: 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі протягом 20 хв.

*Виявлення А:* переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Виявлення В*: обробляють 5% розчином алюмінію хлориду в метанолі, висушують у потоці теплого повітря і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Оцінюють послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину.

*Метод рідинної хроматографії*

Для *ідентифікації і кількісного визначення* мангіферину і біологічно активних сполук рідкого водного екстракту леспедези при стандартизації гелю використовували метод рідинної хроматографії. Випробування проводили на рідинному хроматографі в ізократичному режимі за допомогою колонки заповненою силікагелем *октадецилсилільним для хроматографії Р* розміром 150×4,6 мм з передколонкою, з розміром часток 5 мкм, для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи. Використовували рухому фазу –

0,1% трифтороцтової кислоти в суміші ацетонітрил : вода (13,5 : 86,5). Детектування проводили за допомогою УФ-детектора, використовуючи для кількісного визначення довжину хвилі 340 нм.

*Кількісне визначення мангіферину і ЛЕВР методом рідинної хроматографії*

Кількісне визначення БАС гелю здійснювали методом рідинної хроматографії, за допомогою якого вдалось відокремити мангіферин і біологічно активні сполуки водного екстракту леспедези, а саме рутин і кофейну кислоту.

Випробування проводять методом рідинної хроматографії відповідно до вимог ДФУ 2.2.29.

*Випробовуваний розчин*. Наважку гелю, еквівалентну 50 мг мангіферину, поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 50 мл *метанолу Р* та обробляють ультразвуком протягом 10 хвилин, охолоджують, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки та перемішують.

*Розчин порівняння а*. 50 мг мангіферину поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, розчиняють в 50 мл *метанолу Р*, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки та перемішують.

*Розчин порівняння b*. 50 мг кофейної кислоти, 50 мг хлорогенової кислоти і 50 мг рутину розчиняють у метанолі і доводять об’єм розчину до 25.0 мл. 0,5 мл отриманого розчину доводять метанолом до 25.0 мл.

Перед хроматографуванням розчини фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор не більше 0.45 мкм.

Поперемінно хроматографують по 10 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння на рідинному хроматографі з УФ-детектором, отримуючи не менше 5 хроматограм для кожного розчину за таких умов:

- колонка розміром 150 х 4.6 мм, заповнена *силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р*, з розміром часток 5 мкм, з передколонкою, для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи;

рухома фаза: *ацетонітрил Р* : *вода Р* (13,5:86,5), дегазована зручним способом з додаванням 0,1% трифлуороцтової кислоти;

- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;

- температура колонки: 25 °С;

- детектування за довжини хвилі: 340 нм;

- об'єм інжекції: 10 мкл.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо для розчину порівняння виконуються наступні умови:

-ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком мангіферину, має бути не менше 6000 теоретичних тарілок;

- коефіцієнт симетрії піка мангіферину становить від 0,8 до 1,2;

- відносне стандартне відхилення для площ піків мангіферину, не має перевищувати 1,0 %, розраховане за результатами 5 інжекцій.

### 2.3.3 Біологічні методи досліджень

*Визначення протизапальної активності водного екстракту леспедези двоколірної на моделі опікового запалення шкіри у щурів*.

На базі навчально-наукової тренінгової лабораторії медико-біологічних досліджень навчально-наукового інституту прикладної лабораторії (ННТЛ МБД ННІПФ) НФаУ проведено дослідження водного екстракту леспедези двоколірної.

Дослідження були проведені на щурах самцях. Тварини утримувалися в віварію ННТЛ МБД ННІПФ НФаУ. Утримання тварин відповідало діючим правилам по пристроях, обладнанню та утриманню віварііів. Тварини отримували стандартне харчування відповідно до діючих норм [161,162].

З тваринами поводились згідно з правилами «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986 р) [163].

Проект плану з доклінічного вивчення фармакологічних властивостей тест-зразків був схвалений комітетом з біоетики НФаУ (протокол №10 від 03.10.2023 р.).

Дослідження проведені відповідно до методичних рекомендацій (Стефанов, 2001) і Наказів МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. та № 95 від 16.02.2009 р., з дотриманням вимог Належної лабораторної практики (Good Laboratory Practice (GLP) [162,164,165].

Тварин утримували в окремій кімнаті з контрольованими параметрами мікроклімату: температура повітря 18–22 °С, відносна вологість повітря 50–65 %, світловий режим «12 годин день/ніч», в пластикових клітках із індивідуальною вентиляцією [161]. Стерилізацію приміщення за допомогою УФ-лампи здійснювали щоденно. Тварини мали вільний доступ до води (попередньо відстояна водопровідна вода з напувалок). Для годування тварин використовували гранульовані збалансовані комбікорми (ТУ.У15.7-2123600159-001:2007). Догляд за тваринами проводили відповідно до стандартних операційних процедур ННТЦ МБД НФаУ. Всі етапи дослідження проведені згідно Директиви Європейського Парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» [166].

Перед проведенням експерименту тварини пройшли акліматизацію протягом 7 діб. Протягом періоду акліматизації проводили щоденний огляд кожної тварини (оцінювали поведінку та загальний фізичний стан), спостерігали за тваринами для виявлення можливих випадків захворюваності або смертності. Протизапальну активність тест-зразків вивчали на моделі опікової рани [167]. Дослідження проведено на 12 щурах самцях масою 240–262 г, віком 4–4,5 місяці [166.]. Всіх тварин розподілили на 2 групи по 6 у кожній. Рандомізацію тварин по групах та поміж групами здійснювали за масою, що не перевищувала ±10 %.

1 група – контроль; 2 група – наносили досліджуваний зразок з ЛЕВР.

Опікові рани виконували під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) на попередньо депільованій ділянці шкіри розміром 4 см х 4 см. Опік ініціювали за допомогою приладу з встановленою температурною шкалою та електропаяльником з контактною пластиною діаметром 2,5 см, що дозволяє отримати стандартні опіки за розміром 490,0 мм$^2$. Час експозиції контактної пластини склав 4 с за температури 200 $^0$С. За цих умов опік шкіри за клінічною класифікацією відповідає ІІ ступеню [167]. Досліджуваний зразок наносили на шкіру тварин щодня один раз на добу крапельно в об'ємі 100 мкл безпосередньо на ранову поверхню. Тварин контрольної групи не лікували (група 1). Лікування розпочинали одразу після термічної дії і продовжували до повного загоєння ран [167].

*Мікробіологічні дослідження*

Мікробіологічні дослідження проводили на базі лабораторії біохімії мікроорганізмів і поживних середовищ ДЗ «Інститут мікробіології і імунології ім. І. І. Мечникова НАМН під керівництвом канд. біол. наук, ст. наук. співроб., завідувачки лабораторії біохімії та біотехнології Т.П. Осолодченко.

*Антимікробну активність ЛЕВРР та гелю з мангіферином і ЛЕВРР in vitro* проводили методом дифузії в агар (метод «колодязів») і методом дисків В дослідженнях також використовували метод дисків.

Дослідження проводили на еталонних тест-культурах грампозитивних і грамнегативних бактерій різних таксономічних груп: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Протигрибкову дію досліджували на референтному штамі *Candida albicans* ATCC 885-653. Дослідження проводили також на клінічних ізолятах *Staphylococcus aureus* 16, *Staphylococcus epidermidis* 14, *Staphylococcus aureus* 124, *Streptococcus pneumoniae* 14, *Streptococcus pyogenes* 2432, *Enterococcus faecalis 42, Enterobacter cloaceae 17, Klebsiella pneumoniae 18, Acinetobacter baunani 150, Pseudomonas aeruginosa* 18 і *Candida albicans* 69.

Мікробну суспензію мікроорганізмів готували з використанням приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Мікробну суспензію штамів готували відповідно до Інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ. [168]. Мікробне навантаження, яке встановлювали за стандартом McFarland, становило $10^7$ клітин на 1 мл середовища. Для культивування мікроорганізмів використовували агар Мюллера-Хинтона («HIMedia Laboratorles Pvt. Ltd India», Індія). Для культивування *C. albicans* використовували агар Сабуро ( «HIMedia Laboratorles Pvt. Ltd India», Індія).

Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів заміряли з точністю вимірювання 1,0 мм. При інтерпретації антибактеріальної активності зразків використовували наступні критерії:

Метод дифузії в агар (метод «колодязів»)

Відсутність зони затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, або
зона затримки до 10 мм – мікроорганізм не чутливий до лікарського засобу або концентрації АФІ.

Зони затримки росту діаметром 10 – 15 мм – мала чутливість.

Зони затримки росту діаметром 15 – 25 мм – чутливість.

Зони затримки росту, діаметром понад 25 мм – висока чутливість.

Метод дисків

Відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки – мікроорганізм не чутливий до лікарського засобу або концентрації АФІ.

Зони затримки росту діаметром 5 – 8 мм – мала чутливість.

Зони затримки росту діаметром 9 – 14 мм – чутливість.

Зони затримки росту, діаметром понад 15 мм – висока чутливість.

*Випробування на мікробіологічну чистоту ЛЕВР і гелю з мангіферином і ЛЕВР* проводили відповідно до ДФУ 2.0, 2.6.12, 2.6.13 [153].

Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти готових ЛЗ для зовнішнього застосування (ДФУ 2.0). Загальна кількість аеробних

мікроорганізмів (ТАМС) – $10^2$ КУО/мл. Загальне кількість дріжджових та пліснявих грибів (ТУМС) – $10^1$ КУО/мл. Відсутність *Staphylococcus aureus* в 1 млг. Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 мл.

Згідно з вимогами ДФУ 2.0 у ЛЗ для нашкірного застосування (категорія 2*N*) допускається не більше $10^2$ КУО/мл аеробних мікроорганізмів (ТАМС), $10^1$ КУО/мл дріжджових та пліснявих грибів (ТУМС), відсутність *S. aureus, P. aeruginosa* в 1 мл. У деяких випадках за наявності рослинних БАР не допускається розмноження ентеробактерій (*Enterobacteriaceae*) [153].

*Дослідження вибору консерванту в гелі*

Ефективність консервантів вивчали згідно зі стандартною методикою ДФУ 2.0 за логарифмом зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів за визначений період після інокуляції зразків [153].

*Дослідження противірусної активності* проводили на базі інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України під керівництвом к. біол. н., зав. відділом репродукції вірусів Загородньої С. Д. за сприяння д.біол.н., проф., заслуженого діяча науки і техніки України, академіка НАН України директора інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України Співака М. Я.

*Культура клітин та вірус*

Мікробіологічні дослідження проводили за загальновідомими методиками [153-155].

ВНК-21 (С-13) − клітини нирки сирійського хом’яка, отримані з Банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (Київ, Україна). Культивування клітин проводили за стандартними методиками.

ВПГ-1 (вірус простого герпесу 1 типу) отриманий з музею вірусів Інституту антивірусної хіміотерапії Центру клінічної та теоретичної медицини (Ерфурт, Німеччина). Культивування і накопичення вірусу проводили на культурі клітин ВНК-21. Інфекційний титр вірусу 5,5 $\log_{10}$ $ТЦД_{50}$/мл.

*Дослідження токсичності*

МТТ аналіз у модифікації був використаний для дослідження життєздатності клітин. Через 24 год росту клітин до них вносили 200 мкл середовища сполукою відповідної концентрації. Планшети з клітинами витримували при 37°С в 5% $CO_2$ атмосфері протягом 3 діб. Контролювали стан моношару клітин з використанням світлового інвертованого мікроскопу (збільшення х70). Субстрат МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл тетразолію бромід) (Sigma, США) розчиняли в стерильному фосфатному буфері (рН 7,2) при кімнатній температурі до концентрації 5 мг/мл. Фільтрований розчин МТТ в об'ємі 20 мкл вносили до лунки 96-лункового планшета та інкубували з клітинами протягом 2 – 4 год за 37° С. Після інкубації середовище видаляли, до клітин додавали по 150 мкл 96° етанолу для розчинення кристалів формазану. Результати аналізували спектрофотометрично на рідері Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) за довжини хвилі 538 нм. Визначали відсоток життєздатних клітин (мітхондріальна активність) за формулою:

$$\text{Життєздатність клітин (\%)} = (At/As) \times 100\% , \qquad (2.8)$$

де: As – середнє значення оптичної щільності зразків контролю клітин,

At – середнє значення оптичної щільності дослідних зразків для певної концентрації.

*Дослідження антивірусної дії*

Для детального дослідження активності зразку відносно ВПГ-1 було використано наступні експериментальні процедури:

*(А) попередня обробка клітин*. До клітин ВНК-21 додавали 200 мкл середовища з досліджуваним зразком з 5% вмістом мангіферину та проводили їх інкубацію в 5% атмосфері $CO_2$ при 37 °С протягом 1, 3 та 24 год до інфікування. Використовували розведення досліджуваної речовини на підтримуючому середовищі без додавання сироватки. Потім клітини інфікували ВПГ-1. Через 2 години після адсорбції вірус видаляли та додавали 200 мкл/лунку підтримуючого середовища без сироватки. Плашку з клітинами витримували в 5% $CO_2$ при 37 $^{o}$С до появи вираженої цитопатичної дії вірусу (2

– 3 доби). Проводили відбір проб у стерильних умовах для подальшого дослідження зміни якості утвореного *de novo* потомства вірусу.

*(Б) віруліцидна дія*. ВПГ-1 не розведений змішували у рівному об'ємі з зразком та інкубували при 37°С протягом 1 год. До моношару клітин ВНК-21 додавали суспензію сполука-вірус по 50 мкл на лунку. Після адсорбції вірусу в атмосфері 5% $CO_2$ при 37°С протягом 1,5 год., вірусовмісний матеріал видаляли та вносили по 200 мкл підтримуючого середовища без сироватки. Плашку витримували в 5% $CO_2$ при 37°С до появи вираженої цитопатичної дії вірусу (2-3 доби). Віруліцидну активність відносно ВПГ-1 визначали МТТ-методом за зниженням цитопатичної дії вірусу на клітини та титру вірусу.

*(В) внесення зразку після інфікування клітин вірусом*. Клітини інфікували вірусом герпесу по 50 мкл на лунку та інкубували з вірусом протягом 1,5 год. при 37°С в атмосфері 5% $CO_2$. Потім вірус видаляли та додавали підтримуюче середовище без сироватки з відповідною концентрацією досліджуваної речовини. Через 72 год. її активність відносно ВПГ-1 визначали МТТ-методом за зниженням цитопатичної дії вірусу на клітини чи титру вірусу *de novo*.

*Визначення інфекційного титру вірусу*. До клітин додавали вірусовмісний матеріал десятикратного серійного розведення (лізати зразків відібрані з лунок через 72 год після обробки вірусу відповідними концентраціями сполуки). Для цього з планшети видаляли живильне середовище та у лунки додавали 50 мкл суспензії вірусовмісного матеріалу розведеного у підтримуючому середовищі без сироватки і проводили його адсорбцію на поверхні клітин протягом 2 год за 37 °С в атмосфері 5% $CO_2$. В контрольних клітинах проводили заміну середовища на підтримуюче. Після адсорбції до клітин додавали 150 мкл підтримуючого середовища без сироватки та інкубували в атмосфері 5% $CO_2$ за 37 °С протягом 3 діб. Для виявлення ЦПД стан моношару клітин контролювали з використанням світлового інвертованого мікроскопу (збільшення х70). Результати аналізували спектрофотометрично на рідері Multiskan FC (Thermo Scientific, США) за

довжини хвилі 538 нм. Використовуючи отримані оптичні щільності визначали % пригнічення життєздатності клітин під дією вірусу за формулою:

% пригнічення життєздатності = 100 – (A*100/B), (2.9)

де А – середня оптична щільність дослідного зразка, В – середня оптична щільність контролю клітин

Визначали розведення вірусу, яке зменшує оптичну щільність зразка у порівнянні з оптичною щільність контролю клітин на 50 %, що і є титром вірусу та виражається $ТЦД_{50}$/мл.

Зниження титру вірусу, синтезованого *de novo* визначали за формулою (2.10):

Зниження інфекційного титру = титр вірусу у контролі - титр вірусу у досліді (2.10)

Зниження інфекційного титру вірусу на 2 $\log_{10}$ і більше, у порівнянні з контролем, свідчить про виражену активність сполуки відносно вірусу.

Обробку отриманих даних проводили за стандартними підходами для обчислення статистичних помилок (стандартне відхилення) використовуючи програму Microsoft Excel 2010. Результати відображали як середнє значення ± S.D., отримане в трьох-чотирьох незалежних експериментах.

### 2.3.4 Статистичний аналіз

Статистична обробка результатів експериментальних даних проводилася відповідно до вимог статей ДФУ 5.3. «Статистичний аналіз біологічних випробувань та кількісних визначень», 5.3.N. «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» [169].

## Висновки до розділу 2

1. Обґрунтовано методологію досліджень з розробки гелю з леспедези екстрактом водним рідким і мангіферином для терапії герпесвірусних захворювань шкіри.

2. Наведено характеристику лікарської рослинної сировини – надземної частини леспедези двоколірної, яку були використано при отриманні ЛЕВР. Наведено характеристику напівпродукту (ЛЕВР), мангіферину та допоміжних речовин, що були використані при розробці м’якого лікарського засобу противірусної дії.

3. Обрано та описано методики фармакотехнологічних, фізико-хімічних та біологічних досліджень, використані при обґрунтуванні технології та стандартизації ЛЕВР та при розробці складу, технології та дослідженні гелю.

# РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ УМОВ ОТРИМАННЯ І ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕСПЕДЕЗИ ЕКСТРАКТУ ВОДНОГО

## 3.1 Обґрунтування технології леспедези екстракту водного рідкого

### 3.1.1 Дослідження умов отримання леспедези екстракту водного рідкого

Для розширення спектру фармакологічної дії дерматологічного засобу обрано леспедезу двоколірну (Lespedeza bicolor Turch, Leguminosae). Аналіз літературних джерел показав, що вилучення леспедези володіють антиоксидантною, репаративною, протизапальною [119, 126-128,135] і антимікробною [119, 126,137] активністю.

Для отримання водних вилучень використовували надземну частину леспедези двоколірної (*Lespedeza bicolor* Turcz., Leguminosae), яка складалась із суміші бутонів, квітів, листя і стебл.

Попередні дослідження показали, що настій надземної частини леспедези двоколірної, отриманий за загальними правила отримування настоїв, шляхом настоювання сировини на водяній бані за співвідношення 1:10 з урахуванням коефіцієнта водопоглинання протягом 15 хв з подальшим настоюванням при охолодженні протягом 45 хв містить 0,612 ± 0,016 % поліфенольних сполук, 0,062 ± 0,016 % танінів та 0,041 ± 0,013 % флавоноїдів [171]. Однак, умови отримання настоїв не забезпечують повноти вилучення БАС, настої мають короткий термін придатності, що обмежує їх використання при створення ЛЗ. Тому метою подальших досліджень була оптимізація умов отримання водного екстракту леспедези.

Екстракт отримували методом ремацерації з примусовим перемішуванням за температури 95–100 ºС. При обґрунтуванні умов отримання водного екстракту визначали вплив часу та кількість ступенів екстракції сировини на вихід БАС. Оцінку ефективності екстракції проводили за вмістом

поліфенольних сполук і флавоноїдів, які досліджували в кожній порції екстракту, яку відбирали через 15 хв упродовж 120 хв (рис.3.1).

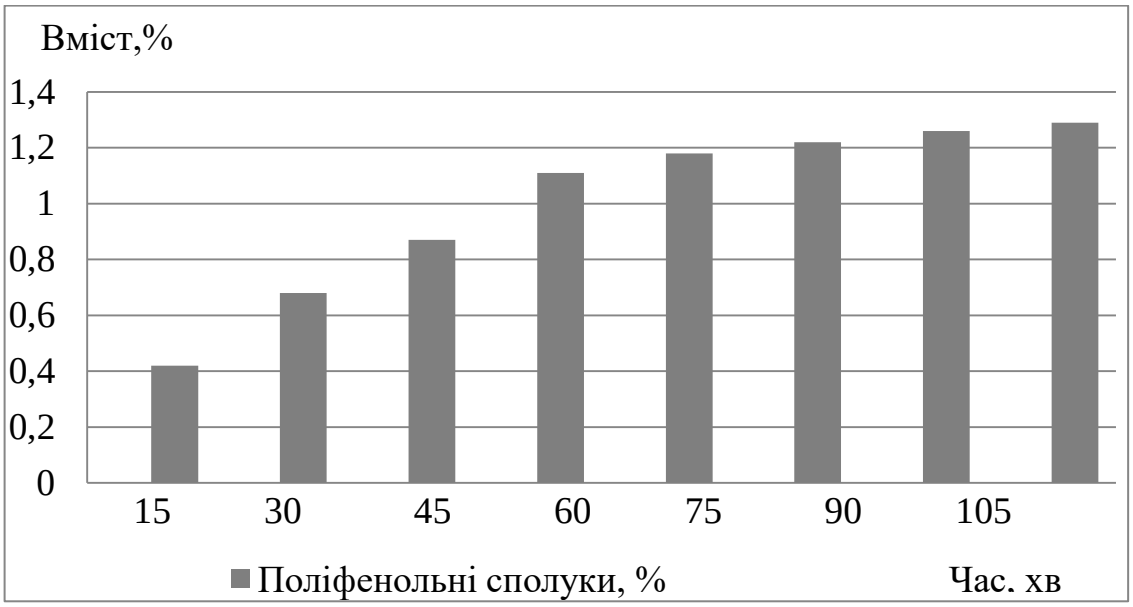



Рис. 3.1 Залежність вмісту поліфенольних сполук у водному екстракті леспедези від часу екстрагування

Як свідчать отримані результати, вміст як поліфенольних сполук (рис. 3.1), так і флавоноїдів (рис. 3.2) у екстрактах поступово зростає при екстрагуванні впродовж перших 60 хв, а далі змінюється несуттєво.

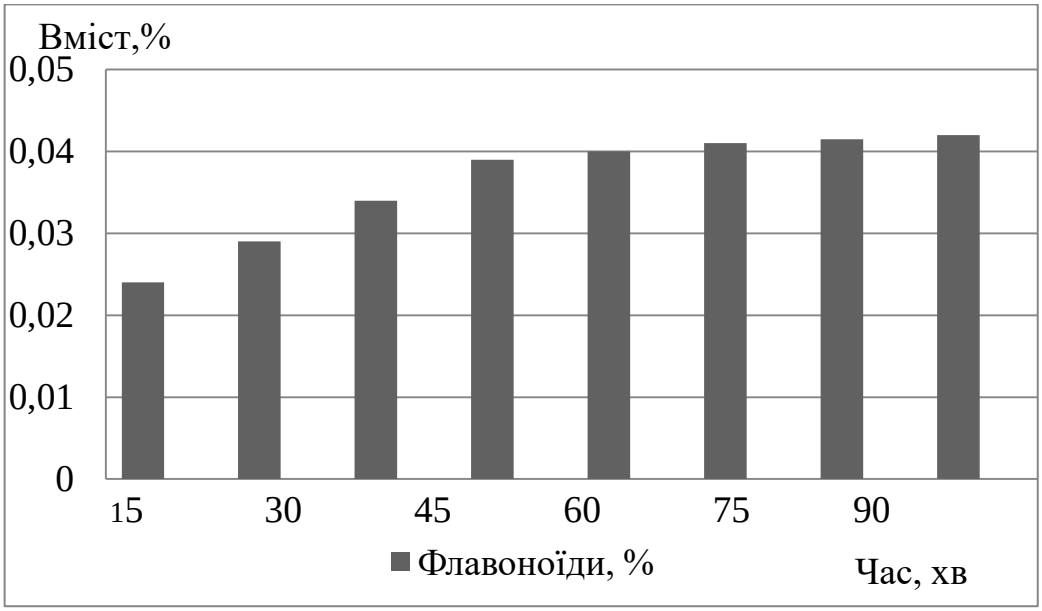



Рис. 3.2 Залежність вмісту флавоноїдів у водному екстракті леспедези від часу екстрагування

Тому саме цей час є оптимальним для екстракції надземної частини леспедези. Необхідно було також визначити кількість ступенів екстракції, при яких відбувається максимальне виснаження сировини. Проведено чотирикратну ремацерацію сировини з настоюванням впродовж 60 хв за температури 95–100 °С і примусовим перемішуванням.

Мінімальна кількість екстрагенту для першого ступеня, при якій отримували «дзеркало», по відношенню до сировини становить 4 : 1, для наступних ступенів екстракції екстрагент ділили на рівні частини. Вміст поліфенольних сполук в перерахунку на пірогалол і флавоноїдів в перерахунку на рутин, який визначили у кожній порції екстракту, наведено в табл. 3.1.

Отримані результати свідчать, що ефективними є перші три ступені екстракції, під час яких спостерігається інтенсивне вилучення біологічно активних сполук, в той час на 4 ступені екстракції вилучається незначна кількість поліфенольних сполук та флавоноїдів. Це надає можливість зробити висновок, що максимальне виснаження сировини забезпечує трьохступенева ремацерація із загальним співвідношенням сировина : готовий екстракт 1 : 8.

*Таблиця 3.1*

**Вміст поліфенольних сполук і флавоноїдів в екстракті леспедези залежно від ступеня екстракції, n=3**

| Біологічно активні сполуки | Ступені екстракції | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Флавоноїди, мг/мл | 0,31±0,02 | 0,22±0,03 | 0,13±±0,02 | 0,05±±0,02 |
| Поліфенольні сполуки, мг/мл | 1,92±0,09 | 0,86±0,06 | 0,69±±0,03 | 0,14±±0,02 |

Обрані умови екстрагування надземної частини леспедези двоколірної надали можливість отримати водний екстракт, який містить більшу майже в п’ять раз кількість поліфенольних сполук у перерахунку на пірогалол і на 50 %

флавоноїдів у перерахунку на рутин порівняно з отриманням настою з того ж виду сировини [172].

### 3.1.2 Обґрунтування технології леспедези екстракту водного рідкого

На основі проведених досліджень було розроблено технологічний процес отримання леспедези екстракту водного рідкого та складено його технологічну схему.

Підготовка виробництва складається з процедур підготовки повітря, виробничих приміщень та обладнання, дезінфекційної обробки й ультрафіолетового опромінення поверхонь приміщень відповідно до затверджених стандартних робочих методик (СРМ). Технологічний процес отримання водного рідкого екстракту леспедези здійснюється за затвердженою рецептурою і технологічними інструкціями.

*Стадія 1. Підготовка рослинної сировини*. Для виробництва водного екстракту леспедези використовують ЛРС, що відповідає вимогам специфікації, пройшла попередній вхідний контроль і має відповідні протоколи. Подрібнення та зважування сировини проводять згідно із СРМ. Подрібнення рослинної сировини проводять на млині роторному ножовому РМ-250 та центровому МЦ-1, після чого її знепилюють шляхом просіювання на віброситі з розміром отворів 0,16 мм. Подрібнену та знепилену рослинну сировину передають на стадію 2.

*Стадія 2. Одержання водного екстракту*. В екстрактор з паровою оболонкою завантажують ЛРС зі стадії 1. Для екстрагування використовують воду очищену, отриману зі стадії 1. Сировину заливають водою до отримання «дзеркала» й екстрагують протягом (60 ± 5) хв. за температури 95–100 °С. Після закінчення часу екстрагування через випускний кран відбору екстрактора зливають отриману витяжку в збірник.

Сировину, що залишилась в екстракторі, заливають другою частиною води очищеної та проводять екстрагування з дотриманням вищевказаних

параметрів. Після зливу отриманого водного екстракту у збірник сировину заливають третьою частиною води очищеної з урахуванням загального співвідношення сировина : готовий екстракт (1 : 8) та екстрагують з дотриманням вищевказаних параметрів. Після закінчення часу екстрагування через випускний кран відбору екстрактора зливають отриману витяжку в збірник. Визначають загальний об’єм водного екстракту і передають на стадію 3. Після охолодження екстрактора шрот вивантажують і передають на утилізацію.

*Стадія 3. Відстоювання та фільтрація водного екстракту.* Водний рідкий екстракт зі стадії 3 поміщають у ємність для відстоювання і витримують за температури (10 ± 2) °С протягом 8–10 год. Після відстоювання екстракт фільтрують крізь нутч-фільтр патронного типу на основі поліпропілену. Профільтрований екстракт зберігають у герметично закритих пластмасових збірниках, кожен збірник повинен мати ідентифікаційну етикетку.

*Стадія 4. Упарювання водного екстракту.* Упарювання сумарного водного екстракту зі стадії 3 проводять у роторному вакуум-випарному апараті за температури (75 ± 5) °С за умови розрідження 0,8–0,7 МПа. Ступінь упарювання контролюють візуально за об’ємом витяжки.

В отриманому рідкому екстракті відбирають пробу на аналіз вмісту сухого залишку. Відбирають пробу профільтрованого екстракту та передають на контроль до лабораторії відділу технологічного контролю згідно з проєктом МКЯ на проміжну продукцію. Після отримання позитивних результатів аналізу екстракт передають на стадію 5 для фасування, пакування та маркування отриманого продукту.

*Стадія 5. Фасування, пакування та маркування водного екстракту.* Фасування водного екстракту леспедези, отриманого зі стадії 4, проводять у широкогорлі контейнери, які щільно закриваються, на автоматичній лінії фасування. Упакований і промаркований водний екстракт леспедези передають на склад проміжної продукції. Далі проводили дослідження з визначення

якісного та кількісного вмісту АФІ в отриманому водному екстракті леспедези. Методики дослідження наведено у розділі 2.

Технологічна схема виробництва леспедези екстракту водного рідкого наведена на рис. 3.3.

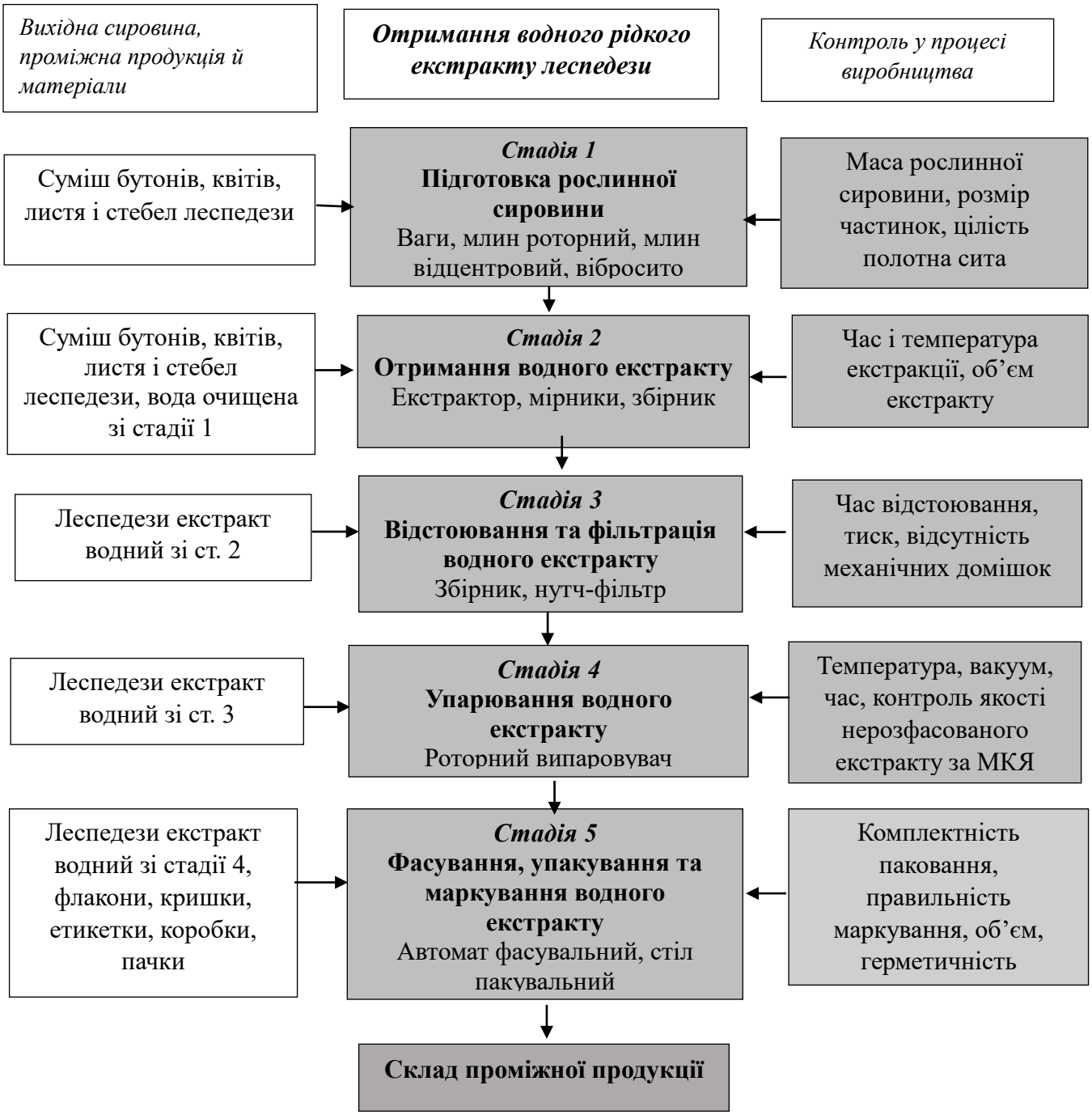



Рис. 3.3 Технологічна схема виробництва леспедези екстракту водного рідкого

У табл. 3.2 наведено критичні параметри і стадії, які безпосередньо контролюються.

*Таблиця 3.2*

**Основні критичні параметри виробництва ЛЕВР**

| Назва технологічної стадії | Назва технологічного параметру | Показники технолог-гічного параметру |
|---|---|---|
| Підготовка рослинної сировини | Розмір часток<br>Маса сировини | 2–5 мм<br>Згідно виробничої рецептури |
| Отримання водного екстракту | Температура екстракції<br>Час екстракції | 95 ± 5° С<br>60 ± 5 хв |
| Відстоювання та фільтрація водного екстракту | Температура відстоювання<br>Час відстоювання<br>Відсутність механічних домішок | 10 ± 2ºС<br>9 ± 1 год<br>Візуально |
| Упарювання водного екстракту | Температура<br>Вакуум<br>Контроль якості проміжної продукції за МКЯ | 75 ± 5 °С<br>0,8–0,7 МПа<br>Згідно виробничої рецептури |
| Фасування, пакування та маркування водного екстракту | Комплектність паковання<br>Правильність маркування<br>Об’єм<br>Герметичність | Візуально<br>Візуально<br>100 ± 3 мл<br>Візуально |

## 3.2 Розробка методик контролю якості та стандартизація леспедези екстракту водного рідкого

Для виготовлення лікарських засобів з ЛЕВР та їх подальшого застосування в медичній практиці, екстракт необхідно стандартизувати.

Контроль якості розробленого ЛЕВР проводили за показниками: опис (зовнішній вигляд, колір, запах, консистенція), ідентифікація флавоноїдів, ідентифікація речовин полісахаридної будови, вміст важких металів, вміст

сухого залишку, кількісне визначення флавоноїдів та суми поліфенолів, об’єм вмісту контейнеру.

Стандартизацію водного екстракту проводили на основі результатів експериментальних досліджень, відповідно до вимог ДФУ (табл. 3.3) [153]. Встановлено, що це прозора рідина жовтувато-коричнюватого кольору зі специфічним трав’яним запахом.

За результатами ідентифікації БАС у рідкому екстракті, за допомогою кольорових реакції встановлено наявність речовин флавоноїдної будови, дубильних речовин і вуглеводнів [171].

Для ідентифікації біологічно активних речовин водного екстракту використовували *хімічні реакції,* наведені у розділі 2 дисертаційної роботи.

У результаті ціанідинової проби в модифікації за Бріантом утворюються забарвлені у рожевий колір розчини, реакції досліджуваного розчину екстракту з 2% спиртовим розчином алюмінію хлориду – яскраве зеленувато-жовте забарвлення, що свідчить про наявність флавоноїдів.

Наявність флавоноїдів також підтверджено реакцією з 10% спиртовим розчином лугу – утворюються розчини жовтого кольору і реакцією з мінеральними кислотами – утворюються розчини малинового забарвлення.

У результаті реакції розчину екстракту з розчином $FeCl_3$ утворюється синьо-зелене забарвлення, що вказує на присутність фенолів і дубильних речовин.

На присутність відновлюючих цукрів вказує цегляно-червоний осад, що з'являється в нижній частині пробірки після кипятіння досліджуваного водного екстракту леспедези з рівним об'ємом мідно-тартратного 1 і мідно-тартратного 2 реагентів.

Методом ТШХ ідентифіковано фенольні сполуки: флавоноїди, гідроксикоричні кислоти (рутин, кверцетин, хлорогенова та кофейна кислоти), таніни і речовини полісахаридної будови [171] (рис 3.4, 3.5).

Рис. 3.4 Загальний ТШХ профіль екстракту леспедези та двох стандартів (хлорогенова кислота (1) та рутин (3)) під УФ 254 нм (A), УФ 366 нм (B) і білим світлом (C) до дериватизації та під УФ 366 нм після дериватизації (D) і білим світлом після дериватизації (E)

| | |
|---|---|
| Блідо-блакитна флуоресценція (кофейна кислота)<br><br>Коричнювато-жовта флуоресценція (кверцетин)<br><br>Жовта флуоресценція (рутин)<br><br>Блакитна флуоресценція (хлорогенова кислота) | Кофейна кислота: блідо-блакитна флуоресценція<br><br>Кверцетин: коричнювато-жовта флуоресценція<br><br>Рутин: жовта флуюоресценція<br><br>Хлорогенова кислота: блакитна флуоресценція |
| Випробуваний розчин | Розчин порівняння |

Рис. 3.5 Схема хроматограми, отримана при ідентифікації речовин поліфенольної природи у дослідних зразках водного екстракту леспедези

*Метод тонкошарової хроматографії використовували для ідентифікації* у водному екстракті речовин *полісахаридної будови*. Досліджуваний водний екстракт розводили 70% спиртом етиловим, наносили на тонкошарові пластинки, вміщували в рухому фазу вода – мурашина кислота – етилацетат (5:10:85) з використанням маркерів фруктоза і пірогалол. Коли фронт

розчинників пройшов 10 см, хроматограми сушили на повітрі, обробляли розчином анісового альдегіду, нагрівали при температурі 100–105 $^0$С 15 хв і переглядали при денному світлі.

На рис. 3.6 наведено послідовність зон на хроматограмах випробуваного розчину та розчину порівняння.

На хроматограмі випробуваного розчину можуть виявлятися й інші зони. Отримані результати свідчать про наявність у досліджуваному екстракті речовин полісахаридної будови і танінів.

Отже, методом тонкошарової хроматографії та хімічними реакціями підтверджено наявність у досліджуваному водному екстракті леспедези двоколірної речовин флавоноїдної будови, фенолів, дубильних речовин та речовин полісахаридної природи.

| Верхня частина пластинки | |
|---|---|
| Піраголол: коричнева зона<br><br>Фруктоза: зеленувато-синя зона | Коричнева зона (пірогалол)<br><br>Зеленувато-синя зона (фруктоза) |
| Розчин порівняння | Випробуваний розчин |

Рис. 3.6 Схема хроматограми, отримана при ідентифікації речовин полісахаридної будови у дослідних зразках екстракту леспедези

*Кількісне визначення флавоноїдів*

Методом тонкошарової хроматографії у досліджуваному рідкому екстракті встановлена наявність флавоноїдів, схожих за будовою з рутином. Для кількісної оцінки вмісту речовин флавоноїдної будови використовували

метод абсорбційної спектрофотометрії у видимій ділянці після отримання забарвленого розчину водного екстракту леспедези двоколірної після взаємодії з розчином алюмінію (III) хлоридом в оцтовокислому середовищі. Встановили, що електронний спектр поглинання продукту реакції характеризується наявністю максимуму поглинання за довжини хвилі 406 нм, що знаходиться в межах ±5 нм положення максимуму рутину в цих умовах 408 нм (рис. 3.7).

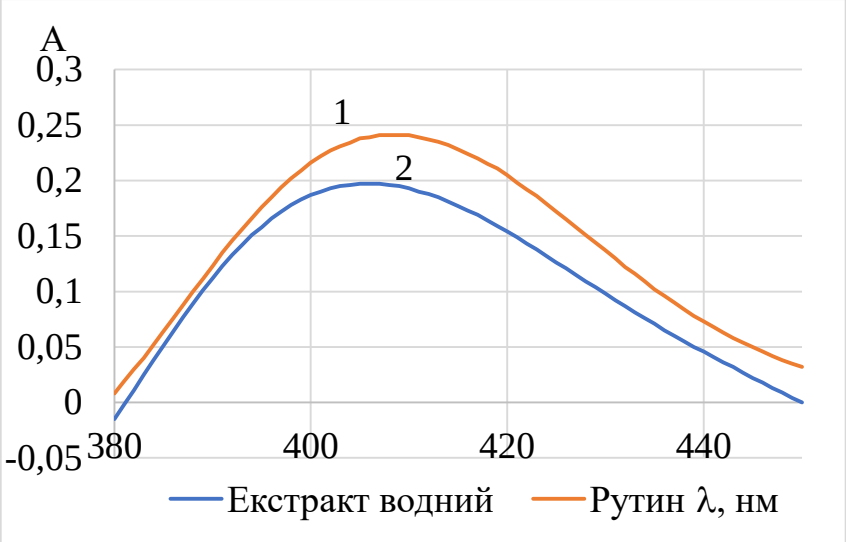



Рис. 3.7 Абсорбційні спектри поглинання після реакції з розчином алюмінію хлориду в оцтовокислому середовищі 1 – рутину, 2 – водного екстракту леспедези

Оптичну густину випробовуваного розчину вимірюють через 30 хв після приготування за довжини хвилі 408 нм відносно компенсаційного розчину. Вміст суми флавоноїдів (X, мг) у перерахунку на рутин обчислюють за формулою, наведеною у розділі 2.

Для оцінки запропонованої методики для визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів проведена низка паралельних вимірювань та для отриманих результатів проведена статистична обробка даних (таблиця 3.3).

Відносна невизначеність середнього результату із довірчою вірогідністю 0,95 складає 5,65 % при відсутності систематичної похибки запропонованої методики та її відтворюваність.

За результатами дослідження в проект МКЯ у розділ кількісне

визначення флавоноїдів, включено вимогу, що вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин у 1,0 г рідкого екстракту має бути не менше 0,5 мг.

*Таблиця 3.3*

**Метрологічна характеристика спектрофотометричного у видимій ділянці методу визначення суми флавоноїдів у екстракті**

| Вміст суми поліфенолів, мг | ν | Середнє значення (х сер.) | Дисперсія, $S^2$ | Стандартне відхилення середнього результату $S_x$ | Відносна величина статистичної похибки окремого визначення Δх | Відносна невизначеність середнього результату, $\bar{\varepsilon}$, % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,65 | 5 | 0,61 | 0,0011 | 0,0133 | 0,0839 | 5,65 |
| 0,61 | | | | | | |
| 0,59 | | | | | | |
| 0,64 | | | | | | |
| 0,57 | | | | | | |
| 0,58 | | | | | | |

*Кількісне визначення речовин поліфенольної будови*

Суму речовин поліфенольної будови визначали після реакції з фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом в середовищі насиченого розчину натрію карбонату за методикою ДФУ [ 153]. Методику наведено в розділі 2.

Забарвлений у синій колір продукт реакції характеризується наявністю доволі пологого максимуму поглинання за довжини хвилі 760 нм, що відповідає максимуму поглинання розчину пірогалолу в цих умовах (рис. 3.8).

Для оцінки запропонованої методики для визначення кількісного вмісту суми поліфенолів проведена низка паралельних вимірювань та отримані результати метрологічно атестовані (таблиця 3.4).

Відносна невизначеність середнього результату із довірчою вірогідністю 0,95 складає 2,87 %. Проведені досліди показали відсутність систематичної похибки запропонованої методики і її відтворюваність.

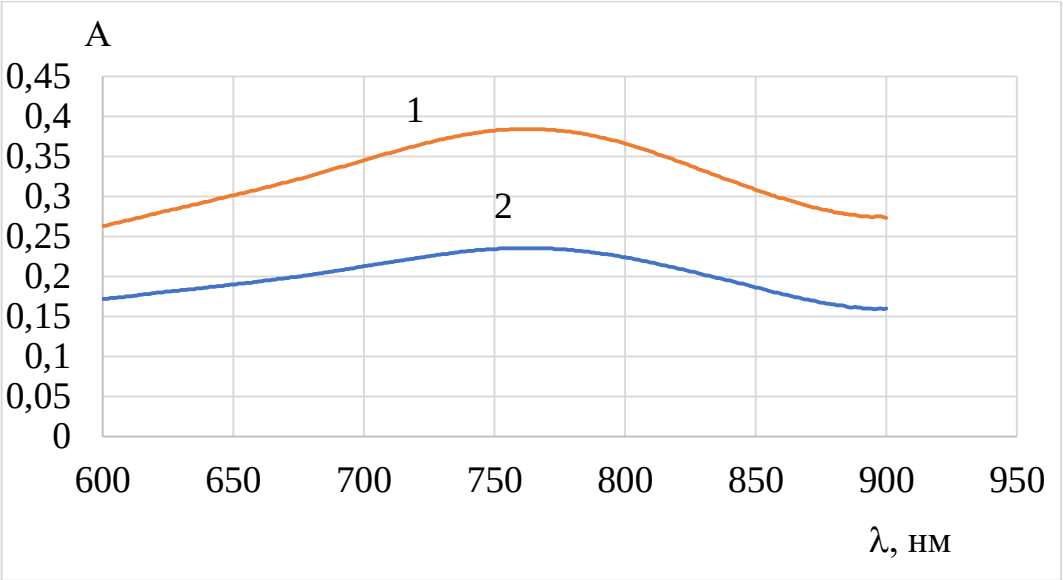



Рис. 3.8 Абсорбційні спектри водних розчинів 1 – пірогалолу; 2 - досліджуваного екстракту після реакції з фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом

*Таблиця 3.4*

**Метрологічна характеристика спектрофотометричного у видимій ділянці методу визначення суми поліфенолів у екстракті**

| Вміст суми поліфенолів, мг | ν | Середнє значення (х сер.) | Дисперсія, $S^2$ | Стандартне відхилення середнього результату $S_x$ | Відносна величина статистичної похибки окремого визначення Δх | Відносна невизначеність середнього результату, $\bar{\varepsilon}$, % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 38,26 | 5 | 36,99 | 1,0211 | 0,4125 | 2,5977 | 2,87 |
| 37,08 | | | | | | |
| 36,43 | | | | | | |
| 35,87 | | | | | | |
| 38,12 | | | | | | |
| 36,19 | | | | | | |

За результатами дослідження в проект МКЯ у розділ кількісне визначення суми поліфенолів, включено вимогу, що вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол у 1,0 г рідкого екстракту має бути не менше 35 мг.

Результати дослідження показали, що вміст сухого залишку в ЛЕВР був в межах 18,8–20,2 %, танінів в перерахунку на пірогалол – 35,87–38,26 мг/мл, флавоноїдів в перерахунку на рутин 0,58–0,65 мг/мл. Екстракт витримував випробування на важкі метали, вміст яких не перевищував 0,001 % (100 ppm).

На підставі результатів дослідження складено специфікацію на ЛЕВР, яку наведено в табл.3.5

*Таблиця 3.5*

**Специфікація на леспедези екстракт водний рідкий**

| Показник | Допустимі межі |
|---|---|
| Опис | Рідина зеленувато-бурого кольору зі специфічним приємним трав'яним запахом |
| Ідентифікація:<br>*Речовини поліфенольної і флавоноїдної будови*<br><br>*Речовини полісахаридної будови і таніни* | На хроматограмі досліджуваного розчину мають проявитися плями, що відповідають за значенням Rf та кольором плямам рутину, кверцетину, кислот хлорогенової та кавової.<br>Можуть бути присутні й інші, менш помітні плями<br>На хроматограмі досліджуваного розчину мають проявитися плями, що відповідають за значенням Rf та кольором плямам пірагололу та фруктози.<br>Можуть бути присутні й інші зони |
| Важкі метали, % | Не більше 0,001 |
| Сухий залишок, % | Не менше 18% |
| Мікробіологічна чистота | Критерій прийнятності:<br>ТАМС: не більше $10^2$ КУО/г<br>ТУМС: не більше $10^1$ КУО/г<br>відсутність *P. aeruginosa, S. aureus* |
| Об'єм вмісту контейнеру, мл | 97,0–103,0 |
| Кількісне визначення:<br>- *флавоноїдів, у перерахунку на рутин*<br>- *танінів, у перерахунку на пірогалол* | не менше 0,5 мг у 1,0 г екстракту<br><br>не менше 35 мг в 1,0 г екстракту |

3.3 Обговорення результатів дослідження біологічних властивостей леспедези екстракту водного рідкого

3.3.1 Обговорення результатів дослідження антимікробної активності леспедези екстракту водного рідкого

В дослідженні антимікробної дії використовували еталонні тест-культури: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538-P, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Ps. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* ATCC 4636, *B.subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 885-653, і клінічні ізоляти *S. aureus* 16, *S. epidermidis* 14, *S. aureus* 124, *St. pneumoniae* 14, *St. pyogenes* 2432, *En. faecalis* 42, *En. cloaceae* 17, *K. pneumoniae* 18, *Ac. baunani* 150, *P. aeruginosa* 18, *C. albicans* 69. Результати дослідження антимікробних властивостей леспедези екстракту водного рідкого наведені в таблиці 3.6.

*Таблиця 3.6*

**Антибактеріальна дія леспедези екстракту водного рідкого, n=3**

| Мікроорганізми | Діаметри зон затримки росту в мм до зразків | |
|---|---|---|
| | Метод | Леспедези екстракт водний |
| 1 | 2 | 3 |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 | Колодязь | 16±0,5 |
| | Диски | 13±0,5 |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P | Колодязь | 17±0,5 |
| | Диски | 13±0,5 |
| *Escherichia coli*ATCC 25922 | Колодязь | 14±0,5 |
| | Диски | 11±0,5 |
| *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 | Колодязь | 12±0,5 |
| | Диски | 11±0,5 |
| *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 | Колодязь | 13±0,5 |
| | Диски | 11±0,5 |
| *Proteus vulgaris* ATCC 4636 | Колодязь | 12±0,5 |
| | Диски | 9±0,5 |
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | Колодязь | 17±0,5 |
| | Диски | 13±0,5 |

*Продовження табл.3.6*

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| *Candida albicans* ATCC 885-653 | Колодязь | 12±0,5 |
| | Диски | 10±0,5 |
| *Staphylococcus aureus* 16 | Колодязь | 13±0,5 |
| | Диски | 9±0,5 |
| *Staphylococcus epidermidis* 14 | Колодязь | 16±0,5 |
| | Диски | 12±0,5 |
| *Streptococcus pneumoniae* 14 | Колодязь | 13±0,5 |
| | Диски | 10±0,5 |
| *Streptococcus pyogenes* 2432 | Колодязь | 13±0,5 |
| | Диски | 11±0,5 |
| *Staphylococcus aureus* 124 | Колодязь | 13±0,5 |
| | Диски | 10±0,5 |
| *Enterococcus faecalis 42* | Колодязь | 14±0,5 |
| | Диски | 10±0,5 |
| *Klebsiella pneumoniae 18* | Колодязь | 13±0,5 |
| | Диски | 9±0,5 |
| *Enterobacter cloaceae 17* | Колодязь | 13±0,5 |
| | Диски | 11±0,5 |
| *Acinetobacter baunani 150* | Колодязь | рост |
| | Диски | 8±0,5 |
| *Pseudomonas aeruginosa* 18 | Колодязь | ріст |
| | Диски | ріст |
| *Candida albicans* 69 | Колодязь | 12±0,5 |
| | Диски | 10±0,5 |

Результати мікробіологічних досліджень демонструють чутливість тест-штамів *S. aureus* ATCC6538-P та *S. aureus* ATCC 6538-P (діаметри зон затримки росту в середньому 16 та 17 мм) до водного екстракту надземної частини леспедези двоколірної (*Lespedeza bicolor)* та до клінічних ізолятів *S. aureus* 16 і *S. epidermidis 14.* Отримані результати надають можливість обрати водний екстракт до складу дерматологічного засобу, що розробляється. Актуальність використання витяжки леспедези підтверджується літературними джерелами щодо наявності встановленої репаративної, антиоксидантної і протизапальної дії вилучень з рослин різних видів *Леспедези* [127,128,135,137].

3.3.2 Обговорення результатів дослідження протизапальної дії леспедези екстракту водного рідкого

Ефективність протизапальної активності досліджували на моделі опікової рани за методикою наведеною в розділі 2. Зміну площі опікових ран (S, мм$^2$), коефіцієнт швидкості загоєння і відсоток щурів із загоєними ранами визначали у порівнянні з контрольною групою. Площу ран вимірювали за методом Л.Н. Попової з використанням прозорого міліметрового паперу, який прикладали до рани. Дослідження проводили на 2, 6, 9, 13, 16 і далі щоденно з 20 до 30 доби лікування до повного загоєння ран [167]. На наступний день після відтворення опікової травми II ступеня у всіх тварин дослідних груп нами відмічено наявність утворення щільного струпу із сіро-бурого кольору з чітко обмеженою зоною некрозу і з вираженими запальними змінами навколишніх тканин [167,174]. Розмір ранового дефекту збільшився на 3–7 % від площі ураження 490,0 мм$^2$ (табл. 3.6).

*Таблиця 3.6*

**Динаміка планіметричних показників у щурів з опіковими ранами при лікуванні леспедези екстрактом водним, n=6, (M±m)**

| Доба експерименту | Показники | Контроль | Леспедези екстракт водний рідкий |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Вихідні дані | $S_{вихід}$, мм$^2$ | 490,00±0,00 | 490,00±0,00 |
| 2 доба | $S_{вихід}$, мм$^2$ | 497,83±26,45 | 495,67±32,90 |
| | V, ум.од. | -0,02 | -0,01 |
| 6 доба | S, мм$^2$ | 442,83±32,50 | 419,50±34,52 |
| | V, ум.од. | 0,10 | 0,14 |
| 9 доба | S, мм$^2$ | 397,33±33,43 | 367,50±38,18 T5 |
| | V, ум.од. | 0,19 | 0,25 |

*Продовження табл.3.6*

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| 13 доба | S, мм$^2$ | 307,17±37,28 | 256,33±40,80 |
| | V, ум.од. | 0,37 | 0,48 |
| 16 доба | S, мм$^2$ | 200,33±33,68 | 152,50±38,56 |
| | V, ум.од. | 0,59 | 0,69 |
| 20 доба | S, мм$^2$ | 142,00±34,81 | 102,67±22,90 |
| | V, ум.од. | 0,71 | 0,79 |
| | % тварин з рубцями | – | – |
| 21 доба | S, мм$^2$ | 129,17±33,82 | 92,67±21,02 |
| | V, ум.од. | 0,74 | 0,81 |
| | % тварин з рубцями | - | – |
| 22 доба | S, мм$^2$ | 116,33±32,03 | 78,67±16,43 |
| | V, ум.од. | 0,76 | 0,88 |
| | % тварин з рубцями | - | – |
| 23 доба | S, мм$^2$ | 104,33±32,69 | 60,83±15,28 |
| | V, ум.од. | 0,79 | 0,89 |
| | % тварин з рубцями | – | – |
| 24 доба | S, мм$^2$ | 92,83±33,32 | 50,67±15,17 |
| | V, ум.од. | 0,81 | 0,90 |
| | % тварин з рубцями | – | – |
| 25 доба | S, мм$^2$ | 81,50±32,67 | 46,00±14,12 |
| | V, ум.од. | 0,83 | 0,91 |
| | % тварин з рубцями | – | 16,7 % (1 тварина) |
| 26 доба | S, мм$^2$ | 71,17±32,37 | 37,00±12,13 Т5 |
| | V, ум.од. | 0,85 | 0,92 |
| | % тварин з рубцями | – | 16,7 % (1 тварина) |
| 27 доба | S, мм$^2$ | 71,00±35,91 | 28,40±10,67 Т5 |

*Продовження табл.3.6*

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| 27 доба | V, ум.од. | 0,86 | 0,94 |
| | % тварин з рубцями | 16,7 % (1 тварина) | 16,7 % (1 тварина) |
| 28 доба | S, мм$^2$ | 78,50±40,42 | 23,00±10,11 |
| | V, ум.од. | 0,84 | 0,95 |
| | % тварин з рубцями | 33,3 % (2 тварини) | 33,3 % (2 тварини) |
| 29 доба | S, мм$^2$ | 65,00±38,52 | 21,00±1,00 |
| | V, ум.од. | 0,87 | 0,96 |
| | % тварин з рубцями | 33,3 % (2 тварини) | 66,7 % (4 тварини) |
| 30 доба | S, мм$^2$ | 59,00±44,40 | 20,00±4,00 |
| | V, ум.од. | 0,88 | 0,96 |
| | % тварин з рубцями | 33,3 % (2 тварини) | 66,7 % (4 тварини) |

В ході експерименту відмічено, що у тварин, яких лікували екстрактом, виразність клінічних ознак запалення істотно зменшувалася порівняно з контрольною групою, площа запалення зменшувалася, а коефіцієнт швидкості загоєння ран збільшувався. Початок епітелізації відмічається на 25-у добу. На 30 добу чотири з шести тварин мали загоєні рани, порівняно з двома нелікованими тваринами контрольної групи. Відмічено, що у дослідній групі тварин коефіцієнт швидкості загоєння був вище контрольної групи. Відмічено зменшення гіперемії та набряку порівняно з контрольною групою тварин [173].

За час застосування ЛЕВР усі тварини були активними, мали задовільний апетит, маса тварин дослідної і контрольної груп не відрізнялася (табл. 3.7)

*Таблиця 3.7*

**Вплив застосування леспедези екстракту водного на динаміку маси тіла (г) щурів самців, *M±m***

| Термін дослідження | Контроль | Леспедези двоколірної екстракт водний |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |

*Продовження табл.3.7*

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| Вихідні дані | 253,17 ± 3,47 | 251,67 ± 2,72 |
| 1 тиждень | 246,33 ± 3,81 | 246,00 ± 2,80 |
| 2 тиждень | 254,00 ± 3,55 | 252,67 ± 2,65 |
| 3 тиждень | 258,17 ± 4,16 | 259,33 ± 2,47 |
| 4 тиждень | 263,33 ± 3,76 | 262,50 ± 2,32 |

Примітка: n - кількість тварин у кожній групі

Висновки до розділу 3

1. Експериментально обґрунтовані умови отримання ЛЕВР – трьохступенева ремацерація з настоюванням впродовж 60 хв за температури 95±5$^{o}$С при яких забезпечується максимальне вилучення сполук поліфенольної природи, флавоноїдів і танінів. Розроблено технологічну схему виробництва проміжного продукту – ЛЕВР.

2. Досліджено фізико-хімічні властивості ЛЕВР, які підтверджують якість і закладені у специфікацію на проміжний продукт: опис, ідентифікація (полісахариди (фруктоза), речовини поліфенольної і флавоноїдної природи (кофейна, хлорогенова кислоти, рутин, кверцетин), таніни (пірогалол)), важкі метали, сухий залишок (не менше 18 %), кількісне визначення (флавоноїди у перерахунку на рутин, таніни у перерахунку на пірогалол). Складено специфікацію, яку включено в проект МКЯ і технологічну інструкцію на екстракт – проміжний продукт – леспедези екстракт водний рідкий.

3. Мікробіологічними дослідженнями підтверджено, що ЛЕВР проявляє виражений антимікробний ефект відносно тест-штамів мікроорганізмів *Staphylococcus,* що підтверджує перспективи його використання для розробки дерматологічного лікарського засобу.

4. Результати дослідження протизапальної активності на моделі опікової рани показали, що застосування ЛЕВР сприяє зменшенню ознак запалення і відсутність візуальних ознак приєднання інфекційного процесу порівняно з тваринами контрольної групи.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Development of the composition of aqueous extract of Lespedeza bicolor and gel with extract and mangiferin / M. Yaromiy, N. Bevz, O. Mykhailenko, V. Kovalov, N. Polovko, Y. Marchenko. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2025. № 1 (53). P. 4–13. https://doi.org/10.15587/2519-4852.2025.322720 (Scopus).

2. Обґрунтування вибору екстрагента для отримання вилучень наземної частини леспедеці двоколірної / К. Є. Кисельова, Н. Ю. Бевз, О. О. Михайленко, М. В. Яромій, Л. І. Вишневська. *Вісник фармації.* 2024. № 1 (105). С. 58–65. https://doi.org/10.24959/nphj.24.126

3. Яромій М.В., Юдкевич Т. К., Половко Н.П. Дослідження протизапальної активності водного екстракту леспедези двоколірної. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали XI Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 27 листопада 2024 р.). Харків : Вид-во НФаУ, 2024. С. 158–159.

# РОЗДІЛ 4
# ОБГРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ДЕРМАТОЛОГІЧНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ У ФОРМІ ГЕЛЮ

## 4.1 Обґрунтування введення до складу м’якої лікарської форми мангіферину

Актуальність розробки нових ефективних засобів фармакотерапії герпетичної інфекції пов’язана з широкою розповсюдженістю, спроможністю вірусу уражати усі органи і системи організму людини з виникненням латентної і хронічної рецидивуючої форми [2]. Лікування герпетичної інфекції складне, а сучасні методи лікування спрямовані на перешкоджання розвитку вірусу і відновлення ускладнень, які провокує активація вірусу герпесу в організмі. Існує два напрямки лікування герпесу, це застосування етіопатогенетичної противірусної терапії та комплексний метод, який включає специфічну та неспецифічну імунотерапію в комплексі з противірусною терапією [2, 3].

Перспективною сировиною за рахунок поєднання різних механізмів противірусної дії, наявності додаткових, необхідних в дерматологічних препаратах фармакологічних ефектів, є мангіферин. Мангіферин володіє такими фармакологічними ефектами, як імуномодулювальний, знеболювальний, антиоксидантний, протизапальний і антибактеріальний [175-182]. Експериментально підтверджено, що мангіферин виявляє антибактеріальну дію проти *Staphylococcus aureus* [180], а також протигрибкову (*C. albicans*, *A. niger* і *A. flavus*) [181] дію. Підтверджена противірусна активність мангіферину, отриманого з *Mangifera indica*, а також із кореневища *Anemarrhena asphodeloides* до вірусу простого герпесу 1 типу [18-21, 183, 184]. Мангіферин має здатність проникати через роговий шар і переходити в епідерміс і дерму [185]. Автори [185] методом ex vivo з використанням флуоресцентної мікроскопії підтвердили здатність мангіферину долати роговий шар епідермісу і проникати в більш глибокі шари епідермісу і в дерму. Окрім

здатності накопичуватися в шкірі, мангіферин проникає через шкіру, що підтверджено ВЕРХ аналізом з електрохімічним детектуванням усіх шарів шкіри і акцепторної рідини. На підставі дослідження впливу мангіферину на шкіру, авторами зроблено висновок щодо можливості його використання в дерматологічних і косметичних засобах [185].

Для обґрунтування введення мангіферину, отриманого із листя манго до складу гелю, нами було досліджено противірусний ефект 5% суспензії мангіферину в комбінованому водно-спирто-поліетиленоксидному розчиннику (у співвідношення інгредієнтів 5:65:10:20). Суміш розчинників суспензії обирали з огляду на їх вплив на властивості мангіферину в ЛФ, що розробляється. Дослідження проводили на базі інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України під керівництвом к. біол. н., зав. відділом репродукції вірусів Загородньої С. Д. за методиками наведеними в розділі 2.

*Визначення токсичності сполуки для культури клітин*

Цитотоксичний вплив для кожного розведення дослідного зразка оцінювали за життєздатністю клітин МТТ методом — методом колориметричної оцінки метаболічної активності клітнин (рис. 4.1).

Рис. 4.1 Вплив мангіферину на життєздатність клітин, чутливих до вірусу герпесу

Як видно із рисунка 4,1 зразок у розведеннях 1:40 – 1:640 проявив незначний токсичний ефект на клітини Vero, оскільки життєздатність клітин у порівнянні з контрольним значенням була в межах 82 – 100 %. Натомість зразок у розведенні 1:20 був токсичним для клітин, оскільки знижував життєздатність клітин на 44 %, що свідчить про низьку цитотоксичність, яка може бути пов'язана з використанням етанолу і ПЕО-400 як співрозчинників.

*Визначення антигерпетичної дії дослідного зразку*

Для визначення безпосереднього ефекту дослідного зразка, що містить 5% мангіферину на вірус герпесу (віруцидної дії), зразки (нерозведений, у розведенні 1:2,5 та 1: 5) змішували у рівних об'ємах із не розведеним вірусом простого герпесу 1 типу (ВПГ-1), проводили інкубацію суспензії зразок-вірус протягом 10, 30 та 60 хв., та визначали зміну титру вірусу.

Виявлено, що дослідний зразок проявляє значну віруцидну дію відносно ВПГ-1 (рис.4.2). Однак слід зауважити, що віруцидна дія зразку була подібною не залежно від використаного її розведення та часу експозиції з вірусом, адже зниження титру вірусу герпесу було в межах 1,7 – 2,2 $\log_{10}$.

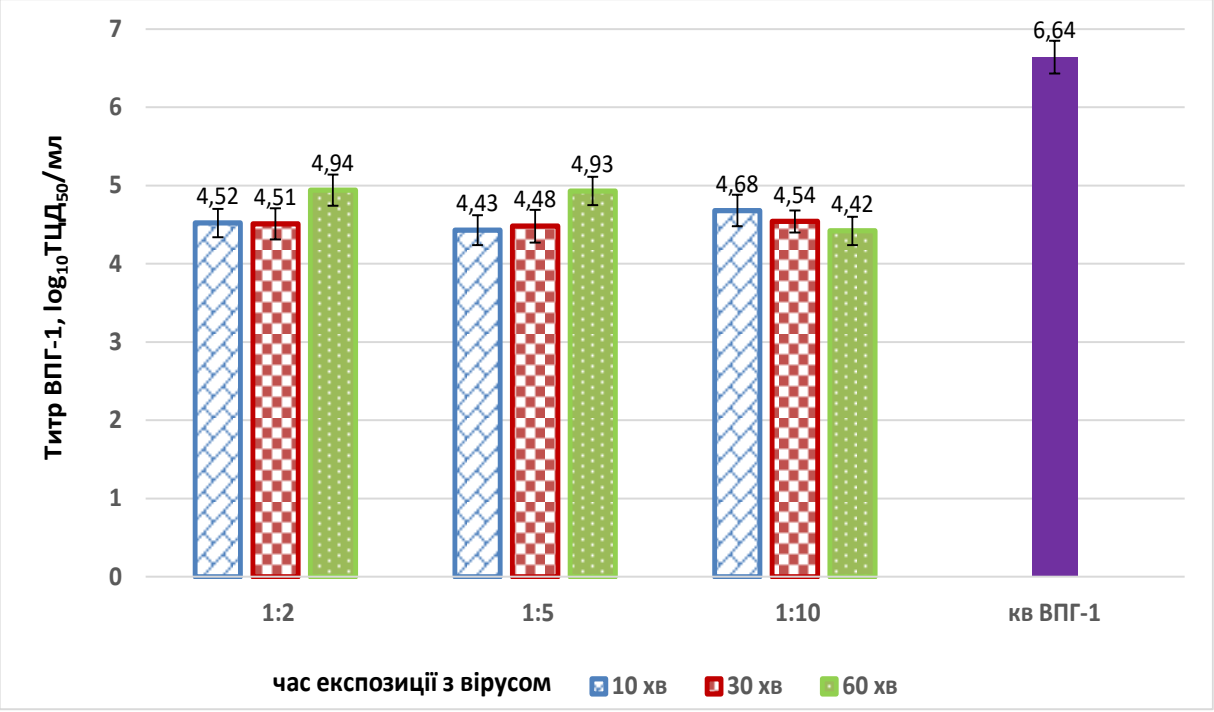



Рис. 4.2 Віруцидна активність дослідного зразку

Досліджено здатність зразку впливати на розвиток цитопатичної дії (ЦПД) вірусу герпесу на клітинах. Для цього різні розведення (1:20 – 1:320) вносили до клітин одразу після адсорбції та проникнення вірусу, та аналізували розвиток ЦПД вірусу.

Встановлено, що у досліджених розведеннях зразок ефективно пригнічує репродукцію вірусу та розвиток ЦПД ВПГ-1 на клітинах Vero у порівнянні із контролем вірусу (на 29 – 64 %) (рис.4.3).

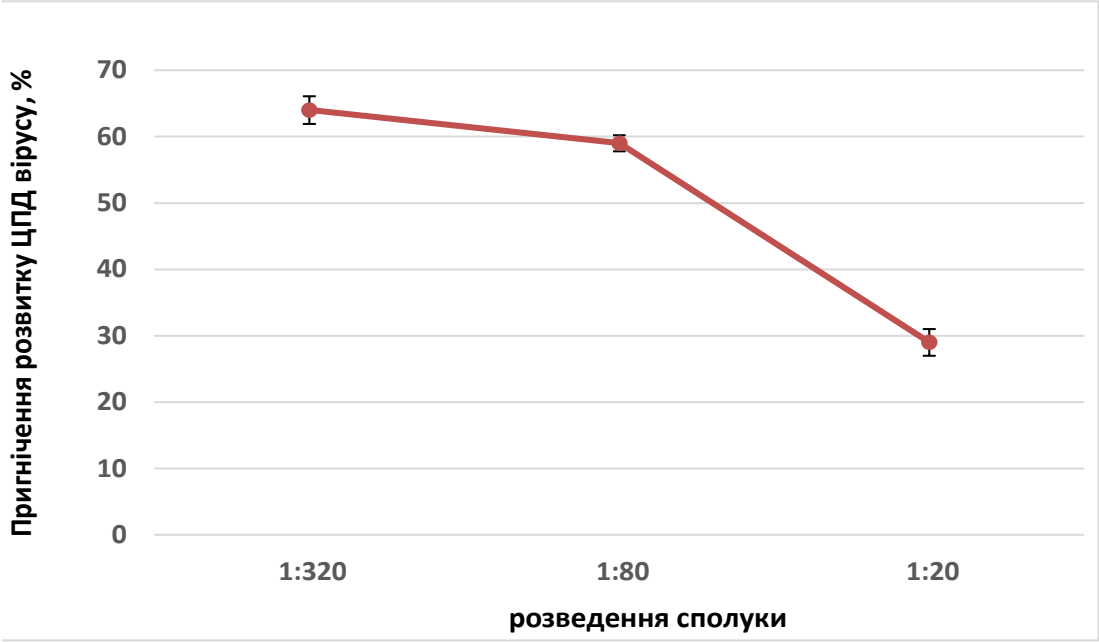



Рис. 4.3 Вплив дослідного зразка на динаміку розвитку ЦПД вірусу герпесу

Оскільки наявність або відсутність впливу сполук на ЦПД вірусу ще не дає інформації стосовно якості, повноцінності та інфекційності потомства вірусу, проведено дослідження інфекційного титру вірусу герпесу синтезованого *de novo* після обробки різними розведеннями дослідного зразку.

Як видно із рисунка 4.3, зразок у використаних розведеннях незначно впливає на репродукцію вірусу герпесу та його інфекційність, адже зниження титру вірусу не перевищувало 1,1 $\log_{10}$.

При дослідженні цитотоксичності встановлено, що дослідний зразок у максимальній досліджуваній концентрації (розведення 1:20) знижував

життєздатність клітин на 44 %, що свідчить про його низьку токсичність, яка може обумовлена дією співрозчинника ПЕО-400.

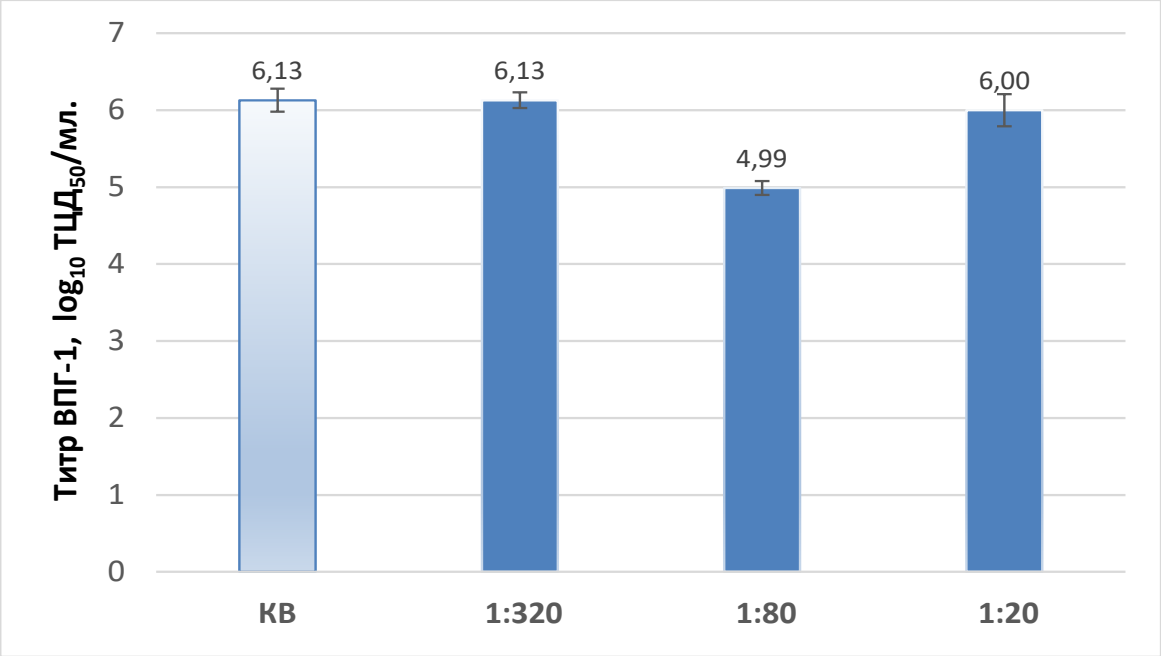



Рис. 4.4 Вплив сполуки на інфекційний титр синтезованого *de novo* ВПГ-1 (схема внесення вірусу після адсорбції вірусу)

Експериментально встановлено, що дослідний зразок проявляє значну віруцидну дію відносно ВПГ-1, відмічено, що зниження титру вірусу герпесу знаходилося в межах 1,7–2,2 $\log_{10}$. Визначено, що у досліджуваних розведеннях дисперсія мангіферину незначно впливає на репродукцію вірусу герпесу та його інфекційність, адже зниження титру вірусу не перевищувало 1,1 $\log_{10}$.

Встановлено, що у досліджених розведеннях дослідний зразок ефективно пригнічує репродукцію вірусу та розвиток ЦПД ВПГ-1 на клітинах Vero. Слід зазначити, що із збільшенням розведення сполуки її противірусна активність також збільшувалася [186].

Отримані результати підтверджують противірусну активність мангіферину, отриманого із листя манго, і відповідно перспективи створення МЛФ антигерпетичної дії.

## 4.2 Розробка складу і технології гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним

### 4.2.1 Розробка складу гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним

Для розробки дерматологічного лікарського засобу місцевої дії обрано форму гелю. До переваг гелів, як лікарської форми, належать простота технологічного процесу, економічна доступність, зручність нанесення, гігієнічність, швидкість всмоктування та швидкість вивільнення діючих речовин.

Вибір лікарської форми базувався на фармацевтичних та медико-біологічних вимогах до МЛЗ для місцевого лікування герпесу.

Вірус герпесу є внутрішньоклітинним мікроорганізмом Хвороба проходить декілька різних фази, тому основа ЛЗ повинна впливати на перебіг захворювання на різних фазах. До складу основи необхідно вводити допоміжні речовини, які підвищують проникнення АФІ. Основа повинна абсорбувати ексудат з вірусами і не перешкоджати загоєнню дефекту шкіри. Обрані АФІ повинні розчинятися, або знаходитися в мілкодисперсному стані для забезпечення їх проникнення в зону ураження. З огляду на означені вимоги та застосування в терапії вірусу герпесу 1 і 2 типу форма гелю є більш раціональною.

Однією з важливих технологічних задач є забезпечення розчинення або максимального диспергування АФІ в основі м’якого лікарського засобу.

Мангіферин помірно розчинний в етанолі і малорозчинний у воді в діапазоні температур від 15 до 30 $^{o}$C (0,18 г/100 мл при 15 $^{o}$C і 0,19 г/100 мл при 30 $^{o}$C у воді очищеній та 0,71 г/100 мл при 15$^{o}$C і 1,25 г/100 мл при 30 $^{o}$C в 96 % етанолі), практично не розчинний в органічних розчинниках, які використовуються в фармацевтичній технології.

Обґрунтування складу гелю проводили на підставі результатів органолептичних, фармакотехнологічних та реологічних досліджень. Особливості введення мангіферину до складу гелю підтверджували шляхом проведення мікроскопічних досліджень.

На етапі визначення умов введення мангіферину до МЛФ досліджували здатність диспергуватися в різних за природою розчинниках. Як розчинники використовуваливоду очищену, гліцерин, ПЕО-400, етанол 96 % – гідрофільні розчинники;и гідрофобний розчинник – кукурудзяну олію та ПАР – полісорбат 80 (Tween-80), який є солюбілізатором і підвищує розчинність важкорозчинних сполук.

ГНР, як і інші допоміжні речовини, які обрано для розробки гелю, широко використовуються в фармацевтичній технології.

З огляду на те, що мангіферин не розчиняється в обраних розчинниках, він повинен вводитися до МЛФ у вигляді дрібнодисперсного порошку. Різна здатність змочуватися розчинниками обумовила необхідність обґрунтованого вибору ГНР для введення мангіферину до складу МЛФ.

Результати дослідження показали, що мангіферин не розчинний в обраних розчинниках у максимальному співвідношенні (1:20) за температури 20 °С, а у певних співвідношеннях (ПЕО-400 і етанол 96 % – 1:2, Tween 80 і кукурудзяна олія – 1:3, вода очищена – 1:3, гліцерин – 1:6) змочується і далі змішується з розчинником з утворенням однорідних дисперсій світло-жовтого кольору.

Дослідні зразки суміші мангіферину з розчинниками гомогенізували з використанням змішувача МІ-2 для рідких та м’яких лікарських форм впродовж 15 хв зі швидкістю 100 об/хв.

Мікроскопічні дослідження показали, що субстанція мангіферину належить до моноклінічної системи (рис. 4.5). Частинки не подрібненої субстанції мають анізодіаметричну форму, з уламками на поверхні, здатні до агломерації, розмір більшості знаходиться в інтервалі 0,4–0,1 мкм.

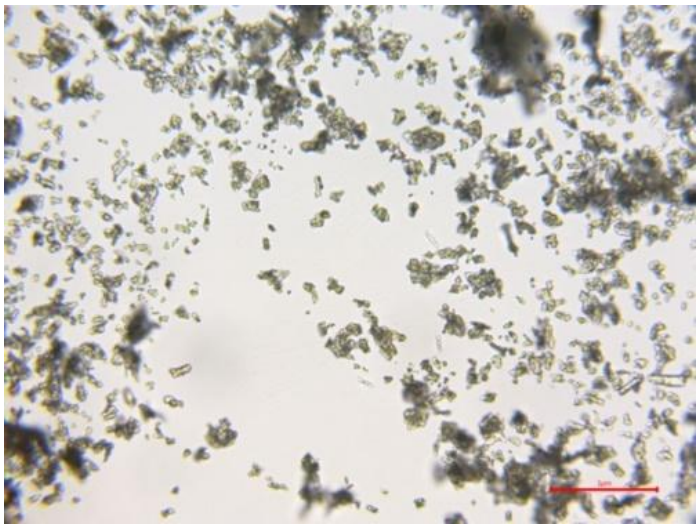


Рис. 4.5 Мікрофотографії мангіферину (при 400х збільшенні)

Мікроскопічні дослідження суспензій мангіферину з ПЕО-400 (рис. 4.6), етанолом 96 % (рис. 4.7) у співвідношенні 1:2 і водою очищеною 1:3 (рис. 4.8) показали, що розмір часток мангіферину в суспензії з водою і ПЕО-400 не змінюється, певна частина АФІ знаходиться у вигляді агломератів. В суспензії з 96% етанолом мангіферин менш схильний до агломерації, частки більш однорідні, переважна більшість має розмір менше 0,1 мкм (рис. 4.7).

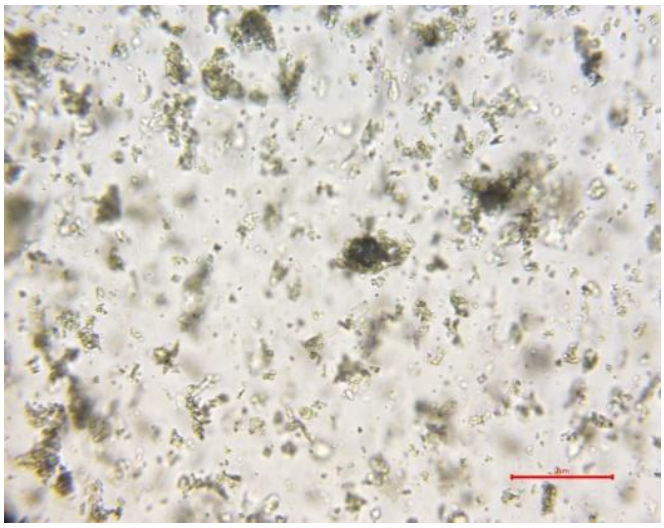


Рис. 4.6 Мікрофотографія суспензії мангіферину з ПЕО-400 (при 400х збільшенні)

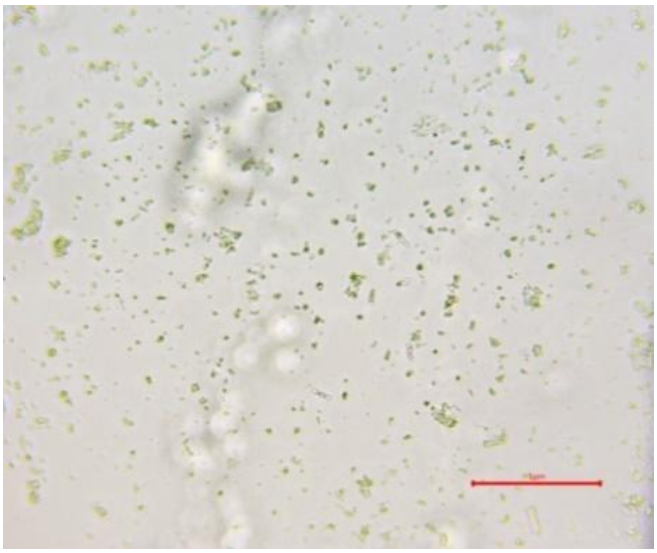


Рис. 4.7 Мікрофотографія суспензії мангіферину з етанолом 96 % (при 400х збільшенні)

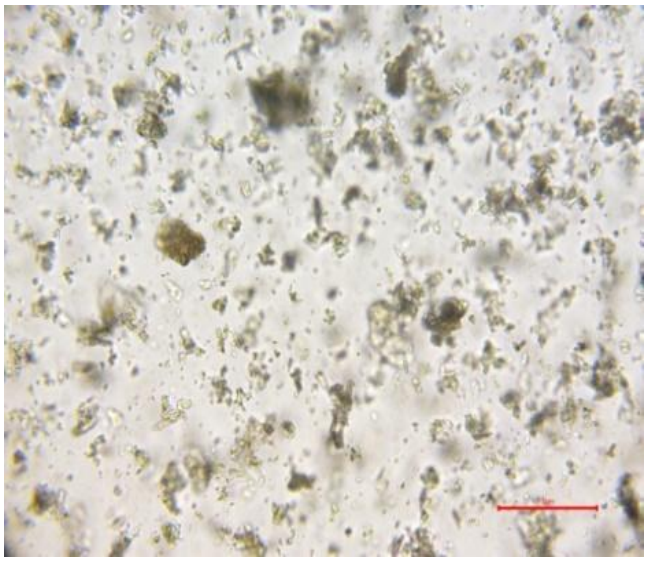


Рис. 4.8 Мікрофотографія суспензії мангіферину з водою (при 400х збільшенні)

Отримані результати враховували при розробці складу та технології гелю [187].

На підставі аналізу літературних джерел та результатів власних експериментальних досліджень, які підтвердили антимікробну та протизапальну активність ЛЕВР, до складу гелю нами введено по 5 % мангіферину і ЛЕВР [172, 173].

Склад дослідних зразків гелів наведено в таблиці 4.1. Зразки гелів гомогенізували за допомогою змішувача МІ-2 впродовж 15 хв зі швидкістю 100 об/хв. Зразки оцінювали за зовнішнім виглядом, значенням pH, осмотичною здатністю і вивільненням мангіферину методом діалізу через напівпроникну мембрану.

*Таблиця 4.1*

**Склад дослідних зразків**

| Найменування інгредієнта | Номер зразку/Вміст інгредієнтів, % | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Мангіферин | 5,0 | | | | | | |
| Леспедези екстракт водний рідкий | 5,0 | | | | | | |
| ПЕО-400 | 20,0 | | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 |
| Етанол 96 % | | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | | 10,0 |
| Кукурудзяна олія | | | | | | 5,0 | 5,0 |
| Твін 80 | | | | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Карбопол | 0,8 | | | | | | |
| Трометамол | 0,8 | | | | | | |
| Вода очищена | До 100 | | | | | | |

Органолептичні і фізико-хімічні дослідження зразків, які проводили за методиками, описаними в розділі 2, наведено в таблиці 4.2.

*Таблиця 4.2*

**Властивості дослідних зразків**

| Найменування інгредієнта | Номер зразку/Вміст інгредієнтів, % | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Опис | Однорідна маса кремового кольору зі слабким трав’яним запахом | | | | | | |

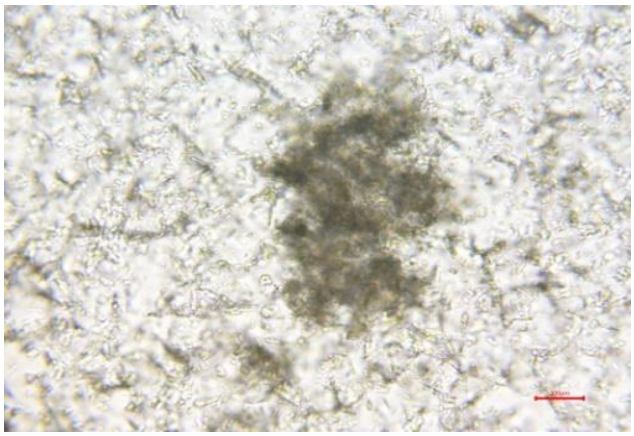
*Продовження табл.4.2*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Термостабільність | Стабільний | | | | | | |
| Колоїдна стабільність | Стабільний | | | | | | |
| Значення pH | 6,5± 0,1 | 6,5± 0,2 | 6,6± 0,3 | 6,5± 0,2 | 6,5± 0,2 | 6,4± 0,2 | 6,5± 0,1 |

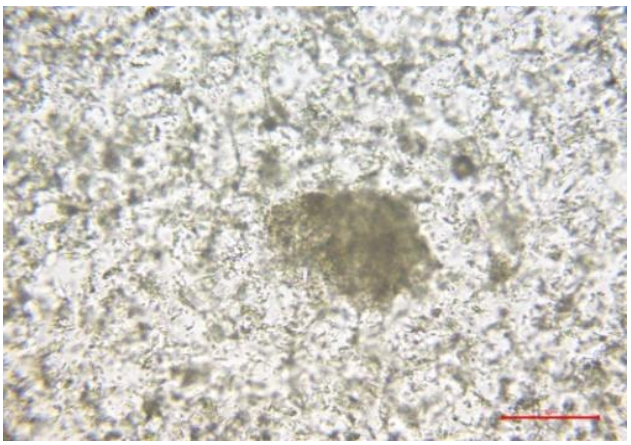
За органолептичними і фізико-хімічними властивостями зразки гелів є однорідною масою кремового кольору зі слабким трав'яним запахом, термо- і колоїдностабільні, зі значенням pH в діапазоні 6,2–6,9 [188].

Обґрунтування складу ЛЗ проводили за результатами мікроскопічних досліджень зразків, визначення їх осмотичних властивостей та здатності мангіферину вивільнятися з основ.

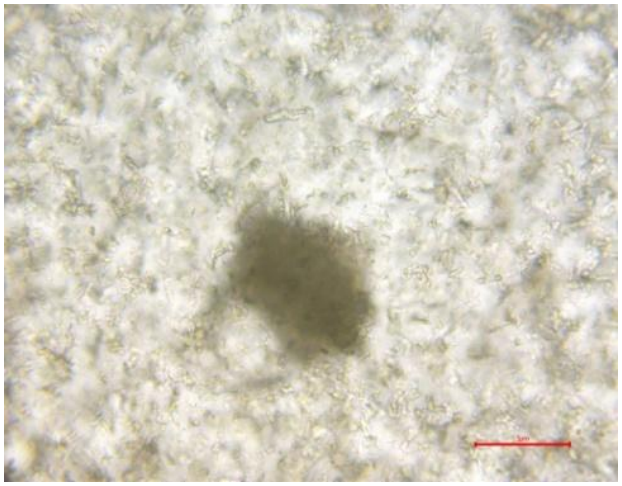
Мікрофотографії зразків (рис. 4.9), склад яких наведено в табл. 4.1, продемонстрували схильність до агломерації мангіферину у водному середовищі, однак попереднє диспергування з 96 % етанолом зменшує розмір агломератів, а введення ПАР (полісорбату 80) попереджає їх утворення (зразки 4, 5) за виключенням зразку 6, який не містив етанол. Встановлено, що введення ПАР до зразку 6 зменшує розмір агломератів порівняно зі зразком 1. В зразках 6 та 7 спостерігається наявність мілкодиспергованих часток олії кукурудзяної, розмір яких був в діапазоні від 0,14 до 0,22 мкм.



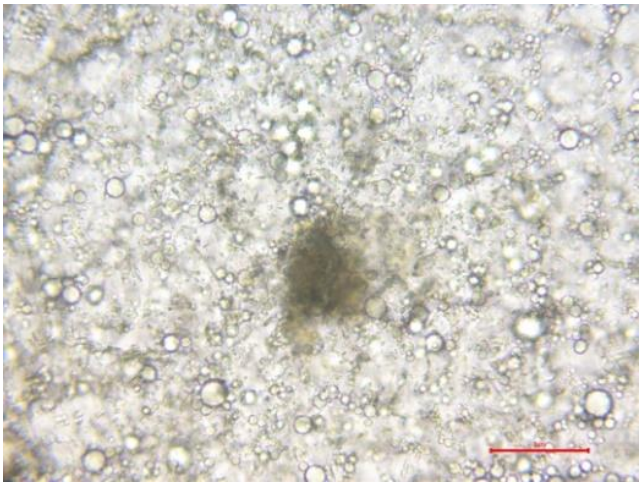
Зразок № 1



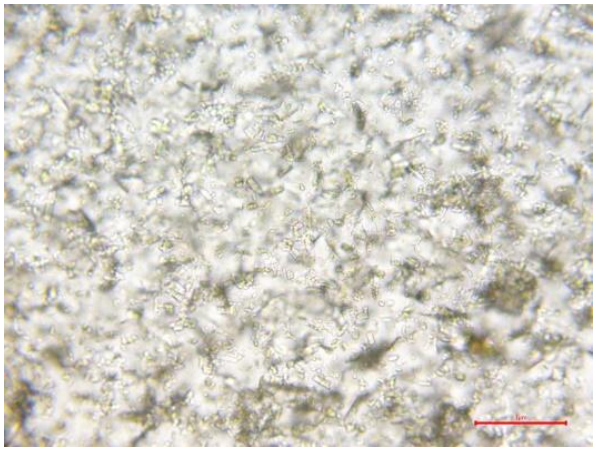
Зразок № 2



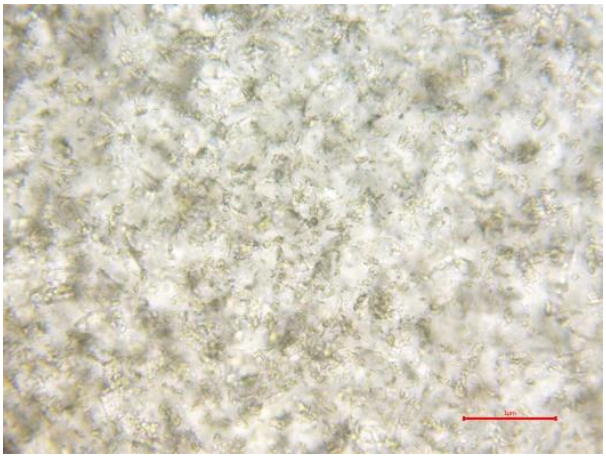
Зразок № 3



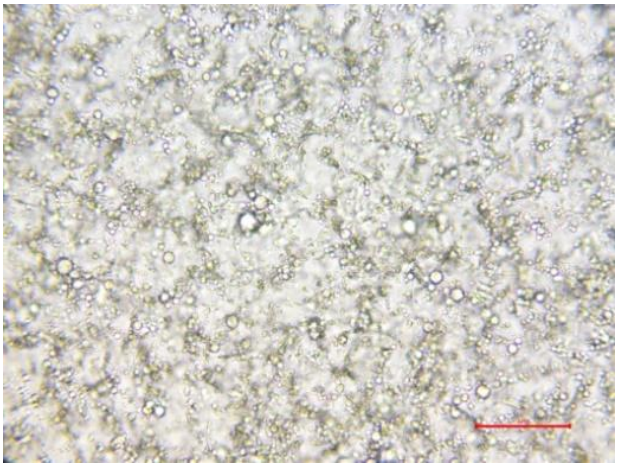
Зразок № 4



Зразок № 5



Зразок № 6



Зразок № 7

Рис. 4.9 Мікрофотографії дослідних зразків при 400х збільшенні

На наступному етапі дослідження нами вивчалася осмотична активність дослідних зразків

Як було зазначено, обґрунтування складу ЛЗ повинно ґрунтуватися на медико-біологічних вимогах до м'якого лікарського засобу, основа якого повинна впливати на перебіг захворювання у різних фазах. ЛЗ для терапії герпесвірусних інфекцій повинен поглинати ексудат з вірусами. Цей ефект забезпечується введенням осмотично-активних речовин, до яких, в першу чергу, відносяться поліетиленоксиди. Для визначення осмотичної активності основ нами проведено дослідження абсорбційної здатності дослідних зразків (табл. 4.1).

Дослідження осмотичної активності проводили за температури 34 ± 1 °С у дослідах *in vivo* методом діалізу через напівпроникну целофанову мембрану за методикою наведеною в розділі 2.

Результати дослідження показали (рис. 4.10), що гелеві основи з осмотично-активним неводним розчинником ПЕО-400 (зразки 1, 3, 5), мають виражену осмотичну активність, і здатні впродовж 8 годин абсорбувати близько 40 % води, на відміну від гелів, що не містять ПЕО-400 і абсорбують менше 10 % води (зразки 2 і 4).

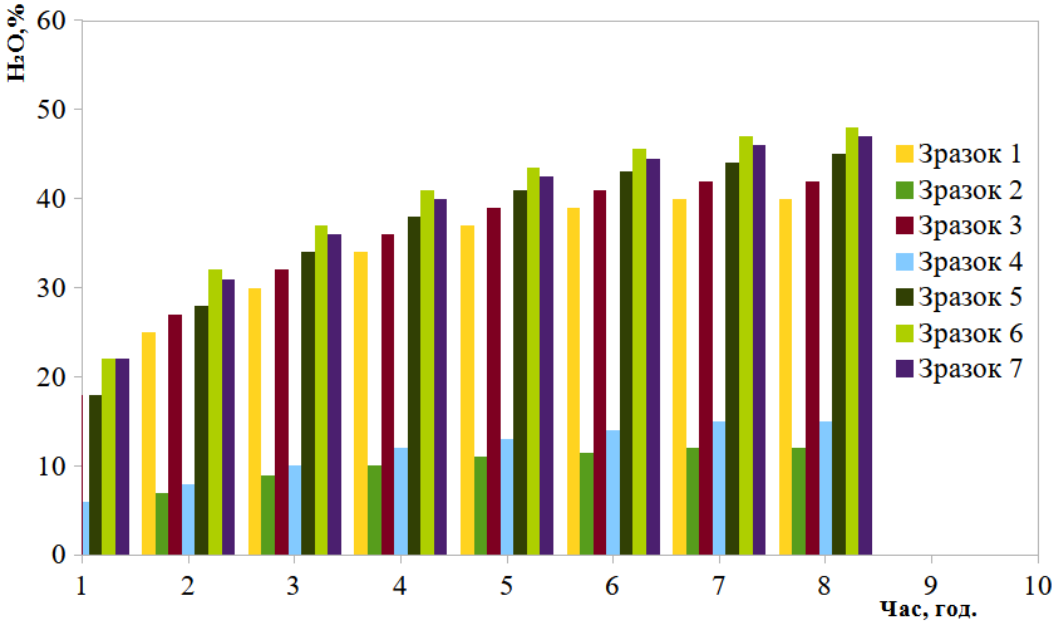



Рис. 4.10 Кінетика абсорбції води дослідними зразками

Введення олії і ПАР приводить до незначного підвищення осмотичних властивостей модельних зразків з ПЕО-400 (близько 5 % для зразків 6 і 7), яке відбувається за рахунок зменшення кількості гідрофільної фази і відповідно підвищення в ній концентрації осмотично-активного ГНР [187, 188].

Важливим етапом обґрунтування складу основи МЛФ є дослідження динаміки вивільнення АФІ. Підтвердження спроможності вивільнятися з основи МЛФ проводиться біофармацевтичними дослідженнями і частіше за все з використанням методу діалізу через напівпроникну мембрану.

*Визначення кінетичних параметрів зразків* проводили методом діалізу через напівпроникну мембрану діалізатору за методикою наведеною в розділі 2. Як діалізну рідину використовували фосфатний буферний розчин з pH 6,0 PI, Дослідження проводили при температурі (34 ± 1) °С. Відбір проб (аліквот) проводили через кожну годину впродовж 5 год експерименту. У відібраних пробах визначали вміст мангіферину методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці.

Важливим етапом проведення досліджень є вибір акцепторного середовища і методу кількісного визначення АФІ в ній.

При проведенні біофармацевтичних досліджень обґрунтовували використання методу абсорбційної спектрофотометрії для кількісного визначення мангіферину. В ході досліджень встановлено, що в ділянці від 200 нм до 400 нм 0,016 % розчин стандартного зразку мангіферину і 0,016 % розчину ЛЕВР у фосфатному буферному розчині з pH 6 характеризуються наявністю максимумів поглинання за довжин хвилі 242 нм, 257 нм, 318 нм і 369 нм. Проба діалізної рідини відібрана після дифундування дослідного зразку гелю має доволі інтенсивний і пологий максимум за довжини хвилі 255 нм і максимуми за довжин 318 нм і 369 нм (рис. 4.11).

Наявність у діалізній рідині вилучення з гелю інтенсивного максимуму за довжини хвилі 255 нм свідчить про вплив допоміжних речовин гелю на характер спектру (рис. 4.11).

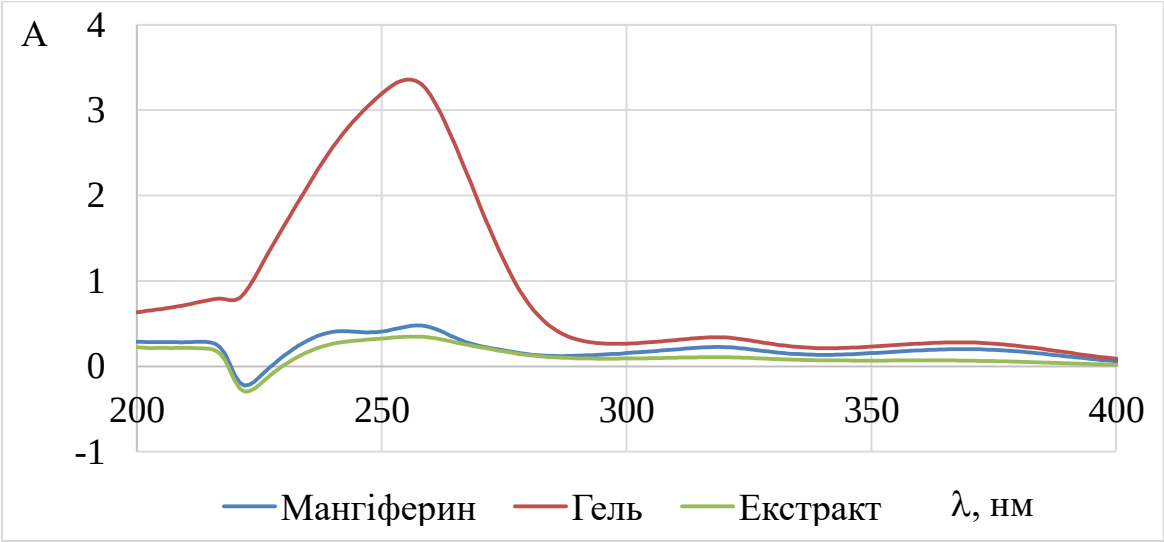



Рис. 4.11 Електронний спектр поглинання 1 – вивільнення з гелю; 2 – розчину мангіферину і 3 – розчину ЛЕВР в фосфатному буферному розчину з pH 6,0

Кількість мангіферину, що перейшов у середовище вивільнення, визначали за довжини хвилі 369 нм, при якій відбувається мінімальний вплив на оптичну густину розчину ЛЕВР (рис.4.12).

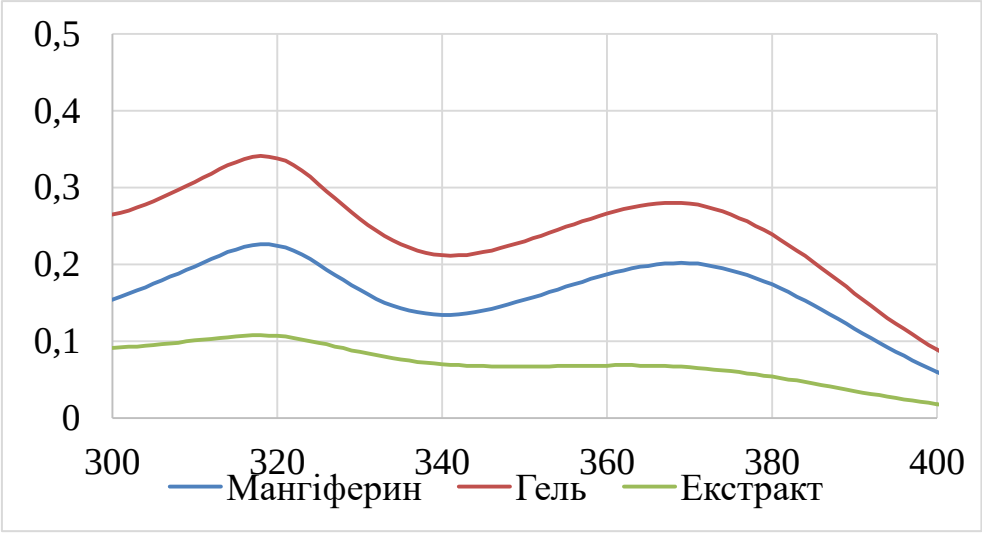



Рис. 4.12 Електронний спектр поглинання 1 – вивільнення з гелю; 2 – розчину мангіферину і 3 – розчину ЛЕВР в фосфатному буферному розчину з pH 6,0

Результати дослідження кількісного вмісту мангіферину в акцепторній рідині показали його здатність вивільнятися в буферний розчин, отже, обраний

метод може бути використаний при проведенні кількісного визначення мангіферину в акцепторній рідині.

Методику проведення досліджень наведено в розділі 2. Залежність вивільнення мангіферину від складу експериментальних основ (табл. 4.1) наведено на рис. 4.13. Результати продемонстрували, що більш інтенсивне вивільнення з усіх основ відбувається впродовж перших 3 год дослідження [189].

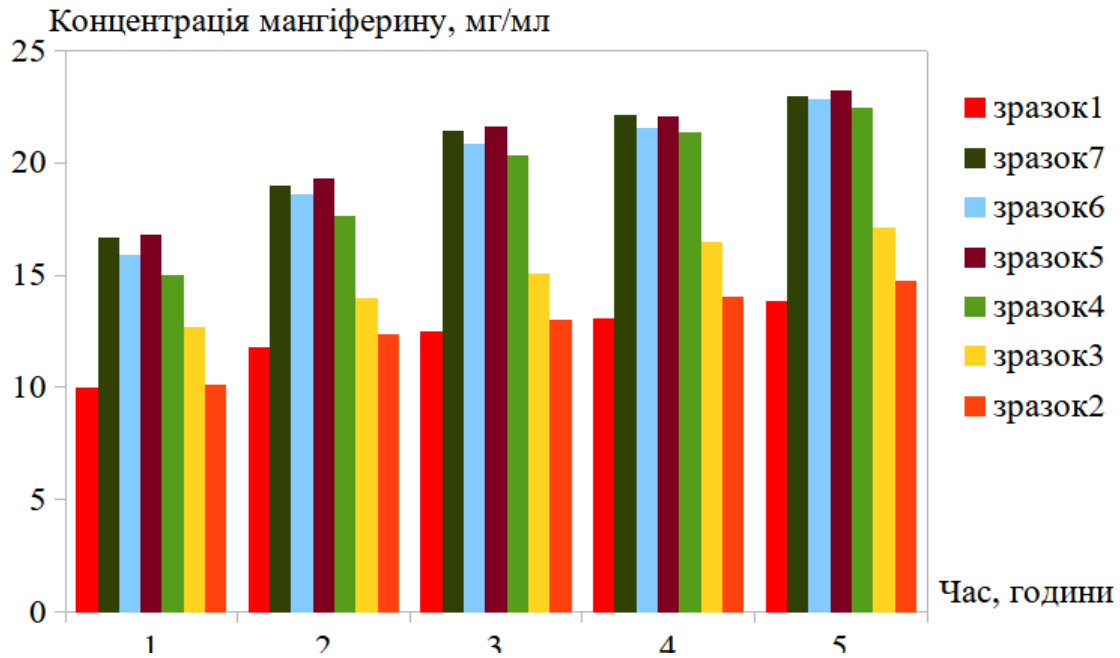



Рис. 4.13 Динаміка вивільнення мангіферину з дослідних гелевих основ

Експериментально встановлено, що повнота вивільнення залежить від складу основи.

Введення до складу основи 96 % етанолу і ПЕО-400 підвищує вивільнення на близько 20 % порівняно з основами, що містили лише один із зазначених спів-розчинників (зразок 3, порівняно з 1 і 2). Однак більш інтенсивно на швидкість і повноту вивільнення впливає твін-80 (зразки 4–7), а введення 5 % олії кукурудзяної статистично значимо не впливає на цей процес (зразок 7 порівняно з 5) [188]. Спочатку було запропоновано склад, де є 96% етанол і ПЕО-400.

З огляду на отримані результати, для подальших досліджень з

обґрунтування складу гелю обрано основу 7, що містить 20 % ПЕО-400, 10 % 96 % етанолу; 5 % олії кукурудзяної, 1 % твін-80, карбополу і трометамолу по 0,8% та води очищеної до 100,0. Завдяки осмотичним властивостям, які забезпечуються введенням 20 % ПЕО-400, основа буде абсорбувати ексудат з вірусами. Суміші співрозчинників (етанолу, ПЕО-400 і твіну-80), попереджає агрегацію мангіферину, забезпечує більш повне вивільнення із основи. Введення рослинної олії сприяє пом'якшувальному ефекту основи. Використання ПАР, етанолу, гідрофобних допоміжних речовин відповідає основним підходам до розробки МЛЗ з мангіферином [190

*Обґрунтування вибору консерванту*

Наступним етапом досліджень було обґрунтування доцільності введення консерванту до складу гелю з мангіферином і ЛЕВР.

Дослідження проводили за методикою ДФУ [153], яку наведено у розділі 2. Як консерванти обрано калію сорбат і натрію бензоат. Зразок 1 – не містив консерванту; зразки 2–4 містили натрію бензоат в концентрації 0,1, 0,2 та 0,3 % відповідно; зразки 5–7 – калію сорбат в концентрації 0,2, 0,3 та 0,4 %

Результати дослідження ефективності обраних консервантів, які наведено у табл. 4.3, показали необхідність введення до складу гелю консерванту.

*Таблиця 4.3*

**Дослідження ефективності консервантів у зразках дерматологічного гелю** (n = 5, P = 95%)

| Тест-культури мікроорганізмів | Консервант (концентрація, %) | Мікробне навантаження після інокуляції, lg КУО/мл | Lg зменшення вихідного мікробного навантаження (вимоги ДФУ/зразок) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 2 доби | 7 діб | 14 діб | 28 діб |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
| *Staphylococcus aureus* АТСС 6538 | № 1 без консерванта | 5,84 | 2/2,06 | 3/3,04 | — | НЗ/НЗ |
| | № 2 натрію бензоат 0,1 % | 5,78 | 2/2,40 | 3/3,34 | — | НЗ/НВ |
| | № 3 натрію бензоат 0,2 % | 5,82 | 2/3,24 | 3/4,18 | — | НЗ/НВ |

*Продовження табл. 4.3*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | № 4 натрію бензоат 0,3 % | 5,80 | 2/2,46 | 3/4,62 | — | НЗ/ |
| | № 5 калію сорбат 0,2 % | 5,86 | 2/3,00 | 3/4,26 | — | НЗ/ НВ |
| | № 6 калію сорбат 0,3 % | 5,82 | 2/3,55 | 3/ НВ | — | НЗ/ НВ |
| | № 7 калію сорбат 0,4 % | 5,84 | 2/3,64 | 3/ НВ | — | НЗ/ НВ |
| *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027 | № 1 без консерванта | 5,78 | 2/1,26 | 3/1,92 | — | НЗ/2 ,86 |
| | № 2 натрію бензоат 0,1 % | 5,85 | 2/2,24 | 3/3,24 | — | НЗ/ НВ |
| | № 3 натрію бензоат 0,2 % | 5,78 | 2/2,88 | 3/3,82 | — | НЗ/ НВ |
| | № 4 натрію бензоат 0,3 % | 5,90 | 2/3,14 | 3/4,28 | — | НЗ/ НВ |
| | № 5 калію сорбат 0,2 % | 5,78 | 2/2,90 | 3/3,58 | — | НЗ/ НВ |
| | № 6 калію сорбат 0,3 % | 5,80 | 2/2,86 | 3/НВ | — | НЗ/ НВ |
| | № 7 калію сорбат 0,4 % | 5,78 | 2/3,15 | 3/НВ | — | НЗ/ НВ |
| *Candida albicans* АТСС 885-653 | № 1 без консерванта | 5,84 | — | — | 2/2,12 | НЗ/2 ,91 |
| | № 2 натрію бензоат 0,1 % | 5,70 | — | — | 2/3,28 | НЗ/ НВ |
| | № 3 натрію бензоат 0,2 % | 5,92 | — | — | 2/3,40 | НЗ/ НВ |
| | № 4 натрію бензоат 0,3 % | 5,88 | — | — | 2/3,62 | НЗ/ НВ |
| | № 5 калію сорбат 0,2 % | 5,64 | — | — | 2/3,24 | НЗ/ НВ |
| | № 6 калію сорбат 0,3 % | 5,72 | — | — | 2/3,92 | НЗ/ НВ |
| | № 7 калію сорбат 0,4 % | 5,84 | — | — | 2/НВ | НЗ/ НВ |
| *Aspergillus brasiliensis* АТСС 16404 | № 1 без консерванта | 5,90 | — | — | 2/1,96 | НЗ/2 ,98 |
| | № 2 натрію бензоат 0,1 % | 5,94 | — | — | 2/2,64 | НЗ/ НВ |

*Продовження табл. 4.3*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | № 3 натрію бензоат 0,2 % | 5,92 | — | — | 2/2,94 | НЗ/ НВ |
| | № 4 натрію бензоат 0,3 % | 5,87 | — | — | 2/3,98 | НЗ/ НВ |
| | № 5 калію сорбат 0,2 % | 5,80 | — | — | 2/3,16 | НЗ/ НВ |
| | № 6 калію сорбат 0,3 % | 5,76 | — | — | 2/НВ | НЗ/ НВ |
| | № 7 калію сорбат 0,4 % | 5,88 | — | — | 2/НВ | НЗ/ НВ |

Примітка: НВ – мікроорганізми не виявляються; НЗ – не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів; «—» – не потребує визначення за методикою.

У зразку 1, який не містив консервант, не спостерігається необхідне зменшення мікробного навантаження, так логарифм зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів *Ps. aeruginosa* менше 2 через 2 доби, що свідчить про необхідність введення антимікробних консервантів до розробленого гелю.

Результати мікробіологічних досліджень свідчать про те, що дослідні зразки гелів, що містять обрані консерванти – натрію бензоат з 0,1 по 0,3 %, а також калію сорбат з 0,2 та 0,4 % відповідають критерію класу «А» (по відношенню до бактерій *S. aureus* ATCC 6538 *і Ps.aeruginosa* ATCC 9027 і грибгів *C. albicans* ATCC 885-653 *і A. brasiliensis* ATCC 16404 для нестерильних ЛП для зовнішнього застосування) згідно вимог ДФУ. Враховуючи логарифм зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів, безпеку використання та економічну доступність сировини, обрано 0,3 % калію сорбату.

*Дослідження структурно-механічних властивостей розробленого гелю*

Важливим етапом в розробці складу м’якої лікарської форми є визначення в’язкопластичних властивостей, таких як структурна в’язкість, межа плину, тиксотропність та інші. Саме завдяки цим дослідженням м’яка лікарська форма володіє необхідними структурно-механічними властивостями, які забезпечують стабільність в процесі виробництва та зберігання, легкість транспортування, дозування, екструдування з туби, нанесення та розподіл на

поверхні шкіри. Під час реологічних досліджень зразки піддаються механічному руйнуванню за допомогою внутрішнього циліндра віскозиметра із наростаючою швидкістю, цей процес подібний тому, який відбувається при таких технологічних операціях виробництва ЛЗ, як гомогенізація і фасування, а також при використанні ЛЗ під час намазування на поверхню шкіри [150]. Головним показником консистентних властивостей є тип плину, який для МЛФ має бути неньютонівським, і який в свою чергу може бути псевдопластичним або пластичним. На проміжку пластичної течії в'язкість постійна і не залежить від швидкості деформації [150]. Дослідження реологічних (структурно-механічних) властивостей експериментального зразку гелю здійснювали реовіскозиметром Rheolab QC (Anton Paar, Австрія) з використанням системи коаксіальних циліндрів C-CC27/SS Результати дослідження структурно-механічних властивостей розробленого гелю наведено в табл. 4.4.

*Таблиця 4.4*

**Результати дослідження структурно-механічних властивостей дослідного зразка**

| Показники | Властивості дослідного зразка |
|---|---|
| Структурна в'язкість, ŋ, Па×с при температурі 25° С і:<br>- швидкості зсуву Dr, 1,005 $C^{-1}$<br>- швидкості зсуву Dr, 350 $C^{-1}$ | 87±9<br>0,78±0,10 |
| Механічна стабільність | 1,10 |
| Коефіцієнт динамічного розрідження в діапазоні швидкостей зсуву:<br>$K_d$ 3,45 і 10,4 $s^{-1}$<br>$K_d$ 27,7 і 100 $s^{-1}$ | 58,83<br>61,29 |

Показник динамічного розрідження $Kd_1$ розраховували у проміжку швидкостей зсуву, які умовно відповідають швидкостям розподілення зразка по поверхні шкіри. Показник динамічного розрідження $Kd_2$ відповідає швидкостям

технологічного процесу виробництва. Як видно із отриманих даних, значення показника $Kd_2$ є вищими, ніж $Kd_1$, так як структура руйнується у більшій мірі за високих швидкостей зсуву.

Розраховане значення механічної стабільності дослідних зразків гелів близьке до 1, що підтверджує незначний ступінь руйнування структури каркасу гелю в процесі механічної дії та про наявність тиксотропних властивостей, завдяки яким гелева структура відновлюється після припинення механічної дії [150].

На рис. 4.14 наведена реограма плину досліджуваного зразку, з якої видно, що він має псевдопластичний тип плину, а для початку плину зразку необхідно було прикласти деяку руйнівну силу. Про псевдопластичний тип плину свідчить і поступове зменшення структурної в'язкості зразку за наростаючої швидкості руйнування системи (рис. 4.15). Наявність незначних тиксотропних властивостей структурованих систем є гарантією відновлення частково зруйнованої структури гелю у стані спокою.

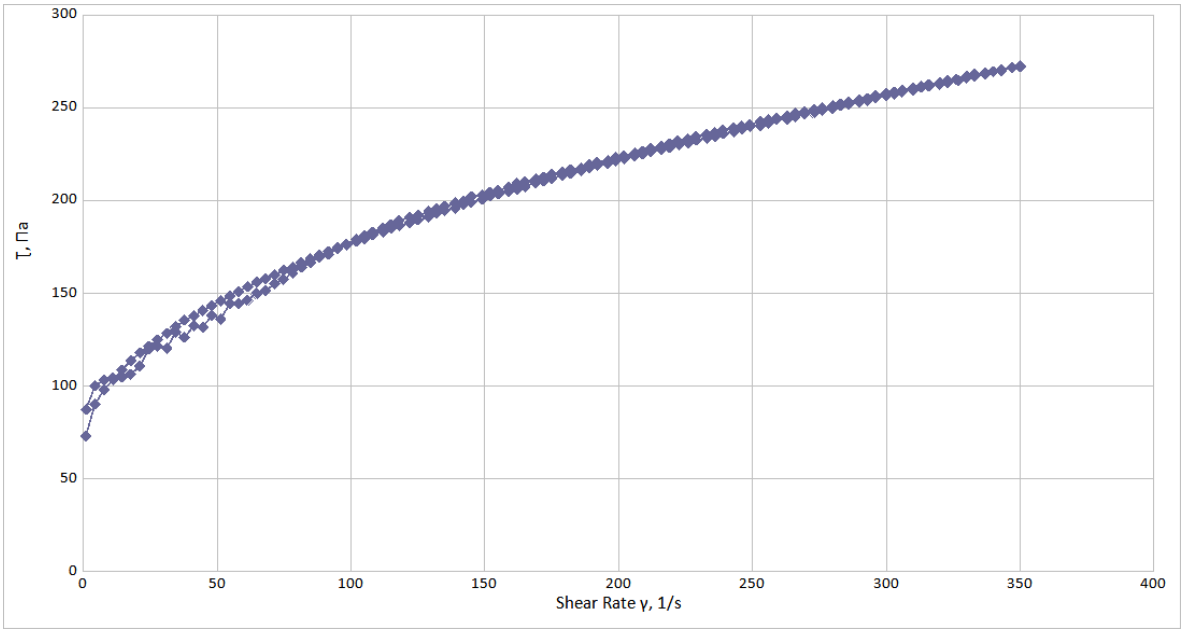



Рис. 4.14 Залежність напруги зсуву (τ, Па) від градієнта швидкості зсуву (γ, 1/s)

Про тиксотропію системи свідчить низхідна крива, яка характеризує його поведінку у зворотному напрямку, тобто швидкості зсуву від 350 $s^{-1}$ до 1 $s^{-1}$ і

розташована вона нижче висхідної кривої. Величина площі петлі гістерезису, яка може свідчити про швидку або повільну тиксотропію, демонструє швидке відновлення структури [191].

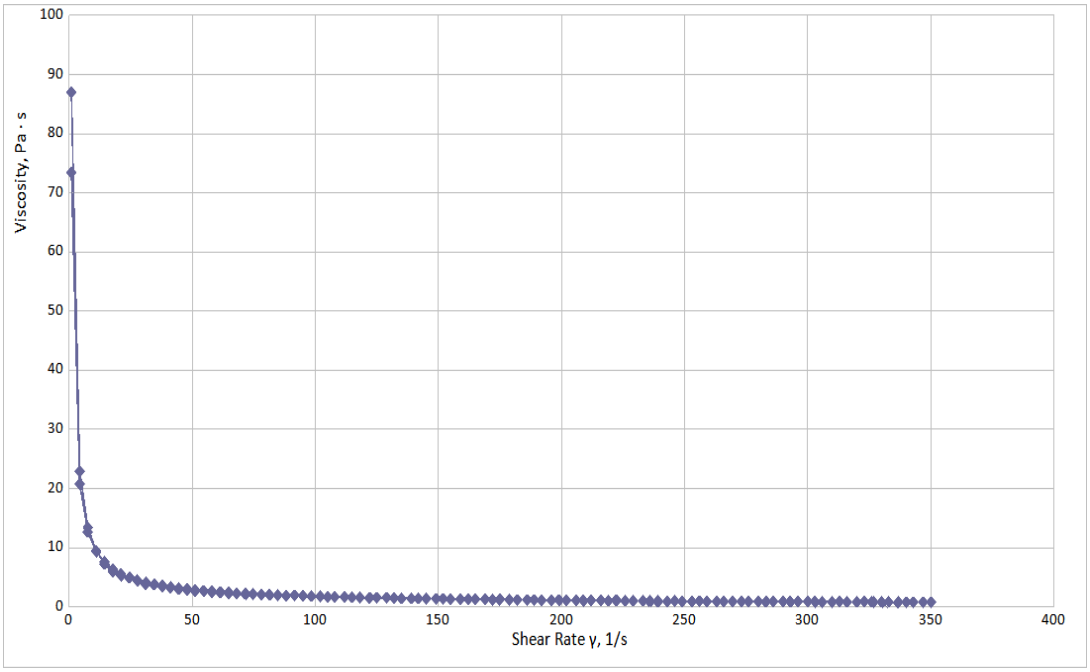



Рис. 4.15 Залежність структурної в'язкості (η, Pa·s) від градієнта швидкості зсуву (γ, 1/s)

Отже, результатами оцінки реологічних властивостей гелю показано стабільність гелевої структури і її здатність відновлюватися у стані спокою.

4.2.2 Викладення технологічного процесу виробництва гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким

4.2.2.1 Опис технологічного процесу виготовлення гелю «Манголеспедин» в умовах виробничих аптек

Ключовим аспектом забезпечення якості і нешкідливості ЛЗ є дотримання технологічних параметрів виготовлення/виробництва з визначеними критеріями прийнятності. Нами опрацьовано технологію виготовлення гелю з мангіферином і ЛЕВР в умовах виробничої аптеки та промислового виробництва і складено блок-схеми технологічного процесу. Розробка

технології гелю базувалась на попередньо проведених експериментальних дослідженнях.

Блок-схема технологічного процесу виготовлення та контролю якості основних параметрів розробленого гелю в умовах аптеки наведена на рис. 4.16.

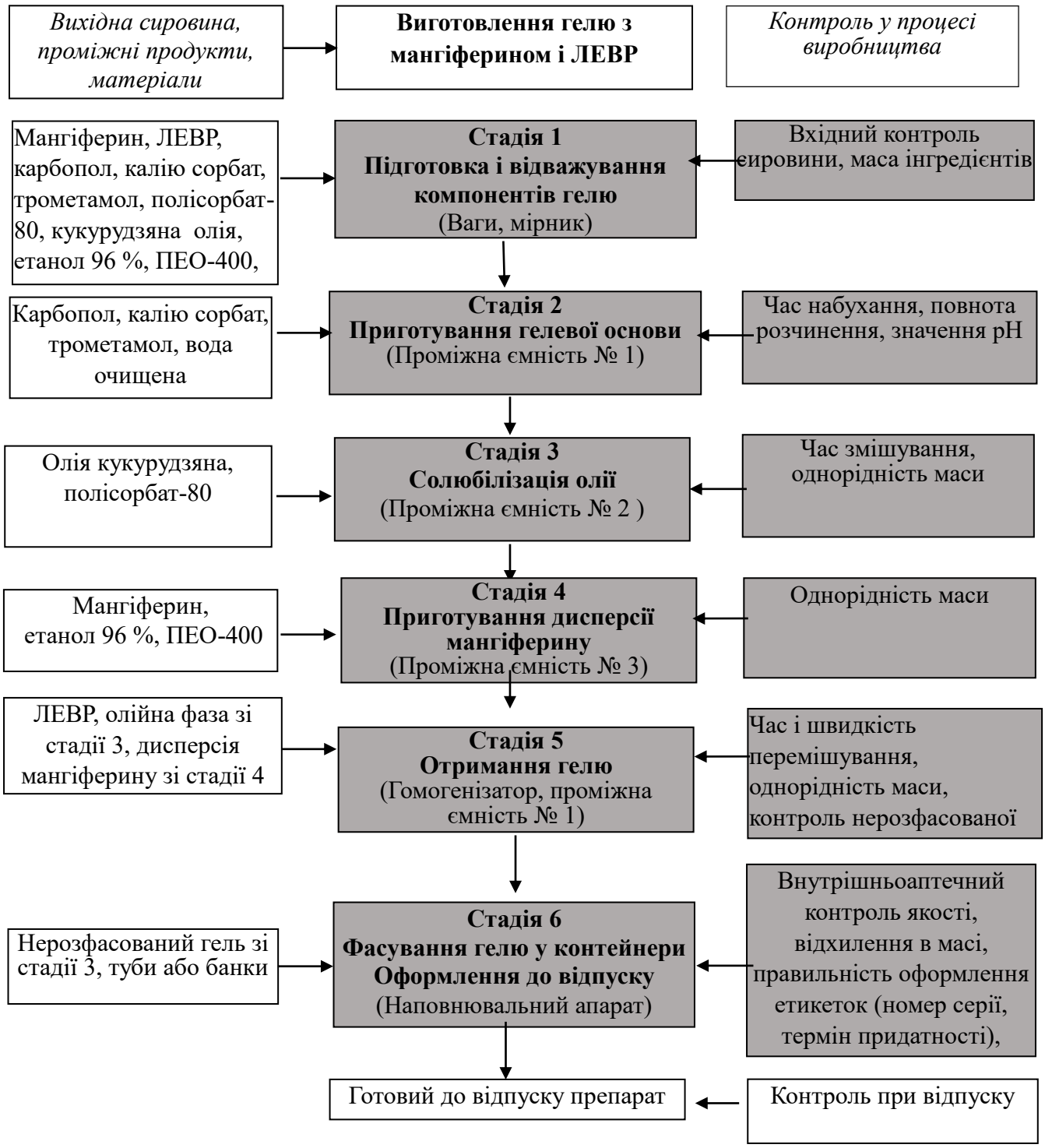



Рис. 4.16 Блок-схема виробництва гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким в умовах аптеки

Експериментальні зразки виготовляли з урахуванням правил виготовлення гелів і введення до їх складу нерозчинних речовин з утворенням суспензій гідрофобних речовин: у ємності № 1 на поверхню води очищеної наносили тонким шаром карбопол і залишали для набухання на 15–20 хв, після чого додавали калію сорбат і перемішували до розчинення, далі додавали трометамол і перемішували до розчинення, загущення маси і утворення гелю; у ємності № 2 відважували кукурудзяну олію і додавали необхідну кількість полісорбату-80 і перемішували до однорідності; у ємності № 3 мангіферин змішували з етанолом 96 % і додавали ПЕО-400 при перемішуванні. Після цього солюбілізовану олію з ємності № 2 додавали до гелю у ємність № 1 і гомогенізували за допомогою гомогенізатора зі швидкістю 100 об/хв, впродовж 10 хв, додавали дисперсію магіферину з ГНР, перемішували до однорідності; далі вводили необхідну кількість ЛЕВР і продовжували перемішувати до однорідності, після чого передавали на фасування.

Виготовлений гель є однорідною в'язкою гелеподібною масою жовтого кольору зі специфічним запахом, властивим мангіферину. Готовий гель фасують і пакують у пластикові контейнери. За розробленою технологією виготовили три серії (01092023, 02092023, 03092023) та провели проміжний контроль гелю (табл. 4.5).

*Таблиця 4.5*

**Результати проміжного контролю нерозфасованого гелю**

| Показник | Допустима норма | Результати досліджень, серія препарату | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 01092023 | 02092023 | 03092023 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Опис | Однорідна гелеподібна маса кремового кольору, зі слабо-вираженим трав'яним запахом, без видимих включень | відповідає | відповідає | відповідає |

*Продовження табл.4.5*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| Однорідність | Має бути однорідним | однорідний | однорідний | однорідний |
| pH | 6,0–7,0 | 6,5±0,1 | 6,5±0,1 | 6,5±0,1 |

Отримані результати досліджень надають можливість вважати, що препарат, виготовлений за розробленою технологією, є стабільним, технологія, яку внесено до технологічної інструкції виготовлення гелю «Манголеспедин», дозволяє отримати ЛЗ, який відповідає вимогам специфікації ТІ та ДФУ.

За результатами дослідження складено технологічну інструкцію на препарат – гель «Манголеспедин», технологію апробовано на базі виробничих аптек «Леда», м. Харків та «Гармонія 200», м. Чернівці, № 80, м. Слов'янськ (Додаток Г).

4.2.2.2 Опис технологічного процесу промислового виробництва гелю «Манголеспедин»

У виробництві гелю використовували стандартне для виробництва м'яких ЛЗ обладнання. Технологічний процес складається із наступних стадій: підготовки сировини, технологічного процесу виробництва гелю, фасування, пакування і маркування готового продукту [192]. Стадії основного технологічного процесу виробництва гелю включають наступні технологічні операції: приготування гелевої основи; приготування дисперсії мангіферину; солюбілізація олії; отримання гелю.

На стадії допоміжних робіт забезпечують підготовку приміщень, персоналу, обладнання, лікарських та допоміжних речовин, паковання та ін. Усі стадії основного технологічного процесу та пакування проводять у приміщеннях з класом чистоти D. Сировину для виготовлення гелю після

проходження вхідного контролю транспортними візками передають на стадії основного технологічного процесу.

*Стадія 1. Підготовка сировини*. У збірниках на вагах зважують та відмірюють необхідну кількість усіх компонентів, що зазначено у виробничій рецептурі: мангіферин, ЛЕВР, карбопол, трометамол, кукурудзяну олію, полісорбат-80, ПЕО 400, калію сорбат, етанол 96% та воду очищену.

*Стадія 2. Приготування гелевої основи.* У гомогенізатор додають попередньо відміряну кількість води очищеної. Відважують 0,8 кг карбополу додають поступово в гомогенізатор до води очищеної кімнатної температури і залишають для набухання впродовж 20–30 хв. Поступово при перемішуванні лопатевою (рамною) мішалкою гомогенізатору додають 0,3 кг калію сорбату, перемішують і далі додають трометамол (зі стадії 1) до значення pH 6,5 (проводять контроль значення pH). Масу гомогенізують при невисоких обертах мішалки 80–100 об/хв. до утворення в'язкої гелеподібної маси.

*Стадія 3. Приготування дисперсії мангіферину*. В окремому гомогенізаторі 5 кг мангіферину при постійному перемішуванні змішують з 10 л етанолу 95% і додають 20 кг ПЕО-400 перемішують за допомогою скребкової (лопатевої) мішалки при невисоких обертах мішалки 80–100 об/хв впродовж 10–20 хв. у герметично закритому збірнику до повного змочування АФІ і отримання однорідної маси.

*Стадія 4. Солюбілізація олії***.** В окремому гомогенізаторі 5 кг олії кукурудзяної при постійному перемішуванні змішують з 1 кг полісорбату 80 за допомогою скребкової (лопатевої) мішалки при невисоких обертах мішалки 80–100 об/хв. впродовж 10–20 хв. до однорідної маси.

*Стадія 5. Отримання гелю*. Дисперсію мангіферину з 96 % етанолом і ПЕО-400 зі стадії 3, солюбілізовану кукурудзяну олію зі стадії 4 і ЛЕВР зі стадії 1 додають до гелевої основи і перемішується лопатевою (рамною) мішалкою при 80–100 об/хв. протягом 20–30 хв до утворення однорідної гелеподібної маси і подають на фасування в полімерні контейнери. З отриманого гелю відбирають пробу для проведення контролю якості проміжної

продукції та передають до відділу контролю якості. Проміжний контроль здійснюють за такими показниками: опис, однорідність, значення pH. Результати контролю проміжного продукту мають відповідати вимогам проєкту МКЯ. Після отримання результатів про відповідність показникам якості гель відвантажують у збірник за допомогою стиснутого повітря під тиском 0,5–0,7 МПа та передають на стадію 6. «Фасування гелю».

*Стадія 6. Фасування гелю***.** Отриманий гель транспортують в бункер наповнювального автомата і дозують по 10 г у полімерні контейнери. Проводять контроль точності дозування та правильності маркування (номер серії і термін придатності) та контролюють комплектність.

*Стадія 7. Пакування контейнерів у пачки*. Контейнери з інструкцією до застосування пакують у пачки на автоматі паковання.

*Стадія 8. Пакування пачок у коробки*. Пакування пачок у коробки здійснюють на паковальному столі. Серію готової продукції формують із розрахунку одного завантаження реактора. На серію готової продукції видають аналітичний паспорт і відправляють на склад готової продукції. Проводять контроль готової продукції відповідно до вимог якості згідно з вимогами прості МКЯ.

Викладена технологія виробництва розробленого гелю може бути впроваджена у фармацевтичне виробництво і може здійснюватися в умовах стандартного обладнання, яке використовується для виробництва МЛФ.

Технологічну схему виробництва гелю «Манголеспедин» у промислових умовах зображено на рис. 4.17.

Для трансферу технології у промислове виробництво для розробленої лабораторної технології гелю «Манголеспедин» визначено критичні параметри й умови технологічного процесу, що дозволить отримати готову продукцію відповідної якості. Критичні параметри технологічного процесу виробництва гелю наведено в табл. 4.7.

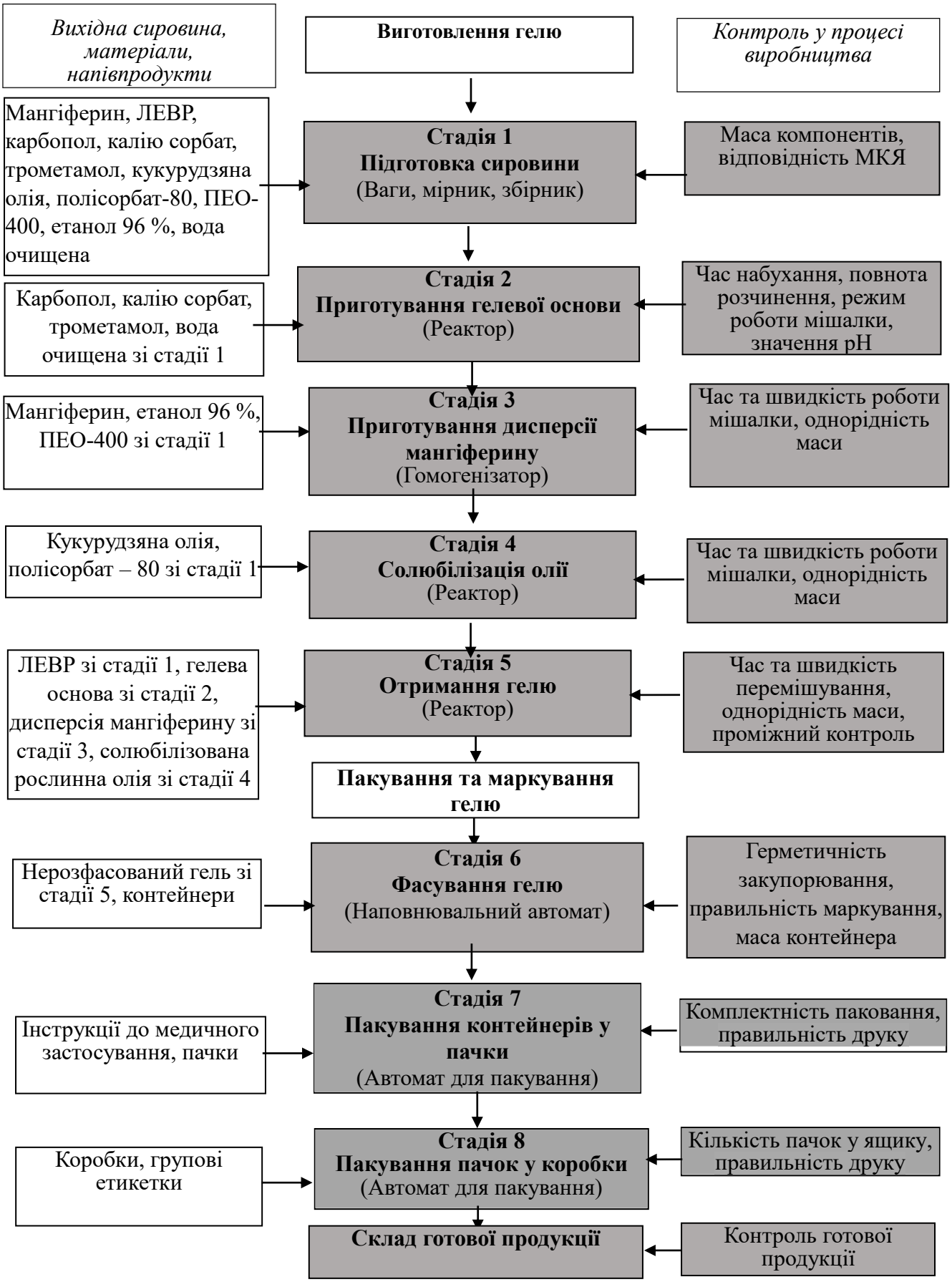



Рис. 4.17 Технологічна схема виробництва гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким

*Таблиця 4.7*

**Основні критичні параметри виробництва гелю «Манголеспедин»**

| Назва технологічної стадії | Назва технологічного параметру | Показники технологічного параметру |
|---|---|---|
| Підготовка сировини | Маса і об'єм сировини | Відповідно до виробн. рецептур |
| Приготування гелевої основи | Час перемішування<br>Режим змішування<br>Повнота розчинення<br>Значення pH | 25±5 хв<br>90±10 об./хв<br><br>6,5±0,5 |
| Приготування дисперсії мангіферину | Час перемішування<br>Режим роботи змішувача<br>Однорідність маси | 15±5 хв<br>90±10 об./хв<br><br>Візуально |
| Солюбілізація олії | Час перемішування<br>Режим роботи змішувача<br>Однорідність маси | 15±5 хв<br>90±10 об./хв<br><br>Візуально |
| Отримання гелю | Час перемішування<br>Режим роботи змішувача<br>Контроль проміжної продукції | 25±5 хв<br>90±10 об./хв<br><br>Згідно з виробничою рецептурою |
| Фасування гелю | Герметичність закупорювання<br>Правильність маркування<br>Маса вмісту паковання | Візуально<br><br>Візуально<br><br>10,0 г |

Висновки до розділу 4

1. За результатами органолептичних, фізико-хімічних, фармакотехнологічних досліджень, мікроскопічного аналізу, визначення осмотичної активності основи й динаміки вивільнення мангіферину запропоновано склад гелю з мангіферином і ЛЕВР. Показано, що введення до складу гелевої основи 20 % ПЕО-400, 10 % етанолу 96 % та 1 % твін-80

забезпечує її абсорбційну здатність та підвищує швидкість вивільнення мангіферину.

2. Мікробіологічними дослідженнями доведено необхідність введення консервантів до складу розробленого гелю, визначена ефективність обраних антимікробних консервантів калію сорбату та натрію бензоату. За результатами дослідження обґрунтовано використання калію сорбату як консерванта в концентрації 0,3 %.

3. Реологічними дослідженнями установлено, що розроблений гель має здатність розріджуватися зі збільшенням градієнта швидкості зсуву, що буде сприяти рівномірному розподілу АФІ і гомогенізації під час проведення технологічного процесу та легкому нанесенню на шкіру.

4. Розроблено технологічний процес виробництва гелю під умовною назвою «Манголеспедин» в умовах виробничих аптек та фармацевтичних підприємств, який складається зі стадій: підготовка сировини (відважування, відмірювання компонентів гелю); приготування гелевої основи; приготування дисперсії мангіферину; солюбілізація олії; отримання гелю; фасування та маркування гелю; упакування контейнерів у пачки; упакування пачок у коробки. Визначено критичні технологічні параметри отримання препарату. Розроблено ТІ, технологію гелю апробовано в умовах низки виробничих аптек.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Development of the composition of aqueous extract of Lespedeza bicolor and gel with extract and mangiferin / M. Yaromiy, N. Bevz, O. Mykhailenko, V. Kovalov, N. Polovko, Y. Marchenko. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2025. № 1 (53). P. 4–13.

2. Вивчення противірусної дії м’якої лікарської форми / С. Д. Загородня, М. В. Яромій, Л. О. Артюх, Н. П. Половко. *Вісник фармації*. 2024. № 2(106). С. 58–64.

3. Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар.участю (м. Тернопіль, 22–23 вересня 2022 р.). Тернопіль: ТНМУ, 2022. С. 77.

4. Яромій М. В., Бевз Н. Ю. Ідентифікація мангіферину в антигерпетичному гелі. *Youth Pharmacy Science* : матеріали III Всеукр.наук.-практ. конф. з міжнар. участю. (м. Харків, 7–8 груд. 2022 р.). Харків : НФаУ, 2022. С. 78.

5. Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обґрунтування складу гелю з мангіферином і леспедезою біколірною. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології*: матеріали III Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 24 листопада 2023 р.). Х.: НФаУ, 2023. С. 499

6. Яромій М., Половко Н. Дослідження реологічних властивостей гелю з мангіферином і водним екстрактом леспедеці. *Науково-технічний прогрес і оптимізація економіки технологічних процесів створення лікарських препаратів*:матеріали X наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої пам’яті зав.каф. управління та фармації з технологією ліків, д-ра фарм.наук, проф. Т.А. Грошового (17 – 18 жовтня 2024 р.). Тернопіль : ТНМУ,2024. С. 203.

7. Яромій М. В., Ковальов В.В., Половко Н.П. Обґрунтування вибору гідрофільного неводного розчинника до складу гелю з мангіферином. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 25 жовтня 2024 р.). Харків : НФаУ, 2024. С. 348–351.

# РОЗДІЛ 5
# ДОСЛІДЖЕННЯ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ ГЕЛЮ

## 5.1 Розробка методики ідентифікації, кількісного визначення біологічно активних сполук та стандартизація гелю

### 5.1.1 Розробка методики ідентифікація та кількісного визначення біологічно активних сполук в гелі

Стандартизація ЛЗ є гарантом їх якості при виробництві, забезпечує ефективність і безпечність застосування препарату протягом всього терміну зберігання. Необхідність контролю якості ЛП, і в першу чергу ідентифікації та кількісного визначення АФІ. Тому наступним етапом роботи було ідентифікація та розроблення методик ідентифікації БАС в запропонованій ЛФ.

Хімічна будова сполук дозволяє для ідентифікації та кількісного визначення використовувати хімічні та фізико-хімічні методи аналізу, такі як тонкошарова хроматографія та метод рідинної хроматографії.

З хімічних методів ідентифікації використовували реакцію з розчином заліза (III) хлориду. Утворення осаду темно-зеленого кольору підтвердило наявність у складі гелю речовин поліфенольної будови.

Для ідентифікації мангіферину і БАС ЛЕВР у складі гелю використовували метод ТШХ, який описано у розділі 2 [160]. На хроматограмах і схемах послідовності (рис. 5.1 і 5.2) наведено зони розчину порівняння та випробовуваного розчину.

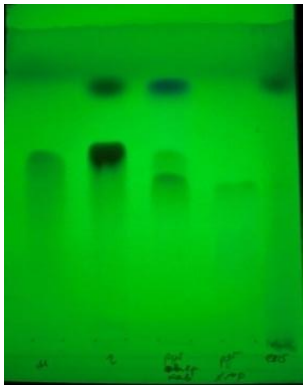


Рис 5.1 *Виявлення А*

Рис. 5.2 *Виявлення В*

| Верхня частина пластинки | | |
|---|---|---|
| Зона поглинання (кофейна кислота)<br><br>Зона поглинання (мангіферин)<br>Зона поглинання (кверцетин)<br><br>Зона поглинання (рутин)<br><br>Зона поглинання (хлорогенова кислота) | Мангіферин: зона поглинання | Кофейна кислота: зона поглинання<br><br>Кверцетин: зона поглинання<br><br>Рутин: зона поглинання<br><br>Хлорогенова кислота: зона поглинання |
| Випробуваний розчин | Розчин порівняння (а) | Розчин порівняння (б) |

Рис 5.1 Хроматограма і схема послідовності зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину (*виявлення А*)

| Верхня частина пластинки | | |
|---|---|---|
| Яскрава помаранчева зона (мангіферин)<br>Бліда блакитна флуоресценція (кверцетин)<br><br>Блакитна флуоресценція (рутин)<br><br>Яскрава блакитна флуоресценція (хлорогенова кислота) | Мангіферин: яскрава помаранчева зона | Кофейна кислота: блідо блакитна флуоресценція<br><br>Кверцетин: бліда блакитна флуоресценція<br><br>Рутин: блакитна флуоресценція<br><br>Хлорогенова кислота: яскрава блакитна флуоресценція |
| Випробуваний розчин | Розчин порівняння (а) | Розчин порівняння (b) |

Рис. 5.2 Хроматограма і схема послідовності зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину (*виявлення В*)

*Для ідентифікації і кількісного визначення* мангіферину і біологічно активних сполук рідкого водного екстракту леспедези використовували метод рідинної хроматографії за методикою, наведеною в розділі 2. Випробування проводили на рідинному хроматографі в ізократичному режимі за допомогою колонки заповненою силікагелем *октадецилсилільним для хроматографії Р* розміром 150×4,6 мм з передколонкою, з розміром часток 5 мкм, для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи. Використовували рухому фазу – 0,1 % трифтороцтової кислоти в суміші ацетонітрил : вода (13,5 : 86,5). Детектування проводили за допомогою УФ-детектора, використовуючи для кількісного визначення довжину хвилі 340 нм. На хроматограмі випробовуваного розчину 1, одержаній при кількісному визначенні компонентів гелю, час утримування основних піків має з часом утримування основних піків на хроматограмі розчину порівняння, приготованого з використанням мангіферину, кофейної, хлорогенової кислот і рутину (рис. 5.3–5.4) [160, 193, 194].

Дані хроматограм (рис. 5.3–5.4) свідчать про наявність у досліджуваному гелі мангіферину, а також кофейної кислоти і рутину, що входять до складу леспедези екстракту водного рідкого [160].

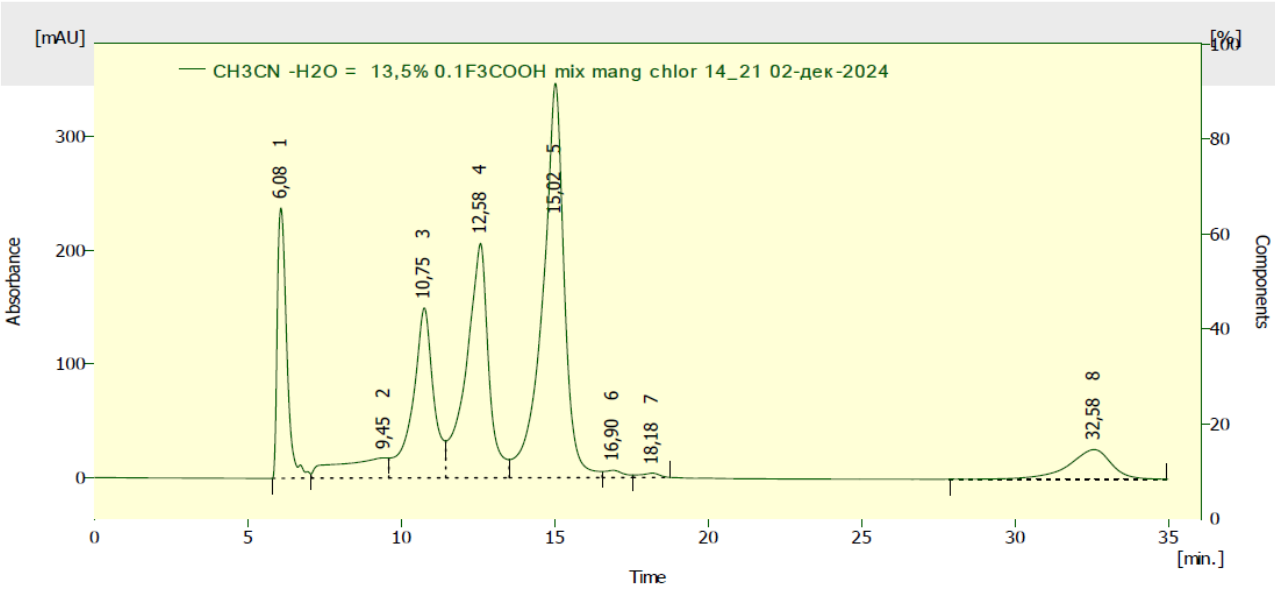



Рис. 5.3 Хроматограма розчину порівняння

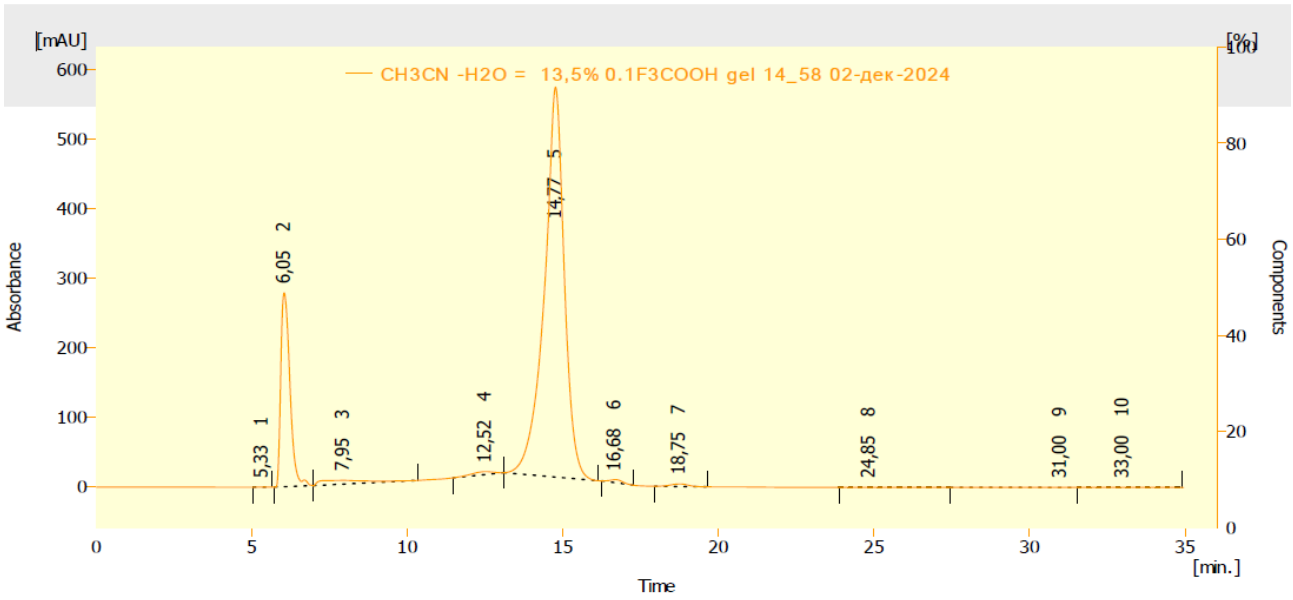



Рис. 5.4 Хроматограма випробовуваного розчину

*Кількісне визначення компонентів гелю* здійснювали методом рідинної хроматографії відповідно до вимог ДФУ 2.2.29., за допомогою якого вдалось відокремити мангіферин і БАС леспедези екстракту водного, а саме рутин і кофейну кислоту. Опис методики наведено в розділі 2 дисертаційної роботи.

Вміст мангіферину в грамах (X), в 100 г препарату, розраховують за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100.0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 100.0} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m}, \qquad (5.1)$$

де $S_1$ – середнє значення площ піків мангіферину, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

$S_0$ – середнє значення площ піків мангіферину, розраховане з хроматограм розчину порівняння *а*;

m – маса наважки гелю, у грамах;

$m_0$ – маса наважки мангіферину, взятої для приготування розчину порівняння, у грамах;

P – вміст основної речовини в мангіферині, взятого для приготування розчину порівняння, у відсотках.

Вміст гідроксикоричних кислот у перерахунку на кофейну кислоту в міліграмах (X), в 100 г препарату, розраховують за формулою:

$$x = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100.0 \cdot 0.5 \cdot 100 \cdot P \cdot 1000}{S_0 \cdot m \cdot 25.0 \cdot 25.0}, \qquad (5.2)$$

де $S_1$ – середнє значення площ піків кофейної кислоти, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

$S_0$ – середнє значення площ піків кофейної кислоти, розраховане з хроматограм розчину порівняння *b*;

$m_0$ – маса наважки кофейної кислоти у розчину порівняння *b*, в грамах;

mi – маса наважки препарату, в грамах;

P – вміст кофейної кислоти у СЗ кофейної кислоти, у відсотках.

Вміст флавоноїдів у перерахунку на рутин в міліграмах (X), в 100 г препарату, розраховують за формулою:

$$x = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100.0 \cdot 0.5 \cdot 100 \cdot P \cdot 1000}{S_0 \cdot m \cdot 25.0 \cdot 25.0}, \qquad (5.3)$$

де $S_1$ – середнє значення площ піків рутину, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

$S_0$ – середнє значення площ піків рутину, розраховане з хроматограм розчину порівняння *b*;

$m_0$ – маса наважки рутину у розчину порівняння *b*, в грамах;

mi – маса наважки препарату, в грамах;

P – вміст рутину у СЗ рутину, у відсотках.

Норми вмісту мангіферину і БАС ЛЕВР в гелі, наведені в табл. 5.1.

*Таблиця 5.1*

**Допуски вмісту мангіферину і біологічно активних сполук леспедези екстракту водного рідкого у 100 г гелю**

| Біологічно активна сполука | Норма |
|---|---|
| Мангіферин | Вміст повинен бути від 4,75 % до 5,25 % |
| Гідроксикоричних кислот у перерахунку на кофейну кислоту | Не менше 8 мг |
| Флавоноїдів у перерахунку на рутин | Не менше 2,5 мг |

*Специфічність* методики підтверджена шляхом порівняння хроматограми розчину порівняння та випробовуваного розчину. Часи утримування кофейної кислоти, мангіферину та рутину з випробуваного розчину відповідають часам утримування кофейної кислоти, мангіферину та рутину з розчину порівняння.

Лінійність методики визначали на 9 модельних розчинів, які готували в діапазоні концентрацій від 80 до 120 % (крок – 5 %) від номінальної обраної концентрації мангіферину, кофейної кислоти і рутину (табл. 5.2).

*Таблиця 5.2*

**Розрахунок параметрів лінійності визначення мангіферину і біологічно активних сполук леспедези екстракту рідкого (кофейної кислоти і рутину)**

| № | С,% | С (мкг/мл) | Ci/st | Середнє значення площі піку | Si/st |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Мангіферин | | | | | |
| 1 | 80,40 | 402 | 80,00 | 21729 | 99,50 |
| 2 | 85,40 | 427 | 84,99 | 23085 | 99,52 |
| 3 | 91,60 | 458 | 90,00 | 24445 | 98,25 |
| 4 | 94,80 | 474 | 95,03 | 25812 | 100,25 |
| 5 | 100,20 | 501 | 100,25 | 27229 | 100,05 |
| 6 | 105,80 | 529 | 105,32 | 28607 | 99,55 |
| 7 | 110,40 | 552 | 110,02 | 29883 | 99,66 |
| 8 | 115,20 | 576 | 115,04 | 31246 | 99,86 |
| 9 | 120,60 | 603 | 120,04 | 32604 | 99,54 |
| СЗ мангіферину | | 500 | | 27161 | Середнє 99,58 |
| Кофейна кислота | | | | | |
| 1 | 80,25 | 32 | 79,97 | 8375 | 80,10 |
| 2 | 84,75 | 34 | 84,92 | 8894 | 84,83 |
| 3 | 90,75 | 36 | 90,01 | 9427 | 89,63 |
| 4 | 95,25 | 38 | 95,06 | 9956 | 94,92 |
| 5 | 100,25 | 40 | 100,14 | 10488 | 99,90 |

*Продовження табл. 5.2*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 105,75 | 42 | 105,12 | 11009 | 105,02 |
| 7 | 109,50 | 44 | 110,12 | 11533 | 110,11 |
| 8 | 114,75 | 46 | 115,63 | 12110 | 114,97 |
| 9 | 119,25 | 48 | 120,07 | 12575 | 119,87 |
| СЗ кофейної кислоти | | 40 | | 10473 | Середнє 100,02 |
| Рутин | | | | | |
| 1 | 80,40 | 8,0 | 80,24 | 1697 | 99,80 |
| 2 | 85,60 | 8,5 | 85,25 | 1803 | 99,59 |
| 3 | 89,60 | 9,0 | 90,40 | 1912 | 100,89 |
| 4 | 94,80 | 9,5 | 95,37 | 2017 | 100,60 |
| 5 | 100,80 | 10,0 | 100,80 | 2132 | 100,00 |
| 6 | 105,20 | 10,5 | 105,58 | 2233 | 100,36 |
| 7 | 110,00 | 11,0 | 110,02 | 2327 | 100,02 |
| 8 | 115,20 | 11,5 | 115,18 | 2436 | 99,98 |
| 9 | 120,40 | 12,0 | 120,00 | 2538 | 99,67 |
| СЗ рутину | | 10,0 | | 2115 | Середнє 100,10 |

На рис. 5.5 представлений графік лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчину, побудований в нормалізованих координатах, виходячи з наведених в таблиці даних.

За розрахованими методом найменших квадратів даними, отримували коефіцієнти кореляції і будували графіки лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчинів (рис. 5.5 – 5.7).

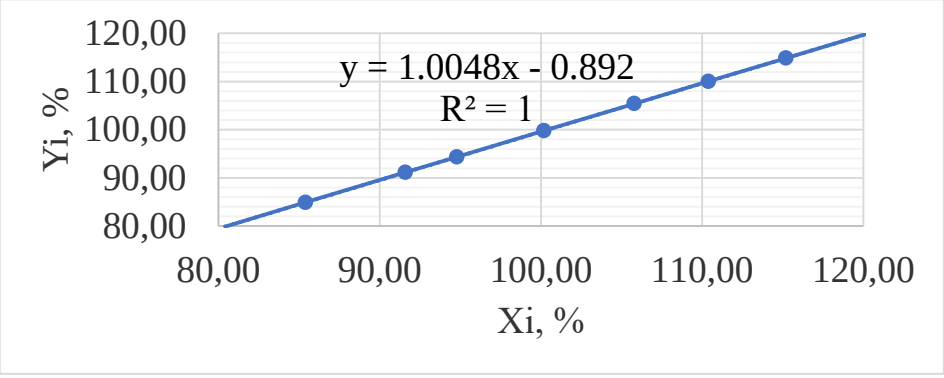



Рис. 5.5 Градуювальний графік залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації мангіферину

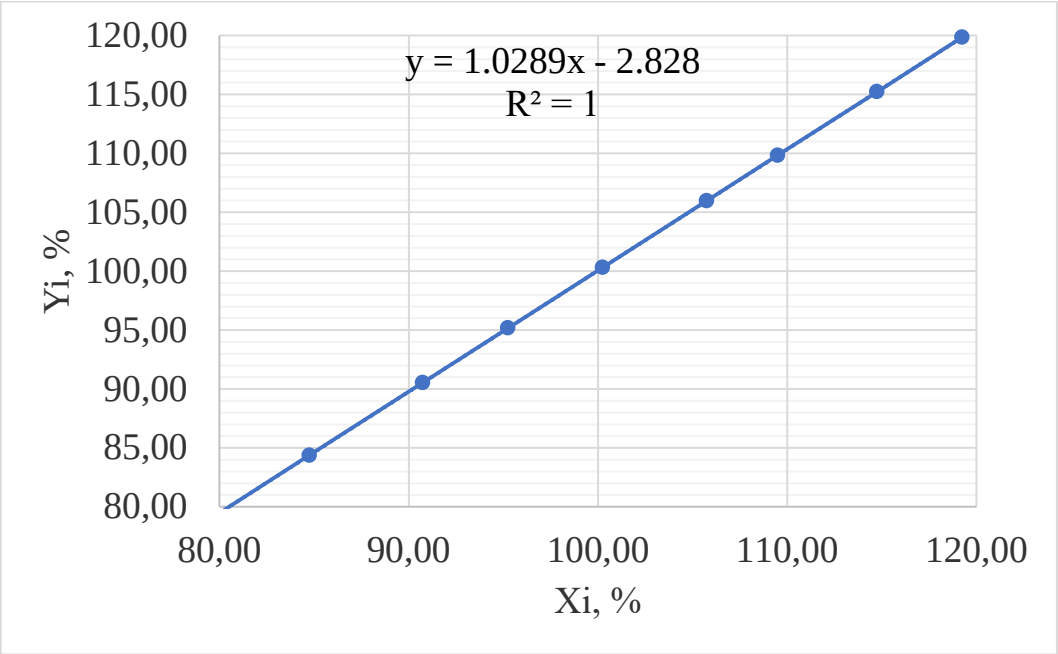



Рис. 5.6 Градуювальний графік залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації кофейної кислоти

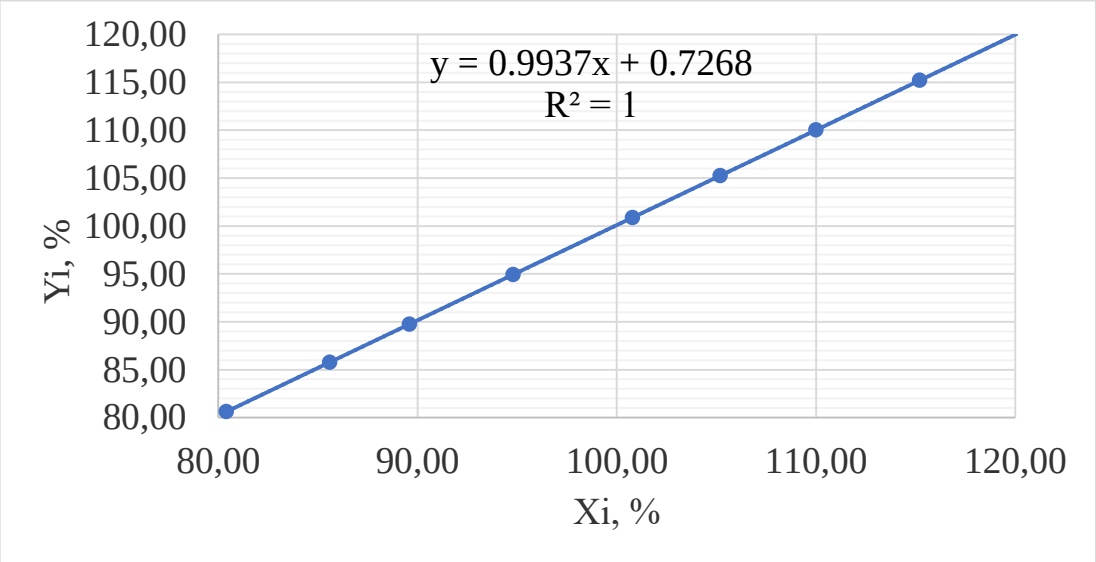



Рис. 5.7 Градуювальний графік залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації рутину

Одержані значення коефіцієнтів кореляції (табл. 5.3) свідчать про те, що лінійність методики підтверджується в обраних діапазонах концентрацій і виконуються усі вимоги ДФУ щодо параметрів лінійної залежності.

*Таблиця 5.3*

**Метрологічні характеристики лінійної залежності**

| з/п | Параметр | Вимоги | Отримане значення | Виконання критерію |
|---|---|---|---|---|
| Мангіферин | | | | |
| 1 | $\|a\|$ | ≤ 2.60 | 0.8920 | Виконується |
| 2 | $S_0$ | ≤ 0.84 | 0.5120 | Виконується |
| 3 | r | > 0.9981 | 0.9993 | Виконується |
| Кофейна кислота | | | | |
| 1 | $\|a\|$ | ≤ 5.10 | 2.8280 | Виконується |
| 2 | $S_0$ | ≤ 1.69 | 0.4608 | Виконується |
| 3 | r | > 0.9924 | 0.9994 | Виконується |
| Рутин | | | | |
| 1 | $\|a\|$ | ≤ 5.10 | 0.7268 | Виконується |
| 2 | $S_0$ | ≤ 1.69 | 0.4002 | Виконується |
| 3 | r | > 0,9924 | 0.9996 | Виконується |

Прецизійність і правильність оцінювали за даними, отриманими при вивченні лінійності, і встановили, що ці параметри (табл. 5.4) відповідають вимогам ДФУ.

*Таблиця 5.4*

**Результати перевірки правильності і прецизійності**

| Параметр | Значення | Вимоги до статистичної незначущості | Вимоги до практичної незначущості | Виконання критерію |
|---|---|---|---|---|
| Мангіферин | | | | |
| $\|\bar{Z} - 100\|$ | 0,42 | ≤ 0,35 | ≤ 0,51 | Виконується за другим критерієм |
| Δintra | 1,06 | ≤ 1,6 | – | Виконується |
| Кофейна кислота | | | | |
| $\|\bar{Z} - 100\|$ | 0,02 | ≤ 0,36 | ≤ 1,02 | Виконується за двома критеріями |
| Δintra | 1,08 | ≤ 3,2 | – | Виконується |
| Рутин | | | | |
| $\|\bar{Z} - 100\|$ | 0,10 | ≤ 0,28 | ≤ 1,02 | Виконується за двома критеріями |
| Δintra | 0,83 | ≤ 3,2 | – | Виконується |

### 5.1.2 Дослідження показників якості в процесі зберігання та стандартизація гелю

Для підтвердження якості розробленого гелю з мангіферином і ЛЕВР нами проведені дослідження за показниками: опис, ідентифікація та кількісне визначення мангіферину, ідентифікація і кількісне визначення БАС ЛЕВР, однорідність, pH, кількісне визначення флавоноїдів і суми поліфенолів, мікробіологічна чистота, маса вмісту контейнера. Їх здійснювали на основі розроблених та загальноприйнятих методик і положень ДФУ 2.0 [153].

*Опис.* Однорідна гелеподібна маса кремового кольору без видимих включень, зі слабо-вираженим трав'яним запахом. Не повинен мати стороннього запаху, а також ознак фізичної нестабільності (сенерезису та ін.).

Усі лабораторні зразки гелю відповідали наведеному опису. Визначення запаху гелю проводили за методикою ДФУ 2.0 2.3.4 – від 0,5 до 2,0 г гелю розподіляли тонким шаром на склі. Через 15 хв. визначали запах. Досліджувані зразки гелю мали слабо-виражений трав'яний запах.

*Однорідність***.** Гель повинен бути однорідним. Однорідність визначали за методикою ДФУ 2.0 (2.9.40), яка наведена в розділі 2. При перегляді неозброєним оком на відстані 30–40 см від очей зразки гелю не включали видимих часток та сторонніх домішок і були однорідними.

*Значення pH* визначали потенціометрично за методикою ДФУ 2.0, п. 2.2.3, описаною в розділі 2. pH усіх серій гелю було в межах критерію – від 6,4 до 6,6. У процесі зберігання pH становило 6,6 ± 0,3. Тому до специфікації було закладено межі від 6,0 до 7,0.

*Маса вмісту контейнера.* Випробування здійснюють на 10 пакованнях відповідно до ДСТУ 64-492-85. Маса вмісту контейнеру знаходилася в межа 9,7 ± 0,4. В специфікацію закладено норму згідно вимог ДФУ – від 9,2 до 10,8 г.

Для встановлення терміну придатності гелю з мангіферином і ВЕЛ досліджували зразки гелю за різних температурних режимів протягом 27

місяців за органолептичними (опис, однорідність), фізико-хімічними (ідентифікація, pH, кількісне визначення АФІ).

*Мікробіологічна чистота.* Випробовування мікробіологічної чистоти розробленого гелю проводили методом, наведеним в статті 2.6.13 ДФУ [153]. Відповідно до вимог ДФУ 2.0 статті 5.1.4 «Мікробіологічна чистота нестерильних ЛЗ та субстанцій для фармацевтичного застосування» для лікарських засобів для нашкірного застосування критеріями прийнятності мікробіологічної чистоти є такими: ТАМС КУО/г – $10^2$, ТУМС КУО/г – $10^1$ і відсутність *S. aureus, P. aeruginosa* в 1 г [153]. Дослідження проводили методом прямого посіву на живильні середовища «методом колодязів» (див. розділ 2). З метою уникнення помилок експериментально встановили, що гель у розведенні 1:10 не виявляє антимікробної дії. Результати проведених мікробіологічних досліджень свіжовиготовлених зразків та зразків гелю, які зберігали впродовж 27 місяців за різних температурних режимах, наведено в табл. 5.5. Для визначення терміну і умов зберігання ЛЗ дослідні зразки гелю виготовляли та закладали на зберігання по п’ять зразків в пластикових контейнерах за двох температурних режимів – 5 ± 3°С і 25 ± 2 °С. Показники якості гелю визначали відразу після виготовлення зразків і кожні 6 місяців протягом 2 років, а потім ще після 3 місяців зберігання (табл. 5.6).

*Таблиця 5.5*

**Результати дослідження мікробіологічної чистоти гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким**

| Час/температура зберігання | | Гель з мангіферином і леспедези екстрактом | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Загальна кількість мікроорганізмів в 1 г гелю | | Мікроорганізми | |
| | | Бактерії | Гриби | S. aureus | P aeruginosa |
| 1 | | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Свіжовиготовлений ЛЗ | | 10 | <10 | Відсутність росту | Відсутність росту |
| Через 6 місяців зберігання | 5 ± 3 °С | 10 | <10 | Відсутність росту | Відсутність росту |
| | 25 ± 2 °С | 20 | | | |

*Продовження таблиці 5.5*

| 1 | | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Через 12 місяців зберігання | 5 ± 3 °С | 10 | <10 | Відсутність росту | Відсутність росту |
| | 25 ± 2 °С | 20 | | | |
| Через 18 місяців зберігання | 5 ± 3 °С | 20 | <10 | Відсутність росту | Відсутність росту |
| | 25 ± 2°С | 30 | | | |
| Через 24 місяців зберігання | 5 ± 3 °С | 20 | <10 | Відсутність росту | Відсутність росту |
| | 25 ± 2 °С | 40 | | | |
| Через 27 місяців зберігання | 5 ± 3 °С | 30 | 10 | Відсутність росту | Відсутність росту |
| | 25 ± 2 °С | 50 | | | |

Як свідчать результати мікробіологічних досліджень, наведені в табл. 5.4, у свіжовиготовлених зразках та при їх зберіганні за двох температурних режимах (5 ± 3 °С і 25 ± 2 °С) впродовж 2 років загальна кількість бактерій в 1 г гелю не перевищувала 50 і загальна кількість грибів не перевищувала 10 монокультур, бактерії *P. aeruginosa* й *S. aureus* відсутні.

Низькі показники мікробної контамінації зразків досліджуваного ЛЗ обумовлені антимікробною активністю гелю, ефективною дією консерванту та дотриманням належних санітарних умов при виготовленні та зберіганні.

Результати періодичного контролю якості гелю при зберіганні за різних температурних режимів наведено в табл. 5.5.

Одержані дані свідчать, що досліджувані зразки за умов прохолодної та кімнатної температури мають належні фізико-хімічні показники, зберігається якісний і кількісний склад діючих речовин ЛЕВР та мангіферину. За описом значенням pH та іншими показниками відповідають вимогам проекту МКЯ протягом усього терміну зберігання. Отже, нами запропоновано зберігати розроблений гель за температури, що не перевищує 25°С, в захищеному від світла місці у полімерних контейнерах. За таких умов зберігання термін придатності препарату становить 2 роки. У табл. 5.7 наведено показники якості, які внесені до специфікації проєкту МКЯ на гель з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким.

*Таблиця 5.6*

**Результати визначення показників якості та мікробіологічної чистоти гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким в процесі зберігання, P = 0,95; n = 5**

| Випробування | Допустимі норми | Результати аналізу | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Початкові | 3 місяці | 6 місяців | 12 місяців | 18 місяців | 24 місяці | 27 місяців |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| У полімерних контейнерах при температурі 25 ±2ºС | | | | | | | | |
| Опис | Однорідна гелеподібна маса кремового кольору, зі слабо-вираженим трав'яним запахом, без видимих включень | | | | | | | |
| Ідентифікація ТШХ | *мангіферин* | На хроматограмі випробовуваного розчину проявляється пляма яскраво-оранжева зона (мангіферин) на рівні відповідної плями такого самого кольору хроматограми розчину порівняння | | | | | | |
| | *поліфенольні сполуки* | На хроматограмі випробовуваного розчину проявляються плями блідо-блакитного (кофейна кислота) та яскраво- блакитного (хлорогенова кислота), блакитного (рутин), блідо-блакитного (кверцетин) кольорів на рівні відповідних плям такого самого кольору хроматограм розчину порівняння | | | | | | |
| pH | 6,0 – 7,0 | 6,5±0,1 | 6,5±0,2 | 6,6±0,1 | 6,6±0,3 | 6,6±0,3 | 6,7±0,2 | 6,7±0,1 |
| Однорідність | Повинен бути однорідним | відповідає | відповідає | відповідає | відповідає | відповідає | відповідає | відповідає |
| Кількісне визначення: *– мангіферин* | 4,75 – 5,25% | 5,08±0,06 | 5,02±0,10 | 5,02±0,08 | 5,00±0,04 | 4,96±0,08 | 4,96±0,04 | 4,95±0,10 |
| *– гідроксикоричних кислот у перерахунку на кофейну кислоту* | Не менше 8 мг | 8,98±0,10 | 8,84±0,12 | 8,80±0,10 | 8,78±0,12 | 8,76±0,14 | 8,74±0,12 | 8,65±0,11 |
| *– флавоноїдів у* | Не менше | 2,82±0,12 | 2,80±0,12 | 2,76±0,08 | 2,74±0,10 | 2,71±0,14 | 2,68±0,10 | 2,62±0,12 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *перерахунку на рутин* | 2,5 мг | | | | | | | |
| Маса вмісту контейнера, г | 9,2 – 10,8 г | 9,7±0,2 | 9,7±0,4 | 9,6±0,2 | 9,6±0,3 | 9,5±0,2 | 9,4±0,1 | 9,5±0,2 |
| У полімерних контейнерах при температурі 5 ±3ºС | | | | | | | | |
| Опис | Однорідна гелеподібна маса кремового кольору, зі слабо-вираженим трав'яним запахом, без видимих включень | | | | | | | |
| Ідентифікація ТШХ | *мангіферин* | На хроматограмі випробовуваного розчину проявляється пляма яскраво-оранжева зона (мангіферин) на рівні відповідної плями такого самого кольору хроматограми розчину порівняння | | | | | | |
| | *поліфенольні сполуки* | На хроматограмі випробовуваного розчину проявляються плями блідо-блакитного (кофейна кислота) та яскраво- блакитного (хлорогенова кислота), блакитного (рутин), блідо- блакитного (кверцетин) кольорів на рівні відповідних плям такого самого кольору хроматограм розчину порівняння | | | | | | |
| pH | 6,0 – 7,0 | 6,5±0,3 | 6,5±0,3 | 6,6±0,1 | 6,6±0,2 | 6,6±0,2 | 6,7±0,1 | 6,7±0,1 |
| Однорідність | Повинен бути однорідним | відповідає | відповідає | відповідає | відповідає | відповідає | відповідає | відповідає |
| Кількісне визначення: *–мангіферин* | 4,75 – 5,25% | 5,08±0,06 | 5,04±0,08 | 5,04±0,05 | 5,02±0,06 | 5,00±0,08 | 5,00±0,05 | 4,98±0,10 |
| *–гідроксикоричних кислот у перера-хунку на кофейну кислоту* | Не менше 8 мг | 8,98±0,10 | 8,92±0,14 | 8,90±0,11 | 8,88±0,10 | 8,86±0,12 | 8,82±0,14 | 8,78±0,10 |
| *– флавоноїдів у перерахунку на рутин* | Не менше 2,5 мг | 2,82±0,12 | 2,82±0,08 | 2,80±0,10 | 2,76±0,12 | 2,74±0,14 | 2,72±0,12 | 2,63±0,10 |
| Маса вмісту контейнера, г | 9,2 – 10,8 г | 9,7±0,2 | 9,7±0,2 | 9,6±0,2 | 9,6±0,3 | 9,5±0,2 | 9,4±0,2 | 9,4±0,2 |

*Таблиця 5.7*

**Специфікація на гель «Манголеспедин»**

| Показник | Допустимі норми | Методи аналізу |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Опис | Однорідна гелеподібна маса кремового кольору, зі слабо-вираженим трав'яним запахом, без видимих включень | МКЯ, п.1, ДФУ, стаття «М'які лікарські засоби для нашкірного застосування» |
| Ідентифікація: ТШХ<br>*мангіферин*<br><br><br><br><br><br><br>*кофейна кислота, хлорогенова кислота, рутин, кверцетин* | <br><br><br>На хроматограмі випробовуваного розчину повинна проявлятися яскраво-оранжева зона (мангіферин) на рівні відповідної плями такого самого кольору хроматограми розчину порівняння<br><br>На хроматограмі випробовуваного розчину повинні проявлятися плями блідо-блакитного (кофейна кислота) та яскраво-блакитного (хлорогенова кислота), блакитного (рутин), блідо-блакитного (кверцетин) кольорів на рівні відповідних плям такого самого кольору хроматограм розчину порівняння | МКЯ, п.2 метод ТШХ |
| Однорідність | Препарат має бути однорідним. У 3 із 4 проб не має бути видимих частинок | МКЯ, п.3. ДФУ, 2.9.40 |
| pH | 6,0 – 7,0 | МКЯ, п.4 ДФУ, 2.2.3 |
| Мікробіологічна чистота | Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – $10^2$ КУО/г<br>Загальне число дріжджових та плісеневих грибів (ТУМС) – $10^1$ КУО/г<br>Відсутність Pseudomonas aeruginosa в 1 г<br>Відсутність Staphylococcus aureus в 1 г | МКЯ, п.5 ДФУ, 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4 |

*Продовження таблиці 5.7*

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| Кількісне визначення:<br>– *мангіферин*<br>–<br>*гідроксикоричні кислоти в перерахунку на кофейну кислоту*<br>*– флавоноїди в перерахунку на рутин* | 4,75 – 5,25 % (у 100 г гелю)<br><br>Не менше 8 г (у 100 г гелю)<br><br>Не менше 2,5 мг (у 100 г гелю) | МКЯ п.6. Метод рідинної хроматографії ДФУ 2.2.29 |
| Маса вмісту контейнера, г | 9,2 – 10,8 г | |
| Маркування | Згідно з оригінал-макетом паковання | |
| Зберігання | В оригінальному пакованні при температурі не вище 25°С | |
| Термін придатності | 2 роки | |

5.2 Дослідження антимікробної активності гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким

Вивчення антимікробної активності гелю з мангіферином і ЛЕВР розробленого зразку гелю визначали дифузійним методом «лунок» та дисків з вимірюванням діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів за методикою, наведеною в розділі 2. Для мікробіологічного дослідження використовували еталонні тест-культури мікроорганізмів різних таксонометричних груп та клінічних ізолятів: *S. aureus* АТСС 25923, *S. aureus* АТСС 6538-Р, *E. coli* АТСС 25922, *P.aeruginosa* АТСС 27853, *P. aeruginosa* АТСС 9027, *P. vulgaris* АТСС 4636, *B.* АТСС 6633. Протигрибкову дію речовин досліджували на референтному штамі *C. albicans* АТСС 885-653, а також клінічних ізолятах *S. aureus* 16, *S. epidermidis* 14, *S. pneumoniae* 14, *S. pyogenes* 2432, *S. aureus* 124, *E. faecalis 42, K. pneumoniae 18, E. cloaceae 17, A. baunani 150, P. aeruginosa* 18, *C. albicans* 69.

В якості референтного препарату використовували «Календули мазь», виробництва ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика», м. Житомир, серія 10623. Результати дослідження антимікробних властивостей гелю з ЛЕВР і мангіферином до штамів мікроорганізмів, наведені в таблиці 5.8.

*Таблиця 5.8*

**Протимікробна активність гелю з мангіферином і леспедези екстрактом водним рідким відносно референтних штамів мікроорганізмів, n=3**

| Мікроорганізми | Метод | Діаметри зон затримки росту в мм до зразків | |
|---|---|---|---|
| | | Дослідний гель | Референтний препарат |
| **1** | **2** | **3** | **4** |
| Staphylococcus aureus ATCC 25923 | Колодязь | 18,5±0,5 | 15,5±0,5 |
| | Диски | 17,3±0,3 | 11,5±0,5 |
| Staphylococcus aureus ATCC 6538-P | Колодязь | 16,5±0,5 | 16,5±0,5 |
| | Диски | 15,5±0,5 | 10,5±0,5 |
| Escherichia coli ATCC 25922 | Колодязь | 15,5±0,5 | 13,5±0,5 |
| | Диски | 12,5±0,5 | 10,5±0,5 |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 | Колодязь | 13,5±0,5 | ріст |
| | Диски | 12,5±0,5 | ріст |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 | Колодязь | 13,5±0,5 | ріст |
| | Диски | 11,5±0,5 | ріст |
| Proteus vulgaris ATCC 4636 | Колодязь | 14,5±0,5 | ріст |
| | Диски | 13,5±0,5 | ріст |
| Bacillus subtilis ATCC 6633 | Колодязь | 16,5±0,5 | 16,5±0,5 |
| | Диски | 14,5±0,5 | 12,5±0,5 |
| Candida albicans ATCC 885-653 | Колодязь | 16,5±0,5 | ріст |
| | Диски | 13,5±0,5 | ріст |
| Staphylococcus aureus 16 | Колодязь | 16,5±0,5 | 12,5±0,5 |
| | Диски | 12,5±0,5 | 10,5±0,5 |
| Staphylococcus epidermidis 14 | Колодязь | 15,5±0,5 | 14,5±0,5 |
| | Диски | 12,5±0,5 | 10,5±0,5 |
| Streptococcus pneumoniae 14 | Колодязь | 13,5±0,5 | Ріст |
| | Диски | 11,5±0,5 | ріст |
| Streptococcus pyogenes 2432 | Колодязь | 13,5±0,5 | Ріст |
| | Диски | 11,5±0,5 | ріст |

*Продовження табл. 5.8*

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| Staphylococcus aureus 124 | Колодязь | 14,5±0,5 | 12,5±0,5 |
| | Диски | 11,5±0,5 | 8,5±0,5 |
| Enterococcus faecalis 42 | Колодязь | 14,5±0,5 | 13,5±0,5 |
| | Диски | 10,5±0,5 | 7,5±0,5 |
| Klebsiella pneumoniae 18 | Колодязь | 14,5±0,5 | ріст |
| | Диски | 10,5±0,5 | ріст |
| Enterobacter cloaceae 17 | Колодязь | 14,5±0,5 | ріст |
| | Диски | 11,5±0,5 | ріст |
| Acinetobacter baunani 150 | Колодязь | ріст | ріст |
| | Диски | 8,5±0,5 | ріст |
| Pseudomonas aeruginosa 18 | Колодязь | 12,5±0,5 | ріст |
| | Диски | 9,5±0,5 | ріст |
| Candida albicans 69 | Колодязь | 13,5±0,5 | ріст |
| | Диски | 10,5±0,5 | ріст |

За результатами досліджень встановлено, що гель ЛЕВР і мангіферин володіє вираженою антибактеріальною активністю. Тест-штами *S.aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538-P і *C. albicans* ATCC 885-653 та клінічні ізоляти *S. aureus* 16 *S. epidermidis* 14 показали чутливість до дослідного зразку гелю. Клінічні ізоляти *S. pneumoniae* 14, *S. pyogenes* 2432 і *S. aureus* 124 мають низьку чутливість до дослідного зразку гелю. Експериментально встановлено що за рівнем активності дослідний гель перевищує активність референтного препарату по відношенню до більшості мікроорганізмів. Для низки мікроорганізмів активність знаходиться на рівні активності препарату порівняння, так як отримані дані знаходяться в межах статистичної похибки [195].

З огляду на отримані результати і наявність вираженої чутливості тест-штамів мікроорганізмів *Staphylococcus* розроблений нами гель, який містив мангіферин і ЛЕВР може розглядатися як потенційний дерматологічний засіб.

Висновки до розділу 5

1. Опрацьовано методики ідентифікації мангіферину і БАС ЛЕВР в складі гелю з використанням хімічних реакцій, методу тонкошарової

хроматографії і рідинної хроматографії. Запропоновано для ідентифікації мангіферину і БАС ЛЕВР у складі гелю використовувати метод ТШХ.

2. Підібрано умови і запропоновано метод рідинної хроматографії для кількісного визначення суми активних речовин препарату – мангіферину і БАС леспедези екстракту водного рідкого (гідроксикоричних кислот в перерахунку на кофейну кислоту та флавоноїдів в перерахунку на рутин). Визначено норми вмісту зазначених БАС, мангіферину – 4,75–5,25 % (у 100 г гелю); гідроксикоричних кислот в перерахунку на кофейну кислоту не менше 8 г (у 100 г гелю) та флавоноїдів в перерахунку на рутин не менше 2,5 мг (у 100 г гелю).

3. За результатами дослідження показників якості розробленого гелю в процесі зберігання, обрано термін зберігання препарату – 2 роки при температурі, що не перевищує 25 °С, в захищеному від світла місці у полімерних контейнерах. Складено специфікацію до проєкту МКЯ на лікарський препарат «Манголеспедин».

4. Експериментально встановлена наявність вираженої антимікробної дії гелю відносно тест-штамів *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538-P і *C. albicans* ATCC 885-653 та клінічних ізолятів *S. aureus* 16 і *S. epidermidis* 14. Встановлено, що за рівнем активності дослідний гель перевищує активність референтного препарату по відношенню до дослідних тест-штамів та клінічних ізолятів більшості мікроорганізмів.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Вивчення противірусної дії м’якої лікарської форми / С. Д. Загородня, М. В. Яромій, Л. О. Артюх, Н. П. Половко. *Вісник фармації*. 2024. № 2(106). С. 58–64 DOI: https://doi.org/10.24959/nphj.24.155
2. Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м’якій лікарській формі.

*Фармацевтичний часопис*. 2022. № 3. С. 23-32 DOI: https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.3.13548

3. Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедези двоколірної *Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології* : зб. публікацій І Міжнар. наук.–практ. online конф., присвяч. 85-річчю з дня заснування каф. Біохімії (м. Харків, 7 берез. 2024 р.). Харків : НФаУ, 2024. С. 332–338.
4. Підбір методик ідентифікації та кількісного визначення мангіферину / М. В. Яромій, Ранія Хізрі, Н.П. Половко, Н.Ю. Бевз. *Modern chemistry of medicines* : матеріали Міжнар. Internet-конф. (м. Харків, 18 трав. 2023 р.). Харків : НФаУ, 2023. С. 261.
5. Яромій М. В., Бевз Н. Ю. Ідентифікація мангіферину в антигерпетичному гелі. *Youth Pharmacy Science* : матеріали ІІІ Всеукр.наук.-практ. конф. з міжнар. участю. (м. Харків, 7–8 груд. 2022 р.). Харків : НФаУ, 2022. С. 78.

# ВИСНОВКИ

1. На підставі комплексу фізико-хімічних, біофармацевтичних, реологічних і біологічних досліджень науково та експериментально обґрунтовано умови отримання леспедези двоколірної екстракту водного рідкого та розроблено склад, технологію і запропоновано для практичної медицини оригінальний лікарський препарат у формі гелю із мангіферином ті ЛЕВР під умовною назвою «Манголеспедин» противірусної, антимікробної та протизапальної дії.

2. За результатами маркетингового та бібіліосематичного аналізу показано перспективу розробки МЛФ з мангіферином і екстрактом леспедези двоколірної, що обумовлена широким спектром фармакологічних властивостей, якими володіють обрані АФІ природного походження, і насамперед такими, як противірусна, імуномодулювальна, антиоксидантна, протизапальна, антибактеріальна, протигрибкова.

3. Експериментально обґрунтовані умови отримання леспедези екстракту водного рідкого – трьохступенева ремацерація з настоюванням впродовж 60 хв при температурі 95 ± 5 $^{o}$C, при яких забезпечується максимальне вилучення сполук поліфенольної природи, флавоноїдів і танінів. Розроблено технологічну схему виробництва проміжного продукту – ЛЕВР.

4. На підставі результатів досліджень розроблено специфікацію на ЛЕВР, яка включає: опис, ідентифікація методом ТШХ (полісахариди (фруктоза), речовин поліфенольної і флавоноїдної природи (кофейна, хлорогенова кислоти, рутин, кверцетин) і таніни (пірогалол)); важкі метали, сухий залишок (не менше 18 %), кількісне визначення (флавоноїди у перерахунку на рутин (не менше 0,5 мг/1,0 г) , таніни у перерахунку на пірогалол (не менше 35 мг/1,0 г)).

5. Мікробіологічними дослідженнями підтверджено, що ЛЕВР проявляє виражений антимікробний ефект відносно тест-штамів мікроорганізмів *Staphylococcus.* Фармакологічними дослідженнями

протизапальної активності на моделі опікової рани показано, що застосування ЛЕВР сприяє зменшенню ознак запалення і відсутності візуальних ознак приєднання інфекційного процесу у лабораторних тварин.

6. За результатами органолептичних, фізико-хімічних, фармакотехнологічних досліджень, мікроскопічного аналізу й визначення динаміки вивільнення мангіферину з основи, запропоновано склад гелю, що містить по 5,0 % мангіфериному і ЛЕВР. Показано, що введення до складу гелевої основи 20 % ПЕО-400, 10 % етанолу 96 % та 1 % твін-80 забезпечує її абсорбційну здатність та підвищує швидкість вивільнення мангіферину. Мікробіологічними дослідженнями підтверджена противірусна активність гелю з 5,0 % мангіферину та обґрунтовано використання консерванту – 0,3 % калію сорбату.

7. Реологічними дослідженнями встановлено наявність тиксотропних властивостей, що сприятиме рівномірному розподілу АФІ і гомогенізації під час виробництва гелю. Розроблено технологічний процес виробництва гелю «Манголеспедин» в умовах виробничих аптек та фармацевтичних підприємств, визначено критичні технологічні параметри отримання препарату.

8. Методом ТШХ, рідинної хроматографії та з використанням хімічних реакцій досліджено якісний склад гелю та доведено наявність мангіферину, рутину, кверцетину, хлорогенової та кофейної кислот. Підібрано умови і запропоновано метод рідинної хроматографії для кількісного визначення мангіферину (4,75–5,25 % у 100 г гелю) і БАС ЛЕВР (гідроксикоричних кислот в перерахунку на кофейну кислоту (не менше 8 г/100г) та флавоноїдів в перерахунку на рутин (не менше 2,5 мг/100 г). Доведено стабільність препарату в процесі зберігання, встановлено термін та умови зберігання – 24 місяці у пластикових контейнерах за температури не вище 25°С.

9. Експериментально встановлена наявність вираженої антимікробної дії гелю відносно тест-штамів *S. aureus* АТСС 25923, *S. aureus* АТСС 6538-Р і *C. albicans* АТСС 885-653 та клінічних ізолятів *S. aureus* 16 і *S. epidermidis* 14.

10. Розроблено проєкти МКЯ, технологічних регламентів і ТІ на виробництво ЛЕВР і крему «Манголеспедин», які апробовано в умовах виробничих аптек: № 8 «Леда», м. Харків, № 5 «Гармонія-2000», м. Чернівці, № 80, м. Слов'янськ. Окремі фрагменти роботи упроваджені в освітньо-науковий процес закладів вищої освіти фармацевтичного (медичного) профілю України.

# СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Маркетинговий аналіз вітчизняного фармацевтичного ринку протигерпетичних лікарських засобів / Н. А. Гербіна ті ін.. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. 2022. Т. 8, № 1. - С. 75-82. DOI : 10.24959/sphhcj.22.246.

2. Herpes simplex virus. URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus (Date of access: 01.12.2023).

3. What does the latest report from WHO say about Herpes? URL: https://middle-east.better2know.com/blog/2022/03/11/what-does-the-latest-who-report-say-about-herpes/ (Date of access: 01.12.2023).

4. Яромій М. В., Половко Н. П. Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації. *Аннали Мечниковського інституту*. 2023. № 1. С. 52–58. DOI: 10.5281/zenodo.7721743.

5. Anticancer Properties of Graviola (Annona muricata): A Comprehensive Mechanistic Review / I. Rady et al. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2018. Vol. 30. P. 1826170. DOI: 10.1155/2018/1826170.

6. Identification of anti-inflammatory constituents in Phellodendri Cortex and Coptidis Rhizoma by monitoring the suppression of nitric oxide production / A. Fujii et al. *J. Nat. Med*. 2017. Vol. 71(4). P. 745–756. DOI: 10.1007/s11418-017-1107-4. Epub 2017 Jul 5.

7. Pharmacological effects of Zataria multiflora Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects / M. R. Khazdair et al. *Fundam. Clin. Pharmacol*. 2018. Vol. 32(1). P. 26–50. DOI: 10.1111/fcp.12331.

8. Natural Compounds for the Treatment of Psoriatic Arthritis: A Proposal Based on Multi-Targeted Osteoclastic Regulation and on a Preclinical Study / S. Deng et al. *JMIR Res Protoc*. 2017. Vol. 6(7). P. e132. DOI: 10.2196/resprot.76362017.

9. Topical herbal formulae in the management of psoriasis: systematic review with meta-analysis of clinical studies and investigation of the pharmacological

actions of the main herbs / S. Deng et al. *Phytotherapy Res*. 2014. Vol. 28(4). P. 480–497. DOI: 10.1002/ptr.5028.

10. Protective effect of naringin against ankylosing spondylitis via ossification, inflammation and oxidative stress in mice / K. Liu et al. Exp. *Therapeutic Medicine*. 2016. Vol. 12(2). P. 1153–1158. DOI: 10.3892/etm.2016.3410.

11. Effects of baicalin on diabetic cardiac autonomic neuropathy mediated by the P2Y12 receptor in rat stellate ganglia / X. Sheng et al. *Cell. Physiol. Biochem*. 2018. Vol. 46(3). P. 986–998. DOI: 10.1159/000488828.

12. Combination treatment with quercetin and resveratrol attenuates high fat diet-induced obesity and associated inflammation in rats via the AMPKα1/SIRT1 signaling pathway / Le Zhao et al. *Exp. Therapeutic Med*. 2017. Vol. 14(6). P. 5942–5948. DOI: 10.3892/etm.2017.5331.

13. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders / M. Imran et al. *Lipids Health Dis.* 2017. Vol. 16. P. 84. DOI: 10.1186/s12944-017-0449-y.

14. Mangiferin antagonizes TNF-α-mediated inflammatory reaction and protects against dermatitis in a mice model / Y. Zhao et al. *Int. Immunopharmacol*. 2017. Vol. 45. P. 174–179. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.02.014.

15. The effect of mangiferin on skin: Penetration, permeation and inhibition of ECM enzymes / R. Ochocka et al. *PLoS One*. 2017. Vol. 12(7). P. e0181542. DOI: 10.1371/journal.pone.0181542.

16. Mangiferin ameliorates colitis by inhibiting IRAK1 phosphorylation in NF-KB and MAPK pathways / Jin-Ju. Jeong et al. *Eur. J. Pharmacol*. 2014. Vol. 740. P. 652–661. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.06.013.

17. Mangifera indica L. extract could be used to treat neuropathic pain and implication of mangiferin / B. B. Garrido-Suárez et al. *Molecules*. 2010. Vol. 15(12). P. 9035–9045. DOI: 10.3390/molecules15129035.

18. Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains / R. R. Wang et al. *Molecules.* 2011. Vol. 16(5). P. 4264–4277. DOI: 10.3390/molecules16054264.

19. Antiviral potential of mangiferin against poliovirus / D. Rechenchoski et al. *International Journal of Pharmacological Research*. 2018. Vol. 8. P. 34. DOI: 10.7439/IJPR.V8I4.4706.

20. Zheng M. S., Lu Z. Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chin. Med. J.* 1990. Vol. 103(2). P. 160–165.

21. Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 in vitro / X. M. Zhu et al. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1993. Vol. 14(5). P. 452–454

22. Ultrasound-assisted extraction of Mangiferin from Mango (Mangifera indica L.) leaves using response surface methodology / Tang-Bin Zou et al. *Molecules*. 2014. Vol. 19(2). P. 1411–1421. DOI: 10.3390/molecules19021411.

23. Mangiferin – a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant / A Matkowski et al. *Mini Rev. Med. Chem*. 2013. Vol. 13(3). P. 439–455.

24. Recent advances toward development of plant cell culture process for sustainable production of lignans and their health benefits / A. M. M. Gabr et al. *Exploring Plant Cells for the Production of Compounds of Interest* / eds. S. Malik et al. Springer, 2021. P. 249–289. DOI: 10.1007/978-3-030-58271-5_10.

25. Ajila C. M., Rao L. J., Prasada Rao U. J. S. Characterization of bioactive compounds from raw and ripe Mangifera indica L. peel extracts. *Food and Chemical Toxicology*. 2010. Vol. 48(12). P. 3406–3411. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.012.

26. Isolation of mangiferin from flowering buds of mangifera indica l and its evaluation of in vitro antibacterial activity / H. S. Maji et al. *JPA*. 2015. Vol. 4(3). P. 49–56.

27. Quantitative RP-LC Analysis of Mangiferin and Homomangiferin in Mangifera indica L. Leaves and in Mangifera persiciforma CY Wu et TL Ming Leaves / J. P. Qin et al. *Chromatographia*. 2008. Vol. 68(11–12). P. 955–960. DOI: 10.1365/s10337-008-0842-9.

28. Singh V. K. Physiological and biochemical changes with special reference to mangiferin and oxidative enzymes level in malformation resistant and susceptible cultivars of mango (Mangifera indica L.). *Scientia Horticulturae*. 2006. Vol. 108(1). P. 43–48. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.01.007.

29. Mangifera indica L. (Vimang) protection against serum oxidative stress in elderly humans / G. L. Pardo-Andreu et al. *Archives of Medical Research*. 2006. Vol. 37(1). P. 158–164. DOI: 10.1016/j.arcmed.2005.04.017.

30. Sun Q. H., Sun A. L., Liu R. M. Preparative isolation and purification of four compounds from the Chinese medicinal herb Rhizoma Anemarrhenae by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1104(1–2). P. 69–74. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.046.

31. Mangiferin: An effective therapeutic agent against several disorders (Review) / S. Du et al. *Mol. Med. Rep*. 2018. Vol. 18(6). P. 4775–4786. DOI: 10.3892/mmr.2018.9529.

32. Bioactive constituents of Iris hybrida (Iridaceae): Processing effect / O. Mykhailenko et al. *Biomedical Chromatography*. 2022. Vol. 36(7). P. e5369. DOI: 10.1002/bmc.5369.

33. Innovative GACP Approaches for Obtaining the Quality Iris hybrida Leaves for the Pharmaceutical Industry / O. Mykhailenko et al. *Chem. Biodiversity*. 2022. Vol. 19(4). P. e202200149. DOI: 10.1002/cbdv.202200149.

34. Augustyn W. A., Combrinck S., Botha B. M. Comparison of mangiferin in mango leaf and honeybush infusions. *Planta Medica*. 2011. Vol. 77(12). P. 1326–1326. DOI: 10.1055/s-0031-1282469.

35. Investigation on the antioxidant activity of leaves, peels, stems bark, and kernel of mango (Mangifera indica L.) / B. Sultana et al. *Food Sci*. 2012. P.77:C849–C852. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02807.x.

36. Volatile compounds of leaves and fruits of Mangifera indica var. coquinho (Anacardiaceae) obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation / S.S. Gebara. et al. *Food Chem*. 2011. V.127. P.689–693. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.123.

37. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem*. 2001;8:303–313. doi: 10.1016/S1350-4177(01)00071-2.

38. Extraction of antioxidant compounds from different varieties of Mangifera indica leaves using green technologies / M.T. Fernández-Ponce et al. *J. Sup. Fluids.* 2012. V.72. P.168–175. doi: 10.1016/j.supflu.2012.07.016.

39. Supercritical CO2 and low-pressure solvent extraction of mango (Mangifera indica) leaves: Global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing / I. M. Prado et al. *Food Bioprod. Process*. 2013. Vol. 91(4). P. 656–664. DOI: 10.1016/j.fbp.2013.05.007.

40. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds / K. Ghafoor et al. *Agric. Food Chem*. 2009. V. 57. P. 4988–4994. doi: 10.1021/jf9001439.

41. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis / T.B. Zou et al. *Drugs.* 2013. V.11. P. 1644–1655. doi: 10.3390/md11051644.

42. Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A.* 2003;1012:119–128. doi: 10.1016/s0021-9673(03)01184-1.

43. Da Porto C., Porretto E., Decorti D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (Vitis vinifera L.) seeds. *Ultrason. Sonochem*. 2013. V. 20. P. 1076–1080. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.12.002.

44. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from Gardenia jasminoides. Wang X.S., Wu Y.F., Dai S.L., Chen R., Shao Y. *Ultrason. Sonochem*. 2012. V.19. P. 1155–1159. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.03.012.

45. Antimicrobial evaluation of mangiferin and its synthesized analogues / S. K. Singh et al. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2012. Vol. 2(2). P. 884–887. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60329-3.

46. Dineshkumar B., Mitra A., M Manjunatha M. Studies on theanti-diabetic and hypolipidemic potentials of mangiferin (XanthoneGlucoside) in streptozotocin-induced Type 1 and Type 2 diabeticmodel rats. Int. J. Adv. *Pharmaceut. Sci.* 2010. Vol. 1. P. 75–85. DOI: 10.5138/IJAPS.2010.0976.1055.01009.

47. Benard O., Chi Y. Medicinal Properties of Mangiferin, Structural Features, Derivative Synthesis. Pharmacokinetics and Biological Activities. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2015. Vol. 15(7). P. 582–594. DOI: 10.2174/1389557515666150401111410.

48. Extraction of mangiferin from Mangifera indica L. leaves using microwave assisted Technique / S. Salomon et al. *J. Food Agric*. 2014. Vol. 26(7). P. 616–622.

49. Свідоцтво 123958 Україна про реєстрацію авторського права на твір «Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації» / Яромій М. В., Половко Н. П. (Україна) ; зареєстровано 19 лютого 2024 р.

50. Comparison of microwave-assisted and conventional extraction of mangiferin from mango (Mangifera indica L.) leaves / T. Zou et al. *J. Sep. Sci.* 2013. Vol. 36(20). P. 3457–3462. DOI: 10.1002/jssc.201300518.

51. Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (Mangifera indica L.) / G. Ruiz-Montañez et al. *Food. Chem*. 2014. Vol. 159. P. 267–272. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.009.

52. Aspé E., Fernández K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from Pinus radiata Bark. *Industrial crops and products*. 2011. Vol. 34(1). P. 838–844. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.02.002.

53. Preparative scale extraction of mangiferin and lupeol from mango (Mangifera indica L.) leaves and bark by different extraction methods / J. M. Lerma-Torres et al. *J. Food. Sci Technol*. 2019. Vol. 56(10). P. 4625–4631. DOI: 10.1007/s13197-019-03909-0.

54. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango ( Mangifera indica L.) / J. Barreto et al. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008. Vol. 56(14). P. 5599–5610. DOI: 10.1021/jf800738r.

55. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin / I. Stoilova et al. *Herba Pol*. 2005. Vol. 51(1–2). P. 37–44.

56. Efficacy of mangiferin against Cryptosporidium parvum in a neonatal mouse model / S. Perrucci et al. *Parasitol Res.* 2006. Vol. 99(2). P. 184–188. DOI: 10.1007/s00436-006-0165-4.

57. Rajendran P., Ekambaram G., Sakthisekaran D. Protective role of mangiferin against benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* 2008. Vol. 31(6). P. 1053–1058. DOI: 10.1248/bpb.31.1053.

58. Beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factorinduced activation of nuclear transcription factor kB but potentiates apoptosis / A. Sarkar et al. J. *Biol. Chem.* 2004. Vol. 279(32). P. 33768–33781. DOI: 10.1074/jbc.M403424200.

59. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta genes / J. M. Leiro et al. *Biochem. Pharmacol.* 2003. Vol. 65(8). P. 1361–1371. DOI: 10.1016/s0006-2952(03)00041-8.

60. Gold-Smith F., Fernandez A., Bishop K. Mangiferin and cancer: mechanisms of action. *Nutrients*. 2016. Vol. 8(7). P. 396. DOI: 10.3390/nu8070396.

61. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats / S. Muruganandan et al. J. *Ethnopharmacol.* 2005. Vol. 97(3). P. 497–501. DOI: 10.1016/j.jep.2004.12.010.

62. Modulation of diabetes and dyslipidemia in diabetic insulin-resistant rats by mangiferin: Role of adiponectin and TNF-α / S. Saleh et al. *An Acad. Bras Cienc*. 2014. Vol. 86(4). P. 1935–1948. DOI: 10.1590/0001-3765201420140212.

63. Effect of species variation and processing on phenolic composition and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of Cyclopia spp. (honeybush tea) / E.

Joubert et al. *J. Agri. Food Chem.* 2008. Vol 56(3). P. 954–963. DOI: 10.1021/jf072904a.

64. Ghosh M., Das J., Sil P. C. D(+) galactosamine induced oxidative and nitrosative stress-mediated renal damage in rats via NF-kappa B and inducible nitric oxide synthase (iNOS) pathways is ameliorated by a polyphenol xanthone, mangiferin. *Free Radical Research*. 2012. Vol. 46(2). P. 116–132. DOI: 10.3109/10715762.2011.644240.

65. Therapeutic and cosmetic applications of mangiferin: A patent review / M. Telang et al. *Expert Opin Ther Pat*. 2013. Vol. 23(12). P. 1561–1580. DOI: 10.1517/13543776.2013.836182.

66. In vivo and in vitro antiinflammatory activity of Mangifera indica L. extract (Vimang® ) / G. Garrido et al. *Pharmacol. Res*. 2004. Vol. 50(2). P. 143–149. DOI: 10.1016/j.phrs.2003.12.003.

67. Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship / A. Dar et al. *Biol. Pharm. Bull*. 2005. Vol. 8(4). P. 596–600. DOI: 10.1248/bpb.28.596.

68. Mangiferin: A possible strategy for periodontal disease to therapy / X. Y. Duang et al. *Med. Hypotheses*. 2011. Vol. 76(4). P. 486–488. DOI: 10.1016/j.mehy.2010.11.029.

69. Pokorski M. Mangiferin – A Nutraceutical with Clinical Implications. *Vitam Miner*. 2013. Vol. 3(1). P. 1000e122.

70. Makare N., Bodhankar S., Rangari V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of Mangifera indica L. in mice. *J. Ethnopharmacol*. 2001. Vol. 78(2–3). P. 133–137. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00326-9.

71. Saha S., Sadhukhan P., Sil P. C. Mangiferin: A xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential. *Biofactors*. 2016. Vol. 42(5). P. 459–474. DOI: 10.1002/biof.1292.

72. Jagetia G. C., Venkatesha V. A. Mangiferin protects human peripheral blood lymphocytes against γ-radiation–induced DNA strand breaks: a fluorescence

analysis of DNA unwinding assay. *Nutrition Research*. 2006. Vol. 26(6). P. 303–311. DOI: 10.1016/j.nutres.2006.06.011.

73. Effects of a natural extract from Mangifera indica L, and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells / J. Rodríguez et al. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. Vol. 1760(9). P. 1333–1342. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.04.005.

74. Effects of the Mango Components Mangiferin and Quercetin and the Putative Mangiferin Metabolite Norathyriol on the Transactivation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Isoforms / A. S. Wilkinson et al. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008. Vol. 56(9). P. 3037–3042. DOI: 10.1021/jf800046n.

75. Positive interaction of mangiferin with selected oral hypoglycemic drugs: A therapeutic strategy to alleviate diabetic nephropathy in experimental rats / V. Sekar et al. *Mol. Biol. Rep*. 2020. Vol. 47(6). P. 4465–4475. DOI: 10.1007/s11033-020-05517-0.

76. Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression and protects podocyte function via autophagy in diabetic rat glomeruli / X. Wang et al. *Eur. J. Pharmacol.* 2018. Vol. 824. P. 170–178. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.02.009.

77. Effect of mangiferin isolated from Salacia chinensis regulates the kidney carbohydrate metabolism in streptozotocin–induced diabetic rats / P. S. Sellamuthu et al. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2012. Vol. 12. P. 1583–1587. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60457-2.

78. In vitro studies on mangiferin protection against cadmium-induced human renal endothelial damage and cell death via the MAP kinase and NF-j B pathways / P. Rajendran et al. *J. Recept. Signal Transduct*. 2016. Vol. 36(1). P. 57–66. DOI: 10.3109/10799893.2015.1019137.

79. Walia V., Chaudhary S. K., Sethiya N. K. Therapeutic Potential of Mangiferin in the Treatment of Various Neuropsychiatric and Neurodegenerative Disorders. *Neurochem. Int.* 2021. Vol. 143. P. 104939. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104939.

80. Mangiferin attenuates renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and inducing adenosine production / B. Wang et al. *Int. Immunopharmacol*. 2015. Vol. 25(1). P. 148–154. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.11.011.

81. Mangiferin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in rats mediating modulation of MAPK pathway / A. K. Sahu et al. *Mol. Cell. Biochem*. 2019. Vol. 452(1-2). P. 141–152. DOI: 10.1007/s11010-018-3420-y.

82. Mangiferin attenuate sepsis-induced acute kidney injury via antioxidant and anti-inflammatory effects / L. He et al. *Am. J. Nephrol.* 2014. Vol. 40(5). P. 441–450. DOI: 10.1159/000369220.

83. Therapeutic Potential of Mangiferin against Kidney Disorders and its Mechanism of Action: A Review / P. T. Lum et al. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022. Vol. 29(3). P. 1530–1542. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.11.016.

84. Mangiferin: A multipotent natural product preventing neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's disease models / S. T. Feng et al. *Pharmacol. Res*. 2019. Vol. 146. P. 104336. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104336.

85. Sethiya N. K., Mishra S. H. Investigation of mangiferin, as a promising natural polyphenol xanthone on multiple targets of Alzheimer's disease *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 2014. Vol. 4(2). P. 110–119.

86. Mangiferin regulates proliferation and apoptosis in glioma cells by induction of microRNA-15b and inhibition of MMP-9 expression / J. Xiao et al. *Oncol. Rep.* 2015. Vol. 33(6). P. 2815–2820. DOI: 10.3892/or.2015.3919.

87. Mangiferin in cancer chemoprevention and treatment: pharmacokinetics and molecular targets / P. Rajendran et al. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2015. Vol. 35(1). P. 76–84. DOI: 10.3109/10799893.2014.931431.

88. Plessis-Stoman D., Preez J., Venter M. Combination treatment with oxaliplatin and mangiferin causes increased apoptosis and downregulation of NFκB in cancer cell lines. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med*. 2011. Vol. 8(2). P. 177–184. DOI: 10.4314/ajtcam.v8i2.63206

89. NF-kB in development and progression of human cancer / X. Dolcet et al. *Virchows Archiv*. 2005. Vol. 446(5). P. 475–382. DOI: 10.1007/s00428-005-1264-9.

90. Molecular mechanisms underlying mangiferin-induced apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung carcinoma cells / W. Shi et al. *Mol. Med. Rep*. 2016. Vol. 13(4). P. 3423–3432. DOI: 10.3892/mmr.2016.4947.

91. Mangiferin induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells both in vitro and in vivo / J. Lv et al. *J. Anim. Vet. Adv*. 2013. Vol. 12. P. 352–359.

92. Mangiferin induces apoptosis in human ovarian adenocarcinoma OVCAR3 cells via the regulation of Notch3 / B. Zou et al. *Oncol. Rep*. 2017. Vol. 38(3). P. 1431–1441. DOI: 10.3892/or.2017.5814.

93. Mangiferin inhibits tumor necrosis factor-?-induced matrix metalloproteinase-9 expression and cellular invasion by suppressing nuclear factor-B activity / M. Dilshara et al. *BMB reports*. 2015. Vol. 48(10). P. 559–564. DOI: 10.5483/bmbrep.2015.48.10.003.

94. Mangiferin protects rats against chronic bronchitis via regulating NF-kappaB (P65) and IkappaBalpha expression in mononuclear cells / Z. Q. Wei et al. *Yao Xue Xue Bao*. 2014. Vol. 49(5). P. 596–601.

95. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats / S. Prabhu et al. *J. Ethnopharmacol*. 2006. Vol. 107(1). P. 126–133. DOI: 10.1016/j.jep.2006.02.014.

96. Effect of mangiferin on mitochondrial energy production in experimentally induced myocardial infarcted rats / S. Prabhu et al. *Vascul Pharmacol*. 2006. Vol. 44(6). P. 519–525. DOI: 10.1016/j.vph.2006.03.012.

97. Prabhu S., Narayan S., Devi C. Mechanism of protective action of mangiferin on suppression of inflammatory response and lysosomal instability in rat model of myocardial infarction. *Phytother. Res*. 2009. Vol. 23(6). P. 756–760. DOI: 10.1002/ptr.2549

98. Cardioprotective effect of mangiferin on left ventricular remodeling in rats / D. Zheng et al. *Pharmacology*. 2012. Vol. 90(1–2). P. 78–87. DOI: 10.1159/000339450.

99. The effects of mangiferin (Mangifera indica L) in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats / W. Arozal et al. *Drug Res. (Stuttg).* 2014. Vol. 65(11). P. 574–580. DOI: 10.1055/s-0034-1394457.

100. Beneficial effects of mangiferin on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters / F. Guo et al. *Mol. Nutr. Food. Res*. 2011. Vol. 55(12). P. 1809–1818. DOI: 10.1002/mnfr.201100392.

101. IL1β/ TNFα/COX-2/VEGF axis responsible for effective healing potential of C-glucoside xanthone (mangiferin) based ointment in immunocompromised rats / V. P. Yadav et al. *Cytokine*. 2022. Vol. 158. P. 156012. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.156012.

102. Fe(III) improves antioxidant and cytoprotecting activities of mangiferin / G. L. Pardo-Andreu et al. *Eur. J. Pharmacol*. 2006. Vol. 547(1–3). P. 31–36. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.07.040.

103. Mangiferin ameliorates colitis by inhibiting IRAK1 phosphorylation in NF-KB and MAPK pathways / Jin-Ju. Jeong et al. *Eur. J. Pharmacol*. 2014. Vol. 740. P. 652–661. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.06.013.

104. Anti-hypernociceptive effect of mangiferin in persistent and neuropathic pain models in rats / B. B. Garrido-Suárez et al. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2014. Vol. 124. P. 311–319. DOI: 10.1016/j.pbb.2014.06.019.

105. Mangiferin Nanoemulsions in treatment of Inflammatory Disorders and Skin Regeneration / M. Pleguezuelos-Villa et al. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Vol. 564. P. 299–307. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.056.

106. Antiherpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants / C. Yoosook et al. *Phytomedicine*. 2000. Vol. 6(6). P. 411–419. DOI: 10.1016/S0944-7113(00)80068-9.

107. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Anacardium occidentale and Mangifera indica in oral care / G. Anand et al. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2015. Vol. 7(1). P. 69–74. DOI: 10.4103/0975-7406.148780.

108. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS / D. Han et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. Vol. 51(1). P. 260–263. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.07.021.

109. Pharmacokinetics of mangiferin and its metabolite-norathyriol, Part 1: systemic evaluation of hepatic first-pass effect in vitro and in vivo / X. Tian et al. *Biofactors*. 2016. Vol. 42(5). P. 533–544. DOI: 10.1002/biof.1291.

110. Pharmacokinetics of mangiferin and its metabolite-norathyriol, Part 2: influence of UGT, CYP450, P-gp, and enterobacteria and the potential interaction in Rhizoma Anemarrhenae decoction with timosaponin B2 as the major contributor / X. Tian et al. *Biofactors*. 2016. Vol. 42(5). P. 545–555. DOI: 10.1002/biof.1290.

111. Improving permeability and oral absorption of mangiferin by phospholipid complexation / H. Ma et al. *Fitoterapia*. 2014. Vol. 93. P. 54–61. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.10.016.

112. Increased absorption of mangiferin in the gastrointestinal tract and its mechanism of action by absorption enhancers in rats / X. Wang et al. *Drug. Dev. Ind. Pharm*. 2013. Vol. 39(9). P. 1408–1413. DOI: 10.3109/03639045.2012.704043.

113. Metabolism and pharmacokinetics of mangiferin in conventional rats, pseudo-germ-free rats, and streptozotocin-induced diabetic rats / H. Liu et al. *Drug. Metab. Dispos*. 2012. Vol. 40(11). P. 2109–2118. DOI: 10.1124/dmd.112.045849.

114. Exploring and validating physicochemical properties of mangiferin through GastroPlus® software / R. K. Khurana et al. *Future Sci OA*. 2017. Vol. 3(1). P. FSO167. DOI: 10.4155/fsoa-2016-0055.

115. Яромій М. В., Половко Н. П. Перспективи створення м'якого лікарського засобу з мангіферином для терапії герпесу. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали II Міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 13 жовт. 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 208.

116. Яромій М. В., Половко Н. П. Використання мангіферину у фармації та медицині. *Сучасні досягнення фармацевтичної справи* : зб. наук. пр. Харків : НФаУ, 2022. Вип. 1. С. 253.

117. Herbal Principles in Cosmetics: Properties and Mechanisms of Action / B. Burlando et al. NewYork: CRC Press, 2010. 460 p.

118. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus Lespedeza and description of Bradyrhizobium yuanmingense sp. nov. / Zhu Yun Yao et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002. V. 52. P. 2219–2230. DOI: 10.1099/00207713-52-6-2219.

119. Лисюк Р. М., Дармограй Р. Є. Рослини роду Lespedeza як перспективні джерела сучасних лікарських засобів. *Фітотерапія*. 2015. № 2. С. 31–35.

120. Isocarlinoside, a di-C-glycosylflavone from Lespedeza capitata / A. Linard et al. *Phytochemistry*. 1982. Vol. 21, № 3. P. 797–799. https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)83197-X .

121. Wagner H. Elbl G. ACE-inhibitory procyanidins from Lespedeza capitata. *Planta Medica*. 1992. № 58. P. 297 - 298. DOI: 10.1055/s-2006-961466.

122. Кисельова К. Е., Яромій М. В. Використання леспедези в народній і традиційній медицині. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція* : матеріали VI наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 16 листоп. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 232.

123. New prenylated isoflavanones and other constituents of Lespedeza bicolor / O.B. Maximov et al. *Fitoterapia*. 2004. № 75. P. 96–98. DOI: 10.1016/j.fitote.2003.07.012

124. Flavonoids of Lespedeza hedysaroides / H. Wuet al. *Xibei Zhiwu Xuebao*. 2009. Vol. 29, № 9. P. 1904 – 1908.

125. Lespedeza bicolor ameliorates endothelial dysfunction induced by methylglyoxal glucotoxicity / M. H. Do et al. *Phytomedicine*. 2017. Vol. 36. P. 26–36. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.09.005.

126. Соколова Л.К., Пушкарьов В.М., Тронько М.Д. Перспективи використання препаратів леспедези (Lespedeza sp.) для лікування патології нирок та інших діабетичних ускладнень. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2023. Том 19, №5. С. 6-15.

127. Antioxidant activity and irritation response of Lespedeza bicolor / Y. S. Lee et al. *J. Toxicol*. 2005. Vol. 21. P. 115–119.

128. Lee S. J., Hossaine M. D., Park S. C. A potential anti-inflammation activity and depigmentation effect of Lespedeza bicolor extract and its fractions. *Saudi J. Biol. Sci*. 2016. Vol. 23(1). P. 9–14. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.01.016.

129. Kim Y.R., Nam S.H. Effects of a mouthwash containing Lespedeza cuneata extract on risk of dental caries: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Sci. Rep*. 2022. 12(1). 20761. doi: 10.1038/s41598-022-25162-w.

130. Lespedeza bicolor Extract Improves Amyloid Beta25-35-Induced Memory Impairments by Upregulating BDNF and Activating Akt, ERK, and CREB Signa–ling in Mice / Y.H. Ko et al. *Planta Med.* 2019. Vol. 85. № 17. P. 1363-1373. DOI: 10.1055/a-1018-5402.

131. Therapeutic Potential of Lespedeza bicolor to Prevent Methylglyoxal-Induced Glucotoxicity in Familiar Diabetic Nephropathy / M.H. Do et al. *J. Clin. Med*. 2019. Vol. 8. № 8. P. 1138. DOI: 10.3390/jcm8081138. PMID: 31370192; PMCID: PMC6723630.

132. Effects of Lespedeza Bicolor Extract on Regulation of AMPK Associated Hepatic Lipid Metabolism in Type 2 Diabetic Mice / Y. Kim et al. *Antioxidants (Basel)*. 2019. Vol. 8. № 12. P. 599. DOI: 10.3390/antiox8120599.

133. Cornara L., Xiao J., Burlando B. Therapeutic Potential of Temperate Forage Legumes: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2016. Vol. 56. Suppl. 1. P. S149-61. DOI: 10.1080/10408398.2015.1038378. PMID: 26507574.

134. Antiproliferative Pterocarpans and Coumestans from Lespedeza bicolor / N. T. T. Thuy et al. *J. Nat. Prod*. 2019. Vol. 82(11). P. 3025–3032. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00567.

135. Antioxidant 2-Phenylbenzofurans and a Coumestan from Lespedeza virgata / Yan Chen et al. *Journal of Natural Products*. 2008. Vol. 71, № 6. P. 929 - 932.

136. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications / eds. Q. M. Andersen et al. London, New York: Taylor & Francis Group, 2006. 1197 p.

137. Antibacterial and immuno-modulatory activity of ethanol extracts from Lespedeza sp. during Helicobacter pylori infections / J. K Yang et al. *Biotechnol. Bioproc*. 2010. Vol. 15. P. 1077–1083. DOI: 10.1007/s12257-009-3115-z.

138. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera Astragalus and Lespedeza grown in the Loess Plateau of China and description of Rhizobium loessense sp. nov. /Ge Hong Wei et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003. № 53. P. 1575–1583. DOI: 10.1099/ijs.0.02031-0

139. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: http://www.drlz.kiev.ua/ (дата звернення: 01.12.2023).

140. Компендіум. Лікарські препарати України. URL: http://compendium.com.ua/ (дата звернення: 01.12.2023).

141. Державний формуляр лікарських засобів. URL: https://moz.gov.ua/uploads/10/54241-dn_418_12032024_dod.pdf (дата звернення: 20.01.2025).

142. Ацикловір. *Компендіум. Лікарські препарати України*. URL: https://compendium.com.ua/uk/atc/d06bb03/ (дата звернення: 20.01.2023).

143. Mangiferin-Loaded Smart Gels for HSV-1 Treatment Pharmaceutics / M. Sicurella et al. *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13(9). P. 1323. DOI: 10.3390/pharmaceutics13091323.

144. Противірусні засоби. *Компендіум. Лікарські препарати України*. URL: https://compendium.com.ua/uk/atc/d06bb/ (дата звернення: 20.01.2023).

145. Мангогерпін. *Нормативно-директивні документи МОЗ України*. URL: https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=5216 (дата звернення: 20.01.2023).

146. Кречун А. В. Вивчення біологічно активних речовин півників угорських та розробка субстанцій на їх основі : дис. … д–ра філософії. Харків : НФаУ, 2020. 250 с.

147. Лікарські засоби. Настанова з якості. Допоміжні речовини : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.6:2004. URL: https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-6-2004/ (дата звернення: 20.01.2024).

148. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 2. 724 с.

149. Допоміжні речовини у виробництві ліків : навч. посіб. для студентів вищ. фармацевт. навч. закл. / О. А. Рубан т ін. ; за ред. І. М. Перцева. Харків : Золоті сторінки, 2016. 720 с.

150. Encyclopedia of pharmaceutical technology / ed. by J. Swarbrick. 3rd ed. New York : In-forma Healthcare USA, 2007. 4372 p.

151. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines. 2013. 3655 p.

152. ДСТУ 8808:2003 Олія кукурудзяна. Технічні умови. Офіц. вид. ; чинний від 01.01.2004. Київ : Держспоживстандарт України, 2003. 18 с.

153. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.

154. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.

155. Державна Фармакопея України. Доповнення 1 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків :

ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 360 с.

156. ДСТУ 4765:2007 Креми косметичні. Загальні технічні умови. Офіц. вид. ; чинний від 01.01.2009. Київ : Держспоживстандарт України, 2008. 12 с.

157. 2.2.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України /Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. 1-е вид. Харків:Ріпег, 2001. С. 58-67. Доповнення 1. 2004. С. 2-4. Доповнення 2. 2008. С. 85-100. Доповнення 4. 2011. С. 27-28.

158. Лікарські засоби. Валідація процесів : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.5:2016. Київ : МОЗ України, 2016. 25 с. URL: https://surl.li/ywenaj (дата звернення: 20.01.2025).

159. Determination of mangiferin solubility in solvents used in the biopharmaceutical industry / J. Acosta et al. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research.* 2016. 4 (2). P.49-53

160. Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методик ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м’якій лікарській формі. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 3. С. 23–32. DOI: 10.11603/2312-0967.2022.3.13548.

161. Науково практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем`якін та ін. Київ : Авіцена, 2002. 156 с.

162. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. Київ : Авіцена, 2001. 528. с.

163. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Council of Europe. Strasbourg, 1986. 53 p.

164. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008. Київ : МОЗ України, 2012. 27 с. URL: https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-2/st-n-mozu-42-6-0-2008/ (дата звернення: 20.01.2024).

165. Порядок проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів : наказ МОЗ України від 14.12.2009р. № 944. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0053-10#Text (Date of access: 15.08.2023).

166. Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*. 2010. № L276. P. 33–79.

167. Експериментальне вивчення нових препаратів для місцевого лікування ран. Методичні рекомендації / Л.В. Яковлєва та ін. Харків: Вид-во НФаУ, 2013. 52 с.

168. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: метод. реком. / Ю. Л. Волянський та ін. Київ. 2004. 38 с.

169. Державна Фармакопея України. Доповнення 6 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків , 2023. 424 с.

170. Garber, A., Barnard, L., Pickrell, C. Review of Whole Plant Extracts With Activity Against Herpes Simplex Viruses In Vitro and In Vivo. *J Evid Based Integr Med*. 2021. Vol. 26. P. 1-57. https://doi.org/10.1177/2515690X20978394

171. Обґрунтування вибору екстрагента для отримання вилучень наземної частини леспедеці двоколірної / К. Є. Кисельова та ін. *Вісник фармації*. 2024. Т. 107, № 1. С. 58–65. DOI: 10.24959/nphj.24.126.

172. Development of the composition of aqueous extract of lespedeza bicolor and gel with extract and mangiferin / M. Yaromiy, N. Bevz, O. Mykhailenko, V. Kovalov, N. Polovko, Y. Marchenko. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2025. № 1 (53). P. 4–13. https://doi.org/10.15587/2519-4852.2025.322720 (Scopus)

173. Яромій М.В., Юдкевич Т. К., Половко Н.П. Дослідження протизапальної активності водного екстракту леспедези двоколірної. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали XI Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 27 листопада 2024 р.). Харків : Вид-во НФаУ, 2024. С. 158–159.

174. Маєвський О.Є., Міронов Є.В. Зміни в шкірі після термічного опіку (огляд літераатури). *Biomedical and biosocial anthropology*. 2015. № 25. С.218-220.

175. Wang Y., Cui C., Sun H. Anti-Inflammatory Effect of Mangiferin on an Experimental Model of Allergic Rhinitis through the Inhibition of NF-κB Signaling Pathways. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2020. Vol. 39(4). P. 357–364. DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2020032390.

176. Anti-inflammatory and immunomodulatory activity of Mangifera indica L. reveals the modulation of COX-2/mPGES-1 axis and Th17/Treg ratio / A. Saviano et al. *Pharmacol Res*. 2022. Vol. 182. P. 106283. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106283.

177. Mangiferin: Analgesic properties in neuropathic pain, molecular docking and meta-analysis / B. Chang et al. *Phytomedicine Plus*. 2022. Vol. 2(1). P. 100170. DOI: 10.1016/j.phyplu.2021.100170.

178. Phytochemical screening and antibacterial and antioxidant activities of Mangifera indica leaves / A. Maharaj et al. *Horticulturae*. 2022. Vol. 8(10). P. 909. DOI: 10.3390/ horticulturae8100909.

179. Alaiya M. A., Odeniyi M. A.Utilisation of Mangifera indica plant extracts and parts in antimicrobial formulations and as a pharmaceutical excipient: a review. *Futur. J. Pharm. Sci*. 2023. Vol. 9(1). P. 29. DOI: 10.1186/s43094-023-00479-z.

180. Antibacterial activity and phytochemical screening of (Mangifera indica) Mango stem and leaf extracts on clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus / S. Diso et al. *J. Adv. Med. Pharm. Sci*. 2017. Vol. 13(1). P. 1–6. DOI: 10.9734/JAMPS/2017/31127.

181. Diesegha G. C., Akani N. P. Antifungal activity of Mangifera indica leaf extracts on selected fungi. *Curr. Stud. Comparat Educ. Sci Technol*. 2017. Vol. 4(2). P. 136–148.

182. Ointment formulation and characterization of Arum Manis Mango Mangifera indica leaves methanol extract as an antibacterial agent against

Propionibacterium acnes / D. R. Ningsih et al. *Curr. Bioact. Compd*. 2022. Vol. 17(1). P. 66–75. DOI: 10.2174/1573407216666200214100855

183. Mangiferin: A promising natural xanthone from Mangifera indica for the control of acyclovir – resistant herpes simplex virus 1 infection / D. Z. Rechenchoski et al. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 28(4). P. 115304. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115304.

184. Wang W.-D., Chen G. Antiviral activity of against herpes simplex virus type 1. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2023. Vol. 13(3). P. 112–120. DOI: 10.4103/2221-1691.372284.

185. Perspectives on Medicinal properties of Mangiferin / A. Vyas et al. *Mini Rev. Med. Chem*. 2012. Vol. 12(5). P. 412–425. DOI: 10.2174/138955712800493870.

186. Вивчення противірусної дії м'якої лікарської форми / С. Д. Загородня та ін. *Вісник фармації*. 2024. Т. 106, № 2. С. 58–64. DOI: 10.24959/nphj.24.155.

187. Яромій М. І., Ковальов В. В., Половко Н. П. Обґрунтування вибору гідрофільного неводного розчинника до складу гелю з мангіферином. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. Харків : НФаУ, 2024. С. 348–351.

188. Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Обгрунтування складу гелю з мангіферином і леспедезою біколірною. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали III Міжнар. наук.-практ. конф. Харків : НФаУ, 2023. С. 499.

189. Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 22–23 верес. 2022 р. Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 77.

190. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011 / ДП «ДНЦЛЗ» ; авт. кол.: М. Ляпунов та ін. Вид. офіц. Київ : МОЗ України, 2011. 33 с.

191. Яромій М., Половко Н. Дослідження реологічних властивостей гелю з мангіферином і водним екстрактом леспедеці. *Науково-технічний прогрес і оптимізація економіки технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали X наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. пам'яті зав. каф. управління та фармації з технологією ліків, д-ра фармацевт. наук, проф. Т. А. Грошового, 17–18 жовт. 2024 р. Тернопіль : ТНМУ, 2024. С. 203.

192. Лікарські засоби. Технологічний процес. Документація : Настанова 42-01-2003. URL: https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-01-2003/ (дата звернення: 20.01.2025).

193. Яромій М. В., Бевз Н. Ю. Ідентифікація мангіферину в антигерпетичному гелі. *Youth Pharmacy Science* : матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 7–8 груд. 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 78.

194. Підбір методик ідентифікації та кількісного визначеня мангіферину / М. В. Яромій та ін. *Modern chemistry of medicines* : матеріали Міжнар. Internet-конф., м. Харків, 18 трав. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 261.

195. Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедези двоколірної. *Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології* : зб. публікацій I Міжнар. наук.–практ. online конф., присвяч. 85-річчю з дня заснування каф. біохімії, м. Харків, 7 берез. 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 332–338.

# ДОДАТКИ

*Додаток А*

**Список публікацій здобувача**

1. Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 3. С. 23-32 DOI: https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.3.13548 (*Особистий внесок – планування та проведення дослідження, оброблення та узагальнення отриманих даних, підготовка статті; Половко Н. П. – участь у формуванні цілей плануванні експерименту та фармуванні висновків; Бевз Н. Ю. – участь у проведенні фіто-хімічних досліджень, обговорення результатів досліджень* ).

2. Яромій М. В., Половко Н. П. Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації. *Аннали Мечниковського інституту.* 2023. № 1. С. 52–58. DOI:10.5281/zenodo.7721743 (*Особистий внесок здобувача – аналіз, узагальнення літературних джерел, формування висновків, написання статті; Половко Н.П. – участь у формуванні цілей роботи та висновків*).

3. Вивчення противірусної дії м'якої лікарської форми / С. Д. Загородня, М. В. Яромій, Л. О. Артюх, Н. П. Половко. *Вісник фармації*. 2024. № 2(106). С. 58–64 DOI: https://doi.org/10.24959/nphj.24.155 (*Особистий внесок здобувача – участь у проведенні досліджень, оброблення та узагальнення отриманих даних, підготовка статті; Загородня С. Д. – організація і проведення мікробіологічних досліджень, обговорення результатів досліджень; Артюх Л. О. – участь у проведенні мікробіологічних досліджень, статистична обробка результатів; Половко Н. П. – участь у формуванні цілей та висновків*).

4. Обґрунтування вибору екстрагента для отримання вилучень наземної частини леспедеці двоколірної / К. Є. Кисельова, Н. Ю. Бевз, О. О. Михайленко, М. В. Яромій, Л. І. Вишневська. *Вісник фармації.* 2024. № 1 (105). С. 58–65. https://doi.org/10.24959/nphj.24.126 (*Особистий внесок здобувача –*

*участь в аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експерименту та обговоренні результатів дослідження; Кисельова К.Є. – аналіз літературних джерел, планування та проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, формування висновків, підготовка статті до друку; Бевз Н. Ю. – участь у плануванні, проведенні та обговоренні результатів фізико-хімічних досліджень; Михайленко О. О. – участь у плануванні, проведенні та обговоренні результатів фіто-хімічних досліджень; Вишневська Л. І. – участь у формуванні цілей, плануванні експерименту та обговоренні результатів*).

5. Development of the composition of aqueous extract of Lespedeza bicolor and gel with extract and mangiferin / M. Yaromiy, N. Bevz, O. Mykhailenko, V. Kovalov, N. Polovko, Y. Marchenko. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2025. № 1 (53). P. 4–13. https://doi.org/10.15587/2519-4852.2025.322720 (Scopus) (*Особистий внесок здобувача – участь в аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експерименту, обговоренні результатів дослідження та підготовка статті; Бевз Н. Ю. – участь у плануванні, проведенні та обговоренні результатів фізико-хімічних досліджень; Михайленко О. О. – участь у обговоренні результатів фіто-хімічних досліджень; Ковальов В. – участь у проведенні та обговоренні результатів мікроскопічних досліджень Марченко Я.С. – участь у проведенні та обговоренні результатів фармакотехнологічних досліджень; Половко Н.П. – участь у формуванні цілей та висновків досліджень*).

6. А.с. 123958 Україна. Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації / М. В. Яромій, Н. П. Половко № 123958; опубл. 19.02.2024. (*Особистий внесок здобувача – аналіз, узагальнення літературних джерел, формування висновків, участь у написанні наукового твору та оформлення авторського права на твір; Половко Н.П. – участь у формуванні цілей та висновків до твору та участь у оформленні авторського права на твір*).

7. Яромій М. В., Половко Н. П. Перспективи створення м'якого лікарського засобу з мангіферином для терапії герпесу. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали II Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 13 жовт. 2022 р.). Харків : НФаУ, 2022. С. 208.

8. Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар.участю (м. Тернопіль, 22–23 вересня 2022 р.). Тернопіль: ТНМУ, 2022. С. 77.

9. Яромій М. В., Половко Н. П. Використання мангіферину у фармації та медицині. *Сучасні досягнення фармацевтичної справи* : зб. наук. пр. Харків : НФаУ, 2022. Вип. 1. С. 253..

10. Яромій М. В., Бевз Н. Ю. Ідентифікація мангіферину в антигерпетичному гелі. *Youth Pharmacy Science* : матеріали III Всеукр.наук.-практ. конф. з міжнар. участю. (м. Харків, 7–8 груд. 2022 р.). Харків : НФаУ, 2022. С. 78.

11. Підбір методик ідентифікації та кількісного визначення мангіферину / М. В. Яромій, Ранія Хізрі, Н.П. Половко, Н.Ю. Бевз. *Modern chemistry of medicines* : матеріали Міжнар. Internet-конф. (м. Харків, 18 трав. 2023 р.). Харків : НФаУ, 2023. С. 261.

12. Кисельова К. Є., Яромій М. В. Використання леспедези в народній і традиційній медицині. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція* : матеріали VI наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю (м. Харків, 16 листопада 2023 р.). Харків: НФаУ, 2023. С. 232.

13. Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обґрунтування складу гелю з мангіферином і леспедезою біколірною. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології*: матеріали III Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 24 листопада 2023 р.). Х.: НФаУ, 2023. С. 499

14. Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедези двоколірної *Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології* : зб. публікацій І Міжнар. наук.–практ. online конф., присвяч. 85-річчю з дня заснування каф. Біохімії (м. Харків, 7 берез. 2024 р.). Харків : НФаУ, 2024. С. 332–338.

15. Яромій М., Половко Н. Дослідження реологічних властивостей гелю з мангіферином і водним екстрактом леспедеці. *Науково-технічний прогрес і оптимізація економіки технологічних процесів створення лікарських препаратів*:матеріали Х наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої пам’яті зав.каф. управління та фармації з технологією ліків, д-ра фарм.наук, проф. Т.А. Грошового (17 – 18 жовтня 2024 р.). Тернопіль : ТНМУ,2024. С. 203.

16. Яромій М. В., Ковальов В.В., Половко Н.П. Обґрунтування вибору гідрофільного неводного розчинника до складу гелю з мангіферином. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 25 жовтня 2024 р.). Харків : НФаУ, 2024. С. 348–351.

17. Яромій М.В., Юдкевич Т. К., Половко Н.П. Дослідження протизапальної активності водного екстракту леспедези двоколірної. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали XI Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Харків, 27 листопада 2024 р.). Харків : Вид-во НФаУ, 2024. С. 158–159.

*Продовження дод. А*

**Апробація результатів дисертації**

1. II Міжнародна науково-практична конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, 2022 р., форма участі – публікація тез, постерна доповідь).

2. IX Науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали» (м. Тернопіль, 2022 р., форма участі – публікація тез).

3. III Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Youth Pharmacy Science» (м. Харків, 2022 р., форма участі – публікація тез).

4. Міжнародна Internet-конференція «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, 2023 р., форма участі – публікація тез).

5. VI Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (м. Харків, 2023 р., форма участі – публікація тез).

6. III Міжнар. наук.-практ. конф. Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології: матеріали. (м. Харків, 2023 р., форма участі – публікація тез, постерна доповідь ).

7. I Міжнародна науково–практична online конференція, присвячена 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії «Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології» (м. Харків, 2024 р., форма участі – публікація тез).

8. X Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена пам’яті завідувача кафедри управління та фармації з технологією ліків, доктора фарм.наук, проф. Т.А. Грошового «Науково-технічний прогрес і оптимізація економіки технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м. Тернопіль, 2024 р., форма участі – публікація тез).

9. IV Міжнародна науково-практична конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, 2024 р., форма участі – публікація тез).

10. XI Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (м. Харків, 2024 р., форма участі – публікація тез).

*Додаток Б*

УКРАЇНА

# СВІДОЦТВО

**про реєстрацію авторського права на твір**

**№ 123958**

**Науковий твір «Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації»**

(вид, назва твору)

Автор (співавтори) **Яромій Мар'яна Вячеславівна, Половко Наталя Петрівна**

(прізвище, ім'я, по батькові (за наявності), псевдонім (за наявності))

Твір оприлюднено: **Опублікування: Яромій М. В., Половко Н. П. Аналіз досвіду та перспективи використання мангіферину у медицині та фармації // Annals of Mechnikov's Institute - 2023. - № 1. - С. 76-89.**

(відомості про факт і дату оприлюднення твору (за наявності))

Авторські майнові права належать спільно **Яромій Мар'яна Вячеславівна, вул. Котляревського, 15 А, кв. 38, м. Сколе, Сколівський р-н, Львівська обл., 82600; Половко Наталя Петрівна, вул. Леся Сердюка, 18, кв. 57, м. Харків, 61107**

(прізвище, ім'я, по батькові (за наявності) фізичної особи / найменування юридичної особи, адреса)

Дата реєстрації 19 лютого 2024 р.

**Директор Державної організації «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій»** **Олена ОРЛЮК**

УКРНОІВІ

*Продовження дод. Б*

Форма В50

МІНЕКОНОМІКИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

**ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ**
**«УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС**
**ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ»**

**(УКРНОІВІ)**

вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ, 01601, тел.: +380 44 209-27-06, +380 67 501-05-95
e-mail: office@nipo.gov.ua, http://www.nipo.gov.ua, код згідно з ЄДРПОУ 44673629

13.03.2025 № 4231/ЗУ/25

Стосується заявки № u 2024 02039
/ при листуванні просимо посилатися на цей № /

Адреса для листування
Національний фармацевтичний університет,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002

**Рішення**
**від «13» березня 2025 р.**

**(21)** Реєстраційний номер заявки **u 2024 02039**

**(22)** Дата подання **18.04.2024**

**(71)** Заявник(и)
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Керуючись Законом України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі", Правилами складання, подання та проведення експертизи заявки на винахід і заявки на корисну модель, затвердженими наказом Міністерства економіки України від 09.09.2024 № 23301, що зареєстрований в Міністерстві юстиції 18.09.2024 за № 1411/42756, УКРНОІВІ на підставі висновку експертизи від 13.03.2025 № 4228/ЗУ/25 прийнято рішення про державну реєстрацію корисної моделі "СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГЕРПЕТИЧНИХ УРАЖЕНЬ ШКІРИ І СЛИЗОВИХ ОБОЛОНОК У ФОРМІ ГЕЛЮ".

Це рішення може бути оскаржене в судовому порядку або до Апеляційної палати протягом двох місяців з дати одержання цього рішення чи копій затребуваних матеріалів.

Директор Олена ОРЛЮК

*Додаток В*

| Аптека № 80 | | | |
|---|---|---|---|
| ТЕХНОЛОГІЧНА І Н С Т Р У К Ц І Я | | | |
| **ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ**<br>**Леспедези екстракт водний рідкий** | | | Стор. 1 |
| Рецептурно-виробничий відділ аптеки № 80 | Дата впровадження: | Серія | 1 екземпляр<br>з ___ |
| | | | Версія № 01 |

**ЗАТВЕРДЖУЮ**
Завідувачка аптеки № 80
_____ Н. І. Штучна
11.. січня 2024 р.

Діє від «___» _____ 2024 р.
Дата перегляду «___» _____ 2028 р.

## ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЕКСТЕМПОРАЛЬНОГО ЗАСОБУ ЛЕСПЕДЕЗИ ЕКСТРАКТ ВОДНИЙ РІДКИЙ

| Розроблено / змінено | Узгоджено |
|---|---|
| Аспірантка кафедри аптечної технології ліків НфаУ | Завідувачка кафедри аптечної технології ліків, професор НФаУ |
| Яромій М. В. | Вишневська Л. І. |
| Підпис: | Підпис: |
| Дата: | Дата: |
| | |
| Професорка кафедри аптечної технології ліків НфаУ | |
| Половко Н. П. | |
| Підпис: | |
| Дата: | |
| | |

*Продовження дод. В*

| Аптека № 80 | | | |
|---|---|---|---|
| ТЕХНОЛОГІЧНА І Н С Т Р У К Ц І Я | | | |
| **ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ**<br>**Гель манголеспедин** | | | Стор. 2 |
| Рецептурно-виробничий відділ аптеки № 80 | Дата впровадження: | Серія | 1 екземпляр<br>з___ |

**ЗАТВЕРДЖУЮ**
Завідувачка аптеки № 80
_____ Н. І. Штучна
«11» липня 2024 р.

Діє від «___» _____ 2024 р.
Дата перегляду «___» _____ 2028 р.

## ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЕКСТЕМПОРАЛЬНОГО ЗАСОБУ «ГЕЛЬ МАНГОЛЕСПЕДИН»

| Розроблено / змінено | Узгоджено |
|---|---|
| Аспірантка кафедри аптечної технології ліків | Завідувач кафедри аптечної технології ліків, професор |
| Яромій М. В. | Вишневська Л. І. |
| Підпис: | Підпис: |
| Дата: | Дата: |
| | |
| Професорка кафедри аптечної технології ліків | |
| Половко Н. П. | |
| Підпис: | |
| Дата: | |
| | |

*Продовження дод. В*

| ТЕХНОЛОГІЧНА ІНСТРУКЦІЯ | | | |
|---|---|---|---|
| **ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ**<br>**Леспедези екстракт водний рідкий** | | | Стор. 1 |
| Рецептурно-виробничий відділ аптеки № 80 | Дата впровадження: | Серія | 1 екземпляр з ___<br>Версія № 01 |

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
ПП «Гармонія-2000»
Завідувачка аптеки № 5,
м. Чернівці
_____ О. М. Голубнича
« 12» серпня 2024 р.

Діє від «___» _____ 2024 р.
Дата перегляду «___» _____ 2028 р.

## ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЕКСТЕМПОРАЛЬНОГО ЗАСОБУ ЛЕСПЕДЕЗИ ЕКСТРАКТ ВОДНИЙ РІДКИЙ

| Розроблено / змінено | Узгоджено |
|---|---|
| Аспірантка кафедри аптечної технології ліків НфаУ | Завідувачка кафедри аптечної технології ліків, професор НФаУ |
| Яромій М. В. | Вишневська Л. І. |
| Підпис: | Підпис: |
| Дата: | Дата: |
| | |
| Професорка кафедри аптечної технології ліків НфаУ | |
| Половко Н. П. | |
| Підпис: | |
| Дата: | |
| | |

*Продовження дод. В*

| ТЕХНОЛОГІЧНА І Н С Т Р У К Ц І Я | | | |
|---|---|---|---|
| **ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ**<br>**Гель манголеспедин** | | | Стор. 2 |
| Рецептурно-виробничий відділ аптеки № 80 | Дата впровадження: | Серія | 1 екземпляр з___ |

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
ПП «Гармонія-2000»
Завідувачка аптеки № 5,
м. Чернівці
_____ О. М. Голубнича
«05» грудня 2024 р.

Діє від «___» _____ 2024 р.
Дата перегляду «___» _____ 2028 р.

## ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЕКСТЕМПОРАЛЬНОГО ЗАСОБУ «ГЕЛЬ МАНГОЛЕСПЕДИН»

| Розроблено / змінено | Узгоджено |
|---|---|
| Аспірантка кафедри аптечної технології ліків | Завідувач кафедри аптечної технології ліків, професор |
| Яромій М. В. | Вишневська Л. І. |
| Підпис: | Підпис: |
| Дата: | Дата: |
| | |
| Професорка кафедри аптечної технології ліків | |
| Половко Н. П. | |
| Підпис: | |
| Дата: | |
| | |

*Додаток Г*

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
ПП «Гармонія-2000»
Завідувачка аптеки № 5, м. Чернівці
_____ О. М. Голубнича
«19» грудня 2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Г. Сковороди, 53; асп. Яромій М. В., д. фарм. н., проф. Н. П. Половко.

**3. Джерело інформації:**

**3.1.** Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. Фармацевтичний часопис. 2022. № 3. С. 23-32.

**3.2.** Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар.участю (22–23 верес. 2022 р.). Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 77.

**3.3.**Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обґрунтування складу гелю з мангіферином і ліспедеца біколірна. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2023. С. 499.

**3.4.** Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: збірник публікацій I Міжнародної науково-практичної online конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії (м. Харків, 07 березня 2024 р.). Х. : НФаУ, 2024. С. 332-338.

**4. Ефективність впровадження:** Запропонована технологія м'якої лікарської форми дозволить розширити асортимент лікарських засобів, а також забезпечить можливість якісного виготовлення і контролю якості лікарського засобу в умовах аптек.

*Продовження дод. Г*

**«ЗАТВЕРДЖЕНО»**
Завідувачка аптеки № 80
_____Н. І. Штучна
«01» серпня 2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Г. Сковороди, 53; асп. Яромій М. В., д. фарм. н., проф. Н. П. Половко.

**3. Джерело інформації:**

**3.1.** Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. Фармацевтичний часопис. 2022. № 3. С. 23-32.

**3.2.** Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар.участю (22–23 верес. 2022 р.). Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 77.

**3.3.**Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обґрунтування складу гелю з мангіферином і лісподеца біколірна. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2023. С. 499.

**3.4.** Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: збірник публікацій І Міжнародної науково-практичної online конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії (м. Харків, 07 березня 2024 р.). Х. : НФаУ, 2024. С. 332-338.

**4. Ефективність впровадження:** Запропонована технологія м'якої лікарської форми дозволить розширити асортимент лікарських засобів, а також забезпечить можливість якісного виготовлення і контролю якості лікарського засобу в умовах аптек.

*Продовження дод. Г*

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ТОВ «Леда»
_____ І. М. Чанчалгашвілі
«5» листопада 2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Виготовлення водного екстракту і гелю для лікування дерматологічних захворювань.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 53; асп. М.В. Яромій, д. фарм. н., проф. Н.П.Половко.
3. **Джерело інформації:**


1. Обгрунтування умов отримання вилучень наземної частини лепеделі двоколірної. К. Є. Кисельова, Н. Ю. Бевз, О. О. Михайленко, М. В. Яромій, Л. І. Вишневська. Вісник фармації 2024. № 1 (105). С. 58-65.
2. Яромій М.В., Половко Н. П.Аналіз досвіду та перспектива використання мангіферину у медицині та фармації *Аннали Мечниковського інституту.* 2023. № 1. С. 52–58. DOI:10.5281/zenodo.7721743
3. Обгрунтування умов отримання вилучень наземної частини лепеделі двоколірної. К. Є. Кисельова, Н. Ю. Бевз, О. О. Михайленко, М. І. Яромій, Л. І. Вишневська. Вісник фармації 2024. №1 (105). с. 58-65.
4. Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обгрунтування складу гелю з мангіферином і лепеделеца біколірна. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2023. С. 499
5. Яромій М.І., Ковальов В.В., Половко Н.П. Обгрунтування вибору гідрофільного неводного розчинника до складу гелю з мангеферином. Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2024. С. 348-351


4. **Ефективність впровадження:** Запропонований склад і технологія водного екстракту і м'якого лікарського засобу дозволить розширити асортимент АФІ та лікарських засобів, призначених для профілактики і лікування захворювань шкіри, а також забезпечить можливість якісного приготування і контролю якості лікарського засобу в умовах аптек.

Завідувачка аптеки
№ 6 ТОВ «Леда» Анна Несвітайло

*Додаток Д*

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**
Проректор
з наукової роботи та інновацій
Національного медичного
Університету імені О.О. Богомольця
д.мед.н., проф. Земсков С.В.
«16» 12 2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Г. Сковороди, 53; Виконавець: асп. Яромій М. В., д. фарм. н., проф. Н. П. Половко.

**3. Джерела інформації:**

**3.1.** Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. Фармацевтичний часопис .2022. № 3. С. 23-32.

**3.2.** Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар.участю (22–23 верес. 2022 р.). Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 77.

**3.3.**Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обґрунтування складу гелю з мангіферином і лісподеца біколірна. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2023. С. 499.

**3.4.** Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: збірник публікацій І Міжнародної науково-практичної online конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії (м. Харків, 07 березня 2024 р.). Х.: НФаУ, 2024. С. 332-338.

**4. Впроваджено:** в освітній процес кафедри аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету імені О.О. Богомольця при вивченні теми «Екстракційні препарати» та «М'які лікарські форми»(лекційний курс, практичні заняття), згідно протоколу №12 засідання кафедри від 5.12.2024р.

**5. Ефективність впровадження:** Запропонована технологія м'якої лікарської форми дозволить розширити асортимент лікарських засобів.

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуються здобувачами вищої освіти на кафедрі аптечної та промислової технології ліків.

**Відповідальний за впровадження:**
Завідувачка кафедри аптечної
та промислової технології ліків
професор, доктор фармацевтичних наук Жанна Полова

*Продовження дод. Д*

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
доц. Ірина СОЛОШИНКО
_____
«___»_____ 2024р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Г. Сковороди, 53; асп. Яромій М. В., д. фарм. н., проф. Н. П. Половко.

**3. Джерело інформації:**

**3.1.** Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. Фармацевтичний часопис. 2022. № 3. С. 23-32.

**3.2.** Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар.участю (22–23 верес. 2022 р.). Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 77.

**3.3.**Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обґрунтування складу гелю з мангіферином і ліспедеца біколірна. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2023. С. 499.

**3.4.** Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: збірник публікацій І Міжнародної науково-практичної online конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії (м. Харків, 07 березня 2024 р.). Х. : НФаУ, 2024. С. 332-338.

**4. Впроваджено:** В освітній процес кафедри технології ліків і біофармації у лекційний курс дисципліни «Технологія лікарських засобів» при вивченні тем «Екстракційні препарати» та «М'які лікарські засоби».

**5. Термін впровадження:** 2024/2025 н.р.

**6. Ефективність впровадження:** Запропонована технологія м'якої лікарської форми дозволить розширити асортимент вітчизняних лікарських засобів. Результати наукових досліджень впроваджено з метою вдосконалення та оптимізації навчального процесу, зокрема розширення інформації про розробку нових лікарських засобів.

Завідувач кафедри
технології ліків і біофармації
ЛНМУ імені Данила Галицького,
д. фарм. н., професор Світлана БІЛОУС

*Продовження дод. Д*

«ЗАТВЕРДЖЕНО»
Проректор закладу вищої освіти з
наукової роботи Тернопільського
національного медичного
університету імені
І.Я. Горбачевського МОЗ України
Іван КЛІЩ
«__» _____ 2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Г. Сковороди, 53; асп. Яромій М. В., д. фарм. н., проф. Н. П. Половко.

**3. Джерело інформації:**

**3.1.** Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. Фармацевтичний часопис. 2022. № 3. С. 23-32.

**3.2.** Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар. участю (22–23 верес. 2022 р.). Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 77.

**3.3.** Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обгрунтування складу гелю з мангіферином і лісподеца біколірна. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2023. С. 499.

**3.4.** Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: збірник публікацій І Міжнародної науково-практичної online конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії (м. Харків, 07 березня 2024 р.). Х. : НФаУ, 2024. С. 332-338.

**4. Впроваджено:** в освітній процес кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків у лекційний курс при вивченні теми «Екстракційні препарати» та «М'які лікарські форми».

**5. Ефективність впровадження:** Запропонована технологія м'якої лікарської форми дозволить розширити асортимент лікарських засобів.

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуються здобувачами вищої освіти на кафедрі управління та економіки фармації з технологією ліків.

Завідувачка кафедри
управління та економіки фармації
з технологією ліків — Наталія БЕЛЕЙ

*Продовження дод. Д*

УЗГОДЖЕНО
Проректор з науково-педагогічної роботи НФаУ
проф. Інна ВЛАДИМИРОВА
02 вересня 2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Г. Сковороди, 53; асп. Яромій М. В., д. фарм. н., проф. Н. П. Половко.

**3. Джерело інформації:**

**3.1.** Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. Фармацевтичний часопис. 2022. № 3. С. 23-32.

**3.2.** Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар. участю (22–23 верес. 2022 р.). Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 77.

**3.3.**Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обгрунтування складу гелю з мангіферином і лісподеца біколірна. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2023. С. 499.

**3.4.** Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: збірник публікацій І Міжнародної науково-практичної online конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії (м. Харків, 07 березня 2024 р.). Х. : НФаУ, 2024. С. 332-338.

**4. Впроваджено:** в освітній процес кафедри промислової технології ліків та косметичних засобів НФаУ у лекційний курс при вивченні теми «Екстракційні препарати» та «М'які лікарські форми».

**5. Ефективність впровадження:** Запропонована технологія м'якої лікарської форми дозволить розширити асортимент лікарських засобів.

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуються здобувачами вищої освіти на кафедрі промислової технології ліків та косметичних засобів.

Завідувачка кафедри
промислової технології ліків
та косметичних засобів НФаУ,
професор Олена РУБАН

*Продовження дод. Д*

УЗГОДЖЕНО
Проректор з науково-педагогічної
роботи НФаУ
проф. Інна ВЛАДИМИРОВА
01 квітня 2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу і технології м'якої лікарської форми з мангіферином.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Г. Сковороди, 53; асп. Яромій М. В., д. фарм. н., проф. Н. П. Половко.

**3. Джерело інформації:**

**3.1.** Яромій М. В., Половко Н. П., Бевз Н. Ю. Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення мангіферину в м'якій лікарській формі. Фармацевтичний часопис. 2022. № 3. С. 23-32.

**3.2.** Яромій М., Половко Н. Дослідження умов введення мангіферину до складу гелевої основи. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали IX наук.-практ. конф. з міжнар.участю (22–23 верес. 2022 р.). Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 77.

**3.3.**Яромій М.В., Половко Н.П., Бевз Н.Ю. Обгрунтування складу гелю з мангіферином і ліспедеца біколірна. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології». Харків. НФаУ. 2023. С. 499.

**3.4.** Яромій М., Осолодченко Т., Половко Н. Дослідження антибактеріальної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: збірник публікацій І Міжнародної науково-практичної online конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії (м. Харків, 07 березня 2024 р.). Х. : НФаУ, 2024. С. 332-338.

**4. Впроваджено:** в освітній процес кафедри аптечної технології ліків НФаУ у лекційний курс при вивченні теми «Екстракційні препарати» та «М'які лікарські форми».

**5. Ефективність впровадження:** Запропонована технологія м'якої лікарської форми дозволить розширити асортимент лікарських засобів.

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуються здобувачами вищої освіти на кафедрі аптечної технології ліків.

Завідувачка кафедри
аптечної технології ліків
професор Лілія ВИШНЕВСЬКА

*Додаток Е*

**Станом на 1 лютого 2023 року**

| № | Лікарський засіб | Форма випуску | Виробник | Покази до застосування |
|---|---|---|---|---|
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| D06B B Кислота гліциризинова | | | | |
| 1 | Епіген інтим | Спрей 0,1 % по 15 мл | Б.БРАУН МЕДІКАЛ С.А., Іспанія | Лікування папіломавірусної інфекції, вірусної інфекції, спричиненої вірусом простого герпесу I і II типів, вірусом Varicella Zoster (оперізувальний лишай), у складі комплексної терапії. Профілактика рецидивів вірусних інфекцій, спричинених вірусом простого герпесу I і II типів, вірусом Varicella Zoster, вірусом папіломи людини. Лікування неспецифічного кольпіту і вагініту (у складі комплексної терапії). |
| 2 | Епіген інтим | Спрей 0,1 % по 60 мл | Б.БРАУН МЕДІКАЛ С.А., Іспанія | |
| D06B B03 Ацикловір | | | | |
| 1 | Агерп | Крем 5 %, 2 г | Спільне українсько-іспанське підприємство "Сперко Україна", Україна | Інфекції губ та обличчя, спричинені вірусом простого герпесу (Herpes labialis). |
| 2 | Агерп | Крем 5 %, 10 г | | |
| 3 | Ацик | Крем 5 % | Салютас Фарма ГмбХ, Німеччина | Лікування інфекцій губ та обличчя, спричинених вірусом простого герпесу (Herpes labialis). |
| 4 | Ацикловір | Мазь 2,5%, 5 г | ТОВ "ДКП "Фармацевтична фабрика", Україна | |
| 5 | Ацикловір | Мазь 2,5 %, 10 г | ТОВ "ДКП "Фармацевтична фабрика", Україна | |
| 6 | Ацикловір Белупо | Крем 5 %, 2 г | Белупо, ліки та косметика, д.д., Хорватія | Лікування інфекцій губ та обличчя, спричинених вірусом простого герпесу (Herpes labialis). |
| 7 | Ацикловір Белупо | Крем 5 %, 5 г | | |
| 8 | Ацикловір Белупо | Крем 5 %, 10 г | | |
| 9 | Ациклостад | Крем 5 %, туба 2 г | СТАДА Арцнаймітель АГ, Німеччина | |

*Продовження дод.Е*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| 10 | Герпевір | Мазь, 25 мг/г, 5 г | ПАТ "Київмедпрепарат", Україна | Лікування інфекцій губ та обличчя, спричинених вірусом простого герпесу (Herpes labialis). |
| 11 | Герпевір | Мазь, 25 мг/г, 15 г | ПАТ "Київмедпрепарат", Україна | |
| 12 | Зовіракс | Крем 5%, туба 2 г | Глаксо Оперейшнс ЮК Лімітед, Велика Британія | |
| 13 | Ліпстер | Крем 5 %, | АТ "Фармак", Україна | |
| 14 | Ліпстер мінт | Крем 5 %, | | |
| **D06B B06 Пенцикловір** | | | | |
| 1 | Пен-герпевір | Крем 10 мг/г, 2г | ПАТ "Київмедпрепарат", Україна | Герпес губ (Herpes labialis). |
| 2 | Афлубін - Пенцикловір | Крем 1%, 2 г | Медженікс Бенелюкс НВ (виробництво за повним циклом), Бельгія | |
| 3 | Афлубін - Пенцикловір тонувальний | Крем 1%, 2 г | | |
| 4 | Лабіум Моно б/р | Крем 1 %, 5 г | ТОВ "ДКП "Фармацевтична фабрика", Україна | |
| 5 | Пенцикловір-Здоров’я | Крем 10 мг/г, 5 г | Товариство з обмеженою відповідальністю "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна | |
| 6 | Пенцикловір-Фітофарм | Крем 1%, 5 г | ПРАТ "ФІТОФАРМ", Україна | |
| **D06B B10 Іміквімод** | | | | |
| 1 | Алдара Віатріс Хелскеа Лімітед, Ірландія<br><br>МЕДА АБ, Швеція | Крем 5 %, 250 мг в саше | С.П.М. КонтрактФарма ГмбХ (виробництво, випробування контролю якості (фіз-хім)); Лабор ЛС СЕ і Ко. КГ (випробування контролю якості (мікробіологічні)); Свісс Кепс ГмбХ (первинне, вторинне пакування, ввезення та випуск серій), Німеччина | Лікування: зовнішніх генітальних і періанальних бородавок (гострокінцевих кондилом); невеликих поверхневих базаліом; клінічно типового, негіперкератичного, негіпертрофічного актинічного кератозу на шкірі обличчя або голови у пацієнтів з нормально функціонуючою імунною системою. |

*Продовження дод.Е*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| 2 | Зіклара<br><br>Віатріс Хелскеа Лімітед, Ірландія | Крем 3,75 %, 250 мг саше | С.П.М. КонтрактФарма ГмбХ (виробництво, випробування контролю якості (фіз-хім)); Лабор ЛС СЕ і Ко. КГ (випробування контролю якості (мікробіологічні)); Свісс Кепс ГмбХ (первинне, вторинне пакування, ввезення та випуск серій), Німеччина | Лікування: зовнішніх генітальних і періанальних бородавок (гострокінцевих кондилом); невеликих поверхневих базаліом; клінічно типового, негіперкератичного, негіпертрофічного актинічного кератозу на шкірі обличчя або голови у пацієнтів з нормально функціонуючою імунною системою. |
| 3 | Кераворт | 1 саше (250 мг крему) містить іміквімод у 12,5 мг | Гленмарк Фармасьютикалз Лтд., Індія | |
| **D06B B11 Доконазол** | | | | |
| 1 | Приора | Крем 100 мг/г, 2 г | Дендрон Брендс Лімітед, Велика Британія | Ранні стадії (продромальна або еритемна стадія) рецидивуючої герпетичної інфекції губ у дорослих та дітей віком від 12 років з нормальним імунітетом. |
| 2 | Приора | Крем 100 мг/г, 5 г | | |
| **D06B B167** Денотивір** | | | | |
| 1 | Вратизолін | Крем 30 мг/г , туба 3 г | Фармзавод Єльфа А.Т., Польща | Герпес на губах та обличчі, спричинений вірусом Herpes simplex |
| **D06B B53 Ацикловір в комбінації** | | | | |
| 1 | Зовіракс Дуо (ацикловір, гідрокортизон) | крем, по 2 г крему у тубі; | Глаксо Оперейшнс ЮК Лімітед, Велика Британія | Лікування ранніх ознак та симптомів рецидивуючого лабіального герпесу (герпесу губ) для зменшення прогресування епізодів герпетичних пухирців до стадії утворення виразок у імунокомпетентних дорослих та дітей віком від 12 років. |
| **D11AX Інші дерматологічні препарати** | | | | |
| | Фладекс | мазь, 20 мг/г по 10 г | Товариство з обмеженою відповідальністю "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна | Місцеве лікування усіх форм і стадій псоріазу, алергічного, атопічного, періорального та себорейного дерматитів, нейродерміту, фотодерматозів, токсидермій, а також лишаю пухирчастого (герпесу) різної локалізації (губної, щічної, носової, вушної, генітальної) та оперізувального лишаю. |

*Продовження дод.Е*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| | Фладекс | мазь, 20 мг/г по 15 г | | |
| **S01 Засоби, що застосовуються в офтальмології<br>S01A D Противірусні засоби** | | | | |
| | Ганцикловір | гель очний 1,5 мг/г по 5 г у тубі | Фарміла – Теа Фармацеутіці С.п.А., Італія | Лікування гострого поверхневого кератиту, спричиненого вірусом простого герпесу. |
| | Оксолін-Дарниця | мазь, 2,5 мг/г, по 10 г у тубі | ПрАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна | Профілактика грипу, лікування вірусного риніту |
| | Оксолінова мазь | мазь 0,25 % по 10 г у тубі | ТОВ "ДКП "Фармацевтична фабрика", Україна | Оксолінова мазь може виступати в якості засобу для лікування гострого герпетичного стоматиту, хоча за ефективністю вона поступається місцевим препаратам з ацикловіром Можна застосовувати в якості допоміжного засобу для топічної терапії екземи Капоші |
| **R05X Інші препарати, що застосовуються у разі кашлю та застудних захворювань** | | | | |
| | Оксолін | мазь 0,25 % по 10 г тубі; | АТ "Лубнифарм", Україна | Профілактика грипу; лікування вірусного риніту. До дії оксоліну чутливі віруси Herpes simplex, оперізувального герпесу, аденовіруси, віруси інфекційних бородавок та контагіозного молюска. |
| | Оксолін | мазь 2,5 мг/г, по 10 г в тубі | ПАТ "Хімфармзавод "Червона зірка", Україна | Профілактика грипу; лікування вірусного риніту. |
| | Оксолін | мазь 2,5 мг/г, по 15 г в тубі | | |
| | Оксолінова мазь | мазь, 2,5 мг/г по 10 г у тубі | ТОВ "Тернофарм", Україна | Індивідуальна профілактика грипу в період епідемії; лікування вірусних ринітів. |
| | Оксолін Лаванда | мазь 2,5 мг/г по 3 г в тубі алюмінієвій; | "Сперко Україна", Україна | Профілактика грипу; лікування вірусного риніту. |