

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Ada Stelmakienė

**PUSKIEČIŲ FORMULUOČIŲ
SU NATŪRALIOS KILMĖS
MEDŽIAGOMIS MODELIAVIMAS,
REOLOGINIS IR BIOFARMACINIS
VERTINIMAS**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
farmacija (08B)

Kaunas, 2017

Disertacija rengta 2010–2016 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Klinikinės farmacijos katedroje

Mokslinė vadovė

prof. dr. Kristina Ramanauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

prof. habil. dr. Valdimaras Janulis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Nariai:

prof. dr. Daiva Majienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

prof. dr. Sonata Trumbeckaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

prof. dr. Pranas Viškelis (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

prof. habil. dr. Mirosława Krauze – Baranowska (Gdanskio medicinos universitetas (Lenkija), biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Disertacija ginama viešame Farmacijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 metų birželio 21 dieną 10 valandą, LSMU Santakos slėnio naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centro 202 auditorijoje.

Adresas: Sukilėlių pr. 13, Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Ada Stelmakienė

**MODELING, RHEOLOGICAL AND
BIOPHARMACEUTICAL EVALUATION
OF SEMISOLID FORMULATIONS
WITH NATURAL SUBSTANCES**

Doctoral Dissertation
Biomedical Sciences,
Pharmacy (08B)

Kaunas, 2017

Dissertation has been prepared at the Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2010–2016.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Kristina Ramanauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Dissertation is defended at the Pharmacy Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Prof. Habil. Dr. Valdimaras Janulis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Members:

Prof. Dr. Daiva Majienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Prof. Dr. Sonata Trumbeckaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Prof. Dr. Pranas Viškelis (Kaunas University of Technology, Physical Sciences, Chemistry – 03P)

Prof. Habil. Dr. Mirosława Krauze-Baranowska (Medical University of Gdansk (Poland), Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Dissertation will be defended at the open session of the Pharmacy Research Council of Lithuanian University of Health Sciences on 21 of June, 2017 at 10 a.m in 202 auditorium of “Santaka” valley Center for the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies.

Address: Sukilėlių pr. 13, Kaunas, Lithuania

TURINYS

SANTRUMPOS	7
IVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Pusiau kietos formuluotės su natūralios kilmės medžiagomis.....	13
1.1.1. Natūralios kilmės pusiau kietų preparatų sudėtinės dalys	13
1.1.2. Pusiau kietų preparatų kokybės vertinimo metodai	15
1.1.3. Natūralios kilmės pusiau kietų preparatų privalumai ir trūkumai	16
1.2. Medaus sudėtis, fizikinės, cheminės ir reologinės savybės ir naudojimas.....	17
1.3. Modelinės veikliosios medžiagos ir jų biofarmaciniai tyrimai.....	21
1.3.1. Gudobelių žiedų su lapais ekstrakto sudėtis ir biologinis aktyvumas.....	22
1.3.2. Vaistinių melisų lapų ekstrakto sudėtis ir biologinis aktyvumas.....	27
1.4. Reologija: pagrindiniai parametrai, medžiagų tekėjimo tipai, metodo taikymas.....	29
2. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI	32
2.1. Tyrimų objektas	32
2.2. Reagentai ir medžiagos.....	32
2.3. Tyrimų metodai ir metodika	32
2.3.1. Eksperimentinės pusiau kietos formos	32
2.3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktuose	34
2.3.3. Gudobelių žiedų su lapais ekstraktų analizė ESC metodu bei metodikos pritaikymas ir validacija.....	34
2.3.4. Vaistinių melisų (<i>Melissa officinalis</i> L.) lapų ekstrakto analizė ESC metodu bei metodikos pritaikymas ir validacija	37
2.3.5. Pusiau kietų formuluočių biofarmaciniai tyrimai.....	39
2.3.6. Eksperimentinių pusiau kietų formų reologinių savybių tyrimas.....	40
2.3.7. Eksperimentinių pusiau kietų formų stabilumo tyrimas.....	41
2.3.8. Antiradikalinio ir antimikrobinio aktyvumo nustatymas <i>in vitro</i>	41
2.3.9. Medaus savybių ir kokybės vertinimas	42
2.3.10. Statistinė analizė	42
3. REZULTATAI	43
3.1. Pusiau kietų formuluočių pagrindų modeliavimas ir stabilumo vertinimas	43
3.1.1. Hidrofobinio (I grupė) tepalo pagrindo modeliavimas ir stabilumo vertinimas	43
3.1.2. Hidrofobinio (II grupė) tepalo pagrindo modeliavimas ir stabilumo vertinimas	45
3.1.3. Kremo vanduo aliejuje (v-a) pagrindo modeliavimas ir stabilumo vertinimas	49

3.1.4. Hidrogelio pagrindo modeliavimas	51
3.2. Medaus, gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktų charakteristika.....	52
3.2.1. Medaus fizikinių, cheminių, reologinių savybių bei fenolinių rūgščių kokybės ir kiekybės vertinimas	52
3.2.2. Gudobelių žiedų su lapais ekstraktų kokybinė ir kiekybinė sudėtis, antiradikalinio ir antimikrobinio aktyvumo tyrimai <i>in vitro</i> bei skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimai <i>ex vivo</i>	55
3.2.3. Vaistinių melisų (<i>Melissa officinalis L.</i>) lapų sausojo ekstrakto kokybinė ir kiekybinė sudėtis, antiradikalinio ir antimikrobinio aktyvumo tyrimai <i>in vitro</i> ir skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimas <i>ex vivo</i>	59
3.3. Pusiau kietų preparatų su modelinėmis veikliosiomis medžiagomis modeliavimas ir kokybės vertinimas.....	62
3.3.1. Sausuojo gudobelių žiedų su lapais ekstrakto (C serija) įtakos stabilų pagrindų reologinėms savybėms tyrimas	63
3.3.2. Sausojo gudobelių žiedų su lapais ekstrakto fenolinių junginių atpalaidavimo iš pusiau kietų preparatų tyrimas <i>in vitro</i>	64
3.3.3. Hidrofobinių tepalų su sviestmedžio aliejumi ir sausuoju gudobelių žiedų su lapais ekstraktu (T serija) modeliavimas ir stabilumo tyrimai	67
3.3.4. Formuluočių su sausuoju vaistinių melisų lapų ekstraktu (R serija) stabilumo vertinimas.....	71
3.3.5. Alginato hidrogelių su modelinėmis veikliosiomis medžiagomis reologinių savybių ir fenolinių junginių	74
atpalaidavimo tyrimas <i>in vitro</i>	74
3.4. Tepalų, kremų ir hidrogelių su gudobelių žiedų su lapais ir su vaistinių melisų lapų ekstraktais antimikrobinis tyrimas <i>in vitro</i>	78
3.5. Fenolinių junginių iš pusiau kietų formuluočių skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimai <i>ex vivo</i>	80
IŠVADOS.....	82
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS	84
DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ	102
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	102
SUMMARY	145
PRIEDAI	159
Sumodeliuotų formuluočių sudėtys.....	159
CURRICULUM VITAE	162
PADĖKA	163

SANTRUMPOS

CHR	– chlorageno rūgštys
DPPH	– 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas
ESC	– efektyvioji skysčių chromatografija
HP	– hiperozidas
IC50	– pusė maksimalios inhibuojančios koncentracijos
IKV	– izokvercitrinas
LOD	– medžiagos aptikimo riba
LogP	– pasiskirstymo koeficiento tarp oktanolio-vandens logaritminė reikšmė
LOQ	– medžiagos kiekybinio įvertinimo riba
PAM	– paviršiaus aktyvios medžiagos
RR	– rozmarino rūgštis
SE	– standartinė paklaida (angl. standard error)
VAŽ	– vaistinė augalinė žaliava
VOR	– viteksin-2"-O-ramnozidas

IVADAS

Pusiau kietos vaisto formos yra svarbios siekiant tikslinio veikliosios medžiagos patekimo į pažaidos vietą. Pusiau kieti preparatai dažniausiai yra skirti paviršiniam ar vietiniam poveikiui sukelti vengiant sisteminio poveikio ir su juo susijusių galimų nepageidaujamų reakcijų. Pusiau kieti preparatai yra skirti odos funkcijoms palaikyti, odos įvairių būklių profilaktikai ar korekcijai.

Daugelio žmonių problema – išsausėjusi oda [67]. Odos sausumą lemiančios priežastys yra riebalinio sluoksnio, saugančio nuo vandens išgaravimo, netektis. Ji atsiranda dėl kelių priežasčių. 1) Riebalinio sluoksnio sumažėjimo, būdingo vyresnio amžiaus žmonėms. Nustatyta, kad vieno iš dviejų senyvo amžiaus žmonių oda yra išsausėjusi [153]. Sausa oda dažnai būdinga kūdikiams ir vaikams, kurie turi mažiau riebalinio sluoksnio. Klinikiniu tyrimu su 8–9 metų vaikais nustatyta, kad 75 proc. vaikų oda daugiau ar mažiau sausa [55]. 2) Riebalinio sluoksnio pašalinimo. Tam daugiausiai įtakos turi intensyvus paviršiaus aktyvių medžiagų (PAM) vartojimas [12]. 3) Dėl aplinkos veiksnių, lemiančių odos sausėjimą. Dažniausiai taip yra dėl oro kondicionierių ar šildytuvų naudojimo, tam tikrų vaistų vartojimo (pvz., gabapentino, citalopramo), tam tikrų ligų ar medicininių būklių (pvz., cukrinis diabetas, atopinis dermatitas) [174].

Žmonės į odos sausumą dažnai nekreipia dėmesio ir jam šalinti nesiima jokių priemonių. Žinoma, kad odos sausumas lemia ankstyvą odos senėjimą. Odos sausėjimas susilpnina odos apsaugines funkcijas ir oda netenka elastingumo [47]. Dėl to gali atsirasti įtrūkimų ir žaizdelių. Siekiant sulėtinti odos senėjimo procesą ir išlaikyti tinkamą odos funkciją, būtina kasdienė odos priežiūra tiksliai parinktais kokybiškais produktais, kurie atstatytų riebalinį odos sluoksnį, užtikrintų tinkamą drėgmės kiekį odoje ir slopintų laisvųjų radikalų sukeliamą neigiamą efektą.

Riebalinio sluoksnio, neleidžiančio pasišalinti vandeniui, atstatymas ir vandens kiekio užtikrinimas odoje yra pagrindiniai odos sausumo gydymo / valdymo metodai. Riebaliniam sluoksniui atstatyti naudojami emolientai, pusiau kietos formuluotės su riebaline faze [71]. Norint užtikrinti tinkamą vandens koncentraciją odoje, dažniausiai užtenka vartoti pakankamą kiekį skysčių, galima vartoti odą drėkinančias priemones, kurias sudaro medžiagos, kaupiančios didelį vandens kiekį (pvz., hialurono rūgštį ar hidrogelius) [106].

Žinoma, kad medus geba palaikyti odos drėgmę, neleisti išgaruoti vandeniui ir pasižymi baktericidinėmis savybėmis. Dėl to jis tinka ne tik odos sausumui reguliuoti, bet ir smulkioms žaizdelėms gydyti [26]. Naudinga

medų įterpti į pusiau kietas formuluotes ir taip praturtinti odos preparato teigiamų savybių spektrą.

Farmacijos kompanijos investuoja dideles lėšas į augalinių žaliavų tyrimus siekdamos įrodyti arba surasti naujų biologinių poveikių tradicinio augalinio vartojimo žaliavoms [214]. Susidomėjimas tradicinio augalinio vartojimo žaliavomis neblėsta, nes dažniausiai jau yra žinomas jų saugumas, o įvairių junginių mišiniai turi platesnį spektrą teigiamų savybių nei išgrynintos ar cheminės medžiagos. Kita vertus, kyla nemažai problemų dėl preparatų reguliavimo ir kokybinių kriterijų, susijusių su tikslia junginių kompozicija [36, 150]. Naudinga yra žinomų augalinių preparatų žaliavas (gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktus) bandyti pritaikyti pusiau kietose vaistų formose, kurios potencialiai galėtų būti vartojamos odos ligų gydymui ir profilaktikai.

Viena iš galimų odos sausėjimo prevencijos priemonių – kasdienis kūno priežiūros priemonių vartojimas. Rinkoje yra daug ir įvairių kūno priežiūros priemonių, todėl vartotojas gali rinktis. Vis dėlto nekomercinės informacijos apie tam tikrus produktus nepakanka. Būtina atlikti išsamius modeliujamų preparatų tyrimus, kurie leistų užtikrinti priimtinas vartotojui produkto savybes. Vienas iš būdų produktus klasifikuoti – pagal gamybai naudojamų medžiagų prigimtį: sintetinė ar natūrali. Kūno priežiūros priemonės sertifikuojančios komercinės organizacijos (NATRUE, BDIH ir kt.) skirtingai vertina, ką reiškia natūralus produktas [50], todėl renkantis sertifikuotą produktą, būtina išsiaiškinti sertifikuojančios įmonės taikytus kriterijus. Žinoma, kad natūralios kilmės sudėtinės dalys (pvz., riebiosios rūgštys, cholesterolis) chemine struktūra yra artimesnės odos sudėtyje esančių komponentų cheminei struktūrai nei sintetiniai komponentai (pvz., dimetikonas) [41]. Naudinga modeliuoti, vertinti ir naudoti natūralios kilmės kūno priežiūros priemones, kurios nekenkia aplinkai ir odai, kurių sudėtyje nėra daugybės sudėtinių sintetinių dalių, gerinančių preparatų tekstūrą, bet neturinčių jokios naudos odai. Tiriamajame darbe pusiau kietų formuluočių modeliavimui buvo pasirinkti natūralios kilmės komponentai: vanduo, augaliniai ekstraktai, augaliniai aliejai, bičių produktai, gyvūninės kilmės medžiagos bei iš dumblių gaunamas polimeras (natrio alginatas).

Darbe buvo svarbu įvertinti modeliujamų preparatų reologines ir biofarmacines savybes siekiant jų tikslingo pritaikymo ir efektyvaus poveikio užtikrinant kuo mažesnę šalutinio poveikio tikimybę. Modeliuojant pusiau kietas formuluotes, svarbu įvertinti struktūros vidinių ryšių stiprumą, kurie lemia formuluočių tepumą ir stabilumą laikymo metu. Struktūros vidinių ryšių stiprumo vertinimui naudingas reologijos mokslas, kurio esmė yra nustatyti tiriamosios medžiagos gebėjimą priešintis deformuojančiam jėgai. Reologijos metodas jautrus, nes geba įvertinti vidinių formuluočių

ryšių silpnėjimą nesant matomų nestabilumo požymių. Reologija plačiausiai taikoma maisto pramonės, dažų, asfalto, metalo lydinių pramonėje. Tikslingas reologijos mokslo pritaikymas farmacijos pramonėje suteikia galimybę panaudoti jautrius metodus preparatų kokybei vertinti. Biofarmaciniais tyrimais vertinamas veikliųjų medžiagų atpalaidavimas bei skvarba į biologines matricas. Biofarmacinių tyrimų rezultatai leidžia prognozuoti preparatų biologinį pasisavinimą vartojimo metu, kuris būtinas siekiant sukelti biologinį preparato poveikį.

Darbo tikslas: Sumodeliuoti stabilias, tyrimais pagrįstas formuluotes su natūralios kilmės sudedamosiomis dalimis ir įvertinti jų reologines bei biofarmacines savybes.

Darbo uždaviniai:

1. Sumodeliuoti pusiau kietus pagrindus naudojant natūralios kilmės medžiagas ir įvertinti jų reologines savybes ir stabilumą.
2. Įvertinti medaus pritaikymo galimybes pusiau kietoms formuluočiams modeliuoti.
3. Įvertinti gudobelių žiedų su lapais (chlorogeno rūgštis, vitekisin-2"-O-ramnozido, hiperozido, izokvercitrino) ir vaistinių melisų lapų (rozmarino rūgštis) ekstraktų vyraujančių komponentų skvarbos į žmogaus odą galimybes, antiradikalinį ir antimikrobinį aktyvumą tyrimais *in vitro*.
4. Įvertinti tiriamų augalinių ekstraktų įtaką pusiau kietų formuluočių reologinėms savybėms.
5. Įvertinti modelinių augalinių ekstraktų fenolinių komponentų atpalaidavimo ir skvarbos į odą iš pusiau kietų formuluočių kinetiką biofarmaciniais tyrimais *in vitro*.

Mokslinio darbo naujumas. Sumodeliuotos stabilios pusiau kietos formuluotės derinant bičių vašką, medų, kakavos aliejų, cholesterolį, alyvuogių aliejų, vandenį, vazeliną ir kietąjį parafiną. Parinkta ir pritaikyta reologijos metodika pusiau kietų formuluočių stabilumo vertinimo tyrimams. Reologiniais tyrimais pagrįsta bičių vaško, medaus, išgrynintojo vandens, sausųjų ekstraktų įtaka visos formuluotės struktūrai ir reologinėms savybėms. Atlikus medaus laisvųjų fenolinių rūgščių kokybės ir kiekybės ESC metodu tyrimus, medaus fizikinių, cheminių ir reologinių savybių tyrimus nustatyta, kad medus pagrįstai gali būti naudojamas pusiau kietoms formuluočiams modeliuoti. Biofarmaciniais tyrimais pagrįsta bičių vaško ir sviestmedžio aliejaus įtaka gudobelių fenoliniams junginiams atpalaiduoti. Pirmą kartą įvertinta chlorogeno rūgštis, vitekisin-2"-O-ramnozido, hipe-

rozido, izokvercitrino ir rozmarino rūgšties skvarba į nepažeistą žmogaus odą tyrimais *ex vivo*. Nustatyta, kad vienintelė rozmarino rūgštis skverbiasi į žmogaus odą. Išvystyta ir validuota ESC metodika, kuri pritaikyta gudobelių žiedų su lapais ekstrakto fenolinių junginių (chlorogeno rūgšties, viteksin-2"-O-ramnozido, hiperozido ir izokvercitrino) ir vaistinių melisų lapų fenolinio junginio (rozmarino rūgšties) nustatymui žmogaus odoje.

Praktinė ir teorinė reikšmė. Sumodeliuoti stabilūs du tepalai ir kremas derinant bičių vašką, medų, kakavos aliejų, cholesterolį, alyvuogių aliejų, vandenį, vazeliną ir kietąjį parafiną, kurie gali būti pateikiami į rinką ir naudojami kaip emolientai. Atlikti tyrimai įrodė, kad medus pusiau kietose formulotėse pagrįstai gali būti naudojamas kaip komponentas, darantis įtaką visos formulotės struktūrai. Reologiniais ir biofarmaciniais tyrimais įrodyta bičių vaško įtaka formulotės vidinės struktūros formavimui ir gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimui. Gauti rezultatai leido įvertinti ryšį tarp formuluočių reologinių savybių ir atpalaiduotų fenolinių junginių kiekio. Išvystyta ir validuota ESC metodika, kuri pritaikyta gudobelių žiedų su lapais ekstrakto fenolinių junginių (chlorogeno rūgšties, viteksin-2"-O-ramnozido, hiperozido ir izokvercitrino) ir vaistinių melisų lapų fenolinio junginio (rozmarino rūgšties) nustatymui žmogaus odoje. Nustatyta, kad chlorogeno rūgštis, viteksin-2"-O-ramnozidas, hiperozidas, ir izokvercitrinas, kaip santykinai hidrofiliškesnės medžiagos, į nepažeistą žmogaus odą nesiskverbia, o rozmarino rūgštis, kaip santykinai hidrofobiškesnis junginys, skverbėsi į žmogaus epidermį ir dermą. Puskiečių formuluočių kokybė buvo vertinama nustatant pH reikšmę, reologines savybes, ESC metodu nustatant tam tikrų fenolinių junginių kiekius, atpalaiduotus iš pusiau kietų formuluočių. Gauti rezultatai svarbūs pusiau kietų formuluočių kokybės ir biofarmacinių savybių vertinimui bei kuriant tikslinio pritaikymo vaisto formas ateityje.

Darbo rezultatų aprobavimas. Tyrimų rezultatai paskelbti 6 mokslinėse konferencijose: Functional Foods for Chronic Diseases: Science and Practice (2011 m. kovo 15–17 d., Las Vegas, JAV); „Žmogaus ir gamtos sauga 2011“ (2011 m. gegužės 11–13 d., Kaunas, Lietuva); 5th International Scientific conference „The Vital Nature Sign“ (2011 m. gegužės 19–21 d., Kaunas, Lietuva); „Žmogaus ir gamtos sauga 2012“ (2012 m. gegužės 16–17 d., Kaunas, Lietuva); Achievements and development perspectives of pharmaceutical chemistry and other sciences: the international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice dedicated to 125th Birth Anniversary of prof. Benediktas Šiaulis (2012 m. lapkričio 24 d., Kaunas, Lietuva); The 17th International Congress PHYTOPHARM 2013 (2013 m. liepos 8–10 d., Viena, Austrija);

Tyrimų tematika paskelbti 5 moksliniai straipsniai, iš kurių 3 išspausdinti leidiniuose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto duomenų bazę.

Darbo apimtis ir struktūra: disertaciją sudaro įvadas, literatūros apžvalga, tyrimo objektas ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas (215 šaltinių), disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas, modeliuotų formuluočių sudėtys, mokslinių publikacijų disertacijos tema kopijos, santrauka (anglų k.), gyvenimo, mokslinės ir kūrybinės veiklos aprašymas. Darbe pateikta 10 lentelių, 20 paveikslų. Disertacijos apimtis 163 puslapiai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pusiau kietos formuluo­­tės su natūralios kilmės medžiagomis

1.1.1. Natūralios kilmės pusiau kietų preparatų sudėtinės dalys

Modeliuojant hidrofobinius natūralios kilmės pusiau kietus preparatus pagrindiniai sudedamieji komponentai yra įvairūs lipidai, dažniausiai trigliceridai ar riebieji esteriai, steroliai, angliavandeniliai, gaunami iš augalinių ar gyvūninių šaltinių. Siekiant sumodeliuoti pusiau kietos konsistencijos preparatą turi būti parenkami skirtingos lydymosi temperatūros lipidai.

Sistemą tirštinančios medžiagos dažniausiai yra aukšta lydymosi temperatūra pasižymintys vaš­­kai: karnauba vaškas, pasižymintis aukščiausia lydymosi temperatūra (80–88 °C) tarp natūralių vaš­­kų [168], kandelila vaškas (lydymosi temperatūra 67–80 °C), ryžių sėlenų vaškas (lydymosi temperatūra 75–80 °C), bičių vaškas (61–66 °C) [50]. Bičių vaškas yra natūralus bičių sekrecijos produktas, jame nustatoma daugiau kaip 300 komponentų įvairių medžiagų. Pagrindinės sudedamosios dalys yra esteriai, angliavandeniliai, laisvosios riebiosios rūgštys [29]. Kremuose ir tepaluose naudojami 5–20 proc. bičių vaško kiekiai, kaip tirštinanti medžiaga. Bičių vaškas turi emulguojančių savybių [168]. Bičių vaškas yra priskiriamas medžiagoms, kurios sudaro plėvelę ant odos pavartojus vietiš­­kai. Ši plėvelė sudaro papildomą apsauginį barjerą nuo neigiamų aplinkos faktorių poveikio (šalčio, vėjo, dirginančių ar alergizuojančių medžiagų ir kita). Taip pat, ši plėvelė sudaro barjerą, pro kurį negali išgaruoti vanduo iš odos, taip mažindamas odos sausumą [30].

Kitas pusiau kietų preparatų konsistenciją palaikantis komponentas yra skystieji lipidai. Dažniausiai tai yra augaliniai aliejai, kurių pasirinkimas yra itin platus. Augalai, iš kurių augaliniai aliejai gali būti išgaunami, priklauso įvairioms augalų šeimoms [18]. Augalinių aliejų pagrindinės sudedamosios dalys yra įvairių polinesočiųjų riebalų rūgščių trigliceridai, kurių dėka augaliniai aliejai yra skystos konsistencijos. Alyvuogių aliejus yra emolientas, t. y. turi minkštinančių, apsauginių savybių, apsaugo nuo vandens netekimo, tinkamas sausos odos priežiūrai [95]. Tyrimai su pelėmis / žiurkėmis rodo, jog vietiš­­kai vartojamas alyvuogių aliejus geba apsaugoti nuo UVB sukeltos karcinogenezės ir odos vėžio formavimosi formavimosi [35,96].

Modeliuojant pusiau kietus preparatus reikia pagalbinių medžiagų, užtikrinančių preparato tepumą, minkštumą, kuris palengvina preparato išėmimą iš talpyklės. Modeliuojant preparatus iš natūralios kilmės medžiagų, šią funkciją atlieka augaliniai sviestai ar spermacetas (lydymosi temperatūra 43–47 °C) [168]. Šių medžiagų lydymosi temperatūra yra žemesnė nei vašku, tačiau kambario temperatūroje jie yra kietos konsistencijos. Cheminiu požiūriu augaliniai sviestai yra augaliniai aliejai, kuriuose yra didesnis kiekis sočiųjų riebalų rūgščių, todėl jiems būdinga kietą konsistenciją ir aukštesnę lydymosi temperatūrą [72,81].

Šiuo metu yra įmanoma įsigyti pusiau sintetinių augalinių sviestų, kurie yra gauti hidrinant augalinius aliejus, taigi bet kurį augalinį aliejų hidrinus gaunamas to augalo sviestas.

Kakavos aliejus (*Theobroma cacao* L.), sviestmedžio aliejus (*Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn.) ir kokoso aliejus (*Cocos nucifera* L.) yra visiškai natūralūs augaliniai sviestai, kurie kambario temperatūroje yra kietos konsistencijos.

Hidrofobiniuose preparatuose vartojami emulsikliai, kurie veikia kaip struktūrą stabilizuojančios medžiagos ir suriša preparate galimai atsiradusį vandens kiekį (pvz., paėmimo metu, nesilaikant preparato laikymo sąlygų ir pan.), taip neleisdami pakisti hidrofobinio preparato struktūrai. Natūralios kilmės emulsikliai yra kai kurios riebalų rūgštys, polimerai (akacijos sakai, agaras, alginato druskos, celiuliozė ir kt), lanolinas, jo alkoholiai, cholesterolis, cetilo ir cetostearilo alkoholiai, sojų ar kiaušinių lecitinai, fosfolipidai, vidutinės grandinės ilgio trigliceridai [168]. Daliai šių emulsiklių reikalingas ženklus vandens kiekis (pavyzdžiui polimerams), kuriame jie gali ištirpti ir formuoti emulsines struktūras. Siekiant, kad emulsiklis surišų nedidelius kiekius vandens, galimai atsirasiančius preparato laikymo ir vartojimo metu, medžiaga turi būti tirpi lipiduose ir pasižymėti higroskopinėmis savybėmis.

Dauguma riebiųjų komponentų hidrofobiniame preparate veikia kaip struktūrą formuojantys komponentai, tirpikliai. Parinkus skirtingos lydymosi temperatūros lipidus užtikrinamas preparato elastingumas, tepumas vartojimo metu. Dauguma riebiųjų komponentų gali būti vartojami ne tik kaip pagalbinės medžiagos, bet ir kaip teigiamą poveikį odai turintys preparatai – emoliantai. Emoliantai – tai preparatai skirti sausos odos gydymui. Preparatai turi odą minkštinančių, lipidais papildančių savybių. Ant odos paviršiaus plėvelę formuojantys komponentai saugo odą nuo vandens netekimo ir dar didesnio sausumo [107, 178].

Odos sausumas (kserozė) yra plačiai paplitusi būklė, ypač būdinga vyresnio amžiaus žmonėms [153], kūdikiams, nes jų oda plonesnė ir membranos laidesnė (vandens netekimas spartesnis) [69], dializuojamiems

pacientams, diabetu sergantiems pacientams, ŽIV pacientams, intensyviai naudojantiems muilus, PAM, antibakterines medžiagas alkoholio pagrindu. Laiku neatstčius lipidų barjero, odos sausumas komplikuojasi ir vystosi atopinis dermatitas, egzema.

Hidrofobiniai preparatai taip pat gali būti naudojami ir kaip odos apsauginės priemonės nuo žalingo aplinkos poveikio: vėjo, šalčio, UV spindulių sukulto dirginimo.

Hidrogeliai modeliuojami iš natūralios kilmės polimerų, gamtoje tai dažniausiai yra įvairūs polisacharidai. Labai platus pasirinkimas yra celiuliozės polimerų, kurie yra skirtingų polimerizacijos laipsnių, skirtingi pakaitai įvesti į celiuliozės struktūrą lemia skirtingas polimerų savybes [168]. Hidrogelius galima modeliuoti iš akacijos sakų, agaro, ksantano dervos, įvairių augalų krakmolo. Šiek tiek mažiau hidrogelių gamyboje naudojami polimerai yra įvairios algininės rūgšties druskos, chitozanas, kuris yra vienintelis natūralus katijoninis polimeras [70].

Natrio alginatas yra išgaunamas iš rudųjų dumblių. Natrio alginatas vandenyje išbrinksta ir suformuoja tirpalus pasižyminčius neniutoniškėmis savybėmis. Gretimos polimerų grandys gali būti sujungtos panaudojus daugiavalenčius jonus (kalcio ar bario). Sąveika vyksta per cukrinės dalies karboksilines grupes, taip suformuojamas gelis. Tradiciškai natrio alginatas ir jo geliai plačiausiai naudojami maisto pramonėje kaip stabilizatoriai. Alginatas naudojamas tekstilės ir popieriaus spausdinimo pramonėje, dėl didelio spalvų našumo ir spausinimo galimybių. Šis polimeras plačiai taikomas farmacijos pramonėje kaip pagalbinė medžiaga vaistų, protezų ir žaizdų perrišimo priemonėse. Pagrindiniai alginato privalumai yra biosuderinamumas ir imunogeniškumo nebuvimas, taip pat lengvas gelifikavimosi procesas, kuris nepažeidžia vaistinės medžiagos. Alginato geliai naudojami baltymų ir ląstelių vaistų formų gamyboje. Pagrindinis alginato trūkumas, kad organizme jis nėra natūraliu fermentiniu būdu skaidomas [19, 113].

1.1.2. Pusiau kietų preparatų kokybės vertinimo metodai

Europos farmakopėja (04/2010:0132) pateikia šiuos rekomenduojamus pusiau kietų preparatų kokybės vertinimo metodus:

- gaminant pusiau kietus preparatus vartojimui ant odos turi būti atliekami atitinkami matavimai, kurie užtikrintų apibrėžtas produkto reologines savybes. Esant reikalui gali būti atliekami šie neprivalomi testai: konsistencijos matavimas penetrometru (2.9.9), klampos (tariamąsios klampos) matavimas (2.2.10) ir testas, parodantis veikliosios medžiagos atpalaidavimą.

- Gaminant pusiau kietus preparatus skirtus vartoti ant odos, turinčius pagrinde netirpių veikliųjų medžiagų, turi būti atliekami matavimai, kurie užtikrintų tinkamą preparato homogeniškumą jį vartojant [215].

Europos farmakopėjoje numatyta, kad sterilumo testas yra vienintelis aprašytas privalomas testas, jei pusiau kieto preparato specifikacijoje numatyta, kad jis turi būti sterilus [215].

Chang su kolegomis publikuotame apžvalginiame straipsnyje [40] pateikiami produktų, skirtų vartoti ant odos, rekomenduojami tyrimai, kurie gali būti naudingi vertinant produktų kokybę (organoleptinių savybių tyrimas, vizualinis homogeniškumo vertinimas, kiekybinis veikliųjų medžiagų vertinimas, pH nustatymas, produkto konsistencijos įvertinimas, etc.). Dauguma šių testų nėra reglamentuoti kaip privalomi, tačiau rekomenduojami siekiant patikrinti ir patvirtinti modeliuojamo preparato kokybę [40, 195].

1.1.3. Natūralios kilmės pusiau kietų preparatų privalumai ir trūkumai

Pusiau kieti preparatai skirti vartoti ant odos, vietinei ar transderminei aktyvių junginių pernašai, minkštinančiam ar apsaugančiam veikimui.

Pusiau kieti preparatai skirti vartoti ant odos susideda iš paprasto ar sudėtinio pagrindo ir vienos ar daugiau veikliųjų medžiagų, kurios yra ištirpintos ar disperguotos pagrinde. Homogeninės išvaizdos pagrindas gali būti iš natūralių ar sintetinių medžiagų [215].

Verta plačiau panagrinėti, kokius privalumus ir trūkumus turi natūralios kilmės odos priežiūros priemonės.

Odos priežiūros priemonių, pagamintų iš natūralios kilmės medžiagų privalumai:

- priemonės draugiškos aplinkai;
- natūralios kilmės preparatų sudėtyse esančių komponentų struktūra panašesnė į odoje esančių medžiagų struktūrą (pvz. riebiosios rūgštys, cholesterolis);
- tikima, kad natūralūs preparatai sukelia mažiau pašalinių reiškinių.

Odos priežiūros priemonių, pagamintų iš natūralios kilmės medžiagų trūkumai:

- trumpesnis galiojimo laikas. Natūralūs konservantai (dažniausiai eteriniai aliejai) dažnai mikroorganizmus veikia silpniau ir mažesnę spektrą nei sintetiniai konservantai. Kai kurie mikroorganizmai gali misti, natūraliomis medžiagomis, įeinančiomis į produkto sudėtį.

- produktai brangesni. Natūralios kilmės medžiagų išgavimo resursai riboti, išgavimas gali reikalausti daugiau procedūrų, priklausyti nuo sezono, o tai lemia augančią galutinio produkto kainą.
- sudėtinių dalių nestabilumas, oksidacija, estetiniai ribotumai, nesusuderinamumai tarpusavyje ir su kitomis medžiagomis [50].
- sunkiau sumodeliuoti. Mažesnis spektras galimų medžiagų, atliekančių tą pačią funkciją preparate. Be to, iš natūralių šaltinių išgaautos medžiagos gali šiek tiek skirtis savo fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis dėl išgavimo procedūros, augimvietės, klimatinių sąlygų [41].

Kita vertus, nepriklausomai nuo medžiagų kilmės jas reikia vertinti kaip chemines medžiagas, potencialiai galinčias sukelti nepageidaujamus reiškinius. Pusiau kietų formuluočių modeliavime gali būti naudojamos įvairios natūralios medžiagos. Dauguma jų hidrofobinės, pasižyminčios skirtingomis lydymosi temperatūromis, todėl modeliuojant pusiau kietas formuluotes yra galimybė rintis iš plataus spektro medžiagų, siekiant išgauti kokybiškiausią ir vartotojui priimtinausią produktą. Galutinio produkto vertinimui privalomų testų yra nedaug, tačiau siekiant įvertinti preparato kokybę dažnai naudojami neprivalomi testai, kurių rezultatai leidžia prognozuoti modeliuojamo produkto savybes. Natūralios kilmės pusiau kietas kūno priežiūros priemonės yra daug sunkiau sumodeliuoti, tačiau jos draugiškos aplinkai, sudėtinės dalys artimesnės odos struktūriniais komponentams ir dažniausiai yra labiau pageidaujamos galutinio vartotojo, nepaisant aukštesnės kainos.

1.2. Medaus sudėtis, fizikinės, cheminės ir reologinės savybės ir naudojimas

Medaus teigiamosios savybės žinomos nuo senovės Egipto laikų. I a. Dioskoridas medų naudojo žaizdų gydymui [126]. Šiuo metu medaus vartojimas medicinoje patiria renesansą, atsiranda vis daugiau klinikinių studijų vertinančių medaus savybes įvairioms indikacijoms. Daugiausia tyrinėta Manuka medaus rūšis, kurios pagrindu yra sukurtos medicininės priemonės: MediHoney® medus ir Optimel™ akių lašai. MediHoney® medus gali būti naudojamas žaizdų gydymui arba gali būti naudojamas kaip komponentas įvairių kūno priežiūros priemonių sudėtyse. Kūno priežiūros priemonių pramonėje yra daug įvairių produktų (nuo šampūnų, losjonų iki lūpų pieštukų), kurių sudėtyse yra didesni ar mažesni kiekiai medaus. Dažnai medus į kūno priežiūros priemones dedamas rinkodariniais tikslais, tuomet jo kiekiai galutiniame produkte yra nedideli.

Medaus organoleptinės savybės išduoda, kad daugiausiai meduje nustatoma angliavandenių (gliukozės ir fruktozės po 33–40 proc.), iki 20 proc. vandens. Nedideliais kiekiais meduje nustatomi komponentai (įvairūs mineralai, vitaminai, amino rūgštys, baltymai, fermentai, žiedadulkės, polifenoliniai junginiai, organinės rūgštys, lakieji junginiai [13, 31]), taip pat labai svarbūs, nes dėl jų medus yra vertinamas kaip naudingas maisto produktas, naudingesnis organizmui sacharozės pakaitalas.

Meduje esančių mažųjų komponentų kokybinė ir kiekybinė sudėtis gali labai stipriai skirtis priklausomai nuo geografinės vietovės ir augalo rūšies iš kurio buvo surinktas nektaras. Tam tikrų junginių buvimas ir / ar jų kiekiai meduje naudojami kaip žymenys vertinant medaus kilmės vietą ir augalų rūšį iš kurios buvo surinktas nektaras [169]. Pavyzdžiui, abscizo rūgštis yra būdinga šilinių viržių medui, o hesperitas – citrusinių vaisių medui [13].

Siekiant medų vartoti ant odos, kaip veikliąją medžiagą, svarbios yra medui priskiriamos antibakterinės, antiradikalinės, antioksidacinės savybės [8, 9, 57], kurias daugiausiai lemia medaus rūgštingumas, vandenilio peroksido kiekis, polifenolių kiekis [57, 127]. Medus kaip produktas negali būti standartizuotas, nes medus gautas iš skirtingų augalų rūšių, augusių skirtingose klimatinėse sąlygose ir / ar geografinėse vietovėse skirsis, tačiau medui kaip produktui yra keliami tam tikri kokybės reikalavimai [156]. Reikalavimai (1.2.1 lentelė) yra įtvirtinti Europos Komisijos direktyva 2001/110/CE ir perkelti į Lietuvos nacionalinę teisę (ŽŪM įsakymas „Dėl medaus analizės metodų“ 2000 m. sausio 10 d. Nr. 5 ir ŽŪM įsakymas Nr. 3D-333 „Dėl medaus techninio reglamento patvirtinimo“).

Mikroskopavimo metodu galima įvertinti medaus kristališkumą, o medaus polinkis kristalizuotis vertinamas pagal gliukozės / fruktozės santykį, drėgmę bei žiedadulkių kiekį meduje. Gali būti vertinamos medaus reologinės, juslinės, tekstūrinės savybės, bei įvairus medaus sukeliamas biologinis poveikis [27].

Medaus kaip produkto vertinime reologinių savybių analizė nėra reglamentuota, tačiau dažnai yra vertinama siekiant nustatyti skirtumus tarp medaus rūšių. Reologinių savybių vertinimas gali būti naudojamas kaip vienas iš botaninės prigimties nustatymo būdų [200]. Įvairūs reologinių savybių pokyčiai (pvz. dėl kristalizacijos) daro didelę įtaką medaus paruošimo procesams, todėl reologinių savybių vertinimas svarbus įmonėms, gaminančioms medų [53, 61]. Verta paminėti, kad medaus sudėtyje yra amino rūgščių, baltymų, kuriems priskiriami biologiniai poveikiai (pvz. antibakterinis) [145], jie vertingi maistine prasme, todėl medaus kaitinimas paruošimo metu galimas tik iki 40 °C temperatūros. Jei medus paruošimo proceso metu buvo perkaitintas jame ženkliai padidėja hidroksimetilfurfurolo kiekis [53].

1.2.1 lentelė. Medaus kokybės vertinimo kriterijai

Kriterijus	Vertė
Redukuojančio cukraus kiekio nustatymas	ne mažiau kaip 60 g/100 g
Sacharozės kiekio nustatymas	ne daugiau kaip 5 g/100 g
Drėgnumo nustatymas	ne daugiau kaip 20 proc.
Vandenyje netirpių medžiagų kiekio nustatymas svorio metodu	ne daugiau kaip 0,1 g/100 g
Bendrojo rūgštingumo nustatymas	ne daugiau kaip 50 rūgšties miliekvivalentų 1 000 gramų
Diastazės aktyvumo nustatymas	ne mažiau kaip 8 vienetai
Hidroksimetilfurfurolo (HMF) nustatymas	ne daugiau kaip 40 mg/kg
Medaus botaninės sudėties nustatymas	

Kita vertus medaus reologinių savybių vertinimas, kaip pusiau kietų preparatų komponento, taip pat svarbus, nes jis daro įtaką viso preparato reologinėms savybėms. Skirtingų rūšių medus gali turėti skirtingas reologines savybes, todėl šių savybių vertinimas svarbus siekiant pasirinkti tinkamą medaus rūšį pagal pritaikymo sritį. Svarbu įvertinti medaus reologinių savybių pokyčius kintant temperatūrai, nes sumodeliuoti pusiau kieti preparatai taip pat gali patirti temperatūrinius pokyčius.

Pagrindiniai faktoriai, darantys įtaką medaus reologinėms savybėms, yra drėgmės kiekis, medaus sudėtis lemianti kristalizaciją ir temperatūra [61, 76, 179]. Dauguma mokslinės literatūros šaltinių nurodo, kad medus pasižymi niutoninių skysčių savybėmis [27, 53, 86, 111, 130, 146, 192], tačiau yra nustatytų ir pseudoplastinėmis bei dilatacinėmis savybėmis pasižyminčių medaus rūšių. [53, 179, 183, 202].

Australijoje surinktos medaus rūšys (*Eucalyptus intemedica* R. T. Baker, *Eucalyptus moluccana* Roxb., *Banksia ericifolia* L. f., *Eucalyptus crebra* F. Muell., *Eucalyptus tetradonta* F. Muell., *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake, *Eucalyptus ochrophloia* F. Muell, *Eucalyptus melliodor* A.Cunn. ex Schauer) pasižymėjo niutoninėmis savybėmis temperatūrų intervale nuo 1 °C iki 40 °C [130]. Liepų, saulėgrąžų medus taip pat pasižymėjo niutoninėmis savybėmis [53]. Tiksotropinėmis savybėmis pasižymi viršių (*Calluna vulgaris* (L.) Hull), grikių (*Fagopyrum esculentum* Moench), baltųjų dobilų (*Trifolium repens* L.), Naujosios Zelandijos Manuka (*Leptospermum scoparium* J. R. Forst. et G.Forst.) ir Indijos karvi (*Carvia callosa* (Nees)) medaus rūšys [27, 132]. Rumunijoje surinktos rapsų ir lipčiaus medaus rūšys pasižymėjo tiksotropinėmis savybėmis [53]. Di-

latacinės savybės nustatytos Nigerijos (*Opuntia engelmann Salm-Dyck ex Engelmann*) medui ir keletui eukaliptų medaus rūšių, pavyzdžiui *Eucalyptus ficifolia* (F. Muell.) K. D. Hill et L. A. S. Johnson [182]. Manoma, kad dėl neniutoninių medaus savybių yra atsakingi medaus sudėtyje esantys angliavandenių kristalai, baltymai ir kitos stambiamolekulinės medžiagos, pavyzdžiui dekstranas [53, 132].

Verta pažymėti, kad medus laikymo metu yra linkęs kristalizuotis. Kaip greitai konkretus medus kristalizuojasi priklauso nuo medaus sudėtyje esančio gliukozės / fruktozės santykio, stambiamolekulinių junginių kiekio ir netirpių dalelių (pvz. žiedadulkių) kiekio apie kurias kristalai gali formuotis [179].

Dauguma autorių, vertinančių medaus reologines savybes, medaus pavyzdžius prieš tyrimą pakaitina iki 55 °C ir tirpalą 48 valandas laiko 30 °C temperatūroje, kad pasišalintų oro burbulai. Kaitinimu siekiama ištirpdyti laikymo metu atsiradusius kristalus, tačiau medaus kristalizacijos priežastys nėra pašalinamos, todėl ilgainiui toks medus gali vėl kristalizuotis [63, 130, 146]. Kita vertus yra autorių, teigiančių, kad netgi 83 °C temperatūroje medaus sudėtyje yra nustatoma tam tikros struktūros kristalų [22]. Smanalieva ir Senge (2009) [179] medaus pavyzdžių prieš tyrimą nekaitino siekdami, kad medaus reologinės savybės atspindėtų medaus formą ir kristalų kiekį.

Medaus terapinė nauda gydant žaizdas, opas, nudegimus žinoma nuo antikinų laikų [126]. Pastaruoju metu medus patyrė renesansą, kaip priemonė žaizdų gydymui. Sugrįžęs susidomėjimas medumi ir šiuolaikinės galimybės paskatino mokslininkus nustatyti junginius ir jų veikimo mechanizmus, atsakingus už medaus biologinį poveikį žaizdų gydyme. Vienas pagrindinių medui priskiriamų biologinių poveikių yra bakteriocidinės savybės prieš daugelį žaizdose nustatomų patogenų, netgi atsparių antibiotikams. Nustatyta, kad medaus bakteriocidines savybes lemia vandenilio peroksidas, metilglioksalis, bičių defensinas-1 ir rūgštinis medaus pH [109]. Manoma, kad medaus bakteriostatinės savybės gali būti susijusios su meduje esančiu dideliu cukrų kiekiu, kuris lemia didelį tirpalo osmoliariškumą, todėl bakterijos nebegali augti [120]. Medus veikia kaip mechaninis barjeras, nes dėl medaus klampos papildomo užteršimo galimybė sumažėja, o palaikomas reikiamas drėgmės kiekis skatina žaizdos gijimą [109].

Ląstelių modeliais įrodyta, kad medus turi imunomoduliacinių savybių [118]. Meduje esantis stambiamolekulinis(iai) junginys(iai) aktyvina odoje esančius makrofagus, o šie skatina interleukino-6, navikų (angl. *tumor*) nekrozės faktoriaus- α , interleukino-1 β gamybą ir išsiskyrimą odoje. Kita vertus, pernelyg intensyvi šių citokinų gamyba ligonio būklę gali tik pabloginti, o vienas iš būdų sustabdyti uždegiminį ciklą yra iš uždegiminės aplinkos

pašalinti reaktyviasias deguonies rūšis. Meduje esantys antioksidantai geba tai padaryti, todėl medus yra subalansuota priemonė uždegiminio proceso valdymui žaizdose. Klinikiniais, histologiniais ikiklinikiniais tyrimais ir ląstelių modeliais įrodyta, kad medus pasižymi ląstelių regeneraciją skatinančiu poveikiu [126].

Mokslinėje literatūroje yra praktikų atsiliepimų, klinikinės studijos patvirtina, kad medus yra efektyvi priemonė skatinanti žaizdų gijimą [28, 65, 116], tačiau esama studijų, atliktų gydant lėtines kojų venų opas, kurios nepatvirtino medaus privalumų [85, 173]. Pastaruoju metu, atsiranda duomenų, gautų ląstelių modeliais ir tyrimais su gyvūnais, teigiančių, kad medus pasižymi antiproliferacinėmis savybėmis [80], tačiau klinikinių tyrimų, patvirtinančių šiuos duomenis, rasti nepavyko.

Nepaisant to, kad klinikinių studijų, įrodančių medaus privalumus gydant žaizdas ir nudegimus, yra nemažai, pažymėtina, kad dauguma tų studijų yra prastos kokybės, mažų imčių, todėl siekiant tvirto įrodymo, kad medus tinkamas žaizdų ir nudegimų gydymui, reikėtų didelės imties, gerai sumodeliuoto dvigubai aklo, randomizuoto klinikinio tyrimo [84].

Smulkios žaizdelės yra neatsiejamas išsausėjusios odos palydovas, dėl suprustėjusių sausos odos elastinių savybių ir barjerinės funkcijos. Sausos odos gijimo procesas lėtesnis, dėl nepakankamo drėgmės kiekio žaizdų aplinkoje. Kaip minėta anksčiau, odos sausumo gydymui ir profilaktikai naudojami emoliantai, o į emoliantų sudėtį įeinantis medus atlieka drėkinančią, bakteriocidinę ir žaizdelių gijimą skatinančią funkciją. Al-Waili su kolegomis atliko eilę klinikinių tyrimų, kurie įrodė medaus, bičių vaško ir alyvuogių aliejaus mišinio teigiamą poveikį atopinio dermatito, žvynelinės, kontaktinio (sauskelnių) dermatito, grybelinių infekcijų pažeistos odos (įvairiaspalvės dedervinės, kūno ir veido dermatofitozės), *Herpes simplex* viruso pažeistai odai [2–5]. Shirvani su kolegomis [176] atlikęs trigubai aklą randomizuotą tyrimą nustatė, kad medaus gelis yra efektyvus malšinant skausmą ir skatinant žaizdos gijimą po Cezario pjūvio.

1.3. Modelinės veikliosios medžiagos ir jų biofarmaciniai tyrimai

Gamtinės kilmės junginiai plačiai naudojami medicinos praktikoje. Daliai gamtinės kilmės junginių efektyvumas ir saugumas buvo patvirtinti ne tik vartojimo patirtimi, bet ir kokybiškai organizuotais klinikiniais tyrimais. Gamtinės kilmės preparatai yra gaminami ir vartojami įvairiomis vaistų formomis priklausomai nuo paskirties. Pusiaus kietų vaistų formų vaistiniai preparatai su gamtinės kilmės medžiagomis skirti vietiniam vartojimui – dažniausiai kraujagyslių stiprinimui, nuskausminimui, atsi-

kosėjimo lengvinimui. Pusiau kietose formuluotėse skirtose kūno priežiūrai gamtinės kilmės medžiagų vartojimas įvairiomis koncentracijos labai platus.

Lietuvoje gudobelių vaistiniai preparatai yra registruoti tik *per os* vartojamomis formomis (tabletėmis, geriamuoju tirpalu ar lašais) su indikacijomis į širdies ir kraujagyslių sistemą. Pastaruoju metu mokslininkų bendruomenėje kilusi iniciatyva įvertinti seniai žinomų vaistinių augalų kitus poveikius. Portugalijos mokslininkų grupė sumodeliavo pusiau kietas formuluotes su gudobelių ekstraktu ir įvertino jų antioksidacinį aktyvumą [23]. Kinijos gudobelių VAŽ ekstraktai pasižymėjo melanomą slopinančiu [134] bei odos senėjimą stabdančiu [73] poveikiu ląstelių modeliuose, todėl yra aktualu sumodeliuoti pusiau kietas formas su gudobelių ekstraktais.

1.3.1. Gudobelių žiedų su lapais ekstrakto sudėtis ir biologinis aktyvumas

Europos farmakopėjos monografijose, skirtose gudobelių žiedų su lapais augalinei žaliavai (01/2010:1432) ir gudobelių žiedų su lapais sausajam ekstraktui, teigiama, kad augalinė žaliava turi turėti mažiausiai 1,5 proc. flavonoidų, išreikštų hiperozido ekvivalentais. Sausajame ekstrakte, gautame iš vandeninės ar alkoholinės ištraukos, turi būti atitinkamai mažiausiai 2,5 proc. arba 6 proc. flavonoidų, išreikštų hiperozido ekvivalentais [215].

Įvertinus mokslinės literatūros duomenis, nustatyta, kad gudobelių žiedų su lapais ekstraktuose yra įvairių fenolinių junginių, bet didžiausiais kiekiais nustatomi pagrindiniai keturi fenoliniai junginiai: fenolinė rūgštis – chlorogeno rūgštis (CHR); flavono-C-glikozidas – viteksin-2"-O-ramnozidas (VOR) ir flavonolio-O-glikozidai – hiperozidas (HP) ir izokvercitrinas (IKV) [136].

Barros ir kt. [24] įvertino gudobelių žiedų (*Crateagus monogyna* Jacq.) maistinę vertę ir nustatė, kad gudobelių žieduose yra $77,42 \pm 1,30$ proc. angliavandenių, $11,75 \pm 1,37$ proc. baltymų, $3,57 \pm 0,15$ proc. riebalų ir $7,25 \pm 0,26$ proc. pelenų. Šimte gramų sauso gudobelių žiedų svorio nustatyta $159,84 \pm 25,06$ mg tokoferolių, $408,37 \pm 2,96$ mg askorbo rūgšties ir $52,62 \pm 0,02$ mg β -karoteno [24]. Gudobelių žieduose nustatoma cukrų, organinių ir fenolinių rūgščių, terpenų, saponinų, taninų, eterinių aliejų, kardiotoninių aminų, fenilpropanoidų: hidroksicinamono rūgščių, lignanų, flavonoidų [56, 108].

Įvairių gudobelių rūšių ekstraktų biologinis aktyvumas yra siejamas su širdį apsaugančiu ir įvairius širdies ir kraujagyslių sutrikimus gydančiu poveikiu [24,108], kurie priskiriami flavonoidams: hiperozidui, viteksinui ir jo dariniams bei oligomeriniams procianidinams [56]. Gudobelių ekstraktams būdingas antioksidacinis poveikis yra nulemtas chlorogeno rūgščių

kiekio [56]. Nepaisant to, klinikinėje praktikoje naudojamas gudobelių ekstraktas, neskirstant atskirų junginių. Tyrimais *in vitro*, *in vivo* ir klinikiniais tyrimais įrodyta, kad gudobelių ekstraktas pagerina širdies darbą, kraujotaką ir toleranciją darbui esant deguonies trūkumo būklei, turi antiaritminių poveikių bei sumažina pokrūvį [52, 58, 99, 190]. Dalli ir kt. [51] atliktas klinikinis tyrimas įrodė, kad gudobelių ekstraktas sumažina neutrofilų elastazės ir didelio tankio lipoproteinų cholesterolio kiekius diabetu sergantiems pacientams su širdies nepakankamumu, po 6 mėnesių gudobelių preparato vartojimo. Kitų autorių tyrimai teigiamų gudobelių ekstrakto poveikių neįrodė. Asher ir kt. [16] teigia, kad jei gudobelių ekstraktui ir būdingas antihipertenzinis efektas, jis išreikštas ne per NO sistemą; Zick ir kt. [208, 209] teigia, kad gudobelių ekstraktas nepagerina širdies nepakankamumu sergančiųjų prognozės bei neturi simptominių bei funkcinių teigiamų efektų jiems.

Kita vertus, pastaruoju metu mokslinėje literatūroje skelbiami duomenys apie kitus biologinius poveikius būdingus gudobelių ekstraktui. Daugiausiai tai *in vitro* tyrimai su ląstelių modeliais ir ikiklinikiniai tyrimai su gyvūnais. *C. monogyna* Jacq. ekstraktai buvo efektyvūs prieš *Candida albicans* grybelį ir *Herpes simplex* virusą [144], tačiau Tadic ir kt. [190] nenustatė gudobelių ekstrakto efekto prieš *C. albicans*. Nustatyta, kad sausieji gudobelių ekstraktai (*Crataegus monogyna* Jacq., *Crataegus oxyacantha* L., *Crataegus laevigata* (Poir.) DC.) turi uždegimą slopinančių, virškinimo traktą apsaugančių ir priešmikrobinių savybių [25, 104, 190]. Hwang su kolegomis atliktame tyrime nusatyta, kad gudobelių ir ženšenio ekstraktų mišinys pasižymėjo odos senėjimą stabdančiu efektyvumu tyrimuose su žmogaus odos fibroblastais ir žmogaus oda [73]. Mustapha su kolegomis nustatė, kad gudobelių ekstraktas pasižymi melanomą ir melanino gamybą slopinančiu efektu [134].

Daug autorių tyrimais *in vitro* nagrinėja skirtingų gudobelių augalo dalių ir rūšių antioksidacinį ir antiradikalinį aktyvumą [24, 97, 177]. Tyrimais nustatyta, kad *C. monogyna* Jacq. apsaugo nuo UVA ir UVB spindulių sukiamų laisvųjų radikalų pažeidų [54, 83]. Įvairių *C. monogyna* Jacq. vaistinių augalinių žaliavų ekstraktai pasižymėjo antiproliferaciniu aktyvumu, susijusiu su vėžio progresavimu ir vystymusi. Ekstraktai turėjo įtakos ląstelių dauginimuisi, apoptozei, ląstelių diferencijacijai ir kraujagyslinio tinklo vystymuisi, tačiau nepasižymėjo toksiškumu ne vėžinėms ląstelėms [167]. Kiti autoriai, taip pat nurodo priešvėžinį *Crataegus* spp. aktyvumą žmogaus gerklų vėžio (Hep-2), žmogaus skrandžio vėžio (MGC-803) ir žmogaus tulžies vėžio (EJ) ląstelių linijoms [189].

Chlorogeno rūgštis. Augaluose dažnai nustatomi chlorogeno rūgščių (CHR) grupės junginiai. Jie priklauso fenolinių junginių klasei, fenolinėms

rūgštims. Chlorogeno rūgštys yra hidroksicinamono rūgščių (kavos, ferulo, p-kumaro ir sinapo rūgščių) ir kvino rūgšties esteriai. Labiausiai paplitęs ir dažnai bendrinio pavadinimu vadinamas būtent kavos rūgšties esteris. Esterinė jungtis sudaryta susijungus kavos rūgšties karboksi grupei su kvino rūgšties alkoholine grupe. Chlorogeno rūgšties molekulinis svoris yra 354 g/mol, o apskaičiuotasis logaritminis medžiagos pasiskirstymo oktanolėje / vandenyje koeficientas (logP) lygus (-0,4) [137], kuris rodo, kad CHR yra nestipriai hidrofilinis junginys, kurio dvi dalys tirpsta oktanolėje ir penkios dalys vandenyje.

CHR plačiai paplitusi daugelyje augalų. Daug jos nustatoma kavos pupelėse [43]. Kadangi CHR nustatoma maisto produktuose, klinikiniais tyrimais daugiau tyrinėtas biologinis pasisavinimas pavartojus *per os*. Daugumoje studijų dalyvavo mažai tiriamųjų, o gauti biologinio pasisavinimo rezultatai įvairavo tarp atskirų individų (7–72 proc.), todėl galutinių išvadų apie CHR biologinį pasisavinimą daryti dar negalima [129, 206]. Renouf ir kt. [165] atlikto tyrimo metu nustatyta, kad suminė CHR koncentracija kraujo plazmoje priklauso nuo suvartotos dozės, tačiau nepakitusios CHR biologinis pasisavinimas nedidelis. Dėl žarnyne vykstančio metabolizmo, vėliau atsirandančių CHR metabolitų kraujyje buvo daugiau ir jų kiekis buvo mažiau susijęs su pavartota doze [165].

CHR skvarba į odą tirta dar mažiau. Japonijos mokslininkai CHR naudojo kaip modelinę medžiagą siekdami įvertinti, kaip ši medžiaga skverbiasi į Yucatan mikrokiaulių ir jūros kiaulyčių nugaros odą [78, 98]. Yutani ir kt. [78] tyrimų tikslas buvo palyginti dviejų sudėčių mikroemulsijų įtaką CHR skvarbai pro Yucatan mikrokiaulių odą. Tyrimų metu nustatyta, kad iš mikroemulsijos su sacharozės laureatu į epidermį prasiskverbė 0,25 proc., o į dermą 0,12 proc. CHR, ir tai buvo 6 ir 3,5 karto daugiau nei iš mikroemulsijos su tvinu 80, atitinkamai po 40 valandų tyrimo [78].

Kitagawa ir kt. [98] atlikto tyrimo tikslas buvo įvertinti skirtingų tipų mikroemulsijas kaip CHR nešiklius į Yucatan mikrokiaulių ir jūros kiaulyčių odą. Tyrimais nustatyta, kad iš vandeninio nešiklio (1,49 $\mu\text{mol/g}$ odos) CHR skverbiasi į jūros kiaulyčių odą, tačiau nesikaupia joje, o mikroemulsijos ypač aliejus – vanduo tipo paskatina CHR kaupimąsi odoje. Tokia pati tendencija buvo patvirtinta ir su Yucatan mikrokiaulių oda. Tyrimo metu taip pat buvo nustatyta, kad mikroemulsijos gelis apsaugojo jūros kiaulyčių odą nuo UVB sukeltos eritemos [98].

Marti-Mestres ir kt. [121] nustatė, kad CHR skvarba po 48 valandų tyrimo į kiaulių ausų odą yra 0,48 $\mu\text{g/cm}^2$ val. Dabboue ir kt. [49] tyrimas patvirtino, kad 30 kartų lipnia juostele pašalinus žmogaus ar kiaulės odos raginį sluoksnį (*stratum corneum*) sluoksnį, gaunamas pažeistos odos

eksperimentinis modelis, panašus į subdymą mikroadatėlėmis. Pažeista oda buvo laidi 1 proc. CHR tirpalui.

CHR biologinis aktyvumas vertinamas tyrimais *in vitro*, įvairiais ląstelių, gyvūnų modeliais bei klinikiniais tyrimais. Įvairiais klinikiniais tyrimais (dažniausiai nedidelių imčių) nustatyta, kad CHR turi antioksidacinį aktyvumą [46, 105], antihipertenzinį poveikį per NO vazodilatacinį mechanizmą [131,198], mažina gliukozės absorbciją [191], uždegimą ir kitus cukrinio diabeto rizikos faktorius [90].

Tyrimais *in vitro* nustatyta, kad CHR pasižymi antimikrobinio aktyvumu prieš *E. coli*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella Typhimurium* mikroorganizmų padermes [87, 115]. Panaudojant ląstelių ir audinių modelius nustatytas antioksidacinis [171] ir uždegimą slopinantis poveikiai [194]. Tyrimu su laboratorinėmis žiurkėmis įrodytas CHR uždegimą slopinantis ir analgetinis poveikiai, bet paneigtas karščiavimą slopinantis poveikis [170].

Viteksin-2''-O-ramnozidas. Viteksin-2''-O-ramnozidas yra flavonoidų grupės C glikozidas. Viteksin-2''-O-ramnozido molekulinis svoris yra 578,5 g/mol, o logP yra (–0,9) [138], kuri rodo, kad VOR yra silpnai hidrofilinis junginys, kurio 1 dalis tirpsta oktanolėje, o 8 dalys vandenyje.

Anglies glikozidai yra daug rečiau sutinkami augaluose nei deguonies glikozidai [163, 203]. VOR kaip ir daugelis fenolinių junginių dažniausiai gaunamas su maistu, todėl dauguma autorių orientuojasi į biologinio pasisavinimo pro virškinamąjį traktą tyrimus. Tyrimų su žmonėmis, kuriuose būtų tirtas izoliuotas VOR junginys mokslinėje literatūroje nustatyti nepavyko, tačiau yra tyrimų, atliktų su laboratoriniais gyvūnais. Ma ir kt. [117] nustatė, kad žiurkėms po vienkartinės VOR dozės pavartotos *per os*, biologinis pasisavinimas buvo mažas, bet į sisteminę kraujotaką patekusi dalis greitai (0,75 val.) pasiekė maksimalią koncentraciją kraujyje ir pasiskirstė audiniuose (po 0,5–1 valandos didžiausios koncentracijos nustytos kepenyse ir inkstuose), o pusinės eliminacijos laikas buvo 2,32 val. Pro hematoencefalinį barjerą VOR nepraejo. Nustatyta, kad didžiausia VOR dalis yra šalinama su išmatomis (~88 proc.). Kiti autoriai taip pat nustatė, kad VOR biologinis pasisavinimas mažas [11,60].

Tyrimų, kuriuose būtų tirta VOR skvarba į odą mokslinėje literatūroje nustatyti nepavyko, nepaisant to, yra tyrimų su ląstelių modeliais, įrodančių VOR efektyvumą gydant melanomą [134]. Įvairiais tyrimais nustatytas VOR ar viteksino efektyvumas prieš uždegimo sukeliamą skausmą [14, 32], analgetinis poveikis per opioidinius receptorius [149, 207], apsauginis poveikis nuo peroksido sukeliama oksidacinio streso [199].

Hiperozidas (HP) ir izokvercitrinas (IKV). Hiperozidas ir izokvercitrinas yra flavonoidų klasės flavonolių glikozidai. Hiperozidas ir izokvercitrinas

yra stereioizomerai, nes prie flavonolio kvercetino aglikono yra prisijungusios cukrinės dalys, besiskiriančios viena OH grupės padėtimi. Hiperozido sudėtyje yra galaktozė, o izokvercitrino – gliukozė. HP ir IKV molekulinis svoris yra 464 g/mol, o logP yra 0,4 [139, 140], kuri rodo, kad junginiai yra silpnai lipofiliniai – 5 dalys tirpsta oktanolis, o 2 dalys vandenyje. Eksperimentiniais metodais nustatytas izokvercitrino logP buvo 0,77 [133].

Kvercetino glikozidai yra plačiai augaluose nustatomi junginiai, kurių yra vaisiuose, daržovėse, grūdiniuose kultūrose, vaistiniuose augaluose. Nežiūrint to, kad šių junginių paplitimas didelis, augaluose nustatomi kiekiai yra nedideli [196]. IKV yra dažniau sutinkamas kvercetino glikozidas nei HP.

Iki šiol yra nedaug studijų su įvairiais gyvūnais ir žmonėmis, kurios būtų vertinusios izoliuotų HP ar IKV biologinį pasisavinimą. IKV biologinis pasisavinimas vertintas žiurkių [38, 119, 154], šunų [164], kiaulių [37], žmonių [133, 143] organizmuose, tačiau jų rezultatai panašūs nepriklausomai nuo gyvūno rūšies. Nustatyta, kad IKV biologinis pasisavinimas *per os* geresnis (9–12 proc.) nei kvercetino (2–3,8 proc.) [196]. Nedideliais kiekiais IKV pasiskirsto žiurkių smegenyse, kepenyse, širdyje, inkstuose, plaučiuose ir kraujo plazmoje [154]. Per pirmas 24 valandas šlapime nustatoma 1,2–6,7 proc. IKV dozės metabolitų pavidalu žmonių ir žiurkių organizmuose [42, 143].

Mokslinėje literatūroje yra HP biologinio pasisavinimo studijų atliktų su žiurkėmis [38,39]. Studijų metu nustatyta, kad žiurkių organizmuose nustatomi didesni veikliųjų junginių kiekiai kuomet jie suvartojami (*per os* ar *i.v.*) gudobelių ekstrakto pavidalu nei grynų komponentų pavidalu [39]. IKV yra daug geriau absorbuojamas žiurkių organizmuose nei HP, dėl skirtingų cukrinių liekanų [39].

IKV ir HP skvarba į odą tirta dar mažiau, mokslinėje literatūroje šia tema pavyko rasti tik vieną tyrimą [114], kuriame buvo tirta kvercetino, jo polimetilinto junginio ir glikozidų skvarba į pelių odą. Tyrimo metu nustatyta, kad IKV ir HP skvarbos koeficientai skiriasi: HP skvarbos koeficientas buvo $15,64 \pm 4,05$ (skvarbos greitis $1,08 \pm 0,28$ nmol/cm²/val), o IKV – $5,65 \pm 0,62$ (skvarbos greitis $0,09 \pm 0,01$ nmol/cm²/val). Kita vertus *in vitro* ir ląstelių tyrimais yra nustatyti HP ir IKV biologiniai poveikiai odoje. HP pasižymėjo antioksidaciniu poveikiu, apsaugančiu melanocitus nuo peroksido sukeltų pažeidimų, apoptozės, skatino melanocitų proliferaciją [74]. IKV pasižymėjo kolageno sintezę skatinančiu, antioksidaciniu poveikiu [152].

Klinikinių studijų, tiriančių izoliuotų HP ar IKV biologinius efektus, rasti nepavyko.

1.3.2. Vaistinių melisų lapų ekstrakto sudėtis ir biologinis aktyvumas

Europos farmakopėjos monografijoje (01/2010:2524), skirtoje vaistinių melisų lapų vaistinei augalinei žaliavai, teigiama, kad vaistinių melisų lapuose turėtų būti nustatoma 4 proc. hidroksicinamono rūgščių junginių, išreikštų rozmarino rūgštimi [215].

Surinkus mokslinės literatūros duomenis nustatyta, kad vaistinių melisų lapų ekstraktams yra būdingi kelių klasių junginiai: eteriniai aliejai, terpenai, fenolinės rūgštys ir flavonoidai. Fenolinės rūgštys yra pagrindiniai vaistinių melisų lapų junginiai [175], o iš fenolinių rūgščių didžiausiais kiekiais nustatoma rozmarino rūgštis [15].

Vaistinių melisų lapų pagrindiniai biologiniai poveikiai yra priskirami lakiems junginiams ir fenolinėms rūgštims. Vaistinių melisų lapų ekstraktai nuo seno naudojami neurologinėms, psichikos ligoms gydyti, o šias indikacijas pagrindžia klinikinės studijos. Vaistinių melisų ekstraktas turėjo įtakos sveikų savanorių pažintinei funkcijai ir nuotakai normaliomis [91, 92, 172] ir laboratorijoje sukeltomis stresinėmis sąlygomis [93]. Kitose klinikinėse studijose nustatytas vaistinių melisų lapų ekstrakto antioksidacinis [204], antihiperlipideminis [82] poveikiai, ekstraktas sumažino padažnėjusį širdies plakimo ir nerimo epizodų skaičių [7]. Vaistinių melisų lapų ekstraktas buvo efektyvus gydant *Herpes simplex* infekciją [100].

Tyrimais su gyvūnais nustatomi ir kiti vaistinių melisų ekstrakto biologiniai poveikiai. Vaistinių melisų ekstrakto vartojimas pelėms sumažino skausmą [64]. Ląstelių modeliuose vaistinių melisų lapų ekstraktas pasižymėjo *Herpes simplex* viruso dauginimąsi stabdančiu [124] poveikiu.

Rozmarino rūgštis (RR). Rozmarino rūgštis yra fenolinių, hidroksicinamono rūgščių klasės junginys. RR yra kavos rūgšties ir 3,4-dihidroksifenilpieno rūgšties esteris. RR molekulinis svoris yra 360 g/mol, o logP yra 2,4 kuri rodo, kad RR yra lipofilinis junginys, kurio 251 dalis tirpsta oktanolėje ir 1 dalis – vandenyje [141].

RR dažniausiai yra nustatoma notrelinių (lot. *Lamiaceae*) ir agurklinių (lot. *Boraginaceae*) augalų šeimose, taip pat atskiruose kitų šeimų augaluose. Augaluose paplitusi gana plačiai [157]. Kaip ir daugelio fenolinių junginių RR biologinis pasisavinimas tyrinėtas po pavartojimo *per os*. Tyrimų su Caco-2 ląstelių monosluoksniu modeliu rezultatai rodo, kad RR pro žarnyno sienelės skverbiasi paraląstelinio keliu, o absorbcijos efektyvumas yra žemas. Tyrimo rezultatai leido daryti hipotezę, kad RR metabolizuojama ne gleivinių esterazių, bet virškinamojo trakto mikrofloros ir tuomet efektyviai absorbuojama [102]. Rezultatus patvirtino Qiang su kolegomis [161] nustatęs, kad RR gliukoronidai ir sulfatai daug efektyviau absorbuojami iš apikalinės į bazolateralinę Caco-2 ląstelių pusę. Rezultatus

patvirtina ir *in vivo* studijos su žiurkėmis, kurios RR vartojo *per os*. Po 18 valandų tyrimo žiurkių šlapime nustatyta 5,47 proc. pavartotos RR dozės įvairių metabolitų pavidale [21]. Nustatyta, kad RR biologinis pasisavinimas panašus į galo rūgšties ir dešimt kartų mažesnis nei kavos rūgšties [101]. Tyrimais *in vitro* ir *in vivo* nustatyta, kad RR biologinį pasisavinimą pagerina RR ir fosfolipidų kompleksas [75]. Baba ir kt. [20] įvertino RR biologinį pasisavinimą žmonių organizme pavartojus *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstrakto ir nustatė, kad laisvos RR ar jos metabolitų (metilintos RR ir ferulo rūgšties) kraujyje ir šlapime nustatomi labai nedideli kiekiai, o daug daugiau nustatoma konjuguotos formos junginių. Bendras RR kiekis visomis formomis išskirtas su šlapimu sudarė 6,3 proc. pavartotos dozės. Randomizuotu, placebo kontroliuojamu klinikiu tyrimu (n=11) nustatyta, kad maisto vartojimas kartu su RR *per os* pagerino absorbciją, bet maksimalios koncentracijos plazmoje pasiekimo laiką prailgino nuo 1 iki 3 valandų. Tyrimo autoriai teigia nenustatę jokių saugumo ar toleravimo problemų, susijusių su RR vartojimu [142].

Verta pažymėti, jog viena pirmųjų studijų, vertinusių RR biologinį pasisavinimą, vertino ir šios medžiagos skvarbą pro žiurkių odą [166]. Autoriai nustatė, kad RR gerai (absolūtus biologinis pasisavinimas 60 proc.) skverbiasi pro žiurkių odą ir transderminis kelias gali būti naudojamas siekiant sisteminio uždegimą slopinančio RR efekto, nes prėjus 4,5 valandos (t max) po RR pavartojimo, ji nustatyta žiurkių kraujyje, odoje, raumenyse ir kauluose. Mokslinės literatūros duomenų paieška atskleidė, kad šio tyrimo rezultatai nepaskatino susidomėjimo RR skvarba pro / į odą ir iki šiol ši sritis labai menkai tirta. RR skvarba į pelių odą tirta siekiant palyginti paprastą hidrogelį su hidrogeliu, kuriame RR įterpta į niosomas. Autoriai nustatė, kad RR skverbiasi į pelių odą ir iš paprasto hidrogelio, tačiau niosominis hidrogelis skvarbą pagerina. Autoriai šį hidrogelį siūlo vartoti gydant odos aknę [34].

Nepaisant to, kad skvarbos į odą tyrimų atlikta labai ribotai, RR yra susidomėjimą keliantis junginys, pasižymintis įvairiais biologiniais poveikiais, įrodytais tyrimais *in vitro* ir *in vivo*. Tyrimai atlikti su žmonių keratinocitų ląstelių linija (HaCaT) įrodė, kad RR efektyviai apsaugo nuo UVA ir UVB spindulių sukeltamo oksidacinio streso ir DNR pažeidimų bei skatina melanogenezę [155, 160, 197]. *In vitro* tyrimai rodo antiherpetinį RR aktyvumą [17]. Tyrimu su pelėmis įrodyta, kad RR vartojama ant odos stabdo odos vėžio formavimąsi [147]. Klinikiniais tyrimais įrodytas RR aktyvumas gydant atopinį dermatitą [112], sezonines alergines ligas [148], mažinant osteoartrito sukiamą skausmą [45].

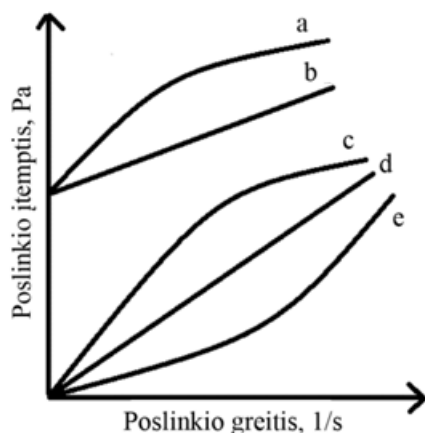
Surinkus literatūros duomenis, nustatyta, kad gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktams būdingi fenolių klasės junginiai: flavo-

noidai ir fenolinės rūgštys. Biofarmacinės ekstraktų ir atskirų vyraujančių fenolinių komponentų savybės daugiausiai tyrinėtos iš *per os* vartojamų vaistų formų. Kita vertus, gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktams ir / ar atskiriems vyraujantiems fenoliniams komponentams būdingi įvairūs biologiniai poveikiai taip pat ir poveikiai odoje. Įvertinus mokslinėje literatūroje skelbiamus biologinio poveikio tyrimus nustatyta, kad gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktus verta įterpti į pusiau kietas vaisto formas ir įvertinti, ekstraktuose esančių vyraujančių fenolinių komponentų, biofarmacines savybes.

1.4. Reologija: pagrindiniai parametrai, medžiagų tekėjimo tipai, metodo taikymas

Stabilumo įvertinimas yra sunkiausia užduotis modeliuojant pusiau kietas formuluotes. Reologijos metodo naudojimas stabilumo tyrimo metu sudaro galimybes įvertinti pusiau kietų formuluočių struktūros vidinių ryšių pokyčius, nesant matomų pakitimų. Pritaikius reologinių savybių nustatymo metodikas galima įvertinti pusiau kietų formuluočių tepumą, struktūrinius pokyčius temperatūros pokytyje, elastingumo ir klampumo dedamąsias dalis.

Reologija (gr. *rheos* – tekėti; *logia* – mokslas) tai mokslas, tiriantis medžiagų deformaciją ir takumą. Ji tyrinėja skysčius, puskiečius ir kietus kūnus, tokiomis sąlygomis kada šie ne tik deformuojasi, bet ir teka. Šiuolaikinės reologijos esmė yra kontroliuojamomis sąlygomis įvertinti mėginio takumą esant tam tikrai deformuojančiai jėgai. Tekėjimo tyrimuose priklausomai nuo pasirinktų sąlygų ar turimos įrangos gali būti kontroliuojamas vienas iš dviejų pagrindinių parametrų (poslinkio įtempis ar poslinkio greitis), tuomet atitinkamai matuojamas kitas parametras. Taip pat kontroliuojami kiti dydžiai: temperatūra, mėginio storis, matavimo sistema (kūgis ar plokštelė), matavimo sistemos skersmuo. Esant kontroliuojamam poslinkio greičiui yra įvertinama kokios jėgos reikia sukelti mėginio tekėjimą, o esant kontroliuojamam poslinkio įtempiui įvertinama kokių greičiu mėginys geba tekėti prie užduotos jėgos. Pagal gautą tekėjimo kreivę (reogramą) galima įvertinti kokių medžiagų savybėmis pasižymi tiriamasis mėginys (1.4.1 pav.), bei pritaikius įvairius matematinius modelius apskaičiuoti išvestinius parametrus.



1.4.1 pav. Medžiagų tekėjimo tipų reogramos, kai kontroliuojamas tekėjimo greitis

a – pseudoplastinis su ribiniu takumu; b – plastinis; c- pseudoplastinis; d – niutoninis; e – išsiplečiantis

Pagrindiniai išvestiniai parametrai yra ribinis takumas, konsistencijos koeficientas, tekėjimo indeksas, dinaminė klampa.

Ribinis takumas [Pa] – tai dydis, kuriuo nustatoma kiek pradinės jėgos reikia norit mėginyje sukelti tekėjimą. Esant mažiems poslinkio įtempiams tokios medžiagos neteka, bet patiria grįžtamą deformaciją, taip kaip kietieji elastiški kūnai. Kai yra pasiekiamas tam tikras poslinkio įtempis (ribinis), medžiagos teka kaip skysčiai. Prie mažų poslinkio įtempių medžiagos neteka, nes jų struktūra paprastai yra kaip tinklas, apimantis visą sistemą, pasiekus tam tikrą poslinkio įtempį, kada šis tinklas yra dalinai pažeidžiamas, tokios medžiagos pradeda tekėti. Dažniausiai ši savybė būdinga pus-kietėms medžiagoms [62].

Konsistencijos koeficientas $[(Pa \cdot s)^n]$ – tai klampos rodiklis. Medžiagai pasižymint niutoninėmis savybėmis konsistencijos koeficientas sutampa su dinamine klampa.

Tekėjimo indeksas – bedimensinis dydis, kuriuo apibūdinama kaip labai tiriamosios medžiagos savybės yra nutolusios nuo niutoninių skysčių savybių. Kinta nuo 0 iki 1. 0 reikšmė rodo, kad medžiagai būdingos idealiai kieto kūno savybės, o 1 rodo, kad medžiagai būdingos niutoninės savybės.

Dinaminė klampa ($Pa \cdot s$) – tai dydis, kuriuo apibūdinama medžiagos tendencija priešintis jėgai.

Tiesiogiai dinaminė klampa turėtų būti matuojama tik niutoniniams skysčiams, nes matavimas vyksta vieno taško principu. Prie tam tikro poslinkio greičio yra įvertinamas poslinkio įtempis. Kadangi niutoninių

skysčių reograma yra tiesė nuo koordinatų pradžios taško, tai esant bet kokiam poslinkio greičiui poslinkio įtempis gausis toje pačioje tiesėje.

Dažnai dinaminė klampa vieno taško principu yra matuojama neniutoniniams skysčiams, tuomet gaunama tariamoji dinaminė klampa, kuri rodo, kokia medžiagos klampa būtų, jei ji pasižymėtų niutoninėmis savybėmis. Matavimas vieno taško principu turi nemažai trūkumų, kadangi esant skirtingiems poslinkio greičiams gali būti gaunama visiškai kitokia tariamoji dinaminė klampa [33].

Reologijos asociacijos moto – „viskas teka“ atskleidžia reologijos mokslo taikymo galimybes, tačiau yra nemažai sričių, kur reologinių charakteristikų nustatymas turi praktinę reikšmę. Reologijos mokslas atsirado ir vystėsi maisto technologijos moksle ir pramonėje, todėl dauguma fundamentinių pavyzdžių yra iš maisto technologijos srities, kur šis mokslas plačiai taikomas iki šiol. Didelę praktinę reikšmę reologinių charakteristikų nustatymas turi dažų, asfalto, metalo lydinių, polimerų moksle ar bet kurioje kitoje pramonės šakoje, kur svarbus medžiagų takumas.

Pusiau kietų formuluočių modeliavimas ne išimtis, kadangi priimtinas tepumas (takumas) yra viena svarbiausių charakteristikų vertinant formulotės patrauklumą. Kūno priežiūros priemonės gali pasižymėti labai skirtingomis reologinėmis savybėmis, nuo niutoninių skysčių savybėmis pasižyminčių, kūno pienelių iki pseudoplastinių medžiagų su ribiniu takumu pasižyminčių, kūno sviestų. Panašios konsistencijos formulotės tepimo metu gali turėti labai skirtingas savybės priklausomai nuo vidinių struktūrinių ryšių tvirtumo. Viena formulotė gali lengvai teptis ir pasiskirstyti ant odos paviršiaus, o kitą išskirstyti gali būti sunku, todėl reologinių savybių nustatymo tyrimai padeda prognozuoti tokias savybes ir jas susieti su organoleptinių savybių tyrimo rezultatais. Vidinių struktūrinių ryšių tvirtumas svarbus ne tik tepimo metu, bet ir laikymo. Taikant reologijos mokslą ne tiesiogiai galima vertinti ir sumodeliuotų formuluočių struktūrinius ryšius, jų stabilumą. Siekiamybė yra sumodeliuoti pusiau kietą formulotę, kuri laikymo metu išlaiko savo struktūrą, tačiau tepimo metu lengvai pasiskirsto ant odos. Vidiniai struktūriniai ryšiai turi būti tvirti laikymo metu, bet lengvai nutraukiami, veikiant jėgai. Reologinių savybių tyrimas yra jautrus įrankis siekiant nustatyti puskiečių preparatų struktūrinius pokyčius [103].

Įvertinus mokslinėje literatūroje aprašomas reologijos metodų taikymo galimybes, nustatyta, kad tai tinkamas metodas vertinant modeliujamų pusiau kietų formuluočių kokybę ir stabilumą.

2. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimų objektas

Tyrimų objektas yra eksperimentinės pusketės formos (tepalai, vanduo-aliejus (v-a) tipo kremai, hidrogeliai) sumodeliuotos naudojant natūralias medžiagas, į kurias įterpti modeliniai gudobelių žiedų su lapais ar vaistinių melisų lapų ekstraktai.

2.2. Reagentai ir medžiagos

Sausieji vaistinių melisų lapų ir gudobelių žiedų su lapais ekstraktai gauti iš įmonės „Naturex“ (Avignon, Prancūzija). Gudobelių žiedų su lapais vaistinė augalinė žaliava gauta iš UAB „Acorus Calamus“ (Kaunas, Lietuva). Etanolis (96,3 proc.) gautas iš AB „Stumbras“ (Kaunas, Lietuva). Grikių, rapsų, eukaliptų medus gautas iš UAB „Korio laboratorija“ (Kaunas, Lietuva), akacijų medus iš FÜRSTEN-REFORM Dr. med. Hans Plümer Nachf. GmbH & Co. KG (Braunschweig, Vokietija), miško medus surinktas dr. Algirdo Amšiejaus. Bičių vaškas gautas iš UAB „Bičių korys“ (Vilnius, Lietuva).

Kietasis parafinas, baltasis vazelinai, cholesterolis, alyvuogių aliejus, natrio alginatas, rozmarino rūgštis, chlorogeno rūgštis, hiperozidas, izokvercitrinas, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH), acetnitrilas, acto rūgštis, Folin-Ciocalteu reagentas, viteksin-2"-O-ramnozidas, natrio benzoatas gauti iš Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija).

Kalcio chloridas, natrio chloridas, bevandenis natrio karbonatas, avokadų aliejus įsigyti iš Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Vokietija), o natrio azidas įsigytas iš POCh (Gliwice, Lenkija). Miulerio-Hintono II agaras įsigytas iš BBL (Cockeysville, JAV). Sviestmedžio aliejus gautas iš Fagron Iberica S.A.U. (Terrassa, Ispanija). Kakavos aliejus įsigytas iš Henry Lamotte Oils GmbH (Bremen, Vokietija). Visi kiti naudoti reagentai buvo analitinio švarumo.

2.3. Tyrimų metodai ir metodika

2.3.1. Eksperimentinės pusiau kietos formos

Tyrimų metu buvo tiriamos skirtingų prigimčių pusiau kietos formos. Modeliuotų formuluočių pagrindų sudėty pateikiamos 2.3.1.1 lentelėje.

2.3.1.1 lentelė. Modeliuotų formuluočių pagrindų sudėtys

Komponentai (proc.)	Tepalas I (N)	Tepalas II (M)	Tepalas III (T)	Kremas (K)	Hidrogelis (A)
Bičių vaškas	0,5–15,0	5,0–15,0	0–1,0	5,0	–
Kietasis parafinas	5,0	–	–	–	–
Vazelinas	5,0	–	–	–	–
Medus	–	1,0–10,0	10,0	10,0	10,0
Kakavos aliejus	10,0	10,0	10,0	10,0	–
Sviestmedžio aliejus	–	–	14,0–15,0	–	–
Cholesterolis	1,0–5,0	3,0	3,0	3,0	–
Alyvuogių aliejus	iki 100,0	iki 100,0	iki 100,0	iki 100,0	–
Natrio alginatas	–	–	–	–	2,0–4,0
10 proc. CaCl ₂	–	–	–	–	2,0–4,0
Išgrynintas vanduo/ vandeninis ekstraktas	–	–	–	20–40	iki 100,0

Tepalo I (N serija) gamyba. Komponentai lydomi ant vandens vonios lydymosi temperatūros mažėjimo seka.

Tepalo II (M serija) ir tepalo III (T serija) gamyba. Hidrofobiniai komponentai lydomi ant vandens vonios lydymosi temperatūros mažėjimo seka. Lydalas maišomas piestele kol pradeda stingti, tuomet nedideliais kiekiais įterpiamas medus. Gauta masė perkeliama į specialią maišyklės Unguator® 2100 (GAKO® International GmbH, Munchin, Vokietija) talpyklę galutiniam sumaišymui.

Kremo (K serija) gamyba. Hidrofobiniai komponentai lydomi ant vandens vonios lydymosi temperatūros mažėjimo seka. Medus ištirpinamas atitinkamame kiekyje išgrynintojo vandens. Tirpalas pašildomas ir nedideliais kiekiais, nuolat maišant piestele terpiamas į lydalą. Gauta masė perkeliama į specialią maišyklės Unguator® 2100 talpyklę galutiniam sumaišymui.

Hidrogelio (A serija) gamyba. Atitinkame tūryje išgrynintojo vandens / vandeninio ekstrakto ištirpinamas medus. Tirpalas padalinamas į dvi apylygias dalis. Vienoje dalyje brinkomas natrio alginatas kambario temperatūroje. Į kitą dalį įpilamas kalcio chlorido tirpalas. Išbrinkus natrio alginatui abejos dalys sumaišomos. Maišoma, kol gaunamas hidrogelis.

Ekstraktų įterpimas. Į tepalus ekstraktai įterpiami suspensiniu pavidalu. Sausasis ekstraktas disperguojamas mažu kiekiu (pagal Deriagino taisyklę) aliejaus ir nedidelėmis porcijomis sumaišomas su tepalo pagrindu. Hidrogeliuose naudojamas sausojo ekstrakto vandeninis tirpalas arba vandeninė vaistinės augalinės žaliavos ištrauka kaip vandeninė fazė.

2.3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktuose

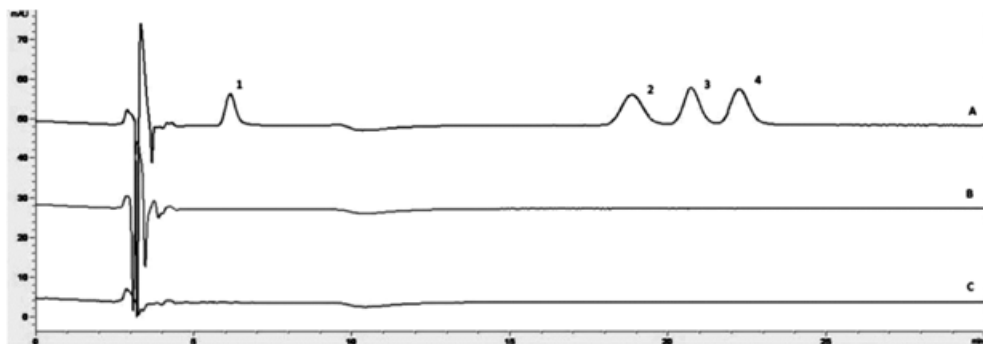
Sausieji ekstraktai buvo tirpinami išgrynintame vandenyje valandą laiko kambario temperatūroje maišant magnetine maišykle IKAMAG® C-MAG HS-7 (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Vokietija). Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas buvo atliekamas ekstrakto tirpalą veikiant Folin-Ciocalteu reagentu ir reakcijos produktą įvertinant spektrofotometriškai su Agilent 8453 UV–Vis spektrofotometru (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, JAV). Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas pagal p-kumaro rūgšties kalibracinę kreivę [211]. Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas miligramais grame sausojo ekstrakto ar mikrogramais mililitre vandeniniuose ekstraktų tirpaluose / ištraukose pagal p-kumaro rūgšties ekvivalentą.

2.3.3. Gudobelių žiedų su lapais ekstraktų analizė ESC metodu bei metodikos pritaikymas ir validacija

Sausojo gudobelių žiedų su lapais bei vandeninių ištraukų iš gudobelių žiedų su lapais vaistinės augalinės žaliavos kokybinė ir kiekybinė analizė atlikta, naudojant Agilent 1260 Infinity kapiliarinį skysčių chromatografą (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, JAV) su diodų matricos detektoriumi. Pagrindinių fenolinių junginių atskyrimui naudota ACE C18 kolonėlė (150 × 0,5 mm, 5 µm dydžio dalelėmis) su prieškolone ACE C18 5 µm. Judri fazė sudaryta iš 0,5 proc. acto rūgšties vandeninio tirpalo (eliuentas A) ir acetonitrilo (eliuentas B). Naudotas segmentinis eliuavimas: 0–3 min 10 proc. eliuento B, 3,1–25 min 14 proc. eliuento B. Injekcijos tūris – 0,2 µl, o tėkmės greitis buvo 10 µl/min. Kolonėlėje buvo palaikoma pastovi 25 °C temperatūra. Junginių smailių integravimas atliktas esant 340 nm bangos ilgiui. Visi mėginiai prieš atliekant chromatografinę analizę buvo filtruojami pro Rotilabo® 0,2 µm PVDF membraninius švirkštų filtrus (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Vokietija).

Specifiškumas. Gudobelės žiedų su lapais fenolinių junginių tapatybė nustatyta analičių spektrus lyginant su atitinkamų standartų spektrais gautais diodų matricos detektoriumi 210–600 nm bangos ilgio intervale. Specifiš-

kumas vertinamas lyginant atitinkamų standartų (A) ir epidermio (B) ir dermos (C) ($n=3$) mėginių be gudobelių fenolinių junginių chromatogramas (2.3.3.1 pav.). Iš atšildytos odos iškirpti $0,64 \text{ cm}^2$ odos gabaliukai, kuriems epidermis nuo dermos atskirtas „sausos karščio“ metodu. Epidermio ir dermos mėginiai ekstrahuojami 1 ml metanolio ir 30 min veikiami ultragarsu vonelėje. Epidermio ir dermos ekstraktų chromatogramose (2.3.3.1 pav.) jokių junginių nenustatoma pritaikius naudojamą metodiką, todėl jie nemaišo fenolinių junginių analizei. Gudobelių žiedų su lapais ekstraktų tirpaluose nustatomi fenoliniai junginiai, turintys tokius pačius sulaikymo laikus ir spektrus kaip ir standartų tirpalai.



2.3.3.1 pav. Gudobelių žiedų su lapais fenolinių junginių standartų (A) (1 – chlorogeno rūgštis; 2 – viteksin-2"-O-ramnozidas; 3 – hiperozidas; 4 – izokvercitrinas), epidermio (B) ir dermos (C) mėginių chromatogramos esant 340 nm bangos ilgiui

Metodikos pritaikymas ir validacija. Įvertinus mokslinės literatūros duomenis nustatyta, kad gudobelių žieduose su lapais yra kaupiami kelių klasių fenoliniai junginiai [56]. Vyraujantys junginiai yra: fenolinė rūgštis – chlorogeno rūgštis; flavono-C-glikozidas – viteksin-2"-O-ramnozidas ir flavonolio-O-glikozidai – hiperozidas ir izokvercitrinas [136]. ESC metodika pritaikyta šių junginių kokybinei ir kiekybinei analizei biofarmacinių *in vitro* ir *ex vivo* tyrimų mėginiuose ir ekstraktuose.

Naudojant 0,5 proc. acto rūgšties vandeninį tirpalą (eliuentas A) ir acetonitrilą (eliuentas B) optimalus fenolinių junginių atskyrimas pasiektas naudojant segmentinį eliuavimą, kai pirmas tris minutes buvo 10 proc. eliuento B, po to staigiai (per 6 sekundes) pakeliama eliuento B dalis iki 14 proc. ir palaikoma iki 25 minučių. Gauta smailių skiriamoji geba (R_s) buvo $> 1,5$. Gauti fenolinių junginių sulaikymo laikai buvo: chlorogeno rūgšties – 6,1 min, viteksin-2"-O-ramnozido – 18,7 min, hiperozido – 20,5 min ir izokvercitrino – 22,0 min (2.3.3.1 pav.).

ESC metodikos validacija. Aptikimo (LOD) ir kiekybinio nustatymo (LOQ) ribos nustatytos analizuojant trijų koncentracijų standartų tirpalus: 0,2, 0,6 ir 1 µg/ml. Pagal nustatytas ribas paruošti penkių koncentracijų standartų tirpalai naudoti kalibracinių kreivių sudarymui. Kiekvienas tirpalas injekuotas po 3 kartus. Sudarytų kalibracinių kreivių linijiškumas vertintas pagal determinacijos koeficientą (R^2).

Kiekvieno tirto junginio koncentracijų intervalai, aptikimo ir nustatymo ribos, bei sudarytų kalibracinių kreivių lygtys pateikiami 2.3.3.1 lentelėje. Nustatyti kalibracinių kreivių determinacijos koeficientai ($R^2 \geq 0,99982$) patvirtino kalibracinių kreivių linijiškumą.

2.3.3.1 lentelė. *Gudobelių žiedų su lapais fenolinių junginių kalibracinių kreivių parametrai*

Analitė	Koncentracijos intervalas (µg/ml)	Regresijos lygtis	R^2	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Chlorogeno rūgštis	0,6–45,02	$y = 23,59x - 1,46$	0,99993	0,18	0,60
Viteksin-2"-O-ramnozidas	1,16–86,66	$y = 25,86x - 2,35$	0,99982	0,31	1,02
Hiperozidas	1,12–84,04	$y = 25,27x - 6,33$	0,99983	0,23	0,78
Izokvercitrinas	1,09–81,47	$y = 27,22x - 4,96$	0,99993	0,24	0,80

Metodikos tikslumas ir glaudumas vertintas ruošiant tris serijas trijų koncentracijų tirpalus tą pačią dieną (pakartojamumo validacija) ir skirtingomis dienomis (atkartojamumo validacija). Tikslumas vertinamas pagal procentinę nustatytos analitės kiekį, o glaudumas pagal santykinį standartinį nuokrypį (SSN, proc.). Tikslumo ir glaudumo rezultatai pateikti 2.3.3.2 lentelėje.

2.3.3.2 lentelė. *ESC metodikos tikslumo ir glaudumo reikšmės pakartojamumo ir atkuriamumo sąlygomis*

Analitė	Pakartojamumas		Atkartojamumas	
	Tikslumas, (proc.)	Glaudumas, SSN (proc.)	Tikslumas, (proc.)	Glaudumas, SSN (proc.)
Chlorogeno rūgštis	81,7–114,0	0,3–4,9	93,3–114,8	0,9–7,7
Viteksin-2"-O-ramnozidas	94,2–119,8	1,4–3,4	93,8–104,3	1,7–3,5
Hiperozidas	92,6–125,9	1,1–4,9	91,8–123,2	3,2–8,9
Izokvercitrinas	86,8–121,1	1,0–8,3	90,3–112,8	4,3–4,8

Pakartojamumo sąlygomis tikslumas buvo nuo 81,7 proc. iki 125,9 proc., o atkuriamumo sąlygomis nuo 90,3 proc. iki 123,8 proc. Glaudumo reikšmės pakartojamumo sąlygomis neviršijo 8,3 proc., o atkuriamumo sąlygomis 8,9 proc.

Gauti validacijos parametrai patvirtino ESC metodikos tinkamumą gudobelių žiedų su lapais fenolinių junginių kokybinei ir kiekybinei analizei ekstraktuose / ištraukose bei fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimuose *in vitro*, kai akceptorinė terpė vanduo bei skvarbos į žmogaus odą tyrimuose *ex vivo*.

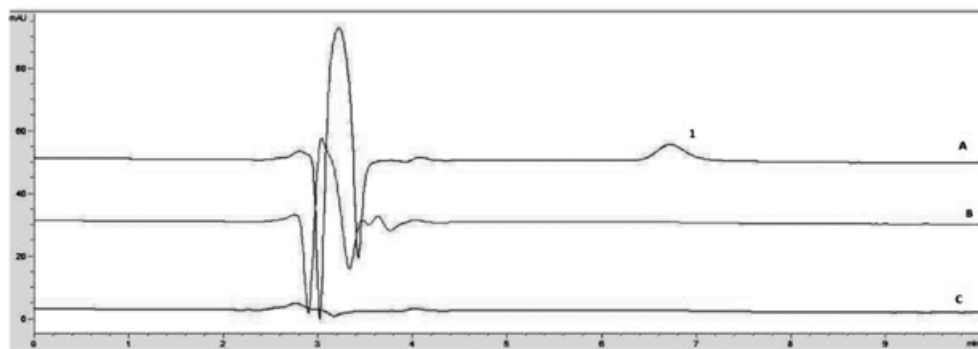
2.3.4. Vaistinių melisų (*Melissa officinalis* L.) lapų ekstrakto analizė ESC metodu bei metodikos pritaikymas ir validacija

Sausojo vaistinių melisų lapų kokybinė ir kiekybinė analizė atlikta, naudojant Agilent 1260 Infinity kapiliarinį skysčių chromatografą (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, JAV) su diodų matricos detektoriumi. Rozmarino rūgšties atskyrimui naudota ACE C18 kolonėlė (150 × 0,5 mm, 5 µm dydžio dalelėmis) su prieškolone ACE C18 5 µm. Judri fazė sudaryta iš 0,5 proc. acto rūgšties vandeninio tirpalo (eliuentas A) ir acetonitrilo (eliuentas B). Naudotas gradientinis eliuavimas: 0–10 min eliuntas B kito 23–40 proc. Injekcijos tūris – 0,2 µl, o tėkmės greitis buvo 10 µl/min. Kolonėlėje buvo palaikoma pastovi 25 °C temperatūra. Smailės integravimas atliktas esant 330 nm bangos ilgiui. Visi mėginiai prieš atliekant chromatografinę analizę buvo filtruojami pro Rotilabo® 0,2 µm PVDF membraninius švirkštų filtrus.

Specifiškumas. Rozmarino rūgšties tapatybė nustatyta analitės spektrą, lyginant su rozmarino standarto spektru, gautu diodų matricos detektoriumi 210–600 nm bangos ilgio intervale. ESC specifiškumas vertintas pagal chromatogramas gautas įjekavus rozmarino rūgšties standarto (A) tirpalą, ekstrahuotus dermos (C) ir epidermio (B) (n=3) mėginius be rozmarino rūgšties (2.3.4.1 pav.). Epidermio ir dermos ekstraktų chromatogramose (2.3.4.1 pav.) jokių junginių nenustatoma pritaikius naudojamą metodiką, todėl jie nemaišo rozmarino rūgšties analizei. Sausojo vaistinių melisų lapų ekstrakto tirpale nustatomas junginys, turintis tokį patį sulaikymo laiką ir spektrą kaip ir standarto tirpalas.

Metodikos pritaikymas ir validacija. Įvertinus mokslinės literatūros duomenis nustatyta, kad vaistinių melisų lapuose vyraujantis biologiškai aktyvus junginys yra rozmarino rūgštis (RR) [15]. ESC metodika pritaikyta rozmarino rūgšties kokybinei ir kiekybinei analizei biofarmacinių *in vitro* ir *ex vivo* tyrimų mėginiuose ir ekstrakte.

Naudojant 0,5 proc. acto rūgšties vandeninį tirpalą (eliuentas A) ir acetonitrilą (eliuentas B) optimalus rozmarino rūgšties atskyrimas buvo pri-
taikius gradientinį eliuavimą – 10 minučių acetonitrilo koncentraciją kei-
čiant nuo 23 iki 40 proc. Gauta smailių skiriamoji geba (R_s) buvo > 2 . Roz-
marino rūgšties sulaikymo laikas (2.3.4.1 pav.) buvo 6,67 min.



2.3.4.1 pav. Rozmarino rūgšties standarto (A), epidermio (B) ir dermos (C) mėginių chromatogramos esant 330 nm bangos ilgiui

ESC metodikos validacija. Rozmarino rūgšties ESC metodikos validacija vykdyta tokia pačia procedūra kaip ir gudobelių fenolinių junginių nustatymo ESC metodikos validacija. Rozmarino rūgšties koncentracijų inter-
valas (0,5–48,83 $\mu\text{g/ml}$) pasirinktas įvertinus aptikimo (0,14 $\mu\text{g/ml}$) ir nustatymo ribas (0,46 $\mu\text{g/ml}$). Sudaryta kalibracinės kreivės lygtis ($y = 33,56x + 5,16$), kurios determinacijos koeficientas $R^2 = 0,99992$ patvirtino kalibracinių kreivių linijiskumą.

2.3.4.1 lentelė. Rozmarino rūgšties ESC metodikos tikslumo ir glaudumo reikšmės pakartojamumo ir atkuriamumo sąlygomis

Analitė	Pakartojamumas		Atkartojamumas	
	Tikslumas, (proc.)	Glaudumas, SSN (proc.)	Tikslumas, (proc.)	Glaudumas, SSN (proc.)
Rozmarino rūgštis	80,0–99,5	0,8–2,4	80,8–96,6	2,3–4,6

Tikslumo ir glaudumo tyrimų rezultatais nustatyta, kad pakartojamumo sąlygomis tikslumas buvo nuo 80,0 proc. iki 99,5 proc., o atkuriamumo sąlygomis nuo 80,8 proc. iki 96,6 proc. Glaudumo reikšmės pakartojamumo sąlygomis neviršijo 2,4 proc., o atkuriamumo sąlygomis 4,6 proc.

Gauti validacijos parametrai patvirtino ESC metodikos tinkamumą vaistinių melisų lapų junginių kokybinei ir kiekybinei analizei ekstraktuose, fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimuose *in vitro*, kai akceptorinė terpė vanduo bei skvarbos į žmogaus odą tyrimuose *ex vivo*.

2.3.5. Pusiau kietų formuluočių biofarmaciniai tyrimai

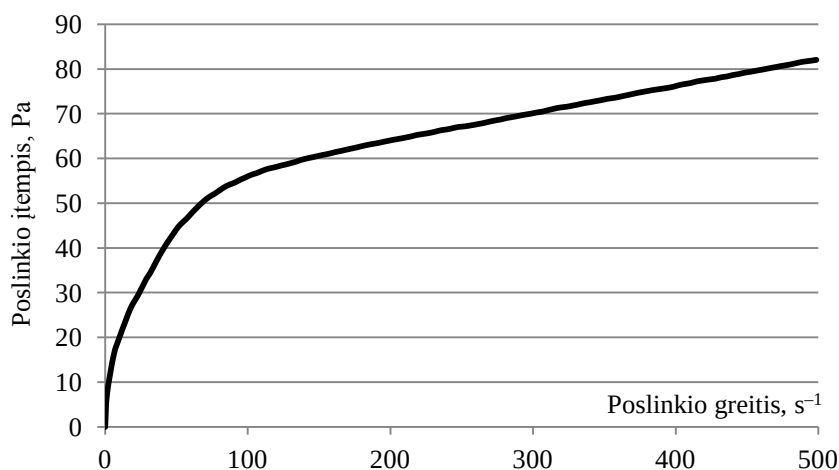
Fenolinių junginių atpalaidavimo iš pusiau kietų formuluočių tyrimai in vitro. Atpalaidavimo tyrimai ($n = 3$) *in vitro* atlikti naudojant modifikuotas Franz tipo difuzines celes. Donorinė fazė ($1,0 \pm 0,2$ g) patalpinama į celę su regeneruotos celiuliozės dializės membrana Cuprophane[®] (Medicell International Ltd., Londonas, JK). Prieš eksperimentą membrana brinkinama išgrynintame vandenyje ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) ne trumpiau 12 valandų. Efektyvus difuzijos plotas $1,77\text{ cm}^2$. Termostatuojama išorinė vandens vonelė ($t \leq 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), kurioje patalpinta difuzinė celė. Akceptorinė terpė nuolat maišoma magnetine maišykle IKAMAG[®] C-MAG HS-7. Eksperimentinės sąlygos neribojo tirtų fenolinių junginių tirpumo ir tirpimo proceso vandeninėje akceptorinėje terpėje, vykstant difuzijos procesui. Akceptorinės terpės mėginiai (1 ml) imami po 1, 2, 4 ir 6 valandų nuo tyrimo pradžios. Iškart po akceptorinės terpės paėmimo ji papildoma tokia pat tūriu šviežios akceptorinės terpės. Mėginiai analizuoti ESC metodu.

Fenolinių junginių skvarbos į žmogaus odą tyrimai ex vivo. Skvarbos į odą *ex vivo* tyrimai ($n=3$) atlikti, naudojant Bronaugh tipo pratakias difuzines celes. Stabili celių temperatūra palaikoma specialiu metaliniu bloku, kuris termostatuojamas cirkuliuojančio vandens dėka, naudojant termostatinę ($t \leq 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) cirkuliacinę vandens vonelę Grant GD120 (Grant Instruments Ltd., Kembridžas, JK). Efektyvus difuzijos plotas $0,64\text{ cm}^2$. Akceptorinė terpė sudaryta iš 0,9 proc. natrio chlorido ir 0,005 proc. konservanto natrio azido. Akceptorinės terpės cirkuliacinis greitis ($0,6\text{ ml/min}$) palaikytas naudojant peristaltinį siurbį Masterflex[®] L/S[®] su daugiakanale siurblio galva (Cole-Parmer Instruments Co., Ilinojus, JAV). *Ex vivo* tyrimams naudota 25–40 metų baltodžių moterų oda gauta po plastinių operacijų, atliktų Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Plastinės ir rekonstrukcinės chirurgijos klinikoje. Oda užšaldyta ir laikyta $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ne ilgiau kaip 6 mėnesius. Tyrimams su žmogaus oda gautas Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas (2008-11-05, Nr. BE-2-53). Mėginio, odos paruošimo ir nuėmimo procedūros atliktos pagal Kežutytės ir Žiliaus metodiką [94, 212].

2.3.6. Eksperimentinių pusiau kietų formų reologinių savybių tyrimas

Pusiau kietų formų reologinių savybių nustatymui atliktas tekėjimo tyrimas. Mėginių ($n=5$) reologinės savybės nustatytos naudojantis reometru Carri-med CSL² 500 (TA Instruments, New Castle, JAV), naudojant plokštės-kūgio geometrijos sistemą (kūgio skersmuo – 60 mm, kampas – 2° , mėginio storis – 150 μm), esant 25–30 $^\circ\text{C}$ plokštelės temperatūrai. Pasirinkta temperatūra buvo artima odos paviršiaus temperatūrai bei mėginių lydymosi temperatūrai, todėl tyrimo metu mėginių reologinės savybės buvo artimos mėginio vartojimo sąlygoms. Tokiomis sąlygomis nustatytos reologinės savybės leido tiksliau prognozuoti mėginio laikymo sąlygas, tinkamumo laiką bei tepumą. Deformacijos greitis 2 minutes didintas nuo 0 iki 500 s^{-1} . Duomenys apdoroti naudojantis programa Data Rheology Solutions Software (TA Instruments, New Castle, JAV).

Tipinė tirtų mėginių reograma pateikta 2.3.6.1 pav., kurioje matoma, kad didėjant poslinkio greičiui, poslinkio įtempis taip pat didėja. Tokio tipo reogramos būdingos mėginiams, pasižymintiems pseudoplastinėmis medžiagų savybėmis.



2.3.6.1 pav. Tipinė tirtų pusiau kietų formuluočių reograma

2.3.7. Eksperimentinių pusiau kietų formų stabilumo tyrimas

Stabilumo tyrimo metu eksperimentiniai mėginiai laikomi klimatinėje spintoje Climacell MMM-Group (Medcenter Einrichtungen GmbH, Brno, Čekija), esant 30 ± 2 °C temperatūrai ir 65 ± 5 proc. santykinei drėgmei. Mėginių stabilumas vertinamas 1 para po pagaminimo (0 mėnesių), praėjus 1, 3 ir 6 mėnesiams po pagaminimo. Stabilumas vertinamas pagal reologinių savybių tyrimą, pH, fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimą *in vitro*.

pH nustatymas. Pusiau kietų mėginių ($n=3$) pH nustatymui naudotas HD 2105.1 pH – metras (Delta OHM, Italija). Tirti pusiau kietų formų 5 proc. vandeniniai tirpalai. Cheminėje stiklinėje atitinkamas pusiau kieto mėginio kiekis užpilamas išgrynintuoju vandeniu ir mišinys maišomas ant magnetinės maišyklės IKAMAG® C-MAG HS7 30 min, esant 50 °C temperatūrai. Tirpalai vėsunami ir filtruojami pro popierinį filtrą Whatman™ 90 mm skersmens su 11 µm porų dydžiu (GE Healthcare Europe GmbH, Helsinkis, Suomija).

2.3.8. Antiradikalinio ir antimikrobinio aktyvumo nustatymas *in vitro*

Antiradikalinis aktyvumas. Gudobelių žiedų su lapais bei vaistinių melisų lapų ekstraktų suminis veikliųjų junginių antiradikalinis aktyvumas buvo nustatomas pagal DPPH radikalo surišimą. Pagamintas 0,1 mmol/l DPPH tirpalas 96 proc. etanolyje laikomas 24 valandas tamsioje, vėsioje vietoje. Įvairių skiedimų ekstraktų tirpalams reakcija ($n = 3$) atliekama vienkartinėje plastikinėje kiuvetėje Fisher Scientific UV Grade Disposable (Fisher Scientific, Pittsburgh, JAV). Į ją pilama 2,9 ml DPPH tirpalo ir 0,1 ml tiriamojo tirpalo. Reakcijos mišinio absorbcija spektrofotometru Agilent 8453 UV-Vis (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, JAV) matuojama prie 518 nm bangos ilgio praėjus 30 minučių nuo reakcijos pradžios. Rezultatai išreiškiami surišamo DPPH radikalo kiekiu procentais pagal Molyneux [128].

Antimikrobinis aktyvumas. Gudobelių žiedų su lapais, vaistinių melisų lapų ekstraktų ir pusiau kietų formuluočių antimikrobinis aktyvumas ($n = 5$) buvo nustatomas standžioje terpėje šulinėlių metodu aseptinėmis sąlygomis. Bakterijų atsparumas mėginiams buvo vertinamas Mueller-Hinton agarų gelyje (Mueller-Hinton Agar II, BBL, Cockeysville, JAV) naudojant standartines bakterijų kultūras: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 12459, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 8035 ir *Candida albicans* ATCC 60193. Mikroorganizmų

suspensija agarų gelyje pilama į sterilias 85 mm diametro (20 ml) Petri lėkštelės. Sustingusiame gelyje padaromi 7 mm vidinio diametro šulinėliai pripildomi sterilaus tiriamojo ekstrakto tirpalo (0,1 ml) ar pusiau kietos formos. Petri lėkštelės inkubuojamos 37 °C termostate. Po 24 valandų inkubavimo matuojamas skaidrios zonos skersmuo, susidaręs aplink šulinėlius esant antimikrobiniam aktyvumui. Preparatų atsparumas grybeliui vertinamas po 48 valandų inkubacijos.

2.3.9. Medaus savybių ir kokybės vertinimas

Įvairių rūšių medaus kokybė buvo vertinama pagal LR Žemės ūkio ministro 2000 m. sausio 10 d. įsakymą „Dėl medaus analizės metodų“ [213]. Taip pat buvo atliekama:

- mikrostruktūros įvertinimas atliktas mikroskopu Motic® (Motic China Group Co., Ltd., Kinija);
- laisvų fenolinių rūgščių nustatymas atliktas ESC metodu. Tyrimams buvo naudojami 30 proc. medaus tirpalai 60 proc. etanolyje. Paga-
minti tirpalai buvo filtruojami pro nailoninę membraninę filtrą (0,22 µm porų dydžio) ir analizuojami ESC metodu [79];
- reologinių savybių vertinimas reometru Carri med CSL 500 [186].

2.3.10. Statistinė analizė

Statistinis gautų tyrimų rezultatų įvertinimas buvo atliekamas naudojant programas SPSS 22.0 ir Microsoft Office Excel 2010. Tyrimų duomenų analizei taikytas vieno faktoriaus dispersinės analizės modelis (One-Way ANOVA), naudojant Tukey'o HSD (angl. *Honestly Significant Difference*) kriterijų arba blokuotųjų duomenų vieno faktoriaus dispersinę analizę (Repeated Measures ANOVA). Taip pat skaičiuoti imčių vidurkiai, santykiniai standartiniai nuokrypiai, standartinės paklaidos, Spearmen'o ranginės koreliacijos koeficientai. Visiems kriterijams nustatytas reikšmingumo lygmuo buvo $\alpha = 0,05$.

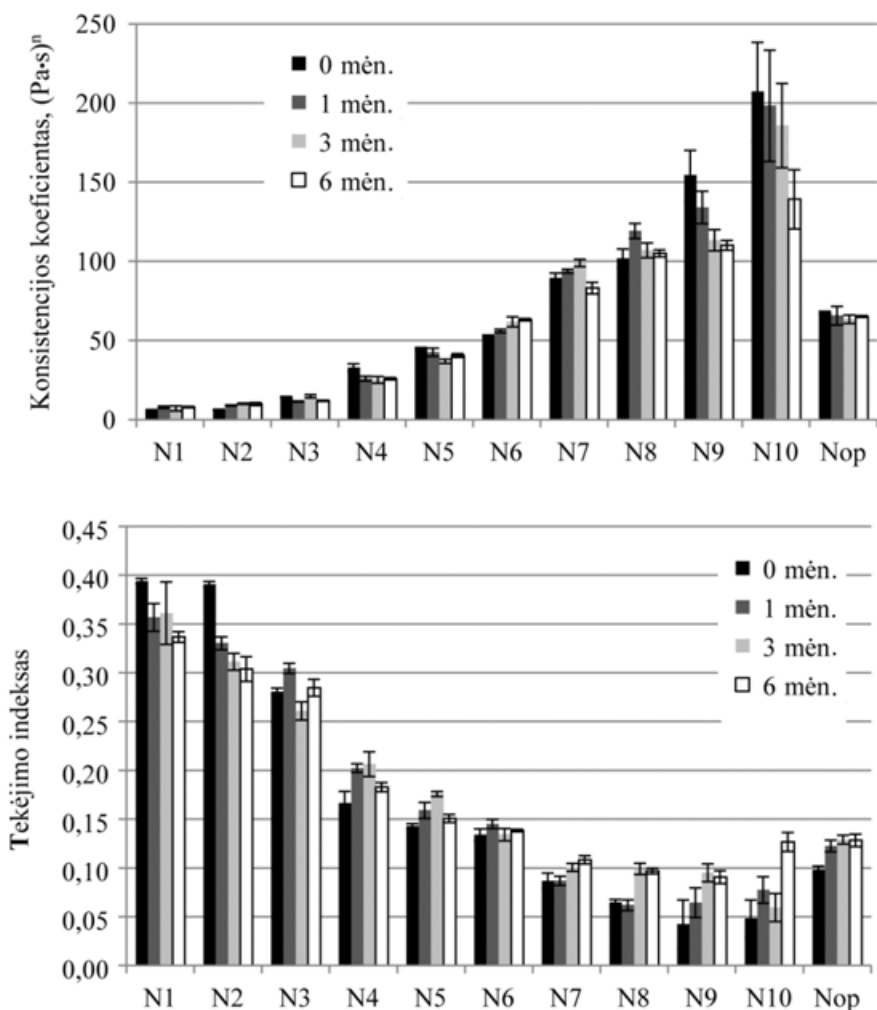
3. REZULTATAI

3.1. Pusiau kietų formuluočių pagrindų modeliavimas ir stabilumo vertinimas

3.1.1. Hidrofobinio (I grupė) tepalo pagrindo modeliavimas ir stabilumo vertinimas

Modeliuojant pusiau kietą hidrofobinį tepalo pagrindą pagrindiniais komponentais pasirinkti geltonasis bičių vaškas ir alyvuogių aliejus. Geltonasis bičių vaškas pasirinktas kaip tirštinanti medžiaga ir konsistenciją formuojantis komponentas. Pusiau kietų preparatų, tokių, kaip kremai, tepalai, lūpų balzamai, gamyboje bičių vaškas naudojamas, kaip konsistenciją suteikiantis ir nuo drėgmės netekimo saugantis komponentas. Įvertinus literatūros duomenis, nustatyta, kad pusiau kietose formulotėse bičių vaško naudojamas kiekis svyruoja nuo 5 iki 20 proc. [168]. Alyvuogių aliejus pasirinktas, kaip hidrofobinis skystis pasiskirstantis bičių vaške ir taip suformuojantis pusiau kieto preparato matricą. Alyvuogių aliejus pasirinktas įvertinus jo teigiamas savybes – gerai maišosi su kietomis medžiagomis, gyvulinės kilmės riebalais, vaškais, parafiniais. Modeliuojant tepalo pagrindą pasirinkti pagalbiniai komponentai – kietasis parafinas, baltasis vazelinas, kakavos aliejus, cholesterolis. Kietasis parafinas įdėtas kaip papildoma tirštinanti medžiaga. Vazelinas preparatui suteikia minkštumą ir pagerina tepumą. Kietasis parafinas ir vazelinas yra plėvelę ant odos formuojantys komponentai, saugantys odą nuo drėgmės netekimo [106]. Kakavos aliejus tepalui suteikia elastingumo, t. y. gerina tepumą, o cholesterolis naudojamas kaip emulsiklis ir stabilizuojanti medžiaga. Pusiau kietuose preparatuose, skirtuose vartoti ant odos, rekomenduojama cholesterolio naudoti nuo 0,3 iki 5 proc. [168].

Atsižvelgiant į ankstesnių tyrimų duomenis [188] parenkami pagalbinių medžiagų kiekiai ir varijuojant pagrindinių sudėtinių medžiagų kiekiais pagaminama N serija tepalų, kurių sudėtys pateiktos Prieduose 1 lentelėje (159 psl.). N serijos tepalų pH po 6 mėnesių stabilumo tyrimo svyravo nuo $5,1 \pm 0,1$ iki $5,8 \pm 0,3$. Nustatytos pH reikšmės rodo, kad visi N serijos tepalai yra tinkami vartojimui ant odos, nes atitinka fiziologinį odos pH intervalą, kuris yra nuo 4 iki 6,3 [6, 110]. N serijos tepalų stabilumas vertinamas vidutinio greičio senėjimo sąlygomis vertinant tepalų reologinių savybių pokyčius (3.1.1.1 pav.).



3.1.1.1 pav. *N serijos tepalų reologinių savybių pokyčiai stabilumo tyrimo metu*

Atlikus N serijos tepalų reologinių savybių tyrimą (3.1.1.1 pav.) nustatyta, kad didėjant bičių vaško kiekiui nuo 0,5 iki 14 proc. konsistencijos koeficientai didėja nuo 6,26 iki 207,17 (Pa·s)ⁿ, o tekėjimo indeksai mažėja nuo 0,3940 iki 0,0484. Bičių vaško kiekio didinimas tvirtina pusiau kietos formulotės struktūrą, kurios vidinių ryšių nutraukimui reikia didesnių deformuojančių jėgų. Atlikus koreliacinę analizę nustatyta, jog yra statistiškai reikšmingi stiprūs ryšiai tarp bičių vaško kiekio ir formuluočių reologinių savybių. Didėjant bičių vaško kiekiui konsistencijos koeficientai didėja, o tekėjimo indeksai mažėja.

Stabilumo tyrimo metu nustatyta, kad N9 ir N10 formuluotėse stebimas statistiškai reikšmingas konsistencijos koeficiento didėjimas ir tekėjimo indekso mažėjimas stabilumo tyrimo metu, rodantis, jog tepalas laikymo metu prarado pirminę struktūrą [151]. Įvertinus stabilumo tyrimo metu gautus rezultatus, tolimesniems tyrimams pasirinkta stabili N6 sudėtis:

Bičių vaškas 6,0
Kietasis parafinas 5,0
Baltasis vazelinas 5,0
Kakavos aliejus 10,0
Cholesterolis 3,0
Alyvuogių aliejus iki 100,0

3.1.2. Hidrofobinio (II grupė) tepalo pagrindo modeliavimas ir stabilumo vertinimas

Tolimesniame tyrimų etape kietasis parafinas ir baltasis vazelinas buvo keičiami kitomis pagalbinėmis medžiagomis. Atliktais reologinių savybių tyrimais nustatyta, kad kietasis parafinas gali būti keičiamas karnauba vašku, o baltasis vazelinas – įvairių rūšių medumi (grikių, eukaliptų, akacijų, rapsų bei miško) [187]. Tepalai su karnauba vašku suformavo pusketes struktūras, tačiau buvo nustatyta, kad karnauba vaško įvedimas suformuoja nevienalytės konsistencijos pagrindus, kurių organoleptinės savybės tepimo metu buvo nepriimtinos. Tolimesniuose tyrimuose buvo nuspręsta karnauba vaško atsisakyti ir pagrindine tirštinančia medžiaga pasirinkti bičių vašką.

Tyrimų rezultatais nustatyta, kad visos tirtos medaus rūšys gali būti naudojamos baltojo vazelino keitimui pusiau kietose formuluotėse [187]. Tolimesniuose tyrimuose siekiant išsamiau įvertinti bičių vaško ir medaus kiekio bei medaus rūšies įtaką pusiau kietų formuluočių reologinėms savybėms pasirinktos dvi medaus rūšys (akacijų ir miško), labiausiai besiskiriančios struktūrinėmis ypatybėmis: akacijų medus yra bekristalinis, o miško medus – kristalinis. Sumodeliuotos pusiau kietos formuluotės, kurių sudėtys pateiktos 3.1.2.1 lentelėje, besiskiriančios bičių vaško ir medaus kiekiais. Tepaluose M11–M15 buvo naudojamas miško medus, o tepalų M21–M25 modeliavimui – akacijų medus.

M11–M25 tepalų reologinių savybių tyrimais nustatyta, kad visiems tepalams buvo būdingos neniutoninių skysčių savybės. Iš pateiktų reologinių savybių tyrimų duomenų matoma (3.1.2.2 lentelė), kad formuluotės, kuriose buvo 15 proc. bičių vaško, pasižymėjo didžiausiais konsistencijos koeficientais ir mažiausiais tekėjimo indeksais visuose tirtuose temperatū-

riniuose režimuose. Temperatūros didinimas tolygiai silpnina sumodeliuotų formuluočių atsparumą deformuojančiai jėgai.

3.1.2.1 lentelė. Tepalų su skirtingų rūšių medumi sudėtys

Sudėtinė dalis / Tepalas	Bičių vaškas, g	Medus, g	Kakavos aliejus, g	Cholesterolis, g	Avokadų aliejus, g
M11/21	5,0	1,0	10,0	3,0	81,0
M12/22	5,0	10,0	10,0	3,0	72,0
M13/23	15,0	1,0	10,0	3,0	71,0
M14/24	15,0	10,0	10,0	3,0	62,0
M15/25	12,5	5,5	10,0	3,0	69,0

Tepalo koduotėje pirmasis skaičius reiškia medaus rūšį:

1 – miško medus; 2 – akacijų medus.

3.1.2.2 lentelė. Tepalų su skirtingų rūšių medumi reologinių savybių tyrimo rezultatai

Mėginys	Temperatūra ir reologinės savybės					
	20 °C		30 °C		40 °C	
	K, (Pa·s) ⁿ	n	K, (Pa·s) ⁿ	n	K, (Pa·s) ⁿ	n
M11	10,85	0,375	3,01	0,499	0,45	0,690
SE	0,31	0,004	0,08	0,005	0,02	0,008
M12	14,18	0,320	4,10	0,482	0,63	0,669
SE	0,78	0,050	0,12	0,005	0,02	0,004
M13	140,95	0,162	77,56	0,153	19,36	0,268
SE	7,33	0,008	1,64	0,002	1,53	0,012
M14	161,22	0,177	93,30	0,151	16,86	0,318
SE	9,73	0,011	2,32	0,005	2,41	0,022
M15	99,73	0,183	41,77	0,231	7,04	0,403
SE	5,10	0,005	2,58	0,007	0,41	0,008
M21	8,71	0,403	3,87	0,454	0,46	0,684
SE	0,26	0,005	0,14	0,006	0,02	0,005
M22	11,08	0,410	3,87	0,490	0,41	0,730
SE	0,87	0,012	0,23	0,011	0,01	0,002
M23	120,47	0,173	69,36	0,167	20,15	0,260
SE	5,23	0,006	1,93	0,001	2,21	0,017
M24	178,56	0,163	108,68	0,132	23,02	0,276
SE	5,17	0,006	4,55	0,003	2,49	0,016
M25	83,69	0,214	43,12	0,215	6,66	0,411
SE	1,20	0,010	2,31	0,005	0,33	0,007

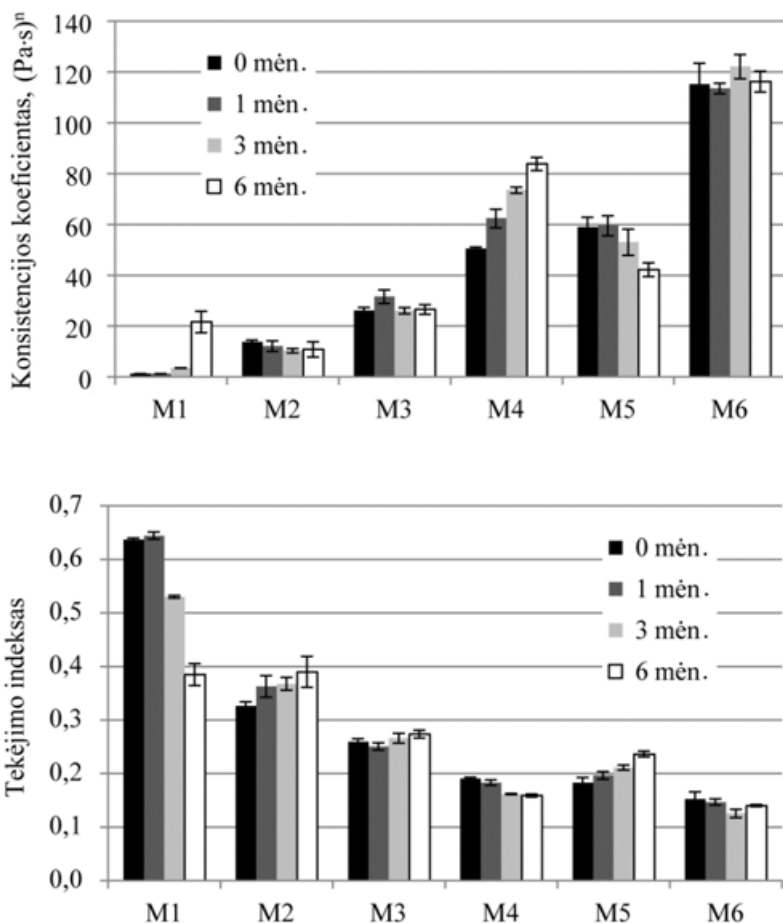
Konsistencijos koeficientas mažėjo, o tekėjimo indeksas didėjo temperatūrą keičiant nuo 20–40 °C (3.1.2.2 lentelė). Atlikta gautų duomenų statistinė analizė vertinant medaus rūšies, medaus kiekio ir bičių vaško kiekio įtaką formuluočių reologinėms savybėms. Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad medaus rūšis įtakos tepalų reologinėms savybėms neturi. Nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) skirtumas tik tarp 13 ir 23 mėginių konsistencijos koeficientų. Bičių vaško kiekis daro reikšmingą įtaką tepalų reologinėms savybėms, nes nustatyti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai tarp visų lygintų mėginių porų reologinių savybių.

Tuo tarpu medaus kiekio įtaka yra ribota, statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,05$) nustatyti tik tarp M13–M14 ir M23–M24 tepalų, reologinių savybių. Tai rodo, kad medus kaip pagalbinė tirštinanti medžiaga veikia tik esant tvirtai mėginio struktūrai.

Nustačius, kad medaus rūšis neturi įtakos formuluočių reologinėms savybėms tolimesniems tyrimams pasirinktas poliflorinis miško medus, kuris turi didesnę kiekį laisvų fenolinių rūgščių [162]. Pasirinktas 10 proc. medaus kiekis, kuris sudaro galimybes medų naudoti kaip medžiagą, darančią įtaką formuluočių struktūrai bei veikliąją medžiagą.

Įvertinus tyrimo rezultatus (3.1.2.2 lentelė) nustatyta, kad formuluočių reologinėms savybėms didžiausią įtaką darė bičių vaško kiekis, todėl tolimesniame tyrimų etape buvo sumodeliuota M serija tepalų, kurios sudėtys pateiktos Prieduose 2 lentelėje (159 psl.). M serijos formuluočių skyrėsi bičių vaško kiekis ir alyvuogių aliejaus kiekis atitinkamai. Visų kitų sudėtinių dalių kiekiai nekito. Buvo atliktas stabilumo tyrimas vertinant tepalų reologines savybes, o tyrimo rezultatai pateikti 3.1.2.1 pav.

Gauti tyrimų rezultatai (3.1.2.1 pav.) patvirtino ankstesnių tyrimų rezultatus, jog didėjant bičių vaško kiekiui nuo 5 iki 15 proc. didėja formuluočių konsistencijos koeficientai nuo 1,33 iki 129,40 (Pa·s)ⁿ bei mažėja tekėjimo indeksai nuo 0,6370 iki 0,1078. Atlikus koreliacinę analizę nustatyta, jog yra statistiškai reikšmingi stiprūs ryšiai tarp bičių vaško kiekio ir formuluočių reologinių savybių.



3.1.2.1 pav. *M serijos tepalų reologinių savybių pokyčiai stabilumo tyrimo metu*

Pritaikius blokuotųjų duomenų vieno faktoriaus dispersinę analizę (ANOVA), vertinti statistiškai reikšmingi reologinių savybių pokyčiai praėjus 1, 3 ir 6 mėnesiams po pagaminimo. Nustatyta, kad stabilūs buvo 2, 3 ir 6 tepalai (3.1.2.1 pav.), kuriuose bičių vaško kiekis atitinkamai buvo 7, 9, ir 15 g/100 g pagrindo. Tuo tarpu tepalai (1 ir 4), kuriuose bičių vaško kiekis atitinkamai buvo 5 ir 11 g/100 g, stabilūs buvo tik mėnesį laiko po pagaminimo. Tyrimais nustatyta, kad 5 tepalas, kuriame buvo 13 g bičių vaško, stabilus buvo tris mėnesius po pagaminimo (3.1.2.1 pav.). M serijos tepalų pH po 6 mėnesių stabilumo tyrimo kito nuo $4,4 \pm 0,1$ iki $5,3 \pm 0,1$. Nustatytos pH reikšmės rodo, kad visi M serijos tepalai yra tinkami vartojimui ant odos, nes atitinka fiziologinį odos pH intervalą [6, 110].

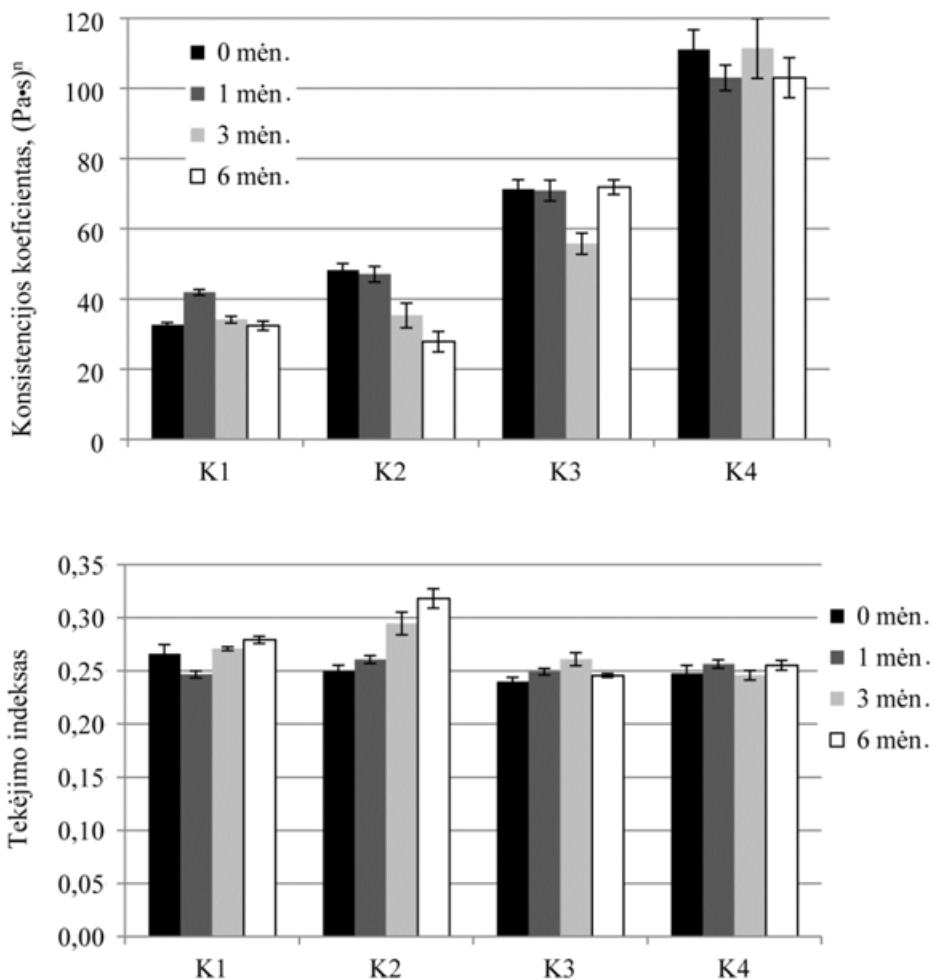
Įvertinus stabilumo tyrimo metu gautus rezultatus tolimesniems tyrimams pasirinkta stabili M6 sudėtis:

Bičių vaškas 15,0
Miško medus 10,0
Kakavos aliejus 10,0
Cholesterolis 3,0
Alyvuogių aliejus iki 100,0

3.1.3. Kremo vanduo aliejuje (v-a) pagrindo modeliavimas ir stabilumo vertinimas

Kremai yra minkštesnės konsistencijos nei tepalai, jie lengviau išimami iš talpyklės bei paskirstomi ant odos. Kremo sudėtyje yra hidrofilinė fazė, todėl jis geriau susigeria, palieka mažesnę riebumo jausmą lyginant su hidrofobiniais tepalais ir papildo odą lipofilinėmis molekulėmis [59]. Modeliuojant v-a kremą buvo siekiama išlaikyti pusiau kietų formuluočių linijos vientisumą, todėl pagrindinis sudėčių skirtumas lyginant su tepalais buvo įvesta hidrofilinė fazė – išgrynintasis vanduo. Proporcingai buvo mažinamas kito skystojo komponento – alyvuogių aliejaus, kiekis. Kremo sudėtyje pasirinktas mažiausias rekomenduojamas bičių vaško kiekis 5 proc. [168]. Tepalų sudėtyse buvęs cholesterolis, kaip stabilizuojanti medžiaga, modeliuojant kremą v-a atliko emulsiklio funkciją. Pagaminta K serija kremų, kurių sudėtys pateikiamos Prieduose 3 lentelėje (159 psl.). K serijos kremų sudėtyse kito išgrynintojo vandens, nuo 20 proc. iki 35 proc., ir alyvuogių aliejaus kiekiai, atitinkamai iki 100 proc. Sumodeliuotiems pagrindams buvo atliktas stabilumo tyrimas vertinant reologinių savybių pokyčius laikymo metu (3.1.3.1 pav.).

Atlikus reologinių savybių tyrimą su K serijos kremams iškart po pagaminimo nustatyta, kad pusiau kietuose preparatuose išgrynintojo vandens kiekį didinant nuo 20 iki 35 proc. formuluočių konsistencijos koeficientai didėja. Didėjant išgrynintojo vandens kiekiui atitinkamai mažėja alyvuogių aliejaus kiekis. Bendras skystųjų komponentų kiekis išlieka toks pats, tačiau yra žinoma, kad cholesterolis pasižymi higroskopinėmis, absorbcinėmis savybėmis [168], kurios lemia vandens surišimą, todėl mažėjant alyvuogių aliejaus kiekiui, pagrindų konsistencijos koeficientai didėja.



3.1.3.1 pav. *K serijos kremų reologinių savybių pokyčiai stabilumo tyrimo metu*

Verta pastebėti, kad nenustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,05$) tarp K serijos kremų tekėjimo indeksų, pamatuotų iškart po preparatų pagaminimo. Visų kremų tekėjimo indeksų reikšmės buvo apie 0,2500, tai rodo, kad K serijos kremų savybės panašiai nutolusios nuo niutoninių skysčių savybių. Atlikus koreliacinę analizę nustatyta, jog yra statistiškai reikšmingi tiesiškai stiprūs ryšiai tarp vandens kiekio ir formuluočių konsistencijos koeficiento. Spearman'o koreliacijos koeficientas tarp vandens kiekio ir kremų tekėjimo indeksų buvo tik $-0,46$, tai rodo, jog koreliacinis ryšys silpnas.

K serijos kremų pH po 6 mėnesių stabilumo tyrimo kito nuo $3,6 \pm 0,1$ iki $4,1 \pm 0,1$. Nustatytos pH reikšmės rodo, kad visi K serijos kremai yra tinkami vartojimui ant odos, nes atitinka fiziologinį odos pH intervalą [6, 110]. Pagrindų K1–K3 reologinės savybės laikymo metu kito (3.1.3.1 pav.), tai rodo, jog kremai stabilumo neišlaikė. Atlikus blokuotųjų duomenų dispersinę analizę nustatyta, kad vienintelio kremo pagrindo K4 reologinės savybės statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) nepakito per 6 mėnesių stabilumo tyrimo laikotarpį, todėl ši formuluoję pasirinkta tolimesniems tyrimams:

Bičių vaškas 5,0
Miško medus 10,0
Kakavos aliejus 10,0
Cholesterolis 3,0
Išgrynintasis vanduo 35,0
Alyvuogių aliejus iki 100,0

3.1.4. Hidrogelio pagrindo modeliavimas

Hidrogelio modeliavimui buvo pasirinkta natūrali brinkstanti medžiaga – natrio alginatas. Algininė rūgštis yra gaunama iš įvairių rūšių jūros dumblių, ji neutralizuojama natrio karbonatu ir taip gaunamas natrio alginatas [168]. Natrio alginatą brinkinant vandenyje gaunami įvairaus klampumo skysčiai priklausimai nuo natrio alginato ir išgrynintojo vandens santykio. Norint pagaminti natrio alginato hidrogelį būtina papildoma rišančioji medžiaga (angl. *cross-linker*), sukurianti cheminius ryšius tarp natrio alginato molekulių. Įvertinus mokslinę literatūrą, šia medžiaga pasirinktas kalcio chloridas [113]. Modeliuojant natrio alginato hidrogelį kritinis etapas yra parinkti tinkamą makromolekulės ir rišančiosios medžiagos santykį, bei jų įterpimo būdą. Išbandžius įvairius santykius nustatyta, kad hidrogelis susiformuoja esant 1 : 10 kalcio chlorido ir natrio alginato santykiui. Kalcio chloridas yra higroskopiška medžiaga [168], todėl hidrogelių gamybai patogiau naudoti jo tirpalą. Naudojant 10 proc. kalcio chlorido tirpalą, hidrogeliai gaminami santykiu 1 : 1.

Hidrogelio susiformavimas vertintas vizualiai, nes esant netinkamai parinktam makromolekulės ir rišančiosios medžiagos santykiui lieka negelifikuoto vandens arba gelifikacija neįvyksta. Pagamintų hidrogelių pH kito nuo $5,27 \pm 0,01$ iki $5,33 \pm 0,02$, ribose atitinkančiose fiziologinį odos pH [6, 110].

Modeliuojant pusiau kietų formuluočių pagrindus buvo įvertinta pagalbinių medžiagų įtaka pagrindų reologinėms savybėms. Nustatyta, kad labiausiai pagrindų konsistencijos koeficientus didino ir tekėjimo indeksus

mažino didėjantis bičių vaško kiekis. Įvertinus reologinių savybių pokyčių tyrimų rezultatus stabilumo tyrimų metu, tolimesniems tyrimams pasirinkti sumodeliuoti stabilūs du tepalų, kremų v-a ir hidrogelio pagrindai. Visų pagrindų pH buvo ribose atitinkančiose odos fiziologinį pH.

3.2. Medaus, gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktų charakteristika

3.2.1. Medaus fizikinių, cheminių, reologinių savybių bei fenolinių rūgščių kokybės ir kiekybės vertinimas

Fizikinės ir cheminės įvairių rūšių medaus savybės. Fizikinių ir cheminių savybių tyrimo metu buvo vertinta įvairių rūšių medaus organoleptinės savybės, bendras rūgštingumas, drėgmės kiekis, pH bei mikrostruktūra (3.2.1.1 lentelė).

3.2.1.1 lentelė. Įvairių rūšių medaus fizikinės ir cheminės savybės

Medaus rūšis	Spalva	Kvapas	Bendrasis rūgštingumas, meq/kg	Drėgmė (proc.)	pH	Mikrostruktūra
Grikių	Geltonai rudas	Specifinis, aštrus	24.17±0.60	19.1±0.1	3.97±0.02	
Eukaliptų	Geltonas	Švelnus	19.67±0.44	18.2±0.0	4.39±0.01	
Akacijų	Skaidrus, gelsvas	Silpnas, švelnus	11.33±0.33	19.1±0.1	3.86±0.01	
Rapsų	Gelsvai balkšvas	Rūgštus	14.17±0.67	20.2±0.0	3.76±0.01	
Miško	Geltonas	Švelnus, vaško kvapo	24.50±0.58	18.9±0.1	3.74±0.01	

Įvairių rūšių medaus spalva ir kvapas buvo vertinami subjektyviai, siekiant išskirti specifinėmis sensorinėmis savybėmis pasižyminčias medaus rūšis. Specifiniu kvapu ir spalva pasižymėjo grikių ir rapsų medūs. Medaus bendrasis rūgštingumas – tai bendras laisvų bei sujungtų organinių ir neorganinių rūgščių kiekis, esantis meduje [213]. Medaus bendrasis rūgštingumas ir drėgmės kiekis buvo nustatyti pagal 2000 m. sausio 10 d. Nr. 5 ŽŪM įsakymą „Dėl medaus analizės metodų“. Tyrimais nustatyta, kad didžiausiu bendruoju rūgštingumu pasižymi miško ir grikių medūs, o mažiausiu akacijų medus (3.2.1.1 lentelė). Visų tirtų mėginių bendrasis rūgštingumas atitiko nustatytas normas (ne daugiau 50 meq/kg) [44].

Fizikinių ir cheminių savybių tyrimų rezultatais nustatyta, kad tirtų medaus rūšių drėgmės kiekis svyravo nuo 18,2 iki 20,2 proc. Verta pažymėti, kad rapsų medus viršijo nustatytą leidžiamą 20 proc. normą [44]. Tirtų medaus rūšių pH tyrimu nustatyta, kad mažiausias pH reikšmes turi miško ir rapsų (3,74 ir 3,76 atitinkamai) medūs, o didžiausią – eukaliptų medus (3.2.1.1 lentelė).

Medaus mikrostruktūros tyrimu nustatyta, kad akacijų medus yra bekrystalinis, o miško medus pasižymi didžiausiomis kristalų sancaupomis. Kristalų dydis mažėja šia seka: grikių, eukaliptų ir rapsų medus (3.2.1.1 lentelė).

3.2.1.2 lentelė. Laisvų fenolinių rūgščių kiekiai įvairių rūšių meduje

Fenolinė rūgštis	Laisvų fenolinių rūgščių kiekis Vidurkis (µg/ml) ± SD				
	Akacijų medus	Aviečių medus	Grikių medus	Eukaliptų medus	Miško medus
Galo rūgštis	< LOD*	1,04 ± 0,03	< LOD	5,15 ± 0,04	0,77 ± 0,02
Chlorogeno rūgštis	0,75 ± 0,01	5,75 ± 0,05	18,40 ± 0,06	1,04 ± 0,05	79,11 ± 0,03
Vanilo rūgštis	< LOD	0,30 ± 0,01	2,31 ± 0,03	0,32 ± 0,21	8,05 ± 0,05
Kavos rūgštis	0,49 ± 0,02	0,23 ± 0,05	3,83 ± 0,04	0,38 ± 0,06	4,74 ± 0,06
p-kumaro rūgštis	3,67 ± 0,01	0,85 ± 0,08	43,68 ± 0,05	3,32 ± 0,02	2,15 ± 0,01
Rozmarino rūgštis	0,41 ± 0,03	0,44 ± 0,01	0,50 ± 0,03	0,53 ± 0,03	8,39 ± 0,02
Cinamono rūgštis	0,45 ± 0,05	0,02 ± 0,05	3,30 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,10 ± 0,06
Ferulo rūgštis	1,39 ± 0,01	0,75 ± 0,03	35,13 ± 0,02	2,01 ± 0,02	22,32 ± 0,03
Suminis fenolinių rūgščių kiekis	7,16	9,38	107,15	13,02	125,63

*LOD – detekcijos riba.

Laisvų fenolinių rūgščių kokybinė bei kiekybinė analizė įvairių rūšių meduje. Tiriamajame darbe medų siekta naudoti ir kaip veikliąją medžiagą, todėl buvo vertinama laisvų fenolinių rūgščių kokybinė ir kiekybinė sudėtis įvairiose medaus rūšyse, siekiant atrinkti medaus rūšis, kuriose nustatyti didžiausi fenolinių junginių kiekiai. Įvertinus literatūros duomenis nustatyta, kad įvairių rūšių meduje nustatoma įvairi kokybinė ir kiekybinė laisvų fenolinių rūgščių sudėtis [13,180].

Panaudojus išvystytą ir validuotą ESC metodiką [79], nustatyti fenolinių rūgščių kiekiai grikių, akacijų, aviečių, eukalipto ir miško medaus rūšyse (3.2.1.2 lentelė).

Tyrimo rezultatais nustatyta, kad mažiausiais tirtų fenolinių rūgščių kiekiais pasižymi aviečių, akacijų bei eukaliptų medus, o didžiausiais grikių ir miško medūs. Suminis nustatytų fenolinių rūgščių kiekis buvo 107,15 ir 125,63 $\mu\text{g/ml}$ grikių ir miško meduje atitinkamai, tačiau vyraujančios fenolinės rūgštys šiose medaus rūšyse įvairavo (3.2.1.2 lentelė).

Miško meduje vyravo chlorogeno ($79,11 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) ir ferulo ($22,32 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) rūgštys, grikių meduje *p*-kumaro ($43,68 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$), ferulo ($35,13 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$) bei chlorogeno ($18,40 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$) rūgštys. Eukaliptų medus pasižymėjo vidutiniu suminiu fenolinių rūgščių kiekiu ($13,02 \mu\text{g/ml}$), tačiau vyraujanti fenolinė rūgštis buvo galo rūgštis ($5,15 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$). Įvertinus tyrimo rezultatus galima teigti, kad meduje esančių laisvų fenolinių rūgščių kokybinė bei kiekybinė sudėtis priklauso nuo augalų rūšių, nuo kurių medus buvo surinktas. Įvertinus ESC tyrimo rezultatus ir siekiant medų naudoti kaip veikliąją medžiagą tolimesniems tyrimams galima rinktis miško arba grikių medų. Tyrimo rezultatai išsamiau aptarti straipsnyje „The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey“ (žr. Priedai).

Reologinės įvairių rūšių medaus savybės. Siekiant įvertinti medaus reologines savybes, atliktas įvairių medaus rūšių reologinių savybių tyrimas, esant skirtingoms temperatūroms. Gautoms reogramoms analizuoti tinkamiausias buvo Ostwald de Waele matematinis modelis, rodantis, kad visoms tirtoms medaus rūšims buvo būdingos pseudoplastinės, neniutoninių skysčių savybės. Tyrimų rezultatai nepatvirtino daugumos literatūros šaltinių, kurie teigia, kad skirtingos augalinės kilmės medaus rūšys pasižymi niutoninių skysčių savybėmis [27, 53, 86, 111, 130, 146, 192]. Kita vertus yra literatūros duomenų nurodančių, jog medus pasižymi pseudoplastinėmis savybėmis [53, 179] ar dilatacinėmis savybėmis [183].

Keičiant temperatūrą nuo 20 iki 50 °C visų medaus rūšių konsistencijos koeficientai mažėja, o tekėjimo indeksai didėja ir artėja prie niutoniniams skysčiams būdingų savybių, medus skystėja. Reologinių savybių tyrimu, esant 20 °C temperatūrai, nustatyta, kad didžiausi konsistencijos koefi-

cientai ($119,59 \pm 23,83$ ir $67,77 \pm 2,36$ (Pa·s)ⁿ) ir mažiausi tekėjimo indeksai ($0,52 \pm 0,04$ ir $0,56 \pm 0,01$) būdingi atitinkamai eukaliptų ir miško medui. Akacijų medus turi mažiausią konsistencijos koeficientą ($5,31 \pm 0,12$ (Pa·s)ⁿ) ir didžiausią tekėjimo indeksą ($0,94 \pm 0,00$) ir jo savybės artimiausios niutoniniams skysčiams.

Akacijų medus kambario temperatūroje yra bekristalinis (3.2.1.1 lentelė), o reologinių savybių tyrimas atskleidė, kad ši medaus rūšis patiria mažiausius struktūros pokyčius keliant temperatūrą. Gauti tyrimų rezultatai patvirtino literatūros duomenis, kad staigus reologinių savybių pasikeitimas temperatūros poveikyje yra susijęs su yrančiais / besilydančiais medaus kristalais [179]. Įvairių rūšių medaus fizikocheminės ir reologinės savybės plačiau aptartos straipsnyje „Examination of rheological and physicochemical characteristics in Lithuanian honey“ (žr. Priedai).

3.2.2. Gudobelių žiedų su lapais ekstraktų kokybinė ir kiekybinė sudėtis, antiradikalinio ir antimikrobinio aktyvumo tyrimai *in vitro* bei skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimai *ex vivo*

Tiriamajame darbe gudobelių žiedų su lapais ekstraktai pasirinkti kaip modelinės veikliosios medžiagos. Gudobelių žiedų su lapais ekstrakto vyraujantys fenoliniai junginiai pasižymi skirtingomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis (chlorogeno rūgštis ir viteksin-2"-O-ramnozidas yra santykinai hidrofiliniai junginiai, hiperozidas ir izokvercitrinas yra santykinai mažiau hidrofiliniai junginiai). Esant duomenų apie teigiamą gudobelių poveikį odai [73, 135], nutarta, kad tai tinkamos modelinės medžiagos įterpimui į pusiau kietas vaisto formas.

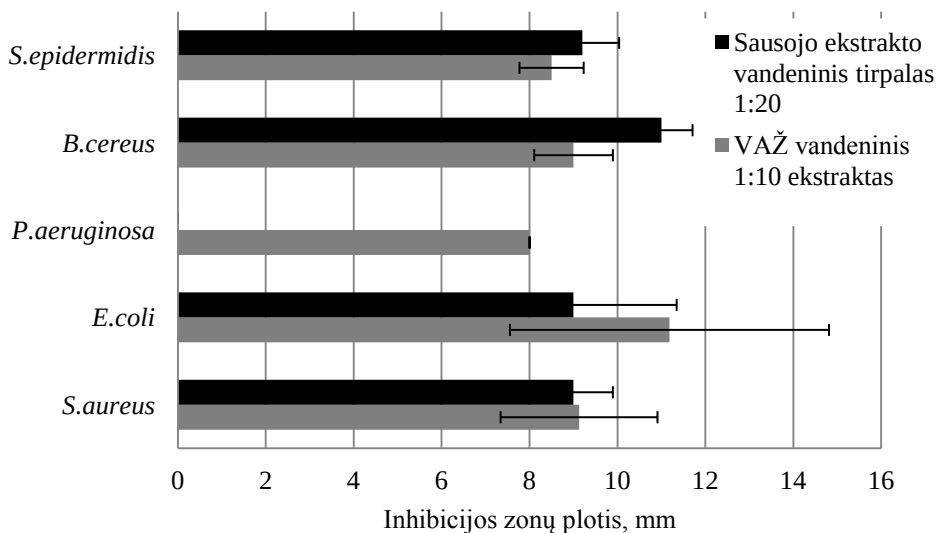
Pritaikius išvystytą ir validuotą ESC metodiką sausajame gudobelių ekstrakto nustatyti dominuojančių fenolinių junginių kiekiai bei bendras fenolinių junginių kiekis. Tyrimais nustatyta, kad sausajame gudobelių žiedų su lapais ekstrakto daugiausiai yra viteksin-2"-O-ramnozido ($23,00 \pm 1,38$ mg/g). Nustatyti mažesni kiekiai chlorogeno rūgšties ($7,91 \pm 0,52$ mg/g) ir mažiausi hiperozido ($3,65 \pm 0,43$ mg/g) bei izokvercitrino ($1,95 \pm 0,89$ mg/g) kiekiai. Vertinant bendrąjį fenolinių junginių kiekį pagal *p*-kumaro rūgšties ekvivalentą nustatyta, kad sausajame gudobelių žiedų su lapais ekstrakto yra $92,00 \pm 0,53$ mg/g fenolinių junginių.

Gudobelių žiedų su lapais vaistinė augalinė žaliava buvo ekstrahuota išgrynintuoju vandeniu 20 min ultragarso vonelėje santykiu 1 : 10 [122]. ESC metodu nustatyta gauto vandeninio ekstrakto kokybinė ir kiekybinė sudėtis. ESC tyrimo duomenimis nustatyta, kad gudobelių žiedų su lapais vaistinėje augalinėje žaliavoje vyrauja chlorogeno rūgštis $2,59 \pm 0,37$ mg/g,

viteksin-2"-O-ramnozidas $2,32 \pm 0,41$ mg/g, hiperozidas $0,68 \pm 0,17$ mg/g bei izokvercitrinas $0,33 \pm 0,17$ mg/g.

Siekiant įvertinti gudobelių ekstraktų galimą biologinį poveikį, atrinkti jautrius mikroorganizmus ir ekstraktų koncentracijas, pasižyminčias anti-radikalinio aktyvumu, atlikti antimikrobinio ir antiradikalinio aktyvumo tyrimai.

Antimikrobinis aktyvumas in vitro. Įvertinus mokslinės literatūros duomenis, nustatyta, kad gudobelių ekstraktai pasižymi antimikrobinio aktyvumu, tačiau aktyvumas prieš konkrečius mikroorganizmus skirtingų autorių darbuose yra nevienodas [25, 104, 190]. Mokslininkai tyrimuose naudojo skirtingas augalines žaliavas, skirtingus ekstrahentus bei skirtingas eksperimentines sąlygas, todėl tyrimų rezultatai yra tiesiogiai nepalyginami. Mūsų atlikto mikrobiologinio tyrimo metu buvo tiriami *Crataegus oxyacantha* L. žiedų su lapais sausojo ekstrakto vandeninis tirpalas 1 : 20 ir vandeninis 1 : 10 ekstraktas iš vaistinės augalinės žaliavos, kuriuose atitinkamai buvo 4,6 mg/ml ir 1,41 mg/ml fenolinių junginių pagal *p*-kumaro rūgšties ekvivalentą. Antimikrobinio aktyvumo tyrimais *in vitro* nustatyta, jog gudobelių ekstraktų veiklieji junginiai pasižymi antimikrobinio aktyvumu (3.2.2.1 pav.).



3.2.2.1 pav. Bakterijų augimo inhibicijos zonų plotis (mm), įskaitant šulinėlio skersmenį (7 mm), paveikus gudobelių žiedų su lapais ekstraktų tirpalais

Mikrobiologinio tyrimo metu buvo tiriamas mikroorganizmų jautrumas gudobelių žiedų su lapais ekstraktams. Ekstraktų tirpalai slopino *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* ir *S. aureus* padermių augimą, o VAŽ ekstraktas turėjo nežymų poveikį prieš *P. aeruginosa* bakterijų padermę. Tuo tarpu *P. mirabilis*, ir *C. albicans* mikroorganizmų padermės buvo atsparios abiejų gudobelių ekstraktų junginiams. Tyrimo rezultatai patvirtino Tadic ir kt.[190] rezultatus ir paneigė Orhan ir kt. [144] rezultatus, dėl gudobelių ekstraktų antimikrobinio aktyvumo prieš *C. albicans*. Didžiausią jautrumą (plačiausia inhibicijos zona) sausajam gudobelių ekstraktui turėjo *B. cereus* bakterijų padermė, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. O gudobelių žiedų su lapais VAŽ ekstraktas (1:10) statistiškai reikšmingą didžiausią aktyvumą rodė prieš *E.coli* bakterijų kultūrą.

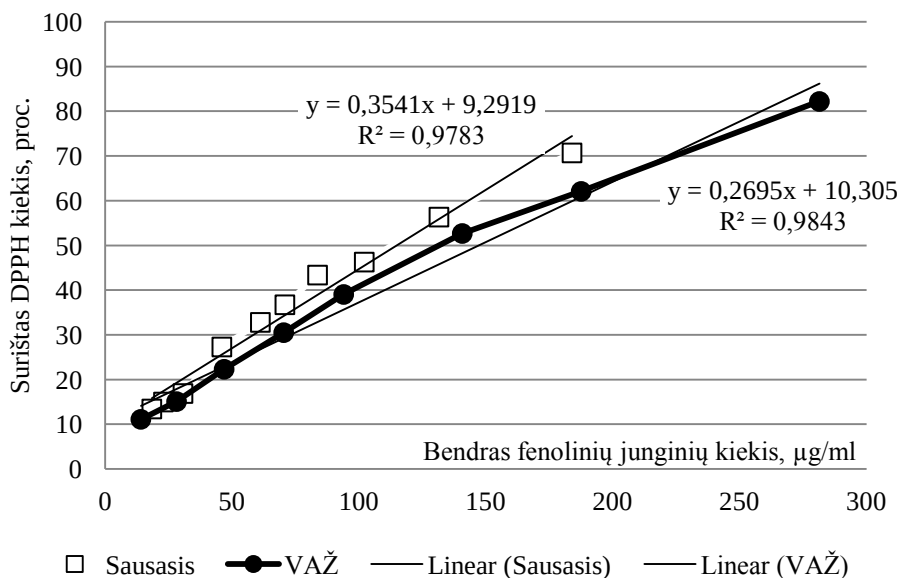
Lou ir kt. [115] tyrimais nustatė, kad chlorogeno rūgšties MIC prieš *S. aureus* bakterijų kultūrą yra 40 µg/ml, o prieš *E.coli* bakterijų kultūrą yra 80 µg/ml. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad gudobelių ekstraktų aktyvumas prieš *S. aureus* ir *E. coli* yra panašus.

Antiradikalinis aktyvumas in vitro su DPPH laisvuju radikalu. Surinkus mokslinės literatūros duomenis nustatyta, kad gudobelių žiedų su lapais ekstraktai pasižymi antiradikaliu aktyvumu, kuris nustatomas įvairiais metodais [24, 104, 177]. Skaitine verte DPPH antiradikalinis aktyvumas skirtingų autorių darbuose skiriasi dėl taikytų metodikų skirtumų, todėl tiesiogiai palyginti mokslinėje literatūroje nustatomų rezultatų negalima.

Atlikti sausojo (1 : 20) ir VAŽ (1 : 10) gudobelių žiedų su lapais vandinių tirpalų antiradikalinio aktyvumo tyrimo rezultatai patvirtino literatūros duomenis, jog gudobelių ekstraktai pasižymi antiradikaliu aktyvumu (3.2.2.2 pav.).

Įvertinus įvairių koncentracijų sausojo ir VAŽ gudobelių ekstraktų vandinių tirpalų DPPH laisvojo radikalo surišimą gautos regresijos lygtys (3.2.2.2 pav.). Pagal regresijos lygtis apskaičiuotas sausojo ir VAŽ ekstraktų tirpalų IC₅₀ atitinkamai buvo 115,0 µg/ml ir 147,3 µg/ml. Pagal tą pačią metodiką atlikus trolokso antiradikalinio aktyvumo tyrimą, nustatyta, kad 162 µg/ml trolokso suriša 50 proc. DPPH laisvojo radikalo. Tyrimais nustatyta, kad abiejų gudobelių ekstraktų veiklieji junginiai pasižymi didesniu antiradikaliu aktyvumu nei standartinis antioksidantas troloksas.

Biologinio aktyvumo tyrimų rezultatai patvirtino mokslinėje literatūroje paskelbtus duomenis [24, 190], jog gudobelių ekstraktai pasižymi antimikrobinėmis ir antiradikalinėmis savybėmis, todėl gali būti naudojami vietinio poveikio preparatų modeliavime.



3.2.2.2 pav. Gudobelių žiedų su lapais sausojo ekstrakto bendro fenolinių junginių kiekio įtaka DPPH laisvojo radikalo surišimui

Skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimai *ex vivo*. Siekiant nustatyti gudobelių žiedų su lapais fenolinių junginių skvarbos galimybes tyrimų metu ant žmogaus odos *ex vivo* buvo užnešti gudobelių ekstraktų bei gudobelių fenolinių junginių standartų mišinių mėginiai. Po 24 valandų tyrimo nustatyta, kad gudobelių fenoliniai junginiai į žmogaus odą nesiskverbia ir yra sulaikomi odos raginio sluoksnio.

Mokslinės literatūros duomenimis yra keletas junginių klasių, kurie gali įvairiais mechanizmais paskatinti kitų medžiagų skvarbą į odą [201]. Pasirinktos skirtingų klasių skvarbą skatinančios medžiagos (oleino rūgštis, d-lemoneno, propilenglikolio, metanolio) buvo įdėtos į tiriamuosius mišinius, tačiau tyrimu nustatyta, kad skvarbą skatinančios medžiagos nesukėlė jokio efekto – gudobelių fenoliniai junginiai į odą nesiskverbė.

Iškėlus hipotezę, kad gudobelių fenolinius junginius odos paviršiuje sulaiko viršutinis raginis odos sluoksnis, jis buvo pašalintas ir užneštos tiriamųjų bandinių begalinės dozės. *Ex vivo* skvarbos tyrimais nustatyta, kad po 24 valandų tyrimo epidermyje nustatyti hiperozido ir izokvercitrino pėdsakai, kurie buvo žemiau kiekybinio nustatymo ribos, o chlorogeno rūgštis bei viteksin-2"-O-ramnozido nenustatyta. Gautus rezultatus galima susieti su hiperozido ir izokvercitrino didesniu lipofiliškumu ($\log P$ yra 0,4), nei chlorogeno rūgštis ir viteksin-2"-O-ramnozido prognozuojamomis

hidrofilinėmis savybėmis, nes jų logP atitinkamai yra –0,4 ir –0,9. Prastą VOR skvarbą taip pat galėjo lemti santykinai didesnė molekulės masė ($M = 579$ Da) nei hiperozido ir izokvercitrino ($M=464$ Da).

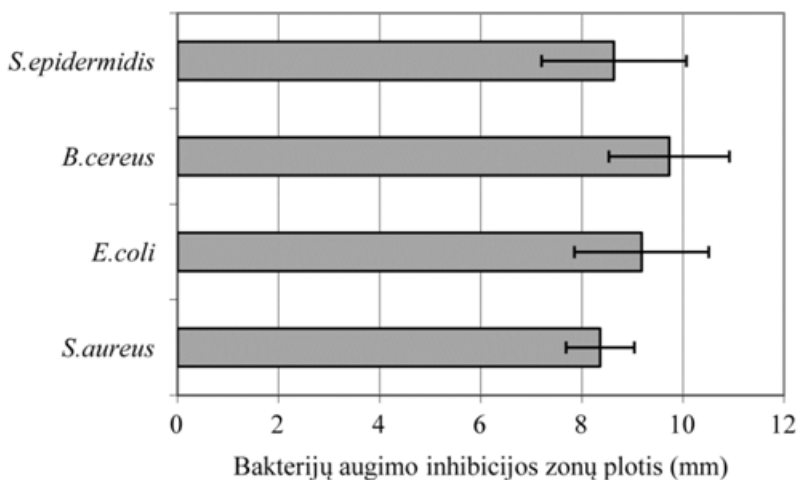
Įvertinus tyrimų rezultatus nustatyta, kad raginis sluoksnis nėra vienintelė priežastis lemianti tirtųjų junginių nesiskverbimą į odą. Galima daryti prielaidą, kad gudobelės fenolinių junginių skvarbai įtakos turi ir gyvasis epidermis, kurio lipofiliškumas didėja, artėjant prie raginio sluoksnio [89]. Įvertinus tyrimų rezultatus nustatyta, kad gudobelių žiedų su lapais fenoliniai junginiai į žmogaus odą nesiskverbia, o yra sulaikomi ant odos paviršiaus. Gauti rezultatai patvirtino mokslinės literatūros duomenis, kad į žmogaus odą skverbtis gali tik santykinai lipofilinės, mažamolekulinės medžiagos [89, 193, 205].

3.2.3. Vaistinių melisų (*Melissa officinalis* L.) lapų sausojo ekstrakto kokybinė ir kiekybinė sudėtis, antiradikalinio ir antimikrobinio aktyvumo tyrimai *in vitro* ir skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimas *ex vivo*

Sausajame vaistinių melisų lapų ekstrakto pagrindinis biologinis poveikis turintis junginys yra rozmarino rūgštis. Cheminiu požiūriu rozmarino rūgštis yra kavos rūgšties ir 3,4-dihidroksifenil pieno rūgšties esteris [10]. Panaudojus išvystytą ir validuotą kapiliarinės ESC metodiką nustatyta, kad sausajame vaistinių melisų lapų ekstrakto yra 80 ± 2 mg/g rozmarino rūgšties.

Surinkus literatūros duomenis nustatyta, kad vaistinių melisų ekstraktas pasižymi antimikrobinio aktyvumu [48, 125]. Dauguma autorių vertino eterinio aliejaus antimikrobinį aktyvumą, tačiau yra studijų, įvertinusių ir fenolines vaistinių melisų ekstrakto frakcijas. Vandeninis vaistinių melisų ekstraktas pasižymėjo aktyvumu prieš *S. lutea*, *S. aureus* ir *B.cereus* bakterijų kultūras, o MIC prieš šias bakterijas buvo 1,25 mg/ml [48]. Nustatyta, kad rozmarino rūgštis, išskirta iš vaistinių melisų vaistinės augalinės žaliavos, pasižymi bakteriostatinėmis savybėmis prieš *S. aureus*, *S. epidermidis* ir *B. spizizenii* mikroorganizmų kultūras, o bakteriocidinių savybių neturi [125].

Antimikrobinio tyrimo rezultatai patvirtino literatūros duomenis, kad sausojo vaistinių melisų (*Melissa officinalis* L.) lapų ekstrakto vandeninis tirpalas pasižymi antimikrobinio aktyvumu, nes bakterijų augimo inhibicijos zonų plotis buvo didesnis už šulinėlio plotį (3.2.3.1 pav.).

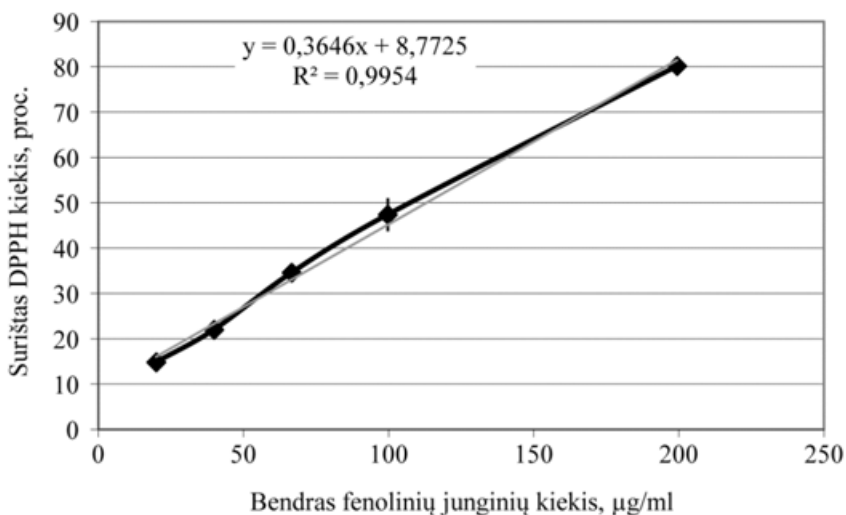


3.2.3.1 pav. *Bakterijų augimo inhibicijos zonų plotis (mm), įskaitant šulinėlio skersmenį (7 mm), paveikus vaistinių melisų lapų ekstrakto tirpalu*

Įvertinus antimikrobinio tyrimo rezultatus nustatyta, kad *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* bei *S. aureus* bakterijų kultūros yra jautrios melisų lapų sausojo ekstrakto vandeniniam tirpalui, tuo tarpu *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* ir *C. albicans* mikroorganizmų padermės buvo atsparios šiam ekstraktui. Nustatyti bakterijų augimo inhibicijos zonų pločiai buvo panašaus skersmens ir įvairavo nuo 8 iki 10 mm. Pritaikius statistinės analizės metodus nustatyta, kad nėra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp nustatytų mikroorganizmų jautrumo vaistinių melisų lapų ekstrakto tirpalui. Tyrimo rezultatai patvirtino literatūros duomenis, kad vandeniniam vaistinių melisų lapų ekstraktui jautrios *S. aureus*, *S. epidermidis* ir *B. cereus* bakterijų kultūros [48, 125].

Atlikus vaistinių melisų lapų sausojo ekstrakto antiradikalinio aktyvumo tyrimą *in vitro* (3.2.3.2 pav.) nustatyta, kad ekstraktas efektyviai suriša laisvąjį DPPH radikalą.

Įvertinus įvairių melisų lapų ekstrakto skiedimų įtaką DPPH laisvojo radikalo surišimui, sudaryta tiesinės priklausomybės kreivė ir regresijos lygtis. Pagal regresijos lygtį apskaičiuotas IC₅₀ buvo 113 µg/ml bendro fenolinių junginių kiekio, kai tuo tarpu trolokso IC₅₀ buvo 162 µg/ml. Kadem ir kt. atliktame tyrime buvo nustatyta, kad melisos ekstrakto IC₅₀ prieš DPPH laisvąjį radikalą buvo 48,76 µg/ml, tačiau autoriai vertino hidroalkoholinius (70 proc.) vaistinės melisos ekstraktus, kuriuose, tikėtina, buvo platesnis spektras fenolinių junginių [88]. Tyrimu nustatyta, kad vaistinių



3.2.3.2 pav. *Vaistinių melisų lapų sausojo ekstrakto vandeninio tirpalo bendro fenolinių junginių kiekio įtaka DPPH laisvojo radikalo surišimui*

melisų sausojo ekstrakto vandeninis tirpalas pasižymi didesniu antiradikalinio aktyvumu nei standartinis antioksidantas troloksas. Tyrimo rezultatai patvirtino literatūros duomenis, kuriuose rašoma, kad vaistinių melisų lapų ekstraktai pasižymi stipriu antiradikalinio ir antioksidacinio aktyvumu įvairiuose tyrimų modeliuose [10, 88].

Skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimas ex vivo. Vaistinių melisų lapų sausojo ekstrakto vandeninio tirpalo skvarbos tyrimu pro nepažeistą žmogaus odą *ex vivo* nustatyta, kad rozmarino rūgštis skverbiasi į epidermį. Epidermyje po 24 valandų tyrimo nustatyta $0,42 \pm 0,05$ proc. (arba $5,96 \pm 0,74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) rozmarino rūgšties, o dermoje nustatyti rozmarino rūgšties pėdsakai, kurie buvo žemiau kiekybinio nustatymo ribos.

Įvertinus įvairių rūšių medaus tyrimų rezultatus nustatyta, kad didžiausiais laisvų fenolinių rūgščių kiekiais pasižymi grikių ir miško medūs, grikių ir rapsų medaus rūšims būdingos specifinės sensorinės savybės, rapsų meduje esantis drėgmės kiekis viršija leistinas normas, o vienintelis akacijų medus yra bekristalinės struktūros ir su tuo susiję mažiausi reologinių savybių pokyčiai keičiant temperatūrą. Eukaliptų ir rapsų medaus rūšims būdingi didžiausi reologinių savybių pokyčiai keičiant temperatūrą.

Rapsų medaus rūšies buvo atsisakyta, nes jis neatitiko norminių reikalavimų (drėgmės kiekis virš 20 proc.), o eukaliptų meduje nustatytas vienas mažiausių fenolinių rūgščių kiekis. Akacijų meduje fenolinių rūgščių buvo

dar mažiau, tačiau ši medaus rūšis palikta tolimesniems tyrimams, nes vienintelė iš pasirinktų tirti medaus rūšių buvo bekrystalinės struktūros.

Modeliuojant pusiau kietas formuluotes su medumis tyrimų eigoje grikių medaus buvo atsisakyta, nes jo struktūrinės galimybes pakeisti baltąją vazeliną buvo silpniausios. Sumodeliuotos pusiau kietos formuluotės pasižymėjo mažiausiais konsistencijos koeficientais ir didžiausiais tekėjimo indeksais lyginant su kitų rūšių medumis [187]. Grikių medus pasižymėjo išskirtinėmis sensorinėmis savybėmis, aštriu kvapu. Kita vertus, tyrimais su pusiau kietomis formuluotėmis, kuriose įterptas akacijų ir miško medūs nustatyta, jog šios dvi medaus rūšys daro vienodą įtaką formuluočių reologinėms savybėms (3.1.2 skyrius, 3.1.2.1 lentelė). Iš pastarųjų dviejų medaus rūšių tolimesniems tyrimams pasirinkta miško medaus rūšis, kurioje buvo nustatyti didžiausi laisvų fenolinių rūgščių kiekiai.

Biologinio aktyvumo tyrimais *in vitro* nustatyta, kad gudobelių žiedų su lapais ir melisų lapų ekstraktai pasižymi antimikrobiniu aktyvumu prieš *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* bei *S. aureus* bakterijų kultūras. Antiradikalinio aktyvumo tyrimais nustatyta, kad visi tirtieji ekstraktai pasižymėjo stipreniu antiradikaliu aktyvumu nei standartinis antioksidantas troloksas.

Vertinant gudobelių žiedų su lapais ekstraktų fenolinių junginių skvarbą į žmogaus odą tyrimais *ex vivo*, nustatyta, kad fenoliniai junginiai į žmogaus odą nesiskverbia ir yra sulaikomi ant odos paviršiaus. Tyrimų rezultatai gali būti sietini su santykinai hidrofilinėmis gudobelių žiedų su lapais ekstrakto fenolinių junginių savybėmis. Tuo tarpų rozmarino rūgštis, esanti melisų lapų ekstraktoje, į žmogaus odą skverbėsi. Po 24 valandų tyrimo dermoje buvo nustatyti rozmarino rūgšties pėdsakai, o epidermyje – kiekybiškai įvertinami kiekiai.

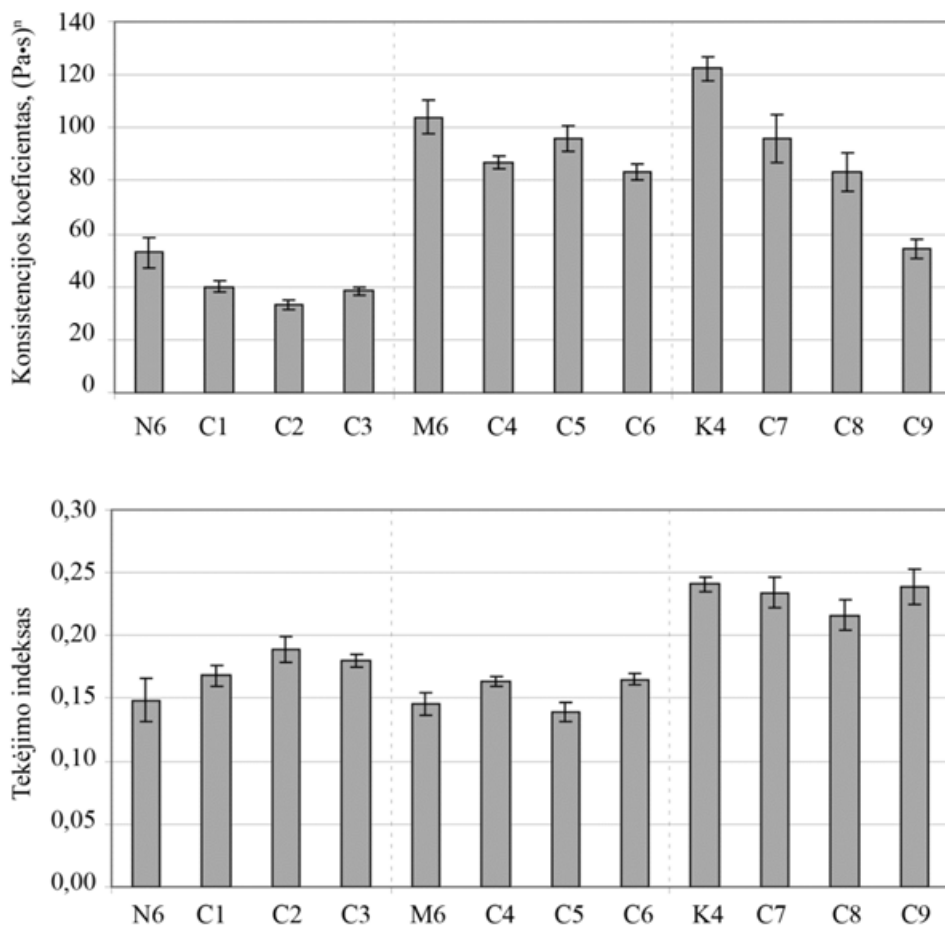
3.3. Pusiau kietų preparatų su modelinėmis veikliosiomis medžiagomis modeliavimas ir kokybės vertinimas

Ankstesnių tyrimų metu sumodeliavus natūralios kilmės stabilūs pusiau kietus pagrindus tolimesniuose tyrimuose įterpiamos modelinės veikliosios medžiagos – gudobelių žiedų su lapais ar vaistinių melisų lapų ekstraktai.

Ekstraktai pasirinkti siekiant išlaikyti natūralumo liniją bei dėl skirtingų pagrindinių veikliųjų junginių fizikinių ir cheminių savybių. Sausajame gudobelių žiedų su lapais ekstrakto vyraujantys chlorogeno rūgštis ($M = 354$ Da) bei viteksin-2"-O-ramnozidas ($M = 579$ Da) yra silpnai hidrofiliniai junginiai ($\log P$ $-0,4$ ir $-0,9$ atitinkamai) [137, 138], hiperozidas ir izokvercitrinas ($M = 464$ Da) yra silpnai hidrofobiniai junginiai ($\log P$ $0,4$) [139, 140], o vaistinių melisų lapų sausajame ekstraktoje esanti rozmarino rūgštis ($M = 360$ Da) yra hidrofobinis junginys ($\log P$ $2,4$) [141].

3.3.1. Sausuojo gudobelių žiedų su lapais ekstrakto (C serija) įtakos stabilių pagrindų reologinėms savybėms tyrimas

Modeliuojant pagrindus (3.1 skyrius) buvo atrinktos trys stabilios sudėtys: hidrofobiniai tepalai (N6, M6) ir kremas v-a tipo (K4). Į hidrofobinio tepalo N6 sudėtį įterpus 0,5, 1 ir 2 proc. gudobelių sausojo ekstrakto buvo atitinkamai pagamintos C1–C3 formulės. Tokie pat kiekiai gudobelių sausojo ekstrakto buvo įterpti ir į M6 ir K4 pagrindus ir atitinkamai pagamintos C4–C6 ir C7–C9 formulės. C serijos formuluočių sudėtys pateiktos prieduose 4 lentelėje (160 psl.). Gudobelių ekstraktą buvo nuspręsta įvesti nedideliais kiekiais, siekiant įvertinti jo daromą įtaką pusiau kietų pagrindų reologinėms savybėms (3.3.1.1 pav.).



3.3.1.1 pav. Sausuojo gudobelių ekstrakto pridėjimo į pagrindus (N6, M6, K4) įtaka pusiau kietų formuluočių reologinėms savybėms

Atlikus reologinių savybių tyrimą nustatyta, kad sausojo gudobelių žiedų su lapais ekstrakto įvedimas į atrinktus pusiau kietus pagrindus mažina konsistencijos koeficientus bei didina tekėjimo indeksus. Atlikus statistinę vieno faktoriaus ANOVA analizę nustatyta, kad statistiškai reikšmingai nuo atitinkamų pagrindų skiriasi mėginių C2, C3, C6, C8 bei C9 konsistencijos koeficientai, o tarp tekėjimo indeksų statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Tyrimų rezultatai rodo, kad gudobelių sausojo ekstrakto įvedimas į pusiau kietus pagrindus mažina formuluočių konsistencijos koeficientus, todėl formuluočių silpniau priešinasi deformuojančiai jėgai ir lengviau tepasi.

3.3.2. Sausojo gudobelių žiedų su lapais ekstrakto fenolinių junginių atpalaidavimo iš pusiau kietų preparatų tyrimas *in vitro*

3.3.2.1. Gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimas iš C serijos ir P serijos formuluočių

Į sumodeliuotus stabilius pagrindus (3.1 skyrius, N6, M6, K4) įterpus gudobelių sausąjį ekstraktą gauta C serija tepalų (Priedai, 4 lentelė, 160 psl.). Atlikus 6 valandų fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimą *in vitro* iš C serijos tepalų nustatyta, kad nei viena formuluočių fenolinių junginių neatpalaiduoja. Buvo iškelta hipotezė, kad pagrindo pagalbinės medžiagos stabdo fenolinių junginių atpalaidavimą iš pagamintų formuluočių. Hipotezės patikrinimui suformuota P serija formuluočių, kurių sudėtinės dalys pateiktos 3.3.2.1.1 lentelėje.

Formuluotėse P1–P6 buvo naudojami tokie patys sudėtiniai komponentai, kaip M serijos tepaluose (bičių vaškas, medus, kakavos aliejus, cholesterolis ir alyvuogių aliejus bei gudobelių sausasis ekstraktas). P1–P3 sudėtys atitiko M1–M3 sudėtis, jomis buvo siekiama patikrinti ar gudobelių fenoliniai junginiai yra atpalaiduojami bičių vaško kiekį sumažinus nuo 15 g iki 5–9 g. Atpalaidavimo tyrimu nustatyta, jog po 6 valandų tyrimo iš P1–P3 tepalų atpalaiduotų junginių nebuvo, todėl buvo pagaminta sudėtis P4, kurioje bičių vaško kiekis atitiko atrinktos stabilios M6 sudėties bičių vaško kiekį, tačiau buvo pašalinti pagalbiniai tekstūrą gerinantys komponentai. Mėginyje P4 buvo paliktas tik bičių vaškas, alyvuogių aliejus bei sausasis ekstraktas. Pagalbinių komponentų (medaus, kakavos aliejaus, cholesterolio) pašalinimas įtakos neturėjo ir atpalaidavimo nepagerino – atpalaiduotų junginių nenustatyta.

3.3.2.1.1 lentelė. P serijos formuluočių sudėtys (g) gudobelių ekstrakto fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimui *in vitro*

Mėginys	Bičių vaškas	Sviestmedžio aliejus	Cholesterolis	Miško medus	Kakavos aliejus	Alyvuogių aliejus	Sausasis ekstraktas	Sausojo ekstrakto vandeninis tirpalas (1 : 20)	Išgrynintasis vanduo
P1	5,0	\	3,0	10,0	10,0	62,0	10,0	\	\
P2	7,0	\	3,0	10,0	10,0	60,0	10,0	\	\
P3	9,0	\	3,0	10,0	10,0	58,0	10,0	\	\
P4	15,0	\	\	\	\	75,0	10,0	\	\
P5	\	90,0	\	\	\	\	10,0	\	\
P6	\	15,0	3,0	10,0	10,0	52,0	10,0	\	\
P7	5,0	\	3,0	10,0	10,0	37,0	\	35,0	\
P8	5,0	\	3,0	10,0	10,0	35,25	1,75*	\	35,0
P9	\	25,0	3,0	10,0	\	25,25	1,75	\	35,0
P10	\	25,0	3,0	10,0	\	27,0	\	35,0	\

*Fenolinių junginių kiekis esantis 1,75 g sausojo gudobelių žiedų su lapais ekstrakto atitinka 35,0 g 1 : 20 tirpintame ekstrakto esantį fenolinių junginių kiekį.

\ – komponento sudėtyje nėra.

Tuomet buvo nuspręsta bičių vašką pakeisti kitu komponentu – sviestmedžio aliejumi. Sviestmedžio aliejus pasirinktas dėl daugelio teigiamų savybių odai, tokių kaip apsaugančių nuo drėgmės netekimo, minkštinančių (emolientas), uždegimą mažinančių savybių [77]. Mėginys P5, kuriame buvo tik sviestmedžio aliejus ir gudobelių sausasis ekstraktas, buvo pagamintas siekiant įvertinti sviestmedžio aliejaus daromą įtaką gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimui. Tyrimu nustatyta, kad po 6 valandų eksperimento iš P5 tepalo buvo atpalaiduota 2,5 proc. viteksin-2"-O-ramnozido. Mėginys P6 buvo sumodeliuotas stabilios M6 sudėties pagrindu, kuriame bičių vaškas pakeistas sviestmedžio aliejumi. Atpalaidavimo tyrimu nustatyta, kad po 6 valandų eksperimento yra atpalaiduojama 8,5 proc. chlo-rogeno rūgšties, 37,4 proc. viteksin-2"-O-ramnozido, 13,5 proc. hiperozido ir 9,9 proc. izokvercitrino.

Emulsiniai v-a mėginiai P7-P10 buvo sumodeliuoti K serijos mėginių pagrindu (Priedai, 3 lentelė, 159 psl.). P7 ir P8 buvo pagaminti atrinkto stabilaus K4 mėginio pagrindu, į kurį toks pat fenolinių junginių kiekis buvo įvestas dviem būdais. Mėginyje P7 gudobelių fenoliniai junginiai buvo vandeninėje fazėje, o P8 – aliejinėje fazėje. Atlikus atpalaidavimo tyrimą *in vitro* nustatyta, kad po 6 valandų eksperimento fenoliniai junginiai nei iš

vieno mėginio nebuvo atpalaiduoti. Analogiškai buvo sumodeliuoti mėginiai P9 ir P10, tik juose bičių vaškas pakeistas sviestmedžio aliejumi. Atpalaidavimo tyrimu *in vitro* nustatyta, kad po 6 valandų eksperimento atpalaiduojama 26,8 proc. ir 22,4 proc. chlorogeno rūgšties, 23,8 proc. ir 19,4 proc. vitekisin-2"-O-ramnozido, 28,9 proc. ir 0 proc. hiperozido ir izokvercitrino pėdsakai atitinkamai iš P9 ir P10 mėginių.

Tyrimais nustatyta, kad pagrindo pagalbinės medžiagos turi įtakos gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimui. Tyrimais nustatyta, kad tinkamesnis gudobelių sausojo ekstrakto įvedimo būdas yra sausąjį ekstraktą disperguoti aliejinėje fazėje. P mėginių serijos atpalaidavimo tyrimais nustatyta, kad sviestmedžio aliejus yra tinkamas komponentas bičių vaško pakeitimui pusiau kietuose preparatuose, neribojantis gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimo.

Įvertinus P serijos formuluočių atpalaidavimo tyrimo rezultatų duomenis, buvo iškelta hipotezė, kad gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimą ribojantis veiksnys yra bičių vaškas. Siekiant patikrinti šią hipotezę buvo sumodeliuota AV serija mėginių.

3.3.2.2. Gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimas iš AV serijos mėginių

Šiame tyrimų etape buvo vertinama bičių vaško kiekio įtaka gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimui. Sumodeliuota AV serija mėginių, besiskirianti bičių vaško (0–5 proc.) ir alyvuogių aliejaus kiekiais. Serijos mėginiuose nebuvo pagalbinių pusiau kietų formuluočių tekstūrą gerinančių komponentų, siekiant išvengti galimos šių komponentų įtakos gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimui.

Tyrimo rezultatai išsamiai aptarti straipsnyje „Application of dry hawthorn (*Crateagus oxyacantha* L.) extract in natural topical formulations“ (žr. Priedai). *In vitro* atpalaidavimo tyrimu nustatyta, kad 0,5 proc. bičių vaško neturi įtakos gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimui po 6 valandų tyrimo, nes formuluočių be bičių vaško ir su 0,5 proc. bičių vaško atpalaidavo panašius fenolinių junginių kiekius, atitinkamai 318,5 ir 337,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Tuo tarpu 1 proc. bičių vaško statistiškai reikšmingai sumažina atpalaiduotų junginių kiekius (66,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) lyginant su formuluočių be bičių vaško. Gudobelių fenoliniai junginiai nebuvo atpalaiduoti iš mėginių, kurių sudėtyse buvo 1,5–5 proc. bičių vaško. Kiti M serijos puskiečių formuluočių komponentai gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimą sulėtina, tačiau jų suminis efektas nėra tiek reikšmingas kaip bičių vaško įtaka. Tyrimo rezultatai patvirtino hipotezę, kad pagrindinis gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimą ribojantis veiksnys yra bičių vaškas ir pusiau kietose

formuluotėse su gudobelių ekstraktu jis turėtų būti keičiamas kita tirštinančia medžiaga.

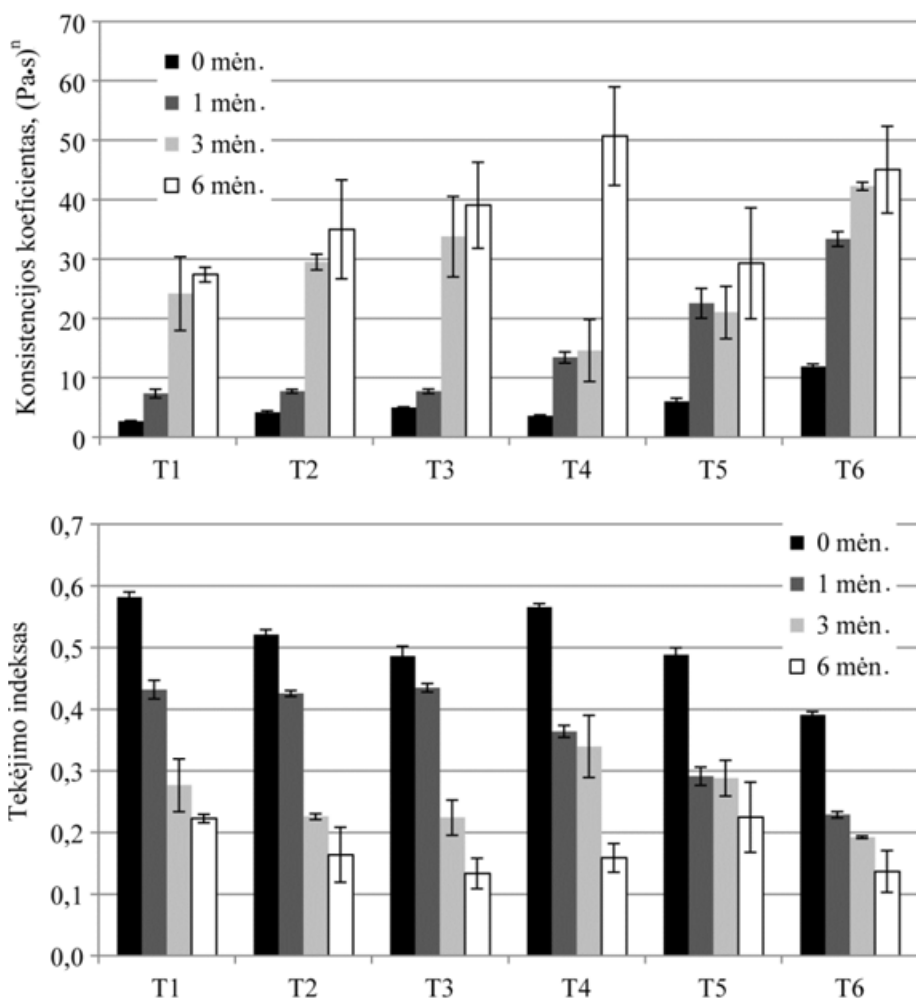
3.3.3. Hidrofobinių tepalų su sviestmedžio aliejumi ir sausuoju gudobelių žiedų su lapais ekstraktu (T serija) modeliavimas ir stabilumo tyrimai

Stabilumo tyrimas pagal reologines charakteristikas ir pH. Atsižvelgiant į aukščiau pateiktų tyrimų duomenis (C, P, AV mėginių serijų tyrimų rezultatais pateiktais 3.3.2 skyriuje), bičių vaškas keičiamas sviestmedžio aliejumi. Sviestmedžio aliejus yra augalinis aliejus gaunamas iš sviestmedžio (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.) sėklų. Sviestmedžio aliejaus lydymosi temperatūra yra 32–45 °C [66].

Sumodeliuota serija (T serija) tepalų, besiskiriančių sviestmedžio aliejaus ir bičių vaško kiekiais (Priedai, 5 lentelė, 160 psl.), kuriose naudojamas bičių vaško kiekis ne didesnis kaip 1 proc. Atlikto stabilumo tyrimo rezultatai pagal reologines charakteristikas pateikti 3.3.3.1 pav. Įvertinus, kad sumodeliuotų formuluočių lydymosi temperatūra yra žemesnė nei 30 °C, stabilumo tyrimo metu formuluotės buvo laikomos kambario temperatūroje, o reologinės savybės nustatytos esant 25 °C temperatūrai.

Reologinių savybių vertinimas buvo atliktas pagrindams (T1–T3) ir formuluotėms su sausuoju gudobelių žiedų su lapais ekstraktu (T4–T6). Tyrimu iškart po formuluočių pagaminimo nustatyta, kad tepalo be bičių vaško (T4) reologinėms savybėms sausojo gudobelių ekstrakto įvedimas įtakos neturėjo, tuo tarpu tepalui su 1 proc. bičių vaško (T6) nustatyti statistškai reikšmingi ($p < 0,05$) pokyčiai konsistencijos koeficiento bei tekėjimo indekso reikšmėse. Tepalui su 0,5 proc. bičių vaško (T5) sausojo gudobelių ekstrakto įvedimas statistškai reikšmingai padidino konsistencijos koeficientą. Bičių vaškas, kaip tirštinanti medžiaga tolygiai pasiskirstanti formuluotėje gali veikti kaip kietųjų dalelių stabilizatorius [123], todėl didėjant bičių vaško kiekiui, sausojo ekstrakto įvedimas tvirtina formuluotės struktūrą ir ji tampa atsparesnė deformuojančiai jėgai.

Atlikus T serijos mėginių 6 mėnesių stabilumo tyrimą nustatyta, kad laikymo metu mėginių konsistencijos koeficientai didėja, o tekėjimo indeksai mažėja. Konsistencijos koeficiento didėjimas laikymo metu gali būti sietinas su sudėtinių dalių netekimu [68], tačiau nagrinėjami preparatai jokių lakių junginių sudėtyse neturėjo, todėl ši priežastis mažai tikėtina. Kita priežastis, lemianti tokius reologinių savybių pokyčius, gali būti preparato vidiniai struktūriniai pokyčiai [159], rodantys jog preparato vidiniai ryšiai tvirtėja ir juos nutraukti reikia didesnės deformuojančios jėgos.



3.3.3.1 pav. *T serijos tepalų reologinių savybių pokyčiai stabilumo tyrimo metu*

Atlikus statistinę blokuotųjų duomenų vieno faktoriaus dispersinę analizę nustatyta, kad visų tirtųjų formuluočių konsistencijos koeficientai statistiškai reikšmingai padidėjo, o tekėjimo indeksai statistiškai reikšmingai sumažėjo per 6 mėnesių stabilumo tyrimo laikotarpį. T serijos tepalų stabilumo tyrimu pagal reologinių savybių pokyčius nustatyta, jog laikymo metu šie tepalai nestabilūs.

Stabilumo tyrimo metu formulotėms vertintas pH rodiklis tepalui T4 kito nuo $4,44 \pm 0,06$ iki $4,66 \pm 0,02$, tepalui T5 kito nuo $4,45 \pm 0,06$ iki $4,68 \pm 0,04$, o tepalui T6 kito nuo $4,47 \pm 0,02$ iki $4,84 \pm 0,01$. pH reikšmių tyrimu

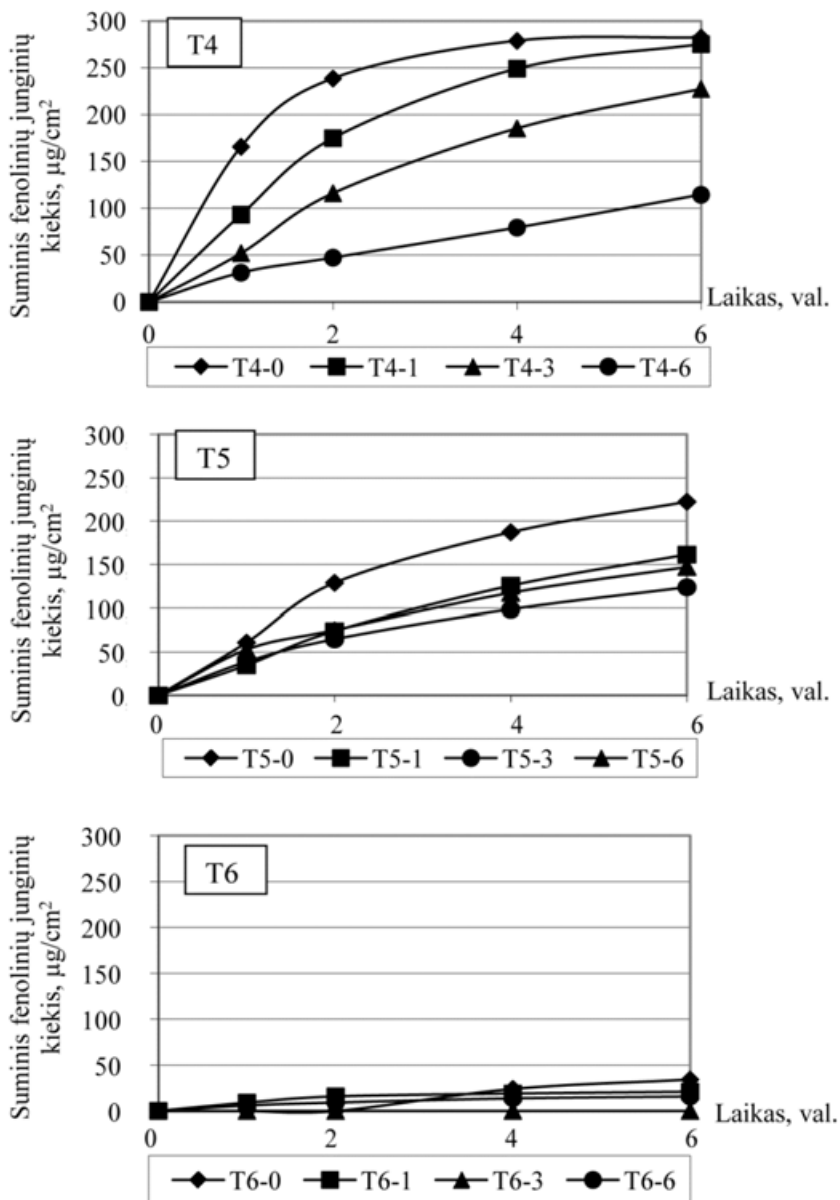
nustatyta, kad laikymo metu pH rodiklis didėja, tačiau vertinant priimtinių vartoti ant odos produktų pH leidžiamas ribas [6, 110] pokyčiai nėra reikšmingi.

Stabilumo tyrimas pagal gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimą in vitro. Laikymo metu gali kisti ne tik formuluočių vidinė struktūra, bet ir veikliųjų medžiagų atpalaidavimas, todėl stabilumo tyrimo metu yra svarbu įvertinti veikliųjų medžiagų atpalaidavimą tyrimu *in vitro*. Vertinti T serijos tepalai T4–T6, kurių sudėtyse buvo sausojo gudobelių ekstrakto (2 proc.). Gudobelių ekstrakto suminis fenolinių junginių atpalaidavimas iš sumodeliuotų formuluočių pateiktas 3.3.3.2 pav.

Atpalaidavimo tyrimu *in vitro* nustatyta, kad po 6 valandų daugiausiai (41,4–42,4 proc.) fenolinių junginių yra atpalaiduojama iš tepalo T4, kuriame nėra bičių vaško. Tuo tarpu mažiausi fenolinių junginių kiekiai (5,37–6,63 proc.) buvo atpalaiduoti iš tepalo T6, kuriame buvo 1 proc. bičių vaško. Tepalas T5, kuriame buvo 0,5 proc. bičių vaško, atpalaidavo vidutinius kiekius (32,0–35,4 proc.) fenolinių junginių. Atlikus dispersinę statistinę analizę nustatyta, kad iš tepalų T4 ir T5 atpalaiduoti fenolinių junginių kiekiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė, o iš tepalo T6 atpalaiduoti fenolinių junginių kiekiai buvo statistiškai reikšmingai mažesni nei iš T4 ir T5 tepalų. Suminio fenolinių junginių kinetinio profilio matematine analize atpalaidavimo tyrimui iškart po formulotės pagaminimo nustatyta, kad Higuchi modelio regresijos koeficientai tepalams T4, T5 ir T6 buvo atitinkamai 0,864, 0,981 ir 0,892. Koeficientų reikšmės rodo, jog pusiau kieta forma neriboja fenolinių junginių atpalaidavimo.

Suminio fenolinių junginių kiekio stabilumo statistine analize nustatyta, kad iš tepalo T4 trečią ir šestą mėnesį yra atpalaiduojama statistiškai reikšmingai mažiau (atitinkamai 19,4 proc. ir 59,4 proc. mažiau) junginių nei iškart po pagaminimo. Iš mėginio T5 statistiškai reikšmingai mažiau (33,8 proc.) junginių yra atpalaiduojama šestą mėnesį lyginant su iškart po pagaminimo atpalaiduotu suminiu junginių kiekiu. O mėginyje T6 nustatyti statistiškai reikšmingai mažesni fenolinių junginių kiekiai trečią mėnesį po pagaminimo. Įvertinus fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimo rezultatus nustatyta, kad formuluočioms būdinga nestabili fenolinių junginių atpalaidavimo kinetika, kuri susijusi su nestabiliais vidiniais struktūriniais formuluočių ryšiais. Fenolinių junginių atpalaidavimo priklausomybė nuo tepalo reologinių charakteristikų buvo patvirtinta koreliacine analize. Atlikus koreliacinę analizę pagal Spearman'o kriterijų nustatytas statistiškai reikšmingas koreliacinis ryšys tarp T4 mėginio atpalaiduotų fenolinių junginių kiekio ir formulotės konsistencijos koeficiento (koreliacijos koeficientas –0,972). Kitų mėginių koreliaciniai koeficientai tarp atpalaiduotų fenolinių junginių kiekių ir reologinių savybių buvo dideli, tačiau statistiškai nereikšmingi.

Koreliacinės analizės tyrimu nustatyta, kad didėjant konsistencijos koeficientui, mažėjant tekėjimo indeksui mažėja gudobelių fenolinių junginių atpalaiduojami kiekiai.



3.3.3.2 pav. *Suminio gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimo kinetika iš T serijos tepalų*

◆ – 0 mėn.; ■ – 1 mėn.; ▲ – 3 mėn.; ● – 6 mėn. po pagaminimo.

T serijos tepalų stabilumo tyrimais nustatyta, jog laikymo metu šie tepalai nestabilūs, todėl vartojimui nerekomenduojami. Reikia atlikti papildomus tyrimus siekiant sumodeliuoti stabilų tepalą su sviestmedžio aliejumi.

3.3.4. Formuluočių su sausuoju vaistinių melisų lapų ekstraktu (R serija) stabilumo vertinimas

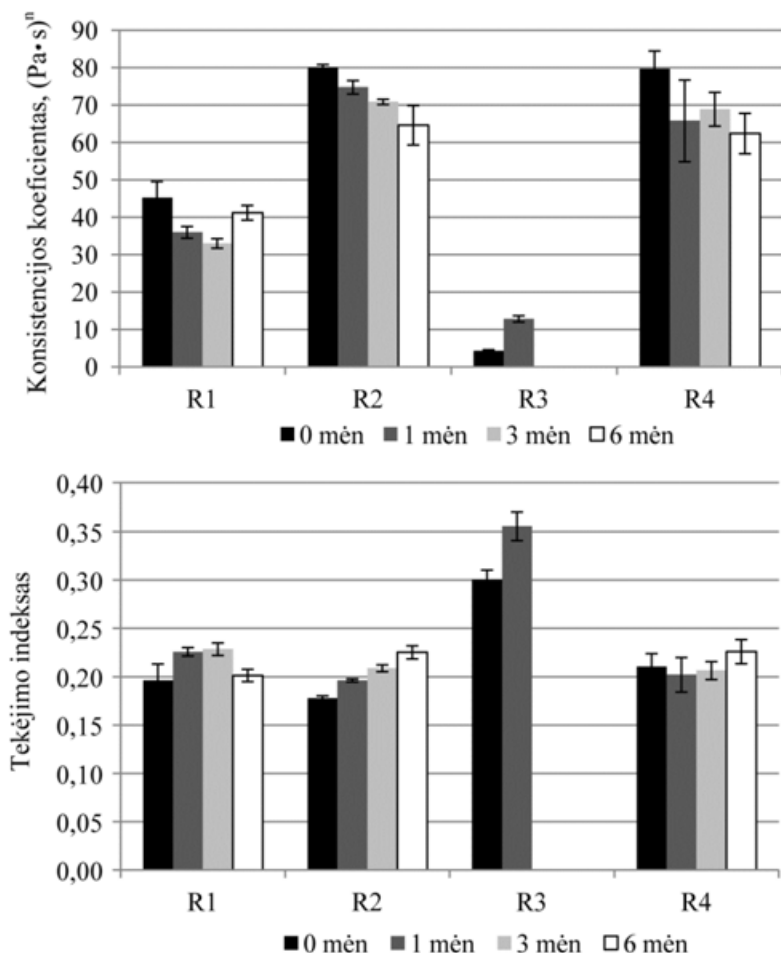
Stabilumo tyrimas pagal reologines charakteristikas ir pH. Ankstesnių tyrimų metu atrinkti stabilūs pusiau kieti pagrindai (N6, M6, K4) papildomi 4 proc. sausojo vaistinių melisų lapų ekstrakto ir atitinkamai suformuojamos formulotės R1, R2 ir R3 (Priedai, 6 lentelė, 161 psl.). Kremas R4 gautas ištirpinus sausąjį vaistinių melisų lapų ekstraktą išgrynintame vandenyje santykiu 1 : 15 ir įterpus į pagrindą K4 kaip vandeninę fazę.

Veikliosios medžiagos koncentracija pusiau kietoje formulotėje parinkta pagal Lee ir kt. atliktą klinikinę studiją [112], kurioje nustatyta, kad pusiau kietas preparatas su 300 mg rozmarino rūgšties turi „galimą klinikinę naudą kaip terapinė medžiaga atopinio dermatito gydyme“ [112]. Sumodeliuotų pusiau kietų formuluočių su sausuoju vaistinių melisų lapų ekstraktu (R serija) reologinių savybių pokyčiai stabilumo tyrimo metu vidutinio greičio senėjimo sąlygomis pateikti 3.3.4.1 pav.

Iškart po pagaminimo atliktu reologinių savybių tyrimu nustatyta, kad sausojo vaistinių melisų lapų ekstrakto įvedimas į atrinktus pagrindus statistiškai reikšmingai sumažina pagrindų konsistencijos koeficientus ir padidina tekėjimo indeksus. Stabilumo tyrimu pagal reologines savybes nustatyta, kad kremas R3 yra nestabilus. Laikymo metu šiame kreme po 3 mėnesių nustatytas fazių išsiskyrimas, todėl tyrimas su šiuo mėginiu nebuvo tęsiamas. Tuo tarpu vienintelis stabilus visą stabilumo tyrimo laikotarpį (6 mėn.) buvo R4 kremas, kuriame nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp reologinių savybių skirtingais tyrimo laikotarpiais.

Hidrofobiniai tepalai R1 ir R2 vizualių nestabilumo požymių neparodė, tačiau įvertinus reologinių savybių tyrimo rezultatus, nustatyta, jog yra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp reologinių savybių, matuotų iškart po pagaminimo ir kitais tyrimo laikotarpiais.

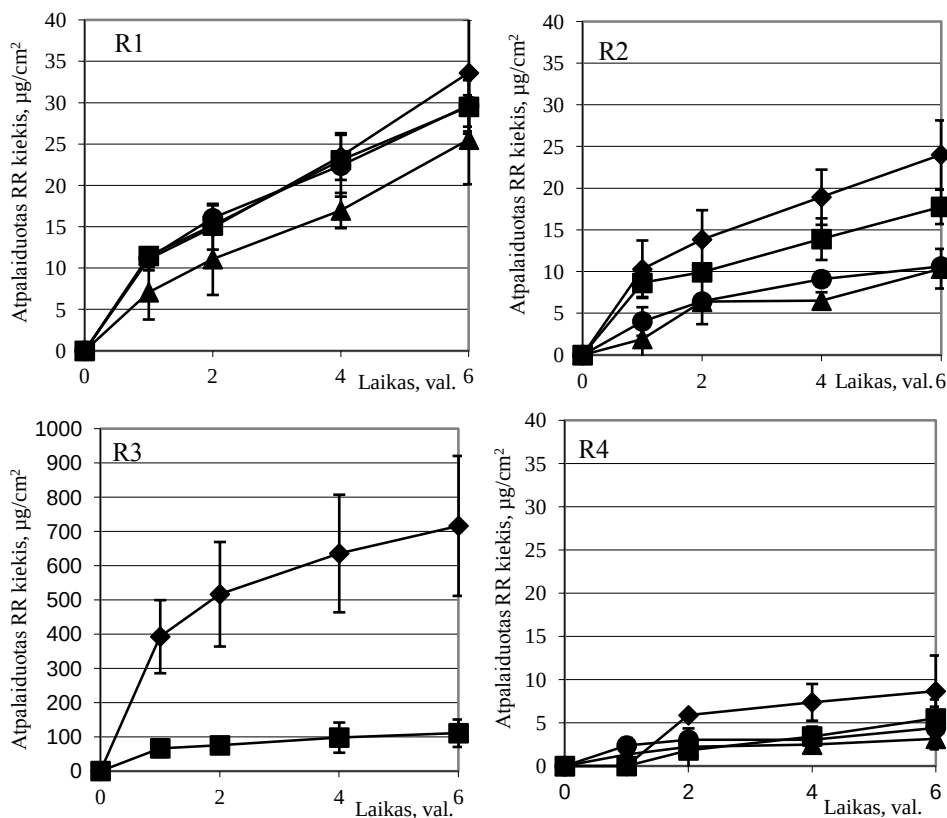
pH vertinimo duomenys stabilumo tyrimo metu vertingi tuo, kad juos įvertinus galima prognozuoti galimą mikroorganizmų aktyvumą, lemiantį reikšmingus pusiau kietų sistemų pH pokyčius. R serijos formuluočių pH tyrimais nustatyta, kad mėginių pH kito nežymiai – 7 proc. ribose. Po pagaminimo mėginių pH varijavo nuo $4,86 \pm 0,08$ iki $5,08 \pm 0,02$, o po 6 mėnesių stabilumo tyrimo mėginių pH varijavo nuo $4,72 \pm 0,01$ iki $5,44 \pm 0,01$. Visais tyrimo laikotarpiais mėginių pH buvo preparatams, skirtiems vartoti ant odos, priimtinos ribose [6, 110].



3.3.4.1 pav. *R serijos mėginių reologinių savybių pokyčiai stabilumo tyrimo metu*

Stabilumo tyrimas pagal rozmarino rūgšties atpalaidavimo tyrimą *in vitro*. Siekiant įvertinti rozmarino rūgšties atpalaidavimą iš sumodeliuotų pusiau kietų formuluočių atliktas rozmarino rūgšties atpalaidavimo tyrimas stabilumo tyrimo metu (3.3.4.2 pav.).

Atpalaidavimo tyrimu *in vitro* nustatyta, kad rozmarino rūgštis iš pusiau kietų formuluočių yra atpalaiduojama skirtingai. Didžiausi atpalaiduojami rozmarino rūgšties kiekiai (39,60 proc. 0 mėn ir 6,11 proc. 1 mėn) po 6 valandų tyrimo buvo nustatyti formuluočiame R3, kuri, pasižymėjo mažiausiais konsistencijos koeficientais ir didžiausiais tekėjimo indeksais. Po 3 mėnesių stabilumo tyrimo kreme R3 buvo nustatytas fazių išsiskyrimas, todėl tyrimai



3.3.4.2 pav. Rozmarino rūgšties atpalaidavimo kinetika iš R serijos stabilumo tyrimo metu.

◆ – 0 mėn.; ■ – 1 mėn.; ▲ – 3 mėn.; ● – 6 mėn.

su šiuo kremu nebuvo tęsiami. Mažiausius rozmarino rūgšties kiekius atpalaidavo stabili formuluotė R4. Visuose vertintuose laikotarpiuose atpalaiduotas rozmarino rūgšties kiekis buvo mažesnis nei 1 proc. nuo įterpto kiekio. Tikėtina, jog tokie atpalaidavimo tyrimo rezultatai yra susiję su apsunkinta rozmarino rūgšties difuzija link vandeninės akceptorinės terpės iš v–a tipo emulsinio pagrindo, kuriame riebalinė terpė sudarė barjerą.

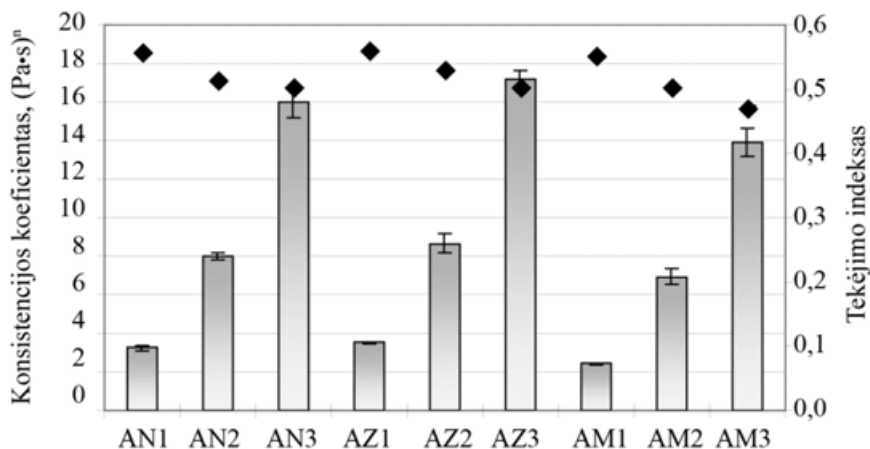
Rozmarino rūgšties atpalaidavimas iš hidrofobinių formuluočių R1 ir R2 buvo nedidelis ir svyravo nuo 0,59 iki 1,86 proc. įvairiais tyrimo laikotarpiais. Rozmarino rūgšties kinetinio profilio matematine analize atpalaidavimo tyrimui iškart po formuluotės pagaminimo nustatyta, kad Higuchi modelio regresijos koeficientai formuluotėms R1, R2, R3 ir R4 buvo atitinkamai 0,973, 0,998, 0,967 ir 0,928, tai rodo, jog pusiau kietos formuluotės sudėtinės dalys neriboja rozmarino rūgšties atpalaidavimo.

Rozmarino rūgšties atpalaidavimo stabilumo tyrimais *in vitro* nustatyta, kad rozmarino rūgšties atpalaidavimas iš tepalų R1 ir R2 buvo stabilus visą 6 mėnesių stabilumo tyrimo laiką. Vertinant atpalaiduotos rozmarino rūgšties kiekį per kvadratinį centimetrą po 6 valandų tyrimo nenustatyta jokių statistiškai reikšmingų skirtumų tarp tyrimo, atlikto iškart po mėginio pagaminimo, ir tyrimų, atliktų kitais laikotarpiais. Atpalaidavimo tyrimais *in vitro* nustatyta, kad formuliuotės R1, R2 ir R4 buvo stabilios visą 6 mėnesių tyrimo laiką pagal atpalaiduotą rozmarino rūgšties kiekį.

3.3.5. Alginato hidrogelių su modelinėmis veikliosiomis medžiagomis reologinių savybių ir fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimas *in vitro*

Siekiant sumodeliuoti hidrofilinį natūralų pagrindą modelinių veikliųjų medžiagų įterpimui, polimeru pasirinktas natrio alginatas ir kalcio chloridas, kaip Ca^{2+} jonų šaltinis. Skirtingos klampos hidrogeliai (Priedai, 7 lentelė, 161 psl.) buvo modeliuojami su tirpintais sausaisiais vaistinių melisų lapų (AM mėginiai) ir gudobelių žiedų su lapais ekstraktais (AN mėginiai) bei gudobelių žiedų su lapais ekstraktu (AZ mėginiai), pagamintu iš vaistinės augalinės žaliavos, ir vertinta sumodeliuotų hidrogelių reologinės savybės, pH ir fenolinių junginių atpalaidavimas.

A serijos mėginių reologinių savybių ir pH tyrimas. Siekiant įvertinti skirtingų ekstraktų bei skirtingų natrio alginato kiekių įtaką sumodeliuotų hidrogelių reologinėms savybėms atliktas reologinių savybių tyrimas, kurio rezultatai patiekti 3.3.5.1 pav.



3.3.5.1 pav. Natrio alginato hidrogelių su skirtingais ekstraktais reologinių savybių (30 °C) tyrimo rezultatai.

Konsistencijos koeficientą žymi stulpeliai, tekėjimo indeksą – rombai.

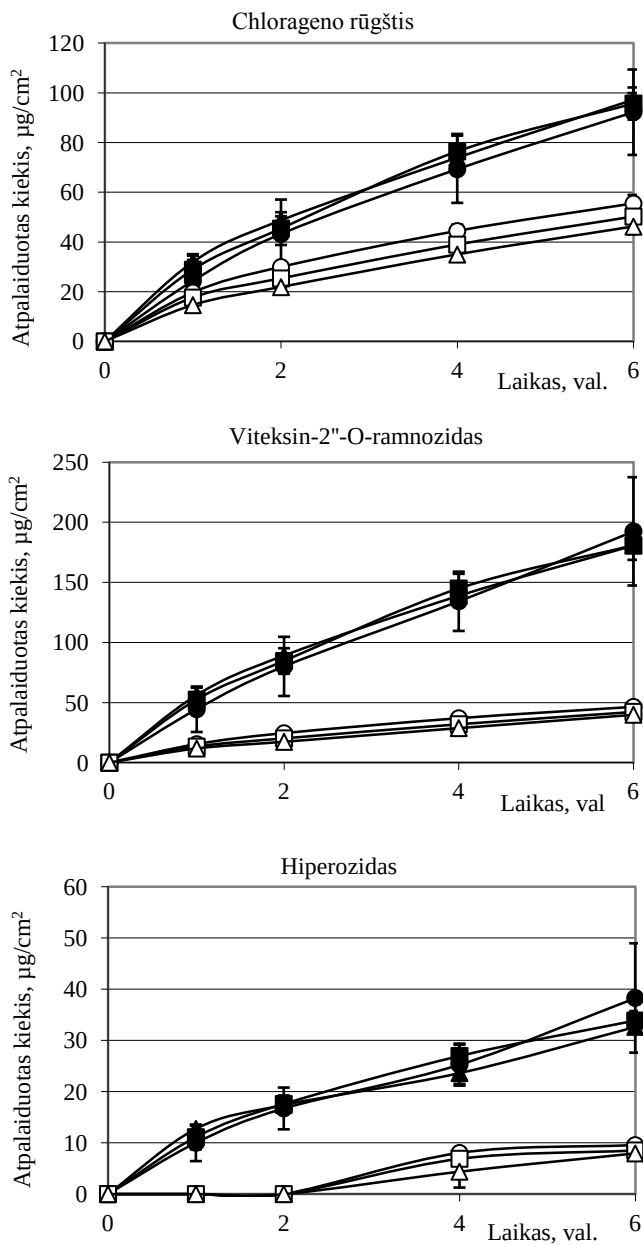
Reologinių savybių tyrimais nustatyta, kad hidrogelių konsistencijos koeficientas kinta nuo ~ 2 iki ~ 17 (Pa·s)ⁿ, o tekėjimo indeksas yra nuo 0,5–0,6, kintant natrio alginato koncentracijai nuo 2 iki 4 proc. Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad natrio alginato koncentracija (2–4 proc.) daro statistiškai reikšmingą įtaką hidrogelių reologinėms savybėms, kai tuo tarpu statistiškai reikšmingų skirtumų tarp gelių su skirtingais ekstraktais nenustatyta.

pH tyrimais nustatyta, kad A serijos hidrogelių pH absoliučios reikšmės kito nuo $5,02 \pm 0,01$ iki $5,34 \pm 0,00$. pH kitimas nustatytas nedidelėse irbose, todėl galima teigti, kad hidrogelių pH nepriklauso nuo fenolinių junginių kilmės, o nustatytos reikšmės yra priimtinos produktams skirtiems vartoti ant odos [6, 110].

Gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimo iš A serijos mėginių tyrimas. Alginato hidrogeliai buvo gaminami su dviem gudobelių žiedų su lapais ekstraktais. AN mėginių gamybai buvo panaudotas tirpintas išgrynintame vandenyje 1 : 20 sausasis gudobelių žiedų su lapais ekstraktas, o AZ mėginių gamybai panaudotas 1 : 10 vandeninis ekstraktas, gautas išekstrahavus vaistinę augalinę žaliavą (ekstrakto gamyba plačiau aprašyta 3.2.3 skyriuje). Ekstraktai buvo panaudoti kaip vandeninė hidrogelio fazė. Fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimo *in vitro* rezultatai pateikti 3.3.5.2 pav.

Atpalaidavimo tyrimais *in vitro* nustatyta, kad po 6 valandų iš hidrogelių yra atpalaiduojama apie 50 proc. fenolinių junginių nuo įterpto kiekio. 3.3.5.2 pav. pateiktuose fenolinių medžiagų atpalaidavimo kinetikos grafikuose matyti, kad iš AN serijos gelių yra atpalaiduojami didesni fenolinių junginių kiekiai, tačiau AN serijos gelių gamybai buvo panaudotas tirpintas sausasis ekstraktas, kuriame ištirpusių fenolinių junginių kiekis buvo didesnis nei iš vaistinės augalinės žaliavos išekstrahuotų junginių kiekis (AZ mėginiai). Vertinant santykį tarp atpalaiduotų junginių kiekio ir įterpto junginių kiekio nustatyta, kad po 6 valandų tyrimo iš AZ mėginių yra atpalaiduojama $44,37 \pm 1,22$ – $56,47 \pm 3,58$ proc. fenolinių junginių, o iš AN mėginių – $42,03 \pm 1,42$ – $50,10 \pm 1,42$ proc. fenolinių junginių.

Suminio fenolinių junginių kinetinio profilio matematine analize atpalaidavimo tyrimui iškart po formuluotės pagaminimo nustatyta, kad Higuchi modelio regresijos koeficientai formuluotėms AN1, AN2 ir AN3 buvo atitinkamai 0,958, 0,980 ir 0,987, o formuluotėms AZ1, AZ2 ir AZ3 – 0,986, 0,978 ir 0,964 atitinkamai. Higuchi modelio regresijos koeficientai rodo, kad alginato hidrogelis neribojo gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimo.

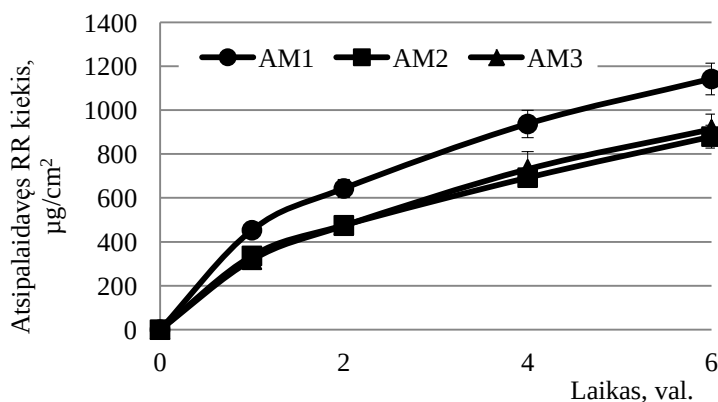


3.3.5.2 pav. *Gudobelių žiedų su lapais fenolinių junginių atpalaidavimo kinetika iš A serijos mėginių*

● – AN1; ■ – AN2; ▲ – AN3; ○ – AZ1; □ – AZ2; △ – AZ3.

Atlikus statistinę analizę nustatyta, jog nėra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp fenolinių junginių kiekių, atpalaiduotų iš hidrogelių su skirtingomis alginato koncentracijomis ar pagamintų su skirtingais ekstraktais. Statistinės koreliacinės analizės duomenimis nustatyta, kad nėra statistiškai reikšmingų korelacijų tarp hidrogelių reologinių savybių ir fenolinių junginių kiekių, atpalaiduotų iš hidrogelių.

Rozmarino rūgšties atpalaidavimo iš A serijos hidrogelių tyrimas. Sausasis vaistinių melisų lapų ekstraktas buvo tirpintas santykiu 1 : 15 išgrynintame vandenyje, o gautas tirpalas buvo naudojamas alginato gelių gamybai. Rozmarino rūgšties atpalaidavimo iš skirtingų alginato gelių kinetika pateikta 3.3.5.3 pav.



3.3.5.3 pav. Rozmarino rūgšties atpalaidavimo kinetika iš hidrogelių

Atpalaidavimo tyrimu nustatyta, kad rozmarino rūgšties atpalaidavimo profilis yra panašus į gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimo profilį. Didžiausi rozmarino rūgšties kiekiai yra atpalaiduojami iš hidrogelio AM1, kuriame alginato koncentracija mažiausia. Po 6 valandų tyrimo iš AM gelių yra atpalaiduojama nuo $48,39 \pm 2,86$ iki $61,41 \pm 3,88$ proc. rozmarino rūgšties. Matematinės analizės rezultatai rodo, jog rozmarino rūgšties atpalaidavimas iš alginato hidrogelių atitinka Higuchi modelį, nes determinacijos koeficientai formuluotėms AM1, AM2 ir AM3 buvo atitinkamai 0,999, 0,998 ir 0,994, kurie rodo, kad hidrogelis neribojo rozmarino rūgšties atpalaidavimo.

Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad po 6 valandų tyrimo iš gelio AM1 atpalaiduotos rozmarino rūgšties kiekis yra statistiškai reikšmingai didesnis nei iš gelio AM2. Daugiau statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Koreliacinės analizės duomenimis nustatyta, kad nėra statistiškai reikš-

mingo koreliacinio ryšio tarp hidrogelių su vaistinių melisų ekstraktu reologinių savybių ir rozmarino rūgšties kiekio atpalaiduoto po 6 valandų tyrimo *in vitro*.

Reologiniais tyrimais buvo nustatyta, kad sausųjų ekstraktų įvedimas daro įtaką pagrindų reologinėms savybėms. Didesnė dalis mėginių stabilumo tyrimo metu parodė nestabilumo požymių vertinant pagal reologines savybes. Atpalaidavimo tyrimais *in vitro* įrodyta, kad gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimas iš tepalų ir kremų yra ribojamas bičių vaško, todėl bičių vaškas buvo pakeistas sviestmedžio aliejumi. Formuluočių su sviestmedžio aliejumi stabilumo tyrimai parodė, kad visos formuluočės buvo nestabilios.

Atpalaidavimo tyrimais *in vitro* nustatyta, kad iš tepalų ir kremų atpalaiduojami rozmarino rūgšties kiekiai yra iki 2 proc. įterpto kiekio. Išimtis buvo kremas, kuriame buvo įterptas sausasis melisų lapų ekstraktas, iš kurio atspalaidavo iki 39,6 proc. rozmarino rūgšties, tačiau vertinant šio mėginio reologines savybes nustatytas didžiausias konsistencijos koeficiento sumažėjimas. Po trijų stabilumo tyrimo mėnesių kreme buvo vizualiai matomi nestabilumo požymiai.

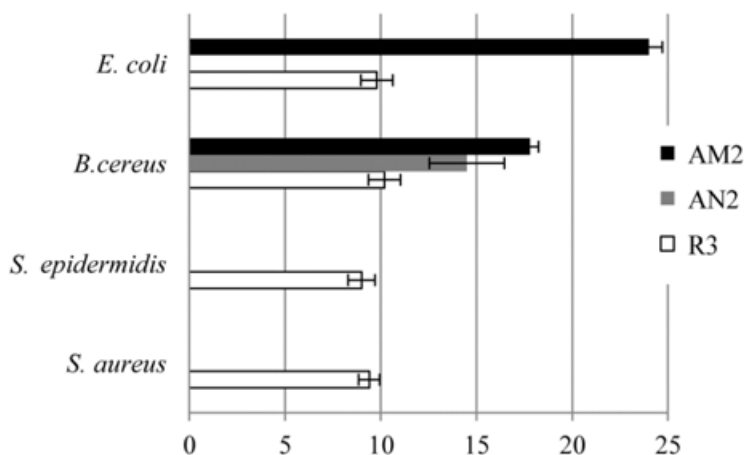
Vertinant alginato hidrogelius nustatyta, kad alginato koncentracija turi įtakos alginato reologinėms savybėms, tačiau neturi įtakos atpalaiduojamų junginių kiekiams. Atlikus statistinę analizę nustatyta, jog nėra statistškai reikšmingų skirtumų tarp atpalaiduotų fenolinių junginių kiekių hidrogelius pagaminus su skirtingais ekstraktais (gudobelių žiedų su lapais ar vaistinių melisų).

Tolimesniems tyrimams verta plėtoti hidrogelius, išbandant daugiau polimerų ar kitas rišančiąsias medžiagas. Verta ieškoti kitų tirštinančių medžiagų, kurios pasižymėtų priimtinomis savybėmis, bet galėtų pakeisti bičių vašką modeliuojant stabilias pusiau kietas formuluočes. Verta įvertinti kitų veikliųjų junginių atpalaidavimo ir skvarbos į odą galimybes siekiant surasti būdingas tendencijas.

3.4. Tepalų, kremų ir hidrogelių su gudobelių žiedų su lapais ir su vaistinių melisų lapų ekstraktais antimikrobinis tyrimas *in vitro*

Antimikrobinio tyrimo metu buvo siekiama įvertinti ar iš pusiau kietos formuluočės atpalaiduotos veikliosios medžiagos geba sukelti biologinį poveikį. Tyrimo metu analizuotos keturios bakterijų kultūros (*E.coli*, *B. cereus*, *S. epidermidis* ir *S. aureus*), kurios tyrimų su vandeniniais ekstraktais metu buvo jautrios tirtiems ekstraktams. Antimikrobinio aktyvumo tyrimais su pusiau kietais pagrindais be modelinių veikliųjų junginių nustatyta, kad

pusiau kieti pagrindai nepasižymėjo antimikrobinio aktyvumu prieš tirtuosius mikroorganizmus. Antimikrobinio aktyvumo tyrimui buvo pasirinktos šešios pusiau kietos formuluotės: T1, R1, R2, R3, AN2, AM2, kurios atpalaidavo kiekybiškai įvertinamus fenolinių junginių kiekius. Tyrimų rezultatai pateikti 3.4.1 pav.



3.4.1 pav. Bakterijų augimo inhibicijos zonų plotis (mm), įskaitant šulinėlio skersmenį (7 mm), paveikus pusiau kietomis formuluotėmis

Tyrimų rezultatais nustatyta, kad hidrofobiniai tepalai T1 (su gudobelių ekstraktu), R1 ir R2 (su vaistinių melisų ekstraktu) neturi antimikrobinio aktyvumo. Tokie tyrimų rezultatai gali būti sietini su mažu atpalaiduotu fenolinių junginių kiekiu iš šių tepalų. Atpalaiduotų junginių kiekiai buvo nepakankami siekiant sukelti biologinį poveikį bakterijoms.

V-a tipo kremas R3 pasižymėjo nedideliu antimikrobinio poveikiu prieš visas bakterijas. Atpalaidavimo tyrimo metu nustatyta, kad iš kremo R3 yra atpalaiduojama iki 39,60 proc. rozmarino rūgšties.

Hidrogelis su gudobelių ekstraktu AN2 turėjo aktyvumą prieš *B. cereus* bakterijų kultūrą, o hidrogelis su vaistinių melisų ekstraktu AM2 – prieš *B. cereus* ir *E. coli* bakterijų kultūras. Verta pastebėti, kad hidrogelių inhibicijos zonų pločiai jautrioms bakterijoms buvo didesni nei atitinkamų ekstraktų inhibicijos zonų pločiai.

Gudobelių žiedų su lapais ekstraktai ir vaistinių melisų lapų ekstraktai bei pusiau kieti preparatai su šiais ekstraktais pasižymi antibakteriniu aktyvumu prieš specifinius mikroorganizmus.

3.5. Fenolinių junginių iš pusiau kietų formuluočių skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimai *ex vivo*

Modelinėmis veikliosiomis medžiagomis pasirinkti dviejų augalinių žaliavų fenoliniai junginiai, pasižymintys skirtingomis fizikocheminėmis savybėmis. Siekiant įvertinti šių junginių skvarbos galimybes į nepažeistą žmogaus odą atlikti tyrimai *ex vivo* su ekstraktais ir pusiau kietomis formulotėmis, kuriose ekstraktai įterpti suspensine ir skysta formomis. Skvarbos tyrimai į žmogaus odą iš ekstraktų pateikti 3.2.3 ir 3.2.5 skyriuose.

Veikliosios medžiagos molekulė turi būti atpalaiduota iš pusiau kietos formos, patekti ant odos ir tik tada gali skverbti į odą. Skvarbos tyrimai iš pusiau kietų formuluočių su gudobelių ekstraktais atlikti su formulotėmis T1, AZ2 ir AN2, t. y. formulotėmis, kurių atpalaidavimo tyrimais buvo nustatomi kiekybiškai įvertinami atpalaiduotų fenolinių junginių kiekiai. *Ex vivo* skvarbos tyrimais nustatyta, kad po 24 valandų gudobelių fenoliniai junginiai, esantys pusiau kietose formulotėse į žmogaus odą nesiskverbia, todėl formulotės gali būti naudojamos tik siekiant sukelti paviršinį, apsauginį poveikį. Naudotos pusiau kietos formulotės neturėjo įtakos skvarbos tyrimo rezultatams, nes skvarbos tyrimas su pusiau kietomis formulotėmis patvirtino skvarbos tyrimo rezultatus su gudobelių ekstraktais ir standartų mišiniu (3.2.3 skyrius). Nustatyta, kad gudobelių fenoliniai junginiai, kurių logP svyruoja nuo -0,9 iki 0,4 nesiskverbia į nepažeistą žmogaus odą. Gauti tyrimų rezultatai patvirtino literatūros duomenis, kad molekulės hidrofiliskumas yra vienas iš veiksmų darančių įtaką molekulės skvarbai į odą [210]. Siekiant santykinai hidrofilinėmis savybėmis pasižyminčius junginius įvesti į gilesnius odos sluoksnius gali reikėti modeliuoti nanotechnologijomis paremtas vaistų formas [1].

3.2.5 skyriuje aprašytais tyrimais buvo nustatyta, kad rozmarino rūgštis skverbiasi į nepažeistą žmogaus odą. *Ex vivo* skvarbos tyrimai atlikti su stabiliomis pusiau kietomis formulotėmis, kurių sudėtyje buvo vaistinių melisų lapų ekstraktas (R serijos mėginiais ir hidrogeliu).

Rozmarino rūgštis iš hidrogelio (AM2) skverbėsi į gilesnius odos sluoksnius ir buvo kiekybiškai įvertinama dermoje. Suminiai rozmarino rūgšties kiekiai, nustatyti odoje po 24 valandų tyrimo iš hidrofilinės formulotės buvo 0,5 proc. (0,34 proc. epidermyje ir 0,16 proc. dermoje). Tyrimais nustatyta, kad rozmarino rūgšties kiekiai, besiskverbiantys iš hidrofilinės formulotės, buvo panašūs į laisvai difundavusios rozmarino rūgšties kiekius. Nustatyta, kad hidrofilinis pagrindas nesudarė barjero rozmarino rūgšties skvarbai į nepažeistą žmogaus odą. Tikėtina, kad hidrogelis hidratuodamas odą, sudarė sąlygas spartesnei rozmarino rūgšties skvarbai [158]. Rozmarino rūgšties skvarbos rezultatai patvirtino literatūros duomenis, kad

polimerai gali veikti kaip veikliųjų medžiagų skvarbą skatinančios medžiagos, sąveikaudami su *stratum corneum* lipidais [181]. Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad epidermyje nustatomas rozmarino rūgšties kiekis iš formuluočių R1, R2, R4 ir AM2 statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Tyrimo rezultatai išsamiau aptarti straipsnyje „Release of rosmarinic acid from semisolid formulations and its penetration through human skin *ex vivo*“ (žr. Priedai).

IŠVADOS

1. Pusiau kieti pagrindai buvo sumodeliuoti naudojant bičių vašką, alyvuogių aliejų, kakavos aliejų, cholesterolį, miško medų, kietąjį parafiną, baltąjį vazeliną ir išgrynintąjį vandenį. Reologiniais tyrimais nustatyta, kad tepalų struktūros vidinių ryšių tvirtėjimui didžiausią įtaką daro bičių vaško kiekis, o kremų v-a – išgrynintojo vandens kiekis. Modelinių veiklių medžiagų pridėjimui atrinkti stabilūs pusiau kieti pagrindai.
2. Eksperimentiniais tyrimais nustatyta, kad medus yra tinkamas komponentas pusiau kietų formuluočių modeliavimui – nustatyta, kad pagrindai su medumi yra homogeniški ir išlieka stabilūs 6 mėn. Įvertinus tirtų medaus rūšių fizikines, chemines, reologines savybes ir fenolinių rūgščių kiekį, puskiečių formuluočių modeliavimui atrinkta miško medaus rūšis.
3. *Ex vivo* tyrimais nustatyta, kad santykinai hidrofiliniai gudobelių fenoliniai junginiai (chlorogeno rūgštis, vitekisin-2"-O-ramnozidas, hiperozidas ir izokvercitrinas) į žmogaus odą nesiskverbia, o santykinai hidrofobinė rozmarino rūgštis buvo nustatyta žmogaus epidermyje ir dermoje.
4. Antiradikalinio aktyvumo tyrimais *in vitro* nustatyta, kad gudobelių žiedų su lapais ir vaistinių melisų lapų ekstraktai pasižymi stipresniu antiradikaliu aktyvumu prieš DPPH laisvąjį radikalą nei troloksas. Antimikrobinio tyrimu nustatytas abiejų ekstraktų aktyvumas prieš *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* ir *S. aureus* mikroorganizmų kultūras.
5. Reologiniais tyrimais nustatyta, kad sausųjų ekstraktų dėjimas į hidrofobinis ar kremų v-a pagrindus silpnina vidinės struktūros ryšius – konsistencijos koeficientai mažėja, o tekėjimo indeksai didėja. Hidrofilinės formulotės, pagamintos su gudobelių ir vaistinių melisų ekstraktais, pasižymi statistiškai reikšmingai nesiskiriančiomis reologinėmis savybėmis.
6. Pagrindinis fenolinių junginių atpalaidavimą ribojantis veiksnys – bičių vaškas. Tyrimais nustatyta, kad tepalai atpalaiduoja iki 2 proc. rozmarino rūgšties. Bičių vaško kiekį padidinus nuo 0,5 iki 1 proc., gudobelių fenolinių junginių atpalaidavimas sumažėja 79 proc. Nustatyta, kad bičių vašką pakeitus taukmedžio aliejumi, fenolinių junginių atpalaidavimas padidėja iki 42 proc. Efektyviu fenolinių junginių atpalaidavimu (apie 50 proc.) pasižymi hidrogeliai.
7. *Ex vivo* tyrimais nustatyta, kad gudobelių fenoliniai junginiai, atsipalaidavę iš pusiau kietų formuluočių, yra sulaikomi odos paviršiuje, todėl gali būti naudojami paviršinio poveikio preparatuose. Tyrimais nustatyta, kad pusiau kietos formulotės su vaistinių melisų ekstraktu potencialiai

gali sukelti vietinį poveikį – didžiausias rozmarino rūgšties kiekis kaupiasi epidermyje, o nedideli kiekiai nustatomi dermoje.

8. Tyrimais nustatyta, kad tepalai su augaliniais ekstraktais antimikrobiniu aktyvumu nepasižymėjo. Hidrogelis su gudobelių žiedų su lapais ekstraktu pasižymi antimikrobiniu aktyvumu prieš *B.cereus* bakterijų kultūrą. Kremas v-a su sausuoju vaistinių melisų lapų ekstraktu pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš *B.cereus*, *E.coli*, *S.epidermidis* ir *S. aureus* bakterijų kultūras, o hidrogelis su vaistinių melisų lapų ekstraktu – prieš *B. cereus* ir *E. coli* bakterijų kultūras.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Abla MJ, Singh ND, Banga AK. Role of Nanotechnology in Skin Delivery of Drugs. In: *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers*. 2016, pp 1–384.
2. Al-Waili NS. An alternative treatment for pityriasis versicolor , tinea cruris, tinea corporis and tinea faciei with topical application of honey, olive oil and beeswax mixture : an open pilot study. *Complement Ther Med* 2004; 12: 45–47.
3. Al-Waili NS. Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. *Med Sci Monit* 2004; 10: 94–99.
4. Al-Waili NS. Topical application of natural honey, beeswax and olive oil mixture for atopic dermatitis or psoriasis: Partially controlled, single-blinded study. *Complement Ther Med* 2003; 11: 226–234.
5. Al-Waili NS. Clinical and mycological benefits of topical application of honey, olive oil and beeswax in diaper dermatitis. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 160–163.
6. Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: From basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol* 2013; 93: 261–267.
7. Alijaniha F, Naseri M, Afsharypuor S, Fallahi F, Noorbala A, Mosaddegh M *et al*. Heart palpitation relief with Melissa officinalis leaf extract: Double blind , randomized , placebo controlled trial of efficacy and safety. *J Ethnopharmacol* 2015; 164: 378–384.
8. Alvarez-Suarez J, Gasparrini M, Forbes-Hernández T, Mazzoni L, Giampieri F. The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods* 2014; 3: 420–432.
9. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Diaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F *et al*. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 2490–2499.
10. Amoah SKS, Sandjo LP, Kratz JM, Biavatti MW. Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta Med* 2016; 82: 388–406.
11. An Y, Zhang C, Du Y, Zhao L, Cheng Z, Zhang W *et al*. Comparative excretion of vitexin-2 "- O-rhamnoside in mice after oral and intravenous administration. *African J Pharm Pharmacol* 2013; 7: 833–837.
12. Ananthapadmanabhan KP, Moore DJ, Subramanyan K, Misra M,

- Meyer F. Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing. *Dermatol Ther* 2004; 17: 16–25.
13. Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem* 1998; 63: 549–562.
 14. Aquino DFDS, Piccinelli AC, Soares FLP, Arena AC, Salvador MJ, Kassuya CAL. Anti-hyperalgesic and Anti-inflammatory Activity of *Alternanthera Maritima* Extract and 2 " -O- α -l- rhamnopyranosyl-vitexin in Mice. *Inflammation* 2015; 38: 2057–2066.
 15. Arceusz A, Wesolowski M. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L . commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 83: 215–220.
 16. Asher GN, Viera AJ, Weaver MA, Dominik R, Caughey M, Hinderliter AL. Effect of hawthorn standardized extract on flow mediated dilation in prehypertensive and mildly hypertensive adults : a randomized , controlled cross-over trial. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: Art. no. 26.
 17. Astani A, Navid MH, Schnitzler P. Attachment and Penetration of Acyclovir- resistant Herpes Simplex Virus are Inhibited by *Melissa officinalis* Extract. *Phyther Res* 2014; 28: 1547–1552.
 18. Athar M, Nasir SM. Taxonomic perspective of plant species yielding vegetable oils used in cosmetics and skin care products. *African J Biotechnol* 2005; 4: 36–44.
 19. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 2006; 6: 623–33.
 20. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Yasuda A, Muto Y, Hiyoshi K *et al*. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Eur J Nutr* 2005; 44: 1–9.
 21. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m -coumaric acid. *Life Sci* 2004; 75: 165–178.
 22. Bakier S. Description of phenomena occurring during the heating of crystallized honey. *Acta Agrophysica* 2004; 3: 415–424.
 23. Barreira JCM, Rodrigues S, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Development of hydrosoluble gels with *Crataegus monogyna* extracts for topical application : Evaluation of antioxidant activity of the final

- formulations. *Ind Crops Prod* 2013; 42: 175–180.
24. Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Comparing the Composition and Bioactivity of *Crataegus Monogyna* Flowers and Fruits used in Folk Medicine. *Phytochem Anal* 2011; 22: 181–188.
 25. Belkhir M, Rebai O, Dhaouadi K, Congiu F, Tuberoso CIG, Amri M *et al.* Comparative Analysis of Tunisian Wild *Crataegus azarolus* (Yellow Azarole) and *Crataegus monogyna* (Red Azarole) Leaf, Fruit and Traditionally Derived Syrup: Phenolic Profiles and Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Aqueous-Acetone Extracts. *J Agric Food Chem* 2013; 61: 12171–2.
 26. Bell SG. The therapeutic use of honey. *Neonatal Netw* 2000; 26: 247–251.
 27. Bhandari B, D’Arcy B, Kelly C. Rheology and crystallization kinetics of honey: Present status. *Int J Food Prop* 1999; 2: 217–226.
 28. Biglari B, Linden PH, Simon A, Aytac S, Gerner HJ, Moghaddam A. Use of Medihoney as a non-surgical therapy for chronic pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord* 2012; 50: 165–169.
 29. Bogdanov S. Quality standards of bee pollen and beeswax. *Apiacta* 2004; 39: 334–341.
 30. Bogdanov S. Beeswax: Quality issues today. *Bee World* 2004; 85: 46–50.
 31. Bogdanov S. Honey Composition. Online, 2011.
 32. Borghi SM, Carvalho TT, Staurengo-ferrari L, Hohmann MSN, Pinge-filho P, Casagrande R *et al.* Vitexin Inhibits Inflammatory Pain in Mice by Targeting TRPV1, Oxidative Stress, and Cytokines. *J Nat Prod* 2013; 76: 1141–9.
 33. Bourne MC. Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. 2nd ed. Elsevier Science & Technology Books, 2002.
 34. Budhiraja A, Dhingra G. Development and characterization of a novel antiacne niosomal gel of rosmarinic acid. *Drug Deliv* 2015; 22: 723–30.
 35. Budiyo A, Ahmed NU, Wu A, Bito T, Nikaido O, Osawa T *et al.* Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2085–2090.
 36. Carmona F, Pereira AMS. Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings. *Brazilian J Pharmacogn* 2013; 23: 379–385.
 37. Cermak R, Landgraf S, Wolfram S. The Bioavailability of Quercetin in Pigs Depends on the Glycoside Moiety and on Dietary Factors. *J*

- Nutr 2003; 133: 2802–2807.
38. Chang Q, Zuo Z, Chow MSS, Ho WKK. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59: 549–555.
 39. Chang Q, Zuo Z, Ho WKK, Chow MSS. Comparison of the Pharmacokinetics of Hawthorn Phenolics in Extract Versus Individual Pure Compound. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 106–112.
 40. Chang R-K, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *AAPS J* 2013; 15: 41–52.
 41. Chen Q. Evaluate the Effectiveness of the Natural Cosmetic Product Compared to Chemical-Based Products. *Int J Chem* 2009; 1: 57–59.
 42. Choudhury R, Srai K, Debnam E, Rice-Evans CA. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 278–286.
 43. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 1999; 79: 362–372.
 44. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard for Honey. 2001.
 45. Connelly AE, Tucker AJ, Tulk H, Catapang M, Chapman L, Sheikh N *et al.* High-Rosmarinix Acid Spearmint Tea in the Management of Knee Osteoarthritis Symptoms. *J Med Food* 2014; 17: 1361–1367.
 46. Corrêa TA, Monteiro MP, Mendes TM, Oliveira DM de, Rogero MM, Benites CI *et al.* Medium Light and Medium Roast Paper-Filtered Coffee Increased Antioxidant Capacity in Healthy Volunteers: Results of a Randomized Trial. *Plant Foods Hum Nutr* 2012; 67: 277–282.
 47. Crisan M, Badea R, Cattani C, Crisan D. Imagistic noninvasive assessment of skin ageing and anti-ageing therapies. InTech, 2012.
 48. Čanadanović-Brunet J, Četković G, Djilas S, Tumbas V, Bogdanović G, Mandić A *et al.* Radical Scavenging, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of *Melissa officinalis* L. Extracts. *J Med Food* 2008; 11: 133–143.
 49. Dabboue H, Builles N, Frouin É, Scott D, Ramos J, Marti-Mestres G. Assessing the Impact of Mechanical Damage on Full-Thickness Porcine and Human Skin Using an In Vitro Approach. *Biomed Res Int* 2015; : Art. ID 434623.
 50. Dayan N, Kromidas L. Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products. Wiley & sons: Hoboken, New Jersey, 2011.
 51. Dalli E, Colomer E, Tormos MC, Cosin-Sales J, Milara J, Esteban E *et al.* *Crataegus laevigata* decreases neutrophil elastase and has

- hypolipidemic effect: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Phytomedicine* 2011; 18: 769–775.
52. Degenring FH, Suter A, Weber M, Saller R. A randomised double blind placebo controlled clinical trial of a standardised extract of fresh *Crataegus* berries (*Crataegisan*) in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine Int J Phyther Phytopharm* 2003; 10: 363–369.
 53. Dobre I, Georgescu LA, Alexe P, Escuredo O, Seijo MC. Rheological behavior of different honey types from Romania. *Food Res Int* 2012; 49: 126–132.
 54. Dumitriu B, Olariu L, Ene MD, Zglimbea L, Rosoiu N. The Photo-Protective Activity of *Crataegus monogyna* Extract Proved by Complementary Mechanisms of Skin Inflammation, Damage of Extracellular Matrix, Cellular Survival and Proliferation Disorders. *Int J Biotechnol Wellness Ind* 2012; 1: 177–188.
 55. Eberlein-König B, Schafer T, Huss-Marp J, Darsow U, Mohrenschlager M, Herbert O *et al.* Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 188–191.
 56. Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* 2012; 79: 5–26.
 57. Ferreira ICFR, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem* 2009; 114: 1438–1443.
 58. Furey A, Tassell M, Kingston R, Gilroy D, Lehan M. Hawthorn (*Crataegus* spp.) in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacogn Rev* 2010; 4: 32–41.
 59. Gad SC. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey Published, 2007 doi:10.1002/9780470259818.
 60. Gao Y, Du Y, Ying Z, Leng A, Zhang W, Meng Y *et al.* Hepatic, gastric and intestinal first-pass effects of vitexin-2''-O-rhamnoside in rats by ultra-high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2016; 30: 111–116.
 61. Gasparoux J, Laux D, Ferrandis J, Attal J, Tordjeman P. Large frequency range viscoelastic properties of honey. *J Nonnewton Fluid Mech* 2008; 153: 46–52.
 62. Gohel MC, Parikh RK, Nagori SA, Shah SN, Dabhi MR. Preparation

- and evaluation of soft gellan gum gel containing paracetamol. *Indian J Pharm Sci* 2009; 71: 120–4.
63. Gómez-díaz D, Navaza JM, Quintáns-Riveiro LC. Effect of Temperature on the Viscosity of Honey. *Int J Food Prop* 2009; 12: 396–404.
 64. Guginski G, Luiz AP, Silva MD, Massaro M, Martins DF, Chaves J *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 93: 10–16.
 65. Gunes UY, Eser I. Effectiveness of a Honey Dressing for Healing Pressure Ulcers. *J Wound Ostomy Cont Nurs* 2007; 34: 184–190.
 66. Gunstone F. *Vegetable Oils in Food Technology– Composition, Properties and Uses.* Blackwell Publishing, 2002.
 67. Haroun MT. Dry skin in the elderly. *Geriatr Aging* 2003; 6: 41–44.
 68. Herrmann J, Bodmeier R. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 45: 75–82.
 69. Hoeger PH, Enzmann CC. Skin physiology of the neonate and young infant: A prospective study of functional skin parameters during early infancy. *Pediatr Dermatol* 2002; 19: 256–262.
 70. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 3–12.
 71. Holden C, English J, Hoare C, Jordan A, Kownacki S, Turnbull R *et al.* Advised best practice for the use of emollients in eczema and other dry skin conditions. *J Dermatolog Treat* 2002; 13: 103–6.
 72. Honfo FG, Linnemann AR, Akissoe N, Soumanou MM, Boekel MAJS Van. Characteristics of traditionally processed shea kernels and butter. *Int J Food Sci Technol* 2013; 48: 1714–1721.
 73. Hwang E, Park SY, Yin CS, Kim HT, Kim YM, Yi TH. Antiaging effects of the mixture of *Panax ginseng* and *Crataegus pinnatifida* in human dermal fibroblasts and healthy human skin. *J Ginseng Res* 2017; 41: 69–77.
 74. Yang B, Yang Q, Yang X, Yan HB, Lu QP. Hyperoside protects human primary melanocytes against H₂O₂-induced oxidative damage. *Mol Med Rep* 2016; 13: 4613–4619.
 75. Yang J, Zhang L, Li J, Chen L, Zheng Q, Chen T *et al.* Enhanced oral bioavailability and prophylactic effects on oxidative stress and hepatic damage of an oil solution containing a rosmarinic acid – phospholipid complex. *J Funct Foods* 2015; 19: 63–73.
 76. Yanniotis S, Skaltsi S, Karaburnioti S. Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. *J Food Eng* 2006; 72:

- 372–377.
77. Israel MO. Effects of topical and dietary use of shea butter on animals. *Am J Life Sci* 2014; 2: 303–307.
 78. Yutani R, Kikuchi T, Teraoka R, Kitagawa S. Efficient Delivery and Distribution in Skin of Chlorogenic Acid and Resveratrol Induced by Microemulsion Using Sucrose Laurate. *Chem Pharm Bull* 2014; 62: 274–280.
 79. Ivanauskas L, Jakštas V, Radušienė J, Lukošius A, Baranauskas A. Evaluation of phenolic acids and phenylpropanoids in the crude drugs. *Med* 2008; 44: 48–55.
 80. Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: Art.ID 830616.
 81. Jahurul MHA, Zaidul ISM, Norulaini NAN, Sahena F, Jinap S, Azmir J *et al.* Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. *J Food Eng* 2013; 117: 467–476.
 82. Jandaghi P, Noroozi M, Ardalani H, Alipour M. Lemon balm: A promising herbal therapy for patients with borderline hyperlipidemia – A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med* 2016; 26: 136–140.
 83. Jarzycka A, Lewińska A, Gancarz R, Wilk KA. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; Photostability in cosmetic emulsions. *J Photochem Photobiol B Biol* 2013; 128: 50–57.
 84. Jull A, Walker N, Deshpande S. Honey as a topical treatment for wounds (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2013 2013; : Art. No.: CD005083.
 85. Jull A, Walker N, Parag V, Molan P, Rodgers A. Randomized clinical trial of honey-impregnated dressings for venous leg ulcers. *Br J Surg* 2008; 95: 175–182.
 86. Juszczak L, Fortuna T. Rheology of selected Polish honeys. *J Food Eng* 2006; 75: 43–49.
 87. Kabir F, Katayama S, Tanji N, Nakamura S. Antimicrobial Effects of Chlorogenic Acid and Related Compounds. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2014; 57: 101–107.
 88. Kamdem JP, Adeniran A, Boligon AA, Klimaczewski CV, Eleko-fehinti OO, Hassan W *et al.* Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Ind Crops Prod*

- 2013; 51: 26–34.
89. Karadzovska D, Brooks JD, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Predicting skin permeability from complex vehicles. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 265–277.
 90. Kempf K, Herder C, Erlund I, Kolb H, Martin S, Carstensen M *et al.* Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 950–957.
 91. Kennedy DO, Scholey AB, Tildesley NTJ, Perry EK, Wesnes KA. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 72: 953–964.
 92. Kennedy DO, Wake G, Savelev S, Tildesley NTJ, Perry EK, Wesnes KA *et al.* Modulation of Mood and Cognitive Performance Following Acute Administration of Single Doses of *Melissa Officinalis* (Lemon Balm) with Human CNS Nicotinic and Muscarinic Receptor-Binding Properties. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1871–1881.
 93. Kennedy DO, Little W, Scholey AB. Attenuation of Laboratory-Induced Stress in Humans After Acute Administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). *Psychosom Med* 2004; 66: 607–613.
 94. Kežutytė T, Kornýšova O, Maruška A, Briedis V. Assay of tolnaftate in human skin samples after in vitro penetration studies using high performance liquid chromatography. *Acta Pol Pharm - Drug Res* 2010; 67: 327–334.
 95. Kiechl-Kohlendorfer U, Berger C, Inzinger R. The effect of daily treatment with an olive oil/lanolin emollient on skin integrity in preterm infants: A randomized controlled trial. *Pediatr Dermatol* 2008; 25: 174–178.
 96. Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J Nutr* 2009; 139: 2079–86.
 97. Kirakosyan A, Seymour E, Kaufman PB, Warber S, Bolling S, Chang SC. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 3973–3976.
 98. Kitagawa SK, Yoshii KY, Morita SM, Teraoka RT. Efficient Topical Delivery of Chlorogenic Acid by an Oil-in-Water Microemulsion to Protect Skin against UV-Induced Damage. *Chem Pharm Bull* 2011; 59: 793–796.
 99. Koch E, Malek FA. Standardized Extracts from Hawthorn Leaves

- and Flowers in the Treatment of Cardiovascular Disorders – Preclinical and Clinical Studies. *Planta Med* 2011; 77: 1123–1128.
100. Koytchev R, Aiken RG, Dundarov S. Balm mint extract (Lo-701) for topical treatment of recurring Herpes labialis. *Phytomedicine* 1999; 6: 225–230.
 101. Konishi Y, Hitomi Y, Yoshida M, Yoshioka E. Pharmacokinetic Study of Caffeic and Rosmarinic Acids in Rats after Oral Administration. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4740–4746.
 102. Konishi Y, Kobayashi S. Transepithelial Transport of Rosmarinic Acid in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 583–591.
 103. Korhonen M. Rheological properties of pharmaceutical creams containing sorbitan fatty acid ester surfactants. 2004.
 104. Kostic DA, Velickovic JM, Mitic SS, Mitic MN, Randelovic SS. Phenolic Content , and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Crataegus Oxyacantha* L (Rosaceae) Fruit Extract from Southeast Serbia. *Trop J Pharm Res* 2012; 11: 117–124.
 105. Kotyczka C, Boettler U, Lang R, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I *et al.* Dark roast coffee is more effective than light roast coffee in reducing body weight, and in restoring red blood cell vitamin E and glutathione concentrations in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res* 2011, 2011; 55: 1582–1586.
 106. Kraft JN, Lynde CW. Moisturizers: what they are and a practical approach to product selection. *Skin Therapy Lett* 2005; 10: 1–8.
 107. Kucharekova M, Van De Kerkhof PCM, Van Der Valk PGM. A randomized comparison of an emollient containing skin-related lipids with a petrolatum-based emollient as adjunct in the treatment of chronic hand dermatitis. *Contact Dermatitis* 2003; 48: 293–9.
 108. Kumar D, Arya V, Bhat AZ, Khan AN, Prasad DN. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Brazilian J Pharmacogn* 2012; 22: 1187–1200.
 109. Kwakman PHS, Velde AA, Boer L De, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ. How honey kills bacteria. *FASEB J* 2010; 24: 2576–2582.
 110. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH Is on average below 5 , which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28: 359–370.
 111. Lazaridou A, Biliaderis CG, Bacandritsos N, Sabatini AG. Composition , thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *J Food Eng* 2004; 64: 9–21.
 112. Lee J, Jung E, Koh J, Kim YS, Park D. Effect of rosmarinic acid on

- atopic dermatitis. *J Dermatol* 2008; 35: 768–771.
113. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2012; 37: 106–126.
 114. Lin C, Leu Y, Al-suwayeh SA, Ku M, Hwang T, Fang J-Y. Anti-inflammatory activity and percutaneous absorption of quercetin and its polymethoxylated compound and glycosides: The relationships to chemical structures. *Eur J Pharm Sci* 2012; 47: 857–864.
 115. Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *J Food Sci* 2011; 76: M398–M403.
 116. Lund-Nielsen B, Adamsen L, Kolmos HJ, Rorth M, Tolver A, Gottrup F. The effect of honey-coated bandages compared with silver-coated bandages on treatment of malignant wounds – a randomized study. *Wound Rep Reg* 2011; 19: 664–670.
 117. Ma LY, Liu RH, Xu XD, Yu MQ, Zhang Q, Liu HL. The pharmacokinetics of C -glycosyl flavones of Hawthorn leaf flavonoids in rat after single dose oral administration. *Phytomedicine* 2010; 17: 640–645.
 118. Majtan J. Honey: An immunomodulator in wound healing. *Wound Repair Regen* 2014; 22: 187–192.
 119. Makino T, Shimizu R, Kanemaru M, Suzuki Y, Moriwaki M, Mizukami H. Enzymatically Modified Isoquercitrin, a -Oligoglucosyl Quercetin 3-O-Glucoside, Is Absorbed More Easily than Other Quercetin Glycosides or Aglycone after Oral Administration in Rats. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 2034–2040.
 120. Mandal MD, Mandal S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; 1: 154–160.
 121. Marti-Mestres G, Mestres JP, Bres J, Martin S, Ramos J, Vian L. The ‘in vitro’ percutaneous penetration of three antioxidant compounds. *Int J Pharm* 2007; 331: 139–144.
 122. Martino E, Collina S, Rossi D, Bazzoni D, Gaggeri R, Bracco F *et al.* Influence of the extraction mode on the yield of hyperoside, vitexin and vitexin-2-O-rhamnoside from *Crataegus monogyna* Jacq. (Hawthorn). *Phytochem Anal* 2008; 19: 534–540.
 123. Mastropietro DJ, Nimrooz R, Omidian H. Rheology in Pharmaceutical Formulations-A Perspective. *J Dev Drugs* 2013; 2.
 124. Mazzanti G, Battinelli L, Pompeo C, Serrilli AM, Rossi R, Sauzullo I *et al.* Inhibitory activity of *Melissa officinalis* L . extract on Herpes simplex virus type 2 replication. *Nat Prod Res Former Nat Prod Lett* 2008; 22: 1433–1440.
 125. Mencherini T, Picerno P, Scesa C, Aquino R. Triterpene, antioxidant,

- and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. *J Nat Prod* 2007; 70: 1889–1894.
126. Molan P. Why honey is effective as a medicine. *Bee World* 2001; 82: 22–40.
 127. Molan PC. The antibacterial activity of honey 2 . Variation in the potency of the antibacterial activity Variation in antibacterial activity. *Bee World* 1992; 73: 59–76.
 128. Molyneux P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26: 211–219.
 129. Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. *J Nutr* 2007; 137: 2196–2201.
 130. Mossel B, Bhandari B, Arcy BD, Caffin N. Use of an Arrhenius Model to Predict Rheological Behaviour in some Australian Honeys. *Leb u-Technol* 2000; 33: 545–552.
 131. Mubarak A, Bondonno CP, Liu AH, Considine MJ, Rich L, Mas E *et al.* Acute Effects of Chlorogenic Acid on Nitric Oxide Status, Endothelial Function, and Blood Pressure in Healthy Volunteers: A Randomized Trial. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 9130–9136.
 132. Munro JA. The Viscosity and Thixotropy of Honey. *J Econ Entomol* 1943; 36: 769–777.
 133. Murota K, Matsuda N, Kashino Y, Fujikura Y, Nakamura T, Kato Y *et al.* a -Oligoglucosylation of a sugar moiety enhances the bioavailability of quercetin glucosides in humans. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501: 91–97.
 134. Mustapha N, Bzeouich IM, Ghedira K, Hennebelle T, Chekir-Ghedira L. Compounds isolated from the aerial part of *Crataegus azarolus* inhibit growth of B16F10 melanoma cells and exert a potent inhibition of the melanin synthesis. *Biomed Pharmacother* 2015; 69: 139–144.
 135. Mustapha N, Bzéouich IM, Ghedira K, Hennebelle T, Chekir-Ghedira L. Compounds isolated from the aerial part of *Crataegus azarolus* inhibit growth of B16F10 melanoma cells and exert a potent inhibition of the melanin synthesis. *Biomed Pharmacother* 2015; 69: 139–144.
 136. Nabavi SF, Habtemariam S, Ahmed T, Sureda A, Daglia M, Sorbarzo-Sanchez E *et al.* Polyphenolic Composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From Chemistry to Medical Applications. *Nutrients* 2015; 7: 7708–7728.
 137. National C for BIPCD. CID=1794427. [https://pubchem.ncbi.nlm.](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427)

- nih.gov/compound/1794427.
138. National C for BIPCD. CID=5282151. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282151>.
 139. National C for BIPCD. CID=5281643. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281643>.
 140. National C for BIPCD. CID=5280804. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280804>.
 141. National C for BIPCD. CID=5281792. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281792>.
 142. Noguchi-Shinohara M, Ono K, Hamaguchi T, Iwasa K, Nagai T, Kobayashi S *et al*. Pharmacokinetics, Safety and Tolerability of Melissa officinalis Extract which Contained Rosmarinic Acid in Healthy Individuals: A Randomized Controlled Trial. PLoS One 2015; 10: Art. No e0126422.
 143. Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB. Bioavailabilities of Quercetin-3- Glucoside Quercetin-4'- Glucoside Do Not Differ in Humans. J Nutr 2000; 2: 1200–1203.
 144. Orhan I, Ozcelik B, Kartal M, Ozdeveci B, Duman H. HPLC Quantification of Vitexine-2 "- O -rhamnoside and Hyperoside in Three Crataegus Species and Their Antimicrobial and Antiviral Activities. Chromatogr Suppl 2007; 66: S153–S157.
 145. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Biological Properties and Therapeutic Activities of Honey in Wound Healing: A narrative review and meta-analysis. J Tissue Viability 2016; 25: 98–118.
 146. Oroian M, Amariei S, Escriche I, Leahu A, Damian C, Gutt G. Chemical composition and temperature influence on the rheological behaviour of honeys. Int J Food Prop 2014; 17: 2228–2240.
 147. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses : anticarcinogenic effect of Perilla frutescens extract in the murine two-stage skin model. Carcinogenesis 2004; 25: 549–557.
 148. Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, Inoue K-I *et al*. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. BioFactors 2004; 21: 127–131.
 149. Özkay ÜD, Can ÖD. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. Pharmacol Biochem Behav 2013; 109: 23–30.
 150. Pan S-Y, Chen S-B, Dong H-G, Yu Z-L, Dong J-C, Long Z-X *et al*. New perspectives on chinese herbal medicine (zhong-yao) research and development. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011:

- 403709.
151. Park EK, Song KW. Rheological evaluation of petroleum jelly as a base material in ointment and cream formulations: Steady shear flow behavior. *Arch Pharm Res* 2010; 33: 141–150.
 152. Park K, Kim H, Kim KM, Kim K, Chong Y. Synthesis and biological evaluation of flavonol-glucose conjugates for cosmeceutical development. *Korean Soc Appl Biol Chem* 2015; 58: Art. No 317.
 153. Paul C, Maumus-Robert S, Mazereeuw-Hautier J, Guyen CN, Saudez X, Schmitt AM. Prevalence and risk factors for xerosis in the elderly: A cross-sectional epidemiological study in primary care. *Dermatology* 2011; 223: 260–265.
 154. Paulke A, Eckert GP, Schubert-Zsilavecz M, Wurglics M. Isoquercitrin provides better bioavailability than quercetin: comparison of quercetin metabolites in body tissue and brain sections after six days administration of isoquercitrin and quercetin. *Pharmazie* 2012; 67: 991–996.
 155. Pérez-Sánchez A, Barrajón-Catalán E, Herranz-López M, Castillo J, Micol V. Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. *J Dermatol Sci* 2016; 84: 169–177.
 156. Persano Oddo L, Bogdanov S. Determination of honey botanical origin: problems and issues. *Apidologie* 2004; 35: S2–S3.
 157. Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003; 62: 121–125.
 158. Pham QD, Björklund S, Engblom J, Topgaard D, Sparr E. Chemical penetration enhancers in stratum corneum – Relation between molecular effects and barrier function. *J Control Release* 2016; 232: 175–187.
 159. Podlogar F, Bešter Rogač M, Gašperlin M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40®-Imwitor 308®-IPM micro-emulsions on ketoprofene release. *Int J Pharm* 2005; 302: 68–77.
 160. Psotova J, Svobodova A, Kolarova H, Walterova D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J Photochem Photology B Biol* 2006; 84: 167–174.
 161. Qiang Z, Ye Z, Hauck C, Murphy PA, McCoy J-A, Widrlechner MP *et al.* Permeability of Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and Ursolic acid in *Salvia officinalis* Extracts across Caco-2 Cell Monolayers. *J Etnopharmacology* 2011; 137: 1107–1112.
 162. Ramanauskiene K, Stelmakiene A, Briedis V, Ivanauskas L, Jakštas V. The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. *Food Chem* 2012; 132: 1544–1548.

163. Ratz-Lyko A, Arct J, Majewski S, Pytkowska K. Influence of Polyphenols on the Physiological Processes in the Skin. *Phyther Res* 2015; 29: 509–17.
164. Reinboth M, Wolffram S, Abraham G, Ungemach FR, Cermak R. Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *Br J Nutr* 2010; 104: 198–203.
165. Renouf M, Marmet C, Giuffrida F, Barron D, Beaumont M, Williamson G *et al.* Dose – response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58: 301–309.
166. Ritschel W, Starzacher A, Sabouni A, Hussain A, Koch H. Percutaneous absorption of rosmarinic acid in the rat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1989; 11: 345–352.
167. Rodrigues S, Calhella RC, Barreira JCM, Dueñas M, Carvalho AM, Abreu RM V *et al.* *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Res Int* 2012; 49: 516–523.
168. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of pharmaceutical excipients. Sixth edit. Pharmaceutical Press: London, Chicago, 2009 doi:10.1016/S0168-3659(01)00243-7.
169. Ruoff K. Authentication of the Botanical Origin of Honey. 2006.
170. Santos DM dos, Almeida MC, Lopes NP, Souza GEP De. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 2236–2240.
171. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T *et al.* In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm* 2011; 403: 136–138.
172. Scholey A, Gibbs A, Neale C, Perry N, Ossuoukhova A, Bilog V *et al.* Anti-Stress Effects of Lemon Balm-Containing Foods. *Nutrients* 2014; 6: 4805–4821.
173. Schumacher HHA. Use of medical honey in patients with chronic venous leg ulcers after split-skin grafting. *J Wound Care* 2004; 13: 451–452.
174. Seité S, Khemis A, Rougier A, Ortonne JP. Importance of treatment of skin xerosis in diabetes. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2011; 25: 607–609.
175. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. *Melissa officinalis* L.– A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 2016; 188: 204–28.

176. Shirvani MA, Nikpour M, Azadbakht M, Banihosseini ZS, Zanjani R. The effect of honey gel on cesarean incision pain : A triple blind clinical trial. *African J Pharm Pharmacol* 2013; 7: 19–24.
177. Shortle E, O’Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP. Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* 2014; 98: 828–834.
178. Simpson EL, Chalmers JR, Hanifin JM, Thomas KS, Cork MJ, McLean WHI *et al.* Emollient enhancement of the skin barrier from birth offers effective atopic dermatitis prevention. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 818–823.
179. Smanalieva J, Senge B. Analytical and rheological investigations into selected unifloral. *Eur Food Res Technol* 2009; 229: 107–113.
180. Socha R, Juszczak L, Pietrzyk S, Fortuna T. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoney. *Food Chem* 2009; 113: 568–574.
181. Songkro S. An overview of skin penetration enhancers: Penetration enhancing activity, skin irritation potential and mechanism of action. *Songklanakarin J Sci Technol* 2009; 31: 299–321.
182. Sopade PA, Halley PJ, D’Arcy B, Bhandari B, Caffin N. Dynamic and steady-state rheology of australian honeys at subzero temperatures. *J Food Process Eng* 2004; 27: 284–309.
183. Steffe J. Rheological methods in food process engineering. second. Freeman Press, 1996.
184. Stelmakienė A, Ramanauskienė K, Petrikaite V, Jakstas V, Briedis V. Application of dry hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) extract in natural topical formulations. *Acta Pol Pharm - Drug Res* 2016; 73: 955–965.
185. Stelmakienė A, Ramanauskienė K, Briedis V. Release of rosmarinic acid from semisolid formulations and its penetration through human skin ex vivo. *Acta Pharm* 2015; 65: 199–205.
186. Stelmakienė A, Ramanauskienė K, Briedis V, Leskauskaite D. Examination of rheological and physicochemical characteristics in Lithuanian honey. *African J Biotechnol* 2012; 11: 12406–12414.
187. Stelmakienė A, Ramanauskienė K, Brusokas V, Dagilyte A. Pusiau kietų sistemų su bičių produktais modeliavimas ir reologinių savybių vertinimas. In: *Žmogaus ir gamtos sauga 2011*. 2011, pp 115–118.
188. Stelmakienė A, Ramanauskienė K, Malinauskyte E, Leskauskaite D. Modelling of semisolid natural basis and powder of liquorice as active constituent influence on rheological characteristics of systems. *J Med Plants Res* 2012; 6: 981–989.

189. Sun J, Gao G, Gao Y, Xiong liJuan, Li X, Guo J *et al.* Experimental Research on the In Vitro Antitumor Effects of *Crataegus sanguinea*. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67: 207–213.
190. Tadić VM, Dobrić S, Marković GM, Dordević SM, Arsić IA, Menković NR *et al.* Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 7700–7709.
191. Thom E. The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. *J Int Med Res* 2007; 35: 900–908.
192. Trávníček P, Vítěz T, Přidal A. Rheological properties of honey. *Sci Agric Bohem* 2012; 43: 160–165.
193. Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19: 106–121.
194. Tsang MSM, Jiao D, Chan BCL, Hon K, Leung PC, Lau CBS *et al.* Anti-Inflammatory Activities of Pentaherbs Formula, Berberine, Gallic Acid and Chlorogenic Acid in Atopic Dermatitis-Like Skin Inflammation. *Molecules* 2016; 21: art. No 519.
195. Ueda CT, Shah VP, Derdzinski K, Ewing G, Flynn G, Maibach H *et al.* Topical and Transdermal Drug Products. *Dissolution Technol* 2010; : 12–25.
196. Valentova K, Vrba J, Bancirova M, Ulrichova J, Kren V. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem Toxicol* 2014; 68: 267–282.
197. Vostalova J, Zdarilova A, Svobodova A. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2010; 302: 171–181.
198. Watanabe T, Arai Y, Mitsui Y, Kusaura T, Okawa W, Kajihara Y *et al.* The Blood Pressure-Lowering Effect and Safety of Chlorogenic Acid from Green Coffee Bean Extract in Essential Hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2006; 28: 439–449.
199. Wei W, Ying X, Zhang W, Chen Y, Leng A, Jiang C *et al.* Effects of vitexin-2''-O-rhamnoside and vitexin-4''-O-glucoside on growth and oxidative stress-induced cell apoptosis of human adipose-derived stem cells. *J Pharm Pharmacol* 2014; 66: 988–997.
200. Wei Z, Wang J, Wang Y. Classification of monofloral honeys from different floral origins and geographical origins based on rheometer. *J Food Eng* 2010; 96: 469–479.

201. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 128–137.
202. Witeczak M, Juszczak L, Gałkowska D. Non-Newtonian behaviour of heather honey. *J Food Eng* 2011; 104: 532–537.
203. Xiao J, Capanoglu E, Jassbi AR, Miron A. Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016; 56: S29–S45.
204. Zeraatpishe A, Oryan S, Bagheri MH, Pilevarian AA, Malekirad AA, Baeeri M *et al.* Effects of *Melissa officinalis* L. on oxidative status and DNA damage in subjects exposed to long-term low-dose ionizing radiation. *Toxicol Ind Health* 2011; 27: 205–212.
205. Zhao L, Fang L, Xu Y, Liu S, He Z, Zhao Y. Transdermal delivery of penetrants with differing lipophilicities using O-acylmenthol derivatives as penetration enhancers. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 199–213.
206. Zhao Z, Moghadasian MH. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochem Rev* 2010; 9: 133–145.
207. Zhu Q, Mao L, Liu C, Sun Y, Jiang B, Zhang W *et al.* Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain. *Sci Rep* 2016; 14: art. No 19266.
208. Zick SM, Gillespie B, Aaronson KD. The Effect of *Crataegus oxyacantha* Special Extract WSS 1442 on Clinical Progression in Patients with Mild to Moderate Symptoms of Heart Failure. *Eur J Hear Fail* 2008; 10: 587–593.
209. Zick SM, Vautaw BM, Gillespie B, Aaronson KD. Hawthorn Extract Randomized Blinded Chronic Heart Failure (HERB CHF) Trial. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 990–999.
210. Zillich O V., Schweiggert-Weisz U, Hasenkopf K, Eisner P, Kerscher M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *Int J Cosmet Sci* 2013; 35: 491–501.
211. Žilius M. Dermatologinių puskiečių formų su propolio produktais modeliavimas, optimizavimas ir biofarmacinis vertinimas. 2014.
212. Žilius M, Ramanauskiene K, Briedis V. Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin in vitro. *Evidence-based Complement Altern Med* 2013; 2013. doi:10.1155/2013/958717.
213. ŽŪM. Del medaus analizes metodu. 2000.
214. Novartis eyes traditional Chinese medicine – UPI.com. <http://www.upi.com/Novartis-eyes-traditional-Chinese-medicine/52051162841894/> (accessed 5 Mar2017).

215. European Pharmacopoeia 8th Edition | EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-8th-edition-1563.html>.

DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje „Tomson Reuters Web of Knowledge“ ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė, Vilma Petrikaitė, Valdas Jakštas, Vitalis Briedis. Application of dry hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) extract in natural topical formulations. *Acta Poloniae pharmaceutica. Drug research.* 2016, vol. 73, no. 4, p. 955-965.
2. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis. Release of rosmarinic acid from semisolid formulations and its penetration through human skin ex vivo. *Acta pharmaceutica.* 2015, vol 65, no. 2, p. 199-205.
3. Kristina Ramanauskienė, Ada Stelmakienė, Vitalis Briedis, Liudas Ivanauskas, Valdas Jakštas. The Quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. *Food chemistry.* 2012, vol. 132, iss. 3, p. 1544-1548.

Straipsniai recenzuojamuose mokslo leidiniuose, referuojamuose kitose duomenų bazėse:

1. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis, Daiva Leskauskaitė. Examination of rheological and physicochemical characteristics in Lithuanian honey. *African journal of biotechnology.* 2012, vol. 11, no. 60, p. 12406-12414.

Straipsniai kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose:

1. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė, Ernesta Malinauskytė, Daiva Leskauskaitė. Modelling of semisolid natural basis and powder of liquorice as active constituent influence on rheological characteristics of systems. *Journal of medicinal plants research.* 2012, vol. 6, iss. 6, p. 981-989.

Straipsniai recenzuojamoje Lietuvos tarptautinės konferencijos medžiagoje:

1. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė, Daiva Leskauskaitė. Įvairių rūšių medaus reologinės ir fizikocheminės savybės. Tarptautinės mokslinės – praktinės konferencijos „Žmogaus ir gamtos sauga 2012“ medžiaga, 1-oji dalis, Akademija (Kauno r.); 2012: p. 123-125.
2. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė, Valdemaras Brusokas, Audronė Dagilytė. Pusiau kietų sistemų su bičių produktais mode-

liavimas ir reologinių savybių vertinimas. Tarptautinės mokslinės – praktinės konferencijos „Žmogaus ir gamtos sauga 2011“ medžiaga, 1-oji dalis, Akademija (Kauno r.); 2011, p. 115-118.

Konferencijų tezės:

1. Ada Stelmakienė, Modestas Žilius, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis, Irmantas Ramanauskas. Biopharmaceutical properties of semisolid natural systems with lemon balm extract. The 17th International Congress PHYTOPHARM 2013. 2013 m. liepos 8–10, Viena, Austria.
2. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė, Valdas Jakštas, Vitalis Briedis. Active compounds of hawthorn released from natural basis. Achievements and development perspectives of pharmaceutical chemistry and other sciences: the international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice dedicated to 125th Birth Anniversary of prof. Benediktas Šiaulis. 2012 lapkričio 24, Kaunas.
3. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė. Modelling and Evaluation of Rheological Characteristics of Semisolid Systems With Honey 5th International Scientific conference "The Vital Nature Sign". 2011 gegužės 19-21, Kaunas.
4. Ada Stelmakienė, Kristina Ramanauskienė, Asta Marija Inkėnienė, Vitalis Briedis, Arūnas Savickas, Ernesta Malinauskytė, Daiva Leskauskaitė, Danik M. Martirosyan. Rheological and organoleptic characteristics of various semisolid hydrophobic systems. Functional Foods for Chronic Diseases: Science and Practice : Proceedings of the 8th International Conference. 2011 kovo 15-17, Las Vegas, USA.

APPLICATION OF DRY HAWTHORN (*CRATAEGUS OXYACANTHA* L.)
EXTRACT IN NATURAL TOPICAL FORMULATIONSADA STELMAKIENE¹*, KRISTINA RAMANAUSKIENE¹, VILMA PETRIKAITE²,
VALDAS JAKSTAS³ and VITALIS BRIEDIS¹¹Department of Clinical Pharmacy, ²Department of Drug Chemistry, ³Department of Pharmacognosy,
Lithuanian University of Health Sciences, Mickėvieciaus 9, Kaunas, Lithuania

Abstract: There is a great potential for a semi-solid preparation for topical application to the skin that would use materials of natural origin not only as an active substance but also as its base. The aim of this research was to model semisolid preparations containing hawthorn extract and to determine the effect of their bases (carriers) on the release of active components from experimental dosage forms, based on the results of the *in vitro* studies of the bioactivity of hawthorn active components and *ex vivo* skin penetration studies. The active compounds of hawthorn were identified and quantified by validated HPLC method. The antimicrobial and antiradical activity of dry hawthorn extract were evaluated by methods *in vitro*. The penetration of active substances into the full undamaged human skin was evaluated by method *ex vivo*. Natural topical composition was chosen according to the results of release of active compounds. Release experiments were performed with modified Franz type diffusion cells. *B. cereus* was the most sensitive bacteria for the hawthorn extract. Extract showed antiradical activity, however the penetration was limited. Only traces of hyperoside and isomeritrin were founded in epidermis. Protective topical preparation with shea butter released 41.4–42.4% of active substances. Four major compounds of dry hawthorn extract were identified. The research showed that extract had antimicrobial and antiradical activity, however compounds of hawthorn stay on the surface of the undamaged human skin. Topical preparation containing beeswax did not release active compounds. Beeswax was identified as suspending agent. Topical preparations released active compounds when shea butter was used instead of beeswax.

Keywords: hawthorn, natural, release, skin penetration, topical

The base of semisolid preparations is an active factor that may affect the release of the drug substances from a pharmaceutical form and their absorption through biological membranes, which in turn may have an effect on the pharmacokinetic parameters of a pharmaceutical preparation (1, 2). The base composition of a semi-solid preparation affects its stability and drug release kinetics. As products from natural materials are becoming increasingly popular, scientists and manufacturers face a challenging task of creating stable products that meet modern requirements by using materials of natural origin (2). There is a great potential for a semi-solid preparation for topical application to the skin that would use materials of natural origin not only as an active substance but also as its base. When modeling an ointment basis, the following components were selected: beeswax, shea butter, cholesterol, cocoa butter, honey, avocado and olive oils (3).

Dry hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) extract was used as an active substance for formula-

tions modeling. *Crataegus* spp. is a member of the rose family which has been used for its medical properties since ancient times. It is well known that bioactivity of hawthorn is associated with the treatment of cardiovascular diseases (4–7), however recently, a broader spectrum of the effect of hawthorn bioactivity has been found. Hawthorn extracts were incorporated into semisolid drug forms (8). *Crataegus* spp. is indeed one of the species that is highly recommended in folk medicine, being regarded as particularly important in the management and prevention of age-related diseases (for instance, cardiovascular disease, atherosclerosis, arthritis, and hypertension), nervous system disorders (such as migraines, confusion, irritability and memory loss) and treatment of upper respiratory infections, cellulite, obesity and menopause disturbances (9, 10). The juice of its fruits is a topical preparation for skin application that relieves pain and stiffness (10). *C. monogyna* extracts have been verified to be highly effective against *Candida albi-*

* Corresponding author: e-mail ada.stelmakiene@yahoo.com

cans and *Herpes simplex virus* (11). However, no effect of hawthorn extracts on *C. albicans* was observed by other authors (4). The *O*-glycosidic flavonoids and the oligomeric proanthocyanidins from *Crataegus sinica* exhibited significant inhibitory activity against *Herpes simplex virus* type 1 (HSV-1), which was shown to be due to an extracellular mechanism for procyanidin C-1 (12). Extracts of *Crataegus spp.* have anti-inflammatory, gastro-protective and antimicrobial properties (4, 13-15). Antioxidant, radical-scavenging activity of different parts of hawthorn have been evaluated by a number of authors (16-19).

Research has shown that *C. monogyna* extract can be used as a photoprotective agent, which provides stronger protection against UVA than UVB radiation (20). *Crataegus monogyna* has been shown to be cytoprotective by scavenging free radicals. Jalali et al. study has shown that *Crataegus monogyna* fruits aqueous extract with antioxidant properties could serve as a protective agent against reproductive toxicity during cyclophosphamide treatment in a rat model (21). Furthermore, *Crataegus pinnatifida* extract significantly inhibited the generation of reactive oxygen species and the phenomena of inflammation induced by TPA. Also, extract inhibited benzopyrene/TPA-induced skin tumor formation and decreased the incidence of tumor (22). The extracts obtained from *C. monogyna* parts revealed antiproliferative activity associated with cancer pro-

gression and development, such as cell proliferation, apoptosis, cell differentiation and neovascularization, and did not show toxicity for non-tumor cells (23). Other authors also found antitumor activity of *Crataegus spp.* demonstrated on various cell lines (24).

There are little data published in the scientific literature about the use of hawthorn extract in the production of topical preparations. The literature search did not yield any data pertaining to the skin penetration of the active components of hawthorn extract or the effect of carriers on the release of active components from topical preparations. The physical and chemical properties of the drug substance in the topically applied pharmaceutical forms determines the permeation of a given drug substances through the skin from applied carrier matrix (25). Topical bioavailability of a drug depends on the amount of drug diffusing from the dosage form and reaching the surface of the skin where it can be absorbed. Thus, it is relevant not only to produce stable semisolid preparations but also to study the skin penetration of hawthorn active components and to select suitable carriers that would ensure a proper release of active compounds.

The aim of this research was to model semisolid preparations containing hawthorn extract and to determine the effect of their bases (carriers) on the release of active components from experimental dosage forms, based on the results of the *in vitro*

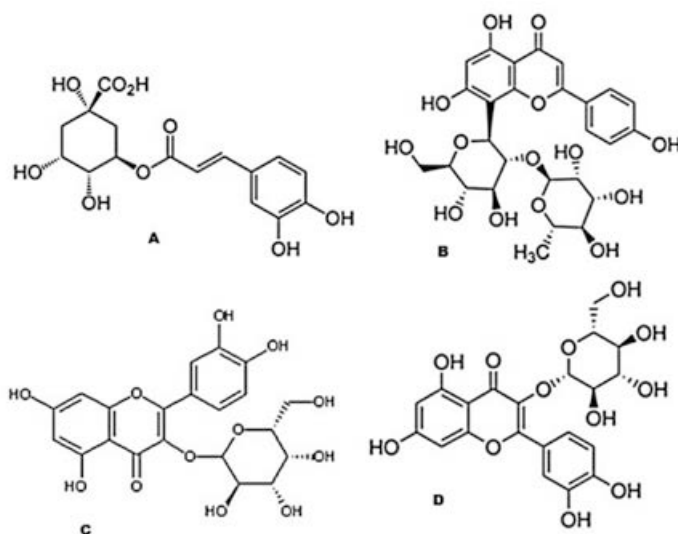


Figure 1. Chemical structure of active compounds of hawthorn flowers and leaves extract. A - chlorogenic acid; B - vitexin-2''-O-rhamnoside; C - hyperoside; D - isoquercitrin

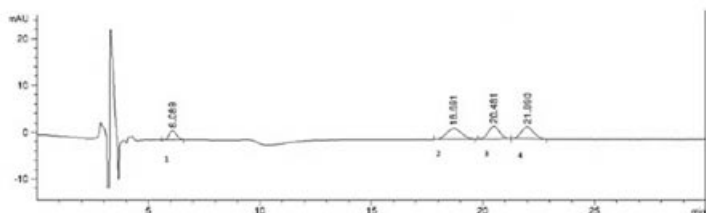


Figure 2. Typical chromatogram of active compounds of hawthorn extract: 1 - chlorogenic acid; 2 - vitexin-2''-O-rhamnoside; 3 - hyperoside; 4 - isoquercitrin

studies of the bioactivity of hawthorn active components and *ex vivo* skin penetration studies.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Vitexin-2''-O-rhamnoside, HPLC grade acetonitrile and acetic acid were purchased from Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Hyperoside, isoquercitrin and chlorogenic acid were purchased from Carl Roth. Standardized dry hawthorn extract was purchased from Naturex (France).

Methods

Preparation of hawthorn extract for analysis

The hawthorn leaf and flower dry extract was dissolved in purified water at the ratio 1 : 20 (w/v) by mixing it with a magnetic stirrer for one hour at room temperature.

HPLC

Amounts of hawthorn active components were evaluated by HPLC method with Agilent 1260 Infinity Capillary LC System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) using the Agilent diode array detector (DAD) and applying validated HPLC method for quantification. The separation was performed in C18 ACE (5 μ m) 150 $\times$ 0.5 mm i.d. column. The mobile phase consisted of the solvent (A) 0.5% aqueous acetic acid (v/v) and (B) acetonitrile, using gradient elution of 10% (B) at 0-3 min, 14% (B) at 3.1-25 min, and 70% (B) at 26-29 min and then returned to the initial conditions with 10 min re-equilibration, with total 40 min run time. The analysis was carried out at a flow rate of 10 μ L/min with the detection wavelength set at 340 nm.

Total phenolic content

Total phenolic content was determined according to the method of Ramanauskienė et al. (26). The

quantity ($n = 3$) of phenolic compounds was determined using Agilent 8453 UV-Vis spectrophotometer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) according to p-coumaric acid equivalents after reaction with Folin-Ciocalteu phenol reagent.

Antiradical scavenging activity

A 0.1 mmol/L DPPH solution was prepared in 96% ethanol. The solution was kept in a cool, dark place for 24 h. The reaction ($n = 3$) was initiated in a cuvette to which 2.9 mL of DPPH solution and 0.1 mL of the analyzed solution were added. The absorbance of the reaction mixture was measured at the wavelength of 518 nm 30 min after the start of the reaction. The results were expressed in percentage of bound DPPH according to Molyneux (27).

Antimicrobial activity

The microbiological examination ($n = 5$) was performed in aseptic conditions. During the microbiological study, the antimicrobial activity of the studied preparation was determined using solid growth media and the well technique. Resistance to preparations from natural material was examined in Mueller-Hinton agar (Mueller-Hinton Agar II, BBL, Cockeysville, USA) with standard cultures of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 12459, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 8035 and *Candida albicans* ATCC 60193. Agar was poured into sterile Petri dishes 85 mm in diameter (20 mL in each dish). Agar wells were 7 mm in diameter and 8 mm deep. The density of microorganism suspensions applied in the test was 0.5 Mac Farland standard scale (5.107 $\times$ 1.108 CFU/mL). The density of the bacterial suspension in the Mueller-Hinton agar was 106 CFU/mL. After the agar solidified, wells were formed in the medium and were filled with the studied preparation. The cultures were incubated for 24 h in a thermostat at

37°C, and then the microorganism growth in the whole agar volume was evaluated.

Rheological flow behavior test

The test ($n = 5$) was performed using the Carri-med CSL² 500 rheometer (TA Instruments, USA), by applying the cone-and-plate geometry system (cone diameter – 60 mm, angle – 2°, sample thickness – 150 µm). The shear rate was increased for 2 min from 0 to 500 s⁻¹. Rheological characteristics were calculated according to the Ostwald de Waele's mathematical model.

In vitro release study

In vitro release experiments ($n = 3$) were performed using the modified Franz type diffusion cells. The semisolid sample (1.00 ± 0.02 g) was placed into these cells with a dialysis membrane. The Cuprophane® dialysis membrane (Medicell International Ltd., London, UK) was made of natural cellulose. Area of the diffusion was 1.77 cm². Purified water was used as an acceptor medium. The temperature of acceptor medium was kept on $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$. The medium was stirred using magnetic stirrer. The samples from the acceptor solution were taken at 1, 2, 4, 6 h and immediately replaced with the same volume of fresh acceptor solution.

Penetration experiment through the full-thickness undamaged human skin

Abdominal skin of Caucasian women (age range: 25-40 years) was obtained from the Department of Plastic and Reconstructive Surgery (the Hospital of the Lithuanian University of Health Sciences, Lithuania) after cosmetic surgery. It was stored at -20°C for not longer than 6 months before use. Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee has approved the use of human skin for transdermal penetration studies. A Bronaugh-type flow-through diffusion cell with full-thickness human skin was used for *ex vivo* skin penetration experiments ($n = 3$). The experiment was performed according to the methods proposed by Kezutyte et al. and Zilius et al. (25, 28, 29).

Statistical data evaluation was performed using the SPSS software with one-way ANOVA. Tukey's *post hoc* test was performed for multiple comparisons. Level of significance was determined as $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental research found phenolic compounds of different classes in the standardized extract of dried hawthorn leaves and flowers: phe-

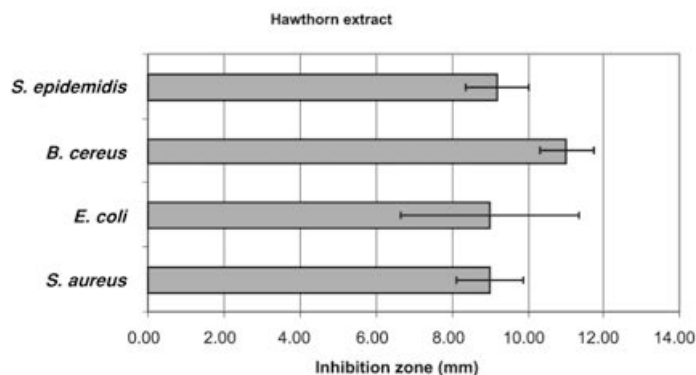


Figure 3. Inhibition zones (mm) of bacterial growth including well diameter (7 mm)

Table 1. Amounts of active components found in dry hawthorn extract.

Analyzed sample	Total phenolic content based on p-coumaric acid equivalent, mg/g	Chlorogenic acid, mg/g	Vitexin-2''-O-rhamnoside, mg/g	Hyperoside, mg/g	Isoquercitrin, mg/g
Dry hawthorn extract	92.00 ± 0.53	7.91 ± 0.52	23.00 ± 1.38	3.65 ± 0.43	1.95 ± 0.89

Table 2. Penetration (n = 3) of standard mix of hawthorn active compounds into human skin *ex vivo*.

Sample	Epidermis, µg/mL			
	Chlorogenic acid	Vitexin-2''-O-rhamnoside	Hyperoside	Isoquercitrin
Standard mix and taped skin	-	-	tr	-
Standard mix	-	-	tr	tr

tr = traces

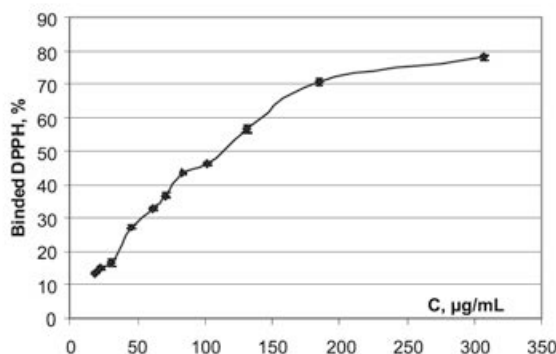


Figure 4. Antiradical activity (n = 3) of the total phenolic content of hawthorn based on the binding of DPPH radical

nolic acid, flavone-C-glycoside, flavonol-O-glycoside. The prevailing compounds, the chemical structure of which is provided in Figure 1, were quantitatively assessed in the hawthorn extract.

A typical chromatogram of active components of hawthorn dried leaves and flowers extract was obtained (seen in Fig. 2), based on the adapted and validated HPLC method. The quality of the dry hawthorn extract was assessed by measuring the amounts of prevailing active components as well as the total phenolic content (Table 1). It has been determined that the hawthorn leaf and flower extract contained the highest levels of vitexin-2''-O-rhamnoside.

While there are research data indicating that hawthorn extracts show antimicrobial activity, the activity against specific microorganisms varies between different authors (4, 14, 15). The aforementioned differences are probably determined by different hawthorn species analyzed, different hawthorn plant materials as well as different solvents. The antimicrobial research carried out by the authors of this study analyzed an aqueous solution of *Crataegus oxyacantha* dried flowers and leaves extract. The results of the antimicrobial activity *in vitro* studies showed that the active components of

the hawthorn extract possess antimicrobial activity. Seven microorganisms were analyzed during the antimicrobial study. The extract of hawthorn flowers and leaves inhibited the growth of *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* and *S. aureus*, whereas *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* remained resistant. *B. cereus* showed the highest degree of sensitivity (the widest zone of inhibition) to the hawthorn extract (Fig. 3).

Different methods can be found in scientific literature to determine antiradical and antioxidant activity of hawthorn extract (14, 16-19). Differences in values of DPPH antiradical activity occur as a result of methodological differences. The study results of antiradical activity showed that the hawthorn extract possesses antiradical activity (Fig. 4). The binding of the free radical DPPH[•] depends on the concentration of compounds: the greater amount of phenolic compounds leads to more powerful radical binding effect.

The results of the bioactivity tests have confirmed the data reported in scientific literature (4, 16) that hawthorn extract is a suitable component for topical preparations due its antimicrobial and antioxidant properties.

Ex vivo penetration experiment was conducted using full-thickness undamaged human skin to determine the capacity of hawthorn active compounds for skin penetration. The study results (Table 2) showed that the epidermis acts as a permeability barrier; no analyzed compounds were found in the dermis. After 24 h of testing, it was determined that the more lipophilic hyperoside and isoquercitrin accumulate in the epidermis but their amounts are below the limit of quantification (Table

2). This can be associated with the fact that the solubility of hyperoside and isoquercitrin is higher in a lipophilic environment than in a hydrophilic one ($\log P$ is 0.4), as compared to the predicted hydrophilic properties of chlorogenic acid and vitexin-2''-O-rhamnoside because their $\log P$ is -0.4 and -1.3, respectively. The permeation test results showed that the hawthorn active compounds do not permeate across the undamaged human skin and their activity is limited to the surface of the skin

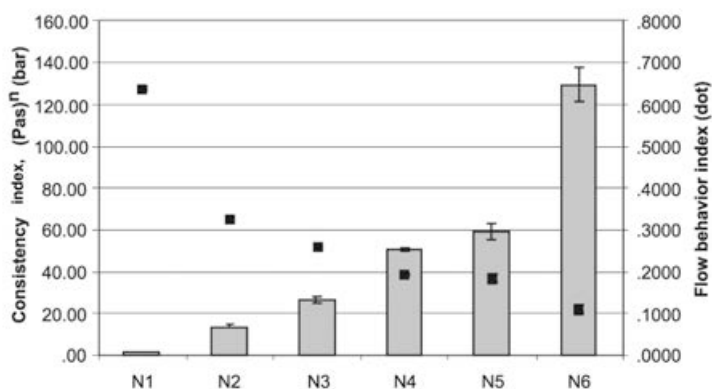


Figure 5. Rheological characteristics of group I samples at the temperature of 30°C

Table 3. Compositions of modelled natural topical formulations (g).

Group	Sample no.	Beeswax	Honey	Butter cacao	Cholesterol	Avocado/Olive oil	Shea butter	Dry hawthorn extract
I	N1	5.0	10.0	10.0	3.0	72.0	-	-
	N2	7.0	10.0	10.0	3.0	70.0	-	-
	N3	9.0	10.0	10.0	3.0	68.0	-	-
	N4	11.0	10.0	10.0	3.0	66.0	-	-
	N5	13.0	10.0	10.0	3.0	64.0	-	-
	N6	15.0	10.0	10.0	3.0	62.0	-	-
II	N7	-	-	-	-	98.0	-	2.0
	N8	0.5	-	-	-	97.5	-	2.0
	N9	1.0	-	-	-	97.0	-	2.0
	N10	1.5	-	-	-	96.5	-	2.0
	N11	2.0	-	-	-	96.0	-	2.0
	N12	3.0	-	-	-	95.0	-	2.0
	N13	5.0	-	-	-	93.0	-	2.0
	N14	-	10.0	10.0	3.0	60.0	-	2.0
III	N15	-	10.0	10.0	3.0	60.0	15.0	2.0
	N16	0.5	10.0	10.0	3.0	60.0	14.5	2.0
	N17	1.0	10.0	10.0	3.0	60.0	14.0	2.0

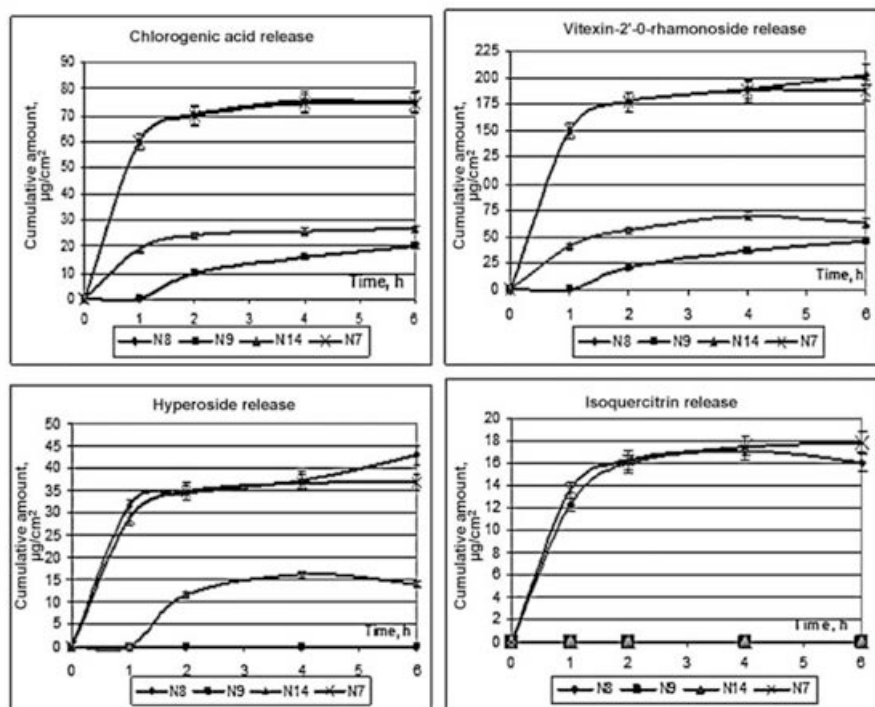


Figure 6. The kinetics of hawthorn active compounds release ($n = 3$) from group II formulations

(Table 2). This is determined by their lipophilicity and skin layer properties. In order to determine whether the stratum corneum limits the penetration of hawthorn active compounds into the human skin, this skin layer was removed. *Ex vivo* penetration results showed that the permeability of active compounds across the human skin with no stratum corneum did not increase over 24 h of the test. No active compounds were found in the dermis layer of the skin. Meanwhile, hyperoside and isoquercitrin (Table 2) were identified in the epidermis with no stratum corneum. The study results showed that the stratum corneum does not limit the permeability of the studied compounds. Based on the results obtained, it can be assumed that the permeability of active compounds is affected by the viable epidermis which is more lipophilic, the closer it is to the stratum corneum (30). The study results have supported the data reported in scientific literature that the physical and chemical properties of the drug substance in the topical dosage forms determines the permeation of the drug substance across the skin (31, 32). Based on the results of these hawthorn skin

penetration tests, it is appropriate to select carriers that act in the epidermis and on its surface and allow modeling a stable protective semisolid preparation for topical application (33). The ointment base for incorporating active substance was selected by combining components of natural origin (Table 3).

Beeswax and olive oil were the main components of semisolid bases of groups I and II. Also, a N7 suspension and a N14 formulation without beeswax were prepared to determine the effect of this material on the release of active substances. Shea butter and olive oil were used as the main components for the base of group III semisolids. An emulsifier – cholesterol for enhanced stability and cocoa butter for better spreadability were incorporated into the base of I and III group semisolids (34). Furthermore, honey was incorporated for its antibacterial, anti-inflammatory and wound-healing properties (35, 36). According to the data reported in scientific literature, honey, olive oil and beeswax mixture is useful on patients with atopic dermatitis, psoriasis vulgaris and eczema (37, 38). Shea butter has moisturizing, anti-inflammatory, UV protection, anti-age-

ing properties (39, 40). Two percent of active substance, extract of dried hawthorn leaves with flowers, was incorporated into the bases (Table 3).

A comparative analysis of rheological characteristics (Fig. 5) between samples of group I revealed a high variety of consistency index from 1.33 to 129.40 (Pa s)ⁿ. It was noticed 2-fold increase of the consistency index when increasing the amount of beeswax by 2 grams (the amount of beeswax range was between 5 to 15 grams) compared with a sample containing less than 2 grams of beeswax. An exception was the range of beeswax between 11 to 13 grams that had a slight effect on rheological characteristics. The highest change (decrease) of flow behavior index was seen when increasing the amount of beeswax from 5 to 7 grams, and later, a consistent reduction of the flow behavior index to 0.1 was observed. All tested samples had pseudoplastic characteristics. Statistical evaluation of rheological characteristics revealed that samples can be divided into four homogeneous subsets ($p > 0.05$) (N1-N2, N2-N3, N4-N5 and N6) according to the consistency

index. On the other hand, there was five homogeneous subsets (N1, N2, N3, N4-N5 and N6) according to the flow behavior index.

The 2% of dry hawthorn extract were added to the semisolid formulations, however the results of the *in vitro* release testing of the active compounds of group I formulations with 2% of dry hawthorn extract showed that these bases are not suitable carriers because the analyzed hawthorn compounds were not released after 6 h of testing. The hypothesis that beeswax may suspend active compounds has been suggested. Therefore, samples of group II (Table 3) were modeled. The experimental tests determined the effect of beeswax on the release of hawthorn active compounds by analyzing the samples of group II (Fig. 6). The results demonstrated that an increase in beeswax content had a statistically significant effect on the release of active substances. The samples (N10-N13) with 1.5-5% of beeswax did not release active substances. The data presented in Figure 5 show that formulations N7 and N8 released significantly higher amounts of active

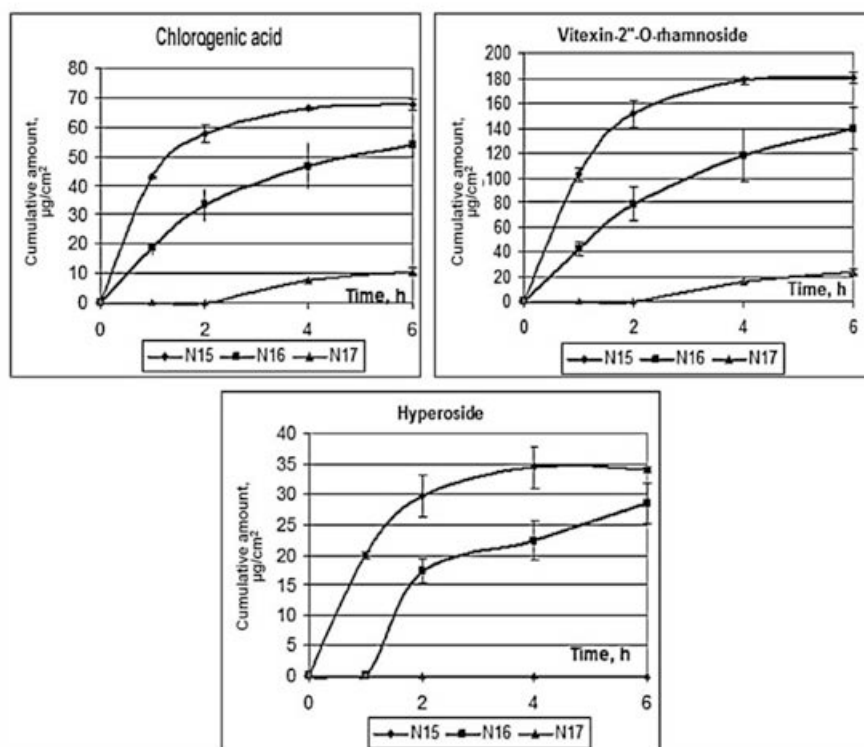


Figure 7. The kinetics of hawthorn active compounds release from group III formulations

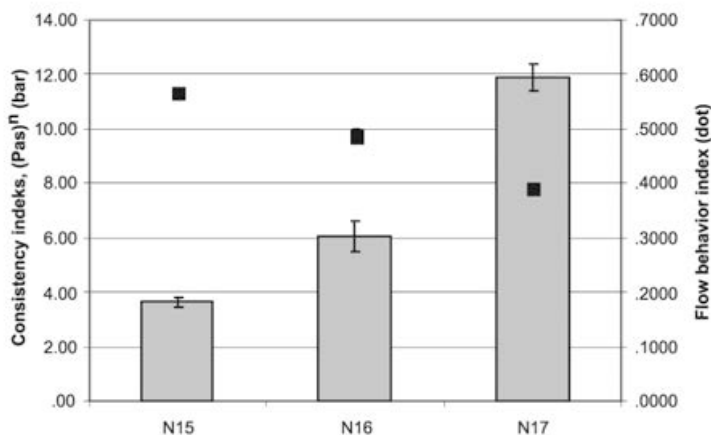


Figure 8. Rheological characteristics of group III samples at the temperature of 25°C

substances compared to the formulations N9 and N14. The results demonstrated that 0.5% of beeswax did not affect the release of active compounds, whereas 1% of this material caused a statistically significant reduction in the amounts of active compounds released. Other components contained in the semisolid formulations (Table 3) decelerate the release of active compounds but their cumulative effect is not significant as compared to the effect of beeswax. The mathematical analysis were performed for cumulative amounts of active substances released per square cm from modeled formulations. It revealed that R^2 values of Higuchi model were 0.829, 0.952, 0.974, 0.830 of formulations N7, N8, N9 and N14, respectively. The study results showed that the release of a drug substance is determined by the components of the selected carrier matrix (41). After analyzing the results obtained from the tests, shea butter was chosen as a thickening agent for the semisolid formulations of group III (Table 3) as a full or partial substitution for beeswax. An *in vitro* release test of hawthorn active compounds from formulated semisolid formulations was conducted (Fig. 7).

The results of the release test (Fig. 7) showed that the formulation N15 without beeswax released the highest amounts (41.4-42.4%) of active substances, and the formulation N17 with 1% of beeswax released the lowest amounts (5.37-6.63%). Formulation N16 released moderate amounts (32.0-35.4%) of active compounds. Moreover, the amount of hyperoside (N17) and amounts of isoquercitrin released from all the formulations were lower than the limit of quantification. According to the release kinetic

profile given in Figure 7, the most rapid processes occurred during the first and the second hour. The deceleration of release was observed after 4 h of the test and stabilization was found after 6 h. The results of statistical analysis showed that amounts of released substances differed statistically significantly between all the tested formulations. The mathematical analysis of kinetic profile of active substances released per square cm from modeled formulations revealed that R^2 values of Higuchi model were 0.864, 0.981, 0.892 of formulations N15, N16 and N17, respectively. The analysis of rheological characteristics (Fig. 8) of group III formulations confirmed literature data that higher amounts of active compounds were released from formulations with lower consistency indices and higher flow behavior indices (42). The rheological characteristics of group III formulations showed that even small amounts of beeswax (up to 1%) statistically significant influenced rheological characteristics of formulations (Fig. 8).

The study results confirmed the hypothesis that the amount of beeswax had an effect of modeled formulation on active substance release. A statistically significant difference was found between group III samples and the sample N14. The amounts of active compounds released from the formulation N14 were lower than those released from the formulations N15 and N16, and higher than those released from the formulation N17. The test results demonstrated that shea butter does not limit the release of hawthorn active components from semisolid forms.

The *ex vivo* skin penetration tests of semisolid samples containing shea butter (Table 3, group III)

revealed that hawthorn active substances do not penetrate into the skin. The test results demonstrated that the formulated semisolid preparation can only affect the surface of the skin. The test results supported the data found in the scientific literature that the physical and chemical properties of a drug substance in topical dosage forms determines the permeability of that substance across the skin from the applied carrier matrix (31, 32).

CONCLUSIONS

The study analyzed the extract of dried hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) leaves with flowers in which the following were identified as the main phenolic compounds: chlorogenic acid, vitexin-2''-O-rhamnoside, hyperoside and isoquercitrin; the extract possesses antibacterial activity against *B. cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *E. coli*, and antiradical activity based on the DPPH radical binding capacity, and can be used as an active ingredient in the topical formulations. The *ex vivo* penetration test using undamaged human skin demonstrated that the permeability of hawthorn active substances is limited: only the traces of hyperoside and isoquercitrin were found in the epidermis. The *in vitro* release tests revealed that beeswax in semisolid formulations has a limiting effect on the release of hawthorn active components.

Declaration of interest

The authors report no declarations of interest.

REFERENCES

- Ramanauskienė K., Zilius M., Briedis V.: *Medicina* (Kaunas) 47, 354 (2011).
- Hougeir F.G., Kircik L.: *Dermatol. Ther.* 25, 234 (2012).
- Stelmakiene A., Ramanauskienė K., Malinauskytė E., Leskauskaitė D.: *J. Med. Plants Res.* 6, 981 (2012).
- Tadić V.M., Dobrić S., Marković G.M., Dordević S.M., Arsić I.A. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 7700 (2008).
- Tassell M.C., Kingston R., Gilroy D., Lehane M., Furey A.: *Pharmacogn. Rev.* 4, 32 (2010).
- Koch E., Malek F.A.: *Planta Med.* 77, 1123 (2011).
- Pittler M.H., Guo R., Ernst E.: *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, CD005312 (2008).
- Barreira J.C.M., Rodrigues S., Carvalho A.M., Ferreira L.C.F.R.: *Ind. Crop. Prod.* 42, 175 (2013).
- Neves J.M., Matos C., Moutinho C., Queiroz G., Gomes L.R.: *J. Ethnopharmacol.* 124, 270 (2009).
- Carvalho A.M., Ed.: *Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal.* Biblioteca de Ciencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid 2010.
- Orhan I., Özcelik B., Kartal M., Özdeveci B., Duman H.: *Chromatographia* 66, Suppl. 1, 153 (2007).
- Shahat A.A., Cos P., De Bruyne T., Apers S., Hammouda F.M. et al.: *Planta Med.* 68, 539 (2002).
- Kao E.S., Wang C.J., Lin W.L., Yin Y.F., Wang C.P., Tseng T.H.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 430 (2005).
- Kostić D.A., Velicković J.M., Mitić S.S., Mitić M.N., Randelović S.S.: *Trop. J. Pharm. Res.* 11, 117 (2012).
- Belkhir M., Rebai O., Dhauadi K., Congiu F., Tuberoso C.I. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 61, 9594 (2013).
- Barros L., Carvalho A.M., Ferreira I.C.: *Phytochem. Anal.* 22, 181 (2011).
- Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman P.B., Warber S., Bolling S., Chang S.C.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 3973 (2003).
- Shortle E., O'Grady M.N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerry J.P.: *Meat Sci.* 98, 828 (2014).
- Ozturk N., Tuncel M.: *J. Med. Food.* 14, 664 (2011).
- Dumitriu B., Olariu L., Ene M.D., Zglimbea L., Rosoiu N.: *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* 1, 177 (2012).
- Jalali A.S., Hassanzadeh S., Malekinejad H.: *Vet. Res. Forum* 2, 266 (2011).
- Kao E.S., Wang C.J., Lin W.L., Chu C.Y., Tseng T.H.: *Food Chem. Toxicol.* 45, 1795 (2007).
- Rodrigues S., Calhella R.C., Barreira J.C.M., Dueñas M., Carvalho A.M. et al.: *Food Res. Int.* 49, 516 (2012).
- Sun J., Gao G., Gao Y., Xiong L., Li X.: *Cell Biochem. Biophys.* 67, 207 (2013).
- Zilius M., Ramanauskienė K., Briedis V.: *Evid-Based Compl. Alt. Med.* 2013, Article ID 958717 (2013).
- Ramanauskienė K., Zilius M., Briedis V.: *Medicinos teorija ir praktika* 18, 181 (2012).
- Molyneux P.: *Songklanakarini J. Sci. Technol.* 26, 211 (2004).

28. Kezutyte T., Kornysova O., Maruska A., Briedis V.: *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 67, 327 (2010).
29. Kezutyte T., Drevinskas T., Maruska A., Rimdeika R., Briedis V.: *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 68, 965 (2011).
30. Karadzovska D., Brooks J.D., Monteiro-Riviere N.A., Riviere J.E.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 265 (2013).
31. Trommer H., Neubert R.H.: *Skin Pharmacol. Physiol.* 19, 106 (2006).
32. Zhao L., Fang L., Xu Y., Liu S., He Z., Zhao Y.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 199 (2008).
33. Barry B.W.: *Drug Discov. Today* 6, 967 (2001).
34. Betageri G., Prabhu S. Semisolid preparations. in: Swarbrick J., Ed., *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, pp. 3257-3274. Informa Healthcare, New York 2007.
35. Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E., Battino M.: *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 3, 15 (2009).
36. Cooper R.A., Fehily A.M., Pickering J.E., Erusalimsky J.D., Elwood P.C.: *Curr. Aging Sci.* 3, 239 (2010).
37. Al-Waili N.S.: *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 160 (2005).
38. Al-Waili N.S.: *Complement. Ther. Med.* 11, 226 (2003).
39. Honfo F.G., Akissoe N., Linnemann A.R., Soumanou M., Van Boekel M.A.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 673 (2014).
40. Israel M.O.: *Am. J. Life Sci.* 2, 303 (2014).
41. Montenegro L., Carbone C., Puglisi G.: *Int. J. Pharm.* 405, 162 (2011).
42. el Gendy A.M., Jun H.W., Kassem A.A.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 823 (2002).

Received: 30. 06. 2015

Release of rosmarinic acid from semisolid formulations and its penetration through human skin *ex vivo*

ADA STELMAKIENĖ
KRISTINA RAMANAUSKIENĖ
VITALIS BRIEDIS

Department of Clinical Pharmacy
Lithuanian University of Health
Sciences, Kaunas, Lithuania

The aim of this study was to evaluate the release of rosmarinic acid (RA) from the experimental topical formulations with the *Melissa officinalis* L. extract and to evaluate its penetration through undamaged human skin *ex vivo*. The results of the *in vitro* release study showed that higher amounts of RA were released from the emulsion vehicle when lemon balm extract was added in its dry form. An inverse correlation was detected between the released amount of RA and the consistency index of the formulation. Different penetration of RA into the skin may be influenced by the characteristics of the vehicle as well as by the form of the extract. The results of penetration assessment showed that the intensity of RA penetration was influenced by its lipophilic properties: RA was accumulating in the epidermis, while the dermis served as a barrier, impeding its deeper penetration.

Keywords: human skin penetration, rosmarinic acid, rheology, release

Accepted October 21, 2014

Atopic dermatitis is one of the most common skin diseases. Since dermatologic products from natural raw materials are becoming increasingly popular, it is relevant to produce a semisolid transdermal preparation that would have not only natural active ingredients, but a natural base as well. A clinical study performed by Lee *et al.* (1) showed »the possible clinical use of rosmarinic acid (RA) as a therapeutic agent for atopic dermatitis«. Rosmarinic acid demonstrated cellular protective properties against the damaging radical species induced by UVB radiation (2). Scientific literature describes penetration studies with RA using Caco-2 cell monolayers (3), which reflects penetration of RA through the intestinal wall. Research has shown (3) that the botanical matrix had no effect on RA penetration through the Caco-2 cell monolayer. Lee *et al.* (1) performed a clinical study to evaluate the effect of a topical RA preparation. However, in our review of scientific literature, we failed to find any studies analyzing the penetration of RA through undamaged full-thickness human skin.

* Correspondence; e-mail: ada.stelmakienė@yahoo.com

RA is the key active ingredient of a *Melissa officinalis* L. extract (4). *European Pharmacopoeia*, monograph *Melissa officinalis* L. leaves, states that *Melissa officinalis* L. leaves should contain at least 4 % of hydroxycinnamic acids expressed as RA. RA is also known as an antiviral (5), anti-inflammatory (5), antioxidant (6), photoprotective (2) and anti-proliferative (6) component of *Melissa officinalis* L., which makes it relevant to apply the *Melissa officinalis* L. extract as a natural source of RA in the modeling of semisolid formulations.

The aim of this study was to evaluate the release of rosmarinic acid from the experimental topical formulations with the *Melissa officinalis* L. extract and to evaluate its penetration through undamaged human skin *ex vivo*.

EXPERIMENTAL

Materials

Rosmarinic acid, HPLC-grade acetonitrile, and acetic acid were purchased from Sigma Aldrich Chemie GmbH (Germany). Standardized dry lemon balm extract (*sicc. Extractum Melissa officinalis*) was purchased from Naturex (France).

Methods

Preparation of semisolid formulations. – The components of the formulation are listed in Table I. The choice of the components for the ointment and w/o cream semisolid vehicles were developed with reference to the earlier published research data (7). In accordance with the study of Lee *et al.* (1), the formulations were produced with 4 % of dry lemon balm extract containing 80 mg g⁻¹ RA. Formulations were prepared according to the general technological principles of semisolid preparation.

Quantification of rosmarinic acid by HPLC. – The amount of RA was evaluated by applying the capillary HPLC method, which was developed and validated, using the Agilent 1260 Infinity Capillary LC System (Agilent Technologies, USA) with an Agilent diode array detector. The separation was performed on a C18 ACE (5 µm) 150x0.5 mm i.d. column. The

Table I. Composition (g) of semisolid formulations with *Melissa officinalis* L. extract

	Beeswax	Paraffin	Vaseline	Honey	Cocoa butter	Cholesterol	Olive oil	Water	Aqueous lemon balm extract, 1:15	Dry extract
N 1	6.0	5.0	5.0	–	10.0	3.0	67.0	–	–	4.0
N 2	15.0	–	–	10.0	10.0	3.0	58.0	–	–	4.0
N 3	5.0	–	–	10.0	10.0	3.0	33.0	35.0	–	4.0
N 4	5.0	–	–	10.0	10.0	3.0	37.0	–	35.0	–

mobile phase consisted of solvents A (0.5 % aqueous solution of acetic acid, V/V) and B (acetonitrile) using the following gradient elution: 23 % of B at time 0, 40 % of B at 10 min, and 70 % of B at 11–15 min, and then returned to the initial conditions by 10-minute re-equilibration, with the total run time of 25 minutes. The analysis was carried out at a flow rate of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, with the detection wavelength set at 330 nm.

Rheological flow behavior test. – The test ($n = 5$) was performed using the Carri-med CSL² 500 rheometer (TA Instruments, Germany), applying the cone-and-plate geometry system (cone diameter 60 mm, angle 2°, sample thickness 150 μm). The shear rate was increased from 0 to 500 s^{-1} for 2 minutes. The rheological properties of the samples were determined according to the Oswald de Waele (8) equation:

$$\sigma = K \dot{\gamma}^n$$

where σ is shear stress (Pa), $\dot{\gamma}$ is shear rate (s^{-1}), and K is the consistency index [$(\text{Pa s})^n$] which is the indicator of viscosity. The flow behavior index (n) is a dimensionless number that indicates the closeness to the Newtonian flow. For a Newtonian liquid $n = 1$ for a dilatant fluid $n > 1$, and for a pseudoplastic fluid $n < 1$ (8).

In vitro release study. – *In vitro* release experiments were performed using modified Franz-type diffusion cells (9). The semisolid sample (1.00 ± 0.02 g) was placed into the cell with a dialysis membrane Cuprophane® (Medicell International Ltd., UK). The area of the diffusion was 1.77 cm^2 . Thermostated (37 ± 0.2 °C) purified water acted as the acceptor medium. The medium was stirred using a magnetic stirrer. Samples from the acceptor solution were taken at 1, 2, 4, and 6 h and were immediately replaced with the same volume of fresh acceptor solution.

Ex vivo penetration through the full-thickness undamaged human skin. – Abdominal skin of Caucasian women (age range 25–40 years) was obtained from the Department of Plastic and Reconstructive Surgery (the Hospital of the Lithuanian University of Health Sciences, Lithuania) after cosmetic surgery. It was stored at -20 °C for not longer than 6 months before use. Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee had approved the use of human skin for transdermal penetration studies. A Bronaugh-type flow-through diffusion cell with full-thickness human skin was used for *ex vivo* skin penetration experiments ($n = 3$). The experiment was performed according to the methods proposed by Kezutyte et al. and Zilius et al. (9, 10).

Statistical data evaluation was performed using the SPSS software with one-way ANOVA. Tukey's *post hoc* test was performed for multiple comparisons.

RESULTS AND DISCUSSION

Stable vehicles were developed in our previous research (7). Vehicles contained all components indicated in Table I, except *Melissa officinalis* L. extract. Formulation N1 was a hydrophobic vehicle with solid paraffin and vaseline, formulation N2 a hydrophobic vehicle with beeswax instead of paraffin and honey instead of vaseline, formulation N3 was an emulsion vehicle with dry *Melissa officinalis* L. extract, and formulation N4 was an emulsion vehicle with aqueous *Melissa officinalis* L. extract. During the first stage of the study, we evaluated the influence of the semisolid bases and the addition of the extract on the rheological characteristics of the formulations by determining their consistency index and

flow behavior index. Modification of viscosity is an important part of the preparation of semisolid formulations and is regarded to be a critical quality attribute in the development stage of the product (11). To evaluate the possible effect of temperature on the structure of semisolid formulations during their storage period, we selected the temperature of 30 °C, which was approximate to the melting temperature of the experimental formulations as well as to the skin surface temperature. The obtained results showed that all the investigated formulations displayed pseudoplastic characteristics. The results of the experiments showed that addition of the *Melissa officinalis* L. extract significantly reduced consistency indices of the formulations and increased their flow behavior indices compared to the rheological characteristics of the vehicles (Fig. 1).

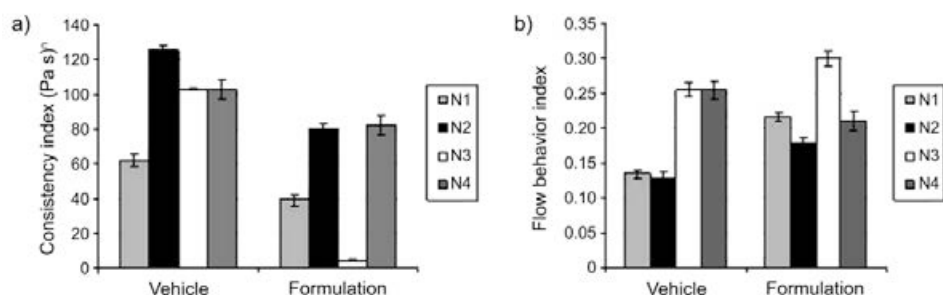


Fig. 1. Rheological properties of semisolid formulations with *Melissa officinalis* L. extract and vehicles at 30 °C: a) consistency index, b) flow behaviour index (mean $\pm$ SD, $n = 5$).

The addition of dry *Melissa officinalis* L. extract had the greatest influence on the rheological properties of N3 as compared to those of hydrophobic formulations (N1 and N2). The results showed that the addition of the active substance in its dry form had a greater impact on the rheological properties of emulsion formulations. The calculated consistency and flow behavior indices reflected the effect of the *Melissa officinalis* L. extract on the weakening of the structure of semisolid formulations, which may affect the expiry date of formulations.

The results of the RA release studies were in line with the published data, demonstrating that the release of drug substances from semisolid vehicles is influenced not only by the properties of the drug molecule, but also by the properties of the vehicle (12). Data presented in Fig. 2 show that higher amounts of RA were released from the vehicles (N1, N2, and N3) when the *Melissa officinalis* L. extract was added in its dry form compared to formulation N4, which contained an aqueous lemon-balm extract. The results of the experiments demonstrated that formulation N4 released the lowest amounts (less than 1 %) of RA (Fig. 2) within 6 hours of testing. Hypothetically, it can be stated that the diffusion of RA from the aqueous phase of this emulsion was hampered by the inner lipophilic phase. The highest amounts (39.6 %) of RA were released from the emulsion vehicle N3 within 6 hours. Results of the statistical analysis revealed a statistically significant ($p < 0.01$) inverse correlation (Spearman's correlation coefficient of -0.82) between the consistency index and the amount of RA released from the formulations within 6 hours of the experiment. However, no statistically significant differences between N1, N2 or N4 were found.

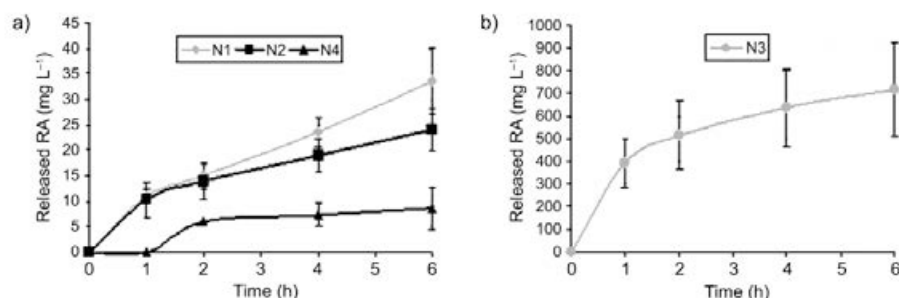


Fig. 2. Release profiles of rosmarinic acid from semisolid formulations with *Melissa officinalis* L. extract: a) N1, N2 and N4, b) N3 (mean $\pm$ SD, $n = 3$).

A statistically significant ($p < 0.05$) difference of RA release from N3 could be determined by the consistency index, which was significantly ($p < 0.05$) different from that of the emulsion base. Since the consistency index indicates viscosity (8), and viscosity, in turn, has an inversely proportional influence on the diffusion process, a decrease in viscosity could lead to an increase in the substance release rate.

Penetration of RA from the aqueous *Melissa officinalis* L. extract through the skin was influenced only by the diffusion process and the properties of the active substance itself. It was therefore, used as a penetration reference. Penetration tests through undamaged human skin within 24 hours revealed that the aqueous *Melissa officinalis* L. extract penetrated the epidermis and the dermis; unfortunately, the amounts traced in the dermis could not be assessed quantitatively. The results confirmed the data presented in the literature, indicating that passive diffusion of a solute from its vehicle into the skin is determined by the unique molecular and physical properties of the diffusant, the vehicle and the skin (13).

The results of the study showed that RA from hydrophobic formulations N1 and N2 penetrated the epidermis within 24 hours of the experiment (Table II), and the amount penetrated (0.20 % and 0.15 %, respectively) was half that of RA from the reference. No RA was found in the dermis. The obtained results also showed that the penetration of RA was limited by the release of the active substance from the dosage form. It should be noted that hydrophobic formulations contain 15 % of substances that form a film on the surface of the skin (beeswax, paraffin, or petroleum jelly) (14), which may constitute an additional barrier to RA. RA that penetrated from N4 was also traced only in the epidermis (0.22 %). The results of the statistical analysis revealed that there was no statistically significant difference in the amounts of RA that penetrated the epidermis from formulations N1, N2, and N4. The results of the experiments demonstrated that the penetration of RA from formulation N3 into the epidermis was approximately 6-fold higher (1.08 %) compared to the results after the application of N1, N2 and N4. The quantities of RA were significantly higher in the epidermis when emulsion N3 was used as a vehicle for RA if compared to the application of the reference. The results of the penetration assessment showed that RA was accumulating in the epidermis, and the hydrophilic dermis acted as a barrier preventing deeper penetration and entry of RA into systemic blood flow. Data showed that the penetration of RA from N3 was enhanced because the penetration was greater than the refer-

Table II. Penetration of rosmarinic acid into the epidermis and dermis from semisolid formulations with *Melissa officinalis* L. extract

Rosmarinic acid (%)	Sample				
	Aqueous extract of <i>Melissa officinalis</i> L. (1:15)	N 1	N 2	N 3	N 4
Epidermis	0.42 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.15 ± 0.00	1.08 ± 0.18	0.22 ± 0.01
Dermis	tr	0	0	tr	0
Acceptor	0	0	0	0	0

tr – traces

^aAfter 24-hours application.

ence. The enhancer was probably olive oil, which was one of the components of the vehicle. Olive oil contains high amounts of oleic acid, which is known as a penetration enhancer (15). RA was not found in the acceptor phase of any sample. These results have show that RA used topically generates only local effects.

CONCLUSIONS

The results of the *in vitro* release study showed that higher amounts of RA were released from the emulsion vehicle when the *Melissa officinalis* L. extract was added in its dry form. An inverse correlation was detected between the amount of RA released and the consistency index of the vehicle, the decreasing viscosity of the formulations resulting in higher amounts of RA being released. Differences in penetration of RA into the skin may be influenced by the characteristics of the vehicle as well as by the form of the extract. The results have shown that RA used topically generates only local effects. Further studies are required for the development of more effective lemon balm extract-containing formulations that would ensure a better penetration of RA into the skin.

Acknowledgements. – We thank the Department of Food Technology, Kaunas University of Technology, and its staff for providing the possibility to work with the Carri-med CSL² 500 rheometer (TA Instruments, Germany).

REFERENCES

1. J. Lee, E. Jung, J. Koh, Y. S. Kim and D. Park, Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis, *J. Dermatol.* **35** (2008) 768–771; DOI: 10.1111/j.1346-8138.2008.00565.x.
2. S. Lembo, A. Balato, R. Di Caprio, T. Cirillo, V. Giannini, F. Gasparri and G. Monfrecola, The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine/chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) cells, *Biomed. Res. Int.* (2014) Article ID 346793; DOI: 10.1155/2014/346793.
3. Z. Qiang, Z. Ye, C. Hauck, P. A. Murphy, J. A. McCoy, M. P. Widrlechner, M. B. Reddy and S. Hendrich, Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers, *J. Ethnopharmacol.* **137** (2011) 1107–1112; DOI: 10.1016/j.jep.2011.07.037.

4. A. Arceusz and M. Wesolowski, Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **83** (2013) 215–220; DOI: 10.1016/j.jpba.2013.05.020.
5. V. Swarup, J. Ghosh, S. Ghosh, A. Saxena and A. Basu, Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis, *Antimicrob. Agents Chemother.* **51** (2007) 3367–3370; DOI: 10.1128/AAC.00041-07.
6. J.-T. Lin, Y.-C. Chen, Y.-C. Lee, C.-W. Rolis Hou, F.-L. Chen and D.-J. Yang, Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *LWT – Food Sci. Technol.* **49** (2012) 1–7; DOI: 10.1016/j.lwt.2012.04.009.
7. A. Stelmakienė, K. Ramanauskienė, E. Malinauskaitė and D. Leskauskaitė, Modelling of semisolid natural basis and powder of liquorice as active constituent influence on rheological characteristics of systems, *J. Med. Plants Res.* **6** (2012) 2567–2575; DOI: 10.5897/JMPR11.512.
8. M. C. Bourne, *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*, 2nd ed., Academic Press, San Diego 2002, pp. 87–89.
9. M. Žilius, K. Ramanauskienė and V. Briedis, Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin *in vitro*, *Evid. Based Compl. Altern. Med.* (2013) Article ID 958717; DOI: 10.1155/2013/958717.
10. T. Kezutyte, T. Drevinskas, A. Maruska, R. Rimdeika and V. Briedis, Study of tolinaftate release from fatty acids containing ointment and penetration into human skin *ex vivo*, *Acta Pol. Pharm.* **68** (2011) 965–973.
11. R.-K. Chang, A. Raw, R. Lionberger and L. Yu, Generic development of topical dermatologic products: Formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products, *AAPS J.* **15** (2013) 41–52; DOI: 10.1208/s12248-012-9411-0.
12. I. N. Eros, E. Y. Abu-Eida, I. Csoka, Z. Santa, A. R. Cserne and T. N. Kover, Optimization of drug release from dermatological semisolid preparations, *Drug Devel. Res.* **59** (2003) 316–325; DOI: 10.1002/ddr.10213.
13. S. Farahmand and H. I. Maibach, Estimating skin permeability from physicochemical characteristics of drugs: a comparison between conventional models and an *in vivo*-based approach, *Int. J. Pharm.* **375** (2009) 41–47; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.03.028.
14. D. J. Hall, *Edible Coatings from Lipids, Waxes, and Resins*, in *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, 2nd ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton 2012, pp. 79–102.
15. M. E. Lane, Skin penetration enhancers, *Int. J. Pharm.* **447** (2013) 12–21; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.040.



Short communication

The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey

Kristina Ramanauskiene^a, Ada Stelmakiene^{a,*}, Vitalis Briedis^a, Liudas Ivanauskas^b, Valdas Jakštas^c^a Department of Clinical Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Mickėvieciaus Str. 9, Kaunas, Lithuania^b Department of Analytical and Toxicological Chemistry, Lithuanian University of Health Sciences, Mickėvieciaus Str. 9, Kaunas, Lithuania^c Department of Pharmacognosy, Lithuanian University of Health Sciences, Mickėvieciaus Str. 9, Kaunas, Lithuania

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2010

Received in revised form 5 October 2011

Accepted 5 December 2011

Available online 13 December 2011

Keywords:

Honey

Vanillin

Phenolic acid

Monofloral

Polyfloral

ABSTRACT

Different sorts of Lithuanian honey were analysed by quantitative determination of eight free phenolic acids and phenylpropanoid vanillin using high performance liquid chromatography (HPLC). Aqueous ethanol 60% was used as a solvent for preparation of honey samples. Amounts of phenolic acids honey solutions were in the range from 7.176 to 125.624 mg/ml. Free phenolic acids and vanillin had been detected in all samples of honey, but their composition and amount depended on its botanic origin. *p*-Coumaric and ferulic acids proved to be the main components in the acacia and buckwheat honey. Raspberry and polyfloral forest honey contained the highest amounts of chlorogenic acid. Gallic acid is a principal phenolic acid in eucalyptus honey. The highest amount of vanillin was identified in buckwheat honey. The results of the analysis revealed that free phenolic acids and vanillin were detected in all honey samples analysed, and their range and amounts varied.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, honey is one of the last remaining untreated natural foods, minimally affected by industrial technologies and highly varying consumer characteristics. Honey is one of the oldest and traditional sweetening agents for foods and it has still retained a "natural" image (Aparna & Rajalakshmi, 1999). This natural product is widely appreciated as the only concentrated form of sugar available worldwide and is also used for food preservation (Cherbuliez & Domergo, 2003; Ferreira, Aires, Barreira, & Esteveinho, 2009). Honey is an important and unique food product containing bioactive compounds derived from bees and plants (Kaškonienė, Maruška, & Kornyšova, 2009). Honey has been reported to contain up to 200 substances (complex mixture of carbohydrates as well as small amounts of other constituents such as minerals, proteins, vitamins, organic acids, flavonoids, phenolic acids, enzymes and other phytochemicals), and is considered to be an important part of traditional medicine (White, 1979). Application of honey for wound infections and healing is well documented in medical publications (Carson & Riley, 2003; Van den Berg et al., 2008). Modern medicine rediscovers therapeutic properties of natural honey after its potential has been confirmed by clinical trials in gastric and cardiovascular diseases (Alvarez-Suarez, Tulipani, Romandini, Bertoli, & Battino, 2010).

Honey contains phenolic compounds, which are recognised as natural antioxidants thus supporting the application of its use in

specific health conditions. These compounds can also be used as the indicators in the studies of the floral and geographical origin of honey and propolis. Phenolic acids are important group of compounds with respect to appearance and functional properties. Phenolic compounds occurring in honey have been classified into three groups: flavonoids, cinnamic acids and benzoic acids (Amiot, Aubert, Gonnet, & Tacchini, 1989). Some researchers classified phenolic compounds into two groups: phenolic acids including phenolic esters and flavonoids (Amiot et al., 1989; Martos et al., 2000). The composition of honey phenolic compounds depends on the floral source used to collect nectar, seasonal and environmental factors, geographic origin, storage conditions; additionally, the processing may affect antioxidant activity of honey which is determined by the composition of phenolic compounds (Anklam, 1998). Differences in physical properties of honey (colour, viscosity, hygroscopic properties and pH) and taste are mainly determined by botanical composition of honey (volatile compounds, carbohydrates and phytochemicals) that can vary significantly. Existing data on chemical composition confirm the differences in qualitative and quantitative composition of honey polyphenols. Determination of total polyphenols in Portugal rosemary, viper's bugloss and heather honeys revealed variations from 132.0 µg/g for honey extract and up to 728.0 µg/g for whole honey. The lower values were determined in the case of honey extracts and that could be explained by losses of some ingredients during extraction process (Ferreira et al., 2009). The total content of phenolic compounds in herbal honeys from Romania was in the range 20.0–450.0 µg/g (Al et al., 2009). Determined quantities of phenolic acids in Australian honeys were relatively low and ranged from 2.13 mg/

* Corresponding author. Tel.: +370 37327254.

E-mail address: ada.stelmakiene@yahoo.com (A. Stelmakiene).

100 g in sunflower honey to 12.11 mg/100 g in tea tree honey, while the amounts of individual acids varied significantly (Socha, Juszczak, Pietrzyk, & Fortuna, 2009). Polish researchers have determined phenolic acids and flavonoids in buckwheat, acacia and honeydew honeys while developing liquid chromatography/tandem mass spectrometry analytical method (Pyrzyska & Biesaga, 2009). Available data demonstrates a key role of phenolic acids and phenylpropanoids in antioxidative defence mechanisms in biological systems, exhibit health-promoting effects and may have inhibitory effects on mutagenesis and carcinogenesis (Ivanuskas, Jakštas, Radušienė, Lukošius, & Baranauskas, 2008). Phenolic acids and phenylpropanoids have showed a significant antibacterial activity (Aljadi & Yusoff, 2003). A contribution of natural phenolic compounds to the nutritional quality of fruits and fruit products, which play an important role in the daily diet, is clearly established (Summanen, 1999). Thus phenolic acids and phenylpropanoids could be proposed as the reliable indicators of honey quality and authenticity. The aim of the study was to determine the qualitative and quantitative composition of free phenolic acids (caffeic acid, chlorogenic acid, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, rosmarinic acid and vanillic acid) and phenylpropanoid vanillin in various sorts of Lithuanian honey by high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. Analysis of obtained data will support preliminary conclusions on possibilities to identify sorts of Lithuanian honey referring to the phenolic fingerprint and provide data for comparison to the similar results presented by other research groups.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Four honey samples were collected in Lithuania in 2008 during the flowering season in central geographical region of Lithuania. Three samples of monofloral raspberry (*Rubus idaeus*), acacia (*Acacia catechu*) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) honey and the sample of polyfloral forest honey were selected for the analysis since they are main honey sorts consumed in Lithuania. For comparative purposes samples of eucalyptus honey (*Eucalyptus globules*) of Spanish origin purchased from the supermarket was analysed.

2.2. Detection of free phenolic acids and phenylpropanoids by high-performance liquid chromatography

2.2.1. Test solution

For the analysis of the active substances, 30% of honey ethanol solutions were used. For the extraction of active substances from honey 60% ethanol was used. After extraction, the honey extract was filtered through a paper filter. Solutions were filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 µm (membrane filters for syringes, nylon membrane, diameter of 13 mm; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

2.2.2. Materials

Methanol for HPLC analysis was of HPLC grade and was purchased from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Distilled water used for the preparation of solvents was filtered through the Millipore HPLC grade water preparation cartridge (Millipore, Bedford, USA) and 0.45 µm pore size membrane filter. Standards of phenolic acids and phenylpropanoids were purchased from ChromaDex (Santa Ana, USA). HPLC analysis with UV/PDA detection was carried out using the Waters 2690 chromatography system model (Waters, Milford, USA), equipped with a Waters 2487 UV/Vis detector and Waters 996 PDA detector. A Hichrom column Hypersil

H50DS-150A 150 × 4.6 mm (Hichrom Ltd., Berkshire, UK) and a H50DS-10C guard-cartridge were used for separation. The data were collected and analysed using Waters Millennium 2000® chromatographic manager system (Waters Corporation, Milford, USA) software. Eluent A was methanol and eluent B was 0.5% (v/v) acetic acid in water. The elution profile was as follows: 0 min 10% A in B, 28 min 60% A in B and 30 min 10% A in B. All gradients were linear. The flow rate was 1 ml/min, the column temperature was ambient, and the injection volume was 10 µl. UV detection was performed at 290 nm. An identification of eluted components was based on the retention time by comparison of the reference standard. The identity of constituents was also confirmed with a PDA detector by comparison with UV spectra of the reference standard in the wavelength range of 190–400 nm (Ivanuskas et al., 2008; Ramanauskienė et al., 2009).

Statistical analysis was performed using statistical software package Statistica 5.5. The data is presented as mean ± SD (standard deviation), and SE (standard errors). Statistical analysis was performed using Student's *t* test, and *P* < 0.05 was used as the level of significance. All samples were prepared in triplicate.

3. Results and discussion

The qualitative and quantitative fingerprint of phenolic acids in honey could be evaluated using it as a reliable indicator of honey origin and quality. The samples of Lithuanian honey were analysed to determine the significance of differences between composition of free phenolic acids and phenylpropanoid vanillin, and in respect of eucalypt honey. The HPLC analysis confirmed the presence of the phenolic acids and phenylpropanoid vanillin in the analysed honey samples. The chemical structures of determined phenolic acids and vanillin are presented in Fig. 1.

Analytical data demonstrated that the highest total amount of phenolic acids was detected in forest (125,624 µg/ml) and buckwheat (117,434 µg/ml) honey (Table 1). The determined quantities of phenolic acids in acacia, raspberry and eucalyptus honey samples were significantly lower. The difference between the quantities of phenolic acids in polyfloral forest honey and monofloral buckwheat honey was statistically significant. Similarly, the differences between the quantities of phenolic acids in raspberry and acacia Lithuanian honeys were also statistically significant. Nevertheless, the total amount of phenolic acids could not be recommended as a single indicator for honey quality confirmation.

Gallic acid is one of the phenolic acids frequently determined in samples of honey of different geographic origin (Oddo et al., 2008). Gallic acid was found to be the dominant acid in some Australian, New Zealand and Peruvian honeys (Gómez-Caravaca, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2006; Rodríguez-Malaver et al., 2009; Yao et al., 2003; Yao, Jiang, Singanusong, Datta & Raymont, 2004, 2005). The analysed samples of Lithuanian honey contained relatively low amounts of gallic acid, and it was below limit of detection in analysed samples of acacia and buckwheat honey that had been collected in Lithuania. A typical chromatogram of acacia honey is provided in Fig. 2. The analysed eucalyptus honey sample contained the highest amount of gallic acid, and that could be considered as one of characteristic differences when compared with analysed samples of Lithuanian honey. The results of the analysis are in line with the data available from other groups of researchers that concluded gallic acid as one of the dominating acids in eucalyptus honey (Gómez-Caravaca et al., 2006; Yao et al., 2003, 2004). The chromatogram of analysed eucalyptus honey is presented in Fig. 3.

Available data on contents of ferulic and *p*-coumaric acids in Lithuanian propolis products have indicated relatively high quantities (Ivanuskas et al., 2008; Ramanauskienė et al., 2009).

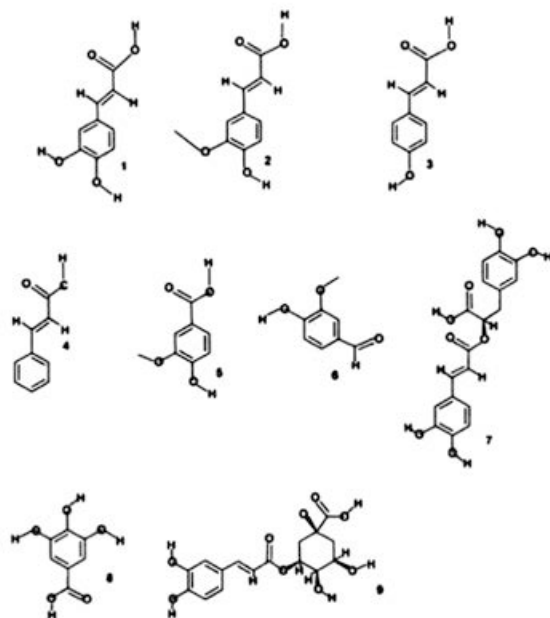


Fig. 1. The structures of the analysed compounds. 1-caffeic acid; 2-ferulic acid; 3-coumaric acid; 4-cinnamic acid; 5-vanillic acid; 6-vanillin; 7-rosmarinic acid; 8-gallic acid; 9-chlorogenic acid.

Table 1

The amounts of phenolic acids in the analysed honey samples.

Phenolic acid	Amount of phenolic acids				
	Mean ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ SD				
	Acacia	Raspberry	Buckwheat	Eucalyptus	Forest
Gallic acid	<LOD ^a	1.041 $\pm$ 0.029	<LOD	5.150 $\pm$ 0.041	0.774 $\pm$ 0.019
Chlorogenic acid	0.754 $\pm$ 0.012	5.751 $\pm$ 0.051	18.402 $\pm$ 0.057	1.044 $\pm$ 0.049	79.106 $\pm$ 0.026
Vanillic acid	<LOD	0.295 $\pm$ 0.011	2.310 $\pm$ 0.028	0.320 $\pm$ 0.21	8.048 $\pm$ 0.054
Caffeic acid	0.494 $\pm$ 0.022	0.225 $\pm$ 0.046	3.831 $\pm$ 0.037	0.376 $\pm$ 0.062	4.736 $\pm$ 0.058
Coumaric acid	3.674 $\pm$ 0.009	0.852 $\pm$ 0.08	43.676 $\pm$ 0.051	3.323 $\pm$ 0.024	2.147 $\pm$ 0.012
Rosmarinic acid	0.412 $\pm$ 0.025	0.440 $\pm$ 0.011	0.500 $\pm$ 0.028	0.529 $\pm$ 0.027	8.389 $\pm$ 0.016
Cinnamic acid	0.453 $\pm$ 0.046	0.023 $\pm$ 0.054	3.299 $\pm$ 0.052	0.274 $\pm$ 0.047	0.104 $\pm$ 0.058
Ferulic acid	1.389 $\pm$ 0.014	0.745 $\pm$ 0.025	35.128 $\pm$ 0.017	2.014 $\pm$ 0.018	22.320 $\pm$ 0.031
Total amount of phenolic acids	7.176	9.372	117.434	13.03	125.624

^a LOD – limit of detection.

Dependence of *p*-coumaric and ferulic acids quantities in honey was associated with its botanical origin (Aljadi & Yusoff, 2003; Gómez-Caravaca et al., 2006). Characteristic feature of buckwheat honey was high amount of *p*-coumaric acid, which was at least 10-fold exceeding the quantities of the same acid in other analysed sorts of Lithuanian honey.

High amounts of ferulic acid were found in buckwheat (35.128 $\mu\text{g/ml}$) and polyfloral forest (22.32 $\mu\text{g/ml}$) honey, and samples of acacia, raspberry and eucalyptus contained from 0.745 up to 2.014 $\mu\text{g/ml}$ of ferulic acid. The characteristic chromatogram of buckwheat honey is given in Fig. 4.

A significant variation of chlorogenic acid quantity was determined in the analysed honey samples. The determined quantity

of chlorogenic acid decreased in the samples in the following order: polyfloral forest > buckwheat > raspberry > eucalyptus > acacia. Chlorogenic acid accounts for up to 60% of the total amount of phenolic acids in analysed raspberry and polyfloral forest honeys, and only approximately for 15% of the total amount of phenolic acids in analysed buckwheat honey samples. The chlorogenic acid is determined in many sorts of honey and is considered as an informative part of honey characteristic phenolic profile (Yao et al., 2003, 2004, 2005).

Rosmarinic acid is considered to be characteristic of thyme honey (Andradea, Ferreres, Gilb, & Tomás-Barberán, 1997). Therefore, it could be evaluated as indicative for forest honey, and this assumption was confirmed by the analysis results of polyfloral

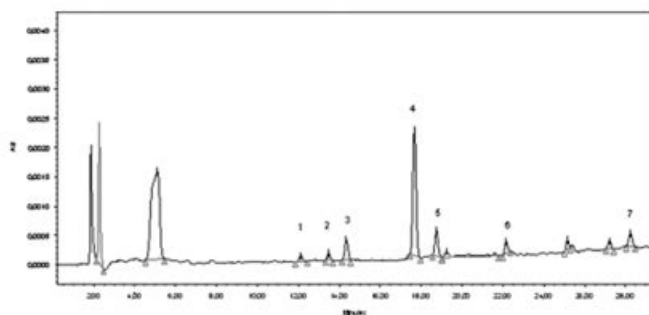


Fig. 2. Results of HPLC determination of phenolic compounds present in acacia honey 1-chlorogenic acid; 2-caffeic acid; 3-vanillin, 4-coumaric acid; 5-ferulic acid; 6-rosmarinic acid; 7-cinnamic acid.

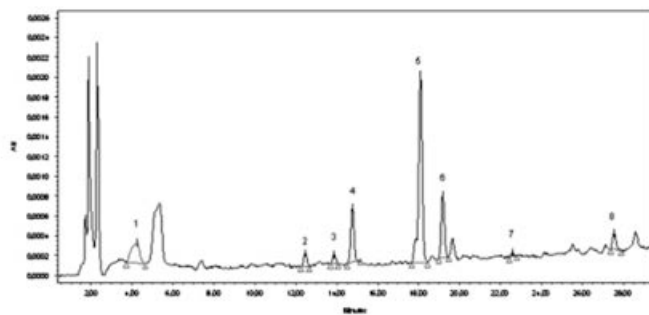


Fig. 3. Results of HPLC determination of phenolic compounds present in eucalyptus honey 1-gallic acid; 2-chlorogenic acid; 3-caffeic acid; 4-vanillin; 5-coumaric acid; 6-ferulic acid; 7-rosmarinic acid; 8-cinnamic acid.

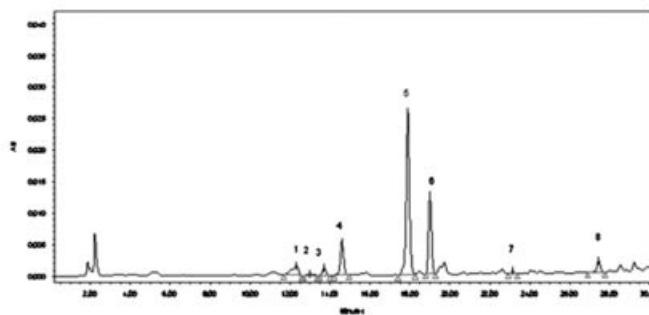


Fig. 4. Results of HPLC determination of phenolic compounds present in buckwheat honey 1-chlorogenic acid; 2-vanillin; 3-caffeic acid; 4-vanillin; 5-coumaric acid; 6-ferulic acid; 7-rosmarinic acid; 8-cinnamic acid.

forest honey. Rosmarinic acid quantities in any other analysed honey sample did not exceed 6% of the total amount of phenolic acids.

The data presented in Table 1 demonstrate that vanillic acid was not detected in acacia honey, and its highest amounts were identified in forest honey samples. The higher amount of caffeic

acid was detected in buckwheat and forest honey, whereas cinnamic acid was determined only in the analysed buckwheat honey samples (Table 1).

Phenylpropanoid vanillin was detected in all analysed honey samples. Its highest amounts were determined in buckwheat honey samples, high amounts in forest honey and relatively low

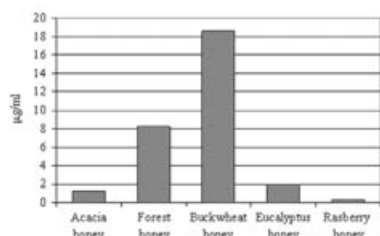


Fig. 5. The amount of vanillin in the analysed honey samples.

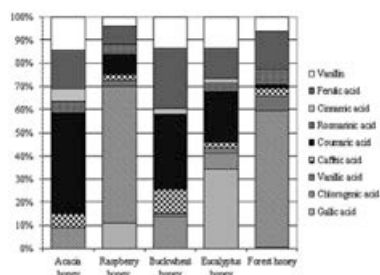


Fig. 6. Relative quantities of analysed phenolic acids and vanillin in honey samples.

amounts in acacia, eucalyptus and raspberry honeys (Fig. 5). The amount of vanillin in buckwheat honey was significantly higher if compared to other analysed samples, thus it could be used to distinguish buckwheat honey from acacia, raspberry and eucalyptus honey.

Comparison of relative quantities of phenolic acids and vanillin in different honey samples demonstrated significant variations of their quantitative composition (Fig. 6). Thus the HPLC fingerprint of phenolic acids could be considered as one of the rational methods to determine the identity of honeys produced in Lithuania. Attempts to apply single phenolic acid analytical data for authentication of honey type can lead to fallacious results, as quantities of some individual phenolic acids could be present in similar quantities, and those are subjects for annual variations. Ferulic acid was determined in all analysed honey samples, significant amounts of chlorogenic acid were present in raspberry and forest honey, *p*-coumaric acid was determined in acacia, buckwheat and eucalyptus honeys, traces of cinnamic, caffeic and vanillic acids. Therefore, comparative ratios of phenolic acids in honeys could be considered as potential indicators of botanical/floral origin of honey.

4. Conclusions

The analysis method applying high performance liquid chromatography is appropriate for the identification and quantification of free phenolic acids and vanillin in honey. Total amounts of phenolic acids in forest and buckwheat honeys exceeded the contents of phenolic acids in acacia, raspberry and eucalyptus honey more than 10-fold. *p*-Coumaric and ferulic acids were identified as the main components in acacia and buckwheat honey. Relative quantity of *p*-coumaric acid in acacia honey (approximately 45%) was significantly higher if compared to raspberry, and forest honey (up to 10%). The largest amount of chlorogenic acid was found in raspberry and polyfloral forest honeys, and it made up to 60% of to-

tal phenolic acid contents. In eucalyptus honey, gallic acid accounted for the largest fraction (approximately 35%) of phenolic acids. Only traces of gallic acid were determined in acacia, buckwheat and forest honeys. Vanillin was detected in all analysed samples of honey, but its highest absolute amounts were detected in buckwheat honey. The results of the analysis revealed that free phenolic acids and vanillin were detected in all honey samples analysed, and their range and amounts could be related to the botanical origin of the honey.

References

- Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., & Bogdanov, S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112(4), 863–867.
- Aljadi, A. M., & Yusoff, K. M. (2003). Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 33, 229–236.
- Alvarez-Suarez, J., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 15–23.
- Amiot, M. J., Aubert, S., Gonnet, M., & Tacchini, M. (1989). Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie*, 20, 115–125.
- Andrade, P., Ferreres, F., Gilb, M. L., & Tomás-Barberán, F. A. (1997). Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 60(1), 79–84.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food chemistry*, 63, 549–562.
- Aparna, A. R., & Rajalakshmi, D. (1999). Honey – Its characteristics, sensory aspects and applications. *Food Reviews International*, 15(4), 455–471.
- Carson, C. F., & Riley, T. V. (2003). Non-antibiotic therapies for infectious diseases. *Commun. Dis. Intell.*, 27(Suppl), S143–6.
- Cherbuliez, T., & Domergue, R. (2003). *L'apithérapie, Médecine des abeilles*. Editions Amyris.
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., & Estevinho, L. M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438–1443.
- Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Problems of quantitative and qualitative estimation of polyphenols in honey by capillary electrophoresis with UV–Vis detection. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 17(4), 68–70.
- Ivanaukas, L., Jakštas, V., Radušienė, J., Lukošius, A., & Baranauskas, A. (2008). Evaluation of phenolic acids and phenylpropanoids in the crude drugs. *Medicina (Kaunas)*, 44, 48–55.
- Kaškonienė, V., Maruška, A., & Kornyšova, O. (2009). Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey. *Cheminé technologija*, 3, 74.
- Martos, L., Ferreres, F., Yao, L., D'Arcy, B., Caffin, N., & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4744–4748.
- Oddo, L. P., Heard, T. A., Rodríguez-Malaver, A., Perez, R. A., Fernandez-Muino, M., Sancho, M. T., Sesta, G., Lusco, L., & Vit, P. (2008). Composition and antioxidant activity of Trigona carbonaria honey from Australia. *Journal of Medicinal Food*, 11(4), 789–794.
- Pyrzyska, K., & Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(7), 893–902.
- Ramanauskienė, K., Savickas, A., Inkenienė, A., Vitkevičius, K., Kasparavičienė, G., Briedis, V., & Amšiejus, A. (2009). Analysis of content of phenolic acids in Lithuanian propolis using high-performance liquid chromatography technique. *Medicina*, 45(9), 712–717.
- Rodríguez-Malaver, A. J., Rasmussen, C. L., Gutiérrez, M. G., Gild, F., Nieves, B., & Vit, P. (2009). Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *Natural Product Communications*, 4(9), 1221–1226.
- Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., & Fortuna, T. (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chemistry*, 113, 568–574.
- Summanen, J. O. (1999). A chemical and ethnopharmacological study on *Phyllanthus emblica* (Euphorbiaceae) [PhD dissertation], University of Helsinki; Helsinki.
- Van Den Berg, A. J., Van Den Worm, E., Van Oort, H. C., Halkes, S. B., Hoekstra, M. J., Beukelman, C. J., (2008). An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *Journal of Wound Care*, 17(4), 172–176.
- White, J. W. (1979). Composition of honey. Crane E. (Ed.), *Honey: A comprehensive survey*. Heinemann, London, 157–158.
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., Martos, L., & Singanurong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81, 159–168.
- Yao, L., Jiang, Y., Singanurong, R., Datta, N., & Raymont, K. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86(2), 169–177.
- Yao, L., Jiang, Y., Singanurong, R., Datta, N., & Raymont, K. (2005). Phenolic acids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food research international*, 38(6), 651–658.

Full Length Research Paper

Examination of rheological and physicochemical characteristics in Lithuanian honey

Ada Stelmakienė¹, Kristina Ramanauskienė^{1*}, Vitalis Briedis¹ and Daiva Leskauskaitė²

¹Department of Clinical Pharmacy, Lithuanian university of health sciences, Mickėviečiaus str. 9, Kaunas, Lithuania.

²Department of Food Technology, Kaunas University of Technology, Radvilėnu pl. 19, 50254 Kaunas, Lithuania.

Accepted 22 June, 2012

The aim of the study was to determine the effect of the biological origin and temperature on rheological and physicochemical characteristics of honey. The honey of the selected varieties differed in color, scent, microstructure, total acidity, moisture, and pH. The level of moisture statistically significantly correlated with the rheological characteristics. The highest total acidity was a characteristic of forest and buckwheat honey, and the lowest of acacia honey. The lowest pH value (3.76) was found in forest and rape honey, and the highest in eucalyptus honey. Moisture levels significantly correlated with the rheological characteristics. All varieties of honey at all the studied temperatures were characterized by properties of non-Newtonian substances. The study showed that the effect of temperature on rheological characteristics of different types of honey varied and was more pronounced in honey with a crystalline structure, and less pronounced in non-crystalline honey.

Key words: Honey, rheological characteristics, physicochemical properties.

INTRODUCTION

Honey is known as a viscous and aromatic product produced by bees, mainly from the nectar of flowers or honeydew (Lazaridou et al., 2004). This natural product is widely appreciated as the only concentrated form of sugar available worldwide and is also used as a food preservative (Cherbuliez and Domerago, 2003; Ferreira et al., 2009). Honey contains readily available sugars, organic acids and some amino acids, as well as certain macro and microelements, and also is a rich source of many biologically active compounds (Juszczak and Fortuna, 2006; Kayacier and Karaman, 2008). The composition and properties of honey vary with the floral and honeydew sources utilized by honeybees, as well as regional and climatic conditions (Lazaridou et al., 2004). The color of honey, beside flavor and aroma, is one of the characteristics that serve to indicate the plant source. It ranges from very pale yellow through amber and dark reddish amber to nearly black (Bertoncelj et al., 2007; Mateo Castro et al., 1992; Terrab et al., 2004).

About 80,000 bee colonies are grown in Lithuania (The

Lithuanian Department of Statistics under the Government of the Republic of Lithuania 2008), and ca. 1.8 thousand tons of honey is harvested in the country. One colony of bees produces ca. 20 to 22 kg of honey. Lithuania is exporting honey (about 100 to 200 tons) to the USA, Germany, and the Nordic countries (The Lithuanian Department of Statistics under the Government of the Republic of Lithuania 2010). The predominant variety of honey in Lithuania is polyfloral honey (from meadows and forests), and also rape and buckwheat honey; linden honey is less common, and acacia honey is very rare.

The Greeks, Egyptians, and other cultures made use of honey as a medicine throughout history. It is one of the oldest known medicines and has continued being used up to present times. Honey is a viscous texture, in addition features anti-bacterial, anti-inflammatory, promotes wound healing, and is used as the active ingredient in creams and ointments compositions. Honey's hygroscopic property also makes it an ideal ingredient as it helps keep skin hydrated and fresh and prevents drying. Many authors demonstrated that honey serves as a source of natural antioxidants, which are effective in reducing the risk of heart disease, cancer, immune-system decline, cataracts, different inflammatory processes etc. (The National Honey Board, 2003). Antioxidant

*Corresponding author. E-mail: kristinaraman@gmail.com. Tel: +37037327290.

activity was the lowest in the brightest acacia and lime honeys and the highest in darker honeys, namely fir, spruce and forest (Bertoncelj et al., 2007).

Honey is described in the pharmacopoeias of many countries, including the European Pharmacopoeia (Supplement 5.1 to the 5th). The quality of honey is determined by testing the water content, purity, diastase number. The rheological characteristics are not analyzed by honey quality standard. Rheology is a key physical property in understanding the flow and deformation of raw materials, processing intermediates, and final products (Race, 1991; Martin, 1998; Sopade et al., 2004). The rheological data are used in engineering calculations involving a wide range of equipments such as pipelines, pumps, mixers, extruders, homogenizers, coaters, heat exchangers, calenderes; in the determination of ingredient functionality in the product development and shelf life testing (Sopade et al., 2004; Steffe, 1996).

Rheological properties of honey are very important in terms of applications related to handling, processing, storage, and quality control (Yoo, 2004). The rheological behavior of honey depends on the floral sources, moisture, and temperature (Rao, 1977). Consequently, rheology can be used to characterize changes in the composition of honey which can occur naturally over time, such as moisture absorption, or sugar crystallization (Cohen and Weihs, 2010). In most of the published papers, honey is reported to be a Newtonian fluid (Lazaridou et al., 2004; Juszczak and Fortuna, 2006; Bhandari et al., 1999; Mossel et al., 2000), pseudoplastic (Pereira et al., 2003; Smanalieva and Senge, 2008), and dilatant (Steffe, 1996). Australian honeys (bloodwood, blue top iron bark, gum top, heath, narrow leafed iron bark, stringy bark, tea tree, yapunyah, and yellow box) were analyzed over a range of temperatures (1 to 40°C) and exhibited Newtonian behavior (Mossel et al., 2000).

Queiroz et al. (2005) showed that the honey from *Piptadenia moniliformis* flowers has a non-Newtonian fluid behavior with characteristics of a pseudoplastic fluid. Thixotropy is quite pronounced in honey from heather (*Calluna vulgaris*), buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), white clover (*Trifolium repens*), New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*), and Indian karvi (*Carvia callosa*) (Munro, 1943). Dilatancy is reported in Nigerian honey (*Opuntia engelmannii*) and several *Eucalyptus* honeys such as that from *Eucalyptus ficifolia* (White, 1978). The thixotropic behavior is thought to be due to proteins in the honey, while the presence of a high-molecular weight (1,250,000) dextran is responsible for the dilatancy (White, 1978).

Viscosity of honey depends on several factors: such as temperature, moisture and crystal structure, it is important to evaluate these factors before using honey as active substance or excipient in pharmaceutical products. Viscosity, one of the most important rheological parameters of honey, largely affects product quality and processing conditions related to the design of honey-processing equipment (Yanniotis et al., 2006). It is known

that knowledge of the effects of temperature on the rheological properties of honey is necessary for its production, processing, and storage (Oh and Yoo, 2011). The rheological properties of honey are important qualities that influence the sensory quality of the product and also affect a number of technological operations, such as honey heating, mixing, filtering, hydraulic transport and bottling (Yanniotis et al., 2006).

Considering that the rheological properties of honeys are strongly influenced by temperature, it is necessary to study the effect of temperature on the relationship between moisture content, microstructure and rheological properties of honeys to provide some information for estimating the quality of honey. Therefore, many researchers have studied the rheological properties of honey at different temperatures (Sopade et al., 2004; Kang and Yoo, 2008; Bhandari et al., 1999; Al-Malah et al., 2001; Abu-Jdayil et al., 2002; Yoo, 2004). However, the rheological properties of different honey varieties produced in the Baltic region at different temperatures has not been studied. The aim of the study is to determine the effect of the biological origin and temperature on rheological and physicochemical characteristics of honey.

MATERIALS AND METHODS

The objective of the study was buckwheat, eucalyptus, acacia, rape, and forest honey. Honey samples were obtained in a Lithuanian supermarket. Eucalyptus honey was selected for comparative studies, as it is popular among Lithuanian consumers. Honey samples were kept in a sealed glass container at room temperature.

Rheological flow examination

The examination was performed using a rheometer Carri-med CSL² 500 (TA Instruments, Germany), by applying the cone-plate geometry system (cone diameter (40 mm), angle (2°) and sample thickness (850 µm) at the designated temperatures 20, 30, 40, and 50°C. In the previous research, many researches heated at 50 or 55°C honey samples before rheological measurement (Mossel et al., 2000; Abu-Jdayil et al., 2002; Lazaridou et al., 2004; Yoo, 2004; Sopade et al., 2004). In the present study, however, the measuring of honey samples has been done in a natural state without a heating process applied to the samples. The temperature range from 40 to 50°C was selected, due to honey crystals melting temperature and peculiarities of the production of liquid and semi-solid preparations (Xu, 2003; Rowe et al., 2003; Bakier, 2004; Smanalieva and Senge, 2008). The shear rate was increased for 2 min from 0 to 500 s⁻¹, and then for 2 min decreased from 500 to 0 s⁻¹. The rheological characteristics were calculated by applying Ostwald de Waele's mathematical model (Bourne, 2002).

Determination of the pH value

Determination of the pH value was performed with a pH/mV meter Delta OHM HD 2105.1 (Delta OHM, Italy).

Determination of the microstructure

The microstructure of the samples was determined by using the

Motic® (Motic China Group Co., Ltd., China) microscope, Reaetifs Rai (France) immersion oil, and 100x magnification lenses. The microstructure of the samples was photographed with a Moticam 1000 1.3 Pixel camera (Motic China Group Co., Ltd., China).

Determination of moisture levels

Moisture levels were determined with a refractometer (IPΦ-22, N. 550251), by applying the Chatway method. The refraction index was determined with a refractometer at the temperature of 20°C. Depending on the refraction index, the moisture level (%) was determined according to the presented tables (Decree of the Minister of Agriculture of the Republic of Lithuania, 2000, Codex standard for honey, Codex STAN 12-1981 Codex Alimentarius Commission Adopted in 1981, Revisions 1987 and 2001).

Determination of total acidity

The total acidity of honey is a total amount of free and linked organic and inorganic acids in honey.

10 g of honey was weighed with 0.01 g accuracy, and subsequently dissolved in 75 ml of distilled water. The sample was then titrated with 0.1 M potassium (sodium) alkali, adding 4 to 5 drops of phenolphthalein into the titration flask. The altered color of the solution should remain stable for 10 seconds (Decree of the Minister of Agriculture of the Republic of Lithuania, 2000, Codex standard for honey, Codex STAN 12-1981 Codex Alimentarius Commission Adopted in 1981, Revisions 1987 and 2001). All measurements were performed in triplicate. The results were obtained by calculating the arithmetic mean $\pm$ standard error (SE).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 software, by applying the univariate dispersion analysis (ANOVA). Multiple comparisons were performed by applying Tukey's HSD criterion. Correlations were determined by applying Spearman's criterion. The significance level was set at $\alpha = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characteristics of honey

Data presented in Table 1 show that buckwheat and rape honey had specific sensory characteristics. The highest total acidity was characteristic of forest and buckwheat honey, while the lowest total acidity was observed in acacia honey (Table 1). Total acidity of all varieties of honey did not exceed the set norms (Codex standard for honey, Codex STAN 12-1981 Codex Alimentarius Commission Adopted in 1981, Revisions 1987 and 2001). Meanwhile, the lowest pH value was found in forest and rape (3.76) honey, while the highest – in eucalyptus honey. Water content detected in the studied honey samples ranged between 18 to 20.2%. The moisture level of Lithuanian honey samples was consistent with Indian honey, with 18.7 to 21.8% (Singh and Bath, 1997), and Moroccan honey with 16.8 to 20.3% (Terrab et al., 2002). In contrast, Saudi honey had lower moisture content, with 14.0 to 16.9% (Al-Khalifa and Al-Arfy, 1999), Turkish

honey - with 16.3 to 17.9% (Kayacier and Karaman, 2008), and Polish honey - with 14.7 to 18% (Juszczak and Fortuna, 2006), while Chinese honey had a higher moisture content - in the range of 19.8 to 29.0% (Junzheng and Changying, 1998). It is noteworthy that moisture of rape honey somewhat exceeded the set norms, but not more than by 20% (Codex standard for honey, Codex STAN 12-1981 Codex Alimentarius Commission Adopted in 1981, Revisions 1987 and 2001). The evaluation of the microstructure of honey samples showed that acacia honey did not have crystals, forest honey was characterized by accumulation of large crystals, and crystal size progressively decreased in, accordingly, buckwheat, eucalyptus, and rape honey, forming an integral crystalline structure (Table 1).

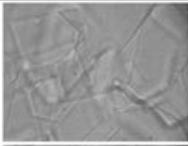
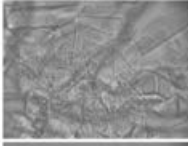
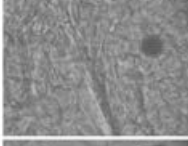
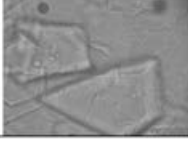
Rheology of honey

Rheological characteristics of honey samples at the temperatures of 20 and 30°C

The analysis of the relationship between the shear stress of the studied systems and the shear rate showed that at the temperatures of 20 and 30°C, all honey samples showed characteristics of non-Newtonian substances (Figure 1). The results did not confirm most literature data that honeys from different origins exhibit the Newtonian behavior (Junzheng and Changying, 1998; Bhandari et al., 1999; Mossel et al., 2000; Al-Malah et al., 2001; Sopade et al., 2002). However, there are also reports indicating non-Newtonian flow characteristics of certain honeys. For example, Indian Karvi honey and New Zealand Manuka honey were found to exhibit thixotropic behavior, while a Nigerian honey and eucalyptus honeys exhibited dilatant flow behavior (Munro, 1943; White, 1975; Mossel et al., 2000). Also, it was reported that German, *P. moniliformis* and Galician honeys exhibit pseudoplastic behavior (Smanaliev and Senge, 2008; Queiroz et al., 2005; Gomez-Diaz et al., 2006).

Curves presented in Figure 1 show that the greatest shear stress at the temperatures of 20 and 30°C was observed in eucalyptus honey, while the lowest in acacia honey. Meanwhile, rape honey at 20°C and greater shear rate did not flow (the curve was chaotic). Honey of this sort did flow at the temperature of 30°C. The smallest space between up and down curves was observed in acacia honey. Data presented in Table 2 show that the highest flow consistency index (K) and thixotropy at both temperatures was seen in eucalyptus honey, and the lowest in acacia honey. At the temperature of 20°C, the lowest flow behavior index (n) was observed in eucalyptus and forest honey, although the flow consistency index of eucalyptus honey was nearly by two-fold higher than that of forest honey. Data in Table 1 show that large crystals predominated in forest honey, which might have affected poor flow behavior of this honey. Different sizes and forms of honey crystals are formed

Table 1. Physicochemical characteristics of different varieties of honey.

Variety (number)	Color	Scent	Total acidity (meq/kg)	Moisture (%)	pH	Microstructure
Buckwheat (1)	Yellow-brown	Specific, rich	24.17 ± 0.60	19.1 ± 0.1	3.97 ± 0.02	
Eucalyptus (2)	Yellow	Mild	19.67 ± 0.44	18.2 ± 0.0	4.39 ± 0.01	
Acacia (3)	Clear, yellowish	Weak, mild	11.33 ± 0.33	19.1 ± 0.1	3.86 ± 0.01	
Rape (4)	Yellowish-whitish	Sour	14.17 ± 0.67	20.2 ± 0.0	3.76 ± 0.01	
Forest (5)	Yellow	Mild, waxy	24.50 ± 0.58	18.9 ± 0.1	3.74 ± 0.01	

due to presence of sugars and their influence on tautomerism of glucose. Rheological characteristics of honey are affected by honey crystals (Smanalieva and Senge, 2008). Acacia honey did not have any crystalline structure, and thus had the lowest flow consistency index and the highest flow behavior index. The flow characteristics of acacia honey were similar to Brasil honey of *P. moniliformis* (Queiroz et al., 2005). Crystalline structure was also characteristic of buckwheat honey (Table 1), but its flow consistency index was lower, compared to that of forest and eucalyptus honey – the varieties with a typical crystalline structure. The flow behavior index of buckwheat honey had an intermediate position between forest and acacia honey (Table 2). The highest thixotropy at the temperature of 20°C was observed in eucalyptus honey (202433 Pa/s), and the

lowest in acacia honey (7793 Pa/s).

In addition to that, studies showed that viscosity and flow ability were more dependent on the biological origin of the honey because even though moisture was the highest in rape honey, compared to other honey varieties (Table 1), yet the honey did not flow at 20°C (Figure 1A). The evaluation of the flow behavior and rheological characteristics of rape honey at the temperature of 30°C showed that this sample had the highest consistency coefficient, although its thixotropy was similar to that of forest honey, whose flow consistency index was lower by 4 times. This shows that at 30°C rape honey demonstrated elastic properties and, with decreasing shear rate, returned to its initial state better than eucalyptus honey with a lower flow consistency index did.

Data presented in Table 2 show that that temperature

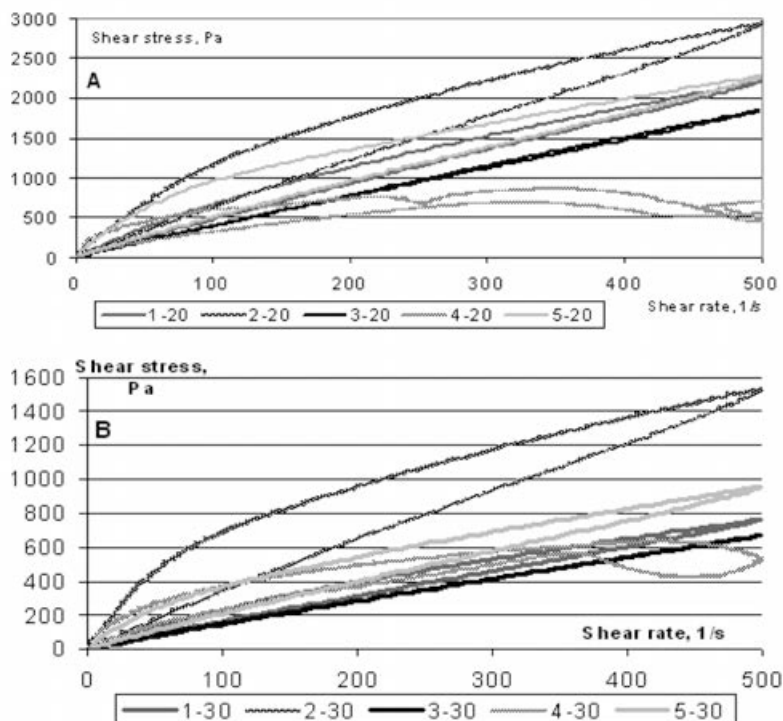


Figure 1. Flow curves of different varieties of honey at temperatures of (A) 20°C and (B) 30°C.

change by 10°C had different effects on rheological properties of different varieties of honey, which indicates that the biological origin of honey also plays a role. K value and thixotropy of eucalyptus honey dropped by half, while n value remained unchanged. In other varieties of honey, K value and thixotropy decreased by three times, while n value remained unaltered. Only thixotropy of acacia honey was an exception it dropped by half from 7793 to 3663 Pa/s, and was by over 8 times lower than that of buckwheat honey, and over 28 times lower, compared to that of eucalyptus honey.

The evaluation of these findings confirms literature data indicating that temperature and biological origin of honey affect its rheological characteristics (Yoo, 2004). Statistical evaluation of the rheological characteristics of different varieties of honey at the temperatures of 20 and 30°C is provided in Table 3. Data presented in Table 3 shows that most numerous statistically significant

differences were found between thixotropy and flow behavior indices of different varieties of honey. This indicates that even at similar consistency coefficients, the flow behavior of honey and its ability to return to the initial state after deformation differ.

Rheological characteristics of honey samples at the temperature of 40 and 50°C

At the temperatures of 40 and 50°C, all varieties of honey demonstrated pseudoplastic substance properties (Figure 2). The viscosity all honey samples decreased with increasing temperature as expected (Kayacier and Karaman, 2008). Curves presented in Figure 2 show that at the temperature of 40°C, the highest shear stress was observed in eucalyptus honey, while the lowest in acacia and forest honey. At the temperature of 50°C, the flow

Table 2. Rheological characteristics according to Ostwald de Waele's mathematical model in different varieties of honey at the temperatures of 20 and 30°C.

Property/ sample	20°C			30°C		
	K, (Pa·s) ⁿ	n	Thixotropy, Pa/s	K, (Pa·s) ⁿ	n	Thixotropy, Pa/s
1	23.58 ± 1.16	0.7344 ± 0.01	75173 ± 4434	8.13 ± 0.52	0.7313 ± 0.01	27825 ± 885
2	119.59 ± 23.83	0.5219 ± 0.04	202433 ± 9663	56.03 ± 4.07	0.534 ± 0.01	105577 ± 3775
3	5.31 ± 0.12	0.9436 ± 0.003	7793 ± 1399	1.86 ± 0.04	0.9482 ± 0.002	3663 ± 118
4	-	-	-	86.23 ± 14.76	0.3298 ± 0.03	59345 ± 5428
5	67.77 ± 2.36	0.564 ± 0.006	138850 ± 1050	22.30 ± 0.32	0.6014 ± 0.004	52850 ± 1509

Table 3. Statistical evaluation of the rheological characteristics of honey at the temperatures of 20 and 30°C.

Variety	Variety	Property					
		20°C			30°C		
		K	n	Thixotropy	K	n	Thixotropy
1	2	Y ^a	Y	Y	N	Y	Y
	3	N ^a	Y	Y	N	Y	Y
	4	-	-	-	Y	Y	Y
	5	N	Y	Y	N	Y	Y
2	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	4	-	-	-	N	Y	Y
	5	N	N	Y	N	N	Y
3	4	-	-	-	Y	Y	Y
	5	N	Y	Y	N	Y	Y
4	5	-	-	-	Y	Y	N

^aHere and further on: Y – a statistically significant difference detected; N – no statistically significant difference detected; level of significance $\alpha = 0.05$.

curves of all samples were similar, except for the flow curve of eucalyptus honey, where the greatest shear stress change under the influence of shear rate was observed.

Data presented in Table 4 show that at the temperature of 40°C, K value in all honey samples decreased by 6 to 7-fold, compared to the K value registered at the temperature of 30°C (Table 2). An exception was acacia honey whose K value dropped by 3-fold. The highest K value at the temperature of 40°C was observed in rape and eucalyptus honey (Table 4). Those two varieties of honey were also characterized by the highest thixotropy, respectively, 18180 and 22707 Pa/s. At the temperature of 40°C, acacia honey showed the least deviation from the characteristics of Newtonian fluids, while the deviation of eucalyptus honey was the greatest. At the temperature of 50°C, K values in all samples approximated 1, while n values varied from 0.7263 (rape honey) to 0.8814 (acacia honey). The highest thixotropies

at that temperature were also observed in rape honey (5084 Pa/s) and eucalyptus honey (4183 Pa/s).

Acacia honey that had no crystals at room temperature underwent less pronounced changes of the rheological characteristics with increasing temperature (Table 4). The obtained findings confirmed literature data indicating that sudden temperature-related changes in rheological characteristics occur due to the decomposing/melting of honey crystals (Smanalieva and Senge, 2008). The statistical evaluation of the rheological characteristics of honey at the temperatures of 40 and 50°C is provided in Table 5. Data presented in Table 5 show that at the temperature of 40°C, the rheological characteristics of all varieties of honey differed statistically significantly, and only buckwheat and acacia honey demonstrated similar consistency coefficients and thixotropies. Meanwhile, at the temperature of 50°C, the differences diminished again. Statistically significant differences in all rheological characteristics were observed only between rape honey

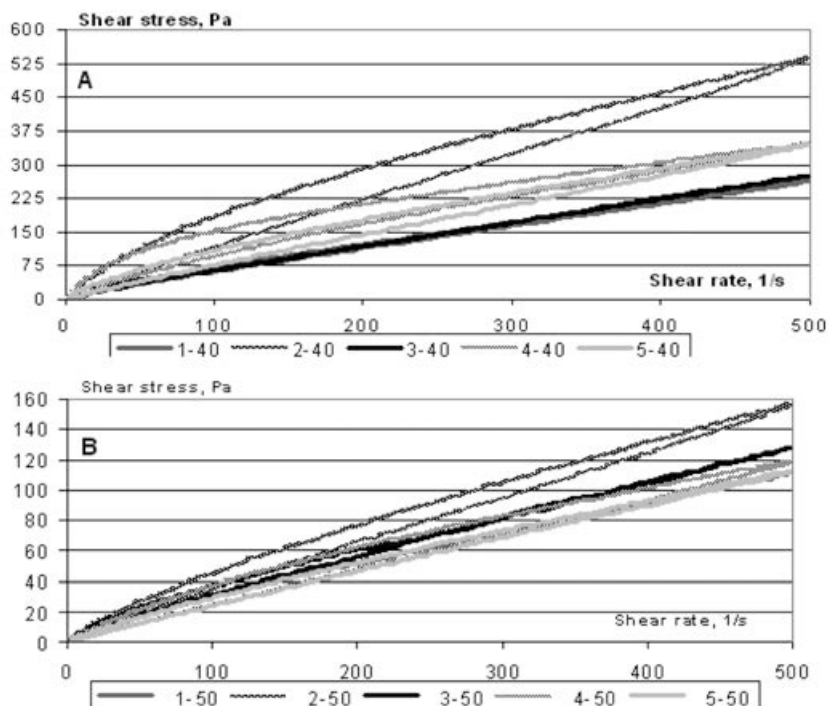


Figure 2. Flow curves of different varieties of honey at the temperatures of (A) 40°C and (B) 50°C.

and buckwheat, acacia and forest honey.

In addition, the effect of temperature on each variety of honey was assessed. The statistical evaluation of these data is presented in Table 6 which shows that rheological characteristics of buckwheat and eucalyptus honey did not differ statistically significantly at the temperatures of 40 and 50°C, and only the flow behavior index at these temperatures showed statistically significant differences between acacia and rape honey. It is noteworthy that the flow behavior index of acacia honey was nearly independent of the temperature, and statistically significant differences were observed only between the temperatures of 40 and 50°C. Meanwhile, the flow consistency index of this honey was, conversely, statistically significantly different at all temperatures, except for 40 and 50°C. The rheological characteristics of buckwheat and forest honey demonstrated the highest number of temperature-related statistically significant differences.

Correlation between rheological and physicochemical characteristics of honey

Spearman's criterion was used to determine correlations between rheological characteristics of honey at 20°C and its physicochemical properties. Very strong statistically significant correlations were found between thixotropy and the flow consistency index (direct), and between thixotropy and the flow behavior index (inverse). Strong statistically significant correlations were observed between the rheological characteristics and the moisture level of honey. Yanniotis et al. (2006) and Lazaridou et al. (2004) also reported that rheological parameters and moisture content were highly related. The moisture level directly correlated with the flow behavior index and inversely correlated with the flow consistency index and thixotropy. This is confirmed by literature data indicating that the moisture level affects the rheological characteristics

Table 4. Rheological characteristics according to Ostwald de Waele's mathematical model in different varieties of honey at the temperatures of 40 and 50°C.

Property/ sample	40°C			50°C		
	K (Pa·s) ⁿ	n	Thixotropy (Pa/s)	K (Pa·s) ⁿ	n	Thixotropy (Pa/s)
1	1.19 ± 0.10	0.8665 ± 0.01	3915 ± 209	0.47 ± 0.002	0.8696 ± 0.002	626 ± 107
2	7.29 ± 0.57	0.6910 ± 0.01	22707 ± 1172	1.16 ± 0.04	0.7853 ± 0.003	4183 ± 42
3	0.51 ± 0.01	0.9145 ± 0.001	1402 ± 91	0.52 ± 0.10	0.8814 ± 0.04	1593 ± 62
4	13.2 ± 0.03	0.5228 ± 0.001	18180 ± 532	1.30 ± 0.08	0.7263 ± 0.01	5084 ± 207
5	3.54 ± 0.06	0.7342 ± 0.001	12230 ± 50	0.61 ± 0.01	0.8422 ± 0.003	1982 ± 100

Table 5. Statistical evaluation of the rheological characteristics of honey at the temperatures of 40 and 50°C.

Variety	Variety	Property					
		40°C			50°C		
		K	n	Thixotropy	K	n	Thixotropy
1	2	Y	Y	Y	Y	N	Y
	3	N	Y	N	N	N	Y
	4	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	5	Y	Y	Y	N	N	Y
2	3	Y	Y	Y	Y	N	Y
	4	Y	Y	Y	N	N	Y
	5	Y	Y	Y	Y	N	Y
3	4	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	5	Y	Y	Y	N	N	N
4	5	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Table 6. Statistical evaluation of the effect of temperature on the rheological characteristics of different varieties of honey.

Temperature (°C)	Temperature (°C)	Property											
		Buckwheat			Eucalyptus			Acacia			Rape		
		K	n	Tx ^b	K	n	Tx	K	n	Tx	K	n	Tx
20	30	Y	N	Y	Y	N	Y	Y	N	Y	-	-	-
	40	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	-	-	-
	50	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	-	-	-
30	40	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
	50	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
40	50	N	N	N	N	N	N	N	Y	N	N	Y	Y

^bTx – thixotropy.

(Yoo, 2004). No statistically significant correlations between the rheological characteristics and pH or total acidity were found.

Conclusion

The water content in the studied honey samples ranged

between 18 and 20.2%. The highest total acidity was characteristic of forest and buckwheat honey, and the lowest of acacia honey. The lowest pH value (3.76) was found in forest and rape honey, and the highest in eucalyptus honey. Moisture levels significantly correlated with the rheological characteristics. All varieties of honey demonstrated non-Newtonian characteristics at all the studied temperatures. At the temperature change of 20 to 30°C, statistically significant differences were found between varieties of honey with respect to thixotropy and flow behavior indices. This indicates that different varieties of honey differently return to their initial state despite similar flow consistency coefficients.

At the temperature of 40°C, no significant differences were found, except between flow consistency coefficients and thixotropy of buckwheat and acacia honey. Meanwhile, at the temperature of 50°C, statistically significant differences in rheological characteristics were found only between rape honey and buckwheat, acacia, and forest honey. The rheological characteristics of honey were affected by temperature (especially by changes from 20 to 40°C); statistically significant differences were found when evaluating changes in rheological characteristics at changing temperatures. Acacia honey was least sensitive to temperature changes.

REFERENCES

- Abu-Jdayil B, Al-Majeed Ghazwi A, Al-Malah KIM, Zaitoun SJ (2002). Heat effect on rheology of light- and dark-colored honey. *J. Food Eng.* 51:33-38.
- Al-Khalifa AS, Al-Arifi IA (1999). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. *Food Chem.* 67(1):21-25.
- Al-Malah KIM, Abu-Jdayil B, Zaitoun S, Al-Majeed Ghazwi A (2001). Application of WLF and Arrhenius kinetics to rheology of selected dark-colored honey. *J. Food Process Eng.* 24:341-357.
- Bakier S (2004). Description of phenomena occurring during the heating of crystallized honey. *Acta Agrophysica* 3(3):415-424.
- Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* 105(2):822-828.
- Bhandari B, D'Arcy B, Chow S (1999). Rheology of selected Australian honeys. *J. Food Eng.* 41:65-68.
- Bourne MC (2002). Food texture and viscosity: Concept and measurement, 2nd edition. Press: Elsevier Science and Technology Books, p. 89.
- Cherbuliez T, Domergo R (2003). *L'apithérapie, Médecine des abeilles*. Editions Amyris, California, USA, 252 pp.
- Codex standard for honey. Codex STAN 12-1981 Codex Alimentarius Commission Adopted in 1981. Revisions 1987 and 2001.
- Cohen I, Weihs D (2010). Rheology and microrheology of natural and reduced-calorie Israeli honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. *J. Food Eng.* 100(2):366-371.
- Decree of the Minister of Agriculture of the Republic of Lithuania (2000). 01 10. Nr. 5. Vilnius. URL: <http://www.zum.lt/lt/teisine-informacija/sakymai/64/>
- Ferreira ICFR, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* 114(4):1438-1443.
- Gomez Diaz D, Navaza JM, Quintans Riveiro LC (2006). Rheological behaviour of Galician honeys. *Eur. Food Res. Technol.* 222:439-442.
- Junzheng P, Changying J (1998). General rheological model for natural honeys in China. *J. Food Eng.* 36(2):165-168.
- Juszcak L, Fortuna T (2006). Rheology of selected Polish honeys. *J. Food Eng.* 75(1):43-49.
- Kang KM, Yoo B (2008). Dynamic rheological properties of diluted honeys at low temperatures as affected by moisture content and temperature. *Food Sci. Biotechnol.* 17:90-94.
- Kayaci A, Karaman S (2008). Rheological and some Physicochemical characteristics of selected Turkish honeys. *J. Texture. Stud.* 39(1):17-27.
- Lazaridou A, Biliaderis CG, Bacandritsos N, Sabatini AG (2004). Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *J. Food Eng.* 64(1):9-21.
- Martin G (1998). Oscillatory rheometry. In *Rheological Measurements*. (A.A. Collyer and D.W. Clegg, eds.) Press: 2nd Ed. Chapman and Hall, London, UK, pp. 3-46.
- Mateo Castro R, Jimenez Escamilla M, Bosch-Reig F (1992). Evaluation of the color of some unifloral honey types as a characterization parameter. *J. AOAC Int.* 75:537-542.
- Mossel B, Bhandari B, D'Arcy B, Caffin N (2000). Use of an Arrhenius model to predict rheological behaviour in some Australian honeys. *Lebenswiss. Technol.* 33(8):545-552.
- Munro JA (1943). The viscosity and thixotropy of honey. *J. Entomol.* 36:769-777.
- Oh JH, Yoo B (2011). Effect of temperature on the relationship between moisture content and dynamic rheological properties of Korean honey. *Food Sci. Biotechnol.* 20(1):261-265.
- Pereira EA, Queiroz AJM, Figueiredo RMF (2003). Comportamento Reológico de Mel da Abelha Urucu. *Revista Ciências Exatas e Naturais* 5(2):179-186.
- Queiroz AJM, Figueiredo RMF, Silva CL (2005). Rheological evaluation of honey produced from *Piptadenia moniliformis* flowers. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering.
- Race SW (1991). Improved product quality through viscometry measurement. *Food Technol.* 45(7):85-88.
- Rao MA (1977). Rheology of liquid foods - A review. *J. Texture. Stud.* 8(2):135-168.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ (2003). Handbook of pharmaceutical excipients. London: Pharmaceutical Press, pp. 687-690.
- Singh N, Bath PK (1997). Quality evaluation of different types of Indian honey. *Food Chem.* 58(1-2):129-133.
- Smanaliev J, Senge B (2008). Analytical and rheological investigations into selected unifloral German honey. *Eur. Food Res. Technol.* 229(1):107-113.
- Sopade PA, Halley PJ, D'Arcy BR, Bhandari B, Caffin N (2004). Dynamic and steady-state rheology of Australian honeys at subzero temperatures. *J. Food Process Eng.* 27:284-309.
- Steffe JF (1996). Rheological methods in food process engineering 2nd edition. Press: Freeman, East Lansing, MI, USA, p. 21.
- Terrab A, Diez MJ, Heredia FJ (2002). Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem.* 79(3):373-379.
- Terrab A, Escudero ML, González-Miré ML, Heredia FJ (2004). Colour characteristics of honeys as influenced by pollen grain content: A multivariate study. *J. Sci. Food. Agric.* 84:380-396.
- The Lithuanian Department of Statistics under the Government of the Republic of Lithuania 2008. URL: <http://db1.stat.gov.lt/statbank/default.asp?w=1280>
- The Lithuanian Department of Statistics under the Government of the Republic of Lithuania 2010. URL: <http://db1.stat.gov.lt/statbank/default.asp?w=1280>
- The National Honey Board (2003). Honey - Health and therapeutic qualities. 390 Lashley Street Longmont.
- White Jr JW (1978). Honey. *Advances in Food Res.* 24:288-354.
- Xu R (2003). A pharmaceutical base in ointment form and its use - Patent EP0763362.
- Yanniotis S, Skaltsi S, Karaburnioti S (2006). Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. *J. Food Eng.* 72:372-377.
- Yoo B (2004). Effect of temperature on dynamic rheology of Korean honeys. *J. Food Eng.* 65(3):459-463.

Full Length Research Paper

Modelling of semisolid natural basis and powder of liquorice as active constituent influence on rheological characteristics of systems

Ada Stelmakiene^{1*}, Kristina Ramanauskiene¹, Ernesta Malinauskyte² and Daiva Leskauskaitė²

¹Department of Pharmaceutical Technology and Social Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, A. Mickevičiaus Str. 9, 44307, Kaunas, Lithuania.

²Department of Food Technology, Kaunas University of Technology, Radvilenu pl. 19, 50254 Kaunas, Lithuania.

Accepted 9 May, 2011

Skin dysfunctions are a common problem. To restore and maintain skin functions, we modeled original semisolid hydrophobic systems from natural crude materials, using the experimental planning technique. The evaluation of the quality of the modeled systems according to the flow characteristics showed that the beeswax content in the systems affected their yield stress, consistency coefficient, and the flow behavior index, while the effect of cholesterol was slight. At temperatures of 40 and 50°C, the systems have pseudoplastic properties, while at 60°C – Newtonian. The evaluation of the viscoelasticity of the systems showed that the systems had elastic properties, and the most stable structure at different temperatures was demonstrated by formula VC6, containing: Beeswax (5.828 g); solid paraffin (5.0 g); white Vaseline (5.0 g); cocoa butter (10.0 g); cholesterol (3.0 g); and olive oil (70.0 g). Introduction of 0.5% liquorice root powder into the modeled base showed that this substance made the system thinner. The evaluation of the sensory properties of the bases showed that the characteristics of the VC6 system were most acceptable to the customer.

Key words: Rheological characteristics, semisolid bases, beeswax.

INTRODUCTION

Ointments are homogeneous, semisolid preparations intended for external application to the skin or mucous membranes. They are used as emollients or for the application of active ingredients to the skin for protective, therapeutic, or prophylactic purposes and where a degree of occlusion is desired (Carter, 2006). Ointments have the following rheological properties – shear stress, viscosity, and elasticity module (Bourne, 2002; Steffe, 1996). Typical texture characteristics of semisolid preparations are softness, strength, viscosity, and elasticity (Gohel and Parikh, 2008). Experimental determination of texture characteristics of the preparations is most commonly performed using rheological examination techniques.

It is also can be regarded as sensitive tools for detecting structural changes in pharmaceutical creams

(Korhonen, 2004). To achieve high-quality description of the texture of products, device readings should be associated with consumer's sensory experience (Akiyama et al., 2010) when applying the semisolid preparation.

Since the modern dosage forms are systems consisting of active ingredients and excipients, the selection of the latter is one of the major tasks in drug modeling. Excipients used for the modeling of the semisolid system matrix should ensure the stability, elasticity, and soft texture of the preparation, as well as its acceptability to the customer; in addition to that, the excipients should not alter the effect of the active ingredients and should ensure their stability in the semisolid matrix (Gohel and Parikh, 2008; European Pharmacopeia, 2008).

For the testing, we selected natural excipients to model a stable natural ointment base that would be acceptable for the customer and would have protective, moisturizing, and skin-nourishing properties. For these reasons, the two natural components selected for the modeling of the

*Corresponding author. E-mail: kristinaraman@gmail.com.

Table 1. Amounts (g) of the variable components of the hydrophobic ointment base according to the full composition plan.

Sample No.	Component					
	Yellow beeswax	Cholesterol	Solid paraffin	White vaseline	Cocoa butter	Olive oil
VC1	1.000	1.000	5.000	5.000	10.000	70.000
VC2	1.000	5.000	5.000	5.000	10.000	70.000
VC3	5.000	1.000	5.000	5.000	10.000	70.000
VC4	5.000	5.000	5.000	5.000	10.000	70.000
VC5	0.172	3.000	5.000	5.000	10.000	70.000
VC6	5.828	3.000	5.000	5.000	10.000	70.000
VC7	3.000	0.172	5.000	5.000	10.000	70.000
VC8	3.000	5.828	5.000	5.000	10.000	70.000
VC9	3.000	3.000	5.000	5.000	10.000	70.000

base of the preparation were beeswax and olive oil.

Studies (Al-Waili, 2003; Rit et al., 1999) have proven the anti-inflammatory effect of beeswax, and thus this substance can be used for the treatment of skin diseases and lesions of oral mucosa. Olive oil has an antioxidant, nourishing, protective, antiseptic, and stimulating effect. In addition to that, olive oil protects sensitive and dry skin, restores its protective layer, suppresses water evaporation, improves skin structure, and soothes and nourishes the skin (Visioli et al., 2002; Aburjai and Natsheh, 2003).

The aim of the study was to model an original semisolid hydrophobic base (system) from natural crude materials, using the experimental planning technique, and to evaluate the quality of this system on the basis of its rheological characteristics and sensory properties.

MATERIALS AND METHODS

Optimization of the composition of the ointment base

Optimal selection of the amounts of ingredients was performed on the basis of the orthogonal composition plan, using Statistica 6.0 software. The characteristic feature of this plan is that removal of any coefficient of the equation does not affect the values of other coefficients. Experiments were performed at the end-points of the model (+1, -1), the "asterisk" points, and the middle points (mean values) (Shirmani, 2004).

We calculated the amounts of beeswax and cholesterol at the points of the model, and compiled a full orthogonal composition plan. The amounts of solid paraffin, vaseline, cocoa butter, and olive oil remained unaltered. The amounts of the ingredients are presented in Table 1.

The studied sample VC6+S was the one in which the composition of the VC6 base was supplemented with 0.5% liquorice root powder. This sample was used to determine how introduction of suspension substances affected the rheological characteristics of the base.

Rheological flow behavior test

The test was performed using the Carri-med CSL² 500 rheometer (TA Instruments, Germany), by applying the cone- and- plate

geometry system (cone diameter, 60 mm; angle, 2°; sample thickness, 150 µm) at temperatures of 40, 50, and 60°C. The shear rate was increased for 2 min from 0 to 500 s⁻¹.

Rheological oscillation test

Viscoelastic properties were tested using the Carri-med CSL² 500 rheometer (TA Instruments, Germany), by applying the cone-and-plate geometry system (cone diameter, 60 mm; angle, 2°, sample thickness – 1000 µm), with 0.1% strain, 6, 20, and 30°C temperature, and stress rate varying from 0.1 to 100 rad⁻¹. The results were expressed as elasticity G', viscosity G'', and complex G* modules (Leskauskaitė et al., 2006; Liutkevičius and Speičienė, 2006).

Evaluation of the sensory characteristics

A trained group of specialists analyzed pre-selected products (samples) and chose terms (compiled the vocabulary) to describe their sensory characteristics. Subsequently, the scales for the evaluation of the intensity of these characteristics were selected and discussed, and the intensity of each characteristic of all products was then marked on separate scales.

Using these data, mathematical statistics techniques were applied to compile a profile of sensory characteristics for each product, indicating the intensity of each characteristic. This profile could then be used to compare products according to their separate properties and their intensity, to determine the relationship between the sensory quality of products and their individual characteristics, etc. A group of 12 evaluators participated in the study (ISO 8586-2:2008).

All experimental measurements were repeated three times, and the results were presented as arithmetic means of these measurements.

RESULTS AND DISCUSSION

According to their composition, the samples were distributed into three groups: Group I – samples VC1, VC2, VC3, and VC4, group II – samples VC5, VC6, VC6+S, and VC9, and group III – samples VC7, VC8, and VC9. In addition to that, ingredients of the systems (white vaseline, cocoa butter, and olive oil) were analyzed as

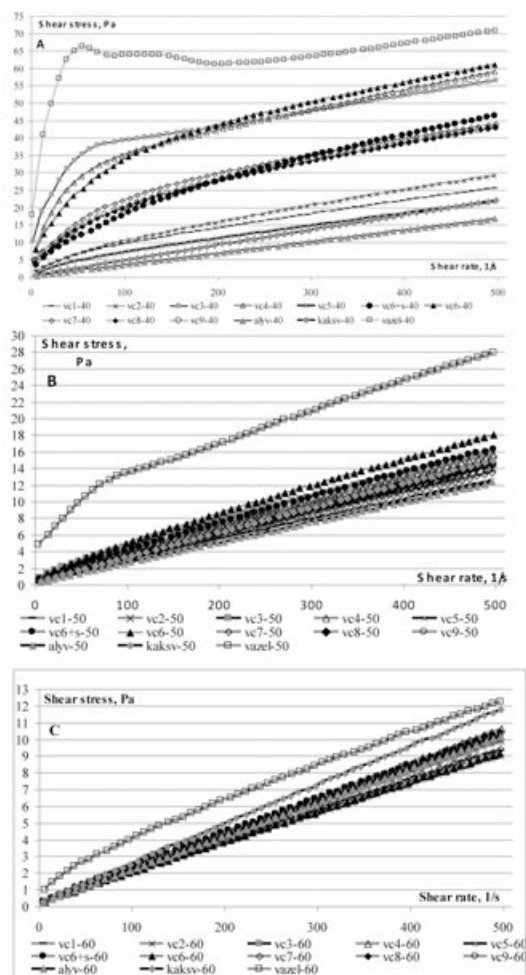


Figure 1. Flow behavior curves of all the studied samples at the temperatures of A) 40, B) 50 and C) 60°C.

well. In order to evaluate the flowability of the optimized compositions and changes in the characteristics of the systems during the technological process, flow behavior testing was performed, which also evaluated the spreadability of the semisolid preparations on the skin.

The testing of the flow behavior of the ingredients showed that irrespectively of the temperature, the highest shear stress was observed in vaseline, and the lowest in olive oil (Figure 1).

The results of the testing showed that shear stress

Table 2. Rheological characteristics of ointments tested at the temperature of 40°C.

Sample No.	Herschel-Bulkley		
	σ_0, Pa	$K, \text{Pa} \cdot \text{s}^{-n}$	n
VC1	2.845	0.3618	0.6760
VC2	2.804	0.8323	0.6841
VC3	17.62	12.67	0.2333
VC4	13.66	6.8725	0.3436
VC5	1.964	0.1761	0.7668
VC6+S	5.401	1.2455	0.5850
VC6	11.803	5.697	0.3825
VC7	7.494	3.0745	0.43055
VC8	6.492	1.7855	0.5134
VC9	6.765	2.3415	0.4660

directly depended upon beeswax content in the systems; the highest shear stress at the temperature of 40°C was observed in systems VC3, VC4, and VC6 (Figure 1a), and the lowest in systems VC5, VC1, and VC2 (Figure 1a). At temperatures of 50 and 60°C (Figure 1b and c), flowability curves of the majority of the tested systems at low strain coincided, but somewhat differed in higher strain regions. Vaseline was an exception, demonstrating the highest shear stress in all temperature regimes.

The analysis of the relationship between shear stress of the studied systems and their shear rate showed that at the temperature of 40°C, all systems had characteristics of pseudoplastic substances, where increasing shear rate disrupted the structure of the system, resulting in increasing shear stress. At first shear stress increased rather significantly, but later on, at higher shear rates and with a more uniform already disrupted initial structure and lower resistance to deformation, the increase in shear stress became more even.

Experimental testing showed that the flowability of the modeled systems at the temperature of 40°C corresponded to the Herschel-Bulkley mathematical model and could be described with the following equation:

$$\sigma = \sigma_0 + K\dot{\gamma}^n,$$

where σ is shear stress (Pa), $\dot{\gamma}$ is shear (deformation) rate (s^{-1}), σ_0 is yield stress indicating the shear stress required to achieve shear rate, K is consistency coefficient, which is the indicator of viscosity, and n is flow behavior index, which is the indicator of deviation from the characteristics typical of Newtonian fluids (Bourne, 2002; Leskauskaitė et al., 2006). The flow behavior index values calculated according to the The flowability of the modeled systems at the temperature of 50°C corresponded to the Casson mathematical model and could be described with the following equation (Steffe, 1996):

Herschel-Bulkley equation (Table 2) in group I ranged from 0.2333 (VC3) to 0.6841 (VC2), in group II - from 0.3825 (VC6) to 0.7668 (VC5), and in group III - from 0.43055 (VC7) to 0.5134 (VC8). The highest consistency coefficient, which may be the indicator of the viscosity of the system, in group I was observed in system VC3 (12.67), in group II - in system VC6 (5.697), and in group III - in system VC7 (3.0745). The highest σ_0 , which indicates pressure required to initiate flow and thus the system's initial resistance to deformation in group I was observed in system VC3 (17.62 Pa), in group II in system VC6 (11.803 Pa), and in group III in system VC7 (7.494 Pa). It is noteworthy that the same samples demonstrated the highest yield stress and consistency coefficient.

The comparison of the rheological characteristics with the composition of the tested systems showed that the lowest flow index, the highest consistency coefficient, and the highest yield stress were characteristic of samples that contained more beeswax. In group III, the beeswax content equaled to 3.0 g, while the cholesterol content varied, and thus the effect of cholesterol on the rheological characteristics could be observed.

The test findings presented in Figure 2 and Table 2 indicate that the effect of cholesterol was only slight, yet it may be presumed that this component had a somewhat thinning effect on the systems, because higher amounts of cholesterol (VC8) resulted in lower yield stress and consistency coefficient, compared to systems with lower cholesterol content (VC7).

The relationship between shear stress of the tested systems and the shear rate curve at the temperature of 50°C is presented in Figure 3, indicates that shear stress was lower and similar in all samples. Flow behavior curves in group II samples were somewhat different (Figure 3b).

$$\sqrt{\sigma} = \sqrt{\sigma_0} + K\sqrt{\dot{\gamma}}$$

Consistency constants and σ_0 calculated according to the

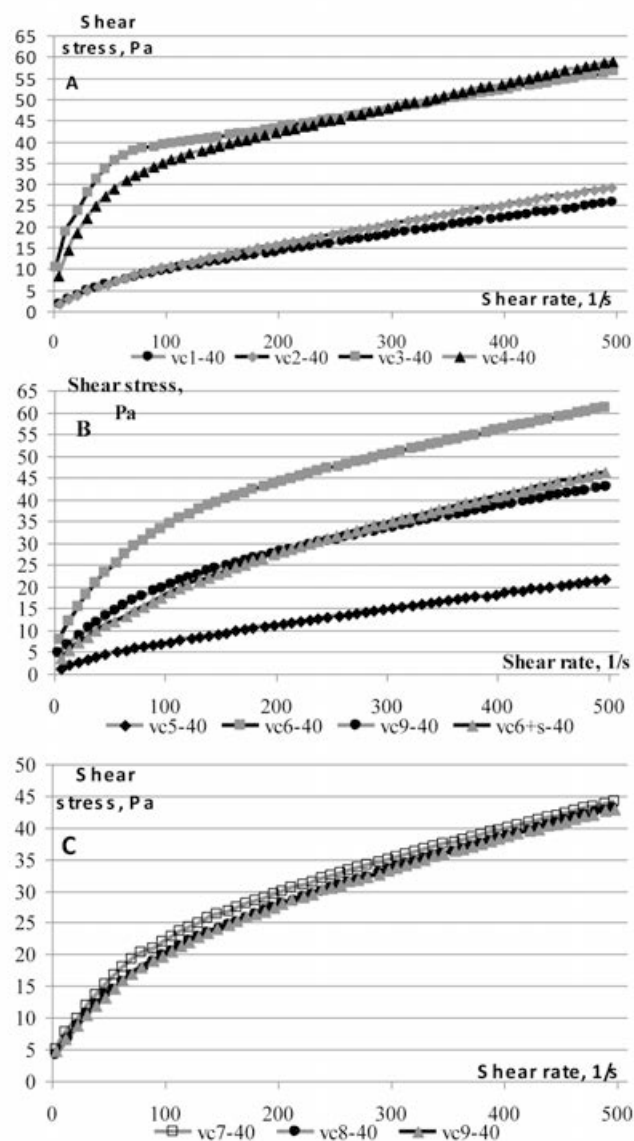


Figure 2. Flow behavior charts at the temperature of 40°C A) group I, B) group II, C) group III.

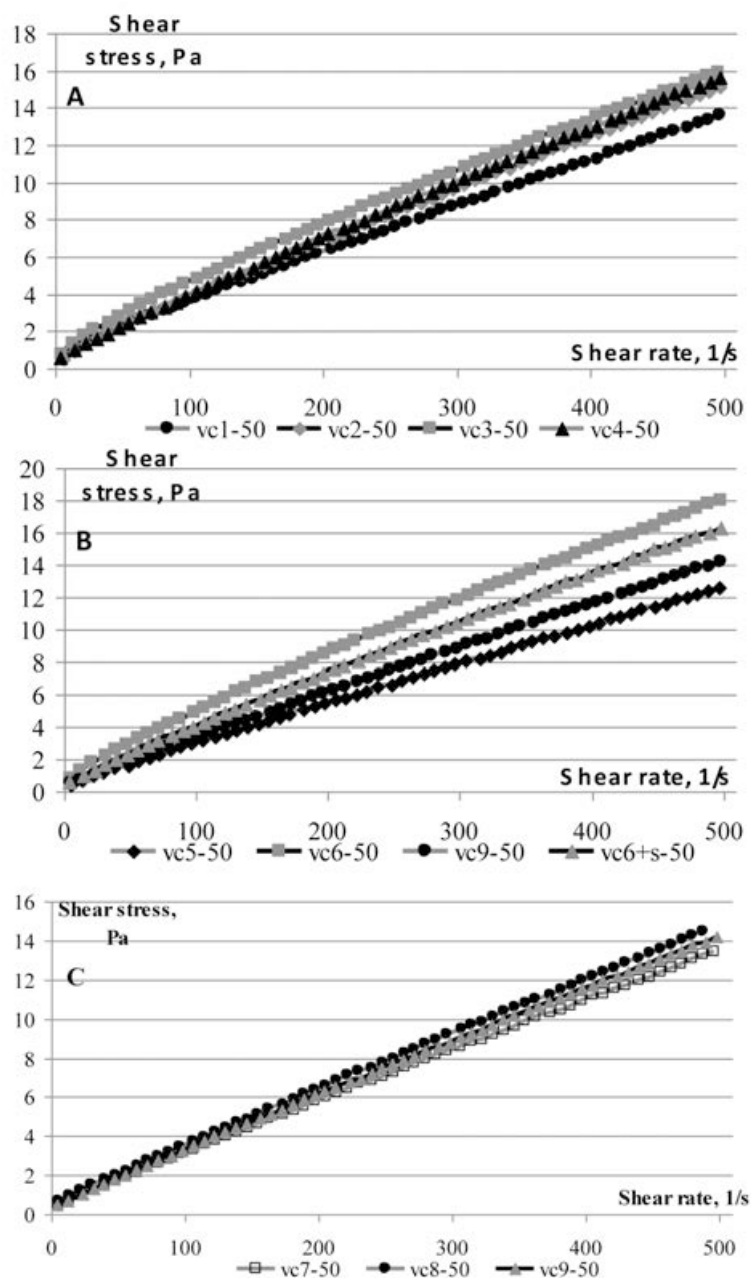


Figure 3. Flow behavior curves at the temperature of 50°C A) group I, B) group II, C) group III.

Table 3. Rheological characteristics of ointments tested at the temperature of 50°C.

Sample No.	Casson	
	σ_0, Pa	$K \text{ Pa s}$
VC1	0.2081	0.0249
VC2	0.1875	0.0239
VC3	0.4248	0.0223
VC4	0.1608	0.0258
VC5	0.0749	0.0216
VC6+S	0.1742	0.0268
VC6	0.3650	0.0266
VC7	0.0686	0.0269
VC8	0.0499	0.0260
VC9	0.0605	0.0249

Table 4. Rheological characteristics of ointments tested at the temperature of 60°C.

Sample No.	Newtonian
	$\eta \text{ Pa s}$
VC1	0.0192
VC2	0.0204
VC3	0.0200
VC4	0.0216
VC5	0.0183
VC6+S	0.0216
VC6	0.0188
VC7	0.0190
VC8	0.0208
VC9	0.0204

Casson equation (Table 3) indicated that in all groups the consistency coefficient dropped below one and was similar in all samples, between 0.0216 (VC5) and 0.0269 (VC7). σ_0 was more varied from 0.0499 (VC8) to 0.4248 (VC3), which indicates that quite different initial stress was required to initiate flow in the tested systems despite their similar viscosity. This shows that even at higher temperatures the structure stability of the systems remained different.

The flowability of the modeled systems at the temperature of 60°C corresponded to the Newtonian model described with the following equation (Bourne, 2002; Steffe, 1996):

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

Where η – dynamic viscosity. The dynamic viscosity was low and similar in all systems; from 0.0183 to 0.0216 (Table 4). This shows that at the temperature of 60°C, the studied semisolid systems transformed into Newtonian fluids.

Semisolid preparations should be of suitable consistency (neither too hard nor too soft, and should not crack when being spread on the skin) and should retain the stability of their structure at changing temperatures. Oscillation testing was performed in order to evaluate the viscoelastic characteristics of the optimized compositions and the stability of their structure at temperatures of 6, 20, and 30°C.

The evaluation of the viscoelastic characteristics at temperatures of 6, 20, and 30°C showed a higher elasticity module G' than the viscosity module G'' in the majority of the samples, which indicates that the elastic characteristics predominated over the flowability properties in these systems (Table 5). Data presented in Table 5 show that in many samples G^* quite significantly differed at different temperatures; from 178.113 to 22.353 Pa (VC4) or from 69.857 to 4.289 Pa (VC9). Testing results showed that the most stable structure at various temperatures was observed in the system VC6, whose complex module (G^*) varied the least, compared to other systems (from 28.777 to 32.650 Pa).

Table 5. Viscoelastic characteristics at 55.18 rad/s frequency and 6, 20, and 30°C temperature.

Sample No.	G', Pa			G'', Pa			G*, Pa		
	6°C	20°C	30°C	6°C	20°C	30°C	6°C	20°C	30°C
VC1	9.891	41.246	2.752	9.149	38.498	725	18.577	56.747	2.849
VC2	-	41.181	2.048	4.479	28.152	525	17.824	49.917	2.125
VC3	29.617	47.793	21.260	43.924	12.643	10.677	54.957	50.867	28.890
VC4	28.370	20.055	14.360	12.259	1.471	12.360	178.113	33.320	22.353
VC5	31.497	7.322	538	4.693	2.930	225	44.487	8.177	584
VC6+S	18.797	10.554	971	1.200	4.341	451	37.977	11.743	1.071
VC6	24.640	29.250	27.113	6.775	24.760	4.716	31.700	32.650	28.777
VC7	29.883	18.680	46.364	45.500	19.395	4.609	81.447	63.890	96.344
VC8	35.520	12.050	4.564	5.620	2.541	1.536	38.977	62.993	4.822
VC9	21.050	55.640	3.650	-	53.597	2.210	41.313	69.857	4.289

*Note – negative value.

To evaluate how the rheological characteristics of a system were affected by the introduction of suspension substances into the ointment base, we studied a sample containing 0.5% liquorice root powder (VC6+S). Upon introduction of liquorice root powder into this system, the complex module at different temperatures ranged between 37.977 and 1.071 Pa, which indicates that this structure did not remain stable when affected by temperature and stress (Table 5). The testing has shown that as the result of the introduction of suspension substances, the consistency coefficient dropped from 5.697 (VC6) to 1.2455 (VC6+S), and yield stress from 11.803 (VC6) to 5.401 (VC6+S), while the flow behavior index increased from 0.3825 (VC6) to 0.5850 (VC6+S) (Table 2) at the temperature of 40°C, which shows that liquorice root powder had a thinning effect on the ointment.

To improve the sensory characteristics of the ointment that is, to achieve semisolid consistency, acceptable spreadability, and elasticity, the following substances were added to the ointment base: Cocoa butter, vaseline, and paraffin. All the tested preparations had light yellow color and acceptable mild scent. The following sensory criteria were evaluated: Color, scent, spreadability, lubricity, and consistency. The results of the evaluation are presented in Figure 4.

Findings presented in Figure 4 indicate that the system VC6 demonstrated the most acceptable spreadability, while the spreadability of the system VC5 was least acceptable. The ointment base VC6 also had the most acceptable consistency, while the consistency of VC7 was the poorest. Even though the preparations did not contain any scent-enhancing substances, ointment bases VC6, VC 4, and VC5 demonstrated the most intensive scent.

The evaluation of the color ranged between 6 and 8 points. The color of the base VC6 was considered to be most acceptable to the customers. The results of the

evaluation showed that the content of beeswax and cholesterol affected the sensory characteristics of the modeled ointment bases. These results corroborated literature data (Aulton, 1998) indicating that excipients affect the sensory characteristics of the preparations.

The evaluation of the lubricity and the moisturizing ability of the preparations showed that the base VC6 was most acceptable, while the base VC3 was the least acceptable.

The results of the evaluation of the sensory characteristics showed that the base VC6 was most suitable for further testing.

Conclusions

The study showed that beeswax had the greatest effect on the decrease in the flow behavior index and the increase in the consistency coefficient and the yield stress parameters of semisolid system bases. Evaluation of the rheological characteristics of the semisolid systems showed that temperature may affect the characteristics of the modeled system.

At the temperature of 40 to 50°C, the systems started demonstrating characteristics of pseudoplastic substances and at the temperature of 60°C, the characteristics of Newtonian substances. Using the experimental planning technique and results of the evaluation of sensory and rheological characteristics of the samples, we designed an original semisolid hydrophobic ointment base from the following natural crude materials: Beeswax, 5.828 g; solid paraffin, 5.0 g; white vaseline, 5.0 g; cocoa butter, 10.0 g; cholesterol, 3.0 g; olive oil, 70.0 g.

It has been found that the introduction of liquorice root powder into the selected optimal-composition base entailed changes in the structure of the semisolid system, resulting in its instability when affected by temperature

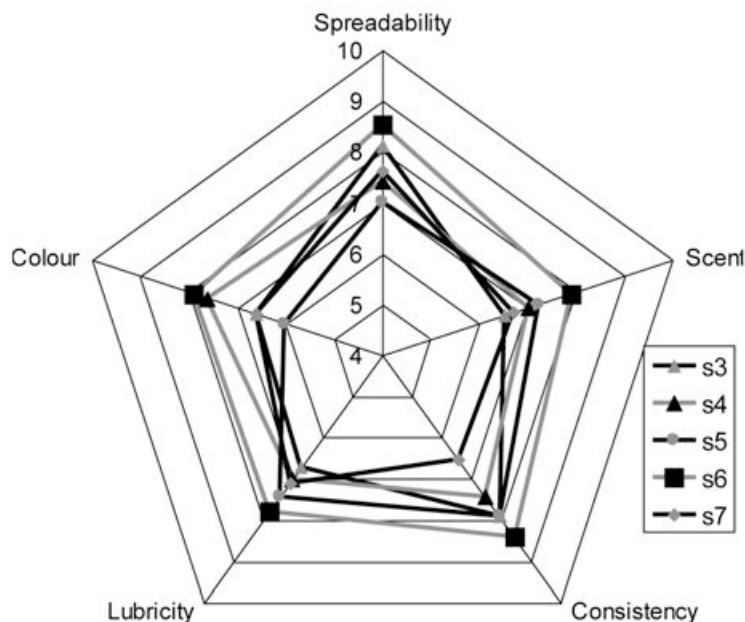


Figure 4. Results of the evaluation of the sensory characteristics.

and stress.

REFERENCES

- Aburjai T, Natsheh FM (2003). Plants used in cosmetics. *Phytother. Res.*, 17(9): 987–1000.
- Akiyama Y, Izumi Y, Nishijima S (2010). Evaluation of tactile sensation of cosmetics by tactile movement — Application movement of skin care products. *Int. J. Cos. Sci.*, 32(2): 164–165.
- Al-Waili NS (2003). Topical application of natural honey, beeswax and olive oil mixture for atopic dermatitis or psoriasis: Partially controlled, single-blinded study. *Compl. Ther. Med.*, 11(4): 226–234.
- Aulton ME (1998). *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. Churchill Livingstone, pp. 257–258.
- Bourne MC (2002). Food texture and viscosity: Concept and measurement, 2nd ed., Academic Press, pp. 77–99.
- Carter SJ (2006). Cooper and Gunn: Dispensing for Pharmaceutical Students, 12th Ed, CBS Publishers, Delhi, pp. 192–193.
- European Pharmacopoeia (2008) 6th Ed. Vol 1, Council of Europe, Strasbourg, pp. 24: 27–746
- Gohel M, Parikh R (2008). Novel semisolid dosage forms. Available from URL: <http://www.pharmainfo.net/>
- Sensory analysis (2008). General guidance for the selection, training and monitoring of assessors — Part 2: Expert sensory assessors (ISO 8586-2:2008).
- Korhonen M (2004). Rheological properties of pharmaceutical creams containing sorbitan fatty acid ester surfactants. PhD dissertation, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Leskauskaitė Dk, Malinauskaitė E, Ramoškienė S (2006). Jelly-forming additives on the rheological properties of dairy desserts. *Food Chem. Technol.*, 40(1): 39–46.
- Liutkevičius A, Speičienė V (2006). Functional food substances influence of ice characteristics. *Food Chem. Technol.*, 40(1): 47–54.
- Rit TP, Keunen K, Behrer R (1999). Beeswax through the ages. Available from URL: <http://www.kosterkeunen.com/News/customerfiles/Beeswax%20Through%20The%20Ages.pdf>.
- Shiromani PK (2004). Statistical optimization of pharmaceutical formulations. *Pharm&Bioingredients*, 1, 1. Available from URL: <http://www.pharmabioingredients.com>.
- Steffe JF (1996). *Rheological methods in food process engineering* 2nd ed., Freeman press, USA, pp. 21–27.
- Visioli F, Poli A, Gall C (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.*, 22(1): 65–75.

SUMMARY

INTRODUCTION

Semisolid dosage forms are important for target based delivery of active substances. Semisolid preparations are used for surface or topical applications, with a purpose to avoid systemic exposure and side effects. Semisolid preparations are used for maintenance of skin functions, prevention and correction of different skin conditions.

Xerosis is widespread problem worldwide, which may be caused by several factors: age (more often determined in young [55] and old subjects [153]), often surfactant usage, use of medicines (e.g. gabapentine) or comorbidity (diabetes mellitus, atopic dermatitis). Skin dryness also may be caused by cold and wind in winter. The main two methods to treat xerosis are emollient therapy, which restore lipid barrier that does not let to evaporate water from the skin and/or humectant therapy, which saturates skin with the water (e.g. hydrogels or other substances, which accumulate high amounts of water). Lesions and increased risk of infection may be associated with untreated dry skin, which can't execute its functions properly due to loss of elasticity and integrity. The main advantage of natural emollients is their lipids structure similar to the skin lipids. Emollient therapy is very effective and helpful against xerosis.

It is known that honey do not let evaporate water from skin thus it maintains moisture. Also honey has bacteriocidal properties, therefore it is suitable component for treatment of small wound, bruise [26]. Big pharmaceutical companies invest huge resources in research of known herbal substances on new applications [214]. The interest for traditional herbal research is huge due to known safety profile and variety of potential positive actions. However, the main issues raise in regulatory field related with exact composition of preparations [36,150]. Therefore it is relevant to model semisolid preparations with known herbal substances (extracts of hawthorn and lemon balm).

There are a lot of body care products in the market. However, there is a lack of non-commercial information on them. Therefore, it is important to conduct comprehensive research of modelled forms, which would ensure acceptable product properties for customer. Body care products may be classified based on whether natural or synthetic substances were used. Commercial organisations certificating products (NATRUE, BDIH, etc.) do not have consensus on what "natural" means. So this term may be speculated in products with only small part of natural composition [50]. It is

known that chemical structure of natural components such as fat acid or cholesterol is similar to the structure of skin components [41]. It is important to model, evaluate and use natural body care products, which are friendly for skin and environment. Natural components used in this research work were water, herbal extracts, vegetable oils, bee products, animal nature substances and polymer from algae.

Quality evaluation of semisolid preparations is a relevant step to get purposeful application, effect and the lowest side-effect risk. Rheology is a method capable to evaluate strength of internal relationships and stability of structure without any external signs of instability. Evaluation of biopharmaceutical characteristics gives information about bioavailability during the time of use.

The aim of this work was to model stable, evidenced by research semisolid formulations with natural components and to evaluate its rheological and biopharmaceutical properties.

The objectives of work were:

1. To model semisolid bases using natural substances and evaluate its rheological characteristics and stability.
2. To evaluate possibilities to use honey in modelling of semisolid formulations.
3. To evaluate antiradical and antimicrobial activity and penetration into human skin possibilities of components of hawthorn (chlorogenic acid, vitexin-2''-O-rhamnoside, hyperoside, isoquercitrin) and lemon balm (rosmarinic acid) extracts with *in vitro* and *ex vivo* methods.
4. To investigate selected herbal extracts influence to the rheological properties of semisolid formulations.
5. To determine release and penetration kinetics of the main phenolic components of selected herbal extracts from the semisolid formulations with the biopharmaceutical methods *in vitro*.

Scientific novelty. Stable semisolid formulations were modelled combining beeswax, honey, cacao butter, cholesterol, olive oil, water, soft and hard paraffin. The method of rheology was selected and applied for stability evaluation of semisolid formulations. The role of beeswax, honey, water and herbal extracts for structure and rheological properties of entire formulation were determined.

The results of HPLC, physicochemical and rheological investigation showed that honey reasonably could be used in modelling of semisolid formulations. Using biopharmaceutical investigation, the influence of beeswax and shea butter for hawthorn phenolic substances release from modelled formulations was determined. The penetration of chlorogenic acid, vitexin-2''-O-rhamnoside, hyperoside, isoquercitrin and rosmarinic acid in

the undamaged human skin were evaluated for the first time. HPLC methods were developed, optimized and validated for qualitative and quantitative analysis of hawthorn (chlorogenic acid, vitexin-2"-O-rhamnoside, hyperoside, isoquercitrin) and lemon balm (rosmarinic acid) phenolic substances in human skin.

Practical and theoretical significance. Two stable ointments and one cream w-o were modelled combining beeswax, honey, cacao butter, cholesterol, olive oil, water, soft and hard paraffin. These formulations could be introduced into the market and used as emollients. It was proven by research that honey reasonably could be used as the structure component in semisolid formulations. The important role of beeswax as internal structure forming component and component mainly responsible for hawthorn phenolic substances release was proven by rheological and biopharmaceutical research. The relationship between rheological characteristics of formulations and the released amount of phenolic substances was evaluated according to the results of research. HPLC methods were developed, optimized and validated for qualitative and quantitative analysis of hawthorn (chlorogenic acid, vitexin-2"-O-rhamnoside, hyperoside, isoquercitrin) and lemon balm (rosmarinic acid) phenolic substances in human skin. The knowledge about penetration in human skin of chlorogenic acid, vitexin-2"-O-rhamnoside, hyperoside, isoquercitrin and rosmarinic acid was gained and later associated to lipophilicity of molecule. It was determined that chlorogenic acid, vitexin-2"-O-rhamnoside, hyperoside, isoquercitrin being relatively more hydrophilic compounds did not penetrate into human skin, whereas rosmarinic acid, being as relatively more hydrophobic compound, was found in epidermis and derma of human skin. The quality of the semisolid formulation was assessed with pH, rheological properties and release tests. HPLC methods were used for evaluation of hawthorn and lemon balm extracts phenolic components after biopharmaceutical tests. These results are important for the purposeful use and the evaluation of quality biopharmaceutical properties of semi solid formulations.

MATERIALS AND METHODS

Experimental formulations: The compositions of experimental formulations (ointments, creams and hydrogels) are presented in Table 1.

Table 1. Compositions of modeled formulation basis

Components (%)	Ointment I (N)	Ointment II (M)	Ointment III (T)	Cream w-o (K)	Hydrogel (A)
Beeswax	0.5–15.0	5.0–15.0	0–1.0	5.0	–
Solid paraffin	5.0	–	–	–	–
Soft paraffin	5.0	–	–	–	–
Honey	–	1.0–10.0	10.0	10.0	10.0
Cacao butter	10.0	10.0	10.0	10.0	–
Shea butter	–	–	14.0–15.0	–	–
Cholesterol	1.0–5.0	3.0	3.0	3.0	–
Olive oil	up to 100.0	up to 100.0	up to 100.0	up to 100.0	–
Sodium alginate	–	–	–	–	2.0–4.0
10% CaCl ₂	–	–	–	–	2.0–4.0
Distilated water / Aqueous solution of dry extract	–	–	–	20–40	up to 100.0

Analysis of phenolic compounds in herbal extracts: Total phenolic content in extracts were evaluated with Folin-Ciocalteu reaction [211]. Qualitative and quantitative analysis of components of hawthorn and lemon balm extracts were conducted with validated HPLC methods, which were used in the qualitative and quantitative evaluation of phenolic substances in the biopharmaceutical studies *in vitro* and *ex vivo* [184, 185].

***In vitro* release studies of phenolic compounds from semisolid formulations:** *In vitro* release experiments (n=3) were conducted using modified Franz-type diffusion cells. The semisolid sample (1.00±0.02 g) was placed into the cell with a dialysis membrane Cuprophan® (Medicell International Ltd., UK). The area of the diffusion was 1.77 cm². Thermostated (37±0.2°C) purified water acted as the acceptor medium, which was stirred using a magnetic stirrer. Samples from the acceptor solution were taken at 1, 2, 4, and 6 h and were immediately replaced with the same volume of fresh acceptor solution. Samples were analysed with HPLC [184,185].

Penetration experiment through the full-thickness undamaged human skin: Abdominal skin of Caucasian women (age range: 25–40 years) was obtained from the Department of Plastic and Reconstructive Surgery (the Hospital of the Lithuanian University of Health Sciences, Lithuania) after cosmetic surgery. It was stored at –20°C for not longer than 6 months before use. Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee has approved the use of human skin for transdermal penetration studies. A Bronaugh-type flow-through diffusion cell with full-thickness human skin was used for *ex*

vivo skin penetration experiments (n=3). The experiment was conducted according to the methods proposed by Kezutyte et al. and Zilius et al. [94, 212].

Evaluation of rheological characteristics of semisolid formulations: The test (n=5) was performed using the Carrimed CSL² 500 rheometer (TA Instruments, USA), by applying the cone-and-plate geometry system (cone diameter – 60 mm, angle – 2°, sample thickness – 150 µm). The shear rate was increased for 2 min from 0 to 500 s⁻¹. Rheological characteristics were calculated according to the Ostwald de Waele mathematical model.

Assessment of stability of semisolid formulations: Stability of semisolid formulations were assessed during 6 months storage in climatic shelf Climacell MMM-Group (Medcenter Einrichtungen GmbH, Brno, Czech Republic) with controlled conditions (30±2 °C temperature and 65±5 proc. of moisture). Stability was assessed according to the rheological, release and pH test at 0, 1, 4, 6 months.

In vitro assessment of biological activity. Antiradical scavenging activity: A 0.1 mmol/L DPPH solution was prepared in 96 % ethanol. The reaction (n=3) was initiated in a cuvette to which 2.9 mL of DPPH solution and 0.1 mL of the analysed solution were added. The absorbance of the reaction mixture was measured at the wavelength of 518 nm 30 min after the start of the reaction. The results were expressed in percentage of bound DPPH.

Antimicrobial activity: The antimicrobial activity of extracts and semisolid formulations was assessed using solid growth Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Agar II, BBL, Cockeysville, JAV) media and the well technique. Activity against standard cultures of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 12459, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 8035 and *Candida albicans* ATCC 60193 were evaluated. After the agar solidified, wells (7 mm diameter) were formed in the medium and were filled with the studied preparation. The cultures were incubated for 24 h (bacteria) or 48 h (fungi) in a thermostat at 37 °C, and then the microorganism growth was evaluated measuring transparent zones.

Evaluation of honey quality: Various types of honey were evaluated according to the regulation [44, 213] and additional tests: microstructure with immersed microscope Motic® (Motic China Group Co., Ltd., China), free phenolic acid evaluation with HPLC [79] and rheological evaluation with rheometer Carri-med CSL² 500 [186].

Statistical methods: The results of the researches were statistically evaluated using SPSS 22.0 and Microsoft Office Excel 2010 softwares. One

Way ANOVA method with Tukey HSD (Honestly Significant Difference) criteria or Repeated Measures ANOVA were used for statistical comparisons. Also, means, standard deviations, standard errors, correlation coefficient of Spearman were calculated. Significance level of $\alpha=0.05$ was set for all statistical tests.

RESULTS

Modelling stable semisolid bases from natural components

Natural components were selected for bases formulation. Beeswax was selected as thickening component. Olive oil was as liquid component forming the main structure of formulation. Butters were introduced as components, which ensure softness, spreadability of formulation. Cholesterol was used as stabilizing agent. Rheological test revealed that beeswax and water amount had the highest impacts to the rheological characteristics of formulations. Consistency coefficients increased and flow behaviour indices decreased with increasing amount of beeswax (Fig. 3.1.1.1 and Fig. 3.1.2.1). The same effect was gain when amount of water was increased in cream w-o (Fig. 3.1.3.1). It could be explained by absorptive characteristics of cholesterol [168]. The rheological characteristics measurements of semisolid formulations revealed that all evaluated honey types (buckwheat, rape, forest, eucalyptus and acacia) could be used in modelling of semisolid formulations (Table 3.1.2.2), despite the huge differences in their own rheological characteristics. Forest honey contained huge crystals, high consistency coefficients and low flow behaviour index, while acacia honey had no crystals, low consistency coefficients and high flow behaviour index (Table 3.2.1.1). Rheological characteristics measurements revealed that during 6 months stability test the following formulations were stable and selected for further experiments:

N6	M6	K4
Beeswax 6.0	Beeswax 15.0	Beeswax 5.0
Solid paraffin 5.0	Forest honey 10.0	Forest honey 10.0
Soft paraffin 5.0	Cacao butter 10.0	Cacao butter 10.0
Cacao butter 10.0	Cholesterol 3.0	Cholesterol 3.0
Cholesterol 3.0	Olive oil up to 100.0	Distillated water 35.0
Olive oil up to 100.0		Olive oil up to 100.0

Sodium alginate was chosen as polymeric compound for hydrogel formation. Calcium chloride acted as cross-linker between sodium alginate

molecules. Three different concentrations (2, 3, and 4%) of sodium alginate hydrogels were modelled.

Evaluation of honey rheological, physicochemical properties and phenolic acids composition

Eucalyptus, rape, buckwheat, acacia, raspberry, forest honey types were chosen for investigation. The HPLC results showed that acacia (7.16 µg/ml) and raspberry (9.38 µg/ml) honeys had the lowest amounts, the buckwheat (107.15 µg/ml) and forest (125.63 µg/ml) honeys had the highest amounts of free phenolic acids. For more information see manuscript "The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey".

The results of physicochemical properties showed that rape honey had too high amount of moisture (20.2%) and unpleasant scent (sour). The highest acidity was in buckwheat (24.17 ± 0.60 meq/kg) and forest (24.50 ± 0.58 meq/kg) honeys and the lowest pH had forest (3.74 ± 0.01) honey. The results of microstructure assessment showed that acacia honey did not have any crystals and the forest honey had the highest accumulation of sugar crystals. On the other hand, rape and eucalyptus honeys had experienced the highest changes on rheological characteristics during different temperature regimens. To sum up the results from three studies, for further research buckwheat and forest honey types were chosen, while acacia honey was chosen as the only honey type without crystals. For more information see manuscript "Examination of rheological and physicochemical characteristics in Lithuanian honey".

Different honey types were added to the semisolid formulations. The results of the research showed that buckwheat honey had the weakest effect [187] on semisolid structure, while other types of honey had similar effects. The rheological characteristics assessment showed that there were no difference between acacia and forest honey abilities to make effect on semisolid structure. Therefore, the forest honey, which had higher amounts of the free phenolic acids, was chosen for further investigations.

Evaluation of composition, antiradical and antimicrobial activity *in vitro* and penetration in human skin *ex vivo* of hawthorn extracts

Extracts composition assessment. Hawthorn and lemon balm extracts were chosen as source of phenolic substance. The literature review revealed that hawthorn flower with leaves extract contains four main substances, which have different physicochemical properties. Chlorogenic acid (MW=354 Da) and vitexin-2"-O-rhamnoside (MW=579 Da) are relatively

hydrophilic compounds with calculated logP -0.4 and -0.9 , respectively. Hyperoside and isoquercitrin are slightly hydrophobic stereoisomers with MW=464 Da and 0.4 logP value.

Amounts of phenolic compounds in dry and retrieved from herbal hawthorn flower with leaves extracts determined by HPLC were: chlorogenic acid 7.91 ± 0.52 mg/g and 2.586 mg/g, vitexin-2"-O-rhamnoside 23.00 ± 1.38 mg/g and 2.324 mg/g, hyperoside 3.65 ± 0.43 mg/g and 0.680 mg/g and isoquercitrin 1.95 ± 0.89 mg/g and 0.327 mg/g, respectively.

Antimicrobial activity in vitro. The results of the antimicrobial activity (Fig. 3.2.2.1) *in vitro* showed that hawthorn extracts had activity against *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* and *S. aureus* species, while extract retrieved from hawthorn herbal showed weak additional effect against *P. aeruginosa*. Both extracts had no activity against *P. mirabilis*, and *C. albicans* microorganisms. Dry extract showed the highest, however not significantly, activity against *B. cereus*, while herbal extract showed statistically significantly highest activity against *E.coli*.

Antiradical scavenging activity. The results of antiradical scavenging activity (Fig. 3.2.2.2) against DPPH free radical showed that IC₅₀ were 115 μ g/ml and 147 μ g/ml for dry and herbal hawthorn extracts, respectively. The assessment of trolox performed according to the same method showed that IC₅₀ was 162 μ g/ml. The results showed that both hawthorn extracts had higher activity against DPPH free radical than standard antioxidant trolox.

Penetration in human skin ex vivo. The results of hawthorn extract components penetration in human skin *ex vivo* showed that substances did not penetrate during 24-hour period. It was decided to add classical penetration enhancers (oleic acid, d-limonene, propylene glycol, methanol). However, they did not enhance the penetration. The next step was to remove *stratum corneum* by tape stripping technique. After 24 hours experiment, unquantifiable traces of hyperoside and isoquercitrin were found in epidermis. In conclusion, the penetration of hawthorn phenolic compounds was stopped not only by *stratum corneum* but also by live epidermis. It was concluded that penetration was influenced by physicochemical characteristics of hawthorn phenolic compounds.

Evaluation of composition, antiradical and antimicrobial activity *in vitro* and penetration in human skin *ex vivo* of lemon balm extract

Phenolic composition of lemon balm dry extract. Rosmarinic acid is the main phenolic compound in lemon balm extract. It is hydrophobic compound with MW=360 Da and logP value of 2.4. Rosmarinic acid content was 80 ± 2 mg/g in dry lemon balm extract.

Antimicrobial activity in vitro. The results of the antimicrobial activity (Fig. 3.2.3.1) *in vitro* showed that lemon balm extract had activity against *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* and *S. aureus* bacteria species, while *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* were not susceptible. The statistical analysis revealed that activity was similar against all susceptible bacteria.

Antiradical scavenging activity. The results of antiradical scavenging activity (Fig. 3.2.3.2) against DPPH free radical showed that IC₅₀ was 113 µg/ml, while IC₅₀ for trolox was 162 µg/ml. The results showed that lemon balm extract had higher activity against DPPH free radical than standard antioxidant trolox.

Penetration in human skin ex vivo. The results showed that rosmarinic acid penetrates in human skin in *ex vivo* experiments. After 24 hours $0.42 \pm 0.05\%$ (or $5.96 \pm 0.74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) of rosmarinic acid was found in epidermis and unquantifiable traces were detected in derma.

Modelling and stability evaluation of semisolid formulations with hawthorn extracts

Rheological evaluation of formulations with dry hawthorn extract (C set). 1, 2 or 3% of extract was added to the stable semisolid bases. Assessment of rheological characteristics showed that addition of dry hawthorn extract made influence on the rheological characteristics of formulations. The consistency coefficient decreased and the flow behaviour index increased in the majority of cases with higher extract concentrations (Fig. 3.3.1.1).

Biopharmaceutical evaluation of formulations with dry hawthorn extract. After 6-hour release experiments with C set samples were conducted, it was determined that phenolic substances of hawthorn had not been released from the formulations.

To answer the question what stopped the release of hawthorn compounds from formulations an additional set of samples (P set) was produced (The compositions of P set is presented in Table 3.3.2.1.1). The impact of different formulation components on phenolic substance release was checked. The conclusion was made that the highest influence had beeswax.

Therefore, the set of samples (AV) was made in order to evaluate the amount of beeswax which influences the release of hawthorn compounds. AV samples contained only three components: 2% of dry hawthorn extract, different amounts of beeswax (0–5%) and oil up to 100%. The results of release test showed that phenolic compounds of hawthorn were not released from formulations which contained 1.5%–5% of beeswax. The release was

similar between formulations without beeswax and 0.5% of beeswax and statistically significant reduced from formulation with 1% of beeswax. For more information see manuscript “Application of dry hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) extract in natural topical formulations”.

The huge impact of beeswax on hawthorn phenolic compounds release profiles led to the decision that beeswax should be changed to other natural component. Shea butter was chosen and the results of release experiments showed that shea butter did not limit the release of hawthorn compounds.

Stability of formulations with shea butter (T set). Rheological characteristics of formulations with shea butter (T set) statistically significantly changed during 6 months stability testing period. Consistency coefficient statistically significantly increased and the flow behaviour index decreased for all formulations (Fig. 3.3.3.1). The increment of consistency coefficient during the storage period could be related to the loss of components [65], however our formulations did not have volatile components, so this reason is little probable. Another reason for such changes could be internal changes of links between components [154], which led to the stronger internal structure with the need of stronger forces to break it.

The results of the release test (Fig. 3.3.3.2) showed that the highest amounts (41.4–42.4%) of hawthorn phenolic compounds were released from formulations without beeswax and the lowest (5.37–6.63%) from formulations with 1% of beeswax. The statistical analysis showed that the amounts released from formulations without beeswax and with 0.5% of beeswax did not differ, while amounts released from formulation with 1% of beeswax were statistically lower. Mathematical analysis revealed that R squares were 0.864, 0.981, 0.892. Pearson correlation coefficient (–0.972) was statistically significant and showed strong correlation between released amounts and rheological characteristics for formulation without beeswax. The results of correlation analysis showed that released amounts were inversely and directly related to consistency coefficient and flow behaviour index, respectively.

The value of pH varied between 4.44 ± 0.06 and 4.84 ± 0.01 during the stability period. However, these values were in the acceptable range of products pH for use on skin [6, 110].

Modelling and stability evaluation of semisolid formulations with lemon balm extracts

Rheological evaluation of formulations with lemon balm extract (R set). The rheological and biopharmaceutical characteristics were assessed for semisolid formulations (R set) with 4% dry lemon balm extract. Rheological

characteristics showed that addition of dry lemon balm extract decreased consistency coefficients and increased flow behaviour index for formulations (Fig. 3.3.4.1). The stability test showed that cream formulation (R3) with dry extract was not stable. The statistically significant differences were not determined in cream w-o formulation with dissolved extract (R4) during all stability test period.

Biopharmaceutical evaluation of formulations with lemon balm extract. The highest amounts (39.60% at 0 month and 6.11% at 1 month) of rosmarinic acid were released from the R3 formulation during 6 hour test (Fig. 3.3.4.2). It is noteworthy that this one formulation had the lowest consistency coefficient and the highest flow behaviour index. Cream w-o with dissolved extract (R4) released less than 1% of rosmarinic acid. The release from ointments (R1 and R2) was from 0.59 to 1.86%. The mathematical analysis revealed that R square was 0.973, 0.998, 0.967 and 0.928 for R1 – R4 formulations, respectively. The stability test showed that R1 and R2 formulations release of rosmarinic acid during all stability test period was stable. The stability according to the pH test showed that there were no significant changes during the stability test period.

Modelling, rheological and biopharmaceutical evaluation of hydrogels with hawthorn and lemon balm extracts

Three concentrations (2, 3, 4%) of alginate hydrogels were produced with three extracts – dissolved dry hawthorn, herbal hawthorn and dissolved dry lemon balm extracts. The determination of rheological characteristics revealed that consistency coefficient varied from 2 to 17 (Pa s)ⁿ and the flow behaviour index varied between 0.5–0.6 (Fig. 3.3.5.1). The statistical analysis results showed that concentration of sodium alginate played significant role on rheological characteristics of formulations, while the nature of extract was not a significant.

Biopharmaceutical evaluation of sodium alginate formulations. *In vitro* release test results (Fig. 3.3.5.2) showed that formulations with herbal hawthorn extract released 44.37±1.22–56.47±3.58% of phenolic compounds and the formulations with dissolved hawthorn extract released 42.03±1.42–50.10±1.42% of phenolic compounds. *In vitro* release test results showed that formulations with dissolved dry lemon balm extract released 48.39±2.86–61.41±3.88 proc. of rosmarinic acid (Fig. 3.3.5.3).

Mathematical analysis showed that R square varied between 0.958 and 0.999 for different hydrogel formulations. The statistical analysis revealed that there were no statistical differences between releases from hydrogels with different concentrations of sodium alginate or different hawthorn

extracts. The statistical comparison between lemon balm hydrogels showed that formulation with 2% of sodium alginate released higher amount of rosmarinic acid as compared with 3% of sodium alginate formulation. However, no other statistical significant differences were found.

The values of hydrogels pH varied between 5.02 ± 0.01 – 5.34 ± 0.00 and it was in the acceptable range for skin.

Antimicrobial activity evaluation of semisolid formulations with extracts

E.coli, *B.cereus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* were chosen for evaluation of semisolid formulations activity against microorganisms. The research was done on the formulations which released the highest amounts of phenolic compounds. The results (Fig. 3.4.1) of the experiment showed that lemon balm hydrogel had activity against *B.cereus* and *E. coli*, while hawthorn hydrogel had activity only against *B.cereus*. Cream w-o with dry lemon balm extract had activity against all tested microorganisms, while other tested formulations didn't show antimicrobial activity. It is worth to mention, that activity showed by hydrogels were higher than the initial extract activity.

Penetration of phenolic compounds from semisolid formulations to the undamaged human skin ex vivo

Penetration experiments were conducted only with semisolid formulations which released phenolic compounds. The test results of three hawthorn formulations showed that phenolic compounds of hawthorn did not penetrate to human skin. The nature of formulations did not affect penetration of hawthorn compounds, therefore formulations based on nanotechnologies may be necessary for hydrophilic compounds to penetrate to the deeper layers of human skin [1].

The results of the penetration experiment showed that rosmarinic acid penetrated to human skin. The penetration rate depended on semisolid formulation. After 24-hour experiment with applied hydrogel 0.34% and 0.16% of rosmarinic acid were found in epidermis and dermis, respectively. Higher rate (1.08%) of penetrated rosmarinic acid was found from cream formulation, while penetrations were lower from other semisolid formulations. For more information read manuscript "Release of rosmarinic acid from semisolid formulations and its penetration through human skin ex vivo".

CONCLUSIONS

1. The semisolid bases were modelled using beeswax, olive oil, cacao butter, cholesterol, forest honey, soft and hard paraffin and distilled water. Research of rheological characteristics revealed that the highest influence for the firming internal structure of ointments had amount of beeswax and for the cream w-o – amount of distilled water. Stable semisolid bases were selected for addition of active substances.
2. Experimental research showed that honey is a suitable component for modelling of semisolid formulations. It was determined that bases with honey were homogenic and stable during 6 months stability research. Forest honey was chosen for further experiments after evaluation of rheological, physicochemical properties and amounts of free phenolic acids.
3. *Ex vivo* experiments showed that relatively hydrophilic hawthorn compounds (chlorogenic acid, vitexin-2"-O-rhamnoside, hyperoside and isoquercitrin) did not penetrate to human skin when relatively hydrophobic rosmarinic acid was found in epidermis and derma.
4. Evaluation of antiradical activity *in vitro* showed that hawthorn flowers with leaves and lemon balm leaves extracts had higher radical scavenging activity against DPPH than trolox. The antimicrobial activity against *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* and *S. aureus* was determined for both herbal extracts.
5. The rheological investigation showed that internal structures of formulations were weakened by the addition of dry extracts to the hydrophobic or cream bases. The consistency coefficients decreased and the flow behaviour indices increased. Hydrophylic formulations, produced with hawthorn or lemon balm extracts, had rheological characteristics which did not differ statistically significantly.
6. It was determined that beeswax was the main limiting agent for phenolic compound release. The experiments showed that ointments released up to 2% of rosmarinic acid. Release of phenolic compounds decreased by 79% when beeswax content was increased from 0.5 to 1%. It was determined that release of phenolic compounds increased up to 42% when beeswax was changed to the shea butter. Hydrophilic formulations had effective (approximately 50%) release rates.
7. The results of the *ex vivo* experiments showed that phenolic compounds of hawthorn released from semisolid formulations were founded only on the surface of the skin, thus formulations of hawthorn may be used in semisolid preparations which act on skin surface. The research showed that semisolid formulations with lemon balm extract may have potential

topical effect since the highest content of rosmarinic acid was determined in epidermis and low amounts of rosmarinic acid determined in derma.

8. Experimental investigations showed that ointments with herbal extracts did not have antimicrobial activity. Hydrogel with hawthorn extract had antimicrobial activity against *B. cereus*. Cream (w-o) with lemon balm extract had activity against *B. cereus*, *E. coli*, *S. epidermidis* and *S. aureus*, while hydrogel with lemon balm extract had activity only against *B. cereus* and *E. coli*.

PRIEDAI

Sumodeliuotų formuluočių sudėtys

1 lentelė. N serijos sudėtys

Formuluotė	Bičių vaškas	Kietasis parafinas	Vazelinai	Kakavos aliejus	Choles- terolis	Alyvuogių aliejus
N1	0,5	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N2	1,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N3	2,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N4	3,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N5	4,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N6	6,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N7	8,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N8	10,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N9	12,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
N10	14,0	5,0	5,0	10,0	3,0	iki 100,0
Nop	5,8	5,0	5,0	10,0	3,0	70,0

2 lentelė. M serijos sudėtys

Formuluotė	Bičių vaškas	Medus	Kakavos aliejus	Choles- terolis	Alyvuogių aliejus
M1	5,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0
M2	7,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0
M3	9,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0
M4	11,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0
M5	13,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0
M6	15,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0

3 lentelė. K serijos sudėtys

Formuluotė	Bičių vaškas	Medus	Kakavos aliejus	Choles- terolis	Alyvuogių aliejus	Išgrynintas vanduo
K1	5,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	20,0
K2	5,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	25,0
K3	5,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	30,0
K4	5,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	35,0

4 lentelė. C serijos formuluočių sudėtys

Formuluotė	Bičių vaškas	Kietasis parafinas	Vazelinas	Medus	Kakavos aliejus	Cholesterolis	Alyvuogių aliejus	Išgrynintas vanduo	Sausasis gudobelių ekstraktas
N6	6,0	5,0	5,0	\	10,0	3,0	iki 100,0	\	\
C1	6,0	5,0	5,0	\	10,0	3,0	iki 100,0	\	0,5
C2	6,0	5,0	5,0	\	10,0	3,0	iki 100,0	\	1,0
C3	6,0	5,0	5,0	\	10,0	3,0	iki 100,0	\	2,0
M6	15,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	\	\
C4	15,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	\	0,5
C5	15,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	\	1,0
C6	15,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	\	2,0
K4	5,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	35,0	\
C7	5,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	35,0	0,5
C8	5,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	35,0	1,0
C9	5,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	35,0	2,0

5 lentelė. T serijos formuluočių sudėtys

Formuluotė	Bičių vaškas	Sviestmedžio aliejus	Medus	Kakavos aliejus	Cholesterolis	Alyvuogių aliejus	Sausasis gudobelių ekstraktas
T1	0,0	15,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	\
T2	0,5	14,5	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	\
T3	1,0	14,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	\
T4	0,0	15,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	2,0
T5	0,5	14,5	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	2,0
T6	1,0	14,0	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	2,0

6 lentelė. R serijos formuluočių sudėtys

Formuluotė	Bičių vaškas	Kietasis parafinas	Vazelinai	Medus	Kakavos aliejus	Cholesterolis	Alyvuogių aliejus	Išgrynintas vanduo/ vandeninis ekstraktas	Sausasis vaistinių medžių ekstraktas
R1	6,0	5,0	5,0	\	10,0	3,0	iki 100,0	\	4,0
R2	15,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	\	4,0
R3	5,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	35,0	4,0
R4	5,0	\	\	10,0	10,0	3,0	iki 100,0	35,0	\

7 lentelė. A serijos formuluočių sudėtys

Formuluotė	Natrio alginatas	10 proc. CaCl ₂	Medus	1:20 gudobelių sausojo ekstrakto vandėninis tirpalas	1:10 gudobelių VAŽ vandeninė ištrauka	1:15 vaistinių medžių sausojo ekstrakto vandėninis tirpalas	Natrio benzoatas
AN1	2,0	2,0	10,0	iki 100,0	\	\	0,5
AN2	3,0	3,0	10,0	iki 100,0	\	\	0,5
AN3	4,0	4,0	10,0	iki 100,0	\	\	0,5
AZ1	2,0	2,0	10,0	\	iki 100,0	\	0,5
AZ2	3,0	3,0	10,0	\	iki 100,0	\	0,5
AZ3	4,0	4,0	10,0	\	iki 100,0	\	0,5
AM1	2,0	2,0	10,0	\	\	iki 100,0	0,5
AM2	3,0	3,0	10,0	\	\	iki 100,0	0,5
AM3	4,0	4,0	10,0	\	\	iki 100,0	0,5

CURRICULUM VITAE

Name	Ada
Surname	Stelmakienė
Address:	Sukilėlių 13, Kaunas
E-mail:	ada.stelmakiene@yahoo.com

Education

2005–2010	Master of Pharmacy, Kaunas University of Medicine
2001–2005	Kaunas „Saulės“ Gymnasium
1993–2001	Kaunas Vaizganto Secondary School

Qualification

Since 2010	Profession qualification of pharmacist
------------	--

Work experience

Since 2012/09	Assistant, Junior research, Department of Clinical Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences
---------------	---

PADĖKA

Dėkoju disertacinio darbo vadovei prof. Kristinai Ramanauskienei, Klinikinės farmacijos katedros vedėjui prof. Vitaliui Briedžiui ir visam kolektyvui už visapusišką pagalbą ir materialinę bazę.

Dėkoju Farmakognozijos katedros prof. Valdui Jakštui už galimybę įgyti patirties efektyviosios skysčių chromatografijos srityje.

Dėkoju KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros prof. Daivai Leskauskaitei už galimybę atlikti reologijos tyrimus.

Dėkoju Analizės ir toksikologinės chemijos katedros vedėjui prof. Liudui Ivanauskui už bendradarbiavimą vertinant medaus kokybę.

Dėkoju Vaistų chemijos katedros doc. dr. Vilmai Petrikaitei už bendradarbiavimą vertinant mikrobiologinį aktyvumą.

Dėkoju Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mokslo fondui ir Atvirajam fondui už finansinę paramą.