

Pusiau kietų sistemų su vaistinių melisų (*Melissa officinalis* L.) ekstraktu modeliavimas ir biofarmacinis tyrimas

Indrė Čizaitė, Kristina Ramanauskienė, Modestas Žilius, Vytis Čizinauskas, Vitalis Briedis

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Atopinio dermatito gydymui įprastai yra skiriami steroidiniai preparatai, tačiau šie gali sukelti daugybę pašalinių efektų: kraujagyslių išsiplėtimą, depigmentaciją ir kt. Aktualu pritaikyti skystąjį vaistinių melisų ekstraktą puskiečių preparatų gamyboje, kadangi vaistinė melisa yra natūralus rozmarino rūgšties šaltinis, kuri yra vartojama atopinio dermatito gydymui. Taip pat svarbu įvertinti puskiečių preparatų kokybę biofarmaciniais tyrimais – nustatant veikliosios medžiagos atpalaidavimo greitį iš sumodeliuotų pagrindu, nes nuo atpalaiduoto veikliosios medžiagos kiekio priklauso preparato veiksmingumas. Tyrimo tikslas – sumodeliuoti hidrofilines pusiau kietas formas su skystuoju vaistinių melisų ekstraktu ir nustatyti jų kokybę, pagrindžiant biofarmaciniais tyrimais. Veikliųjų junginių atpalaidavimo tyrimas *in vitro* iš puskiečių sistemų, kuriose įterptas skystasis vaistinės melisos ekstraktas, atliktas naudojant Franz tipo modifikuotas difuzijos celes. Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas spektrofotometrinio metodu. Tyrimams buvo pasirinkti devyni skirtingų kompozicijų geliai, kuriuose įterptas vaistinių melisų skystasis ekstraktas. Visi pagaminti geliai vienalytiški ir pasižymi tinkamu odai pH. Nustatyta, jog dinaminė klampa didesnė geliuose, kuriuose kaip gelifikuojanti medžiaga naudojamas sintetinis karbomeras (nuo 1.15 ± 0.02 iki 3.55 ± 0.10 Pa x s), nei geliuose, pagamintuose su pusiau sintetinė gelifikuojančia medžiaga metilceliulioze (nuo 0.01 ± 0.04 iki 2.18 ± 0.03 Pa x s). Iš karbomerinių gelių stebimas ir didesnis veikliųjų junginių atpalaidavimas: tyrimo pabaigoje didžiausias atpalaiduotas veikliųjų junginių kiekis iš šių gelių yra net 5 kartus didesnis už didžiausią veikliųjų junginių kiekį, atpalaiduotą iš gelių su metilceliulioziniu pagrindu.

Vaistinė melisa, geliai, junginių atpalaidavimas

Įvadas

Vaistinė melisa (*Melissa officinalis* L.) atstovauja notrelinių (*Lamiaceae*), dar kitaip žinomai kaip lūpažiedžių (*Labiatae*), šeimai (British, 2006). Vaistinės melisos augalinė žaliava (*Melissae folium*), kuri aprašyta Europos Farmakopėjoje (Eu.Pharm.,2013), ir jos preparatai pasižymi lengvai raminančiu, antivirusiniu poveikiu, gerina virškinamojo trakto veiklą bei atpalaiduoja žarnyno spazmus (British, 2006, Lee et al., 2008, Vejdani et al., 2006). Vaistinė melisa taip pat yra natūralus rozmarino rūgšties šaltinis, kuri yra kavos rūgšties bei 3,4 – dihidroksifenipieno rūgšties esteris ir pasižymi antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis, antivirusinėmis savybėmis (Petersen, Simmonds, 2003). Dėl pastarųjų savybių vaistinių melisų ekstraktas gali būti pritaikomas gydant ir atopinį dermatitą (Lee et al., 2008; Jang et al.,2011). Aktualu pagaminti hidrofilinius puskiečius preparatus su vaistinių melisų ekstraktu, kurie galėtų būti pritaikomi atopinio dermatito gydymui, ir įvertinti jų kokybę (pH, dinaminė klampa, vienalytiškumas, stabilumas). Taip pat svarbu įvertinti veikliosios medžiagos atpalaidavimo greitį iš sumodeliuotų sistemų, nes nuo atpalaiduoto veikliosios medžiagos kiekio priklauso preparato veiksmingumas.

Tyrimo tikslas – sumodeliuoti hidrofilines pusiau kietas formas su skystuoju vaistinių melisų ekstraktu ir nustatyti jų kokybę, pagrindžiant biofarmaciniais tyrimais.

Tyrimo objektas – hidrofilinės pusketės sistemos su skystuoju vaistinių melisų ekstraktu.

Tyrimų metodika

1 lentelėje pateikta skirtingų kompozicijų gelių, kuriuose įterpta 10 % skystojo melisų ekstrakto, sudėtis. Veikliųjų junginių atpalaidavimo tyrimas *in vitro* iš puskiečių sistemų, kuriose įterptas vaistinės melisos ekstraktas, atliktas naudojant Franz tipo modifikuotas difuzijos celes (Ramanauskienė ir kt.,2012). Atpalaiduotas veikliųjų junginių kiekis nustatytas atliekant reakciją su

Folin-Ciocalteu reagentu ir matuojant absorbciją 765nm bangos ilgyje Agilent 8453 UV-Vis spektrofotometru (Ramanauskienė ir kt.,2012; Ondrejovič et al., 2012). Gauti rezultatai lyginami pagal kumaro rūgšties kalibracinę kreivę (Ramanauskienė ir kt.,2012). Puskiečių preparatų dinaminė klampa nustatyta naudojant *Vibro viscometer SV-10* viskozimetrą, o pH - *ph-meter 766 su elektrodu Knick SE 104 N* pHmetrą.

Visi tyrimai kartoti tris kartus. Rezultatų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti naudojant Microsoft Office Excel 2010 programą. Tyrimų rezultatų skirtumų reikšmingumas įvertintas naudojant SPSS programą. Skirtumai yra statistiškai reikšmingi, kada $p < 0,05$.

Rezultatai ir aptarimas

Tyrimų metu pagaminti devyni skirtingos sudėties geliai, kurių gamyboje pasirinktos dvi gelifikuojančios medžiagos – pusiau sintetinės kilmės metilceliuliozė ir sintetinės kilmės karbomeras. Pagaminti geliai – nuo gelsvos iki rusvos spalvos, vienalytiški, pasižymi tinkama klampa bei pH (2 lentelė).

Tyrimų rezultatai parodė, jog didžiausia klampa pasižymi geliai [N1–N3], kurių gamyboje kaip pagrindinė gelifikuojanti medžiaga naudotas karbomeras ($1.15 \pm 0.02 - 3.55 \pm 0.10$ Pa x s), o mažiausia dinaminė klampa nustatyta geliuose [N7–N9], pagamintuose tik su metilceliuliozės pagrindu: $0.01 \pm 0.04 - 0.71 \pm 0.08$ Pa x s. Pastarosios pusketės sistemos pasižymi skysta konsistencija. Tai parodo, jog sintetinės kilmės karbomeras yra stipresnė gelifikuojanti medžiaga nei pusiau sintetinės kilmės metilceliuliozė. Tyrimo rezultatai taip pat parodė, jog puskiečių sistemų klampa didėja, didinant gelifikuojančių medžiagų koncentracijas jose (2 lentelė).

1 lentelė. Gelių su skystuoju vaistinės melisos ekstraktu sudėtis
Table 1. Composition of gels containing lemon balm liquid extract

| Sudėtis (%) | Geliai | | | | | | | | |
|--|--------|------|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | N1 | N2 | N3 | N4 | N5 | N6 | N7 | N8 | N9 |
| Karbomeras 980 | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | | | |
| Metilceliuliozė 15cP | | | | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 1.0 | 2.0 | 4.0 |
| Trietanolaminas | 1.0 | 2.0 | 3.0 | | | | | | |
| Propilenglikolis | | | | 20.88 | 20.88 | 20.88 | 20.88 | 20.88 | 20.88 |
| 1.0 % NaOH | | | | qs ad pH 7 | qs ad pH 7 | qs ad pH 7 | | | |
| 50 % Etanolis | 97.5 | 96.0 | 94.5 | | | | | | |
| Išgrynintas vanduo | | | | qs ad 100% | qs ad 100% | qs ad 100% | qs ad 100% | qs ad 100% | qs ad 100% |
| <i>Melissa Officinalis</i> (L.) ekstraktas | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |

Geliai, kurių sudėtyje yra karbomeras [N1 – N6], taip pat pasižymi aukštesnėmis pH reikšmėmis: nuo 7.05 ± 0.02 iki 7.72 ± 0.01 . Tuo tarpu, geliai, kuriuose kaip gelifikuojanti medžiaga yra metilceliuliozė [N7 – N9], pasižymi silpnai rūgštiniu pH – reikšmės vyrauja nuo 5.96 ± 0.05 iki 6.58 ± 0.01 . Tyrimų rezultatai parodė, jog didėjant metilceliuliozės koncentracijai šiuose geliuose, didėja ir gelių pH reikšmė ir jie tampa mažiau rūgštiniai (2 lentelė).

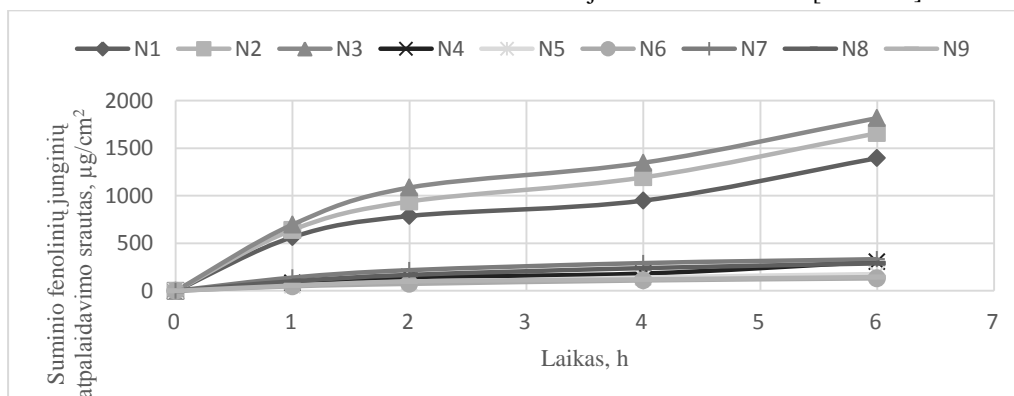
2 lentelė. Gelių su vaistinių melisų ekstraktu kokybės parametrai
Table 2. Quality parameters of gels with lemon balm liquid extract

| Geliai | Kokybės parametrai | |
|--------|-------------------------|-----------------|
| | Dinaminė klampa, Pa x s | pH |
| N1 | 1.15 ± 0.02 | 7.65 ± 0.02 |
| N2 | 3.01 ± 0.08 | 7.72 ± 0.01 |
| N3 | 3.55 ± 0.10 | 7.69 ± 0.01 |
| N4 | 0.54 ± 0.14 | 7.35 ± 0.07 |
| N5 | 0.9 ± 0.08 | 7.20 ± 0.05 |
| N6 | 2.18 ± 0.03 | 7.05 ± 0.02 |
| N7 | 0.01 ± 0.04 | 5.96 ± 0.05 |
| N8 | 0.07 ± 0.07 | 6.14 ± 0.01 |
| N9 | 0.71 ± 0.08 | 6.58 ± 0.01 |

Veikliųjų junginių atpalaidavimo *in vitro* tyrimai iš gelių su skystuoju vaistinių melisų ekstraktu (1 pav.) parodė, jog didžiausias kiekis veikliųjų junginių

atpalaiduojamas iš gelių su karbomeriniu pagrindu [N1 – N3]. Po 6h iš gelio, kuriame gelifikuojančios medžiagos karbomero koncentracija yra 1.5 %, atsipalaidavo $1817.26 \pm 10.15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ veikliųjų junginių, šiek tiek mažiau iš gelių, kuriuose įterpta 0.5 % bei 1.0 % kiekiai karbomero, atitinkamai $1395.43 \pm 17.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ir $1657.92 \pm 43.86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ veikliųjų junginių. Tarp atpalaiduoto veikliųjų junginių kiekio iš gelių, kuriuose karbomero koncentracija 1.0 % ir 1.5 %, statistiškai reikšmingas skirtumas nenustatytas ($p > 0.05$).

Mažesnis veikliųjų junginių atpalaidavimas stebimas iš gelių, kurių gamybai kaip pagrindinė gelifikuojanti medžiaga yra naudojama metilceliuliozė [N4 – N9]. Po 6h didžiausias veikliųjų junginių kiekis atpalaiduojamas iš gelių, kuriuose įterptas mažiausias 1.0 % kiekis metilceliuliozės: $305.77 \pm 6.89 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ veikliųjų junginių atpalaiduota iš N4 kompozicijos gelio, o $332.54 \pm 11.73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ veikliųjų junginių atpalaiduota iš N7 kompozicijos gelio. Mažiausias kiekis fenolinių junginių atpalaiduojamas iš gelių, kuriuose metilceliuliozės koncentracija didžiausia. Tyrimų rezultatai parodė, jog didėjant gelio klampai veikliųjų junginių atpalaidavimas lėtėja. Nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0.05$) tarp atpalaiduoto veikliųjų junginių kiekio iš gelių, kurių gamyboje kaip pagrindinė gelifikuojanti medžiaga naudojamas karbomeras [N1 – N3], ir tarp gelių, kurių gamyboje kaip pagrindinė gelifikuojanti medžiaga naudojama metilceliuliozė [N4 – N9].



1 pav. Veikliųjų junginių atpalaidavimo iš gelių su vaistinių melisų ekstraktu kinetika
Fig. 1. The results of *in vitro* release study for the release of the active compounds from gels

Išvados

1. Pagaminti stabilūs, vienalytiški, tinkamo odai pH, nuo gelsvos iki rusvos spalvos geliai, kuriuose įterpta natūrali veiklioji medžiaga – skystasis vaistinių melisų ekstraktas.

2. Parinktas gelifikantas turi įtakos pagamintų gelių kokybei. Veikliųjų junginių atpalaidavimo tyrimo *in vitro* rezultatai parodė, jog gelifikuojanti medžiaga metilceliuliozė sulėtina veikliųjų junginių atspalaidavimą, lyginant su karbomeru. Karbomeras yra tinkamesnis hidrofilinių gelių suformulavimui su skystuoju vaistinių melisų ekstraktu.

Literatūra

1. British Herbal Medicine Association. British Herbal Compendium. Vol. 2. 2006; p. 276-282.
2. European Pharmacopoeia 7th ed. Council of Europe. Strasbourg; 2013.

3. JANG A.H., KIM T.H., KIM G.D., KIM J.E., KIM H.J., KIM S.S., JIN J.H., PARK J.S., PARK C.S. Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *International Immunopharmacology* 11 (2011), p. 1271–1277.
4. LEE J., JUNG E., KOH J., KIM J.S., PARK D. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *Journal of Dermatology* 2008; 35: p. 768–771.
5. ONDREJOVIČ M., KRAIC F., BENKOVIČOVA H., ŠILHAR S. Optimisation of antioxidant extraction from Lemon balm. *Czech Journal of Food Sciences*. Vol. 30, 2012, No.4: p. 385 – 393.
6. PETERSEN M., SIMMONDS M.S.J. Molecules of interest: Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62:2003, p. 121–12
7. RAMANAUSKIENĖ K., ŽILIUS M., BRIEDIS V. Rheological and biopharmaceutical studies of the experimental propolis semisolid preparations. *Medicinos teorija ir praktika* 2012 - T. 18 (Nr. 2), p. 181–188.
8. VEJDANI R., REZA H., SHALMANI M., MIR-FATTAHI M., SAJED-NIA F., ABDOLLAHI M., ZALI M.R., HOUSHANG A., ALIZADE M., BAHARI A., AMIN G. The Efficacy of an Herbal Medicine, Carmin, on the Relief of Abdominal Pain and Bloating in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Pilot Study. *Digestive Diseases and Sciences* (2006) 51: p.1501–1507.

Indrė Čizaitė, Kristina Ramanauskienė, Modestas Žilius, Vytis Čizinauskas, Vitalis Briedis

Modeling and comparative evaluation of topical semisolid formulations containing lemon balm (*Melissa Officinalis* L.) extract**Summary**

Topical steroids are currently the main pharmaceuticals used in treatment of atopic dermatitis, although they are associated with potential side effects such as depigmentation and enlarged blood vessels. To avoid these side effects, natural substance like lemon balm liquid extract could be used in topical formulations for the treatment of this inflammatory disease. The aim of this study is to evaluate the quality (pH, dynamic viscosity, release of active compounds *in vitro*) of modeled semisolid dosage forms containing lemon balm liquid extract. The active compounds release is analyzed by *in vitro* release studies, during which the total polyphenols content is determined by the Folin – Ciocalteu method and the absorbance of the reaction mixture is measured at 765 nm using the spectrophotometer. Nine different hydrogel compositions with active ingredient in the form of liquid extract were produced. The gels of lemon balm are from light yellow to brown colour with a viscosity of $\geq 0.01 \pm 0.04$ Pa·s, a pH value of 6.14 to 7.9. The highest amount of the active compounds is released from carbopol gels after 6 h from the beginning of the study. *In vitro* release studies revealed that the more appropriate semisolid dosage form for *Melissa Officinalis* (L.) extract, based on the highest amount of released active compounds, is hydrogels containing carbopol as a gel's matrix.

Lemon balm, gels, release of compounds

Gauta 2015 m. kovo mėn., atiduota spaudai 2015 m. balandžio mėn.

Indrė ČIZAITĖ. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto biomedicinos (farmacijos) mokslų, studentė.

Adresas: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: indre.cizaitė@gmail.com.

Indrė CIZAITĖ. Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Pharmacy, Biomedical Sciences (Pharmacy), student.

Address: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: indre.cizaitė@gmail.com.

Kristina RAMANAUSKIENĖ. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto biomedicinos (farmacijos) mokslų daktaras, profesorė. Adresas: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: kristinaraman@gmail.com.

Kristina RAMANAUSKIENE. Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Pharmacy, Biomedical Sciences (Pharmacy), PhD, Professor. Address: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: kristinaraman@gmail.com.

Modestas ŽILIUS. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto biomedicinos (farmacijos) mokslų daktaras. Adresas: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: Modestas.Zilius@lsmuni.lt.

Modestas ZILIUS. Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Pharmacy, Biomedical Sciences (Pharmacy), PhD. Address: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: Modestas.Zilius@lsmuni.lt.

Vytis ČIZINAUSKAS. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto biomedicinos (farmacijos) mokslų doktorantas, asistentė. Adresas: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: Vytis.cizinauskas@lsmuni.lt

Vytis CIZINAUSKAS. Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Pharmacy, Biomedical Sciences (Pharmacy), PhD student, Assistant. Address: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: Vytis.cizinauskas@lsmuni.lt

Vitalis BRIEDIS. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto biomedicinos (farmacijos) mokslų daktaras, profesorius. Adresas: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: Vitalis.Briedis@lsmuni.lt.

Vitalis BRIEDIS. Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Pharmacy, Biomedical Sciences (Pharmacy), PhD, Professor. Address: Eivenių 4, Kaunas Tel. (8 37) 32 72 90, el. paštas: Vitalis.Briedis@lsmuni.lt