

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Фармацевтичний факультет

Спеціальність – 226 «Фармація, Промислова фармація»

Кафедра хімії ліків та лікарської токсикології

Допущено до захисту
Протокол засідання кафедри
№ _____ від “ _____ ” 2022р.

Завідувачка кафедри
хімії ліків та лікарської
токсикології
докторка медичних наук,
професорка, заслужена діячка
науки і техніки України
Ніженковська І. В.

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

**Розробка та валідація методів визначення нікотинаміду у кремах
методом спектрофотометрії**

Виконала: студентка 5-го курсу, групи
8802 фармацевтичного факультету

Малиш Вікторія Євгенівна

Науковий керівник:

Доцентка кафедри
фармацевтичної, біологічної та
токсикологічної хімії, кандидатка
хімічних наук,

Афанасенко Ольга Вікторівна

Київ – 2023

Зміст

Зміст.....	2
Список умовних скорочень	4
ВСТУП.....	5
Розділ 1: Огляд літератури	7
1.1. Характеристика компонентів. Їхні фармакологічні властивості та застосування.	7
1.1.1. Нікотинамід	7
1.1.2. Саліцилова кислота.....	10
1.1.3. Алантоїн	14
1.1.4. Камфора рацемічна	16
1.2. Характеристика нікотинаміду. Методи ідентифікації: фармакопейні та нефармакопейні.....	17
1.2.1. Фармакопейні методи визначення	18
1.2.2. Нефармакопейні методи визначення	21
1.3. Валідація.....	25
1.3.1. Валідація процесу.....	25
1.3.2. Валідація аналітичної методики.....	26
Розділ 2: Експериментальна частина.....	31
2.1. Реактиви та матеріали:	31
2.2. Прилади та обладнання:	31
2.3 Приготування розчинів.....	31
2.3.1. Приготування розчинів речовин для дослідження спектра поглинання:.....	31

2.3.2. Приготування розчинів для дослідження лінійності:	32
2.3.3. Приготування розчинів для дослідження специфічності	32
2.3.4. Приготування крему для дослідження оптичної густини, збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності	33
2.4. Визначення оптичного поглинання для речовин	35
2.5. Визначення оптичного поглинання для лікарської форми:	37
2.6. Валідація методики	38
2.6.1. Лінійність	38
2.6.2. Специфічність	42
2.6.3. Збіжність і внутрішньолабораторна прецизійність.....	43
2.6.4. Правильність.....	45
2.6.5. Діапазон застосування.....	45
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	47

Список умовних скорочень

AQP3 – аквапорин-3

IFN- γ – інтерферон-гама

IL-1 – інтерлейкін-1

IL-6 - інтерлейкін-6

IL-8 - інтерлейкін-8

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

NF- κ B – nuclear factor kappa B (ядерний транскрипційний фактор капа B)

ROS – reactive oxygen species (реактивні види кисню)

RSD - відносне стандартне відхилення

SD – стандартне відхилення

SIRT-1 – сиртуїн-1

TNF- α – tumor necrosis factor α (фактор некрозу пухлини α)

TRPA1 - transient receptor potential cation channel A – 1

TRPV1 – transient receptor potential cation channel V – 1

АТФ - аденозинтрифосфат

ВПЛ (HPV) – human papillomavirus (вірус папіломи людини)

ГХА – газово-хроматографічний аналіз

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид

НАДФ – нікотинамідаденіндинукдеотид фосфат

Нуклеотид С – цитозиновий нуклеотид

Нуклеотид Т – тиміновий нуклеотид

ПАРП-1 – полі(АДФ-рибозо)полімераза-1

ЯМР – ядерний магнітний резонанс

ВСТУП

Шкіра є одним із найбільш вразливих органів людського організму, оскільки щоденно зазнає негативного впливу факторами зовнішнього середовища, тому важливо забезпечити її належний догляд та захист. Нікотинамід, або як він ще відомий ніацинамід, є одним із ключових інгредієнтів дерматокосметичних засобів, які використовують як для щоденного догляду за шкірою обличчя та тіла, так і з лікувальною метою для великої кількості шкірних захворювань у складі багатокомпонентних засобів. Його використання є дуже поширеним, оскільки він має науково обґрунтовані фармакологічні властивості, має високу стійкість у складі різних лікарських форм, оскільки залишається стабільним під впливом світла, тепла та тривалого часу зберігання, тому нікотинамід є привабливим для виробників дерматокосметологічних засобів, які мають змогу створювати доступні продукти, що мають високу ефективність.

Таке часте використання нікотинаміду у дерматокосметичних засобах також пояснюється багатофункціональністю його властивостей та низькою токсичністю. Варто зазначити, що в останні кілька років нікотинамід став частіше зустрічатися як інгредієнт у засобах з SPF захистом, оскільки було доведена його властивість захищати геном від мутацій, що можуть бути викликані УФ-випромінюванням. Нікотинамід також зустрічається в складі регенеративних кремів, проте його частка тут менше ніж у сонцезахисних засобах. Використання його зумовлене здатністю до вироблення колагену та еластину, що сприяє відновленню тканин. Хоча регенеративні креми з нікотинамідом не є основним засобом догляду за шкірою, вони можуть бути корисними як додатковий засіб для відновлення тканин після травм та опіків. В залежності від конкретного продукту, концентрація нікотинаміду може коливатися від 2% до 10% або більше, однак, важливо врахувати, що ефективність такого крему залежить від вмісту не тільки нікотинаміду, але і від інших інгредієнтів, що містяться у його складі.

Розробка та валідація методів визначення нікотинаміду у кремах методом спектрофотометрії є актуальною проблемою під час виробництва зовнішніх лікарських форм, до складу яких крім нікотинаміду, ще входять активні речовини.

Об'єкт дослідження: Лікарська речовина нікотинамід (ніацинамід), похідний піридинів, в якому водень у положенні 3 заміщений на карбоксамідну групу.

Предмет дослідження: Розробка науково обґрунтованих спектрофотометричних методів визначення нікотинаміду у м'яких лікарських формах, а точніше у кремі.

Мета: Розробка спектрофотометричних методів визначення нікотинаміду у кремі та валідація цих методів.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо фармакологічних властивостей та використання у дерматокосметології нікотинаміду та інших компонентів, що входять до складу крему.
2. Експериментально розробити та дослідити методику спектрофотометричної ідентифікації нікотинаміду в багатокомпонентній зовнішній лікарській формі кремі.
3. На основі розробленої методики, провести валідацію для доказу її практичної придатності та правильності.

Розділ 1: Огляд літератури

1.1. Характеристика компонентів. Їхні фармакологічні властивості та застосування.

1.1.1. Нікотинамід

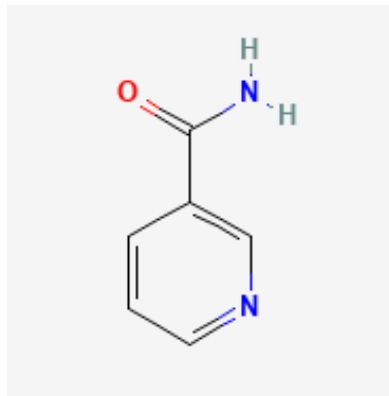


Рис 1. Формула нікотинаміду.

Ніацинамід, амід нікотинової кислоти та вітамін В3 – це все назви під якими відомий нікотинамід у світі. Дослідники характеризують нікотинамід, як водорозчинну амідну форму вітаміну В3 [71]. У літературі він відомий, як первинний попередник коферменту НАД (нікотинамідаденіндинуклеотид) та його фосфатного похідного НАДФ (нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат), які є коферментами ферментів класу оксидоредуктаз, що приймають участь в процесах біологічного окиснення, синтезу ліпідів, жирних кислот та ще близько 40 біохімічних реакціях. [54].

Нікотинамід може синтезуватися в організмі людини двома шляхами [82], але значна його частина надходить із зовнішнього середовища, тобто у складі продуктів харчування, таких як: молочні продукти, дріжджі, багато видів м'яса, горіхи, квасоля, кава, чай [74]. До першого шляху синтезу нікотинаміду в організмі людини належить його утворення з триптофану у кілька етапів [82]. На першому етапі відбувається конвертація триптофану до кінуреніну (фермент реакції – 2,3-діоксигеназа), на наступному етапі кінуренін перетворюється на антранілову кислоту (фермент реакції – кінуренінгідроксилаза). Після цього антранілова кислота перетворюється до кінуреніну і утворює квінолінінову кислоту, яка у свою чергу за допомогою

ферменту квінолінінової оксиредуктази перетворюється до ніотинової кислоти. Заключним етапом є перетворення ніотинової кислоти до ніотинаміду за допомогою ферменту амідази ніотинової кислоти [26]. Другим шляхом синтезу ніотинаміду є пряме перетворення ніотинової кислоти, що надходить у складі їжі, під дією ферменту, що згадувався вище [69].

Значна частина дослідників використовують ніотинамід у комплексному лікуванні багатьох захворювань, зокрема він цінний активний фармацевтичний інгредієнт у лікарських формах зовнішнього використання. Особлива увага направлена до його використання в складі кремів для обличчя та тіла для щоденного користування або у складі комплексного багатоетапного догляду за обличчям, коли після етапу агресивних і концентрованих засобів, коли потрібно відновити шкіру та захистити її від дії ультрафіолетового випромінювання.

Починаючи з кінця ХХ століття, науковці активно займалися дослідженнями, які були спрямовані на доведення фотозахисних та антиканцерогенних властивостей ніотинаміду, для доведення його позитивних ефектів у комплексному лікуванні раку шкіри, оскільки середньорічний темп приросту захворюваності на рак шкіри у світі становить близько 5% і вважається одним із найвищих показників серед усіх ракових захворювань. [1]. Механізм перетворення соматичних клітин в ракові включає в себе генні мутації та заміни в ДНК піримідинів, тобто пряме пошкодження клітинної ДНК, [23] інгібування протипухлинного імунітету, [8] стимуляція місцевих запальних процесів шкіри та інгібування репарації ДНК в кераноцитах людини. [70] Внаслідок прямого ушкодження ДНК в кераноцитах людини, утворюються циклобутан піримідинові димери (CPDs) і піримідин. [65] Як наслідок виникають мутації – перехід С (цитозинівий нуклеотид) в Т (тиміновий нуклеотид) або ще у варіації СС – ТТ. Такі мутації можуть викликати зміну гена p43 [30] та утворення злжкісних пухлин шкіри. Ще одним доказом канцерогенної дії УФ-випромінювання є те, що

ультрафіолетове випромінювання є каталізатором утворення протизапальних цитокінів (IL-1, IL-6, IL-8, IFN-у, гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (C-GSF), макрофагного загального білку (MIP-β), які мають здатність викликати запалення та апоптоз клітини. [7]

Основна функція нікотинаміду у забезпеченні стабільності геному – це забезпечення енергією ПАРП-1 та створення енергетичного клітинного резерву АТФ [46]. Дослідження, яке було проведено в 2010 році на культивованих кераноцитах людини вказувало на те, що УФ-випромінювання виснажує НАД⁺, який є коферментом ферменту, який забезпечує виробництво АТФ. [54]. Зниження механізмів репарації ДНК пояснюється тим, що ультрафіолетове випромінювання активує полі-АДФ-рибозополімерази-1 (ПАРП-1). [74] Це фермент ядра еукаріотичної клітини, який виявляє пошкодження ДНК, зв'язується з одноланцюговим або дволанцюговим розривом ДНК та використовує НАД⁺, для утворення нікотинаміду і АДФ-рибози для репарації молекули ДНК [54]. ПАРП-1 є частиною структури хроматину ДНК, тому має здатність запобігати випадковій транскрипції і підтримує компактну структуру хроматину. [47] Механізм дії ПАРП-1 полягає у тому, ПАРП-1 блокує утворення НАД⁺ гліколітичним шляхом і тим самим зменшує енергетичні запаси клітини [74].

Серед різних методів лікування, що зараз використовується для покращення симптомів atopічного дерматиту, одним із найкращих вважається нікотинамід. Атопічний дерматит – це шкірне захворювання, що характеризується зниженням рівня керамідів, збільшенням трансепідермальної втрати води та збільшення рівня запальних цитокінів, як наслідок порушенням шкірного бар'єру. [35] На площі ураження atopічним дерматитом відбувається посилена регуляція аквапорину 3 (AQP3), який кодує водні канали, це призводить до посиленої втрати води. Нікотинамід стимулює експресію білків каналів AQP3, завдяки чому зменшує втрату води шкірою. [20] Також він зменшує рівень запальних цитокінів та посилює вироблення захисних функцій шкіри, таких як колаген та філагрин. [7]

Нікотинамід привертає увагу дослідників як перспективний антивіковий продукт, така популярність обґрунтована доволі потужною науковою базою, яка доводить позитивні властивості нікотинамід у старіючу шкіру. Антивіковий ефект нікотинамід забезпечується тим, що він має здатність зменшувати підвищений рівень глікоамідглікозидів (AGEs) у шкірі. [49] AGEs утворюється внаслідок взаємодії вільних амінокислот з вуглеводневими структурами, які надходять в організм людини разом з продуктами харчування або утворюються в організмі при гіперглікемії. [14] Нікотинамід зменшує рівень AGEs у шкірі за рахунок двох механізмів: зниження вироблення реактивних видів кисню (ROS), за рахунок активації ферментів супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази, які беруть участь у захисті клітин від окиснювального стресу. [44] Другий механізм - стимулювання активності SIRT-1, ферменту, який видаляє AGEs з організму [73], завдяки тому, що нікотинамід є первинним попередником коферменту NAD, а NAD в свою чергу є коферментом ферменту SIRT-1. [63] До властивостей нікотинамід, що захищають від старіння шкіри також відноситься те, що він збільшує вироблення епідермальних білків: кератину, філагрину та інволюкрину. [64] Механізм впливу на ці білки пов'язаний із зниженням активації сигнального шляху NF-κB, що інактивує експресію генів, які кодують ці білки. Варто також згадати, що нікотинамід, як попередник коферментів НАД та НАДФ, може зупинити розпад мітохондрій в клітинах за рахунок підвищеного рівня НАД⁺ в організмі [9].

1.1.2. Саліцилова кислота

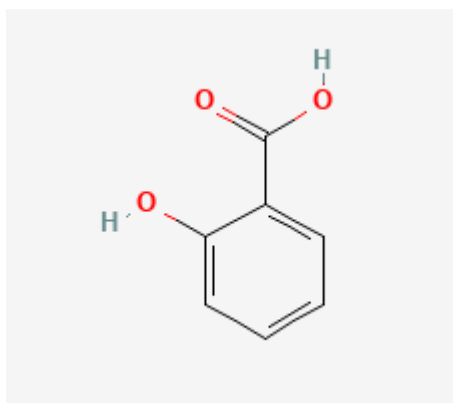


Рис 2. Формула саліцилової кислоти.

В останні десятиліття саліцилова кислота широко використовується в дерматології як один із найбільш ефективних та безпечних засобів для лікування різноманітних дерматологічних захворювань. Використання саліцилової кислоти в дерматології є досить поширеним та підтвердженим багатьма науковими дослідженнями та клінічними випробуваннями. При використанні її, як активного фармацевтичного інгредієнта, у засобах для зовнішнього користування можна досягти високої ефективності при лікуванні дерматологічних захворювань, при цьому практично без побічних ефектів.

Саліцилова кислота є найпоширенішою та найбільш вивченою з відомих на сьогодні кератолітичних сполук. У здоровому стані ороговілі клітини епідермісу утворюють шар, який складається з мертвих клітин, що розташовані дуже компактно, запобігаючи проникненню бактерій та інших речовин у глибинні шари шкіри. [46]. Механізм кератолітичної дії полягає у тому, що саліцилова кислота зменшує силу адгезії між ороговілими клітинами епідермісу і запускає процес їх відшарування та ексфоціації [32]. Процес адгезії відбувається, коли саліцилова кислота взаємодіє з протеїнами, що забезпечують міцність зв'язку, як наслідок забезпечують відлучення ороговілих клітин. [40] Ексфолювання - це природній процес безперервного видалення ороговілих часток від поверхні шкіри [62]. Механізм дії саліцилової кислоти при цьому полягає у руйнуванні зв'язків на поверхні шкіри і полегшення видалення пігментованого старого шару клітин [84]. Також вона підвищує швидкість обміну речовин в шкірі та знижує синтез кератину в клітинах шкіри [32].

Крім кератолітичних властивостей, саліцилова кислота має протизапальну дію та здатна зменшувати почервоніння та запалення. Ці властивості роблять її однією із перших засобів для лікування шкірних захворювань, що супроводжуються почервоніннями, такими як: розацеа, себорейний дерматит та інші. [45] Це можливо завдяки її властивості знижувати вироблення цитокінів, таких як інтерлейкін-1 (IL-1), інтерлейкін-2

(IL-2) та тумор некрозного фактору альфа (TNF- α), які є медіаторами запалення в організмі [39]. Це відбувається внаслідок інгібування активації NF-каппа-B та блокування сигнальних шляхів [4], внаслідок цього зменшується запальний процес при різних дерматологічних захворюваннях.

Саліцилова кислота проявляє антибактеріальну властивість проти різноманітних мікроорганізмів, зокрема стрептококів та стафілококів. [83] В основу її антибактеріальної дії покладена властивість знижувати рН шкіри і при цьому створювати умови для зменшення життєдіяльності бактерій. Також за рахунок зниження рН, знижується продукція шкірного сала, яка є сприятливим середовищем для розмноження та існування бактерій [21]. Також зниженням рН шкіри пояснюють антифунгальну дію саліцилової кислоти. Оскільки рН шкіри стає більш лужним, то це дестабілізує мембрани грибів та порушує синтез ергостеролу (складова мембрани грибів) і призводить до порушення їхнього життєвого циклу і загибелі [75]. Таким чином, використання саліцилової кислоти в зовнішніх лікарських формах є ефективним методом лікування бактеріальних і грибкових інфекцій шкіри.

Станом на сьогодні акне або вугровий висип є однією із найпоширеніших дерматологічних проблем у світі, особливо у підлітків. Він спричинений запаленням волосяних фолікулів, які розташовуються в шкірі обличчя, спині та грудях, проявляється комедонами, папулами, вузлами та пустулами. [81] Саліцилова кислота є ефективним засобом для лікування вугрового висипу, може використовуватися в складі комплексної терапії та монотерапії [48]. Лікарські косметичні засоби, у складі яких міститься саліцилова кислота, можуть бути у різних формах: креми, пілінги, пудри. Доволі ефективними є пілінги з саліциловою кислотою, вони мають здатність пом'якшувати роговий шар шкіри за рахунок розпушення внутрішньоклітинного матриксу та розриву зв'язків між роговими клітинами шкіри [42]. Когезія епідермальних клітин у шкірі залежить від наявності в них десмосом, це клітинні включення, які багаті на вміст білків, особливо десмоглеїнів. Оскільки саліцилова кислота відноситься до органічних кислот,

то має здатність екстрагувати десмосомальні білки, та як наслідок зменшувати когезію клітин епідермісу та провокувати її лущення [55].

Саліцилову кислоту використовують для лікування веррукозних пустул [76], оскільки механізм її дії полягає у тому, що вона проникає у епідерміс і розкладає білки, що утворюють верхню частину пустули [29]. Таким чином відбувається відлущування верхнього шару пустули та зменшення вмісту білка кератина у верхніх шарах епідерміса, внаслідок цього після видалення бородавок шкіра швидше регенерує [76]. Наукові дослідження показали, що саліцилова кислота може мати противірусні властивості. Окремі дослідження показали, що вона може унеможливити розмноження вірусу ВПЛ (HPV) у клітинах епідермісу [24], що робить її одним із можливих засобів для лікування. Проте, саліцилова кислота не є універсальним засобом для боротьби з веррукозними пустулами, особливо у випадках, коли зона ураження пустулами займає велику площу шкіри або має глибокі корені. [19]

Себорейний дерматит є однією із найбільш поширених шкірних проблем, яка супроводжується запаленням і лущенням шкіри. [77] Лікування цього захворювання доволі складне, оскільки його механізми розвитку та причини утворення досі не повністю зрозумілі. Саліцилова кислота є одним із засобів для лікування себорейного дерматиту. [81] Зазвичай використовують місцеві препарати у формі гелів, кремів із саліциловою кислотою у концентрації 2-5%, які можна наносити на місця запалення [61]. Завдяки своїм кератолітичним властивостям саліцилова кислота зменшує згущення шкірного сала і забезпечує засвоєння інших терапевтичних засобів. Також саліцилова кислота буде покращувати симптоми себорейного дерматиту, такі як лущення, свербіж і почервоніння, завдяки її протизапальній дії [81]. Саліцилова кислота ефективна при лікуванні псоріазу, оскільки має властивість відлущувати зроговілі сухі пластинки шкіри [15], та зменшувати запалення шкіри, що характерне для псоріазу [28].

Відомо, що саліцилову кислоту використовують для лікування рідкісного захворювання – іхтіоз [56], який є групою генетичних захворювань,

характерним симптомом яких є суха, шорстка шкіра з різноманітними формами лускатості [56]. Основна мета терапії – покращення бар'єрної функції шкіри шляхом посилення гідратації та кератолітичної дії, для зменшення сухості та лущення. Саліцилову кислоту додають до комплексного лікування цього захворювання, оскільки дія саліцилової кислоти полягає в зменшенні загрубіння і розм'якшенні шкіри, що дозволяє покращити її зовнішній вигляд та стан [70]. Крім того, саліцилова кислота має протизапальні властивості, що допомагає зменшити запалення та свербіж, які можуть супроводжувати іхтіоз [39].

1.1.3. Алантоїн

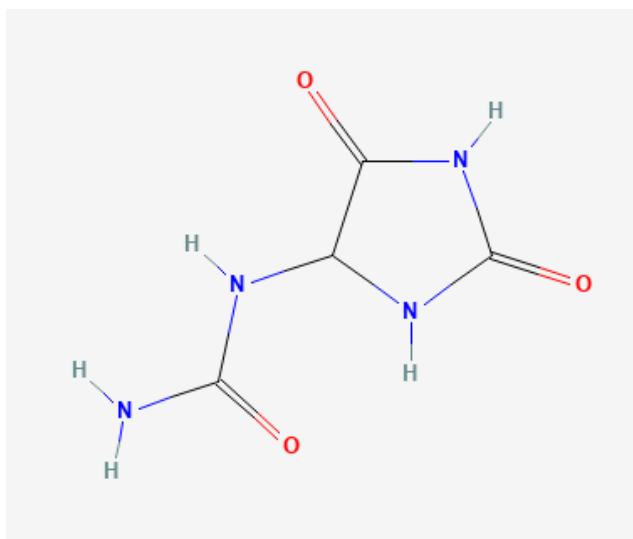


Рис 3. Формула алантоїну.

Алантоїн є природньою сполукою, що входить до складу багатьох рослин, таких як алое, кукурудза, шавлія та інші. [31] Ця речовина часто цитується в літературі як засіб для покращення стану шкіри, зокрема він застосовується при запаленнях, роздратуваннях, різних видів дерматитах та інших захворюваннях [84], зокрема він також може бути ефективний при лікуванні псоріазу та екземи. [33]

Алантоїн традиційно використовується у дерматології завдяки своїй здатності збільшувати гідратацію шкіри, що пов'язують з його властивістю запобігати втраті вологи та затримання її у шкірі. Механізм дії пов'язаний із здатністю алантоїну зв'язувати воду в шарах шкіри, утворюючи гелеподібну

структуру та стимулювання синтезу ліпідів, які є складовою захисного ліпідного бар'єра шкіри [38].

Алантаїн здатен стимулювати регенерацію шкіри [84] завдяки здатності збільшувати вироблення гіалуронової кислоти. Є кілька механізмів, які це пояснюють. Перший, алантаїн може активувати фібробласти (клітини, які мають здатність виробляти колаген та складові екстрацелюлярної матриці шкіри), завдяки наявності на їхній клітинній стінці спеціальних рецепторів, які мають здатність реагувати на алантаїн і активуватися [27]. Другий механізм пов'язаний з тим, що алантаїн може активізувати синтез гіалуронової кислоти в клітинах епідермісу за рахунок взаємодії алантаїну з гіалуронсинтазами (фермент, що забезпечує синтез гіалуронової кислоти) [68]. Стимулювати регенерацію шкіри алантаїн, в тому числі, може за рахунок зменшення запалення, через інгібування утворення проміжних цитокінів, таких як TNF- α , IL-6 та IL-8 [25]. Здатність алантаїну впливати на вироблення цитокінів пояснюється на можливість зниження оксидативного стресу в клітинах [5]. Він може знижувати продукцію вільних радикалів та активацію NF- κ B, внаслідок цього знижується продукція запальних цитокінів [60]. Алантаїн взаємодіє з фібробластами шкіри, які відповідають за вироблення колагену та активує та стимулює їх проліферацію та диференціацію. Також він активує сигнальні шляхи, що забезпечують синтез колагену в клітинах шкіри, в основному діє на шляхи фосфатидилінозитол-3-кінази / протеїнкіназа B (PI3K / Akt) [13].

Алантаїн є потужним антиоксидантом і має здатність нейтралізувати окислюючі речовини і вільні радикали, що знаходяться в клітинах шкіри [25]. Крім цього, він зменшує утворення окислених жирних кислот та перекисних ліпідів, як мають здатність загострювати пошкодження клітин та їх запалення [60]. Відома здатність алантаїну стимулювати синтез власного антиоксиданта – глутатіону [50]. Алантаїн активує фактор Nrf2, який є транскрипційним фактором ядра клітини і впливає на експресію генів антиоксидантів та протизапальних факторів. Внаслідок активації цього фактора відбувається посилення експресії глутатіону та антиоксидантів, за рахунок чого

посилюється захист клітин від пошкоджень та зменшуються окиснювальні впливи всередині клітин [60].

1.1.4. Камфора рацемічна

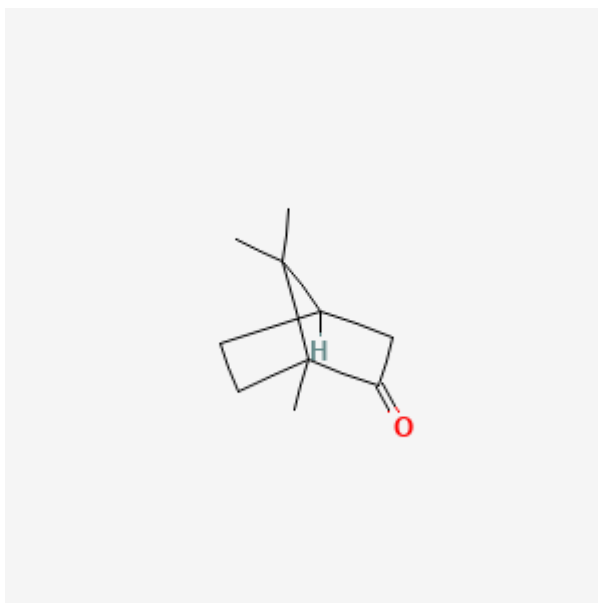


Рис 4. Формула камфори рацемічної.

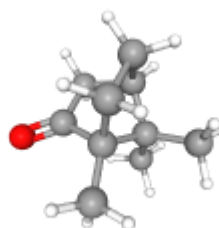


Рис 5. 3D структура камфори рацемічної.

Камфора рацемічна є одним зі складових багатьох традиційних препаратів, які використовуються в дерматології для лікування різних захворювань шкіри. Концентрації камфори рацемічної в косметичних та лікувальних засобах можуть варіюватися в залежності від типу продукту та його призначення. Зазвичай, для косметичних цілей камфору використовують у концентрації 0,5-3%. У лікувальних засобах, таких як мазі та гелі для зовнішнього застосування, концентрація камфори може бути значно вищою - до 20% .

Протизапальні властивості камфори вже давно використовуються в китайській народній медицині та мають наукове підтвердження численними

дослідженнями. Ці дослідження показали, що камфора може взаємодіяти з різними молекулярними мішенями, зокрема з рецепторами TRPV1 та TRPA1, шляхом активації TRPV1, який при цьому буде зазнавати десенсибілізації, ті інгібуванням TRPA1 [34], що забезпечують сприйняття болю та запальних процесів в тканинах [10]. Крім того, камфора може зменшувати продукцію протизапальних цитокінів, таких як інтерлейкін-1 β та інтерлейкін-6 [22].

Камфора рацемічна має антисептичні властивості та діє проти різноманітних бактерій та грибків, зокрема *Staphylococcus aureus* [12], *Escherichia coli*, *Candida albicans* та *Trichophyton mentagrophytes*. Камфора рацемічна має доведену антифунгальну активність проти різних видів грибків, таких як *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* та *Candida albicans* [2]. Вона може бути використана в лікуванні грибкових інфекцій шкіри, таких як дерматофітози, павутина і користувальницький дерматит. Механізм антифунгальної дії камфори рацемічної ще не повністю з'ясований, але відомо, що вона може порушувати мембрани грибів та сприяти їх руйнуванню. Крім того, вона може зменшувати вироблення грибами ензимів, необхідних для їх життєдіяльності [2]. Камфора рацемічна має протисвербіжну дію, що може бути корисною в лікуванні різних захворювань шкіри, які супроводжуються свербінням, таких як екзема, контактний дерматит, уртикарія та інші [79]. Механізм протисвербіжної дії камфори рацемічної пов'язаний з її здатністю стимулювати рецептори холоду на поверхні шкіри, що допомагає зменшити відчуття свербіжу. Крім того, камфора має здатність зменшувати запалення та інфекцію на поверхні шкіри, що також може знизити відчуття свербіжу [34].

1.2. Характеристика нікотинаміду. Методи ідентифікації: фармакопейні та нефармакопейні.

Нікотинамід (ніацінамід) – це похідне піридину, у якому водень у положенні 3 заміщений на карбоксамідну групу. Він є активною формою вітаміну B₃ і компонентом коферменту нікотинамідаденідинуклеотиду (НАД).

Назва зв IUPAC – піридин-3-карбоксамід

Молекулярна формула (брутто-формула)

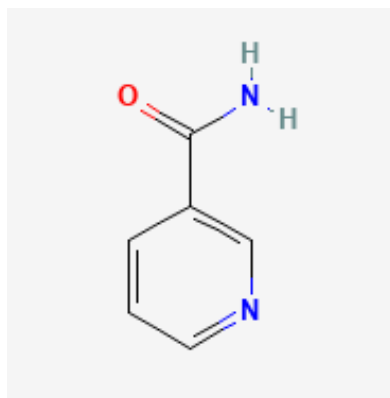
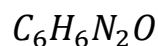


Рис 5. Формула нікотинаміду.

Фізичні властивості

Нікотинамід – це білий порошок, може бути у формі голчастих кристалів, без запаху, має гіркий смак.[59] Температура кипіння 157°С при тиску 0,67 Па, діапазон сублімації - 80 - 100°С. [3] Дуже добре розчиняється у воді (в 1 мл води повністю розчиняється 1 г речовини), добре розчинний у спирті (в 1,5 мл спирті розчиняється 1 г речовини), розчинний у гліцерині (у 10 мл 1 г речовини), розчинний також в бутанолі та хлороформі. [52]

1.2.1. Фармакопейні методи визначення

Згідно з Державною фармакопеею України 2 видання 2 доповнення нікотинамід ідентифікують за допомогою двох ідентифікацій: першої ідентифікації, до якої відноситься А та В, та другої ідентифікації А, С, D.

При першій ідентифікації А досліджується температура плавлення. У фармакопеї України зазначено, що температура плавлення для нікотинаміду має становити від 128°С до 131°С. [52] Європейська фармакопея пропонує ті ж дані.

Інфрачервоний спектр поглинання субстанції досліджується для ідентифікації В. Інфрачервоний спектр поглинання субстанції має відповідати спектру ФСЗ нікотинаміду, тобто методика вимірювання оптичної густини на спектрофотометрі, що описана в практичній частині роботи є фармакопейною методикою.

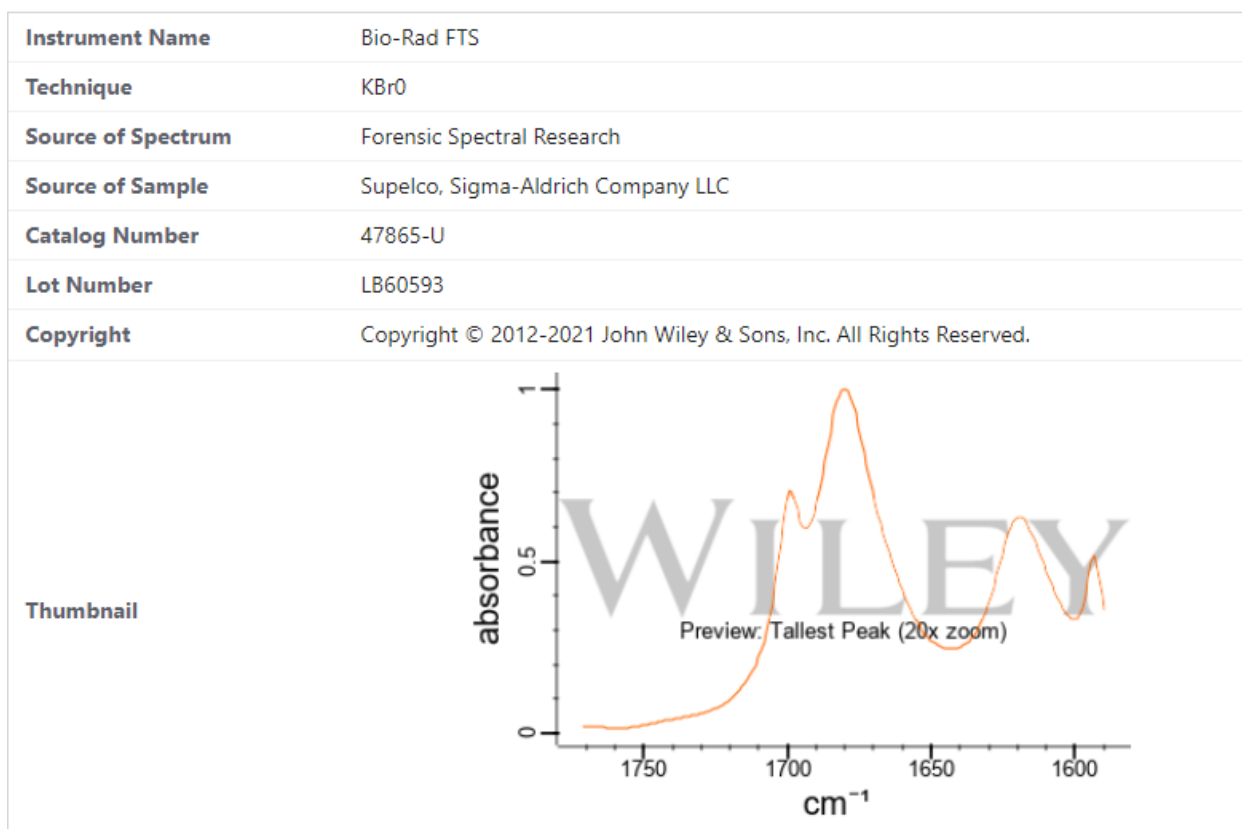
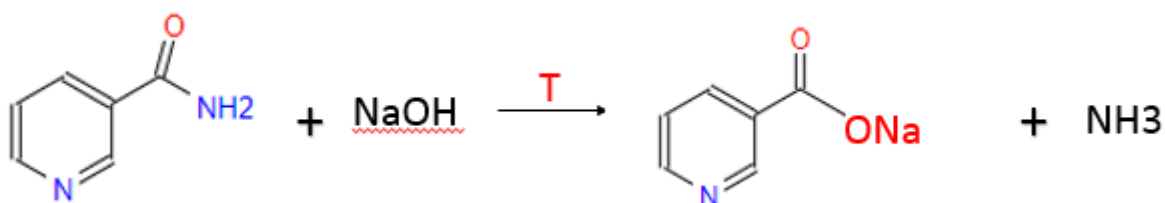


Рис. ІЧ-спектрофотометрія для Нікотинаміду [51]

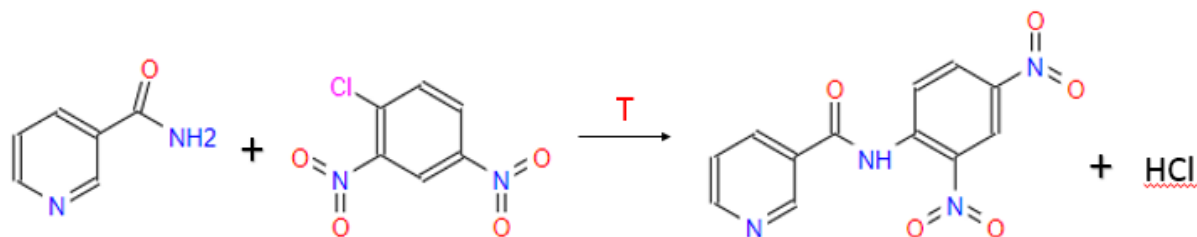
Для ідентифікації С: кип'ять субстанцію з 1 мл розчином натрію гідроксиду (*P*) та спостерігають виділення аміаку, який виявляють за своєрідним запахом.



Для ідентифікації D: 2 мл розчину S (2,5 г субстанції нікотинаміду розчинили у воді, *вільній від вуглецю діоксиду*, і довели об'єм тим самим розчинником до 50 мл) доводять *водою P* до об'єму 100 мл. До 2 мл одержаного розчину додали 2 мл *ціаноброміду розчину P* і 3 мл розчину 25 г/л *аніліну P* і струшують – з'являється жовте забарвлення.

Натомість в японській фармакопеї, на відміну від української та європейської, до методів ідентифікації ще відноситься сплавлення з 1-хлор-

2,4-динітробензолом. Після охолодження сплаву, до нього додають спиртовий розчин калію гідроксиду та спостерігають появу червоного забарвлення. [4]



Ідентифікація готових лікарських форм з ніацинамідом описана в фармакопеї США [16], де зазначено дві лікарські форми: нікотинамід в ін'єкціях та таблетках.

Фармакопейне кількісне визначення – ацидиметрія у неводному середовищі. Як титрант використовують хлорну кислоту, середовище – безводна оцтова кислота, індикатор – кристалічний фіолетовий. Методика заснована на розчиненні 0,250 г нікотинаміду у 20 мл оцтової кислоти безводної (при необхідності нагрівають та додають 5 мл оцтового ангідриду) та титрують хлорною кислотою до зеленувато-синього забарвлення (індикатор – розчин кристалічного фіолетового).

Нікотинамід в ін'єкціях – це стерильна лікарська форма, до складу якої входить нікотинамід у воді для ін'єкцій, концентрація нікотинаміду в якій не менше 95.0% і не більше 110.0. Методика ідентифікації складається з того, що спочатку розводять дану лікарську форму, у кількості еквівалентній 200 мг нікотинаміду, водою до об'єму 10 мл та додають до розчину 2.5 М розчин гідроксиду натрію, після цього випарюють на водяній бані досуха та додають 5 мл води, в якій розводили лікарську форму, та випарюють до 1 мл (під час початкового випарювання відсутній запах аміаку). Розчин нейтралізують соляною кислотою, додаючи 1 мл надлишку цієї кислоти, та залишають у холодильнику на 2 години. Розчин з холодильника фільтрують та промивають невеликими порціями крижаної води до повного звільнення від хлоридів та сушать при температурі 105 °С протягом години.

Вимірюють ІЧ-спектр (Au) поглинання дисперсії калію броміду в залишку, який має максимуми у тих самих довжинах хвиль що і ФСЗ нікотинаміду.

Методика кількісного визначення нікотинаміду у ін'єкціях складається з розведення точно відміряного розчину ін'єкції нікотинаміду, який еквівалентний кількості нікотинаміду в стандартному зразку 50 мг, водою до 500 мл у мірній колбі. Після цього, мірною піпеткою відмірюють 10 мл розчину і переносять його в колбу на 100 мл та розбавляють водою до позначки. Кількість нікотинаміду в 1 мл ін'єкції V

$$X = \left(\frac{50}{V}\right) * \left(\frac{Au}{As}\right)$$

, де

V- це об'єм ін'єкції в мл;

Au- поглинання ІЧ-спектра в досліджуваному препараті

As- поглинання ІЧ-спектра в стандарті.

Таблетки ніацинаміду містять від 90.0 до 110.0 % від зазначеної кількості нікотинаміду. Для ідентифікації ніацинаміду в таблетках в американській фармакопеї описано два методи: ІЧ- та УФ- спектроскопія. Для даних методів проводять екстрагування нікотинаміду з таблеток за допомогою двох порцій спирту до 10 мл, випарювання отриманого екстракту на водяній бані та сушінням при 80°C протягом 2 годин. Отриману речовину розчиняють у воді до кількості 20 мг/мл та проводять спектрофотометричне визначення. ІЧ-спектр 245 нм (A_{245}), УФ-спектр – 262 (A_{262}). Співвідношення A_{245}/A_{262} становить 0,63 – 0,67.

1.2.2. Нефармакопейні методи визначення

Крім фармакопейних методів ідентифікації, дослідники використовують нефармакопейні, такі як газово-хроматографічні методи [41], ЯМР-спектроскопія [36].

Метод газового-хроматографічного аналізу (ГХА) заснований на розділенні компонентів речовини у газовій фазі, застосовуючи спеціальну колонку [6]. Метод ГХА може бути використаний при ідентифікації

нікотинаміду з використання різних детекторів, таких як мас-спектрометрія або флуоресцентна детекція [57].

Методика ГХА складається з підготовки зразка: розчинення нікотинаміду воді, для цього часто використовують ультразвукову ванну [36]. Концентрація діючої речовини у зразку має коливатися в межах 0,1-100 мкг/мл. Наступним етапом є підготовка стандартних розчинів у тому ж розчиннику але у різних концентраціях. До підготовки газової-хроматографічної системи відноситься: налаштування системи з використанням колонки з вузькими порами та стаціонарною фазою, що забезпечує розділення нікотинаміду від інших сполук у зразку. Ідентифікація здійснюється за допомогою порівняння його ретенційного часу та спектрів мас-спектрофотометра із стандартними зразками [36].

Крім ГРХ, увагу дослідників все більше звертає такий вид хроматографії, як надкритична рідинна хроматографія (НРХ), яка була вперше представлена у 1962 році [17]. Описали використання НРХ у поєднанні з мас-спектрометрією для визначенні нікотинаміду у японському університеті Осаку вчені Kaori Taguchi, Eiichiro Fukusaki, and Takeshi Vamba [17]. У НКХ використовується надкритичний (субкритичний) розчин, для якого задається температура і тиск вище або поблизу критичної температури та тиску для CO₂ в рухомій фазі. Використання в НКХ даного розчину, забезпечує низьку густину і високу дифузію [85] та додатково рухома фаза може змінювати свою полярність, за рахунок зміни температури та тиску [53] або змішування інших розчинників з CO₂, завдяки чому полярність рухомої фази може бути змінена з неполярної на полярну [80]. Завдяки такій властивості НКХ можуть бути дослідженні не тільки гідрофобні сполуки, але і гідрофільні. Даний метод може бути використаний для визначення нікотинаміду як у лікарських

засобах, так і в біологічних рідинах, що має велике практичне значення.

Accession ID	MSBNK-Fac_Eng_Univ_Tokyo-JP005706
Authors	MASS SPECTROSCOPY SOC. OF JAPAN (MSSJ)
Instrument	HITACHI M-80
Instrument Type	EI-B
MS Level	MS
Ionization Mode	POSITIVE
Ionization	ENERGY 70 eV
Top 5 Peaks	122 999 106 609 78 605 51 320 50 183
SPLASH	splash10-0kor-9800000000-1809e537780b814af0c9

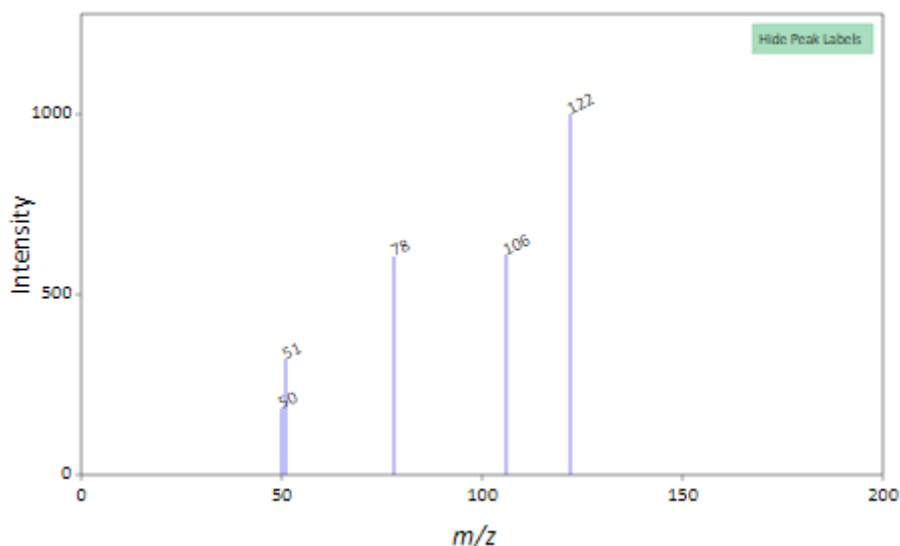


Рис. Мас-спектроскопія для нікотинаміду [20]

Методика дослідження нікотинаміду методом ЯМР починається, підготовкою речовини та розчиненням її у дейтерованому розчиннику (для нікотинаміду може бути використаний дейтерований піридин та нітробензол) [37]. Отриманий зразок занурюють в магніт спектрометра і доводиться до певної температури (можливе вимірювання при температурі від -20 до 150°C)[80] для вимірювання спектра. Після цього калібрують датчик спектрометра на реєстрацію магнітного ядра та оптимізацію магнітного поля. Основний

показник, що визначається хімічний зсув, який може відобразитися вздовж однієї частотної осі або декількох осей (багатовимірний ЯМР) [72].

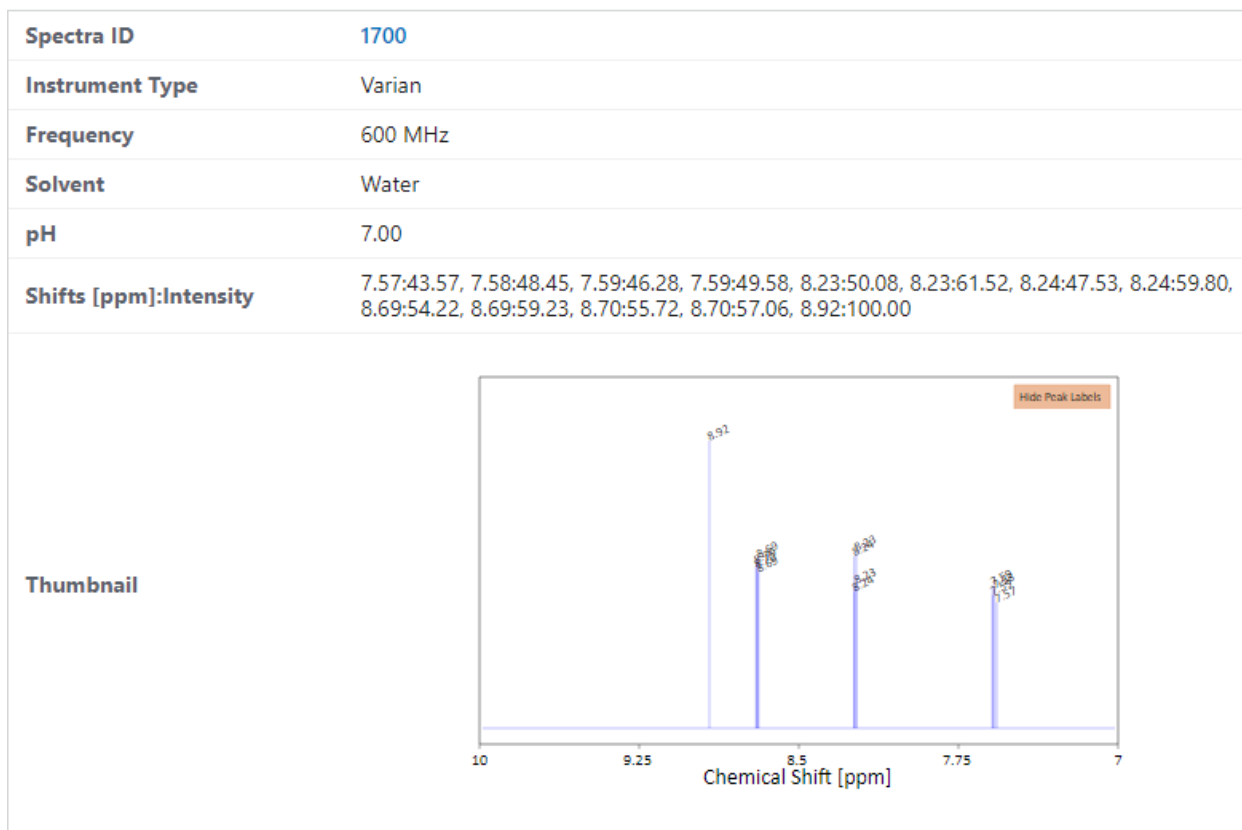


Рис. ЯМР спектр для Нікотинаміду [17]

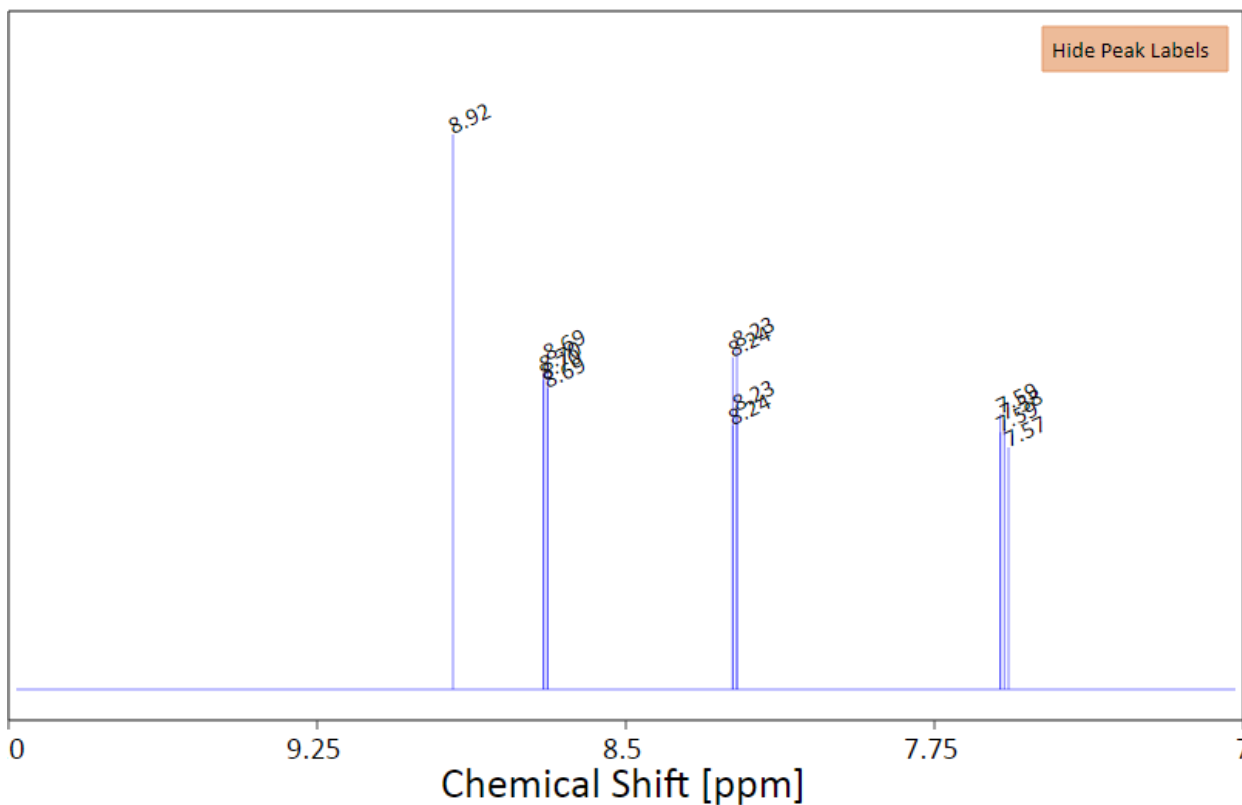


Рис. ЯМР спектр для Нікотинаміду [17]

1.3. Валідація

1.3.1. Валідація процесу

Перед тим як препарат вийде на ринок будь-якої країни, він має пройти валідацію виробничого процесу. [85] *Валідація процесу* – це задокументоване підтвердження процесу, який відбувається в межах встановлених параметрів, та є відтворювальним і приводить до отримання лікарського препарату, що відповідає специфікаціям та показникам якості. Валідацію проводять відповідно до вимог GMP та обов'язково включають у реєстраційне досьє, крім цього валідація має проводитися на кожній ділянці виробництва встановленим вимогам та додатково там зберігатися.

У реєстраційному досьє до лікарського препарату повинні міститися дані про валідацію для промислових серій. Якщо цієї інформації не має у реєстраційному досьє, то заявнику потрібно надати схему валідації процесу з мінімумом інформації:

1. Опис процесу, в якому буде зазначені критичні параметри або стадії, які необхідно контролювати під час валідації (стисло).
2. Специфікація готової продукції при випуску (посилання на відповідну частину досьє).
3. Відомості про аналітичні методики (посилання на відповідну частину досьє).
4. Критерії прийнятності та контроль у процесі виробництва.
5. Додаткові випробування, що обов'язково мають бути проведенні (разом з критеріями прийнятності, даними про валідацію аналітичних методик, не обов'язково, при необхідності).
6. План відбору проб.
7. Дані про спроби протоколювання та оцінки результатів.
8. Пропонований часовий графік.

Критичний параметр процесу – параметр процесу, всі можливі відхилення якого можуть вплинути на критичний показник якості. Критичний

параметр процесу має бути постійним об'єктом моніторингу для того, щоб забезпечити необхідну якість продукції, яка отримана в результаті процесу. [85]

Критичний показник якості – характеристика продукту (фізична, хімічна, біологічна, мікробіологічна), яка має знаходитися в певних межах або відповідному діапазоні, для забезпечення необхідної якості продукції.

Постійна верифікація процесу (постійне підтвердження) – альтернативний підхід до валідації процесу, в якому постійно оцінюють та контролюють показники виробничого процесу.

1.3.2. Валідація аналітичної методики

Валідація аналітичної методики – це доказ, який проводиться шляхом експерименту, що методика придатна до використання для розв'язання поставлених завдань. [88]

В залежності від призначення аналітичної методики, використовують набір валідаційних характеристик. До валідаційних характеристик відноситься: правильність, прецизійність (збіжність та внутрішньолабораторна прецизійність), специфічність, межа виявлення, межа кількісного визначення, лінійність та діапазон застосування. [87]

Правильність – це ступінь відповідності між справжнім значенням, яке заздалегідь відоме, або довідковою величиною та значенням, яке отримали за допомогою цієї методики. Правильність визначають у межах діапазону застосувань аналітичної методики.

Для доведення правильності субстанції використовуються такі способи:

- Застосування аналітичної методики до стандартного зразка, тобто того, що має відомий ступінь чистоти;
- Порівняння результатів аналізу, які одержані з методики, що валідується, і незалежним методом (правильність і прецизійність відомі);

- Висновок про правильність встановлюється лише при відомих результатах прецизійності, лінійності та специфічності, які були проведенні в ході валідації.

Для правильності оцінюють результати дев'яти визначень для трьох концентрацій, що охоплюють діапазон застосування, та виражають у відсотках між середнім і справжнім значенням з урахуванням відповідних довірчих інтервалів.

Прецизійність – це ступіть близькості або розкиду результатів для серії вимірювань, які виконувались за даною методикою на різних пробах того самого однорідного зразка. Дана методика використовується для кількісного визначення основної речовини та домішок. Прецизійність розглядається на трьох рівнях:

- Збіжність;
- Внутрішньолабораторна прецизійність;
- Відтворюваність.

Основними характеристиками для позначення прецизійності є дисперсія, стандартне відхилення та відносне стандартне відхилення для серії випробувань.

Збіжність – це характеристика прецизійності методики, якщо її виконують в однакових умовах та протягом невеликих проміжків часу.

Для вивчення збіжності виконують: не менше дев'яти визначень, що охоплюють діапазон застосування методики; не менше 6 визначень для зразків із вмістом аналізованої речовини, який близький до номінального.

Внутрішньолабораторна прецизійність – це характеристика внутрішньолабораторних варіацій, які будуть залежати від того, в який спосіб буде використовуватися методика. До внутрішньолабораторних варіацій належать: різні дні, різні аналітики, різне обладнання тощо.

Відтворюваність – це характеристика прецизійності у міжлабораторному експерименті. Відтворюваність визначається під час стандартизації аналітичної методики.

Межа виявлення – це мінімальна кількість аналізованої речовини у зразку, яку можна виявити. Межу виявлення визначають шляхом аналізу проб, які мають відомі значення концентрацій та мінімальним вмістом досліджуваних речовин, за яких дана речовина достовірно визначається. Дані при цьому подають разом із зазначенням способу визначення.

Межа виявлення (вираження у формулі):

$$DL = 3,3 * s/b$$

S – стандартне відхилення;

b – тангенс кута нахилу калібрувальної прямої.

Межа кількісного визначення – це мінімальна кількість аналізованої речовини у зразку, що може бути кількісно визначена з подібною правильністю і прецизійністю. В залежності від того чи є методика інструментальною чи неінструментальною, можуть використовуватись наступні підходи:

- Візуальне оцінювання – межу кількісного визначення визначають способом аналізу проб із відомими концентраціями аналізованих речовин і оцінкою мінімального вмісту цих речовин, при цьому аналізовані речовини достовірно кількісно визначені з потрібною правильністю і прецизійністю.
- Відношення «сигнал/шум» - порівняння величини сигналів, які отримані для контрольного дослідження та для проб з низькими концентраціями та встановлення мінімальної концентрації, для якої величина відношення «сигнал/шум» відповідає 10:1.
- Використання стандартного відхилення та нахилу калібрувальної прямої:

$$QL = 10 * s/b$$

S – стандартне відхилення;

b – тангенс кута нахилу калібрувальної прямої.

Лінійність – здатність методики давати величини, які прямо пропорційні кількості або концентрації аналізованої речовини у зразку. Лінійність досліджується в межах діапазону застосування та підтверджується шляхом розведення вихідного розчину до визначених концентрацій.

За кінцевими результатами досліджень будують графік залежності сигналу від кількості визначуваної речовини (або концентрації) та оцінюють візуально лінійність. При умові, якщо спостерігається лінійна залежність, результати обробляють статистичним методом (наприклад: метод найменших квадратів). Для підтвердження лінійності використовують не менше 5 концентрацій.

Діапазон застосування – інтервал між мінімальною і максимальною концентрацією аналізованої речовини у пробі, для якої встановлено, що аналітична методика має потрібну прецизійність, правильність і лінійність. Діапазон застосування залежить від призначення методики та встановлюється під час проведення лінійності.

Допустимі діапазони застосування методик (мінімальні)

- Кількісне визначення: від 80% до 120% від вмісту аналізованої речовини у вихідному розчині;
- Домішки: в залежності від межі кількісного визначення або від 50% відносно максимального припустимого вмісту кожної домішки;

Робасність – міра здатності аналітичної методики не зазнавати впливу малих контрольованих дослідником змін під час та в умовах виконання методики. Оцінювання робасності проводять під час розробки методики для доведення надійності результатів аналізу в разі невеликих змін параметрів. Умови, якими можуть впливати на методику, мають біти стандартизовані. Результатом оцінювання робасності є розробка параметрів придатності

аналітичної системи, які гарантують, що методика дає конкретні результати під час використання. [87] До параметрів, які можуть вивчати відноситься:

- Різне обладнання;
- Різні аналітики;
- Стійкість у часі зразків, що аналізуються.

Для прикладу: у рідинній хроматографії параметрами, що варіюють є:

- рН рухомої фази;
- склад рухомої фази;
- температура;
- колонки (різні серії або постачальники);
- швидкість рухомої фази.

Розділ 2: Експериментальна частина

2.1. Реактиви та матеріали:

Стандартний зразок:

- Нікотинамід ФСЗ.

Реактиви:

- Вода дистильована;
- Етанол 96%; торгова назва «Спиртол», виробник ТОВ «ФІТОФАРМ».

2.2. Прилади та обладнання:

- спектрофотометр Jenway 7315;
- аналітичні ваги Radwag AS 220/R2 (d= 0,0001 г);
- перемішувальний пристрій В-ПД-1;
- плита електрична одноконвекторна дискова RAF 1000 Вт;
- мірний посуд – мірні колби, мірні мензурки, мірні піпетки класу точності А.

2.3 Приготування розчинів

2.3.1. Приготування розчинів речовин для дослідження спектра поглинання:

1. Розчин ФСЗ нікотинаміду: відважили ФСЗ нікотинаміду кількістю 0,2 г і помістили у колбу місткістю 20 мл та довели водою очищеною до мітки 20 мл.

2. Розчин саліцилової кислоти: відважили саліцилової кислоти 0,1 г і помістили в колбу на 10 мл та довели етанолом 96% до мітки.

3. Розчин алантоїну: відважили алантоїну кількістю 0,1 г, помістили у термостійку колбу на 10 мл до довели до позначки водою очищеною та підігріли на плиті електричній до повного розчинення речовини.

4. Розчин камфори рацемічної: відважили камфори рацемічної кількістю 0,1 г, помістили в колбу на 10 мл та довели до позначки етанолом 96%.

2.3.2. Приготування розчинів для дослідження лінійності:

Для даного дослідження були обрані розчини нікотинаміну в діапазоні 80-120%.

Першим кроком було приготування стандартного розчину St: для цього зважили нікотинамід ФСЗ 12,21 мг і розчинили в 100 мл води дистильованій.

Наступним кроком – приготування розчинів в діапазоні 80-120% шляхом розведення стандартного розчину:

Розчин 1 (S1): на 100 мл 80% розчину потрібно - 4,0 мл розчину нікотинаміду St та води дистильованої до 100 мл.

Розчин 2 (S2): на 100 мл 90% розчину потрібно – 4,5 мл розчину нікотинаміду St та води дистильованої до 100 мл.

Розчин 3 (S3): на 100 мл 100% розчину потрібно – 5,0 мл розчину нікотинаміду St та води дистильованої до 100 мл.

Розчин 4 (S4): на 100 мл 110% розчину потрібно 5,5 мл розчину нікотинаміду St та води дистильованої до 100 мл.

Розчин 5 (S5): на 100 мл 120% розчину потрібно 6.0 мл розчину нікотинаміду St та води дистильованої до 100 мл.



Рис. 2.3.1. Розчини, які були приготовані шляхом розведення стандартного розчину

2.3.3. Приготування розчинів для дослідження специфічності

Для дослідження специфічності було обрано в якості робочого розчину – розчин нікотинамід у концентрації 10^{-3} , а в якості розчину плацебо – розчин алантоїну у тій самій концентрації.

Робочий розчин: відважили ФСЗ нікотинамід у кількості 0,2 г і помістили у колбу місткістю 20 мл та довели водою очищеною до мітки 20 мл.

Плацебо: відважили алантоїну кількість 0,1 г, помістили у термостійку колбу місткістю 10 мл, довели до позначки водою очищеною та підігріли на плиті електричній до повного розчинення.

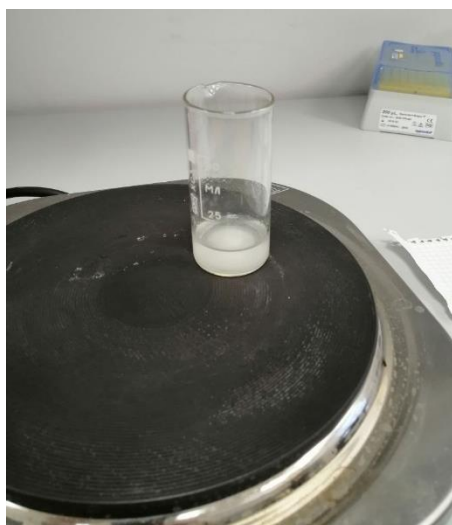


Рис.2.3.2. Розчинення алантоїну

2.3.4. Приготування крему для дослідження оптичної густини, збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності

Діючі речовини у складі крему:

- Алантоїн 0,15
- Нікотинамід 0,125
- Саліцилова кислота 0,05
- Рацемічна камфора 0,5

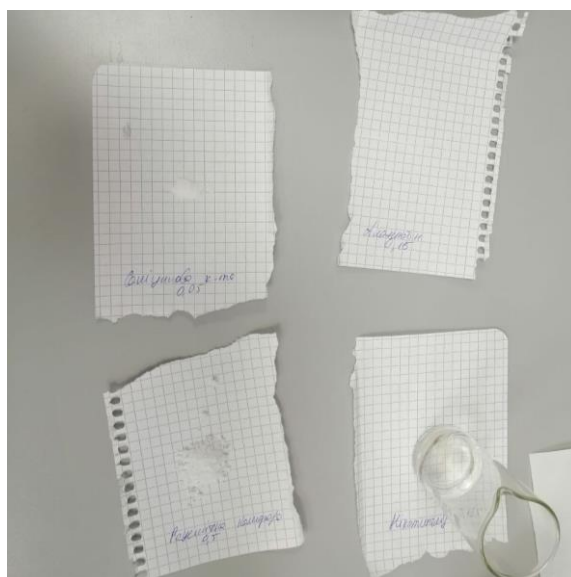


Рис.2.3.3. Відважування компонентів крему

Допоміжні речовини:

- Олія Ши 2,5 г
- Масло какао 2,5 г
- Олія авокадо 6 г
- Емульгатор – Планта-М 3,5 г
- Вода очищена
- Спирт етиловий 96%

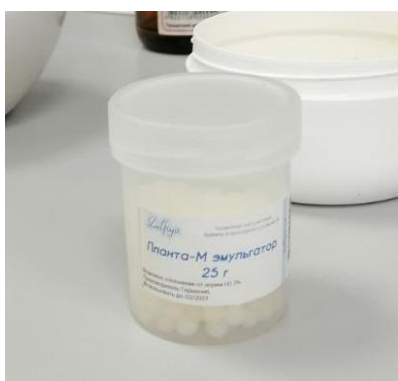


Рис.2.3.4. Емульгатор Планта-М

Технологія: у термостійку колбу відміряли 0,15 г алантоїну та додали 5 мл води очищеної та підігріли до кипіння. Після охолодження розчину, додали заздалегідь відмірянй 0,125 г нікотинамід та розчинили. У ступці диспергували 0,05 г саліцилової кислоти з частиною олії авокадо та розчинили у суміші 0,5 г камфори рацемічної. Отриману суміш змішали з розправленими

на водяній бані основами та емульгатором (олія Ши, масло какао + Планта-М). Після охолодження суміші тонко вливали та одразу змішували заздалегідь приготовлений та охолоджений розчин з алантоїном і нікотинамідом. Змішували до загустіння та однорідності.



Рис.2.3.6. Приготування крему

2.4. Визначення оптичного поглинання для речовин

Для досліду використано розчини, приготовлені на етапі 2.3.1.

Вимірювання 1.

Заздалегідь приготовлений розчин ФСЗ нікотинамідом помістили у кювету, яку заклали у спектрофотометр, та виміряли спектр поглинання.

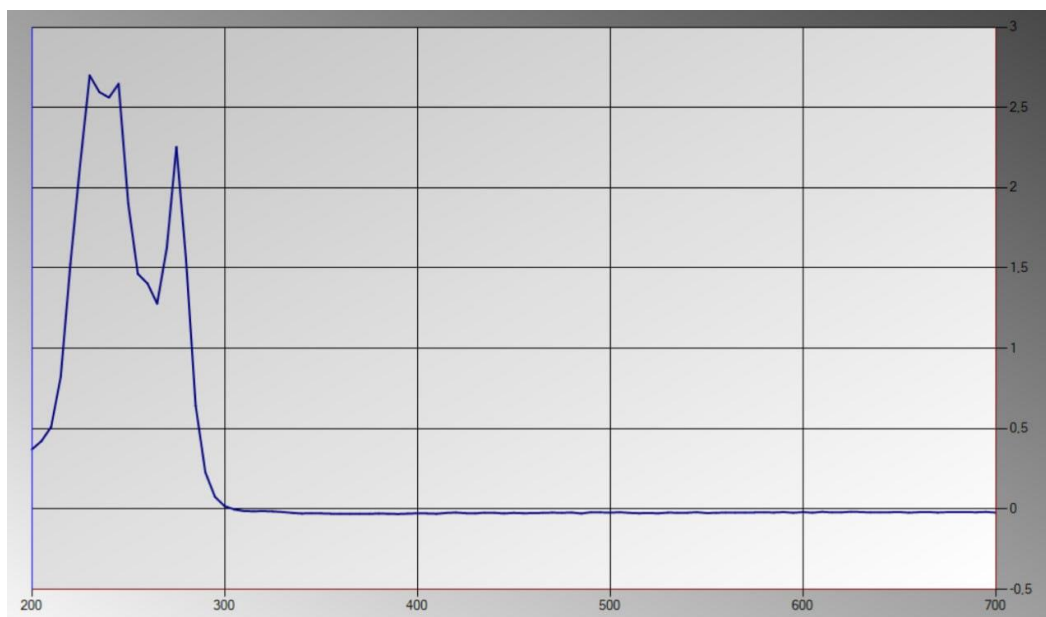


Рис.2.4.1 Спектр поглинання нікотинамідом у воді очищеній.

Виявлено, що ФСЗ нікотинаміду має максимум оптичного поглинання при довжині хвилі 275 нм.

Випробування 2.

Заздалегідь приготовлений розчин саліцилової кислоти помістили у кювету, яку заклали у спектрофотометр, та виміряли спектр поглинання.

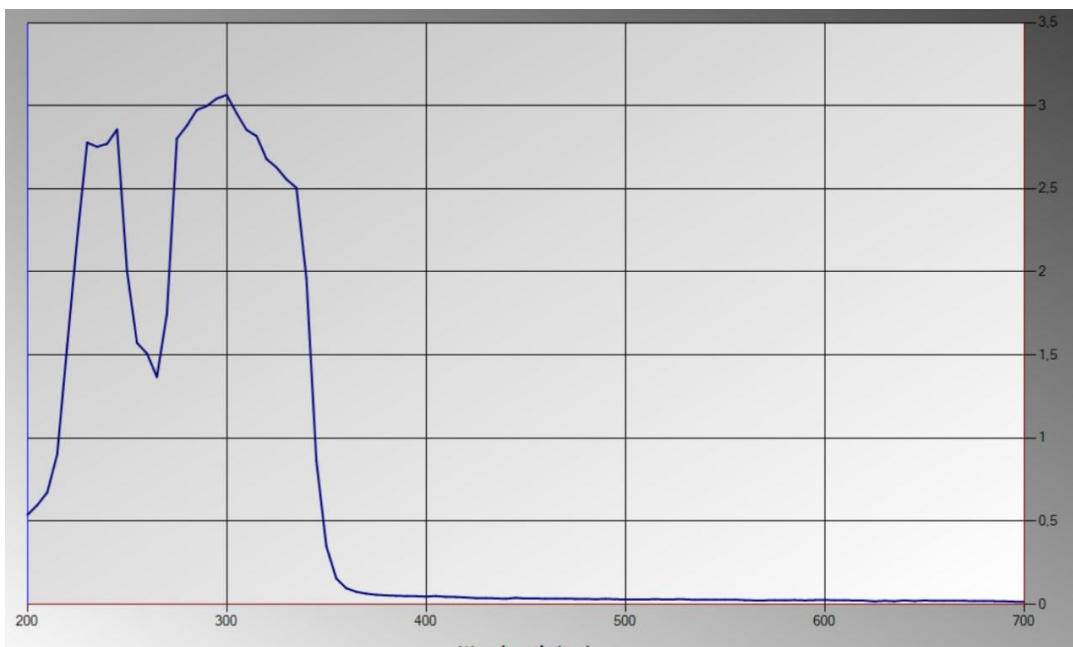


Рис. 2.4.2. Спектр поглинання саліцилової кислоти у етанолі 96%.

Виявлено, що саліцилова кислота має максимум оптичного поглинання при довжині хвилі 300 нм.

Випробування 3.

Заздалегідь приготовлений розчин камфори рацемічної помістили у кювету, яку заклали у спектрофотометр та виміряли спектр поглинання.

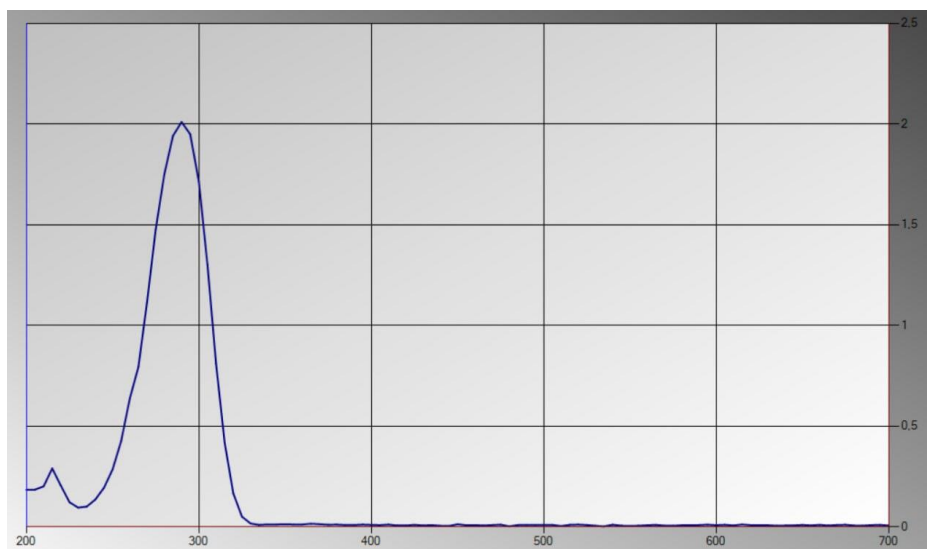


Рис. Спектр поглинання камфори рацемічної у спирті етиловому 96%.

Виявлено, що камфора рацемічна має максимум оптичного поглинання при довжині хвилі 290 нм.

Випробування 4.

Заздалегідь приготовлений розчин алантоїну помістили у кювету, яку заклали у спектрофотометр та виміряли спектр поглинання.

Вимірювання показало, що алантоїн не поглинає випромінювання у вибраному діапазоні, тому він не буде впливати на спектрофотометричну ідентифікацію нікотинамід у лікарській формі.

За результатами вимірювання було зроблено висновок, що нікотинамід поглинає у специфічній довжині хвилі, при якій інші компоненти лікарської форми не мають змогу визначатися.

2.5. Визначення оптичного поглинання для лікарської форми:

Для приготування розчину з лікарської форми:

1. Відміряли приготовленого крему (етап 2.3.4.) 0,4 г (така кількість крему, який містить нікотинамід, еквівалентна кількості нікотинамід у розчині ФСЗ).
2. Екстрагували нікотинамід з лікарської форми (екстрагент – вода очищена) – відміряну кількість крему помістили у колбу ємністю 50 мл та залили екстрагентом. Для кращого екстрагування помістили колбу в перемішувальний пристрій В-ПД-1 на 1 годину.
3. Фільтрували отриманий розчин через паперовий складчастий фільтр.
4. Виміряли спектр поглинання отриманого розчину.

Результати:

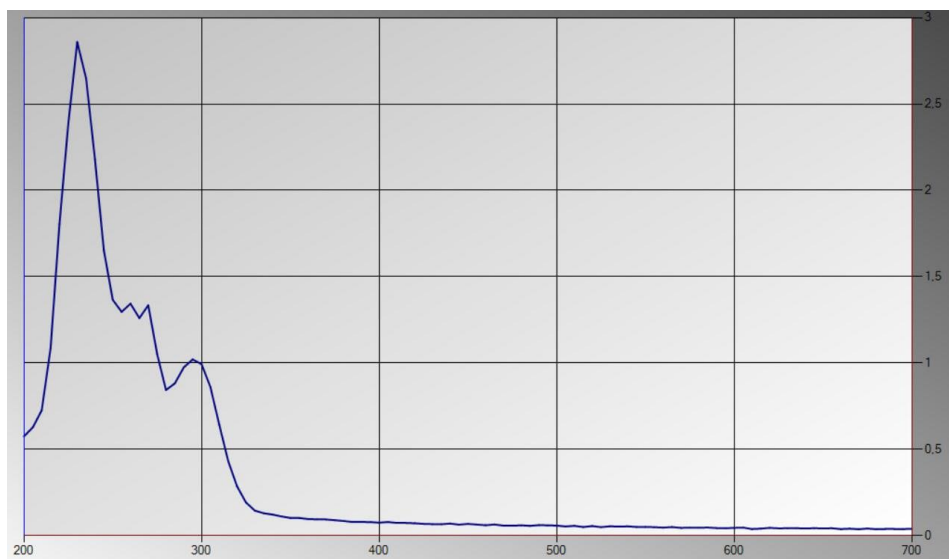


Рис. Спектр поглинання приготовленого крему.

За даними графіку ми зробили висновок, що саліцилова кислота та камфора у складі крему не будуть перешкоджати спектрофотометричній ідентифікації нікотинаміду.

2.6. Валідація методики

До валідаційних характеристик, які використовують для валідації методики, використовують:

- 1) Правильність.
- 2) Прецизійність, які складається із збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності.
- 3) Специфічність.
- 4) Межа виявлення.
- 5) Межа кількісного визначення.
- 6) Лінійність.
- 7) Діапазон застосування.

2.6.1. Лінійність

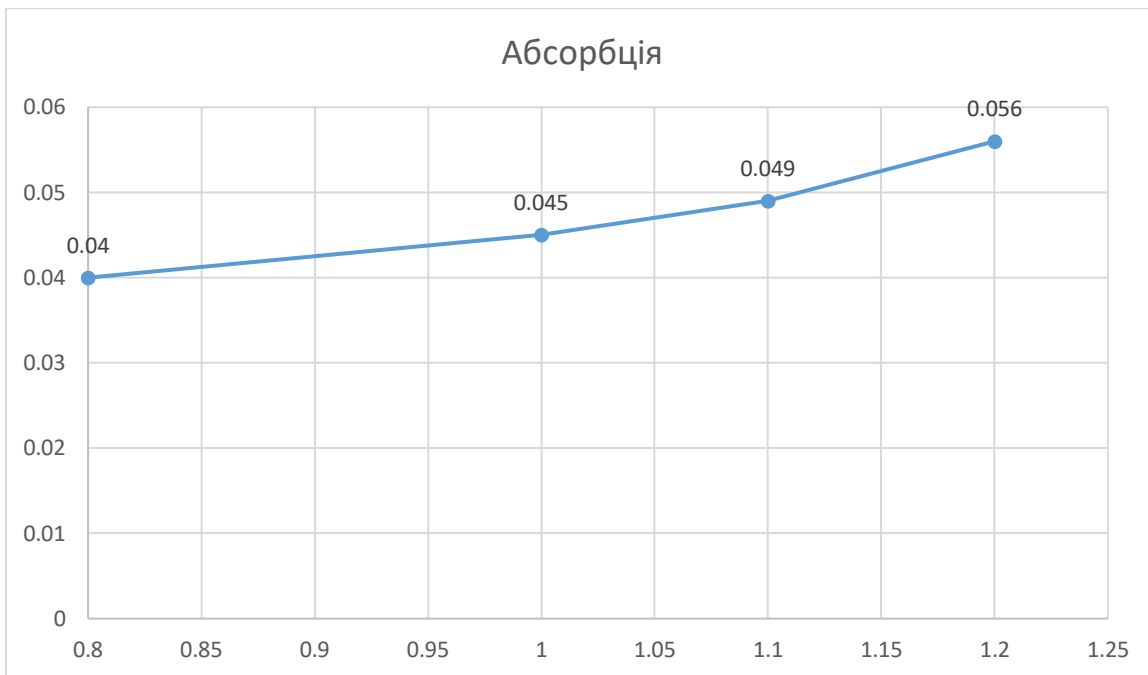
Для проведення лінійності використовували розчини, приготовлені на етапі

Аналітична довжина при якій вимірювалася величина абсорбції – 275 нм. За отриманими даними побудували Таб. Та графіки залежності абсорбції від концентрації зразка (Гр.1, Гр.2, Гр.3)

Результати

Розчин	Спроба	Абсорбція
80%	Спроба 1	0,040
	Спроба 2	0,043
	Середнє	0,0415
90%	Спроба 1	
	Спроба 2	
	Середнє	
100%	Спроба 1	0,045
	Спроба 2	0,042
	Середнє	0,0435
110%	Спроба 1	0,049
	Спроба 2	0,050
	Середнє	0,0495
120%	Спроба 1	0,056
	Спроба 2	0,058
	Середнє	0,057

Таб. Результати дослідження лінійності.



Гр.1. Залежність абсорбції від концентрації нікотинаміду у розчині.

Рівняння регресії:

$$y = a + b * x$$

Y – абсорбція;

B – кутовий коефіцієнт = 0,008257

A – 0,038286

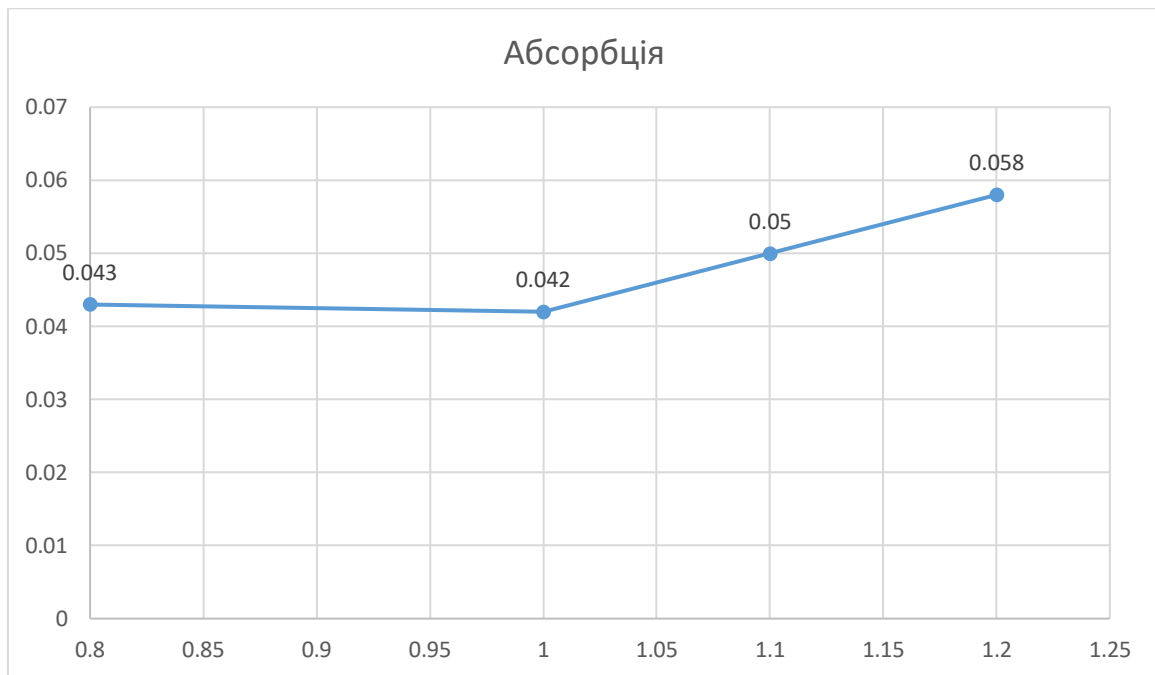
$SD(b) = 0,170783$

$SD(a) = 0,006758$

Коефіцієнт кореляції (R_1^2) = 0,967566

Рівняння регресії

$$y = 0,038286 + 0,008257 * x$$



Гр.2. Залежність абсорбції від концентрації нікотинаміду у розчині.

Рівняння регресії:

$$y = a + b * x$$

Y – абсорбція;

B – кутовий коефіцієнт = 0,011057

A – 0,036286

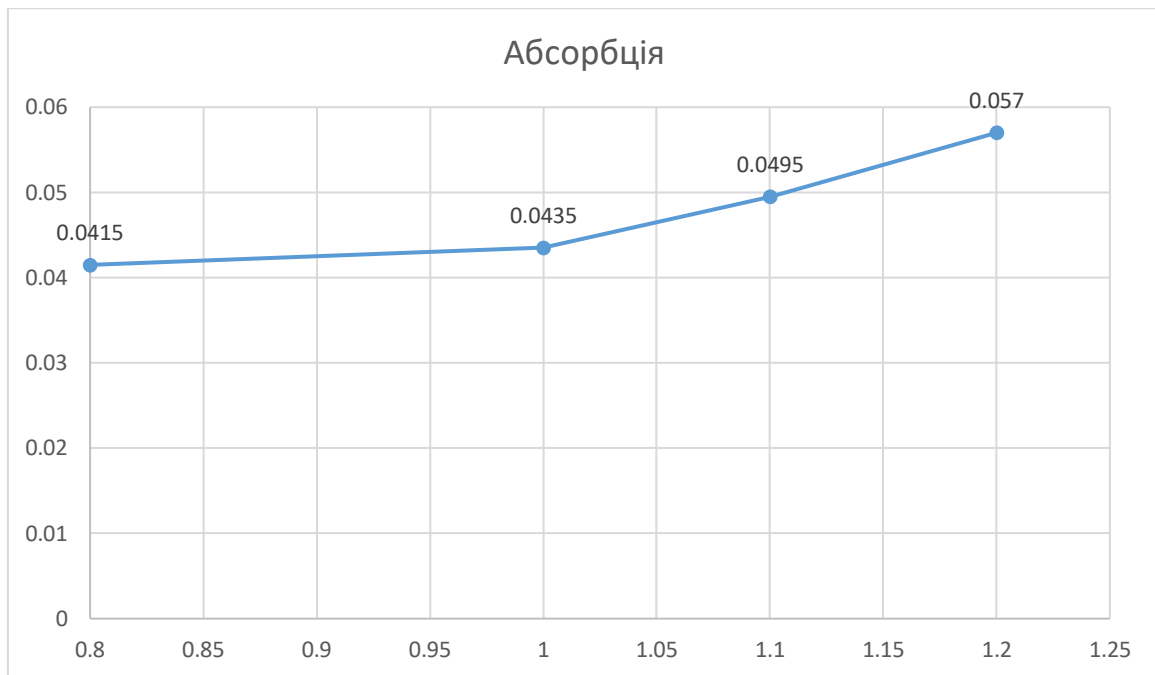
$SD(b) = 0,170783$

$SD(a) = 0,007411$

Коефіцієнт кореляції (R^2) = 0,836232

Рівняння регресії

$$y = 0,036286 + 0,011057 * x$$



Гр.3. Залежність абсорбції від концентрації нікотинаміду у розчині.

Графік по середньому значенні

Рівняння регресії:

$$y = a + b * x$$

Y – абсорбція;

B – кутовий коефіцієнт = 0,009657

A – 0,037286

$SD(b)$ = 0,170783

$SD(a)$ = 0,006969

Коефіцієнт кореляції (R^2) = 0,913767

Рівняння регресії

$$y = 0,037286 + 0,009657 * x$$

2.6.2. Специфічність

Для проведення специфічності обрали розчини приготовані на етапі 2.3.3. та виміряли спектр поглинання кожного.

Результати:

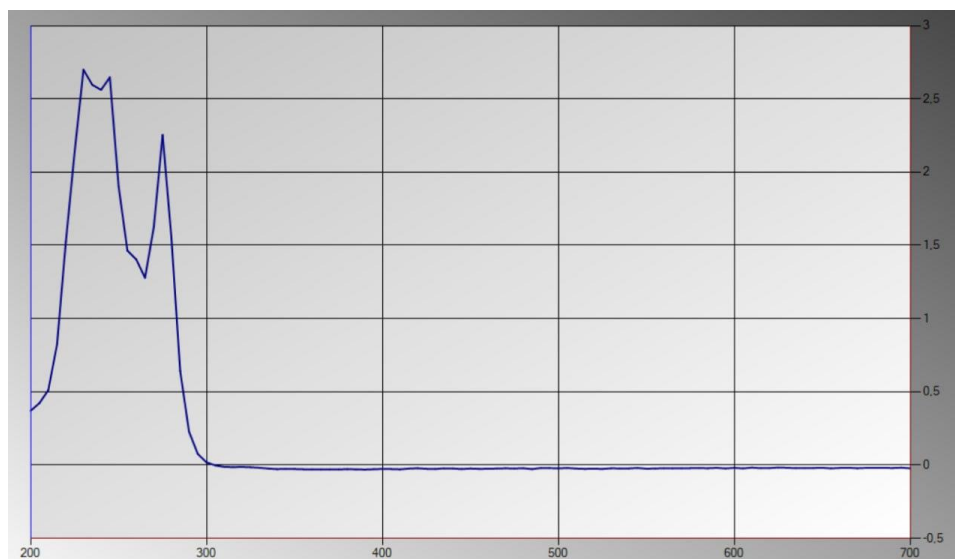


Рис. Спектр поглинання робочого розчину – розчин нікотинамід 10^{-3}
 Оскільки алантоїн не поглинає випромінювання у вибраній області спектра, в якій знаходиться максимум поглинання нікотинамід, ми можемо зробити висновок, що ця методика є специфічною.

2.6.3. Збіжність і внутрішньолабораторна прицензійність

Для даного дослідження потрібно екстрагувати з лікарської форми речовину, що досліджується (нікотинамід). Екстрагентом була обрана вода очищена, оскільки нікотинамід дуже добре розчиняється у воді (в 1 мл води повністю розчиняється 1 г речовини).

Методика

Зважили 5 зразків крему по 0,4 г на аналітичних вагах Radwag AS 220/R2 ($d= 0,0001$ г) та розчинили у 10 мл води очищеної. Для кращого розчинення речовини використовували перемішувальний пристрій В-ПД-1, час перемішування на якому становив – 1 година. Після повного розчинення, профільтрували через паперовий складчастий фільтр кожен розчин та вимірювали величину абсорбції при аналітичній довжині хвилі 270 нм.

Дослідження 1 (результати за 17.02)

Зразок	Абсорбція	Середнє	Вміст, %
1	1,574	1,574	152,3254
	1,574		

2	1,670	1,676	162,4427
	1,682		
3	1,676	1,6755	162,3931
	1,675		
4	1,652	1,6725	162,0955
	1,693		
5	1,779	1,7805	172,8079
	1,782		

SD	0,073035
Вміст, % (сеп)	162,4149
RSD ₁ , %	0,044969

Дослідження 2 (результати за 03.03)

Зразок	Абсорбція	Середнє	Вміст,%
1	1,847	1,8455	179,2551
	1,844		
2	1,964	1,9635	190,9594
	1,963		
3	1,690	1,6965	164,476
	1,703		
4	1,733	1,7385	168,642
	1,744		
5	1,873	1,875	182,1812
	1,877		

SD	0,107343
Вміст, % (сеп)	177,1028

RSD ₂ , %	0,06061
----------------------	---------

2.6.4. Правильність

Правильність встановлюється тільки при відомих результатах прецизійності, специфічності та лінійності, які були проведенні під час валідації методики.

2.6.5. Діапазон застосування

Діапазон застосування визначається інтервалом концентрацій аналізованої речовини у пробі, для якої відомі валідаційні характеристики (прецизійність, правильність, лінійність). Мінімальний діапазон застосування для нікотинаміду у лікарських формах складає 80%, а максимальний - 120%, ці діапазони визначаються при дослідженні лінійності методики.

ВИСНОВКИ

Підсумовуючи всі отримані дані в ході дослідження, яке було проведене, ми отримали наступні висновки:

1. Було розроблено та перевірено спектрофотометричну методику визначення нікотинаміду у зовнішній лікарській формі – кремі. В результаті експерименту було з'ясовано, що максимум оптичного поглинання нікотинаміду 275 нм, що є абсолютно специфічним, всі інші компоненти крему не будуть визначатися при цій довжині.
2. Було проаналізовано літературні джерела що до використання нікотинаміду та інших компонентів, що входили до складу крему, заснованих на їхніх фармакологічних властивостях. Ми дійшли висновку, що використання нікотинаміду у кремах обґрунтовується тим, що нікотинамід є первинним попередником коферментів, що входять до складу ферментів, які забезпечують стабільність геному та беруть участь у близько 40-ка біохімічних реакціях, також стимулює синтез керамідів, впливаючи на експресію білків.
3. Було проведено валідацію аналітичної методики згідно з валідаційними характеристиками, які відповідають вимогам Державної Фармакопеї України:
 - Лінійність: коефіцієнт кореляції – $R_1^2 = 0,964566$; $R_2^2 = 0,836232$; $R_1^2 = 0,913767$;
 - Специфічність: поглинання зразка з нікотинамідом при довжині хвилі спектра 275 нм та відсутність поглинання в розчині плацебо;
 - Збіжність та внутрішньолабораторна прецизійність: $RSD_1, (\%) = 0,044969$; $RSD_2, (\%) = 0,06061$;
 - Правильність;
 - Діапазон застосування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Коровин, С. И., Кукушкина, М. Н., Паливец, А. Ю., Литус, А. И., & Литвиненко, Б. В. (2014). Дерматоскопия в предоперационной диагностике меланомы кожи. *Здоров'я України*, 36-37.
2. Ivanov M, Kannan A, Stojković DS, Glamočlija J, Calhelha RC, Ferreira ICFR, Sanglard D, Soković M. Camphor and Eucalyptol-Anticandidal Spectrum, Antivirulence Effect, Efflux Pumps Interference and Cytotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 6;22(2):483. doi: 10.3390/ijms22020483. PMID: 33418931;
3. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 2-е вид., допов. 2. – Х. : PIPEГ, 2014. – 722 с.
4. Zhang T, Sun L, Liu R, Zhang D, Lan X, Huang C, Xin W, Wang C, Zhang D, Du G. A novel naturally occurring salicylic acid analogue acts as an anti-inflammatory agent by inhibiting nuclear factor-kappaB activity in RAW264.7 macrophages. *Mol Pharm*. 2012 Mar 5;9(3):671-7. doi: 10.1021/mp2003779. Epub 2012 Feb 15.
5. Zhang P, Wang Y, Zhang J, Hong T. Allantoin Inhibits Compound 48/80-Induced Pseudoallergic Reactions In Vitro and In Vivo. *Molecules*. 2022 May 27;27(11):3473. doi: 10.3390/molecules27113473.
6. Zhang J., Xu X., Xu W. et al. Identification of nicotinamide in serum by GC/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 2009; 877(29): 3745-3749.
7. Yoshizumi M, Nakamura T, Kato M, Ishioka T, Kozawa K, Wakamatsu K, Kimura H. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol Int*. 2008 Nov;32(11):1405-11. doi: 10.1016/j.cellbi.2008.08.011. Epub 2008 Aug 20.
8. Yiasemides E, Sivapirabu G, Halliday GM, Park J, Damian DL. Oral nicotinamide protects against ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. *Carcinogenesis*. 2009 Jan;30(1):101-5. doi: 10.1093/carcin/bgn248. Epub 2008 Nov 20.

9. Yamamoto T, Byun J, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Sadoshima J. Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD⁺ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion. *PLoS ONE* 2014;
10. Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci*. 2005 Sep 28;25(39):8924-37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2574-05.2005.
11. Wishart DS, Guo AC, Oler E, et al., HMDB 5.0 the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022. Jan 7;50(D1)D622–31. 34986597
12. Wang L, Zhang K, Zhang K, et al. Antibacterial Activity of Cinnamomum camphora Essential Oil on Escherichia coli During Planktonic Growth and Biofilm Formation. *Front Microbiol*. 2020;11:561002. Published 2020 Nov 12. doi:10.3389/fmicb.2020.561002
13. Tzeng CY, Lee WS, Liu KF, Tsou HK, Chen CJ, Peng WH, Tsai JC. Allantoin ameliorates amyloid β -peptide-induced memory impairment by regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in rats. *Biomed Pharmacother*. 2022 Sep;153:113389. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113389. Epub 2022 Jul 13.
14. Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziolkiewicz M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*. 2022 Apr 12;11(8):1312. doi: 10.3390/cells11081312.
15. Torsekar R, Gautam MM. Topical Therapies in Psoriasis. *Indian Dermatol Online J*. 2017 Jul-Aug;8(4):235-245. doi: 10.4103/2229-5178.209622.
16. The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia. 39th ed. The National Formulary. 34th ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; May 1, 2016.
17. Taguchi K, Fukusaki E, Bamba T. Determination of niacin and its metabolites using supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass

- spectrometry. *Mass Spectrom (Tokyo)*. 2014;3(1):A0029. doi: 10.5702/massspectrometry.A0029. Epub 2014 Aug 1.
18. Surjana D, Halliday GM, Martin AJ, Moloney FJ, Damian DL. Oral nicotinamide reduces actinic keratoses in phase II double-blinded randomized controlled trials. *J Invest Dermatol*. 2012 May;132(5):1497-500. doi: 10.1038/jid.2011.459. Epub 2012 Feb 2. PMID: 22297641.
 19. Sterling JC, Handfield-Jones S, Hudson PM. Guidelines for the management of cutaneous warts. *Br J Dermatol*. 2001;144(1):4-11. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04066.x
 20. Song X, Xu A, Pan W, Wallin B, Kivlin R, Lu S, Cao C, Bi Z, Wan Y. Nicotinamide attenuates aquaporin 3 overexpression induced by retinoic acid through inhibition of EGFR/ERK in cultured human skin keratinocytes. *Int J Mol Med*. 2008 Aug;22(2):229-36.
 21. Song X, Li R, Zhang Q, He S, Wang Y. Antibacterial Effect and Possible Mechanism of Salicylic Acid Microcapsules against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Oct 6;19(19):12761. doi: 10.3390/ijerph191912761.
 22. Somade OT, Ajayi BO, Tajudeen NO, Atunlute EM, James AS, Kehinde SA. Camphor elicits up-regulation of hepatic and pulmonary pro-inflammatory cytokines and chemokines via activation of NF- κ B in rats. *Pathophysiology*. 2019 Sep-Dec;26(3-4):305-313. doi: 10.1016/j.pathophys.2019.07.005. Epub 2019 Jul 29.
 23. Snaidr VA, Damian DL, Halliday GM. Nicotinamide for photoprotection and skin cancer chemoprevention: A review of efficacy and safety. *Exp Dermatol*. 2019 Feb;28 Suppl 1:15-22.
 24. Singh DP, Moore CA, Gilliland A, Carr JP. Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Mol Plant Pathol*. 2004 Jan 1;5(1):57-63. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00203.x.

25. Selamoglu Z, Dugun C, Akgul H, Gulhan MF. In-vitro Antioxidant Activities of the Ethanolic Extracts of Some Contained-Allantoin Plants. *Iran J Pharm Res.* 2017;16(Suppl):92-98.
26. SCHWEIGERT BS, GERMAN HL, GARBER MM. Synthesis of nicotinic acid from tryptophan by the developing chick embryo. *J Biol Chem.* 1948 May;174(1):383.
27. Savić VLj, Nikolić VD, Arsić IA, Stanojević LP, Najman SJ, Stojanović S, Mladenović-Ranisavljević II. Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. *Phytother Res.* 2015 Aug;29(8):1117-22. doi: 10.1002/ptr.5356. Epub 2015 Apr 16.
28. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1475. Published 2019 Mar 23. doi:10.3390/ijms20061475
29. Redzic N, Benoy I, Vanden Broeck D, Bogers JP. Efficacy of AV2-Salicylic acid combination therapy for cutaneous warts: Study protocol for a single-center randomized controlled trial. *Contemp Clin Trials Commun.* 2020 Jan 21;17:100534. doi: 10.1016/j.conctc.2020.100534.
30. Patra V, Wagner K, Arulampalam V, Wolf P. Skin Microbiome Modulates the Effect of Ultraviolet Radiation on Cellular Response and Immune Function. *iScience.* 2019 May 31;15:211-222. doi: 10.1016/j.isci.2019.04.026.
31. Paller AS, Browning J, Nikolic M, et al. Efficacy and tolerability of the investigational topical cream SD-101 (6% allantoin) in patients with epidermolysis bullosa: a phase 3, randomized, double-blind, vehicle-controlled trial (ESSENCE study). *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):158. Published 2020 Jun 23. doi:10.1186/s13023-020-01419-3
32. Nook TH. In vivo measurement of the keratolytic effect of salicylic acid in three ointment formulations. *Br J Dermatol.* 1987 Aug;117(2):243-5. doi: 10.1111/j.1365-2133.1987.tb04123.x.
33. Naldi L, Rzany B. Psoriasis (chronic plaque). *BMJ Clin Evid.* 2009;2009:1706. Published 2009 Jan 9.

34. Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J (2005) Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25:4052–4061
35. Murota, H., & Matsui, S. (2018). Clinical application of niacinamide for Japanese patients with acne vulgaris and atopic dermatitis. *Journal of clinical and experimental dermatology research*, 9(1), 1-7. doi: 10.4172/2155-9554.1000458
36. Martin D, Devendran S, Mangala LS, Murthy CR. Structural characterization of nicotinamide by NMR spectroscopy and DFT calculations. *J Mol Struct.* 2016;1119:97-103. doi: 10.1016/j.molstruc.2016.04.032
37. Marion D. An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol Cell Proteomics.* 2013 Nov;12(11):3006-25. doi: 10.1074/mcp.O113.030239. Epub 2013 Jul 6.
38. Manca ML, Matricardi P, Cencetti C, Peris JE, Melis V, Carbone C, Escribano E, Zaru M, Fadda AM, Manconi M. Combination of argan oil and phospholipids for the development of an effective liposome-like formulation able to improve skin hydration and allantoin dermal delivery. *Int J Pharm.* 2016 May 30;505(1-2):204-11. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.008. Epub 2016 Apr 5.
39. Lu J, Cong T, Wen X, Li X, Du D, He G, Jiang X. Salicylic acid treats acne vulgaris by suppressing AMPK/SREBP1 pathway in sebocytes. *Exp Dermatol.* 2019 Jul;28(7):786-794. doi: 10.1111/exd.13934. Epub 2019 May 15.
40. Lodén M, Boström P, Kneezke M. Distribution and keratolytic effect of salicylic acid and urea in human skin. *Skin Pharmacol.* 1995;8(4):173-8. doi: 10.1159/000211343.
41. Liu H, Li H, Li Y, Guan H, Li Q. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in infant formula by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2014;164:301-307. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.069

42. Lee HS, Kim IH. Salicylic acid peels for the treatment of acne vulgaris in Asian patients. *Dermatol Surg*. 2003 Dec;29(12):1196-9; discussion 1199. doi: 10.1111/j.1524-4725.2003.29384.x.
43. Kwok CS, Gibbs S, Bennett C, Holland R, Abbott R. Topical treatments for cutaneous warts. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(9):CD001781. Published 2012 Sep 12. doi:10.1002/14651858.CD001781.pub3
44. Kwak JY, Ham HJ, Kim CM, Hwang ES. Nicotinamide exerts antioxidative effects on senescent cells. *Mol Cells*. 2015 Mar;38(3):229-35. doi: 10.14348/molcells.2015.2253. Epub 2015 Jan 19.
45. Klebeko J, Ossowicz-Rupniewska P, Świątek E, Szachnowska J, Janus E, Taneva SG, Krachmarova E, Guncheva M. Salicylic Acid as Ionic Liquid Formulation May Have Enhanced Potency to Treat Some Chronic Skin Diseases. *Molecules*. 2021 Dec 30;27(1):216. doi: 10.3390/molecules27010216.
46. Kircik, L. H. (2013). Salicylic acid 6% in an ammonium lactate emollient foam vehicle in the treatment of mild-to-moderate scalp psoriasis. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 12(7), 780-783.
47. Kim MY, Mauro S, Gévry N, Lis JT, Kraus WL. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*. 2004 Dec 17;119(6):803-14. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.002.
48. Kempiak, S. J., & Uebelhoer, N. (2008, September). Superficial chemical peels and microdermabrasion for acne vulgaris. In *Seminars in cutaneous medicine and surgery* (Vol. 27, No. 3, pp. 212-220). No longer published by Elsevier.
49. Kawada A, Konishi N, Momma T, Oiso N, Kawara S. Evaluation of anti-wrinkle effects of a novel cosmetic containing retinol using the guideline of the Japan Cosmetic Industry Association. *J Dermatol*. 2009 Nov;36(11):583-6. doi: 10.1111/j.1346-8138.2009.00716.x.

50. Kand'ár R, Záková P. Allantoin as a marker of oxidative stress in human erythrocytes. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(9):1270-4. doi: 10.1515/CCLM.2008.244.
51. John Wiley & Sons, Inc. SpectraBase; SpectraBase Compound ID=30xgQiaY0m0 SpectraBase Spectrum ID=GngFnh835Oz <https://spectrabase.com/spectrum/GngFnh835Oz> (accessed 29.03.2023).
52. Japanese Pharmacopoeia 17th Edition. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan: 2016.
53. J. Shi, M. Khatri, S. J. Xue, G. S. Mittal, Y. Ma, D. Li. Solubility of lycopene in supercritical CO₂ uid as aected by temperature and pressure. *Separ. Purif. Tech.* 66: 322–328, 2009.
54. J. Park, G. M. Halliday, D. Surjana, D. L. Damian, *Photochem. Photobiol.* 2010, 86, 94
55. Imayama S, Ueda S, Isoda M. Histologic changes in the skin of hairless mice following peeling with salicylic acid. *Arch Dermatol.* 2000 Nov;136(11):1390-5. doi: 10.1001/archderm.136.11.1390.
56. Ichthyosis. (2022). In MedlinePlus. Retrieved February 22, 2023, from <https://medlineplus.gov/ichthyosis.html>.
57. Huang W., Ye Q., Liao X. et al. Rapid and sensitive detection of nicotinamide in rat plasma by LC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2013; 27(8): 1025-1029.
58. <https://github.com/MassBank/MassBank-web/blob/main/MassBank-Project/LICENSE.txt>
59. Haynes, W.M. (ed.). *CRC Handbook of Chemistry and Physics.* 95th 2. Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL 2014-2015, p. 3-474
60. Hamidi-Zad Z, Moslehi A, Rastegarpanah M. Attenuating effects of allantoin on oxidative stress in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis: role of SIRT1/Nrf2 pathway. *Res Pharm Sci.* 2021;16(6):651-659. Published 2021 Oct 15. doi:10.4103/1735-5362.327511

61. Habif, T. P. (2010). *Clinical dermatology: a color guide to diagnosis and therapy*. Edinburgh: Mosby. [Book]
62. Grajčevci-Kotori M, Kocinaj A. Exfoliative Skin-peeling, Benefits from This Procedure and Our Experience. *Med Arch*. 2015;69(6):414-416. doi:10.5455/medarh.2015.69.414-416
63. Gomes, A. P., Price, N. L., Ling, A. J., Moslehi, J. J., Montgomery, M. K., Rajman, L., . . . Sinclair, D. A. (2013). Declining NAD⁺ Induces a Pseudohypoxic State Disrupting Nuclear-Mitochondrial Communication during Aging. *Cell*, 155(7), 1624-1638. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.037
64. Gehring W. Nicotinic acid/niacinamide and the skin. *J Cosmet Dermatol*. 2004 Apr;3(2):88-93. doi: 10.1111/j.1473-2130.2004.00115.x.
65. Forbat E, Al-Niaimi F, Ali FR. Use of nicotinamide in dermatology. *Clin Exp Dermatol*. 2017 Mar;42(2):137-144. doi: 10.1111/ced.13021
66. *European Pharmacopoeia 7.0*. Council of Europe, Strasbourg, France: 2010.
67. E. Klesper, A. H. Corwin, D. A. Turner. High pressure gas chromatography above critical temperature. *J. Org. Chem*. 27: 700–701, 1962.
68. Draelos D. *Cosmetics in Dermatology*. Wiley-Blackwell; 2015. doi: 10.1002/9781118655464.
69. Dowden J, Moreau C, Brown RS, Berridge G, Galione A, Potter BV. Chemical synthesis of the second messenger nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate by total synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004 Sep 6;43(35):4637-40. doi: 10.1002/anie.200460054.
70. DiGiovanna JJ, Bostom-Robinson R. Ichthyosis: etiology, diagnosis, and management. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:81–95.
71. Diehl, С. "Використання нікотинаміду в дерматології." *Український журнал дерматології, венерології, косметології* 4 (2019): 85-92.
72. de Graaf RA, Behar KL. Detection of cerebral NAD(+) by in vivo (1)H NMR spectroscopy. *NMR Biomed*. 2014 Jul;27(7):802-9. doi: 10.1002/nbm.3121. Epub 2014 May 15.

73. Danby, F. W. (2010). Nutrition and aging skin: sugar and glycation. *Clinics in dermatology*, 28(4), 409–411. doi:10.1016/j.clindermatol.2010.03.018.
74. Damian DL. Photoprotective effects of nicotinamide. *Photochem Photobiol Sci*. 2010 Apr;9(4):578-85.
75. da Rocha Neto AC, Maraschin M, Di Piero RM. Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *Int J Food Microbiol*. 2015 Dec 23;215:64-70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.018.
76. Cockayne S, Hewitt C, Hicks K, Jayakody S, Kang'ombe AR, Stamuli E, Turner G, Thomas K, Curran M, Denby G, Hashmi F, McIntosh C, McLarnon N, Torgerson D, Watt I; EVerT Team. Cryotherapy versus salicylic acid for the treatment of plantar warts (verrucae): a randomised controlled trial. *BMJ*. 2011 Jun 7;342:d3271. doi: 10.1136/bmj.d3271.
77. Clark GW, Pope SM, Jaboori KA. Diagnosis and treatment of seborrheic dermatitis. *Am Fam Physician*. 2015 Feb 1;91(3):185-90
78. Chen AC, Damian DL. Nicotinamide and the skin. *Australas J Dermatol*. 2014 Aug;55(3):169-75. doi: 10.1111/ajd.12163. Epub 2014 Mar 17. PMID: 24635573.
79. Cahusac PMB, Veermalla A. Effects of camphor and related compounds on slowly adapting mechanoreceptors in the rat sinus hair follicle. *IBRO Neurosci Rep*. 2022;13:114-119. Published 2022 Jul 19. doi:10.1016/j.ibneur.2022.07.002
80. C. West. How good is SFC for polar analytes?. *Chromatogr. Today* May/June: 22–27, 2013.C.
81. Borda LJ, Perper M, Keri JE. Treatment of seborrheic dermatitis: a comprehensive review. *J Dermatolog Treat*. 2019 Mar;30(2):158-169. doi: 10.1080/09546634.2018.1473554. Epub 2018 May 24.
82. Benavente CA, Jacobson MK, Jacobson EL. NAD in skin: therapeutic approaches for niacin. *Curr Pharm Des*. 2009;15(1):29-38. doi: 10.2174/138161209787185760.

83. Bandara M, Sankaridurg P, Zhu H, Hume E, Willcox M. Effect of Salicylic Acid on the Membrane Proteome and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Mar;57(3):1213-20. doi: 10.1167/iovs.15-18990.
84. Araújo LU, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VC, Carneiro CM, Silva-Barcellos NM. Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cir Bras*. 2010 Oct;25(5):460-6. doi: 10.1590/s0102-86502010000500014.
85. Araújo LU, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VC, Carneiro CM, Silva-Barcellos NM. Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cir Bras*. 2010 Oct;25(5):460-6. doi: 10.1590/s0102-86502010000500014.
86. A. L. Magalhães, R. V. Vaz, R. M. G. Gonçalves, F. Da Silva, C. M. Silva. Accurate hydrodynamic models for the prediction of tracer diffusivities in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 83: 15–27, 2013.
87. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання.- Харків : РІПЕГ, 2001. – с.58-67. – Доповнення 1. – 2004. – с.2-4.
88. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.
89. Настанова 42-3.5:2004. – Настанови з якості. Лікарські засоби. Валідація процесів / М. Ляпунов, В. Георгієвський, О. Безугла та ін. – Київ, МОЗ України, 2004. – VI + 12 с