

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ДОЗОВАНОЇ ФОРМИ КОМБІНОВАНОГО РОСЛИННОГО ЗАСОБУ АНТИАЛЕРГІЧНОЇ ДІЇ

Котов С.А., Гонтова Т.М

Національний фармацевтичний університет,
Харків, Україна

Кожен рік відмічається зростання алергопатологій у зв'язку з несприятливою екологічною обстановкою у світі. Алергічні реакції вже не є рідким явищем, а є, хоча сумним, але повсякденним клопотом кожної 10-ої людини у світі. На ринку України найпопулярнішими препаратами проти симптомів алергії є блокатори H-1 гістамінових рецепторів 1-ого та 2-го покоління. Але ця група препаратів має низку побічних реакцій, наприклад таких як негативний вплив на серцево-судинну систему, сонливість [1,2]. Тому доцільним є створення комбінованого лікарського рослинного препарату на основі вітчизняної сировини з широкою сировинною базою. Перевагою такого препарату є широкий спектр біологічно активних речовин у первісному вигляді, низька токсичність та практична відсутність побічних дій, виключаючи індивідуальну алергічну реакцію на пилок рослин. Нами раніше були проведені роботи з розробки такого комбінованого рослинного засобу на основі композиції лікарської рослинної сировини – череди трави, нагідок квіток та глоду листя та квіток – у співвідношенні 6:3:1. Спосіб одержання комбінованого рослинного засобу захищений Патентом України на корисну модель [3]. Згідно з Патентом його можна застосовувати у різноманітних формах, а саме рідкого екстракту, густого екстракту, сухого екстракту, таблеток, капсул, гранул, суспензій, сиропу, або місцево. У раніше опублікованих роботах ми описали критичні аспекти екстракції сировини, провели комплексний кількісний та якісний аналіз вихідної сировини, отриманого сухого екстракту, вивчили його антиалергічну активність [4-6].

Метою даної роботи є стандартизація дозованої форми комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії (твердих желатинових капсул), розробка методик контролю їх якості.

Планування дослідження щодо стандартизації якості комбінованого рослинного засобу у формі капсул включало кілька етапів:

- фармако-технологічні дослідження як капсульної маси, так і дозованої форми відповідно до вимог ДФУ;

- фізико-хімічні дослідження розробленої дозованої форми, ідентифікація, кількісне визначення;

- валідаційні дослідження методики кількісного визначення відповідно до вимог загальної статті ДФУ 2.4, 5.3.N.2 “Валідація аналітичних методик і випробувань” та до наукових рекомендацій, щодо валідації аналітичних методик [7].

Матеріали і методи

Отримання капсульної маси комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії.

Висушену сировину череди трироздільної трави, нагідок квіток та глоду листя та квіток у необхідному співвідношенні подрібнювали, після подрібнення сировину просіювали крізь сито 3000 (ДФУ, 2.9.12). В якості екстрагенту використовували спирт етиловий 40%. Подрібнену сировину переносили в перколятор, заливали екстрагентом до утворення «дзеркала», вміст екстрактора залишали настоюватися на протязі 12 годин і проводили екстракцію протягом 48 год, до повного виходу перколяту самопливом. Всього екстрагенту було використано у кількості, що відповідає співвідношенню сировина:екстрагент 1:20. Об'єднаний витяг відстоювали протягом 2 діб за температури 8 °С і фільтрували від можливих домішок. Одержаний водно-спиртовий розчин поміщали у реактор, де видаляють екстрагент шляхом упарювання при температурі 60-80°C за залишкового тиску (під вакуумом, за зниженим тиском) до співвідношення сировина:густий екстракт 1:0,25-0,35, далі до отриманого густого екстракту додавали 40-60% від загальної маси екстракту мікрокристалічної целюлози (МКЦ), ретельно перемішували і видаляли вологу до остаточної її кількості не більше 5%, отримуючи випробовувану капсульну масу комбінованого рослинного засобу (далі КЗ).

Отримання капсул з КЗ. Зразки капсул із КЗ були отримані на ручній капсульній машинці (виробництво КНР). Капсульну масу поміщали у тверду желатинову капсулу, розміру №0, циліндричної форми з прозорим корпусом та прозорою кришечкою.

Фармако-технологічні дослідження. При розробці твердих дозованих форм у вигляді капсул необхідними є визначення фармако-технологічних характеристик капсульних мас та безпосередньо капсул: втрата в масі під час висушування, однорідність дозування, розчинення і таке інше. Вивчення вищевказаних показників проводили згідно з вимогами відповідних розділів Державної Фармакопеї України. Дослідження текучості, насипної густини та густини після усадки капсульної маси проводили також за методиками ДФУ, 2.9.16, 2.9.34 [8]. Для визначення текучості використовували прилад ERWEKA GT, Німеччина, насипної густини - ERWEKA SVM 202, Німеччина та прилад ВП-12А (Маріупольський завод технічного обладнання).

Фізико-хімічні дослідження. «Втрата в масі під час висушування» згідно з ДФУ 2.5, 2.2.32. [9]. Для визначення втрати в масі під час висушування використовувались ваги аналітичні ES225M-DR ф.«Preisa Gravimetrics AG» Швейцарія та сушильна шафа 2В-151 «Одеський завод медлабортехники».

Визначення розчинення капсул проводили на приладі для розчинення лікарських засобів з таблеток та капсул SOTAX AT-7 (Швейцарія).

Ідентифікація. Якісний аналіз проводили за допомогою методу тонкошарової хроматографії за національними монографіями ДФУ «Череди трава^N» [10] та «Нагідок квітки^N» [11]. Експеримент здійснювали на пластинках із шаром силікагелю 60 F₂₅₄ (Merck, Germany). У якості зовнішніх стандартів використовували ФСЗ ДФУ (кофейна кислота, гіперозид, хлорогенова кислота, рутин, лютеолін, лютеолін-7-глікозид, календулозиди), а також екстракти череди, нагідок, глоду, комбінований рослинний екстракт сухий.

Кількісне визначення. Вміст суми поліфенольних сполук оцінювали за допомогою модифікованого методу реактивної спектрофотометрії Фоліна-Чіокальтеу за уніфікованою фармакопейною методикою [12]. Згідно даної методики в якості стандартного зразку, за допомогою якого розраховували вміст поліфенолів, використовували ФСЗ ДФУ пірогалолу.

Приготування вихідного розчину. 0,05 г (точна наважка) капсульної маси поміщали у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додавали 40 мл води Р, нагрівали протягом 30 хв на водяній бані, охолоджували та кількісно переносили у мірну колбу місткістю 50 мл. Круглодонну колбу обполіскували водою Р, промивні води переносили у мірну колбу і доводили об'єм розчину водою Р до позначки. Давали осадку осісти та рідину фільтрували крізь фільтрувальний папір, відкидаючи перші 20 мл фільтрату. Далі за фармакопейною методикою готують випробовуваний розчин і розчин порівняння пірогалолу.

Приготування модельних розчинів. Для вивчення лінійності методики готували 5 модельних розчинів, у яких досліджуваний вміст суми поліфенолів рівномірно розподілене у діапазоні

методики (50 % – 150 %): 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 % від номінальної концентрації у випробовуваному розчині згідно методики, у якому вміст суми поліфенолів близький до регламентованого значення. Для приготування модельних розчинів, аликвоти вихідного розчину (приготованого відповідно за методикою) 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 і 3.0 мл відповідно, що відповідають необхідній концентрації поліфенолів в модельному розчині (МР), поміщали у мірну колбу об'ємом 25 мл, додавали об'єм розчинника, який зменшували відповідно до росту об'єму аликвоти, додавали 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р, доводили об'єм розчину натрію карбонату Р до позначки і перемішували.

Реєстрували спектри поглинання випробовуваних розчинів, модельних розчинів та розчину порівняння за довжини хвилі 760 нм. Реєстрацію спектрів здійснювали на приладі HP 8453 UV-VIS фірма Hewlett Packard, США.

Результати та обговорення

Фармако-технологічні дослідження.

Одним з найважливіших критеріїв вибору допоміжних речовин при розробці твердих желатинових капсул, які надають фармако-технологічні властивості лікарській формі – це фізико-хімічні властивості субстанції. Значення втрати в масі під час висушування отриманої капсульної маси становила $4.89 \pm 0.24\%$. Після додавання МКЦ у вибраному співвідношенні рослинний екстракт став менш гігроскопічним, що забезпечувало задовільну текучість капсульної маси та її незмінність в процесі зберігання [13]. В Табл. 1 наведено результати дослідження технологічних характеристик отриманої капсульної маси.

Таблиця 1 Результати дослідження технологічних характеристик капсульної маси КЗ

Показники	Вимоги ДФУ 2.9.16. 2.9.34. 2.9.36	Отриманий результат*
Насипна густина, г/см ³	-	$0,571 \pm 0,015$
Густина після усадки, г/см ³	-	$0,714 \pm 0,022$
Ступінь стисливості (Індекс Карра, %)	16–20 відпов. текучості «задовільна»	$20 \pm 0,35$
Коефіцієнт Гауснера	1,19–1,25 відпов. текучості «задовільна»	$1,25 \pm 0,03$
Текучість г/с	-	$11,111 \pm 0,004$

*n=3

Фізико-хімічні дослідження

Відповідно до вимог загальної монографії ДФУ 2.0 «Фармацевтичні препарати», а також монографії на дозовані форми «Капсули», обов'язковими тестами для даного виду дозованої лікарської форми є наступні тести: «Опис», «Ідентифікація», «Однорідність дозованих одиниць», «Однорідність вмісту», «Однорідність маси однодозових препаратів», «Розчинення», «Кількісне визначення». Для твердих капсул також вимагається випробування «Розпадання», але у разі виконання випробування за показником розчинення,

випробування на розпадання не є обов'язковим. Тест «Однорідність дозованих одиниць» не поширюється на лікарську рослинну сировину і лікарські рослинні препарати в дозованій формі, якими і є дослідні капсули. Стосовно однорідності вмісту, в загальній монографії зазначено, що даний тест мають витримувати капсули із вмістом діючої речовини менше 2 мг, або менше 2 % від маси вмісту. Враховуючи що, в капсулі міститься в середньому 12 мг поліфенолів і це відповідає 2.4% від маси вмісту капсул, дане випробування також не є обов'язковим.

Ідентифікація. Ідентифікацію капсул проводили методом ТШХ, використовуючи для цього капсульну масу, отриману при визначенні середньої маси вмісту капсул. Використовували уніфіковані ТШХ- методики [14], що описані у попередніх роботах [15].

При проведенні випробування методом ТШХ в умовах методики національної монографії «Череди трава^N» для виявлення зон флавоноїдів і гідроксикоричних кислот, на хроматограмі капсульної маси були виявлені характерні зони, властиві екстрактам череди, нагідок і глоду (Рис.1):
а) 2 зеленуваті флуоресціуючі зони в нижній третині хроматограми (характерні для нагідок);

б) жовта флуоресціуюча зона на рівні зони рутину (характерна для нагідок і глоду);

с) інтенсивна блакитна флуоресціуюча зона, розташована на рівні зони хлорогенової кислоти (характерна для нагідок і глоду);

д) інтенсивна жовта флуоресціуюча зона в середній частині хроматограми, розташована майже на рівні зони гіперозиду (характерна для череди і глоду);

е) 2-3 інтенсивні блакитні флуоресціуючі зони у верхній третині хроматограми (характерні для череди, нагідок, глоду);

ф) інтенсивна жовта флуоресціуюча зона розташована близько до фронту розчинника на рівні зони лютеоліну (характерна для череди).

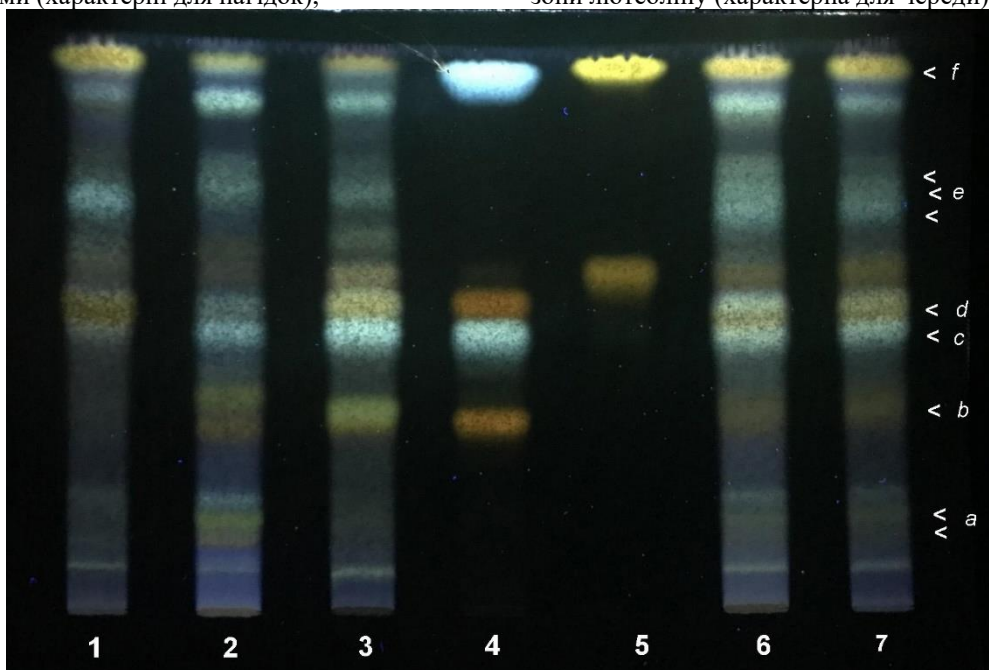


Рис. 1. Хроматограма, отримана при проведенні випробування в умовах методики національної монографії «Череди трава^N»: 1 - череди екстракт, 2 – нагідок екстракт, 3 - глоду екстракт, 4 - рутин + хлорогенова кислота + гіперозид + кофейна кислота (в порядку збільшення значення Rf), 5 - лютеолін-7-глікозид + лютеолін, 6 – комбінований екстракт «чистий», 7 – КЗ

Додатково були проведені випробування для ідентифікації тритерпенових сполук в капсульній масі в умовах методики Ідентифікації D національної монографії «Нагідок квітки^N». Як видно, на хроматограмі розчину капсульної маси, комбінованого екстракту та екстракту нагідок виявлено 2 фіолетові зони, які співпадали за кольором і розташуванням із відповідними зонами на хроматограмі розчину ФСЗ ДФУ календулозидів.

Однорідність маси. Дане випробування проводили відповідно до вимог ДФУ 2.4, 2.9.5. Для капсул з масою 300 мг і більше припустимим відхиленням маси окремої капсули від середньої маси є 7.5%. В результаті аналізу 20 капсул було встановлено, що середня маса капсул складає $0,609734 \pm 0,0102$ г, відхилення від середньої маси знаходиться в межах від 0,18% до 2,75 %,

максимальне відхилення при аналізі випробовуваних капсул було 2.75%, що відповідає вимогам ДФУ.

Для кількісного визначення додатково проводили визначення середньої маси вмісту капсул, яку в подальшому використовували при розрахунку вмісту поліфенолів в одній капсулі. Для цього зважували 20 капсул окремо кожен, повністю видаляли вміст кожної капсули і знову зважували. За різницею розраховували масу вмісту кожної капсули і середню масу вмісту 20 капсул, яку використовували під час розрахунків. В результаті аналізу було встановлено, що середня маса вмісту капсул складала $0,4994973 \pm 0,0100$ г. Таким чином, в подальшому використовували значення середньої маси вмісту капсул, що дорівнює 0.4995 г.

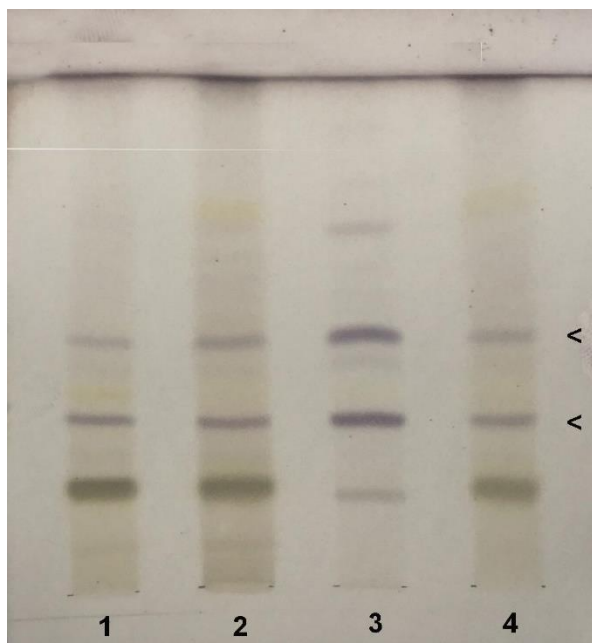


Рис. 2. Хроматограма, отримана при проведенні випробування в умовах методики ідентифікації D національної монографії «Нагідок квіткі^N»: 1 – нагідок екстракт, 2 - комбінований екстракт «чистий», 3 - ФСЗ ДФУ календулозиди, 4 – КЗ

Тест розчинення. Дане випробування проводили відповідно до вимог ДФУ 2.0, 2.9.3 «Тест «Розчинення» для твердих дозованих одиниць». Визначення проводили на приладі з кошиком, швидкість обертання кошика - 100 об/хв, використовували 500 мл води Р в якості середовища розчинення, температура середовища ($37 \pm 0,5$) °С. 6 капсул поміщали до приладу, через 45 хв відбирали

10 мл розчину з кожної посудини, фільтрували, відкидаючи перші 5 мл. 2.0 мл фільтрату використовували для приготування випробовуваного розчину. Паралельно проводили визначення вмісту поліфенолів в наважці капсульної маси у перерахунку на пірогалол. Розрахунок для капсул проводили, використовуючи знайдену середню масу вмісту 20 капсул (Результати наведено в Табл.2).

Таблиця 2 Результати визначення розчинення випробовуваних капсул

Об'єкт	Вміст поліфенолів , у %	Відсоток вивільнення %
Капсульна маса	2,577 ± 0,012	
1 капсула	2,435 ± 0,009	94,496
2 капсула	2,487 ± 0,014	96,494
3 капсула	2,528 ± 0,017	98,0792
4 капсула	2,407 ± 0,007	93,394
5 капсула	2,510 ± 0,014	97,389
6 капсула	2,551 ± 0,011	99,003
	Середній відсоток	96,476

Як видно, кількість діючої речовини, що вивільнилася в середовище розчинення протягом 45 хв при швидкості обертання кошика 100 об/хв, склало не менше 93 % (середнє для 6 капсул – 96.5%), що відповідає вимогам ДФУ.

Кількісне визначення. Загальні поліфеноли. Визначення проводили спектрофотометричним методом (ДФУ, 1 вид., 2.2.25). Розробку і валідаційні випробування проводили на капсульній масі, отриманій при визначенні вмісту 20 капсул для отримання середньої маси вмісту капсул.

При розробці методики кількісного визначення суми загальних поліфенолів за основу була взята методика, що описана в розділі ДФУ 2.0,

2.8.14 «Визначення танінів в лікарській рослинній сировині». Методика засновується на кольоровій реакції поліфенольних сполук, які входять до складу рослинного екстракту, з фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом і вимірюванні оптичної густини отриманого розчину за довжини хвилі 760 нм. Вміст загальних поліфенолів в сировині визначають в перерахунку на пірогалол, який містить в молекулі три гідроксильні групи.

В першу чергу при розробці методики була перевірена відповідність спектрів поглинання випробовуваного розчину, одержаного в умовах методики і спектру поглинання розчину пірогалолу. Спектр поглинання випробовуваного розчину в

області від 600 нм до 850 нм мав чітко виражений максимум за довжини хвилі 760 ± 2 нм, що практично співпадало із максимумом поглинання спектру пірогалолу (рис.3). Таким чином, отримані дані дозволили зробити висновок про можливість визначення вмісту загальних поліфенолів препарату в перерахунку на пірогалол.

При проведенні валідаційних досліджень методики кількісного визначення загальних поліфенолів були перевірені наступні метрологічні характеристики: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність та внутрішньолaboratorна прецизійність.

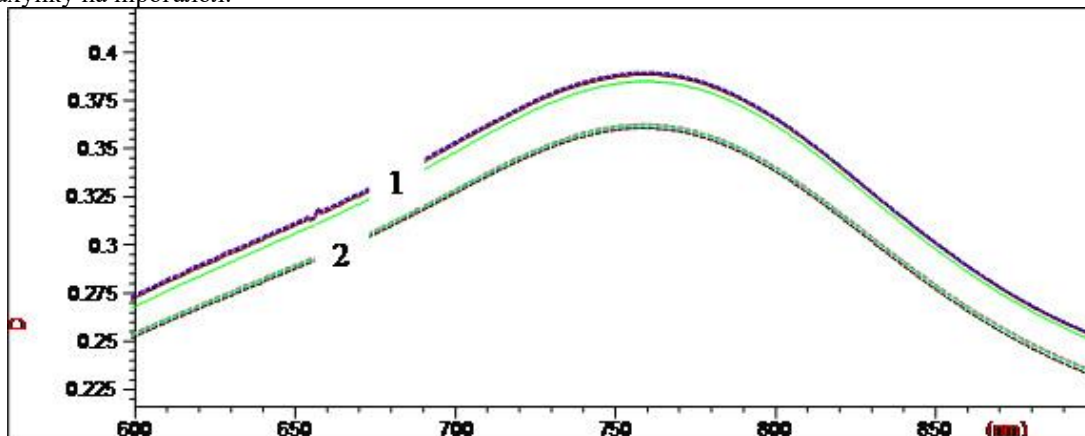


Рис. 3. Спектри поглинання розчинів препарату (1) і С3 пірогалолу (2), отримані при визначенні вмісту загальних поліфенолів

Для оцінки результатів валідації, невизначеність результатів аналізу виражали як одnobічний відносний довірчий інтервал для рівня надійної ймовірності 95 %. У відповідності з рекомендаціями ДФУ, враховуючи одnobічне нормування «не менше» було прийнято, що максимально припустима невизначеність результатів кількісного визначення поліфенолів не повинна перевищувати 6.4% (Δ_{As}).

Вивчення специфічності. Специфічність методики була досліджена на розчині плацебо (який

готували із використанням мікрокристалічної целюлози, у тій кількості, що входить до складу капсульної маси) та на випробовуваному розчині, які готували відповідно за методикою (Табл. 3). Оптична густина розчину плацебо повинна бути незначущою відносно оптичної густини випробовуваного розчину, приготованого відповідно за методикою, тобто

$$\Delta_{placebo} \leq \Delta_{As} \cdot 0.32 = 2.04\%$$

$$\Delta_{placebo} \leq 2.04\%$$

Таблиця 3 Результати перевірки впливу плацебо на визначення вмісту поліфенолів

Найменування розчину	Оптична густина, A			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{середнє}
Розчин плацебо	0.007206	0.007848	0.007323	0.007459
Випробовуваний розчин	0.381352	0.382472	0.383101	0.38231
$\square_{placebo}$, %	1.95 %			
Вимоги	max $\Delta_{placebo} \leq 2.04\%$			
Висновок	Витримуються; специфічність підтверджена			

Вивчення лінійності

Розрахунки проводили в системі нормалізованих координат. Реєстрували УФ-спектри поглинання модельних розчинів та розчину порівняння за довжини хвилі 760 нм в умовах наведених в розділі «Матеріали і методи» (Рис.4). За оптичною густиною модельних розчинів будували

лінійну залежність A_{ir} від C_{ir} в нормалізованих координатах (Табл. 4, Рис.5). Розраховували параметри лінійної залежності. Критерії прийнятності встановлювали відповідно до вимог загальної статті ДФУ 2.4, 5.3.N.2 “Валідація аналітичних методик і випробувань” та до наукових рекомендацій, щодо валідації аналітичних методик [7] (Табл.5).

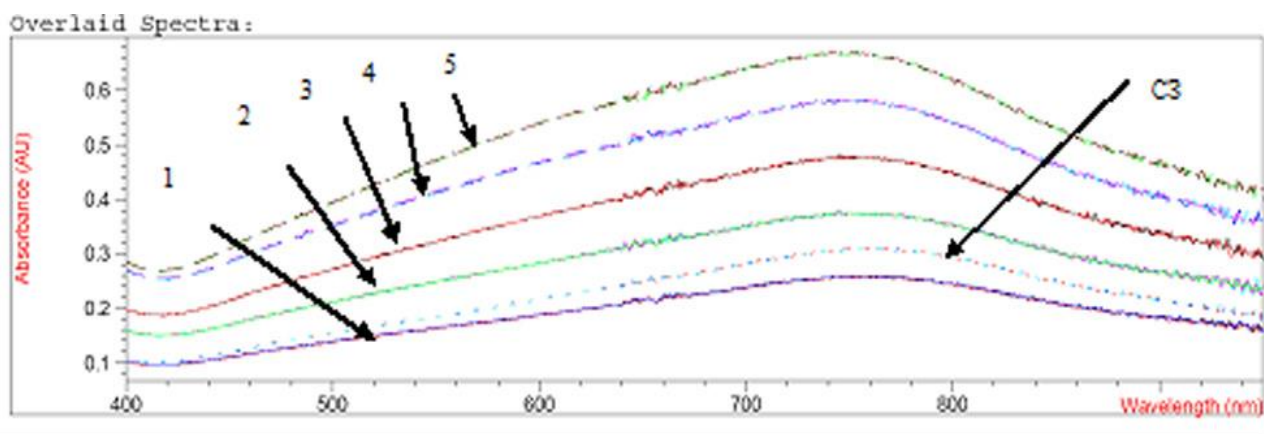


Рис. 4. УФ-Спектри: модельних розчинів (1-5) та розчину порівняння С3 пірогалолу, одержані при вивченні лінійності методики

Таблиця 4 Приведені значення модельних розчинів (МР) для побудови графіка залежності

МР	Вміст поліфенолів від регламентованого, %	Концентрація поліфенолів у МР у перерахунку на пірогалол, C_i , мг/мл	Знайдено/ Y_i	Введено/ X_i	$Z_i, \%$
1	50%	0,001036	51,315	51,806	99,052
2	75%	0,001554	78,487	77,710	101,001
3	100%	0,002072	101,975	103,613	98,419
4	125%	0,00259	125,020	129,516	96,529
5	150%	0,003108	149,929	155,419	96,467

Таблиця 5 Критерії лінійності і розраховані параметри лінійної залежності

Параметри	Значення	Вимоги	Оцінка результатів
b	0,9411	-	
s_b	553	-	
a	3,83	$a \leq 4.0$	витримуються
s_a	1,70685	-	
RSD_0	1,27219	≤ 3.4	витримуються
r	0,9996	$\geq 0.99512 $	витримуються
Δ_{sample}	$\leq 6,4$	$\Delta_{sample} = 6.4\%$	витримуються

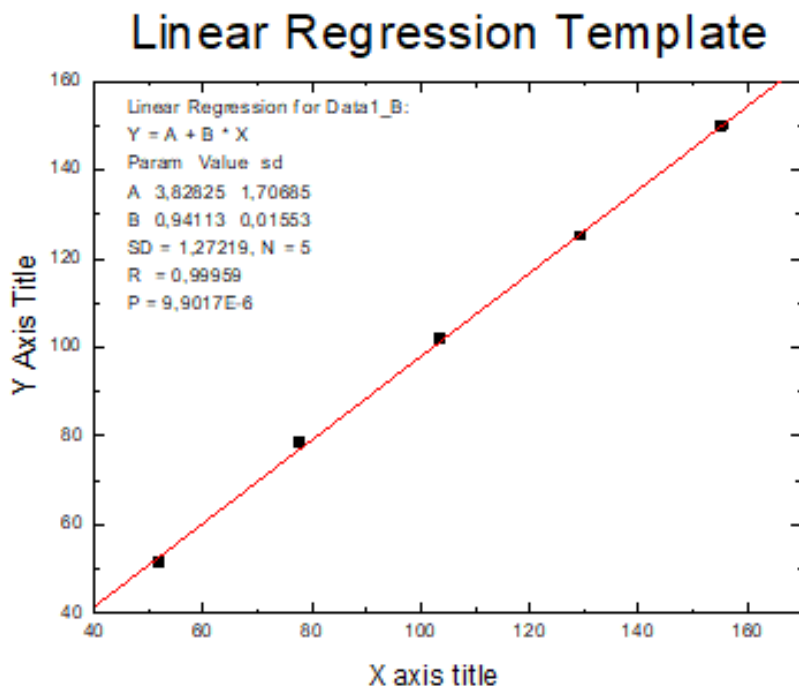


Рис. 5. Графік залежності для приведених значень $Y_i = a + b \times X_i$ для суми поліфенолів

Правильність і прецизійність методики. Правильність методики оцінювали на модельних сумішах капсульної маси з додаванням СЗ пірогалолу 100, 150 % і 200%, до вихідної концентрації поліфенолів у перерахунку на пірогалол у випробовуваному розчині (результати в Табл. 6).

Показано, що відсоток відновлення знаходиться в межах від 95,11 до 100,03% і має середнє значення 96,9%. Практична незначущість систематичної похибки виконується, так само як і вимоги до прийнятної прецизійності (Табл.4).

Таблиця 6 Результати, отримані під час вивчення правильності та прецизійності методики

Маса наважки	C_{iz} мг/г	C_{iv} мг/г	$C_{iz}/C_{iv}, \%$	Критерії
Пірогалол 0,0252 г	-	-	-	
Капсульна маса 0,0251 г	25,7714	-	-	
Капсульна маса + пірогалол 0.0252 мг	50,8213	50,8711	99,90	
Капсульна маса + пірогалол 0.0252 мг	50,8855	50,8711	100,03	
Капсульна маса + пірогалол 0.0252 мг	50,0425	50,8711	98,37	
Капсульна маса + пірогалол 0.0502 мг	73,2415	75,7715	96,66	
Капсульна маса + пірогалол 0.0502 мг	72,0684	75,7715	95,11	
Капсульна маса + пірогалол 0.0502 мг	72,6282	75,7715	95,85	
Капсульна маса + пірогалол 0.0756 мг	96,2071	101,0703	95,19	
Капсульна маса + пірогалол 0.0756 мг	96,3685	101,0703	95,35	
Капсульна маса + пірогалол 0.0756 мг	96,4141	101,0703	95,39	
Середнє			96,87	
SD			2,028	
RSD			2,094	
Δ_{sample}			3.773	<6.4
Статистична незначущість			3.127	>2.05
Практична незначущість			3.127	< 6.4

Внутрішньолабораторна прецизійність

Випробовуваний розчин капсульної маси аналізують в різні дні. Дослідження проводять різні аналітики (Табл.7). Різниця між знайденим значенням вмісту поліфенолів у випробовуваних

розчинах (Δ_{intra}), не повинна перевищувати наступного значення:

$$\Delta_{intra} \leq 0.26 B,$$

$$\Delta_{intra} \leq 5.2\%.$$

Таблиця 7 Результати, отримані під час вивчення внутрішньолабораторної прецизійності

1 День			2 день		
Маса наважки	Асп	Поліфеноли, %	Маса наважки	Асп	Поліфеноли, %
СЗ 0,0252 г	0,4011		СЗ 0,0252 г	0,4006	
0,04245 г	0,3291	2,599	0,04256 г	0,3253	2,569
0,04243 г	0,3236	2,558	0,04245 г	0,3276	2,596
0,04260 г	0,3258	2,573	0,04238 г	0,3269	2,590
	Csample(1)	2,577		Csample(2)	2,585
Δ_{intra}			0.65 \leq 5.2%		

Таким чином методика кількісного визначення поліфенолів за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність, прецизійність та внутрішньолабораторна прецизійність відповідає вимогам ДФУ 2.4, 5.3.N.2.

Вміст загальних поліфенолів в препараті, в перерахунку на пірогалол має бути не менше 12 мг в одній капсулі (регламентація встановлена відповідно експериментальним даним, які одержані при аналізі 3 дослідних серій препарату ($X_{(c.1120520)}=12.9$, $X_{(c.2050419)}=12.6$, $X_{(c.3111120)}=12.8$). Вона також корелює із вмістом поліфенолів у капсульній масі: враховуючи що у капсульній масі знаходиться не менше 2.5 % поліфенолів, а середня маса вмісту капсул дорівнює 0.4995 г, отримуємо $2.5 \cdot 0.4995/100=0.0125$ г.

Висновки

Розроблено параметри стандартизації дозованої форми комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії.

Вивчено фармако-технологічні характеристики капсульної маси і капсул за показниками, які є обов'язковими для них і регламентуються вимогами ДФУ.

Розроблено комплекс фізико-хімічних методик аналізу, що дозволить провести систематичне забезпечення фармацевтичної розробки капсул комбінованого рослинного засобу.

Вивчено валідаційні характеристики методики кількісного визначення поліфенолів відповідно до вимог ДФУ.

Standardization of the dosage form for the combined herbal medicine with anti-allergic activity

Kotov S.A., Gontova T.M.

Introduction. The creation of a combined herbal preparation with anti-allergic action is an urgent task, it is supported by a wide base of herbal drugs for the creation of the future medicine, a wide range of biologically active substances in their original form, low toxicity and the practical absence of side effects. Such an object is the developed combined plant extract based

on the composition of herbal drugs – bur-marigold herb, calendula flowers and hawthorn leaves and flowers - in a ratio of 6:3:1. **The aim of the work** was to standardize the dosage form of a combined herbal medicine (hard gelatine capsules), to develop methods of their quality control. **Materials and methods.** The combined herbal preparation of anti-allergic action with a filler of 50% microcrystalline cellulose was developed according to the utility model patent. Samples of capsules containing the combined drug were obtained using a manual capsule machine. The capsule mass was placed in a hard gelatine capsule, size #0, cylindrical in shape with a transparent body and a transparent lid. Study of flowability, bulk density and tapped density of the capsule mass was carried out according to the methods of State Pharmacopeia of Ukraine (SPHU), 2.9.16, 2.9.34. Analytical scales ES225M-DR manufactured by «Preisa Gravimetrics AG», Switzerland and a drying cabinet 2B-151 manufactured by «Odessa Medical Laboratory Technology» were used to determine the loss on drying. Determination of the dissolution of capsules was carried out on a dissolving device for tablets and capsules SOTAX AT-7 (Switzerland). Qualitative analysis was carried out using the method of thin-layer chromatography according to the national monographs of the SPhU "Bur-marigold herb" and "Calendula flowers". As external standards, pharmacopoeial standard samples (caffeic acid, hyperoside, chlorogenic acid, rutin, luteolin, luteolin-7-glycoside, calendulosides), as well as extracts of bur-marigold, calendula, hawthorn and combined dry extract were used. The total content of polyphenolic compounds was determined using a modified Folin–Ciocalteu reactive spectrophotometry method. Pyrogallol was used as a standard sample, which the content of polyphenols was calculated. Validation studies of quantitative determination method were carried out in accordance with the requirements of the general article SPhU 2.4, 5.3.N.2 "Validation of analytical methods and tests". **Results & discussion.** The loss on drying of the obtained capsule mass was $4.89 \pm 0.03\%$ which ensured satisfactory flowability of the capsule mass and its stability during storage. During the study of the technological characteristics of the

obtained capsule mass, the following results were obtained: bulk density - 0.571 g/cm³; tapped density - 0.714 g/cm³; compressibility index (Carr Index) – 20%; the Hausner ratio – 1.25; flowability – 11.11 g/s, which met the requirements of the SPhU 2.9.16. 2.9.34. 2.9.36. The identification of capsules was carried out by TLC method, using for this purpose the capsule mass obtained by determining the average mass of the contents of the capsules. When conducting a TLC test in the conditions of the national monograph "Bur-marigold herb" to detect the zones of flavonoids and hydroxycinnamic acids, characteristic zones of the extracts of bur-marigold, calendula and hawthorn were found in the chromatogram of the capsule mass. During the identification of triterpene compounds in the capsule mass under the conditions of Identification method D of the national monograph "Calendula flowers", 2 purple zones were found, which coincided in color and location with the corresponding zones on the chromatogram of the reference standard solution of calendulosides. It was found that the average weight of the capsules was 0.609734 ± 0.0102 g, the deviation from the average weight was in the range from 0.18% to 2.75%, the maximum deviation during the analysis of the tested capsules was 2.75%, which met the requirements of the SPhU, 2.9.5. Determination of dissolution was carried out on a device with a basket, the speed of rotation of the basket - 100 revolutions/min, 500 ml of water was used as a dissolution medium, the temperature of the medium was (37 ± 0.5) °C. 6 capsules were placed in the device, after 45 minutes, 10 ml of the solution was taken from each vessel, filtered, discarding the first 5 ml and then quantitative determination of polyphenols was carried out. As a result, it was found that the amount of active substance released into the dissolution medium within 45 minutes was at least 93% (average for 6 capsules – 96.5%), which met the requirements of the SPhU, 2.9.3. Quantitative determination of polyphenols was carried out by the spectrophotometric method (SPhU, 2.2.25). The development and validation tests were carried out on the capsule mass obtained by determining the content of 20 capsules. During the validation studies, the following metrological characteristics were checked: specificity, linearity, accuracy, precision and intra-laboratory precision. It was found that the method of quantitative determination of polyphenols met the requirements of SPhU 2.4, 5.3.N.2 according to all the studied validation characteristics. The content of total polyphenols in the preparation, in terms of pyrogallol, is regulated to be at least 12 mg in one capsule. **Conclusions.** The parameters of standardization of the dosage form for the combined herbal medicine with antiallergic activity have been developed. The pharmaco-technological characteristics of the capsule mass and capsules were studied according to the indicators that are mandatory and regulated by the requirements of the SPhU. A complex of physico-chemical methods of analysis has been developed, which allows systematic support for the pharmaceutical development of developed capsules. The validation characteristics of the method for the

quantitative determination of polyphenols in accordance with the requirements of the SPhU were studied.

Keywords: standardization, combined herbal extract, dosage form, pharmaco-technological characteristics, validation

References

- 1 Compendium. Medicines Antihistaminial products for systemic use. 2020. Published on the Internet. <https://compendium.com.ua/uk/atc/r06/>
- 2 Vityuk O. Side effects of antihistamines: when to stop taking anti-allergy drugs. Published on the Internet. 2020. <https://allergy.org.ua/pobichni-efekty-antyhistaminnykh-koly-prypynyty-prymaty-lyky-proty-alerhii/>
- 3 Kotov S.A, Kotov A.G, Gontova T.M, Kononenko N.M, Chernyavski E.S, Ruban O.A Method of obtaining a combined herbal medicine with anti-allergic action. Patent for utility model 2021 No. 149399 of Ukraine. IPC (2009) A61K 36/00. No. u 2020 08228.
- 4 Kotov S.A, Kotova E.E., Bezruk I. V., Gontova T.N., Kotov A.G. Study of the dynamics extraction of biologically active substances from the bur-marigold herb and antioxidant activity of the obtained extracts. EUREKA: Health Sciences. 2020. № 6. P. 95-101. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2020.001408>.
- 5 Kotov S.A, Gontova T.M., Kotov A.G. Technological aspects of extraction of bur-marigold herb, calendula flowers and hawthorn leaves and flowers. Planta+. Science, practice and education. 2021. Kyiv. P. 226-230.
- 6 Kotov S., Gontova T., Kononenko N., Chernyavski E., Chikitkina V. Phytochemical analysis and anti-allergic activity of a combined herbal medicine based on bur-marigold, calendula and hawthorn. Pharmacia. 2022. 69 (1). P. 237-247/[doi: 10.3897/pharmacia.69.e77624](https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e77624).
- 7 State Pharmacopoeia of Ukraine. Ukrainian scientific pharmacopoeial center for quality of medicines. Kharkiv. 2019. P. 123-236.
- 8 State Pharmacopoeia of Ukraine. Ukrainian scientific pharmacopoeial center for quality of medicines. Kharkiv. 2015. Vol. 1. 1128 p.
- 9 State Pharmacopoeia of Ukraine. Ukrainian scientific pharmacopoeial center for quality of medicines. Kharkiv. 2021. P. 76-77.
- 10 State Pharmacopoeia of Ukraine. Ukrainian scientific pharmacopoeial center for quality of medicines. Kharkiv. 2018. P. 217-219.
- 11 State Pharmacopoeia of Ukraine. Ukrainian scientific pharmacopoeial center for quality of medicines. Kharkiv. 2014. Vol. 3. P. 400-402.
- 12 Kotova E.E., Kotov A.G. Systematization of pharmacopoeial requirements for quality control methods of herbal drugs. Unified spectrophotometric methods. Pharmacom. 2014. №1. 4. P. 22-34.
- 13 Chu K. K., Chow A. H. Impact of carbohydrate constituents on moistures or ption of herbal extracts. Pharmaceutical Research. 2000.17. P. 1133-1137.
- 14 Kotova E.E., Kotov A.G. Systematization of pharmacopoeial requirements for quality control methods of herbal drugs. Unified TLC identification methods. Pharmacom. 2015 №1. P.41-47.

15 Kotov S., Gontova T., Котова Е. Study of the chromatographic profile of the combined herbal drug extract. Proceedings of the scientific and practical conference «The State Pharmacopoeia of Ukraine – European quality of domestic medicines». Kharkiv. 25-26 November 2021. Pharmacom. 2021. 1/4. P. 65-69.