

ЛІСОВИЙ ВАДИМ

Київський національний університет технологій та дизайну

<https://orcid.org/0000-0002-8038-0650>e-mail: v.lisovyi@kyivpharma.eu

БЕССАРАБОВ ВОЛОДИМИР

Київський національний університет технологій та дизайну

<https://orcid.org/0000-0003-0637-1729>e-mail: v.bessarabov@kyivpharma.eu

ГОЙ АНДРІЙ

Київський національний університет технологій та дизайну

<https://orcid.org/0009-0004-7044-4050>e-mail: goy.am@knutd.edu.ua

КОСТЮК ВІКТОР

Київський національний університет технологій та дизайну

<https://orcid.org/0000-0001-5454-4247>e-mail: kostiuk.vh@knutd.edu.ua

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ГЕСПЕРИДИНУ У СКЛАДІ ПОЛІМЕРНОГО КОМПОЗИЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ, ОТРИМАНОВОГО МЕТОДОМ ВІДЦЕНТРОВОГО ФОРМУВАННЯ ВОЛОКОН

Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення біофлавоноїда гесперидину у складі полімерних композиційних матеріалів, а саме у твердих дисперсних системах, отриманих методом відцентрового формування волокон. Запропонована методика базується на якійсній реакції гесперидину з ферум (III) хлоридом, у результаті чого утворюється сполука зеленого кольору, максимальне оптичне поглинання якої спостерігається при довжині хвилі 602 нм. Досліджено валідаційні характеристики розробленої методики, зокрема лінійність, прецизійність, специфічність та стабільність. Валідація запропонованої методики здійснювалася відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ). Спектрофотометричні вимірювання здійснювали за допомогою УФ-спектрофотометра OPTIZEN POP (Mecasys, Південна Корея) у кюветках з кварцового скла з товщиною оптичного шару 1 см (Agilent, США).

У ході проведених експериментальних досліджень доведено, що довжина хвилі 602 нм є специфічною для визначення кількісного вмісту гесперидину у відцентрово сформованих твердих дисперсних системах, що підтверджує аналіз абсорбційних спектрів супутніх речовин. Встановлено, що розроблена спектрофотометрична методика кількісного визначення гесперидину у складі полімерних твердих дисперсних систем із використанням 0,3 н феруму (III) хлориду є лінійною ($R^2=0,997$) в діапазоні концентрацій гесперидину 80–120 %. Довірчий інтервал для збіжності та відтворюваності аналізу не перевищує максимально допустимі межі, що свідчить про прецизійність методики. При зміні довжини хвилі на ± 2 нм стандартне відхилення отриманих результатів становить 0,12%, що доводить стабільність системи.

Доведено, що всі обрані валідаційні характеристики спектрофотометричної методики кількісного визначення гесперидину у відцентрово сформованих твердих дисперсних системах відповідають критеріям прийнятності. Зроблено висновок, що запропонована методика валідна.

Ключові слова: гесперидин, полімерний композиційний матеріал, відцентрове формування волокон, тверді дисперсні системи, валідація, спектрофотометрія.

LISOVYI VADYM, BESSARABOV VOLODYMYR, GOY ANDRIY, KOSTIUK VIKTOR

Kyiv National University of Technologies and Design

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINING THE ASSAY OF HESPERIDIN IN THE COMPOSITION OF POLYMER COMPOSITE MATERIAL OBTAINED BY CENTRIFUGAL FIBER FORMATION

A spectrophotometric method for the assay of the bioflavonoid hesperidin in polymer composite materials, namely in solid dispersed systems obtained by the method of centrifugal fiber formation, has been developed. The proposed method is based on the qualitative reaction of hesperidin with ferric (III) chloride, resulting in the formation of a green compound with a maximum optical absorption at a wavelength of 602 nm. The validation characteristics of the developed method, in particular, linearity, precision, specificity, and stability, were investigated. The validation of the proposed method was carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU). Spectrophotometric measurements were performed using an OPTIZEN POP UV spectrophotometer (Masys, South Korea) in quartz glass cuvettes with an optical layer thickness of 1 cm (Agilent, USA).

In the course of the experimental studies, the wavelength of 602 nm is specific for determining the assay of hesperidin in centrifugally formed solid dispersed systems, which is confirmed by the analysis of the absorption spectra of related substances. It was found that the developed spectrophotometric method for the quantitative determination of hesperidin in polymeric solid dispersed systems using 0.3 n of ferric (III) chloride is linear ($R^2= 0.997$) in the range of hesperidin concentrations of 80–120 %. The confidence interval for the convergence and reproducibility of the analysis does not exceed the maximum permissible limits, which indicates the accuracy of the method. When changing the wavelength by ± 2 nm, the standard deviation of the results obtained is 0.12%, which proves the stability of the system.

It is proved that all the selected validation characteristics of the spectrophotometric method for the assay of hesperidin in centrifugally formed solid dispersed systems meet the acceptance criteria. We concluded that the proposed methodology is valid.

Keywords: hesperidin, polymeric composite material, centrifugal fibre formation, solid dispersion systems, validation, spectrophotometry.

Постановка проблеми

Перспективним напрямом досліджень сучасної фармації є вивчення біологічної активності сполук рослинного походження, перевагами яких над синтетичними є м'яка фізіологічна дія, мінімальна токсичність, відсутність звикання та пригнічення імунітету, можливість тривалого використання тощо [1]. Серед широкого спектру біологічно активних речовин рослинного походження особливе місце належить флавоноїдам. Відомим представником групи біофлавоноїдів, цікавим з точки зору фармакологічних властивостей, є гесперидин, який міститься у високій концентрації в шкірці цитрусових [2]. Відомо, що гесперидин проявляє низку фармакологічних властивостей, зокрема антиоксидантну, протиракову, антибактеріальну, протигрибкову, протидіабетичну, нейропротекторну, протизапальну та чинить сприятливу дію на серцево-судинну систему [2].

Головним недоліком більшості природних флавоноїдів, в тому числі і гесперидина, є низька розчинність у воді, що призводить до зниженої біодоступності та повільної абсорбції з кишково-шлункового тракту при пероральному застосуванні лікарських засобів (ЛЗ) на його основі [3]. Тому існує нагальна потреба в розробці методів підвищення розчинності гесперидину у водних розчинах.

У науково-літературних джерелах повідомляється, що для покращення розчинності гесперидину у водному середовищі було застосовано декілька методів, зокрема введення АФІ в наноемульсію [4] та наносуспензію [5], комплексоутворення з β -циклодекстрином [6], а також метод утворення полімерних композиційних матеріалів у вигляді твердих дисперсних систем (ТДС) [7]. Повідомляється про велику кількість різноманітних технік утворення твердих дисперсій, серед яких є випаровування розчинника, екструзія гарячого розплаву, розпилювальне сушіння, електроформування волокон тощо [8]. У літературних джерелах повідомляється, що відносно новим багатообіцяючим методом утворення ТДС є відцентрове формування волокон [9, 10]. За допомогою даної техніки можна утворити полімерні композити у вигляді волокон різного розміру. У даному процесі матеріал поміщають у попередньо нагріту або кімнатної температури обертову головку, яка має отвори для бічних сопел. Вона обертається з високою швидкістю в діапазоні 3000–15 000 об/хв при цьому відцентрова сила проштовхує розплавлену масу через отвори головки, в результаті чого на колекторі осідає утворений композит у вигляді волокон [11]. Загалом, кількість полімерних твердих дисперсій, утворених за допомогою відцентрового формування нині досить невелика, адже це відносно нова технологія у фармацевтичній сфері. Однак результати застосування відцентрового формування волокон на практиці доводять, що цей підхід має великий потенціал за рахунок інноваційного дизайну технології в галузі твердих дисперсних систем. Тому з метою утворення твердих дисперсних систем для підвищення розчинності гесперидину було обрано саме цей метод.

Для отримання коректних результатів щодо ступеня підвищення розчинності гесперидину у складі полімерних композитів, отриманих методом відцентрового формування волокон необхідно підібрати відповідну методику визначення кількісного вмісту АФІ в отриманих ТДС. Методика повинна бути простою, показувати точний вміст речовини у виготовленому зразку та бути специфічною.

Аналіз останніх джерел

Згідно з аналізом літературних джерел встановлено, що кількісне визначення концентрації гесперидину зазвичай проводять з використанням спектрофотометричного методу. Гесперидин має пік поглинання при довжині хвилі 284 нм [12]. Але цей метод досить складно застосовувати для кількісного визначення вмісту гесперидину у складі відцентрово сформованих твердих дисперсних систем, оскільки речовини, які зазвичай використовуються у даному процесі, зокрема сахароза та фармацевтично прийнятний полімер полівінілпіролідон (ПВП), після переплавлення у головці установки для відцентрового формування волокон, поглинають світло орієнтовно у тій же області.

Відомо, що флавоноїди здатні утворювати комплекси жовтого кольору з солями алюмінію. У випадку реакції гесперидину з алюмінію (III) хлоридом отримуємо продукт інтенсивного жовтого забарвлення, абсорбційний максимум якого знаходиться при довжині хвилі 410 нм і який також перекривається спектрами поглинання полімерних носіїв твердої дисперсної системи. Однак дану реакцію можна дещо модифікувати: при додаванні нітриту натрію і гідроксиду натрію утворюється сполука рожевого кольору, яка поглинає світло за довжини хвилі 510 нм [13]. Але ця реакція не є якісною на гесперидин, тому, відповідно, її неможливо використати.

Також доведено, що якісною реакцією на флавоноїди є реакція з хлоридом феруму (III). Забарвлення розчину флавоноїдів варіюється від темно-зеленого до синьо-чорного в залежності від досліджуваної сполуки [14]. У ході досліджень встановлено, що гесперидин у складі полімерного композиційного матеріалу, отриманого методом відцентрового формування волокон, реагує з FeCl_3 , утворюючи сполуку темно-зеленого кольору. Тому можна стверджувати, що дана реакція підходить для визначення вмісту гесперидину у відцентрово сформованих полімерних твердих композитах, адже довжина хвилі поглинання суміші дорівнює 602 нм, і, відповідно, полімерні носії та допоміжні речовини, що використовуються для приготування ТДС не заважатимуть визначенню продукту реакції.

Метою роботи є розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гесперидину у полімерних композиційних матеріалах, отриманих методом відцентрового формування волокон.

Виклад основного матеріалу

У ході досліджень розроблено методику кількісного визначення гесперидину у відцентрово сформованих полімерних ТДС із використанням феруму (III) хлориду. Валідація запропонованої методики здійснювалася відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [15].

Реактиви та обладнання. При проведенні експериментальних досліджень використовували наступні реактиви: гесперидин (Chengdu Okay Pharmaceutical Co., LTD, Китай); полівінілпіролідон (JRS Pharma GmbH & Co.KG, Німеччина); хлорид феруму (III) (Макрохім, Україна); вода очищена; диметилсульфоксид (Merck, Німеччина).

У ході досліджень застосовували наступне обладнання та допоміжні матеріали: ваги аналітичні AS 60/220. R2 (Radwag, Польща); установку для виготовлення цукрової вати (Китай); лабораторну установку водопідготовки RO-4 (Werner, Німеччина); лабораторну мікроцентрифугу CM-3 (Micromed, КНР); пробірки типу Eppendorf об'ємом 2 мл; таймер; УФ-спектрофотометр OPTIZEN POP (Mecasys, Південна Корея); кювети з кварцового скла з товщиною оптичного шару 1 см (Agilent, США); термостат для кювет DB-10C (Biosan, Латвія); одноканальні напівавтоматичні дозатори об'ємами 50, 200, 1000 мкл (Dragon-Lab, Китай); лабораторний посуд.

Методика отримання твердих дисперсних систем гесперидину. Полімерний композиційний матеріал гесперидину у вигляді волокнистих твердих дисперсних систем готували на установці для виготовлення цукрової вати. У обертовій головці цієї установки розплавляли суміш гесперидину та полівінілпіролідону (відсоткове співвідношення АФІ:полімер становило 1:99) при температурі 160-180 °С. Через декілька хвилин на установці встановлювали швидкість обертання і розплав суміші вилітав крізь фільтри головки за рахунок відцентрової сили та застигав у вигляді волокон твердих дисперсій гесперидину.

Методика визначення кількісного вмісту гесперидину у складі твердих дисперсних систем, отриманих методом відцентрового формування волокон.

Приготування розчину ТДС гесперидину: тверду дисперсну систему гесперидину, одержану методом відцентрового формування волокон подрібнювали у ступці, зважували та розчиняли зазначену кількість у 1,0 мл води очищеної при 25°C на термошейкері протягом 30 хвилин. Потім досліджуваній розчин центрифугували протягом 20 хв (6000 об/хв) і використовували надосадову рідину для подальшого аналізу.

Приготування 0,3 н розчину ферум (III) хлориду: у мірну колбу на 200,0 мл вносили 5,40 г FeCl_3 , додавали 100,0 мл води очищеної, розчиняли та доводили об'єм розчину до позначки.

Приготування досліджуваного розчину: У результаті реакції гесперидину у складі відцентрово сформованих твердих дисперсних систем з ферумом (III) хлоридом утворився продукт зеленого кольору, абсорбційний максимум якого спостерігається за довжини хвилі 602 нм.

Під час процедури валідації запропонованої методики спектрофотометричного визначення кількісного вмісту гесперидину у відцентрово сформованих полімерних твердих дисперсіях із використанням 0,3 н розчину FeCl_3 були визначені наступні валідаційні параметри: специфічність, лінійність, прецизійність та стабільність системи.

Специфічність

Специфічність – здатність аналітичної методики здійснювати однозначну оцінку кількісного вмісту аналізованої речовини у присутності інших компонентів. Для валідації запропонованої методики за параметром «Специфічність» було записано спектри поглинання досліджуваного зразка та всіх супутніх речовин. Результати представлено на рисунку 1.

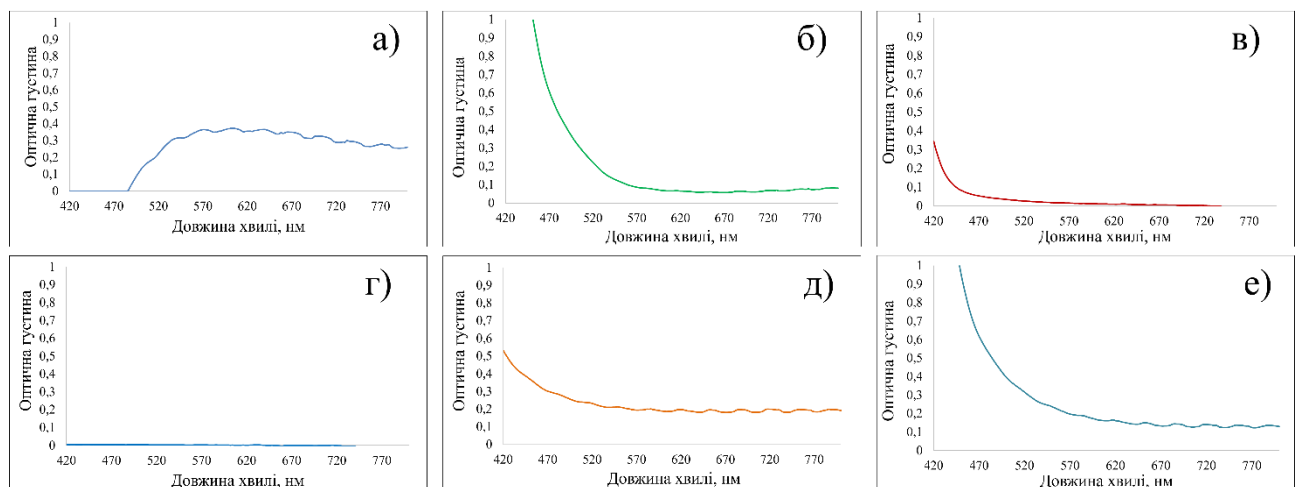


Рис. 1. Спектри оптичного поглинання: а) продукту реакції ферум (III) хлориду з гесперидином у складі полімерної відцентрово сформованої ТДС; б) розчину ферум (III) хлориду; в) розчину гесперидину (1 г/л) у диметилсульфоксиді; г) розчину диметилсульфоксиду; д) розчину відцентрово сформованих полімерних волокон з полівінілпіролідону; е) розчину відцентрово сформованої полімерної ТДС на основі полівінілпіролідону та гесперидину (1%)

Аналіз спектрів показав, що максимуми поглинання супутніх сполук за заданої довжини хвилі відсутні, отже, довжина хвилі специфічна для аналізованої речовини.

Лінійність

Лінійність спектрофотометричної методики – це здатність забезпечити пряму пропорційність між сигналом детектора (оптичним поглинанням) і концентрацією (в даній області) аналізованого компонента в розчині.

У запропонованій методиці аналізована речовина – продукт реакції гесперидину у складі ТДС з хлоридом феруму (III). Концентрація аналізованої речовини відповідає концентрації полімерного композиту гесперидину в розчині, тому варіацію концентрацій можна зробити на рівні розчинення ТДС у воді очищеній.

Для валідації методики за параметром «Лінійність» записували спектри поглинання розчинів, що містять полімерну ТДС гесперидину у формі волокон, отриману з суміші ПВП і гесперидину при концентрації гесперидину 1%, у концентраціях (г/л): 40, 45, 50, 55, 60, що відповідає концентраційним рівням (%): 80; 90; 100; 110 і 120.

Розчини вимірювали та готували відповідно до методики, на кожному концентраційному рівні здійснювали по три виміри. Приготування розчинів для визначення лінійності показано в таблиці 2.

Таблиця 2

Склад розчинів для визначення параметра «Лінійність»

№	Концентраційний рівень, %	Концентрація, г/л	Об'єм розчину ТДС гесперидину 1 г/л, мкл	Об'єм води очищеної, мкл
1	80	0,40	400	600
2	90	0,45	450	550
3	100	0,50	500	500
4	110	0,55	550	450
5	120	0,60	600	400

Статистичні розрахунки виконувалися у програмному забезпеченні Microsoft Excel для Microsoft 365. Результати представлено в таблиці 3.

Таблиця 3

Дані випробування за параметром «Лінійність»

Конц. рівень, %	Оптичне поглинання						За рівнянням регресії		
	Вимір № 1	Вимір № 2	Вимір № 3	Сер.	Відх.	%	Знач.	Відх.	%
80	0,381	0,376	0,390	0,3823	0,00710	0,02	0,3843	0,001	0,37
90	0,432	0,441	0,445	0,4393	0,00665	0,01	0,4313	0,005	1,31
100	0,476	0,485	0,490	0,4837	0,00709	0,01	0,4783	0,004	0,80
110	0,526	0,537	0,541	0,5346	0,00776	0,02	0,5253	0,007	1,25
120	0,576	0,582	0,590	0,5827	0,00702	0,02	0,5723	0,007	1,28
Сума квадратів відхилень							0,0002544		
Залишкове стандартне відхилення							0,00798		

Був побудований графік в координатах концентраційний рівень (%) – площа піку (Рис. 2) та знайдені коефіцієнт рівняння лінійної регресії; коефіцієнт кореляції; залишкове стандартне відхилення.

Залишкове стандартне відхилення σ обчислено за формулою 1:

$$\sigma = \sqrt{\sum / (N - 1)}, \quad (1)$$

де \sum – сума квадратів відхилень від рівняння регресії;
N – кількість точок лінії регресії.

Коефіцієнт кореляції в інтервалі концентрацій 80-120% розчину гесперидину у складі відцентрово сформованих полімерних твердих дисперсних систем становить 0,9967. Оскільки значення коефіцієнту кореляції перевищує 0,99, то можна стверджувати, що методика є лінійною.

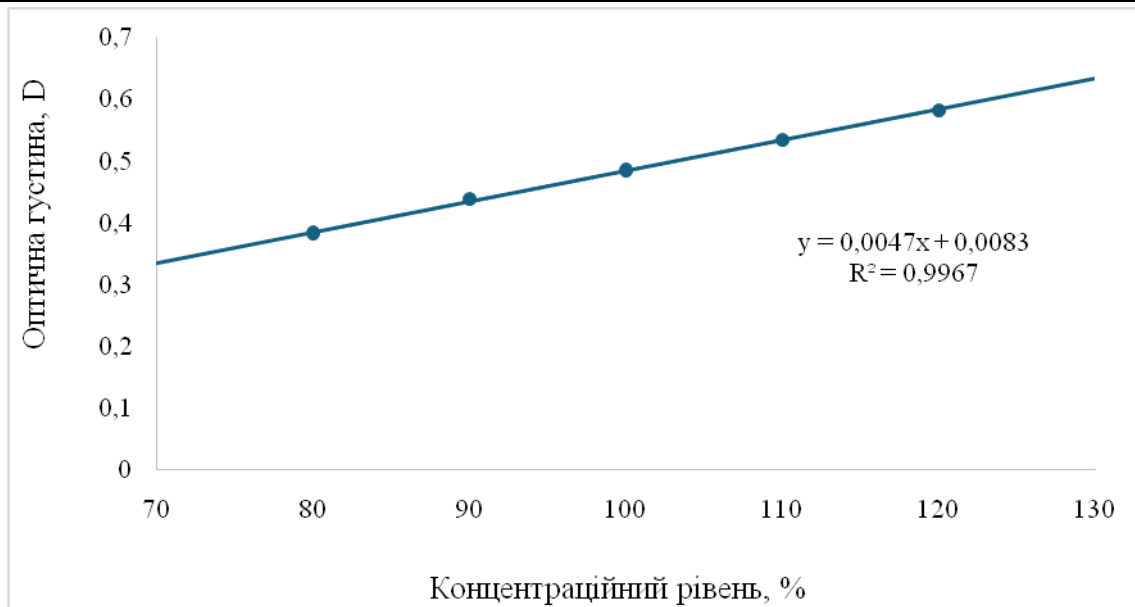


Рис. 2. Графік лінійності валідованої методики

Прецизійність

Прецизійність аналітичної методики виражається ступенем розсіювання значень вимірюваної величини, отриманих при вимірюваннях на декількох пробах одного і того ж однорідного зразка в одних умовах, навколо центру групування (середнього арифметичного).

Прецизійність визначається на двох рівнях: відтворюваність і збіжність.

Збіжність визначається як міра прецизійності при вимірах в одних умовах за короткий проміжок часу.

Для валідації методики по пункту «прецизійність – збіжність» відповідно до запропонованої методики проведено 9 повторних вимірів оптичної густини та обчислено середнє значення, значення стандартного відхилення і довірчого інтервалу (Табл. 4).

Відтворюваність методики визначено як внутрішньо лабораторна збіжність, тобто вся процедура, описана для «збіжності» виконується через день, іншим оператором (аналітик 2). Після цього обчислюється відтворюваність методики як довірчий інтервал середніх вимірів першого і другого аналітиків.

Таблиця 4

Дані випробування за параметром «Прецизійність»

Параметр	Аналітик 1	Аналітик 2
Вимір 1	0,939	0,954
Вимір 2	0,943	0,930
Вимір 3	0,940	0,930
Вимір 4	0,933	0,938
Вимір 5	0,936	0,940
Вимір 6	0,923	0,956
Вимір 7	0,931	0,912
Вимір 8	0,926	0,922
Вимір 9	0,915	0,95
Середнє значення	0,932	0,937
Стандартне відхилення	0,009	0,015
Стандартне відхилення, %	2,250	3,500
Довірчий інтервал	0,009	0,015
Відтворюваність, довірчий інтервал, %	0,97	

У ході експериментальних досліджень встановлено, що для збіжності методики довірчий інтервал становить 0,014 (<0,5%), для відтворюваності – 0,97% (<1,0%), отже, прецизійність методики підтверджено.

Стабільність системи

Стабільність аналітичної методики визначається її здатністю не реагувати на вплив невеликих, але навмисних змін параметрів методики і є показником надійності методики при використанні в нормальних умовах.

Для валідації запропонованої методики за параметром «Стабільність» оцінювали вплив зміни довжини хвилі на результати методики. Записували значення детектора тричі при довжини хвилі, нм: 600; 602; 604, для визначення впливу на оптичне поглинання довжини хвилі (таблиця 5).

Таблиця 5

Залежність оптичного поглинання від довжини хвилі

Довжина хвилі, нм	Вимір № 1	Вимір № 2	Вимір № 3	Середнє значення	Стандартне відхилення	Стандартне відхилення, %
600	0,701	0,704	0,705	0,703	0,002	0,290
602	0,703	0,708	0,711	0,707	0,004	0,560
604	0,698	0,696	0,702	0,699	0,003	0,430
Загальне				0,703	0,004	0,560

При відхиленні довжини хвилі на ± 2 нм стандартне відхилення становить 0,56%, що є менше за 1,0%, що підтверджує стабільність системи.

Загальні висновки валідації

Загальні висновки валідації спектрофотометричної методики визначення кількісного вмісту гесперидину у складі твердих дисперсних систем, отриманих методом відцентрового формування волокон, наведено у таблиці 6.

Таблиця 6

Результати валідації методики визначення концентрації гесперидину за параметрами та критеріями прийнятності

№	Параметр	Критерій прийнятності	Результати валідації
<i>Кількісне визначення</i>			
1	Специфічність	Довжина хвилі детектора має бути специфічною виключно для аналізу.	Відповідає
2	Лінійність	Коефіцієнт кореляції в інтервалі концентрацій 80-120% не менше 0,990.	0,997
3	Прецизійність:	Довірчий інтервал Δ не більше 0,5%; Довірчий інтервал Δ не більше 1,0%.	0,014%
	збіжність		0,97%
<i>Загальні параметри</i>			
4	Стабільність системи	Довжина хвилі детектора	Відповідає

Результати валідації методики визначення концентрації гесперидину за параметрами та критеріями прийнятності свідчать про валідність методики у відповідності до вимог ДФУ 2.0.

Висновки

Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення гесперидину у складі полімерного композиційного матеріалу, отриманого методом відцентрового формування волокон. Запропонована методика базується на якісній реакції гесперидину з ферум (III) хлоридом, у результаті чого утворюється сполука зеленого кольору, максимальне оптичне поглинання якої спостерігається при довжині хвилі 602 нм. Доведено, що за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, прецизійність, специфічність та стабільність досліджуваної системи запропонована методика валідна.

Література

1. Chaachouay, N.; Zidane, L. Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development. *Drugs Drug Candidates* 2024, 3, 184-207. <https://doi.org/10.3390/ddc3010011>
2. Ji, Z., Deng, W., Chen, D., Liu, Z., Shen, Y., Dai, J., Zhou, H., Zhang, M., Xu, H., & Dai, B. (2024). Recent understanding of the mechanisms of the biological activities of hesperidin and hesperetin and their therapeutic effects on diseases. *Heliyon*, 10(5), e26862. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26862>

3. Cao, R., Zhao, Y., Zhou, Z., & Zhao, X. (2018). Enhancement of the water solubility and antioxidant activity of hesperidin by chitoooligosaccharide. *Journal of the science of food and agriculture*, 98(6), 2422–2427. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8734>
4. Shailesh, S. C., Sanjay, J. S., Sameer, N. G., Kaushalendra, K. C., Pankaj, V. D. (2021). Solid self-microemulsifying nutraceutical delivery system for hesperidin using quality by design: assessment of biopharmaceutical attributes and shelf-life. *Journal of Microencapsulation*, 38(1), 61-79. <https://doi.org/10.1080/02652048.2020.1851788>
5. Wei, Q., Keck, C. M., & Müller, R. H. (2018). Solidification of hesperidin nanosuspension by spray drying optimized by design of experiment (DoE). *Drug development and industrial pharmacy*, 44(1), 1-12. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1285309>
6. Wdowiak, K., Rosiak, N., Tykarska, E., Żarowski, M., Płazińska, A., Płaziński, W., & Cielecka-Piontek, J. (2022). Amorphous Inclusion Complexes: Molecular Interactions of Hesperidin and Hesperetin with HP-B-CD and Their Biological Effects. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 4000. <https://doi.org/10.3390/ijms23074000>
7. Colombo M, Michels LR, Teixeira HF, et al. Flavonoid delivery by solid dispersion: a systematic review. *Phytochem Rev*. 2022;21:783-808. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09763-3>
8. Bhujbal SV, Mitra B, Jain U, et al. Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies. *Acta Pharm Sin B*. 2021;11(8):2505-2536. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.05.014>
9. Marano, S., Barker, S. A., Raimi-Abraham, B. T., Missaghi, S., Rajabi-Siahboomi, A., & Craig, D. Q. M. (2016). Development of micro-fibrous solid dispersions of poorly water-soluble drugs in sucrose using temperature-controlled centrifugal spinning. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 103, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.03.021>
10. Hussain, A., Hussain, F., Arshad, M. S., Abbas, N., Nasir, S., Mudassir, J., Mahmood, F., & Ali, E. (2021). Ibuprofen-loaded centrifugally spun microfibers for quick relief of inflammation in rats. *Drug development and industrial pharmacy*, 47(11), 1786–1793. <https://doi.org/10.1080/03639045.2022.2059500>
11. Bitay, E., Gergely, A. L., & Szabó, Z. I. (2023). Optimization and Production of Aceclofenac-Loaded Microfiber Solid Dispersion by Centrifugal Spinning. *Pharmaceutics*, 15(9), 2256. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092256>
12. Mazzaferro, L. S., & Breccia, J. D. (2012). Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase. *Food chemistry*, 134(4), 2338–2344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.107>
13. Derouich, M., Bouhlali, E. D. T., Bammou, M., Hmidani, A., Sellam, K., & Alem, C. (2020). Bioactive Compounds and Antioxidant, Antiperoxidative, and Antihemolytic Properties Investigation of Three Apiaceae Species Grown in the Southeast of Morocco. *Scientifica*, 2020, 3971041. <https://doi.org/10.1155/2020/3971041>
14. Rakkimuthu, R., S. Palmurugan, and A. Shanmugapriya. "Effect of temperature, light, pH on the stability of anthocyanin pigments in cocculus hirsutus fruits." *International Journal of Multidisciplinary Research and Modern Education* 2.2 (2016): 91-96. <https://doi.org/10.5281/zenodo.61818>
15. Validation of analytical methods and tests. State Pharmacopoeia of Ukraine. State Enterprise "Scientific Expert Pharmacopoeia Center". 2nd edition. Kharkiv: State enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products". 2015;1:910-929.