

ФАРМАЦІЯ

УДК 661.1:615.4

DOI <https://doi.org/10.32782/health-2024.2.15>ОЦІНЮВАННЯ ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ГІАЛУРОНАТУ НАТРІЮ В МЕДИЧНИХ ВИРОБАХ – ІМПЛАНТАТАХ
ІН'ЄКЦІЙНИХ

Бондарець Інна Русланівна,
аспірантка кафедри фармацевтичної хімії
Національного фармацевтичного університету
ORCID: 0009-0004-0286-3966

Георгіянц Вікторія Акопівна,
доктор фармацевтичних наук, професор,
завідувач кафедри фармацевтичної хімії
Національного фармацевтичного університету
ORCID: 0000-0001-8794-8010

Станом на тепер одними з найбільш поширених та популярних медичних виробів є ін'єкційні імпланти на основі гіалуронової кислоти. Така поширеність зумовлена широким спектром властивостей гіалуронату натрію, які знайшли своє застосування в багатьох галузях медицини, як-от косметологія, офтальмологія, хірургія, дерматологія тощо. Враховуючи, що згадані вище продукти є медичними виробами найвищого класу ризику, критично необхідним для кожного виробника є проведення контролю якості готової продукції за визначеними характеристиками якості. Однією з ключових характеристик якості медичного виробу є кількісний вміст гіалуронату натрію як основного компонента, від якого залежить ефективність застосування продукту. Для контролю кількісного вмісту гіалуронату натрію було вибрано методику, яка описана в Європейській Фармакопеї для субстанції гіалуронату натрію. У статті продемонстровано процес валідації методики кількісного визначення гіалуронату натрію методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області в лінійці медичних виробів «Імпланти ін'єкційні» на основі незшитої гіалуронової кислоти 1,1%, 18%, 2,2%, 2,5%, 3,3%. Метою валідації є підтвердження можливості використання даної методики для визначення гіалуронату натрію в склади гелю «Імплантату ін'єкційного», який містить низку допоміжних речовин. Авторами представлено отримані експериментальні дані, критерії валідності та статистичні розрахунки, що демонструють валідність методики в досліджуваних умовах та можливість її використання для визначення гіалуронату натрію в готовому медичному виробі.

Ключові слова: валідація, аналітична методика, кількісне визначення, гіалуронова кислота, гіалуронат натрію, медичні вироби.

Inna Bondarets, Victoriya Georgiyants. Assessing the suitability of the method for the quantitative determination of sodium hyaluronate in medical devices of injectable implants

One of the most common and most popular medical device are injectable implants based on hyaluronic acid. Such prevalence is due to a wide range of properties of sodium hyaluronate, which have found their application in many fields of medicine, such as cosmetology, ophthalmology, surgery, dermatology, etc. Given that the above-mentioned products are medical devices of the highest risk class, it is critically necessary for each manufacturer to conduct quality control of finished products according to defined quality characteristics. One of the key characteristics of the quality of a medical device is the quantitative content of sodium hyaluronate as the main component, which depends on the effectiveness of the product. To control the quantitative content of sodium hyaluronate, the method described in the European Pharmacopoeia for the substance sodium hyaluronate was chosen. This article demonstrates the process of validation of the method of quantitative determination of sodium hyaluronate by the method of absorption spectrophotometry in the ultraviolet region in the line of medical devices for injectable implants based on un-crosslinked hyaluronic acid 1.1%, 18%, 2.2%, 2.5%, 3.3%. The purpose of the validation is to confirm the possibility of using this technique to determine sodium hyaluronate in the gel of the injectable implant, which contains a number of auxiliary substances. The authors present the obtained experimental data, validity criteria and statistical calculations that demonstrate the validity of the technique in the studied conditions and the possibility of its use for the determination of sodium hyaluronate in the finished medical device.

Key words: validation, analytical technique, quantitative definition, hyaluronic acid, sodium hyaluronate, medical products.

Вступ. Валідація аналітичних методик є важливим елементом у виробництві, а саме в контролі якості фармацевтичної продукції. Щодо медичних виробів значимість валідації та необхідність у підвищеному контролі якості є обов'язковим етапом для медичних виробів III, тобто найвищого класу ризику, як-от «Імпланти ін'єкційні на основі гіалуронату натрію». Гіалуронат натрію – це ключовий компонент у багатьох медичних та косметичних продуктах, тому точне визначення його концентрації має велике значення для забезпечення ефективності продукту та безпеки його застосування.

Імпланти ін'єкційні на основі гіалуронату натрію стають усе більш популярними в медичних галузях, оскільки гіалуронат натрію – це полісахарид, який має унікальні властивості, що робить його ідеальним компонентом для використання у фармацевтичних продуктах у сфері ортопедії [1; 2; 3] (відновлення рухливості суглобів), косметології [4] (зволоження тканин, збільшення об'єму губ, контурна пластика), дерматології [5; 6] (лікування опіків, посттромботичних трофічних порушень шкіри), офтальмології [7; 8] (пересадка рогівки, лікування катаракти, глаукоми) тощо.

Згідно з Постановою від 2 жовтня 2013 р. № 753 Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів [9], кожен виробник зобов'язаний гарантувати безпечність та ефективність застосування медичного виробу, на що безпосередньо впливає кількісний вміст основного компоненту – гіалуронату натрію – у готовому продукті.

Для аналізу кількісного вмісту гіалуронату натрію виробники здебільшого використовують для контролю лікарських форм метод рідинної хроматографії, що набув високої популярності і має беззаперечні переваги перед іншими методами, особливо для визначення наявності певних речовин. Умови і підтвердження коректності таких методик наведено українськими [12], індійськими [13], турецькими [14], китайськими [15] вченими.

Методика визначення кількісного вмісту субстанції гіалуронату натрію описана і в Європейській фармакопеї (Ph.Eur) [10]. Для цього рекомендовано використовувати абсорбційну спектрофотометрію в УФ- та видимій області. Визначення ґрунтується на вимірюванні оптичної густини комплексу гіалуронату натрію по реакції з карбазолом. Фактично реакція відбувається за рахунок D-глюкуронової кислоти, що є одним із

компонентів у структурі глікозаміноглікану – гіалуронової кислоти [16].

Незважаючи на це, навіть використання фармакопейної методики вимагає підтвердження її коректності в разі застосування в лікарських формах, сумішах тощо. У статті описано імпланти ін'єкційні, для виробництва яких випускають додавання допоміжних речовин хлориду натрію, сукцинату натрію та бурштинової кислоти. Додавання цих речовин може вплинути на результати кількісного визначення, тому підтвердженням коректності застосування цієї методики для імплантів може слугувати відповідність критеріям невизначеності, отримана в ході процедури валідації за вимогами ДФУ [11].

Мета та завдання. Метою роботи є представлення валідації методики кількісного визначення гіалуронату натрію в лінійці імплантів ін'єкційних на основі незшитої гіалуронової кислоти різної концентрації, що випускаються у формі в'язкого гелю.

Методи дослідження. Для валідації та підтвердження можливості застосування методики кількісного визначення гіалуронату натрію в медичному виробі «Імплант ін'єкційний» (далі – Імплант) було вибрано методику кількісного визначення гіалуронату натрію, наведену в монографії Sodium hyaluronate [9067-32-7] Ph.Eur [10], методом абсорбційної спектрофотометрії згідно з монографією Ph.Eur 2.2.25.

Вимірювання проводилось на спектрофотометрі Perkin Elmer Lambda 25, застосовувалися ваги лабораторні електронні RAD WAG AS 200/C, мірний посуд класу А. Вимірювання абсорбції проводилося у видимій області спектра в прямокутних кварцових кюветах із товщиною шару 1 см на фоні компенсаційного розчину. Статистичне оброблення та визначення валідаційних характеристик проводилося відповідно до вимог ДФУ.

Методика визначення.

Приготування реагенту А: розчиняють 0,95 г динатрію тетраборату Р в 100,0 мл сірчаної кислоти Р.

Приготування реагенту В: розчиняють 0,125 г карбазолу Р в 100,0 мл безводного етанолу Р.

Приготування розчину порівняння (вихідний розчин): розчиняють 0,100 г D-глюкуронової кислоти Р, попередньо висушеної у вакуумі над дифосфору пентоксидом (2.2.32) до постійної маси, у воді Р та доводять до 100,0 мл тим самим розчинником. 10,0 мл одержаного розчину розводять до 200,0 мл водою Р.

Приготування розчинів порівняння: Готують 5 розведень вихідного розчину порівняння з вмістом 6,5 мкг/мл, 21,2 мкг/мл, 35,8 мкг/мл, 50,4 мкг/мл, 65 мкг/г D-глюкуронової кислоти.

Досліджувані розчини: наважку Імплантату відповідної концентрації перенесли в мірний стакан, додали воду масою, визначеною за формулою:

$$m_{H_2O} = \frac{m_{impl} * W}{m_{гк}} - m_{impl},$$

де m_{H_2O} – необхідна маса води, m_{impl} – маса Імплантату, W – передбачуваний вміст гіалуронату натрію в Імплантаті, %, $m_{гк}$ – необхідний вміст гіалуронату натрію в кінцевому розчині, %.

Було приготовано 4 зразки досліджуваного розчину однієї концентрації та проведено підготовку розчину аналогічно до розчинів порівняння згідно з методикою, описаною в Ph.Eur 2.2.25.

У пробірки з номерами від 1 до 15 додають по 1,0 мл розчинів порівняння, по 3 кожної концентрації (пробірки порівняння). У пробірку 16 – 1,0 мл води Р (холостий розчин).

У три окремі пробірки наливають по 1,0 мл випробовуваного розчину, одержаного з Імплантату (тест-пробірки). До кожної пробірки додають 5,0 мл свіжоприготованого реагенту А, попередньо охолодженого в льодяній воді. Щільно закривають пробірки пластиковими кришками, збовтують і поміщають у водяну баню на 15 хвилин. Потім охолоджують у льодяній бані та додають до кожної пробірки 0,20 мл реагенту В. Знов закривають пробірки, збовтують та поміщають у водяну баню на 15 хвилин. Пробірки охолоджують до кімнатної температури і вимірюють поглинання (2.2.25) розчинів

за довжини хвилі 530 нм щодо холостого розчину.

На основі отриманих результатів поглинання розчинів порівняння було побудовано калібрувальну криву за середнім значенням оптичної густини, визначеної для кожної з п'яти концентрацій.

За калібрувальною кривою визначають концентрацію D-глюкуронової кислоти в досліджуваних розчинах. Концентрація гіалуронату натрію в процентах визначається за формулою:

$$C = \frac{C_g}{C_s} * Z * \frac{\omega}{100 - \lambda} * \frac{401,3}{194,1},$$

де ω – вміст гіалуронату натрію в медичному виробі, %; C_g – концентрація D-глюкуронової кислоти в досліджуваному розчині, мг/мл; Z – процентний вміст глюкуронової кислоти в D-глюкуроновій кислоті, %; γ – втрата маси в разі висушування в D-глюкурованій кислоті, %; 401,3 – відносна молекулярна маса дисахаридних фрагментів; 194,1 – відносна молекулярна маса глюкуронової кислоти.

Для підтвердження придатності методики було вибрано такі валідаційні характеристики та застосовані для них критерії прийнятності:

1. Специфічність: вміст гіалуронату натрію, визначений за даною методикою, для приготування розчинів гіалуронату натрію 0,011 г/мл, 0,018 г/мл, 0,022 г/мл та 0,033 г/мл повинен збігатися з вмістом гіалуронату натрію в розчинах, приготованих на основі медичного виробу з вмістом гіалуронові кислоти 1,1%, 1,8%, 2,2%, 2,5%, 3,3%. Відносні стандартні відхилення (RSD) не повинні перевищувати 2%;

2. Діапазон застосування методики повинен відповідати мінімально допустимому діапазону

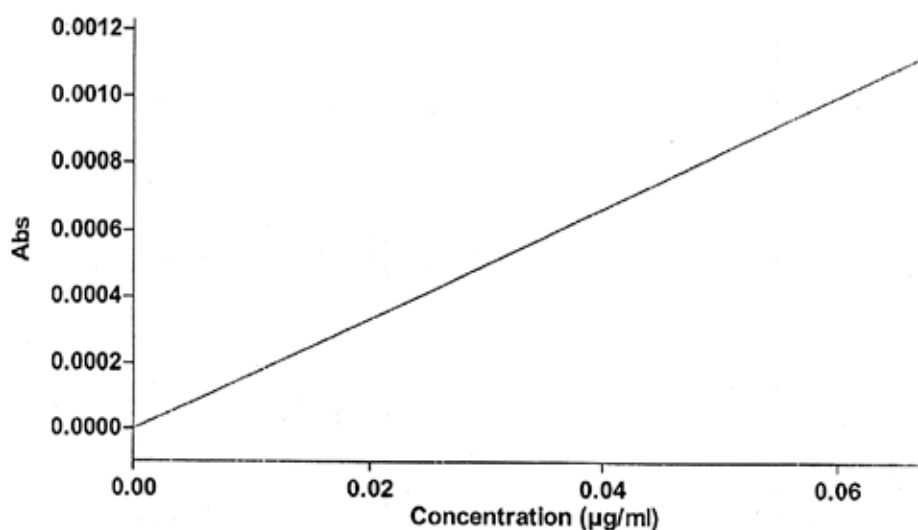


Рис. 1. Калібрувальна крива

застосування методики для кількісного визначення, тобто від 80% до 120% від номінального значення;

3. Правильність: систематична похибка статистично повинна відрізнятися від нуля (відхилення Z від 100% не має перевищувати свій довірчий інтервал). Якщо цей критерій (критерій статистичної незначущості) не виконується, повинен виконуватися критерій практичної незначущості, згідно з яким систематична похибка не повинна перевищувати максимально допустиму невизначеність аналізу;

4. Прецизійність (точність): односторонній довірчий інтервал Δ_Z не повинен перевищувати максимально допустиму невизначеність аналізу Δ_{As} ;

5. Лінійність: підтвердження здатності методики надавати результати, які відповідають кількості аналізованої речовини в зразку.

Результати дослідження. Аналітична методика кількісного визначення гіалуронату натрію в медичних виробках «Імплантати ін'єкційні на основі гіалуронової кислоти» 1,1%, 1,8%, 2,2%, 2,5%, 3,3% передбачає використання методу абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій області. Методика ґрунтується на лінійній залежності оптичної густини досліджуваного розчину від вмісту в ньому гіалуронату натрію.

У результаті випробування та підтвердження специфічності методики було отримано зна-

чення вмісту гіалуронату натрію, які наведено в таблиці 1.

Як видно з таблиці, RSD в усіх випадках не перевищує 2. Відповідно до отриманих результатів, методика є підтвердженою на специфічність визначення гіалуронату натрію в медичному виробі «Імплантат ін'єкційний».

Як видно з таблиці 2, діапазон застосування методики відповідає мінімально допустимому діапазону застосування методики для кількісного визначення від 80% до 120% від номінального значення.

Систематична похибка не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу. Таким чином, виконується критерій практичної незначущості.

Для дослідження лінійності методики було використано модельні розчини 9 концентрацій гіалуронату натрію в межах діапазону методики. Отримані результати наведено в таблиці 3. Лінійність методики представлено на рисунку 2.

За отриманими результатами проведено розрахунки з використанням підходу застосування принципу незначимості та нормалізації координат, рекомендованого ДФУ) [11] «Валідація аналітичних методик і випробувань».

Вимоги до вільного члена (а) – вільний член не повинен перевищувати свій довірчий інтервал (Δ_a), якщо цей критерій (критерій статистичної незначущості) не виконується, повинен викону-

Таблиця 1

Результати дослідження методики на специфічність

№	Досліджувані розчини	Отриманий результат кількісного вмісту гіалуронату натрію, г/мл	RSD
1	Імплантат ін'єкційний на основі гіалуронової кислоти 1,1%	0,0108	1,428
	Приготований зі стандарту розчин гіалуронату натрію 0,0110 г/мл	0,0110	
2	Імплантат ін'єкційний на основі гіалуронової кислоти 1,8%	0,0179	1,414
	Приготований зі стандарту розчин гіалуронату натрію 0,0180 г/мл	0,0182	
3	Імплантат ін'єкційний на основі гіалуронової кислоти 2,2%	0,0212	1,458
	Приготований зі стандарту розчин гіалуронату натрію 0,0220 г/мл	0,0216	
4	Імплантат ін'єкційний на основі гіалуронової кислоти 2,5%	0,0249	0,708
	Приготований зі стандарту розчин гіалуронату натрію 0,0250 г/мл	0,0252	
5	Імплантат ін'єкційний на основі гіалуронової кислоти 3,3%	0,0324	0,479
	Приготований зі стандарту розчин гіалуронату натрію 0,0330 г/мл	0,0327	

Таблиця 2

Аналітичні сигнали, що відповідають вмісту гіалуронату натрію для модельних розчинів,
для підтвердження діапазону застосування

Кількісний вміст у % до номінального (0,085 мг/г)	Аналітичний сигнал	Середній аналітичний сигнал	RSD, %
80	0,237	0,237	0,243
	0,238		
	0,237		
85	0,257	0,257	0,2444
	0,258		
	0,257		
90	0,266	0,266	0
	0,266		
	0,266		
95	0,285	0,286	0,202
	0,286		
	0,286		
100	0,297	0,298	0,194
	0,298		
	0,298		
105	0,314	0,313	0,369
	0,314		
	0,312		
110	0,325	0,325	0
	0,325		
	0,325		
115	0,343	0,343	0,292
	0,344		
	0,342		
120	0,358	0,359	0,161
	0,359		
	0,359		

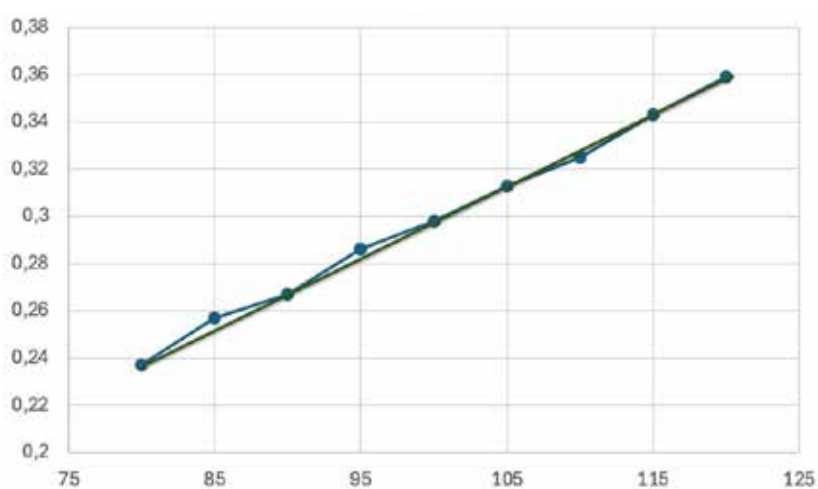


Рис. 2. Лінійність методики

ватись критерій практичної незначущості, згідно з яким внесок вільного члену в невизначеність результату аналізу повинні бути незначущими в порівнянні з максимально допустимою невизначеністю аналізу.

Вільний член a для даної методики дорівнює 0,8807 і є меншим за значення від довірчого інтервалу, якій дорівнює 6,0333.

Приведення концентрації та аналітичних сигналів до нормалізованих координат розраховувалось за формулами:

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} * 100\%, Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} * 100\%, Z_i = \frac{Y_i}{X_i} * 100\%,$$

де X_i та Y_i – нормалізовані координати; Z_i – співвідношення «знайдено/введено» для оцінювання правильності та прецизійності; C_i – концентрація речовини, що аналізується в зразку, що аналізується, мг/мл; C_{st} – концентрація цієї самої речовини в розчині; A_i – аналітичний сигнал для досліджуваного розчину, мг/мл; A_{st} – аналітичний сигнал цієї самої речовини в розчині порівняння, мг/мл.

Розрахунок одностороннього довірчого інтервалу для оцінювання прецизійності методики проводився за формулою:

$$s_z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} = 1,1274$$

$$\Delta_z = s_z(\%) * t(95\%, n-1) \leq \Delta_{As}$$

$$2,0964 \leq 3,2,$$

де Δ_z – односторонній довірчий інтервал; Δ_{As} – максимально допустима невизначеність аналізу; s_y (%) – стандартне відхилення, вира-

жене у відсотках, розраховане для співвідношення «знайдено/введено» для всіх розчинів; $t(95\%; n-2)$ – коефіцієнт Стьюдента для довірчої ймовірності 95% і числа ступеня свободи $n-2$; n – об'єм вибірки.

Односторонній довірчий інтервал не перевищує максимальну недопустиму невизначеність аналізу, що підтверджує точність методики.

Розрахунок RSD проводився за формулою:

$$RSD = s_r * 100\%, s_r = \frac{s}{\bar{x}}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n * \bar{x}^2}{n-1}},$$

де RSD – відносне стандартне відхилення в процентах; s_r – відносне стандартне відхилення; s – дисперсія; \bar{x} – середнє значення вибірки; n – об'єм вибірки.

Вимоги до залишкового стандартного відхилення (S_0) – довірчий інтервал розкиду точок навколо прямої не повинен перевищувати гранично допустиму невизначеність аналізу Δ_{As} . Залишкове стандартне відхилення відповідає 1,2234 і є меншим за 3,2, що задовольняє вимоги.

Розрахунок критеріїв незначущості для оцінювання правильності методики проводився за формулою розрахунку критерію статистичної незначущості та критерію практичної незначущості.

Критерій статистичної незначущості:

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq \frac{\Delta_z}{n}$$

$$0,2657 \leq 0,6988$$

Таблиця 3

Лінійність, правильність та прецизійність методики кількісного визначення гіалуронату натрію методом об'ємного аналізу

Кількісний вміст у % до номінального (0,170 мг/мл)	C_i отримана концентрація, мг/мл	A_i аналітичний сигнал для досліджуваного розчину, мг/мл	Нормалізовані координати X_i	Нормалізовані координати Y_i	Z_i – співвідношення «знайдено/введено»
80%	0,1359	0,1346	79,9412	79,2353	99,1170
85%	0,1445	0,1471	85,0000	86,5295	101,7993
90%	0,1531	0,1502	90,0589	88,3529	98,1058
95%	0,1615	0,1625	95,0000	95,5882	100,6192
100%	0,1700	0,1695	100,0112	99,7189	99,7057
105%	0,1785	0,1789	105,0000	105,2353	100,2241
110%	0,1867	0,1837	109,8235	108,0588	98,3931
115%	0,1955	0,1949	115,0000	114,6470	99,6931
120%	0,2041	0,2040	120,0588	120,0000	99,9510
Cst = 0,1700					
Ast = 0,1700					
max Δ_{As} = 3,2					

Критерій практичної незначущості:

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq \Delta_{As}$$

$$0,2657 \leq 3,2 ,$$

де δ – систематична похибка.

Односторонній довірчий інтервал не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу Δ_{As} .

Довірчий інтервал розкиду точок довкола прямої не перевищує гранично допустиму невизначеність аналізу Δ_{As} . Вимоги до залишкового стандартного відхилення (S0) виконуються.

Критерій статистичної незначущості виконується. Внесок вільного члена в невизначеність результату аналізу не має значення в порівнянні з максимально допустимою невизначеністю аналізу, критерій практичної незначущості виконується.

Вимоги до коефіцієнту кореляції (r) відображено у формулі нижче.

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{\Delta_{As}}{s_{y,t(95\%;n-2)}}\right)^2}$$

$$0,9960 \geq 0,9923 ,$$

де Δ_{As} – невизначеність аналізу; s_y – стандартне відхилення; $t(95\%; n-2)$ – коефіцієнт Стьюдента для довірчої ймовірності 95% і числа ступеня свободи $n-2$.

Вимоги до коефіцієнту кореляції r виконуються.

Таким чином, усі статистичні обрахунки, наведені вище, задовольняють установлені вимоги та підтверджують успішність проведеної валідації.

Висновки. Проведено валідацію методики кількісного визначення гіалуронату натрія в медичних виробках «Імпланти ін'єкційні 1,8%, 2,2%, 2,5%, 3,3%». Отримані результати статистично підтверджують відповідність специфічності, лінійності, правильності та прецизійності аналітичної методики критеріям придатності відповідно до вимог ДФУ, Додаток 2. Відповідно, описана в статті валідація підтверджує можливість використання методики кількісного вмісту гіалуронату натрію в субстанції, наведеної в Європейській фармакопеї, для визначення кількісного вмісту гіалуронату натрію в медичних виробках «Імпланти ін'єкційні» на основі незшитої гіалуронової кислоти у формі гелю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Wenbin Liu, Mengxi Ma, Zehua Lei, Zihuan Hiong, Tenggui Tao, Pengfei Lei, Ige Gu, Hulin Yang, Yun Hiao (2022). Intra-articular injectable hydroxypropyl chitin/hyaluronic acid hydrogel as bio-lubricant to attenuate osteoarthritis progression. *Materials & Design*. 110579. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110579>.
2. John W. Belk B.A., Joseph J. Lim, Carson Keeter M.S., Patrick C. McCulloch M.D., Darby A. Houck B.A., Eric C. McCarty M.D., Rachel M. Frank M.D., Matthew J. Kraeutler M.D. (2023) Patients with Knee Osteoarthritis Who Receive Platelet-Rich Plasma or Bone Marrow Aspirate Concentrate Injections Have Better Outcomes Than Patients Who Receive Hyaluronic Acid: Systematic Review and Meta-analysis. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 39, 1714-1734. DOI: 10.1016/j.arthro.2023.03.001.
3. Alberto Gobbi, Macarena Morales, Giulia Avio, Riccardo D'Ambrosi (2022). Double-blinded prospective randomized clinical trial in knee joint osteoarthritis treatment: safety assessment and performance of trehalose hyaluronic acid versus standard infiltrative therapy based on medium-weight sodium hyaluronate. *Journal of Cartilage & Joint Preservation*. 100043. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcjp.2022.100043>.
4. Vineet Kumar Rai, Ivy Saha, Mahboob Alam, Kumar Nishchaya, Goutam Ghosh, Goutam Rath (2023). Microneedle arrays for cutaneous and transcutaneous drug delivery, disease diagnosis, and cosmetic aid. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 79, 104058. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104058>.
5. Yusuke Shimizu, Edward Hosea Ntege, Hiroshi Sunami (2022). Current regenerative medicine-based approaches for skin regeneration: A review of literature and a report on clinical applications in Japan. *Regenerative Therapy*. 21, 73–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.05.008>.
6. Alexander Huynh, Ronny Priefer (2020). Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. *Carbohydrate Research*. 489, 107950. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107950>.
7. Danny J. Soares, Giancarlo F. Zuliani (2022). Orbital post-septal hyaluronic acid: An iatrogenic etiology compounding lower eyelid steatoblepharon. *JPRAS Open*. 34, 173–177. DOI: 10.1016/j.jptra.2022.09.010.
8. Antonio J. Mateo-Orobia, Eduardo del Prado Sanz, Alejandro Blasco-Martínez, Luis E. Pablo-Júlvez, Sarah Farrant, Frédéric Chiambaretta (2023). Efficacy of artificial tears containing trehalose and hyaluronic acid for dry eye disease in women aged 42–54 versus ≥ 55 years. *Contact Lens and Anterior Eye*. 26, 101845. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clae.2023.101845>.
9. Постанова від 2 жовтня 2013 р. № 753 Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів.
10. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 11th Edition. URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>. (Date of access: 23.04.2024).
11. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.

12. Orlenko, D., Yakovenko, V., Plastun, V., & Vyshnevskaya, L. (2020). Development and validation of methods for quantitative determination of sodium hyaluronate in the composition of combined dental gel. *Eureka: Health Sciences*, 5, 72–81. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2020.001420>.
13. Kandasamy, Ruckmani & Shaikh, Saleem & Khalil, Pavne & Muneera, M.S. & Thusleem, O.A. (2013). Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 3. 324–329. [10.1016/j.jpha.2013.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.02.001).
14. Çağlar EŞ, Üstündağ Okur N, Karasulu HY (2022). Development and validation of an HPLC method for the determination of hyaluronic acid active substance in pharmaceutical formulations. *J Res Pharm*. 26(1): 112-122
15. Chang, Wan-Hsin, Liu, Pei-Yi, Jiang, Yuan-Ting, Hsu, Howard Yuan-Hao (2020). A Sensitive Chromatographic Method for Hyaluronate Quantification Applied to Analyze the Desorption Behavior on Contact Lenses, *Current Pharmaceutical Analysis*, 16(6), 782-791, DOI: [10.2174/1573412915666190304142952](https://doi.org/10.2174/1573412915666190304142952).
16. Sze JH, Brownlie JC, Love CA(2016). Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*. 6(1), 67. DOI: [10.1007/s13205-016-0379-9](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0379-9).