

УДК 543.544.922:615.244:615.453.42:615.074

DOI <https://doi.org/10.32782/health-2024.4.8>

ДОСЛІДЖЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ДОМІШОК УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЇ КИСЛОТИ У ТВЕРДИХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Салій Олена Олександрівна,

кандидат фармацевтичних наук,
доцент кафедри промислової фармації
Київського національного університету технологій та дизайну
ORCID: 0000-0001-7103-2083
Scopus Author ID: 57219560195
Researcher ID: AAC-5721-2019

Тарасенко Ганна Вікторівна,

кандидат технічних наук,
доцент кафедри промислової фармації
Київського національного університету технологій та дизайну
ORCID: 0000-0002-0995-7322
Scopus Author ID: 58032095000
Researcher ID: JHT-0528-2023

Фуклева Лариса Анатоліївна,

кандидат фармацевтичних наук,
старший викладач ЗВО кафедри управління і економіки фармації
та фармацевтичної технології
Запорізького державного медико-фармацевтичного університету
ORCID: 0000-0002-2930-0619
Scopus Author ID: 57822281100

Ясько Яна Валеріївна,

магістр кафедри промислової фармації
Київського національного університету технологій та дизайну

Урсодезоксихолева кислота (УДХК) – одна з нативних жовчних кислот, яка синтезується в процесі нормального обміну жовчних кислот в організмі людини та широко використовується у формі твердих лікарських форм як терапевтичний засіб першої лінії в лікуванні різних холестатичних захворювань і гепатобілярних патологій печінки, а також у лікуванні холестеринових жовчних каменів. Під час синтезу в субстанцію УДХК можуть потрапляти домішки як споріднені жовчні кислоти, а саме хенодезоксихолева кислота (домішка А), холева кислота (домішка В) і літохолева кислота (домішка С), які застосовуються як вихідний матеріал, а також інші органічні сполуки, зокрема альдегіди та кетони. Нами розроблено аналітичну методику визначення домішок УДХК у твердих желатинових капсулах методом тонкошарової хроматографії, яка характеризується експресністю та відносно низькою вартістю рутинного контролю порівняно з рідинною хроматографією. Утворені плями ідентифікованих домішок оцінювали в порівнянні з плямами розчинів стандартів. Результати аналізу вважали достовірними, якщо на хроматограмі розчину порівняння (g) спостерігали дві плями. Оцінено валідаційні характеристики: специфічність, робастність, придатність хроматографічної системи, межа виявлення. Робастність досліджено з використанням ненасиченої камери й доведено, що методика є стійкою до зміни ступеня насичення камер. Придатність хроматографічної системи перевірено на пластинках тієї самої фірми виробника з алюмінієвою та скляною підкладками. Встановлено, що тип підкладки сорбенту не впливає на придатність хроматографічної системи. Розраховано максимально допустимі значення меж виявлення для УДХК та її домішок та доведено, що плями домішок на рівні межі виявлення чітко спостерігаються.

Ключові слова: урсодезоксихолева кислота, тверді желатинові капсули, аналітична методика, тонкошарова хроматографія, валідаційні характеристики.

Olena Saliy, Hanna Tarasenko, Larysa Fukleva, Yana Yasko. The validation characteristics study of the technique of determining impurities of ursodeoxycholic acid in solid forms by the thin-layer chromatography method

Ursodeoxycholic acid (UDCA) is one of the native bile acids, which is synthesized in the process of normal bile acid metabolism in the human body and is widely used in the form of solid dosage forms as a first-line therapeutic agent for various cholestatic diseases and hepatobiliary pathologies of the liver and the treatment of cholesterol gallstones. During the synthesis, impurities such as related bile acids, namely chenodeoxycholic acid (impurity A), cholic acid (impurity B) and lithocholic acid (impurity C), which are used as starting material, as well as other organic compounds, such as aldehydes and ketones, may enter the UDCA substance. We have developed an analytical technique for determining UDCA impurities in hard gelatin capsules by thin-layer chromatography, which is characterized by expressiveness and relatively low cost of routine control compared to liquid chromatography. The formed spots of identified impurities were evaluated in comparison with the spots of standard solutions. The analysis results were considered reliable if two spots were observed in the chromatogram of the reference solution (g). The validation characteristics of specificity, robustness, suitability of the chromatographic system, and detection limit were evaluated. Robustness was investigated using an unsaturated chamber and it was proven that the method is resistant to changes in the degree of saturation of the chambers. The suitability of the chromatographic system was tested on plates of the same manufacturer with aluminum and glass substrate types. It was established that the type of sorbent substrate does not affect the suitability of the chromatographic system. The maximum permissible values of the detection limits for UDCA and its impurities were calculated and it was proven that the spots of impurities at the detection limit level are clearly observed.

Key words: ursodeoxycholic acid, hard gelatin capsules, analytical technique, thin-layer chromatography, validation characteristics.

Вступ. Урсодезоксихолева кислота (УДХК) – одна з нативних жовчних кислот, яка синтезується в процесі нормального обміну жовчних кислот в організмі людини та широко використовується у формі твердих лікарських форм як терапевтичний засіб першої лінії в лікуванні різних холестатичних захворювань і гепатобіліарних патологій печінки, а також у лікуванні холестеринових жовчних каменів [1]. За хімічними властивостями УДХК є епімером хенодезоксихолевої кислоти й гідрофільною нецитотоксичною жовчною кислотою [2]. Під час синтезу в субстанцію УДХК можуть потрапляти домішки як споріднені жовчні кислоти, а саме хенодезоксихолева кислота (домішка А), холева кислота (домішка В) і літохолева кислота (домішка С), які застосовуються як вихідний матеріал, а також інші органічні сполуки, зокрема альдегіди та кетони [3]. Тверді лікарські форми з УДХК мають досить високий вміст діючої речовини (75,8% від маси всього вмісту желатинових капсул), а погана текучість маси призводить до складнощів капсулювання, потребує наявності високоефективної капсульної машини, що має функцію підпресування і примусового заповнення капсул [4], що може вплинути на ріст домішок і чистоту лікарського засобу з УДХК, тому домішки потрібно визначати та контролювати валідованими методиками, щоб забезпечити безпеку й ефективність кінцевого продукту.

Дев'ять домішок зазначені у Європейській фармакопеї 11.0 (Ph. Eur. 11.0) і Британській фармакопеї 2023 (BP 2023) як потенційно супутні та споріднені речовини УДХК (домішки А~І), з яких

домішка А, домішка С та дезоксихолева кислота (домішка Е) є токсичними в малих кількостях [5]. У науковій літературі описаний метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з різними детекторами для визначення домішок у твердих оральних формах і встановлено, що УФ-детектор був непридатним для використання в цьому методі [6]. Розроблені такі методи: ВЕРХ з обертальною фазою на рефрактометричному детекторі, який враховує низьку молекулярну поглинальну здатність УДХК [7], високочутливий РХ-МС/МС (рідинна хроматографія-мас-спектрометрія / мас-спектрометрія) метод із використанням потрійного квадрупольного масового детектора, оснащеного джерелом ESI (іонізаційний електророзпилювач), що працював у режимі негативних іонів [8]. Зазначено новий градієнтний метод обернено-фазної хроматографії ОФ-ВЕРХ із застосуванням виявлення зарядженого аерозолу (charged aerosol detection – CAD), універсального детектування для одночасного розділення та кількісного визначення дев'яти домішок в УДХК [9].

Описані методи є кошторисними, націленими на вдосконалення методів у поточних фармакопеях і літературі, покращення розуміння профілю домішок, для ідентифікації невідомих домішок. Фармакопейними методами визначення домішок є ВЕРХ з рефрактометричним детектором і метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) для домішки С [10]. Метод ТШХ застосовується для розділення жовчних кислот і кон'югатів УДХК під час аналізу біологічних рідин і лікарських засобів [11]. Нами розроблена ТШХ методика визначення

супутніх домішок для оцінки якості лікарського засобу й подальшого розміщення на ринку. Перевагами цього методу є експресність і відносно низька вартість рутинного контролю порівняно з ВЕРХ. Щоб оцінити, чи відповідає серія лікарського засобу нормативним вимогам, усі аналітичні процедури мають бути валідовані відповідно до загальних міжнародних вимог [12, 13].

Метою роботи було дослідження валідаційних характеристик методики визначення супутніх домішок урсодезоксихолевої кислоти у твердих желатинових капсулах методом тонкошарової хроматографії.

Методи дослідження. Для аналізу були використані: субстанція УДХК фармакопейної якості виробництва Prodotti Chimici E Alimentari S.p.A., Італія; комерційні серії зареєстрованих твердих желатинових капсул з УДХК по 250 мг різних виробників; стандартні зразки EP CRS домішок УДХК. Для приготування плацебо капсул з УДХК застосовували крохмаль кукурудзяний Roquette, Франція, кремнію діоксид колоїдний безводний (Орісіл 300) (ДП «Калуський дослідно-експериментальний завод ІХП НАН України», ТЗОВ «ОПІСІЛ»), натрію кроскармелозу (Solutab A) (Blanver Farmoquímica, Ltd., Бразилія), магнію стеарат (ТОВ НПП «Електрогазохім», Україна).

Для вивчення валідаційних характеристик застосовували реактиви кваліфікації не нижче ч. д. а, воду очищену, яку отримали з установки Milli Q виробництва Millipore Corporation (Німеччина), аналітичні ваги Mettler Toledo XP105DR (Швейцарія), хроматографічні пластини Silica gel 60 Merck Millipore (Німеччина), хроматографічну скляну камеру для ТШХ, посуд класу А фірми Simax (Чехія).

Досліджувана методика. *Випробуваний розчин.* До 264 мг вмісту капсул додають 8 мл суміші ацетон Р – вода Р (9 : 1), ретельно струшують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 2 мл фільтрату.

Розчин порівняння (а). 10 мг стандартного зразка літохолової кислоти (EP CRS) розчиняють у суміші ацетон Р – вода Р (9 : 1) і доводять об'єм розчину до 50,0 мл тим самим розчинником. 1,0 мл одержаного розчину доводять сумішню ацетон Р – вода Р (9 : 1) до 10,0 мл.

Розчин порівняння (б). 10 мг стандартного зразка холевой кислоти (EP CRS) розчиняють у суміші ацетон Р – вода Р (9 : 1) і доводять об'єм розчину до 100,0 мл тим самим розчинником.

Розчин порівняння (с). 20 мг стандартного зразка хенодезоксихолевої кислоти (EP CRS) розчиняють у суміші ацетон Р – вода Р (9 : 1) і доводять об'єм розчину до 100,0 мл тим самим розчинником.

Розчин порівняння (д). 2,5 мл випробуваного розчину доводять сумішню ацетон Р – вода Р (9 : 1) до 100,0 мл (розчин А).

1,0 мл розчину А доводять сумішню ацетон Р – вода Р (9 : 1) до 10,0 мл.

Розчин порівняння (е). 2,0 мл розчину А доводять сумішню ацетон Р – вода Р (9 : 1) до 10,0 мл.

Розчин порівняння (ф). 1,0 мл досліджуваного розчину доводять до об'єму сумішню ацетон Р – вода Р (9 : 1) до 50,0 мл.

Розчин порівняння (г). 10 мг стандартного зразка кислоти урсодезоксихолевої (EP CRS) розчиняють у розчині порівняння (с) і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл.

Розчин порівняння (х). 10 мг стандартного зразка кислоти урсодезоксихолевої (EP CRS) розчиняють у суміші ацетон Р – вода Р (9 : 1) і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл (використовують для тесту «Ідентифікація»).

Умови хроматографування. На лінію старту хроматографічної пластини Silica gel 60 наносять по 10 мкл: випробуваного розчину (200 мкг урсодезоксихолевої кислоти); розчину порівняння (а) (0,2 мкг літохолової кислоти); розчину порівняння (б) (1 мкг холевой кислоти); розчину порівняння (с) (2 мкг хенодезоксихолевої кислоти); розчину порівняння (д) (0,5 мкг урсодезоксихолевої кислоти); розчину порівняння (е) (1,0 мкг урсодезоксихолевої кислоти); розчину порівняння (ф) (4 мкг урсодезоксихолевої кислоти); розчину порівняння (г) (по 2 мкг урсодезоксихолевої та хенодезоксихолевої кислот); розчину порівняння (х) (2 мкг урсодезоксихолевої кислоти).

Пластину сушать на повітрі, поміщають у хроматографічну камеру із сумішню розчинників кислота оцтова крижана Р – метанол Р – хлороформ Р (5 : 5 : 90) і хроматографують висхідним способом. Коли фронт розчинників проходить 10 см від лінії старту, пластину виймають із камери, сушать на повітрі й поміщають у хроматографічну камеру із сумішню розчинників кислота оцтова крижана Р – етилацетат Р – триметилпентан Р (1,25 : 50 : 50). Коли фронт розчинників проходить 8 см від лінії старту, виймають пластину, сушать у потоці теплого повітря й витримують за температури від 110 до 120 °С протягом 30 хв. Після чого обприскують

розчином 50 г/л фосфорномолібденової кислоти P в суміші кислота сірчана P – кислота оцтова крижана P (5 : 95) і витримують пластину за температури від 110 до 120 °С до появи плям темно-синього кольору.

Плями ідентифікованих домішок оцінюють у порівнянні з плямами розчинів стандартів. Сума всіх плям не повинна перевищувати за розміром та інтенсивністю забарвлення плями на хроматограмі розчину порівняння (f). Результати аналізу вважаються достовірними, якщо на хроматограмі розчину порівняння (g) видно дві плями.

Валідація аналітичної методики. Для проведення валідації додатково готували розчин плацебо та піддавали стресовому впливу випробуваний розчин.

Розчин плацебо: до 14 мг вмісту (плацебо) твердих желатинових капсул додають 8 мл суміші ацетон P – вода P (9 : 1), ретельно струшують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 2 мл фільтрату.

Стресові розчини: 1) 1,0 мл випробуваного розчину піддавали УФ-опроміненню протягом 30 хв; 2) до 1 мл випробуваного розчину додавали 0,2 мл 1 М розчину гідроксиду натрію P , витримували протягом 10 хв; 3) до 1,0 мл випробуваного розчину додавали 0,2 мл розведеного розчину пероксиду водню P , витримували протягом 10 хв.

Досліджувані валідаційні характеристики вибрані відповідно до рекомендацій ІСН Q2(R1) і вимог ДФУ [12, 14], а саме для методики визначення супутніх домішок УДХК валідовано такі характеристики: специфічність, робастність, придатність хроматографічної системи, межа виявлення. Розрахунки та статистичну обробку проводили згідно з вимогами ДФУ [15].

Результати дослідження. Специфічність методики експериментально доведена за результатом, що на хроматограмі основна пляма випробуваного розчину УДХК розташована на одному рівні з основною плямою розчину порівняння (h). На хроматограмах «стресових» розчинів плями домішок холевої, літохолевої кислот відокремлюються від плям інших домішок і від плями аналізованої речовини (УДХК). Встановлено, що плями хенодезоксихолевої та урсодезоксихолевої кислот поділяються в тесті на придатність хроматографічної системи в розчині g. На хроматограмах «стресових» розчинів присутня основна пляма урсодезоксихолевої кислоти на тому ж рівні, що і на хроматограмі випробуваного розчину, який не піддавали

стресовому впливу. На хроматограмі розчину плацебо відсутні плями, що перебувають на тому ж рівні, що і плями домішок розчинів порівняння (a), (b), (c), (d) (рис. 1). Отже, методика характеризується достатньою специфічністю.

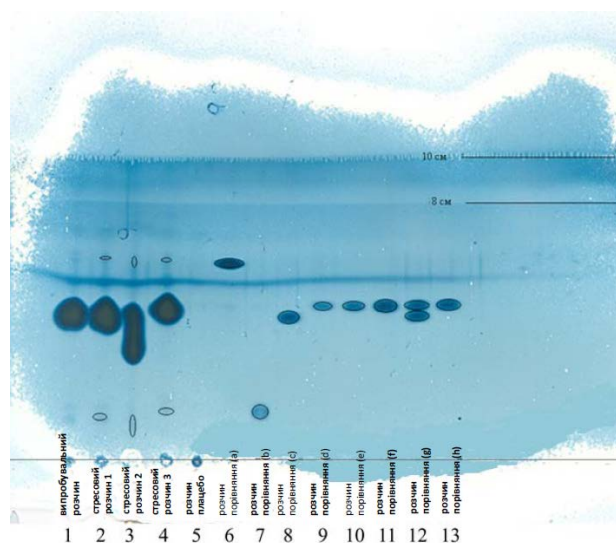


Рис. 1. Хроматограма модельних і стресових розчинів у тесті на специфічність

Примітки: 1 – випробувальний розчин; 2 – стресовий розчин 1; 3 – стресовий розчин 2; 4 – стресовий розчин 3; 5 – розчин плацебо; 6 – розчин порівняння (a); 7 – розчин порівняння (b); 8 – розчин порівняння (c); 9 – розчин порівняння (d); 10 – розчин порівняння (e); 11 – розчин порівняння (f); 12 – розчин порівняння (g); 13 – розчин порівняння (h)

За підтвердження робастності досліджували проведення тесту зі зміною умов, а саме використали ненасичені камери. За результатами випробувань зі зміною зазначеної умови хроматографічний профіль на всіх хроматограмах подібний, отримані на хроматограмах «стресових» розчинів плями домішок холевої та літохолевої кислот у задовільній мірі поділяються від плям інших домішок і від плями аналізованої речовини (УДХК) (рис. 2). Отже, методика є стійкою до зміни ступеня насичення камер.

Перевірку придатності хроматографічної системи доводили на пластинках тієї самої фірми виробника Silica gel 60 (Kiesegel 60) з різними типами підкладки (алюмінієвою та скляною). Визначено, що на хроматограмі розчину порівняння (g), що містить урсодезоксихолеву і хенодезоксихолеву кислоти, спостерігаються дві плями, що чітко розділяються. Плями УДХК і плями її домішок холевої, хенодезоксихолевої, літохолевої кислот, нанесених у кількостях, що відповідають межі виявлення, чітко спостерігаються (рис. 3–4). Отже, тип підкладки сорбенту не впливає на придатність хроматографічної системи.

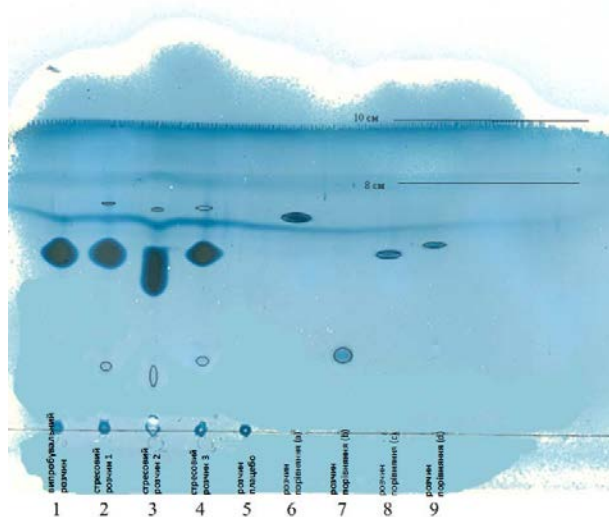


Рис. 2. Хроматограма модельних і стресових розчинів у ненасиченій камері в тесті на робастність

Примітки: 1 – випробувальний розчин; 2 – стресовий розчин 1; 3 – стресовий розчин 2; 4 – стресовий розчин 3; 5 – розчин плацебо; 6 – розчин порівняння (a); 7 – розчин порівняння (b); 8 – розчин порівняння (c); 9 – розчин порівняння (d)

Межа виявлення УДХК та домішок холевої, хенодезоксихолевої, літохолевої кислот у розробленому методі не повинна перевищувати розрахованого максимально допустимого значення. У цьому тесті межа виявлення урсодезоксихолевої кислоти та її домішок холевої, хенодезоксихолевої, літохолевої кислот не перевищує максимально допустимого значення $max MB = 0.32 \cdot Im L$. Встановлено для УДХК цей показник становить не більше ніж 0,08%, для холевої кислоти – не більше за 0,16%, хенодезоксихолевої кислоти – не більше за 0,32%, літохолевої кислоти не більше за 0,03% (рис. 3–4). Отже, плями домішок на рівні межі виявлення чітко спостерігаються.

Таким чином, за результатами валідації методик «Супутні домішки» у лікарському засобі тверді желатинові капсули з УДХК по 250 мг доведено, що специфічність, робастність придатність хроматографічної системи та межа виявлення урсодезоксихолевої кислоти прийнятні. Методика придатна для визначення супутніх домішок УДХК кислоти методом ТШХ у лікарських засобах, що містять урсодезоксихолеву кислоту 250 мг.

Висновки

1. Розроблена аналітична методика визначення супутніх домішок урсодезоксихолевої кислоти у твердих желатинових капсулах методом тонкошарової хроматографії та досліджені валідаційні характеристики, як-от специфічність, робастність, придатність хроматографічної системи та межа виявлення.

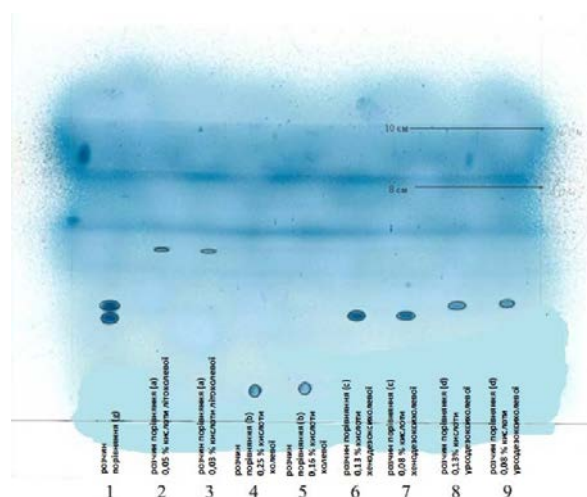


Рис. 3. Хроматограма модельних розчинів у тесті на межу виявлення та придатність хроматографічної системи на пластині зі скляною підкладкою

Примітки: 1 – розчин порівняння (g); 2 – розчин порівняння (a) 0,05% кислоти літохолевої; 3 – розчин порівняння (a) 0,03% кислоти літохолевої; 4 – розчин порівняння (b) 0,25% кислоти холевої; 5 – розчин порівняння (b) 0,16% кислоти холевої; 6 – розчин порівняння (c) 0,13% кислоти хенодезоксихолевої; 7 – розчин порівняння (c) 0,08% кислоти хенодезоксихолевої; 8 – розчин порівняння (d) 0,13% кислоти урсодезоксихолевої; 9 – розчин порівняння (d) 0,08% кислоти урсодезоксихолевої

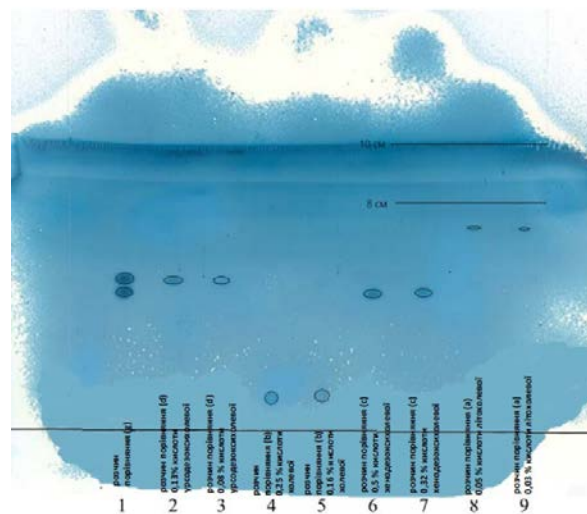


Рис. 4. Хроматограма модельних розчинів у тесті на межу виявлення та придатність хроматографічної системи на пластині з алюмінієвою підкладкою

Примітки: 1 – розчин порівняння (g); 2 – розчин порівняння (d) 0,13% кислоти урсодезоксихолевої; 3 – розчин порівняння (d) 0,08% кислоти урсодезоксихолевої; 4 – розчин порівняння (b) 0,25% кислоти холевої; 5 – розчин порівняння (b) 0,16% кислоти холевої; 6 – розчин порівняння (c) 0,5% кислоти хенодезоксихолевої; 7 – розчин порівняння (c) 0,32% кислоти хенодезоксихолевої; 8 – розчин порівняння (a) 0,05% кислоти літохолевої; 9 – розчин порівняння (a) 0,03% кислоти літохолевої

2. Специфічність методики експериментально доведена за результатом, що на хроматограмі основна пляма випробуваного розчину УДХК розташована на одному рівні з основною плямою розчину порівняння (h). На хроматограмі розчину плацебо відсутні плями, що перебувають на тому ж рівні, що і плями домішок розчинів порівняння холевої, літохолевої та хенодезоксихолевої кислот. Встановлено, що методика характеризується достатньою специфічністю.

3. Робастність досліджено зі зміною умов аналітичної методики, а саме використали ненасичені камери. За результатами випробувань із використанням ненасиченої камери на всіх хроматограмах хроматографічний профіль подібний. Отримані плями домішок холевої та літохолевої кислот на хроматограмах «стресових» розчинів у задовільній мірі поділяються від плям інших домішок та від плями УДХК. Доведено, що методика є стійкою до зміни ступеня насичення камер.

4. Придатність хроматографічної системи експериментально перевірено на пластинах тієї самої фірми виробника з алюмінієвим і скляним типами підкладки. Встановлено, що на хроматограмах, отриманих на пластинах з алюмінієвою

та скляною підкладками чітко спостерігаються як дві плями розчину порівняння (g), що містить урсодезоксихолеву й хенодезоксихолеву кислоти, так і плями урсодезоксихолевої, холевої, хенодезоксихолевої, та літохолевої кислот, нанесених у кількостях, що відповідають межі виявлення.

Отже, тип підкладки сорбенту не впливає на придатність хроматографічної системи.

5. Розраховано максимально допустимі значення меж виявлення для УДХК та її домішок холевої, хенодезоксихолевої, літохолевої кислот. Експериментально доведено, що плями домішок на рівні межі виявлення чітко спостерігаються.

6. Валідацією аналітичної методики «Супутні домішки» в лікарському засобі тверді желатинові капсули з УДХК по 250 мг доведено, що специфічність, робастність придатність хроматографічної системи та межа виявлення урсодезоксихолієвої кислоти прийнятні. Методика придатна для визначення супутніх домішок УДХК кислоти методом ТШХ у лікарських засобах, що містять урсодезоксихолеву кислоту 250 мг. Аналітична методика може бути використана для рутинного контролю якості препаратів з урсодезоксихолевою кислотою.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bessone F., Roma M.G. Is ursodeoxycholic acid detrimental in obstructive cholestasis? A propos of a case of malignant biliary obstruction. *Annals of Hepatology*. 2016;15 (3): 442–447. <https://doi.org/10.5604/16652681.1198824>.
2. Promising new fixed combination for the treatment of diseases of the hepatobiliary system: Substantiation of pharmacotherapeutic properties and pharmaceutical quality profile. L.B. Bondarenko et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018. Vol. 9, Issue 1. P. 23–40. <https://doi.org/10.15421/021804>.
3. Tonin F., Arends I.W.C.E. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. *Beilstein J. Org. Chem.*, 14 (2018), pp. 470–483. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.33>.
4. Салій О. О., Нікітіна О. А., Ковалевська О. І., Ляшенко В. О. Дослідження валідаційних характеристик методики кількісного визначення урсодезоксихолевої кислоти у твердих желатинових капсулах при оцінці однорідності дозованих одиниць. *Фармацевтичний часопис*. 2024. № 2. С. 22–33. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2024.2.14405>.
5. Farina G.A. et al. Adverse effects of deoxycholic acid in submandibular glands, submental, inguinal and subplantar regions: a study in rats. *Clinical Oral Investigations*, 2022. Vol. 26. №. 3. P. 2575–2585. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04227-6>.
6. Roda A. et al. HPLC study of the impurities present in different ursodeoxycholic acid preparations: comparative evaluation of four detectors. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1993, 11.8: 751–760.
7. Peepliwal A., Bonde C.G., Bothara K.G.. A validated RP-HPLC method for quantitative determination of related impurities of ursodeoxycholic acid (API) by refractive index detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011. Vol. 54, Issue 4. P. 845–849. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.10.001>.
8. Boscolo O., Flor S., Dobrecky C., Martinefski M., Tripodi V., Lucangioli S. LC-MS/MS Method Applied to the Detection and Quantification of Ursodeoxycholic Acid Related Substances in Raw Material and Pharmaceutical Formulation (2018). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (2018), 448–455. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3873576>.
9. Huang Y. et al. Development of HPLC-CAD method for simultaneous quantification of nine related substances in ursodeoxycholic acid and identification of two unknown impurities by HPLC-Q-TOF-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2023, 229: 115357. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115357>.
10. Ursodeoxycholic acid (1275). European Pharmacopoeia. 10th Edition. – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, F-67075 Strasbourg Cedex, France, 2019. P. 4152.
11. Repina N. et al. Thin-layer chromatographic separation of a number of bile acids with mobile phases based on surfactants. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 2020, 33.3: 271–279. <https://doi.org/10.1007/s00764-020-00034-z>.
12. ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20%20Guideline.pdf>.

13. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry. FDA CDER etc. U.S. Department of Health and Human Services, 2015, 18 p. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.fda.gov/media/87801/download>.

14. Валідація аналітичних методик і випробувань. *Державна фармакопея України*. 2-ге вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. С. 910–929.

15. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту. *Державна фармакопея України*. 2-ге вид. Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2015. Т. 1. С. 881–909.

REFERENCES

1. Bessone, F., & Roma, M.G. (2016). Is ursodeoxycholic acid detrimental in obstructive cholestasis? A propos of a case of malignant biliary obstruction. *Annals of Hepatology*, 15 (3), 442–447. <https://doi.org/10.5604/16652681.1198824>.

2. Bondarenko, L.B., Gorchakova, N.O., Golembiowska, O.I., & Galkin, O.Y. (2018). Promising new fixed combination for the treatment of diseases of the hepatobiliary system: Substantiation of pharmacotherapeutic properties and pharmaceutical quality profile. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9 (1), 23–40. <https://doi.org/10.15421/021804>.

3. Tonin, F., & Arends, I.W.C.E. (2018b). Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 14, 470–483. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.33>.

4. Saliy, O.O., Nikitina, O.O., Kovalevska, O.I., & Lyashenko, V.O. (2024). Doslidzhennia validatsiinykh kharakterystyk metodyky kilkisnoho vyznachennia ursodeoksykholevoi kysloty u tverdykh zhelatynovykh kapsulakh pry otsyntsi odnoridnosti dozovanykh odynyts [Study of the validation characteristics of the method of quantitative determination of ursodeoxycholic acid in solid gelatin capsules when assessing the uniformity of dosage units]. *Farmatsevtichnyi chasopys – Pharmaceutical Review*, 2, 22–33 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2024.2.14405>.

5. Farina, G.A., Koth, V.S., Maito, F.L.D.M., Payeras, M.R., Cherubini, K., & Salum, F.G. (2022). Adverse effects of deoxycholic acid in submandibular glands, submental, inguinal and subplantar regions: a study in rats. *Clinical Oral Investigations*, 26 (3), 2575–2585. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04227-6>.

6. Roda, A. (1993). HPLC study of the impurities present in different ursodeoxycholic acid preparations: comparative evaluation of four detectors. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 11 (8), 751–760.

7. Peepliwal, A., Bonde, C., & Bothara, K. (2010). A validated RP-HPLC method for quantitative determination of related impurities of ursodeoxycholic acid (API) by refractive index detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54 (4), 845–849. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.10.001>

8. Boscolo O., Flor S., Dobrecky C., Martinefski M., Tripodi V., Lucangioli S. (2018b). LC-MS/MS method applied to the detection and quantification of ursodeoxycholic acid related substances in raw material and pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (5). <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2018.05.002>.

9. Huang, Y., Lu, H., Li, Z., Zeng, Y., Xu, Q., & Wu, Y. (2023). Development of HPLC-CAD method for simultaneous quantification of nine related substances in ursodeoxycholic acid and identification of two unknown impurities by HPLC-Q-TOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 229, 115357. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115357>.

10. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). (2019b). Ursodeoxycholic acid (1275). In *European Pharmacopoeia* (10th ed., p. 4152). France: Council of Europe, F-67075 Strasbourg Cedex.

11. Repina, N., Konovalova, O., Kalinin, D., & Edamenko, D. (2020). Thin-layer chromatographic separation of a number of bile acids with mobile phases based on surfactants. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 33 (3), 271–279. <https://doi.org/10.1007/s00764-020-00034-z>.

12. ICHQ2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20%20Guideline.pdf>.

13. Food and Drug Administration (2015, July). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Retrieved from <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>.

14. Validatsiia analitichnykh metodyk i vyprobuvan (2015). *Derzhavna farmakopeia Ukrainy*. 2-he vyd. Derzhavne pidpriemstvo “Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv” [Validation of analytical methods and tests. *State Pharmacopoeia of Ukraine*. 2nd edition. State Enterprise “Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products”]. Vol. 1. P. 910–929. Kharkiv [in Ukrainian].

15. Statystychnyi analiz rezultativ khimichnoho eksperymentu (2015). *Derzhavna farmakopeia Ukrainy*. 2-he vyd. Derzhavne pidpriemstvo “Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr” [Statistical analysis of the results of a chemical experiment. *State Pharmacopoeia of Ukraine*. 2nd edition. State enterprise “Scientific-expert pharmacopoeial center”]. Vol. 1. P. 881–909. Kharkiv [in Ukrainian].