



DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2024.2.14405>
УДК 543:615.3:543.6

ДОСЛІДЖЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ УРСОДЕОКСИХОЛЕВОЇ КИСЛОТИ У ТВЕРДИХ ЖЕЛАТИНОВИХ КАПСУЛАХ ПРИ ОЦІНЦІ ОДНОРІДНОСТІ ДОЗОВАНИХ ОДИНИЦЬ

О. О. Салій, О. О. Нікітіна, О. І. Ковалевська, В. О. Ляшенко

Київський національний університет технологій та дизайну
saliy.oo@knutd.edu.ua

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:
03.02.2024
Після доопрацювання / Revised:
29.05.2024
Прийнято до друку / Accepted:
30.05.2024

Ключові слова:

урсодезоксихолева кислота;
однорідність дозованих одиниць;
тверді желатинові капсули;
високоєфективна рідинна
хроматографія;
валідаційні характеристики.

АНОТАЦІЯ

Мета роботи. Дослідити валідаційні характеристики методики кількісного визначення урсодеоксихолевої кислоти (УДХК) у твердих желатинових капсулах при оцінці однорідності дозованих одиниць (ОДО).

Матеріали і методи. У роботі використано субстанцію УДХК фармакопейної якості виробництва «Prodotti Chimici E Alimentari S.p.A.», Італія; 6 комерційних серій зареєстрованих твердих желатинових капсул з УДХК по 250 мг різних виробників. Як стандартний зразок УДХК застосовували ВРСRS706 виробництва Sigma-Aldrich. Для кількісного визначення УДХК ми розробили аналітичну методику за методом високоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Досліджувані валідаційні характеристики обирали відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ) та рекомендацій ІСН. Визначення ОДО проводили за розрахунково-ваговим методом. Розраховували вміст УДХК в кожній капсулі, виходячи з результатів визначення індивідуальної маси та кількісного визначення УДХК за методом ВЕРХ.

Результати й обговорення. При валідації методики кількісного визначення діючої речовини у препараті з метою подальшої оцінки показника «ОДО» для контролю за капсулами з УДХК по 250 мг доведено, що специфічність, лінійність, точність, внутрішньолабораторна точність, робастність і правильність визначення є прийнятними, методика систематичною похибкою не обтяжена (систематична похибка ($a=-0,152$), незначна порівняно з максимально допустимим невизначенням аналізу $\Delta_{As} \leq 1,6\%$). При проведенні контролю за ОДО твердих желатинових капсул з УДХК доведено, що всі досліджувані серії комерційних препаратів показали прийнятні результати за показниками «Відхилення маси» та «ОДО» і мали варіації у відхиленні маси нижче 10 % ($n=60$), а середнє значення прийнятності (AV) 7,85, що ≤ 15 .

Висновки. При валідації методики проведено статистичну обробку експериментальних даних, визначений коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеними та знайденими значеннями для кількісного вмісту УДХК становить $>0,998$, що свідчить про коректність методики ВЕРХ для кількісного вмісту УДХК при визначенні ОДО у твердих желатинових капсулах. За результатами статистичної обробки методику вважають валідованою та можна використовувати для кількісного визначення УДХК. Встановлена відповідність критерію 1 за показником «ОДО» комерційних серій свідчить, що жодну з серій низької якості не було доставлено на ринок, і кожен пацієнт отримує дозу УДХК у регламентованих межах, близько 250 мг.

Вступ. Урсодезоксихолеву кислоту ($C_{24}H_{40}O_4$), або УДХК, широко використовують у формі твердих желатинових капсул для терапії гепатобілярних патологій захворювань печінки і лікування холестеринових жовчних каменів [1]. УДХК є гідрофільною жовчною кислотою та епімером хенодесоксихолевої кислоти [2]. На фармацевтичному ринку присутній асортимент лікарських препаратів УДХК у формі твердих желатинових капсул імпортного і вітчизняного виробництва, які входять у групу А05 «Гепатопротектори». Досліджено, що препарати УДХК мають досить високий вміст діючої речовини (75,8 % від маси усього вмісту капсул), тому властивості УДХК мають ключовий вплив на фармако-технологічні показники капсульної маси, яка має низьку текучість, задовільний коефіцієнт Карра і не високу щільність. Погана текучість маси призводить до складнощів у капсулюванні, вимагає наявності високоефективної капсульної машини, що має функцію підпресування і примусового заповнення капсул, та відхилення в однорідності кожної дозованої одиниці у желатиновій капсулі.

Неоднорідність також може бути спричинена типом використовуюваного обладнання та параметрами змішування, що є індивідуальними та специфічними для кожного виробника [3]. Вимогами до серії лікарського засобу (ЛЗ) є забезпечення того, щоби кожна з його дозованої одиниці мала вміст активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ), близького до препарату, зазначеного на етикетці [4]. Цей параметр є вимогою у фармакопєях через узгоджені розділи про однорідність дозованих одиниць (ОДО) – у розділі 2.9.40 Європейської фармакопєї [5], вимог Державної Фармакопєї України (ДФУ) [6] та контролюється під час випуску серії і не є критичним для дослідження стабільності [7]. ОДО – це тест дисперсії активного інгредієнта у процесі серійного виробництва [8].

Для визначення ОДО можна використовувати метод прямого встановлення однорідності вмісту та розрахунково-ваговий. В обох методах для оцінки ОДО застосовують методики кількісного визначення діючої речовини у дозованій лікарській формі. Щоб оцінити, чи відповідає серія ЛЗ нормативним вимогам, для аналізу його одиниць в основному використовують хроматографічні або спектросфотометричні аналітичні процедури, які мають бути валідовані відповідно до загальних вимог ІСН Q2 [9]. Валідація аналітичних методів необхідна перед їх рутинним використанням з метою підтвердження придатності методики до застосування. Тому розробка аналітичних методик вмісту діючої речовини в препараті та їх валідація є обов'язковими в контролі за якістю та важливими для забезпечення результатів при оцінці ОДО і гарантії дози ЛЗ для пацієнта.

Мета роботи. Дослідити валідаційні характеристики методики кількісного визначення урсодесоксихолевої кислоти (УДХК) у твердих желатинових капсу-

лах при оцінці однорідності дозованих одиниць (ОДО).

Матеріали і методи. *Обладнання.* Наважки субстанції УДХК, вміст маси капсул, стандартних зразків і реактивів зважували на аналітичних вагах «Mettler Toledo XP105DR» (Швейцарія). Величину рН вимірювали рН-метром «Mettler Toledo Seven Multi S40» (Швейцарія). Хроматографування проводили на рідинному хроматографі Waters Alliance HPLC (США) з УФ-детектором. У роботі застосували посуд класу А фірми «Simax» (Чехія).

Матеріали та реактиви. Для аналізу використали: субстанцію УДХК фармакопєйної якості виробництва «Prodotti Chimici E Alimentari S.p.A.», Італія; 6 комерційних серій зареєстрованих твердих желатинових капсул з УДХК по 250 мг різних виробників. Як стандартний зразок (СЗ) урсодесоксихолевої кислоти використовували стандарт «BPCRS706 for quantitative test or assay» виробництва «Sigma-Aldrich» (Німеччина). 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 кроскармелоза (Solutab A) (Blanver Farmoquímica, Ltd., Бразилія), магнію стеарат (ООО НПП «Електрогазохім», Україна).

При вивченні валідаційних характеристик використовували реактиви: воду очищену, яку отримали з установки Milli Q, виробництва «Millipore Corporation» (Німеччина), метанол Sigma-Aldrich (чистота 99,9 %), калію дигідрофосфат Р, фосфорну кислоту Р, ацетонітрил Р. Всі реагенти виробництва «Sigma-Aldrich», кваліфікації «чда».

Умови визначення ОДО. Визначення ОДО проводили за розрахунково-ваговим методом для УДХК, оскільки вміст урсодесоксихолевої кислоти перевищує 25 мг і становить більше 25 % від маси лікарської форми.

Оскільки УДХК демонструє помірне поглинання лише в діапазоні коротких хвиль, тобто 200–210 нм, кількісна оцінка вмісту УДХК у фармацевтичних композиціях разом із допоміжними речовинами та розчинниками за допомогою простої УФ-спектросфотометрії обмежена [10], тому при оцінці ОДО обрано метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Кількісне визначення УДХК проводили за методом ВЕРХ на репрезентативному зразку серії, припускаючи, що концентрація (маса діючої речовини на масу дозованої одиниці) однакова для усіх дозованих одиниць. Точно зважували кожну з 10 відібраних капсул, стежачи за їх цілістю. Витягували вміст капсул відповідним способом, стежачи за цілістю оболонки. Точно зважували кожну з порожніх оболонки та розраховували для кожної капсули масу вмісту шляхом віднімання маси оболонки від загальної маси.

Розраховували вміст УДХК у кожній капсулі, виходячи з результатів визначення індивідуальної маси та кількісного визначення за методом ВЕРХ [11]. Розраховували приймальне число AV (ДФУ, табл. 2.9.40.-2.) використовуючи для розрахунку опорного значення M випадок 1. Вимоги ОДО витримуються, якщо приймальне число AV визначене для 10 капсул, менше або дорівнює 15. Якщо приймальне число виходить за допустимі критерії прийнятності, тестують наступні 20 капсул.

Досліджувана методика ВЕРХ. Для кількісного визначення УДХК ми розробили аналітичну методику за методом ВЕРХ відповідно до монографії Британської Фармакопеї «Ursodeoxycholic Acid Capsules» з модифікацією низки параметрів, а саме, оптимізовано співвідношення складових компонентів рухомої фази та збільшено вміст ацетонітрилу для зменшення часу проведення аналізу; запропоновано колонку з меншим зерненням для збільшення ефективності хроматографування і, відповідно, меншого розміру; зменшена швидкість рухомої фази для уникнення зростання тиску до критичного значення.

Випробуваний розчин. До 165 мг вмісту капсул додавали близько 40 мл метанолу P, обробляли ультразвуком протягом 5 хв, охолоджували до кімнатної температури, доводили об'єм розчину до 50,0 мл тим самим розчинником і фільтрували через фільтр PVDF із діаметром пор не більше 0,45 мкм.

Розчин порівняння. 50 мг СЗ УДХК розчиняли в метанолі P і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 20,0 мл.

Умови хроматографування: приготування буферного фосфатного розчину: 0,137 г калію дигідрофосфату P розчиняли в 1000 мл води P і доводили об'єм розчину до 1000,0 мл водою P, рН якого доводили до значення (2,0±0,05) фосфорною кислотою P.

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі з УФ-детектором у таких умовах:

- колонка XBridge C18 фірми Waters, розміром (150×4,6) мм, заповнена окта-децилсилільним сорбентом для хроматографії P з розміром частинок 3,5 мкм;

- швидкість рухомої фази 0,6 мл/хв;

- рухома фаза: суміш ацетонітрил P – 0,001 М розчин калію дигідрофосфату (1:1), рН якої доведено до значення (2,0±0,05) фосфорною кислотою P;

- режим елюювання – ізократичний;
- детектування проводять за довжини хвилі 210 нм;

- температура колонки – 40 °С;

- об'єм проби – 40 мкл.

Валідаційні характеристики. Досліджувані валідаційні характеристики обрані відповідно до вимог ДФУ та рекомендацій ІСН Q2(R1) [12, 13], а саме, для методики кількісного визначення УДХК відвалідовано наступні характеристики: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, робастність. Оцінено максимально допустиму невизначеність результату аналізу ΔAs та невизначеність пробопідготовки ΔSP. Розрахунки та статистичну обробку проводили згідно з вимогами ДФУ [14].

Результати й обговорення. Результати аналізу комерційних серій різних виробників показали, що середня вага капсули становила 325,3 мг для капсул з дозою 250 УДХК (табл. 1). Усі капсули в шести комерційних серіях мали відхилення маси нижче 10 % (n=60), а серії мали середнє значення числа прийнятності менше або дорівнює 15 (табл. 2).

Однорідність вмісту AV (приймальне число) розраховували, використовуючи для розрахунку опорного значення M випадок (випадок 1) [6]. Вимоги ОДО витримуються, якщо AV, визначене для 10 капсул, менше або дорівнює 15.

З таблиці 2 видно, що всі шість серій комерційних препаратів показали прийнятні результати за показниками «Відхилення маси» та «ОДО». Усі серії мали варіації у відхиленні маси нижче 10 % (n=60) та середнє значення AV 7,85, що ≤15. Отже, наявність межі загального AV не більше ніж (NMT) 15 і припущення щодо відповідності критеріям випадку 1 гарантують, що жодна одиниця дозування не перевищить діапазон між 0,75 і 1,25 М. Відповідність критерію 1 за показником «ОДО» свідчить про гарантію фармацевтичних підприємств, що жодну з серій низької якості не було доставлено на ринок, і кожен пацієнт отримує дозу УДХК у регламентованих межах близько 250 мг.

Для кількісного визначення УДХК при оцінці ОДО ми розробили і валідували аналітичну методику за методом ВЕРХ. При валідації методики провели розрахунки невизначеностей результату аналізу та пробопідготовки, оцінили валідаційні характеристики та критерії прийнятності. Максимально допустима

Таблиця 1

Відхилення маси капсул з урсодеоксихолевою кислотою по 250 мг (n=60)

Маса капсули мг, номінал	Маса, мг Minimum	Маса, мг Maximum	Середня маса, мг	Відхилення маси, %
330,0	313,5	346,5	325,3	max 6,5 min 3,6

Таблиця 2

Результати контролю за капсулами з урсодеоксихолевою кислотою по 250 мг

Серія	1	2	3	4	5	6
Назва препарату	«Урсохол», 250 мг	«Урсо- фальк», 250 мг	«Урсомакс», 250 мг	«Урсолів», 250 мг	«Урсіс», 250 мг	«Урсосан», 250 мг
Розмір серії, упак. № 10	5954	–	890	18 804	7009	14 405
Вміст (% від зазначеного на етикетці)	96,24	100,2	100,3	103,2	95,68	96,88
Відхилення маси ± (%)	2,1±0,45	1,6±0,39	5,6±0,24	3,6±0,34	4,1±0,30	3,2±0,51
Однорідність дозованих одиниць (AV)	7,4	5,8	8,5	8,2	10,8	6,4
Розпадання, хв	21	3,5–4,6	5–6	9	8	4
Кількісний вміст, мг у капсулі	243,3	250,3	246,7	241,5	249,4	240,8

невизначеність результату аналізу Δ_{AS} обчислили відповідно до встановлених вимог ДФУ і становить $\Delta_{AS} \leq 1,6\%$ (критерій 1) та $\Delta_{AS} \leq 2,3\%$ (критерій 2). Обчислена невизначеність пробопідготовки становить $\Delta_{SP} \leq 0,32 \cdot \Delta_{AS} = 0,5\%$.

Специфічність методики кількісного визначення УДХК перевіряли, оцінюючи вплив матриці зразка (плацебо) на результат аналізу. На хроматограмах плацебо повинні бути відсутні піки, які перекриваються з піком УДХК на хроматографах модельного розчину. Результати досліджень представлено в таблиці 3 та на рисунках 1–3.

Як видно з наведених хроматограм, внесок плацебо відсутній. На хроматограмі розчинів плацебо та розчинника відсутні піки з часом утримання, близькими до часу утримання піку УДХК, який наявний на хроматограмах модельних розчинів та розчину порівняння, отже, методика характеризується достатньою специфічністю.

Перевірку лінійності й правильності методики проведено за методом «введено/знайдено» при концентраціях УДХК від 80 до 120 % від номінального вмісту з кроком у 10 %. Вимірювання проводили згідно з умовами методики, наведеної вище.

Визначення критеріїв правильності для УДХК за методом рідинної хроматографії (РХ) наведено в таблиці 4.

Результати вимірювання не містять значної систематичної помилки, про що свідчать результати статистичної обробки даних (табл. 5).

Дослідження лінійного діапазону проводили при концентраціях УДХК від 80 до 120 % від номінального вмісту з кроком 10 %, використовуючи розчини, приготовані для дослідження правильності. Визначали залежність відношення площ піків УДХК на хроматограмах модельних розчинів до площ піків УДХК на хроматограмах розчину порівняння від відношення концентрації УДХК у модельних розчинах до концентрації розчину порівняння (рис. 4).

Таблиця 3

Результати дослідження специфічності методики

Назва розчину	Час утримання піку аналіту	Наявність піку з часом утримання близько 2,7 хв
Модельний	2,6928	Наявний
Модельний	2,6929	Наявний
Модельний	2,6939	Наявний
Розчин порівняння	2,7047	Наявний
Плацебо	–	Відсутній
Метанол	–	Відсутній

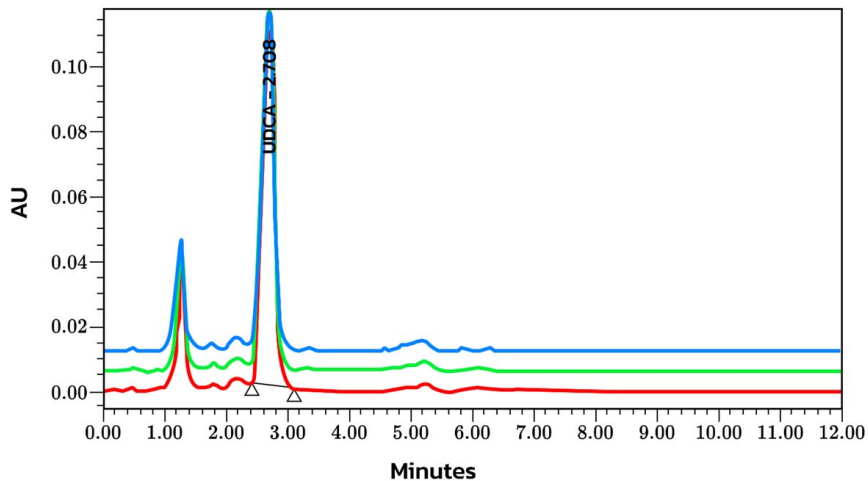


Рис. 1. Хроматограма розчину порівняння урсодезоксихолевої кислоти при визначенні специфічності.

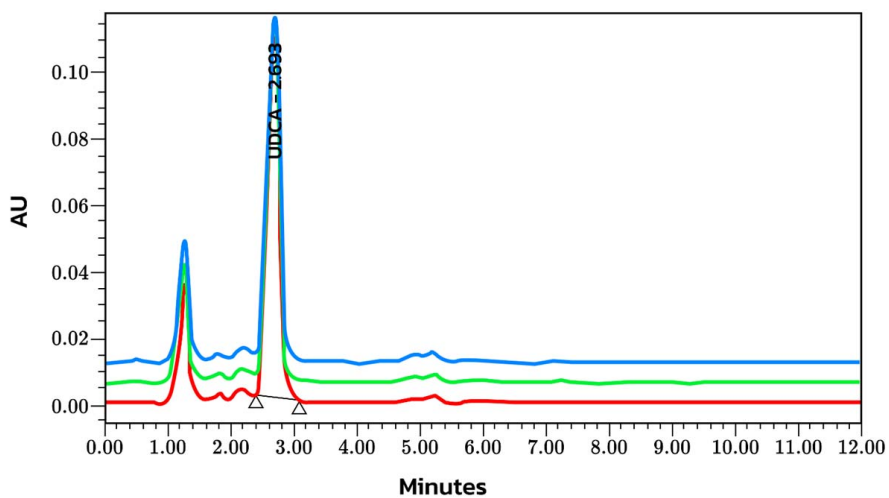


Рис. 2. Хроматограма модельного розчину урсодезоксихолевої кислоти при визначенні специфічності.

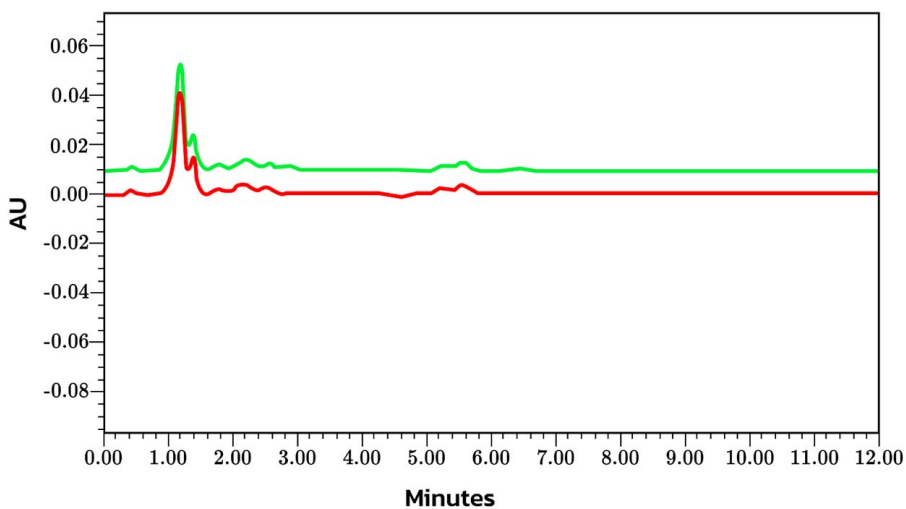


Рис. 3. Хроматограма розчину плацебо при визначенні специфічності.

Таблиця 4

Визначення критеріїв правильності для урсодеоксихолевої кислоти за методом рідинної хроматографії

Модельний розчин, %	Концентрація УДХК, мг/мл	Введено у % до концентрації розчину порівняння (X _i , %)	Середні площі піку УДХК	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння (Y _i , %)	Визначено у % до введеного Z _i = (Y _i /X _i)·100
80	2,00	83,01	1212648	83,23	100,26
80	2,01	83,24	1216123	83,47	100,26
80	2,01	83,24	1207365	82,86	99,55
100	2,51	104,01	1505915	103,35	99,37
100	2,48	104,43	1522289	104,48	100,04
100	2,51	104,15	1517702	104,16	100,01
120	3,00	124,56	1820796	124,97	100,32
120	3,00	124,56	1822572	125,09	100,43
120	2,99	124,43	1808275	124,11	99,74
Відношення «знайдено/введено», середнє, Z _{ср} , %					100,00

Таблиця 5

Результати статистичної обробки перевірки правильності методики кількісного визначення

Відносне стандартне відхилення, SD _x , %	0,40 052
Відносний довірчий інтервал: $\Delta_x = t(95\%, 7) \times SD_x$	0,78
Критерій 1: max Δ_{As} , %	1,6
Критерій 2: max Δ_{As} , %	2,3
Систематична похибка, $\delta = \bar{X} - 100 $	0,13
Критерій статистичної незначущості систематичної похибки: $\delta \leq \frac{\Delta_x}{\sqrt{9}} = 0,26$	Виконується
Критерій практичної незначущості систематичної похибки: $\delta \leq 0,32 \times \max \Delta_{As} = 0,74$	Виконується

Розраховували параметри лінійної залежності: коефіцієнт кореляції ($r=0,99\ 968$), вільний член прямої ($a=-0,152$), кут нахилу прямої ($b=1,00251$); отримані значення менші за критерії прийнятності (табл. 6).

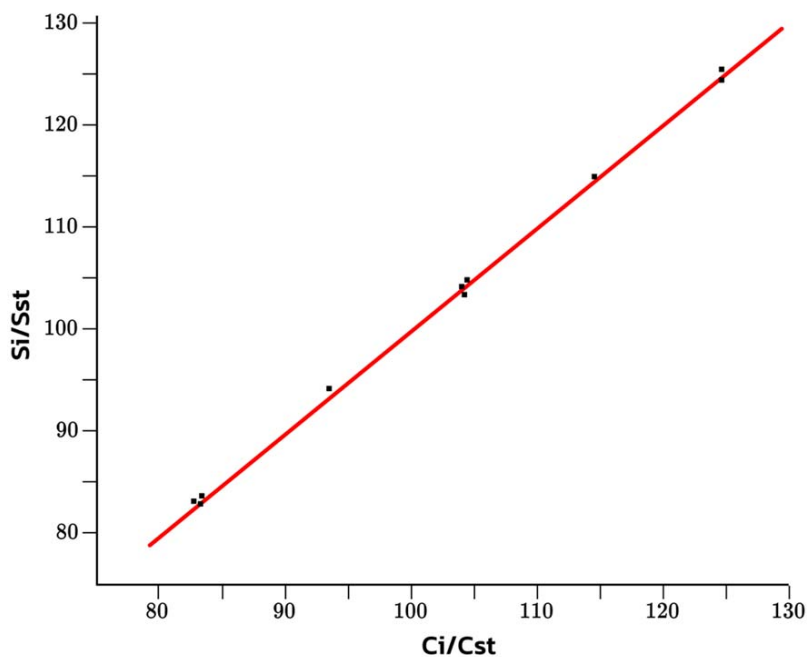
З таблиці 6 видно, що виконання вимог до параметрів лінійної залежності підтверджує лінійність методики визначення УДХК в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій. Значення систематичної похибки відхилення ($a=-0,152$) від нуля незначне порівняно з максимально допустимим невизначенням аналізу $\Delta_{As} \leq 1,6\ %$. Отже, залежність лінійна у зазначених діапазонах.

Прецизійність розробленого методу визначалася проміжною точністю в рамках оцінки відтворюваності результатів при проведенні внутрішньолабораторних досліджень, де різні хіміки-аналітики у різні дні провели аналіз кількісного вмісту УДХК у ЛЗ «Урсофальк», капсули 250 мг. Результати вимірювань надані у таблиці 7.

Отримані значення критеріїв Фішера ($F=2,27$) та Стьюдента ($t=0,043$) відповідають встановленим критеріям ($F \leq 5,050$ та $t \leq 2,228$) і дозволяють говорити про задовільні результати внутрішньолабораторної збіжності. Отже, методика відтворювана.

При підтвердженні робастності досліджували незмінність роздільної здатності методики, оцінюючи хроматографічний профіль розчину УДХК, що містить максимальну кількість домішок деградації.

Дослідження робастності проводили під час варіювання наступних факторів: рН рухомої фази $\pm 0,2$, тобто (від 2,3 до 2,7); швидкість рухомої фази $\pm 50\ %$, тобто (0,6 \pm 0,3) мл/хв; температура колонки $\pm 10\ %$, тобто (40 \pm 4) °C. Умови змінювали одночасно для всіх зазначених параметрів у бік «+» та одночасно в бік «-» (рис. 5, 6). Також для колонки змінювали фірму-виробника, використовували колонку Sunfire 4,6 · 150 мм фірми Waters із розміром частинок 3,5 мкм (рис. 7).



[9/16/2022 14:04 "/Graph1" (2455820)]

Linear Regression for Data1_B:

Y = A + B * X

Parameter	Value	Error	
A	-0.152	0.88788	
B	1.00251	0.00844	
R	SD	N	P
0.99968	0.44559	11	<0.0001

Рис. 4. Залежність відношення площ піків урсодеоксихолевої кислоти на хроматограмах модельних розчинів до площ піків урсодеоксихолевої кислоти на хроматограмах розчину порівняння від відношення концентрації урсодеоксихолевої кислоти в модельних розчинах до концентрації розчину порівняння.

Таблиця 6

Результати статистичної обробки даних та метрологічні характеристики лінійної залежності для урсодеоксихолевої кислоти

Вільний член прямої, a	-0,152
Кут нахилу прямої, b	1,00 251
Коефіцієнт кореляції, r	0,99 968
Стандартне відхилення, %: $SD_X = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$	0,44 559
Остаточне стандартне відхилення: $s_0 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - Y_i)^2}{n-2}}$	0,449

Стандартне відхилення кута нахилу прямої: $s_b = \sqrt{\frac{SD_x}{\sum (C_i - \bar{C})^2}}$	0,00 844
Стандартне відхилення вільного члена прямої: $s_a = s_0 \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{C}^2}{\sum (C_i - \bar{C})^2}}$	0,88 788
Критерій максимально допустимого значення залишкового стандартного відхилення: $s_0 \leq \max \Delta_{As} \cdot b / t(95\%, n - 2) = 1,26$	Виконується
Критерій статистичної незначущості: $ a \leq \Delta_a = t(P95\%, n - 2) \cdot s_a = 1,63$	Виконується
Критерій практичної незначущості відмінності а від нуля: $ a \leq \frac{0,32 \cdot \Delta_{As}}{1 - C_{\min} / 100} = 3,68$	Виконується
Критичне мінімально допустиме значення коефіцієнта кореляції: $r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{\Delta_{As}}{SD_x \cdot t(95\%; n - 2)} \right)^2} = 0,99810$	Виконується

Таблиця 7

Результат тесту на точність визначення (міждобовий) урсодеоксихолевої кислоти за методом рідинної хроматографії

День	Час утримання піку, хв	Площа піку
Перший	2,751	1 528 021,59
Другий	2,750	1 443 352,98
Третій	2,886	1 529 410,48
Об'єднане середнє	2,796	1 486 381,73
RSD, %	2,798	3,285

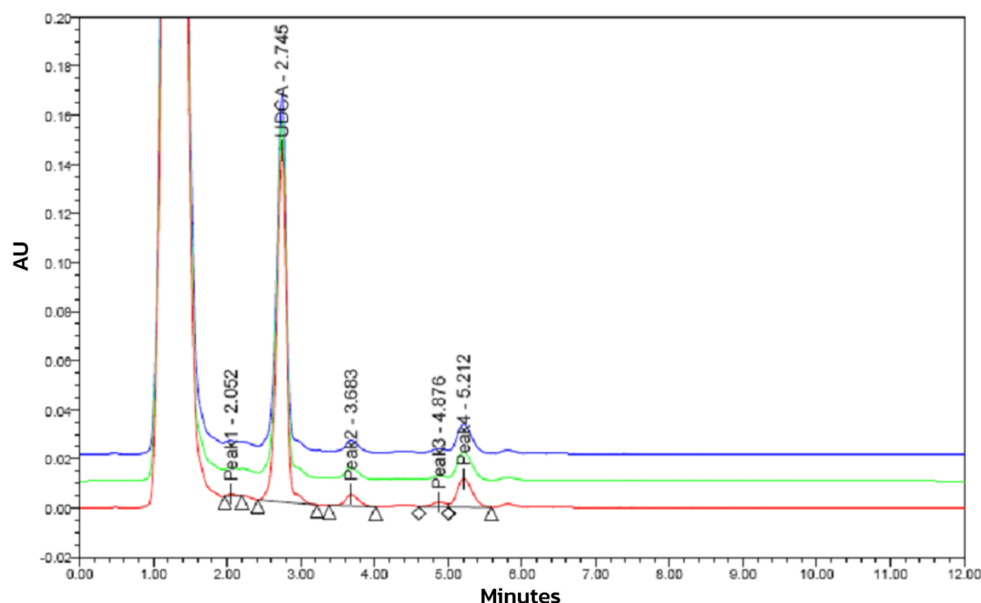


Рис. 5. Хроматограма розчину урсодеоксихолевої кислоти при зміні всіх умов хроматографування у бік «+».

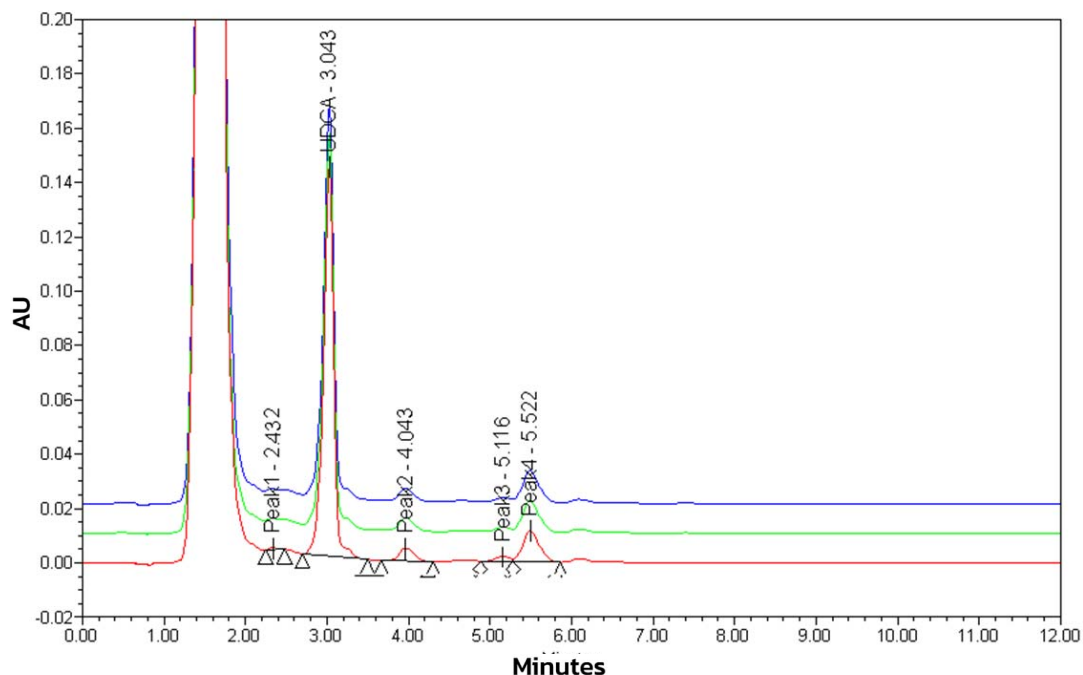


Рис. 6. Хроматограма розчину урсодеоксихолевої кислоти при зміні всіх умов хроматографування у бік «->».

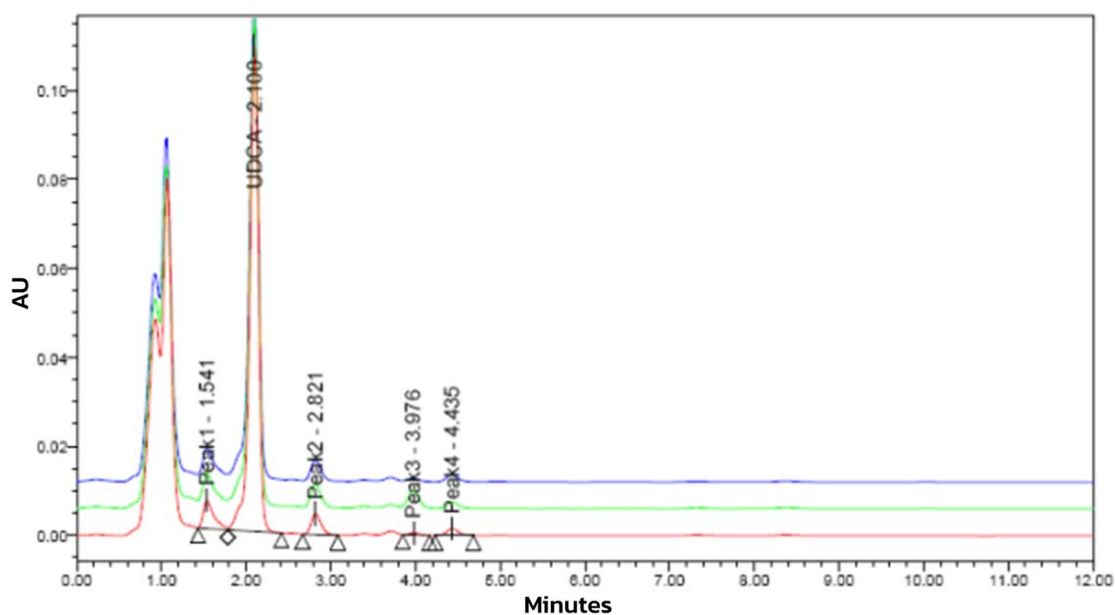


Рис. 7. Хроматограма розчину урсодеоксихолевої кислоти на альтернативній колонці Sunfire C18 Waters.

За результатами випробувань при зміні зазначених умов хроматографічний профіль на всіх хроматограмах подібний, роздільна здатність є прийнятною. Отже, методика стійка до змін рН, швидкості рухомої фази, температури колонки та фірми виробника колонки.

Висновки. При валідації аналітичної методики ВЕРХ кількісного визначення діючої речовини у пре-

параті з метою подальшої оцінки показника «ОДО» для контролю ЛЗ капсули з УДХК по 250 мг доведено, що специфічність, лінійність, точність, внутрішньолабораторна точність, робастність і правильність визначення є прийнятними, методика систематичною похибкою не обтяжена (систематична похибка ($a=-0,152$), незначна порівняно з максимально допус-

тимим невизначенням аналізу $\Delta_{As} \leq 1,6 \%$). Проведено статистичну обробку експериментальних даних, коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеним та знайденими значеннями для кількісного вмісту УДХК, який визначали, становить $>0,998$, що свідчить про коректність методики. За результатами статистичної обробки методика вважається валідованою та може бути використана для кількісного визначення УДХК при оцінці ОДО. При проведенні контролю ОДО у твердих желатинових капсулах з УДХК, виходячи з результатів визначення індивідуальної маси та кількісного визначення, доведено, що всі до-

сліджувані серії комерційних препаратів показали прийнятні результати за показниками «Відхилення маси» та «ОДО». Усі серії мали варіації у відхилення маси нижче 10 % ($n=60$), а середнє значення AV 7,85, що ≤ 15 . Відповідність критерію 1 за показником «ОДО» свідчить про гарантію фармацевтичних підприємств, що жодну з серій низької якості не було доставлено на ринок, і кожен пацієнт отримує дозу УДХК у регламентованих межах, близько 250 мг.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

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

O. O. Saliy, O. O. Nikitina, O. I. Kovalevska, V. O. Lyashenko

Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine

saliy.oo@knutd.edu.ua

The aim of the work. To investigate the validation characteristics of the method of quantitative determination of ursodeoxycholic acid (UDCA) in hard gelatin capsules when assessing the uniformity of dosage units (UDU).

Materials and Methods. The UDCA of pharmacopoeial quality produced by "Prodotti Chimici E Alimentari S.p.A.", Italy was used, as well as 6 commercial series of hard gelatin capsules with UDCA of 250 mg from different manufacturers. BPCRS706 produced by Sigma-Aldrich was used as a UDCA standard. For the assay of UDCA, we have developed an analytical HPLC method. The studied validation characteristics are selected in accordance with the requirements of the SFU and ICH recommendations. Determination of UDU was carried out using the calculation-weight method. The content of UDCA in each capsule was calculated based on the results of determining the individual weight and quantitative determination of UDCA by HPLC method.

Results and Discussion. During the validation of the method of quantitative determination UDCA when assessing of the UDU for the control of 250 mg UDCA capsules, it was proven that the specificity, linearity, accuracy, intra-laboratory accuracy, robustness and correctness of the determination are acceptable, the method is not burdened with a systematic error, as systematic error a (-0.152) is insignificant compared to the maximum permissible uncertainty of the analysis ($\Delta As \leq 1.6\%$). During the control of UDU in hard gelatin capsules it was proven that all studied series of commercial preparations showed acceptable results according to the indicators "Mass Deviation" and "UDU" and had variations in mass deviation below 10% ($n = 60$), and the average acceptance value (AV) 7.85, which is ≤ 15 .

Conclusions. During the validation of the method, statistical processing of the experimental data was carried out, the determined correlation coefficient of linear dependence (r) between the entered and found values for the quantitative content of UDCA is >0.998 , which indicates the correctness of the HPLC method for the quantitative content of UDCA when assessing UDU in hard gelatin capsules. According to the results of statistical processing, the method is considered validated and can be used for assay of UDCA. The established conformity of criterion 1 according to the indicator UDU of the commercial series indicates that none of the low-quality series was released to the market, and each patient receives a dose of UDCA within the regulated limits of about 250 mg.

Key words: ursodeoxycholic acid; uniformity of dosage units; hard gelatin capsules; high performance liquid chromatography; validation characteristics.

Перелік бібліографічних посилань

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. Vol. 15, Issue 3. P. 442–447. DOI: 10.5604/16652681.1198824.
2. Therapeutic Equivalence of Ursodeoxycholic Acid Tablets and Ursodeoxycholic Acid Capsules for the Treatment of Primary Biliary Cirrhosis / C. Hopf et al. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2013. Vol. 2, Issue 3. P. 231–236. DOI: 10.1002/cpdd.24.

- Mixing and formulation of low dose drugs: underlying problems and solutions / V. Kukkar et al. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008. Vol. 32. P. 43–58. Available online: <https://thaiscience.info/Journals/Article/TJPS/10576401.pdf>.
- Methodology for the validation of analytical methods involved in uniformity of dosage units tests / E. Rozet et al. *Analytica Chimica Acta*. 2013. Vol. 760. P. 46–52. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.013.
- European Pharmacopoeia. Uniformity of Dosage Units. 2.9.40. 10th ed. European Commission; Luxembourg: 2020.
- Однорідність дозованих одиниць. 2.9.40. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-ше вид. Доповн. 3. Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2009. С. 60–63.
- 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. DOI: 10.15421/021804.
- Siew A. Analyzing content uniformity. *Pharmaceutical Technology*. 2018. 42 (2). P. 16–21.
- Megawati W., Damayanti S. Analytical Method Development of Quantification and Dissolution Assay of Ursodeoxycholic Acid Capsule. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2021. Vol. 8. Issue 3. P. 96–105. DOI: 10.24198/ijpst.v8i3.31420.
- Sawant T. B., Mane D. Chromatographic Method Development and Validation for Quantitative Determination of Ursodeoxycholic Acid in Ursodeoxycholic Acid Tablets. *Asian Journal of Chemistry*. 2018. Vol. 30, Issue 10. P. 2373–2376. DOI: 10.14233/ajchem.2018.21606.
- Рідинна хроматографія. 2.2.29. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. С. 86–87.
- Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-ге вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. Т. 1. С. 910–929.
- ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Available online: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
- Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту. Державна Фармакопея України. Т. 1 / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-ге вид. Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2015. С. 881–909.

References

- Bessone F, Roma MG. Is ursodeoxycholic acid detrimental in obstructive cholestasis? A propos of a case of malignant biliary obstruction. *Annals of Hepatology*. 2016;15(3):442-447. DOI:10.5604/16652681.1198824.
- Hopf C, Grieshaber R, Hartmann H, Hinrichsen H, Eisdold M, Cordes HJ, Greinwald R, Rust C. Therapeutic Equivalence of Ursodeoxycholic Acid Tablets and Ursodeoxycholic Acid Capsules for the Treatment of Primary Biliary Cirrhosis. *Clinical pharmacology in drug development*. 2013;2(3):231–236. DOI: 10.1002/cpdd.24.
- Kukkar V, Anand V, Kataria M, Gera M, Choudhury P K. Mixing and formulation of low dose drugs: underlying problems and solutions. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;32:43-58.
- Rozet E, Ziemons E, Marini RD, Boulanger B, Hubert P. Methodology for the validation of analytical methods involved in uniformity of dosage units tests. *Analytica Chimica Acta*. 2013;760:46-52. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.013.
- European Pharmacopoeia. Uniformity of Dosage Units. 2.9.40. 10th ed. European Commission; Luxembourg: 2020.
- Uniformity of dosage units. 2.9.40. State Pharmacopoeia of Ukraine. State enterprise "Scientific-expert pharmacopoeial center". Addendum 3. Kharkiv: State enterprise "Scientific-expert pharmacopoeial center". 2009. 60-63.
- Bondarenko LB, Gorchakova NO, Golembiovska OI, Galkin OY. 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*. 2018;9(1):23-40. DOI: 10.15421/021804.
- Siew A. Analyzing content uniformity. *Pharmaceutical Technology*. 2018;42(2):16-21. Available online: <https://www.pharmtech.com/view/analyzing-content-uniformity>.
- Megawati W, Damayanti S. Analytical Method Development of Quantification and Dissolution Assay of Ursodeoxycholic Acid Capsule. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2021;8(3):96-105. DOI: 10.24198/ijpst.v8i3.31420.
- Sawant TB, Mane D. Chromatographic Method Development and Validation for Quantitative Determination of Ursodeoxycholic Acid in Ursodeoxycholic Acid Tablets. *Asian Journal of Chemistry*. 2018;30(10):2373-2376. DOI: 10.14233/ajchem.2018.21606.
- Liquid chromatography. 2.2.29. State Pharmacopoeia of Ukraine. State enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products". - 2nd edition. - Kharkiv: State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for the Quality of Medicinal Products", 2015; 1:86-87. Ukrainian.

12. Validation of Analytical Methods and Tests. State Pharmacopoeia of Ukraine: 1 Vol. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. Ed.2. Vol.1. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products, 2015;910-29. Ukrainian.
13. ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Available online: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
14. Statistical Analysis of Chemical Experiment Results. State Pharmacopoeia of Ukraine. Vol. 1. State Enterprise «Scientific-Expert Pharmacopoeial Center» 2nd edition. Kharkiv: State Enterprise «Scientific-Expert Pharmacopoeial Center», 2015:881–909. Ukrainian.

Відомості про авторів

Салій О. О. – кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри промислової фармації, Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна. E-mail: saliy.oo@knutd.edu.ua, ORCID: 0000-0001-7103-2083.

Нікітіна О. О. – кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри промислової фармації, Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна. E-mail: nikitina.oo@knutd.edu.ua, ORCID: 0000-0001-6994-4294.

Ковалевська О. І. – аспірант кафедри промислової фармації, Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна. E-mail: olga.bochrova77@gmail.com, ORCID: 0000-0001-5029-4623.

Ляшенко В. О. – магістр кафедри промислової фармації, Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна. E-mail: vika.liashenko18@gmail.com, ORCID: 0009-0008-8777-8224.

Information about the authors

Saliy O. O. – PhD (Pharmacy) Associate Professor of the Department of Industrial Pharmacy, Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine. E-mail: saliy.oo@knutd.edu.ua, ORCID: 0000-0001-7103-2083.

Nikitina O. O. – PhD (Pharmacy) Associate Professor of the Department of Industrial Pharmacy, Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine. E-mail: nikitina.oo@knutd.edu.ua, ORCID: 0000-0001-6994-4294.

Kovalevska O. I. – PhD student in pharmacy of the Department of Industrial Pharmacy, Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine. E-mail: olga.bochrova77@gmail.com, ORCID: 0000-0001-5029-4623.

Lyashenko V. O. – Master's graduate of the Department of Industrial Pharmacy, Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine. E-mail: vika.liashenko18@gmail.com, ORCID: 0009-0008-8777-8224.