



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения подлинности и количественного содержания эноксапарина натрия в инъекционных препаратах методом ВЭЖХ

Е. А. Пшеничнов¹✉, К. В. Кондрашева²

¹ СП ООО «Jurabek Laboratories», 100003, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Алмазар, д. 165

² Институт микробиологии академии наук Республики Узбекистан, 100128, Узбекистан, г. Ташкент, ул. А. Кадры, д. 7Б

✉ Контактное лицо: Пшеничнов Егор Александрович. E-mail: egor.p@jurabek.uz

ORCID: Е. А. Пшеничнов – <https://orcid.org/0000-0003-1893-8876>; К. В. Кондрашева – <https://orcid.org/0000-0003-3741-7304>.

Статья поступила: 24.02.2022

Статья принята в печать: 16.01.2023

Статья опубликована: 24.02.2023

Резюме

Введение. Препараты эноксапарина натрия включены в актуальные протоколы лечения COVID-19. При увеличении объема выпуска таких препаратов лаборатории контроля качества испытывают потребность в доступных и точных методиках идентификации и количественного определения активного вещества в лекарственных средствах. Учитывая, что фармакопейные методы требуют дорогостоящих стандартов, реагентов, недоступных многим лабораториям, разработка более доступного метода позволит ускорить и удешевить процесс контроля качества препаратов, содержащих эноксапарин натрия.

Цель. Разработка и валидация простого, экономичного, точного метода гельпроникающей высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением рефрактометрического детектора для оценки эноксапарина натрия в инъекционных препаратах.

Материалы и методы. Объектом исследования явились образцы субстанции и коммерческих препаратов, содержащих эноксапарин натрия. Определение подлинности и количественного содержания активного вещества проводили методом гельпроникающей ВЭЖХ на хроматографе 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), оснащенный дифференциальным рефрактометрическим детектором.

Результаты и обсуждение. В ходе работы проанализированы стандартные валидационные характеристики: специфичность, линейность, прецизионность и правильность метода. Анализ данных показал высокую специфичность и пригодность разработанной методики критериям приемлемости для хроматографических систем. Метод рекомендован к использованию для рутинного контроля готовых лекарственных средств или полупродукта, содержащих от 25 до 200 мг/мл эноксапарина натрия.

Заключение. Разработанный метод является пригодным для использования в рутинном контроле качества инъекционных препаратов, содержащих эноксапарин натрия в качестве действующего вещества.

Ключевые слова: эноксапарин натрия, гельпроникающая ВЭЖХ, подлинность, количественное определение, валидация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Е. А. Пшеничнов проводил подбор условий хроматографирования, подготовку и анализ образцов, статистическую обработку данных, участвовал в написании и корректировке статьи. К. В. Кондрашева проводила анализ материалов, интерпретацию данных, оформление и корректировку статьи.

Для цитирования: Пшеничнов Е. А., Кондрашева К. В. Разработка и валидация методики определения подлинности и количественного содержания эноксапарина натрия в инъекционных препаратах методом ВЭЖХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):76–83. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-76-83>

Development and Validation of Analytical HPLC Method for Identification and Assay of Enoxaparin Sodium in Injectable Preparations

Egor A. Pshenichnov¹✉, Kseniya V. Kondrasheva²

¹ JV «Jurabek Laboratories» Ltd., 165, Almazar str., Tashkent, 100003, Uzbekistan

² Institute of Microbiology, 7B, A. Kadyri str., Tashkent, 100128, Uzbekistan

✉ Corresponding author: Egor A. Pshenichnov. E-mail: egor.p@jurabek.uz

ORCID: Egor A. Pshenichnov – <https://orcid.org/0000-0003-1893-8876>; Kseniya V. Kondrasheva – <https://orcid.org/0000-0003-3741-7304>.

Received: 24.02.2022

Revised: 16.01.2023

Published: 24.02.2023

Abstract

Introduction. Enoxaparin sodium-containing drugs are included in relevant protocols for COVID-19 therapy. An increase in the production volume of such drugs leads to a demand for available and precise methods of identification and quantitative measurement of the active ingredient in the preparations. Considering the fact that pharmacopoeial methods require significant amount of expensive standards and reagents that are unavailable for numerous laboratories, it is relevant to develop a more available method that will accelerate and make cheaper the process of quality control for enoxaparin sodium-containing preparations.

Aim. To develop and validate a simple, economic, and precise method of gel-permeation HPLC with the application of a refractive index detector for the evaluation of enoxaparin sodium in preparations for injection.

© Пшеничнов Е. А., Кондрашева К. В., 2023

© Pshenichnov E. A., Kondrasheva K. V., 2023

Materials and methods. Samples of enoxaparin sodium-containing substances and commercial preparations were studied. The identification and quantitative content of the active ingredient were performed by the method of gel-permeation HPLC using a 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA) chromatograph equipped with a refractive index detector.

Results and discussion. The authors analyzed standard validation characteristics: specificity, linearity, precision, and accuracy of the method. The analysis revealed high specificity and suitability of the proposed method to chromatographic symmetrical multiprocessing systems. The method is recommended for routine control of finished and semi-finished pharmaceutical preparations containing from 25 to 200 mg/ml of enoxaparin sodium-containing.

Conclusion. The proposed method can be used for routine quality control of enoxaparin sodium-containing preparations for injection.

Keywords: enoxaparin sodium, gel permeation HPLC, identification, assay, validation

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Egor A. Pshenichnov performed the selection of chromatography conditions and analysis of samples, statistical data processing, participated in writing and correcting the manuscript. Kseniya V. Kondrasheva analyzed the materials, interpreted the data, designed and corrected the manuscript.

For citation: Pshenichnov E. A., Kondrasheva K. V. Development and validation of analytical HPLC method for identification and assay of enoxaparin sodium in injectable preparations. *Drug development & registration*. 2023;12(1):76–83. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-76-83>

ВВЕДЕНИЕ

Актуальные на сегодняшний день протоколы лечения заболевания COVID-19, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2¹, включают антикоагулянты прямого действия, в том числе, содержащие в качестве основного действующего вещества (API) эноксапарин натрия².

Согласно требованиям Фармакопеи США, подлинность эноксапарина натрия в API и его инъекционных препаратах устанавливается спектрофотометрически, путем определения максимума поглощения; на основании сравнения спектров ¹³C ЯМР стандартного и испытуемого растворов; по отношению числовых значений активности анти-фактора Ха к активности анти-фактора IIa и определению молекулярной массы методом эксклюзионной хроматографии³. Количественное определение рекомендуется проводить фотоколориметрическим методом по образованию окрашенных соединений при взаимодействии хромогенных реагентов с комплексами эноксапарин – фактор свертывания крови Ха и эноксапарин – фактор свертывания крови IIa. Эти методы трудоемки, требуют наличия специального аналитического обо-

рудования и дорогостоящих факторов свертывания крови, недоступных многим лабораториям контроля качества. Кроме этого, спектрофотометрические методы не применимы для препаратов, содержащих вспомогательные вещества, например, бензиловый спирт. Поэтому для испытательных лабораторий фармацевтических предприятий и регуляторных органов необходимо внедрение более доступных, специфичных и универсальных методик идентификации и количественного определения эноксапарина в лекарственных препаратах.

В настоящее время подробно описаны современные способы определения активности гепаринов в зависимости от их молекулярной массы [1], включая коагулометрический и хромогенный методы. Предложен УФ-спектрофотометрический метод количественной оценки эноксапарина натрия по определению анти-Ха и анти-IIa активности в условиях *in vitro* (анализ лекарственного средства) и *in vivo* (анализ плазмы крови кролика) при длине волны 405 нм [2]. А также описана менее затратная по времени и реактивам методика количественного определения непосредственно эноксапарина натрия в растворе. Анализ проводили спектрофотометрически при длине волны 234 нм, но специфичность данного метода не представлена [3].

Учитывая сложную структуру низкомолекулярных гепаринов, был предложен метод масс-спектрометрии для выяснения тонкой структуры веществ [4], что, несомненно, важно во время разработки препаратов-генериков или дополнительного контроля качества нового сырья, но не всегда подходит для рутинного анализа.

¹ Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Available at: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Accessed: 24.03.2022.

² Протокол лечения COVID-19 медицинского центра МГУ. Доступно по: <http://mc.msu.ru/protokol-COVID-MNOC.pdf>. Ссылка активна на 24.03.2022.

³ USP–NF. Available at: <https://www.uspnf.com/> Accessed: 24.03.2022.

Одним из наиболее распространенных и точных методов в современном фармацевтическом анализе является метод хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) и разновидность этого метода – гелипроникающая ВЭЖХ (ГПХ)¹. Еще в 1991 году Kristensen с соавт. предложил использование данного метода для рутинного определения молекулярной массы и молекулярно-массового распределения низкомолекулярных гепаринов [5]. В последние годы проделано достаточное количество исследований, доказывающих надежность эксклюзионной хроматографии для контроля качества данной группы веществ. Так, Radivojĉa Matanoviĉ с соавт. предлагает простой и достоверный метод для количественного определения интактного гепарина в фармацевтических препаратах [6]. Имеются рекомендации фирмы Agilent для проведения ГПХ-анализа биологических полимеров, например, гепарина².

Использование метода ГПХ с детекцией по рефрактометрическому индексу отличается высокой специфичностью за счет возможности оценить молекулярную массу образца эноксапарина и его молекулярно-массовое распределение, а также определить концентрацию исследуемого вещества в растворе, не прибегая к опосредованному методу определения его активности. Специфичность метода позволяет одновременно проводить количественное определение и испытание подлинности анализируемых препаратов, при этом, исключая влияние вспомогательных веществ.

Цель работы. Подбор хроматографических условий и валидация методики определения эноксапарина натрия в водных растворах методом ВЭЖХ для рутинных анализов в лабораториях контроля качества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приборы и оборудование

- Хроматограф высокого давления 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), оснащенный дифференциальным рефрактометрическим детектором.
- Колонка хроматографическая PL aquagel-ОН 30 (8 мкм, 300 × 7,5 мм) (Agilent Technologies, США).
- Программное обеспечение OpenLAB CDS ChemStation ver. A.01.04 и Agilent GPC/SEC Software ver. A.02.01 (Agilent Technologies, США).

Реактивы

- Натрия нитрат (Sigma-Aldrich, США, кат. № S5506), натрия фосфат однозамещенный (Supelco Inc., США, кат. № 52074), кислота ортофосфорная

¹ European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Available at: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>. Accessed: 24.03.2022.

² Your reference guide to the analysis of biopharmaceuticals and biomolecules. Available at: https://www.labc.com.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/5990-9384EN_SEC.pdf. Accessed: 24.03.2022.

(Supelco Inc., США, кат. № 49685), натрия гидроксид (Sigma-Aldrich, США, кат. № S8045), вода очищенная.

- Сертифицированные стандартные образцы для калибровки колонки: декстран 4 ($M_w = 3609$ г/моль, EDQM D0733000, Batch 2), декстран 10 ($M_w = \{8800 \div 10450\}$ г/моль, EDQM D0734000, Batch 2) и полиэтиленгликоль-1500 ($M_w = 1400$ г/моль, USP 1546503, Lot. F0F009).

Приготовление подвижных фаз для хроматографии

1. 1000 мл воды очищенной фильтруют через мембранный фильтр с размерами пор 0,45 мкм.
2. 17,0 г натрия нитрата и 1,2 г натрия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и растворяют в 800 мл воды очищенной, доводят pH до 3,0 кислотой ортофосфорной. Полученный раствор доводят водой очищенной до метки, фильтруют через мембранный фильтр с размерами пор 0,45 мкм.
3. 17,0 г натрия нитрата и 1,2 г натрия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и растворяют в 800 мл воды очищенной, pH доводят 0,1 М натрия гидроксидом до 7,0. Полученный раствор доводят водой очищенной до метки, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Приготовление растворов стандартных образцов для калибровки колонки

По 20 мг каждого стандартного образца для калибровки колонки тщательно растворяют в 1 мл подвижной фазы для хроматографии. Растворы используют свежеприготовленными.

Приготовление испытуемых растворов

Коммерческие образцы субстанции (API) эноксапарина натрия (Hebei Changshan Biochemical Pharmaceutical Co., Ltd., Китай, серия NES190603, срок годности до 06.2022) и препаратов, содержащих эноксапарин натрия в качестве действующего вещества, «Evararin», раствор для инъекций 300 мг / 3 мл (Intas Pharmaceuticals Ltd., Индия, серия L4421006, срок годности до 06.2023), Клексан®, раствор для инъекций 4000 IU (Sanofi S.p.A., Франция, серия AS438, срок годности до 03.2023) и «Эноксапарин-JL», раствор для инъекций 4000 ME («Jurabek Laboratories» МСНУ, Узбекистан, серия 0010520, срок годности до 06.2022) разбавляют подвижной фазой для хроматографии до получения конечных концентраций эноксапарина натрия 10–200 мг/мл.

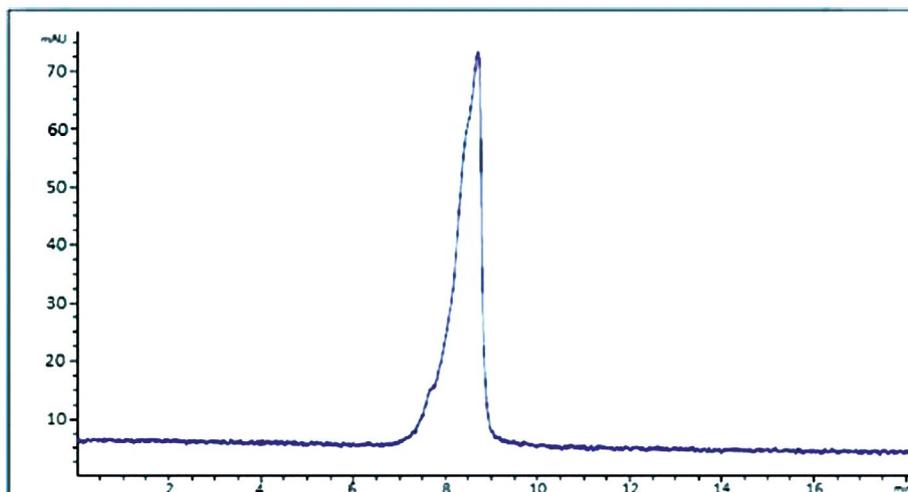


Рисунок 1. Хроматограмма эноксапарина натрия (10 мг/мл); подвижная фаза – вода очищенная
Figure 1. Chromatogram of enoxaparin sodium (10 mg/ml); mobile phase – pure water

Условия хроматографирования

В качестве основы для подбора условий хроматографирования использовали метод количественного определения гепарина, предложенный фирмой Agilent¹ с некоторыми модификациями:

- Хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 300 × 7,5 мм, заполненная сорбентом PL aquagel-ОН 30 с размером частиц 8 мкм.
- Подвижная фаза:
 - 1) вода очищенная;
 - 2) буфер с pH 3,0;
 - 3) буфер с pH 7,0.
- Скорость потока подвижной фазы: 0,6 мл/мин.
- Объем пробы: 20 мкл.
- Детектирование: дифференциальная рефрактометрия.
- Температура колонки: 30 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор методики определения эноксапарина натрия в образцах парентеральных препаратов

С целью подбора оптимальной подвижной фазы для наиболее эффективного хроматографирования раствора эноксапарина натрия были исследованы вода очищенная и водно-солевые буферы с нейтральным и кислым значениями pH. Скорость потока устанавливали в соответствии с рекомендациями для выбранного типа хроматографической колонки (0,6 мл/мин).

¹ Your reference guide to the analysis of biopharmaceuticals and biomolecules. Available at: https://www.labc.com.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/5990-9384EN_SEC.pdf. Accessed: 24.03.2022.

При использовании в качестве подвижной фазы воды очищенной типичная хроматограмма эноксапарина натрия представляла собой один несимметричный пик (рисунок 1).

При использовании солевого буфера с кислым pH наблюдался значительный гидролиз эноксапарина натрия с образованием большого отрицательного пика на хроматограмме (рисунок 2).

Наиболее эффективное хроматографирование было получено при использовании солевого буфера того же состава, но с нейтральным pH (рисунок 3). В этой связи, для дальнейших исследований была выбрана подвижная фаза 3 – буфер с pH 7,0.

Методика с выбранной подвижной фазой была воспроизведена при анализе растворов API и готовых лекарственных форм эноксапарина натрия:

- «Evararin», раствор для инъекций 300 мг / 3 мл (Intas Pharmaceuticals Ltd., Индия).
- Клексан®, раствор для инъекций 4000 IU (Sanofi S.p.A., Франция).
- «Эноксапарин-Л», раствор для инъекций 4000 МЕ («Jurabek Laboratories» МСНУ, Узбекистан).

В результате, для всех образцов была получена характерная хроматограмма, идентичная представленной на рисунке 3.

Валидация методики

С целью изучения пригодности выбранной хроматографической системы в качестве метода количественного определения эноксапарина натрия в водных растворах нами проведена его валидация, в ходе которой определяли стандартные метрологические характеристики, к которым относятся специфичность, линейность, прецизионность и правильность [7].

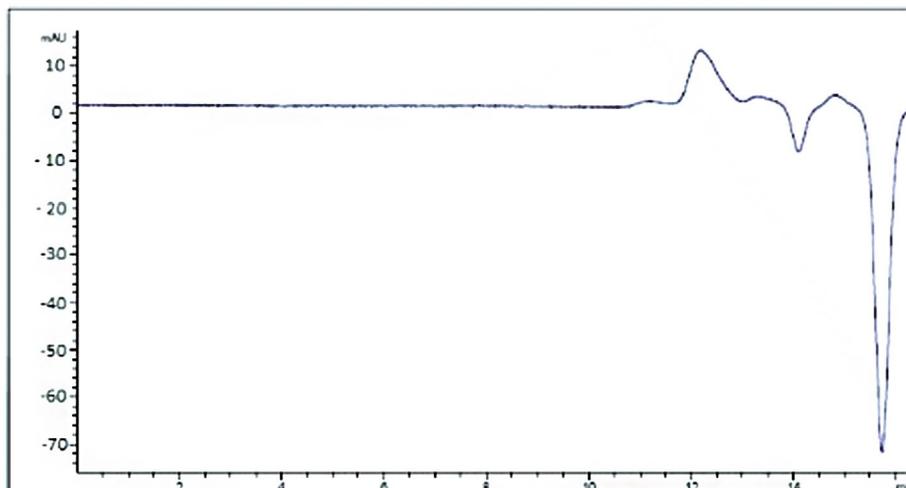


Рисунок 2. Хроматограмма эноксапарина натрия (10 мг/мл), подвижная фаза – буфер с pH 3,0

Figure 2. Chromatogram of enoxaparin sodium (10 mg/ml); mobile phase – buffer solution, pH 3.0

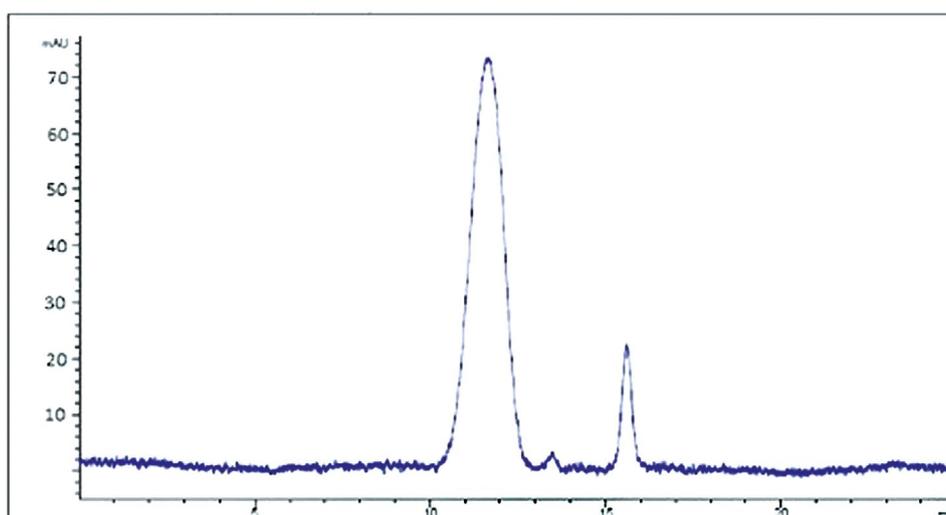


Рисунок 3. Хроматограмма эноксапарина натрия (10 мг/мл), подвижная фаза – буфер с pH 7,0

Figure 3. Chromatogram of enoxaparin sodium (10 mg/ml); mobile phase – buffer-solution, pH 7.0

Специфичность

Специфичность метода, необходимую как для подлинности, так и для количественной оценки, подтверждали путем определения молекулярной массы и молекулярно-массового распределения эноксапарина натрия с использованием прикладной программы Agilent GPC/SEC Software.

Для калибровки хроматографической колонки были использованы сертифицированные стандартные образцы полиэтиленгликоля и декстранов с точно известными молекулярными массами (рисунок 4).

Согласно полученным данным, основной пик на хроматограмме раствора эноксапарина натрия со-

ответствовал средней относительной молекулярной массе $M_w = 4495$ г/моль (75 %).

Эти данные полностью удовлетворяют требованиям Фармакопеи США¹ и Европейской фармакопеи² к характеристике эноксапарина натрия по процентному распределению средней относительной молекулярной массы в пределах установленного диапазона.

¹ USP-NF. Available at: <https://www.uspnf.com/> Accessed: 24.03.2022.

² European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Available at: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>. Accessed: 24.03.2022.

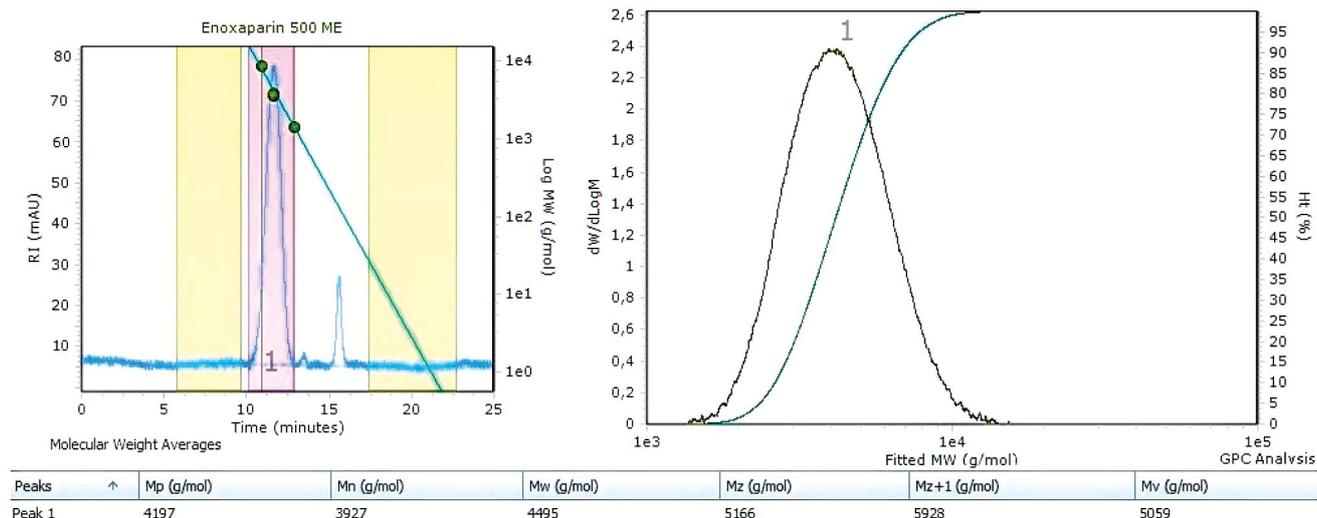


Рисунок 4. Определение молекулярной массы и молекулярно-массового распределения эноксапарина натрия

Figure 4. Determination of molecular mass and molecular-mass distribution of enoxaparin sodium

При анализе готовой лекарственной формы эноксапарина натрия, содержащей в качестве вспомогательного вещества спирт бензиловый [«Evararin», раствор для инъекций 300 мг / 3 мл (Intas Pharmaceuticals Ltd., Индия)], влияние данного компонента на результаты хроматографического разделения не наблюдалось.

Полученные данные подтверждают специфичность выбранного метода хроматографического анализа и позволяют однозначно оценить определяемое вещество в присутствии вспомогательных компонентов.

Линейность

Линейность метода оценивали по зависимости площади пика от концентрации эноксапарина натрия в диапазоне концентраций эноксапарина натрия 25–200 мг/мл (1000–8000 ME) (рисунок 5).

Полученные статистические характеристики линейности метода, представленные в таблице 1, как и графические данные (рисунок 5) позволяют заключить, что зависимость площади пика от концентрации эноксапарина натрия в растворе носит линейный характер.

Таблица 1. Статистические характеристики линейности метода

Table 1. Statistical characteristics of the method linearity

Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results
Наклон (a) Slope (a)	94,0
Отрезок на оси ординат (b) Section on vertical axis (b)	7988
Кoeffициент корреляции (r) Correlation coefficient (r)	0,9997

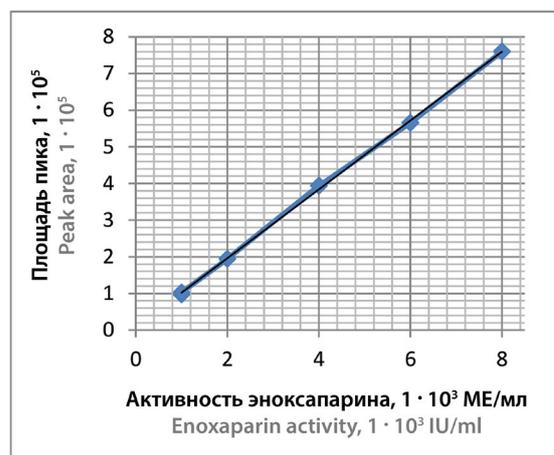


Рисунок 5. График зависимости площади пика от содержания эноксапарина натрия в растворе

Figure 5. Typical relationship between the peak area and concentration of enoxaparin sodium in solution

Прецизионность

Внутрилабораторную прецизионность оценивали статистически: были обработаны результаты двух параллельных определений, выполненных разными операторами в один день, в одной лаборатории и на одном и том же оборудовании. Определения проводились при шестикратной повторности из одинакового разведения препарата (4000 ME/мл) (таблица 2). Как видно из данных, представленных в таблице 2, между результатами, полученными двумя операторами, статистически значимых различий не наблюдалось.

Критерии достоверности гипотезы [7] для данного метода составили 1,027 и 0,774, соответственно.

Таблица 2. Статистические характеристики сходимости метода

Table 2. Statistical characteristics of the method precision

№	Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results	
		Оператор 1 Operator 1	Оператор 2 Operator 2
1	Объем выборки (n) Sample size (n)	6	6
2	Минимальное значение, МЕ/мл Minimal value, IU/ml	3990	3995
3	Максимальное значение, МЕ/мл Maximal value, IU/ml	4005	4007
4	Среднее значение, МЕ/мл Average value, IU/ml	3998	4000
5	Стандартное отклонение Standard deviation	4,779	4,843
6	Коэффициент вариации Variation coefficient	0,1195	0,1211
7	Нижняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Lower limit of confidence interval (P = 95 %)	3993	3995
8	Верхняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Upper limit of confidence interval (P = 95 %)	4003	4005

Правильность

Правильность метода оценивали путем определения фактора отклика трех разведений препарата (соотношение между значением площади хроматографического пика и соответствующим количеством эноксапарина натрия), соответствующих 120%-му, 100%-му и 80%-му содержанию эноксапарина натрия по отношению к исходному содержанию (6000 МЕ/мл)

Таблица 4. Метрологические характеристики метода

Table 4. Metrologic characterization of the method

Параметр валидации Validation parameter	Критерии приемлемости Acceptance criteria	Результаты проверки Results
Линейность Linearity	Коэффициент корреляции $\geq 0,99$ Correlation coefficient ≥ 0.99	0,9997
Внутрилабораторная прецизионность Laboratory precision	Критерий $F \leq 5,05$. Критерий $t \leq 2,228$ Criteria $F \leq 5.05$ Criteria $t \leq 2.228$	$F = 1,027$ $t = 0,774$
Правильность Accuracy	Фактор отклика: среднее значение 97,5–102,5 %. Доверительный диапазон должен включать 100%-е значение. Коэффициент вариации $\leq 2,0$ % Response factor: average value 97.5–102.5 %. Confidence interval includes the value of 100 %. Variation coefficient ≤ 2.0 %.	Среднее значение: 99,88. Нижняя граница доверительного интервала (при P = 95 %): 99,71. Верхняя граница доверительного интервала (при P = 95 %): 100,06. Коэффициент вариации 0,22 %. Average value: 99.88. Lower limit of confidence interval (P = 95 %): 99.71. Upper limit of confidence interval (P = 95 %): 100.06. Variation coefficient 0.22 %

в препарате (определения выполнялись для трех образцов на каждом уровне содержания эноксапарина натрия). Полученные статистические характеристики правильности метода, представленные в таблице 3, удовлетворяют требованиям, предъявляемым к хроматографическим системам [7].

Таблица 3. Статистические характеристики правильности метода

Table 3. Statistical characteristics of the method accuracy

№	Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results
1	Объем выборки (n) Sample size (n)	9
2	Минимальное значение, МЕ/мл Minimal value, IU/ml	99,56
3	Максимальное значение, МЕ/мл Maximal value, IU/ml	100,08
4	Среднее значение, МЕ/мл Average value, IU/ml	99,88
5	Стандартное отклонение Standard deviation	0,224
6	Коэффициент вариации Variation coefficient	0,22
7	Нижняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Lower limit of confidence interval (P = 95 %)	99,71
8	Верхняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Upper limit of confidence interval (P = 95 %)	100,06

Принимая во внимание критерии приемлемости результатов валидации [7], рекомендуемые для хроматографических методов анализа (таблица 4),

полученные нами данные метрологических характеристик позволяют сделать вывод о том, что предложенный метод подтверждения подлинности и количественного определения эноксапарина натрия в водных растворах можно считать с высокой степенью надежности пригодным для применения в заданных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный метод гельпроникающей хроматографии для определения подлинности и количественного содержания эноксапарина натрия соответствует критериям достоверности, предъявляемым к хроматографическим методам анализа лекарственных средств.

Метод оказался простым, высокоточным и воспроизводимым. По итогам валидации методика признана специфичной и пригодной для использования в рутинном контроле качества инъекционных препаратов, содержащих эноксапарин натрия в качестве действующего вещества. Метод внесен в нормативный документ на отечественный лекарственный препарат «Эноксапарин-Л», раствор для инъекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В., Мелкумян А. Л., Козлов А. А., Нешкова Е. А., Яровая Г. А. Методы определения активности гепарина. М.: ГБОУ ДПО РМАПО; 2015. 64 с.
2. Маргаева Б. Ю., Шохин И. Е. Разработка, валидация и апробация методик определения анти- X_A - и анти-IIA-активности эноксапарина натрия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(4):190–196.
3. Sahu S., Lariya N. K. Development and Validation of Spectrophotometric Method for the Estimation of Enoxaparin sodium in marketed formulation. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2019;9(4-s):1236–1239. DOI: 10.22270/jddt.v9i4-s.3972.
4. Wang Zh., Chi L. Recent advances in mass spectrometry analysis of low molecular weight heparins. *Chinese Chemical Letters*, 2018;29(1):11–18. DOI: 10.1016/j.ccllet.2017.08.050.
5. Kristensen H. I., Tromborg E. M., Nielsen J. R., Nielsen J. I., Johansen K. B., Ostergaard P. B. Development and validation of a size exclusion chromatography method for determination of molecular masses and molecular mass distribution in low molecular weight heparin. *Thrombosis research*. 1991;64(2):131–141. DOI: 10.1016/0049-3848(91)90113-b.
6. Matanović M. R., Grabnarm I., Grabnar P. A., Roškar R. Development and validation of a simple and sensitive size-exclusion chromatography method for quantitative determination of heparin in pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica*. 2015;65:(1)43–52. DOI: 10.1515/acph-2015-0010.
7. Береговых В. В. ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. М: Литтера; 2008. 132 с.

REFERENCES

1. Berkovskiy A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V., Melkumyan A. L., Kozlov A. A., Neshkova E. A., Yarovaya G. A. Methods of determination of heparin activity. Moscow: GBOU DPO RMAPO; 2015. 64 p. (In Russ.)

2. Margaeva B. Yu., Shohin I. E. Development, validation and application of anti- X_A - and anti-IIa-enoxaparine sodium assay. *Drug development & registration*. 2016;(4):190–196. (In Russ.)
3. Sahu S., Lariya N. K. Development and Validation of Spectrophotometric Method for the Estimation of Enoxaparin sodium in marketed formulation. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2019;9(4-s):1236–1239. DOI: 10.22270/jddt.v9i4-s.3972.
4. Wang Zh., Chi L. Recent advances in mass spectrometry analysis of low molecular weight heparins. *Chinese Chemical Letters*, 2018;29(1):11–18. DOI: 10.1016/j.ccllet.2017.08.050.
5. Kristensen H. I., Tromborg E. M., Nielsen J. R., Nielsen J. I., Johansen K. B., Ostergaard P. B. Development and validation of a size exclusion chromatography method for determination of molecular masses and molecular mass distribution in low molecular weight heparin. *Thrombosis research*. 1991;64(2):131–141. DOI: 10.1016/0049-3848(91)90113-b.
6. Matanović M. R., Grabnarm I., Grabnar P. A., Roškar R. Development and validation of a simple and sensitive size-exclusion chromatography method for quantitative determination of heparin in pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica*. 2015;65:(1)43–52. DOI: 10.1515/acph-2015-0010.
7. Beregovykh V. V., editor. Validation of analytical methods for medicines manufacturers. Moscow: Littera; 2008. 132 p. (In Russ.)