

PEGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE HEPARIN ATAU ENOKSAPARIN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI PASANGAN ION

Engrid Juni Astuti^{1*}, Ika Ratna Hidayati¹, Slamet Ibrahim², Muhammad Ali Zulfikar³

Informasi Penulis ABSTRAK

¹Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Muhammadiyah Malang, Malang 65145, Indonesia

²Faculty of Pharmacy, Universitas Jenderal Achmad Yani, Cimahi 40633, Indonesia

³Division on Analytical Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Bandung Institute of Technology, Bandung 40132, Indonesia

*Korespondensi

Email: engridjuni81@umm.ac.id

Salah satu obat yang digunakan untuk mengobati dan mencegah masalah tromboemboli saat COVID-19 adalah heparin atau natrium enoksaparin. Heparin dan enoksaparin mempunyai efek samping perdarahan bila digunakan sehingga perlu dilakukan pemantauan terhadap terapi. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi sistem kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) pasangan ion untuk menganalisis adsorpsi heparin atau enoksaparin pada molekuler yang dicetak secara molekuler (MIP) setelah sintesis. Sistem kromatografi terdiri dari kolom C8 dengan detektor *Diode Array* (DAD). Kondisi kromatografi optimal diperoleh dengan menggunakan fase gerak A (300mM NaCl + 10mM tetra n-butyl amonium hidroksida) dan fase gerak B (asetonitril) pada elusi gradien, dan volume injeksi 100 µL. Heparin atau enoksaparin dideteksi pada panjang gelombang 231 nm, menghasilkan puncak simetris dan pemisahan yang baik dalam 4,1 menit setelah injeksi. Metode ini menunjukkan selektivitas yang baik dengan resolusi 3,49 untuk heparin dan 3,74 untuk enoksaparin. Respon detektor linier dengan R² sebesar 0,9965 dan 0,9994 untuk heparin dan enoksaparin. Metode ini menghasilkan presisi serta akurasi yang baik. Metode yang diusulkan telah memenuhi persyaratan validasi metode untuk analisis adsorpsi heparin atau enoksaparin sebelum digunakan dalam validasi pada sampel biologis.

Kata kunci : Heparin, enoksaparin, KCKT, pasangan ion

ION PAIRING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD VALIDATION AND DEVELOPMENT OF HEPARIN OR ENOXAPARIN

ABSTRACT

One of the drugs used to treats and prevents COVID-19 thromboembolic problems is heparin or enoxaparin sodium. Heparin and enoxaparin have the side effect of bleeding when used, so monitoring of therapy is necessary. This present study aims to validate an ion pair high-performance liquid chromatography (HPLC) condition to analyse the adsorption of heparin or enoxaparin at molecularly imprinted polymer (MIP) after synthesis. The chromatographic system consists of a C8 column with a Diode Array Detector (DAD). The optimal chromatographic condition was obtained using mobile phase A (300mM NaCl + 10mM tetra n-butyl ammonium hydroxide) and mobile phase B (acetonitrile) under gradient elution, and 100 µl injection volume. The heparin or enox was detected at 231 nm, generating symmetrical peaks and good separation in 4.1 minutes after injection. The method indicated good selectivity with a resolution of 3.49 for heparin and 3.74 for enox. A linear detector response with R² of 0.9965 and 0.9994 for heparin and enox. The method yields good precision and good accuracy. The proposed method has met the method validation requirements for adsorption heparin or enox analysis before using validation in biological samples.

Keywords: Heparin, enoxaparin, HPLC, Ion pairing

PENDAHULUAN

Heparin merupakan antikoagulan golongan polisakarida alami yang paling banyak digunakan dalam praktik klinis. Heparin adalah salah satu makromolekul alami yang paling kompleks, ditandai dengan polidispersitas berat molekul, mikroheterogenitas dalam struktur, dan polaritas kuat dengan muatan sangat negatif. Heparin dilaporkan memiliki efek samping seperti osteoporosis, trombositopenia, dan perdarahan, karena rantai gulanya yang panjang. Untuk mengatasi masalah ini, heparin dengan berat molekul rendah (LMWHs) mulai digunakan dalam praktik klinis untuk mengurangi efek samping dan meningkatkan bioavailabilitas. Enoksaparin menjadi salah satu heparin dengan berat molekul rendah (LMWH) yang lebih sering digunakan sebagai antikoagulan (Zhu *et al.* 2024).

Pada awal tahun 2020 disaat pandemi covid-19 yang cepat berkembang menjadi gagal napas banyak pasien memerlukan rawat inap untuk dukungan pernapasan hingga ventilasi invasif. Pasien yang dirawat di rumah sakit secara inheren berisiko tinggi mengalami tromboemboli vena (VTE) karena infeksi akut yang diatasi dengan penggunaan golongan heparin berat molekul rendah (LMWH) yaitu enoksaparin atau heparin tak terfraksi (UFH) yaitu fondaparinux (Cosmi *et al.* 2023). Terapi antikoagulan dapat menurunkan angka kematian pada pasien COVID-19 saat itu dengan koagulopati yang disebabkan oleh sepsis, suatu kondisi yang disebut koagulopati terinduksi sepsis (SIC) (Debora *et al.* 2022). Penggunaan antikoagulan pada beberapa pasien yang juga mengalami gagal ginjal dapat menyebabkan perdarahan sehingga diperlukan monitoring terapi obat (TDM).

Metode analisis untuk golongan heparin terutama enoksaparin dalam plasma darah membutuhkan preparasi yang rumit dan panjang. Beberapa metode analisis bahan aktif dalam darah membutuhkan *Solid Phase Extraction* (SPE), ekstraksi cair-cair dan polimer tercetak molekul (MIP) yang akan digunakan sebagai adsorben (Nuriah *et al.* 2023)(Melia & Hasanah 2017). Metode kromatografi *size-exclusion* (SEC) telah dikembangkan pada penelitian terdahulu untuk menganalisis enoksaparin. Kondisi kromatografi

yang optimal menggunakan kolom TSK gel G5000PWXL (10 μ m, 7.8 mm \times 300 mm) dengan laju alir 0.6 mL/min pada suhu 37 $^{\circ}$ C dengan gradien isokratik. Fase gerak buffer fosfat (pH 7.0; 10 mM) dengan panjang gelombang deteksi 232 nm. Metode yang dikembangkan linier, akurat dan *robust* sehingga memberikan cara mudah untuk memantau kapasitas pembentukan kompleks enoksaparin dengan PF4 (Wu *et al.* 2019). Kualitas heparin dinilai secara berkala oleh SEC dan kriteria pelepasan produk yang ketat telah ditetapkan dalam farmakope. masing-masing massa molar rata-rata berat < 8000 g/mol, dan fraksi massa > 60% dengan massa molar < 8000 g/mol. Pentingnya jaminan mutu heparin yang tepat menjadi jelas ketika lebih dari 100 orang meninggal dan beberapa ribu pasien jatuh sakit pada tahun 2008 setelah beberapa perusahaan farmasi gagal menemukan bahan heparin palsu yang digunakan dalam produksi. Kerugian menggunakan SEC adalah resolusinya rendah serta harga kolom yang mahal (Held & Kilz 2021).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan dan validasi metode analisa untuk heparin atau enoksaparin yang dapat digunakan untuk mengukur kadar heparin dan enoksaparin pada hasil adsorpsi MIP. Metode yang dikembangkan menggunakan kromatografi pasangan ion dengan pereaksi tetra n-butyl ammonium hidroksida yang ditambahkan pada fase gerak. Adapun detektor yang digunakan adalah *photo diado array* (PDA) dengan kolom C8. Pengembangan metode analisis ini diharapkan dapat menghasilkan metode analisis yang murah dan valid untuk dapat mengukur kadar enoksaparin atau heparin dari hasil adsorpsi pada MIP.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Heparin (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan), enoksaparin Na (BetaPharma Co. Ltd., Shanghai, China), aqua pro injection (Ika Pharmindo), tetra n-butyl ammonium hidroksida (TBAH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) NaCl (Merck) dan Asetonitril pro-HPLC (Merck.) membrane filter 0.2 μ m (Agilent).

Peralatan

Seperangkat alat KCKT (Agilent, Santa Clara, CA, USA), Kolom Zorbax Eclipse Plus C8 4,6 x 250 mm, 5 μ m (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Metode

Pembuatan larutan standar

Larutan Standar Heparin dan enoksaparin dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan standar kerja heparin dan enoksaparin dibuat dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400 dan 500 mg/mL dari pengenceran larutan standar awal.

Optimasi KCKT

Komposisi fasa gerak yang digunakan fase gerak A yaitu 300 mM NaCl ditambah dengan reagen pasangan ion 10 mM tetra n-butyl ammonium hidroksida (TBAH) dengan fase gerak B yaitu asetonitril menggunakan sistem gradien seperti pada tabel 1. Panjang gelombang yang digunakan adalah 231 nm. Laju aliran dalam instrumen KCKT diatur 1,00 mL/menit dan volume injeksi 100 μ L.

Tabel 1. Sistem gradient KCKT pasangan ion untuk heparin atau enoksaparin

Waktu (menit)	Fase gerak A (%)	Fase gerak B (%)
0,00	100,0	0,0
1,00	95,0	5,0
3,00	0,0	100,0
10,00	0,0	100,0
11,00	100,0	0,0

Uji Validasi

Selektivitas

Uji selektivitas heparin atau enoksaparin dilakukan dengan melihat nilai resolusi atau pemisahan (R_s), dengan nilai diatas 1,5 (Astuti *et al.* 2019).

Linearitas

Larutan kerja standar heparin atau enoksaparin diinjeksikan sebanyak 100 μ L ke dalam sistem KCKT. Kromatogram dicatat, dibuat kurva kalibrasi, kemudian dihitung persamaan regresi dan koefisien korelasinya. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot luas puncak pada sumbu y dan konsentrasi pada sumbu x. Kemudian dilakukan analisis nilai r. Apabila nilai r^2 lebih besar dari

0,990, maka nilai r hitung memenuhi syarat (Muhammad *et al.* 2024). Selain itu dihitung nilai V_{x0} tidak lebih besar dari 5%.

Akurasi dan Presisi

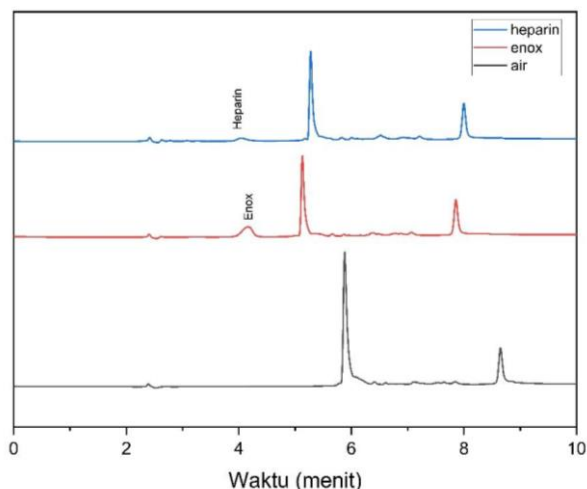
Akurasi dinyatakan sebagai perbandingan antara hasil yang diperoleh dengan hasil sebenarnya dengan tiga konsentrasi berbeda dan masing-masing konsentrasi direplikasi sebanyak tiga kali. Akurasi memenuhi persyaratan jika perolehan kembali masuk direntang 90-110% (USP, 2011) serta presisi memenuhi syarat dengan nilai RSD kurang dari 2.5% (Bhujbal *et al.* 2024).

Batas deteksi dan batas kuantifikasi

batas deteksi (LOD) adalah konsentrasi obat terendah yang dapat dideteksi dalam sampel tetapi tidak dapat diukur secara andal. LOD ditentukan sebagai konsentrasi di mana rasio signal-to-noise minimal 3:1. sedangkan Batas kuantisasi (LOQ) adalah konsentrasi obat terendah yang dapat ditentukan secara kuantitatif yang ditentukan sebagai konsentrasi obat terendah dalam rentang linier dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima dan dengan rasio signal-to-noise minimal 10:1 (Tamer *et al.* 2024).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pengembangan metode analisis KCKT dilakukan optimasi pemilihan panjang gelombang deteksi, pelarut yang digunakan dan pemilihan fase gerak yang digunakan pada proses elusi. Metode analisis yang dikembangkan ini adalah metode analisis untuk enoksaparin atau heparin. Sistem kromatografi hasil pengembangan metode analisis meliputi fase diam yaitu kolom C8, fase gerak A yaitu 300 mM NaCl ditambah dengan reagen pasangan ion 10 mM tetra n-butyl ammonium hidroksida (TBAH) dengan fase gerak B yaitu asetonitril menggunakan sistem gradien seperti pada tabel 1 yang dikembangkan dari metode analisis pada literatur (Galeotti & Volpi 2013). Panjang gelombang deteksi 231 nm, dan volume injeksi 100 μ L dengan laju alir 1 ml/menit. Kromatogram enoksaparin, heparin dan air sebagai pelarut senyawa dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. kromatogram air, enoksaparin 500 mg/L, dan heparin 500 mg/L

Spesifisitas atau selektivitas metode diselidiki dengan menyuntikkan sampel kosong (air deionisasi sebagai pelarut senyawa) untuk menunjukkan tidak adanya gangguan pada elusi heparin atau enoksaparin (Savadkouhi *et al.* 2017). Hasil pengujian selektivitas diperoleh bahwa puncak heparin ataupun enoksaparin muncul di Rt (retention time) 4,1 menit. Nilai resolusi terhadap

puncak eluen untuk heparin adalah 3,49 sedangkan enoksaparin adalah 3,74. Hasil pemisahan ini memenuhi persyaratan terpisah dari puncak lainnya dan nilai resolusinya lebih besar dari 1,5 (Rosydiati 2019).

Linearitas merupakan kemampuan metode analisis dalam memberikan respon yang baik dan proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita 2004). Hasil pengujian linieritas pada rentang konsentrasi 100 – 500 mg/L, diperoleh bahwa untuk kedua senyawa yaitu enoksaparin dan heparin memenuhi syarat linieritas dengan nilai R² untuk kurva linieritas enoksaparin dan heparin masing-masing sebesar 0,9994 dan 0,9965. Nilai V_{xo} dari linieritas untuk enoksaparin dan heparin masing-masing sebesar 1,51 % dan 3,60 % tidak lebih dari 5,0 % (Rahman *et al.*, 2020). Dari pengujian linieritas juga dapat langsung ditentukan nilai batas deteksi dan batas kuantitas metode analisis. Nilai LOD dan LOQ untuk enoksaparin adalah sebesar 13,59 ppm dan 45,29 ppm, sedangkan nilai LOD dan LOQ heparin sebesar 32,42 ppm dan 108,08 ppm. Nilai linieritas, LOD dan LOQ dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Data linieritas validasi metode analisis KCKT untuk enoksaparin

Kadar (mg/L)	\bar{X} area	SD
100	1200,533	12,16237
200	2337,733	52,54125
300	3591,867	52,07037
400	4922,533	92,55757
500	6110,033	91,4383
Persamaan garis regresi	$y=12,404x-88,6$	
R ²	0,9994	
V _{xo} (%)	1,51	
LOD (mg/L)	13,59	
LOQ (mg/L)	45,29	

Tabel 3. Data linieritas validasi metode analisis KCKT untuk heparin

Kadar (mg/L)	\bar{X} area	SD
100	57,66667	1,001665
200	135,7333	2,400694
300	186,0667	3,118226
400	253,6667	1,350309
500	325,5	4,150904
Persamaan garis regresi	$y=0,6536x-4,3533$	
R ²	0,9965	
V _{xo} (%)	3,60	
LOD (mg/L)	32,42	
LOQ (mg/L)	108,08	

Akurasi pada metode analisis dapat didefinisikan sebagai kedekatan hasil pengujian yang diperoleh metode tersebut dengan nilai sebenarnya. Hasil ini dinyatakan sebagai persen pemulihan. Presisi pada metode analisis dapat didefinisikan sebagai kedekatan antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari beberapa pengambilan sampel dari sampel standar yang sama di bawah kondisi yang ditentukan (Sushila Dagadu Chavan & Deepa Mahendra Desai 2022). Hasil pengujian akurasi dan presisi dilakukan pada tiga konsentrasi larutan enoksaparin dan heparin, yaitu 250, 300 dan 350 mg/L. Masing-masing konsentrasi larutan dipreparasi sebanyak 3 kali, kemudian diinjeksikan ke dalam sistem KCKT.

Hasil pengujian untuk parameter akurasi dan presisi dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5. Hasil menunjukkan bahwa % *recovery* memenuhi syarat dan berada pada rentang yang dipersyaratkan yaitu sebesar 90,0 – 110,0 % untuk penetapan kadar zat aktif (USP, 2011). Parameter persen *recovery* ini merupakan parameter yang dijadikan acuan pada penentuan akurasi metode analisis. Dari data nilai RSD dapat dinyatakan bahwa presisi metode analisis adalah memenuhi syarat, karena berada pada nilai di bawah 2,0 % baik enoksaparin maupun heparin.

Tabel 4. Data akurasi dan presisi validasi metode analisis enoksaparin dengan metode KCKT

Konsentrasi (mg/L)	Area	Recovery (mg/L)	Recovery (%)
250	3014	250,13	100,05
250	2919,8	242,53	97,01
250	2874,8	238,91	95,56
300	3651,5	301,52	100,51
300	3555,4	293,78	97,93
300	3568,7	294,85	98,28
350	4083,9	336,38	96,11
350	4143,1	341,16	97,47
350	4150,3	341,74	97,64
	Rata-rata		97,84
	SD		1,6298
	RSD		1,67

Tabel 5. Data akurasi dan presisi validasi metode analisis heparin dengan metode KCKT

Konsentrasi (mg/L)	Area	Recovery (mg/L)	Recovery (%)
250	160,3	251,86	100,74
250	157,7	247,88	99,15
250	159,1	250,02	100,01
300	184,9	289,49	96,50
300	189,6	296,68	98,89
300	184,3	288,58	96,19
350	223,4	348,40	99,54
350	221,3	345,19	98,62
350	222,9	347,63	99,32
	Rata-rata		98,78
	SD		1,5132
	RSD		1,53

Dalam pemisahan kromatografi pasangan ion, retensi analit ditentukan oleh beberapa faktor seperti hidrofobisitas fase diam, konsentrasi organik fase gerak, muatan analit pada pH percobaan, serta muatan, konsentrasi dan

hidrofobisitas reagen pasangan ion yang digunakan. Dalam model retensi elektrostatis melalui pasangan ion, reagen pasangan ion hidrofobik pertama-tama diserap ke permukaan fase diam hidrofobik, muatan positif dari reagen

pasangan ion alkil ammonium berinteraksi secara elektrostatis dengan disakarida pada enoksaparin melalui muatan negatif yang dihasilkan oleh gugus karboksilat dan sulfonatnya. Pembentukan pasangan ion elektrostatis juga dapat terjadi pada fase gerak sebelum interaksi dengan fase diam dengan retensi pasangan ion terjadi pada permukaan fase diam. Kelemahan pasangan ion ini adalah kesetimbangan kolom membutuhkan waktu lebih lama setelah perubahan fase gerak, sedangkan pada penelitian ini digunakan sistem gradien, sehingga waktu retensi sering bergeser (Jones *et al.* 2010)(Andraws & Trefi 2020).

KESIMPULAN

Metode KCKT pasangan ion yang dikembangkan menggunakan (300 mM NaCl + 10 mM TBAH) : asetonitril menggunakan sistem gradien untuk analisis heparin atau enoksaparin memenuhi parameter validasi metode yang ditetapkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pendanaan Penelitian Block Grant Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang Tahun 2024.

REFERENSI

Andraws G, Trefi S, 2020, Ionisable substances chromatography: A new approach for the determination of Ketoprofen, Etoricoxib, and Diclofenac sodium in pharmaceuticals using ion - pair HPLC. *Heliyon* 6(8): e04613, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04613.

Astuti EJ, Ilham RFN, Rahman J, 2019, Validation method for determining sodium benzoate in fruit juice drinks in Malang, *Farmasains : Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kesehatan* 4(1): 19, doi: 10.22219/farmasains.v4i1.6622.

Bhujbal S, Rupenthal ID, Agarwal P, 2024, Development and validation of a stability-indicating HPLC method for assay of tonabersat in pharmaceutical formulations. *Methods* 231: 178-185, doi: 10.1016/j.ymeth.2024.10.001.

Cosmi B, Giannella M, Fornaro G, Cristini F, Patacca A, Castagna A, Mazzaferri F, Testa S, Pan A, Lupi M, Brambilla P, Montineri A, Frattima S, Bignami EG,

Salveti M, De Stefano G, Grandone E, Di Perri G, Rozzini R, Stella A, Romagnoli A, Drago F, Viale P, 2023, Intermediate dose enoxaparin in hospitalized patients with moderate-severe COVID-19: a pilot phase II single-arm study, *INHIXACOV19, BMC Infect Dis* 23(1): 1-13, doi: 10.1186/s12879-023-08297-7.

Debora L, Suprapti B, Kusumawati D, Arina Dery P S, Gabriella Nathasya T, Arini MN, Aryanti LD, 2022, Analysis of Enoxaparin Effectiveness Based on COVID-19 Severity: A Study in a Secondary Hospital in Bandung, Indonesia, *Indonesian J Pharm* 33(3): 381-393, doi: 10.22146/ijp.4133.

Galeotti F, Volpi N, 2013, Novel reverse-phase ion pair-high performance liquid chromatography separation of heparin, heparan sulfate and low molecular weight-heparins disaccharides and oligosaccharides, *J Chromatogr A* 1284: 141-147, doi: 10.1016/j.chroma.2013.02.013.

Harmita, 2004, Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1(3), doi: 10.7454/psr.v1i3.3375.

Held D, Kilz P, 2021, Size-exclusion chromatography as a useful tool for the assessment of polymer quality and determination of macromolecular properties, *Chemistry Teacher International* 3(2): 77-103, doi: 10.1515/cti-2020-0024.

Jones CJ, Membreno N, Larive CK, 2010, Insights into the mechanism of separation of heparin and heparan sulfate disaccharides by reverse-phase ion-pair chromatography, *J Chromatogr A* 1217(4): 479-488, doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.064.

Muhammad S, Ribier Z, Benoit G, Bordenave J, 2024, Stability indicating RP-HPLC method development and validation for the determination of pyrimethamine in an oral paediatric suspension, *J Pharm Biomed Anal Open* 4 (100035), doi: 10.1016/j.jpba.2024.100035.

Nuriah S, Putri MD, Rahayu S, Advaita CV, Nurfadhila L, Utami MR, 2023, Analisis Kualitatif Senyawa Parasetamol Pada Sampel Biologis Menggunakan Metode Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS), *Journal of Pharmaceutical*

and Sciences 6(2): 795–803, doi: 10.36490/journal-jps.com.v6i2.158.

Rahman AP, Purwanto DA, Isnaeni I, 2020, The Effect of Vitamin C Addition on Epigallocatechin Gallate (EGCG) Stability in Green Tea Solution, Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia, 6(2): 62, doi: 10.20473/jfiki.v6i22019.62-68.

Rosydiati, Saleh EK, 2019, Karakterisasi puncak kromatogram dalam High Performance Liquid Chromatography (HPLC) terhadap perbedaan fase gerak, laju alir, dan penambahan asam dalam analisis Indole Acetic Acid (IAA), Kandaga 1(2): 65–73, doi: 10.24198/kandaga.v1i2.25056.g12831.

Savadkouhi MB, Vahidi H, Ayatollahi AM, Hooshfar S, Kobarfard F, 2017, RP-HPLC method development and validation for determination of eptifibatide acetate in bulk drug substance and pharmaceutical dosage forms, Iranian J Pharm Res 16(2): 490–497.

Suherman M, Hasanah AN, 2017, Molekular Imprinting Polimer Untuk Pengujian Atenolol Dalam Cairan Biologis : Review Jurnal, Farmaka 15 (3), doi: 10.24198/jf.v15i3.12857.g6448.

Sushila Dagadu Chavan, Deepa Mahendra Desai, 2022, Analytical method validation: A brief review, World Journal of Advanced Research and Reviews, 16(2): 389–402, doi: 10.30574/wjarr.2022.16.2.1165.

Tamer FS, Oymak T, Dural E, 2024, Determination of seven synthetic colourants in pharmaceuticals, foods, and beverages by a validated HPLC-PDA method: A risk assessment study, J Food Compost Anal 136: 106797, doi: 10.1016/j.jfca.2024.106797

USP, 2011, *Enoxaparin Sodium Injection*: 9–12.

Wu F, Dong K, Zhu M, Zhang Q, Xie B, Li D, Gan H, Linhardt RJ, Zhang Z, 2019, Development of a method to analyze the complexes of enoxaparin and platelet factor 4 with size-exclusion chromatography, J Pharm Biomed Anal 164: 668–671, doi: 10.1016/j.jpba.2018.11.018

Zhu W, Chen L, Zhang W, Qiu L, Fu J, Yi L, Cui J, Ouyang Y, Zhang Z, 2024, Comprehensive chromatographic profiling and structural analysis of key anticoagulant components in enoxaparin, J Chromatogr A 1737: 465457, doi: 10.1016/j.chroma.2024.465457.