

Науковий вісник Львівського національного університету  
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University  
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print  
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet11323  
<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 615.31'466.22+615.31'792].074:543.544.5.068.7

## Quantitative determination of the components of the mixture – ear drops “Melavet” by the method of high-performance liquid chromatography

V. Parchenko<sup>1</sup>, D. Datsiuk<sup>2</sup>, V. Hunchak<sup>2</sup>, V. Martynyshyn<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine

<sup>2</sup>Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine

### Article info

Received 02.02.2024

Received in revised form

04.03.2024

Accepted 05.03.2024

Zaporizhzhia State Medical  
University, Majakovskogo, Str., 26,  
Zaporizhzhia, 69035, Ukraine.  
Tel.: +38-066-405-52-64  
E-mail: [parchenko@ukr.net](mailto:parchenko@ukr.net)

Stepan Gzhytskyi National  
University of Veterinary Medicine  
and Biotechnologies Lviv,  
Pekarska Str., 50, Lviv,  
79010, Ukraine.  
Tel.: +38-097-519-13-88  
E-mail: [doctorvetlviv@ukr.net](mailto:doctorvetlviv@ukr.net)

**Parchenko V., Datsiuk D., Hunchak V., Martynyshyn V. (2024). Quantitative determination of the components of the mixture – ear drops “Melavet” by the method of high-performance liquid chromatography. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 26(113), 150–155. doi: 10.32718/nvlvet11323**

The pharmaceutical industry is one of the most regulated industries in the world, and most medicines remain safe and effective. The level of impurity and degradation products in active pharmaceutical ingredients (APIs) must be strictly controlled and meet the specifications required by international bodies. For many years, chromatography has been the method of choice for assessing the chemical purity of medicinal substances and products and has a wide range of applications in the pharmaceutical industry, from research and development to laboratory quality control. The ability to integrate mass spectrometry into the chromatography workflow has been a real breakthrough in the science of separation, finding many inscriptions, especially in the field of pharmaceutical analysis. Therefore, the relevance of the research lies in finding the quantity of the composition of the created mixture – ear drops “Melavet” by the HPLC method with mass detection of the initial components. The purpose of the work is to create analytical methods for determining the active components of the mixture when they are present in the sample and interact with each other. Materials and methods: Chromato-mass-spectrometric studies, high-performance liquid chromatography (HPLC, LCMS). LCMS device: Agilent 1200 Quaternary DAD HPLC System (degasser, binary pump, autosampler, column thermostat, diode-matrix detector); single-quadrupole mass spectrometer Agilent 1100 LCMSD SL instrument; OpenLAB CDS Software. For the new combined veterinary test of ear drops “Melavet” 10 ml, containing various components, it is necessary to develop optimal methods of standardization. For this, 6 solutions of the external standard of each component were prepared. Based on the research, a method was developed for the simultaneous determination of the components in the model mixture ear drops “Melavet” 10 ml by the method of high-performance liquid chromatography using the same mobile and stationary phases, as well as similar chromatographic conditions, which were used during the study of individual samples of the external standard. When analyzing the chromatographic data, the presence of dioxidin in the mixture was fully consistent. In comparison with the external standards of each component, there are separate icons of substances on the chromatogram of the mixture, which contain information about the purity of the components and the interaction between them. During the research, a highly sensitive technique for the simultaneous determination of the components of the model mixture “Melavet” ear drops 10 ml by the method of high-performance liquid chromatography was developed. The optimal conditions for the simultaneous determination of the components of the mixture in one sample are selected. It was established that there is no interaction between the components of the mixture when they are simultaneously in the sample solution.

**Key words:** chromatography, pharmaceutical analysis, mass detector, ear drops.

## Кількісне визначення компонентів суміші – вушні каплі “Мелавет” методом високоефективної рідинної хроматографії

В. Парченко<sup>1</sup>, Д. Дацюк<sup>2</sup>, В. Гунчак<sup>2</sup>, В. Мартинишин<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup>Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

Фармацевтична промисловість є однією з найбільш результативних галузей у світі, оскільки лікарські засоби мають бути безпечними та ефективними. Рівні домішок і продуктів розпаду в активних фармацевтичних інгредієнтах (АФІ) повинні суворо контролюватися та відповідати специфікаціям, що вимагаються міжнародними органами. Протягом багатьох років хроматографія була методом вибору для оцінки хімічної чистоти лікарських речовин і продуктів і широко використовується у фармацевтичній промисловості, від досліджень і розробок до лабораторій контролю якості. Можливість інтеграції мас-спектрометрії у робочий процес хроматографії стала справжнім проривом у науці розділення, знайшовши багато застосувань, особливо в галузі фармацевтичного аналізу. Тому актуальність дослідження полягає у пошуку кількісного складу створеної суміші – вушні каплі “Мелавет” методом ВЕРХ з мас-детектуванням вихідних компонентів. Метою роботи є створення аналітичних методів визначення активних компонентів суміші при їх сумісній присутності у зразку та взаємного впливу один на одного. Матеріали та методи: Хромато-мас-спектрометричні дослідження, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, LCMS). Прилад LCMS: Agilent 1200 Quaternary DAD HPLC System (дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат колонки, діодно-матричний детектор; одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 1100 LCMSD SL instrument; OpenLAB CDS Software. Для нового комбінованого ветеринарного засобу “вушні каплі “Мелавет” 10 мл”, що містить різноманітні компоненти, необхідно розробити оптимальні методи стандартизації. Для цього виготовили 6 розчинів зовнішнього стандарту кожного компоненту. На основі досліджень розробили методику одночасного визначення компонентів у модельній суміші “вушні каплі “Мелавет 10 мл” методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням таких самих рухомої та нерухомої фаз, а також схожих умов хроматографування, які використовували під час дослідження окремих зразків зовнішнього стандарту. При аналізі хроматографічних даних, встановлено повну відповідність наявності діоксидину в суміші. При порівнянні зі зовнішніми стандартами кожного компоненту на хроматограмі суміші присутні окремі піки речовин, що свідчить про чистоту компонентів і відсутності взаємодії між ними. Під час дослідження розроблена високочутлива методика одночасного визначення компонентів модельної суміші “вушні каплі “Мелавет” 10 мл” методом високоефективної рідинної хроматографії. Підібрані оптимальні умови для одночасного визначення компонентів суміші в одній пробі. Встановлено, що відсутні взаємодії між компонентами суміші при одночасному перебуванні у розчині зразка.

**Ключові слова:** хроматографія, фармацевтичний аналіз, мас-детектор, вушні каплі.

### Вступ

Під час розробки нових лікарських засобів одним з важливих завдань є підтвердження їхньої якості. Сучасні вимоги до фармацевтичного аналізу вимагають глибшого та більш детального вивчення хімічного складу різноманітних сумішей і комбінацій. Зокрема, у хімічному виробництві, в тому числі й виготовленні лікарських засобів, постійно зростає вимога до чистоти продукції, удосконалення методів контролю та застосування кількісних критеріїв при оцінці якості. Таким чином, окрім оцінювання загальних характеристик об'єкта дослідження, часто необхідне докладне вивчення вмісту окремих компонентів, які визначають якість лікарського препарату (Karpenko et al., 2018, 2022). Ефективним рішенням цього завдання є одночасне визначення окремих компонентів у модельній суміші (Borisenko et al., 2019; Vashchuk et al., 2020; Bigdan et al., 2020). Зазвичай спільне визначення компонентів у складних сумішах є складним або навіть неможливим без використання сучасних фізико-хімічних методів. Серед таких методів особливо важливою є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Розвиток цього методу відкриває можливості одночасного визначення сумішей, що містять десятки або навіть сотні компонентів (Martynyshyn et al., 2019; Hunchak et al., 2020; Myha et al., 2021). У відповідних умовах цей метод дозволяє ідентифікувати та кількісно визначити діючі речовини в лікарських засобах (Yaroshenko et al., 2021).

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є домінуючою технікою у фармацевтичному та фітохімічному аналізі різних біоактивних сполук. У порівнянні з іншими аналітичними методами, ВЕРХ забезпечує високу чутливість і точність якісного та кількісного аналізу фармацевтично активних сполук (АФІ) у різних зразках, таких як синтетичні лікарські засоби та рослинні матеріали (Parys et al., 2022).

Хроматографія – це метод розділення речовин у суміші на основі їхніх коефіцієнтів розподілу між

рухомою та нерухомою фазами хроматографічної системи. Основна ідея полягає в розподіленні речовин на основі їх фізичної або хімічної схожості з певними сполуками, які утворюють основу хроматографічної системи. Процес розділення відбувається через переміщення рухомої фази шляхом спонтанної або примусової дифузії вздовж нерухомої фази в конкретному напрямку з визначеною швидкістю (Karpenko et al., 2018).

Хімічна іонізація під атмосферним тиском (APCI) є методом іонізації, який використовується у мас-спектрометрії. Цей метод включає газозафазові іонно-молекулярні реакції при атмосферному тиску ( $10^5$  Па), зазвичай у поєднанні з високоефективною рідинною хроматографією (HPLC). APCI є методом м'якої іонізації, аналогічним хімічній іонізації, де первинні іони утворюються на розпилювачі розчинника. Основне використання APCI полягає в іонізації полярних та менш полярних термічно стабільних сполук з молекулярною масою менше 1500 Да. Застосування APCI з ВЕРХ стало популярним в аналізі слідів, таких як стероїди, пестициди, а також у вивченні метаболітів лікарських засобів (Waligóra & Tyrpień-Golder, 2022).

Для дослідження був запропонований метод зовнішнього стандарту, який передбачає хроматографічний аналіз чистих аналітів окремих компонентів сумішей, що входять до складу досліджуваного зразка (Martynyshyn et al., 2019). Стандартні зразки речовин представлені відповідними фармацевтичними препаратами. Початково готують стандартні розчини для всіх цих сполук із відомою концентрацією, після чого проводять хроматографію. При цьому вводять у колонку кілька проб із різним вмістом сполуки, що визначається так, щоб встановити чутливість детектування даної сполуки в межах концентрацій, які відповідають припущеному вмісту цієї сполуки у невідомій пробі (Yang et al., 2022; Kamble et al., 2023).

**Мета дослідження**

Метою роботи є створення аналітичних методів визначення активних компонентів суміші при їх сумісній присутності у зразку та взаємного впливу один на одного.

**Матеріал і методи досліджень**

Хромато-мас-спектрометричні дослідження, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, LCMS). Прилад LCMS: Agilent 1200 Quaternary DAD HPLC System (дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат колонки, діодно-матричний детектор; одноквадрольний мас-спектрометр Agilent 1100 LCMSD SL instrument; OpenLAB CDS Software. Дослідження проведені на базі науково-дослідницької компанії “Enamine” (Україна, м. Київ).

Умови проведення ВЕРХ-МС дослідження:

- 1) Бінарний градієнт – А: H<sub>2</sub>O (НСООН 0,1 %), В: CH<sub>3</sub>CN (НСООН 0,1 %);
- 2) Колонка Zorbax Eclipse XDB-C8 column (4.6 × 150 мм, 5 μm);
- 3) Температура колонки: 40 °C;
- 4) DAD: 190 – 640 нм;
- 5) Джерело іонів: АРСІ (хімічна іонізація при атмосферному тиску);

- 6) Сканування в діапазоні m/z: 160-600;
  - 7) Фрагментор: змінний 230 V (100–680), 100 V (680–800);
  - 8) Позитивна полярність.
  - 9) Температура азоту – 300°C;
  - 10) Тиск на небулайзері 40 psi;
  - 11) Швидкість газу осушувача (азота) –10 л/хв.
- Рухому фазу фільтрували через нейлоновий мембранний фільтр 0,2 мкм (Alltech, Deerfield, IL, USA).

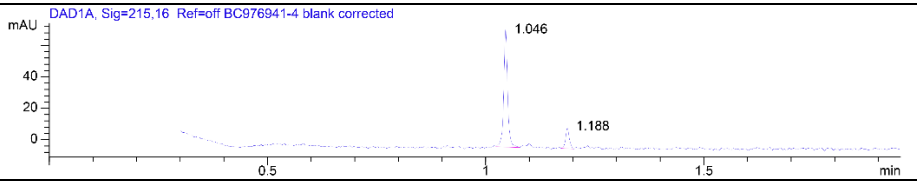
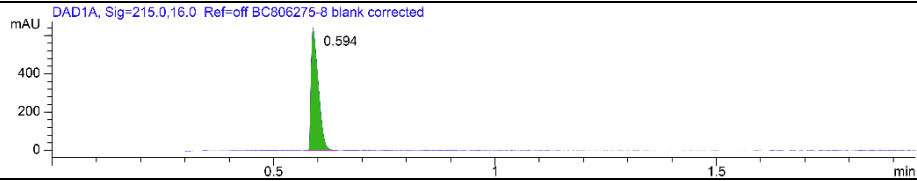
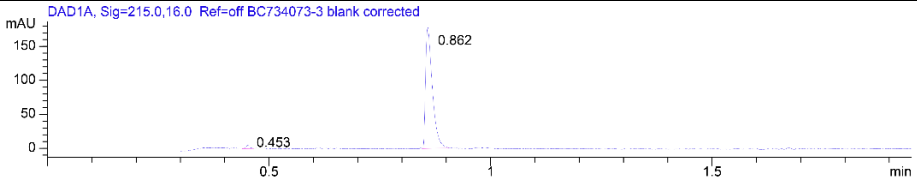
**Результати та їх обговорення**

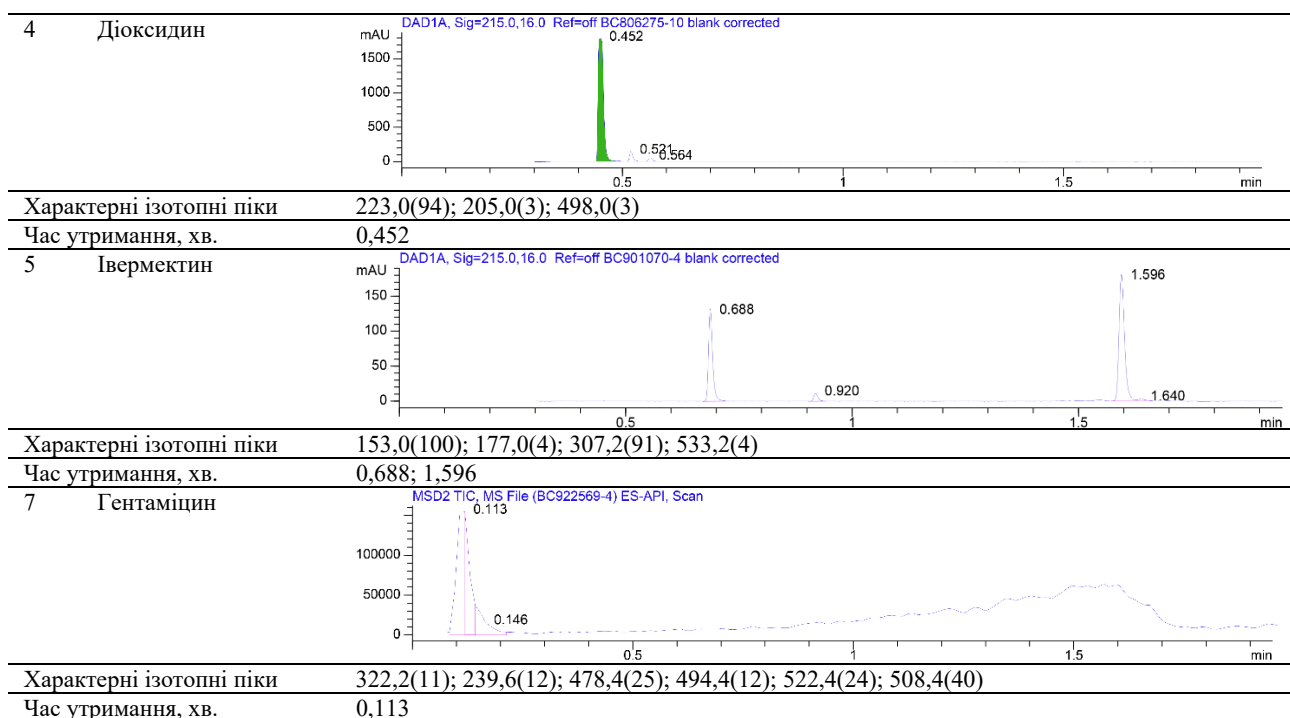
Для нового комбінованого ветеринарного засобу вушні каплі “Мелавет” 10 мл, що містить різноманітні компоненти, необхідно розробити оптимальні методи стандартизації. Для цього виготовили 6 розчинів зовнішнього стандарту кожного компоненту.

Приклади хроматограми 6 розчинів зовнішнього стандарту кожного компоненту наведено в таблиці 1. Використовуючи ці дані, а також у відповідних умовах хроматографування зняли хроматограму робочого розчину ветеринарного засобу вушні каплі “Мелавет” 10 мл. Димексид, що входить до складу відповідної суміші не досліджувався, так як використовується як розчинник при хромато-мас-спектрометричних дослідженнях.

**Таблиця 1**

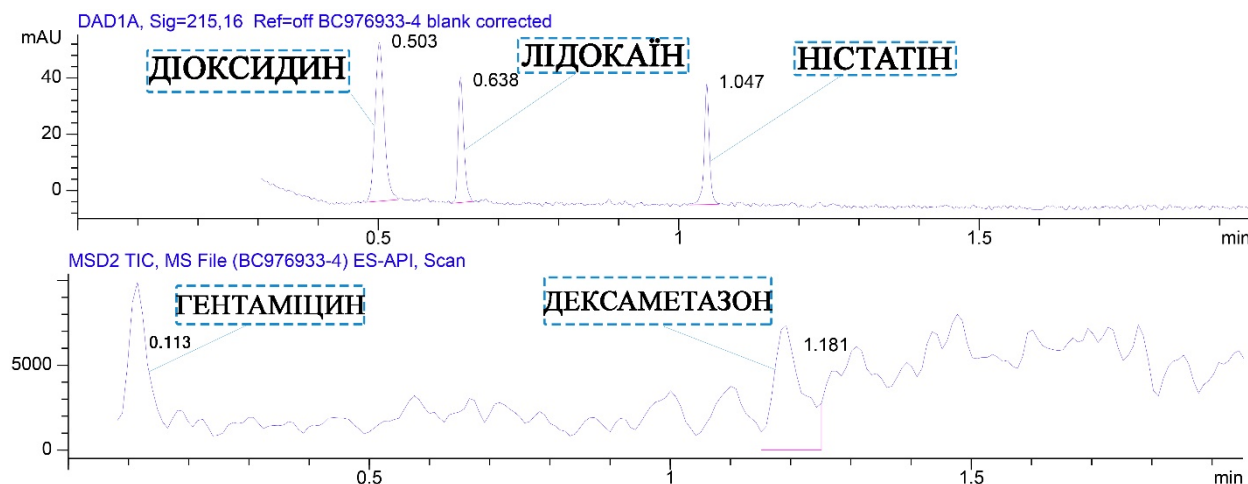
Хроматограми 6 розчинів зовнішнього стандарту кожного компоненту

№ п/п	Компонент	Хроматограма
1	Ністатин	
Характерні ізотопні піки		468,2(35); 363,2(34); 556,2(30)
Час утримання, хв.		1,046
2	Лідокаїн	
Характерні ізотопні піки		235,2(100)
Час утримання, хв.		0,594
3	Дексаметазон фосфат	
Характерні ізотопні піки		236,8(4); 453,2(36); 471,2(100); 473,2(55).
Час утримання, хв.		0,862



На основі досліджень розробили методику одночасного визначення компонентів у модельній суміші “вушні краплі “Мелавет” 10 мл” методом вискоєфективної рідинної хроматографії з використанням таких самих рухомої та нерухомої фаз, а також схожих умов

хроматографування, які використовували під час дослідження окремих зразків зовнішнього стандарту. Отримана хроматограма модельної суміші наведена на [рисунок 1](#).



**Рис. 1.** Хроматограма модельній суміші “вушні краплі “Мелавет” 10 мл” та хімічний склад компонентів суміші

Отриманий хімічний склад компонентів суміші – вушні краплі “Мелавет” представлений у [таблиці 2](#). При дослідженні суміші не вдалося встановити 1 компонент : івермектин. Це пов’язано з тим, що івермектин має складну органічну будову і достатньо низьку температуру плавлення, тому не вдалося встановити його у даній евтектичній суміші і зареєструвати детектором приладу.

Аналіз хроматографічних даних суміші - це важливий етап в хімічних і біологічних дослідженнях, який дозволяє розділити та визначити склад речовин у зразку ([Karpenko et al., 2018](#)). Порівняння теоретичного і практичного складу суміші дозволяє визначити, наскільки добре експериментальні результати відповідають теоретичним очікуванням.

**Таблиця 2**

Хімічний склад компонентів суміші – вушні каплі “Мелавет”

№ п/п	Час утримання, хв	Компонент	Кількісний вміст у суміші	Характерні ізотопні піки
1	1,047	Ністатин	7,56	214,2(100)
2	0,638	Лідокаїн	25,5	235,2(87)
3	1,181	Дексаметазон фосфат	7,56	471,2(100)
4	–	Димексид	–	–
5	0,503	Діоксидин	51,8	223,0(80)
6	–	Івермектин	–	–
7	0,113	Гентаміцин	7,58	239,6(12); 322,2(11); 478,4(25)

**Таблиця 3**

Хімічний склад компонентів суміші – вушні каплі “Мелавет”

№ п/п	Час утримання, хв	Компонент	Кількісний вміст у суміші, %	
			Практичний	Теоретичний
1	1,047	Ністатин	7,56	2,24
2	0,638	Лідокаїн	25,5	5,75
3	1,181	Дексаметазон фосфат	7,56	2,88
4	–	Димексид	–	28,75
5	0,503	Діоксидин	51,8	51,75
6	–	Івермектин	–	2,88
7	0,113	Гентаміцин	7,58	5,75
Всього			100	100

Практичний склад може відрізнятися від теоретичного через різні фактори, такі як хімічна нестабільність, втрати під час дослідження або фільтрування, нечистоти тощо. При аналізі хроматографічних даних, встановлено повну відповідність наявності діоксидину в суміші (табл. 3). При порівнянні зі зовнішніми стандартами кожного компоненту на хроматограмі суміші присутні окремі піки речовин, що свідчить про чистоту компонентів і відсутність взаємодії між ними.

**Висновки**

Під час дослідження розроблена високочутлива методика одночасного визначення компонентів моделі суміші “вушні каплі “Мелавет” 10 мл” методом високоефективної рідинної хроматографії. Підібрані оптимальні умови для одночасного визначення компонентів суміші в одній пробі. Встановлено, що відсутні взаємодії між компонентами суміші при одночасному перебуванні у розчині зразка.

**Відомості про конфлікт інтересів**

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

**References**

Bigdan, O. A., Parchenko, V. V., Kyrychko, B. P., Zvenigorodska, T. V., Gutyj, B. V., Gunchak, A. V., Slivinska, L. G., Savchuk, L. B., Nazaruk, N. V., Kit, L. P., Dashkovskyy, O. O., & Guta, Z. A. (2020). Test of antimicrobial activity of morpholine 2-(5-(3-fluorophenyl)-4-amino-1,2,4-triazol-3-ylthio) acetate (BKP-115) by experimental model of pancreatitis in rats. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(3), 201–207. DOI: 10.15421/2020\_155.

Borisenko, N. N., Bushueva, I. V., Parchenko, V. V., Gubenko, I. Ya., Mykhailiuk, Y. O., Riznyk, O. I., Aleksieiev, O. G., Gutyj, B. V., Lysianska, H. P., & Kurinnyi, A. V. (2019). Anti-Inflammatory, Antiviral Veterinary Medicine with Immuno-Modulating Activity. *Research J. Pharm. and Tech*, 12(11), 5455–5459. DOI: 10.5958/0974-360X.2019.00909.0.

Hunchak, V. M., Martynshyn, V. P., Gutyj, B. V., Hunchak, A. V., Stefanyshyn, O. M., & Parchenko, V. V. (2020). Impact of 1,2,4-thio-triazole derivative-based liniment on morphological and immunological blood parameters of dogs suffering from dermatomycoses. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(2), 294–298. DOI: 10.15421/022044.

Kamble, S., Agrawal, S., Pagade, S., Patil, R., Chaugule, N., & Patil, A. (2023). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13(1), 61–65. DOI: 10.52711/2231-5675.2023.00011.

Karpenko, Y. V., Omelyanchik, L. O., Panasenko, T. V., & Kuchmenko, A. R. (2018). Chromatographic Evaluation Of The Lipophilic Properties Of Some Derivated Acridin-9(10H)-One. *Methods and objects of chemical analysis*, 13(3), 115–120. DOI: 10.17721/moca.2018.115-120.

Karpenko, Y., Hunchak, Y., Gutyj, B., Hunchak, A., Parchenko, M., & Parchenko, V. (2022). Advanced research for physico-chemical properties and parameters of toxicity piperazinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 2(36), 18–25. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.255848.

Martynshyn, V. P., Hunchak, V. M., Yaroshenko, A. I., Parchenko, V. V., Shcherbyna, R. O., Panacenco, V. V., & Hunchak, A. V. (2019). Chromatographic Research of Liniment which Active Substance

- Belongs To New Derivatives of 1,2,4-Triazole. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 806–811. URL: [https://www.researchgate.net/publication/330292853\\_Chromatographic\\_Research\\_of\\_Liniment\\_which\\_Active\\_Substance\\_Belongs\\_to\\_New\\_Derivatives\\_of\\_124-Triazole](https://www.researchgate.net/publication/330292853_Chromatographic_Research_of_Liniment_which_Active_Substance_Belongs_to_New_Derivatives_of_124-Triazole).
- Myha, M., Koshovyi, O., Karpun, E., Kovalyova, A., Mala, O., Parchenko, V., Panasenko, O., & Bunyatyan, V. (2021). Chromato-mass-spectrometric research in *salvia grandiflora l.*, *salvia pratensis* and *salvia verticillata l. Abovegroundorgans*. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 5(33), 32–40. DOI: 10.15587/2519-4852.2021.242761.
- Parys, W., Dołowy, M., & Pyka-Pająk, A. (2022). Significance of Chromatographic Techniques in Pharmaceutical Analysis. *Processes*, 10(1), 172–182. DOI: 10.3390/pr10010172.
- Vashchik, Y., Shcherbyna, R., Parchenko, V., Bushueva, I., Gutyj, B., Fotina, H., Fotina, T., & Stronskyi, Y. (2020). Histological study of a corrective influence of a compound potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4*h*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (pkr-173) on the state of chicken's liver under infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Fac. Pharm. Ankara / Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 44(1), 1–17. DOI: 10.33483/jfpau.567757.
- Waligóra, S., & Tyrpień-Golder, K. (2022). Application of Planar Chromatography in Pharmaceutical, Clinical, and Toxicological Analysis. *Handbook of Bioanalytics*: Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-030-63957-0\_12-1.
- Yang, F., Duan, X., Wang, Z., & Dong, Y. (2022). A gas chromatography flame ionization detector method for rapid simultaneous separation and determination of six active ingredients of anticold drug. *Curr. Pharm. Anal.*, 18(1), 71–81. DOI: 10.2174/1573412917666210106115211.
- Yaroshenko, A. A., Parchenko, V. V., Bihdan, O. A., Panasenko, O. I., Karpenko, Yu. V., & Karpun, E. O. (2021). Method for Trifuzol-Neo assay determination by GC-MS. *Research J. Pharm. and Tech*, 14(9), 4523–4528. DOI: 10.52711/0974-360X.2021.00787.