

УДК 543.062

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСОРБАТОВ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

В.И. Гроховский^{1*}, А.А. Бендрышев¹, С.В. Швец¹, Д.А. Орлов¹, О.А. Ваганова¹

Резюме. Статья представляет собой обзор публикаций, посвященных количественному определению полисорбатов в лекарственных препаратах. В статье затронуты вопросы строения и свойств полисорбатов. Рассмотрен вопрос применения полисорбатов в производстве лекарственных препаратов. Оценены подходы и методы количественного определения полисорбатов, приведены их достоинства и недостатки.

Ключевые слова: полисорбат, ВЭЖХ, биотехнологические препараты, вспомогательные вещества.

DETERMINATION OF POLYSORBATE IN BIOTECH DRUGS

V.I. Grokhovskiy^{1*}, A.A. Bendryshev¹, S.V. Shvets¹, D.A. Orlov¹, O.A. Vaganova¹

Abstract. The article is a review of publications on the quantitative determination of polysorbates in pharmaceuticals. The author touches upon the structure and properties of polysorbates. The question of the use of polysorbates in the production of drugs is considered. Approaches and methods for quantitative determination of polysorbates are evaluated, their advantages and disadvantages are indicated.

Keywords: polysorbate, HPLC, biotechnological preparations, pharmacologically inactive substance.

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, д. 6.

1 – Scientific Center for Expertise of Medicinal products, Ministry of Healthcare, 6, Schukinskaya st., Moscow, 123192, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: grohovsky@expmed.ru

ВВЕДЕНИЕ

Полисорбаты нашли широкое применение в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. В фармации полисорбаты чаще всего используются в качестве солюбилизаторов и стабилизаторов в лекарственных средствах, содержащих в качестве действующего вещества белки и пептиды. Наличие полисорбатов в составе таких лекарственных средств обусловлено необходимостью сохранения биологической активности, что обеспечивается за счет снижения абсорбции белка на поверхности первичной упаковки (флакона, шприца или ампулы), а также снижения поверхностного натяжения между фазами «воздух – жидкость». Кроме того, присутствие полисорбата обеспечивает сохранение третичной структуры белка при хранении и транспортировке [1, 2].

Биотехнологические лекарственные препараты, главным образом содержащие в качестве действующего вещества белки или пептиды, в последнее десятилетие являются наиболее активно развивающейся группой как зарубежного, так и отечественного фармацевтического рынка, отражая тенденции передовых разработок в этом направлении. Проблемы, связанные с необходимостью сохранения структуры и активности действующих веществ данной группы, гораздо более лабильных по сравнению с лекарствен-

ными препаратами, получаемыми путем химического синтеза, при их, как правило, высокой стоимости, делают разработку подходов к сохранению стабилизации биотехнологических соединений востребованной задачей.

Использование именно полисорбатов в производстве лекарственных препаратов в немалой степени обусловлено тем, что многочисленными исследованиями подтверждена их относительная безопасность [3]. В последние годы, однако, появились данные о проявлении реакции гиперчувствительности на различные препараты при введении в их состав полисорбатов. Количество полисорбата и его примесей, содержащихся в препаратах, различается в зависимости от количества необходимого для обеспечения стабильности основного компонента. Можно предположить, что реакцию гиперчувствительности вызывают не сами полисорбаты, а их пероксидные производные и некоторые другие примеси. Таким образом, не только концентрация полисорбата, но и концентрация продуктов его распада может оказывать существенное влияние на качество и безопасность применения лекарственных препаратов. Указанные данные, а также общая тенденция по повышению требований приводят к тому, что определение содержания полисорбатов и оценка состава используемого полисорбата всё чаще включаются в нормативную документацию по контролю ка-

чества лекарственных средств, становясь неотъемлемой частью рутинного контроля.

Поддерживая в неизменённом состоянии структуру белка в лекарственных препаратах, полисорбат образует с ним единый комплекс. Выделить и провести количественное определение полисорбата из таких комплексов чрезвычайно сложно. При этом затруднения может вызвать не только выбор методов и разработка методик определения полисорбата, но и самого белка. Многие методики, особенно использующие хроматографические методы, недостаточно специфичны в отношении действующего вещества и позволяют определять не индивидуальные соединения, а только комплекс «белок – полисорбат», что неприемлемо, поскольку не приводит к должной точности и правильности в оценке содержания белка.

Поэтому разработка воспроизводимой, обладающей требуемой степенью чувствительности, точности, а главное, специфичности методики определения полисорбата в белковых препаратах – чрезвычайно актуальная задача.

Данная работа посвящена рассмотрению наиболее распространенных методов определения полисорбатов.

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ПОЛИСОРБАТОВ

Полисорбаты представляют собой амфифильные, неионогенные, поверхностно активные вещества, состоящие из эфира жирной кислоты (гидрофобная часть) и длинной полиоксиэтиленовой цепи (гидрофильная часть) (рисунок 1). При растворении в воде при определенной концентрации и температуре молекулы полисорбата образуют мицеллы с гидрофобной частью внутри и гидрофильной группой снаружи. Таким образом, гидрофобное ядро мицеллы связывается с гидрофобными участками белков (рисунок 3) [4].

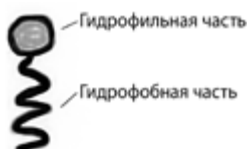


Рисунок 1. Молекула полисорбата



Рисунок 2. Молекула белка



Рисунок 3. Комплекс полисорбата с белком в водном растворе

Все полисорбаты имеют одинаковую полиоксиэтиленовую часть и различаются жирной кислотой, образующей с ней эфир [5].

Полисорбат-20 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан монолаурат

Полисорбат-21 – Полиоксиэтилен 4 сорбитан монолаурат

Полисорбат-40 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан монопальмитат

Полисорбат-60 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан моностеарат

Полисорбат-61 – Полиоксиэтилен 4 сорбитан моностеарат

Полисорбат-65 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан тристеарат

Полисорбат-80 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан моноолеат

Полисорбат-81 – Полиоксиэтилен 5 сорбитан моноолеат

Полисорбат-85 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан триолеат

Полисорбат-120 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан моноизостеарат

Схема синтеза полисорбата-80, а также возможные побочные продукты синтеза представлены на рисунке 4.

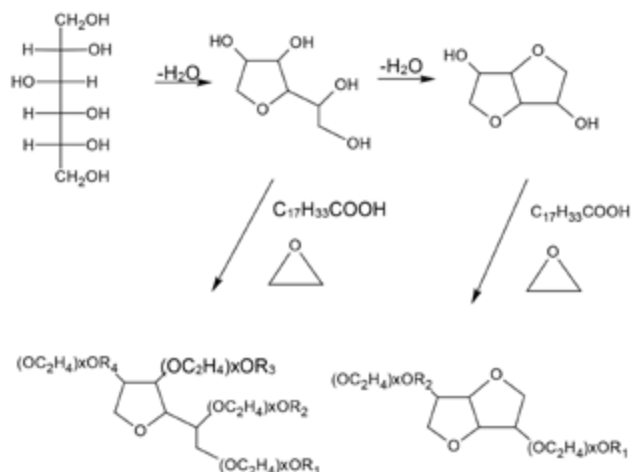


Рисунок 4. Схема синтеза полисорбата-80

В фармации наиболее часто используются полисорбат-20 (рисунок 5) и полисорбат-80 (рисунок 6).

Согласно литературным данным, для качественного и количественного определения полисорбатов можно использовать методы проточно-инжекционного анализа, ЯМР-спектроскопии, спектрофотометрии, однако наиболее часто используются хроматографи-

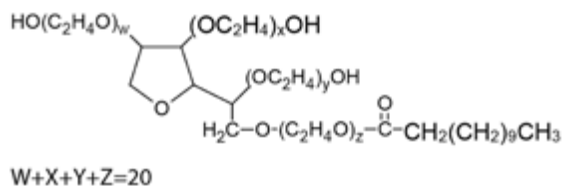


Рисунок 5. Структура полисорбата-20

ческие методы с различными вариантами детектирования. Методы определения полисорбата условно можно разделить на два типа: методы, основанные на определении самого полисорбата, и методы, основанные на определении продуктов его гидролиза. Основными лекарственными препаратами, в состав которых включен полисорбат, являются препараты белкового происхождения.

Таблица 1.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Полиоксиэтилен сорбитан	H	H	H	H
Полиоксиэтилен сорбитан моноолеат	H	H	H	C ₁₇ H ₃₃ CO
Полиоксиэтилен сорбитан диолеат	H	H	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃ CO
Полиоксиэтилен сорбитан триолеат	H	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃ CO
Полиоксиэтилен сорбитан тетраолеат	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃ CO
	R ₁	R ₂		
Полиоксиэтилен изосорбид	H	H		
Полиоксиэтилен изосорбид моноолеат	H	C ₁₇ H ₃₃ CO		
Полиоксиэтилен изосорбид диолеат	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃ CO		

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ НАТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ

Данная группа методов определения полисорбата в отличие от методов, основанных на определении продуктов его гидролиза, не требует обязатель-

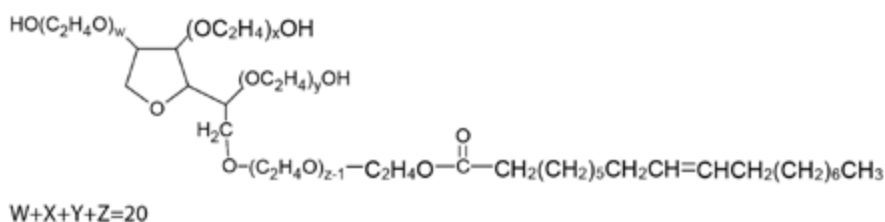


Рисунок 6. Структура полисорбата-80

ного использования в качестве стандартного образца именно того полисорбата (состав, партия, лот), который был использован при производстве лекарственного препарата.

Наиболее часто для определения полисорбатов в нативном виде используются методы ВЭЖХ с различными типами детекторов.

Использование УФ-детектора затруднено тем, что поглощение полисорбата в ультрафиолетовой области незначительно в интервале длин волн 190–200 нм, которые не являются специфическими, что затрудняет идентификацию пика среди прочих компонентов, входящих в анализируемую смесь. Данный факт делает необходимым использование отличных от УФ-ВЭЖХ-детекторов, таких как ELSD, CAD, MS. Разделение обычно осуществляется либо в режиме эксклюзионной хроматографии, либо в режиме ОФ-ВЭЖХ. Рассмотрим существующие в настоящий момент подходы подробнее.

ОФ-ВЭЖХ с детектором заряженного аэрозоля (CAD-детектор)

В работе S. Fakete и соавторов [2] предложен быстрый и чувствительный метод определения полисорбатов в жидких лекарственных формах в присутствии белков и вспомогательных веществ. Определение основано на разделении компонентов смеси методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение проводилось при градиентном элюировании смесью ацетонитрил : метанол : вода : трифторуксусная кислота (80 : 20 : 900 : 1) и ацетонитрил : метанол : вода : трифторуксусная кислота (720 : 180 : 100 : 1) в качестве элюента на колонке Poroshell 300SB-C18, 75x2,1 мм, 5 мкм. Для детектирования использовали CAD-детектор (ESA Inc., Chelmsford, MA). Диапазон линейности составил от предела количественного определения до 150% (10–60 мкг/мл). ПО – 5 мкг/мл, ПКО – 10 мкг/мл. Возможности детектора заряженного аэрозоля, отклик которого не связан с химической структурой определяемого вещества, способность определять нелетучие вещества, не имеющие хромофорных групп, в том числе и белков, и совместимость с любыми ВЭЖХ-системами, включая СВЭЖХ [сверхпроизводительная высокоэффективная (сверх-

эффективная) жидкостная хроматография], делают его универсальным детектором для определения полисорбата в биотехнологических препаратах.

ОФ-ВЭЖХ с испарительным детектором по светорассеянию (ELSD – детектор)

В работе L.M. Nair и соавторов [6] описан метод для определения полисорбата-80 в лекарственных препаратах, основанный на разделении компонентов смеси в градиентном режиме. В качестве подвижных фаз использованы метанол и вода. Для разделения использована колонка Alltima C18, 250×4,6 мм, 5 мкм; регистрация сигнала осуществлялась с помощью детектора Alltech ELSD 2000; линейность отклика подтверждена в диапазоне концентраций от 2 до 6 мг/мл.

ELSD является универсальным детектором и реагирует на любые аналиты, которые менее летучи, чем подвижная фаза. Он имеет низкий фоновый сигнал, совместим с широким спектром растворителей, а также позволяет использовать градиентное элюирование.

ОФ-ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (MS-детектор)

В работе A. Sparreboom и соавторов [7] обсуждается метод совместного определения полисорбата-80 и противоопухолевого препарата доцетаксел в плазме крови человека с добавлением внутреннего стандарта (паклитаксел), с предварительной экстракцией смесью ацетонитрила и н-бутилхлорида (1:4 в/в) с последующим разделением методом жидкостной хроматографии при изократическом элюировании смесью метанол : 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде (9:1) на колонке Waters X-Terra MS ODS 50×2,1 мм, 3,5 мкм и детектированием MS-детектором (Waters Model 996). Метод применим в интервале концентраций от 1 до 100 мкг/мл.

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ СО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

В работе T.H. Tani и соавторов [8] предложен метод, основанный на выделении полисорбата-80 из компонентов смеси, содержащей белки и другие вспомогательные компоненты, методом гель-фильтрационной хроматографии при изократическом элюировании буферным раствором 10 мМ натрия фосфата в растворе 150 мМ натрия хлорида, pH 7,0, с добавлением 10 мл раствора полисорбата-80 с концентрацией 1000 мкг/мл, в 1 литре буферного раствора на колонке TSK G2000/SWXL, 300×7,8 мм, 5 мкм, с последующим де-

тектированием спектрофотометрическим детектором при длине волны 235 нм. Перед разделяющей колонкой устанавливалась специальным образом заполненная сорбентом CL-4B sepharose с привитым протеином А предколонка. Диапазон линейности отклика – от 2 до 1000 мкг/мл.

D.L. McKean и соавторы [9] в своей работе описывают определение полисорбата-20 и полисорбата-80 в биологических жидкостях, основанное на выделении полисорбата из компонентов смеси методом гель-фильтрационной хроматографии в изократическом режиме элюирования. В качестве подвижной фазы используется дихлорметан. Его же используют для экстракции полисорбата из образцов. Разделение осуществляется на колонке uStyragel, 150×3,9 мм, с последующим спектрофотометрическим детектированием при длине волны 620 и 320 нм. Для получения окрашенного комплекса используется заполненная специально подготовленным, содержащим кобальта тиоцианат аммония сорбентом колонка для дериватизации, которая устанавливается между разделяющей колонкой и детектором. Предел обнаружения данного метода – 5 мкг.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Спектрофотометрические методы определения полисорбата, как правило, основаны на его реакции с кобальта тиоцианат аммонием, в результате которой образуется окрашенный продукт. Данные методы применимы ко всем полисорбатам, так как реакция с окрашивающим реактивом идет по общей для всех полисорбатов полиоксиэтиленовой части молекулы.

В работе R.A. Greff и соавторов [10] предложен метод определения полисорбата в малых концентрациях 0–20 ppm. Метод основан на образовании голубого комплекса между кобальта тиоцианат аммонием и полиоксиэтиленовым соединением с последующей экстракцией комплекса бензолом. Определение проводится методом спектрофотометрии при длине волны 320 нм.

В работе A. Nozawa и соавторов [11] предложен метод определения полисорбата, аналогичный вышеописанному, но с измерением при длине волны 624 нм.

В работе N.H. Anderson и соавторов [12] описан метод определения полисорбата, основанный на образовании голубого комплекса с кобальта тиоцианат аммонием. Полиоксиэтиленовые цепи полисорбата реагируют с кобальта тиоцианат аммонием с образованием окрашенного в синий цвет комплекса. Образовавшийся комплекс экстрагируют хлороформом. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации полисорбата. Тиоцианатный комплекс нестабилен в хлороформе, и для повышения стабильности необходимо добавление нитрозо-Р-реагента. Опре-

деление проводится методом спектрофотометрии при длине волны 500 нм.

Метод определения полисорбата в малых концентрациях 1–20 мкг/мл, основанный на образовании голубого амилозно-крахмально-йодного комплекса, описан в работе N.B. Cusakovich [13]. Детектирование проводится спектрофотометрически при длине волны 680 нм. Данный метод может давать неточный результат из-за взаимодействия йода с некоторыми аминокислотами и белками. Добавление окислителя делает метод точным и воспроизводимым.

ЯМР- И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В работе Vu Dang и соавторов [14] обсуждены исследования разных серий полисорбата-60 методами ЯМР- и масс-спектрометрии, которые показали, что серии отличаются между собой соотношением эфиров полиоксиэтиленсорбитана и различных жирных кислот. Также были обнаружены различия в соотношении сорбитана и изосорбитана. Различия в соотношении жирных кислот делают необходимым использование полисорбата только серии, используемой при производстве лекарственного препарата, при количественном определении по продуктам гидролиза.

В работе M. Khosravi и соавторов [15] проведено сравнение ряда методов (спектрофотометрического, флуоресценции мицелл и ЯМР) определения полисорбата-20 в виде нативного соединения. Показано, что спектрофотометрический метод с образованием комплекса с кобальта тиоцианат аммонием не позволяет отличить деградированную форму полисорбата от нативного соединения. Метод флуоресценции мицеллы позволяет определить уменьшение мицеллы, но не может подтвердить того, что мицелла уменьшилась из-за деградации, а не из-за фактического снижения содержания полисорбата. ЯМР-анализ, который использует в основном сигнал от сорбитанполиоксиэтиленовых групп, не позволяет отличить нативное соединение от продуктов деградации.

Спектрофотометрические методы анализа не позволяют достоверно количественно оценить содержание полисорбата, так как определяют не сам полисорбат в нативном состоянии, а лишь его компоненты.

В работе [16] авторами описан метод проточно-инжекционного анализа с детектированием флуоресцентным детектором (метод флуоресценции мицеллы). Данный метод основан на флуоресценции красителя N-фенил-1-нафтиламин (NPN) в гидрофобном ядре полисорбата при длине волны возбуждения 350 нм и длине волны эмиссии 420 нм.

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА ПОЛИСОРБАТА

Данное направление методов анализа базируется на определении продуктов гидролиза полисорбата, основным из которых является соответствующая жирная кислота. По данным литературных источников, процентное содержание жирных кислот в полисорбатах может различаться. Так, для полисорбата 80 процентное содержание основного компонента гидролиза – олеиновой кислоты, может варьироваться от 58 до 85%, а для полисорбата 20 процентное содержание лауриловой кислоты может варьироваться от 40% до 60% [5]. Таким образом, для точного определения содержания полисорбатов в лекарственных препаратах методами, основанными на определении продуктов гидролиза, необходимо в качестве стандартного образца использовать именно тот полисорбат, который использовался при производстве препарата.

В работе M. Nu и соавторов [1] предложен метод определения полисорбата-80 по образующейся при его гидролизе олеиновой кислоте. Гидролиз проводился 1 М раствором калия гидроксида при температуре 40 °С в течение 6 ч. Разделение проводилось в режиме изократического элюирования с использованием колонки Symmetry C₁₈, 150×3,9 мм, 5 мкм, с последующим детектированием УФ-детектором при длине волны 220 нм. В качестве элюента использовали смесь раствора калия фосфата одноосновного с ацетонитрилом в соотношении 8:2 о/о и pH 2,8. Линейность метода была подтверждена в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,04% полисорбата-80.

M. Adamo и соавторы [17] предложили аналогичный метод определения полисорбата-80 по олеиновой кислоте. Разделение проводилось в условиях, аналогичных работе [1], за исключением длины волны детектирования 195 нм. Авторы использовали следующие условия гидролиза: 300 мМ раствор натрия гидроксида при температуре 60 °С в течение 18 ч. После проведения гидролиза в смесь добавлялся ацетонитрил, а затем, после перемешивания, 5 М раствор натрия гидроксида (для разделения водного и ацетонитрильного слоя). Для анализа использовали органический слой.

Z. Oszl и соавторы [18] предложили метод определения полисорбата-20 по лауриловой кислоте. Гидролиз проводился 4 М раствором серной кислоты при комнатной температуре в течение 24 часов. Разделение осуществлялось на колонках Purospher RP-18, 250×4,0 мм, 5 мкм; Lichrosphere 100 RP-8, 250×4,0 мм, 5 мкм; Symmetry C₁₈, 250×4,6 мм, 10 мкм; uBondapak C18, 300×3,9 мм, 10 мкм; Zorbax RX-C18, 250×4,6 мм, 5 мкм, в изократическом режиме. В качестве элюента использовали смесь 20 мМ раствора

натрия гидрофосфата в воде pH 2,8 с ацетонитрилом в соотношении 25:75. Детектирование осуществляли при длине волны 210 нм. Все опробованные колонки пригодны для определения содержания полисорбата. Хроматограммы, полученные на разных колонках, различались между собой по времени удерживания, асимметрии пика лауриловой кислоты и эффективности колонки. Диапазон линейности метода подтвержден в диапазоне концентраций от 2,5 до 125 мг/мл.

ФАРМАКОПЕЙНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Ведущие мировые фармакопеи не включают метод количественного определения полисорбатов. Методом контроля состава является количественное определение жирных кислот, входящих в их состав, методом газовой хроматографии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье рассмотрены основные методы количественного определения полисорбатов. Каждый из подходов имеет свои положительные и отрицательные стороны. Методы анализа полисорбата в нативном виде в большинстве случаев не требуют сложной пробоподготовки, и для их использования в качестве стандартного образца не обязательно использовать именно тот полисорбат, который присутствует в испытуемом образце, однако для этих методов необходимо более дорогостоящее и менее распространенное оборудование (хроматографы, снабженные MS-, ELSC-, CAD-детекторами). При этом в ряде случаев, как например при использовании ELSD- и CAD-детектора, необходимо построение сложной градуировочной зависимости. С другой стороны, анализ полисорбата по продуктам его гидролиза более сложен в пробоподготовке и из-за непостоянного от серии к серии состава полисорбата в качестве стандартного образца требует того же полисорбата, что и в испытуемом. Однако данный подход менее требователен к оборудованию.

Существует ряд нехроматографических методов, использование которых возможно для определения полисорбата в простых объектах, однако для определения полисорбата в сложных смесях методы или совсем не пригодны, или требуют сложной пробоподготовки, которая приводит к увеличению погрешности методики.

Принимая во внимание сложность определения полисорбата в лекарственных препаратах, следует отметить актуальность данной проблемы и необходимость ее дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Hu, M. Niculescu, X.M. Zhang, A. Hui. High-performance liquid chromatographic determination of polysorbate 80 in pharmaceutical suspensions // *Journal of Chromatography A*. 2003. V. 984. I. 2. P. 233–236.
2. S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete. Fast and sensitive determination of Polysorbate 80 in solutions containing proteins // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010. V. 52. I. 5. P. 672–679.
3. Evaluation Report of Food Additives «Polysorbate 20, Polysorbate 60, Polysorbate 65 and Polysorbate 80». Food Safety Commission. Office Location of the FSC: Japan. Tokyo. 2007.
4. R. Zhang, Y. Wang, L. Tan, H.Y. Zhang, M. Yang. Analysis of polysorbate 80 and its related compounds by RP-HPLC with ELSD and MS detection // *Journal of Chromatographic Science*. 2012. V. 50(7) P. 598–607.
5. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Edition. – London; Chicago: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. 888 p.
6. L.M. Nair, N.V. Stephens, S. Vincent, N. Raghavan, P.J. Sand. Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection // *Journal of Chromatography A*. 2003. V. 1012(1) P. 81–86.
7. A. Sparreboom, M. Zhao, J.R. Brahmmer, J. Verweij, S.D. Baker. Determination of the docetaxel vehicle, polysorbate 80, in patient samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. V. 773(2). P. 183–190.
8. T.H. Tani, J.M. Moore, T.W. Patapoff. Single step method for the accurate concentration determination of polysorbate 80 // *Journal of Chromatography A*. 1997. V. 786. I. 1. P. 99–106.
9. D.L. McKean, A.J. Pesce, W. Koo. Analysis of polysorbate and its polyoxyethylated metabolite // *Analytical Biochemistry*. 1987. V. 161. I. 2. P. 348–351.
10. R.A. Greff, E.A. Setzkorn, W.D. Leslie. A colorimetric method for the determination of parts million of nonionic surfactants // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1965. V. 42 (3). P. 180–185.
11. A. Nozawa, T. Ohnuma, T. Sekine. Re-examination of the microanalysis of non-ionic surfactants that contain polyoxyethylene chains by the method involving solvent extraction of the thiocyanatocobaltate(II) complex // *Analyst*. 1976. V. 101 (1204). P. 543–548.
12. N.H. Anderson, J. Girling. Determination of polyoxyethylene non-ionic surfactants at trace levels // *Analyst*. 1982. V.107 (1276). P. 836–838.
13. N.B. Cucakovich, N.B. Cucakovich. Determination of Tween 80 in tissue culture media, vaccines, and related products // *Analytical Biochemistry*. 1971. V. 40. I. 1. P. 183–186.
14. H.V. Dang, A.I. Gray, D. Watson, C.D. Bates, P. Scholes, G.M. Eccleston. Composition analysis of two batches of polysorbate 60 using MS and NMR techniques // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. V. 40. I. 5. P. 1155–1165.
15. M. Khossravi, Y.H. Kao, R.J. Mrsny, T.D. Sweeney. Analysis methods of polysorbate 20: A new method to assess the stability of polysorbate 20 and established methods that may overlook degraded polysorbate 20 // *Pharmaceutical research* 2002. V. 19 (5). P. 634–9.
16. H.C. Mahle, S.K.K. Ravuri. Pharmaceutical formulation for proteins. November 22. 2012. US Patent App. 13/574,071.
17. M. Adamo, L.W. Jr. Dick, D. Qiu, A.H. Lee, J. Devincentis, K.C. Cheng. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography method for polysorbate 80 quantitation in monoclonal antibody drug products // *Journal of chromatography B*. 2010. V. 878 (21). P. 1865–70.
18. Z. Ószi, G. Pethó, Quantitative determination of polysorbate 20 in nasal pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998. V. 18. I. 4–5. P. 715–720.