

УДК 615.014.42; 615.45; 543

СПОСОБЫ СТАБИЛИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (ОБЗОР)

И.И. Яичков^{1*}, А.Л. Хохлов¹, Ю.А. Джурко², Л.Н. Шитов^{1,2}, А.А. Трубников¹

Резюме. В статье рассмотрены основные способы предотвращения разложения химически нестабильных лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях в процессе хранения после отбора у пациентов, что необходимо для точного количественного определения данных соединений.

Ключевые слова: стабилизация, биоэквивалентность, фармакокинетика.

METHODS OF STABILIZATION OF DRUG SUBSTANCES AND THEIR METABOLITES IN BIOLOGICAL FLUIDS DURING BIOANALYTICAL STUDY (REVIEW)

I.I. Yaichkov^{1*}, A.L. Khokhlov¹, Y.A. Dzhurko², L.N. Shitov^{1,2}, A.A. Trubnikov¹

Abstract. This article describes main methods of preventing degradation of chemically unstable drugs and their metabolites in biological fluids during storage after collection from patients. It is necessary for accurate quantitative determination of these compounds.

Keywords: stabilization, bioequivalence, pharmacokinetics.

1 – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, 150000, Россия, Ярославль, ул. Революционная, 5

2 – ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», 150045, Россия, Ярославль, Ленинградский пр-т, 52Г

1 – Yaroslavl State Medical University of the Ministry of health of the Russian Federation, 5, Revolutionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

2 – Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, 52G, Leningradskiy pr., Yaroslavl, 150045, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: ilya_1993_08@mail.ru

Тел.: 8 (4852) 73 40 53

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация и количественное определение лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях является основным этапом изучения фармакокинетики, биоэквивалентности, а также обязательной частью судебно-химических и химико-токсикологических исследований. Некоторые соединения содержат нестабильные функциональные группы и могут разрушаться при хранении образцов или в процессе анализа. Примерами данных веществ являются фенолы, тиолы, сложные эфиры, лактоны, N-оксиды, конъюгированные формы лекарственных веществ (глюкурониды, сульфаты и т.д.) [1, 2]. Также известно явление интерконверсии стереоизомеров. Изменение химической структуры может происходить как под действием внешних факторов – температуры, света, так и под влиянием самой биологической матрицы, прежде всего активности её ферментных систем и величины pH. Предотвратить разложение можно путём изменения условий хранения и при помощи добавления стабилизаторов: антиоксидантов,

буферных растворов, растворов кислот и оснований для коррекции pH, ингибиторов ферментов – в зависимости от особенностей структуры анализируемого вещества.

Согласно руководству по валидации аналитических методик ЕМА [3] и руководству ФГБУ «НЦЭСМП» (том 1) [4] при наличии у лекарственного вещества нестабильных метаболитов, таких как глюкурониды, N-оксиды, сложные эфиры и лактоны, необходимо изучать обратную конверсию данных веществ в процессе хранения, экстракции и проведения аналитических процедур. Данная оценка проводится либо путём добавления метаболита к биологической матрице с последующей оценкой точности количественного определения аналита, либо посредством повторного анализа проанализированных ранее образцов (ISR-теста).

Целью данной работы является выявление методических подходов к стабилизации биологических проб при биоаналитических исследованиях на основании анализа и обобщение данных литературы.

СТАБИЛИЗАЦИЯ ЛЕГКООКИСЛЯЮЩИХСЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К СВЕТУ СОЕДИНЕНИЙ

Фенольные соединения, особенно двухатомные и многоатомные фенолы, достаточно легко подвергаются окислительным процессам [6]. Предотвратить их разложение можно путём добавления к биологическим жидкостям растворов антиоксидантов. Так, для стабилизации молекулы метилдопы, которая содержит два фенольных гидроксила, в плазме крови применялся 5% раствор аскорбиновой кислоты [7], для стабилизации аналогичного по структуре допамина авторами был использован 5% раствор натрия метабисульфита [8]. При количественном определении полифенольных соединений – катехинов к моче добавляли смесь растворов хлористоводородной кислоты в концентрации 1 моль/л и аскорбиновой кислоты в концентрации 10% [9].

Производные птеридина, количественное определение которых в биологических средах имеет большое значение при диагностике некоторых инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, также способны легко окисляться. Для их стабилизации [10] рекомендуют использовать дитиоэритритол (ДТЭ), дитиотреитол, аскорбиновую кислоту и диэтилентриаминпентауксусную кислоту. Например, предупреждение окисления тетрагидробиоптерина до дигидробиоптерина после отбора цереброспинальной жидкости достигалось с помощью смеси растворов ДТЭ и диэтилентриаминпентауксусной кислоты при температуре хранения $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ [11], а после отбора плазмы – с помощью смеси растворов аскорбиновой кислоты в концентрации 0,04% и ДТЭ в концентрации 0,1% при температуре хранения $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [12].

Предотвращения димеризации легкоокисляющихся тиолов можно достигнуть путём дериватизации. Так, для стабилизации меркаптогруппы активного метаболита прасургела R-138727 в качестве дериватизирующего агента использовался 2-бromo-3'-метоксиацетофенон (рисунок 1) [13], при количественном определении каптоприла – N,N,N',N'-тетраметил-2-бутендиамин [14]. Для предупреждения окисления омапатрилата применяли метилирующий агент – метилакрилат [15]. В качестве замены метилакрилата можно использовать N-этилмалеимид [2].

Стабилизации также можно достигнуть без добавки антиоксиданта, с помощью подбора условий хра-

нения и антикоагулянта. Так, 4β-гидроксихолестерол в процессе хранения при температуре не выше $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ был подвержен значительной деградации, а при глубокой заморозке до температуры не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ был относительно стабилен. При этом кровь у пациентов отбирали в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта [16].

N-оксиды способны быстро разлагаться до исходных лекарственных веществ при хранении, при повышенных температурах, в процессе пробоподготовки и проведения анализа. Степень их обратной конверсии зависит от pH среды при экстракции: они относительно нестабильны при щелочной pH среды [1, 2]. Важную роль играет и природа раствора, который используют для коррекции pH. Так, при подщелачивании плазмы крови раствором натрия гидроксида N-оксид хлорпротиксена почти полностью разлагался (рисунок 2), а при подщелачивании раствором натрия гидрокарбоната был относительно стабилен. Для предотвращения разложения данного метаболита пробы плазмы необходимо стабилизировать раствором аскорбиновой кислоты. В процессе экстракции также следует избегать воздействия высоких температур.

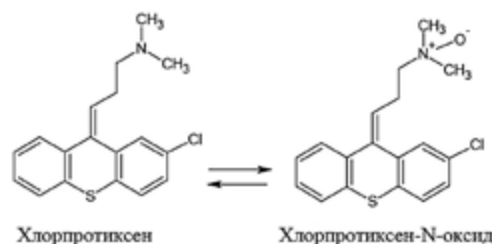


Рисунок 2. Схема разложения N-оксида хлорпротиксена

В качестве метода анализа при количественном определении веществ, которые в процессе метаболизма образуют N-оксиды, предпочтительно использовать ВЭЖХ-МС/МС из-за мягких условий хроматографического разделения и ионизации [1].

Некоторые лекарственные вещества способны разрушаться под действием света. Примерами таких соединений являются витамины группы D, нифедипин, бендрофлуметиазид, монтелукаст [9, 17, 18]. Для предотвращения их разложения в составе биологических проб необходимо использовать пробирки, обернутые алюминиевой фольгой либо изготовленные из тёмного стекла или окрашенного полипропи-

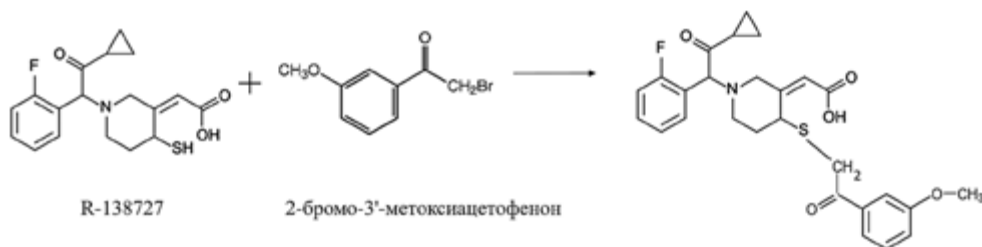


Рисунок 1. Схема дериватизации метаболита прасургела R-138727

лена, не пропускающие свет. Кроме того, целесообразно применять специальные источники освещения, не выделяющие излучения в УФ-диапазоне. Хранение при пониженной температуре также снижает скорость протекания фотохимических реакций [9].

Таким образом, для предотвращения окисления лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях можно использовать растворы антиоксидантов, наиболее распространённым из которых является раствор аскорбиновой кислоты. Для стабилизации тиолов также возможно применение дериватизации. При работе со светочувствительными веществами необходимо избегать прямого попадания ультрафиолетового излучения на образец. Также хранение биологических объектов, содержащих легкоокисляющиеся вещества, необходимо осуществлять при температуре не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, а в некоторых случаях – не выше $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ЗАВИСИМОСТЬ СТАБИЛЬНОСТИ ЛВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ ОТ pH СРЕДЫ. ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ГИДРОЛИЗА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ И ЛАКТОНОВ

Уровень pH биологической жидкости оказывает значительное влияние на стабильность таких соединений, как глюкурониды, лактоны и сложные эфиры. Значение данного показателя сказывается на активности ферментных систем и скорости протекания pH-зависимых реакций. Добавление к образцу растворов кислот, оснований и буферных растворов может существенно повысить стабильность перечисленных выше классов веществ [19].

О-ацилглюкурониды лекарственных веществ по химической структуре являются сложными эфирами. В биологических средах может протекать как полный гидролиз данных метаболитов, так и их изомеризация. При этом происходит миграция сложноэфирной связи в положения С-2, С-3, С-4 глюкуронового кольца с обра-

зованием α - и β -аномеров [9]. Примерами таких соединений являются 1-О-ацилглюкуронид телмисартана и 1-О-ацилглюкуронид диклофенака [20]. Стабилизации данных конъюгатов можно добиться путём коррекции pH до значения ниже 6,0; при щелочных значениях pH биологической жидкости проходит их быстрый гидролиз [2]. Так как данный вид сложноэфирной связи разрушается при воздействии высоких температур, количественное определение данных соединений рекомендовано проводить с использованием в качестве метода анализа ВЭЖХ-МС/МС [1].

При хранении образцов плазмы и сыворотки крови, содержащей статины и их метаболиты, может наблюдаться как явление гидролиза лактонного кольца (рисунок 3), так и циклизация β -гидроксикислоты в лактон (рисунок 4) [9, 21–24]. Для предотвращения обратной конверсии данной группы веществ к пробам, полученным от добровольцев, добавляют буферные растворы со значением pH от 4,0 до 5,0 (см. таблицу 1).

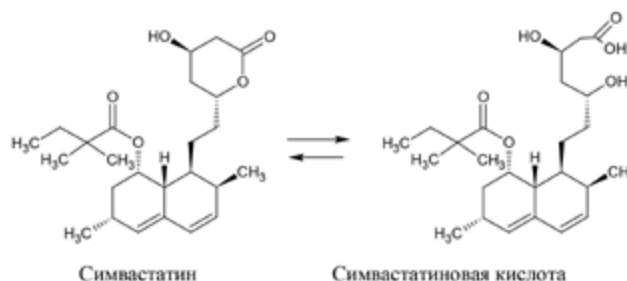


Рисунок 3. Схема гидролиза симвастатина

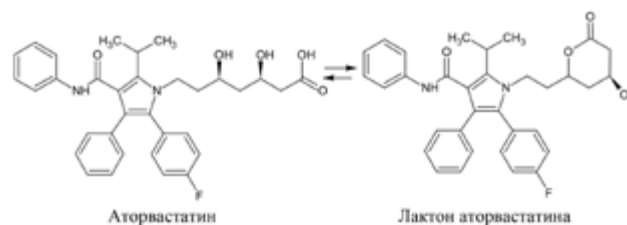


Рисунок 4. Схема циклизации аторвастатина

Таблица 1.

Способы стабилизации статинов в биологических жидкостях

Название лекарственного вещества	Биологическая жидкость	Стабилизатор	Условия хранения	Источник
Правастатин	сыворотка	раствор ацетата аммония с pH 4,5 (500 мМ) (0,3 мл раствора на 0,5 мл сыворотки)	Не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	22
Розувастатин	плазма	раствор ацетата натрия с pH 4,0 (в соотношении 1:1 с плазмой)	Не выше $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	21
Аторвастатин	сыворотка	раствор ацетата натрия с pH 5,0 (в соотношении 1:1 с сывороткой)	Не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	23
Симвастатин	плазма	раствор ацетата натрия с pH 4,2 (0,1 М) (25 мкл раствора на 0,1 мл плазмы)	Не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	24
	плазма	раствор ацетата аммония с pH 4,5 + натрия фторид и калия оксалат в качестве антикоагулянта	Сухой лёд (в эксперименте)	9
	плазма	раствор ацетата аммония с pH 4,5 + K_2 ЭДТА, натрия фторид и калия оксалат в качестве антикоагулянта		

Для предупреждения гидролиза сложных эфиров и лактонов применяют также и ингибиторы эстераз. К ним относятся натрия фторид и его смеси с калия оксалатом и K_2 ЭДТА, параоксон, фенилметансульфонилфторид (ФМСФ), бис-(4-нитрофенил)-фосфат (БНФФ), эзерин, теноилтрифторацетон (ТТФА), диизопропилфторфосфат (ДПФФ), дихлофос и т.д. Причём карбоксиэстеразы способны блокировать БНФФ, ФМСФ, ТТФА, ДПФФ, дихлофос и параоксон, ацетилхолинэстеразы блокируют параоксон, дихлофос и эзерин, фосфодиэстеразы блокирует БНФФ. Натрия фторид является неспецифическим ингибитором данной группы ферментов [25]. Так, для стабилизации симвастатина в плазме крови применялись смеси натрия фторида и калия оксалата, смеси натрия фторида, калия оксалата и K_2 ЭДТА [9], параоксон [26], для устранения гидролиза в плазме осельтамивира (см. рисунок 5) использовался дихлофос [27], для стабилизации селективного ингибитора аденозина 2А В-068645 – ДПФФ [28]. При работе с пробами, содержащими ацетилсалициловую кислоту, необходимо использовать охлаждённые реактивы [29]. В качестве ингибитора эстераз при биоаналитических исследованиях данного соединения обычно используют натрия фторид [30] или его смесь на K_2 ЭДТА [31].

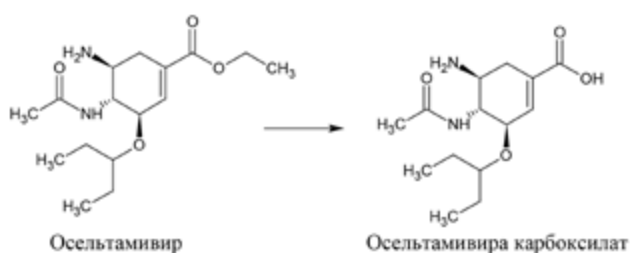


Рисунок 5. Схема гидролиза осельтамивира

Таким образом, для предотвращения гидролиза глюкуронидов, лактонов и сложных эфиров в биологических жидкостях можно использовать ингибиторы ферментных систем и коррекцию значения pH.

Предупреждение интерконверсии энантиомеров и диастереомеров

Известно явление интерконверсии стереоизомеров в плазме крови в процессе хранения. На протекание данного процесса оказывают влияние температура, свет, pH среды и активность ферментов [2]. Так, оксазепам [32], росиглитазон и пиоглитазон [33] подвергаются рацемизации, а 13-транс-ретиноевая кислота способна переходить в 13-цис-ретиноевую кислоту (см. рисунок 6) [34].

Предотвращение рацемизации глитазонов было достигнуто путём коррекции pH среды до 2,5. При значении pH 7,4 и 9,3 рацемизация данных соединений проходила полностью, причём при pH 9,3 процесс завершился намного быстрее – в течение 24 часов [33]. Для стабилизации оксазепам пробы плазмы подкис-

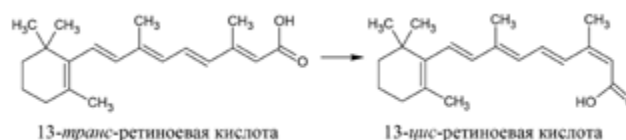


Рисунок 6. Схема изомеризации ретиноевой кислоты

ляли 0,1 н. раствором хлористоводородной кислоты [32], а для предотвращения интерконверсии ретиноидов использовалась смесь натрия аскорбината и N-этилмалеимида [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При разработке биоаналитической методики для количественного определения легкоразлагающихся веществ выбор условий хранения биологической жидкости необходимо начинать с использования более глубокой заморозки до температуры не выше -70 °C или не выше -90 °C. В случае получения неудовлетворительных результатов необходимо применять растворы стабилизаторов (таблица 2).

Таким образом, для стабилизации легкоокисляющихся соединений необходимо использовать антиоксиданты или дериватизацию, для предотвращения гидролиза сложных эфиров, лактонов – ингибиторы эстераз и коррекцию pH, для предотвращения гидролиза глюкуронидов – коррекцию pH, для предупреждения интерконверсии стереоизомеров – закисление среды до pH 2-2,5. Отбор биологических проб при исследованиях светочувствительных веществ необходимо осуществлять в не пропускающую свет тару.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Dell. Labile Metabolites // Chromatographia Supplement. 2004. № 59. С. 139–148.
2. M. Hilhorst et al. Stabilization of clinical samples collected for quantitative bioanalysis – a reflection from the European Bioanalysis Forum // Bioanalysis. 2015. № 3 (7). P. 333–343.
3. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, London, 2013.
4. А.Н. Миронов. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. – М.: Гриф и К. 2013. 322 с.
5. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», 2016.
6. Органическая химия. Кн.1: Основной курс / Под ред. Н.А. Тюкавкиной. – М.: Дрофа. 2003. 640 с.
7. A.L. Khokhlov et al. The Pharmacokinetic Properties and Bioequivalence of Methyl dopa Formulations: Results of an Open-label, Randomized, Two-period, Crossover, Single-dose Study // Journal of Bioequivalence & Bioavailability. 2016. № 8. P. 185–190.
8. N.C. van de Merbel et al. Quantitative determination of free and total dopamine in human plasma by LC-MS/MS: the importance of sample preparation // Bioanalysis. 2011. № 3(17). P. 1949–1961.
9. W. Li et al. Handbook of LC-MS Bioanalysis. – New Jersey: John Wiley and Sons. 2013. 675 p.
10. H. Tomšíková. Determination of pteridines in biological samples with an emphasis on their stability // Bioanalysis. 2013. № 5(18). P. 2307–2326.

Таблица 2.

Основные способы стабилизации аналитов в биологических жидкостях

Группа веществ	Способ стабилизации	Примеры
Легкоокисляющиеся соединения	Добавление антиоксидантов (растворов аскорбиновой кислоты, натрия метабисульфита и др.)	метилдопа, допамин, тетрагидробиоптерин
	Дериватизация	метаболит прасугрела R-138727, омапатрилат, каптоприл
	Хранение при температуре не выше -70 °C	4β-гидроксихолестерол
N-оксиды	Добавление антиоксидантов	хлорпротиксен
Светочувствительные соединения	Хранение в светонепроницаемой таре	витамин D, нифедипин, бендрофлуметиазид, монтелукаст
Глюкуроны	Коррекция pH биологической пробы до значений ниже 6,0	телмисартан, диклофенак
Сложные эфиры	Коррекция pH, использование ингибиторов эстераз (фторида натрия, параоксона, эсерина и др.)	осельтамивир, селективный ингибитор аденозина 2A B-068645, ацетилсалициловая кислота
Лактоны		статины
Стереизомеры	Создание сильноокислой pH среды	оксазепам, росиглитазон и пиоглитазон
	Добавление раствора аскорбиновой кислоты и N-этилмалеимида	ретиноевая кислота

- D.W. Howells, K. Hyland. Direct analysis of tetrahydrobiopterin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with redox electrochemistry: prevention of autoxidation during storage and analysis // *Clinica Chimica Acta*. 1987. V. 167. P. 23–30.
- B. Fiege et al. Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration // *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004. V. 81. P. 45–51.
- E.R. Wickremsinhe et al. Stereoselective Metabolism of Prasugrel in Humans Using a Novel Chiral Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method // *Drug Metabolism and Disposition*. 2007. № 6(35). P. 917–921.
- K.H. Abu-Shandi, E. Redel. Quantification and Stability Evaluation of the Highly Specific Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor in Human Plasma Using a Gas Chromatography Method with N,N,N',N'-teteramethyl-2-butenediamine Derivatizing Agent // *Jordan Journal of Chemistry*. 2009. № 2(4). P. 183–194.
- M. Jemal et al. LC/MS/MS Determination of Omapatrilat, a Sulfhydryl-Containing Vasopeptidase Inhibitor, and Its Sulfhydryl- and Thioether-Containing Metabolites in Human Plasma // *Analytical Chemistry*. 2001. № 22(73). P. 5450–5456.
- N.C. Van de Merbel et al. A validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of 4β-hydroxycholesterol in human plasma // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. V. 55. P. 1089–1095.
- M.Y. Kotteboina, N.R. Pilli, S.R. Salta. LC-MS/MS Method Development and Validation of Montelukast in human plasma and its clinical application// *American Journal of Pharmaceutical Research*. 2015. № 5 (3). P. 646–657.
- Z. Bartoszewicz et al. Can we accurately measure the concentration of clinically relevant vitamin D metabolites in the circulation? The problems and their consequences // *Endokrynologia Polska*. 2013. № 3(64). P. 238–245.
- A. Fura et al. Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003. V. 32. P. 513–522.
- T. Ebner et al. Disposition and Chemical stability of Telmisartan 1-O-acylglucuronide // *Drug Metabolism and Disposition*. 1999. № 10(27). P. 1143–1149.
- C.K. Hull et al. Quantification of rosuvastatin in human plasma by automated solid-phase extraction using tandem mass spectrometric detection // *Journal of Chromatography B*. 2002. V. 772. P. 219–228.
- D. Mulvana, M. Jemal, S.C. Pulver. Quantitative determination of pravastatin and its biotransformation products in human serum by turbo ion spray LC/MS/MS // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000. № 23. P. 851–866.
- M. Jemal et al. Quantitation of the Acid and Lactone Forms of Atorvastatin and its Biotransformation Products in Human Serum by High-performance Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1999. V. 13. P. 1003–1015.
- M. Jemal, Z. Ouyang, M.L. Powell. Direct-injection LC-MS-MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000. V. 23. P. 323–340.
- E.N. Fung et al. Effective screening approach to select esterase inhibitors used for stabilizing ester-containing prodrugs analyzed by LC-MS/MS // *Bioanalysis*. 2010. № 2(4). P. 733–743.
- Z. Suchocka et al. RP-HPLC determination of paraoxonase 3 activity in human blood serum // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. V. 42. P. 113–119.
- N. Lindegardh et al. Importance of Collection Tube during Clinical Studies of Oseltamivir // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007. № 5(51). P. 1835–1836.
- J. Zeng et al. Simultaneous determination of a selective adenosine 2A agonist, BMS-068645, and its acid metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry – Evaluation of the esterase inhibitor, diisopropyl fluorophosphate, in the stabilization of a labile ester-containing drug // *Journal of Chromatography B*. 2007. V. 852. P. 77–84.
- B. Nigori et al. Simulation extraction of acetylsalicylic acid and Salicylic acid from human plasma and simultaneous estimation by liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization / tandem massspectrometry detection // *Arzneimittelforschung*. 2011. № 5(61). P. 301–311.
- S.K. Bae et al. Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid in human plasma using liquid chromatography – tandem massspectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix in Korean healthy volunteers // *Biomedical Chromatography*. 2008. V. 22. P. 590–595.
- X. Xu et al. Rapid and sensitive Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography – tandem massspectrometry: application to pharmacokinetic study // *Biomedical Chromatography*. 2009. V. 23. P. 973–979.
- C. Pham-Huy, G. Villain-Pautet, H. Hua. Separation of oxazepam, lorazepam, and temazepam enantiomers by HPLS on a derivatized cyclodextrin-bonded phase: application to the determination of oxazepam in plasma // *Biochemical and biophysical methods*. 2002. V. 54. P. 287–299.
- B. Jamali et al. Investigation of racemisation of the enantiomers of glitazone drug compounds at different pH using chiral HPLC and chiral CE // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008. V. 46. P. 82–87.
- C.J. Wang et al. Novel inhibition of cis/trans retinoic acid interconversion in biological fluids – an accurate method for determination trans and 13-cis retinoic acid in biological fluids // *Journal of Chromatography B*. 2003. V. 796. P. 283–291.