

1 – ГБОУ ВПО
Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова
Минздрава России, 119991,
Россия, г. Москва,
ул. Трубецкая, 8

2 – ФГБУН НЦБМТ
ФМБА России, 143442,
Россия, Московская обл.,
Красногорский район,
п/о Отрадное,
пос. Светлые горы,
владение 1

3 – ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России,
127051, Россия, г. Москва,
Петровский бульвар, 8

1 – I.M. Sechenov First
Moscow State
Medical University, 8,
Trubetskaya str., Moscow,
119991, Russia

2 – FSBS SCBMT FMBA, 1,
pos. Svetlye gory,
p/o Otradnoe,
Krasnogorskiy r-n,
Moscow region, 143442,
Russia

3 – Scientific Center for
Expertise of Medicinal
Products, 8, Petrovsky blv.,
Moscow, 127051, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: igorshohin@yandex.ru

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАПЕЦИТАБИНА И ЕГО АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА 5-ФТОРУРАЦИЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Е.С. Мельников¹, И.Е. Шохин^{2*}, А.А. Аксёнов¹, Г.В. Адамов¹,
А.Н. Конюшкова³

Резюме. Разработана методика количественного определения капецитабина и 5-фторурацила в плазме крови человека. Пробоподготовка проводилась методом осаждения белков метанолом. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ с использованием масс-селективного детектора с тройным квадруплом. Разработанная методика была валидирована по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов. Аналитический диапазон методики составил 10,0–20000,0 нг/мл для капецитабина и 10,0–400,0 нг/мл для 5-фторурацила. Разработанная методика может быть использована для исследований биоэквивалентности препаратов капецитабина.

Ключевые слова: капецитабин, 5-фторурацил, ВЭЖХ-МС/МС.

DETERMINATION OF CAPECITABINE AND ITS ACTIVE METABOLITE 5-FLUOROURACIL IN BLOOD PLASMA BY HPLC-MS/MS

E.S. Melnikov¹, I.E. Shohin^{2*}, A.A. Aksenov¹, G.V. Adamov¹, A.N. Konyushkova³

Abstract. A method for quantification of capecitabine and 5-fluorouracil in human plasma was developed. The sample preparation was carried out by protein precipitation with methanol. The quantitative determination was performed by HPLC with a triple quadrupole mass-detector. The method was validated in terms of selectivity, calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification, and stability. The analytical range was 10.0–20000.0 ng/mL for capecitabine and 10.0–400.0 ng/ml for 5-fluorouracil. The developed method may be used for bioequivalence studies of capecitabine drug products.

Keywords: capecitabine, 5-fluorouracil, HPLC-MS/MS.

ВВЕДЕНИЕ

Капецитабин – противоопухолевое лекарственное средство из группы анти-метаболитов, являющееся производным фторпиримидина карбамата. Препараты капецитабина применяются для лечения рака молочной железы, ободочной кишки и других видов рака.

Капецитабин включен в перечень ЖНВЛП [1], и, учитывая курс на импортозамещение для важнейших препаратов [2], актуальной задачей является разработка биоаналитических методик, применимых для проведения исследований биоэквивалентности (БЭ) воспроизведенных лекарственных препаратов капецитабина.

Капецитабин является пролекарством, его активный метаболит 5-фторурацил образуется в ходе нескольких ферментативных реакций (рисунок 1). Ферменты, участвующие в метаболизме капецитабина, представлены как в печени, так и в опухолевых тканях [3], что приводит к значительным различиям в концентрациях ка-

пецитабина и 5-фторурацила у здоровых добровольцев и у онкобольных. Помимо этого, имеет место полиморфизм ферментов, задействованных в метаболизме капецитабина [4], определяя значительную вариабельность фармакокинетических параметров у отдельных субъектов.

Таким образом, при определении концентраций капецитабина и 5-фторурацила в плазме крови требуется учитывать особенности фармакокинетики и разрабатывать методики, имеющие широкий аналитический диапазон.

Являясь по своей химической структуре уретаном и N-гликозидом, капецитабин неустойчив в кислой среде и может гидролизироваться до 5-фторурацила *in vitro*, что необходимо учитывать при выборе метода пробоподготовки образцов плазмы крови.

Разработано множество методик определения капецитабина и 5-фторурацила в плазме крови человека (таблица 1). Основным аналитическим методом является высокоэффективная жидкостная

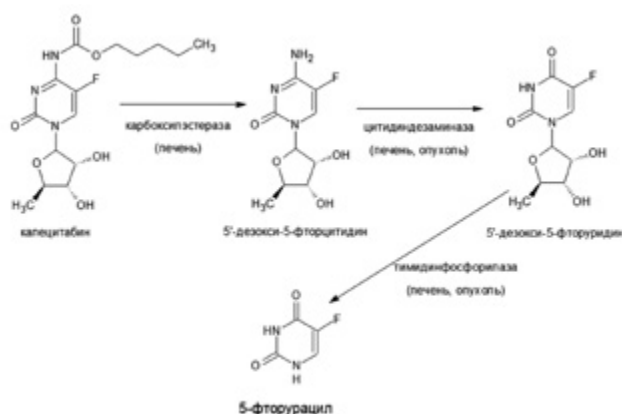


Рисунок 1. Метаболизм капецитабина

хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) одно-квадрупольным масс-спектрометрическим (МС) и тандемным масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС). Применяются такие методы пробоподготовки, как жидкость-жидкостная (ЖЖЭ) и твердофазная экстракция (ТФЭ), а также осаждение белков плазмы органическими растворителями.

Таблица 1.

Биоаналитические методики определения капецитабина и 5-фторурацила

Аналитический метод	Пробоподготовка	Аналитический диапазон, мкг/мл		Ссылка
		Капецитабин	5-фторурацил	
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	0,025–10	0,025–10	[5]
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	0,05–4,39	0,05–4,39	[6]
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	0,1–10	0,05–5	[7]
ВЭЖХ-МС	ТФЭ	0,05–10,0	0,05–25,0	[8]
ВЭЖХ-МС/МС	Осаждение белков, метанол/ацетонитрил (1:1)	0,05–6,0	0,05–6,0	[9]
ВЭЖХ-МС/МС	Осаждение белков ацетонитрилом	0,01–0,5	0,1–5,0	[10]
ВЭЖХ-МС	Осаждение белков ацетонитрилом	0,1–10	0,05–5	[11]

Целью настоящего исследования является разработка методики определения капецитабина и его активного метаболита 5-фторурацила в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС, которая была бы пригодна

не только для терапевтического мониторинга и ФК-исследований на пациентах, но и для исследований БЭ на добровольцах. Исследования БЭ капецитабина на добровольцах обычно проводятся на минимальных дозировках (например, 150 мг) при однократном приеме с целью минимизации нежелательных лекарственных реакций, в связи с этим ожидаемые концентрации капецитабина и 5-фторурацила в биообразцах значительно ниже, чем при проведении курсовой терапии пациентам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение проводили с использованием системы ВЭЖХ-МС/МС LCMS-8040 с тандемным масс-селективным детектором (тройной квадруполь, Shimadzu Corporation, Япония) с программным обеспечением LabSolutions (Ver. 5.3).

Для приготовления растворов и пробоподготовки применяли вортекс-шейкер Reax top (Heidolph, Германия), центрифугу SL 16 (Thermo Scientific, США), аналитические весы OHAUS DV 214C (Китай), дозаторы переменного объема «Ленпипет Дигитал» 10–100 мкл и 100–1000 мкл (Россия).

Реактивы и растворы

В работе были использованы капецитабин, субстанция-порошок (годен до 05.2015, стандарт фирмы, содержание 98,6%); 5-фторурацил, субстанция-порошок (ACROS ORGANICS, содержание 99%); ацетонитрил (gradient grade, Scharlau, Испания); метанол (gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®, Merck Millipore, США); кислота муравьиная (for LC-MS, Merck, США); формиат аммония (for LC-MS, Merck, США); вода Milli-Q.

Образцы интактной и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы (морозильник медицинский Pozis, ММ-180/20/35, Россия) при температуре от –45 °С до –50 °С. Стандартные растворы хранили в морозильнике при температуре от –20 °С до –25 °С.

С учетом содержания капецитабина и 5-фторурацила в субстанциях вносили 10,1 мг и 5,1 мг субстанции капецитабина и 5-фторурацила соответственно, что эквивалентно 10 мг и 5 мг анализируемых веществ соответственно, в мерные колбы вместимостью 50 мл, прибавляли 25 мл метанола, перемешивали до полного растворения, доводили объем растворов тем же растворителем до метки. Полученные растворы имели концентрацию капецитабина 200 мкг/мл (раствор А) и 5-фторурацила 100 мкг/мл (раствор Б). Стандартные растворы готовили путем разведения растворов А и Б метанолом (таблицы 2–3).

Таблица 2. Условия хроматографирования

Приготовление стандартных растворов капецитабина

Концентрация приготовленного раствора капецитабина, нг/мл	Количество компонента, мл	
	Стандартный раствор капецитабина, С=200 мкг/мл	Метанол
100000,0	5,000	До 10,0
50000,0	5,000	До 20,0
20000,0	1,000	До 10,0
10000,0	1,000	До 20,0
5000,0	0,500	До 20,0
1000,0	0,250	До 50,0
500,0	0,250	До 100,0
200,0	0,100	До 100,0
100,0	0,050	До 100,0

Таблица 3.

Приготовление стандартных растворов 5-фторурацила

Концентрация приготовленного раствора 5-фторурацила, нг/мл	Количество компонента, мл	
	Стандартный раствор 5-фторурацила, С=100 мкг/мл	Метанол
4000,0	2,000	До 50,0
2000,0	1,000	До 50,0
1000,0	0,500	До 50,0
400,0	0,400	До 100,0
200,0	0,200	До 100,0

Исходные стандартные растворы для проведения валидации хранили в морозильнике при температуре от -20°C до -25°C . Разведения использовались свежеприготовленными.

Пробоподготовка

К 200 мкл плазмы крови (либо к 180 мкл плазмы с прибавлением 20 мкл раствора стандартного образца), помещённым в центрифужные микропробирки вместимостью 1,5 мл, прибавляли 400 мкл метанола, встряхивали на шейкере типа «вортекс» в течение 10 с, далее центрифугировали в течение 15 мин при 15000 об/мин и отбирали 200 мкл надосадочной жидкости, которую переносили в вials для хроматографа.

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LCMS-8040, оснащённом градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, авто-сAMPLером, фотодиодно-матричным и тандемным масс-спектрометрическим детектором. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.3), Shimadzu Corporation, Япония.

Подвижная фаза: вода, 0,1% муравьиной кислоты, 1 ммоль/л формиата аммония (А) / вода, 0,1% муравьиной кислоты, 1 ммоль/л формиата аммония (В). *Градиент состава подвижной фазы:* 0-1 мин – 0% В; 1-1,1 мин – от 0% до 37% В; 1,1–2,5 мин – 37% В; 2,5–3,5 мин – от 37% до 100% В; 3,5–4,5 мин – 100% В; 4,5–4,8 мин – от 100% до 0% В; 4,8–6,5 мин – 0% В.

В качестве *неподвижной фазы использовалась* хроматографическая колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 75x4,6 мм, 3,5 мкм, при температуре 37°C .

Скорость потока подвижной фазы составляла 1,2 мл/мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Время хроматографирования – 6,5 мин.

Детектирование

Для 5-фторурацила применяли отрицательный режим ионизации электрораспылением, детектирование в SIM-режиме по фрагменту 129,15 m/z, напряжение на капилляре – 5 кВ, распыляющий газ – 2 л/мин, осушающий газ – 20 л/мин, блок нагрева – 400°C , линия десольватации – 300°C .

Для капецитабина применяли положительный режим ионизации электрораспылением, детектирование в режиме мониторинга множественных реакций по переходам 360,1→244,1, 360,1→130,0, напряжение на капилляре – 3,5 кВ, распыляющий газ – 2 л/мин, осушающий газ – 20 л/мин, блок нагрева – 400°C , линия десольватации – 300°C .

Время удерживания 5-фторурацила составляло около 0,9 мин, капецитабина – около 2,8 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководств FDA [12] и ЕМА [13], а также «Руководства по экспертизе лекарственных средств» [14] по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне *intra-run* и *inter-run*), перенос пробы, предел количественного определения, стабильность растворов.

Селективность

Проводили анализ 7 образцов интактной плазмы, образцов интактной плазмы с прибавлением стандартного раствора капецитабина в диапазоне концентраций 10–20000,0 нг/мл и 5-фторурацила в диапазоне концентраций 10–400,0 нг/мл. На хроматограммах образцов интактной плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания капецитабина или 5-фторурацила. Соответствующие хроматограммы приведены на рисунках 2–4.

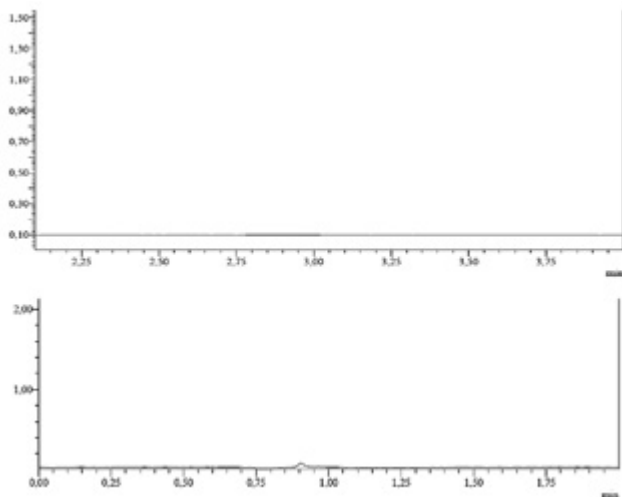


Рисунок 2. Хроматограммы интактной плазмы

Линейность

Проводили анализ 10 образцов интактной плазмы с прибавлением стандартного раствора капецитабина до получения концентраций: 10 нг/мл, 20 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 нг/мл, 2000 нг/мл, 5000 нг/мл, 10000 нг/мл, 20000 нг/мл и 6 образцов интактной плазмы с прибавлением стандартного раствора 5-фторурацила до получения концентраций 10 нг/мл, 20 нг/мл, 40 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 400 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики, приведенные на рисунках 5–6, совместно с уравнением калибровочной кривой.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблицах 4–5.

Правильность и прецизионность

Проводили анализ 4 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора капецитабина до получения концентраций: 10 нг/мл, 50 нг/мл, 10000 нг/мл, 20000 нг/мл.

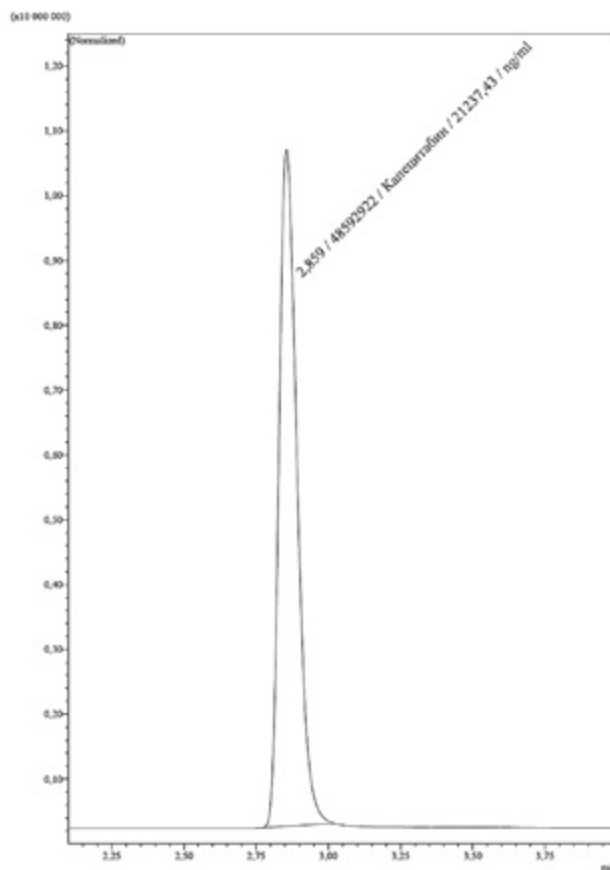


Рисунок 3. Хроматограмма интактной плазмы с прибавлением стандартного раствора капецитабина (20000,0 нг/мл)

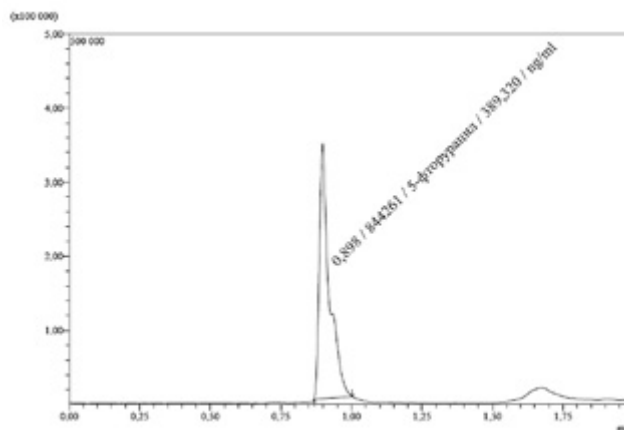


Рисунок 4. Хроматограмма интактной плазмы с прибавлением стандартного раствора 5-фторурацила (400,0 нг/мл)

Проводили анализ 4 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора 5-фторурацила до получения концентраций: 10 нг/мл, 20 нг/мл, 200 нг/мл, 400 нг/мл.

Каждый раствор хроматографировали 5 раз. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (*intra-run*) и 2-й последовательности (*inter-run*). Для полученных значений концентраций были рас-

Таблица 4.

Отклонения концентраций калибровочных растворов капецитабина от фактических значений

$C_{факт}$, нг/мл	10,00	20,00	50,00	100,00	500,00	1000,00	2000,00	5000,00	10000,00	20000,00
$C_{рассч}$, нг/мл	9,68	21,56	48,40	101,52	468,05	875,80	1889,65	5555,73	10408,00	21237,43
ϵ , %	3,20	7,80	3,20	1,52	6,39	12,42	5,52	11,11	4,08	6,19

считаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в таблицах 6–9.

Таблица 5.

Отклонения концентраций калибровочных растворов 5-фторурацила от фактических значений

$C_{факт}$, нг/мл	10,00	20,00	40,00	100,00	200,00	400,00
$C_{рассч}$, нг/мл	10,33	19,16	37,21	101,96	217,24	389,32
ϵ , %	3,29	4,21	6,98	1,96	8,62	2,67

Для расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) на уровне *inter-day* использовались данные ($n=10$), полученные в течение 1-й последовательности (*intra-run*) и 2-й последовательности (*inter-run*).

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) соответствуют нормам (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% для остальных точек).

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация капецитабина и 5-фторурацила в плазме, для которой возможно определение капецитабина и 5-фторурацила со значениями RSD и ϵ не более 20% в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 10,0 нг/мл для обоих веществ.

Стабильность

Была подтверждена стабильность для стандартных растворов капецитабина и 5-фторурацила (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре от $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 48 ч при анализе на следующий день при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) на уровне концентрации 50 и 20000,0 нг/мл для капецитабина, 20 и 400,0 нг/мл для фторурацила. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10%.

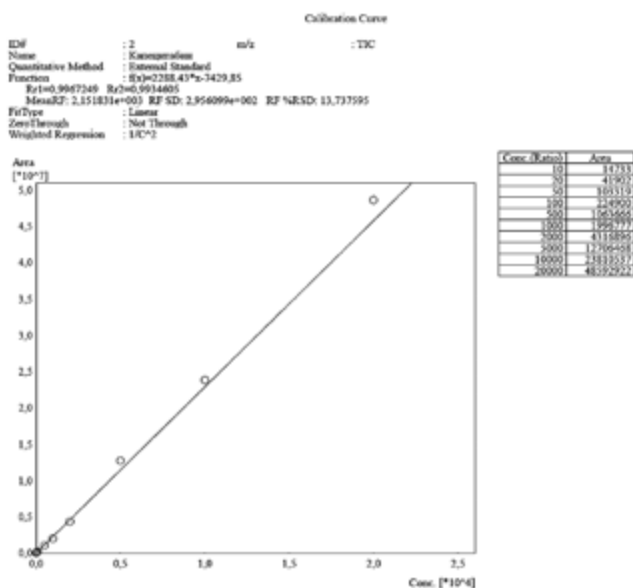


Рисунок 5. Калибровочный график зависимости площади пика капецитабина от концентрации в плазме

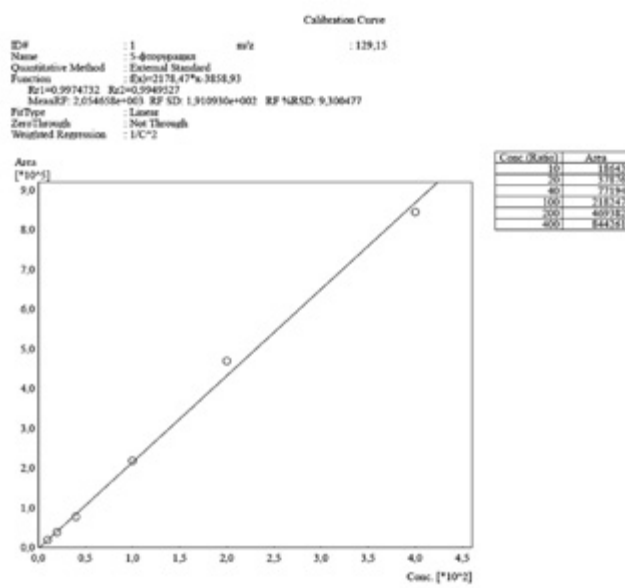


Рисунок 6. Калибровочный график зависимости площади пика 5-фторурацила от концентрации в плазме

Таблица 6.

Таблица 7.

Правильность и прецизионность методики (*intra-run*) для капецитабина

Правильность и прецизионность методики (*inter-run*) для капецитабина

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
10,00	9,68	10,72	0,86	8,06	7,22
	11,34				
	10,01				
	11,72				
	10,86				
50,00	48,40	49,24	3,16	6,43	1,53
	53,93				
	50,03				
	45,20				
	48,62				
10000,00	10408,00	10239,54	167,24	1,63	2,40
	10259,71				
	9959,16				
	10297,07				
	10273,76				
20000,00	21237,43	21153,38	186,98	0,88	5,77
	21014,07				
	21246,17				
	21362,73				
	20906,52				

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
10,00	9,45	10,12	0,99	9,75	1,22
	9,22				
	10,74				
	8,76				
	9,44				
50,00	47,89	48,92	2,50	5,10	2,15
	49,32				
	46,28				
	51,49				
	48,08				
10000,00	10385,96	10476,59	381,17	3,64	4,77
	10853,21				
	11236,83				
	10843,69				
	10248,51				
20000,00	20773,01	21152,95	512,09	2,42	5,76
	21583,17				
	20458,63				
	20698,41				
	22249,37				

Таблица 8.

Правильность и прецизионность методики (*intra-run*) для 5-фторурацила

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
10,00	10,33	9,15	0,70	7,67	8,50
	8,63				
	8,75				
	8,78				
	9,26				
20,00	19,16	19,89	0,97	4,86	0,53
	21,18				
	20,69				
	19,28				
	19,16				
200,00	217,27	198,99	17,10	8,59	0,50
	206,96				
	183,86				
	208,96				
	177,92				
400,00	389,32	397,48	12,83	3,23	0,63
	408,70				
	402,49				
	407,74				
	379,17				

Таблица 9.

Правильность и прецизионность методики (*inter-run*) для 5-фторурацила

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
10,00	9,95	9,40	0,59	6,31	5,97
	9,58				
	9,11				
	10,06				
	9,58				
20,00	20,58	19,73	0,87	4,39	1,35
	18,91				
	19,03				
	20,36				
	18,95				
200,00	205,82	197,37	15,72	7,96	1,31
	180,91				
	178,07				
	198,58				
	215,39				
400,00	401,16	391,81	16,22	4,14	2,05
	405,81				
	358,80				
	381,78				
	383,16				

Перенос пробы

При последовательном вводе пробы с концентрацией капецитабина 20000,0 нг/мл и 5-фторурацила 400,0 нг/мл и чистой плазмы на хроматограмме чистой плазмы отсутствовали пики, соответствующие капецитабину и 5-фторурацилу. Перенос пробы отсутствовал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения капецитабина и его активного метаболита 5-фторурацила в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. По результатам валидации методики был установлен ее аналитический диапазон, который составил 10,0–20000,0 нг/мл для капецитабина и 10,0–400,0 нг/мл для 5-фторурацила. Данный аналитический диапазон был признан пригодным для проведения исследований биоэквивалентности препаратов капецитабина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Распоряжение Правительства РФ № 2724-р «Об утверждении перечней жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2016 год».
2. Приказ Минпромторга РФ от 23.10.2009 № 965 «Об утверждении стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 г».
3. B. Reigner, K. Blesch, E. Weidekamm. Clinical pharmacokinetics of capecitabine // *Clin Pharmacokinet.* 2001. V. 40(2). P. 85–104.
4. D. Caronia, M. Martin, J. Sastre, J. de la Torre, J.A. García-Sáenz, M.R. Alonso, L.T. Moreno, G. Pita, E. Díaz-Rubio, J. Benítez, A. González-Neira. A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome // *Clin Cancer Res.* 2011. V. 17(7). P. 2006–2013.
5. L. Zufia, A. Aldaz, J. Giráldez. Simple determination of capecitabine and its metabolites by liquid chromatography with ultraviolet detection in a single injection // *Journal of Chromatography B.* 2004. V. 809. P. 51–58.
6. И.Е. Шохин, А.Ю. Савченко, Ю.В. Медведев, Л.Л. Шамаль. Разработка и валидация методики определения противоопухолевого препарата капецитабина и его метаболита 5-фторурацила в плазме крови // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2012. № 1. С. 53–56.
7. Т.Н. Комаров, Ю.В. Медведев, Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, Т.А. Ярушок, Е.Ю. Мидруев. Разработка и валидация методики определения противоопухолевого препарата капецитабина и его активного метаболита 5-фторурацила в плазме крови с целью проведения фармакокинетических исследований // *Биофармацевтический журнал.* 2014. Т. 6. № 5. С. 62–67.
8. Y. Xu, J.L. Grem. Liquid chromatography – mass spectrometry method for the analysis of the anti-cancer agent capecitabine and its nucleoside metabolites in human plasma // *Journal of Chromatography B.* 2003. V. 783. P. 273–285.
9. M.J. Deenen, H. Rosing, M.J. Hillebrand. Quantitative determination of capecitabine and its six metabolites in human plasma using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B.* 2013. V. 913–914. P. 30–40.
10. S.M. Guichard, I. Mayer, D.I. Jodrell. Simultaneous determination of capecitabine and its metabolites by HPLC and mass spectrometry for preclinical and clinical studies // *Journal of Chromatography B.* 2005. V. 826. P. 232–237.
11. Т.Н. Комаров, Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, Ю.В. Медведев, Е.Ю. Мидруев, А.А. Львова, Ю.Е. Болдина. Определение некоторых противоопухолевых препаратов из списка жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов в плазме крови с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектированием // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2014. Т. 14. Вып. 6. С. 724–730.
12. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation (draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2013.
13. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. – London. 2011.
14. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. – М.: Гриф и К, 2013. 328 с.