

УДК 604.2; 615.074; 543.422.7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСОРБАТОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

А.Д. Аскретков^{1*}, П.М. Исайкина¹, С.А. Черепушкин², Н.В. Орлова²

Резюме. Разработана методика определения полисорбата-20 и полисорбата-80 в лекарственных препаратах на основе рекомбинантных белков методом спектрофотометрии. Выделение полисорбата из раствора проводится с помощью твердофазной экстракции с последующим элюированием полисорбата ацетонитрилом. Ацетонитрильный раствор упаривается, и полисорбат дериватизируется железотиоцианатным реагентом, полученный дериватизат извлекается в органическую фазу, и измеряется оптическая плотность. Подобраны наиболее оптимальные условия дериватизации, экстракции в органическую фазу и измерения полисорбата. Проведена валидация методики: определены её специфичность, линейность, правильность, прецизионность, устойчивость, предел количественного определения.

Ключевые слова: валидация, рекомбинантные белки, полисорбат, твердофазная экстракция, твин, тиоцианат железа.

DETERMINATION OF POLYSORBATES BY SPECTROPHOTOMETRY IN DRUGS BASED ON RECOMBINANT PROTEINS

A.D. Askretkov^{1*}, P.M. Isaykina¹, S.A. Cherepushkin², N.V. Orlova²

Abstract. Method of determination of polysorbate 20 and polysorbate 80 in recombinant protein drugs based on spectrophotometry has been designed. Isolation of polysorbate from solution is carried out by solid phase extraction followed by elution of polysorbate with acetonitrile. Acetonitrile solution is evaporated and then polysorbate is derivatized with ferrous-thiocyanate reagent. Obtained derivative is extracted into organic phase and optical density is measured. The most optimal conditions of derivatization, extraction into organic phase and measurement was chosen. The validation was performed: specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, limit of quantification.

Keywords: validation, recombinant proteins, polysorbate, solid phase extraction, tween, iron thiocyanate.

1 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (Институт тонких химических технологий), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, 86

2 – ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» («ГосНИИгенетика»), 117545, Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

1 – Moscow Technological University (MITHT), 86, Vernadsky Av., Moscow, 119571, Russia

2 – Scientific Center of Russian Federation «Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms», 1, 1st Dorozhnyi pr., Moscow, 117545, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: sashamitxt@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Белки являются малостабильными веществами, склонными к физической и химической деградации. Это приводит к образованию агрегатов, потере белком специфической биологической активности либо химическим изменениям (дезамидирование, окисление, гидролиз и т.д.). Наличие агрегатов, неактивного и химически измененного белка критически влияет на качество, безопасность и эффективность лекарственных препаратов, поэтому необходим строгий контроль данных показателей. Агрегацию белка на всех стадиях технологического процесса производства лекарственной формы уменьшают путем добавления неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ): полисорбата-20 (ПС-20), полисорбата-80 (ПС-80) [1, 2], полоксамеров и т.д. ПС значительно уменьшают агрегацию белков [3], сорбцию на поверхностях [4]. Также было показано, что ПС защищают белки от агрегации

при механическом воздействии (размешивание, встряхивание) [5], заморозке-оттаивании [6], лиофилизации и последующем растворении [7].

Так как ПС сорбируется на многих поверхностях, мембранах для ультрафильтрации, стерилизующих фильтрах [8], то поддержание концентрации ПС в растворах белков на всех стадиях технологического процесса и в готовой лекарственной форме важно с точки зрения сохранения стабильности препарата. Для определения ПС на каждой стадии процесса необходима достаточно быстрая и простая методика.

ПС представляют собой полиоксиэтилированные эфиры сорбитана с остатком высшей жирной карбоновой кислоты: лауриновой кислоты – ПС-20, олеиновой кислоты – ПС-80. Определение ПС в белковых лекарственных препаратах является важной задачей, однако имеется несколько обстоятельств, затрудняющих анализ данного вещества:

- гетерогенная структура ПС: ПС не является одной молекулой с конкретной формулой, а является смесью, состоящей из более чем 1500 различных типов молекул [9], отличающихся степенью окислирования по разным положениям ядра сорбитана, неоднородностью жирных кислот, наличием примесей (например, ПС-80 содержит только около 60% лауриновой кислоты от общей суммы жирных кислот [10]);
- отсутствие хромофорных групп, что не позволяет проводить прямую детекцию по оптическому поглощению;
- связывание ПС с белком, что влияет на его содержание в растворе и не позволяет проводить количественное извлечение ПС из растворов экстракционными методами.

На данный момент разработано большое количество методик количественного определения ПС. Хроматографические методы включают в себя обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) со спектрофотометрической детекцией, детекцией светорассеянием [11], масс-спектрометрической детекцией [12], детекцией заряженных аэрозолей, рефрактометрической детекцией [13] и детекцией поляризации флуоресценции [14].

Данные методы являются достаточно чувствительными, однако происходит быстрое забивание хроматографической колонки белком, пик ПС имеет большую ширину и может сливаться с пиками других компонентов на хроматограмме. Применяемый метод спектрофотометрической детекции определяет не сам аналит, а примесь, содержащуюся в нем, что дает невозможные результаты при анализе ПС разных серий/производителей. Определение ПС проводится также с помощью газовой хроматографии [15], однако данный метод требует предварительной стадии дериватизации, а также малодоступных реактивов для её осуществления. Имеются работы, в которых ПС определяется колориметрически при помощи реакции полисорбата с йодокрахмальным комплексом [16], однако данный метод имеет низкую чувствительность и плохую повторяемость.

Существует также колориметрический способ определения ПС путем образования комплекса с тиоцианатами кобальта [8], железа [17], молибдена [18] и экстракции образовавшегося комплекса в органическую фазу с дальнейшей детекцией оптической плотности органической фазы. Для данных методов необходимо отсутствие белка в растворе ПС, что обеспечивается жидкостной экстракцией ПС [8] или твердофазной экстракцией [19] с последующим выпариванием раствора ПС в органическом растворителе. Жидкостная экстракция ПС с последующей дериватизацией и колориметрией является очень трудозатратным методом, а также не обеспечивает необходимой точности. Твердофазная экстракция ПС с последующей дериватизацией и колориметрией имеет сильный разброс и нестабильность значений оптической плотности во времени.

В связи с этим стоит задача разработать методику количественного определения ПС, подходящую для быстрого и точного определения ПС.

Целью данной работы являлась разработка и валидация методики количественного определения ПС твердофазной экстракцией с последующей дериватизацией железотиоцианатным реагентом и колориметрическим определением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Исследование проводили, используя спектрофотометр Smart Spec Plus (Bio Rad laboratories, США). Снятие УФ-ВИД-спектров проводили на спектрофотометре Ultrospec 8000 (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания). Взятие навесок осуществляли с помощью аналитических весов «Сартогосм» CE-1502-C (ООО «Сартогосм», Россия). Твердофазную экстракцию проводили, используя систему Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (кат. № 57250-U, SUPELCO, США), картриджи для твердофазной экстракции использовались Supel™-Select HLB SPE Tube (объем – 1 мл, масса сорбента – 30 мг) (кат. № 54181-U, SUPELCO, США). Для упаривания растворов применялся вакуумный концентратор RVC 2-18 HCL (Christ, Германия). Для центрифугирования образцов применялась центрифуга 5417R (Eppendorf, Германия).



Спектрофотометр Ultrospec 8000 GE Healthcare

Приготовление рабочего раствора железотиоцианатного реагента

1,4 г хлорида железа (III) гексагидрата (кат. № 31232, Sigma Aldrich, США) растворяли в 40 мл воды, добавляли 1,6 г тиоцианата аммония (кат. № 31120, Sigma Aldrich, Испания), доводили объем водой до 50 мл. К 9 мл полученного раствора при перемешивании по каплям добавляли 1 мл концентрированной серной кислоты (рабочий раствор). Рабочий раствор использовали свежеприготовленным.

Подготовка испытуемых образцов и калибровочных растворов

Испытуемые образцы разбавляли водой до концентрации ПС 0,01–0,03 мг/мл.

Растворы для калибровки готовили в воде с концентрациями ПС 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2 мг/мл. Твердофазная экстракция для калибровочных растворов не проводилась. 20 мкл калибровочных растворов добавляли в пробирки непосредственно перед стадией дериватизации железотиоцианатным реагентом.

Проведение анализа

В установку для твердофазной экстракции Visiprep™ SPE Vacuum Manifold помещали картриджи для твердофазной экстракции Supel-Select HLB SPE Tube. Проводили кондиционирование картриджей пропуская 1 мл 96% этанола, далее промывали картриджи 1 мл воды, наносили испытуемый образец в количестве 1 мл и пропускали сквозь картридж. Проводили промывку картриджей 1 мл 4 М раствора гидрохлорида гуанидина (кат. № G3272, Sigma Aldrich, США), далее промывали водой 2 раза по 1 мл. В установку под картриджи помещали полипропиленовые пробирки объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой (Sarstedt). Элюировали ПС с картриджей ацетонитрилом 2 раза по 0,7 мл (Panreac, UHPLC Hypergradient). Упаривали ацетонитрил до суха на вакуумном концентраторе (CHRIST RVC2-18HCL). Далее проводили дериватизацию: добавляли 0,5 мл рабочего раствора железотиоцианатного реагента и 0,5 мл хлористого метилена, взбалтывали пробирки, проводили центрифугирование (10000 об/мин, 10 мин). Для калибровки 20 мкл калибровочных растворов помещали в полипропиленовые пробирки и проводили дериватизацию по описанной методике. Далее отбирали органическую фазу и измеряли оптическую плотность при 510 нм. Строили калибровочный график и определяли содержание ПС в образцах средствами Microsoft Office (2010), Microsoft, США.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод определения НП АВ, содержащих оксиэтиленовые звенья, экстракцией комплекса с тиоцианатом кобальта в органическую фазу был предложен изначально как качественная реакция [20], в дальнейшем было показано, что возможно применение данного метода для количественного определения [21]. Однако скоро выяснилось, что определению НП АВ сильно мешают некоторые компоненты пробы, такие как белки и ионные ПАВ [22]. Как следствие, появился метод экстракции ПС органическими растворителями [8] с последующим упариванием органической фазы и проведением дериватизации [23]. Однако данный метод является очень трудоемким, а также не обеспечивает необходимой точности анализа (из-за невозможности количественного извлечения ПС), также при экстракции ПС из белковых растворов часто образуется эмульсия, слабо расслаивающаяся при центрифугировании. Проведение выделения ПС методом твердофазной экстракции [19] значительно упростило анализ

и позволило избежать многих проблем, однако данная методика имеет два недостатка:

- низкий коэффициент экстинкции для комплекса ПС с кобальтотиоцианатным реагентом при длине волны поглощения 620 нм;
- сильный разброс и значительное падение значений оптической плотности с течением времени (рисунок 1).

Выбор реагента для дериватизации

ПС образует окрашенные комплексы с тиоцианатами молибдена, кобальта, железа (III) [17]. При сравнении спектров поглощения данных комплексов (в растворе хлористого метилена) у кобальта наблюдаются максимумы поглощения при $\lambda=320$ нм и $\lambda=620$ нм. Максимум при 320 нм имеет относительно высокий удельный показатель поглощения $A_{1\text{ см}}^{1\%} = 90$, а при 620 нм – $A_{1\text{ см}}^{1\%} = 20$. Детекция при 320 нм нежелательна, так как многие примеси в пробе поглощают в том же диапазоне длин волн. При 620 нм интенсивность поглощения достаточно мала, что негативно влияет на чувствительность метода.

Комплексы молибдена с ПС имеют пики в области 325 и 475 нм. Удельные показатели поглощения для обоих пиков – $A_{1\text{ см}}^{1\%} = 70$.

Комплекс тиоцианата железа (III) имеет максимум поглощения при 510 нм и $A_{1\text{ см}}^{1\%} = 130$ (рисунок 1).

Таким образом, в качестве дериватирующего реагента был выбран тиоцианат железа (III) как наиболее чувствительный реагент и мало подверженный влиянию примесей, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра.

Устранение сильного разброса и падения значений оптической плотности со временем

При дериватизации железотиоцианатным реагентом, как и при дериватизации кобальтотиоцианатным реагентом [17], наблюдались сильный разброс и падение значений оптической плотности с течением времени (рисунок 2), что негативно влияло на количественное определение ПС.

Изначально было предположено, что падение и сильный разброс значений вызваны гетерогенностью системы (присутствием водной эмульсии с дериватирующим агентом в органической фазе). Центрифугирование образцов со скоростями вплоть до 20000 об/мин не дало положительного эффекта.

Было обнаружено, что добавление кислоты позволяет повысить стабильность комплекса, уменьшить разброс значений оптической плотности, а также предотвратить падение значений оптической плотности с

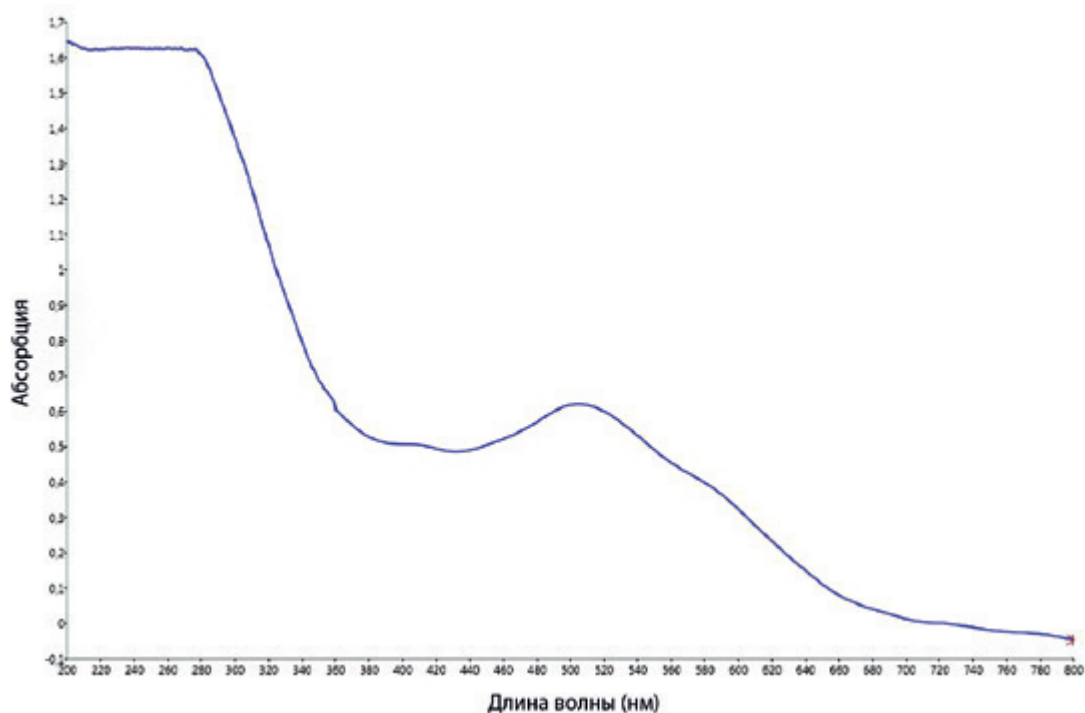


Рисунок 1. Спектр комплекса тиоцианата железа с полисорбатом-80 в хлористом метилене. Концентрация ПС-80 – 1,2 мг/мл. Наблюдается максимум поглощения при 508–510 нм

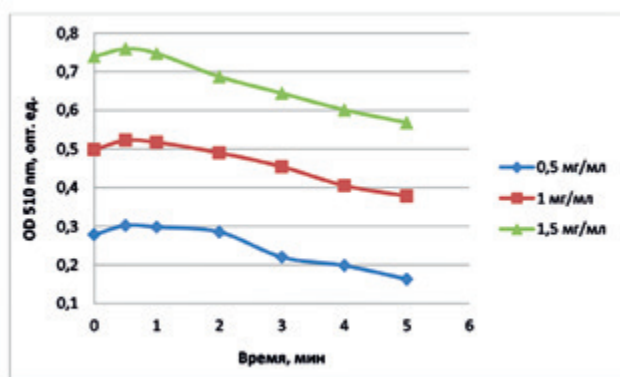


Рисунок 2. График зависимости оптического поглощения комплекса ПС 80 с железо-тиоцианатным реагентом от времени для трех концентраций ПС

течением времени. Наиболее оптимальным являлось добавление концентрированной серной кислоты в количестве 10% от объема дериватирующего агента.

Загрязнение кюветы

Измерение оптической плотности проводили в кварцевых микрокюветах. При этом возникала проблема окраски стенок кюветы комплекса ПС с железо-тиоцианатным реагентом, что приводило к последующему завышению значений оптической плотности. Для очистки кювет после каждого измерения промывали кювету сначала 96% этанолом, потом хлористым метиленом и затем измеряли следующий образец.

Калибровочные кривые для ПС-20 и ПС-80 представлены на рисунке 3.

Экстракция растворов для калибровки

Как было обнаружено, извлечение полисорбата картриджами для твердофазной экстракции проходило почти количественно и поэтому в дальнейшем для уменьшения расхода картриджей калибровку проводили без твердофазной экстракции.

Валидация методики

Валидация методики проводилась для определения ПС-80 по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, устойчивость, предел количественного определения. В качестве раствора белка была взята экспериментальная серия субстанции адалимумаба 0020616 (производство ООО «Фармапарк», Россия, срок годности до 15.06.17) с концентрацией белка 75 мг/мл и концентрацией ПС-80 1,0 мг/мл.

Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов [24]. Определялась путем сравнения оптической плотности матрикса белка (не содержащего ПС-80) с калибровочным раствором, не содержащим ПС-80, и с калибровочным раствором с концентрацией ПС-80 0,3 мг/мл. Оптическая плотность в матриксе составила 0,081; в калибровочном растворе, не содержащем ПС-80, – 0,042, в калибровочном растворе с 0,3 мг/мл ПС-80 – 0,160. Измеренная оптическая плотность в образце матрикса меньше, чем оптическая плотность в калибровочном растворе с концентрацией ПС-80 0,3 мг/мл (минимальная точка калибровки), и не пре-

вышает уровень фона более чем в 3 раза (за фон берется калибровочный раствор, не содержащий ПС-80). Матрикс субстанции не оказывает влияние на анализ, специфичность установлена.

Линейность

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики [24]. Определялась измерением оптической плотности растворов ПС пяти концентраций по 3 повтора каждый (рисунок 3). Квадрат коэффициента линейной регрессии (r^2) равен 0,996, что соответствует требованиям $r^2 \geq 0,99$.

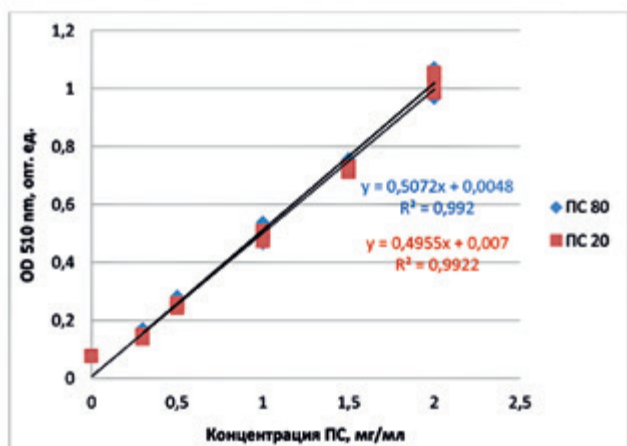


Рисунок 3. График зависимости оптической плотности от концентрации ПС-20 и ПС-80

Правильность

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное [24]. Правильность оценивали определением концентраций ПС-80 в образце субстанции белка, содержащем известные концентрации ПС-80 (таблица 1). Среднее значение степени извлечения составляет 101,2%, что попадает в диапазон 85–115%. Правильность установлена.

Прецизионность

Прецизионность устанавливали по параметрам «повторяемость» и «внутрилабораторная прецизионность».

Повторяемость оценивали, исходя из значений оценки линейности (таблица 2). Относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 10%. Повторяемость установлена.

Внутрилабораторную прецизионность оценивали, проведя 3 аналитические сессии в разные дни, на разном оборудовании и с разным оператором. Результаты представлены в таблице 3. Относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 15%. Внутрилабораторная прецизионность установлена.

Таблица 1.

Оценка правильности методики

Концентрация ПС-80 в образце ($C_{теор}$), мг/мл	Измеренная концентрация ПС-80 в образце, мг/мл	Степень извлечения, %
0,40	0,43	107,5
	0,42	105
	0,40	100
0,80	0,83	103,8
	0,84	105
	0,78	97,5
1,40	1,38	98,6
	1,31	93,6
	1,40	100
Среднее		101,2

Таблица 2.

Оценка повторяемости методики

Концентрация ПС-80 в растворе, мг/мл	0,3	0,5	1	1,5	2
Измерение 1	0,170	0,254	0,516	0,733	1,065
Измерение 2	0,143	0,259	0,468	0,756	0,969
Измерение 3	0,167	0,282	0,537	0,748	1,07
Среднее значение	0,160	0,265	0,507	0,746	1,035
RSD, %	7,55	4,60	5,70	1,28	4,49

Таблица 3.

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики

№ сессии	Значение измеренного содержания ПС-80, мг/мл	Среднее значение измеренного содержания ПС-80, мг/мл
1	0,83	0,82
	0,82	
	0,80	
2	0,84	0,83
	0,83	
	0,81	
3	0,78	0,81
	0,84	
	0,82	
Среднее значение содержания полисорбата-80, мг/мл		0,85
Стандартное отклонение, мг/мл		0,01
RSD, %		1,4

Предел количественного определения

Для оценки предела количественного определения провели измерение стандартного отклонения сигнала для калибровочных растворов, не содержащих ПС-80 (таблица 4). Как видно из графика, предел количественного определения ПС-80 равен 0,059 мг/мл при пересчете на 20 мкл образца белка, использованных для анализа. То есть 0,0012 мг/мл при использовании 1 мл раствора белка для анализа.

Таблица 4.

Определение предела количественного определения методики

Концентрация ПС-80, мг/мл	OD 510 nm, опт. ед.	Стандартное отклонение (σ)
0	0,081	0,003
	0,076	
	0,079	
Угол наклона (b)		0,5072
Предел количественного определения (LOQ=10- σ /b), мг/мл		0,059

Устойчивость

Устойчивость методики оценивали по отношению к изменению свойств ПС-80 у различных производителей и различных серий продукта. Были приготовлены образцы ПС-80 с концентрацией 1 мг/мл и проведена оценка разброса оптических плотностей различных ПС-80 (таблица 5).

Таблица 5.

Оценка устойчивости методики к изменению серий ПС-80

Производитель и lot. ПС-80	Концентрация, мг/мл	OD 510 nm, опт. ед.	RSD, %
Fluka lot. BCB D5524	1	0,507	2,23
Fluka lot. BCBL9041V	1	0,498	
Sigma-Aldrich lot. 59924	1	0,485	

RSD не превышает 10%. Устойчивость по отношению к фактору различия производителей и серий ПС-80 установлена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было показано, что улучшенная и адаптированная нами методика количественного определения ПС-80 с помощью твердофазной экстракции с последующей дериватизацией железотиоцианатным реагентом и колориметрическим определением пригодна для количественного определения ПС-80 в белковых растворах и обеспечивает получение достоверных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

- E.Y. Chi, S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation // *Pharm. Res.* 2003. V. 20(9). P. 1325–1336.
- B.A. Kerwin. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathway // *J. Pharm. Sci.* 2008. V. 97(8). P. 2924–2935.
- M. Agarkhed, C. O'Dell, M.C. Hsieh et al. Effect of Polysorbate 80 Concentration on Thermal and Photostability of a Monoclonal Antibody // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2013. V. 14(1). P. 1–9.
- W. Norde. Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces (Review) // *Cells and Materials.* 1995. V. 5(1). P. 97–112.
- S. Kiese, A. Pappenberger, W. Friess, H.C. Mahler. Shaken, not stirred: mechanical stress testing of an IgG1 antibody // *J. Pharm. Sci.* 2008. V. 97(10). P. 4347–4366.
- L. Kreilgaard, L.S. Jones, T.W. Randolph et al. Effect of tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII // *J. Pharm. Sci.* 1998. V. 87(12). P. 1597–1603.
- L.S. Jones, T.W. Randolph, U. Kohnert. et al. The effects of Tween 20 and sucrose on the stability of anti-L-selectin during lyophilization and reconstitution // *J. Pharm. Sci.* 2001. V. 90(10). P. 1466–1477.
- J.X. Zhou, J. Qiu, G. Jiang et al. Non-specific binding and saturation of Polysorbate-20 with aseptic filter membranes for drug substance and drug product during mAb production // *J. Membrane Sci.* 2008. V. 325(2). P. 735–741.
- T.H. Tani, J.M. Moore, T.W. Patapoff. Single step method for the accurate concentration determination of polysorbate 80 // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 786(1). P. 99–106.
- D. Ilko, A. Braun, O. Germershaus et al. Fatty acid composition analysis in polysorbate 80 with high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detection // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015. V. 94. P. 569–574.
- D. Lee, S. Rumbelow, S.K.R. Williams. Identification and Quantitation of Trace Impurities in Fatty Alcohol Ethoxylates Using HPLC and MALDI-TOF Mass Spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 654(1). P. 59–63.
- S.D. Baker, M. Zhao, P. He et al. Simultaneous analysis of docetaxel and the formulation vehicle polysorbate 80 in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *Anal. Biochem.* 2004. V. 324(2). P. 276–284.
- M. Liu, C. Xie, W. Xu, W. Lu. Separation of polyethylene glycols and their amino-substituted derivatives by high-performance gel filtration chromatography at low ionic strength with refractive index detection // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1046(1-2). P. 121–126.
- M.D. Wenger, A.M. Bowman, M.V. Thorsteinsson et al. An automated homogeneous method for quantifying polysorbate using fluorescence polarization // *Anal. Biochem.* 2005. V. 337(1). P. 48–54.
- Z. Wei, S. Bilbulian, J. Li et al. Universal method for the determination of nonionic surfactant content in the presence of protein // *J. Sep. Sci.* 2015. V. 38(8). P. 1318–1325.
- N.B. Cucakovich. Determination of Tween 80 in tissue culture media, vaccines, and related products // *Anal. Biochem.* 1971. V. 40(1). P. 183–186.
- N. Savjani, E. Babcock, H.K. Khor, A. Raghani. Use of ferric thiocyanate derivatization for quantification of polysorbate 80 in high concentration protein formulations // *Talanta.* 2014. V. 130. P. 542–546.
- H. Yang, B.W. Glickman, G. de Boer Johan. Sex-specific induction of mutations by PhIP in the kidney of male and female rats and its modulation by conjugated linoleic acid // *Environ. Mol. Mutagen.* 2002. V. 40(2). P. 116–121.
- J. Kim, J. Qiu. Quantitation of low concentrations of polysorbates in high protein concentration formulations by solid phase extraction and cobalt-thiocyanate derivatization // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 806. P. 144–151.
- J.A. Van der Hoeve. Analysis of textile auxiliary products // *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.* 1948. V. 67(8), P. 649–664.
- Analytical Methods Committee. Examination of detergent preparations. *Analyst.* 1951. V. 76. P. 279–286.
- U. Zoller, R. Romano. Determination of nonionic detergents in municipal wastewater // *Environ. Int.* 1983. V. 9(1). P. 55–61.
- E.G. Brown, T.J. Hayes. The absorptiometric determination of polyethyleneglycol mono-oleate // *Analyst.* V. 80(955). P. 755–767.
- ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея РФ. XIII изд. Т. 1. – М., 2015.