

# АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПЛАНИРОВАНИЯ ДИЗАЙНА ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ПРЕПАРАТОВ АЛЕНДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

А.Н. Васильев<sup>1</sup>, В.В. Писарев<sup>2</sup>, М.М. Уляшова<sup>2</sup>, А.С. Насонов<sup>1</sup>, Т.А. Посредникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
Vasilev@expmed.ru

**Резюме:** Ранее в исследованиях препаратов алендроновой кислоты для оценки биоэквивалентности использовались данные концентраций алендроната в моче, поскольку из-за низких концентраций алендроната в крови после однократного приема препаратов на тот момент была невозможна точная оценка профиля «концентрация в плазме крови в зависимости от времени». В статье представлен разработанный высокочувствительный и высокоселективный метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием для определения алендроната в плазме крови человека, позволивший впервые в России успешно провести исследование биоэквивалентности первого отечественного генерического препарата алендроновой кислоты с использованием в качестве матрицы плазмы крови. Предел количественного определения разработанного метода порядка 0,1 нг/мл обеспечивает точное и достоверное определение в плазме крови добровольцев концентраций алендроната, необходимых для оценки фармакокинетических профилей сравниваемых препаратов алендроновой кислоты после приема их в дозе 70 мг натощак.

**Ключевые слова:** остеопороз, алендроновая кислота, биоэквивалентность, моча, плазма.

## CURRENT ASPECTS OF PLANNING BIOEQUIVALENCE STUDIES DESIGN FOR ALENDRONIC ACID PREPARATIONS

A.N. Vasiliev<sup>1</sup>, V.V. Pisarev<sup>2</sup>, M.M. Ulyashova<sup>2</sup>, A.S. Nasonov<sup>1</sup>, T.A. Posrednikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow

**Abstract:** Alendronate concentrations in urine used to be included in alendronic acid studies for bioequivalence assessment, as long as due to low concentrations of alendronate in the blood after single dose administration it was impossible at the time to assess the exact profile «plasma concentration against the time». The present article describes the developed highly sensitive and highly selective HPLC method with mass spectrometric detection for alendronate identification and assay in human plasma, which allowed to successfully conduct the first domestic alendronate generic drug bioequivalence study for the first time in Russia, using blood plasma as a template. The assay limit for the developed method is about 0.1 ng/ml, which provides precise and reliable alendronate plasma concentrations measurements in volunteers, necessary to evaluate the pharmacokinetic profiles of the compared alendronic acid preparations after administration of 70 mg fastin.

**Key words:** osteoporosis, alendronic acid, bioequivalence, urine, plasma.

Бисфосфонаты широко используются в медицинской практике для профилактики и лечения постменопаузального остеопороза у женщин, тяжелого остеопороза у мужчин и остеопороза, вызванного глюкокортикостероидными препаратами у мужчин и женщин.

Бисфосфонаты представляют собой синтетические аналоги пирофосфатов костного матрикса, устойчивые к действию гидролитических ферментов желудочно-кишечного тракта, и отличаются от них тем, что центральный атом кислорода заменен атомом углерода (P—C—P- вместо P—O—P-связи). В структуру бисфосфонатов входят две боковые цепи, одна из которых содержит ОН-группу, увеличивающую физико-химическое связывание бисфосфонатов с гидроксипатитом кости, а другая определяет биологическое действие данных препаратов на костные клетки [1].

Основным фармакологическим эффектом бисфосфонатов является снижение костного ремоделирования

с более выраженным угнетением костной резорбции, чем костеобразования, а также снижение частоты активации ремоделирования. С одной стороны, за счет этого прочного связывания с минеральным веществом кости бисфосфонаты препятствуют разрушению кристаллов гидроксипатита, придающих прочность кости. Другой аспект действия бисфосфонатов связан с подавлением активности остеокластов — клеток, вызывающих резорбцию костной ткани [2, 3]. Кроме того, бисфосфонаты способствуют увеличению количества остеобластов в губчатой и кортикальной кости, а также снижению секреции остеобластами остеокласт-стимулирующего фактора [4]. Все это способствует восстановлению объема костной ткани, повышению ее прочности и приводит к снижению риска переломов.

Применение данной группы препаратов началось с использования бисфосфонатов I поколения — клодронат, этидронат. В конце 80-х годов стали

применять бисфосфонаты нового поколения, содержащие один атом азота в своей химической структуре, такие, как памидронат, алендронат, ибандронат. Эти азотсодержащие бисфосфонаты оказались более активными ингибиторами костной резорбции, в сравнении с бисфосфонатами первого поколения. Это обусловлено особенностью метаболизма препаратов. В случае не содержащих аминогруппу препаратов после захвата остеокластами происходит их включение в молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) за счет реакции, осуществляющейся при участии фермента аминоксил-трансферРНК-синтетазы. Внутриклеточное накопление этих негидролизующихся аналогов АТФ оказывает цитотоксическое действие на остеокласты, т.к. они ингибируют ряд АТФ-зависимых биохимических реакций в клетке, что ведет к апоптозу остеокластов. Аминобисфосфонаты имеют принципиально иной механизм действия: проникая в остеобласты, они связываются с ферментом фарнезилпирофосфат синтетазой и подавляют его активность. Данный фермент играет ключевую регулируемую роль в каскаде мевалоновой кислоты, конечным продуктом которого является биосинтез холестерина, а также других стеролов и липидов изопреноидного ряда. Торможение активности фарнезилпирофосфат синтетазы под влиянием аминобисфосфонатов ведет к нарушению посттрансляционной модификации белков, играющих центральную роль в основных функциях остеокластов, тем самым приводя их к апоптозу [5].

### ФАРМАКОКИНЕТИКА И ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА АЛЕНДРОНАТА

Одним из наиболее эффективных, широко и длительно применяющихся для лечения остеопороза аминобисфосфонатов является алендроновая кислота (алендронат). Он был разработан компанией «МеркШарп и Доум» (США) и внедрен в клиническую практику в 1993 году под торговым названием Фосамакс.

Абсорбция алендроната в желудочно-кишечном тракте составляет 25%. В доклинических исследованиях на крысах было показано, что адсорбция препарата происходит преимущественно в верхних отделах тонкого кишечника [6].

Как и все другие бисфосфонаты, алендронат характеризуется низкой биодоступностью как у животных, так и человека. При приеме внутрь натощак в диапазоне доз от 5 до 70 мг непосредственно за 2 ч до завтрака биодоступность алендроновой кислоты составляет около 0,7%. Низкая биодоступность бисфосфонатов объясняется очень высокой гидрофильностью их молекул, что препятствует их прохождению через эпителиальный барьер [2, 7].

В доклинических исследованиях на крысах было показано, что адсорбция алендроната при приеме внутрь натощак в 4–5 раз выше, чем после приема

пищи [6]. Влияние пищи на биодоступность алендроната была показана и у здоровых добровольцев [2]. В исследовании у 49 женщин в постменопаузе было показано, что при приеме 10 мг алендроната биодоступность снижается примерно на 40%, если препарат принимали за 0,5–1 ч до завтрака (по сравнению со значениями биодоступности за 2 ч до еды). Одновременный прием алендроната с кофе или с апельсиновым соком приводит к снижению биодоступности примерно на 60%. Прием препарата через 2 ч после еды на биодоступность не влияет [8].

Как было показано в доклинических исследованиях на самцах крыс, после в/в введения в дозе 1 мг/кг алендронат распределяется в мягкие ткани, затем быстро перераспределяется в костную ткань, где происходит его фиксация, либо он выводится с мочой [9]. Концентрация алендроната в плазме крови после однократного приема препарата внутрь в дозе 70 мг достигается через 0,5–2 ч и составляет около 30 нг/мл [10, 11]. У человека объем распределения в равновесном состоянии составляет 28 л.

Алендронат при физиологических рН (7.4) находится в полностью ионизированном состоянии, поэтому он хорошо связывается с белками плазмы крови, связывание составляет около 78%. Основным белком, связывающим алендронат, является сывороточный альбумин.

Алендронат не подвергается в организме человека и животных метаболизму и обнаруживается в моче в неизменном виде. Процесс выведения характеризуется быстрым снижением концентрации алендроновой кислоты в плазме крови (период полувыведения 1–2 ч) и крайне медленным высвобождением из костей. Поступивший в костную ткань препарат прочно связывается с гидроксипатитом, что определяет его длительное, в течение нескольких лет нахождение в скелете (конечный  $T_{1/2}$  превышает 3 года у собак [12] и 10 лет у человека [3, 7]).

### БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТЬ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ АЛЕНДРОНАТА

Появление на фармацевтическом рынке многих стран мира, в том числе и Российской Федерации, дженериков (воспроизведенных лекарственных препаратов) алендроната обусловлено несколькими причинами. Во-первых, алендронат является наиболее изученным препаратом для лечения первичного остеопороза у женщин и мужчин, а также вторичного глюкокортикоид-индуцированного остеопороза [13, 14]. Во-вторых, он хорошо переносится пациентами, даже при длительном применении [15]. В-третьих, в 2008 г. истек срок действия патента на оригинальный алендронат (Фосамакс) у фирмы-разработчика. Поэтому в настоящий момент актуальным является оценка качества воспроизведенных препаратов алендроната.

При проведении медико-биологического контроля воспроизведенных лекарственных препаратов основным критерием качества, принятым во всем мире, является их биоэквивалентность оригинальным препаратам. Биоэквивалентность, или фармакокинетическая эквивалентность, определяется как идентичность двух фармацевтически эквивалентных лекарственных средств по основным фармакокинетическим параметрам — максимальной концентрации лекарственного вещества в плазме или сыворотке крови ( $C_{max}$ ) и площади под фармакокинетической кривой «концентрация—время» (AUC), определяющей биодоступность препарата.

Однако особенности структуры и фармакокинетики алендроната затрудняют определение вещества в биологических жидкостях, особенно в плазме крови. Алендронат, как и все другие бисфосфонаты, чрезвычайно гидрофилен и структурно похож на многие эндогенные фосфорилированные соединения, что делает его селективное извлечение из сыворотки крови очень сложным. Из-за низкой биодоступности препарата, его концентрация в кровотоке очень низкая и после однократного приема в дозе 70 мг не превышает 30 нг/мл. Кроме того, есть и ряд аналитических трудностей. Алендронат является сильно полярным соединением, которое не очень хорошо удерживается на колонках для обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [16]. Алендронат не является летучим соединением, что делает невозможным его определение с использованием газовой хроматографии. Также в его структуре нет сильных хромофоров для высокочувствительного определения с использованием ультрафиолетовой (УФ) или флуоресцентной детекции. Методы ион-парной хроматографии и ионообменной хроматографии были разработаны только для прямого количественного алендроната в фармацевтических препаратах [17-18] и не могут быть использованы для биологических образцов в связи с низкой чувствительностью. Кроме того, молекулы алендроната могут связываться с некоторыми ионами металлов с образованием аддуктов и многократно заряженных комплексов, которые препятствуют определению алендроната с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Согласно рекомендациям Европейского агентства лекарственных средств (EMA) «Guideline on the investigation of bioequivalence» (2010), в качестве замены плазменной концентрации возможно использование данных об экскреции с мочой: при этом в качестве критериев биоэквивалентности применяются показатель  $A_e$  (общая экскреция вещества с мочой) и максимальная скорость выведения ( $R_{max}$ ), однако эта замена должна быть обоснованной. Ранее в исследованиях препаратов алендроната [19] для оценки биоэквивалентности использовались именно данные

концентраций алендроната в моче, поскольку из-за низких концентраций алендроната в крови после однократного приема препаратов на тот момент была невозможна точная оценка профиля «концентрация в плазме/крови — время». Для определения алендроната в моче были разработаны ряд методов ВЭЖХ с УФ или флуоресцентной детекцией. Предварительная дериватизация молекул аналита ортофталевым альдегидом [20], нафталин-2,3-дикарбоксиальдегидом [21] или 9-флуоренилметилхлороформиадом [19, 22] позволили определять алендронат в моче с пределом обнаружения 3–5 нг/мл.

Однако использование параметров выведения препарата с мочой для оценки биоэквивалентности не всегда надежно и имеет ряд недостатков по сравнению с классикой по плазме:

- высокая степень изменчивости, связанная с кумулятивным содержанием выделяемого вещества с мочой, что приводит к необходимости участия в сравнительном исследовании биоэквивалентности большого количества здоровых добровольцев;
- данные по экскреции вещества с мочой нужно собирать как минимум +5 периодов полувыведения, для того чтобы собрать как минимум 97% вещества от введенной однократной дозы;
- данные по моче будут валидными только в том случае, если выделение вещества почками напрямую зависит от его биодоступности.

На сегодняшний день удалось разработать несколько высокочувствительных методов ВЭЖХ для определения алендроната в плазме крови человека. В 2006 г. Yun с соавт. [23], а позже и Ванс соавт. [24] разработали методы ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием, позволяющие определять алендронат в плазме крови человека с пределом обнаружения 1–2 нг/мл. Данные методы успешно использовались для определения фармакокинетических параметров алендроната в плазме крови и оценки биоэквивалентности после перорального приема препаратов в дозе 70 мг. К сожалению, эти методы включают в себя сложные и трудоемкие процедуры подготовки для удаления избытка реагентов для дериватизации или побочных продуктов и имеют низкую селективность.

Tamim с соавт. [25] разработали высокочувствительный и высокоселективный метод ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС) для определения алендроната в плазме крови человека с пределом обнаружения 50,0 пг/мл. Однако никаких подробностей метода в литературе не приводится. Lu с соавт. [26] разработали метод ВЭЖХ-МС для определения алендроната в плазме крови крыс с предварительной дериватизацией аналита триметилсилилдиазетаном. При этом линейный диапазон калибровочной кривой составил только 0,500–100 мкг/мл, что не при-

менимо для определения концентраций алендроната в плазме крови человека для фармакокинетических исследований.

В данной статье мы представляем высокочувствительный метод ВЭЖХ-МС с предварительной твердофазной экстракцией и дериватизацией алендроната в плазме крови человека с пределом обнаружения 0,1 нг/мл. Подробная методика и ее валидационные характеристики представлены ниже.

### МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЕНДРОНАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

#### Твердофазная экстракция алендроната из образцов плазмы крови и последующая дериватизация

Для выделения алендроната из плазмы крови использовали анионообменные картриджи для твердофазной экстракции AccuBondSAX, 100 мг, 1 мл (США). Картридж предварительно промывали 1 мл метанола и 2 мл воды. 1 мл плазмы перемешивали на вихревой мешалке vortex, центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин и супернатант переносили в картридж. Картридж промывали 1 мл воды и 1 мл метанола, затем наносили на картридж 0,5 мл раствора диазометана в диэтиловом эфире и выдерживали в течение 2 минут. Элюцию проводили 1 мл метанола. Полученный элюат упаривали досуха под вакуумом при 60 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл раствора ацетонитрил—вода (50:50) и 50 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

#### Хроматографический анализ

Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1100» (США) с масс-спектрометрическим детектором (электроспрей). Колонка Luna C18 (2), 5 мкм, 4,6 × 150 мм (США). Температура разделения 400 °С. Скорость потока 0,7 мл/мин. Объем пробы 50 мкл. Подвижная фаза: смесь А и В в соотношении 20% : 80%, где А — ацетонитрил-0,1 М ацетат аммония (90 : 10), В — 0,01 М ацетат аммония. Детектирование проводилось по протонированному молекулярному иону гептаметилпроизводного алендроновой кислоты с  $m/z$  348,1. Фрагментор 30 В, напряжение капилляра 3500 В, температура азота 3500 °С, скорость газа 10,0 л/мин, давление небулайзера 35 psig.

Использовалось автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения Chemstation фирмы «Agilent». Типичные хроматограммы бланковой плазмы крови и плазмы, содержащей алендронат, приводятся на рисунках 1–2.

#### Количественное определение алендроната

Количественное определение алендроната в образце проводили методом абсолютной калибровки с

использованием программного обеспечения фирмы «Agilent».

Калибровочную кривую получали в результате анализа следующих калибровочных стандартов: 0,10; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 10,00; 25,00 и 50,00 нг/мл. Калибровочные стандарты были приготовлены путем добавки 100 мкл рабочего раствора, содержащего известное количество стандарта алендроната натрия, к 900 мкл бланковой плазмы, не содержащей аналит, до общего объема 1,00 мл. Пробоподготовка и последующая дериватизация калибровочных стандартов проводилась по методике, описанной выше.

Калибровочная зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 0,10–50,00 нг/мл. График описывался линейным уравнением  $Y = mx + b$ , где  $m = 6,09 \times 10^4$ ,  $b = 1,01 \times 10^3$ , коэффициент корреляции составил 0,99991 (Рис. 3).

#### Аналитические характеристики метода

Воспроизводимость, точность и достоверность результатов анализа количественного определения алендроната в плазме крови человека достигались в диапазоне концентраций 0,10–50,00 нг/мл. Предел обнаружения методики составил 0,10 нг/мл. Степень извлечения алендроната из плазмы крови человека составила  $90,6 \pm 3,88$  %.

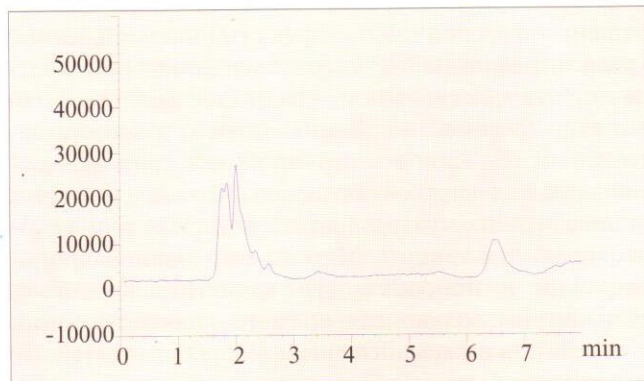


Рис. 1. Типичная хроматограмма бланковой плазмы крови

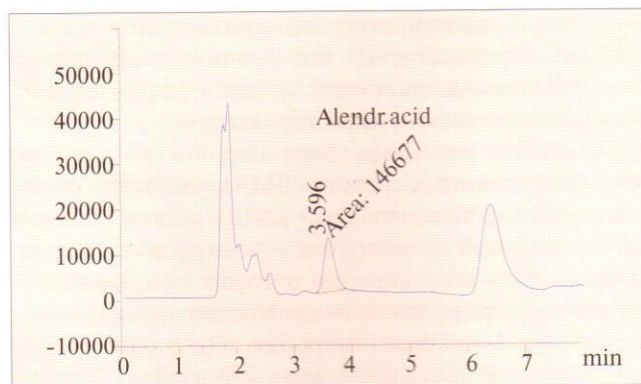


Рис. 2. Хроматограмма плазмы крови, содержащей 4,30 нг/мл алендроната

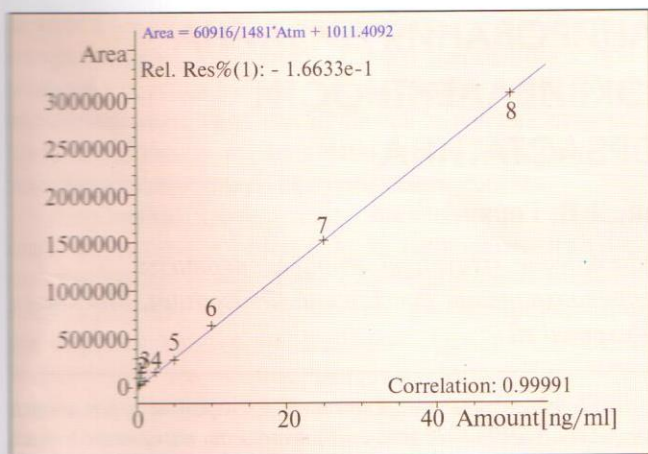


Рис. 3. График калибровочной кривой

## ВЫВОДЫ

В статье представлен высокочувствительный и высокоселективный метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием для определения алендроната в плазме крови человека, позволивший впервые в России успешно провести исследование биоэквивалентности первого отечественного воспроизведенного препарата алендроновой кислоты с использованием в качестве матрицы плазму крови. Предел количественного определения метода 0,10 нг/мл обеспечивает точное и достоверное определение в плазме крови добровольцев концентраций алендроната, необходимых для оценки фармакокинетических профилей сравниваемых препаратов алендроновой кислоты после приема их в дозе 70 мг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шварц Г.Я. Фармакотерапия остеопороза. М.: Медицинское информационное агентство. 2002.
2. Lin J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties // Bone. 1996. № 18(2). P. 75–85.
3. Gertz B.J., Holland S.D., Kline W.F., Matuszewski B.K., Porras A.G. Clinical pharmacology of alendronate sodium // Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 1993. № 3. Suppl 3. P. 13–16.
4. Hughes D.E., Wright K.R., Uy H.L., Sasaki A., Yoneda T., Roodman G.D., Mundy G.R., Boyce B.F. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo // Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 1995. № 10. P. 1478–1487.
5. Drake M.T., Clarke B.L., Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice // Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic. 2008. № 83(9). P. 1032–1045.
6. Lin J.H., Chen I.W., de Luna F.A. On the absorption of alendronate in rats // Journal of pharmaceutical sciences. 1994. № 83(12). P. 1741–1746.
7. Fosamax 10 and 70 mg tablets – Summary of Product Characteristics. Merck, Sharp & Dohme. UK. Jan 2007.
8. Gertz B.J., Holland S.D., Kline W.F., Matuszewski B.K., Freeman A., Quan H., Lasseter K.C., Mucklow J.C., Porras A.G. Studies of the oral bioavailability of alendronate // Clinical pharmacology and therapeutics. 1995. № 58(3). P. 288–298.
9. Lin J.H., Chen I.W., Duggan D.E. Effects of dose, sex and age on the disposition of alendronate, a potent antiosteolytic bisphosphonate, in rats // Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 1992. № 20(4). P. 473–478.
10. Rhim S.Y., Park J.H., Park Y.S., Lee M.H., Kim D.S., Shaw L.M., Yang S.C., Kang J.S. Bioavailability and bioequivalence of two oral formulations of alendronate sodium 70 mg: an open-label, randomized, two-period crossover comparison in healthy Korean adult male volunteers // Clinical therapeutics. 2009. № 31(5). P. 1037–1045.
11. Yun M.H., Woo J.S., Kwon K.I. Bioequivalence and pharmacokinetics of 70 mg alendronate sodium tablets by measuring alendronate in plasma // Archives of pharmacological research. 2006. № 29(4). P. 328–332.
12. Lin J.H., Duggan D.E., Chen I.W., Ellsworth R.L. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals // Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 1991. № 19(5). P. 926–932.
13. Pols H.A., Felsenberg D., Hanley D.A., Stephan J., Munoz-Torres M., Wilkin T.J., Qin-sheng G., Galich A.M., Vandormael K., Yates A.J. et al. Multinational, placebo-controlled, randomized trial of the effects of alendronate on bone density and fracture risk in postmenopausal women with low bone mass: results of the FOSIT study. Fosamax International Trial Study Group // Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 1999. № 9(5). P. 461–468.
14. Торопцова Н.В., Никитинская О.А., Дёмин Н.В., Беневоленская Л.И. Результаты изучения эффективности еженедельного приема алендроната (Фосамакс®) у больных первичным остеопорозом // Остеопороз и остеопатии. 2006. № 1. С. 22–25.
15. Лялина В.В., Дмитриева Е.Г., Корвяков Е.Л. Изучение переносимости алендроната 70 мг (Фосамакс 70 мг один раз в неделю) и причин отмены лечения у больных постменопаузальным остеопорозом в условиях реальной клинической практики // Остеопороз и остеопатии. 2007. № 3(3). С. 31–35.
16. Zacharis C.K., Tzanavaras P.D. Determination of bisphosphonate active pharmaceutical ingredients in pharmaceuticals and biological material: a review of analytical methods // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2008. № 48(3). С. 483–496.
17. Tsai E.W., Ip D.P., Brooks M.A. Determination of alendronate in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with conductivity detection // Journal of chromatography. 1992. № 596(2). P. 217–224.
18. Xie Z., Jiang Y., Zhang D.Q. Simple analysis of four bisphosphonates simultaneously by reverse phase liquid chromatography using n-amylamine as volatile ion-pairing agent. // Journal of chromatography. 2006. № 1104(1-2). P. 173–178.
19. Apostolou C., Dotsikas Y., Kousoulos C., Tsatsou G., Colocouri F., Soumelas G.S., Loukas Y.L. Application of a semi-automated 96-well format solid-phase extraction, column-switching, fluorescence detection protocol for the determination of alendronate in human urine samples obtained from a bioequivalence study // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2007. № 43(3). P. 1151–1155.
20. Al Deeb S.K., Hamdan I.I., Al Najjar S.M. Spectroscopic and HPLC methods for the determination of alendronate in tablets and urine // Talanta. 2004. № 64(3). P. 695–702.
21. Kline W.F., Matuszewski B.K. Improved determination of the bisphosphonate alendronate in human plasma and urine by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection // Journal of chromatography. 1992. № 583(2). P. 183–193.
22. Ptacek P., Klima J., Macek J. Determination of alendronate in human urine as 9-fluorenylmethyl derivative by high-performance liquid chromatography // Journal of chromatography B. Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2002. № 767(1). P. 111–116.
23. Yun M.H., Kwon K.I. High-performance liquid chromatography method for determining alendronate sodium in human plasma by detecting fluorescence: application to a pharmacokinetic study in humans // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2006. № 40(1). P. 168–172.
24. Ban E., Park J.Y., Kim H.T., Kim C.K. Determination of alendronate in low volumes of plasma by column-switching high-performance liquid chromatography method and its application to pharmacokinetic studies in human plasma // Archives of pharmaceutical research. 2011. № 34(12). P. 2079–2086.
25. Tamim M.K., Gagne J-F., Nadeau F., Tanguay M., Trabelsi F., Vallee M. Quantitative determination of alendronate sodium in human plasma using a validated LC-MS/MS method: application to clinical pharmacokinetic studies. www.aapsj.org/abstracts/AM\_2010/M1500.pdf
26. Lu Z., Diehl D., Mazzeo J., Oehrle S.A., Mallet C.R., Young M.S., Chambers E. Methods for separating and analyzing anionic compounds. Patent Application Publication US 2008/0169242 A1. http://www.freshpatents.com/Methods-for-separating-and-analyzing-anionic-compounds-dt20080717-ptan20080169242.php